



УДК 547.854:535.347

ИССЛЕДОВАНИЕ СПЕКТРОВ КРУГОВОГО ДИХРОИЗМА 5-ЗАМЕЩЕННЫХ 2'-ДЕЗОКСИУРИДИНОВ

Володин Ю. Ю., Кикоть В. С., Преображенская М. Н.

Всероссийский онкологический научный центр
Академии медицинских наук СССР, Москва

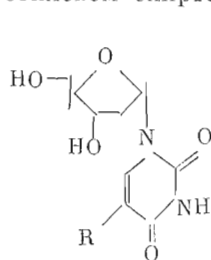
Изучены УФ- и КД-спектры аномерных пар 5-замещенных 2'-дезоксинуридинов в воде и этаноле. Показано, что при переходе от воды к этанолу амплитуда эффекта Коттона B_{2u} -перехода для β -аномеров увеличивается, а для α -аномеров уменьшается. Наблюдается противоположная зависимость во влиянии заместителя в положении 5 урацильного кольца на величину эффекта Коттона и чувствительность спектров КД к изменению растворителя: для нуклеозидов с фторалкильными заместителями эффект Коттона больше, а чувствительность меньше, чем для нуклеозидов с алкильными заместителями. Найденные эффекты объясняются смещением конформационного равновесия между *анти*- и *син*-формами.

В настоящей работе проведено сравнительное исследование влияния заместителя в положении 5 ядра урацила на спектры КД α - и β -аномеров 5-замещенных 2'-дезоксинуридинов в различных растворителях.

В спектрах КД уридина и его производных наблюдаются четыре полосы поглощения, соответствующие переходам E_{1ub} (~200 нм), E_{1ua} (~220 нм), B_{1u} (~240 нм), B_{2u} (260–270 нм).

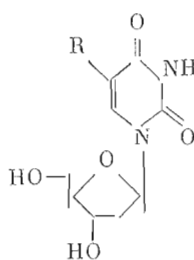
Ранее в работах Майлса с сотр. [1, 2] с помощью спектроскопии КД была изучена конформационная ситуация в растворах природных пиримидиновых нуклеозидов и большого числа их аналогов. Авторами была показана возможность оценки равновесия между *син*- и *анти*-формами по силе вращения B_{2u} -перехода ($\lambda_{max} \approx 270$ нм) в псевдоароматической электронной структуре азотистого основания.

Нами изучены УФ- и КД-спектры α - и β -аномеров 5-замещенных 2'-дезоксинуридинов (I)–(XII), 2,2'-ангидро-1-(1- α -D-рибофуранозил) урацила (XIII) и 2,2'-ангидро-1-(1- α -D-рибофуранозил) тимина (XIV) в воде и этиловом спирте.



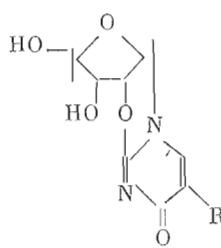
(I- α) — (XII- α)

- (I) R=H
- (II) R=CH₃
- (III) R=(CH₃)₂CHCH₂
- (IV) R=CH₃CH₂CHCH₃
- (V) R=(CH₃)₂CHCH(OC₂H₅)
- (VI) R=I



(I- β) — (XII- β)

- (VII) R=Br
- (VIII) R=F
- (IX) R=CF₃CH₂OCH₂
- (X) R=CF₃CHFCH₂
- (XI) R=(CF₃)₂C(OH)
- (XII) R=(CF₃)₂CF



(XIII) R=H
(XIV) R=CH₃

Из полученных данных видно, что спектры КД в водных и спиртовых растворах в отличие от УФ-спектров заметно зависят от характера заместителя в положении 5 урацильного кольца (см. таблицу).

β -Аномеры производных (I)–(XII), содержащие заместители в положении 5, можно расположить в следующий ряд по увеличению эффекта

Данные УФ- и КД-спектров α - и β -аномеров 5-замещенных 2'-дезоксигуанидинов (I) — (XII), а также ангидроуклеозидов (XIII), (XIV)

Нуклео- зид	Растворитель		$\lambda_{\text{макс}}$, нм		$\epsilon_{\text{макс}}$, л·моль ⁻¹ ·см ⁻¹		$\lambda_{\text{экстр}}$, нм		$[\theta]_{\text{экстр}}$, мград·см·моль ⁻¹		$R_{B_{2U}}^* \cdot 10^{40}$, Био		S	
			α	β	α	β	α	β	α	β	α	β	α	β
(I)	H ₂ O		262	262	8900	10200	264	267	-11100	+6800	-7,7	+4,1	-0,14	+0,88
(II)	EtOH		260	262	8900	10200	266	268	-11400	+12400	-6,6	+7,7	-0,25	+2,00
(III)	H ₂ O		267	267	9700	9600	267	270	-8000	+3400	-6,0	+2,1		
(IV)	EtOH		265	265	9700	9600	270	270	-7400	+9600	-4,5	+6,3		
(V)	H ₂ O		271	270	9400	9400	270	272	-7800	+4200	-5,6	+2,9		
(VI)	EtOH		268	268	9600	10100	271	273	-6800	+9400	-4,3	+5,5	-0,23	+0,90
(VII)	H ₂ O		270	270	9600	9500	270	270	-6800	+5400	-5,0	+3,7	-0,24	+0,46
(VIII)	EtOH		267	267	9800	9800	274	272	-6000	+8900	-3,8	+5,4		
(IX)	H ₂ O		271	270	8800	7800	270	273	-4600	+4200	-2,5	+2,8	0,00	+0,46
(X)	EtOH		271	270	9000	8800	272	274	-6800	+6800	-2,5	+4,1		
(XI)	H ₂ O		288	287	7500	7600	271	271	-3900	+1800	-2,9	+1,3	-0,34	+1,15
(XII)	EtOH		282	283	7800	8000	275	278	-3000	+3800	-1,9	+2,8		
(XIII)	H ₂ O		280	279	9200	9000	276	280	-5900	+3000	-5,0	+2,4	-0,20	+0,67
(XIV)	EtOH		279	279	9000	9100	278	281	-5200	+5800	-4,0	+4,0		
(XV)	H ₂ O		268	268	8800	8800	270	270	+6100	+10600		+4,4		+0,61
(XVI)	EtOH		269	269	10100	10500	266	268	-9200	+6600	-6,2	+7,1	-0,18	+0,41
(XVII)	H ₂ O		263	263	9800	10500	268	269	-7900	+9200	-5,1	+5,5		
(XVIII)	EtOH		264	264	9900	10000	267	269	-9900	+5900	-7,0	+3,7	-0,20	+0,76
(XIX)	H ₂ O		265	265	9900	10000	269	270	-8600	+10900	-5,6	+6,5		
(XX)	EtOH		264	264	9600	9300	269	269	-12400	+7400	-8,6	+4,9	+0,01	+0,19
(XXI)	H ₂ O		267	267	9300	9200	266	269	-13000	+9500	-8,7	+5,8		
(XXII)	EtOH		268	268	9200	9200	269	272	-11000	+8400	-7,4	+5,2	-0,22	+0,02
(XXIII)	H ₂ O		264	264	9700	9800	264	267	-9400	+9700				
(XXIV)	EtOH		264	264	9500	9700	268	271	-11600					
(XXV)	H ₂ O		248	248	8300	8300	242	242	-12900					
(XXVI)	EtOH		253	253	8500	8500	244	244	-9500					
(XXVII)	H ₂ O		251	251	8500	8500	245	245	-11700					

* Вращательная сила B_{2U} -перехода рассчитана по формуле $B_{2U} = 1,23 \cdot 10^{-42} [\theta]_{\text{экстр}} \Delta \lambda_{\text{экстр}}$, где $[\theta]_{\text{экстр}}$ — молярная эллиптичность в экстремуме кривой КД, $\lambda_{\text{экстр}}$ — длина волны экстремума, Δ — полуширина при $[\theta] = [\theta]_{\text{экстр}}/e$.
 ** Отнесение этого перехода к B_{2U} является спорным.

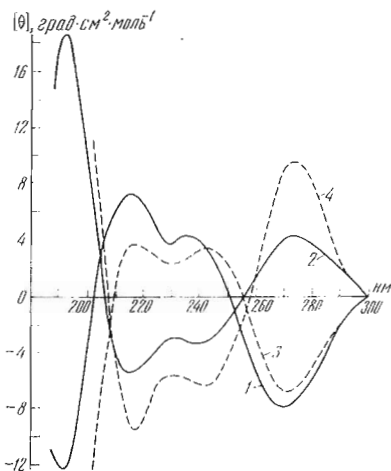


Рис. 1

Рис. 1. КД-спектры α - (1, 3) и β - (2, 4) аномеров 5-изобутил-2'-дезоксипуридина (III) в воде (1, 2) и этаноле (3, 4)

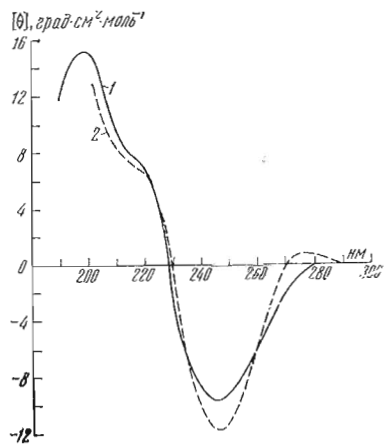


Рис. 2

Рис. 2. КД-спектры ангидропуклеозида (XIV) в воде (1) и этаноле (2)

Коттона:

в воде: (VI) < (II) < (VII) < (V) < (III) < (IV) \approx (X) < (IX) < (I) < (XI) < (XII);

в этаноле: (VI) < (VII) < (V) < (XII) < (IV) < (III) \approx (IX) < (XI) < (II) < (X) < (VIII) < (I).

Для α -аномеров производных (I)–(XII) наблюдается следующая зависимость:

в воде: (V) < (VI) < (IV) \approx (VII) < (III) < (II) < (IX) < (X) < (XII) < (I) < (XI);

в этаноле: (VI) < (V) < (IV) < (VII) < (III) < (II) < (IX) < (X) < (XII) < (I) < (XI).

Видно, что во всех случаях электроноакцепторные фторсодержащие заместители, как правило, обуславливают большую величину эффекта Коттона. Для метила не обнаруживается явной закономерности.

При изучении влияния растворителя на спектры КД нами обнаружено закономерное увеличение эффекта Коттона при переходе от воды к спирту для β -аномеров и его уменьшение для α -аномеров (рис. 1). Подобное явление в литературе ранее не обсуждалось, хотя опубликованы данные по спектрам КД производных некоторых природных β -нуклеозидов в различных растворителях [3–6].

Известно, что для того, чтобы учесть влияние оптических свойств растворителя на спектр КД, следует пользоваться величиной приведенной эллиптичности или соответственно силы вращения [7].

$$R^* = F_1 R \text{ или } R^* = F_2 R,$$

где

$$F_1 = \frac{3}{n^2 + 2}; \quad F_2 = \frac{9n}{(n^2 + 2)^2},$$

n — показатель преломления растворителя при длине волны, равной $\lambda_{\text{экстр}}$ в КД-спектре соответствующего производного. В нашем случае для воды $n_{270}^{20} = 1,37026$; для этанола $n_{270}^{18} = 1,39942$ [8]. Таким образом, в воде $F_1 = 0,77$, а $F_2 = 0,82$; соответственно в этаноле $F_1 = 0,76$ и $F_2 = 0,80$.

Очевидно, что факторы пересчета F_1 и F_2 для воды и этанола примерно равны, и влиянием оптических свойств растворителя нельзя объяснить изменения спектров КД при переходе от воды к спирту.

Для количественного выражения влияния растворителя на спектры КД мы ввели величину

$$S = \frac{R_{\text{EtOH}} - R_{\text{H}_2\text{O}}}{R_{\text{H}_2\text{O}}}$$

— чувствительность к переходу от воды к спирту. Из таблицы видно, что для некоторых изученных соединений эта величина достигает 2. Наиболее чувствительными к изменению растворителя оказываются КД-спектры нуклеозидов с алкильными заместителями, наименее — спектры соединений с фторалкильными заместителями. Изученные производные по влиянию заместителя в положении 5 на чувствительность к изменению растворителя можно расположить в следующие ряды:

$$\text{для } \beta\text{-аномеров: (XII) < (XI) < (IX) < (IV) \approx (V) < (VIII) < \\ < (VII) < (X) < (I) < (III) < (VI) < (II);$$

$$\text{для } \alpha\text{-аномеров: (XI) < (V) < (I) < (IX) < (VII) \approx (X) < (XII) < \\ < (III) < (IV) < (II) < (VI).$$

Таким образом, малая чувствительность спектров КД к изменению растворителя соответствует тем заместителям, которые обуславливают наибольший ЭК, и наоборот.

Нами были получены также спектры КД некоторых 5-замещенных 2'-дезоксинуридинов в метаноле, *трет*-бутаноле, ацетонитриле и DMSO. Спектры в спиртах совпадают со спектрами, снятыми в этаноле. В ацетонитриле и DMSO, как правило, амплитуда эффекта Коттона для α -аномеров меньше, чем для спиртов, а для β -аномеров имеет промежуточное значение между соответствующими величинами для водных и спиртовых растворов. Зависимость спектров КД от заместителя в положении 5 и растворителя можно объяснить изменением конформационного равновесия между *анти*- и *син*-формами.

Теоретические расчеты Майлса с соотр. показали, что для пиримидиновых нуклеозидов существует зависимость вращательной силы B_{21} -перехода от конформации относительно гликозидной связи [2, 9]. Диаграмма Майлса предсказывает для β -аномеров в *анти*-конформации положительный эффект Коттона, а для β -аномеров в *син*-конформации — отрицательный. Для α -аномеров диаграмма Майлса является зеркальным отражением относительно оси абсцисс. В настоящее время наиболее общепринята модель двух состояний [10], в которой принимается, что в растворе нуклеозиды существуют в виде лишь *син*- и *анти*-конформеров и что эти состояния соответствуют минимумам потенциальной энергии [11–15]. Таким образом, положительный эффект Коттона для β -аномеров и отрицательный для α -аномеров говорят о том, что равновесие в растворах обоих типов аномеров сдвинуто в сторону *анти*-конформации.

Наблюдаемую нами зависимость вращательной силы B_{21} -перехода от характера заместителя в положении 5 урацильного цикла также можно трактовать в рамках модели двух состояний: для соединений, содержащих в положении 5 электроноакцепторные заместители, равновесие в большей степени сдвинуто в сторону *анти*-состояния, чем для соединений с алкильными заместителями, что приводит к увеличению эффекта Коттона. Влияние заместителя на величину этого эффекта можно было бы объяснить и изменением электронной структуры хромофора под влиянием поляризуемого заместителя [16]. Однако сходство УФ-спектров изученных нуклеозидов (см. таблицу) говорит о близости электронных структур хромофоров всех изученных соединений, за исключением апидропроизводных (XIII), (XIV). Интересно, что размер заместителя в положении 5, по-видимому, не оказывает существенного влияния на состояние конформационного равновесия.

Сдвиг равновесия в сторону *анти*-состояния для электрооакцепторных заместителей, вероятно, связан со снижением электронной плотности на атоме О2 урацильного цикла из-за сильного индуктивного влияния со стороны заместителя в положении 5, что приводит в свою очередь к уменьшению прочности водородной связи $O2 \cdots HO-5'$, которая могла бы стабилизировать *син*-состояние.

Чувствительность спектров КД к изменению растворителя является еще одним подтверждением зависимости конформационного равновесия от характера заместителя в ядре урацила. Этот эффект также нельзя объяснить одним только изменением электронной структуры хромофора: УФ-спектры изученных нуклеозидов в спирте и воде почти полностью совпадают.

Как показано выше, для β -аномеров $R_{E_{10H}} > R_{H_2O}$ (см. таблицу). В соответствии с моделью двух состояний это означает, что при переходе от воды к спирту увеличивается вес *анти*-популяции. Возможность такого смещения равновесия под влиянием растворителя больше для нуклеозидов с алкильными заместителями, у которых содержание *син*-формы в растворах выше. Соединения с фторалкильными заместителями существуют в водных растворах почти исключительно в *анти*-форме. Концентрация *син*-формы в их водных растворах незначительна, и поэтому переход к спиртовым растворам приводит лишь к малому изменению спектров КД. Такое предположение позволяет объяснить высокую чувствительность к растворителю спектров КД нуклеозидов с алкильными заместителями и низкую чувствительность нуклеозидов с фторалкильными заместителями.

Для α -аномеров переход от воды к спирту в отличие от β -аномеров сопровождается уменьшением эффекта Коттона (см. таблицу). ($|R_{E_{10H}}| < |R_{H_2O}|$), что означает, по Майлсу, увеличение веса *син*-популяций.

Таким образом, данные спектров КД показывают, что переход от воды к спирту смещает конформационное равновесие *син* \rightleftharpoons *анти* для β - и α -аномеров нуклеозидов (I) — (XII) в противоположные стороны: в β -ряду возрастает концентрация *анти*-формы, тогда как в α -ряду при переходе к спирту происходит смещение равновесия в сторону *син*-конформации. Дополнительные результаты по температурным зависимостям спектров КД изученных соединений, подтверждающие наши предположения, будут опубликованы позднее.

Серьезный довод в пользу предлагаемого «конформационного» объяснения зависимости спектров КД от характера растворителя может быть получен при сравнении спектров КД в спирте и воде ангидронуклеозидов (XIII), (XIV), которые являются закрепленными моделями *син*-формы нуклеозидов (рис. 2). Хотя хромофоры в этих соединениях существенно отличаются от хромофоров 5-замещенных 2'-дезоксуридинов, что не позволяет использовать данные спектров КД ангидропроизводных для установления конформации нуклеозидов [16, 17], тем не менее отсутствие зависимости спектров КД от растворителя для закрепленных структур ($R_{E_{10H}} \approx R_{H_2O}$) указывает на то, что основной причиной чувствительности спектров КД 5-замещенных 2'-дезоксуридинов к изменению растворителя является смещение равновесия *син* \rightleftharpoons *анти* при переходе от воды к этанолу. Заметное уширение полосы дихроичного поглощения в случае водных растворов, вероятно, объясняется сольватационным действием молекул воды на хромофор.

Экспериментальная часть

УФ-спектры снимали на спектрофотометре Cary-219 (Varian, Швейцария), а КД-спектры — на дихрографе Roussel-Jouan, Mark III (Jobin Yvon, Франция). Для работы использовали спирт-ректификат (96%) и воду-бидистиллят. Для каждого вещества измерения проводили с тремя растворами, приготовленными растворением «независимых» навесок в соответствующем объеме растворителя так, чтобы концентрация была равна $1 \cdot 10^{-4}$ М. Нулевую линию чистого растворителя для спектров КД записывали до и после снятия спектра образца.

Нуклеозиды (I- α), (II- α), а также α - и β -аномеры нуклеозидов (III)–(V), (IV)–(XII) были получены ранее [18–22] и любезно предоставлены авторами. В работе использовали 2'-дезоксисуридин и 2'-дезокситимидин (Reanal, Венгрия) и 2'-дезоксис-5-фторуридин (VIII- β) фирмы Serva (Швеция). Производные (VI) и (VII) синтезированы А. А. Бахмедовой триметилсилильным методом по общепринятой схеме исходя из 5-галоидурацилов и 2-дезоксис-3,5-ди-О-п-толуил- α -D-рибофуранозилхлорида.

Авторы выражают благодарность В. М. Лобачеву за ценные замечания и интерес к работе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Miles D. W., Robins M. J., Robins R. K., Winkley M. W., Eyring H. J. Amer. Chem. Soc., 1968, v. 91, № 4, p. 824–831.
2. Miles D. W., Robins M. J., Robins R. K., Winkley M. W., Eyring H. J. Amer. Chem. Soc., 1968, v. 91, № 4, p. 831–838.
3. Rabczenko A., Jankowski K., Zakrzewska K. Biochim. et biophys. acta, 1974, v. 353, № 1, p. 1–15.
4. Plochocka D., Rabczenko A., Davies D. B. J. Chem. Soc. Perkin II, 1981, № 1, p. 82–89.
5. Hart P. A., Davies J. P. J. Amer. Chem. Soc., 1972, v. 94, № 8, p. 2572–2577.
6. Delabar J.-M., Guschlbauer W. J. Amer. Chem. Soc., 1973, v. 95, № 17, p. 5729–5735.
7. Sears D. W., Beychok S. In: Physical Principles in Techniques of Protein Chemistry / Ed. Leach S. J. New York – London: Acad. Press, part C, p. 445–593.
8. Landolt-Börnstein. Physikalisch-chemische Tabellen. Berlin: Springer – Verlag, 1923, 5. Auflage, B. II, S. 956, 969.
9. Miles D. W., Inskip W. H., Robins M. J., Winkley M. W., Robins R. K., Eyring H. J. Amer. Chem. Soc., 1970, v. 92, № 13, p. 3872–3881.
10. Teng N. N. H., Itzkowitz M. S., Tinoco I. J. Amer. Chem. Soc., 1971, v. 93, № 23, p. 6257–6264.
11. Haschmeyer A. E. V., Rich A. J. Mol. Biol., 1967, v. 27, № 2, p. 369–384.
12. Jordan F., Pullman B. Theor. chim. acta, 1968, v. 9, № 4, p. 242–253.
13. Lakshminarayanan A. V., Sasisekharan V. Biopolymers, 1969, v. 8, № 4, p. 475–488.
14. Lakshminarayanan A. V., Sasisekharan V. Biochim. et biophys. acta, 1970, v. 204, № 1, p. 49–59.
15. Wilson H. R., Rahman A. J. Mol. Biol., 1971, v. 56, № 1, p. 129–142.
16. Флорентьев В. Л. В кн.: Итоги науки и техники. ВИНТИ. Сер. Молекулярная биология, 1976, т. 8, ч. 1, с. 162–229.
17. Ulbricht T. L. V., Emerson T. R., Swan R. J. Tetrahedron Lett., 1966, № 14, p. 1561–1567.
18. Мельник С. Я., Миникер Т. Д., Ярцева И. В., Преображенская М. Н. Биоорг. химия, 1982, т. 8, № 8, с. 1094–1101.
19. 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. Биоорг. химия, 1982, т. 8, № 8, с. 1102–1107.
20. Мельник С. Я., Бахмедова А. А., Ворновицкая Г. И., Добрынин Я. В., Николаева Т. Г., Иванова Т. П., Ярцева И. В., Преображенская М. Н. Биоорг. химия, 1979, т. 5, № 1, с. 41–46.
21. Мельник С. Я., Бахмедова А. А., Недорезова Т. П., Ворновицкая Г. И., Преображенская М. Н., Аветисян Э. А., Герман Л. С., Полищук В. Р., Чекунова Э. В., Бектемиров Т. А., Анджапаридзе О. Г. Биоорг. химия, 1981, т. 7, № 7, с. 1047–1053.
22. Мельник С. Я., Бахмедова А. А., Ярцева И. В., Недорезова Т. П., Ворновицкая Г. И., Преображенская М. Н., Герман Л. С., Полищук В. Р., Аветисян Э. А. Биоорг. химия, 1981, т. 7, № 11, с. 1711–1717.

Поступила в редакцию
19.IV.1982

CIRCULAR DICHROISM STUDIES OF 5-SUBSTITUTED 2'-DEOXYURIDINES

VOLODIN Yu. Yu., KIKOTJ B. S., PREOBRAZHENSKAYA M. N.
All-Union Cancer Research Center, Academy of Medical Sciences
of the USSR, Moscow

CD spectra of 5-substituted 2'-deoxyuridines were studied in water and ethanol solutions. It was shown that Cotton effect of B_{2u} -transition increases for β -anomers and decreases for α -anomers when ethanol substitutes for water. A 5-substituent in 2'-deoxyuridines affects more the CD than UV spectra. For nucleosides with fluoroalkyl substituents, the Cotton effect is larger than for alkyl ones, and the former are less sensitive to a solvent change. The data obtained can be rationalized in terms of the solvent induced shift of the equilibrium between the nucleoside *anti* and *syn*-forms.