



УДК 577.164.131 : 577.323.2 : 541.651

УФ-СПЕКТРОСКОПИЯ НЕКОТОРЫХ ПИРИДОКСИновых
И ПИРИДОКСАЛЕВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ НУКЛЕИНОВЫХ
ОСНОВАНИЙ

Морозов Ю. В., Божовой В. А., Бажулина Н. П.,
Федорова Л. И., Чехов В. О., Кержант Л. В.,
Карнейский А. М.,* Степанова С. В.,* Гунар В. И.*

Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва;

* Научно-производственное объединение «Витамины», Москва

Изучена зависимость от pH УФ-спектров ряда производных нуклеиновых оснований, у которых к атому азота присоединена молекула пиридоксина или пиридоксала. С помощью математической обработки полученной спектральной информации удалось определить индивидуальные оптические характеристики различных ионных форм изученных соединений и константы равновесия между этими формами. Кроме того, разложение сложных спектров поглощения на полосы, соответствующие отдельным электронным переходам (с учетом самосогласования спектров), позволило разделить и одинаково заряженные таутомеры. Анализ спектроскопического материала дал возможность высказать предположение, что для всех исследованных соединений независимо от их ионного и таутомерного состояния нуклеиновый и пиридоксинный (пиридоксальный) фрагменты молекул расположены в разных плоскостях, что приводит к относительно слабому взаимодействию между их π -электронными системами.

Производные нуклеиновых оснований, у которых к атому азота присоединена молекула пиридоксина (PN) или пиридоксала (PL), представляют двойной интерес: как соединения, содержащие два хромофора, взаимодействие между которыми неизвестно, и как пептикозидные аналоги нуклеозидов, нашедшие достаточно широкое применение в молекулярно-биологических и биохимических исследованиях.

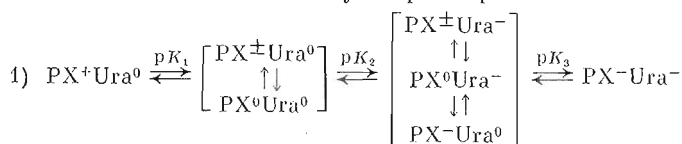
Среди этих аналогов обнаружены соединения, обладающие высокой биологической активностью [1–3]. Некоторые из них обладают противораковыми, противовирусными и иммунодепрессивными свойствами [1].

В работах [4–8] были разработаны методы синтеза нового класса аналогов нуклеозидов, у которых углеводная часть замещена на фрагмент молекулы пиридоксина или пиридоксала. Эти соединения имитируют природные нуклеозиды, а при распаде образуют продукты нормального метаболизма витамина B₆ и соответствующего нуклеинового основания. Способность витамина B₆ проникать через гематоэнцефалический барьер обуславливает дополнительный интерес к таким соединениям. Изучение таких двуххромофорных соединений представляет и самостоятельный интерес. Ранее достаточно подробно были изучены физико-химические свойства нуклеиновых оснований [9] и многочисленных аналогов витамина B₆ [10], поэтому весьма привлекательным представлялось выяснение вопроса, к каким новым качествам приведет объединение этих двух хромофоров в единую молекулярную систему.

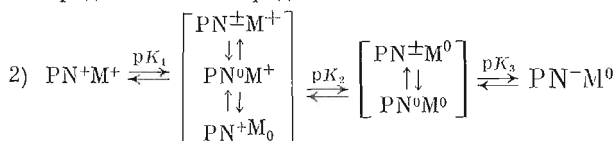
На рис. 1 приведены формулы исследованных в настоящей работе соединений.

Надстрочные знаки «+», «±», «0» и «-» в сокращенных названиях будут в дальнейшем указывать ионное состояние соответствующих молекулярных фрагментов (схема). В частности, обозначение $4PL^{\pm}Ura^0$ показывает, что урацильный фрагмент существует в виде нейтральной формы, а пиридоксальный — в виде биполярного иона. Для катионов пиридоксина

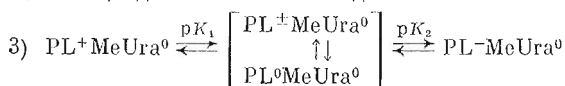
Сокращения: PL — пиридоксаль, PN — пиридоксин, Vim — безимидазол.



PX — пиридоксин или пиридоксаль



M — цитозин, аденин или бензимидазол

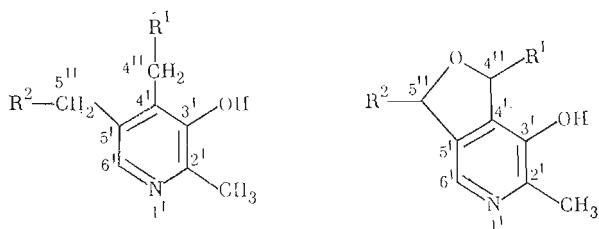


и пиридоксаля дополнительный протон локализован около N1', а у биполярных ионов и анионов депротонирована 3'-оксигруппа [10]. У анионов урацила депротонирован фрагмент N3—H. У катионов цитозина, аденина и бензимидазола дополнительный протон локализован соответственно около атомов N3, N1 и N3 [9, 11].

Математическая обработка суммарных спектров поглощения, измеренных при значениях pH в интервале от 1,0 до 13,0, позволила определить индивидуальные спектры поглощения различных ионных форм и константы равновесия между ними (табл. 1). Следует отметить, что, поскольку характер кислотно-основных равновесий не зависит от места присоединения нуклеинового основания к пиридоксину и пиридоксалью, цифры перед сокращенными названиями опущены. Из табл. 1 видно, что у 5''-замещенных производных пиридоксина и пиридоксаля значения pK₁ заметно выше, чем у 4''-замещенных аналогов. Значения pK₂ в обоих случаях имеют примерно одинаковые величины, значения же pK₃ для пиримидинов несколько выше при их введении в положение 4'', а для аденина и бензимидазола — в положение 5''.

Перейдем теперь к непосредственному рассмотрению результатов разложения индивидуальных спектров поглощения различных ионных форм изученных соединений на полосы, соответствующие отдельным электронным переходам (табл. 2—6).

В основу разложения спектральных кривых были положены следующие соображения. Предполагалось, что полоса, соответствующая отдельному электронному переходу, может быть описана логнормальной функцией $\varphi(\nu, \nu_0, \epsilon_0, \omega, \rho)$ [9], где ν — волновое число, ν_0 — волновое число, соответствующее максимуму полосы поглощения, ϵ_0 — значение коэффи-



4PNUra: R¹=Ura; R²=H
 4PNCyt: R¹=Cyt; R²=H
 4PNAd: R¹=Ad; R²=H
 4PNBim: R¹=Bim; R²=H
 5PNUra: R¹=H; R²=Ura
 5PNCyt: R¹=H; R²=Cyt
 5PNAd: R¹=H; R²=Ad
 5PNBim: R¹=H; R²=Bim

4PLUra: R¹=Ura; R²=H
 4PLMeUra: R¹=4-O-метилUra; R²=H
 5PLUra: R¹=H; R²=Ura
 5PLMeUra: R¹=H; R²=4-O-метилUra

Рис. 1. Строение исследованных в работе соединений. Для производных пиридоксаля приведена нумерация атомов, совпадающая с таковой для пиридоксина

Значения pK для исследованных пиридоксиновых и пиридоксальных производных нуклеиновых оснований

Соединение	pK_1	pK_2	pK_3	Соединение	pK_1	pK_2	pK_3
4PNUra	3,82	8,43	10,12	4PNCyt	3,15	4,58	8,52
5PNUra	4,32	8,32	9,64	5PNCyt	3,65	4,75	8,19
4PLUra	3,13	8,19	9,96	4PNAde	3,47	4,72	8,26
5PLUra	3,84	8,30	9,71	5PNAde	3,68	4,60	8,39
4PLMeUra	3,35	8,29	—	4PNBim	2,89	4,90	8,45
5PLMeUra	3,85	8,06	—	5PNBim	3,55	4,89	8,56

Таблица 2

Значения энергий электронных переходов (E) и соответствующих им сил осцилляторов (f) в спектрах поглощения растворов PN, Urd, 4PNUra и 5PNUra в воде и этаноле

Ионная форма	Компонент	PN и Urd				4PNUra				5PNUra			
		Вода		Этанол		Вода		Этанол		Вода		Этанол	
		E , эВ	f	E , эВ	f	E , эВ	f	E , эВ	f	E , эВ	f	E , эВ	f
PN+Ura ⁰	PN+	4,26	0,28	4,22	0,29	4,23	0,23	4,19	0,24	4,24	0,32	4,21	0,35
	Ura ⁰	4,75	0,43	—	—	4,67	0,48	4,65	0,45	4,72	0,40	4,71	0,43
	PN+	5,41	0,12	5,32	0,12	5,39	0,10	5,26	0,12	5,40	0,14	5,27	0,16
	*	6,05	0,65	6,01	0,65	6,13	1,36	6,01	0,93	6,13	1,41	6,11	1,56
PN±Ura ⁰	PN±	3,82	0,30	3,75	0,30	3,76	0,26	3,68	0,26	3,79	0,34	3,73	0,34
	PN ⁰	4,37	0,19	4,34	0,19	4,32	0,17	4,32	0,17	4,33	0,21	4,31	0,21
	Ura ⁰	4,75	0,43	—	—	4,65	0,47	4,67	0,45	4,66	0,46	4,64	0,46
	PN±	4,90	0,20	4,87	0,49	4,85	0,14	4,79	0,28	4,88	0,24	4,88	0,62
PN ⁰ Ura ⁰	PN±	5,64	0,76	5,56	0,76	—	—	5,53	0,58	—	—	5,48	1,35
	PN ⁰	5,72	0,15	5,64	0,20	—	—	—	—	—	—	—	—
	Ura ⁰	6,00	0,46	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	*	—	—	—	—	5,66	0,66	5,92	0,64	5,69	0,70	6,03	1,03
PN±Ura ⁻	PN±	3,82	0,30	3,75	0,30	3,73	0,26	—	—	3,73	0,37	—	—
	PN ⁻	4,01	0,24	4,01	0,24	3,94	0,22	—	—	3,97	0,27	—	—
	PN ⁰	4,37	0,19	4,34	0,19	—	—	—	—	4,35	0,27	—	—
	Ura ⁰	4,75	0,43	—	—	4,62	0,44	—	—	4,64	0,50	—	—
PN ⁰ Ura ⁻	Ura ⁻	4,75	0,33	—	—	4,64	0,35	—	—	4,67	0,35	—	—
	PN±	4,90	0,20	4,87	0,49	4,85	0,18	—	—	4,88	0,25	—	—
	Ura ⁻	5,08	0,03	—	—	5,01	0,09	—	—	5,03	0,02	—	—
	PN ⁻	5,08	0,29	5,02	0,29	5,06	0,25	—	—	5,07	0,24	—	—
PN ⁻ Ura ⁰	Ura ⁻	5,63	0,40	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	PN±	5,64	0,76	5,56	0,76	—	—	—	—	—	—	—	—
	PN ⁰	5,72	0,15	5,64	0,20	—	—	—	—	—	—	—	—
	PN ⁻	5,90	0,63	5,87	0,59	—	—	—	—	—	—	—	—
PN ⁻ Ura ⁻	*	—	—	—	—	5,85	0,94	—	—	5,75	0,81	—	—
	PN ⁻	4,01	0,24	4,01	0,24	3,96	0,27	3,88	0,26	4,00	0,27	3,98	0,27
	Ura ⁻	4,75	0,33	—	—	4,68	0,38	4,63	0,38	4,68	0,37	4,67	0,39
	Ura ⁻	5,08	0,03	—	—	5,00	0,03	4,98	0,03	5,03	0,04	4,98	0,04
PN ⁻ Ura ⁻	PN ⁻	5,08	0,29	5,02	0,29	5,07	0,18	4,99	0,23	5,07	0,18	4,99	0,22
	Ura ⁻	5,63	0,40	—	—	5,60	0,46	5,58	0,21	5,64	0,54	5,63	0,25
	PN ⁻	5,90	0,63	5,87	0,59	6,01	1,10	5,95	1,14	6,03	0,94	5,96	1,41
	*	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

* Полосы, которые являются суперпозицией нескольких полос.

циента поглощения в максимуме полосы, w — полуширина полосы и ρ — параметр, характеризующий ее асимметрию. Математически задача разбиения сложного спектра на известное число полос, описываемых такими функциями, сводится к такому подбору параметров этих полос, чтобы их огибающая была наиболее близка к исходному спектру поглощения. И программа, реализующая эту процедуру, и модели, на основе

Значения энергий электронных переходов (E) и соответствующих им сил PN, Cyt, Ado, 4PNCyt,

Ионная форма	Компонент	PN и Cyt		4PNCyt		5PNCyt	
		E , эВ	f	E , эВ	f	E , эВ	f
PN+Cyt ⁺	PN ⁺	4,26	0,28	4,22	0,23	4,21	0,43
	Cyt ⁺	4,42	0,53	4,43	0,50	4,44	0,46
	PN ⁺	5,41	0,12	5,45	0,10	5,46	0,19
	Cyt ⁺	5,81	0,55	—	—	—	—
	*	—	—	6,01	0,94	5,96	0,91
PN [±] Cyt ⁺	PN [±]	3,82	0,30	3,76	0,27	3,78	0,34
	PN ⁺	4,26	0,28	4,23	0,23	4,23	0,36
	PN ⁰	4,37	0,19	4,32	0,17	4,33	0,22
	Cyt ⁺	4,42	0,53	4,36	0,47	4,35	0,59
	Cyt ⁰	4,56	0,38	4,56	0,40	4,57	0,34
	PN [±]	4,90	0,20	4,87	0,18	4,88	0,24
	Cyt ⁰	5,31	0,30	5,29	0,27	5,30	0,26
	PN ⁺	5,41	0,12	5,39	0,10	5,40	0,17
	PN [±]	5,64	0,76	—	—	—	—
	PN ⁰	5,72	0,15	—	—	—	—
PN ⁰ Cyt ⁰	Cyt ⁺	5,81	0,55	—	—	—	—
	Cyt ⁰	5,83	0,32	—	—	—	—
	*	—	—	5,68	0,72	5,88	1,00
	PN [±]	3,82	0,30	3,77	0,26	3,79	0,36
	PN ⁰	4,37	0,19	4,31	0,16	4,35	0,24
	Cyt ⁰	4,56	0,38	4,53	0,39	4,52	0,38
	PN [±]	4,90	0,20	4,89	0,12	4,84	0,20
	Cyt ⁰	5,31	0,30	5,31	0,25	5,30	0,31
	PN [±]	5,64	0,76	—	—	—	—
	PN ⁰	5,72	0,15	—	—	—	—
PN ⁻ Cyt ⁰	Cyt ⁰	5,83	0,32	—	—	—	—
	*	—	—	5,75	1,23	5,72	1,25
	PN ⁻	4,01	0,24	3,96	0,27	3,98	0,31
	Cyt ⁰	4,56	0,38	4,54	0,38	4,54	0,43
	PN ⁻	5,08	0,29	5,08	0,18	5,05	0,26
	Cyt ⁰	5,31	0,30	5,37	0,36	5,40	0,41
	Cyt ⁰	5,83	0,32	—	—	—	—
	*	—	—	5,97	1,39	5,91	1,01

* Суперпозиция нескольких полос.

которых возможно проводить физически осмысленное и однозначное (с точностью до экспериментальной ошибки) разложение спектральных кривых на отдельные полосы, подробно рассмотрены и проанализированы в работе [12]. Здесь мы хотим привлечь внимание к процедуре самосогласования спектров, которая позволяет весьма существенно повысить точность разложения.

Нами было показано, что и для соединений группы витамина B₆, в частности для пиридоксина и пиридоксаля и для нуклеиновых оснований, имеется ряд факторов, которые, меняя одни группы параметров спектральных полос, практически не влияют на другие. Так, для соединений группы витамина B₆ оказалось, что при переходе из водного раствора в этанол несколько изменяются положения спектральных полос и соответствующие им силы осцилляторов, а величины w и ρ остаются практически неизменными. Для нуклеиновых оснований присоединение углеводного остатка также практически не сказывается на полуширине и асимметрии полос. Эти факты оказались чрезвычайно важными, так как позволили весьма существенно ограничить область варьирования параметров и тем самым повысить точность проводимых разложений спектральных кривых.

При проведении разложения спектров поглощения обсуждаемых соединений естественно было предположить, что спектры пиридоксинового

осцилляторов (f) в спектрах поглощения водных растворов
5PNCyt, 4PNAdе и 5PNAdе

Ионная форма	Компонент	PN и Ado		4PNAdе		5PNAdе	
		E , эВ	f	E , эВ	f	E , эВ	f
PN ⁺ Adе ⁺	PN ⁺	4,26	0,28	4,22	0,22	4,24	0,34
	Adе ⁺	4,78	0,56	4,77	0,52	4,77	0,57
	Adе ⁺	5,20	0,03	5,18	0,03	5,19	0,03
	PN ⁺	5,41	0,12	5,40	0,15	5,42	0,17
	Adе ⁺	5,97	0,84	—	—	—	—
	*	—	—	5,98	1,38	5,97	1,44
PN [±] Adе ⁺	PN [±]	3,82	0,30	3,78	0,26	3,78	0,39
	PN [±]	4,26	0,28	4,24	0,22	4,25	0,33
	PN ⁰	4,37	0,19	4,35	0,17	4,36	0,24
	Adе ⁰	4,76	0,56	4,73	0,58	4,73	0,55
	Adе ⁺	4,78	0,56	4,75	0,48	4,76	0,62
	PN [±]	4,90	0,20	4,88	0,18	4,84	0,27
	Adе ⁺	5,20	0,03	5,17	0,03	5,19	0,03
	Adе ⁰	5,21	0,06	5,18	0,06	5,18	0,03
	PN ⁺ Adе ⁰	5,41	0,12	5,39	0,10	5,42	0,15
	PN [±]	5,64	0,76	—	—	—	—
PN ⁰	5,72	0,15	—	—	—	—	
Adе ⁺	5,97	0,84	—	—	—	—	
	*	—	—	5,78	0,96	5,91	1,04
PN [±] Adе ⁰	PN [±]	3,82	0,30	3,77	0,25	3,79	0,36
	PN ⁰	4,37	0,19	4,32	0,15	4,35	0,24
	Adе ⁰	4,76	0,56	4,75	0,50	4,73	0,57
	PN [±]	4,90	0,20	4,85	0,13	4,85	0,27
	Adе ⁰	5,21	0,06	5,20	0,05	5,20	0,06
	PN [±]	5,64	0,76	—	—	—	—
	PN ⁰	5,72	0,15	—	—	—	—
	Adе ⁰	6,01	0,90	—	—	—	—
	*	—	—	5,79	1,31	5,77	1,42
PN ⁻ Adе ⁰	PN ⁻	4,01	0,24	3,97	0,23	3,99	0,30
	Adе ⁰	4,76	0,56	4,74	0,50	4,74	0,66
	PN ⁻	5,08	0,29	5,07	0,20	5,05	0,21
	Adе ⁰	5,21	0,06	5,19	0,04	5,20	0,09
	Adе ⁰	6,01	0,90	—	—	—	—
	*	—	—	5,91	1,14	5,86	1,17

(пиридоксалевого) и нуклеинового фрагментов в известной мере близки к аналогичным спектрам собственно пиридоксина (пиридоксала) и соответствующего нуклеозида. При этом также предполагалось, что величины w и ρ тоже сохраняются в разумных пределах.

Для растворов $4PL^+Ura^0$ и $4PL^-Ura^-$ в воде и этаноле реализуются сравнительно простые ситуации (см. рис. 2а и д; г и ж) — отсутствуют таутомерные равновесия и смысл самосогласования спектров поглощения в воде и этаноле сводится к тому, чтобы при сохранении величин w и ρ значения E и f также находились бы в разумном соответствии со спектрами пиридоксала и уридина.

Для нейтральных растворов (рис. 2б и е) ситуация существенно усложняется из-за наличия таутомерных равновесий (рис. 2). Однако на помощь здесь приходит то обстоятельство, что в воде равновесие между прототропными таутомерами $PL^±$ и PL^0 смещено в сторону $PL^±$, а в этаноле — в сторону PL^0 . Пользуясь этим, а также уже сформулированными предположениями и учитывая, что и в воде и в этаноле сумма мольных долей $PL^±$ и PL^0 равна 1, удалось разложить и эти спектры, так как знание соотношения $[PL^±]/[PL^0]$ позволяло определять соответствующие значения f_1 в воде и этаноле. При этом в процессе разложения данные, полученные в результате анализа водного раствора, согласовывали с ана-

Значения энергий электронных переходов (E) и соответствующих им сил осцилляторов (f) спектров поглощения растворов PL, Urd, 4PLUra и 5PLUra в воде и этаноле

Ионная форма	Компонент	PL и Urd				4PLUra				5PLUra			
		Вода		Этанол		Вода		Этанол		Вода		Этанол	
		$E, \text{эВ}$	f	$E, \text{эВ}$	f	$E, \text{эВ}$	f	$E, \text{эВ}$	f	$E, \text{эВ}$	f	$E, \text{эВ}$	f
PL+Ura ⁰	PL ⁺	4,30	0,28	4,27	0,29	4,28	0,24	4,25	0,23	4,36	0,33	4,31	0,33
	Ura ⁰	4,75	0,43	—	—	4,81	0,50	4,80	0,47	4,82	0,39	4,82	0,40
	PL ⁺	5,53	0,17	5,46	0,18	5,50	0,21	5,43	0,15	5,45	0,20	5,39	0,21
	Ura ⁰	6,00	0,46	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	*	—	—	—	—	5,92	0,75	5,90	1,41	5,95	1,06	5,91	1,14
PL [±] Ura ⁰	PL [±]	3,90	0,30	3,81	0,30	3,87	0,30	3,78	0,24	3,95	0,36	3,86	0,31
	PL ⁰	4,50	0,19	4,41	0,19	4,50	0,18	4,40	0,15	4,52	0,23	4,46	0,19
	Ura ⁰	4,75	0,43	—	—	4,78	0,46	4,75	0,40	4,74	0,45	4,72	0,40
	PL [±]	4,89	0,20	4,88	0,50	4,91	0,19	4,81	0,29	4,82	0,22	4,81	0,37
	Ura ⁰	5,55	0,25	—	—	5,49	0,14	5,47	0,17	5,53	0,22	5,45	0,19
PL ⁰ Ura ⁰	PL [±]	5,71	0,63	—	—	—	—	5,60	0,69	—	—	5,61	0,99
	Ura ⁰	6,00	0,46	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	*	—	—	5,65	0,36	5,73	1,13	6,04	0,57	5,75	1,07	6,03	0,71
	PL [±]	3,90	0,30	3,81	0,30	3,85	0,27	—	—	3,84	0,37	—	—
	PL ⁻	4,11	0,24	4,07	0,24	4,07	0,23	—	—	4,16	0,29	—	—
PL [±] Ura ⁻	Ura ⁻	4,75	0,33	—	—	4,70	0,41	—	—	4,72	0,38	—	—
	Ura ⁰	4,75	0,43	—	—	4,74	0,45	—	—	4,79	0,57	—	—
	PL [±]	4,89	0,20	4,88	0,50	4,85	0,20	—	—	4,87	0,26	—	—
	Ura ⁻	5,08	0,03	—	—	5,02	0,04	—	—	5,04	0,04	—	—
	PL ⁻	5,09	0,32	5,04	0,29	5,09	0,32	—	—	5,07	0,22	—	—
PL ⁻ Ura ⁰	Ura ⁻	5,63	0,40	—	—	5,58	0,51	—	—	5,60	0,54	—	—
	PL [±]	5,71	0,63	5,65	0,36	5,66	0,77	—	—	—	—	—	—
	PL ⁻	5,92	0,56	5,91	0,23	5,88	0,39	—	—	—	—	—	—
	Ura ⁰	6,00	0,46	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	*	—	—	—	—	5,98	0,48	—	—	5,97	0,92	—	—
PL ⁻ Ura ⁻	PL ⁻	4,11	0,24	4,07	0,24	4,10	0,24	4,03	0,23	4,18	0,27	4,11	0,26
	Ura ⁻	4,75	0,33	—	—	4,73	0,31	4,67	0,31	4,78	0,41	4,70	0,39
	PL ⁻	5,09	0,32	5,04	0,29	5,05	0,28	4,96	0,39	5,04	0,24	4,92	0,34
	Ura ⁻	5,08	0,03	—	—	5,06	0,02	5,04	0,02	5,08	0,03	5,03	0,04
	Ura ⁻	5,63	0,40	—	—	5,62	0,55	5,60	0,18	5,64	0,52	5,64	0,13
PL ⁻	5,92	0,56	5,91	0,23	—	—	—	—	—	—	—	—	
*	—	—	—	—	5,96	0,61	5,88	0,65	6,01	0,68	5,99	0,84	

* Суперпозиция нескольких полос.

логичными данными в этаноле и наоборот, вплоть до достижения полного (с учетом, естественно, точности эксперимента) самосогласования между полученными результатами. Это позволяло корректно учитывать слабые спектральные полосы.

Для анионов мы имеем спектр поглощения только в водном растворе. Это связано с тем, что величины pK_2 и pK_3 достаточно близки (см. табл. 1) и нельзя подобрать экспериментальные условия, при которых в этаноле существовали бы только анионы. Характер таутомерного равновесия для анионов меняется. Содержание 4PL⁰Ura⁻ в воде очень мало, и им можно пренебречь, поэтому в растворе сосуществуют 4PL[±]Ura⁻ и 4PL⁻Ura⁰. В этом случае можно воспользоваться тем обстоятельством, что [PL[±]] = [Ura⁻] и [PL⁻] = [Ura⁰], а сумма мольных долей PL[±] и PL⁻ равна сумме мольных долей Ura⁻ и Ura⁰ и равна 1. При этом, естественно, спектры поглощения молекулярных фрагментов 4PLUra согласовывали со спектрами поглощения соответствующих ионных форм пиридоксала и уридина.

В случае 4PNAdе и 5PNAdе (рис. 3) в основу процедуры самосогласования спектров были положены их подобие друг другу и соответствующие спектрам пиридоксина и аденозина, а также разумное сохранение величин w и ρ .

Перейдем теперь к анализу данных, суммированных в табл. 2–6.

Значения энергий электронных переходов (E) и соответствующих им сил осцилляторов (f) в спектрах поглощения водных растворов 4PLMeUra и 5PLMeUra

Ионная форма	Компонент	4PLMeUra		5PLMeUra	
		E , эВ	f	E , эВ	f
PL ⁺ MeUra ⁰	PL ⁺	4,26	0,24	4,31	0,33
	MeUra ⁰	4,57	0,27	4,53	0,34
	MeUra ⁰	5,30	0,09	5,30	0,12
	PL ⁺	5,55	0,12	5,55	0,15
	*	5,86	0,78	5,89	1,02
PL [±] MeUra ⁰	PL [±]	3,87	0,28	3,95	0,37
	PL ⁰	4,48	0,18	4,52	0,23
	MeUra ⁰	4,50	0,26	4,52	0,33
	PL ⁰ MeUra ⁰	4,86	0,18	4,79	0,21
PL ⁰ MeUra ⁰	MeUra ⁰	5,37	0,13	5,32	0,14
	*	5,70	1,20	5,80	1,53
	PL ⁻	4,08	0,25	4,18	0,36
	MeUra ⁰	4,54	0,29	4,57	0,29
PL ⁻ MeUra ⁰	PL ⁻	5,07	0,29	5,01	0,33
	MeUra ⁰	5,32	0,04	5,40	0,06
	*	5,87	1,00	6,11	2,18

* Суперпозиция нескольких полос.

Таблица 6

Усредненные значения полуширин (w , 10³ см⁻¹) и асимметрий (ρ) полос поглощения молекулярных фрагментов исследованных соединений

Фрагмент	w_1	$w_{2(s)}$	ρ_1	$\rho_{2(s)}$
PN ⁺	3,25±0,04	4,80±0,01	1,47±0,04	1,25±0,05
PN [±]	3,50±0,03	4,48±0,12	1,45±0,10	1,45±0,02
PN ⁰	3,23±0,05	—	1,45±0,05	—
PN ⁻	3,64±0,04	4,53±0,28	1,37±0,08	1,33±0,07
PL ⁺	3,22±0,07	4,81±0,03	1,42±0,06	1,18±0,02
PL [±]	3,47±0,05	3,55±0,05	1,45±0,06	1,50±0,05
		3,86±0,01		1,30±0,06
PL ⁰	3,20±0,05	4,58±0,02	1,52±0,03	1,21±0,05
PL ⁻	3,45±0,03	4,18±0,03	1,42±0,05	1,40±0,02
Ura ⁰	4,90±0,08	—	1,38±0,05	—
Ura ⁻	4,95±0,06	5,00±0,01	1,48±0,05	1,30±0,01
		5,71±0,06		1,21±0,06
Cyt ⁺	4,34±0,06	—	1,48±0,06	—
Cyt ⁰	4,57±0,03	5,13±0,03	1,54±0,03	1,11±0,03
Ade ⁺	4,50±0,05	4,86±0,01	1,23±0,04	1,15±0,01
Ade ⁰	4,30±0,03	4,85±0,01	1,34±0,04	1,28±0,01
MeUra ⁰	4,59±0,05	5,14±0,04	1,53±0,04	1,10±0,02

В спектре поглощения каждой таутомерной формы наиболее длинноволновая полоса поглощения принадлежит пиридоксеновому (пиридоксальному) фрагменту изученных соединений, а 2-я — соответствующему нуклеиново-му.

И для пиридоксенового (пиридоксальнового) и нуклеинового фрагментов значения w и ρ , принадлежащие одинаково заряженным формам, практически совпадают между собой и с аналогичными величинами для пиридоксина, пиридоксала и соответствующих нуклеозидов (см. табл. 6).

Посмотрим сначала, как влияет присоединение нуклеинового основания на спектральные свойства пиридоксина и пиридоксала. Для исследованных соединений независимо от положения, по которому присоединяется нуклеиновое основание, наблюдается bathochromный сдвиг наиболее длинноволновой полосы поглощения, причем для 5''-производных этот

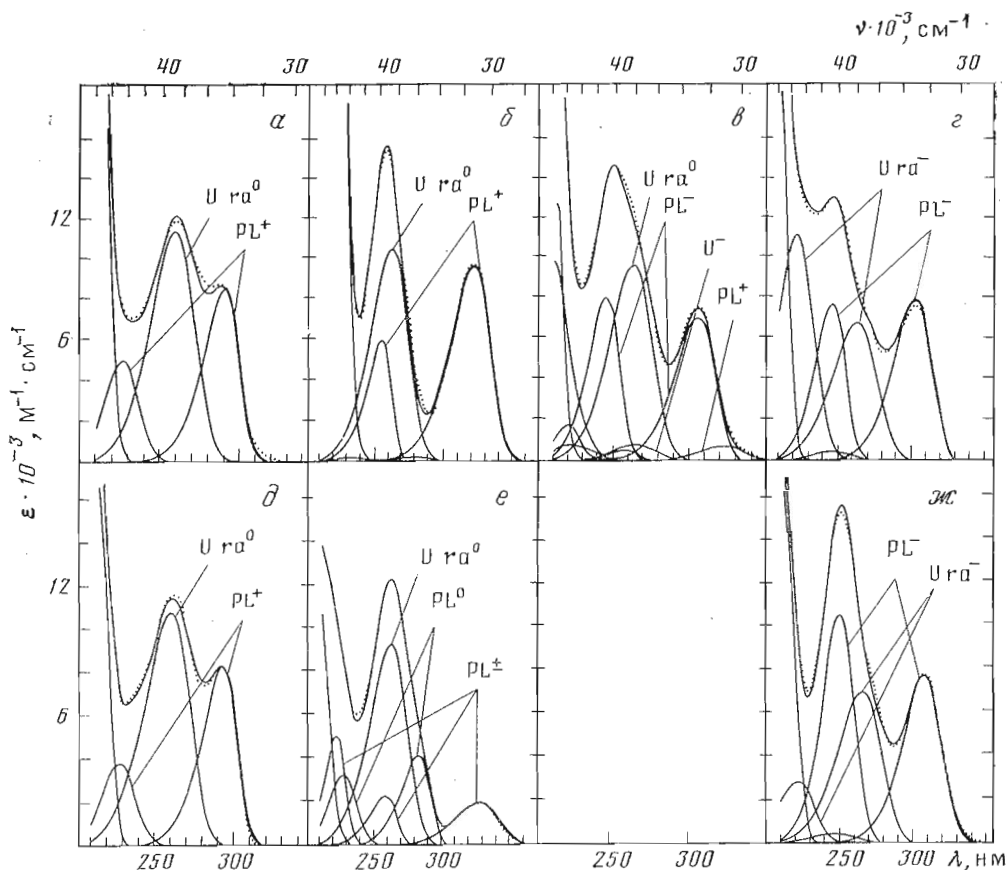


Рис. 2. Спектры поглощения 4PLUra в воде (а-г) и этаноле (д-ж)

сдвиг, как правило, меньше, чем для 4''-производных. Для производных пиридоксаля введение заместителя в положение 4'' приводит обычно к bathochромному сдвигу первой полосы поглощения, а в положение 5'' — к гипсохромному.

Для всех ионных и таутомерных форм 4''-производных пиридоксина и пиридоксаля (за исключением 4PN⁻Ura⁻) значения f_1 меньше, чем у соответствующих ионных форм самих пиридоксина и пиридоксаля, а для всех форм 5''-производных значения f_1 больше.

Переход исследованных соединений из водных растворов в этанол сопровождается в большинстве случаев bathochромным сдвигом спектров поглощения.

Присоединение пиридоксинового (пиридоксалевого) фрагмента к N-гликозидному центру нуклеинового основания приводит к не очень большим (не более 0,13 эВ) спектральным сдвигам длинноволновых полос поглощения нуклеинового фрагмента молекулы. В то же время значения f_1 для этих полос обнаруживают интересную зависимость от положения в пиридоксिनном (пиридоксалево) фрагменте, к которому присоединяются нуклеиновые основания, и от суммарного заряда этого фрагмента. Так, для 4''-производных при изменении его заряда от +1 до -1 происходит уменьшение значения f_1 для нуклеинового фрагмента, а для 5''-производных наблюдается обратная зависимость.

Из табл. 7 видно, что переход рассматриваемых соединений из воды в этанол сопровождается весьма существенным возрастанием процентного содержания таутомерных форм с нейтральным пиридиновым циклом. Для 5''-производных по сравнению с 4''-замещенными аналогами также происходит смещение равновесия в сторону нейтральной формы. Наряду с этим у 5''-производных возрастает содержание таутомеров с нейтральным цитозиновым или адениновым фрагментом.

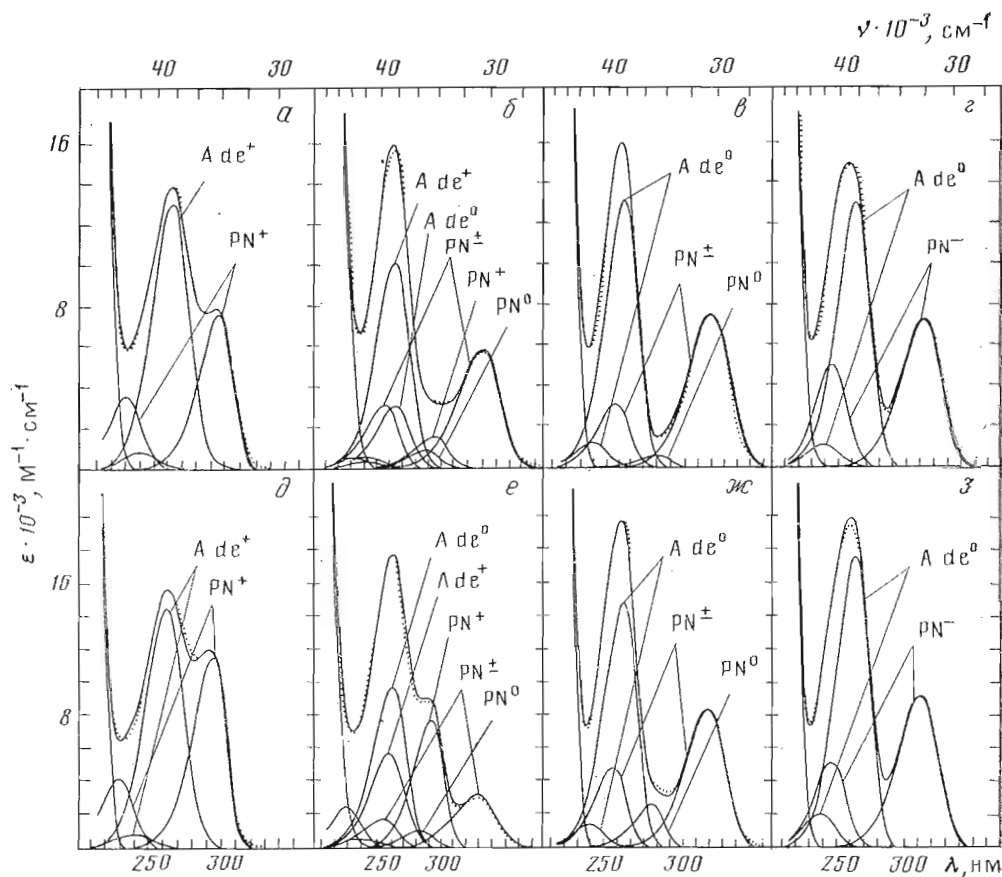


Рис. 3. Спектры поглощения водных растворов 4PNAdе (а-г) и 5PNAdе (д-з)

Заканчивая рассмотрение представленного спектроскопического материала и результатов его математической обработки, следует отметить, что спектры поглощения всех ионных форм обсуждаемых соединений близки к спектрам пиридоксина (пиридоксалия) и соответствующего нуклеозида. Этот факт говорит, по-видимому, о том, что пиридоксинный (пиридоксалевый) и нуклеиновый фрагменты рассматриваемых молекул расположены в различных плоскостях, что весьма существенно ослабляет взаимодействие между их π -электронными системами.

Экспериментальная часть

Все исследованные в работе соединения были хроматографически гомогенными, их синтез и очистка описаны в работах [4-8].

Спектры поглощения измерялись на двухлучевом регистрирующем спектрофотометре EPS-3Т фирмы Hitachi при $(20 \pm 1)^\circ \text{C}$ в интервале pH 1,0-13,0.

В качестве растворителя использовали деионизованную воду и перегнанный этанол. Из-за плохой растворимости в этаноле сначала готовили концентрированные растворы исследованных соединений в воде, а затем необходимые количества таких растворов добавляли к этанолу. Концентрация воды в этаноле не превышала, как правило, 6%. При работе с водными растворами их ионную силу поддерживали постоянной и равной 0,1 М. Закисление и защелачивание растворов осуществляли с помощью добавления микроколичеств HCl и NaOH марки ос.ч. Концентрации исследованных растворов варьировались от $5 \cdot 10^{-5}$ до 10^{-4} М, точность их приготовления (по концентрации) не хуже $\pm 10\%$. Значения pH определяли непосредственно в измерительной кювете с помощью микроэлектродов на универсальном ионметре ЭВ-74 с точностью $\pm 0,05$ ед. pH.

Индивидуальные спектры поглощения различных ионных форм и константы равновесия между ними определяли, исходя из спектров поглощения исследованных соединений, измеренных при различных значениях pH, с помощью программы, алгоритм которой детально описан в работе [9].

Содержание (%) различных таутомерных форм исследованных соединений *

Соединение	Место присоединения нуклеинового основания	Растворитель	Ионная форма				
			PX±Y ⁰	PX ⁰ Y ⁰	PX±Y ⁻	PX ⁰ Y ⁻	PX-Y ⁰
PNUra	4	Вода Этанол	93,3 20,0	6,7 80,0	5,0 —	— —	95,0 —
	5	Вода Этанол	68,6 4,9	31,4 95,1	11,0 —	4,0 —	85,0 —
PLUra	4	Вода Этанол	96,6 24,3	3,4 75,7	7,4 —	— —	92,6 —
	5	Вода Этанол	86,6 10,7	13,4 89,3	3,4 —	— —	96,6 —
PLMeUra	4	Вода »	98,6	1,4	—	—	—
	5		94,9	5,1	—	—	—
			PN±M+	PN ⁰ M+	PN+M ⁰	PN±M ⁰	PN ⁰ M ⁰
PNCyt	4	Вода »	56,0	13,0	31,0	93,1	6,9
	5		25,0	10,0	65,0	78,0	22,0
PNAde	4	» »	68,0	13,0	19,0	90,3	9,7
	5		24,0	11,0	65,0	70,0	30,0

* PX — пиридоксин или пиридоксаль, M — цитозин или аденин, Y — урацил или 4-О-метилурацил.

Разложение спектров поглощения различных ионных форм на полосы, соответствующие отдельным электронным переходам, осуществляли с помощью программы, алгоритм которой и принципы построения физических моделей, на базе которых проводилось разложение, подробно рассмотрены в работе [12].

ЛИТЕРАТУРА

1. Преображенская М. Н., Мельник С. Я. // Итоги науки и техники. Сер. Биорганическая химия. Т. 1. М.: ВИНТИ, 1984. 244 с.
2. De Clercq E., Torrence P. F. // J. Carbohydr. Nucleosides, Nucleotides. 1978. V. 5. № 3. P. 187—224.
3. Крицын А. М., Флорентьев В. Л. // Биорган. химия. 1977. Т. 3. № 2. С. 149—171.
4. Карнейский А. М., Львова С. Д., Гунар В. И., Михайлов С. Н. // Биорган. химия. 1980. Т. 6. № 7. С. 1047—1052.
5. Karpeisky A. M., Gunar V. I. // Nucl. Acid Res. Symp. Ser. 1984. № 14. P. 265—266.
6. Карнейский А. М., Львова С. Д., Гунар В. И. // Биорган. химия. 1985. Т. 11. № 8. С. 1097—1104.
7. Карнейский А. М., Степанова С. В., Филиппова Т. М., Гунар В. И. // Биорган. химия. 1986. Т. 12. № 9. С. 1274—1281.
8. Karpeisky A. M., Stepanova S. V., Gunar V. I. // Communications of Third F. E. C. S. international conference of chemistry and biotechnology of biologically active natural products. September 16—21, 1985. Sofia, Bulgaria. P. 88—92.
9. Бородавкин А. В., Будовский Э. И., Морозов Ю. В., Савин Ф. А., Силукова Н. А. // Итоги науки и техники. Сер. Молекулярная биология. Т. 14. М.: ВИНТИ, 1977. 228 с.
10. Morozov Yu. V. // Pyridoxal phosphate chemical, biochemical and medical aspects. Part A. V. 1A/Ed. Dolphin D. N. Y.; L.: Wiley and Sons, 1986. P. 131—222.
11. Бажулина Н. П., Морозов Ю. В., Савин Ф. А., Федорова Л. П., Чехов В. О. // Биорган. химия. 1985. Т. 11. № 1. С. 49—59.
12. Морозов Ю. В., Савин Ф. А., Будовский Э. И. // Итоги науки и техники. Сер. Общие проблемы физикохимической биологии. Т. 4. М.: ВИНТИ, 1985. С. 144—207.

Поступила в редакцию
26.IX.1986

UV-SPECTROSCOPY OF SOME PYRIDOXINE AND PYRIDOXAL DERIVATIVES OF NUCLEIC BASES

MOROZOV Yu. V., BOKOVOI V. A., BAZHULINA N. P., FEDOROVA L. I.,
CHEKHOV V. O., KARKLIT L. V., KARPEISKY A. M.*, STEPANOVA S. V.*,
GUNAR V. I.*

Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences of the USSR, Moscow;
** All-Union Vitamins Research Institute, Moscow*

The pH-dependence of UV-spectra of nucleic bases linked with a pyridoxine or pyridoxal residue has been studied. The mathematical treatment of spectral information afforded individual optical characteristics of different ionic forms of the compounds and the equilibrium constants. Besides, the deconvolution of complex spectra into absorption bands corresponding to separate electronic transitions (with account of self-consistent deconvolution) allowed to discriminate equally charged tautomers. Analysis of the spectroscopic data led to the conclusion that irrespectively of the ionic and tautomer states the nucleic and pyridoxine (pyridoxal) moieties of the molecules studied are non-coplanar which results in a negligible interaction between their π -electronic systems.