

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
Уфимский федеральный исследовательский центр Российской академии наук
(УФИЦ РАН)
Уфимский Институт химии - обособленное структурное подразделение
Федерального государственного бюджетного научного учреждения
Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук
(УФИХ УФИЦ РАН)

На правах рукописи



АХИЯРОВ АЙДАР АЙРАТОВИЧ

**КИСЛОТНО-ОСНОВНОЕ РАВНОВЕСИЕ 5-ЗАМЕЩЕННЫХ
ПРОИЗВОДНЫХ 6-МЕТИЛ- И 6-АМИНОУРАЦИЛА
В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ**

1.4.4. Физическая химия

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Научный руководитель:
кандидат химических наук
Иванов Сергей Петрович

Уфа – 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР.....	9
1.1 Биологические свойства производных урацила.....	9
1.2 Строение и таутомерные превращения производных урацила	14
1.2.1 Таутомерные перегруппировки с участием -NH ₂ , -SH, -ОН групп	22
1.3 Кислотно-основные свойства производных урацила	25
1.3.1 Кислотно-основные свойства N-метилзамещенных производных	31
1.3.2 Определение анионного состава производных урацила	34
1.3.2.1 Способы N-метилирования пиримидиновых оснований	34
1.3.2.2 Оценка содержания анионных форм производных урацила	42
ВЫВОД К ГЛАВЕ 1	44
ГЛАВА 2 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	46
2.1 Приборы и реагенты.....	46
2.2 Объекты исследования.....	47
2.3 Метилирование 5-циано-6-метилурацила.....	48
2.4 Синтез 5-нитрозо-6-аминоурацила	48
2.5 Определение констант диссоциации производных урацила.....	49
2.5.1 Потенциометрический метод	49
2.5.2 Спектрофотометрический метод	49
2.5.3 Спектрально-люминесцентный метод.....	50
2.5.4 Метод растворимости.....	51
2.6 Растворимость 6-аминоурацила и 1-метил-6-аминоурацила.....	51
2.7 Определение относительной устойчивости таутомеров 6-аминоурацила .	52
2.8 ЯМР спектроскопия.....	53
ГЛАВА 3 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	54
3.1 Определение констант диссоциации 5-замещенных 6-метил- и 6-амино производных урацила	54
3.1.1 Потенциометрический метод	54

3.1.2	Спектрофотометрический метод	56
3.1.3	Метод растворимости.....	57
3.1.3.1	Зависимость растворимости 6-аминоурацила и 1-метил-6-аминоурацила от растворителя и температуры	58
3.1.4	Спектрально-люминесцентный метод.....	61
3.1.4.1	Кето-енольная и амин-иминная таутомерия 6-аминоурацила в воде и ДМСО.....	69
3.2	Изучение кислотно-основного равновесия 5-замещенных производных 6-метил- и 6-аминоурацила в водных растворах методами УФ и ЯМР спектроскопии	73
3.3	Определение анионного состава 5-циано-6-метилурацила.....	78
3.3.1	Синтез N-метилзамещенных модельных соединений 5-циано-6-метилурацила.....	78
3.3.2	Определение соотношения анионных форм 5-циано-6-метилурацила	80
ЗАКЛЮЧЕНИЕ		83
ВЫВОДЫ		84
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....		86
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....		88

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Кислотно-основное равновесие биомолекул в водных растворах играет одну из ключевых ролей в жизнедеятельности животных и растений. Среди них важное место занимают производные пиримидиновых оснований нуклеиновых кислот, входящие в состав ДНК и РНК. Процессы, вызванные кислотно-основным равновесием пиримидиновых оснований, например, урацила и тимина, проявляющих выраженную биологическую активность, могут приводить к возникновению ошибок при репликации ДНК, т.е. к мутациям.

Урацил и его 5- и(или) 6-замещенные производные являются слабыми двухосновными кислотами, pK_{a1} которых в водных растворах, в зависимости от природы заместителя при двойной связи пиримидинового кольца, составляет от 5.3 до 10.2. Поскольку в щелочных водных растворах производных урацила существует вероятность отрыва протона от двух N–H групп пиримидинового кольца, возникает необходимость в понимании порядка диссоциации. Модифицирование химической структуры производных урацила алкильными радикалами по атому азота позволяет получить модельные соединения для определения места первичного отрыва протона путем исключения одного из участков депротонирования.

В связи с этим изучение кислотно-основных свойств производных урацила в растворах и установление места первичного отрыва протона представляет значительный интерес.

Диссертационная работа выполнена в соответствии с планами научно-исследовательских работ УфИХ УФИЦ РАН «*Установление структуры, состава и физико-химических свойств органических, биоорганических, полимерных молекул и комплексных соединений методами хроматографии, масс-спектрометрии, ИК, УФ, ЭПР и ЯМР-спектроскопии*» (рег. номера АААА-А17-117011910027-0, АААА-А20-120012090029-0, 122031400282-9, 1021062311386-8-1.4.1, 123011300044-5).

Степень разработанности темы исследования. Большая часть исследований кислотно-основного равновесия производных урацила в водных растворах посвящена в литературе урацилу, тимину и 5-галогенурацилам. Другие производные изучались в меньшей степени. Для 5,6-замещенных урацилов имеется небольшое количество работ по определению констант диссоциации в растворах потенциометрическим и спектрофотометрическим методами, воспроизводимость которых не оценивалась или не рассматривалась вовсе другими авторами и методами. Изучению механизма диссоциации уделялось значительно меньше внимания, чем определению констант кислотно-основного равновесия.

Целью диссертационной работы является установление закономерностей кислотно-основного равновесия 5-замещенных производных 6-метил- и 6-аминоурацила в водных растворах. В соответствии с поставленной целью решались следующие **задачи**:

- Определить константы и термодинамические характеристики кислотно-основного равновесия 5-замещенных производных 6-метил- и 6-аминоурацилов в воде методами потенциометрического и спектрофотометрического титрования.
- Установить возможность определения pK_a для 6-аминоурацила методами спектрально-люминесцентным и растворимости в водных растворах.
- Определить наиболее стабильную таутомерную форму 6-аминоурацила в воде с учетом неспецифической и специфической сольватации квантово-химическим методом.
- Для 5-замещенных производных 6-метил- и 6-аминоурацила установить порядок диссоциации в водных растворах методами УФ и ЯМР спектроскопии. Выполнить синтез их моно-N-метилзамещенных производных для количественной оценки содержания анионов в водно-щелочных растворах.

Научная новизна. Методом потенциометрического и спектрофотометрического титрования впервые определены константы и

термодинамические характеристики кислотно-основного равновесия 5-(1-пентил-4-метил-1,2,3-триазол-4-ил)-6-метилурацила, 5-циано-6-метилурацила, 5-формил-6-метилурацила, 5-нитрозо-6-аминоурацила. Впервые методом растворимости определены значения констант диссоциации 6-аминоурацила в воде. Впервые предложен метод флюорометрического титрования для определения pK_a производных урацила. Впервые для 6-аминоурацила квантово-химическим методом рассчитан ряд относительной устойчивости восьми таутомеров в моделях неспецифической и специфической сольватации в воде и ДМСО. Синтезированы N-метилпроизводные 5-циано-6-метилурацила и определены их pK_a спектрофотометрическим методом. С использованием синтезированных модельных соединений определен порядок диссоциации 5-циано-6-метилурацила и его анионный состав в водных растворах.

Теоретическая и практическая значимость. Определены константы диссоциации ряда 5-замещенных производных 6-метил- и 6-аминоурацила в водных растворах, которые могут быть использованы в качестве справочных данных при планировании синтезов на основе этих соединений и прогнозировании их химической активности. Установлено влияние природы заместителей в 5-ом положении пиримидинового кольца на кислотно-основные свойства производных 6-метил- и 6-аминоурацилов в водных растворах. Определены центры депротонирования в молекулах рассматриваемых производных урацила. Предложен высокочувствительный метод флюорометрического титрования для определения pK_a производных урацила в воде на примере 6-аминоурацила, который может быть использован для исследования кислотно-основных свойств малорастворимых урацилов.

Методология и методы исследования. Для решения поставленных задач использованы классические методы исследования и установления состава, строения и кислотно-основных свойств производных урацила (электронная, ИК и ЯМР спектроскопия, ВЭЖХ, элементный анализ, а также квантово-химические расчеты).

Положения, выносимые на защиту.

1. Константы диссоциации и термодинамические характеристики кислотно-основного равновесия некоторых 5-замещенных производных 6-амино- и 6-метилурацилов в водных растворах.
2. Определение pK_a 6-аминоурацила в водных растворах методами спектрально-люминесцентным и растворимости.
3. Установление наиболее стабильной таутомерной формы 6-аминоурацила квантово-химическим методом с учетом специфической и неспецифической сольватации.
4. Установление порядка диссоциации и анионного состава 5-циано-6-метилурацила с использованием модельных соединений в водных растворах.

Достоверность результатов. Достоверность научных положений и выводов основана на значительном объеме экспериментальных данных, полученных с применением современного аналитического оборудования ЦКП «Химия» УФИХ УФИЦ РАН и РЦКП «Агидель» УФИЦ РАН, стандартных методов физико-химического анализа и статистической обработки полученных результатов. Полученные результаты не противоречат концепциям физической химии и известным закономерностям кислотно-основного и таутомерного равновесий производных урацила.

Апробация работы. Материалы научно-квалификационной работы доложены и обсуждены на II, III и IV Всероссийских молодежных конференциях «Достижения молодых ученых: химические науки» (Уфа, 2016, 2017 и 2021), на II и IV Всероссийских молодежных конференциях «Проблемы и достижения химии кислород- и азотсодержащих биологически активных соединений» (Уфа, 2017 и 2020), на V Молодежной школе-конференции «Современные аспекты химии» (Пермь, 2018), на I и II Всероссийских молодежных конференциях «Вершины науки - покорять молодым» (Уфа, 2019 и 2021), XIII Всероссийской школе-конференции молодых ученых «Теоретическая и экспериментальная химия жидкофазных систем» (Крестовские чтения) (Иваново, 2021) и XXXIV Симпозиуме «Современная химическая физика» (Туапсе, 2022).

Личный вклад автора заключается в изучении и обобщении литературы, участии в выборе темы, постановке задач, планировании и непосредственном проведении экспериментальных и расчетных работ, обсуждении и оформлении результатов исследований, подготовке статей и апробации работы.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 15 научных трудов, из них 5 статей в научных рецензируемых изданиях, входящих в перечень рекомендованных ВАК РФ, Web of Science и Scopus, 1 – в издании, входящем в РИНЦ, тезисы 9 докладов на Всероссийских конференциях.

Структура и объем научно-квалификационной работы. Научно-квалификационная работа изложена на 109 страницах машинописного текста, содержит 22 рисунка, 23 таблицы. Состоит из введения, литературного обзора, экспериментальной части, обсуждения результатов, выводов, списка литературы (174 наименований).

Автор выражает искреннюю признательность и благодарность научному руководителю в.н.с., к.х.н. Иванову С.П. за неоценимую помощь в постановке цели работы и обсуждении полученных результатов, сотрудникам лаборатории химической физики УФИХ УФИЦ РАН г.н.с., д.х.н. Хурсану С.Л. и с.н.с., к.х.н. Остахову С.С. Всем сотрудникам лаборатории ФХМА, в частности, с.н.с., к.х.н. Лобову А.Н., за научные консультации, помощь и поддержку, оказанные при выполнении работы. Также благодарю с.н.с. лаборатории биоорганической химии и катализа УФИХ УФИЦ РАН к.х.н. Черникову И.Б., с.н.с. лаборатории фармакофорных циклических систем УФИХ УФИЦ РАН к.х.н. Гимадиеву А.Р. и г.н.с. лаборатории химии нуклеотидных оснований ИОФХ им. А.Е. Арбузова ФИЦ КазНЦ РАН д.х.н. Семенова В.Э. за предоставленные соединения.

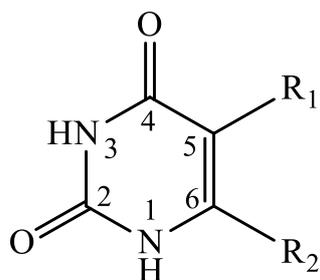
ГЛАВА 1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1 Биологические свойства производных урацила

Широкий спектр фармакологической активности различных производных пиримидинов представлен в обзорной статье [1], где соединения урацилового ряда рассматриваются как основа для синтеза перспективных соединений, направленных на расширение базы лекарственных средств данной химической группы. В обзоре, посвященном соединениям на основе урацила, описаны их кардиотропные, антигипоксические и противовирусные свойства [2]. В настоящее время этот класс лекарственных средств используется в качестве препаратов стимуляции регенераторных процессов иммуотропного и противовоспалительного действия [3].

Особое место в соединениях пиримидинового ряда занимает урацил и его производные, о чем свидетельствует широкий спектр их фармакологической активности и влияние на различные стороны метаболизма. В монографии [4] приводится достаточно подробная информация по синтезу и биологической активности производных урацила, модифицированных по всем положениям пиримидинового кольца.

В частности, соединения 5- и/или 6-замещенных производных урацила широко используются в медицинской практике. Например, **6CH₃U** и **5OH6CH₃U** с успехом применяются в роли стимуляторов регенерации тканей, в том числе костной [5].



U – R₁ = R₂ = H – Урацил;

6CH₃U – R₁ = H, R₂ = CH₃ – 6-метилурацил;

5OH6CH₃U – R₁ = H, R₂ = OH – 5-гидрокси-6-метилурацил.

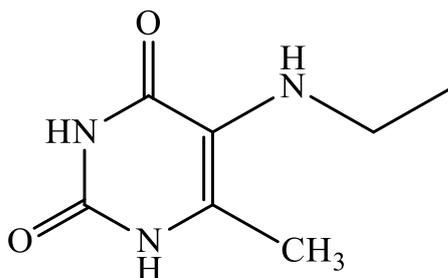
Также авторами [6] для указанных соединений была обнаружена способность повышать фагоцитарную активность лейкоцитов, что позволило расширить их терапевтическое применение. **6CH₃U** является широко известным и применяемым лекарственным средством [7]. Его химическая модификация, преимущественно по C5-положению гетероциклического кольца, может привести к улучшению известных и появлению новых биологических и химических свойств.

Одним из перспективных веществ является **5OH6CH₃U**. По данным [7] это вещество обладает более высокими антиоксидантными и иммуностимулирующими свойствами, чем 6-метилурацил. Другими авторами в работе [8] определена клинико-иммунологическая эффективность 5-гидрокси-6-метилурацила у больных вторичным иммунодефицитным состоянием. Соединение проявляет сильное ингибирующее действие на реакции перекисного окисления. По результатам работы [9] показано, что **5OH6CH₃U** может быть использован в качестве эффективной ловушки пероксильных радикалов.

Многие производные урацила исследованы с точки зрения антиоксидантной активности, чему посвящен обзор [10]. Особое внимание уделено 5-гидрокси-6-метилурацилу и 6-метилурацилу, предложен метод увеличения эффективности их антиоксидантной активности с помощью сочетания с гепатопротекторами.

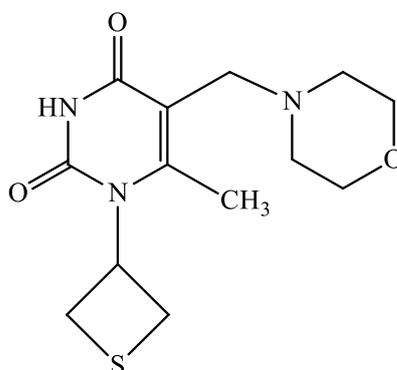
Антирадикальные свойства ряда производных: **5OH6CH₃U**, **5Br6CH₃U**, **5NH₂6CH₃U**, **5NO₂6CH₃U**, **5CH₂NC₅H₁₀6CH₃U** и **5O(CH₂CH₂)₂NCH₃6CH₃U** изучены на реакцию инициированного окисления 1,4-диоксана [11]. Также некоторые из производных 6-метилурацила были исследованы на антиокислительную эффективность в реакциях радикально-цепного окисления изопропилового спирта [12], где наибольшую ингибирующую способность проявляет 5-гидрокси-6-метилурацил.

Низкая токсичность и гепатозащитные свойства производных 6-метилурацила, таких как (5-этиламино-6-метилурацил, 5-диметиламино-6-метилурацил, 5-морфолинометил-6-метилурацил) от действия тетрахлорметана рассмотрены в работе [13].



Предположено, что такая активность связана с выраженными антиоксидантными свойствами у исследуемых соединений. Так, по результатам FRAP-теста 5-этиламино-6-метилурацил имеет высокую восстанавливающую способность, приближающуюся по значениям к свойствам аскорбиновой кислоты. Это позволяет перейти к исследованию *in vivo* гепатопротекторных свойств.

Результаты исследования [14] показали, что 6-метил-5-морфолинометил-1-(тиетанил-3)урацил вызывал у крыс увеличение ориентировочно-исследовательской деятельности, снижение эмоциональной тревожности, увеличение резервных возможностей фагоцитов и проявлений антиокислительной активности.



5-Амино-6-метилурацил и его метилпроизводные были исследованы на антирадикальную активность в системе инициированного радикально-цепного окисления 1,4-диоксана [15]. Авторы связывают ингибирующую активность исследованного соединения с наличием аминогруппы в 5 положении.

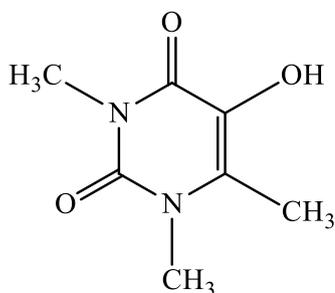
Авторами [16] предложена тест система с использованием радикалов 2,2-дифенил-1-пикрилгидразила для экспресс оценки антиоксидантной активности урацилов. Наибольшую антиоксидантную активность среди изученных соединений проявили производные урацила с протоно-донорными группами в С5

положении $-\text{NH}_2$, $-\text{NHAlk}$ и $-\text{OH}$. Также данные соединения проявили высокую железовосстанавливающую активность.

Некоторые 5-замещенные производные 6-метилурацила исследованы методом УФ спектроскопии с точки зрения окисления их озоном в водных растворах. Авторами, по результатам работ с $6\text{CH}_3\text{U}$, $5\text{Br}6\text{CH}_3\text{U}$, $5\text{NO}_26\text{CH}_3\text{U}$ [17] и $5\text{OH}6\text{CH}_3\text{U}$ [18], предположено, что механизм лимитирующей стадии является единым для изученных урацилов.

Если рассматривать соединения с амино- или гидроксо- группой в С5-положении $6\text{CH}_3\text{U}$ как перспективные антиоксиданты [9, 19], то нитрильная группа [20] используется для картирования белков в качестве вибрационного зонда биомолекулы. В работах [21, 22] изучался ряд производных 5-карбонитрилурацила. Результаты исследования показали, что нитрильная группа при пиримидиновом кольце также может быть вибрационным зондом в ИК спектроскопии для исследования ДНК олигомеров.

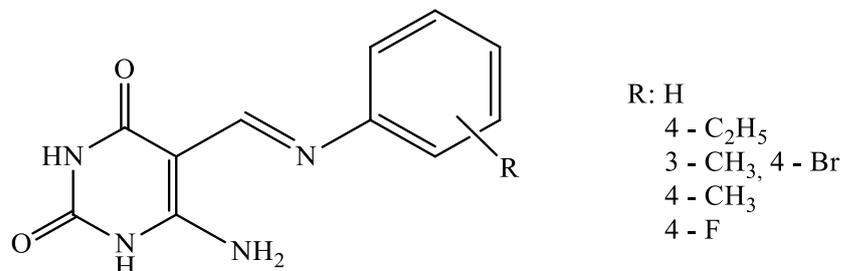
Установлено, что соединения 5-гидрокси-1,3,6-триметилурацила могут быть эффективными ингибиторами изоформ циклооксигеназы (ЦОГ) с повышенной селективностью действия в отношении ЦОГ-2 и обладают выраженной противовоспалительной активностью [23]. Некоторые производные $6\text{CH}_3\text{U}$ могут быть использованы в терапии болезни Альцгеймера [24], а также в качестве перспективного класса ингибиторов холинэстераз [25], способных без угнетения дыхания оказывать избирательный миорелаксирующий эффект на локомоторные мышцы мышей, крыс и собак.



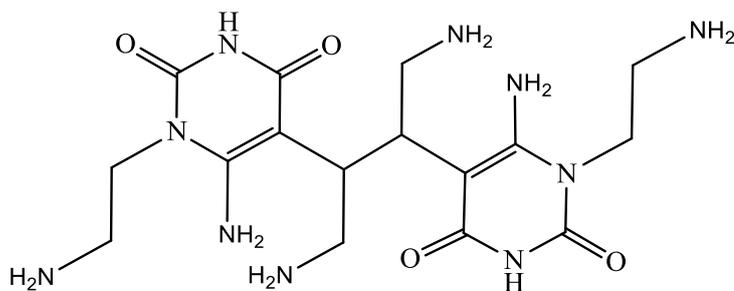
Обнаружено, что $6\text{NH}_2\text{U}$ и $5\text{CH}_36\text{NH}_2\text{U}$ в микромолярных концентрациях ингибируют как катаболические, так и анаболические реакции фермента тимидинфосфорилазы *in vitro* [26, 27] и урацил-ДНК-гликозилазу [28]. Метил- и

галоген- заместители в 5 положении 6-аминоурцила увеличивают ингибирующую способность тимидин фосфорилазы в 2-9 раз [29].

Введение в анилиновый фрагмент молекулы производных **6NH₂U** одновременно липофильных и гидрофильных радикалов могут потенциально проявлять противовирусную и противотуберкулезную активность [30].



Некоторые производные **6NH₂U** рассматривают в качестве перспективного миорелаксанта гладкой мускулатуры с инотропным действием на сердце кроликов [31]. Новый синтезированный ациклический нуклеозид обладает мощной и эффективной антимикробной активностью, в частности антибактериальной, и может быть использован в качестве антибактериального средства [32].



Таким образом, производные урацила находят широкий спектр применения в области медицины в качестве препаратов стимуляции регенераторных процессов, противотуберкулезной активности. Они могут быть использованы в терапии болезни Альцгеймера, а также в качестве перспективного класса ингибиторов холинэстераз. Возможно использование в качестве миорелаксанта без угнетения дыхания. Производные урацила имеют низкую токсичность и, в зависимости от природы заместителей в кольце, обладают антиоксидантными,

кардиотропными, антигипоксическими, противовирусными, противовоспалительными, антимикробными, антибактериальными, иммуностропными, гепатозащитными свойствами.

1.2 Структура и таутомерные превращения производных урацила

Урацил и его 5,6-замещенные производные теоретически могут существовать в шести таутомерных формах (Рисунок 1.1). По данным ИК спектроскопии у **6CH₃U** [33] и **6NH₂U** [34, 35] имеются валентные колебания $\nu(\text{C}=\text{O})$ и $\nu(\text{C}=\text{N})$ обеих структур, находящиеся в области 1650-1750 cm^{-1} , $\nu(\text{N}-\text{H})$ – в области 3200-2900 cm^{-1} и деформационные $\delta(\text{N}-\text{H})$ – в областях 1300-1400 и 1500-1600 cm^{-1} . Такой набор полос соответствует таутомеру в дикетоформе. В пользу дикетоформы также свидетельствуют результаты рентгеноструктурного анализа для **6CH₃U** [36, 37] и **6NH₂U** [35].

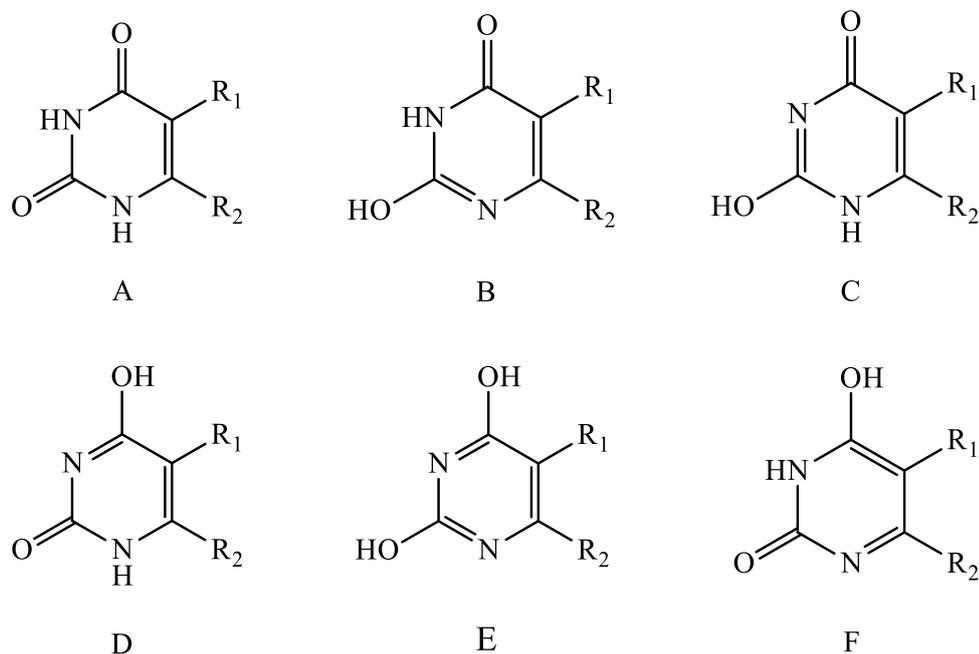


Рисунок 1.1 – Кето-енольные таутомеры 5,6-замещенных производных урацила

Влияние метильного заместителя на геометрические параметры урацила показано методом ИК спектроскопии [38]. Геометрические параметры молекулы урацила незначительно отличаются от 5-метилурацила, о чем свидетельствует

слабое влияние метильной группы в 5 положении урацила на структуру пиримидинового кольца. На основании данных ИК спектроскопии и рентгеноструктурного анализа показано [39-42], что, вне зависимости от заместителя в 5 положении 6-метил- и 6-аминоурацила, основной формой в газовой фазе является дикето таутомер. Флюорометрическим методом была предпринята попытка обнаружить таутомеры А, В, D и Е **5FU** [43] в водных растворах. В нейтральных водных растворах удалось определить их процентное содержание, которое составляло для тауомера: А – 99.5%, В – 0.4%, D – 0.03%, Е – 0.008%. В связи с чем предположено [44], что флюоресценция тауомеров **5FU** происходит путем возбуждения гомоассоциатов урацила с последующим внутримолекулярным переносом протона с образованием пары редких тауомеров (Рисунок 1.2).

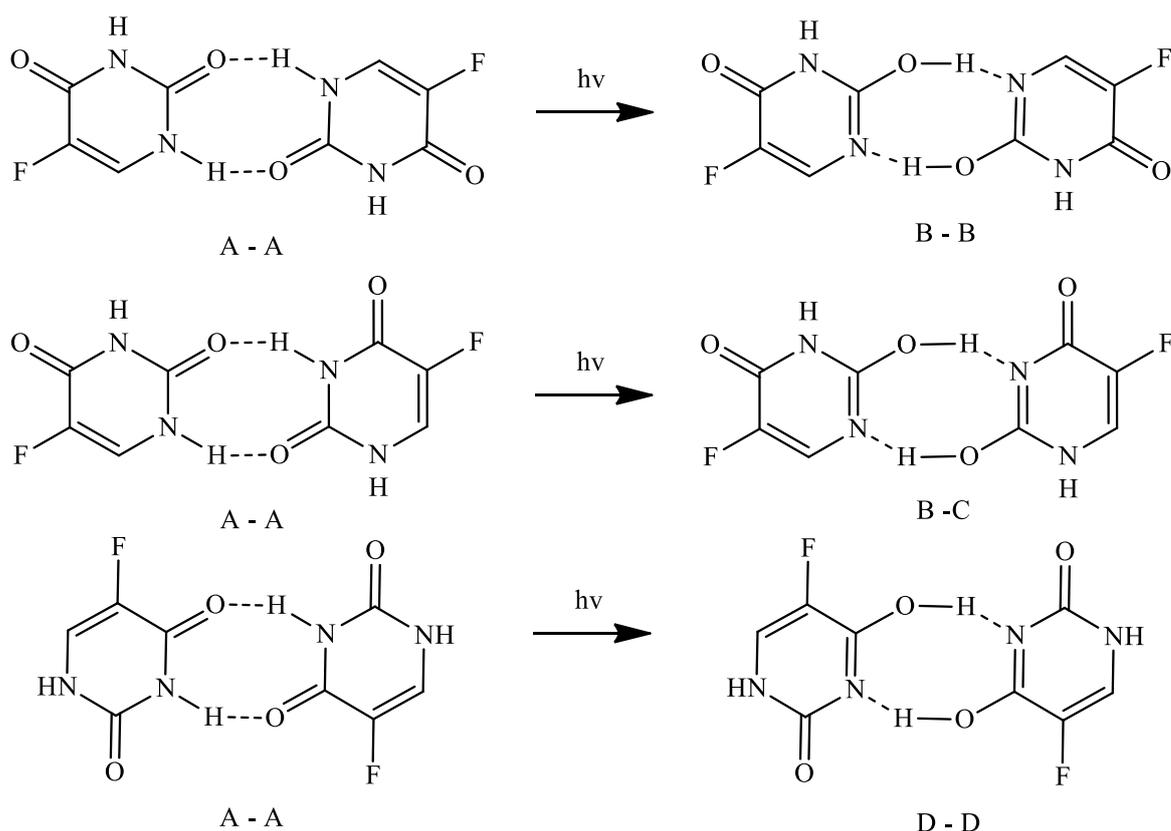


Рисунок 1.2 – Согласованный внутримолекулярный перенос протона в некоторых димерах **5FU**, инициированный фотооблучением

Проблема в исследовании тауомерных перегруппировок производных урацила обусловлена очень низким содержанием минорных форм, вследствие

чего их определение инструментальными методами затруднено. В связи с этим оценку существования таутомерных форм проводят расчетными квантово-химическими методами. Получение ряда стабильности таутомерных форм представляет интерес с точки зрения не только установления наиболее стабильного таутомера, но и выяснения порядка устойчивости минорных таутомерных форм.

При оценке термодинамической стабильности таутомерных форм и рядов устойчивости, сформированных на их основе, решающую роль играет выбранный квантово-химический метод расчета и корректная модель учета растворителя.

Для определения влияния метода расчета на ряд относительной устойчивости таутомеров урацила с использованием литературных данных [45-50] для газовой фазы была построена диаграмма (Рисунок 1.3).

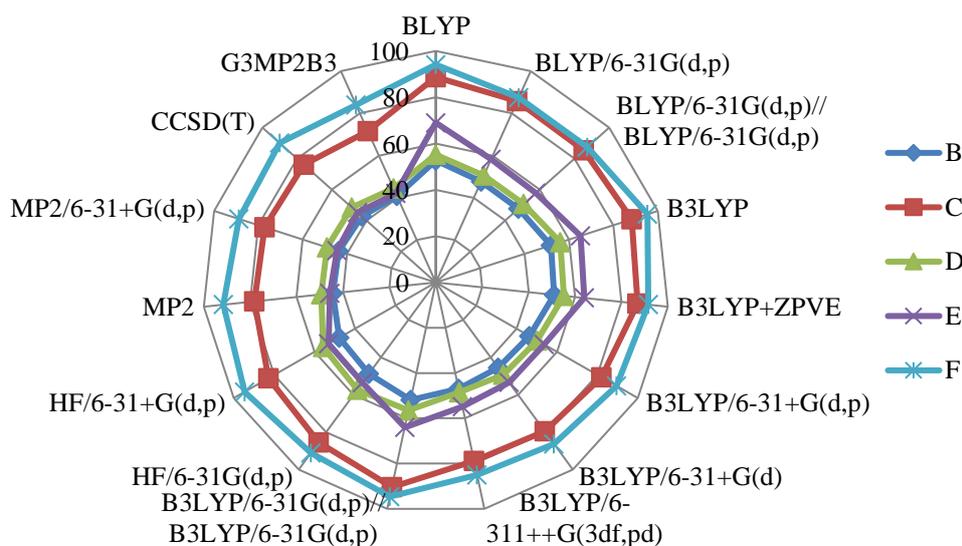


Рисунок 1.3 – Относительная устойчивость таутомеров урацила в зависимости от метода расчета в газовой фазе (ΔG , кДж/моль)

Согласно диаграмме в газовой фазе сохраняется общая тенденция ряда относительной устойчивости $A < B < D < E < C < F$ таутомерных форм для BLYP и B3LYP семейства вне зависимости от выбора базисного набора, с другой стороны для некоторых методов расчета таких как G3MP2B3, MP2, CCSD(T) и HF ряд приобретает вид $A < B < E < D < C < F$. Несмотря на данные противоречия для урацила

наиболее стабильным таутомером в газовой фазе, вне зависимости от метода расчета, является дикето таутомер. Следует отметить, что включение поляризованных р-орбиталей и диффузных функций не оказывают существенного влияния на предсказание относительной устойчивости таутомерных форм и оптимизацию геометрии структуры таутомера.

В таблице 1.1 представлены значения энергии Гиббса для таутомерных форм производных урацила с заместителями в 5 и 6 положении в газовой фазе относительно наиболее стабильного таутомера А.

Таблица 1.1 – Относительная устойчивость наиболее стабильных таутомерных форм производных урацила в газовой фазе (ΔG , кДж/моль)

Соединение	Метод	Таутомеры					Лит.
		B	C	D	E	F	
T	HF/6-31G(d,p)	49.2	74.6	62.3	58.1	115.3	[47]
	HF/6-31+G(d,p)	48.1	80.5	60.6	57.0	113.9	[47]
	MP2/6-31+G(d,p)	42.2	74.9	51.8	44.5	102.4	[47]
	G3MP2B3	39.8	68.9	48.4	44.4	91.1	[50]
5FU	HF/6-31G(d,p)	42.9	75.1	61.2	63.6	94.9	[47]
	HF/6-31+G(d,p)	41.3	72.6	60.0	62.3	93.2	[47]
	MP2/6-31+G(d,p)	35.6	68.0	52.2	49.8	93.4	[47]
	MP4(SDTQ)/def2-TZ-VPP//PBE0/TZVPP	41.8	75.7	56.8	47.8	84.6	[51]
	MP2/6-31+G(d,p)	35.2	64.9	50.5	40.5	83.2	[52]
	G3MP2B3	32.8	61.7	48.6	37.5	83.3	[50]
5CIU	G3MP2B3	34.8	64.7	47.1	38.0	73.6	[50]
	B3LYP/6-311++G(3df,pd)	40.8	71.7	50.4	50.2	74.7	[49]
5OHU	G3MP2B3	34.8	53.8	62.3	52.5	104.4	[50]
5NH₂U	G3MP2B3	33.9	59.1	56.9	45.9	80.4	[50]
6CIU	B3LYP/6-311++G(3df,pd)	36.3	78.1	46.5	41.5	65.8	[49]
6CH₃U	G3MP2B3	40.9	72.2	43.9	42.2	82.7	[50]
5OH6CH₃U	G3MP2B3	35.7	55.1	61.9	52.8	101.2	[50]
	PBE/3z	39.3	57.6	63.5	65.0	102.2	[53]
5NH₂6CH₃U	PBE0/cc-pVTZ	41.4	68.7	68.7	56.8	81.1	[54]
	G3MP2B3	34.6	61.2	54.9	44.3	78.2	[50]

Из таблицы 1.1 видно, что порядок B<E<D<C<F таутомерных форм сохраняется для всех производных урацила, однако выбранный метод расчета может повлиять на порядок в ряду относительной устойчивости таутомерных форм [47, 49, 51]. Присутствие атома хлора в шестом положении увеличивает стабильность всех

таутомеров енольной формы [49] по сравнению с **5FU**. Кроме того, все таутомеры **6CIU** более стабильны, чем **5CIU**, за исключением таутомера С.

Растворитель влияет на устойчивость таутомеров через водородные связи (образование комплексов с молекулами растворителя) или поляризацию растворенного вещества растворителем. Многие работы [47, 50-56] посвящены определению рядов устойчивости урацила и его производных для водных растворов (Таблица 1.2).

Таблица 1.2 – Относительная устойчивость производных урацила при учете неспецифической сольватации в воде и 1,4-диоксане (ΔG , кДж/моль)

Соединение	Метод	Таутомеры					Лит.
		В	С	D	Е	F	
PCM (Вода)							
U	HF/6-31G(d,p)	54.3	70.0	53.8	66.1	71.7	[47]
	HF/6-31+G(d,p)	54.0	65.4	52.0	67.0	69.0	[47]
	MP2/6-31+G(d,p)	49.0	62.9	45.8	54.6	66.7	[47]
T	HF/6-31G(d,p)	55.2	71.5	56.4	68.1	104.6	[47]
	HF/6-31+G(d,p)	55.4	68.0	53.5	68.3	101.9	[47]
	MP2/6-31+G(d,p)	49.5	63.3	45.6	54.3	89.5	[47]
5FU	HF/6-31G(d,p)	40.0	52.5	63.2	70.8	82.1	[47]
	HF/6-31+G(d,p)	37.9	46.9	62.6	71.0	80.0	[47]
	MP2/6-31+G(d,p)	55.4	47.7	53.9	55.0	72.8	[47]
	MP4(SDTQ)/def2-TZ-VPP//PBE0/TZVPP	56.4	63.7	55.7	75.4	86.4	[51]
5NH₂U	G3MP2B3	48.1	35.5	30.8	63.5	64.6	[56]
5NH₂6CH₃U	PBE0/cc-pVTZ	51.5	56.7	49.5	71.9	85.9	[54]
5OH6CH₃U	B3LYP/6-311+G(2d,p)	42.0	43.5	46.4	65.0	76.7	[53]
PCM (1,4 Диоксан)							
U	HF/6-31G(d,p)	51.1	79.5	55.9	58.7	86.1	[47]
	HF/6-31+G(d,p)	50.4	76.4	54.3	58.7	85.1	[47]
	MP2/6-31+G(d,p)	46.0	71.8	47.7	48.7	80.3	[47]
T	HF/6-31G(d,p)	51.7	78.5	60.0	62.1	111.5	[47]
	HF/6-31+G(d,p)	51.1	75.8	57.9	61.5	109.7	[47]
	MP2/6-31+G(d,p)	48.4	70.6	49.6	48.4	98.2	[47]
5FU	HF/6-31G(d,p)	10.3	66.4	61.9	66.5	90.1	[47]
	HF/6-31+G(d,p)	40.1	62.9	60.9	65.8	88.3	[47]
	MP2/6-31+G(d,p)	35.1	60.2	52.9	51.9	80.4	[47]

Для определения влияния растворителя на порядок стабильности таутомеров в работе [45] было изучено взаимодействие кето-енольных таутомеров **U** с водой. Предложена структура молекулы урацила с водой и проведена

сравнительная характеристика относительно исходной структуры урацила. Так, с помощью метода HF/6-31+G(d,p) таутомеры **U** при переходе от газовой фазы к РСМ модели в воде ряд принимает вид $A < B < D < C < E < F$, в то время как для 1,4-диоксана – $A < B < D < E < C < F$ [47].

Для **5FU** в приближении MP2/6-31+G(d,p) при переходе от газовой фазы к неспецифической сольватации в воде [47] наблюдается уменьшение ΔG таутомеров **C** и **F** на 20.2 и 20.6 кДж/моль соответственно, и увеличение ΔG формы **B** на 20.2 кДж/моль. Относительная устойчивость таутомеров **D** и **E** практически не изменилась (менее 1 кДж/моль). При учете в качестве растворителя 1,4-диоксана также наблюдается уменьшение относительной энергии для таутомеров **C** и **F** на 7.8 и 13.0 кДж/моль соответственно. Для остальных таутомеров изменения составили менее 1 кДж/моль. Видно, что таутомер **C** становится более стабильным, чем **E**, при переходе от газовой фазы к полярной среде.

Помимо неспецифической сольватации часто применяется метод учета растворителя в явном виде. Так, в работах [45, 47, 50, 52-56] были применены модели специфической (от 1 до 5 молекул воды) и неспецифической сольватации.

Проблемы при изучении таутомерии в растворах включают высокие скорости таутомерного равновесия, низкое содержание минорных таутомеров и высокое химическое и структурное сходство между соответствующими минорными и основными таутомерными видами. Несмотря на данные экспериментальные сложности, в спектрах люминесценции и фотопоглощения **U** и **T** возможно зарегистрировать некоторые минорные таутомеры. Полученные данные хорошо согласуются с квантово-химическими расчетами [57, 58]. Исследования таутомеров **U** и **T** в газовой фазе и с учетом одной и двух молекул воды представлены в работе [55]. Низкий квантовый выход флуоресценции урацила и тимина привел к тому, что экспериментальные условия были чувствительны ко всем видам эффектов. Таким образом, популяция редких енольных форм **U** и **T** будет очень низкой. Включение в РСМ модель молекул воды от 0 до 7 для 5-аминоурацила и 8 для **6NH₂U** в явном виде позволяет

избежать нестабильной структуры, делая планарный минимум более устойчивым [59].

При исследовании относительной устойчивости тавтомерных форм **5OH6CH₃U** [53] с водой в соотношении 1:1, 1:2, 1:3 и 1:4 использовали метод теории функционала плотности PBE/3z.

Таблица 1.3 – Относительная устойчивость производных урацила с учетом специфической сольватации в газовой фазе и при использовании РСМ в воде (ΔG , кДж/моль)

Соединение	Метод	Таутомер					Лит.
		B	C	D	E	F	
1H ₂ O							
U	MP2/6-31G(d,p)	34.8	61.1	39.0	38.1	82.4	[55]
T	MP2/6-31G(d,p)	33.2	69.8	41.9	38.9	88.7	[55]
2H ₂ O							
U	MP2/6-31G(d,p)	35.6	62.5	37.5	41.0	83.4	[55]
T	MP2/6-31G(d,p)	30.2	46.5	33.7	36.2	66.6	[55]
3H ₂ O							
5FU	MP2/6-31+G(d,p)	34.1	-	53.7	-	-	[52]
4H ₂ O							
5OH6CH₃U	B3LYP/6-311+G(2d,p)	47.2	69.3	29.1	45.1	113.7	[53]
5H ₂ O							
U	G3MP2B3	39.7	52.8	25.2	46.2	117.7	[50]
T	G3MP2B3	38.8	51.2	27.3	47.4	122.7	[50]
5FU	G3MP2B3	33.2	45.4	27.8	42.2	117.2	[50]
5CIU	G3MP2B3	34.2	47.5	27.5	42.9	108.7	[50]
5OHU	G3MP2B3	34.5	41.0	35.4	51.1	133.2	[50]
5NH₂U	G3MP2B3	34.8	44.7	32.1	47.5	110.6	[50]
6CH₃U	G3MP2B3	41.0	53.6	24.5	47.4	114.5	[50]
5OH6CH₃U	G3MP2B3	36.0	42.5	35.4	53.6	129.9	[50]
5NH₂6CH₃U	G3MP2B3	35.7	46.1	30.6	48.0	105.8	[50]
4H ₂ O РСМ (Вода)							
5OH6CH₃U	B3LYP/6-311+G(2d,p)	28.9	32.5	27.0	45.3	83.2	[53]
5H ₂ O РСМ (Вода)							
U	G3MP2B3	41.2	48.1	28.6	52.5	74.8	[50]
T	G3MP2B3	39.3	46.2	29.1	52.0	78.0	[50]
5FU	G3MP2B3	33.6	38.7	31.5	48.5	-	[50]
5CIU	G3MP2B3	34.2	41.7	31.6	49.2	-	[50]
5OHU	G3MP2B3	39.9	36.5	35.1	53.2	88.9	[50]
5NH₂U	G3MP2B3	36.8	40.8	31.7	50.9	78.3	[50]
6CH₃U	G3MP2B3	41.3	48.7	27.9	52.9	74.3	[50]
5OH6CH₃U	G3MP2B3	30.7	38.0	34.3	54.0	85.7	[50]
5NH₂6CH₃U	G3MP2B3	36.8	42.1	29.7	50.3	73.3	[50]

Обнаружено, что ряд устойчивости таутомеров и его изменение зависит от количества молекул воды в ближайшем окружении таутомера. Влияние воды как растворителя учитывалось с использованием модели континуума (B3LYP/6-311+G(2d,p)). Влияние комплексообразования и эффекты среды существенно сказались на ряде стабильности таутомеров (Таблица 1.3). Несмотря на то, что таутомер А оставался наиболее стабильной формой **5ОН6СН₃U** в растворе, снижение энергии дикетоформы при гидратации было меньше, чем для енольных форм.

Увеличение количества молекул воды в сольватационной модели от одной до двух в явном виде приводит к уменьшению относительной энергии для таутомеров С и F тимина и составляет 46.5 и 66.6 кДж/моль соответственно. Для таутомеров В, D, E она уменьшилась не более чем на 8 кДж/моль [55].

Учет неспецифической сольватации тетрагидратного комплекса 5-гидрокси-6-метилурацила [53] приводит к заметному уменьшению относительной устойчивости таутомерных форм В, С, F на 18.3, 36.8, 30.5 кДж/моль соответственно

С целью описания влияния молекул воды в явном виде, авторами [52], рассчитан ряд относительной устойчивости для **5FU**. В газовой фазе ряд имеет вид: $A < B < E < D$. При учете трех молекул воды ряд принимает вид: $A < B < D < E$.

Авторами [50] исследован порядок относительной устойчивости ряда производных урацила: **5FU**, **5CIU**, **5NH₂U**, **5OHU**, **T**, **6СН₃U**, **5ОН6СН₃U** и **5NH₂6СН₃U**. Результаты были получены с использованием композитных (G3MP2B3) и DFT (TPSS) методов. Расчеты проводились для водных растворов с учетом специфической и неспецифической гидратации. Было показано, что энергия гидратации таутомеров существенно различается и приводит к перераспределению в ряду устойчивости таутомеров урацила. Ряды устойчивости представленных производных урацила принимают вид при учете специфической сольватации с использованием пятиводного кластера – $A < D < B < C < E < F$. Специфическая сольватация определяется образованием водородных связей с молекулой урацила, что приводит к стабилизации таутомеров С и D. Влияние

заместителя в пятом положении пиримидинового кольца на энергию таутомеров менее заметно.

Также было оценено процентное содержание кето-енольных таутомерных форм. Наиболее стабильным таутомером для производных урацила является дикето форма. Вероятность нахождения таутомерных форм можно оценить методом распределения Больцмана [59]:

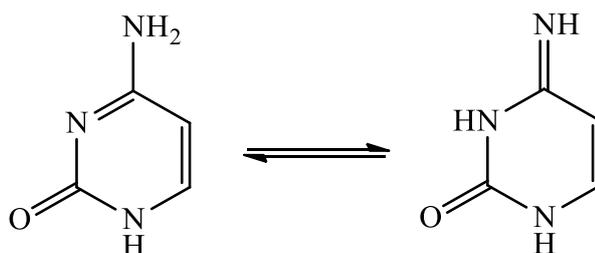
$$a = \frac{e^{-\frac{\Delta H_i}{RT}}}{\sum_1^n e^{-\frac{\Delta H_i}{RT}}} \quad (1.1)$$

Если проанализировать литературные данные из таблиц 1.1-1.3, процентное содержание минорного таутомера, рассчитанное по формуле (1.1), составляет 10^{-5} – 10^{-6} %. Однако для **5FU** в работе [47] содержание минорного таутомера В, рассчитанное по этой же формуле, составляет уже 0.016 %, что, в свою очередь, увеличивает вероятность обнаружения данного таутомера инструментальными методами.

1.2.1 Таутомерные перегруппировки с участием -NH₂, -SH, -OH групп

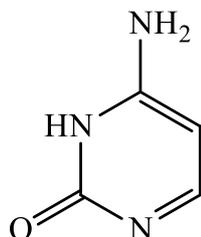
Некоторые заместители при С5 и С6 могут вступать в таутомерные перегруппировки с участием пиримидинового кольца, о чем свидетельствуют многочисленные работы по исследованию таких перегруппировок как –NH₂ в =NH [60-63], –SH в =S [63], –OH в =O [64-68].

Одним из представителей пиримидиновых оснований, входящих в ДНК и РНК, является цитозин. Для него возможна следующая перегруппировка:



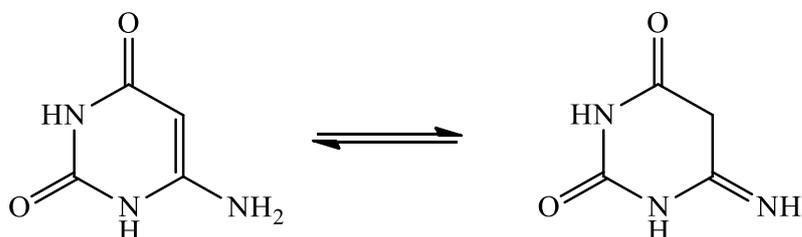
В работах [60, 61] квантово-химическим методом показано, что в газовой фазе наиболее вероятно образуется наряду с аминной, также и иминная форма,

поскольку разница между энергиями этих форм составляет менее 2 кДж/моль [61]. Несмотря на это, самым устойчивым таутомером в воде и ацетонитриле является таутомер в аминной форме. Гидратация цитозина будет уменьшать относительную устойчивость в пользу таутомера с аминогруппой. В растворе вторым по устойчивости, в отличие от газовой фазы, является таутомер:

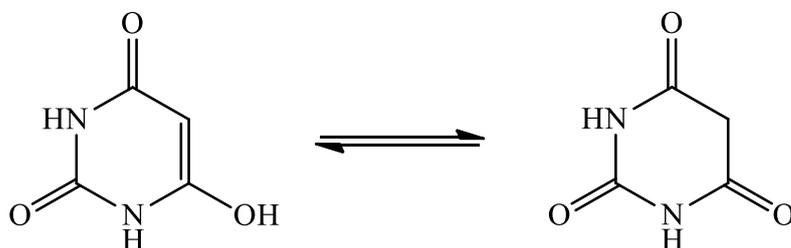


Заместитель в пиримидиновом кольце может влиять не только на порядок относительной устойчивости рассматриваемых кето-енольных форм производных урацила, но и сам вступать в таутомерные перегруппировки.

Так, например, **6NH₂U** может претерпевать помимо кето-енольной перегруппировки, также и амин-иминную [69]. Существование амин-иминных форм также подтверждается данными РСА [70].



У барбитуровой кислоты может наблюдаться следующее таутомерное равновесие [64]:



Расчет относительной устойчивости таутомерных форм барбитуровой кислоты свидетельствует о преимущественном образовании кето-формы. Вторым по устойчивости является таутомер с енольной формой у С6. Аналогичные результаты для барбитуровой кислоты были получены в работе [65].

енольной перегруппировки примерно на 100–120 кДж/моль по сравнению с моделью без воды.

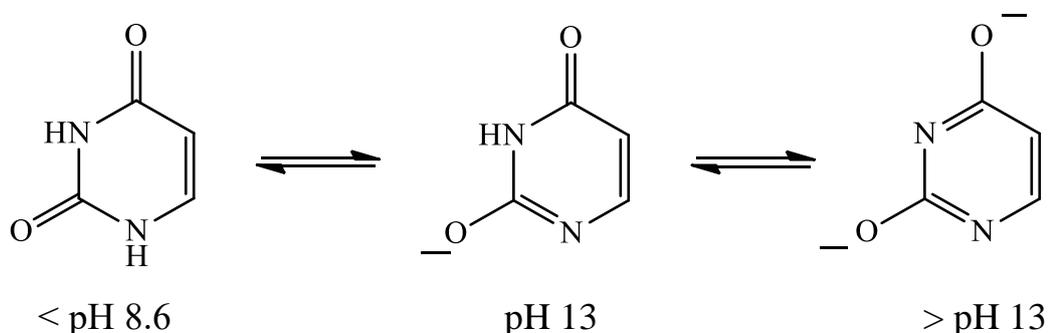
Таким образом, по результатам вычислений во всех случаях дикето-таутомер показал себя наиболее стабильной формой. Исходя из литературных данных учет растворителя, как в явном виде, так и при учете неспецифической сольватации может существенно менять порядок и значения относительной устойчивости таутомерных форм. Общий порядок устойчивости таутомеров для каждого урацила может меняться в зависимости от количества молекул воды в сольватной оболочке и заместителей при атомах углерода C5 и C6 пиримидинового кольца. Помимо кето-енольных перегруппировок производных урацила существуют таутомерные перегруппировки с участием групп $-\text{NH}_2$, $-\text{SH}$, $-\text{OH}$ которые возможны в зависимости от заместителя при C5 и C6, имеющие частный характер при рассмотрении рядов относительной устойчивости.

1.3 Кислотно-основные свойства производных урацила

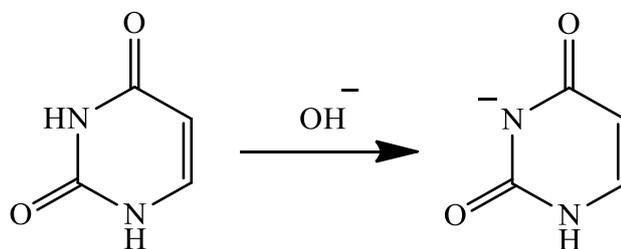
Активное изучение влияния pH на электронные спектры поглощения производных урацила началось в 50-х годах XX в. [72-78]. Многочисленные исследования поведения производных урацила в водных растворах при различных pH свидетельствовали о возможности существования разных структур, а именно: анионов, катионов, цвиттер-ионных форм, нейтральных и ионизированных таутомерных форм.

В спектрах поглощения нейтральных и кислых растворов производных урацила наблюдаются максимумы поглощения в области 200–370 нм [79]. Первый – в области 200–240 нм соответствует $\pi-\pi^*$ переходу карбонильной группы, а второй – в области 240–370 нм, относят к $\pi-\pi^*$ переходу хромофорной группы – $\text{C}=\text{C}-\text{C}=\text{O}$ [80]. Многочисленные исследования методом УФ спектроскопии свидетельствуют о том, что в нейтральном водном растворе производные урацила находятся в дикетоформе [29, 73, 77-79, 81-104].

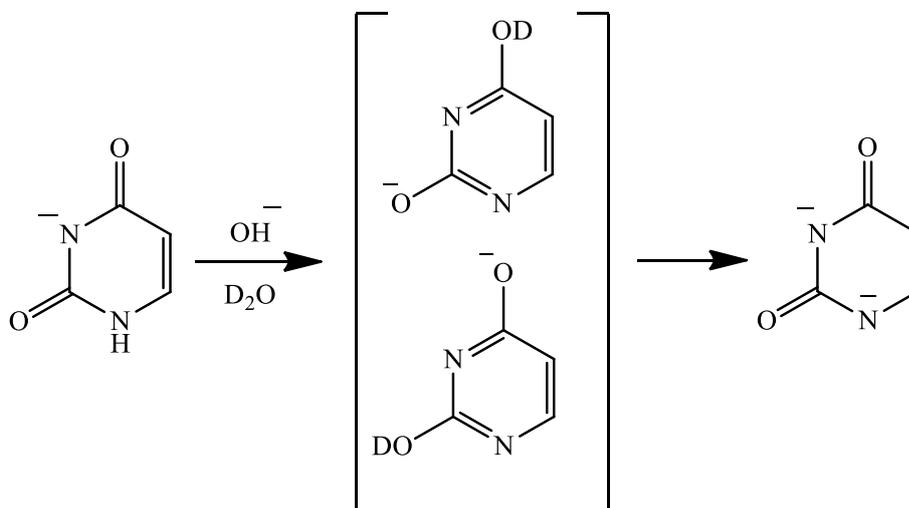
Увеличение pH водных растворов пиридиновых оснований приводит к смещению максимума полосы поглощения в УФ спектрах. В частности в диапазоне pH 10.5–13.0 наблюдается bathochromное смещение максимума полосы поглощения **U** на 24 нм [73]. Авторы связывают его с равновесием:



В работе [90] методом ЯМР спектроскопии исследовано кислотно-основное равновесие **U**. Авторами методом ЯМР ^{13}C проанализированы нейтральные и щелочные растворы урацила в ДМСО. Увеличение pH раствора сопровождается изменениями в сигналах атомов углеродов C2, C4 и C6. Сигнал атома C5 остается без изменения. Такие трансформации, по мнению авторов, связаны с образованием моноаниона **U** с отрывом протона от N3:



Дальнейшее увеличение pH раствора приводит к отрыву второго протона от атома N1.



Вышесказанное свидетельствует о том, что **U** подвергается депротонированию. Отрыв протона можно охарактеризовать при помощи константы диссоциации:

$$K_d = \frac{[H^+][A^-]}{[HA]}$$

Существование различных методов определения констант диссоциации позволяет, при необходимости, выбрать наиболее подходящий метод исследования для соединений, у которых есть один выраженный физико-химический параметр, например такой как, коэффициент экстинкции, растворимость, электропроводность и т.д. Среди различных производных пиримидиновых оснований, наиболее изученными соединениями с точки зрения кислотно-основного равновесия являются **U** и **T**. В таблице 1.4 представлены значения их констант диссоциации, полученные различными методами определения.

Таблица 1.4 – Значения pK_a урацила и тимина в воде в зависимости от метода определения при 25 °С

Метод	U	T	Литература
Спектрофотометрический метод	9.42	9.75	[87]
	9.43	9.90	[88]
	9.50	9.95	[86]
Потенциометрический метод	9.46	9.85	[105]
Калориметрический метод	9.46	9.90	[106]
Кондуктометрический метод	9.45	9.94	[107]
Метод ЯМР	9.70	-	[90]
Метод ЭДС	9.36	9.86	[108]
Квантово-химический метод (CBS-QB3)	9.14	9.74	[109]

Из таблицы видно, что значения для **U**, полученные квантово-химическим и ЯМР методами, несколько отличаются от значений pK_a , определенных другими методами. Несмотря на это, остальные значения pK_a , находятся в пределах погрешности, и имеют хорошую сходимость констант кислотно-основного равновесия вне зависимости от используемого метода.

Наиболее распространенным при изучении кислотно-основных свойств **U** и его производных в растворах является спектрофотометрический метод, достоинством которого является возможность определения pK_a с высокими и низкими значениями (меньше 2.0 и больше 11) и малорастворимых соединений.

Поскольку производные урацила являются плохо растворимыми в воде соединениями, то использование спектрофотометрического метода хорошо подходит для определения констант диссоциации в отличие от потенциометрического метода.

Величины pK_a по первой ступени для некоторых 5- и/или 6-замещенных производных урацила, определенных потенциометрическим и спектрофотометрическим методами, представлены в таблице 1.5.

Таблица 1.5 – Значения pK_a 5- и/или 6-замещенных производных урацила в воде при 25 °С

Соединение	Учет ионной силы	Метод	pK_a	Лит.
6FU	–	СФ	4.03	[110]
5,6-diClU	–	СФ	4.77 ± 0.04	[111]
5Cl6BrU	–	СФ	4.83 ± 0.03	[112]
6Cl5BrU	–	СФ	4.86 ± 0.02	[112]
5NO₂6COOHU	(CH ₃) ₄ NBr 0.1 М	ПТ	4.94	[113]
5,6-diBrU	–	СФ	5.03 ± 0.01	[112]
6Cl5IU	–	СФ	5.04 ± 0.01	[112]
5NO₂U	Na ⁺ 0.1 М	СФ	5.30	[87]
6Br5IU	–	СФ	5.27 ± 0.02	[112]
6ClU	–	СФ	5.67	[110]
6BrU	–	СФ	5.86 ± 0.02	[112]
5Br6IU	–	СФ	5.86 ± 0.03	[112]
5,6-diIU	–	СФ	6.13 ± 0.07	[112]
5NO₂6CH₃U	–	СФ	6.38 ± 0.03	[99]
6IU	–	СФ	6.63 ± 0.03	[112]
5C₂H₅6ClU	–	СФ	6.50	[114]
5CHOU	Na ⁺ 0.1 М	СФ	6.84	[87]
6NH₂5FU	–	СФ	7.30	[29]
5Br6COOHU	(CH ₃) ₄ NBr 0.1М	ПТ	7.33	[115]
6NH₂5BrU	–	СФ	7.50	[29]
5I6COOHU	(CH ₃) ₄ NBr 0.1М	ПТ	7.63	[115]

Продолжение таблицы 1.5

Соединение	Учет ионной силы	Метод	pK _a	Лит.
6NH₂5IU	–	СФ	7.70	[29]
5N(CH₃)CHO6NH₂U	–	СФ	7.79	[116]
5BrU	Na ⁺ 0.1 M	СФ	7.91	[87]
5ClU	Na ⁺ 0.1 M	СФ	7.92	[87]
5NHCHO6NH₂U	–	ПТ	7.92	[116]
5FU	Na ⁺ 0.1 M	СФ	7.93	[87]
5OHU	–	ПТ	8.11	[75]
5IU	Na ⁺ 0.1 M	СФ	8.13	[87]
5,6diNH₂U	–	ПТ	8.30 ± 0.05	[116]
5OH6COOHU	–	СФ	8.31 ± 0.10	[117]
6NH₂U	–	СФ	8.39 ± 0.05	[118]
5NH₂6COOHU	(CH ₃) ₄ NBr 0.1M	ПТ	8.72	[115]
5OH6CH₃U	0.1M KNO ₃	ПТ	8.80 ± 0.07	[119]
5COOHU	KCl 0.1M	ПТ	8.89	[113]
6NH₂5CH₃U	–	СФ	9.00	[29]
6C₆H₅U	–	СФ	9.10	[92]
5CH₂OHU	Na ⁺ 0.1M	СФ	9.27	[87]
5OCH₃6CH₃U	0.1M KNO ₃	ПТ	9.44 ± 0.09	[119]
6COOHU	KCl 0.1M	ПТ	9.45	[113]
5CH₂OH6CH₃U	–	СФ	9.50	[89]
6CH₃U	–	СФ	9.68	[88]
5NH₂U	–	ПТ	9.68 ± 0.04	[109]
5N(C₂H₄Cl)₂6CH₃U	–	СФ	9.70	[89]
5,6 diCH₃U	–	СФ	9.80	[120]
T	KNO ₃ 0.1M	ПТ	9.85 ± 0.05	[105]
6(C₃H₇)U	–	СФ	10.00	[92]

СФ – спектрофотометрический метод, ПТ – потенциометрический метод

Среди 6-метил- и 6-амино- 5-замещенных производных более стабильной анионной формой является анион N1. Различия в энергиях Гиббса между 5-замещенными производными 6-аминоурацила значительно выше, по сравнению с 6-метилурацилом, где для некоторых соединений (**5F6CH₃U**, **5Cl6CH₃U**, **5OH6CH₃U**) значения ΔG для анионов N1 и N3 очень близки [121], что может свидетельствовать о возможном нахождении обеих анионных форм в воде.

В работе [122] изучалась возможность протонирования и депротонирования **5FU** методами квантовой химии в газовой фазе. Предположено, что **5FU** не существует в протонированной и дианионной формах в диапазоне pH 0–14.

Нейтральная форма преобладает ниже рН 8.0, а депротонированная форма N1– выше 8.0.

С использованием различных схем расчета pK_a с учетом 5-ти водного гидратного комплекса на различных уровнях теории, таких как: G3MP2B3 + DFT, TPSS/aug-cc-pVTZ, CBS-QB3 [109], и неспецифической сольватации B3LYP/сс-pVTZ(-f) [123], DFT-B3LYP/aug-cc-pVDZ [124] определены значения pK_a для некоторых производных урацила (Таблица 1.6).

Таблица 1.6 – Рассчитанные квантово-химическими методами значения pK_a урацила, 6-метил- и 6-аминоурацила с учетом неспецифической сольватации в воде

Метод	U	6CH ₃ U	6NH ₂ U	Лит.
G3MP2B3+DFT	9.1	9.66	8.44	[109]*
TPSS/aug-cc-pVTZ	9.16	10.00	8.60	
CBS-QB3	9.14	9.92	8.59	
B3LYP/сс-pVTZ(-f)	10.04	-	-	[123]
DFT-B3LYP/aug-cc-pVDZ	9.38	-	-	[124]

*Расчет проводился также с учетом специфической сольватации

Из таблицы 1.6 на примере урацила видно, что использование различных базисных наборов и уровня теории значения pK_a могут существенно отличаться друг от друга.

Состав растворителя также влияет на значения pK_a . Различные составы растворителя рассмотрены авторами в ряде работ. Так в смесях растворителей проведено исследование для U [125-127], T [126] и 5FU [102, 125] в системе: диоксан-вода [125, 127] метанол-вода, этанол-вода [126], ацетон-вода, ДМФА-вода, ДМСО-вода [127], ацетонитрил-вода [102].

Из данных таблицы 1.7 видно, что замена 50-ти процентов воды на другой растворитель приводит к увеличению значений pK_a для урацила и тимина, а для 5-фторурацила, напротив, – к уменьшению pK_a , что объясняется природой электроотрицательного атома фтора.

Таблица 1.7 – Зависимость констант диссоциации производных урацила от растворителя (соразтворитель:вода в соотношении 50:50) при 25 °С

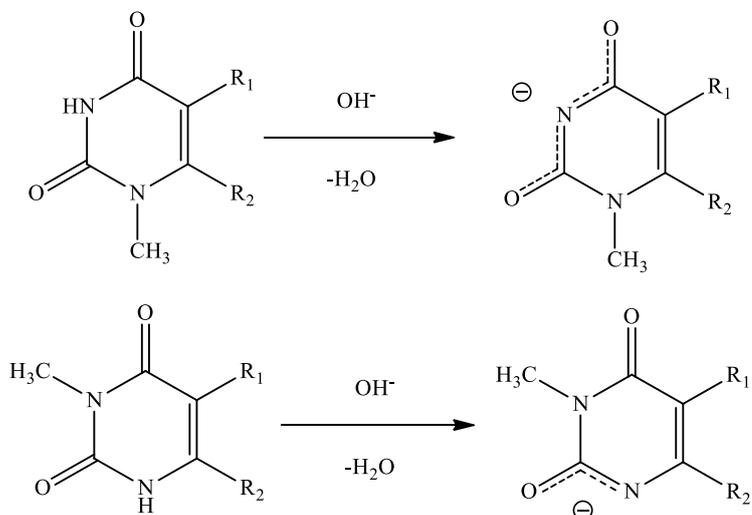
Вещество	вода	Соразтворитель						
		диоксан	метанол	этанол	ацетон	ДМФА	ДМСО	ацетонитрил
U	9.55	10.54	9.64	9.84	9.88	10.10	10.10	–
T	9.79	–	10.07	10.08	10.34	10.14	10.40	–
5FU	8.00	7.65	–	–	–	–	–	7.51

Влияние температуры на значения констант диссоциации производных урацила представлено в работах [94, 105, 108, 119]. В указанных работах температурный диапазон составляет 20÷50 °С, данные условия являются пригодными для жизни большинства организмов и формируют среду, в которой не происходит денатурация белков и инактивация ферментов.

Таким образом, по литературным данным, на значения констант диссоциации существенно влияют такие факторы как: природа заместителей при С5 и С6 положении пиримидинового кольца, растворитель и температура.

1.3.1 Кислотно-основные свойства N-метилзамещенных производных

Работы, в которых изучался вопрос кислотно-основного равновесия N-метилзамещенных производных урацила, не многочисленны. Диссоциация метилзамещенных производных протекает следующим образом:



В таблице 1.8 представлены экспериментальные данные значений pK_a для N1-CH₃ и N3-CH₃ урацила и некоторых 5-замещенных урацилов. Для урацила и тимина характерен отрыв протона от атома азота N3. Образование аниона N1 характерно для таких соединений как **5NO₂U**, где разница между значениями pK_a N1-CH₃ и N3-CH₃ составляет более 1.5 единиц. В работе [96] при определении pK_a **T** использовали в качестве растворителя D₂O, где значения pK_a составляют для 1-метилтимина и 3-метилтимина 10.50 и 11.00 соответственно.

Таблица 1.8 – Значения pK_a N1- и N3-метилурацила и некоторых его 5-замещенных производных (25 °C) в водных растворах

Соединение	Метод*	pK_a			$ \Delta pK_a $ (N1-CH ₃ – N3-CH ₃)	Лит.
		N-1,3H**	N1-CH ₃	N3-CH ₃		
U	СФ	9.43	9.72	9.85	0.13	[88]
	ПТ	9.45	9.75	9.99	0.24	[73]
	СФ	-	9.75	-	-	[93]
	ПТ	-	9.71	-	-	[93]
	СФ	9.45	9.71	9.99	0.28	[107]
	СФ	9.51	9.77	10.00	0.23	[85]
	СФ	9.43	9.72	9.85	0.13	[128]
T	СФ	9.87	10.09	10.52	0.43	[95]
	СФ	-	10.30	10.70	0.40	[96]
5NO₂U	СФ	5.47	7.34	5.65	1.69	[99]
	СФ	5.56	7.35	5.70	1.65	[88]
5BrU	СФ	8.05	8.30	8.30	0	[100]
	СФ	7.83	7.83	-	-	[103]

* Методы определения: СФ – спектрофотометрический; ПТ – потенциометрический.

** Незамещенная форма урацила.

Для **5BrU** величины pK_a N-метилзамещенных производных имеют равные значения между собой [100]. Такие данные свидетельствуют об одновременном отрыве протона как от N1, так и от N3. Однако, в работе [103] для 1-метил-5-бромурцила приводится pK_a равный 7.83, что отличается от величины, приведенной в работе [100].

Из представленных значений pK_a N-метил-6-замещенных производных урацила (Таблица 1.9) видно, что метильная группа у C6 приводит к близким значениям pK_a 1,6-диметилурацила и 3,6-диметилурацила.

Таблица 1.9 – Значения pK_a N1- и N3-метил-6-замещенных производных (25 °C) в водных растворах

Соединение	Метод*	pK_a			$ \Delta pK_a $ (N1-CH ₃ – N3-CH ₃)	Лит.
		N-1,3H**	N1-CH ₃	N3-CH ₃		
6CH₃U	О	9.50	10.06	10.13	0.07	[129]
6COO·U	СФ	-	9.82	10.52	0.70	[76]
6NH₂U	СФ	8.39	11.00	8.63	2.37	[118]
6ClU	СФ	5.75	9.05	5.95	3.10	[114]
	СФ	5.75	-	5.95	-	[112]
6BrU	СФ	5.86	-	6.12	-	[112]
6IU	СФ	6.63	-	6.93	-	[112]

* Методы определения: СФ – спектрофотометрический; О – омыление.

** Незамещенная форма урацила.

Максимальное различие между N1 и N3 метилзамещенными наблюдается у **6ClU** и **6NH₂U**, где разница pK_a составляет 3.10 и 2.37 соответственно. По данным таблицы 1.9 видно, что диссоциация для незамещенного **6ClU** и **6NH₂U** происходит, вероятно, преимущественно по N1. Значения pK_a 3-метил-6-галогензамещенных производных исследованы в работе [112].

Константы диссоциации 5,6-замещенных N-метилпроизводных представлены в таблице 1.10. Из данных таблицы видно, что введение аминогруппы в 5 положение 6-аминоурацила существенно уменьшает значение pK_a 1-метил-5,6-диаминоурацила по сравнению с **6NH₂U**. Введение же формиламина в 5 положение того же 6-аминоурацила несущественно влияет на значения констант диссоциации его N-метилованных форм, по сравнению с аналогичными формами незамещенного 6-аминоурацила. Наименьшая разница в значениях pK_a N-метилзамещенных наблюдается у **5OCH₃6CH₃U**, что связано со схожими кислотно-основными свойствами его метилзамещенных производных.

Таблица 1.10 – Значения pK_a N1- и N3-метил-5,6-замещенных производных (25 °С) в водных растворах

Соединение	Метод*	pK_a			$ \Delta pK_a $ (N1-CH ₃ – N3-CH ₃)	Лит.
		N-1,3H**	N1-CH ₃	N3-CH ₃		
5OCH₃6CH₃U	ПТ	8.80	9.38	9.62	0.24	[119]
5NO₂6CH₃U	СФ	6.38	7.40	6.78	0.62	[99]
5,6diNH₂U	ПТ	8.30	9.50	8.75	0.75	[116]
5NHCHO6NH₂U	ПТ	7.97	10.69	8.18	2.51	[116]
5N(CH₃)CHO6NH₂U	СФ	7.79	10.56	8.03	2.53	[116]
5,6diClU	СФ	4.74	-	4.84	-	[112]
5Br6ClU	СФ	4.86	-	4.85	-	[112]
5I6ClU	СФ	5.04	-	5.15	-	[112]
5,6diIU	СФ	6.13	-	6.17	-	[112]

* Методы определения: СФ – спектрофотометрический; ПТ – потенциометрический

** Незамещенная форма урацила

1.3.2 Определение анионного состава производных урацила

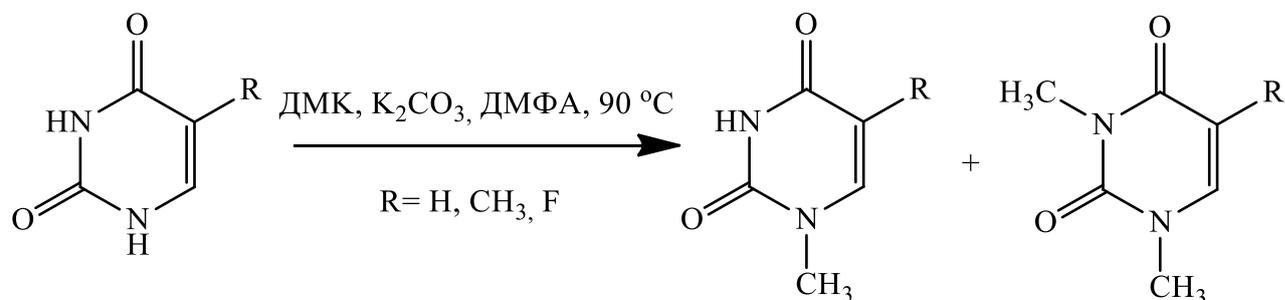
Поскольку существует вероятность параллельного образования двух анионных форм урацилов, одним из подходов в изучении ступенчатой диссоциации производных урацила является исключение возможности депротонирования по одному из атомов азота посредством замещения атома водорода при азоте на метильную группу, что необходимо для понимания механизма диссоциации производных урацила. Подробный синтез N-метилзамещенных производных урацила и оценка содержания их анионных форм рассмотрены ниже.

1.3.2.1 Способы N-метилирования пиримидиновых оснований

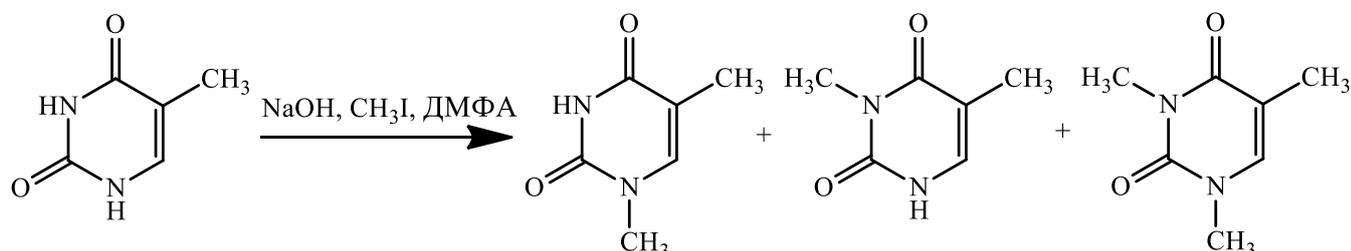
Урацил и его 5-замещенные производные

При использовании в роли алкилирующего агента диметилкарбоната, реакция метилирования урацила протекает с образованием двух продуктов: 1-метил- и 1,3-диметилзамещенных производных с выходами 5 и 74 %, а для тимина при аналогичных условиях выход составляет 1 и 79 % соответственно.

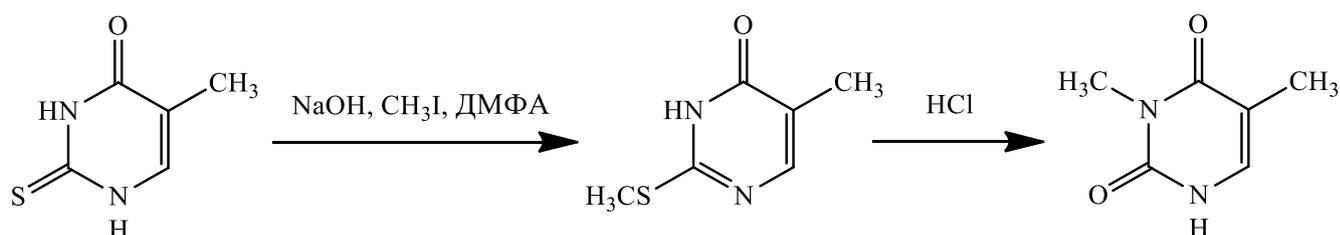
Алкилирование **5FU** происходит с образованием 1,3-диметил-5-фторурацила с выходом 25 % [130]. Данная реакция протекает с использованием карбоната калия, 18-краун-6 и в качестве соразтворителя ДМФА при 90 °С. Реакция без добавления 18-краун-6 приводит, к понижению выхода 1,3-диметилурацилов до 21 %. При температуре ниже 40 °С реакция метилирования не происходит.



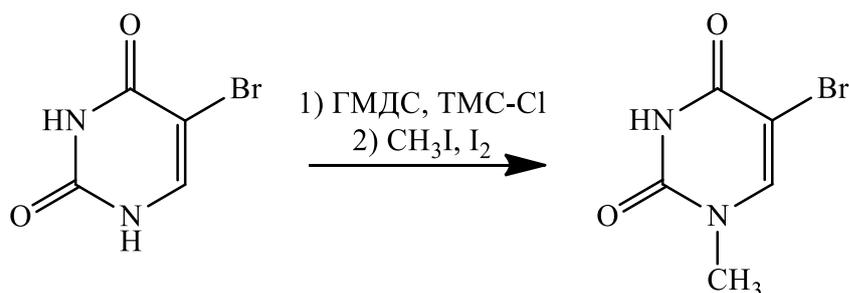
В работе [131] проведено алкилирование **T** с образованием смеси продуктов. N-метилированные производные тимина получали обработкой тимина гидроксидом натрия с последующим добавлением иодметана в диметилформамиде с выходами 1,5-диметилурацила 12 %, 3,5-диметилурацила – 2 % и 1,3,5-триметилурацила – 75 %.



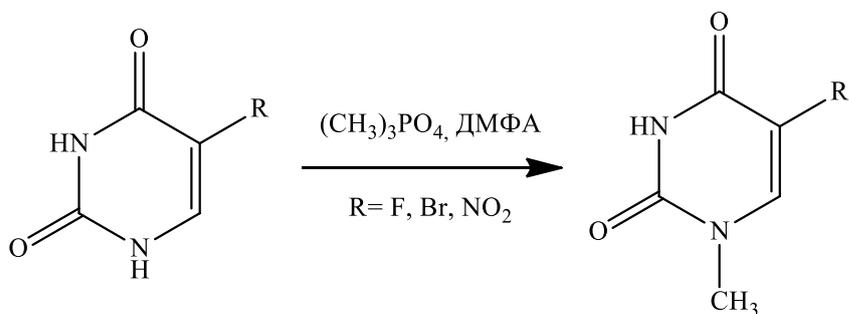
Однако из-за низкого выхода 3,5-диметилурацила, была предпринята попытка синтеза обработкой гидроксидом натрия 2-тиотимина с последующим добавлением иодметана в диметилформамиде. Полученный 2-метилтиопиримидин подвергали взаимодействию с соляной кислотой с получением 3,5-диметилурацила с выходом 77 %.



Метилирование **5BrU** [132] в положении N1 было достигнуто с использованием двухстадийного метода. 5-Бромурацил обрабатывали гексметилдисилазаном (ГМДС) и триметилсилилхлоридом (ТМС-Cl). Далее реакционную смесь обрабатывали иодметаном и небольшим количеством I₂ при 25 °С с выходом 80 %. Другие авторы [133] синтез 1-метил-5-бромурацила проводили без триметилсилилхлорида и I₂. Выход продукта по данной методике составил 68 %.

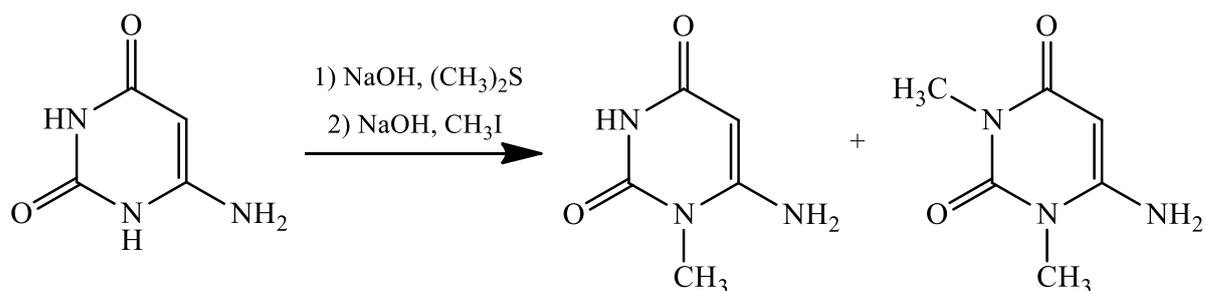


В работе [134] исследована реакция метилирования триметилфосфатом в диметилформамиде некоторых 5-замещенных производных. Сообщается, что такая реакция протекает только для урацилов с электроно-акцепторными заместителями F, Br, NO₂ с образованием N1-метилзамещенных производных урацила, с выходами 7, 12, 70 %, соответственно.

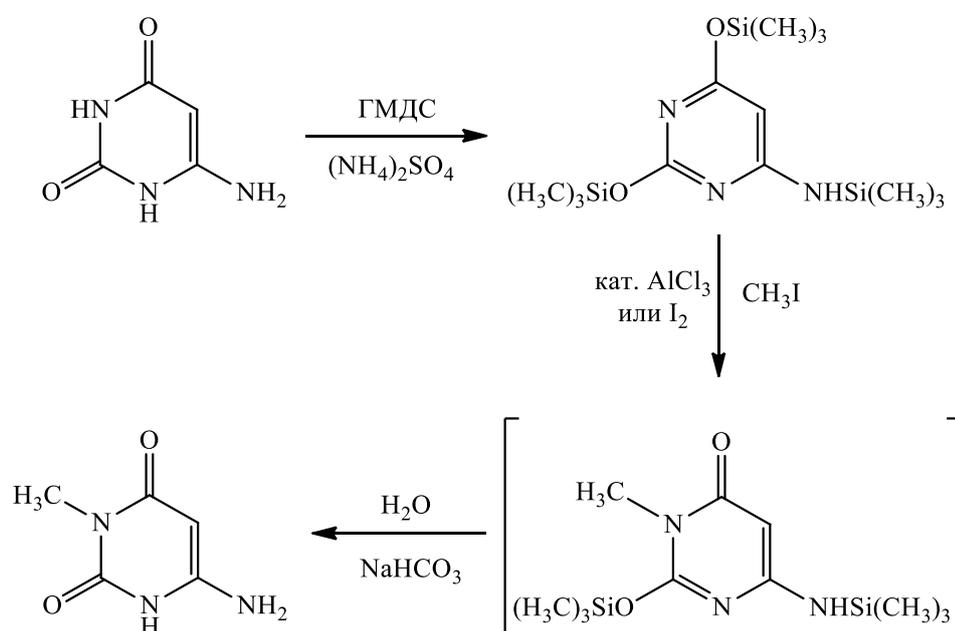


6-Замещенные производные урацила

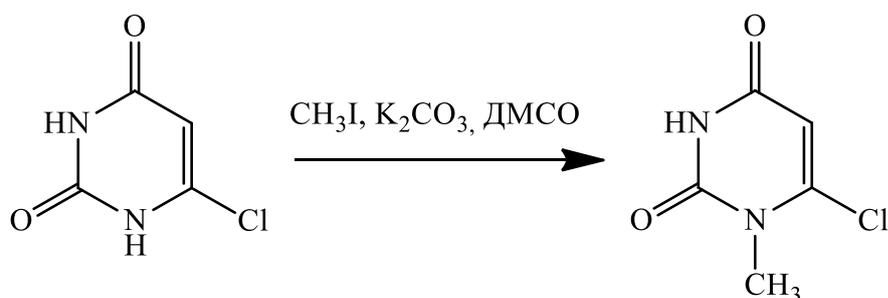
Метилирование **6NH₂U** диметилсульфатом в щелочной среде происходит с образованием 1-метил-6-аминоурацила и 1,3-диметил-6-аминоурацила. При замене диметилсульфида на CH₃I скорость реакции значительно увеличивается. При метилировании данным методом преимущественно образуется замещенная метильная форма у N1 положения [135].



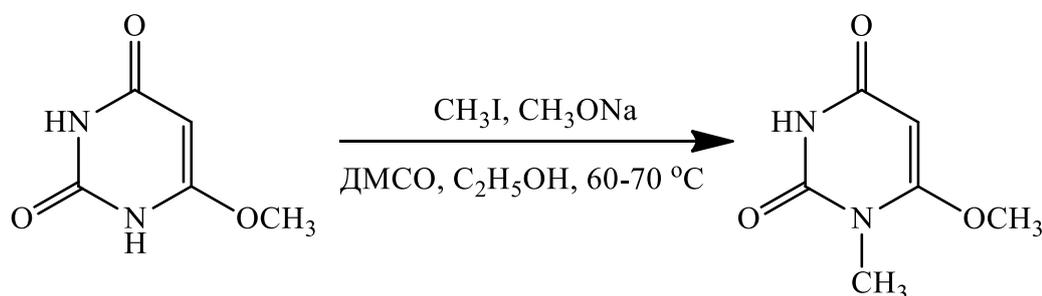
3-Метил-6-аминоурацил впервые был получен в работе [136]. В ходе реакции триметилсилильное производное 6-аминоурацила реагирует с алкилгалогенидом с образованием 3-замещенного силильного производного 6-аминоурацила. Реакция катализируется AlCl₃ или I₂.



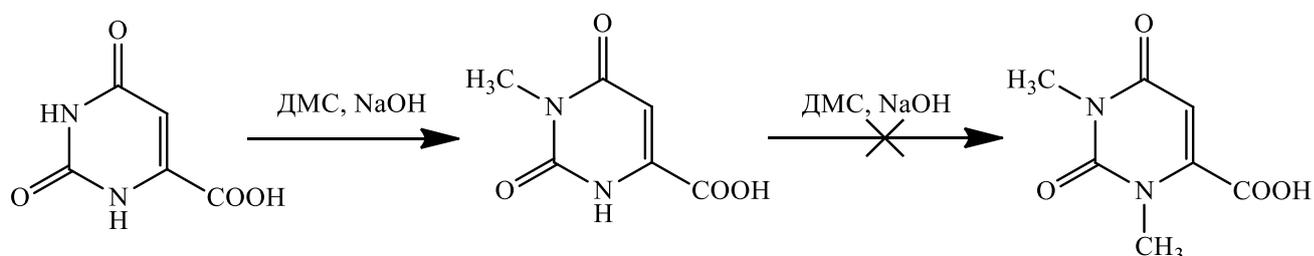
Селективное алкилирование происходит и для **6ClU** [137, 138] при взаимодействии йодистого метила в ДМСО в щелочной среде. Выход 1-метил-6-хлорурацила составляет 60–70 %.



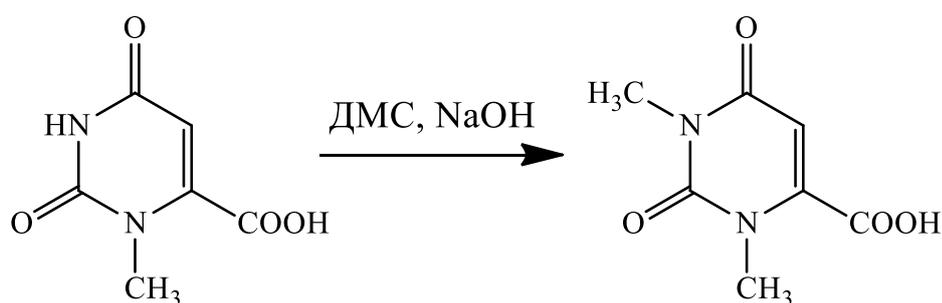
Аналогично образование N1 метилзамещенного производного происходит и у **6OCH₃U** при метилировании иодметаном в этанол-диметилсульфоксидных растворах при 60–70 °С [139].



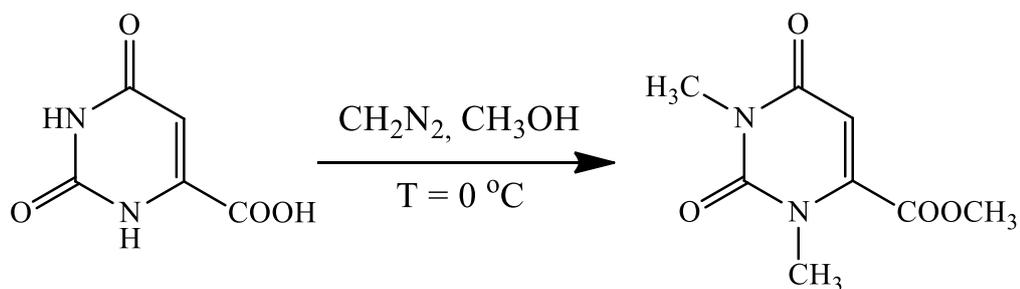
В случае карбоксильной группы в 6 положении пиридинового кольца метилирование диметилсульфатом в щелочной среде протекает с образованием 3-метилоротовой кислоты [76].



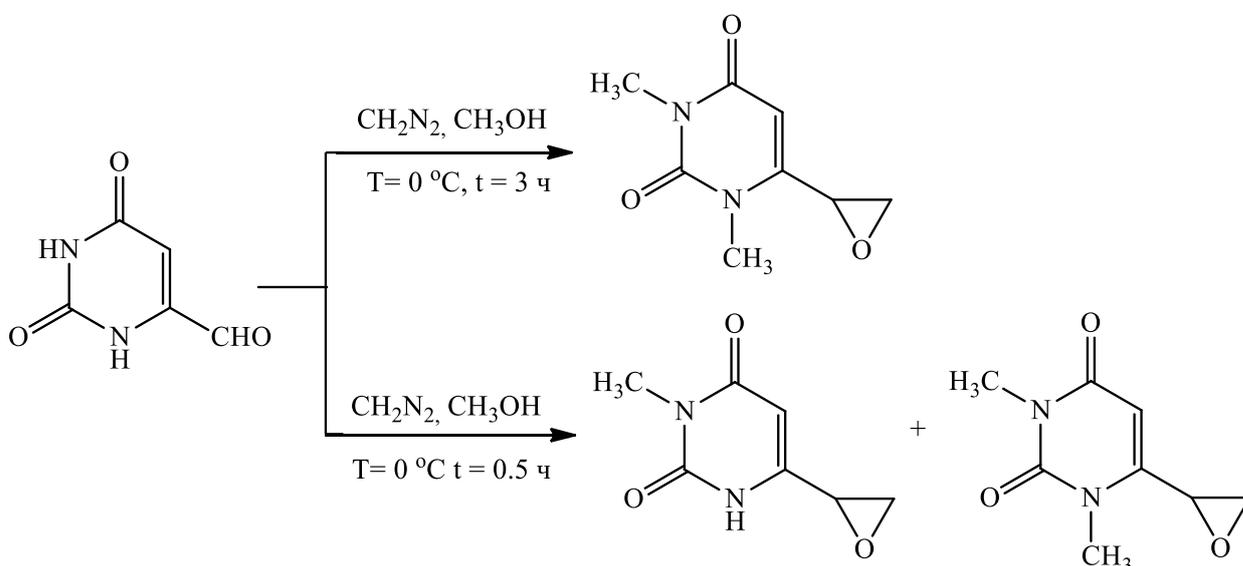
При дальнейшем метилировании по данной методике, образование 1,3-диметилоротовой кислоты не наблюдается. Однако при метилировании 1-метилоротовой кислоты диметилсульфатом в щелочной среде реакция протекает с хорошим выходом 1,3-диметилоротовой кислоты.



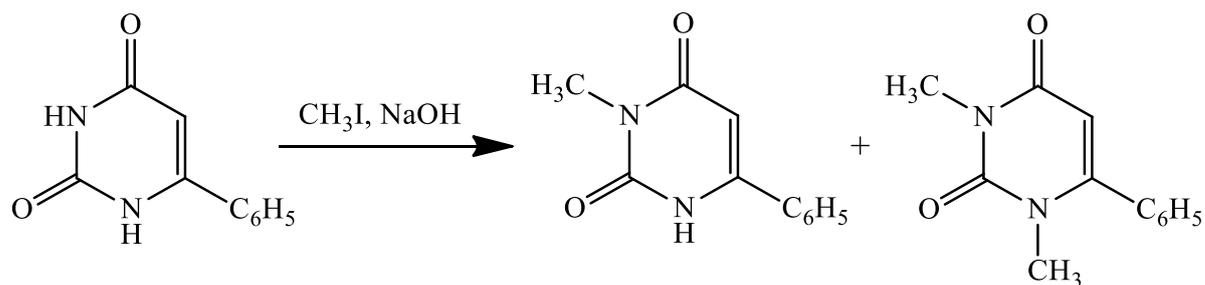
При использовании в качестве метилирующего агента диазومتана, метилирование оротовой кислоты протекает с образованием 1,3-диметил-6-метоксикарбонилурацила [140] с выходом 95 %.



Метилирование **6CHOU** диазометаном, по данным авторов [140], по истечению 3 часов протекает с образованием 1,3-диметил-6-эпоксиурацила с выходом 60 %. Однако, если проводить реакцию за 0.5 ч, в реакционной смеси будет наблюдаться образование помимо 1,3-диметил-6-эпоксиурацила с выходом 28 %, также 3-метил-6-эпоксиурацила с выходом 30 %.

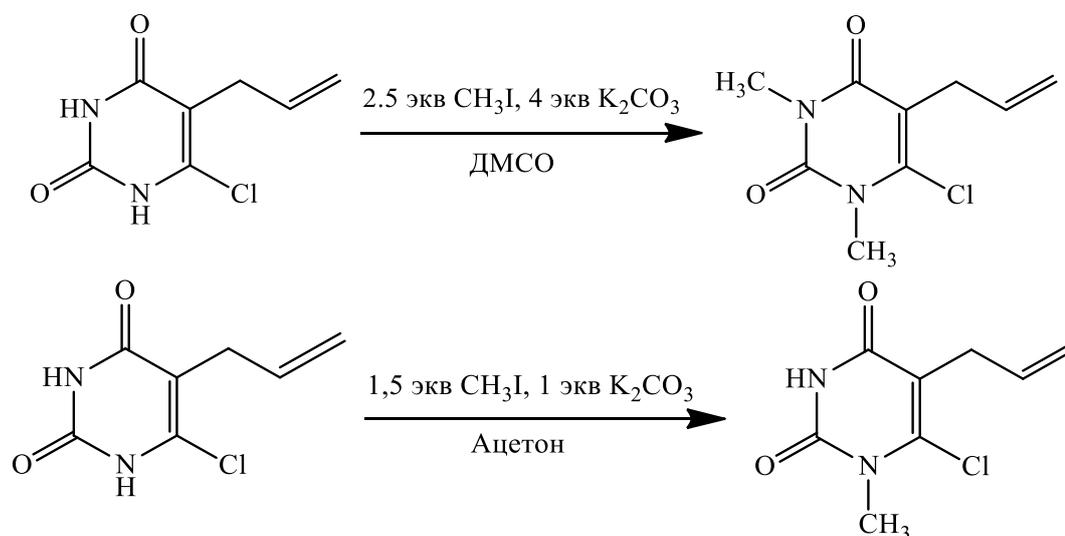


Методика получения 3-метил-6-фенилурацила и 1,3-диметил-6-фенилурацила описана в работе [141]. В качестве метилирующего агента использовали иодметан. Реакция проводилась в метанольно-щелочном растворе, где выход продуктов составил 20 % для монозамещенного производного и 30 % для дизамещенного **6PhU**.

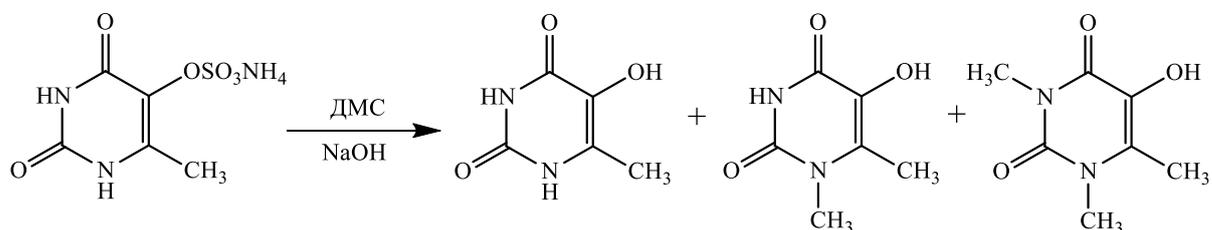


5,6-замещенные производные урацила

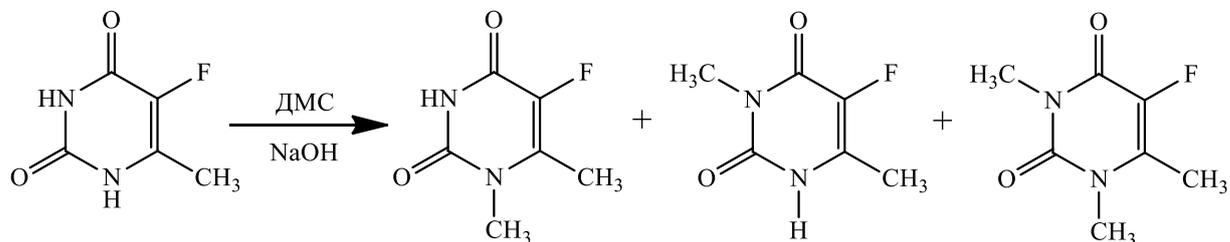
Алкилирование 5-аллил-6-хлороурацила с CH_3I протекает в присутствии карбоната калия в диметилсульфоксиде при 70°C [142] с образованием 5-аллил-1,3-диметил-6-хлороурацила с выходом 75 %. В аналогичных условиях при использовании эквимолярных количеств CH_3I образуется 5-аллил-1-метил-6-хлороурацил с выходом 20 %. Хорошие результаты были получены при использовании CH_3I и K_2CO_3 в молярном соотношении от 1.5 до 0.5 в ацетоне вместо ДМСО с выходом 5-аллил-1,3-диметил-6-хлороурацила 71 %.



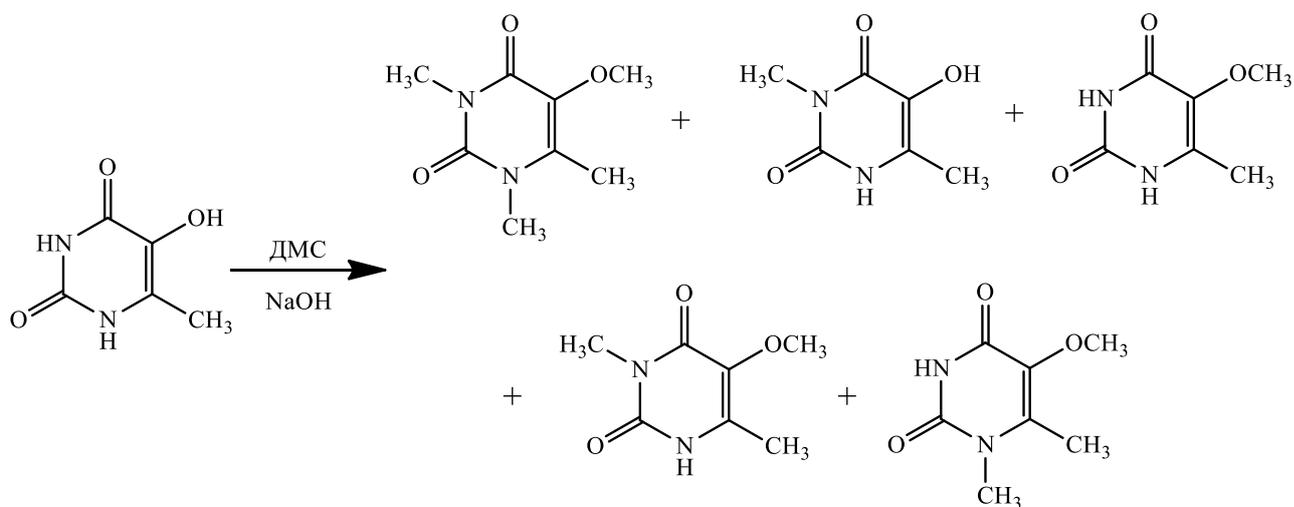
Разработан метод метилирования $5\text{OH}6\text{CH}_3\text{U}$ [143], при котором 6-метил-5-аминосульфатурацил обрабатывают в щелочной среде диметилсульфатом в различной пропорции, при этом образуется три продукта: 6-метил-5-гидроксиурацил, 1,6-диметил-5-гидроксиурацил и 1,3,6-триметил-5-гидроксиурацил. При соотношении 6-метил-5-аминосульфатурацил: NaOH :ДМС 1:1:1, с наибольшим выходом образуется 6-метил-5-гидроксиурацил с выходом 84 %. Увеличение соотношения NaOH и ДМС до 1:4:4, с наибольшим выходом образуется 1,6-диметил-5-гидроксиурацил с выходом 52.5 %. Дальнейшее увеличение NaOH и ДМС до соотношений 1:10:10 с наибольшим выходом получают 1,3,6-триметил-5-гидроксиурацил.



В работе [144] авторами были получены 1-метил-, 3-метил- и 1,3-диметил-5-фтор-6-метилурацил взаимодействием 5-фтор-6-метилурацила и диметилсульфата в воде в присутствии щелочи в молярных соотношениях 1:1.3:1.3 при комнатной температуре.



При метилировании **5OH6CH₃U** [145] ДМС в присутствии щелочи в соотношении **5OH6CH₃U:NaOH:ДМС** (2:5:4) происходит образование пяти продуктов: 5-гидрокси-3,6-диметилурацила (0.5 %), 5-метокси-1,3,6-триметилурацила (22 %), ранее неизвестного 5-метокси-6-метилурацила (9.5 %), 5-метокси-1,6-диметилурацила (3.6 %) и 5-метокси-3,6-диметилурацила (6.8 %).



Различный путь образования продуктов метилирования будет зависеть как от заместителей при C5 и C6 положении, так и от метилирующих агентов и природы растворителя. Реакцию метилирования производных урацила можно разделить на три группы по образованию продуктов реакции: частичное, полное и составное/смесевое метилирование. Частичное метилирование представляет собой образование монометилзамещенных производных преимущественно в N1 положении. Полное метилирование протекает с образованием дизамещенного урацила по N1 и N3. Составное/смесевое метилирование представляет из себя

смесь метилзамещенных как моно- N1 или N3, так и дизамещенные по N1 и N3 пиримидинового кольца.

1.3.2.2 Оценка содержания анионных форм производных урацила

Одним из способов количественной оценки анионных форм является определение pK_a монометилзамещенных форм согласно формуле, предложенной авторами [119].

Согласно уравнению 1.2. на примере **5OH6CH₃U** определен процентный состав анионных форм при соотношении **5OH6CH₃U:KOH** = 1:1, где соотношение аниона N1 и N3 составило 0.35:0.65 соответственно

$$\begin{cases} pK_{a1}(1,6diCH_35OHU)x_1 + pK_{a1}(1,3diCH_35OHU)x_2 = pK_{a1}(5OH6CH_3U) \\ x_1 + x_2 = 1 \end{cases} \quad (1.2.)$$

где $pK_{a1}(1,6diCH_35OHU)$, $pK_{a1}(1,3diCH_35OHU)$ – значения констант диссоциации 1,6-диметил-5-гидроксиурацила и 1,3-диметил-5-гидроксиурацила; x_1 и x_2 – мольные доли анионных форм при диссоциации метильных форм.

Методом ЯМР спектроскопии по изменениям относительных сигналов атомов ¹³C, авторы [146] рассчитывают содержание анионных форм **5FU** при различной концентрации щелочи. Состав анионных форм в водно-щелочных растворах **5FU:KOH** в соотношениях 0.25:1, 0.5:1, 1:1 будут содержать анионы N1 и N3 в процентных соотношениях 0.19 и 0.32, 0.24 и 0.40, 0.38 и 0.62 соответственно. В работе [147] для **5CIU** соотношение анионных N1 и N3 форм при 1:1 урацила со щелочью составило 0.65:0.35, для **5BrU** – 0.72:0.28.

Использование метилированных форм производных урацила как модельных представляет интерес с точки зрения определения процентного соотношения анионных форм производных урацила.

Методом УФ спектроскопии авторами [79] изучен анионный состав **5BrU** с использованием 1-метил-5-бромуррацила и 3-метил-5-бромуррацила

Из-за метильной группы в N3 положении максимум полосы поглощения анионной формы 3-метил-5-бромуррацила имеет небольшой сдвиг по сравнению с

анионом 5-бромурацила. Поправка на сдвиг получается путем постановки соответствующих значений при любой заданной длине волны в следующем уравнении:

$$A(\text{дианион}) = \frac{E_{N1}(3CH_35BrU \text{ анион}) * E_{\text{макс.}}(5BrU \text{ анион})}{E_{\text{макс.}}(3CH_35BrU \text{ анион})} \quad (1.3)$$

A(дианион) представляет суммарное значение коэффициента экстинкции смеси анионов 5-бромурацила с отрывом протона от N1 и N3.

Расчет содержания аниона N3 выполняется следующим образом:

$$E_{N3} = E_{\text{нейтр}} * \frac{E_{N1}(3CH_35BrU)}{E_{\text{нейтр}}(3CH_35BrU)} \quad (1.4)$$

Расчет процентного содержания аниона N3, из смеси анионов 5-бромурацила, осуществляется по формуле:

$$\%_{N3} = \frac{E_{\text{макс.}}(\text{анион 5-бромурацила})}{E_{N3}} * 100 \quad (1.5)$$

Полученные соотношения для анионов N3 и N1 составляет 64 и 36 %

Аналогично может быть рассчитано N1 с использованием данных для 1-метил-5-бромурацила вместо значений для 3-метильного производного в приведенной выше формуле. В данном случае процентное соотношение анионов N1 и N3 составляет 34 и 66 %.

В работе [95] аналогичным образом изучен анионный состав тимина, где процентное содержание аниона N1 и N3 составляет 49 и 51 % при подсчете через N1 анион и 47 и 53 % – через N3 анион.

ВЫВОД К ГЛАВЕ 1

Производные урацила находят широкий спектр применения в медицине в качестве препаратов стимуляции регенераторных процессов и противотуберкулезной активности. Они могут быть использованы в терапии болезни Альцгеймера, а также в качестве перспективного класса ингибиторов холинэстераз и миорелаксанта. Производные урацила имеют низкую токсичность и, в зависимости от природы заместителей в кольце, будут обладать антиоксидантными, кардиотропными, антигипоксическими, противовирусными, противовоспалительными, антимикробными, антибактериальными, иммуностропными, гепатозащитными свойствами.

По результатам квантово-химических расчетов урацилов во всех случаях (метод расчета, учет растворителя) дикето-таутомер показал себя наиболее стабильной формой. Из анализа таутомерных форм производных урацила следует, что учет растворителя, как в явном виде, так и в модели неспецифической сольватации может существенно менять порядок и значения энергии относительной устойчивости минорных таутомерных форм. Общий порядок устойчивости минорных таутомеров для каждого урацила может меняться в зависимости от количества молекул воды в сольватной оболочке и заместителей при атомах углерода C5 и C6 пиримидинового кольца. Тем не менее остается много вопросов к моделям специфической сольватации производных урацила с полярными группами при двойной связи пиримидинового кольца.

Урацил и его производные являются слабыми двухосновными кислотами, pK_a которых находятся в широком диапазоне от 4 до 10. Существенное влияние на значения констант диссоциации производных урацила оказывают такие факторы как: природа заместителей при C5 и C6 положении пиримидинового кольца, растворитель и температура. Довольно большая часть исследований кислотно-основного равновесия производных урацила в водных растворах посвящена в литературе урацилу, тимину и 5-галогенурацилам. Другие производные изучались в значительно меньшей степени. Для 5,6-замещенных урацилов имеются

небольшое количество работ по определению констант диссоциации в растворах потенциометрическим и спектрофотометрическим методами, воспроизводимость которых не оценивалась или не рассматривалась вовсе другими авторами и методами. Изучению механизма диссоциации уделялось значительно меньше внимания, чем определению констант кислотно-основного равновесия.

Различный путь образования продуктов метилирования будет зависеть как от заместителей при C5 и C6 положении, так и от метилирующих агентов и природы растворителя. Реакция метилирования производных урацила можно разделить на три группы по образованию продуктов реакции: частичное, полное и составное/смесевое метилирование. Частичное метилирование представляет собой образование монометилзамещенных производных преимущественно в N1 положении. Полное метилирование протекает с образованием дизамещенного урацила по N1 и N3. Составное/смесевое метилирование представляет из себя смесь метилзамещенных как моно- N1 или N3, так и дизамещенные по N1 и N3 пиримидинового кольца.

Таким образом, изучение кислотно-основных свойств 5 и 6-замещенных производных урацила и установление места первичного отрыва протона в растворах представляет значительный интерес. На основании чего сформулированы цель и задачи научно-квалификационной работы.

ГЛАВА 2 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1 Приборы и реагенты

Фракционное разделение продуктов метилирования проводили на жидкостном хроматографе «Стайер» (Аквилон, Россия) со спектрофотометрическим детектором. УФ-спектры регистрировали на спектрофотометре UV-1800 (Shimadzu, Япония); спектры ^1H , ^{13}C и ^{15}N – на ЯМР спектрометре Avance III 500 MHz (Bruker, Германия); ФЛ-спектры – на спектрофлуориметре CM-2203 (Солар, Республика Беларусь). В работе использовались электронные весы Sartorius A120S и термостат LOIP LT-205. Определение pH проводили с помощью pH-метра pH-150MI. При перемешивании растворов использовали магнитную мешалку Biosan MS 3000. Для дополнительной очистки дистиллированной воды использовали деионизатор «ДВ-1». Отгонку растворителей проводили на роторном испарителе RV 8 (Heidolph, Германия).

В работе использовались реактивы: NaOH марки «ч» (1310-58-3, «Реахим»), фиксанальный раствор HCl 0.1 М, KH_2PO_4 квалификации «хч» (7778-77-0, ОАО «Реатэкс») и $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ «х.ч.» (12045-88-4, ОАО «Реатэкс»). KNO_3 «ч» (7757-79-1 «Реахим»), KOH «х.ч.» (1310-58-3, «Реахим»). Диметилсульфат (77-78-1, $(\text{CH}_3)_2\text{SO}_4$, «SIGMA-Aldrich») с чистотой 99 % использовали без дополнительной очистки. В качестве растворителей применяли ацетонитрил «осч, 4 сорт» (ООО «НПК Криохром»), изопропиловый спирт 99.8 % («Chemsolute»), ацетон («Реахим») марки «осч», ДМСО (ЭКОС-1) «ч» дополнительно перегнанный над KOH. В работе во всех экспериментах использована дистиллированная деионизированная вода.

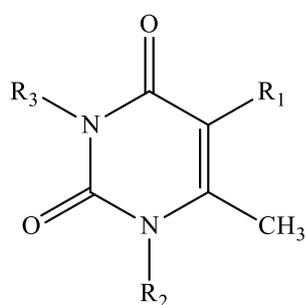
В качестве растворителей для ЯМР спектроскопии использовали диметилсульфоксид (ДМСО- d_6 , 2206-27-1, «DeuteroGmbH») чистотой 99.9 %, дейтерированную воду (D_2O , 7789-20-0, «DeuteroGmbH») чистотой 99 % без дополнительной очистки.

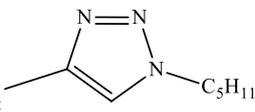
2.2 Объекты исследования

Объектами исследования являлись 5-замещенные производные 6-метилурацила, 5-замещенные производные 6-аминоурацила и некоторые их N-метилированные формы. 6-метилурацил с чистотой 99% (Реахим), 5,6-диметилурацил с чистотой 99% (Реахим), 6-аминоурацил с чистотой 98% (Реахим) и 1-метил-6-аминоурацил 98% (Реахим) использовали без дополнительной перекристаллизации. Соединение 5-(1-пентил-4-метил-1,2,3-триазол-4-ил)-6-метилурацил предоставлено лабораторией химии нуклеотидных оснований ИОФХ РАН им. А.Е. Арбузова ФИЦ КазНЦ РАН, синтезировано по методике [148, 149]. 5-Циано-6-метилурацил и 5-формил-6-метилурацил предоставленные лабораторией биоорганической химии и катализа УФИХ УФИЦ РАН, синтезированы по методике [150, 151].

$R_1=H, R_2=H, R_3=H$ – 6-метилурацил (**6CH₃U**)

$R_1=CH_3, R_2=H, R_3=H$ – 5,6-диметилурацил (**5,6diCH₃U**)



$R_1=$ , $R_2=H, R_3=H$ – 5-(1-пентил-4-метил-1,2,3-триазол-4-ил)-6-метилурацил (**TMU**)

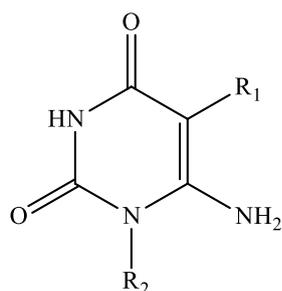
$R_1=NH_2, R_2=H, R_3=H$ – 5-амино-6-метилурацил (**5NH₂6CH₃U**)

$R_1=CHO, R_2=H, R_3=H$ – 5-формил-6-метилурацил (**5CHO6CH₃U**)

$R_1=CN, R_2=H, R_3=H$ – 5-циано-6-метилурацил (**5CN6CH₃U**)

$R_1=CN, R_2=CH_3, R_3=H$ – 5-циано-1,6-диметилурацил (**5CN1,6diCH₃U**)

$R_1=CN, R_2=H, R_3=CH_3$ – 5-циано-3,6-диметилурацил (**5CN3,6diCH₃U**)



$R_1=H, R_2=H$ – 6-аминоурацил (**6NH₂U**)

$R_1=H, R_2=CH_3$ – 1-метил-6-аминоурацил (**1CH₃6NH₂U**)

$R_1=NO, R_2=H$ – 5-нитрозо-6-аминоурацил (**5NO6NH₂U**)

Соединение 5-амино-6-метилурацил предоставлено лабораторией фармакофорных циклических систем УФИХ УФИЦ РАН, синтезировано по методике [152]. Чистота предоставленных соединений превышает 98% (ВЭЖХ). Методика синтеза 5-циано-1,6-диметилурацила, 5-циано-3,6-диметилурацила и 5-нитрозо-6-аминоурацила описана ниже.

2.3 Метилирование 5-циано-6-метилурацила

Алкилирование **5CN6CH₃U** диметилсульфатом проводили в щелочных водных растворах по методике [143]. За ходом реакции следили методом ВЭЖХ. После остановки реакции продукты алкилирования **5CN6CH₃U** были фракционированы методом полупрепаративной ВЭЖХ на хроматографе Стайер (Аквилон) с использованием колонки Pursuit C18 250 x 10.0 мм, 10 мкм. Применяли элюент состава CH₃CN:H₂O 10:90 (% объемн.) при скорости потока 3 мл/мин. Детектирование проводилось на спектрофотометрическом детекторе при длине волны 280 нм.

2.4 Синтез 5-нитрозо-6-аминоурацила

Синтез проводился по методике [153] в кислой среде в одну стадию при комнатной температуре (Схема 2.1). **6NH₂U** массой 500 мг помещали в колбу и добавляли 7 мл воды. Перемешивали на магнитной мешалке в течение часа, затем добавляли NaNO₂ массой 319 мг. После полного растворения NaNO₂ по каплям приливали 1.24 мл ледяной уксусной кислоты. Реакционную смесь перемешивали в течение часа, после чего раствор охлаждали. Выпавший осадок отфильтровывали и промывали холодной водой и этиловым спиртом. Выход **5NO6NH₂U** составил 528 мг. (98.9 %). Выпавший осадок после проведения реакции отфильтровывали и промывали дистиллированной водой.

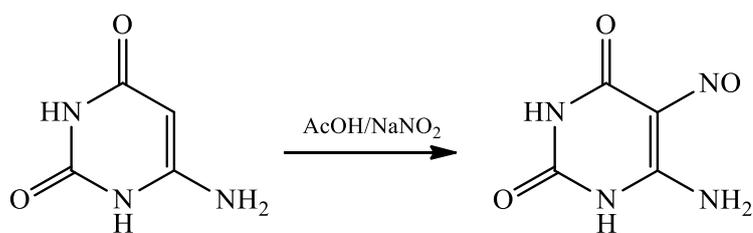


Схема 2.1.

2.5 Определение констант диссоциации производных урацила

2.5.1 Потенциометрический метод

Величину pK_a соединений определяли методом потенциометрического титрования по стандартной методике [154] в одnogорлом термостатируемом реакторе объемом 25 мл при четырех температурах: 15, 25, 35 и 45 °С. Температуру поддерживали с точностью ± 0.1 °С. Постоянную ионную силу поддерживали раствором 0.1 М KNO_3 . Значения рН регистрировали на рН-метре с использованием комбинированного стеклянного электрода ЭСК-10307. Настройку электрода проводили методом двухточечной калибровки с применением фиксальных стандартных буферных растворов с рН 6.86 и 9.18. Концентрация водных растворов для всех исследуемых веществ составила 0.001 моль/л. Для увеличения растворимости соединения ТМУ было добавлено 10 % ацетонитрила.

2.5.2 Спектрофотометрический метод

Готовили водные растворы производных урацила с концентрацией $5 \cdot 10^{-5}$ моль/л в мерные колбы объемом 50 мл и добавляли различные количества раствора КОН с концентрациями 0.01, 0.1 и 1 моль/л для создания определенного значения рН в диапазоне 2 ÷ 11 с шагом 1 единица рН. По полученным данным строили график зависимости в координатах «оптическая плотность – рН» и определяли примерное значение pK_a . Для определения точного значения констант диссоциации были использованы буферные растворы, приготовленные

смешиванием растворов 0.1 М KH_2PO_4 , 0.05 М $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ и 0.1 М NaOH . В мерные колбы объемом 50 мл помещали 5 мл $1.0 \cdot 10^{-4}$ моль/л водного раствора производного урацила и разбавляли до метки буферными растворами с соответствующими значениями pH.

Значения pK_a определяли спектрофотометрическим методом, описанным в работе [154]. Константы диссоциации определены по формуле 2.2.

$$pK_a = \text{pH} + \lg \frac{A - A^{A^-}}{A^{\text{HA}} - A} \quad (2.2)$$

где A – оптическая плотность смеси нейтральной молекулы и аниона; A^{A^-} – оптическая плотность для анионной формы молекулы; A^{HA} – оптическая плотность для нейтральной формы молекулы.

Спектры поглощения регистрировались в диапазоне 200÷350 нм. Использовались кварцевые кюветы с толщиной поглощающего слоя 10 мм.

2.5.3 Спектрально-люминесцентный метод

Спектрально-люминесцентные измерения водных растворов веществ проводили в интервале pH 5.7 ÷ 11.6 при температуре 25 °С и концентрации $2 \cdot 10^{-4}$ моль/л. Для определения pH использовали pH-метр pH-150МИ с комбинированным стеклянным электродом ЭСК-10307. Калибровку электродов проводили с использованием стандартных буферных растворов.

Скорректированные спектры ФЛ регистрировали в кварцевых кюветах ($l = 1$ см) на спектрофлуориметре СМ-2203. Квантовые выходы (φ) флюоресценции урацилов определяли по известной методике [155] с использованием внешнего стандарта триптофана (**Trp**) по уравнению 2.3.

$$\varphi_i = \varphi_{\text{Trp}} \times (S_i \times A_{\text{Trp}}) / (S_{\text{Trp}} \times A_i) \quad (2.3)$$

где φ_i – квантовый выход ФЛ, $\varphi_{\text{Trp}} = 0.14$ – квантовый выход ФЛ **Trp** (H_2O , pH 7, $T = 298$ К) [156], S_i и A_i – светосумма под полосой ФЛ и оптическая плотность исследуемых растворов на длине волны возбуждающего света, соответственно, S_{Trp} и A_{Trp} – аналогично для триптофана.

2.5.4 Метод растворимости

Определение pK_a методом растворимости проводили следующим образом. Заведомо избыточную массу вещества растворяли в 5 мл воды для получения насыщенного раствора. При перемешивании, в течение 7 часов, отбирали надосадочную жидкость объемом 0.1, 0.25 и 0.5 мл каждые 1, 3, 5, 7 часов и разбавляли до метки водой в мерных колбах объемом 50 и 100 мл. Концентрацию полученных растворов регистрировали на спектрофотометре. После чего определяли растворимость в нейтральной форме. Также определяли предельную растворимость при различных значениях pH. Щелочные значения pH достигали с использованием буферных растворов в системах $KH_2PO_4 - Na_2B_2O_7$ и $Na_2B_2O_7 - NaOH$. Согласно формуле 2.4. находили значения pK_a :

$$S_{pH} = S_i(1 + 10^{pH-pK_a}) \quad (2.4)$$

где S_{pH} – растворимость вещества при определенном pH; S_i – растворимость вещества в нейтральной форме.

2.6 Растворимость 6-аминоурацила и 1-метил-6-аминоурацила

Готовили перенасыщенные растворы для каждого вещества в воде, ДМСО, ИПС и ацетоне. Непрерывно перемешивали в течение 7 часов при температуре (25.0 ± 0.1) °С. Концентрацию регистрировали по истечении 1, 3, 5, 7 часов. После завершения эксперимента образец центрифугировали и отбирали надосадочную жидкость. Далее разбавляли раствор до пределов детектирования и определяли концентрацию полученного раствора спектрофотометрически по методике [157]. Для каждого соединения строили градуировочный график в координатах оптическая плотность – концентрация реагента, по которому рассчитывали концентрацию вещества с учетом разбавления. Исходя из полученных данных, рассчитывали его растворимость. Оптическую плотность измеряли при длине волны 263 нм для **6NH₂U** и 266 нм для **1CH₃6NH₂U**. Для определения

термодинамических характеристик в воде были выбраны значения молярной концентрации, выраженные через растворимость S при 15, 25, 35, 45 °С. Термодинамические характеристики определены по формуле 2.5 [158].

$$\ln S = -\frac{\Delta H^\circ}{RT} + \frac{\Delta S^\circ}{R} \quad (2.5)$$

где S – растворимость в воде, моль/л.

2.7 Определение относительной устойчивости таутомеров 6-аминоурацила

Квантово-химические расчеты выполнены с использованием программного пакета Gaussian 09, Rev.C.01 [159]. Визуализацию и обработку молекул осуществляли с использованием программы ChemCraft [160]. В данной работе рассчитана устойчивость таутомеров **6NH₂U** с учетом неспецифической и специфической сольватации в воде и ДМСО. Порядок и обозначения кето-енольных таутомеров использовались в соответствии с предложенным обозначением в работе [51]. Рассчитано 6 кето-енольных (A–F) и 2 амин-иминных (G, H) таутомеров (Рисунок 2.1).

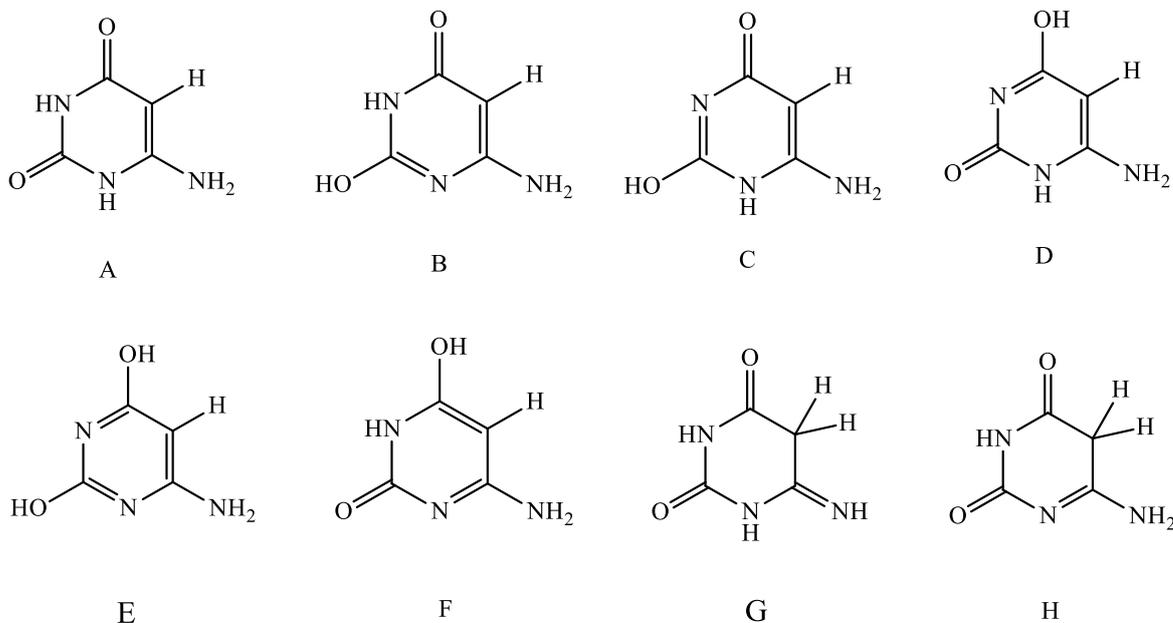


Рисунок 2.1 – Таутомерные формы 6-аминоурацила

Полная оптимизация геометрических параметров, решение колебательной задачи, учет специфической сольватации и расчет энергии Гиббса выполнены с применением теории функционала плотности в приближении обменного TPSS τ -зависимого градиентно-скорректированного функционала [161]. Использовали базисный набор тройного валентного расщепления, дополненный поляризационными функциями d- и p-типа, а также набором диффузных функций 6-311+G(d,p) [162]. Неспецифическую сольватацию ДМСО и водой оценивали с использованием поляризационно-континуальной модели Томази (PCM) [163]. Для расчета специфической сольватации в воде были использованы пятиводный [50] и девятиводный кластеры.

2.8 ЯМР спектроскопия

Спектры ЯМР ^1H , ^{13}C и ^{15}N регистрировали на импульсном спектрометре «Bruker Avance III» с рабочей частотой 500.13 (^1H), 125.47 (^{13}C) и 50.67 МГц (^{15}N) с использованием 5 мм датчика с Z-градиентом PABBO при постоянной температуре образца 298 К в растворе D_2O и DMSO-d_6 . Спектры ЯМР ^{13}C с подавлением по протонам (WALTZ-16) регистрируют при следующих условиях: спектральное окно – 29.8 кГц, количество точек – 64К, длительность возбуждающего импульса (30°) – 3.2 мкс, релаксационная задержка – 2 с, количество проходов – 2к. Химические сдвиги ЯМР ^{15}N получены из F_1 -проекции ^1H - ^{15}N НМВС спектров, значения приведены в аммиачной шкале. С целью увеличения цифрового разрешения применялось дополнение нулями и умножение Фурье-образа спектра на экспоненциальную функцию ($I_b = 0.1$ Гц для ^1H и 1 Гц для ^{13}C). Редактирование спектров ЯМР ^{13}C проводилось на основании экспериментов DEPT-90 и DEPT-135 [164].

ГЛАВА 3 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

3.1 Определение констант диссоциации 5-замещенных 6-метил- и 6-амино производных урацила

3.1.1 Потенциометрический метод

Определенные методом потенциометрического титрования константы и термодинамические характеристики кислотно-основного равновесия для 5-замещенных производных 6-метил- и 6-аминоурацилов представлены в таблице 3.1.

Наибольшее влияние на константу диссоциации производных 6-метилурацила при 25 °С оказывают электроноакцепторные группы –CN и –CHO, значительно уменьшая pK_a на 2.0 и 2.1, соответственно, по сравнению с **6CH₃U**. С другой стороны, присутствие в молекуле 6-метилурацила 1-пентил-4-метил-1,2,3-триазол-4-илного заместителя у пятого углеродного атома приводит к увеличению pK_a примерно на 0.5 единицы по сравнению с 6-метилурацилом, причем термодинамические характеристики кислотно-основного равновесия обоих веществ имеют близкие значения [165].

Влияние 1,2,3-триазольного цикла на величину pK_a не существенно, о чем свидетельствуют константы и термодинамические характеристики кислотно-основного равновесия **5,6diCH₃U** (Таблица 3.1). Также наблюдаются близкие значения констант диссоциации **5NH₂6CH₃U** и **6CH₃U**, что свидетельствует о слабом влиянии аминогруппы в 5 положении 6-метилурацила на значения pK_a .

Полученные данные по **6NH₂U** указывают на то, что аминогруппа в 6 положении приводит к уменьшению константы диссоциации на 1.0 по сравнению с метильной группой. При введении нитрозо- заместителя в 5 положение 6-аминоурацила происходит уменьшение pK_a на 3.34 по сравнению с **6NH₂U**. Видно, что нитрозогруппа оказывает наибольшее влияние на константу диссоциации среди всех изученных в данной работе урацилов.

Таблица 3.1 – Константы и термодинамические характеристики кислотно-основного равновесия 5 замещенных производных 6-метил- и 6-аминоурацила в воде (0.1M KNO₃)

Соединение	T, °C	pK _a	ΔG^{298} , кДж·моль ⁻¹	ΔH , кДж·моль ⁻¹	ΔS^{298} , Дж·моль ⁻¹ ·К ⁻¹
5-замещенные 6-метилурацилы					
6CH₃U	15	9.85 ± 0,04	55.0 ± 0.2	13.3 ± 0.4	-140 ± 1
	25	9.65 ± 0.03			
	35	9.62 ± 0.03			
	45	9.61 ± 0.03			
5,6diCH₃U	15	10.33 ± 0.04	58.5 ± 0.2	11.6 ± 0.3	-158 ± 1
	25	10.26 ± 0.03			
	35	10.20 ± 0.04			
	45	10.13 ± 0.03			
TMU	15	10.14 ± 0.07	57.5 ± 0.9	12.9 ± 0.4	-150 ± 2
	25	10.09 ± 0.07			
	35	9.98 ± 0.05			
	45	9.93 ± 0.05			
5CN6CH₃U	15	7.12 ± 0.01	39.9 ± 0.9	12.0 ± 1.2	-93 ± 7
	25	7.00 ± 0.02			
	35	6.95 ± 0.03			
	45	6.91 ± 0.03			
5CHO6CH₃U	15	7.58 ± 0.05	43.1 ± 0.2	16.3 ± 0.5	-89 ± 1
	25	7.55 ± 0.04			
	35	7.45 ± 0.04			
	45	7.30 ± 0.04			
5NH₂6CH₃U	15	9.65 ± 0.03	54.8 ± 0.2	14.7 ± 0.7	-134 ± 3
	25	9.60 ± 0.03			
	35	9.45 ± 0.04			
	45	9.42 ± 0.04			
5-замещенные 6-аминоурацилы					
6NH₂U	15	8.80 ± 0.04	49.1 ± 0.3	19.4 ± 0.9	-100 ± 7
	25	8.61 ± 0.06			
	35	8.53 ± 0.06			
	45	8.46 ± 0.06			
5NO6NH₂U	15	5.39 ± 0.03	30.1 ± 0.1	17.0 ± 0.2	-43 ± 1
	25	5.27 ± 0.02			
	35	5.20 ± 0.03			
	45	5.09 ± 0.03			

Термодинамические характеристики кислотно-основного равновесия 5-замещенных производных 6-метил- и 6-аминоурацилов свидетельствуют о смещении равновесия в сторону молекулярной формы в нейтральных водных растворах.

3.1.2 Спектрофотометрический метод

Спектрофотометрический метод позволяет проводить определение pK_a при значительно меньших, по сравнению с потенциометрическим методом, концентрациях (до 10^{-4} М в водных растворах) для большинства производных урацила. Область значений констант диссоциации определяли методом спектрофотометрического титрования. После оценки области значения константы кислотно-основного равновесия производных урацила, точную величину pK_a определяли с использованием буферных растворов. Как видно из результатов (Таблица 3.2), величины pK_a , полученные спектрофотометрически при 25 °С для **6CH₃U**, **5,6diCH₃U**, **TMU**[165], **5CN6CH₃U**, **5CHO6CH₃U**, **6NH₂U**, хорошо согласуются со значениями, полученными методом потенциометрического титрования (Таблица 3.1).

Таблица 3.2 – Значения pK_a 5-замещенных производных 6-метил- и 6-аминоурацила, полученных спектрофотометрическим методом, в воде при 25 °С

Соединение	pK_a	λ , нм (НА → А ⁻)*
6CH₃U	9.53 ± 0.05	260 → 279
5,6diCH₃U	10.28 ± 0.11	267 → 273
TMU	9.59 ± 0.10	266 → 283
5CHO6CH₃U	7.51 ± 0.03	284 → 304
5CN6CH₃U	7.00 ± 0.02	273 → 288
5NO6NH₂U	5.00 ± 0.14	315 → 315
6NH₂U	8.69 ± 0.03	263 → 266

* (НА → А⁻) – Переход урацила от нейтральной формы к анионной.

Различия в значениях, полученных двумя методами для **TMU**, можно объяснить наличием небольшого количества ацетонитрила в исходном растворе при потенциометрическом титровании (Таблица 3.1) для определения pK_a [165].

3.1.3 Метод растворимости

Растворимость органических веществ в различных по природе растворителях во многом зависит от доступных для сольватации групп. А поскольку объекты исследования являются слабыми кислотами, то константа диссоциации будет зависеть от двух факторов: растворимости нейтральной и анионной формы вещества в данном растворителе.

В этой связи была определена растворимость **6NH₂U**, **6CH₃U**, **5,6diCH₃U**, **5CN6CH₃U**, **5CHO6CH₃U** в воде при 25 °С (Таблица 3.3).

Таблица 3.3 – Растворимость некоторых 5-замещенных производных 6-метил- и 6-аминоурацила в воде при 25 °С

Соединение	S _i , мг/мл	λ, нм	ε, л·моль ⁻¹ ·см ⁻¹
6NH₂U	0.74	263	22211 ± 372
6CH₃U	6.16	260	9960 ± 509
5,6diCH₃U	1.88	267	9476 ± 262
5CN6CH₃U	2.79	272	11579 ± 346
5CHO6CH₃U	4.68	284	12520 ± 214

Среди исследованных производных урацила, 6-аминоурацил обладает худшей растворимостью, что может быть связано с особенностями его кристаллической структуры.

Поскольку у многих производных урацила низкая растворимость в воде, одним из доступных методов определения pK_a является метод растворимости. На примере 6-аминоурацила и 1-метил-6-аминоурацила были определены константы кислотно-основного равновесия в воде (Таблица 3.4).

Таблица 3.4 – Константа диссоциации и растворимость 6-аминоурацила и 1-метил-6-аминоурацила при различных значениях pH их водных растворов при 20 °С

6NH₂U						
pH	8.50	8.64	8.70	8.80	8.90	9.02
S, мг/мл	0.69	0.82	0.87	1.02	1.07	1.32
pK _a	8.72 ± 0.04					
1CH₃6NH₂U						
pH	10.02	10.22	10.40	10.74	10.85	
S, мг/мл	0.74	1.61	1.79	1.92	2.03	
pK _a	10.75 ± 0.12					

Используя значения растворимости данных соединений в молекулярной и ионной форме, определяли значение pK_a.

Увеличение растворимости происходит с повышением pH водных растворов за счет образования анионной формы согласно формуле 3.1.

$$S_{pH} = S_i(1 + 10^{pH-pK_a}) \quad (3.1)$$

Определенные данным методом величины pK_a в воде хорошо согласуются с результатами, полученными другими методами в этой работе и литературными данными. Метод растворимости впервые применен для определения констант диссоциации **6NH₂U** и может быть использован для определения pK_a 5,6 – замещенных производных урацила в водных растворах.

3.1.3.1 Зависимость растворимости 6-аминоурацила и 1-метил-6-аминоурацила от растворителя и температуры

Величины растворимостей 6-аминоурацила и 1-метил-6-аминоурацила в протонных (вода и изопропиловый спирт (ИПС)) и апротонных (ацетон и диметилсульфоксид (ДМСО)) растворителях приведены в таблице 3.5 и опубликованы нами в работе [166].

Таблица 3.5 – Растворимость **6NH₂U** и **1CH₃6NH₂U** в воде и некоторых органических растворителях при 25 °С, мг/мл

Соединение	Вода	ДМСО	Ацетон	ИПС
6NH₂U	0.73 ± 0.01	28.47 ± 0.18	1.25 ± 0.04	0.64 ± 0.01
1CH₃6NH₂U	0.82 ± 0.01	8.05 ± 0.16	1.48 ± 0.01	0.080 ± 0.005

Из таблицы 3.5 видно, что наибольшая растворимость как у **6NH₂U**, так и у **1CH₃6NH₂U** наблюдается в ДМСО. При этом замена протона у азота N1 на метильную группу приводит к уменьшению растворимости в данном растворителе примерно в 3 раза. Еще более заметное уменьшение (в 8 раз) происходит при сравнении растворимости **6NH₂U** и **1CH₃6NH₂U** в ИПС. С другой стороны, растворимости в воде и ацетоне N-метилзамещенного производного 6-аминоурацила при 25 °С имеют близкие значения с **6NH₂U**. Данные результаты, очевидно, связаны особенностями кристаллических решеток **6NH₂U** и **1CH₃6NH₂U**. С целью изучения влияния температуры на растворимость были определены предельные значения концентрации в водном растворе при 15, 25, 35 и 45 °С, представленные в таблице 3.6. Переход **6NH₂U** из твердого состояния в сольватированную форму с повышением температуры происходит эффективнее, в отличие от его метилзамещенного производного. По-видимому, это обусловлено различием кристаллических решеток данных соединений.

Таблица 3.6 – Концентрация насыщенных растворов **6NH₂U** и **1CH₃6NH₂U** в воде в зависимости от температуры, С·10⁻³, моль/л

Температура, °С	6NH₂U	1CH₃6NH₂U
15	4.6 ± 0.1	4.6 ± 0.3
25	6.0 ± 0.1	5.3 ± 0.1
35	8.6 ± 0.2	7.3 ± 0.1
45	13.6 ± 0.4	8.4 ± 0.5

Из приведенных данных видно, что при 15 – 35 °С растворимость в воде **6NH₂U** и **1CH₃6NH₂U** практически одинакова, однако при последующем увеличении температуры она растет значительно быстрее у 6-аминоурацила, чем у его N-метилзамещенного производного (Рисунок 3.1).

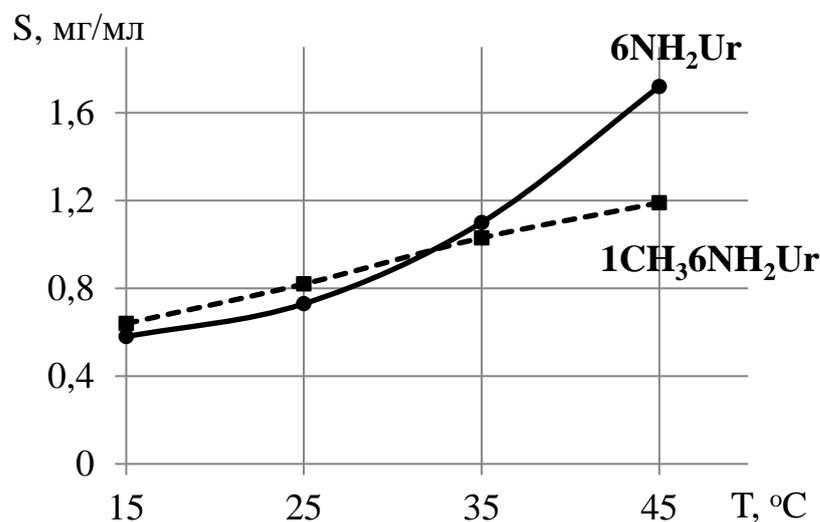


Рисунок 3.1 – Кривые растворимости **6NH₂U** и **1CH₃6NH₂U** в воде в зависимости от температуры

Экспоненциальный вид кривой растворимости 6-аминоурацила с повышением температуры, вероятно, связан с разрывом межмолекулярных водородных связей в его кристаллической решетке при нагревании. Рост растворимости наблюдается и у **1CH₃6NH₂U**, однако, в отличие от **6NH₂U**, вид кривой растворимости **1CH₃6NH₂U** линейный.

Изучение влияния температуры на растворение **6NH₂U** и **1CH₃6NH₂U** в воде дает возможность оценить термодинамические характеристики процесса растворения, приведенные в таблице 3.7.

Таблица 3.7 – Термодинамические характеристики предельной растворимости для 6-аминоурацила и 1-метил-6-аминоурацила в воде

Соединение	ΔG^{298} , кДж·моль ⁻¹	ΔH , кДж·моль ⁻¹	ΔS^{298} , Дж·моль ⁻¹ ·К ⁻¹
6NH₂U	12.7 ± 0.3	26.3 ± 0.3	45.9 ± 0.4
1CH₃6NH₂U	26.1 ± 0.2	61.3 ± 0.9	118.4 ± 0.6

Как видно из таблицы 3.7, растворение данных соединений в воде энергетически не выгодно, причем вклад энтальпийного фактора в величину ΔG является определяющим. Порядок полученных термодинамических характеристик предельной растворимости хорошо согласуется с литературными данными для 5- и 6-замещенных производных урацила [157].

Таким образом, изучена предельная растворимость 6-аминоурацила и 1-метил-6-аминоурацила в протонных (вода и изопропиловый спирт) и апротонных (ацетон и диметилсульфоксид) растворителях. Установлено, что максимальная растворимость среди изученных растворителей у 6-аминоурацила и 1-метил-6-аминоурацила наблюдается в ДМСО. Полученные результаты предельной растворимости **6NH₂U** и **1CH₃6NH₂U** в воде, ДМСО, ацетоне и ИПС, свидетельствуют о существенном влиянии природы растворителя: наибольшая растворимость наблюдается в растворителях с большим дипольным моментом. Показано влияние температуры на растворимость **6NH₂U** и **1CH₃6NH₂U** в воде. На основе полученных данных по растворимости **6NH₂U** и **1CH₃6NH₂U** при 15, 25, 35, 45 °С были рассчитаны термодинамические характеристики предельной растворимости их водных растворов.

3.1.4 Спектрально-люминесцентный метод

При экспериментальном определении pK_a некоторых производных урацила возникают сложности из-за их низкой растворимости в водных растворах. Поскольку коэффициент молярной экстинкции максимумов полос поглощения производных урацила в водных растворах составляет величины порядка $(0.5 \div 1.0) \cdot 10^4$ л·моль⁻¹·см⁻¹, это накладывает ограничения на применимость спектрофотометрического метода в определении pK_a .

Зависимость спектров флуоресценции (ФЛ) некоторых органических люминофоров от pH среды может быть основой метода измерения pK_a как в основном, так и в электронно-возбужденном состоянии [167]. Урацил и его производные также обладают флуоресценцией [57], а высокая чувствительность

ФЛ метода может быть перспективна при изучении кислотно-основного равновесия при недостаточной растворимости урацила или его малом содержании в исследуемом растворе, что важно, например, при исследовании таутомерных превращений в урацилах.

В этой связи целью является оценка возможности использования ФЛ метода для исследования кислотно-основного равновесия и определения pK_a в водных растворах для ряда биологически активных производных урацила: **T**, **5FU** и **6NH₂U**. Результаты исследований были также описаны нами в работе [168].

В УФ спектре нейтрального водного раствора **5FU** (Рисунок 3.2) наблюдается полоса поглощения с максимумом 265 нм, а при увеличении pH регистрируется появление «плеча» в области 310 нм (Рисунок 3.2). Изменения спектров поглощения обусловлены диссоциацией молекул **5FU**, что позволяет определить pK_a спектрофотометрическим методом. Образование анионных форм **5FU** регистрируется также в спектрах ФЛ (Рисунок 3.3), что предоставляет возможность определения pK_a **5FU** спектрально-люминесцентным методом.

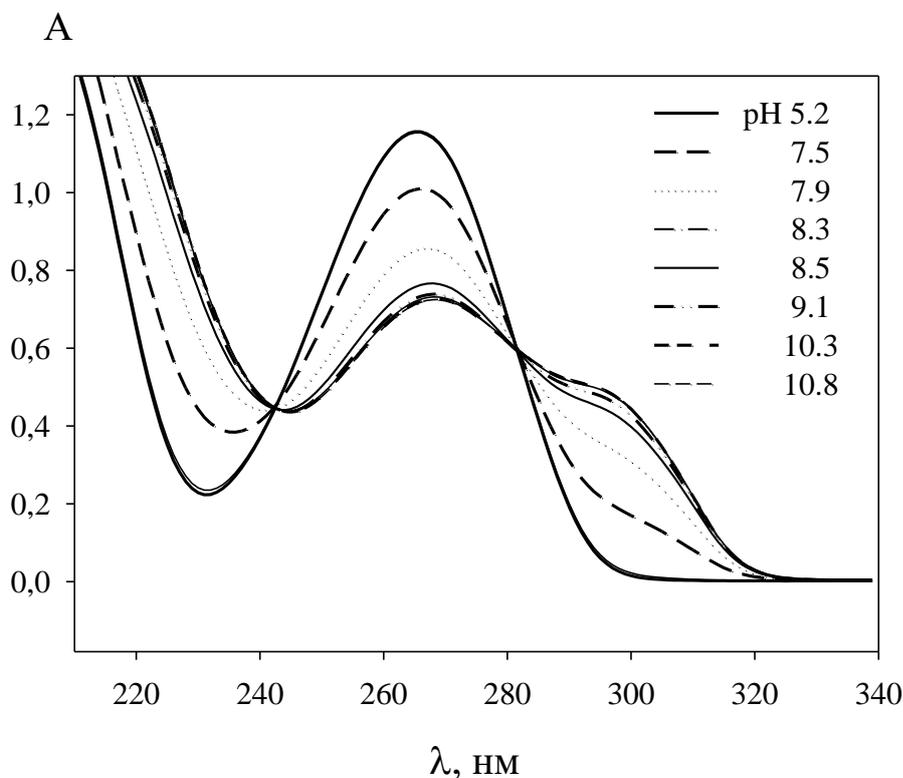


Рисунок 3.2 – Спектры поглощения **5FU** при различных pH ($2.0 \cdot 10^{-4}$ моль/л, H₂O, 25 °C)

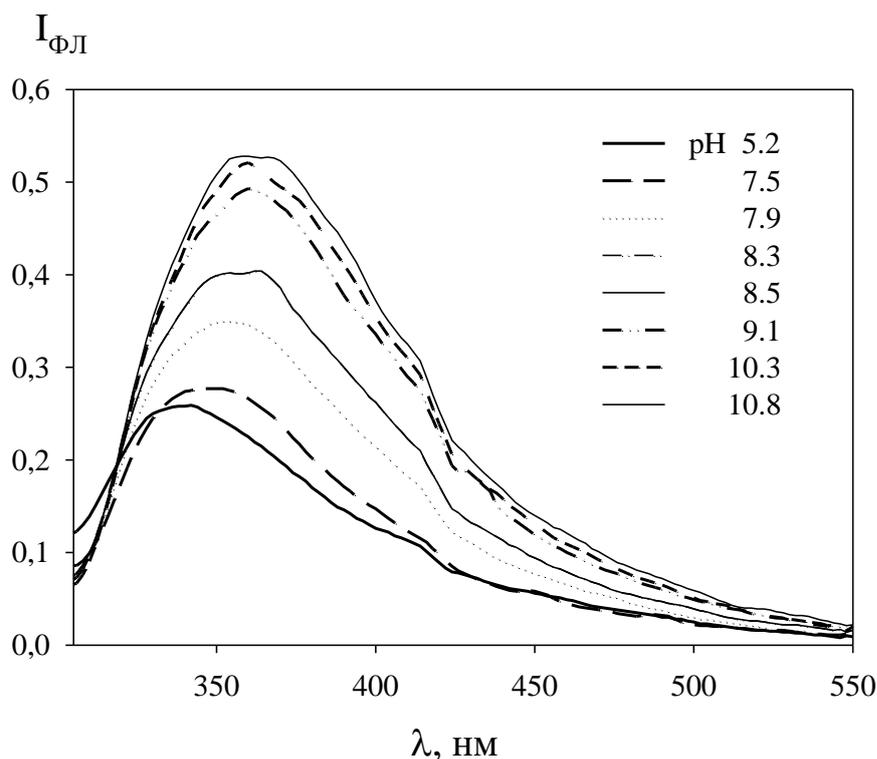


Рисунок 3.3 – Скорректированные спектры ФЛ **5FU** ($\lambda_{ex} = 240$ нм, $2.0 \cdot 10^{-4}$ моль/л, H_2O , 25 °С)

Увеличение рН в интервале 5.2 – 10.8 сопровождается ростом интенсивности ФЛ $I_{ФЛ}$ и батофлорным сдвигом $\lambda_{ФЛ}$ 5-фторурацила (Рисунок 3.2). Следует отметить, что фотовозбуждение **5FU** проводили на длине волны возбуждающего света $\lambda_{ex} = 240$ нм в коротковолновой изобестической точке (Рисунок 3.3). В этой связи не требовалось введение поправок в значения I_{fl} на изменение оптической плотности. Методом трех касательных была установлена точка эквивалентности FL титрования **5FU**, которая составила $pK_a = 7.90$ и 8.05 единиц для зависимостей $I_{ФЛ}$ и $\lambda_{ФЛ}$ от рН (Рисунок 3.4), соответственно, что близко к известным значениям pK_a **5FU** (Таблица 1.5).

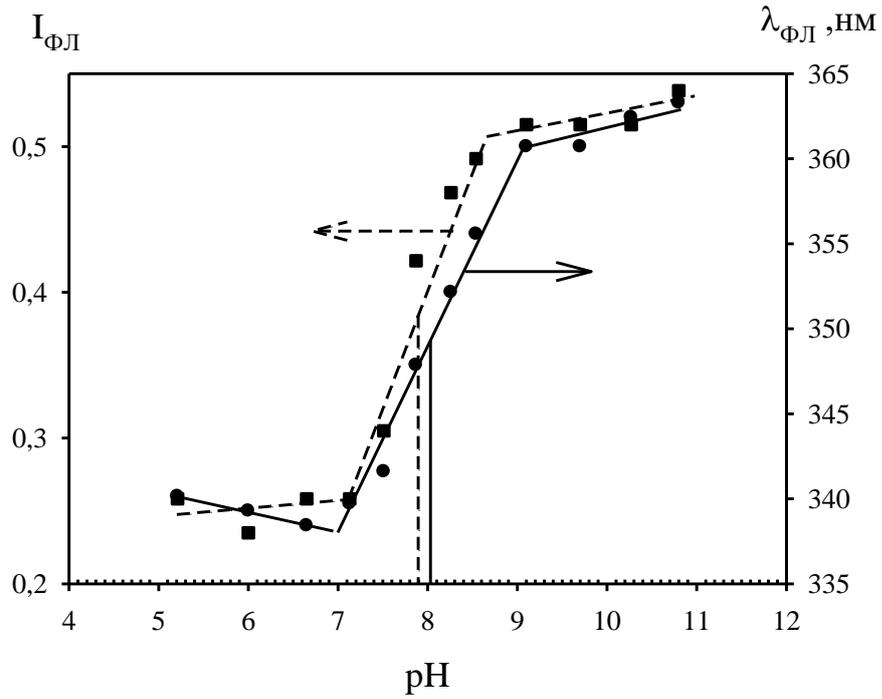


Рисунок 3.4 – Зависимости $I_{\text{ФЛ}}$ (1) и $\lambda_{\text{ФЛ}}$ (2) **5FU** от pH ($\lambda_{\text{ex}} = 240$ нм, $2 \cdot 10^{-4}$ моль/л, H_2O , 25 °С)

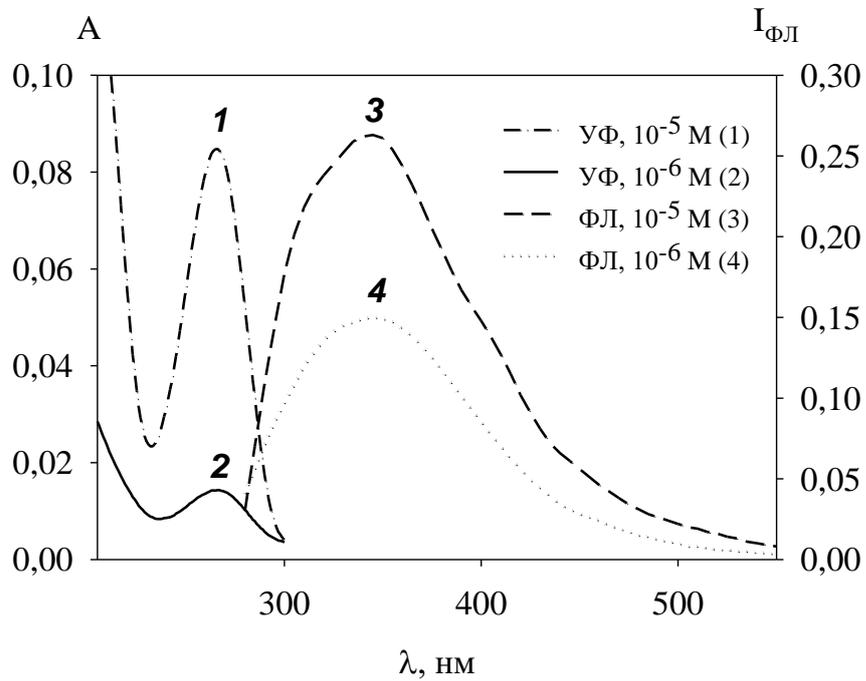


Рисунок 3.5 – Спектры поглощения (УФ, 1, 2) и флюоресценции (ФЛ, 3, 4) **5-фторурацила** с концентрацией $1.0 \cdot 10^{-5}$ (1, 3) и $1.0 \cdot 10^{-6}$ моль/л (2, 4) (pH = 7, H_2O , 25 °С)

Найденная величина pK_a согласуется с известными значениями pK_a **5FU**, определенными другими методами (Таблица 1.5). Следует отметить, что исследование кислотно-основного равновесия **5FU** методом ФЛ можно проводить при существенно меньших концентрациях без потери точности определения pK_a . На рисунке 3.5 показаны УФ и люминесцентные спектры **5FU** при различных концентрациях в нейтральном водном растворе. Даже при концентрации $[5FU] = 1.0 \cdot 10^{-6}$ моль/л интенсивность ФЛ достаточно высока для надежной регистрации сигнала, притом, что в щелочных растворах $I_{ФЛ}$ будет только возрастать (Рисунок 3.3). В то же время микромолярная концентрация **5FU** недостаточна для спектрофотометрических измерений (Рисунок 3.5).

Данный пример иллюстрирует надежность ФЛ метода для количественного описания кислотно-основного равновесия урацилов в водных растворах. Для проверки применимости ФЛ метода были изучены тимин и 6-аминоурацил.

Для водных растворов тимина в диапазоне рН 5.5 – 11.0 наблюдаются изменения в УФ и ФЛ спектрах (Рисунок 3.6, 3.7, 3.8), подобные таковым для **5FU**. Фотовозбуждение растворов **T** проводили в изобестической точке при $\lambda_{ex} = 240$ нм.

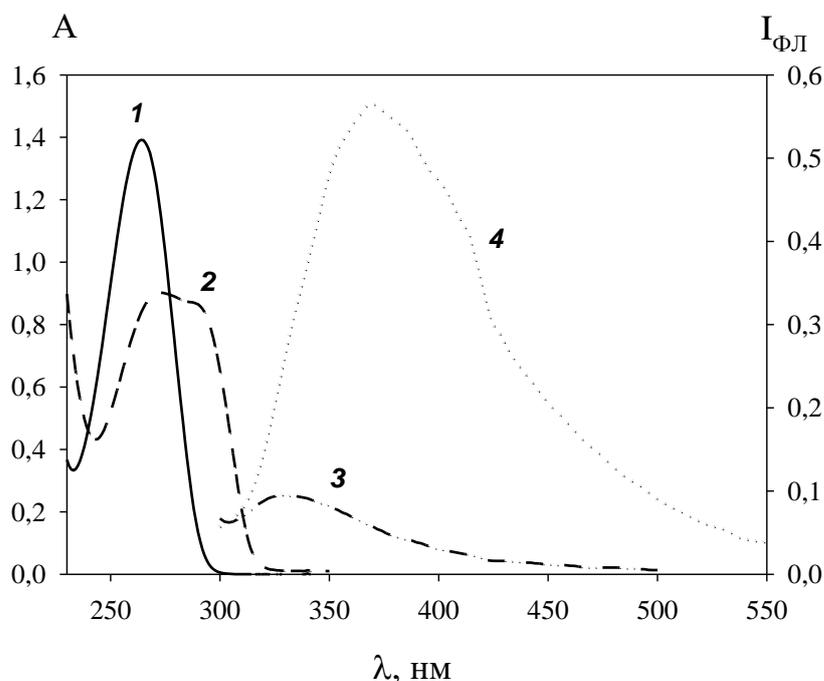


Рисунок 3.6 – Спектры поглощения (1, 2) и ФЛ (3, 4) тимина при рН 5.5 и 11.0, соответственно ($\lambda_{ex} = 240$ нм, $2.0 \cdot 10^{-4}$ моль/л, H_2O , 25 °С)

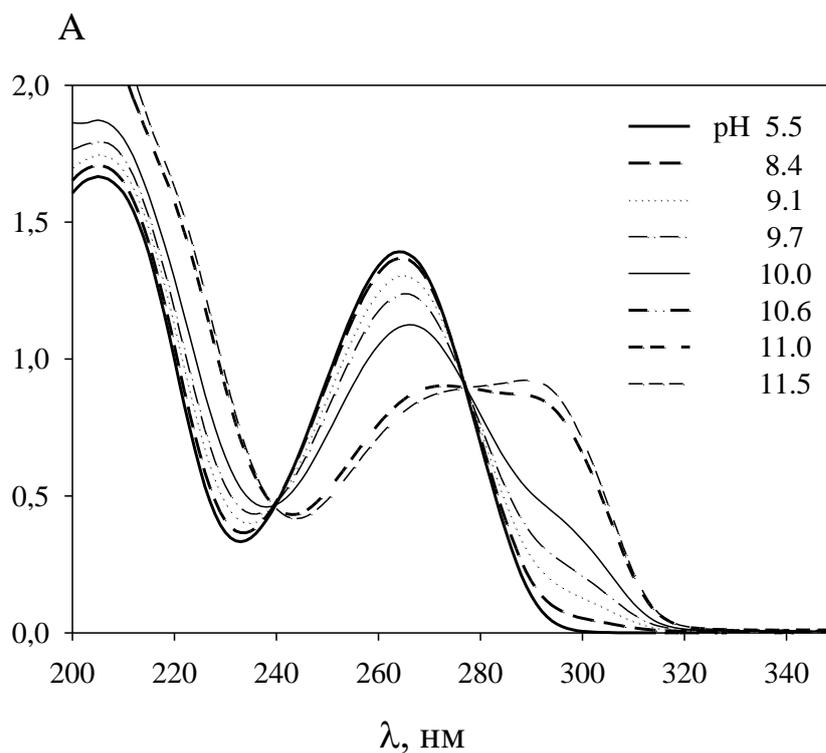


Рисунок 3.7 – Спектры поглощения тимина при различных pH ($2.0 \cdot 10^{-4}$ моль/л, H_2O , 298 K)

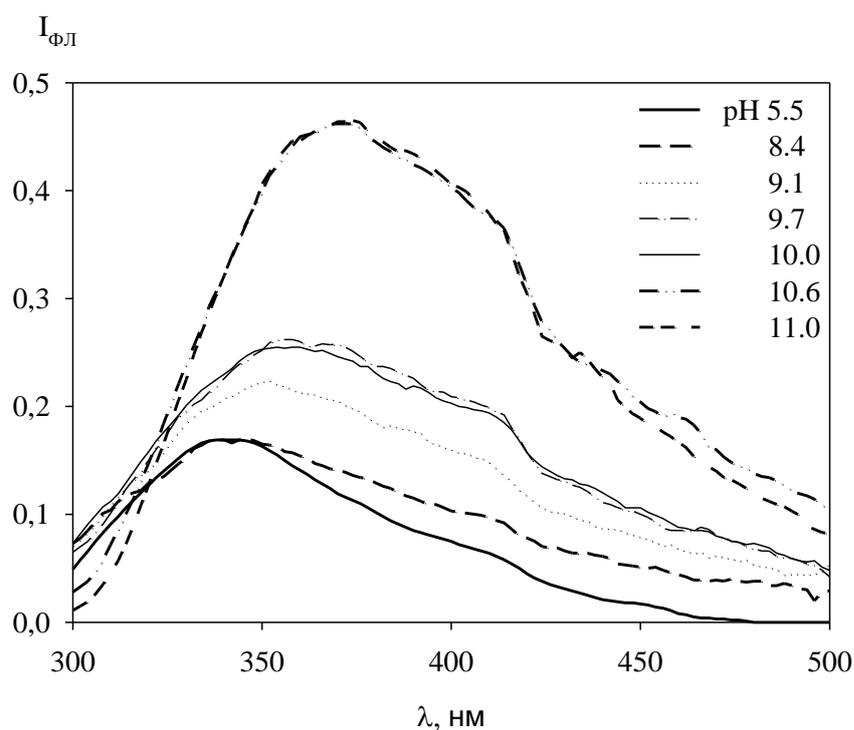


Рисунок 3.8 – Скорректированные спектры ФЛ тимина ($\lambda_{ex} = 240$ нм, $2.0 \cdot 10^{-4}$ моль/л, H_2O , 25 °C)

Обработка результатов флюоресцентных измерений водных растворов **T** способом, примененным выше для **5FU**, выявила ряд особенностей. Так, величина $pK_a = 9.3$ определяется с заметным отклонением от экспериментальных данных для зависимости $\lambda_{\text{ФЛ}}$ от pH. Более удовлетворительное соответствие с данными таблицы 1.5 демонстрирует зависимость $I_{\text{ФЛ}}$ от pH ($pK_a = 9.68$, Рисунок 3.9, кривая 1). По-видимому, основной причиной наблюдаемых отклонений является сложный вид ФЛ спектра **T**, в котором при pH 10 и выше отчетливо проявляется плечо при ~ 410 нм (Рисунок 3.8). В этой ситуации более надежным способом учета количественных изменений в ФЛ спектрах при варьировании pH представляется интегральный метод, а именно определение зависимости квантового выхода ФЛ φ от pH. При таком подходе методически удобно проводить фотовозбуждение растворов урацила в изобестической точке. Как следует из уравнения (2.3) в этом случае нет необходимости контролировать оптическую плотность раствора, и зависимость светосуммы ФЛ от pH полностью соответствует зависимости φ от pH. Действительно, эта зависимость, показанная на рисунке 3.9, кривая 2, имеет точку эквивалентности при pH 9.87, что прекрасно согласуется с известными экспериментальными данными для тимина (Таблица 1.5).

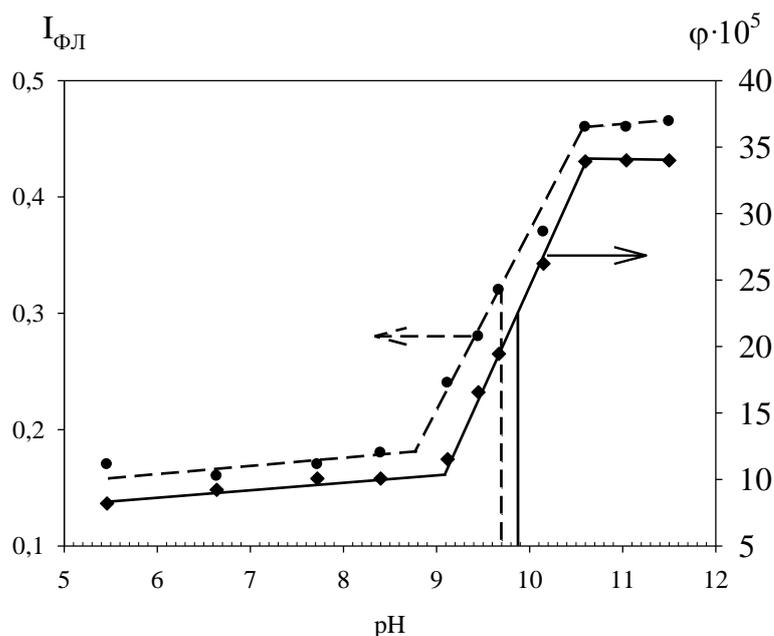


Рисунок 3.9 – Зависимости $I_{\text{ФЛ}}$ (1) и φ (2) от pH для **T** ($\lambda_{\text{ex}} = 240$ нм, $2.0 \cdot 10^{-4}$ моль/л, H_2O , 25 °C)

Определение константы диссоциации люминесцентным методом для 6-аминоурацила проводили в диапазоне рН 5.7 – 11.6. УФ спектр **6NH₂U** в удобной для измерений области (> 260 нм) демонстрирует незначительное батохромное смещение максимума оптического поглощения (Рисунок 3.10) [169]. Аналогично, положение максимума полосы ФЛ 6-аминоурацила практически неизменно во всем исследованном диапазоне рН, что не позволяет использовать зависимость $\lambda_{\text{ФЛ}}$ от рН для определения pK_a . Более того, сложный вид полосы эмиссии 6-аминоурацила (Рисунок 3.10) обуславливает выбор интегрального метода определения pK_a с помощью зависимости φ от рН (Рисунок 3.11). При определении квантового выхода учитывали изменение оптической плотности на длине волны возбуждающего света в соответствии с уравнением (3.2).

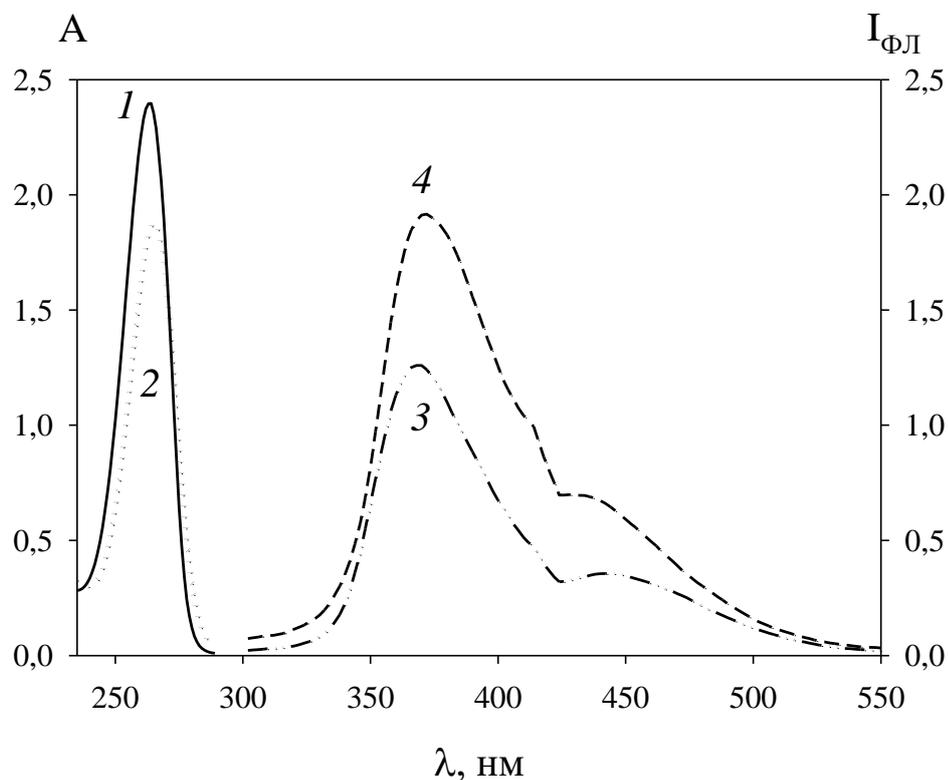


Рисунок 3.10 – Спектры поглощения (1, 2) и флюоресценции (3, 4) 6-аминоурацила при рН 5.7 и 11.6, соответственно ($\lambda_{ex} = 240$ нм, $2.0 \cdot 10^{-4}$ моль/л, H_2O , 25 °С)

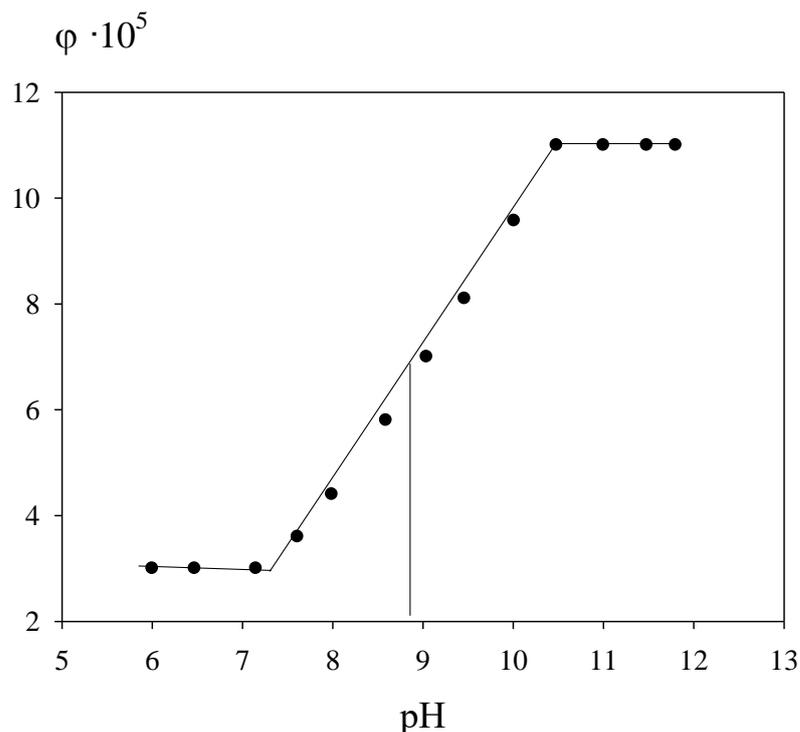


Рисунок 3.11 – Зависимость ϕ ФЛ $6\text{NH}_2\text{U}$ от pH ($\lambda_{ex} = 240$ нм, $2.0 \cdot 10^{-4}$ моль/л, H_2O , 25°C)

Значение pK_a , полученное из кривой ФЛ титрования $6\text{NH}_2\text{U}$, равно 8.9 и в пределах погрешности измерений, также совпадает с величинами pK_a , определенными другими экспериментальными и расчетными методами (Таблица 1.5). Данный метод впервые используется для определения константы диссоциации производных урацила, и может быть использован в дальнейшем для определения pK_a 5,6-замещенных производных урацила с низкой растворимостью.

3.1.4.1 Кето-енольная и амин-иминная таутомерия 6-аминоурацила в воде и ДМСО

Поскольку спектрально-люминесцентный метод имеет высокую чувствительность, и данным методом показано присутствие в водных растворах минорных таутомеров 5-фторурацила [170], была проведена оценка возможного существования и влияния кето-енольных и амин-иминных таутомерных форм на кислотно-основные свойства $6\text{NH}_2\text{U}$ в растворах. Относительная устойчивость 6

кето-енольных (А – F) и 2 амин-иминных (G, H) таутомера **6NH₂U** рассчитана с учетом неспецифической и специфической сольватации в воде и ДМСО [171].

Для расчета специфической сольватации в воде был использован пятиводный кластер (Рисунок 3.12), подробно описанный в работе [50].

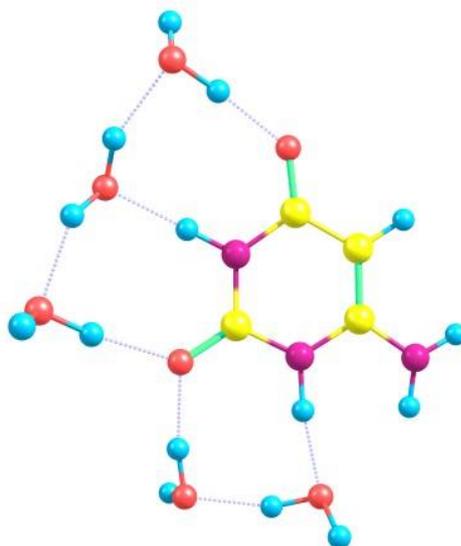


Рисунок 3.12 – Пятиводный кластер 6-аминоурацила

Анализ устойчивости таутомерных форм проводили относительно таутомера с наименьшей энергией Гиббса. Квантово-химические расчеты показали, что самой стабильной формой как в воде, так и в ДМСО при учете неспецифической сольватации является дикето-форма А (Таблица 3.8).

Таблица 3.8 – Относительная устойчивость таутомеров 6-аминоурацила ΔG , кДж/моль

Таутомер	PCM(H ₂ O)		PCM(ДМСО)	
	G4	TPSS	G4	TPSS
A	0	0	0	0
B	39.8	41.8	48.4	51.9
C	64.5	62.7	80.3	79.9
D	30.9	31.5	41.7	43.6
E	52.4	59.0	61.6	71.2
F	38.5	40.2	53.7	55.9
G	36.2	37.2	29.8	32.0
H	11.3	10.7	16.0	14.3

Следующим в ряду устойчивости в воде и ДМСО является таутомер Н (10.7 и 14.3 кДж/моль соответственно) (Рисунок 3.13).

При сравнении рядов устойчивости кето-енольных таутомеров (А – F) $6\text{NH}_2\text{U}$, с ранее опубликованными литературными данными для 5- и 6-замещенных урацилов, отличий в порядке относительной устойчивости таутомеров не наблюдается [50, 51, 53, 54, 56].

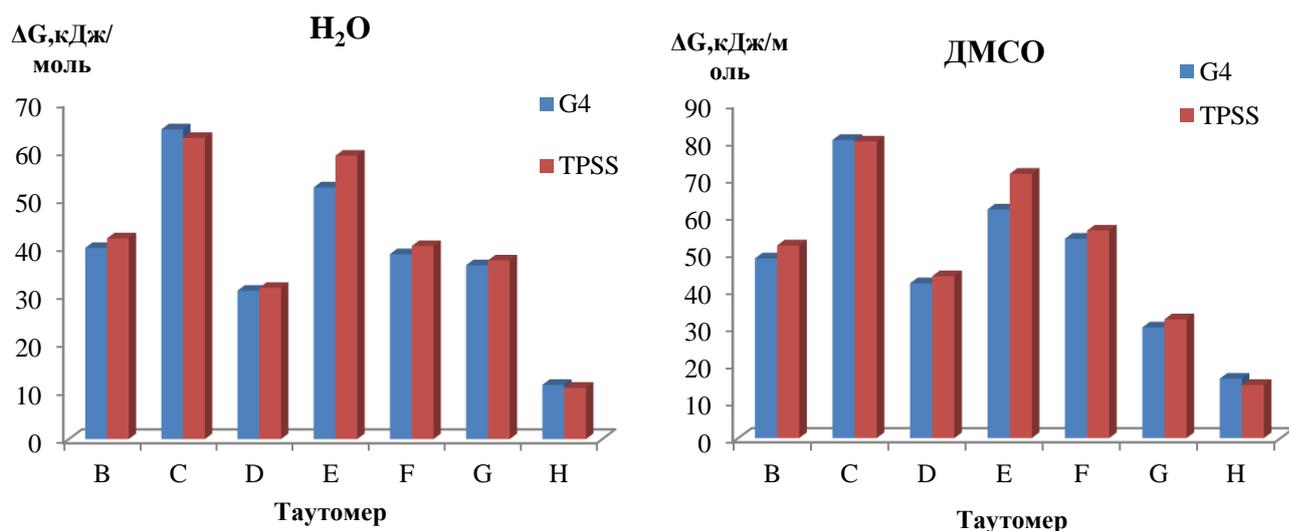


Рисунок 3.13 – Диаграммы рядов относительной устойчивости таутомеров 6-аминоурацила с учетом неспецифической сольватации в воде и в ДМСО

На рисунке 3.14 представлены некоторые таутомерные формы $6\text{NH}_2\text{U}$ в модели расчета сольватной оболочки с использованием 9-ти водного кластера (Рисунок 3.14).

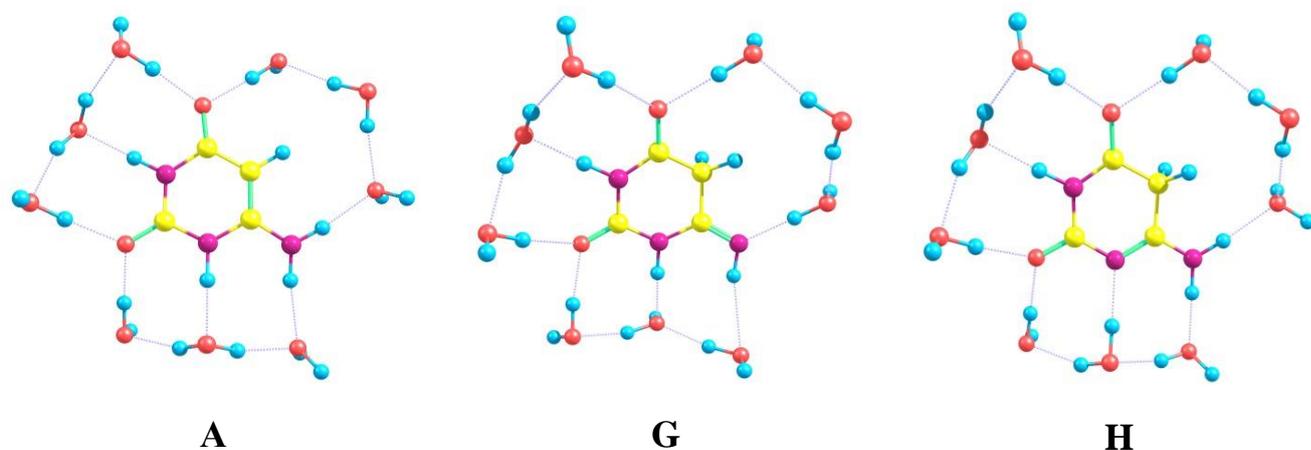


Рисунок 3.14 – Девятиводный кластер таутомеров А, G, H 6-аминоурацила

Данная модель позволяет учесть аминогруппу при расчете относительной устойчивости таутомерных форм б-аминоурацила.

Результаты расчета при учете специфической сольватации квантово-химическим методом представлены в таблице 3.9. Из данных таблицы видно, что при использовании 5-ти водного кластера самой устойчивой формой является таутомер А. Следующим в ряду устойчивости следует таутомер D с относительной устойчивостью 22.9 кДж/моль.

Таблица 3.9 – Относительная устойчивость таутомеров б-аминоурацила при учете пятигидратной и девятигидратной сольватной оболочки, ΔG кДж/моль

Модель сольватации	Таутомер							
	A	B	C	D	E	F	G	H
5H ₂ O	0	35.7	53.7	22.9	50.9	60.2	48.7	32.0
9H ₂ O	0	37.9	48.1	29.2	57.1	46.5	29.7	23.0

При использовании модели девятиводного кластера (9H₂O) наблюдается уменьшение относительной устойчивости таутомеров B, C, D, G в сравнении с РСМ моделью.

Самой устойчивой формой при использовании 9-ти водного кластера является таутомер А. Следующий в ряду устойчивости – таутомер H с разницей энергии $\Delta G = 23.0$ кДж/моль.

Вероятное содержание минорных форм в сольватационных моделях оценивали по распределению Больцмана. Для модели неспецифической сольватации, где разница в энергиях между наиболее устойчивым таутомером А и вторым по устойчивости таутомером H составляет порядка 10 кДж/моль, содержание таутомера H должно составлять ~ 0.01 %, что пренебрежимо мало для влияния минорных таутомерных форм б-аминоурацила в растворах на физико-химические свойства. Поскольку во всех других моделях разница в энергиях между наиболее устойчивым таутомером А и минорными формами еще больше,

то содержанием минорных таутомерных форм при определении pK_a **6NH₂U** можно пренебречь.

Таким образом, рассчитан ряд относительной устойчивости таутомеров б-аминоурацила с учетом неспецифической (вода, ДМСО) и специфической сольватации в воде (пятиводный и девятиводный кластер). Из квантово-химических расчетов следует, что наиболее устойчивым таутомером **6NH₂U** во всех моделях расчета является дикетоформа А. Следующим в ряду устойчивости при учете неспецифической сольватации в воде и ДМСО является иминный таутомер Н. При учете специфической сольватации с увеличением числа молекул воды для большинства таутомеров значения относительной устойчивости стремятся к значениям РСМ модели без учета молекул растворителя в явном виде.

3.2 Изучение кислотно-основного равновесия 5-замещенных производных б-метил- и б-аминоурацила в водных растворах методами УФ и ЯМР спектроскопии

Электронные спектры поглощения производных урацила свидетельствуют об образовании анионных форм соединений при увеличении pH их водных растворов. Как видно из рисунка 3.15 в УФ-спектрах 5-замещенных производных б-метилурацила в кислой и нейтральной средах наблюдаются максимумы поглощения для: **6CH₃U** – 260 нм, **5,6diCH₃U** – 268 нм, **TMU** – 266 нм, **5CN6CH₃U** – 273 нм, **5CHO6CH₃U** – 284 нм, обусловленные поглощением сопряженной группы –C6=C5–C4=O урацильного фрагмента. При увеличении pH в щелочной области наблюдается батохромное смещение максимумов полос поглощения для **6CH₃U**, **5,6diCH₃U**, **TMU**, **5CN6CH₃U** и **5CHO6CH₃U** на 15 – 20 нм.

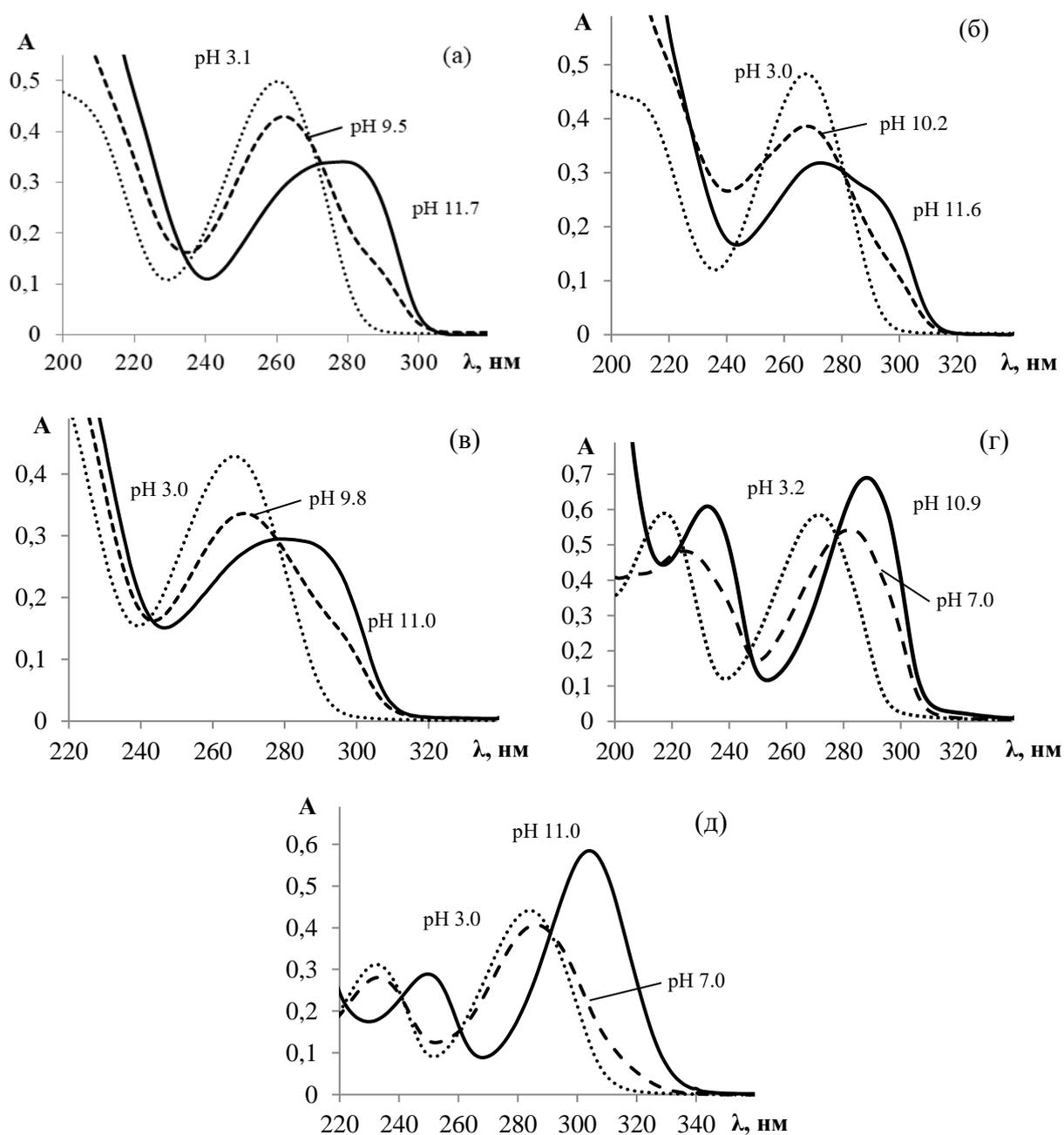


Рисунок 3.15 – УФ спектры **6CH₃U** (а), **5,6diCH₃U** (б), **TMU** (в), **5CN6CH₃U** (г), **5CHO6CH₃U** (д) в водных растворах при различных рН

В УФ спектрах водных растворов **6NH₂U** и **5NO6NH₂U** (Рисунок 3.16) при увеличении рН наблюдается уменьшение интенсивности полосы поглощения с максимумом для **6NH₂U** 263 нм и слабое батохромное смещение на 3 нм. Для **5NO6NH₂U** максимумами являются 224 и 315 нм с гиперхромным эффектом без смещения (Рисунок 3.16 (б)).

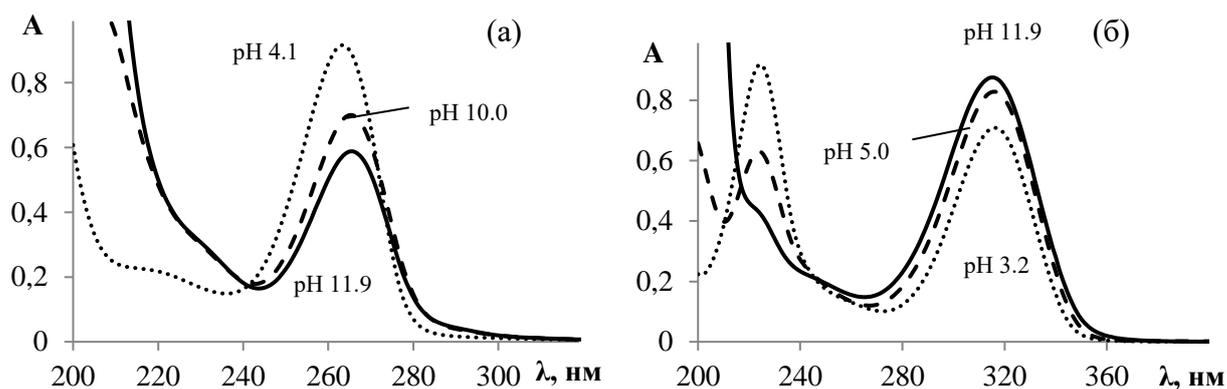
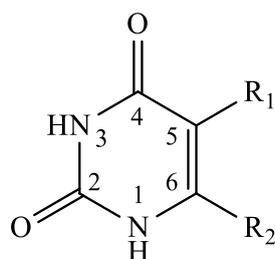


Рисунок 3.16 – УФ-спектры водных растворов **6NH₂U** (а) и **5NO6NH₂U** (б) при различных рН

Показано, что при различных рН в водных растворах наблюдаются изменения в УФ спектрах производных урацила. Существенное влияние оказывают значения рН выше нейтральных, где для 5-замещенных производных 6-метилурацила наблюдается батохромное смещение с уменьшением интенсивности максимумов полос поглощения. В то время как для 6-аминоурацила и 5-нитрозо-6-аминоурацила при увеличении рН происходит лишь уменьшение интенсивности.

С целью изучения структурных изменений 5-замещенных производных 6-метилурацила в щелочных растворах были записаны ЯМР спектры исходных **TMU**, **5CN6CH₃U**, **5CHO6CH₃U** и образцы растворов данных соединений с гидроксидом KOH в соотношении 1:1 и водных растворах (Таблица 3.10). Отнесение сигналов произведено на основании корреляционных HMBC и HSQC спектров. Данные ЯМР **6CH₃U** и **5NH₂6CH₃U** представлены для сравнения данных по кислотно-основным свойствам 5-замещенных производных 6-метилурацила.

При добавлении к водному раствору **TMU** гидроксида калия в мольном соотношении 1:1 в водных растворах наблюдается существенное смещение сигналов углерода C2, C6 и N1 в слабое поле относительно спектра исходного **TMU**. Смещение сигналов углеродов пентильного радикала практически не наблюдается[165].



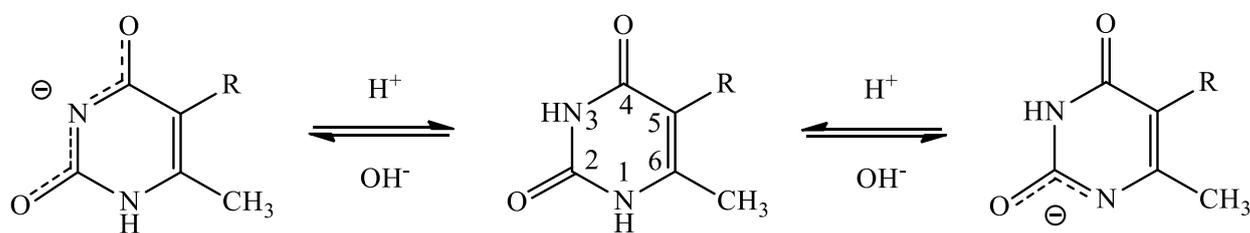
При добавлении к водному раствору $5\text{CHO}6\text{CH}_3\text{U}$ гидроксида натрия в мольном соотношении 1:1 наблюдается существенное смещение в слабое поле сигналов углеродов C2, C6 и азота N1 (Таблица 3.10).

Таблица 3.10 – Данные спектров ЯМР 5,6-замещенных урацилов в D_2O . δ , м.д.

№ атома	$6\text{CH}_3\text{U}$ [172]			TMU			$5\text{NH}_26\text{CH}_3\text{U}$ [173]		
	HA	A ⁻	$\Delta\delta$	HA	A ⁻	$\Delta\delta$	HA	A ⁻	$\Delta\delta$
C2	154.42	163.54	9.12	150.84	158.15	7.31	148.86	159.81	10.95
C4	165.42	163.80	-1.62	164.25	166.48	2.23	160.57	167.99	7.42
C5	99.27	101.83	2.56	106.84	103.36	-3.48	116.23	115.23	-1.00
C6	152.25	176.02	23.77	149.55	161.15	11.6	130.25	138.99	8.74
N1	–	–	–	137.06	164.27	27.21	–	–	–
N3	–	–	–	155.30	–	–	–	–	–
	$5\text{CN}6\text{CH}_3\text{U}$			$5\text{CHO}6\text{CH}_3\text{U}$					
	HA	A ⁻	$\Delta\delta$	HA	A ⁻	$\Delta\delta$			
C2	149.81	157.86	8.05	150.05	156.72	6.67			
C4	161.83	166.78	4.95	164.26	166.86	2.60			
C5	86.48	84.20	-2.28	106.45	105.88	-0.57			
C6	163.83	173.04	9.21	162.24	171.12	8.88			
N1	148.55	197.20	48.65	149.67	211.93	62.26			
N3	–	–	–	156.44	–	–			

Похожим изменениям подвергается и 5-циано-6-метилурацил при аналогичных условиях. По-видимому, такие изменения характерны для анионов с отрывом протона от атома азота N1 пиримидинового кольца. Однако для $5\text{NH}_26\text{CH}_3\text{U}$ и $5\text{CN}6\text{CH}_3\text{U}$ помимо C2 и C6, также подвергаются изменениям сигналы C4, что может свидетельствовать об образовании кроме основного аниона с отрывом протона от азота N1 пиримидинового кольца, также некоторого количества анионов с депротонированием от азота N3. Из данных таблицы 16 видно, что наибольшее влияние щелочи на структурные изменения производных урацила наблюдается для сигналов атомов C2, C4 и C6.

Такие изменения в ЯМР спектрах свидетельствуют, видимо, об образовании анионных форм с отрывом протона в большей степени от азота N1 и меньшей – от N3 пиридинового кольца:



R=H – **6CH₃U**, R= 5-(1-пентил-4-метил-1,2,3-триазол-4-ил) – **TMU**, R=CN – **5CN6CH₃U**, R=CHO – **5CHO6CH₃U**, R=NH₂ – **5NH₂6CH₃U**

Замещение одного из атомов водорода пиридинового кольца на метильный фрагмент ограничит диссоциацию производных урацила. Для изучения влияния метильной группы в пиридиновом кольце при диссоциации. На примере **6NH₂U** и его модельного соединения **1CH₃6NH₂U** были записаны ЯМР спектры их нейтральных и щелочных растворов.

Таблица 3.11 – Данные ЯМР спектра **6NH₂U** и **1CH₃6NH₂U** в D₂O, δ м.д.

№ атома	6NH₂U			1CH₃6NH₂U		
	HA	A ⁻	Δδ	HA	A ⁻	Δδ
C2	150.95	158.39	7.44	152.53	157.35	4.82
C4	164.44	166.76	2.32	165.40	175.38	9.98
C5	74.06	75.03	0.97	76.02	78.49	2.47
C6	155.18	164.51	9.33	158.43	159.66	1.23
N1	124.31	170.44	46.13	125.12	–	–
N3	147.95	146.71	-1,95	147.19	–	–
N7	75.09	–	–	–	–	–

При добавлении к раствору 6-аминоурацила гидроксида калия в мольном соотношении 1:1 наблюдается существенное смещение в слабое поле сигналов углерода C2 и C6, а также азота N1 относительно спектров исходного **6NH₂U** в нейтральной среде. Аналогичным способом был изучен 1-метил-6-аминоурацил в воде (Таблица 3.11). Под влиянием щелочи в соотношении 1:1 1-метил-6-

аминоурицил претерпевает наибольшие изменения у атомов C2 и C4 что, вероятно, связано с отрывом протона от атома азота N3.

Таким образом, при добавлении щелочи к исследованным урацилам в соотношении 1:1, образуется анионы с отрывом протона как от N1, так и N3, однако в большей степени образуется анион с отрывом протона от атома азота N1.

3.3 Определение анионного состава 5-циано-6-метилурацила

3.3.1 Синтез N-метилзамещенных модельных соединений 5-циано-6-метилурацила

Для изучения механизма депротонирования 5-замещенных 6-метил- и 6-аминоурацилов в водном растворе было осуществлено метилирование диметилсульфатом в водно-щелочных растворах объектов, используемых в данной работе. Образование одновременно моно N1- и N3-метилзамещенных продуктов наблюдалось только для 5-циано-6-метилурацила. Для остальных веществ реакция протекала с образованием двух продуктов: N1-метилзамещенного и N1,3-диметилзамещенного производного урацила.

Синтезированные N1- и N3- монометилпроизводные 5-циано-6-метилурацила использовались в качестве модельных соединений для изучения порядка диссоциации в водных растворах [174]. Контроль за ходом реакции осуществляли методом ВЭЖХ.

На рисунке. 3.17 приведена хроматограмма продуктов метилирования $5\text{CN}6\text{CH}_3\text{U}$. Кроме данных продуктов в смеси имеется неизрасходованное исходное соединение. Как видно из рисунка 3.17, в ходе реакции образуются три новых соединения.

Синтезированные вещества были фракционированы методом полупрепаративной ВЭЖХ. Номера фракций соответствуют пикам на хроматограмме (Рисунок 3.17).

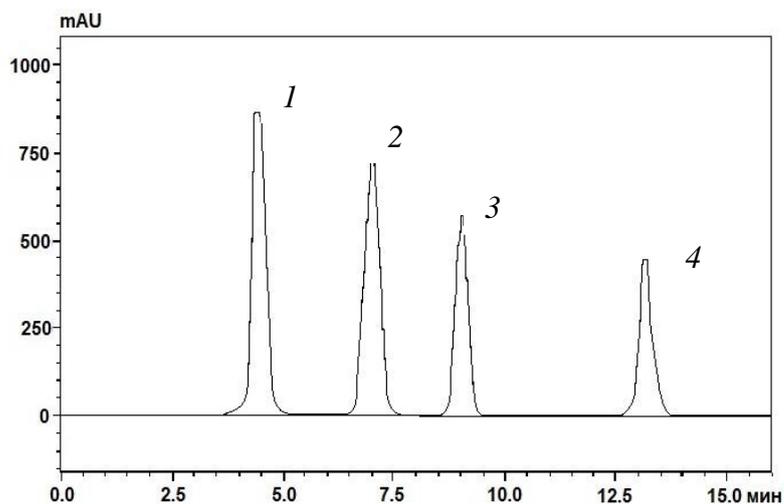


Рисунок 3.17 – Хроматограмма реакционной смеси метилирования 5-циано-6-метилурацила диметилсульфатом; пик 2 – 5-циано-6-метилурацил

Исходя из результатов $\{^1\text{H}, ^{13}\text{C}\}$ НМВС двумерных спектров 3 фракции, появление сигналов протона 3.25 метильной группы, коррелирующих с химическими сдвигами углеродных атомов C4 164.69 и C6 167.63 м.д., свидетельствуют об образовании 5-циано-1,6-диметилурацила (**5CN1,6diCH₃U**). Также это подтверждается прямой корреляцией $\{^1\text{H}, ^{15}\text{N}\}$ НМВС спектра атома азота с метильной группой (Рисунок 3.18а).

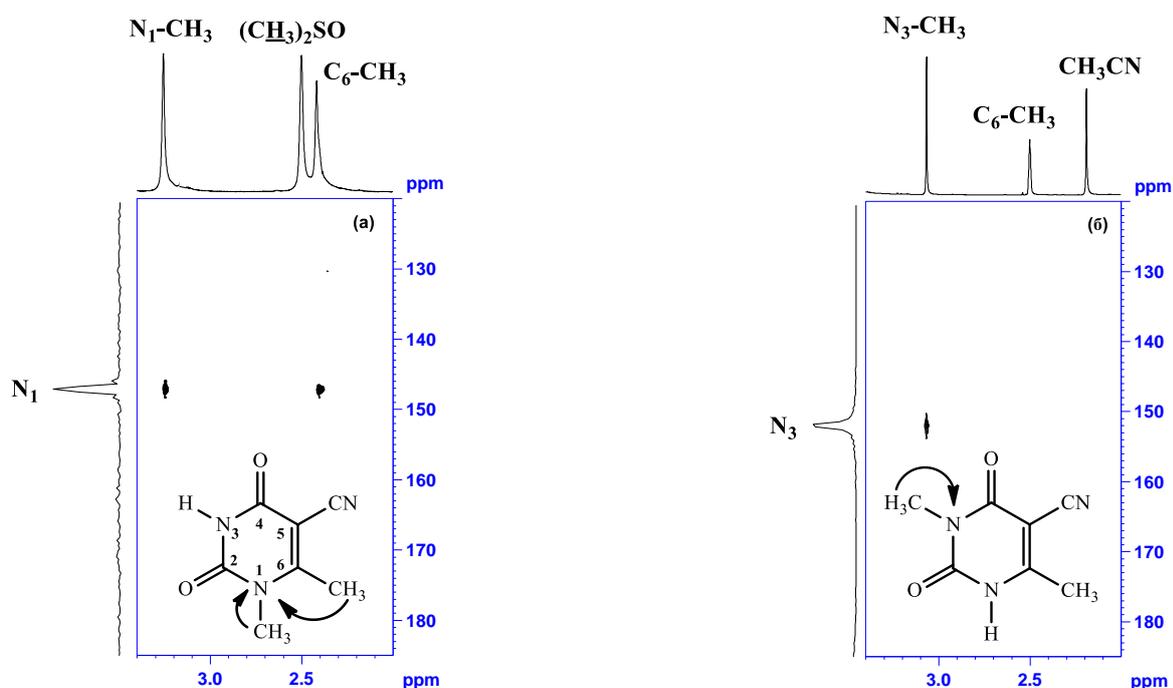
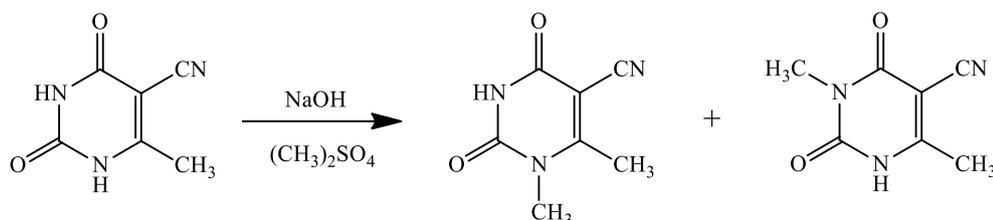


Рисунок 3.18 – Корреляционные спектры ЯМР $\{^1\text{H}, ^{15}\text{N}\}$ НМВС выделенных 3 (а) и 4 (б) фракций

Результаты анализа фракции 4 методом ЯМР спектроскопии показали в $\{^1\text{H}, ^{13}\text{C}\}$ НМВС спектрах корреляцию между протонами метильной группы 3.05 и атомами углерода C2 154.05 и C4 162.28 м.д. соответственно. В спектрах ЯМР $\{^1\text{H}, ^{15}\text{N}\}$ НМВС наблюдается прямая корреляция между атомами водорода метильной группы 3.05 и атомом азота N3 151.92 м.д. (Рисунок 3.18б). Такие данные свидетельствуют, что выделенным веществом является 5-циано-3,6-диметилаурацил.

Образование дизамещенного продукта с метильными группами у атомов азота N1 и N3 не наблюдалось. Таким образом, схему уравнения реакции алкилирования 5-циано-6-метилаурацила с ДМС в щелочном растворе можно записать в общем виде:



3.3.2 Определение соотношения анионных форм 5-циано-6-метилаурацила

Зависимости полос поглощения от увеличения рН модельных соединений $5\text{CN}1,6\text{diCH}_3\text{U}$ и $5\text{CN}3,6\text{diCH}_3\text{U}$ представлены на рисунке 3.19.

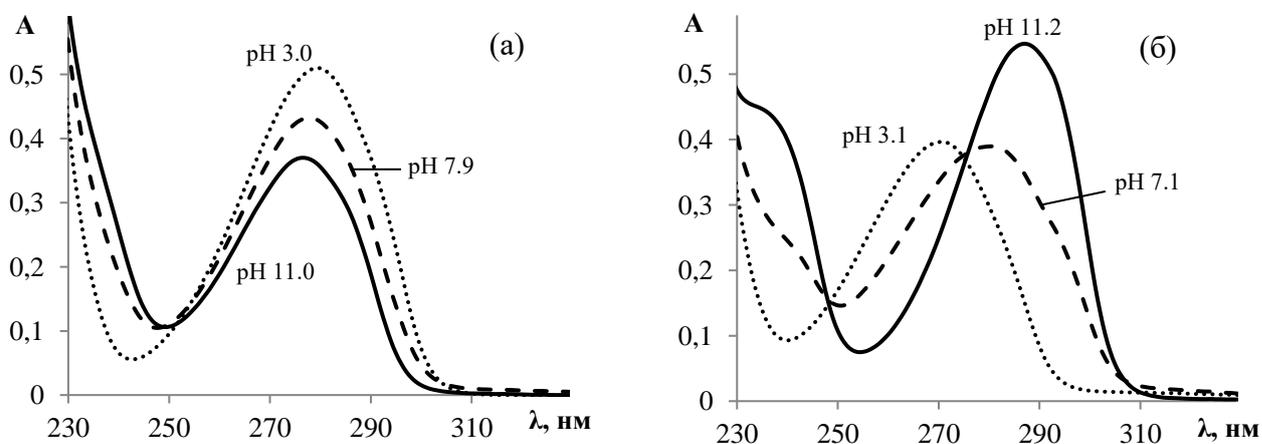


Рисунок 3.19 – УФ спектры водных растворов $5\text{CN}1,6\text{diCH}_3\text{U}$ (а) и $5\text{CN}3,6\text{diCH}_3\text{U}$ (б) при различных рН

Максимум полосы поглощения для **5CN3,6diCH₃U** (Рисунок 3.19б) находится в области 271 нм, при увеличении рН наблюдается смещение максимума полосы поглощения на 17 нм. Аналогичные изменения наблюдаются в УФ-спектрах **5CN6CH₃U** (Рисунок 3.15г). У водного раствора **5CN1,6diCH₃U** (Рисунок 3.19а) с максимумом при 279 нм увеличение рН приводит к уменьшению интенсивности полосы поглощения. Идентичные УФ спектры соединений **5CN6CH₃U** и **5CN3,6diCH₃U** при увеличении рН их водных растворов являются подтверждением образования анионной формы **5CN6CH₃U** с отрывом протона от атома азота N1, поскольку диссоциация **5CN3,6diCH₃U** возможна только от атома азота N1.

Полученные спектрофотометрическим методом данные рK_a моно-N-метилзамещенных производных **5CN6CH₃U** представлены в таблице 3.12.

Таблица 3.12 – Константы диссоциации моно-N-метилзамещенных производных **5CN6CH₃U** в воде при 25 °С

Соединение	рK _a	λ, нм (НА → А ⁻)*
5CN1,6diCH₃U	7.87 ± 0.04	279 → 279
5CN3,6diCH₃U	7.23 ± 0.06	271 → 288

*(НА → А⁻) – переход от нейтральной формы к анионной

Расчет соотношения анионных форм **5CN6CH₃U** (при эквимольном соотношении урацила со щелочью) проводили по следующей системе уравнений:

$$\begin{cases} \Delta\varepsilon(5CN1,6diCH_3U) \cdot x_1 + \Delta\varepsilon(5CN3,6diCH_3U) \cdot x_2 = \Delta\varepsilon(5CN6CH_3U) \\ x_1 + x_2 = 1 \end{cases} \quad (3.2)$$

где $\Delta\varepsilon(5CN1,6diCH_3U)$, $\Delta\varepsilon(5CN3,6diCH_3U)$ и $\Delta\varepsilon(5CN6CH_3U)$ – значения разницы молярного коэффициента экстинкции в нейтральном и щелочном растворе 5-циано-1,6-диметилурацила, 5-циано-3,6-диметилурацила и 5-циано-6-метилурацила; x_1 и x_2 – мольные доли анионных форм при диссоциации метильных форм **5CN6CH₃U** при диссоциации.

Рассчитанное соотношение анионных форм N1:N3 5-циано-6-метилурацила в основных водных растворах с эквимолярным количеством КОН составляет 0.67:0.33, что свидетельствует о преобладании анионной формы с отрывом протона от атомов азота N1 пиримидинового кольца [174].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Определены константы кислотно-основного равновесия для 5-замещенных производных 6-метил- и 6-аминоурацила методами потенциометрического и спектрофотометрического титрования в водных растворах. Метод растворимости использован для определения констант диссоциации производных урацила в воде. Предложен спектрально-люминесцентный метод, как наиболее чувствительный метод, для определения pK_a малорастворимых производных урацила. Сравнение полученных разными методами величин pK_a и чувствительности методов на примере 6-аминоурацила приведено в таблице 3.13.

Таблица 3.13 – Константы диссоциации 6-аминоурацила в водных растворах (20–25 °С), полученных разными методами

Метод	pK_a	Чувствительность метода С, моль/л
Потенциометрический	8.61 ± 0.06	10^{-3}
Спектрофотометрический	8.69 ± 0.03	10^{-5}
Растворимости	8.72 ± 0.04	10^{-5}
Спектрально-люминесцентный	8.9 ± 0.1	10^{-6}

На основании данных, полученных методами УФ и ЯМР спектроскопии, показано, что диссоциация 5-замещенных производных 6-метил- и 6-аминоурацилов в эквимольных количествах с гидроксидом калия протекает преимущественно с образованием аниона с отрывом протона от атома азота N1 в водных растворах. С использованием модельных соединений количественно установлена доля анионных форм 5-циано-6-метилурацила с отрывом протона от атомов N1 и N3 пиримидинового кольца в водно-щелочных растворах с эквимольным количеством КОН.

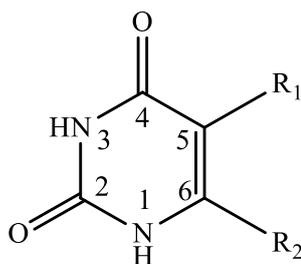
ВЫВОДЫ

1. Впервые определены константы и термодинамические характеристики кислотно-основного равновесия 5,6-диметилурацила ($pK_a = 10.26 \pm 0.03$, $\Delta G^{298} = 58.5 \pm 0.2$ кДж·моль⁻¹, $\Delta H^{298} = 11.6 \pm 0.3$ кДж·моль⁻¹, $\Delta S^{298} = -158 \pm 1$ Дж·моль⁻¹·К⁻¹), 5-(1-пентил-4-метил-1,2,3-триазол-4-ил)-6-метилурацила ($pK_a = 9.98 \pm 0.05$, $\Delta G^{298} = 57.5 \pm 0.9$ кДж·моль⁻¹, $\Delta H^{298} = 12.9 \pm 0.4$ кДж·моль⁻¹, $\Delta S^{298} = -150 \pm 2$ Дж·моль⁻¹·К⁻¹), 5-циано-6-метилурацила ($pK_a = 7.00 \pm 0.02$, $\Delta G^{298} = 39.9 \pm 0.9$, кДж·моль⁻¹, $\Delta H^{298} = 12.0 \pm 1.2$ кДж·моль⁻¹, $\Delta S^{298} = -93 \pm 7$ Дж·моль⁻¹·К⁻¹) 5-формил-6-метилурацила ($pK_a = 7.55 \pm 0.04$, $\Delta G^{298} = 43.1 \pm 0.2$ кДж·моль⁻¹, $\Delta H^{298} = 16.3 \pm 0.5$ кДж·моль⁻¹, $\Delta S^{298} = -89 \pm 1$ Дж·моль⁻¹·К⁻¹), 6-аминоурацила ($pK_a = 8.61 \pm 0.06$, $\Delta G^{298} = 49.1 \pm 0.3$ кДж·моль⁻¹, $\Delta H^{298} = 19.4 \pm 0.9$ кДж·моль⁻¹, $\Delta S^{298} = -100 \pm 7$ Дж·моль⁻¹·К⁻¹), 5-нитрозо-6-аминоурацила ($pK_a = 5.27 \pm 0.02$, $\Delta G^{298} = 30.1 \pm 0.1$ кДж·моль⁻¹, $\Delta H^{298} = 17.0 \pm 0.2$ кДж·моль⁻¹, $\Delta S^{298} = -43 \pm 1$ Дж·моль⁻¹·К⁻¹) в водных растворах потенциометрическим методом.
2. Впервые определены константы диссоциации 5-(1-пентил-4-метил-1,2,3-триазол-4-ил)-6-метилурацила ($pK_a = 9.59 \pm 0.10$), 5-циано-6-метилурацила ($pK_a = 7.00 \pm 0.02$), 5-формил-6-метилурацила ($pK_a = 7.51 \pm 0.03$), 5-нитрозо-6-аминоурацила ($pK_a = 5.00 \pm 0.14$), 5-циано-1,6-диметилурацила ($pK_a = 7.87 \pm 0.04$) и 5-циано-3,6-диметилурацила ($pK_a = 7.23 \pm 0.06$) спектрофотометрическим методом.
3. Изучена предельная растворимость некоторых 5,6-замещенных производных урацила в воде. Установлено, что минимальные значения растворимости наблюдаются у 6-аминоурацила. Впервые методом растворимости для 6-аминоурацила определены pK_a (8.72 ± 0.04) в воде при 20 °С.
4. Впервые предложен спектрально-люминесцентный метод определения констант диссоциации производных урацилов в водных растворах. Показано, что чувствительность данного метода на порядок превышает классические методы. С помощью предложенного метода определены pK_a 6-аминоурацила в водных растворах ($pK_a = 8.9 \pm 0.1$).

5. Методом TPSSTPSS/6-311+G(d,p) рассчитан ряд относительной устойчивости 8 таутомеров 6-аминоурацила с учетом неспецифической (вода, ДМСО) и специфической сольватации в воде (пятиводный и девятиводный кластеры). Установлено, что в водном растворе 6-аминоурацил с вероятностью 99.99 % находится в дикетоаминной форме, а доля следующего после него минорного таутомера составляет менее 0.0001 % при использовании 9-ти водной модели.
6. На основании данных УФ и ЯМР спектроскопии показано, что образование анионов в щелочных водных растворах 5-замещенных производных 6-метил- и 6-аминоурацила протекает преимущественно с отрывом протона от азота N1.
7. Алкилированием диметилсульфатом в водно-щелочных растворах впервые синтезированы 5-циано-1,6-диметилурацил и 5-циано-3,6-диметилурацил. С использованием полученных соединений спектрофотометрическим методом определено соотношение анионных форм 5-циано-6-метилурацила с отрывом протона от атомов N1 и N3 (0.67 и 0.33, соответственно) пиримидинового кольца в водно-щелочных растворах с эквимольным количеством КОН.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ВЭЖХ	высокоэффективная жидкостная хроматография
ГМДС	гексаметилдисилазан
ДМК	диметилкарбонид
ДМСО	диметилсульфоксид
ДМФА	диметилформамид
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
ИК	инфракрасный
ИПС	изопропиловый спирт
РСА	рентгеноструктурный анализ
РСМ	поляризационно-континуальная модель
СФ	спектрофотометрический
ТМС	тетраметилсилан
УФ	ультрафиолетовый
ФЛ	флюоресценция, флюоресцентный
ЦОГ	циклооксигеназа
ЯМР	ядерно-магнитный резонанс
НМВС	гетероядерная многосвязная корреляционная спектроскопия
НМҚС	гетероядерная одноквантовая корреляционная спектроскопия



(U) $R_1 = R_2 = \text{H}$ – урацил

(5BrU) $R_1 = \text{Br}, R_2 = \text{H}$ – 5-бромурацил

(5CH₃/T) $R_1 = \text{CH}_3, R_2 = \text{H}$ – 5-метилурацил/тимин

(5CH₂OHU) $R_1 = \text{CH}_2\text{OH}, R_2 = \text{H}$ – 5-гидроксиметилурацил

(5CHOU) $R_1 = \text{CHO}, R_2 = \text{H}$ – 5-формилурацил

(5ClU) $R_1 = \text{Cl}, R_2 = \text{H}$ – 5-хлорурацил

(5COOHU) $R_1 = \text{COOH}, R_2 = \text{H}$ – 5-карбоксиурацил

(5FU) $R_1 = \text{F}, R_2 = \text{H}$ – 5-фторурацил

(5IU) $R_1 = \text{I}, R_2 = \text{H}$ – 5-йодурацил

(5NH₂U) $R_1 = \text{NH}_2, R_2 = \text{H}$ – 5-аминоурацил

(5NO₂U) $R_1 = \text{NO}_2, R_2 = \text{H}$ – 5-нитроурацил

(5OHU) $R_1 = \text{OH}, R_2 = \text{H}$ – 5-гидроксиурацил

(6BrU) $R_1 = \text{H}, R_2 = \text{Br}$ – 6-бромурацил

(6CH₃U) $R_1 = \text{H}, R_2 = \text{CH}_3$ – 6-метилурацил

(6C₆H₅U) $R_1 = \text{H}, R_2 = \text{C}_6\text{H}_5$ – 6-фенилурацил

(6C₃H₇U) $R_1 = \text{H}, R_2 = \text{C}_3\text{H}_7$ – 6-пропилурацил

(6CHOU) $R_1 = \text{H}, R_2 = \text{CHO}$ – 6-формилурацил

(6ClU) $R_1 = \text{H}, R_2 = \text{Cl}$ – 6-хлорурацил

(6COOHU) $R_1 = \text{H}, R_2 = \text{COOH}$ – 6-карбоксиурацил

(6OCH₃U) $R_1 = \text{H}, R_2 = \text{OCH}_3$ – 6-метоксиурацил

(6FU) $R_1 = \text{H}, R_2 = \text{F}$ – 6-фторурацил

(6IU) $R_1 = \text{H}, R_2 = \text{I}$ – 6-йодурацил

(6NH₂U) $R_1 = \text{H}, R_2 = \text{NH}_2$ – 6-аминоурацил

(5,6diBrU) $R_1 = R_2 = \text{Br}$ – 5,6-дибромурацил

(5Br6CH₃U) $R_1 = \text{Br}, R_2 = \text{CH}_3$ – 5-бром-6-метилурацил

(5Br6COOHU) $R_1 = \text{Br}, R_2 = \text{COOH}$ – 5-бром-6-карбоксиурацил

(5Br6IU) $R_1 = \text{Br}, R_2 = \text{I}$ – 5-бром-6-йодурацил

(5Br6NH₂U) $R_1 = \text{Br}, R_2 = \text{NH}_2$ – 5-бром-6-аминоурацил

(5,6diCH₃U) $R_1 = R_2 = \text{CH}_3$ – 5,6-диметилурацил

(5CH₂OH6CH₃U) $R_1 = \text{CH}_2\text{OH}, R_2 = \text{CH}_3$ – 5-гидрокси-6-метилурацил

(5CH₂NC₅H₁₀6CH₃U) $R_1 = \text{CH}_2\text{NC}_5\text{H}_{10}, R_2 = \text{CH}_3$ – 5-(N-метилпиперидин)-6-метилурацил

(5CH₃6NH₂U) $R_1 = \text{CH}_3, R_2 = \text{NH}_2$ – 5-метил-6-аминоурацил

(5C₂H₅6ClU) $R_1 = \text{C}_2\text{H}_5, R_2 = \text{Cl}$ – 5-этил-6-хлорурацил

(5Cl6BrU) $R_1 = \text{Cl}, R_2 = \text{Br}$ – 5-хлор-6-бромурацил

(5,6-diClU) $R_1 = R_2 = \text{Cl}$ – 5,6-дихлорурацил

(5Cl6NH₂U) $R_1 = \text{Cl}, R_2 = \text{NH}_2$ – 5-хлор-6-аминоурацил

(5F6NH₂U) $R_1 = \text{F}, R_2 = \text{NH}_2$ – 5-фтор-6-аминоурацил

(5I6BrU) $R_1 = \text{I}, R_2 = \text{Br}$ – 5-йод-6-бромурацил

(5I6ClU) $R_1 = \text{I}, R_2 = \text{Cl}$ – 5-йод-6-хлорурацил

(5I6COOHU) $R_1 = \text{I}, R_2 = \text{COOH}$ – 5-йод-6-карбоксиурацил

(5,6diIU) $R_1 = R_2 = \text{I}$ – 5,6-йодурацил

(5I6NH₂U) $R_1 = \text{I}, R_2 = \text{NH}_2$ – 5-йод-6-аминоурацил

(5NH₂6CH₃U) $R_1 = \text{NH}_2, R_2 = \text{CH}_3$ – 5-амино-6-метилурацил

(5N(CH₃)CHO6NH₂U) $R_1 = \text{N(CH}_3\text{)CHO}, R_2 = \text{NH}_2$ – 5-(N-метилформилмино)-6-аминоурацил

(5N(C₂H₄Cl)₂6CH₃U) $R_1 = \text{N(C}_2\text{H}_4\text{Cl)}_2, R_2 = \text{CH}_3$ – 5-(Бис((2-хлорэтил)амино)метил)-6-метилурацил

(5NH(C₂H₅)6CH₃U) $R_1 = \text{NH(C}_2\text{H}_5), R_2 = \text{CH}_3$ – 5-этиламино-6-метилурацил

(5,6diNH₂U) $R_1 = R_2 = \text{NH}_2$ – 5,6-диаминоурацил

(5NHCHO6NH₂U) $R_1 = \text{NHCHO}, R_2 = \text{NH}_2$ – 5-формиламино-6-аминоурацил

(5NH₂COOHU) $R_1 = \text{NH}_2, R_2 = \text{COOH}$ – 5-амино-6-карбоксиурацил

(5NO₂6CH₃U) $R_1 = \text{NO}_2, R_2 = \text{CH}_3$ – 5-нитро-6-метилурацил

(5NO₂6COOHU) $R_1 = \text{NO}_2, R_2 = \text{COOH}$ – 5-нитро-6-карбоксиурацил

(5OCH₃6CH₃U) $R_1 = \text{OCH}_3, R_2 = \text{CH}_3$ – 5-метокси-6-метилурацил

(5O(CH₂CH₂)₂NCH₃6CH₃U) $R_1 = \text{O(CH}_2\text{CH}_2\text{)}_2\text{NCH}_3, R_2 = \text{CH}_3$ – 5-(N-метилморфолин)-6-метилурацил

(5OH6COOHU) $R_1 = \text{OH}, R_2 = \text{COOH}$ – 5-гидрокси-6-карбоксиурацил

(5OH6NH₂U) $R_1 = \text{OH}, R_2 = \text{CH}_3$ – 5-гидрокси-6-аминоурацил

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Фармакологическая активность производных пиримидинов / М.А. Самотруева, А.А. Цибизова, А.Л. Ясенявская [и др.] // Медико-биологические науки. – 2015. – С. 12-29.
2. Uracil as the basis for medication creation / I. Nizhenkovska, N. Gorchakova., G. Zaychenko, V. Narokha. // Current Topics in Pharmacology. – 2018. – V. 22. – P. 19-26.
3. Измайлова, А.Х. Препараты пиримидинового ряда в экспериментальных и клинических исследованиях / А.Х. Измайлова, Д.Х. Шакирова, А.Г. Измайлов // Вестник современной клинической медицины. – 2013. – Т. 6. С. 31-34.
4. Синтез, модификации и биологическая активность урацилов / А.Р. Гимадиева, Ю.Н. Чернышенко, И.Б. Абдрахманов, А.Г. Мустафин. – Уфа : Издательство "Гилем", 2013. – 176 с. – ISBN 9755446600359.
5. Муринов, Ю.И. Влияние производных урацила на регенерацию костной ткани / Ю.И. Муринов, С.А. Грабовский, Л.Р. Валиуллин [и др.] // XX Менделеевский съезд по общей и прикладной химии. Екатеринбург, 2016. С. 322.
6. Каркищенко, Н.Н. Пиримидины. Обзор литературы / Н.Н. Каркищенко, Ж.Н. Асланянц // Фармакология и токсикология. – 1989. – № 6. – С. 100-105.
7. Мышкин, В.А. Оксиметилурацил (Очерки экспериментальной фармакологии) / В.А. Мышкин, А.Б. Бакиров. – Уфа : Издательство ПКП «ДАР», 2001. – 218 с.
8. Борисова, А.М. Клинико-иммунологическая эффективность применения оксиметилурацила у больных вторичным иммунодефицитным состоянием / А.М. Борисова, И.Х. Ситдикова, Б.В. Пинегин // Иммунология. – 1994. – № 5. – С. 48-50.
9. 5-Гидрокси-6-метилурацил эффективная ловушка пероксильных радикалов / Н.Н. Кабальнова, С.А. Грабовский, Т.Р. Нугуманов [и др.] // Известия Академии Наук. Серия химическая. – 2008. – № 11. – С. 2223-2228.

10. Экспериментальная оценка производных пиримидина на моделях токсического поражения печени: обзор / В.А. Мышкин, Д.А. Еникеев, Д.В. Срубиллин, А.Р. Гимадиева // Научное обозрение. Медицинские науки. – 2016. – № 3. – С. 88-98.
11. Ахатова, Г.Р. Антиокислительная активность производных урацила / Г.Р. Ахатова, И.В. Сафарова, А.Я. Герчиков. – DOI 10.1134/S0023158411010010 // Кинетика и катализ. – 2011. – Т. 52, № 1. – С. 3-7.
12. Антиокислительные свойства ряда производных урацила / А.Я. Герчиков, Г.Г. Гарифуллина, И.В. Сафарова, В.П. Кривоногов // Вестник Башкирского университета. – 2004. – № 3. – С. 73-76.
13. Исследование гепатопротекторных свойств производных урацила при цитотоксическом действии тетрахлорметана на культуре гепатоцитов МН22А / Э.Р. Кудояров, Д.Д. Каримов, Т.Г. Кутлина [и др.] // Медицина труда и экология человека. – 2019. – № 2. – С. 63-68.
14. Биологические свойства новых производных урацила / И.В. Петрова, В.А. Катаев, С.А. Мещерякова [и др.] // Медицинский вестник Башкортостана. – 2013. – Т. 8, № 6. – С. 163-165.
15. Ингибирующее влияние 5-амино-6-метилурацила и его производных на свободно-радикальное окисление 1,4-диоксана / Л.Р. Якупова, Р.А. Сахаутдинов, Е.Ю. Панкратьев, Р.Л. Сафиуллин. – DOI 10.1134/S0023158412060110 // Кинетика и катализ. – 2012. – Т. 53, № 6. – С. 708-715.
16. Экспресс-оценка антиоксидантной активности производных урацила / А.Р. Гимадиева, Ю.З. Хазимуллина, Е.А. Белая [и др.]. – DOI 10.18097/PBMC20156106765 // Биомедицинская химия. – 2015. – Т. 61, № 6. – С. 765-769.
17. Кинетика окисления урацила и его производных озоном в водных растворах / А.А. Максютлова, Ю.С. Зимин, А.Р. Гимадиева, А.Г. Мустафин. – DOI 10.1134/S0044453719090139 // Журнал физической химии. – 2019. – Т. 93, № 9. – С. 1322-1327.

18. Кинетика и активационные параметры реакций озона с 5-фторурацилом и 5-гидрокси-6-метилурацилом / А.А. Максютлова, Е.Д. Моисеева, Ю.С. Зимин, А.Г. Мустафин // Вестник Башкирского университета. – 2020. – Т. 25, № 2. – С. 302-307.
19. 5-Амино-6-метилурацил – перспективный антиоксидант пиридиноидной структуры / А.Р. Гимадиева, В.А. Мышкин, А.Г. Мустафин [и др.]. – 10.7868/S0869565213040294 // Доклады РАН. – 2013. – Т. 448, № 4. – С. 484-486.
20. Boxer, I.T. Vibrational stark effects calibrate the sensitivity of vibrational probes for electric fields in proteins / I.T. Suydam, S.G. Boxer. – DOI 10.1021/bi0352926. // Biochemistry. – 2003. – V. 42. – P. 12050-12055.
21. Watson, M. D. A Vibrational probe for local nucleic acid environments: 5-cyano-2'-deoxyuridine / M.D. Watson, X.S. Gai, A.T. Gillies. – DOI 10.1021/jp8067238. // J. Phys. Chem. B – 2008. – V. 112, № 42. – P. 13188-13192.
22. Two-dimensional infrared study of vibrational coupling between azide and nitrile reporters in a RNA nucleoside / A.J. Schmitz, D.G. Hogle, X.S. Gai, [et al.]. – DOI 10.1021/acs.jpcc.6b07212 // J. Phys. Chem. B. – 2016. – V. 120, № 35. – P. 9387-9394.
23. Новые потенциальные лекарственные средства с выраженной противоопухолевой, противовоспалительной, противовирусной активностью среди производных урацила / В.Р. Хайруллина, А.Р. Гимадиева, Ю.З. Хазимуллина, А.Г. Мустафин // Материалы III Междисциплинарного симпозиума по медицинской, органической, биологической химии и фармацевтике – Севастополь, 2017 г. – С.73.
24. Патент № 2565756 С1 Российская Федерация, МПК С07D 239/54, А61К 31/513, А61Р 25/28. Средство на основе производного урацила для терапии болезни Альцгеймера : № 2014152029/04 : заявл. 22.12.2014; опубл. 20.10.2015 / К.А. Петров, В.Э. Семенов, В.С. Резник [и др.]; заявитель Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт

- органической и физической химии им. А.Е. Арбузова Казанского научного центра Российской академии наук. – 12 с.
25. Длительность миорелаксантного действия некоторых производных урацила / В.В. Зобов, К.А. Петров, А.В. Ланцова [и др.] // Токсикологический вестник. – 2006. – № 3. – С. 12-18.
 26. Miszczak-Zaborska, E. The activity of thymidine phosphorylase obtained from human uterine leiomyomas and studied in the presence of pyrimidine derivatives / E. Miszczak-Zaborska, K. Woźniak. – DOI 10.1021/ja105041j // Z. Naturforsch., C., J. Biosci. – 1997. – V. 52. – P. 670-675.
 27. Focher, F. Novel nonsubstrate inhibitors of human thymidine phosphorylase, a potential target for tumor-dependent angiogenesis / F. Focher, D. Ubiali., M. Pregnolato [et al.]. – DOI 10.1021/jm000037u // J. Med. Chem. – 2000. – № 43. – P. 2601-2607.
 28. Mol, C.D. Crystal structure and mutational analysis of human uracil-DNA Glycosylase: structural basis for specificity and catalysis / A.S. Arvai, G. Slupphaug, B. Kavli, [et al.]. – DOI: 10.1016/0092-8674(95)90290-2 // Cell. – 1995. – V. 80. – P. 869-878.
 29. Inhibition of thymidine phosphorylase by 6-aminothymine and derivatives of 6-aminouracil / P. Langen, G. Etzold, D. Barwolff [et al.]. – DOI: 10.1016/0006-2952(67)90260-2 // Biochem. Pharmacol. – 1967. – V. 16. – P. 1833-1837.
 30. Крутиков, В.И. 5-Арилиминометил-1Н-пиримидин-2,4-дионы – потенциальные противогрибковые и противомикробные препараты / В.И. Крутиков, А.В. Еркин, А.В. Александрова // Известия СПбГТИ(ТУ). – 2016. – № 35. – С. 47-50.
 31. Mustafa, A.A. Study on the renal and cardiovascular activities of aminouracil derivatives / A.A. Mustafa, A.A. Alhaider, A.A. Hijazi. – DOI: 10.1023/a:1015979314978 // Pharm. Res. – 1989. – V. 6, № 5. – P. 394-398.
 32. Alhilal, M. Synthesis of novel acyclic nucleoside analogue starting from 6-aminouracil as potent antimicrobial agent / M. Alhilal, Y. A. M. Sulaiman, S.

- Alhilal [et al.]. – DOI 10.1080/10406638.2021.1984260 // Polycyclic Aromatic Compounds. – 2021. – № 9. – P. 1-12.
33. Grosmaire, L. Vibrational spectra of 6-methyluracil, 6-methyl-2-thiouracil and their deuterated analogues / L. Grosmaire, J.L. Delarbre. – DOI 10.1016/j.molstruc.2011.12.007 // J. Mol. Struct. – 2012. – № 1011. – P. 42-49.
34. Aruna, S. Vibrational assignments of six-membered heterocyclic compounds: normal vibrations of 6-amino uracil and 6-amino 2-thio uracil / S. Aruna, G. Shanmugam. – DOI 10.1016/0584-8539(85)80040-4 // Spectrochim. Acta. – 1985. – T. 41, № 4. – P. 531-536.
35. Palafox, M.A. 6-Aminouracil: Geometries and spectra in the isolated state and in the solid state simulation. A comparison with 5-aminouracil / M.A. Palafox, V.K. Rastogi. – DOI 10.1016/j.molstruc.2015.12.004 // J. Mol. Struct. – 2016. – № 1108. – P. 482-495.
36. Naumov, V.A. Molecular structure of 6-methyluracil in the gas phase and characteristics of the 6-methyluracil-water system / V.A. Naumov. – DOI 10.1134/S107036320803016X // Russ. J. Gen. Chem. – 2008. – V. 78, № 3. – P. 432-438.
37. Portalone, G. 6-Methyluracil: a redetermination of polymorph (II) / G. Portalone. – DOI 10.1107/S2414314619008617 // IUCrData. – 2019. – V. 4, № 6. – P. 190861-190867.
38. Singh, J.S. FT-IR and Raman spectra, ab initio and density functional computations of the vibrational spectra, molecular geometries and atomic charges of uracil and 5-methyluracil (thymine) / J.S. Singh. – DOI 10.1016/j.saa.2014.08.060 // Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc. – 2015. – V. 137. – P. 625-640.
39. Spectrophotometric investigation of 5-nitroso-6-aminouracil and its methyl derivative in methanol by selective complexation with bivalent metal ions / B. Kumar, M. Sugunakara Rao, P. Kumar [et al.]. – DOI 10.1016/j.molstruc.2020.128827 // J. Mol. Struct. – 2020. – V. 1221. – P. 128827.

40. Sagstuen, E. Free radicals in pyrimidines. Electron-irradiated an ESR-study of single crystals of 5-nitro-6-methyluracil at 770K / E. Sagstuen, T.B. Melo, T. Henriksen. – DOI 10.2307/3573486 // Radiation research. – 1972. – V. 50. – P. 261-275.
41. Destro, R. The crystal structure of 6-methyluracil-5-acetic acid / R. Destro, R.E. Marsh. – DOI 10.1107/S0567740872007307 // Acta Cryst. – 1972. – V. B28. – P. 2971-2977.
42. Шаяхметова, Р.Х. Моделирование супрамолекулярной структуры 5-гидрокси-6-метилурацила / Р.Х. Шаяхметова, Э.М. Хамитов, А.Г. Мустафин // Вестник Башкирского университета. – 2016. – Т. 21, № 2. – С. 281-285.
43. Ostakhov, S.S. Photoinduced oxo–hydroxo tautomerisation of crystalline 5-fluorouracil / S.S. Ostakhov, M.V. Sultanbaev. – DOI 10.1016/j.mencom.2012.01.008 // Mendeleev Commun. – 2012. – V. 22, № 1. – P. 23-24.
44. Luminescent and DFT study of keto-enol tautomers of 5-fluorouracil and its derivatives in aqueous solutions / S.S. Ostakhov, M.Y. Ovchinnikov, G.A. Masyagutova, [et al.]. – DOI 10.1021/acs.jpca.9b04701 // J. Phys. Chem. A. – 2019. – V. 123, № 37. – P. 7956-7964.
45. Kryachko, E.S. Theoretical study of uracil tautomers. 2. Interaction with water / E. S. Kryachko, M.T. Nguyen, T. Zeegers-Huyskens. – DOI 10.1021/jp0019411 // J. Phys. Chem. A. – 2001. – V. 105. – P. 1934-1943.
46. How many uracil tautomers there are? Density functional studies of stability ordering of tautomers / S.X. Tian, C.F. Zhang, Z.J. Zhang [et al.]. – DOI 10.1016/S0301-0104(99)00009-9 // Chem. Phys. – 1999. – V. 242. – P. 217–225.
47. Yekeler, H. Concerning the solvent effect in the tautomerism of uracil, 5-fluorouracil, and thymine by density-functional theory and ab initio calculations / H. Yekeler, D. Özbakır. – DOI 10.1007/s008940100015 // J. Mol. Model. – 2001. – V. 7, № 4. – P. 103-111.

48. Structures, stabilities and tautomerizations of uracil and diphosphouracil tautomers / A. F. Jalbout, B. Trzaskowski, Y. Xia [et al.]. – DOI 10.1016/j.chemphys.2006.10.026 // Chem. Phys. – 2007. – V. 332. – P. 152-161.
49. FT-IR and FT-Raman spectra of 6-chlorouracil: molecular structure, tautomerism and solid state simulation. A comparison between 5-chlorouracil and 6-chlorouracil / S. Ortiz, M.C. Alvarez-Ros, M.A. Palafox [et al.]. – DOI 10.1016/j.saa.2014.04.009 // Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc. – 2014. – V. 130. – P. 653-668.
50. Relative stability of keto-enol tautomers in 5,6-substituted uracils: Ab initio, DFT and PCM study / T.I. Lukmanov, S.P. Ivanov, E.M. Khamitov [et al.]. – DOI 10.1016/j.comptc.2013.09.005 // Comput. Theor. Chem. – 2013. – V. 1023. – P. 38-45.
51. Квантово-химический расчет относительной устойчивости кето-енольных таутомеров 5-хлорурацила / Т.И. Лукманов, Г.С. Абдрахимова, Э.М. Хамитов [и др.]. – DOI 10.1134/S0036024412070151 // Журнал физической химии. – 2012. – Т. 86, № 7. – С. 1221–1225.
52. Markova, N. Oxo-hydroxy tautomerism of 5-fluorouracil: water-assisted proton transfer / N. Markova, V. Enchev, I. Timtcheva. – DOI 10.1021/jp046132m // J. Phys. Chem. A. – 2005. – V. 109. – P. 1981-1988.
53. Dautova, I.F. Hydration effect on the stability of the keto-enol tautomers of 5-hydroxy-6-methyluracil / I.F. Dautova, S.P. Ivanov, S.L. Khursan. – DOI 10.1007/s10947-009-0162-4 // J. Struct. Chem. – 2009. – V. 50, № 6. – P. 1104-1113.
54. Таутомерия 5-амино-6-метилурацила в рамках модели неспецифической гидратации / Э.М. Хамитов, А.Р. Гимадиева, А.Х. Фаттахов [и др.] // Вестник Башкирского университета. – 2010. – Т. 15, № 4. – С. 1124-1126.
55. Correlated ab initio study of nucleic acid bases and their tautomers in the gas phase, in a microhydrated environment and in aqueous solution. Part 4. Uracil and thymine / J. Rejnek, M. Hanus, M. Kabelac [et al.]. – DOI 10.1039/B501499A // Phys. Chem. Chem. Phys. – 2005. – V. 7, № 9. – P. 2006-2017.

56. Теоретическое исследование относительной устойчивости кетоенольных таутомеров 5-аминоурацила / С.П. Иванов, Т.И. Лукманов, Э.М. Хамитов [и др.] // Башкирский химический журнал. – 2010. – Т. 17, № 1. – С. 95-99.
57. Singlet excited-state behavior of uracil and thymine in aqueous solution: a combined experimental and computational study of 11 uracil derivatives / T. Gustavsson, Á. Bányász, E. Lazzarotto [et al.]. – DOI 10.1021/ja056181s // J. Am. Chem. Soc. – 2006. – V. 128. – P. 607-619.
58. Tautomerism in cytosine and uracil: A theoretical and experimental X-ray absorption and resonant auger study / V. Feyer, O. Plekan., R. Richter [et al.]. – DOI 10.1021/jp105062c // J. Phys. Chem. A. – 2010. – V. 114, № 37. – P. 10270–10276.
59. Atkins, P. Physical Chemistry: Quanta, Matter, and Change / P. Atkins, J. Paula., R. Friedman – W.H. Freeman and Co. New York, 2010. – p. 1010.
60. Paglieri, L. Solvent effects in density functional calculations of uracil and cytosine tautomerism / L. Paglieri, G. Corongiu, D.A. Estrin. – DOI 10.1002/qua.560560517 // Int. J. Quantum Chem. – 1995. – V. 56, № 5. – P. 615-625.
61. Can anion interaction accelerate transformation of cytosine tautomers? Detailed view from QTAIM analysis / M. Jebeli Javan, Z.A. Tehrani, A. Fattahi [et al.]. – DOI 10.1007/s11224-012-9993-2 // Struct. Chem. – 2012. – V. 23, № 6. – P. 1843-1855.
62. Tautomers of cytosine and their excited electronic states: a matrix isolation spectroscopic and quantum chemical study / G. Bazso, G. Tarczay, G. Fogarasi [et al.]. – DOI 10.1039/C0CP02354J // Phys. Chem. Chem. Phys. – 2011. – V. 13, № 15. – P. 6799-807.
63. Les, A. Tautomerism of uracil, cytosine, isocytosine, and some of their thio-derivatives / A. Les. I. Ortega-Blake. – DOI 10.1002/qua.560300204 // Int. J. Quantum Chem. – 1986. – V. 30. – P. 225-237.

64. The thermodynamically stable form of solid barbituric acid: the enol tautomer / M. U. Schmidt, J. Bruning, J. Glinnemann [et al.]. – DOI 10.1002/anie.201101040 // *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.* – 2011. – V. 50, № 34. – P. 7924-7926.
65. Zuccarello, F. Barbituric and thiobarbituric acids: a conformational and spectroscopic study / F. Zuccarello, G. Buemi, C. Gandolfo [et al.]. DOI 10.1016/s1386-1425(02)00146-4 // *Spectrochim. Acta Part A.* – 2003. – V.59. – P. 139-151.
66. Kakkar, R. A semiempirical MO study of tautomerism and the electronic structure of barbituric acid / R. Kakkar, V. Katoch. – DOI 10.1007/BF02872580 // *Proc. Indian Acad. Sci. (Chem. Sci.)*. – 1998. – V.110, № 6. – P. 535-543.
67. Millefiori, S. Tautomerism in barbituric and thiobarbituric acids / S. Millefiori, A. Millefiori. – DOI 10.1002/jhet.5570260324 // *J. Heterocyclic. Chem.* – 1989. – V. 26. – P. 639-644.
68. Delchev, V.B. DFT Ab initio study of the keto-enol tautomerism of barbituric acid / V.B. Delchev. – DOI 10.1007/s10947-005-0031-8 // *J. Struct. Chem.* – 2004. – V. 45, № 4. – P. 570-578.
69. Chmiel-Szukiewicz, E., Hydroxyalkylation of 6-aminouracil / E. Chmiel-Szukiewicz. – DOI 10.1002/app.23422 // *J. Appl. Polym. Sci.* – 2006. – V.100, № 1. – P. 715-719.
70. Several aspects of intermolecular interactions between the carbonyl and imine groups in the crystals of compounds containing six-membered heterocycles / N.I. Golovina, G.N. Nechiporenko, I.N. Zyuzin [et al.]. – DOI 10.1007/s10947-008-0156-7 // *J. Struct. Chem.* – 2008. – V. 49, № 5. – P. 909-916.
71. Valadbeigi, Y. Theoretical study on the isomerization and tautomerism in barbituric acid / Y. Valadbeigi, H. Farrokhpour M. Tabrizchi. – DOI 10.1007/s11224-014-0452-0 // *Struct. Chem.* – 2014. – V. 25, № 6. – P. 1805-1810.
72. Marshall, J. R. An experimental study of some potentially tautomeric 2- and 4(6)-substituted pyrimidines / J.R. Marshall, J. Walke. – DOI 10.1039/JR9510001004 // *J. Chem. Soc.* – 1951. – P. 1004-1017.

73. Shugar, D. Spectrophotometric studies of nucleic acid derivatives and related compounds as a function of pH. I. Pyrimidines / D. Shugar, J.J. Fox. – DOI 10.1016/0006-3002(52)90147-9 // *Biochim Biophys Acta*. – 1952. – V. 9. – P. 199-218.
74. Greenbaum, S.B. A Comparison of the effect of certain sulfur substituents upon acidity in the benzene and 6-uracil series / S.B. Greenbaum. – DOI 10.1021/ja01617a022 // *J. Am. Chem. Soc.* – 1955. – V. 77, № 12. – P. 3221-3224.
75. Albert, A. Ionization constants of heterocyclic substances. Part II. Hydroxy-derivatives of nitrogenous six-membered ring-compounds / A. Albert, J.N. Phillips. – DOI 10.1039/JR9560001294 // *J. Chem. Soc. (Resumed)*. – 1956. – P. 1294-1304.
76. Fox, J.J. Spectrophotometric studies of nucleic acid derivatives and related compounds as a function of pH / J.J. Fox, N. Yung, I. Wempen. – DOI 10.1016/0006-3002(52)90147-9 // *Biochim. Biophys. Acta*. – 1957. – V. 23. – P. 295-305.
77. Sato, M. The ultraviolet absorption spectra and the dissociation constants of the derivatives of barbituric acid / M. Sato // *Nippon Kagaku Zasshi*. – 1957. – V. 78, № 3. – P. 382-385.
78. Giner-Sorolla, A. Fluorine-containing pyrimidines and purines: synthesis and properties of trifluoromethyl pyrimidines and purines / A. Giner-Sorolla, A. Bendtch. – DOI 10.1021/ja01554a041 // *J. Am. Chem. Soc.* – 1958. – V. 80, № 21. – P. 5744-5752.
79. Wempen, I. Spectrophotometric studies of nucleic acid derivatives and related compounds. VI. On the structure of certain 5- and 6-halogenouracils and cytosines / I. Wempen, J.J. Fox. – DOI 10.1021/ja01066a034 // *J. Am. Chem. Soc.* – 1964. – V. 86. – P. 2474-2477.
80. Photochemistry and electrochemistry of anticancer uracils / A. Shah, E. Nosheen, F. Zafar [et al.]. – DOI 10.1016/j.jphotobiol.2012.09.008 // *J. Photochem. Photobiol.* – 2012. – V. 117. – P. 269-277.

81. Cavalieri, L.F. The ultraviolet absorption spectra of pyrimidines and purines / L.F. Cavalieri, A. Bendich. – DOI 10.1021/ja01162a067 // *J. Am. Chem. Soc.* – 1950. – V. 72, № 6. – P. 2587-2594.
82. Iza, N. Identification and tautomeric species of uracil by second derivative UV absorption spectroscopy / N. Iza, M. Gil, J. Marcillo. – DOI 10.1021/ja01162a067 // *J. Mol. Struct.* – 1988. – V. 175, № 1. – P. 31-36.
83. Jonas, J. Nucleic acid components and their analogues. XII. Electronic absorption spectra of 6-azauracil and related compounds / J. Jonas, J. Gut. – DOI 10.1135/cccc19612155 // *Collect. Czechoslov. Chem. Commun.* – 1961. – V. 26, № 12. – P. 2155-2163.
84. Igarashi-Yamamoto, N. Ultraviolet absorption, circular dichroism and magnetic circular dichroism studies of sulfur-containing nucleic acid bases and their nucleosides / N. Igarashi-Yamamoto, A. Tajiri, M. Hatano [et al.]. – DOI 10.1016/0005-2787(81)90020-4 // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1981. – V. 656, № 1. – P. 1-15.
85. Nakanishi, K. Ultraviolet spectra of N-heterocyclic systems. I. The anions of uracils / K. Nakanishi, N. Suzuki, F. Yamazaki. – DOI 10.1246/bcsj.34.53 // *Bull. Chem. Soc. Jpn.* – 1961. – V. 34, № 1. – P. 53-57.
86. Spectrophotometric investigation of the protonation and deprotonation of thymine, uracil, and its 5-haloderivatives / A.S. Gukovskaya, T.M. Prokop'eva, B.I. Sukhorukov, V.L. Antonovskii. – DOI 10.1007/BF00849824 // *Izv. AN SSSR, Ser. Chem.* – 1972. – V. 12. – P. 2682-2688.
87. Privat, E.J. A proposed mechanism for the mutagenicity of 5-formyluracil / E.J. Privat, L.C. Sowers. – DOI 10.1016/0027-5107(96)00005-x // *Mutat. Res.* – 1996. – V. 354. – P. 151-156.
88. Jonas, J. Nucleic acid components and their analogues. XVI. Dissociation constants of uracil, 6-azauracil, 5-azauracil and related compounds / J. Jonas, J. Gut. – DOI 10.1135/CCCC19620716 // *Collect. Czechoslov. Chem. Commun.* – 1962. – V. 27. – P. 716-723.

89. Effect of substituents on electron energy redistribution in uracil derivatives and their ionization in polar solvents / Yu.P. Blagoy, G.G. Sheina, A.V. Luzanov [et al.]. – DOI 10.1002/qua.560180402 // *Int. J. Quantum Chem.* – 1980. – V. 18. – P. 913-920.
90. DeMember, J.R. Uracil and its interaction with silver Ion in aqueous alkaline medial / J.R. DeMember, F.A. Wallace. – DOI 10.1021/ja00854a050 // *J. Am. Chem. Soc.* – 1975. – V. 97, № 21. – P. 6240-6245.
91. Nestler, H.J. Prediction of stability in pharmaceutical preparations. XV. Kinetics of hydrolysis of 5-trifluoromethyl-2'-deoxyuridine. / H.J. Nestler, E.R. Garrett. – DOI 10.1002/JPS.2600570706 // *J. Pharm. Sci.* – 1968. – V. 57, № 7. – P. 1117-1125.
92. Hatada, T. Analytical studies on thiouracils. II. Dissociation constant of thiouracils and their reactions with hydrogen peroxide / T. Hatada, M. Mamori, K. Nakashima [et al.]. – DOI 10.1248/yakushi1947.98.5_668 // *Yakugaku zasshi.* – 1978. – V. 98, № 5. – P. 668-672.
93. Fox, J.J. Spectrophotometric studies of nucleic acid derivatives and related compounds as a function of pH. II. Natural and synthetic pyrimidine nucleosides / J.J. Fox, D. Shugar. – DOI 10.1016/0006-3002(52)90181-9 // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1952. – V. 9. – P. 369-384.
94. Lewin, S. Reactions of nucleic acids and their components. Part V. The reaction of acid imino groups of purine, thymine, and adenine with formaldehyde / S. Lewin, M.A. Barnes. – DOI 10.1039/J29660000478 // *J. Chem. Soc. (B).* – 1966. – P. 478-482.
95. Wittenburg, E., Untersuchung der tautomeren Struktur von thymin und seinen alkylderivaten mit hilfe von UV-spektren / E. Wittenburg. – DOI 10.1002/cber.19660990737 // *Chem. Ber.* – 1966. – V. 99. – P. 2391-2398.
96. Wierzchowski, K.L. Infrared and ultraviolet studies on the tautomeric equilibria in aqueous medium between monoanionic species of uracil, thymine, 5-fluorouracil, and other 2,4-diketopyrimidines / K.L. Wierzchowski, E. Litonska, D. Shugar. – DOI // *J. Am. Chem. Soc.* – 1965. – V. 87, № 20. – P. 4621-4629.

97. Iodonium derivatives of heterocyclic compounds / B.Ya. Karele, S.V. Kalnin, I.P. Grinberga [et al.]. – DOI 10.1021/ja00948a039 // Chem. Heterocycl. Compd. – 1973. – № 9. – P. 510-512.
98. OH Radical reaction of 5-substituted uracils: pulse radiolysis and product studies of a common redox-ambivalent radical produced by elimination of the 5-substituents / M. Mori, S. Teshima, H. Yoshimoto [et al.]. – DOI 10.1021/jp002989h // J. Phys. Chem. B. – 2001. – V. 105, № 10. – P. 2070-2078.
99. Blank, H.U. Pyrimidines X. A facile synthesis of 3-alkyl-5-nitrouracils (1a) / H.U. Blank, J.J. Fox. – DOI 10.1002/jhet.5570070351 // J. Heterocycl. Chem. – 1970. – V. 7, № 3. – P. 735-737.
100. Berens, K. Ultraviolet absorption spectra and structure of halogenated uracils and their glycosides / K. Berens, D. Shugar // Acta Biochim. Pol. – 1963. – V. 10, № 1. – P. 25-48.
101. Barlin, G.B. Ionization constants of heterocyclic substances. Part IX. Protonation of aminopyridones and aminopyrimidones / G.B. Barlin, W. Pfeleiderer. – DOI 10.1039/J29710001425 // J. Chem. Soc. (B). – 1971. – P. 1425-1432.
102. Sanli, N. Determination of dissociation constants of folic acid (Leucovorin), 5-fluorouracil, and irinotecan in hydro-organic media by a spectrophotometric method / N. Sanli, S. Sanli, G. Alsancak. – DOI 10.1021/je100072n // J. Chem. Eng. Data. – 2010. – V. 55, № 8. – P. 2695–2699.
103. Katritzky, A.R. Tautomeric azines. Part I. The tautomerism of 1-methyluracil and 5-bromo-1-methyluracil / A.R. Katritzky, A.J. Waring. – DOI 10.1039/JR9620001540 // J. Chem. Soc. – 1962. – P. 1540-1544.
104. Bardos, T.J. Spectrophotometric and chemical studies of 5-mercaptopuracil, 5-mercaptopdeoxyuridine, and their S-substituted derivatives / T.J. Bardos, T.I. Kalman. – DOI 10.1002/jps.2600550615 // J. Pharm. Sci. – 1966. – V. 55, № 6. – P. 606-610.
105. Thermodynamic quantities associated with interaction of thymine, uracil, cytosine, adenine and hypoxanthine with metal ions / M.M. Taqui Khan, S. Styandarayana, M.S. Jyoti, C.A. Lincoln // Indian J. Chem. – 1983. – V. 22A. – P. 357-363.

106. Christensen, J.J. Thermodynamics of proton dissociation in dilute aqueous solution. VIII. pK , ΔH° , and ΔS° values for proton ionization from several pyrimidines and their nucleosides at 25° / J.J. Christensen, J.H. Rytting, R.M. Izatt. – DOI 10.1021/j100867a047 // J. Phys. Chem. A. – 1967. – V. 71, № 8. – P. 2700-2705.
107. Levene, P.A. The ionization of pyrimidines in relation to the structure of pyrimidines nucleosides / P.A. Levene, L.W. Bass, H.S. Simms // J. Biol. Chem. – 1926. – V. 70. – P. 229-241.
108. Ganguly, S. Protonation/deprotonation energetics of uracil, thymine, and cytosine in water from e.m.f./spectrophotometric measurements / S. Ganguly, K.K. Kundu. – DOI 10.1139/V94-143 // Can. J. Chem. – 1994. – V. 72. – P. 1120-1126.
109. Theoretical models for quantitative description of the acid-base equilibria of the 5,6-substituted uracils / M.G. Ilyina, E.M. Khamitov, S.P. Ivanov [et al.]. – DOI 10.1021/acs.jpca.7b09330 // J. Phys. Chem. A. – 2018. – V. 122, № 1. – P. 341-349.
110. Wempen, I. Pyrimidines. II. Synthesis of 6-fluorouracil / I. Wempen, J.J. Fox. – DOI 10.1021/jm00332a017 // J. Med. Chem. – 1964. – V. 7. – P. 207-209.
111. Neiland, O.Ya. Electronic absorption spectra and acidity of new condensed systems of uracil-derivatives of 1,3-dithiolo[4,5-d]pyrimidine / O.Ya. Neiland, N.N. Zagorskaya. – DOI 10.1007/BF00529385 // Chem. of Heterocycl. Compd. – 1992. – V. 28, № 3. – P. 350-354.
112. Pfleiderer, W. Pyrimidines, part XXII synthesis and properties of 5, 6-dihalogenouracils / W. Pfleiderer, H. Deiss. – DOI 10.1002/ijch.196800078 // Isr. J. Chem. – 1968. – V. 6. – P. 603-614.
113. Tucci, E.R. Acid dissociation constants and complex formation constants of several pyrimidine derivatives / E.R. Tucci, E. Doody, N.C. Li. – DOI 10.1021/j100905a024 // J. Phys. Chem. – 1961. – V. 65. – P. 1570-1574.
114. Kazimierczuk, Z. Photochemical transformation of 6-chlorouracil and some alkylated analogues / Z. Kazimierczuk, D. Shugar. – DOI 10.1016/0005-2787(71)90824-0 // Biochim. Biophys. Acta. – 1971. – V. 245. – P. 157-166.

115. Tucci, E.R. Metal complexation with pyrimidine derivatives – III: 5-substituted orotic acids / E.R. Tucci, F. Takahasi, V.A. Tucci, N.C. Li. – DOI 10.1016/0022-1902(64)80209-8 // J. Inorg. Nucl. Chem. – 1964. – V. 26. – P. 1263-1276.
116. Pfeiderer, W. Synthese und eigenschaften von 5.6.7.8-tetrahydro-lumazinen und ihren 5-acetyl-derivaten / W. Pfeiderer. – DOI 10.1002/jlac.19717470113 // Justus Liebigs Ann. Chem. – 1971. – V. 747. – P. 111-122.
117. Base-promoted reaction of 5-hydroxyuracil derivatives with peroxy radicals / R. Amorati, L. Valgimigli, G.F. Pedulli [et al.]. – DOI 10.1021/ol1017245 // Org. Lett. – 2010. – V. 12, № 18. – P. 4130-4133.
118. Acid dissociation constants of some nitrogen-containing multinuclear systems / E.I. Stankevich, Yu.Yu. Popelis, E.E. Grinshtein [et al.]. – DOI 10.1007/BF00475441 // Chem. Heterocycl. Compd. – 1970. – V. 6, № 1. – P. 122-124.
119. Кислотно-основное равновесие 5-метокси-6-метилурацила в растворах: оценка содержания анионных форм в водном щелочном растворе / С.Ф. Петрова, Т.Р. Нугуманов, Л.В. Спирихин [и др.]. – DOI 10.1134/S107036321806004X // Журнал общей химии. – 2018. – Т. 88, № 6. – P. 895-899.
120. Kinetic and spectral investigation of the electron and hydrogen adducts of dihydroxy- and dimethyl-substituted pyrimidines: a pulse radiolysis and product analysis study / T.L. Luke, H. Mohan, T.A. Jacob [et al.]. – DOI 10.1002/poc.478 // J. Phys. Org. Chem. – 2002. – V. 15, № 5. – P. 293-305.
121. Controlled stabilization of anionic forms of the uracil derivatives: A DFT study / M.G. Ilyina, E.M. Khamitov, A.G. Mustafin, S.L. Khursan. – DOI 10.1016/j.jmglm.2017.11.007 // J. Mol. Graph. Model. – 2018. – V. 79. – P. 65-71.
122. Wielinska, J. 5-Fluorouracil-complete insight into its neutral and ionised forms / J. Wielinska, A. Nowacki, B. Liberek. – DOI 10.3390/molecules24203683 // Molecules. – 2019. – V. 24, № 20. – P. 3683-3701.

123. First principles calculation of pK_a values for 5-substituted uracils / Y.H. Jang, L.C. Sowers, T. Cagin, W.A. Goddard III. – DOI 10.1021/jp994432b // J. Phys. Chem. A. – 2001. – V. 105. – P. 274-280.
124. Matsui, T. A simple scheme for estimating the pK_a values of 5-substituted uracils / T. Matsui, A. Oshiyama, Y. Shigeta. – DOI 10.1016/j.cplett.2010.12.043 // Chemical Physics Letters. – 2011. – V. 502 – P. 248-252.
125. Tyagi, S. Solution studies of some binary and ternary lanthanide complexes / S. Tyagi, R. Kumar, U.P. Singh. – DOI 10.1021/je0400097 // J. Chem. Eng. Data. – 2005. – V. 50. – P. 377-382.
126. Azab, H.A. Medium effect on the apparent dissociation constants of guanine, thymine, uracil, hypoxanthine, and cytosine in various hydroorganic media / H.A. Azab, Z.M. Anwar, M. Sokar. – DOI 10.1021/je030192o // J. Chem. Eng. Data. – 2004. – V. 49, № 2. – P. 256-261.
127. Dissociation constants of aryl azopyrimidine compounds and the formation constants of their cobalt, nickel and copper complexes / M.S. Masoud, E.A. Khalil., A.A. Ibrahim, A.A. Marghany. – DOI 10.1524/zpch.1999.211.Part_1.013 // Zeitschrift für Physikalische Chemie. – 1999. – V. 211, № 8. – P. 13-27.
128. Nucleic acid components and their analogues. IX. N-methyl derivatives of 6-azauracil and 6-azathymine / J. Gut, M. Prystas, J. Jonas [et al.]. – DOI 10.1135/cccc19610974 // Collect. Czechoslov. Chem. Commun. – 1961. – V. 26. – P. 974-985.
129. Wood, J.K. The Acidic constants of some ureides and uric acid derivatives / J.K. Wood. – DOI 10.1039/CT9068901831 // J. Chem. Soc. Trans. – 1906. – V. 89. – P. 1831-1839.
130. Wal, H.J. Reaktionen mit dimethylcarbonat, 5 methylierung der pyrimidin-basen der nucleinsäuren / H.J. Wal, M. Lissel // Z. Naturforsch. – 1989. – V. 44b. – P. 863-865.
131. Itahara, T. Oxidation of thymines by peroxosulfate ions in water / T. Itahara, Y. Fujii, M. Tada. – DOI 10.1021/jo00250a003 // J. Org. Chem. – 1988. – V. 53, № 15. – P. 3421-3424.

132. Shelke, S.A. Structural changes of an abasic site in duplex DNA affect noncovalent binding of the spin label c / S.A. Shelke, S.T. Sigurdsson. – DOI 10.1093/nar/gkr1210 // *Nucleic Acids Res.* – 2012. – V. 40, № 8. – P. 3732-3740.
133. Taniguchi, Y. Adenosine-1,3-diazaphenoxazine derivative for selective base pair formation with 8-oxo-2'-deoxyguanosine in DNA / Y. Taniguchi, R. Kawaguchi, S. Sasaki. – DOI // *J. Am. Chem. Soc.* – 2011. – V. 133, № 19. – P. 7272-7275.
134. Reaction on uracils with trimethyl phosphates and sodium diphenyl phosphate / I.I. Kuz`menko, V.N. Bobkov, T.V. Zvolinskaya, [et al.] // *Zh. Obshch. Khim.* – 1989. – V. 59, № 121. – P. 1751-1755.
135. Ukai, T. Studies on xanthine derivatives. I. Methylation of 4-aminouracil. (1) / T. Ukai, Y. Yamamoto, S. Kanetomo // *Yakugaku Zasshi.* – 1954. – V. 74, № 6. – P. 674-677.
136. Muller, C.E. Synthesis of 3-substituted 6-aminouracils / C.E. Muller. – DOI 10.1016/0040-4039(91)80214-Q // *Tetrahedron Lett.* – 1991. – V. 32, № 45. – P. 6539-6540.
137. El-Kalyoubi, S. A Novel synthesis of fused uracils: indenopyrimidopyridazines, pyrimidopyridazines, and pyrazolopyrimidines for antimicrobial and antitumor evaluation / S. El-Kalyoubi, F. Agili. – DOI 10.3390/molecules21121714 // *Molecules.* – 2016. – V. 21, № 12. – P. 1714-1727.
138. Discovery of potent and orally active lipoprotein-associated phospholipase A2 (Lp-PLA2) inhibitors as a potential therapy for diabetic macular edema / X. Chen, K. Wang, W. Xu [et al.]. – DOI 10.1021/acs.jmedchem.5b01930 // *J. Med. Chem.* – 2016. – V. 59, № 6. – P. 2674-2687.
139. Krasnov, K.A. Alkylation of 6-methoxyuracil and a novel route to the synthesis of N-substituted barbituric acids / K.A. Krasnov, V.I. Slesarev; I.N. Selimanova. – DOI 10.1002/chin.199332185 // *J. Org. Chem.* – 1992. – V. 28, № 7. – P. 1531-1537.
140. Researches on antiviral agents. Synthesis and transformations of racemic and chiral 6-oxiranyl pyrimidinones / M. Botta, R. Saladino, D. Lamba, [et al.]. – DOI

- 10.1016/s0040-4020(01)87190-8 // *Tetrahedron*. – 1993. – V. 49, № 21. – P. 6053-6070.
141. Evans, J. Researches on pyrimidines. cxix. determination of the constitution of alkylation products of phenyluracil and phenylhydrouracil / J. Evans, T. Johnson. – DOI 10.1021/ja01375a051 // *J. Am. Chem. Soc.* – 1930. – V. 52, № 12. – P. 4993-5005.
142. Synthesis of 7-alkyl-1,3,6-trimethylpyrrolo[2,3-d] / I. Ishikawa, V. E. Khachatryan, R. G. Melik-Ohanjanian [et al.] // *Chem. Pharm. Bull.* – 1992. – V. 40, № 4. – P. 846-850.
143. Synthesis and immunotropic activity of derivatives of pyrimidines / V.P. Krivonogov, G.A. Tolstikov, Yu.I. Murinov, [et al.]. – DOI 10.1007/BF02464119 // *Pharm. Chem. J.* – 1993. – V. 27, № 2. – P. 112-120.
144. Studies of vibrational spectra of 6-fluorothymine and its methyl derivatives / S.G. Stepanian, N.A. Smorygo, G.G. Sheina, [et al.]. – DOI 10.1016/0584-8539(90)80105-8 // *Spectrochim. Acta A.* – 1990. – V. 46A, № 3. – P. 355-361.
145. Synthesis of methyl-substituted derivatives of 5-hydroxy-6-methyluracil / S. F. Petrova, T.R. Nugumanov, A.N. Lobov [et al.]. – DOI 10.1134/S1070363218010231 // *Russ. J. Gen. Chem.* – 2018. – V. 88, № 1. – P. 136-139.
146. 5-Fluorouracil solutions: NMR study of acid-base equilibrium in water and DMSO / G.S. Abdrakhimova, M.Y. Ovchinnikov, A.N. Lobov [et al.]. – DOI 10.1002/poc.3350 // *J. Physical Organic Chem.* – 2014. – V. 27, № 11. – P. 876-883.
147. 5-Chlorouracil and 5-bromouracil acid-base equilibrium study in water and DMSO by NMR spectroscopy / G.S. Abdrakhimova, M.Y. Ovchinnikov, A.N. Lobov [et al.]. – DOI 10.1016/j.molstruc.2018.01.013 // *J. Mol. Struct.* – 2018. – V. 1158. – P. 51-56.
148. 6-Methyluracil derivatives as bifunctional acetylcholinesterase inhibitors for the treatment of alzheimer's disease / V.E. Semenov, I.V. Zueva, M.A.

- Mukhamedyarov [et al.]. – DOI 10.1002/cmdc.201500334 // ChemMedChem. – 2015. – V. 10, № 11. – P. 1863-1874.
149. Toward a materials genome approach for ionic liquids: synthesis guided by ab initio property maps / F. Yan, M. Lartey, K. Jariwala, [et al.]. – DOI 10.1021/jp506972w // J. Phys. Chem. B. – 2014. – V. 118, № 47. – P. 13609-13620.
150. Wiley, R.H. Synthesis of pyrimidine-5-carboxaldehydes by the Reimer-Tiemann reaction / R.H. Wiley, Y. Yamamoto. – DOI 10.1021/jo01081a020 // J. Org. Chem. – 1960. – V. 25. – P. 1906-1909.
151. Synthesis of new N-hydroxy-6-methyluracil-5-carboximidoyl chloride derivatives / I.B. Chernikova, I. Z. Sagatova, M.S. Yunusov, R.F. Talipov. – DOI 10.1134/S1070428019030084 // Russ. J. Org. Chem. – 2019. – V. 55, № 3. – P. 325-329.
152. Патент № 2398767 С2 Российская Федерация, МПК С07D 239/46, А61К 31/513, А61Р 39/06. Средство, представляющее собой 5-амино-6-метилурацил, проявляющее антиоксидантную активность, и способ его получения : № 2008112906/04 заявл. 03.04.2008: опубл. 10.09.2010 / А.Г. Мустафин, А.Р. Гимадиева, Ю.Н. Чернышенко [и др.]; заявитель Учреждение Российской академии наук Институт органической химии Уфимского научного центра РАН, Федеральное государственное учреждение науки Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека Роспотребнадзора. – 10 с.
153. Sariri, R. Synthesis of Purine Antiviral Agents, Hypoxanthine and 6-Mercaptopurine / R. Sariri, G. Khalili. – DOI 10.1023/A:1020822216986 // Russ. J. Org. Chem. – 2002. – V. 38. – P. 1053-1055.
154. Albert, A. Ionization constants of acids and bases / A. Albert, E.P. Serjeant, Wiley: London, 1962. – p. 179.
155. Bányász, Á. Effect of amino substitution on the excited state dynamics of uracil / Á. Bányász, T. Gustavsson, E. Keszei, [et al.]. – DOI 10.1039/B800764K // Photochem. Photobiol. Sci. – 2008. – V. 7, № 7. – P. 765-768.

156. Tatischeff, I. Influence of the environment on the excitation wavelength dependence of the fluorescence quantum yield of indole / I. Tatischeff, R. Klein. – DOI 10.1111/j.1751-1097.1975.tb06740.x // Photochem. Photobiol. – 1975. – V. 22. – P. 221-229.
157. Szterner, P. Solubilities in water of uracil and its halogenated derivatives / P. Szterner. – DOI 10.1021/je800029c // J. Chem. Eng. Data. – 2008. – V. 53. – P. 1738–1744.
158. Политермическая растворимость ферроценилкарбоновой и ферроценилдикарбоновой кислот в воде / А.А. Червова, Н.В. Гавголенко, П.В. Фабинский, [и др.] // Журнал Сибирского федерального университета. Химия. – 2014. – Т. 7. – P. 134-138.
159. Frisch, M. J. GAUSSIAN 09 / M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G.A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H.P. Hratchian, A.F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J.L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J.A. Montgomery, Jr., J.E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J.J. Heyd, E. Brothers, K.N. Kudin, V.N. Staroverov, T. Keith, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J.C. Burant, S.S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J.M. Millam, M. Klene, J.E. Knox, J.B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R.E. Stratmann, O. Yazyev, A.J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J.W. Ochterski, R.L. Martin, K. Morokuma, V.G. Zakrzewski, G.A. Voth, P. Salvador, J.J. Dannenberg, S. Dapprich, A.D. Daniels, O. Farkas, J.B. Foresman, J.V. Ortiz, J. Cioslowski, D.J. Fox. – Wallingford CT. Gaussian Inc. 2011.
160. G.A. Zhurko., D.A. Zhurko. Chemcraft, Version 1.8 (build 489). Available at: <http://www.chemcraftprog.com>.
161. Climbing the density functional ladder: nonempirical meta-generalized gradient approximation designed for molecules and solids / J. Tao, J.P. Perdew, V.N. Staroverov, G.E. Scuseria. – DOI 10.1103/PhysRevLett.91.146401 // Phys. Rev. Lett. – 2003. – V. 91, № 14. – P. 146401.

162. Self-consistent molecular orbital methods. XX. A basis set for correlated wave functions / R. Krishnan, J.S. Binkley, R. Seeger, J.A. Pople. – DOI 10.1063/1.438955 // *The Journal of Chemical Physics*. – 1980. – V. 72, № 1. – P. 650-654.
163. Tomasi, J. Quantum mechanical continuum solvation models / J. Tomasi, B. Mennucci, R. Cammi. – DOI 10.1021/cr9904009 // *Chem. Rev.* – 2005. – V. 105, № 8. – P. 2999-2093.
164. Doddrell, D.M. Distortionless enhancement of NMR signals by polarization transfer / D.M. Doddrell, D.T. Pegg, M.R. Bendall. – DOI 10.1016/0022-2364(82)90286-4 // *J. Magn. Reson.* – 1982. – V. 48. – P. 323-327.
165. Кислотно-основное равновесие нового замещенного 1,2,3-триазольным фрагментом производного 6-метилурацила в водных растворах / А.А. Ахияров, Л.М. Губайдуллина, Л.Ф. Сайфина [и др.]. – DOI 10.31857/S0044453721020035 // *Журнал физической химии*. – 2021. – Т. 95, № 2. – С. 207-212.
166. Ахияров, А.А. Растворимость 6-аминоурацила и 1-метил-6-аминоурацила в воде и некоторых органических растворителях / А.А. Ахияров, С.П. Иванов. – DOI 10.33184/bulletin-bsu-2021.3.16 // *Вестник Башкирского университета*. – 2021. – Т. 26, № 3. – С. 631-634.
167. Parker, C.A. Photoluminescence of solutions / C.A. Parker, 1968, Amsterdam, London, New York: Elsevier Pub Co, 1968. – p. 544.
168. On the use of the spectral luminescent method for studying acid–base equilibria of uracil derivatives in aqueous solutions / S.P. Ivanov, S.S. Ostakhov, G.S. Abdrakhimova [et al.]. – DOI 10.1016/j.bpc.2020.106432 // *Biophysical Chemistry*. – 2020. – Vl. 266. – P. 106432-106437.
169. Спектрально-люминесцентное исследование кислотно-основного равновесия 5- и 6-аминоурацила в водных растворах / С. С. Остахов, Р. Р. Каюмова, А. А. Ахияров [и др.]. – DOI 10.31857/S0023119323010102 // *Химия высоких энергий*. – 2023. – Т. 57, № 1. – С. 3-8.

170. Флуоресцентное исследование кето-енольного равновесия таутомеров 5-фторурацила в водных растворах / М. В. Султанбаев, С. С. Остахов, Ш. Х. Ганцев, [и др.] // Химия высоких энергий. – 2010. – Т. 44, № 5. – С. 415–418.
171. Амин-иминная и кето-енольная таутомерия 6-аминоурацила в воде и ДМСО: квантово-химический расчет / А.А. Ахияров, С.Л. Хурсан, М.Ю. Овчинников, С.П. Иванов. – DOI 10.31857/S0044460X22020032 // Известия Уфимского научного центра РАН. – 2019. – № 4. – С. 82-86.
172. Иванов, С.П. Изучение кето-енольного равновесия некоторых производных урацила в водных растворах: специальность 02.00.04 «Физическая химия» : диссертация на соискание ученой степени кандидата химических наук / Иванов Сергей Петрович.– Уфа, 2003. – 100 с.
173. Фаттахов, А.Х. Синтез и исследование таутомерных и кислотно-основных превращений биологически активных С(5)-, N(1)-, N(3)-замещенных производных урацила: специальность 02.00.03 «Органическая химия» : диссертация на соискание ученой степени кандидата химических наук / Фаттахова Альберта Ханифовича.– Уфа, 2011. – 141 с.
174. Кислотно-основные свойства 6-метилурацил-5-карбонитрила и его N-метилпроизводных / А.А. Ахияров, А.Н. Лобов, И.Б. Черникова, С.П. Иванов. – DOI 10.31857/S0044460X22020032 // Журнал общей химии. – 2022. – Т. 92, № 2. – С. 181-188.