

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА
на диссертационную работу Ахиярова Айдара Айратовича
«Кислотно-основное равновесие 5-замещенных производных 6-метил- и 6-
аминоурацила в водных растворах»,
представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук
по научной специальности 1.4.4. Физическая химия.

Актуальность темы диссертационной работы.

Изучение кислотно-основных свойств органических молекул в растворе является важным, актуальным направлением физической химии, поскольку процессы протонирования и диссоциации приводят к образованию различных ионизированных форм или таутомеров, что отражается на растворимости соединений, их липофильности, спектральных свойствах, способности к межмолекулярным взаимодействиям и химическим реакциям, включая их способность ингибировать окислительные процессы. Поэтому информация о кислотно-основных свойствах соединений представляет интерес для широкого ряда областей исследований, таких как органическая химия, фармацевтика, биохимия. Более того, сравнение количественных характеристик процессов протонирования/диссоциации в ряду соединений дает дополнительную информацию об электронной структуре молекул и их кислотно-активных групп. Для пиримидиновых оснований, таких как урацил и его производных, способность к кислотной диссоциации или протонно-донорная способность определяет их биологическую функцию. Спаривание молекул в составе ДНК, молекулярное узнавание аминокислотных остатков в процессе репликации белков на матрице РНК – все эти процессы тонко регулируются протонно-донорной способностью нуклеиновых оснований. Производные урацила также проявляют биологическую активность, многие из них находят применение в медицине. Кислотная диссоциация этих соединений по связям N-H является ключевым моментом, определяющим их реакционную способность. Варьирование природы заместителей и их положения в пиримидиновом кольце приводит к существенному изменению кислотных свойств, величины констант диссоциации могут изменяться на 5 порядков. Не до конца решен вопрос о последовательности 2 стадий диссоциации производных урацила. Для определения места отрыва первого протона от замещенных гетероциклов требуются новые экспериментальные данные с применением специальных приемов по избирательному блокированию кислотно-активных центров молекул. В связи с этим, представленную диссертационную работу, посвященную изучению кислотно-основных равновесий 5-замещенных производных 6-метил и 6-аминоурацила в зависимости от природы заместителей и температуры, следует признать актуальной, а ее результаты востребованными в таких областях, как термодинамика растворов биологических веществ, органическая химия, фармацевтика.

Обоснованность положений и выводов диссертационной работы.

Положения и выводы диссертации основаны на большом объеме полученных автором экспериментальных и расчетных результатов. Достоверность полученных результатов подтверждается чистотой использованных реагентов и техническими возможностями использованного оборудования. Объекты исследования имели чистоту 99-98%. Чистота замещенных производных урацила, полученных по оригинальным методикам для целей данной работы, охарактеризована методом жидкостной хроматографии. Экспериментальные измерения выполнены на современном

оборудовании, обеспечивающем точность результатов на уровне принятых мировых стандартов. Измерения констант диссоциации выполнены в растворах с фоновым электролитом, обеспечивающим постоянство ионной силы раствора и коэффициентов активности ионов. При получении ЯМР спектров использована методика подавления сигнала протонов. Таким образом, в использованных методиках проведения исследований учтены возможные факторы, искажающие измеряемые в эксперименте сигналы. В квантово-химических расчетах использован неэмпирический функционал TPSS, применение которого особенно важно для молекул со значительным градиентом электронной плотности. В использованный базисный набор включены поляризационные и диффузные функции для тяжелых атомов. Оценка деталей квантово-химического моделирования показывает надежность проведенных расчетов.

Новизна результатов диссертационной работы

В диссертационной работе получены новые термодинамические данные для процесса кислотной диссоциации 5-замещенных производных 6-метил и 6-аминоурацила, включающие следующие величины: константы диссоциации при температурах 288.15–318.15 К, изменения свободной энергии Гиббса, энтальпии и энтропии при 298.15 К.

Впервые предложена методика определения констант диссоциации производных урацила из данных флюорометрического титрования, основанная на обработке изменений относительного квантового выхода.

С использованием избирательно N-метилированных производных 5-циано-6-метилурацила определены константы диссоциации групп HN1 и HN3 в гетероцикле. Показано, что в случае замещенного урацила – 5-циано-6-метилурацила, на первой стадии кислотной диссоциации образуется доминирующая анионная форма с отрывом протона от атома N1.

Впервые экспериментально определена растворимость 5-замещенных производных 6-метил- и 6-аминоурацила в воде, а также 6-аминоурацила и 1-метил-6-аминоурацила в воде, ДМСО, ацетоне и изопропиловом спирте при 298.15 К. Для водных растворов изучена температурная зависимость растворимости. Установлено, что растворимость 6-аминоурацила и 1-метил-6-аминоурацила в воде зависит от кислотности раствора, поскольку при варьировании pH в растворе изменяется доля анионной формы вещества.

Для 6-аминоурацила впервые квантово-химическим методом на основе изменений энергии Гиббса определен ряд относительной устойчивости таутомеров в воде и ДМСО с учетом неспецифической и специфической сольватации гетероциклов.

Научная и практическая значимость результатов.

Полученный набор новых данных о константах диссоциации производных урацила показывает влияние природы и положения заместителей в пиримидиновом цикле на кислотные свойства соединений. Полученные данные о константах диссоциации и растворимости являются новыми справочными данными, которые представляют интерес для прогнозирования реакционной способности соединений данного ряда и планирования синтеза их новых производных.

На основе экспериментальных данных, полученных методами УФ-спектроскопии и ЯМР, определен наиболее активный центр депротонирования пиримидинового кольца в производных урацила.

Расширены границы применения спектрально-люминесцентного метода для изучения кислотно-основных свойств соединений путем оценки зависимости

относительного квантового выхода от рН. Благодаря высокой чувствительности предложенная методика может быть использована для малорастворимых соединений.

Анализ содержания диссертационной работы.

В экспериментальной части (глава 2) приводится исчерпывающая информация обо всех объектах исследования, описаны методы исследования. Достоинством использованных методик определения констант диссоциации является выполнение измерений при постоянной ионной силе раствора 0.1 моль/л. Это обеспечивало постоянство коэффициентов активности ионов. Однако, в некоторых разделах отсутствует важная для понимания и оценки работы информация. В разделе 2.5.1 поверхностно описана методика потенциометрического определения констант диссоциации: не указан титрант и его концентрация, не приведены первичные данные в виде кривых титрования, не приведены уравнения или соотношения для расчета рК. В разделе 2.5.2 «Спектрофотометрический метод» не указано как определяли оптическую плотность для анионной и нейтральной формы молекулы.

Наибольший массив термодинамических данных для процесса кислотной диссоциации получен потенциометрическим методом (разделы 3.1.1 и 3.1.2). Можно отметить хорошее согласие полученных значений рК в пределах 0.01-0.2 единиц с имеющимися в литературе данными для 6-амино-урацила и 6-метил-урацила, полученными другими авторами спектральным методом и квантово-химическим расчетом. Как показано далее в работе, на первой стадии диссоциации образуется смесь анионов с доминированием формы, в которой оторван протон от группы NH1. Поскольку в расчетах учитывается общая концентрация всех анионных форм, найденные константы диссоциации следует признать кажущимися. В работе проводится качественное сравнение изменений в величинах рК при введении различных заместителей в положении 5 и 6 пиримидинового кольца. Отмечается, что введение электроноакцепторных групп CN и CNO в положение 5 6-метил-урацила приводит к наибольшим изменениям рК. Введение группы NH₂ в положение 5 оказывает слабое влияние, но замена метильной группы на NH₂ в положении 6 уменьшает величины рК. Максимальное падение (на 4 единицы) величин рК и усиление кислотных свойств обнаружено при введении нитрозо-группы в положение 5 6-амино-урацила. Достоинством полученных результатов является изучение температурной зависимости констант диссоциации, которая позволила оценить изменение энтальпии и энтропии процесса. Из данных следует, что кислотная диссоциация в растворе является эндотермическим процессом, сопровождающимся неблагоприятным отрицательным изменением энтропии, что согласуется с имеющимися в литературе данными для урацила и тимина. Можно заметить, что энтальпийные и энтропийные характеристики очень мало обсуждаются в работе.

Надежные данные по растворимости ряда производных урацила в воде и 2 соединений в воде, ДМСО, ацетоне и изопропиловом спирте при 298.15 К получены методом изотермического насыщения со спектральным контролем концентрации раствора (раздел 3.1.3). Растворимость в ряду изученных соединений не коррелирует с величинами рК, поскольку в нейтральной среде доминирует молекулярная форма веществ, и величина растворимости зависит от ряда других факторов. В обсуждении автор корректно связывает изменение растворимости соединений с изменением кристаллической структуры, но не уделяет внимания изменениям в сольватации веществ. Найдена закономерная зависимость растворимости от рН раствора, что связано с изменением доли анионной формы веществ. Обращает на себя внимание факт, что блокирование атома N1 метильной группой в 6-амино-урациле, приводящего к невозможности кислотной

диссоциации и образованию Н-связей группы HN1 с водой уменьшает растворимость соединения при высоких температурах.

В работе дается подробное и аргументированное обоснование применимости и преимуществ флуоресцентного метода для определения констант диссоциации (раздел 3.1.4). Надежность и высокая чувствительность метода доказана на примере ряда соединений, в том числе ранее хорошо изученных тимина и 6-амино-урацила. Автор справедливо замечает, что более надежным приемом является рассмотрение интегральной величины – относительного квантового выхода вместе оптической плотности. Величины квантового выхода, найденные в работе равными порядка 10^{-5} , более корректно называть относительным квантовым выходом, поскольку абсолютные значения таких величин прямо определить невозможно.

В работе изучена способность пиримидиновых производных к таутомерии на примере 6-амино-урацила квантово-химическим методом (раздел 3.1.4.1). Рассмотрены структуры 6 кето-енольных и 2 амин-иминных таутомеров в среде воды и ДМСО. Для моделирования использован надежный функционал TPSS, чувствительный для оценок градиента электронной плотности, в использованный базисный набор включены поляризационные и диффузные функции для тяжелых атомов. Эффекты неспецифической сольватации учитывались в рамках модели поляризуемого континуума, эффекты специфической гидратации моделировались путем явного введения в окружение 6-амино-урацила 5 и 9 молекул воды. Можно отметить строгий подход к сравнению устойчивости таутомеров, основанный на величинах энергии Гиббса (а не энергий). Полученные ряды устойчивости таутомеров 6-амино-урацила при учете неспецифической сольватации повторяют ранее полученные ряды для других производных урацила. Но при явном введении молекул воды в окружение гетероцикла ряд устойчивости существенно изменяется. Однако, делается убедительный вывод о том, что во всех случаях наибольшую устойчивость сохраняет кето-таутомер, который доминирует в растворах.

Протекание процесса кислотной диссоциации производных урацила при добавлении щелочи доказано в работе методами УФ-спектроскопии и ЯМР (раздел 3.2). В электронных спектрах отмечено батохромное смещение полос поглощения на 3-20 нм при увеличении pH, указывающее на образование анионной формы веществ. Для более строгого анализа было бы полезно выполнить разложение сложных полос на составляющие для молекулярной и анионной формы. Из анализа одномерных и двумерных спектров ЯМР (НМВС, гетероядерной корреляции) для всех изученных производных урацила установлено смещение сигналов атомов C2, C6, N1 при добавлении щелочи, что указывает на отрыв протона преимущественно от атома N1.

Вопрос о доминирующей анионной форме, образующейся на первой стадии диссоциации производных урацила, рассмотрен на примере 5-циано-6-метилурацила путем селективного метилирования атомов N1 и N3 (раздел 3.3). Полученные продукты метилирования охарактеризованы методом ЯМР. Спектральные данные подтверждают протекание процесса диссоциации групп HN1 или HN3, определены константы диссоциации этих групп. Приводятся аргументированные положения о доминировании анионной формы N1 (мольная доля 0.67) над анионом N3 (мольная доля 0.33) при диссоциации исходного 5-циано-6-метилурацила.

Публикации по теме диссертационной работы.

Основные результаты диссертации достаточно полно изложены в 6 опубликованных статьях. Из них 4 статьи – в журналах, индексируемых в международных базах WoS и Scopus (отнесены ВАК к категории К-1); 1 статья в рецензируемом журнале

(Вестник Башкирского университета, категории К-3), включенном ВАК в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные результаты диссертаций по специальности 1.4.4. Физическая химия. Количество публикаций удовлетворяет требованию пункта 11 «Положения о присуждении ученых степеней» (в действующей редакции) и рекомендациям ВАК, введенным с 01.09.2023.

Научная специальность диссертационной работы.

Содержание и название диссертационной работы соответствует паспорту научной специальности 1.4.4. Физическая химия, химические науки, по следующим направлениям исследований:

пункту 2 в части «Экспериментальное определение термодинамических свойств веществ»;
пункту 4 в части «Теория растворов, межмолекулярные и межчастичные взаимодействия. Компьютерное моделирование строения, свойств и спектральных характеристик молекул и их комплексов в простых и непростых жидкостях»;
пункту 10 в части «Связь реакционной способности реагентов с их строением».

Замечания

1. В экспериментальной части в разделе 2.5.1 «Потенциометрический метод» очень поверхностно описана методика определения констант диссоциации: не указан титрант и его концентрация, не приведены первичные данные в виде кривых титрования, не приведены уравнения или соотношения для расчета pK . В разделе 2.5.2 «Спектрофотометрический метод» не указано как определяли оптическую плотность для анионной и нейтральной формы молекулы.
2. Более точная процедура нахождения констант диссоциации из экспериментальных данных, полученных методами потенциометрии, спектроскопии и флуоресценции, заложена в итерационных методах обработки кривых титрования с нахождением минимума ошибок между экспериментальными и рассчитанными величинами. Такая процедура заложена в свободно доступных программах, например PHMETR, KEV и др.
3. Возможно ли протекание процесса с отрывом двух протонов от атомов N1, и N3 с образованием двухзарядного аниона? Что можно сказать об устойчивости такого аниона?
4. Влияние заместителей приводит к перераспределению электронной плотности в гетероцикле, изменению прочности связей NH, что ясно отражается на изменении энтальпии в процессе диссоциации. А как интерпретировать варьирование изменений энтропии диссоциации в ряду замещенных гетероциклов? Во всех рассмотренных случаях при диссоциации образуется по 2 заряженные частицы: анион и протон. Что можно сказать о различиях в гидратации анионов замещенных урацилов?
5. Имеются замечания по оформлению и представлению данных.
 - Неточности в терминологии:
в заголовке табл.3.7 и на стр.61 – «Термодинамические характеристики предельной растворимости» вместо «Термодинамические характеристики растворения»;
используется термин «предельная растворимость», непонятно чем он отличается от просто растворимости.
 - Неточности в символах термодинамических величин:
для процессов диссоциации и растворения изменение энергии Гиббса, энтальпии и энтропии имеет одинаковое обозначение ΔG , ΔH и ΔS без символов процесса. Для растворения величины ΔG и ΔS на стр. 60 приводятся с надстрочным индексом 298, а величины ΔH без индекса.

- Неточности в представлении данных:

концентрации насыщенных растворов в заголовке табл.3.6 обозначены «С 10⁻³» вместо «С 10³», только тогда приведенные величины будут равны 0.0046, 0.0060 и т.д.;

в таблицах приводятся найденные величины констант диссоциации в виде безразмерных величин $pK = -\lg K$, но нигде не указано, в каких единицах измерены величины K (моль л⁻¹ или моль кг⁻¹).

Заключение:

Диссертация Ахиярова А. А. «Кислотно-основное равновесие 5-замещенных производных 6-метил- и 6-аминоурацила в водных растворах» является научно-квалификационной работой, в которой содержится решение научной задачи по установлению влияния природы и положения заместителей в гетероцикле на кислотные свойства производных урацила, от которых зависит ионная форма и реакционная способность соединений в растворах различной кислотности, что имеет значение для развития термодинамики растворов биологически активных соединений.

Представленная диссертационная работа соответствует критериям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, в соответствии с пунктами 9-11, 13, 14 «Положения о присуждении ученых степеней» (утверждено Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 в действующей редакции). Автор диссертационной работы, Ахияров А. А., заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.4. Физическая химия.

Официальный оппонент:

Баранников Владимир Петрович

доктор химических наук, старший научный сотрудник;
заведующий лабораторией «Термодинамика растворов
неэлектролитов и биологических веществ»
научно-исследовательского отдела 1
Федерального государственного бюджетного
учреждения науки Институт химии растворов
им. Г.А. Крестова Российской академии наук (ИХР РАН);
Россия, г. Иваново, ул. Академическая, д.1;
E-mail: vpb@isc-ras.ru

Дата составления отзыва 24.11.2023.

