

На правах рукописи

**Щербаков Роман Сергеевич**

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТАУТОМЕРНОГО СОСТАВА АДЕНИНА  
В РАЗЛИЧНЫХ ФАЗОВЫХ СОСТОЯНИЯХ  
МЕТОДАМИ ИК И УФ СПЕКТРОСКОПИИ**

03.01.02 -Биофизика

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата физико-математических наук

Саратов-2013

Работа выполнена на кафедре физики и методико-информационных технологий  
Саратовского государственного университета им. Н.Г. Чернышевского

**Научный руководитель:**

профессор, д.ф.-м.н.,  
Бурова Татьяна Геннадиевна

**Официальные оппоненты:**

профессор, д.ф.-м.н. Кудряшова Надежда  
Степановна, ведущий научный  
сотрудник, Институт биофизики  
Сибирского отделения РАН;

профессор, д.ф.-м.н. Бабков Лев  
Михайлович, зав. кафедрой  
теоретической физики, Саратовский  
государственный университет

**Ведущая организация:**

Институт геохимии и аналитической  
химии им. В.И. Вернадского РАН

Защита диссертации состоится 23.09.2013 г. в 17:30 в ауд. 34 III корпуса СГУ на  
заседании диссертационного совета Д 212.243.05 в Саратовском государственном  
университете по адресу: 410012, г. Саратов, ул. Астраханская, 83

С диссертацией можно ознакомиться в Зональной Научной библиотеке СГУ имени  
В.А. Артисевич

Автореферат разослан \_\_\_\_\_ 2013 г.

Учёный секретарь  
диссертационного совета  
д.ф.-м.н., профессор



В.Л.Дербов

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** Одной из важнейших фундаментальных задач биофизики, медицины и молекулярной биологии является изучение структуры и свойств ДНК, в том числе - определение механизмов спонтанных мутаций. Согласно современным представлениям спонтанное возникновение мутаций является результатом таутомерии оснований нуклеиновых кислот (ОНК), что делает весьма актуальным исследование таутомерного состава и таутомерных превращений оснований нуклеиновых кислот в разных фазовых состояниях.

Применение методов оптической спектроскопии для определения таутомерного состава ОНК позволяет изучить структурно-динамические и таутомерные превращения молекул ОНК по их спектральным проявлениям, базируясь на использовании связи «структура-спектр», и предполагает описание биологических молекул как квантовых систем, сочетая теоретические квантово-механические методы исследования с экспериментальными методами. При этом наряду с традиционным использованием ИК спектров поглощения для исследования таутомерного состава в данной работе рассмотрены спектры комбинационного рассеяния (КР), резонансного комбинационного и гиперкомбинационного рассеяния (РКР и РГКР) и спектры двухфотонного поглощения (ДФП). Это позволило всесторонне исследовать взаимосвязь спектра и структуры, сопоставить выводы, полученные на основе анализа различных видов спектров, сделать их более обоснованными и достоверными.

Кроме того, следует учесть, что ранее почти не использовавшиеся для изучения таутомерии ОНК спектры РКР и РГКР обладают рядом преимуществ по сравнению с ИК спектрами поглощения, что делает их использование при анализе таутомерных свойств особенно целесообразным. Одним из достоинств является возможность исследования водных растворов, т.е. основания ДНК исследуются в естественной для них среде. Другим важным преимуществом является чувствительность спектров резонансного характера к крайне малым количествам вещества, что дает возможность определять таутомерный состав даже в тех случаях, когда равновесие незначительно смещено в сторону одного из таутомеров. Таким образом, привлечение теоретических и экспериментальных методов оптической спектроскопии для определения таутомерного состава и таутомерных превращений ОНК, как и само изучение таутомерии ОНК, является весьма актуальным.

**Основной целью** работы является определение таутомерного состава одного из простейших оснований нуклеиновых кислот – аденина- в газовой фазе и в водном растворе с помощью методов оптической спектроскопии.

Для этого необходимо решить следующие **задачи**:

1. Провести расчеты спектров ИК-поглощения, КР, РКР, резонансного гиперкомбинационного рассеяния и двухфотонного поглощения различных таутомерных форм аденина;
2. Получить экспериментальные спектры КР и РКР аденина в водном растворе и в газовой фазе при возбуждении лазерным излучением различных длин волн;
3. Определить таутомерный состав аденина в различных фазовых состояниях путем сравнения теоретических и экспериментальных данных по всем видам спектров.

**Научная новизна** работы состоит в следующем:

1. Впервые экспериментально получены спектры РКР аденина в газовой фазе при длинах волн возбуждающего излучения 266, 218 и 200 нм. В спектрах РКР аденина в водном растворе исследованный диапазон частот колебаний расширен до области  $600-1800\text{ см}^{-1}$  при длинах волн возбуждающего излучения 266, 218 и 200 нм;
2. Впервые проведены квантово-механические расчеты спектров РКР, РГКР и двухфотонного поглощения таутомерных форм Ade-N<sub>9</sub>H (am), Ade-N<sub>7</sub>H (am) и Ade-N<sub>9</sub>H (im) в газовой фазе и Ade-N<sub>9</sub>H(am), Ade-N<sub>7</sub>H(am), Ade-N<sub>1</sub>,N<sub>9</sub>H<sup>+</sup>, Ade-N<sub>7</sub>,N<sub>1</sub>H<sup>+</sup> в водном растворе, а также квантово-химические расчеты спектров ИК поглощения и спектров КР названных таутомеров;
3. Установлен таутомерный состав аденина в газовой фазе и в водном растворе на основе анализа экспериментальных данных и результатов расчетов спектров ИК поглощения, КР, РКР, РГКР иДФП различных таутомерных форм;
4. Разработан программный продукт SSUSpectra, позволяющий усовершенствовать процесс обработки, передачи и преобразования данных при расчетах оптических спектров; дополнить результаты, полученные с помощью комплексов Gaussian и Grams, возможностями изменения полуширины линии с сохранением интегральной интенсивности, моделирования спектров смесей и растворов, наглядного представления результатов.

**На защиту выносятся следующие положения и результаты:**

1. В изолирующей матрице и газовой фазе одновременно существуют три таутомера – Ade-N<sub>9</sub>H(am), Ade-N<sub>7</sub>H(am) и Ade-N<sub>9</sub>H(im) – с доминированием аминной формы Ade-N<sub>9</sub>H(am);
2. В водном растворе (pH=3) существуют три структуры – Ade-N<sub>9</sub>H(am), Ade-N<sub>7</sub>H(am) и Ade-N<sub>1,N<sub>9</sub></sub>H<sup>+</sup>, с доминированием последней; возможно наличие малого количества Ade-N<sub>7,N<sub>1</sub></sub>H<sup>+</sup>;
3. Результаты квантово-механических расчетов и полная интерпретация ИК спектров поглощения, спектров КР и РКР, резонансного гиперкомбинационного рассеяния и двухфотонного поглощения трех таутомеров аденина в газовой фазе и четырех таутомеров в водном растворе;
4. Результаты экспериментальных исследований спектров РКР аденина в газовой фазе и в водном растворе при длинах волн возбуждающего излучения 266, 218 и 200 нм, а также спектров КР водного раствора аденина при длине волны возбуждающего излучения 457 нм.

**Апробация работы.**

Результаты работы доложены на Международной конференции по спектроскопии комбинационного рассеяния ICORS-2010 (Бостон, США), Международной конференции «Актуальные вопросы биологической физики и химии. БФФХ-2013» (Севастополь, Украина) и Международной конференции «Информационно-вычислительные технологии в решении фундаментальных проблем и прикладных научных задач химии, биологии, фармацевтики и медицины» (<http://www.ivtn.ru/2009/biomedchem>).

**Публикации**

По теме диссертации опубликовано 10 работ, в том числе - 1 статья в зарубежном журнале, 4 статьи в рецензируемых журналах, входящих в перечень ВАК, 4 тезисов докладов на международных конференциях, свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ.

**Личный вклад автора**

Все представленные в работе расчеты выполнены лично автором, результаты и выводы обсуждены с научным руководителем и соавторами по публикациям, экспериментальные исследования проведены в составе научной группы при непосредственном участии автора.

**Достоверность** результатов исследования подтверждена совпадением выводов, полученных при анализе различных видов спектров и использовании различных методов расчета, а также соответствием результатов расчетов экспериментальным данным, в том числе - данным других авторов.

### **Практическая значимость работы.**

Результаты расчетов спектров КР, РКР, РГКР и ДФП различных таутомеров аденина служат основой для изучения димеров и молекулярных пар, составленных молекулами оснований нуклеиновых кислот, а также используются при проведении дальнейших теоретических исследований структуры и свойств ОНК.

Полученные выводы о таутомерном составе аденина в различных фазовых состояниях могут использоваться при решении задач биофизики, химии, биологии и медицины, в частности - при исследовании механизмов мутаций ОНК, изучении хода химических реакций, в также в фармацевтике при создании новых лекарств.

Разработанный программный продукт SSUSpectra является универсальным средством обработки, передачи и преобразования данных, что позволяет использовать его при анализе всех видов оптических спектров, а дополнительные возможности, предоставляемые SSUSpectra по сравнению с распространенными программными комплексами, обеспечивают его перспективность и востребованность.

Результаты работы использованы при проведении научных исследований и в учебном процессе на кафедре физики и методико-информационных технологий Саратовского государственного университета.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация содержит введение, четыре главы, выводы, список использованных источников и приложение, общий объем работы – 180 страниц печатного текста.

### **КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

**Во введении** обоснована актуальность темы диссертации, сформулированы цель, задачи, научная новизна работы, положения, выносимые на защиту.

**В первой главе** обсуждено явление таутомерии и его роль при исследовании ОНК; обоснована целесообразность использования методов оптической спектроскопии для изучения таутомерного состава, приведен краткий обзор современных методов расчета спектров биомолекул.

**Вторая глава** содержит результаты теоретических и экспериментальных исследований одного из оснований нуклеиновых кислот – аденина (Ade) – в газовой фазе.

Квантово-химическим методом DFT в приближении B3LYP/6-311++G(d,p) [1] рассчитаны колебательные ИК спектры поглощения таутомеров аденина в аминной форме (am), протонированных по положениям N<sub>9</sub> и N<sub>7</sub>, а также иминной формы (im) таутомера Ade-N<sub>9</sub>H. Молекулярные диаграммы указанных таутомеров с обозначением атомов приведены на рис.1.

Частоты и относительные интенсивности линий, соответствующие возбуждению

плоских одноквантовых колебаний в области до  $3000\text{ см}^{-1}$ , приведены в табл.1. Сравнение результатов расчётов ИК спектров Ade-N<sub>9</sub>H(am), Ade-N<sub>7</sub>H(am) и Ade-N<sub>9</sub>H(im) с данными экспериментальных исследований [2-3] показали несостоятельность предположения о присутствии в газовой фазе только одного таутомера Ade-N<sub>9</sub>H(am), т.к. в этом случае не удастся объяснить природу происхождения в экспериментальном спектре Ade двух сильных по интенсивности полос поглощения с частотами  $583$  и  $591\text{ см}^{-1}$ , а также провести интерпретацию целого ряда слабых по интенсивности полос поглощения практически во всей рассматриваемой спектральной области.

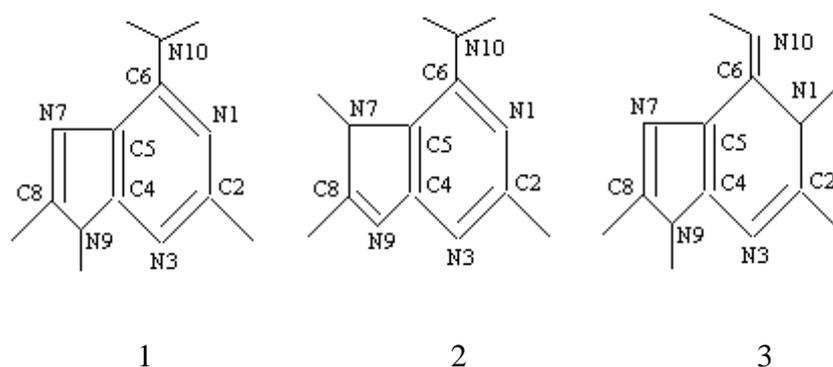


Рис. 1. Молекулярные диаграммы Ade-N<sub>9</sub>H(am) (1), Ade-N<sub>7</sub>H(am) (2) и Ade-N<sub>9</sub>H(im) (3) с обозначением атомов

Так, появление в экспериментальном ИК спектре Ade полос плоских колебаний с частотами  $1032, 1078, 1127, 1334, 1358, 1389, 1599, 1645$  и  $1017, 1133, 1229, 1618, 1693\text{ см}^{-1}$  можно объяснить лишь присутствием в изолированном состоянии таутомеров Ade-N<sub>7</sub>H(am) и Ade-N<sub>9</sub>H(im), причём вычисленные относительные интенсивности рассматриваемых полос поглощения соответствуют экспериментальным. Полосы высокой интенсивности с частотами  $583$  и  $591\text{ см}^{-1}$ , согласно выполненному расчёту, интерпретированы как отвечающие неплоским колебаниям выхода связей CC и CN из плоскости пуринового кольца для Ade-N<sub>9</sub>H и Ade-N<sub>7</sub>H. Колебания в области  $850\text{—}970\text{ см}^{-1}$  отвечают неплоским колебаниям связей C<sub>8</sub>H и C<sub>2</sub>H, причём предположение о присутствии в изолированном состоянии таутомеров Ade-N<sub>7</sub>H(am) и Ade-N<sub>9</sub>H(im) позволило провести интерпретацию всех низкочастотных полос поглощения экспериментального ИК спектра Ade. Т.о. проведенные расчеты позволяют утверждать о присутствии в газовой фазе трёх таутомерных структур Ade, а именно: Ade-N<sub>9</sub>H(am), Ade-N<sub>7</sub>H(am) и Ade-N<sub>9</sub>H(im).

Следующий этап, заключался в экспериментальном и квантово-механическом исследовании спектров РКР Ade в газовой фазе.

Экспериментальное исследование спектров РКР аденина проводилось на базе лаборатории спектроскопии и аналитической химии университета штата Нью-Йорк в Олбани. Аденин для экспериментов был получен от компании Sigma. Спектры РКР Ade в

Таблица 1. Экспериментальные и вычисленные значения частот ( $\nu_3$ ,  $\nu_p$ ,  $\text{см}^{-1}$ ) и интенсивностей ИК спектров ( $I_p$ ,  $\text{км/моль}$ ) Ade-N<sub>9</sub>H(am), Ade-N<sub>7</sub>H(am) и Ade-N<sub>9</sub>H(im)

Ade			Ade-N <sub>9</sub> H(am)		Ade-N <sub>7</sub> H(am)		Отнесение	Ade-N <sub>9</sub> H(im)		
$\nu_3$ [3]	$\nu_3$ [2]	$I_3$ [2]	$\nu_p$	$I_p$	$\nu_p$	$I_p$		$\nu_p$	$I_p$	Отнесение
270 m	276	12	277	11.1	287	0.4	$\beta(\text{C}_6\text{N}_{10})$	302	2.2	$\beta(\text{C}_6\text{N}_{10})$
515 w			520	4.5	524	2.0	} $\gamma$	511	3.3	} $\gamma$
			532	1.8	535	49.2		529	20.7	
600 vw	610	5	619	0.7	614	0.7	$\gamma$	606	5.5	$\gamma$
	717	5	725	2.4	725	2.7	Q	708	7.2	Q
	887	8	900	12.2	894	13.7	$\gamma$	907	4.6	$\gamma$
926 vw	927	13	944	14.5	947	2.3	$\gamma$	952	3.9	$\gamma$
	1005	9	1008	4.7			} $\text{Q}, \beta(\text{NH}_2)$			
1018 m	1017	4						1018	75.7	Q, $\beta(\text{C}_6\text{N}_{10}\text{H})$
1053 w	1032	27			1032	30.6				
1065 w	1061	13	1079	21.1			} $\text{Q}, \beta(\text{N}_9\text{H}), \beta(\text{C}_8\text{H})$			
	1078	1			1091	25.2		1080	19.9	Q, $\beta(\text{N}_9\text{H}), \beta(\text{C}_8\text{H})$
1126 w	1127	6			1124	9.3	} $\text{Q}, \beta(\text{N}_{9(7)}\text{H}), \beta(\text{C}_8\text{H})$			
	1133	7	1143	23.2				1140	7.4	Q, $\beta(\text{N}_1\text{H})$
1234 s	1229	13					} $\text{Q}, \beta(\text{C}_8\text{H}), \beta(\text{N}_{9(7)}\text{H})$	1190	128.9	Q, $\beta(\text{N}_1\text{H}), \beta(\text{C}_8\text{H})$
	1240	28	1242	14.9	1234	10.1				
	1246	9	1267	27.1			} $\text{Q}, \beta(\text{C}_2\text{H}), \beta(\text{C}_8\text{H})$	1262	13.3	Q, $\beta(\text{N}_{10}\text{H}), \beta(\text{C}_8\text{H})$
1280 s	1290	68	1327	75.4	1285	12.3		1301	7.5	Q, $\beta(\text{N}_9\text{H}), \beta(\text{C}_8\text{H}), \beta(\text{N}_{10}\text{H})$
1326 s	1328	40	1356	40.8	1307	0.3				
	1334	7			1353	23.1		1359	3.8	Q, $\beta(\text{C}_2\text{H}), \beta(\text{C}_8\text{H}), \beta(\text{N}_9\text{H})$
1346 m	1345	21	1364	25.6			} $\text{Q}, \beta(\text{C}_8\text{H})$			
	1358	2			1377	22.7				
	1389	45			1389	87.9	Q, $\beta(\text{C}_2\text{H})$	1396	28.5	Q, $\beta(\text{N}_{10}\text{H})$
1415 s	1419	49	1415	14.1	1418	173.9	} $\text{Q}, \beta(\text{N}_{9(7)}\text{H})$	1404	16.8	Q, $\beta(\text{N}_9\text{H}), \beta(\text{C}_2\text{H})$
	1421	Sh	1433	20.4				1444	20.6	Q, $\beta(\text{N}_1\text{H}), \beta(\text{C}_2\text{H})$
1468 s	1474	71	1501	85.3	1503	21.8	} $\text{Q}, \beta(\text{C}_2\text{H})$	1476	5.2	Q, $\beta(\text{N}_1\text{H})$
	1482	11	1513	8.2	1527	38.9		Q, $\beta(\text{C}_8\text{H})$	1519	14.3
	1599	49	1608	14.2	1588	134.5	} $\text{Q}, \beta(\text{NH}_2)$	1587	69.1	Q, $\beta(\text{N}_9\text{H})$
	1612	219	1634	118.6						Q, $\beta(\text{C}_2\text{H})$
	1618	Sh						1622	92.2	
1625 vs	1633	447			1641	37.2				
	1639		1657	654.3			} $\text{Q}, \beta(\text{NH}_2)$			
	1645	33			1663	398.0				
	1693	11						1719	598.3	Q, $\beta(\text{N}_1\text{H})$

газовой фазе сняты на длинах волн возбуждающего излучения 266, 218 и 200 нм при температуре 300°C. Излучение на длине волны 266 нм представляло собой четвертую гармонику наносекундного Nd:YAG лазера. Излучение на длинах волн 218 и 200 нм было получено за счет ВКР-преобразования четвертой гармоники Nd:YAG лазера во вторую и третью анти-Стоксовы компоненты в кювете со сжатым водородом. Для нагрева Аде и поддержания его температуры на постоянном уровне использовался специально изготовленный нагреватель. Аде помещался в кювету, сделанную из супразиловой ЯМР-трубки, которая затем откачивалась и запаивалась. Спектры РКР аденина в газовой фазе представлены на рис. 2.

Для теоретического описания распределения интенсивностей в спектрах РКР таутомеров Аде был использован метод прямого квантово-механического расчета спектров на основе адиабатической модели в приближении Герцберга-Теллера [4-5]. При расчёте распределения интенсивностей в спектрах РКР таутомерных форм Аде- $N_9H(am)$ , Аде- $N_7H(am)$  и Аде- $N_9H(im)$  рассматривались случаи резонанса частоты возбуждающего излучения с частотами трех длинноволновых синглет-синглетных переходов. Вычисления проводились с учетом вклада пяти ближайших к «резонансному» возбужденных электронных состояний (ВЭС) в величину компонент тензора рассеяния. Результаты расчета для наиболее интенсивных линий приведены в табл.2 вместе с данными эксперимента.

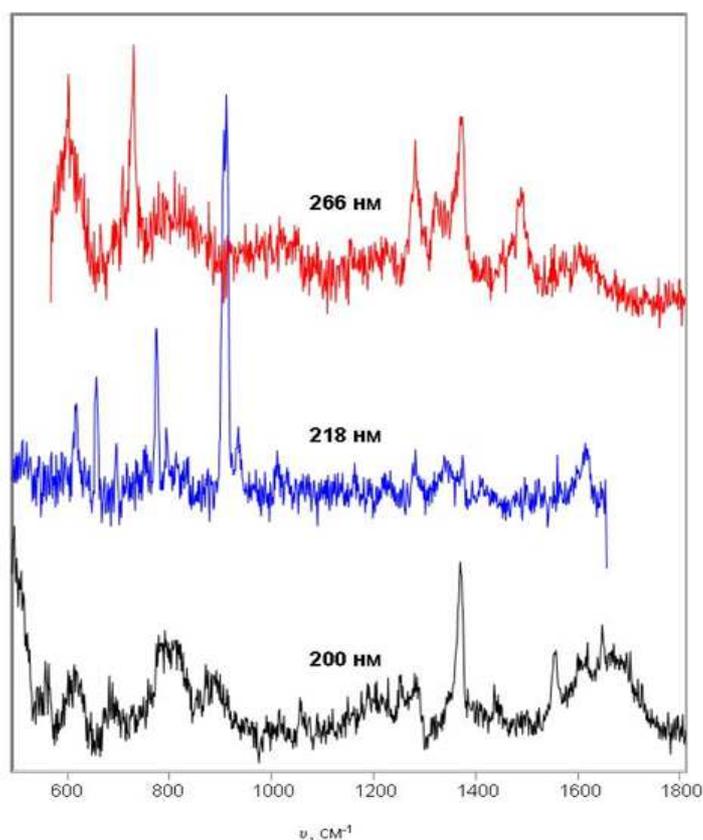


Рис.2. Спектры РКР паров аденина при температуре 300°C, записанные на длинах волн возбуждающего излучения 266, 218 и 200 нм.

Сравнение результатов расчета с экспериментальными данными позволило сделать выводы о таутомерном составе аденина в газовой фазе, полностью подтверждающие выводы, полученные в результате исследований ИК спектров поглощения, а именно: присутствие Аде- $N_7H(am)$  и Аде- $N_9H(im)$  таутомерных форм с доминированием Аде- $N_9H(am)$  таутомерной формы. Возможность присутствия Аде- $N_7H(am)$  в малой концентрации

обусловлена как общим характером распределения интенсивности, так и наличием характерных для Ade-N<sub>7</sub>H(am) линий с частотами 785 см<sup>-1</sup> и 1301 см<sup>-1</sup> в спектре, возбуждаемом излучением с длиной волны 266 нм. О присутствии в газовой фазе иминной формы Ade-N<sub>9</sub>H можно судить по преобладающей роли в спектре РКР, возбуждаемом излучением с длиной волны 218 нм, интенсивной линии с частотой 912 см<sup>-1</sup>, а также по наличию линий с частотами 694 и 618 см<sup>-1</sup>, относящихся к Ade-N<sub>9</sub>H(im).

Таблица 2. Рассчитанные и экспериментальные спектры РКР аденина в газовой фазе

Отнесение	Частота (см <sup>-1</sup> )			Относительная интенсивность		
	Расчет Ade-N <sub>9</sub> H(am)	Расчет Ade-N <sub>9</sub> H(im)	Эксперимент	Расчет Ade-N <sub>9</sub> H(am)	Расчет Ade-N <sub>9</sub> H(im)	Эксперимент
218 нм						
v <sub>8</sub>	1608	1587	1615	0.12	0.05	0.14
v <sub>9</sub>	1513	1519	1559	0.08	0.03	0.09
v <sub>13</sub>	1364	1396	1373	0.10	0	0.09
v <sub>15</sub>	1327	1301	1281	0.15	0	0.12
v <sub>20</sub>	1008	1018	1010	0.10	0.02	0.07
v <sub>21</sub>	944	952	934	0.12	0.19	0.10
v <sub>22</sub>	900	907	912	1.0	1.0	1.0
v <sub>23</sub>	725	-	774	0.76	-	0.45
v <sub>23</sub>	-	708	694	-	0.18	0.12
v <sub>24</sub>	619	-	656	0.41	-	0.35
v <sub>24</sub>	-	606	618	-	0.11	0.23
266 нм						
Отнесение	Расчет Ade-N <sub>9</sub> H(am)	Расчет Ade-N <sub>7</sub> H(am)	Эксперимент	Расчет Ade-N <sub>9</sub> H(am)	Расчет Ade-N <sub>7</sub> H(am)	Эксперимент
v <sub>15</sub> + v <sub>23</sub>	2052	2032	2036	0.17	0.09	0.2
v <sub>8</sub>	1608	1588	1610	0.11	0.05	0.1
v <sub>10</sub>	1501	1503	1490	0.39	0.12	0.5
2v <sub>23</sub>	1450	1450	1464	0.42	0.44	0.2
v <sub>13</sub>	1364	1377	1373	0.87	0.16	0.7
v <sub>14</sub>	1356	1353	1364	0.62	0.04	0.6
v <sub>23</sub> + v <sub>24</sub>	1344	1339		0.42	0.14	
v <sub>15</sub>	1327	-	1327	0.66		0.5
v <sub>15</sub>		1307	1301		0.11	0.1
v <sub>16</sub>	1267		1282	0.19		0.6
v <sub>17</sub>	1242	1234		0.23	0.65	
2v <sub>24</sub>	1238	1228	1204	0.41	0.17	0.3
v <sub>20</sub>	1008	1032	1019	0.12	0.07	0.3
v <sub>26</sub> + v <sub>27</sub>	797	811	785	0	0.12	0.3
v <sub>23</sub>	725	725	729	1.00	1.00	1.0
v <sub>24</sub>	619	614	601	0.64	0.27	0.8

**Третья глава** посвящена определению таутомерного состава аденина (Ade) в водном растворе (рН=3) путем экспериментального изучения КР и РКР спектров и теоретического исследования спектров таутомеров Ade-N<sub>9</sub>H, Ade-N<sub>7</sub>H и их катионов Ade-N<sub>9</sub>,N<sub>1</sub>H<sup>+</sup>, Ade-N<sub>7</sub>,N<sub>1</sub>H<sup>+</sup>.

Спектры нерезонансного КР на длине волны 457 нм записывались на микроскопе КР InVia от компании Renishaw. Для приготовления экспериментальных образцов порошок аденина растворялся в дистиллированной воде, затем рН раствора доводился до значения 3. Концентрация аденина составляла 15 мМ. Спектры РКР на длинах волн возбуждающего излучения 200, 218 и 266 нм (диапазон колебательных частот 600-1800 см<sup>-1</sup>) записывались на спектрографе КР, оптимизированном для работы в УФ и глубокой УФ области при концентрации аденина 5 мМ.

Расчёт структуры и колебательных спектров КР таутомеров Ade-N<sub>9</sub>H, Ade-N<sub>7</sub>H и их катионов Ade-N<sub>9</sub>,N<sub>1</sub>H<sup>+</sup>, Ade-N<sub>7</sub>,N<sub>1</sub>H<sup>+</sup>, молекулярные диаграммы которых представлены на рис. 3, проводился квантово-химическим методом DFT с помощью программ Gaussian-03 [1]. Гармонические колебания рассчитывались в приближении B3LYP/6-311++G(d,p), использующем диффузные функции. Для учёта влияния воды как растворителя на колебательные спектры рассматриваемых молекулярных структур использовалась модель

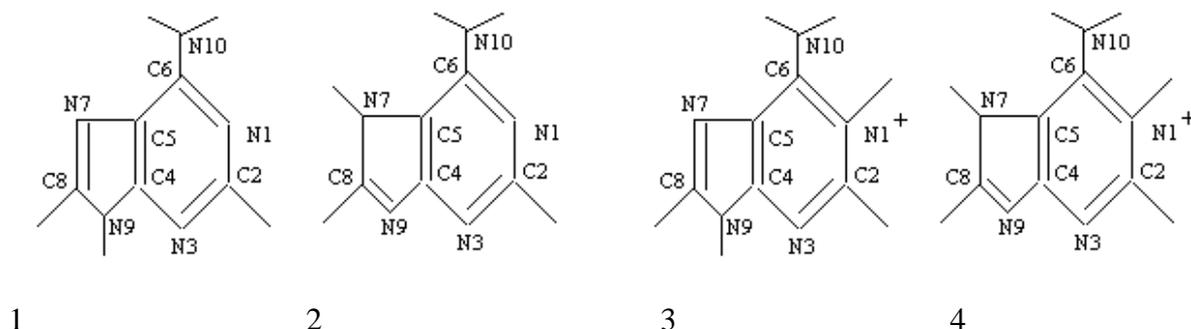


Рис. 3. Молекулярные диаграммы Ade-N<sub>9</sub>H (1), Ade-N<sub>7</sub>H (2) и катионов Ade-N<sub>9</sub>,N<sub>1</sub>H<sup>+</sup> (3), Ade-N<sub>7</sub>,N<sub>1</sub>H<sup>+</sup> (4) с обозначением атомов

реактивного поля (диэлектрическая проницаемость  $\epsilon=78.39$ , метод SCRF).

Как показывает расчёт и сравнение полных энергий рассматриваемых молекул, наиболее стабильными являются структуры Ade, протонированные по положению N<sub>9</sub>, независимо от фазового состояния и ионной формы. При этом разность энергий таутомеров N<sub>9</sub>H и N<sub>7</sub>H в водном растворе уменьшается в 3—5 раз по сравнению с изолированным состоянием, а величина дипольного момента для таутомеров Ade-N<sub>7</sub>H и катиона Ade-N<sub>7</sub>,N<sub>1</sub>H<sup>+</sup>, напротив, увеличивается по сравнению с Ade-N<sub>9</sub>H и Ade-N<sub>9</sub>,N<sub>1</sub>H<sup>+</sup> в 3 раза. Это свидетельствует о том, что в воде одновременно могут существовать таутомеры Ade-N<sub>9</sub>H и Ade-N<sub>7</sub>H. Анализ структурных изменений показал, что в водном растворе происходит сближение

геометрических параметров Ade-N<sub>9</sub>H и Ade-N<sub>7</sub>H и их катионов, при этом длины связей пуриновых колец Ade-N<sub>9</sub>H и Ade-N<sub>7</sub>H, а также связей СН и NH увеличиваются по сравнению с изолированным состоянием.

Результаты расчетов спектров КР вместе с данными эксперимента показаны на рис.4. Анализ частот и интенсивностей экспериментального спектра показывает, что в областях, где имеются наиболее интенсивные линии спектров КР для таутомеров Ade-N<sub>9</sub>H, Ade-N<sub>7</sub>H и их катионов Ade-N<sub>9</sub>,N<sub>1</sub>H<sup>+</sup>, Ade-N<sub>7</sub>,N<sub>1</sub>H<sup>+</sup>, а именно в области ~ 720, 1300, 1420 и 1500 и 1600 см<sup>-1</sup>, наблюдается расщепление линий. Например, колебание 17 имеет три близко расположенных линии с частотами 720, 721 и 722 см<sup>-1</sup>. Это указывает на присутствие в колебательном спектре нескольких (не менее 3-х) молекулярных структур, а сам спектр является суперпозицией нескольких спектров.

Как показали расчёты, присутствие небольшого (5—10 %) количества таутомера Ade-N<sub>7</sub>H и его катиона Ade-N<sub>7</sub>,N<sub>1</sub>H<sup>+</sup> позволяет выполнить отнесение целого ряда линий во всем спектральном диапазоне, однако однозначное определение их присутствия в водном растворе целесообразно провести с использованием спектров резонансного комбинационного рассеяния, принимая во внимание чувствительность спектров РКР к малейшим изменениям структуры молекулы.

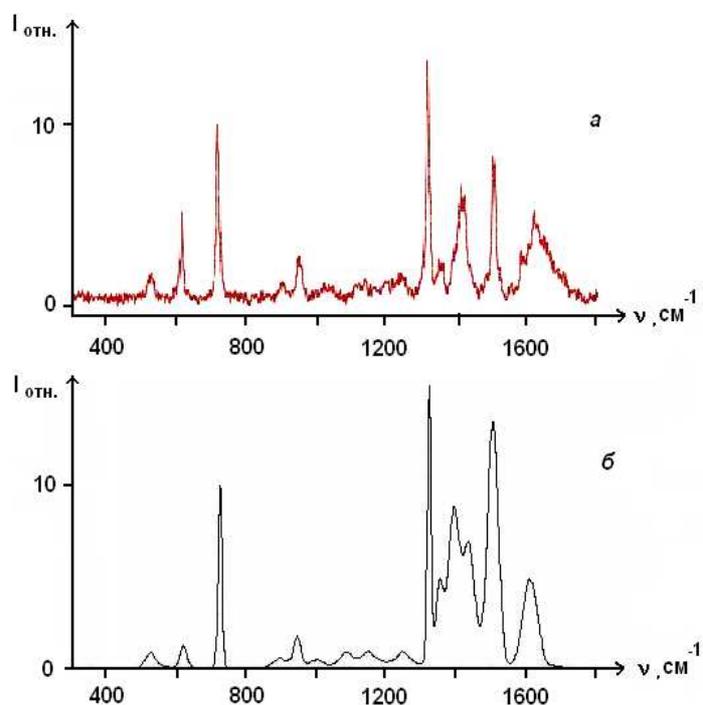


Рис. 4. а) Экспериментальный КР спектр аденина в воде (рН=3,  $\lambda_{\text{возб}}=457$  нм); б) Вычисленный спектр КР Ade-N<sub>9</sub>H (20%) и Ade-N<sub>9</sub>,N<sub>1</sub>H<sup>+</sup> (80%) в воде (расчёт SCRF)

Спектры РКР таутомеров аденина, протонированных по положениям N<sub>9</sub> и N<sub>7</sub>, и их катионов рассчитаны с помощью квантово-механического метода аналогично расчетам в газовой фазе при длинах волн возбуждающего излучения 266, 218 и 200 нм. Полученны

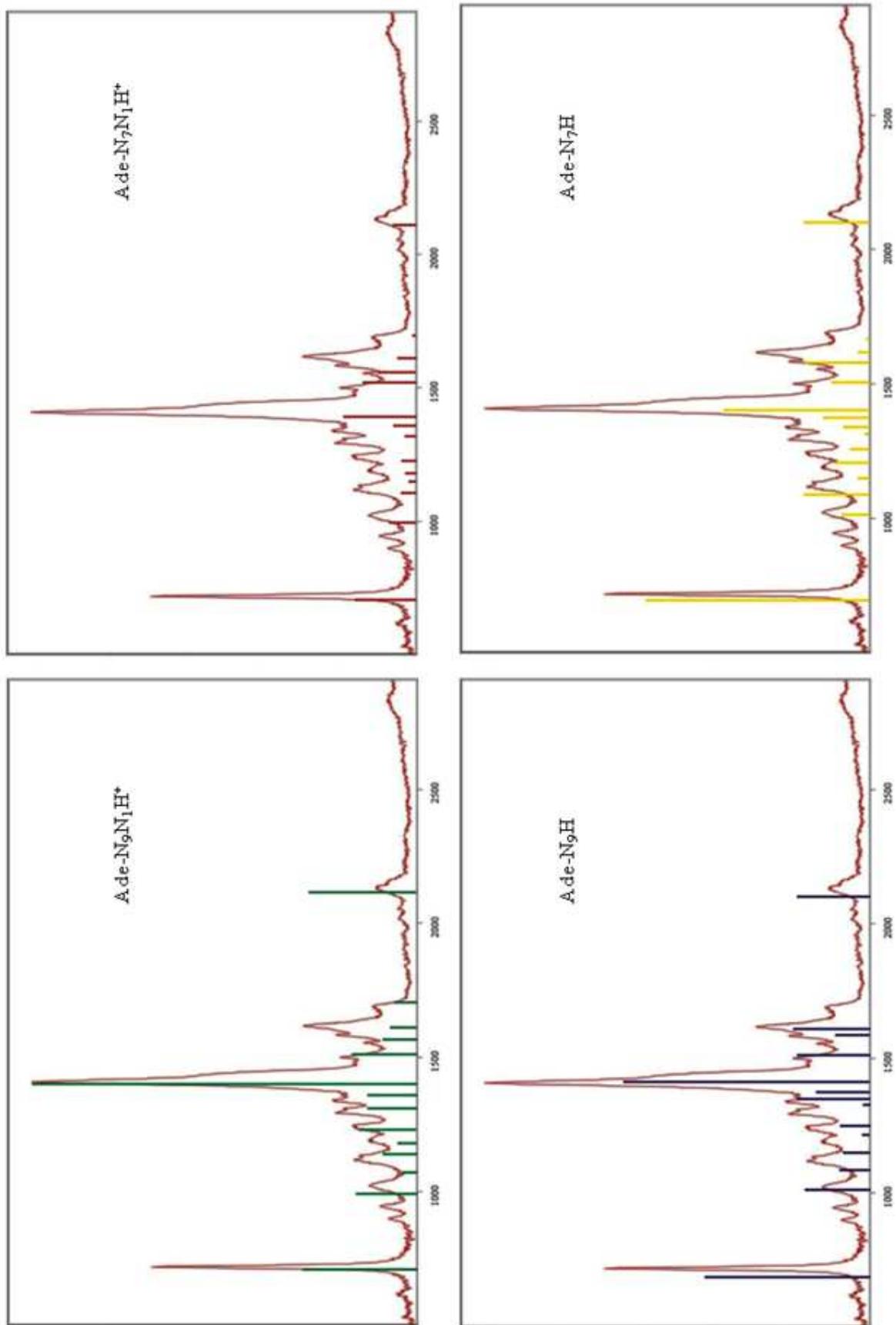


Рис. 5. Рассчитанные спектры таутомеров Ade и экспериментальный спектр РКР Ade в водном растворе при длине волны иницирующего излучения 266 нм

значения относительных интенсивностей линий удовлетворительно соответствуют экспериментальным данным (рис.5). Большинство линий высокой и средней интенсивности описывается возбуждением колебаний Ade-N<sub>9</sub>H и катиона Ade-N<sub>9</sub>,N<sub>1</sub>H<sup>+</sup>, при преобладании вклада катиона Ade-N<sub>9</sub>,N<sub>1</sub>H<sup>+</sup>. Присутствие в водном растворе Ade-N<sub>7</sub>H и катиона Ade-N<sub>7</sub>,N<sub>1</sub>H<sup>+</sup> проявляется в наличии характерных линий с частотами 1104 см<sup>-1</sup> (Ade-N<sub>7</sub>,N<sub>1</sub>H<sup>+</sup>), 1087 и 1134 см<sup>-1</sup> (Ade-N<sub>7</sub>H). При этом спектр катиона Ade-N<sub>7</sub>,N<sub>1</sub>H<sup>+</sup> оказывается значительно слабее остальных спектров, что свидетельствует о крайне малом содержании этого катиона в водном растворе в условиях эксперимента.

На основе проведенного анализа выявлен таутомерный состав аденина в водном растворе (pH=3). Обосновано одновременное существование трех структур – Ade-N<sub>9</sub>H, Ade-N<sub>7</sub>H и Ade-N<sub>1</sub>,N<sub>9</sub>H<sup>+</sup>, с доминированием последней; показана возможность наличия малого количества Ade-N<sub>7</sub>,N<sub>1</sub>H<sup>+</sup>. Выводы, основанные на результатах исследования спектров РКР, не противоречат результатам изучения спектров КР и дополняют последние обоснованием наличия Ade-N<sub>7</sub>H и возможности незначительного содержания катиона Ade-N<sub>7</sub>,N<sub>1</sub>H<sup>+</sup> в водном растворе.

**В четвертой главе** приведены результаты квантово-механических расчетов спектров РГКР всех ранее рассмотренных таутомерных форм аденина как в газовой фазе, так и в водном растворе при длинах волн возбуждающего излучения 266, 218 и 200 нм. Рассчитаны также относительные интенсивности линий спектров ДФП всех изучаемых таутомеров в области второго, третьего и четвертого  $\pi$ - $\pi^*$  переходов. Использование квантово-механического метода [4-5] позволило описать спектры РКР, РГКР и ДФП с единых позиций на основе общего набора параметров. Получены значения относительных интенсивностей линий, соответствующих возбуждению одноквантовых полносимметричных колебаний, их обертонов и комбинаций.

Наиболее интенсивные линии спектра РГКР аденина в водном растворе, возбуждаемого лазерным излучением с длиной волны 266 нм, приведены в табл.3. Сравнение результатов расчетов с имеющимися в литературе экспериментальными данными [6], а также сопоставление распределения интенсивностей в спектрах РКР и РГКР подтверждают выводы о таутомерном составе аденина в газовой фазе и водном растворе, полученные при анализе спектров ИК-поглощения, КР и РКР.

В данной главе описан также авторский программный продукт SSUSpectra©, созданный в качестве инструмента для быстрой и удобной обработки результатов расчетов, полученных в рамках исследования таутомерного состава оснований нуклеиновых кислот, а также для удобства работы со спектрами при написании научных публикаций.

Основные возможности SSUSpectra состоят в следующем: 1) изменение полуширины линии с сохранением интегральной интенсивности; 2) моделирование спектров смесей и растворов в любых концентрациях посредством совершения простейших математических операций со спектрами; 3) получение и обработка спектров ИК-поглощения и КР из файлов листингов других программных продуктов (например, Gaussian 98, Gaussian 03, Gaussian 09); 4) сохранение данных как в графическом и текстовом формате, так и в виде XML таблицы (файл MicrosoftExcel), 5) работа с полученными данными при помощи стороннего программного обеспечения, в частности - Matlab, MicrosoftOffice.

Таблица 3. Рассчитанные и экспериментальные спектры РГКР аденина в водном растворе при длине волны иницирующего излучения 266нм

Частоты, (см <sup>-1</sup> )				Относительные интенсивности				
Ade-N <sub>9</sub> ,N <sub>1</sub> H <sup>+</sup>	Ade-N <sub>7</sub> ,N <sub>1</sub> H <sup>+</sup>	Ade-N <sub>9</sub> H	Ade-N <sub>7</sub> H	Ade-N <sub>9</sub> ,N <sub>1</sub> H <sup>+</sup>	Ade-N <sub>7</sub> ,N <sub>1</sub> H <sup>+</sup>	Ade-N <sub>9</sub> H	Ade-N <sub>7</sub> H	Экспер. [6]
1608	1608	1613	1612	0.23	0.03	0.09	0.59	0.4
1565	1561	1587	1579	0.1	0.02	0.11	0.08	0.1
1513	1521	1505	1508	0.45	0.04	0.29	0.05	0.4
1463	1464	1478	1485	0.24	0.1	0.26	0.09	0.2
1422	1423	1409	1401	0.21	0.04	0.2	0.05	0.1
1422 (2x711)	1424 (2x712)	1378 (2x689)	1388 (2x694)	0.05	0.02	0.11	0.13	0.1
1358	1361	1352	1342	0.22	0.05	0.2	0.1	0.1
1311	1314	1324	1319	1	0.23	0.84	0.76	1
994	998	1003	1016	0.14	0.08	0.13	0.04	0.2
895	879	900	870	0.09	0.07	0.08	0.08	
711	712	689	694	0.3	0.11	0.26	0.31	0.3

Отметим, что SSUSpectra представляет собой уникальный в своём роде программный продукт со значительными возможностями для развития, модернизации и увеличения функционала и не является аналогом таких программных продуктов, как Avogadro или Gaussview, поскольку служит для работы со спектральными данными, а не с моделями молекул.

### **Основные результаты и выводы**

1. Установлен таутомерный состав аденина в газовой фазе и в водном растворе на основе анализа экспериментальных данных и результатов расчетов спектров ИК поглощения, КР, РКР, РГКР и ДФП различных таутомерных форм
  - а) В изолирующей матрице и газовой фазе одновременно существуют три таутомера – Ade-N<sub>9</sub>H(am), Ade-N<sub>7</sub>H(am) и Ade-N<sub>9</sub>H(im) – с доминированием аминной формы Ade-N<sub>9</sub>H(am);
  - б) В водном растворе (рН=3) существуют три структуры – Ade-N<sub>9</sub>H(am), Ade-N<sub>7</sub>H(am) и Ade-N<sub>1</sub>,N<sub>9</sub>H<sup>+</sup>, с доминированием последней; возможно наличие малого количества Ade-N<sub>7</sub>,N<sub>1</sub>H<sup>+</sup>;
2. Экспериментально получены спектры РКР аденина в газовой фазе и в водном растворе при длинах волн возбуждающего излучения 266, 218 и 200 нм для области 600-1800 см<sup>-1</sup>, а также спектр КР водного раствора аденина при длине волны возбуждающего излучения 457 нм.
3. Проведены квантово-химические расчеты спектров ИК поглощения и спектров КР различных таутомерных форм аденина; обосновано наличие Ade-N<sub>9</sub>H(am), Ade-N<sub>7</sub>H(am) и Ade-N<sub>9</sub>H(im) в газовой фазе и Ade-N<sub>9</sub>H(am), Ade-N<sub>7</sub>H(am), Ade-N<sub>1</sub>,N<sub>9</sub>H<sup>+</sup>, Ade-N<sub>7</sub>,N<sub>1</sub>H<sup>+</sup> в водном растворе; достигнуто удовлетворительное соответствие результатов расчетов с экспериментальными данными.
4. Присутствием таутомеров Ade-N<sub>7</sub>H(am) и Ade-N<sub>9</sub>H(im) объяснено наличие ряда слабых полос поглощения в экспериментальном спектре аденина в газовой фазе, что позволило выполнить полную интерпретацию спектра поглощения.
5. Рассчитаны относительные интенсивности линий спектров РКР, РГКР и двухфотонного поглощения названных выше таутомеров в газовой фазе и в водном растворе квантово-механическим методом в приближении Герцберга-Теллера. Получено удовлетворительное соответствие результатов расчета имеющимся экспериментальным данным, проведена интерпретация спектров, объяснены основные закономерности распределения интенсивностей.
6. Возможность присутствия Ade-N<sub>7</sub>H(am) в газовой фазе в малой концентрации обусловлена как общим характером распределения интенсивности, так и наличием характерных для Ade-N<sub>7</sub>H(am) линий с частотами 785 см<sup>-1</sup> и 1301 см<sup>-1</sup> в спектре, возбуждаемом излучением с длиной волны 266 нм. О присутствии в газовой фазе иминной формы Ade-N<sub>9</sub>H можно судить по превалирующей роли в спектре РКР, возбуждаемом излучением с длиной волны 218 нм, интенсивной линии с частотой

912  $\text{cm}^{-1}$ ., а также по наличию линий с частотами 694 и 618  $\text{cm}^{-1}$ , относящихся к Ade- $\text{N}_9\text{H}$  (im).

7. На основе сравнения результатов расчетов спектров РКР с экспериментальными данными обосновано одновременное существование в водном растворе аденина (pH=3) трех структур – Ade- $\text{N}_9\text{H}$ , Ade- $\text{N}_7\text{H}$  и Ade- $\text{N}_1, \text{N}_9\text{H}^+$ , с доминированием последней; показана возможность наличия малого количества Ade- $\text{N}_7, \text{N}_1\text{H}^+$ . Выводы, основанные на результатах исследования спектров РКР, не противоречат результатам изучения спектров КР и подтверждают последние.
8. Впервые проведены квантово-механические расчеты спектров резонансного гиперкомбинационного рассеяния и двухфотонного поглощения трех таутомерных форм аденина в газовой фазе и четырех форм – в водном растворе в приближении Герцберга-Теллера. Реализован единый подход к описанию спектров поглощения, резонансного комбинационного и гиперкомбинационного рассеяния.
9. На основе сравнения полученных результатов по спектрам РГКР и ДФП с экспериментальными данными подтверждено присутствие таутомеров- Ade- $\text{N}_9, \text{N}_1\text{H}^+$ , Ade- $\text{N}_9\text{H}$  (am) и Ade- $\text{N}_7\text{H}$ (am)- в водном растворе аденина.
10. Разработан программный продукт SSUSpectra, позволяющий усовершенствовать процесс обработки, передачи и преобразования данных при расчетах оптических спектров; дополнить результаты, полученные с помощью комплексов Gaussian Grams, возможностями учета полуширины линии с сохранением интегральной интенсивности, моделирования спектров смесей и растворов, наглядного представления результатов.

#### **Список цитированной литературы:**

1. Frisch M.J., Trucks G.W., Schlegel H.B. et al. Gaussian 03. Gaussian Inc., Pittsburgh PA. 2003.
2. Nowak M. J., Lapinski L., Kwiatkowski J. S., Leszczynski J. Molecular Structure and Infrared Spectra of Adenine. Experimental Matrix Isolation and Density Functional Theory Study of Adenine  $^{15}\text{N}$  Isotopomers / M. J. Nowak // J. Phys. Chem. – 1996.– V. 100.– P. 3527.
3. Sheina G.G., Stepanian S.G., Radchenko E.D. and Blagoi Yu. P. IR spectra of guanine and hypoxanthine isolated molecules / G.G. Sheina // J. Mol. Struct.– 1987. –V. 158.– P. 275- 292.
4. Приютов М.В., Бурова Т.Г. Эффект Герцберга-Теллера и распределение интенсивности в спектрах РКР многоатомных молекул / М.В. Приютов // Опт. и спектр. 1988. Т.64, В.1. С.182-185.

5. Бурова Т.Г. Влияние эффекта Герцберга-Теллера на распределение интенсивности в спектрах РКР и двухфотонного поглощения многоатомных молекул / Т.Г. Бурова // Хим. физика.– 1994. – Т.13,№3.– С.29-35.
6. Singh A. Resonant hyper Raman spectra of selected nucleic acid bases / A. Singh // PramanaJ.Phys. – 1994.– V.42. –P.39.

**Основные результаты диссертации изложены в следующих публикациях:**

1. Тен Г.Н., Щербаков Р.С., Бурова Т.Г., Леднев И.К., Баранов В.И. Прототропная тавтомерия N7H $\leftrightarrow$ N9H пурина и аденина. – Информационно-вычислительные технологии в решении фундаментальных проблем и прикладных научных задач химии, биологии, фармацевтики и медицины». [Электронный ресурс]/Г.Н.Тен// Сборник материалов ИВТН-2009. М., 200.– Режим доступа:<http://www.ivtn.ru/2009/biomedchem>.
2. Тен Г.Н., Бурова Т.Г., Щербаков Р.С. Определение таутомерного состава аденина в газовой фазе методами колебательной спектроскопии. Ч.1. Спектры поглощения и КР / Г.Н.Тен // Опт. и спектр. – 2010.–Т.109, №6.– С.910-917.
3. Бурова Т.Г., Тен Г.Н., Ермоленко В.В., Щербаков Р.С., Леднев И.К. Определение таутомерного состава аденина в газовой фазе методами колебательной спектроскопии. Ч.II. Анализ спектров РКР / Т.Г. Бурова // Опт.и спектр. –2010. –Т.109,№6.– С.918-925.
4. T.Burova, I.Lednev, G.Ten, V.Ermolenkov, R.Scherbakov Ultraviolet Resonance Raman spectroscopy as the instrument for determination of the tautomeric forms of adenine in the gas phase/ International conference on Raman spectroscopy ICORS-2010. Boston. USA. – P.137.
5. Burova T., Ermolenkov V., Ten G., Scherbakov R., Baranov V., Lednev I. Raman spectroscopic study of tautomeric composition of adenine in water / T.Burova// J.Phys. Chem.A. –2011.– V.115(38),– P.10600-10609.
6. Т.Г.Бурова, Г.Н.Тен, Р.С.Щербаков Квантово-механический расчет распределения интенсивностей в спектрах таутомеров аденина. Ч.1. Спектры резонансного гиперкомбинационного рассеяния / Т.Г.Бурова // Оптика и спектроскопия. – 2012. – Т.112,№6.– С.1-9.
7. Т.Г.Бурова, Г.Н.Тен, Р.С.Щербаков Квантово-механический расчет распределения интенсивностей в спектрах таутомеров аденина. Ч.2. Спектры двухфотонного поглощения /Т.Г.Бурова// Оптика и спектроскопия. –2012.–Т.113,№1.– С.12-15.
8. Бурова Т.Г., Тен Г.Н., Щербаков Р.С. Исследование таутомерии аденина методами оптической спектроскопии . 1. Спектры резонансного гиперкомбинационного рассеяния//Актуальные вопросы биологической физики и химии. БФФХ-2013.

Мат.международ.конф. Севастополь 2013.

9. Бутова Т.Г., Тен Г.Н., Щербаков Р.С. Исследование таутомерии аденина методами оптической спектроскопии . 2. Спектры двухфотонного поглощения. Актуальные вопросы биологической физики и химии. // БФФХ-2013. Мат.международ.конф.Севастополь.2013.
10. А.с 2012610974 Российская Федерация, МПК (нет), программы для ЭВМ / Щербаков Р.С. – 2011619071, заявлено 28.11.2011, опубл. 23.01.2012, 1 с.