Magdalena M. Szafran, Jacek Kozioł

FLUORESCENCJA KRYSTALICZNYCH PREPARATÓW ALLOKSAZYN

Widma emisji fluorescencji roztworów alloksazyny (All) i jej metylowych pochodnych niepodstawionych przy N-1 w obecności kwasu octowego, pirydyny i wody (tylko niektóre pochodne) charakteryzują się podwójną fluorescencją: pasmo krótkofalowe przy ok. 440 nm odpowiada formie alloksazynowej, a pasmo długofalowe przy ok. 530 nm formie fototautomerycznej, izoalloksazynowej [1-5]. Pojawienie się formy izoalloksazynowej świadczy o przeniesieniu protonu w stanie wzbudzonym z położenia N-1 do N-10. Fototautomerię obserwowano dotychczas tylko w roztworach w obecności czynnika katalizującego ten proces. Alloksazyny powinny również tworzyć dimery typu „head to tail", w których w wyniku autokatalizy mógłby zachodzić proces przeniesienia protonu w stanie wzbudzonym. Próby znalezienia takich kompleksów w nasyconych roztworach alloksazyn w różnych rozpuszczalnikach nie powiodły się i podjęto badania dla sprawdzenia, czy odpowiednie dimery mogą się tworzyć w kryształach alloksazyn.

1. Część doświadczalna

1.1. Materiały

Alloksazyna (All), 6-metylo- (6MAll), 7-metylo- (7MAll), 8-metylo- (8MAll), 9-metylo- (9MAll), 6,7-dimetylo- (6,7MAll), 6,8-dimetylo- (6,8MAll), 6,9-dimetylo- (6,9MAll), 7,8-dimetylo- (7,8MAll), 7,9-dimetylo- (7,9MAll) i 8,9-dimetyloalloksazyna (8,9MAll) zostały zsyntezowane w Zakładzie Analizy Instrumentalnej według metody Kühlinga [6] lub Goldnera i współprac. [7] z modyfikacjami [8].
Produkty syntezy poddane zostały metylowaniu w pierścieniu pirymidynowym [9], w wyniku którego otrzymano 1,3-dimetylo- (1,3MAll), 1,3,6-trimetylo- (1,3,6MAll), 1,3,7-trimetylo- (1,3,7MAll), 1,3,8-trimetylo- (1,3,8MAll), 1,3,9-trimetylo- (1,3,9MAll), 1,3,6,7-tetrametylo- (1,3,6,7MAll), 1,3,6,8-tetrametylo- (1,3,6,8MAll), 1,3,6,9-tetrametylo- (1,3,6,9MAll), 1,3,7,8-tetrametylo- (1,3,7,8MAll), 1,3,7,9-tetrametylo- (1,3,7,9MAll) i 1,3,8,9-tetrametyloalloksazynę (1,3,8,9MAll). Produkty syntez krystalizowano z metanolu, a następnie z 1,2-dichloroetanu, sprawdzając spektrofotometrycznie i chromatograficznie z wykorzystaniem techniki TLC. Zastosowano płytki DC, firmy Merck o grubości warstwy 0,2 mm. Fazami rozwijającymi były:

– benzen-metanol-kwas octowy-butanon-2 (14:2:1:1, obj./obj.),
– chloroform-butanon-2 (14:1, obj./obj.),
– chloroform-metanol-butanon-2 (14:1:1, obj./obj.).

Do pomiarów przygotowano naważki 1 mg (z dokładnością 0,002 mg) każdego z preparatów, które ucierano z jedną standaryzowaną kroplą nujolu (spektr. cz., International Enzymes Ltd.) w moździerzu agatowym, aż do uzyskania jednolitej masy. Zawiesinę umieszczono pomiędzy dwiema płytkami kwarcowymi.

1.2. Metody

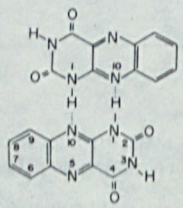
Widma absorpcyjne w nadfiolecie badanych preparatów alloksazyn rejestrowano przy użyciu spektrofotometru Cary 118C, firmy Varian. Jako odnośnik zastosowano dwie matowe płytki kwarcowe z umieszczoną między nimi kroplą nujolu.

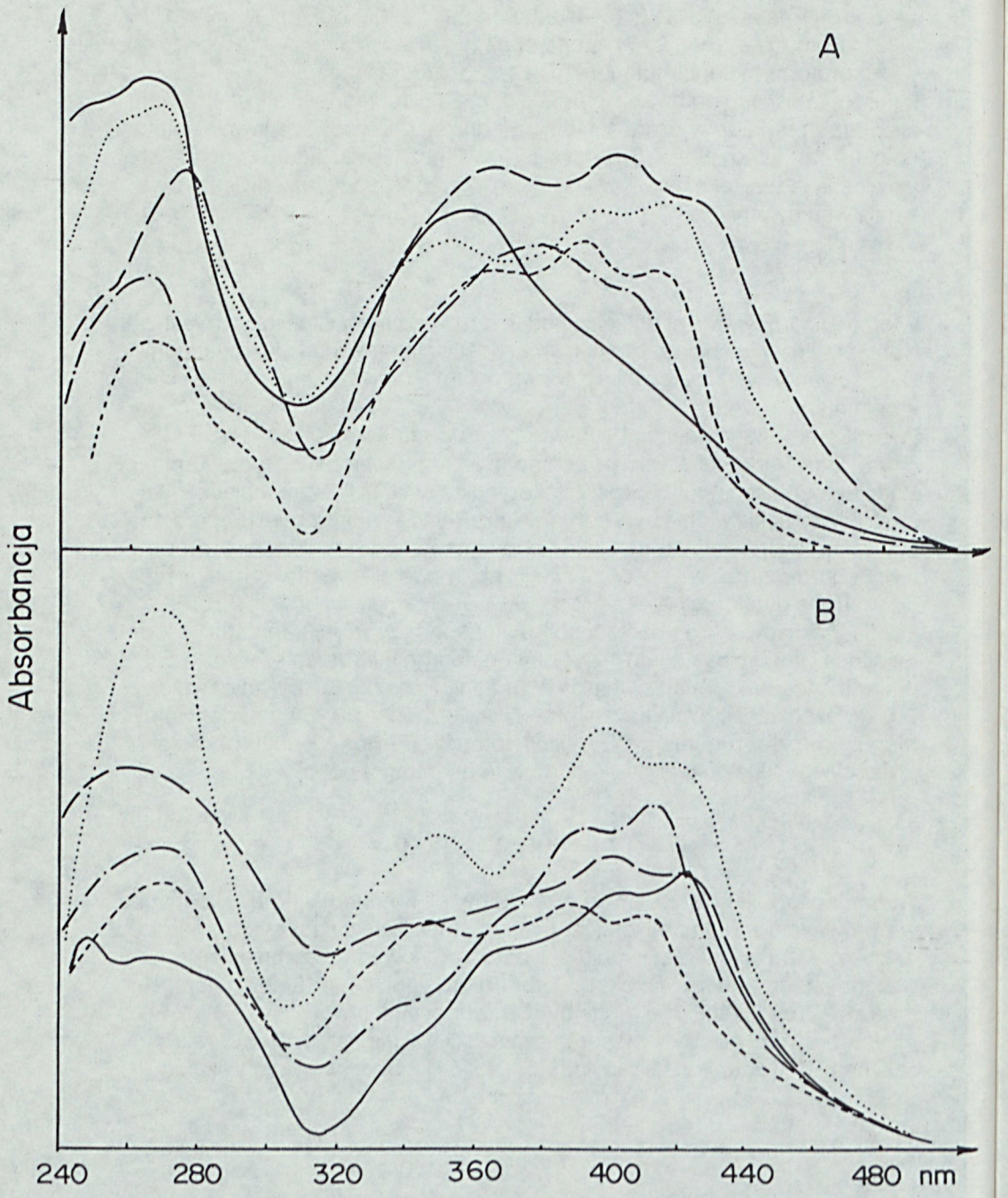
Widma emisji fluorescencji mierzono przy użyciu spektrofluorymetru MPF 44A/E, firmy Perkin-Elmer, wyposażonego w lampę ksenonową typu Cermax, siatki holograficzne, mikroprocesor korygujący (DCSU), wzmacniacz i rejestrator. Wszystkie widma były korygowane. Płytki z naniesionym preparatem ustawiano w specjalnym uchwycie pod kątem ok. 45° w stosunku do obu monochromatorów, w sposób minimalizujący odbicie światła wzbudzającego w stronę detektora.

Pomiary czasów życia fluorescencji wykonano przy użyciu aparatury Fluorescence Lifetime System M 199, firmy Edinburgh Instruments w North East Wales Institute w Connah's Quay w W.Brytanii. Przyrząd ten był wyposażony w laser azotowy pozwalający na pracę przy wzbudzeniu 380 nm, podwójny monochromator o geometrii L i licznik fotonów (Philips XP 2020 photomultiplier). Wszystkie pomiary wykonano w temperaturze pokojowej.

2. Omówienie wyników

Widma absorpcji krystalicznych preparatów All i monometylo-pochodnych w porównaniu z widmami zmierzonymi dla metanolowych i cykloheksanowych roztworów charakteryzują się batochromowym przesunięciem pierwszego pasma absorpcji o ok. 15-25 nm, a drugiego o ok. 15-40 nm (rys. 1a. tabela 1.). Te przesunięcia mogą być spowodowane utworzonymi wiązaniami wodorowymi pomiędzy dwoma cząsteczkami alloksazyn lub/oraz alloksazynami i wodą krystalizacyjną [5, 10, 11]. Obserwowane różnice w





Rys. 1. Widma absorpcji zawiesin krystalicznych preparatów monometylo-pochodnych alloksazyny (A) oraz ich 1,3-dimetylowanych analogów (B) w nujolu

Miejsce metylowania: (-------) bez grupy metylowej; (——) C-6 (· · · · · · · · ·) C-7; (– · – · – · –) C-8; (– – –) C-9.

strukturze wibronowej, a także pojawienie się „ogona" po długofalowej stronie pierwszego pasma absorpcji, wskazują na obecność wielu różnych konformacji. Obliczenie absorpcyjności molowych nie jest możliwe ze względu na niedokładności spowodowane nakładaniem na płytki kwarcowe filmu o niekontrolowanej grubości.

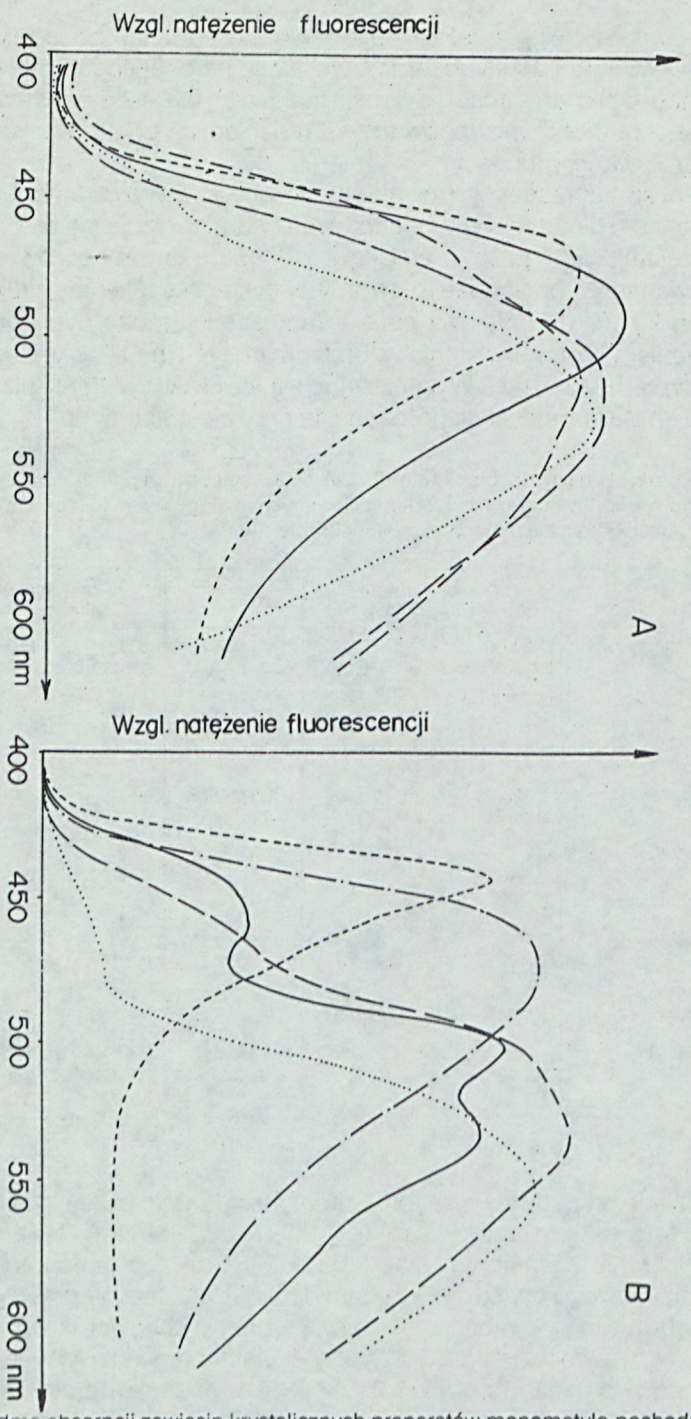
Widma emisji fluorescencji (również w świetle spolaryzowanym) krystalicznych mono- i dimetylowych pochodnych charakteryzują się batochromowym przesunięciem pasma emisji do ok. 535 nm w porównaniu do obserwowanego w przypadku roztworów w cykloheksanie przy 430 nm (rys. 2a. tabela 2.). Ta długofalowa emisja fluorescencji może być związana z przeniesieniem protonu w stanie wzbudzonym z N-1 na N-10 w powstałym dimerze typu „head to tail". Wyjątek stanowią AII, 6MAII i 7, 9MAII, dla których maksima emisji fluorescencji położone są przy ok. 480 nm.

Tabela 1. Położenie pasm absorpcji (w nm) zawiesin krystalicznych preparatów alloksazyny, monometylo-pochodnych oraz ich 1,3-dimetyllowanych analogów w nujolu oraz alloksazyny i 1,3-dimetyloalloksazyny w metanolu i cykloheksanie

Związek	Położenie pasm absorpcji w nm			Związek	Położenie pasm absorpcji w nm		
AII	390 R*~415	362	270 R~295	1,3MAII	382, R~410	343	275
				1,3 MAII w cykloheksanie	377 R~397 R~362	321	248
AII w metanolu	376 R~395	321	255	1,3 MAII w metanolu	379 R~397	321	R~257
6 MAII	R~420 R~390	355	270	1,3,6 MAII	421 R~400	R~365 R~340	270
7 MAII	417 R~390	350	270	1,3,7 MAII	397 R~420	350	275
8 MAII	378 R~405		265 R~295	1,3,8 MAII	412, R~390	R~335	280
9 MAII	401 R~426	363	280	1,3,9 MAII	400 R~422	R~360 R~355	265

R* – ramię

Potwierdzeniem występowania fototautomerii są długie czasy życia fluorescencji (τ 5-16 ns) zmierzone dla AII, 6MAII, 7MAII, 8MAII, 6,7MAII, 6,8MAII, 6,9MAII, 7,8MAII, 7,9MAII i 8,9MAII (tabela 2.). Brak fototautomerycznego, izoalloksazynowego czasu życia w przypadku 9MAII jest najprawdopodobniej spowodowane zawadą przestrzenną grupy metylowej w pozycji C-9. Podobny wpływ na widma emisji i czasy życia fluorescencji wywiera grupa metylowa w przypadku 7,9MAII i 8,9MAII (brak wyraźnej długofalowej emisji i niski udział czasu życia). Przyczyna wystąpienia długofalowej emisji w przypadku 6,9MAII nie jest znana, można przypuszczać, że jest to spowodowane innym ułożeniem cząsteczek w sieci krystalicznej. Dane krystalograficzne określone dla 9MAII wskazują, że cząsteczki tej pochodnej tworzą



Rys. 2. Widma absorpcji zawiesin krystalicznych preparatów monometylo-pochodnych alloksazyny (A) oraz ich 1,3-dimetylowanych analogów (B) w nujolu

Miejsce metylowania: (-------) bez grupy metylowej; (——) C-6 (· · · · · · · · ·) C-7; (– · – · – · –) C-8; (– – –) C-9. Długość fali wzbudzeniowej 350 nm.

wiązania wodorowe między sobą (N-1 do C-4) i z udziałem cząsteczek wody w pozycjach N-5, C-2 i N-3 [11]. Obecność niestechiometrycznych ilości wody w krystalicznych pochodnych alloksazyny i izoalloksazyny została również stwierdzona za pomocą analizy elementarnej [12] oraz w badaniach widm w podczerwieni [13]. Wydaje się, że wyznaczone czasy życia fluorescencji o średniej długości (2-3 ns) można przypisać układom z wiązaniami wodorowymi alloksazyna-woda [5, 10], podobnymi jak w przypadku 9MAll. Dla porównania zostały zmierzone widma absorpcji i emisji fluorescencji oraz czasy życia fluorescencji 1,3-dimetylowych pochodnych alloksazyn niezdolnych do fototautomerii. W widmach absorpcji pasma przyjmują kształt i położenie zbliżone do obserwowanych w widmach alloksazyn niepodstawionych grupami metylowymi w pozycji N-1 i N-3 (rys. 1b., tabela 1.). Różnice polegają na pojawieniu się wyraźniejszych struktur wibronowych. Na podstawie tych danych można sugerować, że w przypadku 1,3-dimetylowych pochodnych przeważa określone uporządkowanie cząsteczek w kryształach (np. typu „stack" [11]).

Tabela 2. Położenia pasm emisji fluorescencji w nm oraz czasy życia fluorescencji w ns i ich procentowe udziały zawiesin krystalicznych preparatów alloksazyn w nujolu

Związek	Maksima emisji fluorescencji w nm			Czas życia fluorescencji w ns (ich udział procentowy) zmierzone w paśmie emisji	
				450 nm	530 nm
All		475		1,7 (86), 3,5 (14)	2,0 (78), 6,8 (22)
6MAll		490		1,3	2,3 (64), 13,8 (36)
7 MAll		535		0,8 (89), 19,1(11)	3,3 (38), 12,4 (62)
8Mall		515		1,3	2,7 (53), 12,3 (47)
9 MAll		525		0,3 (86), 2,8 (14)	0,1 (52), 2,0 (48)
1,3 MAll	445			0,4	0,6 (56), 15,0 (44)
1,3,6 MAll	460	505		1,1	2,0 (67), 9,1 (33)
		R*~535			
1,3,7 MAll		535		1,5 (75), 16,7 (25)	8,4 (18), 22,9 (82)
	R~460				
1,3,8 MAll	460			0,5 (26), 1,5 (74)	1,6 (86), 10,7 (14)
1,3,9 MAll		535		0,5 (87), 2,3 (13)	1,3 (86), 14,3 (14)
	R~460				
6,7 MAll		540		1,1 (66), 4,5 (34)	1,3 (46), 5,0 (54)
6,8 MAll		545		0,3 (73), 1,8 (27)	0,6 (64), 5,3 (36)
6,7 MAll		535		1,2 (90), 7,2 (10)	1,8 (44), 7,7 (55)
7,8 MAll		550		1,3 (80), 3,5 (20)	2,2 (45), 9,0 (56)
	R~460				
7,9 MAll		480		0,2 (89), 1,3 (11)	0,5 (92), 7,7 (8)
8,9 MAll		500		0,3 (49), 1,5 (51)	1,2 (75), 16,0 (25)
1,3,6,7 MAll		512	545	0,5 (92), 2,2 (8)	3,6 (83), 7,5 (17)
	R~460				
1,3,6,8 MAll		508	540	0,1	1,5 (38), 5,0 (62)
	R~465				
1,3,6,9 MAll		520		1,1	1,9 (8), 23,1 (92)
	R~465		R~550		
1,3,7,8 MAll	445	500		0,3	2,2 (34), 7,6 (66)
			R~535		
1,3,7,9 MAll			575	0,9 (75), 4,5 (25)	3,4 (24), 13,2(76)
	R~460				
1,3,89 MAll			548	0,6 (90), 4,0 (10)	2,0 (12), 18,0 (88)
	R~460				

R* – ramię

W widmach emisji fluorescencji, obok spodziewanej fluorescencji alloksazynowej (maximum przy ok. 460 nm), występującej często w formie szczątkowej jako ramię, pojawiają się intensywne, długofalowe pasma (maximum przy ok. 535-575 nm) (rys. 2b., tabela 2.). Wyniki pomiarów czasów życia fluorescencji wskazują na istnienie długo żyjącej formy (τ 18-23 ns) w przypadku 1, 3, 7MAll, 1, 3, 6, 9MAll i 1, 3, 8, 9MAll (tabela 2.), której struktury nie można na podstawie tych wyników nawet w przybliżeniu określić. Dla pozostałych pochodnych, obok typowego alloksazynowego czasu (τ 0,5 ns), obserwowanego w roztworach wyznaczono średni czas (τ 1,5-3,5 ns), o znacznym udziale, za który mogą być oodpowiedzialne kompleksy z wiązaniami wodorowymi. Niektóre specyficzne powiązania wodorowe mogą powodować wydłużenie tego czasu do około 8-10 ns. Dane krystalograficzne wyznaczone tylko dla 1, 3, 8, 9MAll wskazują na tworzenie się warstwowych kompleksów [11], a więc na wyniki czasów życia może mieć wpływ orientacja samych cząsteczek w sieci krystalicznej.

3. Podziękowania

Autorzy dziękują Dr P.F.Heelis'owi za umożliwienie wykonania pomiarów czasów życia fluorescencji. Część wyników została przedstawiona na X International Symposium on Flavins and Flavoproteins w Como we Włoszech w lipcu 1990 r.

Literatura

1. J.Kozioł (1966) : *Studies on flavins in organic solvents. I. Spectral characteristics of riboflavin, riboflavin tetrabutyrate and lumichrome.* Photochem. Photobiol. **5**, 41.
2. P.S.Song, M.Sun, A.Koziołowa, J.Kozioł (1974) : *Phototautomerism of lumichromes and alloxazines.* J. Am. Chem. Soc. **96**, 4319.
3. A.Koziołowa (1977) : *Wpływ środowiska na fototautomerię alloksazyny i jej metylowych pochodnych.* Zesz. Nauk. AE w Poznaniu Seria II z.60, 1.
4. A.Koziołowa (1979) : *Solvent and methyl substituent effect on phototautomerism and ionization of alloxazines.* Photochem. Photobiol. **29**, 459.
5. M.M.Szafran, J.Kozioł, P.F.Heelis (1990) : *Hydrogen bonding and phototautomerism of 3-methyllumichrome.* Photochem. Photobiol. **52**, 353.
6. O.Kühling (1891) : *Über Azine der Harnsaüregruppe.* Chem. Ber. **24**, 2363.
7. H.Goldner, G.Dietz, E.Carstens (1966) : *Die Synthese von Alloxazinen und Alloxazin-5-N-Oxiden. Neue Reaktionen mit Nitrosaoracil — derivaten. IV.* Liebigs Ann. Chem. **694**, 142.
8. D.Panek-Janc, J.Kozioł (1979) : *Simple synthesis of 6-methyl, 3,9-dimethyl, 3-methyl — and 3, 7, 8-dimethylalloxazine.* Tetrahedron Lett. **42**, 4117.
9. K.H.Dudley, P.Hemmerich (1967) : *Stabile Dihydroflavine und Quarträre Flavinium Salze.* Helv. Chim. Acta **50**, 355.
10. M.M.Szafran (1990) : *Wiązanie wodorowe i fototautomeria alloksazyn.* Praca doktorska.
11. J.Csöregh, P.Kierkegaard, J.Kozioł, F.Müller (1987) : *The crystal and molecular structures of 9-methyl — and 1, 3, 8, 9-tetramethylalloxazine.* Acta Chem. Scand. B **41**, 383.
12. Molecular luminescence of some isoalloxazines in apolar solvents at various temperatures. Praca zbiorowa. Photochem. Photobiol. **30**, 463.
13. A.Koziołowa — dane niepublikowane.

Magdalena M. Szafran, Jacek Kozioł

FLUORESCENCJA KRYSTALICZNYCH PREPARATÓW ALLOKSAZYN

SUMMARY
Measurements were done of absorption and fluorescence emission spectra as well as of the fluorescence lifetimes of ctrystalline preparations of alloxazine and ist methyl derivatives. The formation of dimers capable of phototautomerizing and of systems of unknown structure was evidenced.

РЕЗЮМЕ
Измерены спектры поглощения и эмиссии флюоресценции, а также времена жизни флюоресценции кристаллических препаратов аллоксазина и его метиловых производных. На основе полученных результатов было установлено, что образовались димеры, обладающие способностью фототаутомерии и системы с нераспознанной структурой.