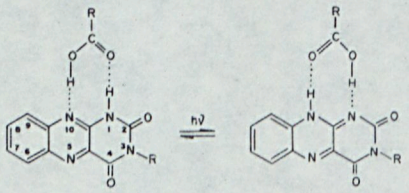
Małgorzata Stroińska, Anna Koziołowa

WPŁYW REAKCJI METANOLU Z KWASEM OCTOWYM NA FOTOTAUTOMERIĘ ALLOKSAZYN

Proces przeniesienia protonu we wzbudzonych cząsteczkach alloksazyn zależy od obecności w środowisku związków zawierających w swojej strukturze funkcje protono-donorowe i akceptorowe o odpowiedniej aktywności (kwasy karboksylowe, woda, pirydyna) [1, 2, 3, 4]. W rezultacie wzajemnych oddziaływań, już w stanie podstawowym, między tymi związkami i alloksazynami tworzy się kompleks z dwoma wiązaniami wodorowymi w położeniu N(1) i N(10) alloksazyny. W wyniku wzbudzenia, któremu towarzyszy obniżenie gęstości elektronowej na N(1) i podwyższenie gęstości na N(10), struktura alloksazynowa zostaje przekształcona w izoalloksazynową (wzór).



alloksazyna izoalloksazyna

W badaniach nad mechanizmem przeniesienia protonu w pierwszej fazie stosowano metanol jako środowisko, w którym alloksazyny dobrze się rozpuszczają [5, 6]. Niezrozumiałe rozbieżności pomiarów fluorescencji alloksazyn w metanolu z kwasem octowym zainicjowały badania nad określeniem oddziaływań zachodzących między cząsteczkami alkoholu i kwasu octowego oraz wpływem tych reakcji na proces fototautomerii alloksazyn.

1. Część doświadczalna

1.1. Materiały

Alloksazyny:
3, 7, 8-trimetyloalloksazyna, tzw. 3-metylolumichrom (3MLc); związek zsyntetyzowany w Zakładzie Analizy Instrumentalnej AE według Kühlinga przy wykorzystaniu zmodyfikowanej reakcji 3-metyloalloksanu z 4,5-dwumetylo-1,2-fenylenodwuaminą [7] i oczyszczany na drodze krystalizacji z metanolu;

czystość sprawdzono metodą spektrofotometrii UV-VIS oraz metodą chromatografii cieńkowarstwowej,
-7-cyjanoalloksazyna (7CNAll); zsyntetyzowana z 7-cyjano-10-hydroksy-izoalloksazyny [8] w Zakładzie Analizy Instrumentalnej; czystość sprawdzono chromatograficznie oraz spektrofotometrycznie.

Odczynniki:

- kwas octowy (AA), spektralnie czysty, f-my Merck, RFN;
- metanol (MeOH), cz.d.a. POCh Gliwice, Polska; oczyszczany na drodze destylacji.

Aparatura:

- spektrofotometr Specord 61 NIR, f-my Carl Zeiss Jena, NRD;
- spektrofluorymetr MPF-44A, f-my Perkin Elmer, USA;
- spektrofotometr Cary 118C, f-my Varian, USA.

1.2. Metody

W celu wyjaśnienia wzajemnych oddziaływań między cząsteczkami alkoholu i kwasu octowego wykonano pomiary widm mieszanin MeOH-AA w zakresie bliskiej podczerwieni 8000-3000 cm^{-1}, stosując jako odniśnik pustą kuwetę szklaną 0,95 mm. Każdorazowo przed pomiarem suszono przyrząd przy pomocy przystawki TLG (f-my Carl Zeiss Jena).
Aby określić wpływ oddziaływań między rozpuszczalnikami na proces fototautomerii, wykreślono widma emisyjne i wzbudzeniowe 3MLc i 7CNAll rozpuszczonych w mieszaninach MeOH-AA. Widma emisyjne rejestrowano przy długości fali wzbudzenia I EX = 385 nm, w zakresie 400-600 nm. Pomiaru widm wzbudzeniowych dokonano dla dwóch długości fal emisyjnych λ_{EM} 430 nm i λ_{EM} = 570 nm. Z uwagi na długi okres badania zmian zachodzących w widmach standaryzowano przyrząd przy pomocy kwarcowego wzorca fluorescencji niebieskiej. W badaniach stosowano kuwety kwarcowe 10 mm.
Wszystkie badania przeprowadzono w temperaturze pokojowej.
Rozdział związków metodą chromatografii cienkowarstwowej prowadzono na żelu krzemionkowym DC-60 (Merck) w następujących fazach rozpuszczalników:
I. benzen-metanol-kwas octowy-keton metylowoetylowy w stosunku 14:2:1:1,
II. chloroform-metanol-keton metylowoetylowy w stosunku 14:1:1.

2. Omówienie wyników

2.1. Analiza widm mieszanin MeOH-AA w zakresie bliskiej podczerwieni (NIR)

W zakresie bliskiej podczerwieni w widmach badanych układów rozpuszczalnikowych (mieszanin MeOH-AA o wzrastającym od 10 do 90% stężeniu kwasu octowego) były widoczne pasma drgań metanolu, jak i pasma drgań kwasu octowego (rys. 1.). Bezpośrednio po zmieszaniu, widma MeOH-AA posiadały kształt pośredni między kształtem widma czystego metanolu a

kształtem widma czystego kwasu octowego. W widmach tych występowały pasma odpowiadające nadtonom drgań podstawowych:

7000-5700 cm^{-1} – pierwszy nadton drgań walencyjnych zasocjowanych grup OH kwasu i OH metanolu,

5720 cm^{-1} – pierwszy nadton drgań walencyjnych symetrycznych CH_3 metanolu i kwasu,

4260 cm^{-1} – drugi nadton drgań deformacyjnych płaszczyznowych OH kwasu nakładający się z drugim nadtonem drgań deformacyjnych OH metanolu i drgań wachlarzowych C-H metanolu,

4160 cm^{-1} – trzeci nadton drgań walencyjnych rozciągających C-O metanolu nakładający się z trzecim nadtonem drgań deformacyjnych pozapłaszczyznowych OH kwasu octowego [9, 10, 11, 12, 13].

Pasma poniżej 4000 cm^{-1} były słabo widoczne ze względu na niską transmitancję tego rejonu wynikającą ze znacznej grubości badanej warstwy.

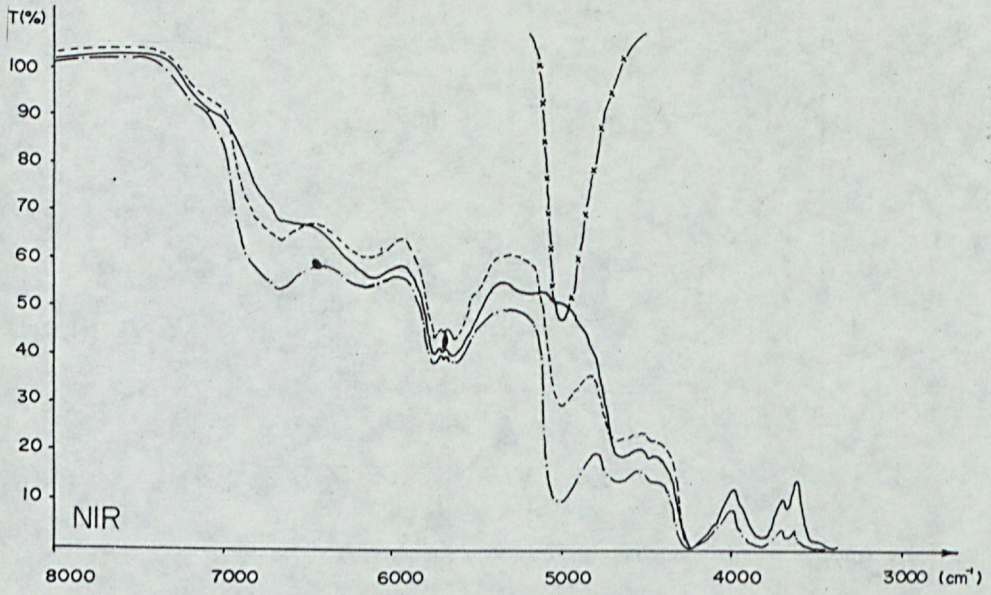
Pomiary widm przeprowadzone po 40 dniach od sporządzenia mieszanin rozpuszczalników wykazały niewielkie zmiany intensywności w/w pasm. Jednakże w drugim dniu badań pojawiło się w widmach mieszanin MeOH-AA dodatkowe pasmo w rejonie 5180 cm^{-1}, które powiększało się w kolejnych dniach badań (rys. 1.). Sugerowało to, że w układzie rozpuszczalników zachodzi reakcja między metanolem i kwasem octowym. W celu identyfikacji tego pasma zarejestrowano widmo octanu metylu oraz wody. W rejonie 5180 cm^{-1} w widmie octanu metylu nie występowało podobne pasmo. Pojawiło się ono natomiast w widmie wody o kształcie i maksimum absorpcji, identycznym jak w widmach mieszanin MeOH-AA (rys. 1.). Potwierdzenia, iż jest to pasmo odpowiadające drganiu kombinacyjnemu wody [14], dostarczyły pomiary widm mieszaniny kwas octowy-metanol-woda. Bezpośrednio po zmieszaniu, w widmie tej mieszaniny pojawiło się pasmo 5180 cm^{-1}, a jego intensywność była zależna od ilości dodawanej wody (rys. 1.).

Z badań przeprowadzonych w zakresie bliskiej podczerwieni wynika, że w mieszaninach metanol-kwas octowy w miarę upływu czasu zachodzi samorzutna reakcja estryfikacji, w wyniku której wydziela się woda.

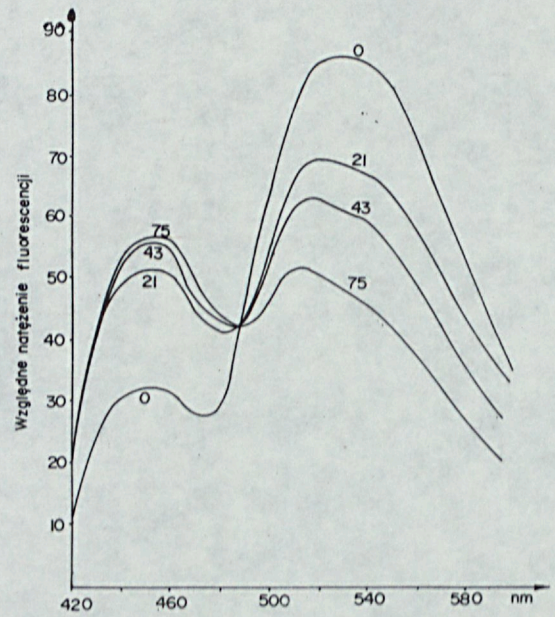
2.2. Analiza widm emisyjnych 3MLc i 7CNAll w mieszaninach MeOH-AA

W widmach emisyjnych 3MLc i 7CNAll w mieszaninach MeOH-AA były widoczne dwa pasma, będące odbiciem dwóch pozostających ze sobą w stanie równowagi form: alloksazynowej, charakterystycznej dla alloksazyny w alkoholu λ_{max} 440 nm) i izoalloksazynowej, charakterystycznej dla alloksazyny w kwasie octowym λ_{max} 530 nm).

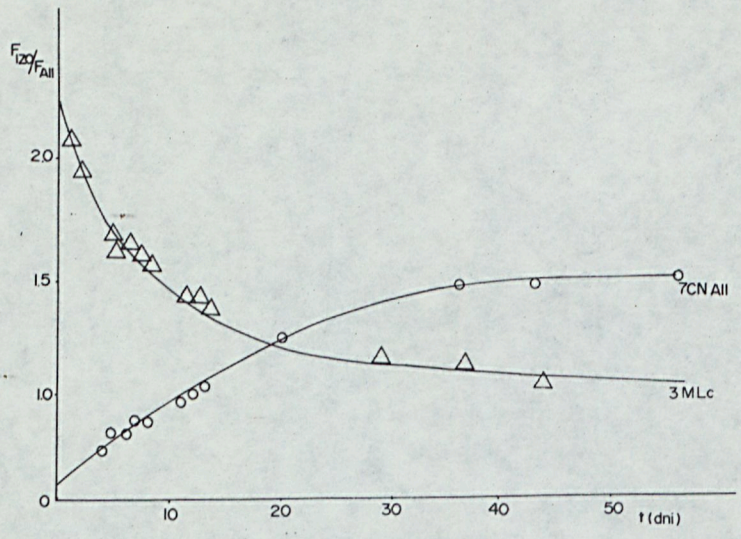
W widmach 3MLc w ciągu 75 dni od rozpuszczenia w mieszaninie MeOH-AA następował spadek intensywności emisji formy izoalloksazynowej i jednoczesny wzrost emisji formy alloksazynowej (rys. 2.). Obniżaniu się intensywności fluorescencji izoalloksazynowej towarzyszyło przesuwanie maksimum emisji ku krótszym falom do około 510 nm. Wydajność procesu fototautomerii mierzona stosunkiem fluorescencji formy izoalloksazynowej (F_{izo}) do fluorescencji formy alloksazynowej (F_{all}) obniżała się w miarę upływu dni (rys. 3.). Zmiany te związane są z reakcją zachodzącą między metanolem i



Rys.1. Widma w zakresie bliskiej podczerwieni:
_____ 40% AA – 60% MeOH, bezpośrednio po zmieszaniu;
- - - - - - - - 40% AA – 60% MeOH, po 8 dniach;
·–·–· 40% AA – 50% MeOH – 10% H2O, bezpośrednio po zmieszaniu;
x-x-x H_2O, pasmo odpowiadające drganiu kombinacyjnemu wody.

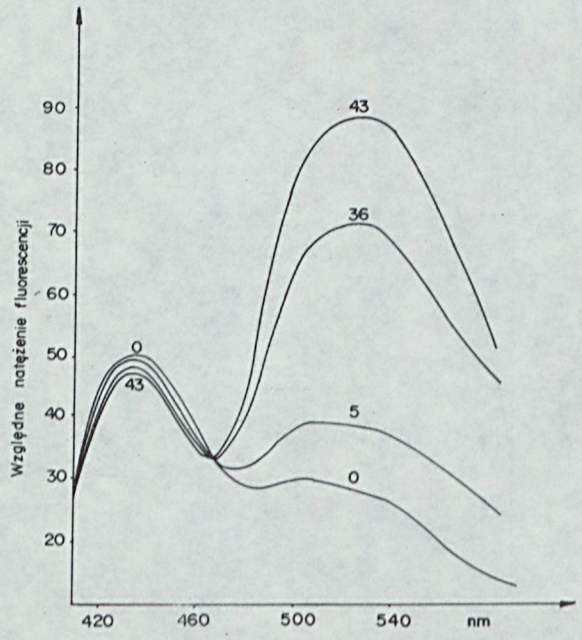


Rys.2. Zmiany w widmach emisyjnych 3MLc w MeOH – 20% AA zachodzące w czasie. Liczby nad krzywymi określają kolejne dni



Rys.3. Zmiany stosunku F_{izo}/F_{all} dla 3MLc i 7CNAll zachodzące w czasie

kwasem octowym. Zmniejszenie się ilości AA w układzie (w wyniku reakcji estryfikacji) powoduje spadek wydajności tautomerii, albowiem powstająca woda słabiej promuje proces fototautomerii metylowej pochodnej alloksazyny niż kwas octowy. W miarę ubywania AA forma izoalloksazynowa z maksimum emisji przy 530 nm zanika, a pojawia się drugi fototautomer

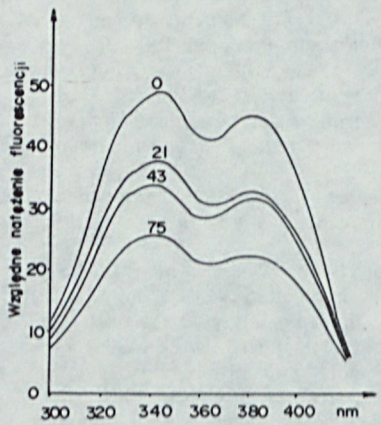


Rys.4. Zmiany w widmach emisyjnych 7CNAll w MeOH – 20% AA zachodzące w czasie. Liczby nad krzywymi określają kolejne dni.

charakteryzujący się fluorescencją w rejonie 510 nm. Obserwowane zmiany odpowiadają zmianom stwierdzonym również w innych badaniach [3], które dowodzą istnienia dwu form tautomerycznych różniących się odmienną solwatacją i różnym usytuowaniem wiązań wodorowych między alloksazynami a kwasem octowym.
W widmach 7CNAll rozpuszczonej w mieszaninach MeOH-AA obserwowano zmiany odwrotne w porównaniu ze zmianami 3MLc. Pod wpływem zachodzącej reakcji estryfikacji podwyższała się emisja formy izolloksazynowej, a spadała fluorescencja alloksazynowa (rys. 4.). Wzrost zawartości wody w układzie powodował zwiększenie efektywności procesu fototautomerii (rys. 3.), ponieważ woda silniej wspomaga przeniesienie protonu w cząsteczkach 7CNAll niż kwas octowy. Efekt ten niewątpliwie wiąże się z wyraźnie niższym pK_a pochodnych cyjanowych niż pochodnych metylowych zarówno w stanie podstawowym, jak i wzbudzonym. Wartości pK_a wyznaczone dla stanu podstawowego, dla 7CNAll i 3MLc wynoszą odpowiednio 7.23 [15] i 8.58 [2].

2.3. Analiza widm wzbudzeniowych 3MLc i 7CNAll w mieszaninach MeOH-AA

Widma wzbudzeniowe 3MLc w MeOH-AA, tak jak widma absorpcyjne, posiadają dwa maksima: I maksimum w rejonie 380 nm i II maksimum w rejonie 340 nm. W ciągu 75 dni badań zwiększała się intensywność widma wzbudzeniowego rejestrowanego przy λ_{EM} = 430 nm, a zmniejszała intensywność widma rejestrowanego przy λ_{EM} = 570 nm (rys. 5.) w wyniku przesuwania się równowagi all ⇌ izoall w stronę formy alloksazynowej. Obniżaniu się intensywności widma wzbudzeniowego dla λ_{EM}=570 nm towarzyszyło krótkofalowe przesunięcie II-ego maksimum (od 344 do 341 nm) wskazujące na zminę równowagi w układzie dwu form tautomerycznych (fluoryzującej przy 510 nm i 530 nm – patrz widmo emisji rys. 2.). Zmiany te potwierdzają zmniejszenie się stężenia kwasu octowego w układzie.



Rys.5. Zmiany w widmach wzbudzeniowych 3MLc w MeOH – 20% AA rejestrowanych przy 570 nm zachodzące w czasie. Liczby nad krzywymi określają kolejne dni.

W widmach wzbudzeniowych 7CNAll w MeOH-AA, tak jak w widmach UV-VIS, występuje jedno maksimum w rejonie 375 nm. Intensywność widma wzbudzeniowego rejestrowanego przy λ_{EM} = 430 nm malała w ciągu 50 dni badań, natomiast zwiększała się intensywność widma monitorowanego przy λ_{EM} = 570 nm. Zmiany te są zgodne ze zmianami zachodzącymi w widmach emisyjnych. Wzrost wydajności procesu fototautomerii powoduje zwiększenie intensywności widm wzbudzeniowych dla λ_{EM} = 570 nm, co wiąże się z przesunięciem równowagi all izoall w stronę formy izoalloksazynowej.

3. Wnioski

Pomiary widm samych mieszanin metanol-kwas octowy oraz po rozpuszczeniu w nich 3MLc i 7CNAll pozwoliły na obserwację płynnych zmian zachodzących w ciągu około dwóch miesięcy w widmach alloksazyn spowodowanych stopniowym zmniejszaniem się stężenia kwasu octowego. Zmiany te bada się na ogół metodą skokowego zwiększania lub zmniejszania stężenia kwasu w układzie. W przypadku alloksazyn rozpuszczonych w mieszaninach metanol-kwas octowy przesunięcia oraz zmiany intensywności pasm w widmach emisyjnych i wzbudzeniowych są tak wolne, że można obserwować je w sposób ciągły. Mieszaniny alkohol-kwas octowy nie powinny być jednak stosowane w badaniach nad przeniesieniem protonu w cząsteczkach alloksazyn. Reakcja estryfikacji zachodząca w tym układzie powoduje zmniejszenie ilości cząsteczek kwasu octowego i pojawienie się wody (już w drugim dniu od sporządzenia mieszanin), co różnie wpływa na proces fototautomerii (a tym samym na widma) metylowych i cyjanowych pochodnych alloksazyn.

Literatura

1. P.S.Song, M.Sun, A.Koziołowa, J.Kozioł (1974) : *Phototautomerism of lumichromes and alloxazines.* Am. Chem. Soc. **96**, 4319.
2. A.Koziołowa (1979) : *Solvent and methyl substituent effect on phototautomerism and ionization of alloxazines.* Photochem. Photobiol. **29**, 459.
3. M.M.Szfran, J.Kozioł, P.F.Heelis (1990) : *Hydrogen bonding and phototautomerism of 3-methyllumichrome.* Photochem. Photobiol. **52**, 2, 353.
4. M.M.Szafran (1990) : *Wiązanie wodorowe i fototautomeria alloksazyn.* Praca doktorska.
5. M.Kasha (1987) : *Proton transfer spectroscopy and proton transfer lasers.* Acta Phys. Pol. **A/1**, 717.
6. A.Koziołowa, A.I.W.G.Visser, J.Kozioł (1988) : *Phototautomerism of lumichrome in methanol-acetic acid mixtures. A steady-state and time-resolved fluorescence study.* Photochem. Photobiol. **48**, 1,7.
7. D.Panek-Janc, J.Kozioł (1979) : *Simple synthesis of 6 methyl-, 3,9-dimethyl-, and 3,7, 8-trimethylalloxazine.* Tetrahedron Letters, 4117.
8. D.Panek-Janc (1990) : *Photochemical N-10-dealkylation of 7-cyano-10-hydroxyethylisoalloxazine.* J. Photochem. Photobiol., A.Chemistry **51**, 355.
9. S.Spychała (1977) : *Alkohole i fenole.* [w:] *Zastosowanie spektrofotometrii i widm Ramana do celów analitycznych.* Red. T.Biernacka. PAN, s. 102.
10. T.Biernacka (1977) : *Związki karbonylowe.* [w:] *Zastosowanie spektrofotometrii i widm Ramana do celów analitycznych.* Red. T.Biernacka. PAN, s. 107.

11. W.Kaye (1954) : *Near-infrared spectroscopy.* Spectrochimica Acta **6**, 257.
12. R.M.Silverstein, G.C.Bassler (1970) : *Spektroskopowe metody identyfikacji związków organicznych.* PWN, Warszawa, s. 92, 93.
13. *Określenie struktury związków organicznych metodami spektroskopowymi.* Praca zbiorowa. Red. M.Szafran, Z.Dega-Szafran. PWN, Warszawa, s. 160. 170, 174.
14. K.B.Whetsel (1968) : *Near-spektroscopy.* Applied Apektroscopy Review **2**, 1,1.
15. A.Koziołowa, M.Stroińska, M.M.Szafran (1990) : *Phototautomerism of alloxazines in the presence of acetic acid in different media.* [w:] *Flavins and Flavoproteins.* Wyd. B.Curti, S.Ronchi, G.Zanetti. W. de Gruyter and Co., Berlin — New York (w druku).

Małgorzata Stroińska, Anna Koziołowa

WPŁYW REAKCJI METANOLU Z KWASEM OCTOWYM NA FOTOTAUTOMERIĘ ALLOKSAZYN

SUMMARY
The analysis of near infrared spectra and emission and excitation fluorescence spectra made it possible to elucidate the interaction occurring between methanol and acetic acid. Besides the effect was established of the latter compounds on the phototautomerism of methyl — and cyano-derivatives of alloxazines.
In methanol-acetic acid mixtures a spontaneous esterification was found to occur with the concomitant formation of water. The latter reaction causes a decrease of the yield of the phototautomeric process of 3-methyllumichrome and brings about its increase in the case of 7-cyanoalloxazine. The above is due to the fact that acetic acid is more effective than water in promoting the process of phototautomerism of methyl derivatives of alloxazines, while water is more effective in promoting the proton transfer in the molecules of cyano-derivatives of alloxazines.

РЕЗЮМЕ
Путем анализа близкой инфракрасной области спектра, а также эмиссионных и возбудительных спектров было объяснено взаимодействие метанола и уксусной кислоты. Определено его влияние на фототаутомерию метил- и циановых производных аллоксазина.
Было установлено, что в смесях метанол — уксусная кислота по мере истечения времени происходит самопроизвольная реакция эстерификации, в результате которой выделяется вода. Реакция ведет к снижению эффективности процесса фототаутомерии 3-метиллюмихрома, и повышению эффективности этого процесса в случае 7-цианаллоксазина. Этот эффект связан с фактом, что уксусная кислота, сильнее чем вода, активизирует процесс фототаутомерии метиловых производных аллоксазина, вода же — сильнее чем уксусная кислота — содействует переносу протона в частицах циановых производных аллоксазина.