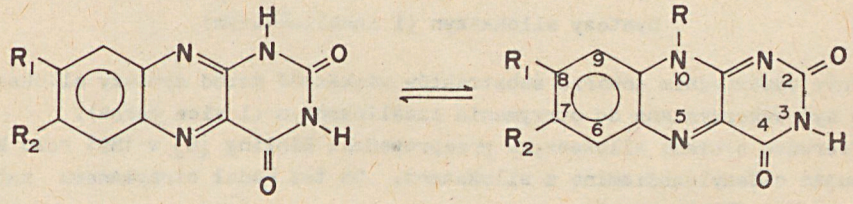
Jacek Kozioł,
Magdalena M. Szafran,
Anna Koziołowa

OTRZYMYWANIE I WŁAŚCIWOŚCI ALLOKSAZYN

Alloksazyna, związek heterocykliczny, który może być traktowany jako pochodna pteryny (benzo[g] pterydynylo-2,4-dion) lub chinoksaliny (2,4--dioksy-1,2,3,4-tetrahydropirymidylo [4,5-b] chinoksalina) zwróciła uwagę badaczy w wyniku odkrycia i podjęcia badań nad właściwościami witaminy B_2 (ryboflawiny, laktoflawiny*, hepatoflawiny*, owoflawiny*), związku o strukturze izoalloksazynowej [1,2].

Ryboflawina i jej tak zwane nukleotydy (flawinomononukleotyd, FMN, flawinoadeninodinukleotyd, FAD) poddane działaniu światła ulegają stosunkowo szybkiemu rozkładowi z wytworzeniem dwóch głównych produktów: związku o strukturze izoalloksazynowej nazwanego lumiflawiną oraz związku o strukturze alloksazynowej nazwanego lumichromem.



alloksazyna (R_1=R_2=H)

lumichrom (R_1=R_2=CH_3)

izoalloksazyna (R=R_1=R_2=H)

ryboflawina (R=rybityl, R_1=R_2=CH_3)

lumiflawina (R=R_1=R_2=CH_3)

Ten ostatni związek pozostawał przez długie lata praktycznie jedyną znaną i badaną pochodną alloksazyny. Ze względu na różnicę trwałości (według obliczeń ab initio [3] rzędu 230 kJ/mol w stanie podstawowym) związki o

*nazwy już zarzucone

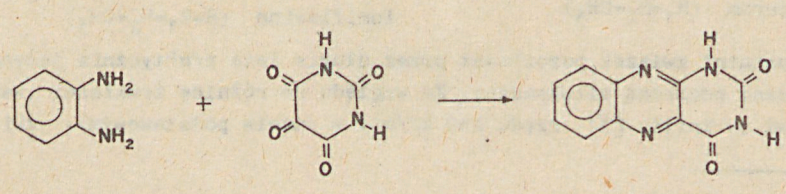
strukturze izoalloksazynowej mogą istnieć tylko w przypadku podstawienia w pozycji przy N-10.

We wszystkich żywych komórkach, zawierających ryboflawinę i jej pochodne, najprawdopodobniej występują również pochodne alloksazyny powstające w wyniku fotochemicznej, chemicznej czy biologicznej degradacji ryboflawiny. Systematycznych badań zmierzających do ustalenia stopnia powszechności występowania alloksazyn w różnych organizmach żywych dotąd nie podjęto. Mała ilość danych na ten temat wynika z wielu przyczyn. Do najważniejszych można by zaliczyć: małe zainteresowanie alloksazynami jako związkami nie przejawiającymi aktywności biologicznej oraz trudności analityczne - - związki występują w bardzo małych ilościach, nie absorbują w rejonie widzialnym, wykazują niską fluorescencję i fototautomerię w wodzie, kwasach karboksylowych, pirydynach [4]. Istniejące w literaturze nieliczne dane są z reguły tylko wzmiankami o zaobserwowaniu obecności alloksazyn (niemal wyłącznie lumichromu) przy badaniu lub oznaczaniu ryboflawiny i jej pochodnych [5]. Dopiero w ostatnich latach pojawiły się doniesienia [6,7] o rozpoznaniu w płynach ustrojowych człowieka i zwierząt pochodnych o strukturze alloksazynowej (7- i 8-karboksylumichromy), będących niewątpliwymi metabolitami ryboflawiny powstającymi najprawdopodobniej w wyniku przemian 7- i 8-hydroksy pochodnych ryboflawiny. Możliwość przemian enzymatycznych i fotochemicznych ryboflawiny w organizmach żywych była przedmiotem dyskusji w czasie VIII Międzynarodowego Sympozjum "Flavins and Flavoproteins" (Brighton, Anglia, 1984 r.). Tam również uzgodniono pogląd, że mimo spektakularnych osiągnięć w badaniach bardzo złożonych cząsteczek flawoproteidów (np. flawodoksyn) dla lepszego zrozumienia właściwości pochodnych ryboflawiny konieczne jest przyspieszenie i rozszerzenie badań podstawowych na układach modelowych. Takimi układami ze względu na trwałość (mimo różnych właściwości) może być alloksazyna i jej pochodne. Potrzebne dla tych celów pochodne alloksazyny uzyskuje się przy pomocy różnorodnych metod syntezy.

Syntezy alloksazyn (i izoalloksazyn)

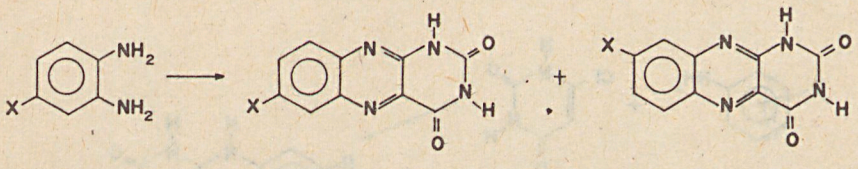
Przy odpowiednim doborze substraktów większość metod syntezy alloksazyn może być wykorzystana do otrzymania izoalloksazyn (i vice versa).

Pierwszą syntezę alloksazyny przeprowadził Kühling [8] w 1891 roku kondensując o-fenylenodiaminę z alloksanem. On też nadał otrzymanemu związkowi nazwę „alloksazyna".



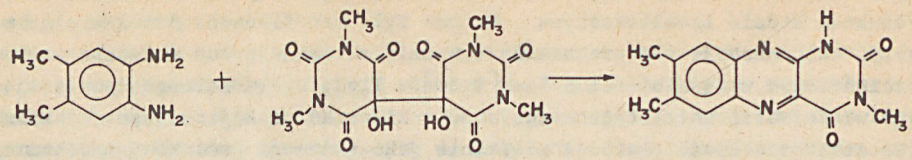
Gdy substratem w tej reakcji jest N-podstawiona-o-fenylenodiamina, wówczas produktem będzie izoalloksazyna. Metoda była modyfikowana przez wielu badaczy. Kondensację przeprowadzono w wodzie, metanolu lub w kwasie solnym rozcieńczonym wodą albo metanolem [9,10]. Ilość kwasu solnego posiadającego właściwości katalityczne decyduje o kierunku reakcji: jego brak lub niedostateczna ilość powoduje powstanie jako głównego produktu pochodnej kwasu ureidowego zamiast alloksazyny lub izoalloksazyny [11]. Dodanie kwasu borowego w wielu przypadkach zwiększa wydajność właściwego produktu [12]. Kondensację przeprowadza się przez mieszanie substratów lub wstrząsanie ich w temperaturze pokojowej albo w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika [9,13].

Jeśli o-fenylenodiamina posiada podstawniki w pierścieniu benzenowym, to w reakcji kondensacji z alloksanem powinny powstać dwa różniące się właściwościami izomery.

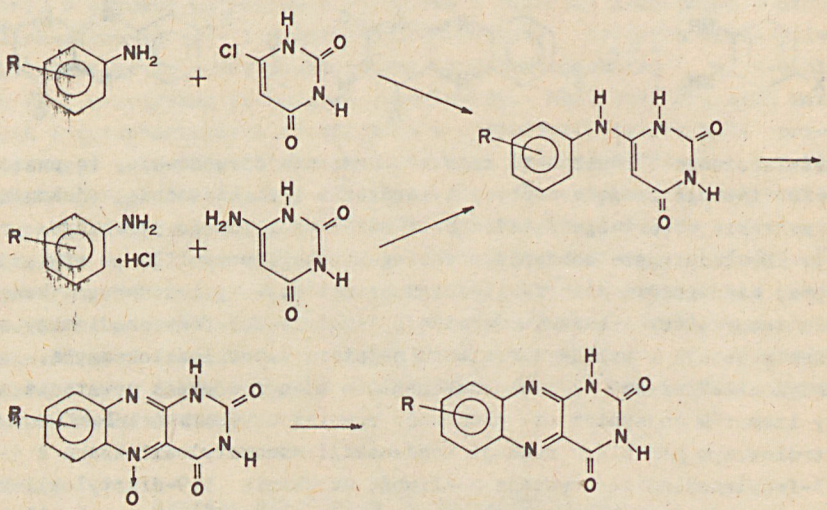


Przeświadczenie o słuszności tego stwierdzenia spowodowało, że przez prawie 100 lat nie podjęto próby potwierdzenia i zlekceważono dokonaną w tym zakresie obserwację świadczącą o możliwości innego przebiegu reakcji [14]. Dokładniejsze zbadanie przebiegu reakcji pozwoliło na stwierdzenie, że przy odpowiednim doborze ilości substratów, wody i dodanego kwasu (a także temperatury i czasu) w reakcji 1-metylo-2,3-fenylenodiaminy z alloksanem powstaje i wypada z roztworu najpierw 6-metyloalloksazyna, a potem 9-metyloalloksazyna [11]. W przekonaniu o nieuchronności powstania mieszaniny izomerów do syntez nie próbowano również użyć monometyloalloksanu. Przy kontrolowanym przebiegu reakcji kondensacji monometyloalloksanu z 1-metylo-2,3-fenylenodiaminą powstaje możliwość uzyskania 3,9-dimetyloalloksazyny (obok mieszaniny z 3,6-dimetylo-izomerem), czystej 3-metyloalloksazyny przy użyciu o-fenylenodiaminy lub 3-metylolumichromu przy użyciu 4,5-dimetylo-1,2-fenylenodiaminy [11]. Ten ostatni sposób dzięki swej prostocie wyparł dotąd stosowane metody oparte na fotolitycznej lub chemicznej degradacji 3-metyloryboflawiny [15].

Pochodne alloksazyny i izoalloksazyny można otrzymać w reakcji Kühlinga stosując alloksantynę zamiast alloksanu [9]. Synteza przebiega wydajnie, gdy diamina ulega kondensacji z alloksantyną lub dimetyloalloksantyną. Wykorzystanie tetrametyloalloksantyny wprawdzie nie umożliwia uzyskanie pochodnej izoalloksazynowej, jednakże pozwala na otrzymanie lumichromu na drodze kondensacji z N,4,5-trimetylo-1,2-fenylenodiaminą [16]. W reakcji tej grupa N-metylowa ulega odszczepieniu. Powstałe produkty krystalizuje się z wody, rozcieńczonego kwasu octowego, etanolu, metanolu, mieszaniny metanol-kwas mrówkowy, pirydyny, a nawet rozcieńczonego kwasu solnego.



Inną metodę syntezy alloksazyn i izoalloksazyn zaproponował Goldner i współpracownicy [17]. Jest to kilkuetapowy proces kondensacji 4(6)-chlorouracylu lub 4(6)-aminouracylu z aniliną lub jej chlorowodorkiem w temperaturze ok. 473 K. 4(6)-Chlorouracyl wykorzystuje się przede wszystkim do kondensacji z para podstawioną aniliną. Otrzymany w ten sposób 4(6)-anilinouracyl ulega reakcji z azotynem izoamylu cyklizując do 5-N-tlenku alloksazyny (izoalloksazyny). Redukcja otrzymanego N-tlenku wodorem w obecności niklu Raneya w acetonie, dioksanie lub acetonitrylu prowadzi do oczekiwanego związku.

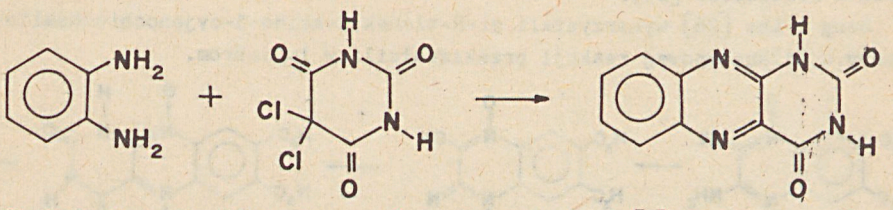


Mimo pewnej ograniczoności metody Goldnera można przy jej pomocy uzyskać te mono-, di- i trimetyloalloksazyny, których otrzymywanie metodą Kühlinga [8] jest nie celowe lub niemożliwe [4]. Otrzymanie właściwej alloksazyny wymaga zastosowania odpowiednich pochodnych aniliny pojedynczo, podwójnie lub potrójnie podstawionych metylami (toluidyny, ksylidyny, trimetyloaniliny). Użycie 1- lub 3-metylo-(alkilo)-4(6)-chloro (lub amino-)uracylu pozwala na uzyskanie, szczególnie pożądanych w niektórych rodzajach badań, pochodnych alloksazyny z podstawionymi metylem (alkilem) azotami N-1 lub N-3. Użycie innych aromatycznych amin umożliwia dalsze rozszerzenie stosowania metody Goldnera i współ. [17] w celu otrzymania innych pochodnych. Wychodząc z 2-dimetyloamino-4-aminotoluenu i 6-chloro- lub 6-chloro-3-metylouracylu uzyskano roseolumichromy (7-metylo- i 3,7-dimetylo-8-dimetyloaminoalloksazyny) [18]. Syntezy pochodnych alloksazyny

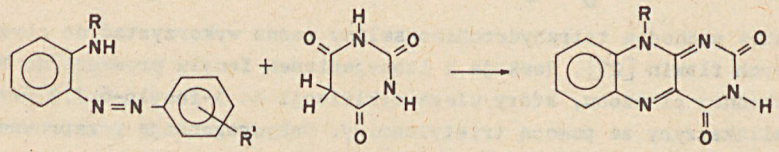
(i izoalloksazyny) z elektronoakceptorowymi podstawnikami w pierścieniu benzenowym nawet w optymalnych warunkach przebiegają opornie i z małymi wydajnościami (fluoro-pochodne) lub wogóle nie zachodzą (niektóre cyjano-pochodne).

Metoda Goldnera i współpr. [17] była wielokrotnie modyfikowana. W syntezie izoalloksazyn Yoneda [19,20] wykorzystał azotyn sodowy w obecności kwasu octowego do zamknięcia pierścienia 4(6)-anilinouracylu, a deoksygenację przeprowadził za pomocą dwutioninu sodowego w wodzie. W 1977 roku Yoneda jeszcze uprościł ten proces otrzymując pochodną izoalloksazyny w wyniku jednoczesnej cyklizacji i redukcji produktu spiekania, stosując N-nitrozodimetyloaminę i chlorek fosforylu [21].

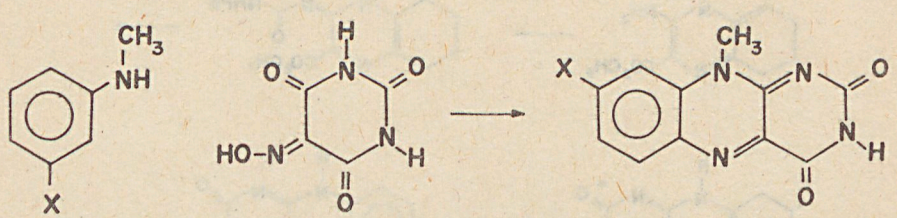
Tishler ze współ. [22] przeprowadził kondensację o-fenylenodiaminy z kwasem 5-chloro- i 5,5-dichlorobarbiturowym. Duże znaczenie w tej syntezie odgrywa reaktywność samej diaminy jak również rozpuszczalnik i temperatura reakcji (pirydyna i 373 K). Metodę tę można również wykorzystać do syntezy izoalloksazyn przez zastosowanie N-podstawionej o-fenylenodiaminy.



Reakcja kwasu barbiturowego z 2-arylazozwiązkami [9], będąca jedną z metod otrzymywania izoalloaksazyn, może być również wykorzystana do syntezy alloksazyn [23]. Kondensacja ta jest katalizowana przez słabe kwasy organiczne (kwasy mineralne przyspieszają reakcję powodując równocześnie rozkład azozwiązku).



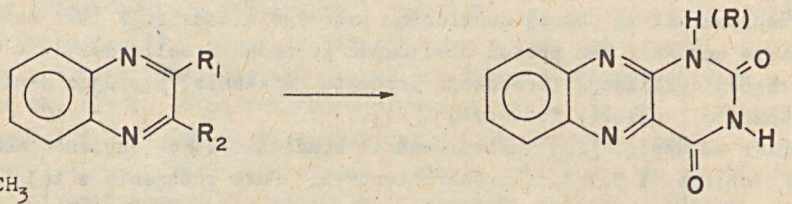
Hemmerich [24] wykorzystał kwas 5-nitrozobarbiturowy, który w reakcji z N-metyloaniliną daje izoalloksazynę. Jeśli anilina



posiada podstawnik w pozycji meta, teoretycznie możliwe jest utworzenie dwóch izomerycznych produktów [9]. W procesie kondensacji powstaje jednak

tylko jeden izomer, gdyż N-metylowy podstawnik aktywuje pozycję para w stosunku do siebie (a orto do grupy $-NHCH_3$). Tak więc podstawniki w pozycji 3 zapewniają atak grupy izonitrozowej na pozycję 6 aniliny.

Kolejna metoda polega na otrzymaniu alloksazyn i izoalloksazyn z chinoksalin [9] posiadających grupy karboksyamidową lub cyjanową oraz aminową. Zachodzi tu bądź to bezpośrednia cyklizacja, bądź cyklizacja poprzedzona częściową hydrolizą.

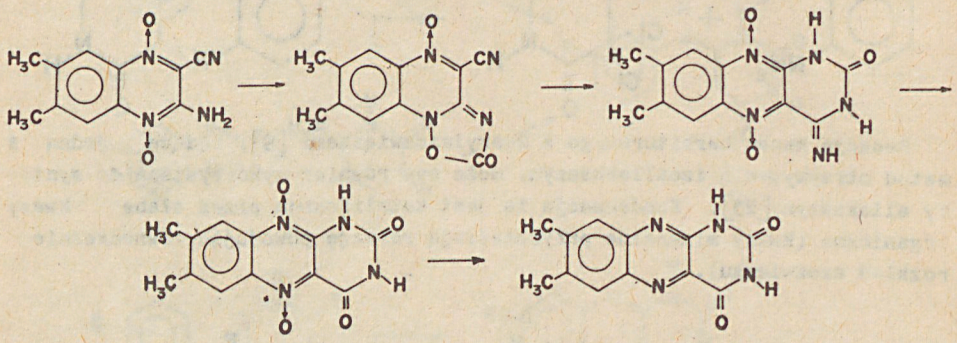


$R = -CH_3$

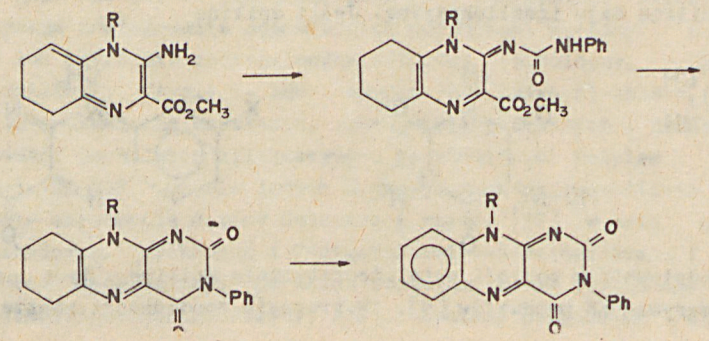
$R_1 = -NHCOCH_3$ lub $-N(CH_3)COOC_2H_5$ $\qquad$ $R_2 = -CONH_2$ lub $-CN$

Podobną metodę dla otrzymania 1,3-dimetylolumichromu zastosowali Brederecк i Pfleiderer [25].

Seng i Ley [26] wykorzystali di-N-tlenek 2-amino-3-cyjanochinoksaliny, który w kilkuetapowej reakcji przekształcili w lumichrom.

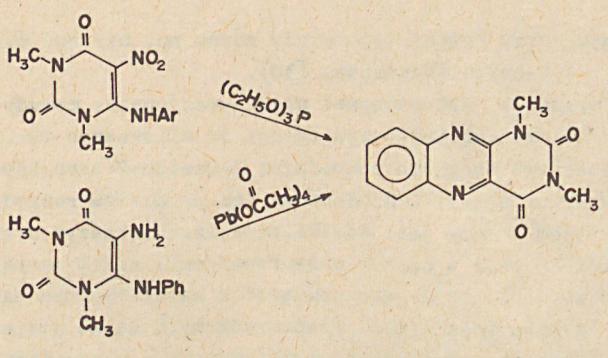


Również pochodną tetrahydrochinoksaliny można wykorzystać do otrzymania niektórych flawin [27]. Reakcja z izocyjanianem fenylu prowadzi do N-acylowej pochodnej pirazonu, który ulega cyklizacji do 3-fenylo-6,7,8,9-tetrahydroizoalloksazyny za pomocą trietyloaminy. Dehydrogenację przeprowadzono we wrzącej dekalinie w obecności palladu na węglu.



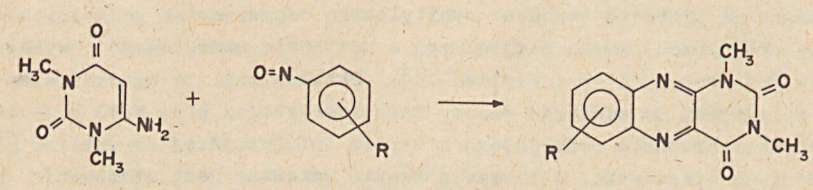
Alloksazyny lub izoalloksazyny można także otrzymać przez przekształcenie niektórych pochodnych uracylu.

5-Nitro-6-anilinouracyl i 5-amino-6-anilinouracyl ulegają cyklizacji odpowiednio z fosforynem etylowym i czterooctanem ołowiu [28] w jednoetapowej reakcji. Zamiast czteroctanu ołowiu

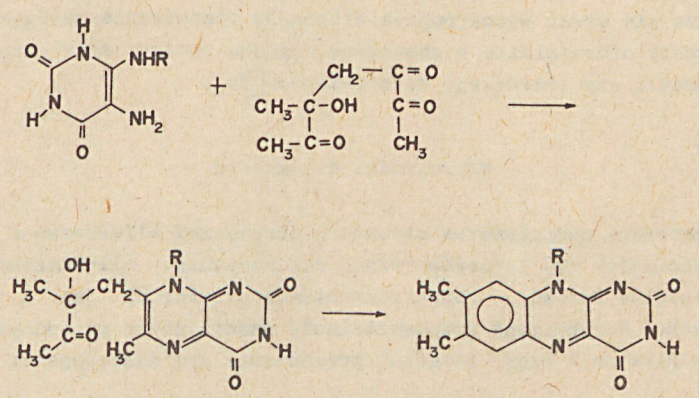


można użyć dwutlenku ołowiu, traci się jednak wówczas na wydajności.

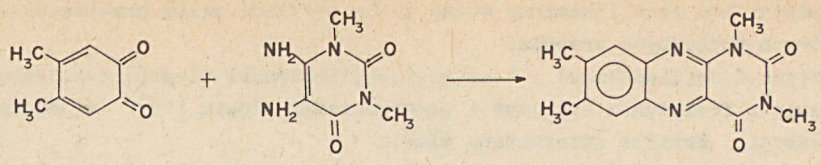
4(6)-Aminouracyl w reakcji z nitrozobenzenami daje alloksazyny wg metody zaproponowanej przez Yonedę [20]. Kondensację przeprowadza się we wrzącym bezwodniku octowym.



Kondensacja N-podstawionych 5,6-diaminouracyli z dimerami aldoli tworzy układ pterydyny, który natychmiast ulega cyklizacji do izoalloksazyny [29].



Do syntezy alloksazyn i izoalloksazyn wykorzystano również pochodne o--benzofenonu i 5,6-diaminopirymidyny [9]. Interesującym jest fakt, że tej kondensacji ulegają wyłącznie podstawione



o-benzofenony. Przy pomocy tej metody można np. uzyskać 6,7- i 8,9-benzoalloksazyny z 1,2-naftalenochinonu [30].

Niekiedy wygodnie jest stosować niekonwencjonalne metody syntezy. Do takich metod należy możliwość cyklizacji do alloksazyn tzw. kowalentnych hydratów alloksazyn będących pochodnymi 3-ureido-2-karboksychinoksalin (cyklizują pod wpływem zasad) lub odbudowy ich produktów rozpadu [31,32].

Podobnym typem metody jest dealkilacja izoalloksazyn przy N-10. Reakcję zauważoną wielokrotnie w czasie przeprowadzania alkilowania izoalloksazyn (w pozycji przy N-3) próbowano powiązać z katalitycznym działaniem metali ciężkich. W wyniku specjalnie przeprowadzonych badań stwierdzono, że reakcja przebiega podczas ogrzewania izoalloksazyn w rozpuszczalnikach o wyższych temperaturach wrzenia (powyżej 373 K). Dealkilacja izoalloksazyn przy N-10 w czasie wielogodzinnego ogrzewania w mieszaninie mocznika z małą ilością dimetyloformamidu (lub gliceryny) przebiega na ogół z dobrą wydajnością [33]. Przydatność równie drastycznych ale wieloetapowych metod opartych na odcięciu łańcucha rybitylowego odpowiednich pochodnych ryboflawiny przy pomocy kwasu nadjodowego a następnie nadoctowego wykazali jeszcze w 1971 roku Müller i Dudley [15]. Okazało się, że ostatni etap tej reakcji polegający na odcięciu reszty formylometylowej przy N-10 przebiega z wytworzeniem produktu pośredniego o bardzo interesującej strukturze [34].

W badaniach właściwości alloksazyn często wskazane jest stosowanie pochodnych alkilowych uzyskiwanych przez podstawienie wymiennych wodorów przy azotach N-1 oraz/lub N-3. Pochodne alkilowane przy N-1 lub N-3 można uzyskiwać wyłącznie na drodze syntezy, natomiast podstawienie obu pozycji przeprowadza się przez wyczerpującą alkilację odpowiednim halogenkiem (np. CH_3J) w dimetyloformamidzie w obecności węglanu potasu, metylowanie siarczanem dimetylu czy (rzadziej) diazometanem [35].

Właściwości alloksazyn

Mimo znacznego podobieństwa struktury cząsteczek alloksazyn i izoalloksazyn właściwości obu izomerów różnią się znacznie. Alloksazyny są trudno rozpuszczalne zarówno w rozpuszczalnikach polarnych, jak i względnie niepolarnych. Przybliżona rozpuszczalność ważniejszych pochodnych (części rozpuszczalnika na 1 część związku) przedstawia się następująco:

Pochodna	Rozpuszczalność		
	w wodzie:	w metanolu:	w cykloheksanie*:
Alloksazyna	400 000	50 000	> 2 000 000
Lumichrom	135 000	20 000	> 1 000 000
1-metylolumichrom	400 000	< 10 000	< 500 000
3-metylolumichrom	400 000	< 10 000	< 500 000
1,3-dimetylolumichrom	500 000	1 000	< 50 000

W warunkach wysokiej próżni (10^{-4} Pa), w temperaturach powyżej 373 K możliwa jest sublimacja alloksazyn [36]. W temperaturach powyżej 453-473 K alloksazyny ulegają rozkładowi bez ostrego punktu topnienia, a wyniki analizy elementarnej wskazują na obecność różnych ilości cząsteczek wody krystalizacyjnej w poszczególnych pochodnych [36]; potwierdzają to widma alloksazyn w zakresie podczerwieni [37].

Alloksazyny łatwo krystalizują z różnych rozpuszczalników w postaci bardzo drobnych igieł nie nadających się do przeprowadzenia analizy rentgenograficznej. Dopiero ostatnio udało się w naszym laboratorium wyhodowanie dostatecznie dużych kryształów 9-monometyloalloksazyny i 1,3,8,9-tetrametyloalloksazyny, których analiza rentgenograficzna została przeprowadzona w Uniwersytecie w Sztokholmie [38]. Uzyskano potwierdzenie wyraźnej planarności cząsteczek alloksazyn oraz silnego powiązania cząsteczek alloksazyn nie podstawionych przy N-1 i N-3 (np. 9-metyloalloksazyny) wiązaniami wodorowymi między sobą i z udziałem cząsteczek wody. Wyniki tej analizy rentgenograficznej są ponadto pierwszymi uzyskanymi eksperymentalnie informacjami o długościach i kątach wiązań w cząsteczkach alloksazyn, co pozwoli na przeprowadzenie poprawnych obliczeń semiempirycznych.

Właściwości spektralne obojętnych cząsteczek alloksazyn

Widma obojętnych form cząsteczek alloksazyn są szczególnie interesujące w odniesieniu do widm izomerycznych cząsteczek izoalloksazyn [39]. Różnice polegają przede wszystkim na przesunięciu długofalowej części widm absorpcji w stronę fal krótkich (najbardziej długofalowe maksimum izoalloksazyn występuje ok. 445 nm, a alloksazyn ok. 375 nm) i różnego wpływu polarności środowiska na widma emisyjne. W miarę wzrostu polarności rozpuszczalnika obniża się natężenie fluorescencji izoalloksazyn (bez istotnych przesunięć maksimów), natomiast podwyższa natężenie fluorescencji alloksazyn z jednoczesnym silnym przesunięciem maksimów w stronę fal dłuższych. Podobieństwa, poza ogólnym kształtem widm, sprowadzają się głównie do niezbyt dobrze rozumianej szczególnej wrażliwości na polarność środowiska położenia maksimum absorpcji w rejonie bliskiego nadfioletu (ok. 373 nm dla izoalloksazyn i ok. 330 ~ 350 nm dla alloksazyn). Szczegółowe badania wpływu polarności środowiska na widma elektronowe izoalloksazyn oraz alloksazyny i jej metylowych pochodnych [4,40] są kontynuowane.

*roztwory nietrwałe, silna tendencja do krystalizacji na granicach faz.

Najnowsze wyniki badań w naszej pracowni wydają się świadczyć o istotnej roli wiązań wodorowych alloksazyna-rozpuszczalnik w przesunięciach obserwowanych w widmach absorpcyjnych i emisyjnych [41].

Alloksazyna w rozpuszczalnikach o różnej polarności (od dioksanu do wody) wykazuje widmo o dobrze rozdzielonych dwóch pasmach długofalowych (372-375 i 318-331 nm), paśmie o charakterystycznej strukturze subtelnej w rejonie 250 nm (z maksimami ok. 250 i 256 nm) i krótkofalowym paśmie przy ok. 213 nm.

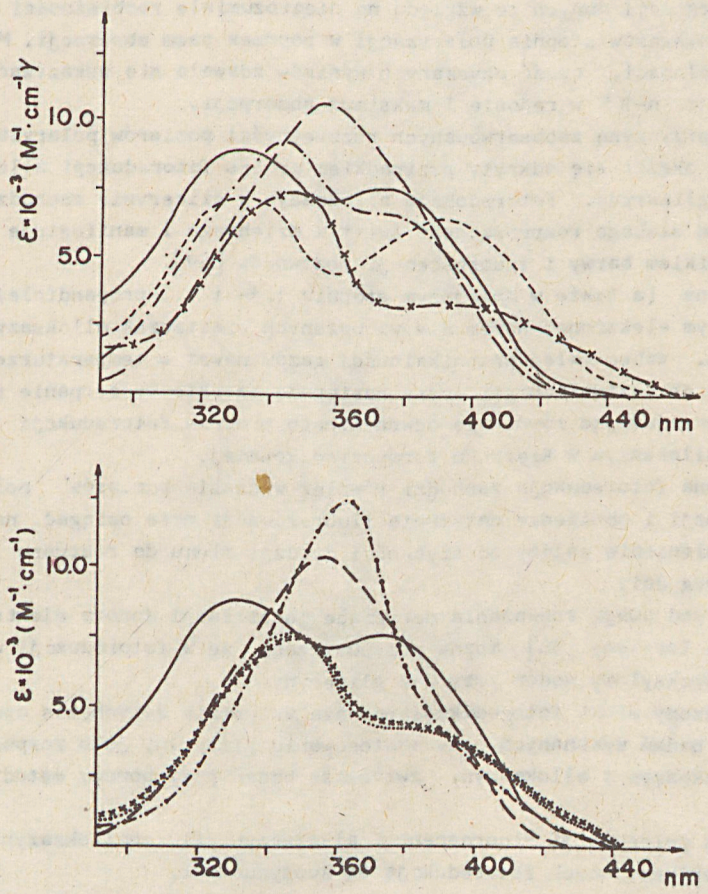
Zmiany w widmie wywołane wprowadzeniem grupy metylowej do cząsteczki alloksazyny w znacznym stopniu zależą od miejsca podstawienia. Metylowanie azotów w pierścieniu pirymidynowym praktycznie nie zmienia podstawowego widma alloksazyny, podczas gdy podstawienie w pierścieniu benzenowym struktury alloksazynowej wywołuje wyraźne, charakterystyczne zmiany położeń, maksimów i absorpcyjności przede wszystkim w obszarze dwóch pasm długofalowych [42]. W szczególności zmiany te dotyczą maksimum II (przy 320 nm), w znacznie mniejszej mierze maksimum I (przy 373 nm). Biorąc pod uwagę położenie pasm i ogólną zmianę kształtu widm metylowych pochodnych alloksazyny, można wyodrębnić kilka rodzajów oddziaływań [42]:

1. Podstawnik w położeniu przy C-7, tak w przypadku alloksazyny jak i jej pochodnych metylowanych w położeniach przy C-6, C-8, C-9, przesuwa maksimum I długofalowo, przez co w widmie wyraźniej rozdzielają się dwa pasma (I i II), odzwierciedlające dwa niezależne przejścia typu $\pi \rightarrow \pi^*$ (rys. 1).
2. Podstawnik w położeniu przy C-8 powoduje znaczne przesunięcie długofalowe i hyperchromię maksimum II, szczególnie w przypadku alloksazyny i bardzo niewielką batochromię maksimum I. W rezultacie, zarówno alloksazyna jak i jej monometylowe pochodne wykazują widma, w których pasma dwu długofalowych przejść nakrywają się, w skrajnych przypadkach (8M--ALL, 6,8M-ALL, 8,9MALL) tak silnie, że powstaje pojedyncze maksimum w rejonie 362 nm (rys. 1). W przypadku 7,8-dimetyloalloksazyny, znanej jako lumichrom, widmo jest rezultatem dwóch przeciwstawnych oddziaływań podstawników przy C-7 i C-8 po długofalowej stronie silnego pasma przy ok. 355 nm, wyraźnie zaznacza się ramię przy ok. 386 nm (rys. 1).
3. Oddziaływanie grup metylowych przy C-6 i C-9 jest zbliżone. W obu przypadkach następuje długofalowe przesunięcie maksimum II i nieco mniejsze maksimum I. Ponieważ przesunięciu maksimum I towarzyszy wyraźna hipochromia, widma 6M-All, 6,7M-All, 6,9M-All, 9M-All, 7,9M-All w rejonie długofalowym wykazują charakterystyczny „ogon" (rys. 1).

Wpływ lokalizacji podstawników metylowych w pierścieniu benzenowym cząsteczki alloksazyny na kształt i położenie maksimów w widmie absorpcyjnym, położenie maksimów emisji fluorescencji oraz wydajności fluorescencji [39,40,42], a także wpływ polarności środowiska na przesunięcia położenia maksimum II i maksimum emisji fluorescencji zdają się wskazywać na możliwość dużego udziału przejść typu $n-\pi^*$ zlokalizowanych w długofalowych rejonie pasm absorpcji. Możliwość wystąpienia jednego lub więcej przejść typu $n-\pi^*$ w bezpośredniej bliskości najbardziej długofa-

lowego przejścia $\pi-\pi^*$ i ich wzajemne oddziaływanie, czy nawet zamiana miejscami (np. n-π^* przesunie się długofalowo poza $\pi-\pi^*$) w wyniku zmiany polarności środowiska, była przez nas sugerowana od dawna przy próbie interpretacji widm emisyjnych alloksazyn [42,43]. W przypadku izoalloksazyn te same przejścia typu n-π^*, pochodzące od elektronów wolnych par przy hetero-atomach (głównie: O-2, O-4, N-1, N-3 i N-5), lokują się w rejonie minimum absorpcji odległego od obu długofalowych przejść typu $\pi-\pi^*$ i nie wywierają tak istotnego wpływu.

Doświadczalna lokalizacja przejść typu n-π^* jest możliwa, jednakże w przypadku alloksazyn nie uzyskano jednoznacznych wyników przy zastosowaniu metody pomiaru dichroizmu kołowego w polu magnetycznym [44] i metody pomiaru polaryzacji fluorescencji [45]. Ta druga metoda w przypadku lepsze-



Rys. 1. Widma absorpcyjne alloksazyny i jej niektórych mono- i dimetylowych pochodnych w obojętnych (pH 6) roztworach wodnych. Alloksazyna (All) ——— , 6-metyloalloksazyna (6MAll) xxx, 7-metyloalloksazyna (7MAll) - - - - , 8-metyloalloksazyna (8MAll) — — —, 9-metyloalloksazyna (9MAll) ..... , 6,7-dimetyloalloksazyna (6,7MAll) — · — , 6,8-dimetyloalloksazyna (6,8MAll) i 8,9-dimetyloalloksazyna (8,9MAll) ·— ·— ·— , oraz 7,8-dimetyloalloksazyna (7,8MAll, lumichrom) —— x ——

go oprzyrządowania i prawidłowego doboru warunków pomiaru powinna pozwolić na uzyskanie powtarzalnych i wiarygodnych wyników, łatwiejszych do interpretacji niż wyniki pomiarów dichroizmu.

Biorąc pod uwagę prace w zakresie teorii i praktyki pomiarów polaryzacji fluorescencji [46], a także najnowsze badania izoalloksazyn [47], wykonano pomiary polaryzacji fluorescencji alloksazyny i jej monometylowych pochodnych.

Pomiary przeprowadzono stosując glicerynowe roztwory alloksazyn zawierające 5% metanolu w temperaturze 263 K, posługując się spektrofluorymetrem o układzie „T" [46,47] oraz standardowym spektrofluorymetrem MPF-44A z przystawką do pomiarów polaryzacji fluorescencji [48]. Uzyskane wyniki umożliwiły wprawdzie obliczenie kątów między momentami długofalowych przejść absorpcyjnych [48], nie pozwoliły jednakże na dokonanie pełnej interpretacji danych ze względu na niezrozumiałe rozbieżności i dziwne przebiegi wykresów stopnia polaryzacji w poprzek pasm absorpcji. Mimo braku powtarzalności, część uzyskanych wyników zdawała się wskazywać na obecność przejść $n-\pi^*$ w rejonie I maksimum absorpcji.

Główną przyczyną zaobserwowanych rozbieżności pomiarów polaryzacji fluorescencji okazał się odkryty przypadkiem proces fotoredukcji alloksazyn w obecności gliceryny. Fotoredukcja alloksazyn w glicerynie zachodzi nawet pod wpływem słabego rozproszonego światła dziennego i manifestuje się wyraźnym zanikiem barwy i fluorescencji roztworów [49].

Gliceryna (a także w mniejszym stopniu 1,3- i 1,2-propandiole) okazała się aktywnym elektronodonorem dla wzbudzonych cząsteczek alloksazyn i izoalloksazyn. Wobec małej przenikalności gazów nawet w temperaturze pokojowej w lepkich roztworach gliceryny następuje szybkie wyczerpanie się zapasu tlenu przesuwając równowagę odwracalnego procesu fotoredukcji alloksazyn i izoalloksazyn w kierunku formy zredukowanej.

Efektywna fotoredukcja zachodzi również w czasie pomiarów polaryzacji fluorescencji i obniżenie natężenia fluorescencji może osiągać nawet 50%. Ponowne utlenienie zależy od szybkości dyfuzji tlenu do roztworu i może trwać szereg dni.

Biorąc pod uwagę rozważania dotyczące lokalizacji donora elektronów w cząsteczce lecytyny [50] można przypuszczać, że w fotoredukcji uczestniczy niehydroksylowy wodór przy C-2 gliceryny.

Stwierdzony efekt fotoredukcji podważa wszystkie dotychczas opublikowane wyniki badań wykonanych przy zastosowaniu gliceryny jako rozpuszczalnika izoalloksazyn i alloksazyn, zwłaszcza badań przy pomocy metod optycznych.

Badania polaryzacji fluorescencji alloksazyn (i izoalloksazyn) w warunkach wykluczających fotoredukcję są kontynuowane.

W widmach absorpcyjnych alloksazyn (i izoalloksazyn), zwłaszcza w rozpuszczalnikach o niskiej polarności, ujawnia się wyraźnie struktura wibracyjna pasma długofalowego (maksimum I) i w mniejszym stopniu pasma w rejonie bliskiego nadfioletu (maksimum II). Istnieje pewne prawdopodobieństwo, że występujące nieregularności w położeniu poszczególnych struk-

tur wibronicznych i ich natężenia (wyraźnie zależne od polarności rozpuszczalników) mogą być pomocne w umiejscowieniu przejść typu $n-\pi^*$. Podjęte próby analizy kształtu widm przy zastosowaniu krzywych o rozkładzie Gaussa (lub lognormalnych) dla widm absorpcyjnych lumiflawiny i alloksazyny (dobrze rozdzielone maksima I i II) w serii rozpuszczalników o różnej polarności pozwoliły na uzyskanie obiecujących wstępnych wyników [42, 51]. Trudności napotkane w trakcie przeprowadzanych analiz są wynikiem wpływu zbyt wielu czynników, z których nie wszystkie dają się zdefiniować. Wyniki ostatnio rozpoczętych badań nad tworzeniem się wiązań wodorowych alloksazyn z cząsteczkami rozpuszczalników [41] zdają się wskazywać na możliwość analizy kształtu widm pod warunkiem zastosowania specjalnie dobranych układów.

Dla alloksazyny i jej pochodnych podstawionych w pierścieniu benzenowym jedną, dwoma, trzema i czterema grupami metylowymi przeprowadzone zostały semiempiryczne obliczenia kwantowo-mechaniczne metodą PPP-MO-SCF-CJ (Pariser - Parr-Pople, Molecular Orbitals, Self-consistent Field, Configuration Interaction) wg parametryzacji i programów obliczeniowych P.S. Song'a [52].

Obliczone energie przejść elektronowych, siły oscylatorów przejść, kierunki momentów przejść elektronowych, kierunków momentów dipolowych, rozmieszczenie gęstości elektronowej i rzędy wiązań dla singletowych i tripletowych stanów wzbudzonych wykazują dobrą zgodność z wynikami doświadczalnymi i są bardzo pomocne w ich interpretacji. Dane te, w wielu przypadkach uzyskane zanim udało się zsyntezować i zbadać szereg pochodnych alloksazyn, okazały się bardzo pomocne w badaniach doświadczalnych. Dla przykładu w Tabeli 1 przedstawiono dane eksperymentalne i obliczeniowe charakteryzujące właściwości spektralne alloksazyny i jej pochodnych podstawionych pojedynczą grupą metylową w pierścieniu benzenowym w położeniu przy C-6, C-7, C-8 i C-9 [53].

Obliczenia semiempiryczne metodą PPP-MO-SCF-CJ zawdzięczają zgodność z wynikami doświadczalnymi specjalnie dobranej parametryzacji, stąd są obecnie rzadko stosowane. Ponadto metoda ta uwzględniając wyłącznie układ elektronów π, nie pozwala na uzyskanie informacji o udziale innych elektronów (sigma oraz n) w tworzeniu stanów wzbudzonych oraz o ich wpływie na właściwości cząsteczki (również w stanie podstawowym). Metody INDO (Intermediate Neglect of Differential Overlap) oraz CNDO (Complete Neglect of Differential Overlap), a zwłaszcza ich wersje „s" (spektralna - - do obliczania energii przejść elektronowych) pozbawione są tych wad i powszechnie uznawane za najlepsze, gdy nie można zastosować metod „ab initio".

W oparciu o dane o długościach wiązań 9-metyloalloksazyny i 1,3,8,9-tetrametyloalloksazyny [38] podjęto obliczenia semiempiryczne dla alloksazyny i jej monometylowych pochodnych metodami INDO/s i CNDO/s. Wstępne wyniki zawierają wyraźne wskazówki o lokalizacji przejść $n-\pi^*$, co znacznie ułatwi ukierunkowanie i prowadzenie dalszych badań właściwości spektralnych alloksazyn.

Tabela 1

Charakterystyka widmowa alloksazyny i jej monometylowych pochodnych
(dane doświadczalne i obliczeniowe)

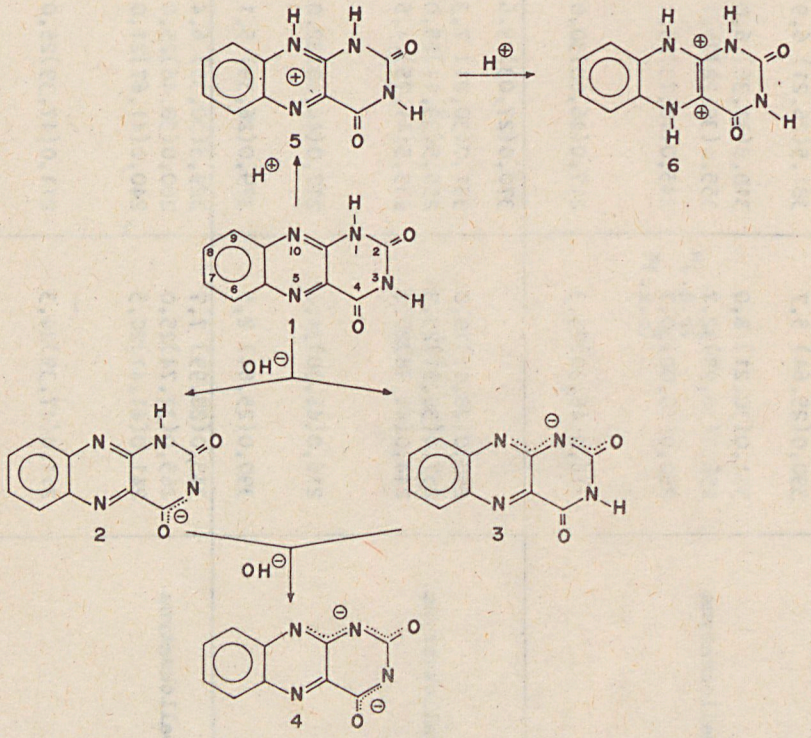
Związek	Doświadczalne Położenia maksimów w nm (kK) oraz absorpcyjności molowe ($x10^{-3}$)		Obliczeniowe Przejścia singletowe (numery orbitali), położenia maksimów w nm (kK) oraz siły oscylatorów
	W buforze fosforanowym pH 6,2	W cykloheksanie-dioksanie (1:1, obj obj.)	
1	2	3	4
Alloksazyna	377,0(26,52) 8,5	372,0(26,84) 7,2 (r.k. i r.d.)*	S_1 (9-10), 359,07(27,85) 0,332
	331,0(30,21)10,0	318,0(31,45) 6,0	S_2 (8-10), 325,38(30,73) 0,215
	256,0(39,06)35,0	252,0(39,68)28,0	S_3 (9-11), 253,45(39,45) 0,387
	240,0(41,67)41,5	240,0(41,67)31,0	S_4 (7-10), 243,10(41,13) 0,419
			S_5 (8-11), 231,75(43,15) 0,355
	213,0(46,95)46,5	213,0(46,95)40,0	S_6 (6-10), 224,19(44,60) 0,729
			S_7 (9-12), 206,97(48,31) 0,095
6-metyloalloksazyna	392,0(25,51) 4,7	377,0(25,53) 5,9	S_1(10-11), 396,04(25,25) 0,157
	350,0(28,65)11,5	332,0(30,12) 8,8	S_2 (9-11), 348,50(28,69) 0,396
	263,5(37,95)29,3	262,0(38,17)27,5	S_3(10-12), 263,03(38,02) 0,581
	242,0(41,32)30,4	240,5(41,58)30,8	S_4 (8-11), 245,76(40,69) 0,187
			S_5 (7-11), 240,02(41,66) 0,179
			S_6 (9-12), 230,09(43-46) 0,580
	210,0(47,51)34,3	217,0(46,08)47,5	S_7(10-13), 224,89(44,46) 0,785
			S_8 (6-11), 213,96(46,74) 0,036

1	2	3	4
7-metyloalloksazyna	390,0(25,64) 5,7	381,5(26,21) 6,9 (r.k. i r.d.)*	S_1(10-11), 385,93(25,91) 0,353
	331,0(30,21) 8,0	318,5(31,36) 6,0	S_2 (9-11), 324,39(30,83) 0,195
	256,5(38,99)32,7 (r.d.)*	355,0(39,22)25,1	S_3(10-12), 266,36(37,54) 0,827
	250,0(40,00)30,7 (r.k.)*	245,0(40,73)25,1	S_4 (8-11), 247,80(40,35) 0,679
			S_5 (7-11), 243,08(41,14) 0,349
			S_6 (9-12), 234,14(42,71) 0,427
	216,0(46,30)25,3	217,0(46,08)30,0	S_7(10-13), 215,20(46,47) 0,037
			S_8(10-14), 206,43(48,44) 0,033
8-metyloalloksazyna		370,0(27,03) 9,6 (r.k. i r.d.)*	S_1(10-11), 361,41(27,67) 0,562
	257,0(28,01)10,8	331,0(30,21) 7,3	S_2 (9-11), 347,97(28,74) 0,087
	257,0(38,91)25,3	255,5(39,14)25,0	S_3(10-12), 257,19(38,88) 1,054
	244,0(40,98)25,2	339,5(41,75)24,5	S_4 (9-12), 248,85(40,18) 0,078
			S_5 (8-11), 242,39(41,25) 0,657
			S_6 (7-11), 236,61(42,26) 0,349
	216,0(46,30)31,0	217,0(46,08)32,0	S_7 (6-11), 212,35(47,09) 0,106
			S_8 (9-13), 208,13(48,04) 0,191
	390,0(25,64) 2,5	379,0(26,39) 5,1 (r.k. i r.d.)*	S_1(10-11), 390,68(25,60) 0,234
9-metyloalloksazyna	345,0(28,99) 7,7	329,5(30,35) 6,4	S_2 (9-11), 339,71(29,44) 0,313
	265,0(37,74)25,0	260,0(38,46)25,0	S_3(10-12), 263,89(37,89) 0,887
	241,0(41,41)20,5	240,0(41,67)21,0	S_4 (9-12), 244,30(40,93) 0,086
			S_5 (8-11), 238,93(41,85) 0,198
			S_6(10-13), 231,45(43,20) 0,131
	211,0(47,39)24,3	211,0(47,39)25,0	S_7 (7-11), 223,48(44,75) 0,417
			S_8 (6-11), 213,84(46,76) 0,634

*(r.k.) - ramię po krótkofalowej stronie maksimum
(r.d.) - ramię po długofalowej stronie maksimum

Alloksazyna i jej pochodne nie podstawione przy azotach N-1 i N-3, w zależności od warunków, mogą występować w następujących formach: obojętnej, dwóch monoanionów (po oddysocjowaniu protonu z N-1 lub N-3), dianionu, monokationu (w wyniku protonacji na N-10) oraz dikationu (Schemat 1).

Uzyskanie widm absorpcyjnych wszystkich możliwych form jonowych danej cząsteczki nie zawsze jest możliwe. W przypadku lumichromu i innych alloksazyn nie podstawionych przy N-1 i N-3 nie jest możliwe zmierzenie widm monoanionów, ponieważ zawsze występuje ich równowagowa mieszanina. Przyjmując założenie, że podstawnik metylowy przy N-1 lub N-3 praktycznie nie wpływa na właściwości spektralne alloksazyn, dla wyznaczenia widm monoanionów posłużono się 1-metylolumichromem (monoanion N-3) i 3-metylolumichromem (monoanion N-1). Pomiary widm form anionowych (roztwory o stężeniu 10^{-5} M, pH od 3 do 14, o stałej sile jonowej) zostały wykonane przy użyciu spektrofotometru sprzężonego z komputerem i pozwoliły na obliczenie wartości pK_a (Tabela 2) oraz kształtu widm indywidualnych form jonowych

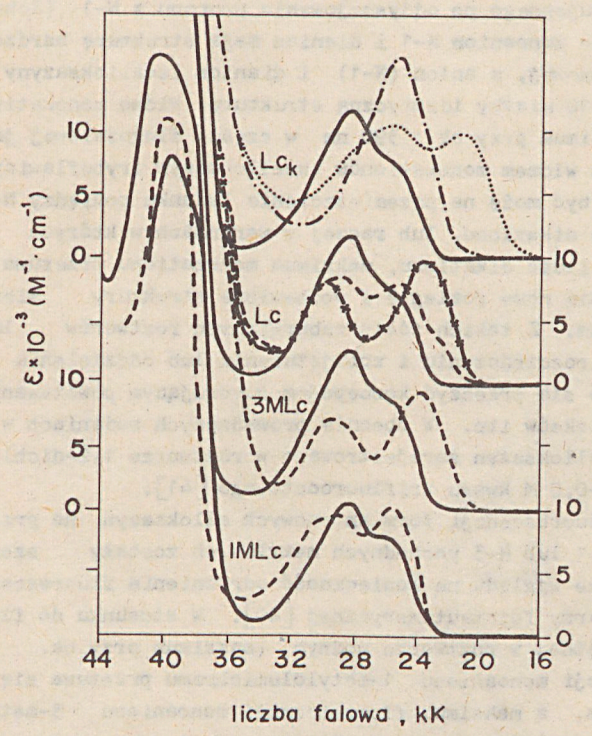


Schemat 1. Struktury form jonowych alloksazyny: 1 - forma obojętna, 2 - monoanion (N-3), 3 - monoanion (N-1), 4 - dianion, 5 - monokation, 6 - dikation

Tabela 2

Wartości pK_a lumichromu i jego pochodnych w stanie podstawowym (wg [40,54,55])

Związek	Monoaniony N-1	Monoaniony N-3	Dianion	Monokation	Dikation
	Sumarycznie				
lumichrom	8,29±0,03		12,9±0,1	-2,2	-6
	mikroskopowo				
	8,59	8,47			
1-metylolumichrom	-	8,54-0,08	-	-	-
3-metylolumichrom	8,58±0,05	-	-	-	-



Rys. 2. Widma absorpcyjne indywidualnych form jonowych lumichromu (Lc), 1--metylolumichromu (1MLc) i 3-metylolumichromu (3MLc): formy obojętne ——, monoaniony - - - - , dianion -x-x- , [54,55]. Widma kationów lumichromu (Lc_k): monokationu -.-.- , dikationu ····· .

(rys. 2) [54,55]. Badanie form kationowych lumichromu przebiegało w roztworach stężonych kwasów, co powodowało znaczne „rozpuszczalnikowe" przesunięcia w widmach, utrudniając interpretację. Stąd przytoczone widma i wartości pK_a kationów (rys. 2, Tab. 2) należy traktować jako przybliżone.

Zmiany w widmach absorpcyjnych obojętnej cząsteczki lumichromu wywołane dysocjacją protonu (ów) lub protonowaniem są bardzo charakterystyczne. W widmach form obojętnych obecne jest jedno maksimum przy ok. 353 nm z silnie zaznaczonym ramieniem przy ok. 384 nm. W wyniku oddysocjowania protonu z N-3 maksimum przesuwa się krótkofalowo do ok. 340 nm w widmie lumichromu i do ok. 347 nm w widmie 1-metylolumichromu, natomiast ramię zaznacza się wyraźniej w widmie lumichromu i przekształca w wyraźne maksimum przy ok. 392 nm w widmie 1-metylolumichromu. Oddysocjowanie protonu z N-1 powoduje silne krótkofalowe przesunięcie maksimum do ok. 342 nm oraz powstanie nowego maksimum przy ok. 425 nm (anion 3-metylolumichromu) zaznaczającego się już bardzo silnie w widmie mieszaniny monoanionów lumichromu. W stężonych wodnych roztworach zasad (np. 2,0 N NaOH) lumichrom występuje w formie trwałego dianionu o widmie prawie identycznym z widmem monoanionu 3-metylolumichromu (położenia maksimów przy ok. 340 i ok. 427 nm). Widmo to jest bardzo podobne do widm izoalloksazyn (w widmie lumiflawiny maksima są położone przy ok. 353 i ok. 444 nm). Biorąc pod uwagę możliwość delokalizacji ładunku ujemnego po oddysocjowaniu protonu z N-1 (Schemat 1) można domniemywać, że monoanion N-1 i dianion mają strukturę bardzo zbliżoną do izoalloksazynowej, a anion (N-1) i dianion izoalloksazyny nie podstawionej przy N-10 miałby identyczną strukturę. Widmo monokationu lumichromu z jednym maksimum przy ok. 390 nm w części długofalowej jest praktycznie identyczne z widmem monokationów izoalloksazyn (ryboflawiny, lumiflawiny) wskazując być może na przemieszczenie ładunku pomiędzy N-1 i N-10 [56]. W widmie dikationu, lub raczej w warunkach w których powinna powstać już znaczna ilość dikationu, maksimum monokationu przesuwa się długofalowo i pojawia się nowe rozległe i pozbawione struktury wibracyjnej pasmo przy ok. 470 nm. Z takich żółto zabarwionych roztworów lumichrom można odzyskać (po rozcieńczeniu i zobojętnieniu lub oddzieleniu kwasu) ilościowo, co wydaje się przeczyć koncepcjom sugerującym powstawanie w tych warunkach kompleksów itp. W obecnie prowadzonych badaniach widma mono- i dikationów alloksazyn zarejestrowano w roztworze 1,2-dichloroetanu zawierającym 0,064-0,8 M kwasu trifluorooctowego [41].

Widma emisyjne fluorescencji form anionowych alloksazyn na przykładzie lumichromu i jego N-1 lub N-3 pochodnych metylowych zostały szczególnie dokładnie zbadane, ze względu na konieczność odróżnienia fluorescencji monoanionu N-1 od formy fototautomerycznej [40]. W stosunku do fluorescencji cząsteczki obojętnej w roztworze wodnym (maksimum przy ok. 490 nm) maksimum fluorescencji monoanionu 1-metylolumichromu przesuwa się krótkofalowo do ok. 465 nm, a maksimum fluorescencji monoanionu 3-metylolumichromu przesuwa się długofalowo do ok. 523 nm. W miarę wzrostu pH roztworu lumichromu najpierw pojawia się fluorescencja monoanionów (ramię po stronie krótkofalowej i długofalowe przesunięcie maksimum) a następnie,

w bardziej stężonych roztworach zasad (> 1 N NaOH), fluorescencja dianionu z maksimem przy ok. 512 nm i wyraźnie niższym natężeniu. Podobnie więc jak w przypadku widm absorpcyjnych, również widma emisyjne potwierdzają podobieństwo struktur monoanionu N-1 i dianionu do struktury izoalloksazynowej.

Monokationy alloksazyn (podobnie jak izoalloksazyn) nie fluoryzują najprawdopodobniej w wyniku silnego wygaszania protonowego [56]. Dikationy wykazują długofalową fluorescencję o małym natężeniu z maksimum w rejonie powyżej 570 nm.

Wartości pK_a stanu wzbudzonego anionów lumichromów, oszacowane z cyklu Förstera dla monoanionu N-3, są zbliżone do wartości pK_a stanu podstawowego, natomiast dla anionu N-1 są wyraźnie niższe [40,57].

Posłużenie się cząsteczką lumichromu jako modelem w badaniu właściwości spektralnych jonowych form alloksazyn jest uzasadnione faktem, że mimo wyraźnych różnic w kształcie widm i położeniach maksimów absorpcji, wywołanych wprowadzeniem podstawników metylowych do pierścienia benzenowego cząsteczki, charakter zmian spowodowanych deprotonacją i protonacją u wszystkich alloksazyn jest niezwykle podobny [41]. To samo dotyczy wartości pK_a stanu podstawowego i wzbudzonego oraz zmian w widmach emisyjnych [4, 40,57].

W badaniach form anionowych alloksazyn nie podstawionych przy N-1 należy pamiętać o zachodzącej w rozcieńczonych wodnych roztworach zasad (począwszy od pH ok. 10,0) odwracalnej reakcji tzw. „kowalentnej hydratacji", polegającej na otwarciu pierścienia pirymidynowego pomiędzy N-3 a C-4 z jednoczesnym przyłączaniem cząsteczki wody [18,31,32,35,54,55].

Literatura

[1] R. Kuhn, F. Weygand - 6,7-Dimethyl-9-l-arabo-flavin, Berichte 68, 166-169 (1935).

[2] P. Karrer, K. Schöpp, F. Benz - Synthesen von Flavinen. IV, Helv. Chim. Acta, 18, 426-429 (1935).

[3] M.H. Palmer, J. Simpson, R.J. Platenkamp - The electronic structure of flavin derivatives, J. Mol. Struct. 66, 243-263 (1980).

[4] A. Koziołowa - Solvent and methyl substituent effect on phototautomerism and ioniozation of alloxazines, Photochem. Photobiol. 29, 459--471 (1979).

[5] L. Tsai, E.R. Stadtman - Riboflavin degradation, w: "Methods in Enzymology" (Wyd. D.B. McCormick, L.D. Wright), Academic Press, New York, 1971 XVIII B, s. 557-571.

[6] H. Ohkawa, N. Ohishi, K. Yagi - New metabolites of riboflavin appear in human urine, J. Biol. Chem. 258 (9), 5623-28 (1983).

Badania nad otrzymywaniem, strukturą i właściwościami alloksazyn prowadzone są w Zakładzie Analizy Instrumentalnej Instytutu Towaroznawstwa w ramach centralnie koordynowanych problemów CPBP.01.12 oraz RPBP.II.13.

[7] K. Yagi, N. Ohishi, H. Ohkawa - Metabolism of flavins in mammals, w: "Progress in bioorganic chemistry and molecular biology", (wyd. J.A. Owchinnikov), Elsevier, Amsterdam 1984, s. 479-486.

[8] O. Kühling - Über Azine der Harnsäuregruppe, Berichte, 24, 2363-2369 (1891).

[9] J.P. Lambooy - The Alloxazines and Isoalloxazines. w: "Heterocyclic Compounds", (Wyd. R.C. Elderfield), J. Willey and Sons, Inc. New York, (1967) tom 9, s. 118-223.

[10] P. Karrer, H. Salomon, K. Schöpp, F. Benz - Synthetische Flavine VII, Helv. Chim. Acta, 18, 1143-1146 (1935).

[11] D. Panek-Janc, J. Kozioł - Simple synthesis of 6-methyl-, 3,9-dimethyl-, 3-methyl-, and 3,7,8-trimethylalloxazine, Tetrahedron Lett., 42, 4117-4118 (1979).

[12] R. Kuhn, K. Reinemund, F. Weygand, R. Ströbele - über die Synthese des Lactoflavins (Vitamina B_2), Berichte 68, 1765-1774 (1935).

[13] W.M. Berezowski, E.P. Rodionowa - Sintez 5,6,7-trimetilizoalloksazinow, Zhur. Obsch. Khim., 28, 1046-1049 (1958).

[14] H.G. Petering, G.J. van Giessen - 8-Chloroalloxazine, A New Diuretic. Synthesis and Structure, J. Org. Chem., 26, 2818-2821 (1961).

[15] F. Müller, K.H. Dudley - The Synthesis and Borohydride Reduction of some Alloxazine Derivatives, Helv. Chim. Acta, 54, (5), 1487-1497 (1971).

[16] P. Hemmerich, B. Prijs, H. Erlenmeyer - Studien in der Lumiflavin reihe, VI. Alkylierungs- und Desalkylierungs - Reaktionen an (Iso) alloxazinen, 1,3,10-Trimethylflavosemichinone, Helv. Chim. Acta, 43, 372-394, (1960).

[17] H. Goldner, G. Dietz, E. Carstens - Die Synthese von Alloxazinen und Alloxazin-5-N-oxiden, Libigs Ann. Chem., 694, 142-148 (1966).

[18] J. Kozioł, D. Panek-Janc - Synteza i własności reseolumichromów i ich kowalentnych hydratów, Zesz. Nauk. Akad. Ekon. Pozn., Seria I, 80, 110-114 (1978).

[19] F. Yoneda, Y. Sakuma, M. Ichiba, K. Shinomura - Syntheses of Isoalloxazines. A New Synthesis of Riboflavin, Chem. Pharm. Bull., 20 (8), 1832-1834 (1972).

[20] F. Yoneda, Y. Sakuma, M. Ichiba, K. Shinomura - Syntheses of Isoalloxazines and Isoalloxazine 5-Oxides. A New Synthesis of Riboflavin, J. Amer. Chem. Soc., 98 (3), 830-835 (1976).

[21] F. Yoneda, K. Shinozuka, Y. Sakuma, K. Senga - A Synthesis of flavins by nitrosative cyclization of 6-(N-alkylanilino) uracils with N--nitrosadimethylaminephosphorus oxychloride mixture, Heterocycles 6 (8), 1179-1180 (1977).

[22] M. Tishler, J.W. Wellman, K. Ladenburg - The Preparation of Riboflavin. III. The Synthesis of Alloxazines and Izoalloxazines, J. Amer. Chem. Soc., 67, 2165-2168 (1945).

[23] W.M. Berezowski, L.S. Tulchinskaya - Isledowanie w riadu allo- i izoalloksazina. II. Nowy sintez sojedinienia alloksazunowo riada, Zhur. Obsh. Khim., 31, 2779-2782 (1961).

[24] P. Hemmerich, B. Prijs, H. Erlenmeyer - Synthesen in der Lumiflavinreihe IV, Helv. Chim. Acta, 42 (5), 1604-1611 (1959).

[25] H. Bredereck, W. Pfleiderer - Über die Kondensation von Dimethyl-alloxan mit o-Phenylendiamin, Berichte, 87, 1119-1123 (1954).

[26] F. Seng, K. Ley - Eine neue Synthese des Lumichroms, Angew. Chem., 21, 1061-1062 (1972).

[27] D. Clerin, A. Lacroix, J.P. Fleury - A New Synthesis of Flavins, Tetrahedron Lett., 33, 2899-2902 (1976).

[28] E.C. Taylor, F. Sowiński, T. Yee, F. Yoneda - New Syntheses of Alloxazines, J. Amer. Chem. Soc., 89 (13), 3369-3370 (1967).

[29] R.M. Cresswell, H.C.S. Wood - The Biosynthesis of Pteridines. Part. I. The Synthesis of Riboflavin, J. Chem. Soc., 4768-4775 (1960).

[30] R. Kuhn, A.H. Cock - Über Lumazine und Alloxazine, Berichte, 70, 761--768 (1937).

[31] J. Kozioł, B. Tyrakowska, F. Müller - The Structure of covalent hydrates of alloxazines, Helv. Chim. Acta, 64, 1812-1817 (1981).

[32] J. Kozioł, B. Tyrakowska, A. Koziołowa - Reakcje odbudowy i resyntezy alloksazyn, Sympozjum PAN, Zielonka 1986 r. w druku.

[33] J. Kozioł, P. Hemmerich - dane nie opublikowane.

[34] V. Szczęsna, J. Kozioł - Formation of N-1 Substituted Alloxazine Derivative from 7,8-Dimethyl-10-Formylmethylisoalloxazine in Acetic Acid, Tetrahedron Lett., 23 (4), 475-476 (1982).

[35] J. Kozioł, P. Hemmerich - Struktur und Reaktivität der "Kovalenten Hydrate" in der Alloxazine - Reihe, Liebigs Ann. Chem. 1276-1288 (1976).

[36] J.K. Eweg, F. Müller, A.J.W.G. Visser, C. Veeger, D. Bebelaar, J.D. van Voorst - Molecular luminescence of some isoalloxazines in apolar solvents at various temperatures, Photochem. Photobiol., 30, 463-471 (1979).

[37] A. Koziołowa, J. Kozioł - dane niepublikowane.

[38] J. Csöregh, P. Kierkegaard, J. Kozioł, F. Müller - The crystal and molecular structures of 9-methyl and 1,3,8,9-tetramethylalloxazine, Acta Chem. Scand., B 41, 383-390 1987.

[39] J. Kozioł - Badania nad fluorymetrycznym oznaczaniem i fluorescencją flawin, Zeszyty Naukowe WSE w Poznaniu, Seria I, Nr 34, s. 27-60 (1969).

[40] A. Koziołowa - Wpływ środowiska na fototautomerię alloksazyny i jej metylowych pochodnych, Zeszyty Naukowe AE w Poznaniu, Seria II, Nr 60, s. 1-127 (1977).

[41] J. Kozioł, M.M. Szafran, P.F. Heelis, A. Koziołowa - Hydrogen bonding and phototautomerism of 3-methyllumichrome, Photochem. Photobiol., w druku.

[42] J. Kozioł, A. Koziołowa, J. Konarski, D. Panek-Janc, J. Dawidowski - - Spectral properties of alloxazines, w: "Flavins and Flavoproteins", (Wyd. K. Yagi, T. Yamano), Jap. Sci. Soc. Press, Tokyo, Univ. Park Press, Baltimore, 1980, s. 475-484.

[43] J. Kozioł - Chemistry of excited flavins, w: "Flavins and Flavoproteins", (Wyd. H. Kamin), Univ. Park Press, Baltimore, Butterworths, London, 1971, s. 54-59.

[44] D.W. Miles, D.W. Urry - Reciprocal Relation and Proximity of Bases in Flavin - Adenine Dinucleotide, Biochem., 7, 2791-2799 (1968).

[45] W.E. Kurtin, P.S. Song - The nature of the lowest triplet configuration of flavins, Photochem. Photobiol., 9, 127-142 (1969).

[46] D.M. Jameson, G. Weber, R.D. Spencer, G. Mitchell - Fluorescence polarization: measurements with a photon - counting photometer, Rev. Sci. Instrum., 49, 510-514 (1978).

[47] A.J.W.G. Visser, F. Müller - Absorption and Fluorescence Studies on Neutral and Cationic Isoalloxazines, Helv. Chim. Acta, 62, 593-608, (1979).

[48] J. Kozioł, A. Koziołowa - Polaryzacja przejść elektronowych alloksazyn, Zeszyty Naukowe AE w Poznaniu, Seria I., Nr 109, s. 98-101 (1983).

[49] M. Stroińska, J. Kozioł - Photoreduction of alloxazines and isoalloxazines by glycerol, IUPAC on the Chemistry of Natural Products 14-th Intern. Symposium, Poznań, 1984, s. 424.

[50] W. Schmidt, P. Hemmerich - On the redox reactions and accessibility of amphiphilic flavins in artifical membrane vesicles, J. Membrane Biol., 60, 129-141 (1981).

[51] J. Kozioł, J. Konarski, J. Dawidowski - Analiza kształtu widm izoalloksazyn, III Środowiskowa Konferencja Chemików, Poznań, 1983 r.

[52] J. Kozioł, P.S. Song - dane niepublikowane (obliczenia wykonano w Texas Tech. University, Lubbock, USA, 1975).

[53] J. Kozioł, A. Koziołowa - Studies on physicochemical properties of alloxazines, w: "Flavins and Fkavoproteins, Physicochemical Properties and Function", (Wyd. W. Ostrowski), Polish Scientific Publishess, Warsaw-Cracow, 1977, s. 81-107.

[54] J. Kozioł, A. Koziołowa - Badania nad kowalentną hydratacją alloksazyn, Część I, Zeszyty Naukowe WSE w Poznaniu, Seria I, Nr 40, s. 51-69 (1971).

[55] J. Kozioł, D.E. Metzler - Formation and possible structure of covalent hydrates of alloxazines, Z. Naturforsch., 27b, 1027-1029 (1972).

[56] N. Lasser, J. Feitelson - Protonation and deprotonation equilibria of lumichrome, Photochem. Photobiol., 25, 451-456 (1977).

[57] A. Koziołowa - Własności spektralne anionów alloksazyn w stanie podstawowym i wzbudzonym, Zeszyty Naukowe AE w Poznaniu, Seria I, Nr 62, s. 75-79 (1975).

SYNTHESIS AND PROPERTIES OF ALLOXAZINES

Summary

The Authors present their own papers and available in the literature data on different possible routes in syntheses of alloxazines. They also discuss the spectral properties of alloxazines depending on type and loca-

ПОЛУЧЕНИЕ И СВОЙСТВА АЛЛОКСАЗИНА

Резюме

На основе собственных исследований и опубликованных работ других авторов представлены возможности синтеза аллоксазина и его производных, а также их спектральные свойства, обусловленные видом и расположением заместителей, полярностью среды и ионной формой.