

Małgorzata Insińska-Rak

**POCHODNE RYBOFLAWINY
JAKO FOTSENSYBILIZATORY
TLENU SINGLETOWEGO**

Praca przedstawiona
Radzie Wydziału Chemii
Uniwersytetu im. A. Mickiewicza w Poznaniu
celem uzyskania
stopnia doktora w dziedzinie Chemii

Promotor: **prof. UAM dr hab. Marek Sikorski**

Poznań 2010

Praca wykonana w Pracowni Fotochemii Stosowanej
Wydziału Chemii
Uniwersytetu im. A. Mickiewicza w Poznaniu

Promotor: prof. UAM dr hab. Marek Sikorski

Poznań 2010

Panu

prof. dr. hab. Markowi Sikorskiemu

za opiekę naukową, przekazaną wiedzę,

umożliwienie i pomoc w wykonaniu pracy

składam serdeczne podziękowania

Małgorzata Insińska-Rak

*Zespołowi
Pracowni Fotochemii Stosowanej
Moim Koleżankom z Pracowni
i spoza niej
za dyskusje naukowe i nie tylko
za wsparcie, życzliwość i wszelką pomoc*

serdecznie dziękuję

Panu

*Prof. dr. hab. Włodzimierzowi Augustyniakowi
za nieustanne przekazywanie wiedzy, dyskusje
oraz życzliwość*

Pani

*dr hab. Ewie Sikorskiej
za umożliwienie wykonania niektórych pomiarów,
za zrozumienie i wszelką pomoc*

*Panu prof. dr. hab. Andrzejowi Maciejewskiemu
oraz*

*Panu prof. dr. hab. Jackowi Koputowi
za dyskusje naukowe,
życzliwość i okazaną pomoc*

składam serdeczne podziękowania

dedykuję mojemu Ojcu ...

Wykaz rysunków, schematów i tabel

I. WSTĘP

1. Rysunek 1 str.2 *Struktura związków flawinowych wykazujących aktywność biologiczną*

III. CZĘŚĆ LITERATUROWA

2. Schemat 1 str. 6 *Cząsteczka flawiny w różnych formach utlenienia*
3. Rysunek 2 str.18 *Lumiflawina w trzech formach utlenienia*
4. Rysunek 3 str.19 *Procesy utleniania i redukcji oraz równowagi kwasowo – zasadowe dla związków flawinowych*
5. Schemat 2 str.23 *Fotoindukowany cykl reakcji utleniania i redukcji w cząsteczce ryboflawiny na granicy faz woda/ CCl_4*
6. Rysunek 4 str. 26 *Struktury tautomeryczne powstające w czasie procesu przeniesienia protonu w cząsteczce 3-hydroksyflawonu obserwowane w szklkach węglowodorowych*
7. Rysunek 5 str. 26 *Struktury tautomeryczne powstające w czasie procesu przeniesienia protonu w cząsteczce 7-azaindolu*
8. Rysunek 6 str. 27 *Struktury tautomeryczne powstające w czasie procesu przeniesienia protonu w cząsteczce adeniny i guaniny*
9. Rysunek 7 str.27 *Struktury tautomeryczne powstające w czasie procesu przeniesienia protonu w cząsteczce 7-azaindolu poprzez kompleks z alkoholem i z kwasem*
10. Rysunek 8 str. 28 *Ilustracja przeniesienia protonu w cząsteczce 7-hydroksychinoliny*
11. Rysunek 9 str. 29 *Ilustracja procesu fotoindukowanego przeniesienia protonu w cząsteczce 7,8-dimetyloalloksazyny **A** (lumichromu), z utworzeniem tautomeru 7,8-dimetyloizalloksazyny **B**, w obecności kwasu octowego*
12. Rysunek 10 str. 30 *Ilustracja procesu fotoindukowanego przeniesienia protonu w cząsteczce 7,8-dimetyloalloksazyny (lumichromu) w obecności pirydyny*
13. Rysunek 11 str. 31 *Ilustracja procesu fotoindukowanego przeniesienia protonu w cząsteczce 7,8-dimetyloalloksazyny (lumichromu) w obecności wody*
14. Rysunek 12 str. 34 *Schemat procesu dysocjacji protonu w cząsteczce lumichromu w stanie podstawowym z powstającą strukturą izoalloksazynową*
15. Rysunek 13 str. 34 *Schemat procesu protonowania cząsteczki lumichromu z powstającymi dwoma kationami o strukturze alloksazynowej i izoalloksazynowej*
16. Rysunek 14 str. 36 *Struktura alloksazynowa (**A**) na przykładzie lumichromu i struktura izoalloksazynowa (**B**) na przykładzie lumiflawiny*
17. Rysunek 15 str. 38 *Widma absorpcji lumichromu i lumiflawiny w metanolu*
18. Rysunek 16 str. 38 *Widma fluorescencji lumichromu i lumiflawiny w metanolu*

19.	Tabela 1	str. 39	<i>Dane spektralne i fotofizyczne dla allokksazyn i izoalloksazyn w stanie singletowym w metanolu</i>
20.	Schemat 3	str.42	<i>Schemat fotosensybilizowanych reakcji utleniania I i II typu</i>
21.	Tabela 2	str.43	<i>Wydajności kwantowe fluorescencji (ϕ_f), wydajności kwantowe przejścia międzysystemowego (ϕ_{ISC}), oraz wydajności tworzenia tlenu singletowego (ϕ_A), dla wybranych sensybilizatorów</i>
22.	Rysunek 17	str.46	<i>Stany elektronowe i ich energie dla cząsteczki tlenu, $T_{1/2}$ dla cząsteczki w roztworze wodnym</i>
23.	Schemat 4	str.53	<i>Mechanizm działania terapii fotodynamicznej z uwzględnieniem zmodyfikowanego diagramu Jabłońskiego</i>
24.	Schemat 5	str.56	<i>Schemat reakcji fotosensybilizacji przebiegającej z udziałem ryboflawiny jako fotosensybilizatora</i>

IV. OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ WŁASNYCH

25.	Rysunek 18	str. 59	<i>Struktury pochodnych ryboflawiny , których właściwości stanowią przedmiot prezentowanej pracy</i>
26.	Rysunek 19	str.61	<i>Znormalizowane widma absorpcji i emisji ($\lambda_{wzb} = 450 \text{ nm}$) dla ryboflawiny w metanolu</i>
27.	Rysunek 20	str.62	<i>Widma absorpcji lumiflawiny, ryboflawiny i 3MeTARF w metanolu</i>
28.	Rysunek 21	str.63	<i>Zestawienie widm absorpcji 3-benzylo-lumiflawiny (3BLfl), lumiflawiny (Lfl), 3-metylo-lumiflawiny (3MeLfl) i 3-etylo-lumiflawiny (3EtLfl) w metanolu</i>
29.	Rysunek 22	str. 64	<i>Zestawienie widm absorpcji 5-deaza-ryboflawiny (5DRfl) i ryboflawiny (Rfl) w metanolu</i>
30.	Tabela 3	str. 65	<i>Parametry spektralne i fotofizyczne dla 5-deaza-ryboflawiny w zestawieniu z danymi dla ryboflawiny w różnych rozpuszczalnikach</i>
31.	Rysunek 23	str. 66	<i>Widma absorpcji izo-6,7-ryboflawiny (IR) i ryboflawiny (Rfl) w metanolu</i>
32.	Tabela 4	str. 67	<i>Parametry spektralne i fotofizyczne dla izo-(6,7)-ryboflawiny w zestawieniu z danymi dla ryboflawiny w metanolu</i>
33.	Rysunek 24	str. 68	<i>Widma absorpcji 3-metylo-tetraacetylo-ryboflawiny (3MeTARF) w metanolu i innych rozpuszczalnikach</i>
34.	Tabela 5	str. 68	<i>Parametry spektralne i fotofizyczne dla 3-metylo-tetraacetylo-ryboflawiny (3MeTARF) i ryboflawiny w różnych rozpuszczalnikach</i>
35.	Rysunek 25	str. 69	<i>Widma absorpcji 3-benzylo-lumiflawiny (3BLfl) i lumiflawiny (Lfl) w metanolu</i>

36.	Tabela 6	str. 70	<i>Parametry spektralne i fotofizyczne dla 3-benzylo-lumiflawiny w zestawieniu z lumiflawiną i innymi jej pochodnymi w metanolu</i>
37.	Rysunek 26	str. 72	<i>Znormalizowane widma emisji 5-deaza-ryboflawiny (5DRfl) i ryboflawiny (Rfl) w metanolu ($\lambda_{wzb} = 425 \text{ nm}$)</i>
38.	Rysunek 27	str. 73	<i>Widma emisji izo-6,7-ryboflawiny (IR) i ryboflawiny (Rfl) w metanolu ($\lambda_{wzb} = 355 \text{ nm}$)</i>
39.	Rysunek 28	str. 74	<i>Widma emisji 3-metylo-tetraacetylo-ryboflawiny (3MeTARF), ryboflawiny (Rfl) i lumiflawiny (Lfl) w metanolu ($\lambda_{wzb} = 450 \text{ nm}$)</i>
40.	Rysunek 29	str. 75	<i>Widma emisji 3-benzylo-lumiflawiny (3BLfl) i lumiflawiny (Lfl) w metanolu, ($\lambda_{wzb} = 450 \text{ nm}$)</i>
41.	Rysunek 30	str. 78	<i>Widmo absorpcji 5-deaza-ryboflawiny w metanolu w zestawieniu z wynikami obliczeń teoretycznych (pionowe linie oznaczają pasma $\pi-\pi^*$, czerwone trójkąty – pasma $n-\pi^*$)</i>
42.	Tabela 7	str. 79	<i>Przewidywane na podstawie obliczeń (B3LYP /6-31G(d)) energie wzbudzenia stanów singletowych ($S_0 \rightarrow S_i$) i trypletowych ($S_0 \rightarrow T_i$) oraz obliczone (UB3LYP /6-31G(d)) energie wzbudzenia od najniższego stanu trypletowego wyższych stanów trypletowych ($T_1 \rightarrow T_i$) wraz z siłą oscylatora dla 5-deaza ryboflawiny</i>
43.	Rysunek 31	str. 81	<i>Widmo absorpcji izo-6,7-ryboflawiny w metanolu w zestawieniu z wynikami obliczeń teoretycznych (pionowe linie oznaczają pasma $\pi-\pi^*$, czerwone trójkąty – pasma $n-\pi^*$)</i>
44.	Tabela 8	str. 82	<i>Przewidywane na podstawie obliczeń (B3LYP /6-31G(d)) energie wzbudzenia stanów singletowych ($S_0 \rightarrow S_i$) i trypletowych ($S_0 \rightarrow T_i$) oraz obliczone (UB3LYP /6-31G(d)) energie wzbudzenia od najniższego stanu trypletowego do wyższych stanów trypletowych ($T_1 \rightarrow T_i$) wraz z siłą oscylatora dla izo-6,7-ryboflawiny</i>
45.	Tabela 9	str. 83	<i>Przewidywane na podstawie obliczeń (B3LYP /6-31G(d)) energie wzbudzenia stanów singletowych ($S_0 \rightarrow S_i$) i trypletowych ($S_0 \rightarrow T_i$) oraz obliczone (UB3LYP /6-31G(d)) energie wzbudzenia od najniższego stanu trypletowego do wyższych stanów trypletowych ($T_1 \rightarrow T_i$) wraz z siłą oscylatora dla ryboflawiny</i>
46.	Rysunek 32	str. 85	<i>Widmo absorpcji 3-metylo-tetraacetylo-ryboflawiny w metanolu w zestawieniu z wynikami obliczeń teoretycznych (pionowe linie oznaczają pasma $\pi-\pi^*$, czerwone trójkąty – pasma $n-\pi^*$)</i>
47.	Tabela 10	str. 86	<i>Przewidywane na podstawie obliczeń (B3LYP /6-31G(d)) energie wzbudzenia stanów singletowych ($S_0 \rightarrow S_i$) i trypletowych ($S_0 \rightarrow T_i$) oraz obliczone (UB3LYP /6-31G(d)) energie wzbudzenia od najniższego stanu trypletowego do wyższych stanów trypletowych ($T_1 \rightarrow T_i$) wraz z siłą oscylatora dla 3-metylo-tetraacetylo-ryboflawiny</i>
48.	Rysunek 33	str. 88	<i>Widmo absorpcji 3-benzylo-lumiflawiny w metanolu w</i>

zestawieniu z wynikami obliczeń teoretycznych (pionowe linie oznaczają pasma $\pi-\pi^*$, czerwone trójkąty – pasma $n-\pi^*$)

- | | | | |
|-----|------------|---------|--|
| 49. | Tabela 11 | str. 89 | Przewidywane na podstawie obliczeń (B3LYP /6-31G(d)) energie wzbudzenia stanów singletowych ($S_0 \rightarrow S_i$) i trypletowych ($S_0 \rightarrow T_i$) oraz obliczone (UB3LYP /6-31G(d)) energie wzbudzenia od najniższego stanu trypletowego do wyższych stanów trypletowych ($T_1 \rightarrow T_i$) wraz z siłą oscylatora dla 3-benzylo-lumiflawiny |
| 50. | Tabela 12 | str. 90 | Przewidywane na podstawie obliczeń metodą (B3LYP) z bazami (6-31G(d)) /6-311G(d,p)) energie wzbudzenia do stanów singletowych ($S_0 \rightarrow S_i$) w porównaniu z wartościami energii obliczonymi z uwzględnieniem makroskopowego efektu rozpuszczalnika (MeOH) w modelu PCM, metodą (B3LYP) z bazami 6-31G(d)) i 6-311G(d,p) wraz z siłą oscylatora dla 3-benzylo-lumiflawiny |
| 51. | Rysunek 34 | str. 92 | Eksperymentalne widmo absorpcji przejściowej (panel dolny), zmierzone dla roztworu 5-deaza-ryboflawiny w metanolu ($\lambda_{ex} = 355$ nm) w zestawieniu z danymi uzyskanymi z obliczeń metodą TD-DFT (panel górny), (pionowe linie reprezentują przewidywane energie przejść tryplet-tryplet dla badanej cząsteczki) |
| 52. | Rysunek 35 | str. 93 | Widmo absorpcji T-T (panel dolny) zmierzone dla roztworu izo-6,7-ryboflawiny w metanolu ($\lambda_{ex} = 355$ nm) w zestawieniu z danymi uzyskanymi z obliczeń metodą TD-DFT (panel górny) (pionowe linie reprezentują przewidywane energie przejść tryplet-tryplet dla badanej cząsteczki) |
| 53. | Rysunek 36 | str. 94 | Widmo absorpcji przejściowej dla roztworu 3MeTARF w metanolu ($\lambda_{ex} = 355$ nm) w zestawieniu z danymi uzyskanymi z obliczeń metodą TD-DFT (pionowe linie reprezentują przewidywane energie przejść tryplet-tryplet dla badanej cząsteczki) |
| 54. | Rysunek 37 | str. 95 | Widmo absorpcji (panel dolny) zmierzone dla roztworu 3-benzylo-lumiflawiny w metanolu ($\lambda_{ex} = 355$ nm) w zestawieniu z danymi uzyskanymi z obliczeń metodą TD-DFT (panel górny) (linie reprezentują przewidywane energie przejść tryplet-tryplet dla badanej cząsteczki) |
| 55. | Rysunek 38 | str. 97 | Kształt orbitali molekularnych HOMO, HOMO-1 i LUMO zaangażowanych w najniższe przejścia energetyczne w cząsteczce 3-benzylo-lumiflawiny |
| 56. | Tabela 13 | str. 98 | Położenie maksimów pasm emisji dla ryboflawiny i badanych pochodnych w roztworze metanolowym i w postaci polikrystalicznej |
| 57. | Rysunek 39 | str. 99 | Widma fluorescencji polikryształów 5-deaza-ryboflawiny, zarejestrowane w odstępach czasowych 5 ns, wzbudzenie 337 nm; górny wykres przedstawia dyfuzyjno – odbiciowe widmo absorpcji polikryształów 5DRfl |
| 58. | Rysunek 40 | str. 99 | Widma fluorescencji polikryształów 5-deaza-ryboflawiny, zarejestrowane w odstępach czasowych 1 μ s, wzbudzenie 337 nm |
| 59. | Rysunek 41 | str.100 | Widma fluorescencji polikryształów izo-6,7-ryboflawiny, |

zarejestrowane w odstępach czasowych 1 ns, wzbudzenie 337 nm

- | | | | |
|-----|-------------|----------|--|
| 60. | Rysunek 42 | str. 101 | <i>Widma fluorescencji polikryształów 3-benzylo-lumiflawiny, zarejestrowane w odstępach czasowych 1 ns, wzbudzenie 337 nm; górny wykres przedstawia dyfuzyjno – odbiciowe widmo absorpcji polikryształów 5BLfl</i> |
| 61. | Rysunek 43 | str. 102 | <i>Widma fluorescencji polikryształów 3MeTARF, zarejestrowane w odstępach czasowych 1 ns, wzbudzenie 337 nm</i> |
| 62. | Tabela 14 | str. 106 | <i>Czas życia stanu trypletowego (τ_T) badanych pochodnych izoalloksazynowych w metanolu, wydajność kwantowa fotosensybilizowanej produkcji tlenu singletowego (ϕ_Δ), oraz jego czas życia (τ_Δ), w porównaniu z odpowiednimi danymi dla lumiflawiny i innych jej pochodnych oraz z danymi dla ryboflawiny</i> |
| 63. | Rysunek 44 | str.108 | <i>Zmiany w widmie absorpcji 5-deaza-ryboflawiny w metanolu, obserwowane podczas naświetlania promieniowaniem $\lambda = 366$ nm</i> |
| 64. | Schemat 6a | str. 109 | <i>Główne fotoprodukty powstające w procesie naświetlania 5-deaza-ryboflawiny w metanolu</i> |
| 65. | Schemat 6b | str. 109 | <i>Proponowane struktury trzeciego fotoproduktu powstającego w wyniku naświetlania 5-deaza-ryboflawiny w metanolu</i> |
| 66. | Rysunek 45 | str. 110 | <i>Zmiany w widmie absorpcji izo-6,7-ryboflawiny w metanolu, zachodzące pod wpływem naświetlania promieniowaniem o długości fali $\lambda = 366$ nm</i> |
| 67. | Schemat 7a | str. 111 | <i>Główne fotoprodukty powstające w procesie naświetlania izo-6,7-ryboflawiny w metanolu</i> |
| 68. | Schemat 7b | str. 111 | <i>Proponowane struktury dodatkowych fotoproduktów naświetlania izo-6,7-ryboflawiny</i> |
| 69. | Rysunek 46 | str. 112 | <i>Zmiany w widmie absorpcji obserwowane podczas naświetlania roztworu ryboflawiny w metanolu (rys.lewy) i 3-metylo-tetraacetylo ryboflawiny w metanolu, (rys. prawy), $\lambda_{na\acute{s}w.} = 366$ nm.</i> |
| 70. | Schemat 8 | str. 113 | <i>Schemat procesu naświetlania 3MeTARF w metanolu</i> |
| 71. | Schemat 9 | str. 114 | <i>Schemat procesu naświetlania i fotoprodukt powstający w wyniku fotolizy 3-benzylo-lumiflawiny w metanolu</i> |
| 72. | Tabela 15 | str. 114 | <i>Wartości wydajności kwantowych wyznaczone dla fotolizy ($\lambda = 366$ nm) pochodnych ryboflawiny w metanolu w warunkach beztlenowych</i> |
| 73. | Tabela 16 | str. 115 | <i>Wartości wydajności kwantowych wyznaczone dla fotolizy ($\lambda = 366$ nm) pochodnych ryboflawiny w metanolu w warunkach nieodtlenionych</i> |
| 74. | Schemat 10a | str. 115 | <i>Mechanizm reakcji tworzenia lumiflawiny w roztworach alkalicznych</i> |
| 75. | Schemat 10b | str. 116 | <i>Mechanizm reakcji tworzenia lumichromu w roztworach alkalicznych</i> |

Wykaz oznaczeń i skrótów stosowanych w pracy

Rfl	– ryboflawina
Lfl	– lumiflawina
5DRfl	– 5-deaza-ryboflawina
IR	– izo-6,7-ryboflawina
FAD	– dinukleotyd flawinowo-adeninowy
FMN	– mononukleotyd flawinowy
NADH	– dinukleotyd nikotynamidoadeninowy
NADPH	– fosforan dinukleotydu nikotynamidoadeninowego
DFT	– Teoria Funkcjonałów Gęstości
TD-DFT	– Czasowo-Zależna Teoria Funkcjonałów Gęstości
FMF	– formylo-metylo-flawina
MeOH	– metanol

Spis treści

I. Wstęp	1
II. Cel pracy	3
III. Część literaturowa	5
1. Charakterystyka pochodnych flawin	5
1.1 Wprowadzenie	5
1.2 Stany singletowe flawin	7
1.3 Stany trypletowe flawin	13
1.4 Właściwości kwasowo-zasadowe flawin	17
2. Reakcje przeniesienia protonu w związkach flawinowych	24
3. Porównawcza charakterystyka właściwości izo- i alloksazyn	36
4. Flawiny jako fotosensybilizatory tlenu singletowego	41
IV. Omówienie wyników badań własnych	58
1. Wprowadzenie	58
2. Właściwości absorpcyjne i emisyjne	60
3. Obliczenia metodą DFT i TD-DFT	76
4. Właściwości emisyjne pochodnych flawin w próbkach polikrystalicznych	98
5. Pochodne flawin jako fotosensybilizatory tlenu singletowego	103
6. Reaktywność fotochemiczna flawin w roztworach metanolowych	107
V. Część eksperymentalna	120
1. Część ogólna	120
2. Część szczegółowa	129
VI. Podsumowanie	134
VII. Literatura	138

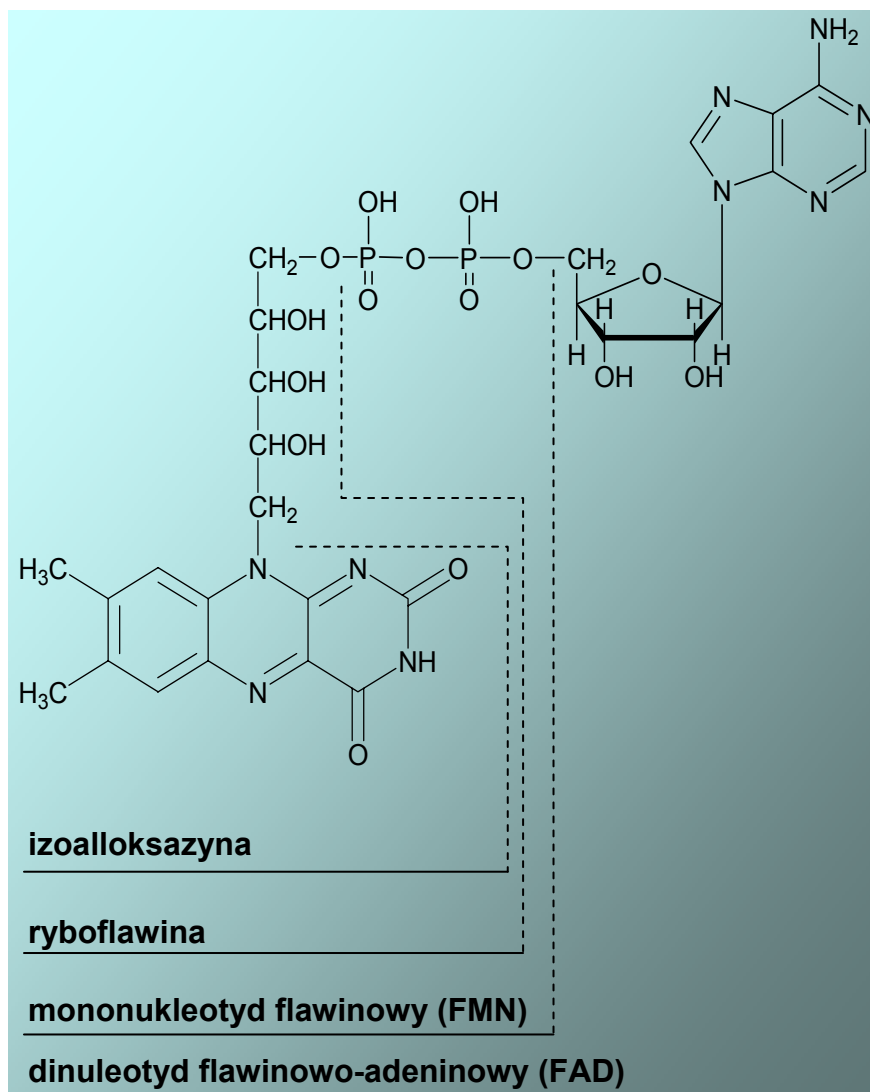
I. Wstęp

Flawiny stanowią dużą grupę związków zaangażowanych w procesy biologiczne takie jak np. fotosynteza czy fototropizm. Występują w produktach żywnościowych, są obecne w enzymach i fotoreceptorach, a dzięki temu są obecne w każdej niemal komórce organizmów żywych. Stanowią chromofory aktywne w procesach utleniania i redukcji zachodzących w komórkach. Zaburzenia w gospodarce ryboflawiną mogą powodować zaburzenia wzrostu i choroby skóry [1]. Badanie właściwości tych związków szczególnie w stanach wzbudzonych wiąże się z przekonaniem o ich istotnym udziale m. in. w tzw. procesie fotorecepcji światła niebieskiego [1].

Najbardziej znanymi przedstawicielami flawin są *ryboflawina*, *mononukleotyd flawinowy* (FMN), oraz *dinukleotyd flawinowo-adeninowy* (FAD). Związki te zaprezentowano na rys.1. Element wspólny i podstawowy w strukturze flawin stanowi pierścień izoalloksazynowy, którego nazwa systematyczna brzmi - 7,8-dimetylobenzo[g]pteridine 2,4(3*H*,10*H*)dione. Tradycyjnie określenie flawiny zarezerwowane jest dla izalloksazyn z podstawnikiem metylowym w pozycjach 7 i 8, czyli pochodnych 7,8-dimetyloizoalloksazyny. Często stosuje się jednak szerszą definicję flawin, w myśl której jako flawiny przyjmuje się wszystkie pochodne izoalloksazyn i alloksazyn.

Flawoproteiny są białkami zdolnymi do przenoszenia elektronów, w których rolę koenzymu spełniają związki z grupy flawin – FMN lub FAD. Związki te, związane kowalencyjnie lub niekowalencyjnie, zdolne są do katalizowania różnorodnych przekształceń o charakterze utleniająco-redukującym w układach biologicznych, np. w procesie oddychania.

Ponieważ zarówno FAD jak i FMN, zawierają ten sam typ pierścienia izoalloksazynowego, który stanowi grupę aktywną w procesach utleniania i redukcji, istotne jest dokładne zbadanie m. in. właściwości spektralnych i struktury elektronowej dla tej grupy związków [2].



Rysunek.1 Struktura związków flawinowych wykazujących aktywność biologiczną, według [3]

W ostatnich kilkudziesięciu latach przeprowadzono wiele badań dotyczących fotofizyki i fotochemii flawin *in vitro*, których cel koncentrował się na wyjaśnianiu mechanizmów rządzących działaniem tych związków w organizmach żywych [4]. Wyjaśnianie zagadnień związanych z właściwościami tego typu związków w układach modelowych pozwala m.in. lepiej zrozumieć i wyjaśnić znacznie bardziej skomplikowane procesy zachodzące w organizmach żywych.

W nurt badań dotyczących systemów modelowych, stosownie do zakresu zainteresowań i możliwości badawczych, nieśmiało wpisuje się także niniejsza praca.

II. Cel pracy

Duże zainteresowanie, które towarzyszy związkom z grupy flawin wynika głównie z ich niebagatelnej roli w funkcjonowaniu organizmów żywych. Szczególnie wiele uwagi poświęca się w badaniach zagadnieniom biochemicznym. Związki te mogą spełniać rolę katalizatorów w procesach, takich jak utlenianie pestycydów lub w reakcjach z pochodnymi fenolu i toluenu [5,6]. Wykazano także udział flawin w niszczeniu patogenów i inaktywacji wielu drobnoustrojów [7]. Niektóre badania wskazują na antynowotworową aktywność pochodnych ryboflawiny, a także udział w terapii innych chorób [8]. W aspekcie właściwości fotofizycznych i fotochemii wnikliwe badania nad flawinami pokazały, że pod wpływem promieniowania UV-Vis flawiny wydajnie obsadzają stany trypletowe i w stanie wzbudzonym wchodzi w reakcje z tlenem [9]. Właściwości te leżą u podstaw wspomnianych praktycznych zastosowań związków z grupy flawin. Skłania to do poszukiwania nowych analogów ryboflawiny, charakteryzujących się lepszymi parametrami spektroskopowymi i fotofizycznymi, takimi jak absorpcja promieniowania w zakresie długofalowym, duża wydajność przejścia międzysystemowego, duża wydajność tworzenia tlenu singletowego [6-9].

Celem niniejszej pracy było określenie właściwości spektralnych, fotofizycznych i fotochemicznych pochodnych 5-deaza-ryboflawiny, izo-6,7-ryboflawiny, 3-metylo-tetraacetylo-ryboflawiny i 3-benzylo-lumiflawiny w roztworach. i sprawdzenie ich jako potencjalnych fotosensybilizatorów tlenu singletowego

Zbadanie właściwości spektralnych flawin oraz procesów fotofizycznych, którym ulegają stanowi istotne zagadnienie w kontekście wnikliwego poznania procesów zachodzących w cząsteczkach flawin w stanie podstawowym i w stanach wzbudzonych. Dokładne opisanie tych procesów wymaga wyznaczenia podstawowych właściwości spektralnych oraz fotofizycznych, tzn. pomiaru widm absorpcji i emisji, wyznaczenia wydajności kwantowej fluorescencji, udziału procesów radiacyjnych i nieradiacyjnych w dezaktywacji stanów wzbudzonych, pomiaru czasu życia fluorescencji. Wykonanie pomiarów absorpcji przejściowej pozwala na zapoznanie się z procesami zachodzącymi w trypletowych stanach wzbudzonych. Zaplanowano zastosowanie metod obliczeniowych DFT i TD-DFT do wyznaczenia energii przejść pomiędzy stanami singletowymi i trypletowymi, oraz wyznaczenie konfiguracji przejść pomiędzy tymi stanami. Zestawienie otrzymanych w wyniku obliczeń danych z wynikami eksperymentalnymi otrzymanymi z

pomiaru widm absorpcji i absorpcji przejściowej pozwala na poszerzenie charakterystyki badanych związków we wzbudzonych stanach singletowych i trypletowych. W ramach realizacji niniejszej pracy zaplanowano także wykonanie pomiarów absorpcyjnych i emisyjnych dla próbek polikrystalicznych badanych związków. Badania te umożliwiają zaobserwowanie wpływu oddziaływań pomiędzy cząsteczkami w sieci krystalicznej.

Celem było zbadanie wykorzystania badanych pochodnych jako fotosensybilizatorów tlenu singletowego. W tym celu wyznaczono parametry fotofizyczne stanów trypletowych, takie jak czas życia stanu trypletowego dla poszczególnych pochodnych i wydajność kwantową sensybilizowanego tworzenia tlenu singletowego.

Ponadto zaplanowano przeprowadzenie reakcji fotolizy badanych związków w roztworze metanolowym i wyznaczenie wydajności kwantowych tego procesu. Podjęto także próbę zidentyfikowania głównych fotoproduktów reakcji fotochemicznych, którym ulegają badane pochodne.

III. Część literaturowa

1. Charakterystyka pochodnych flawin

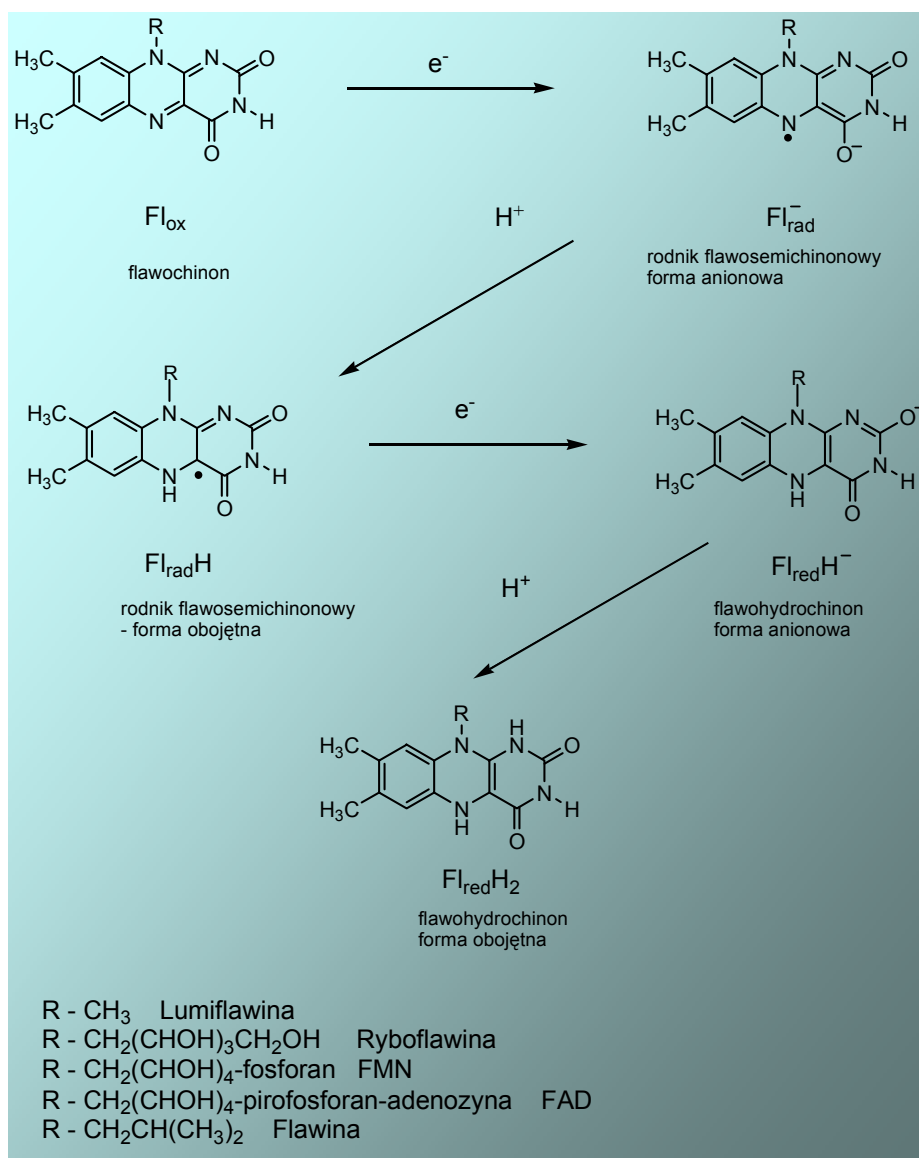
1.1 Wprowadzenie

Flawoenzymy stanowią rodzinę białek różnorodnych pod względem strukturalnym i funkcjonalnym, posiadających właściwości utleniająco-redukujące. Katalizowanie ogromnej liczby biotransformacji możliwe jest dzięki komponentowi flawinowemu, który w strukturze białkowej pełni rolę koenzymu. Reakcje te mogą odbywać się poprzez przeniesienie elektronu, według mechanizmu jedno- i dwuelektronowego, w szerokim zakresie potencjału. Właściwości utleniająco – redukujące flawin są kontrolowane przez niekowalencyjne oddziaływania pomiędzy apoenzymem a flawiną, poprzez wiązania wodorowe lub aromatyczne oddziaływania warstwowe [10].

Komponenty flawinowe (FAD, FMN), jako składniki enzymów biorą udział w procesach katalizowania wielu biologicznych reakcji o charakterze redoks, m.in. dehydrogenacji *dinukleotydu nikotynamidoadeninowego* (NADH) i *fosforanu dinukleotydu nikotynamidoadeninowego* (NADPH), utlenianiu amin do imin, tworzeniu i rozpadzie mostków disiarczkowych, aktywacji tlenu cząsteczkowego, [1] i prace tam cytowane. Ponadto uczestniczą w wielu reakcjach zachodzących w błonach komórkowych, mitochondriach czy cytoplazmie komórek. Działają też jako fotoreceptory światła niebieskiego w roślinach, np. w takich zjawiskach jak fototropizm [11].

Zdolność flawoenzymów do udziału w reakcjach przeniesienia tak jednego jak i dwóch elektronów umożliwia im działanie pomiędzy donorem dwóch elektronów (np. NADH) i akceptorem jednego elektronu (np. hemowy atom Fe). Analogicznie do chinonów, flawiny dysponują trzema miejscami utlenienia. Dzięki temu mogą występować w różnych formach jako: całkowicie utleniona forma flawochininowa (Fl_{ox}); rodnik flawosemichinonowy, czerwony w formie anionowej (Fl_{rad}^-) lub niebieski w formie obojętnej ($Fl_{rad}H$); oraz dwu-elektronowo-zredukowany flawohydrochinon, również istniejący w dwóch formach anionowej ($Fl_{red}H^-$) lub obojętnej ($Fl_{red}H_2$). Odpowiednie struktury przedstawiono na schemacie 1.

Schemat 1, według [12]



Cząsteczka flawiny w różnych formach utlenienia
(struktury proponowane przez Niemz i współpr. [12])

1.2 Stany singletowe flawin

Widma absorpcji flawin

Podstawowym elementem struktury ryboflawiny i jej pochodnych jest izoalloksazyna (rys.1). Taka struktura, zawierająca trójczałonowy pierścień aromatyczny, składający się z pierścienia benzenowego, pirazynowego i pirymidynowego oraz podwójny układ laktamowy, powoduje, że związki tego typu wykazują charakterystyczne właściwości spektralne absorbując promieniowanie elektromagnetyczne z zakresu ultrafioletu i światła widzialnego [13].

Widma absorpcji flawoprotein w świetle widzialnym i bliskim ultrafiolecie kryją w sobie wiele informacji o strukturze i reaktywności związków. Chromofor izoalloksazynowy jest wyjątkowo czuły na zmiany środowiska powodowane przez przyłączenie podstawników do pierścienia lub zmiany konformacyjne całej cząsteczki, a także na reakcje chemiczne, którym ulegają flawiny. Informacje dotyczące wpływu środowiska na właściwości flawin, znajdujące m.in. swoje odzwierciedlenie w widmach absorpcji pozostają przedmiotem intensywnych badań. Pomocne w tych badaniach są niewątpliwie obliczenia kwantowe wykonywane dla układów modelowych i porównanie wyników tych obliczeń z rezultatami uzyskanymi z eksperymentu. Przy założeniu znacznego rozwoju metod obliczeń kwantowych i usprawnień samego sprzętu obliczeniowego, powinno być możliwe dostarczanie podobnych danych również dla flawin wbudowanych w białka [14].

Widmo absorpcji ryboflawiny w roztworze wodnym składa się z czterech pasm, których maksima położone są przy długościach fali 220 nm ($45,5 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$), 265 nm, ($37,7 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$) 375 nm ($26,7 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$), i 446 nm ($22,4 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$). Pasma absorpcji charakteryzują się molowymi współczynnikami absorpcji, rzędu $10^4 \text{ dm}^3 \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ [15,16]. Położenie pasm absorpcji oraz molowe współczynniki absorpcji zależą od środowiska w jakim znajduje się chromofor flawinowy. To zagadnienie, choć samo w sobie podstawowe, jednocześnie wydaje się być jednym z kluczowych dla zrozumienia funkcjonowania tych związków w układach biologicznych [17].

Pasma absorpcji przy długości fali 375 nm ($26,7 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$) pochodzi prawdopodobnie od przejścia $\pi-\pi^*$, chociaż z nowszych obliczeń wynika, że w tym przejściu pewien udział może mieć również przejście $n-\pi^*$, które angażuje elektron z niewiążącej pary elektronowej zlokalizowanej na orbitalu atomu N(1) pierścienia izoalloksazynowego.

Wraz ze wzrostem polarności rozpuszczalnika widoczny jest wzrost intensywności pasma położonego przy 375 nm [15].

Położenie pasm absorpcji flawin zależy od oddziaływań specyficznych tak wewnątrzjaki i międzycząsteczkowych. Dla 3-metylo-lumiflawiny w chloroformie bardziej krótkofalowe pasmo absorpcji położone jest przy 347 nm ($28,8 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$), przy zmianie rozpuszczalnika na protyczny obserwuje się przesunięcie tego pasma w kierunku fal dłuższych, maksimum pasma w wodzie położone jest przy 369 nm ($27,1 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$). Przesunięcie to odzwierciedla destabilizację pary elektronowej na niewiążącym orbitalu atomu N(1) spowodowaną powstawaniem wiązania wodorowego [15,17].

Według Heelis'a [15]., pomiary widm w niskich temperaturach nie dają jednoznacznej odpowiedzi dotyczącej struktury oscylacyjnej flawin w zakresie bliskiego UV, a co za tym idzie rodzajów przejść pomiędzy poziomami wibracyjnymi w cząsteczce. Wysokie molowe współczynniki absorpcji długofalowego maksimum absorpcji wskazują, że dla ryboflawiny przejście przy ok. 450 nm ma charakter $\pi-\pi^*$. Na podstawie obliczeń kwantowo-mechanicznych przewidziano, że odpowiednie przejście o najniższej energii ma charakter $\pi-\pi^*$ i jego energia zbliżona jest do wartości $22,2 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$ (450 nm), co wskazuje na dużą zgodność wyników obliczeń teoretycznych z rezultatami eksperymentu. Pasma absorpcji nie ulega przesunięciu przy zmianie rozpuszczalnika od wody do rozpuszczalnika o mniejszej polarności, co sugeruje, że symetria najniższego przejścia elektronowego została przypisana prawidłowo jako $\pi-\pi^*$ [15].

W pozycjach N(1), N(3), N(5) i N(10) oraz na atomach tlenu w pozycjach C(2)=O i C(4)=O pierścienia izoalloksazynowego, zlokalizowane są niewiążące pary elektronowe, a więc możliwe są w cząsteczce izoalloksazyn również przejścia typu $n-\pi^*$. W cząsteczkach flawin z powodu braku symetrii przejścia typu $n-\pi^*$ mogą być intensywne. Jednakże często przejścia typu $n-\pi^*$ znajdują się w sąsiedztwie znacznie bardziej intensywnych przejść typu $\pi-\pi^*$ [4,15].

Znany jest też wpływ podstawników na kształt widm absorpcji flawin. Visser i współpr. [18] zauważyli, że obecność dodatkowych podstawników metylowych w cząsteczce izoalloksazyn ma wpływ na kształt widma absorpcji, położenie maksimów absorpcji, a także na wartości molowego współczynnika absorpcji. Analiza zmian w widmach absorpcji pochodnych izoalloksazyny zawierających podstawniki metylowe w cząsteczce pokazała [18], że w roztworach rozpuszczalników o wzrastającej polarności krótkofalowe pasmo absorpcji ulega niewielkim zmianom, podczas gdy pasmo bardziej długofalowe podlega wyraźnemu przesunięciu batochromowemu. Ponadto zarówno liczba

podstawników jak i pozycje podstawienia poszczególnych grup metylowych decydują o zmianach w widmach absorpcji poszczególnych związków [18]. Badania Sikorskiej i współpr. [19] dotyczące potwierdziły, że dodatkowe podstawniki w cząsteczce 3,10-dimetyloizalloksazyny obecne w pozycjach 6, 7, 8 i 9 powodują charakterystyczne zmiany w widmach absorpcji i emisji. Ponadto obecność grup metylowych w pozycjach C(6) i C(9) powoduje obniżenie wartości wydajności kwantowej fluorescencji i skrócenie czasu życia fluorescencji. Natomiast podstawnik metylowy w pozycji C(7) wywołuje efekt przeciwny, a maksimum fluorescencji ulega przesunięciu w kierunku fal dłuższych, [19] i prace tam cytowane. Elektronodonorowa grupa w pozycji C(8) powoduje wzrost aktywności utleniającej pierścienia izalloksazynowego [20].

Z danych teoretycznych publikowanych dla alloksazyn i izalloksazyn [19,21,22] wynika, że w cząsteczkach flawin obok najniżej energetycznie położonych wzbudzonych stanów singletowych o konfiguracji (π, π^*) obecne są blisko położone stany o konfiguracji (n, π^*) . Ponieważ, jak pokazała Sikorska i współpr. [19], położenie stanów (π, π^*) zależy od położenia podstawników metylowych w pierścieniu izalloksazynowym, w cząsteczkach niektórych pochodnych izalloksazyn możliwa jest inwersja stanów o konfiguracji (n, π^*) i (π, π^*) co ma istotny wpływ na właściwości spektralne i fotofizyczne tych związków.

Z badań Weigel'a i współpr. [23], dotyczących fotoindukowanych procesów dla ryboflawiny w wodzie i DMSO wynika, że mieszanie stanów $^1\pi-\pi^*$ i $^1n-\pi^*$ zachodzi przez sprzężenie wibronowe w femtosekundowej skali czasowej (~ 20 fs) po wzbudzeniu. Obsadzanie stanów zachodzi pod kontrolą rozpuszczalnika, zależy więc głównie od oddziaływań cząsteczek związku z cząsteczkami rozpuszczalnika. Proces jest kontrolowany przez solwatację. Mieszanie stanów powoduje poszerzenie pasm absorpcji, zarówno w wodzie jak i DMSO.

Właściwości emisyjne flawin

Związki typu flawin fluoryzują w roztworach wodnych w temperaturze pokojowej. Widma fluorescencji wykazują maksimum przy około 530 nm ($18,9 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$). W rozpuszczalnikach mniej polarnych od wody rejestruje się przesunięcie maksimum emisji w kierunku fal krótszych i pojawienie się struktury subtelnej widma. Badania w niskich temperaturach wykazały znaczne przesunięcie hipsochromowe widma, które wiąże się z

zablokowaniem ruchów oscylacyjnych w cząsteczce, pozwalając na wyznaczenie energii przejścia 0-0 [15,17].

W roztworach wodnych o pH = 7 flawiny wykazują wydajność kwantową fluorescencji ok. $\phi = 0,25$ (dla lumiflawiny, ryboflawiny, FMN), natomiast w mieszaninie dioksan-woda (90:10 v/v) wydajność kwantowa rośnie do wartości 0,52, aby w samym dioksanie osiągnąć wartość $\phi = 0,72$. Uważa się, że w przypadku flawin fluoryzują wyłącznie formy obojętne [15,17]. Flawiny wzbudzone promieniowaniem o różnej długości fali nie wykazują zmian kształtu widma emisji ani wartości wydajności kwantowej, co sugeruje, że emitują ze stanu S_1 , a wyższe stany wzbudzone dezaktywują się do tego stanu poprzez konwersję wewnętrzną [15].

Zauważono również, że w acetonitrylu wydajność kwantowa fluorescencji wzrasta w porównaniu z odpowiednimi wartościami otrzymanymi dla roztworów wodnych. Yagi [24] podaje, że wydajność kwantowa fluorescencji maleje, a pasmo fluorescencji ulega poszerzeniu wraz ze wzrostem polarności rozpuszczalnika protycznego. Zjawisko to tłumaczy się udziałem wiązań wodorowych pomiędzy cząsteczkami protycznego rozpuszczalnika i flawiny. Wiązania wodorowe mogą także wpływać na stopień sprzężenia spin-orbita w stanie S_1 , wpływając w ten sposób na szybkość przejścia międzysystemowego i w konsekwencji wydajność kwantową fluorescencji. Na podstawie obliczeń przewiduje się, że najbardziej podatnym na powstawanie wiązań wodorowych miejscem pierścienia izoalloksazynowego jest pozycja N(1), charakteryzująca się najsilniejszymi właściwościami zasadowymi [15,17,24].

Czas zaniku fluorescencji w wodzie (pH = 7) lumiflawiny, ryboflawiny i FMN jest jednakowy i wynosi 5 ns, a dla FAD wyznaczona wartość czasu życia fluorescencji to 2,3 ns [15] i prace tam cytowane. Podane przez Grodowkiego i współpr. [25] czasy życia fluorescencji pochodnych flawin w wodzie (pH = 2,2) są niższe i wynoszą odpowiednio 2,5 i 2,4 ns dla lumiflawiny i ryboflawiny.

W sposób znaczący fluorescencja flawin jest wygaszana, gdy flawiny są związane z białkami w enzymach. Wyjaśnienie mechanizmu wygaszania fluorescencji we flawoenzymach może dostarczyć wiele istotnych informacji dotyczących środowiska, w którym znajdują się cząsteczki flawin [15]. Nakashima i współpr. [26] wyznaczyli wydajność kwantową fluorescencji FAD związanego z proteiną. Jej wartość zależy od stężenia badanego enzymu i dla niskich stężeń (1 μM) wynosi $\phi = 0,25$, tyle ile dla flawin w wodzie. Dla dużych stężeń enzymu (100 μM) wartość ta maleje do wartości 0,12.

W przypadku flawin, do opisu zmian intensywności fluorescencji konieczne jest użycie dwóch mechanizmów - tworzenie niefluoryzującego kompleksu w stanie podstawowym pomiędzy flawiną i cząsteczką wygaszacza oraz mechanizm wygaszania dynamicznego. W myśl mechanizmu dynamicznego cząsteczka ulega wzbudzeniu, a następnie na skutek zderzeń czy też oddziaływań z cząsteczkami wygaszacza jej fluorescencja ulega wygaszaniu. Dla flawin dominujący jest proces kompleksowania w stanie podstawowym. Dzięki pomiarom czasu życia fluorescencji stwierdzono jednak, że w niewielkim stopniu w procesie wygaszania ma też udział mechanizm dynamiczny, jako że czas życia stanu wzbudzonego ulega nieznacznemu skróceniu [15].

Uzyskane przez Nakashimę i współprac. [26] dane dotyczące wydajności kwantowej fluorescencji FAD w obecności proteiny pokazują, że fluorescencja FAD w zastosowanych warunkach zostaje wygaszona w procesie dynamicznym. Z przytaczanych przez Nakashimę wcześniejszych badań wynika, że w roztworze wodnym w obrębie samej cząsteczki FAD powstaje niefluoryzujący kompleks pomiędzy flawiną a adeniną, angażujący 82% FAD, a obserwowana fluorescencja pochodzi od pozostałych niezwiązanych cząsteczek tego związku. W ten sposób jedynie cząsteczki FAD niezwiązane w kompleksie mogą podlegać wygaszaniu dynamicznemu. Ponadto z przedstawionych danych wynika, że cząsteczki aminokwasów o właściwościach elektrondonorowych, takie jak tryptofan czy tyrozyna, także mogą znacząco wygaszać fluorescencję FAD. Sugeruje się, że w tym przypadku możliwe jest przeniesienie elektronu od aminokwasu do pierścienia izoalloksazynowego, [26] i prace tam cytowane.

Fluorescencja flawin jest wydajnie wygaszana jony jodkowe i kationy metali przejściowych [15] i prace tam cytowane. Stany wzbudzone flawin wygaszane są także przez aminy poprzez mechanizm przeniesienia elektronu od aminy do cząsteczki flawiny, z utworzeniem formy przejściowej o charakterze *charge-transfer*. Z rezultatów Porcal i współprac. [27] wynika, że stałe wygaszania stanów singletowych i trypletowych flawin przez alifatyczne donory elektronu mają niższe wartości niż stałe wygaszania przez donory aromatyczne o tym samym potencjale utleniania. Dla ryboflawiny w stanie singletowym w obecności aniliny w roztworze metanолоwym stała wygaszania wynosi $11,7 \times 10^9 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$, podczas gdy w obecności trietyloaminy przyjmuje wartość $2,6 \times 10^9 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [27].

Prowadzone przez Platz'a i współprac.[28] badania reakcji tetraacetylo-ryboflawiny (TARF) z indolem i guanozyną, pokazały, że związek we wzbudzonym stanie trypletowym jest wygaszany przez obydwa związki, odpowiednio ze stałą szybkości dla reakcji z indolem $k_q = 4,5 \times 10^9 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ i dla reakcji z guanozyną $k_q = 1,0 \times 10^8 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Z badań z

zastosowaniem czasowo-zależnej spektroskopii IR wynika, że TARF reaguje z guanozyną tworząc rodnik hydroflawinowy poprzez mechanizm przeniesienia elektronu i przeniesienia protonu.

Dla flawin obserwuje się zjawisko fluorescencji opóźnionej typu E i typu P. Fluorescencja typu E, pojawia się przy tej samej długości fali co zwykła fluorescencja, lecz posiada znacznie dłuższy czas życia np. dla ryboflawiny 58 ms, dla FMN 72 ms [15]. Fluorescencja typu P pochodzi od wzbudzonego dimeru lub wyższych kompleksów, które tworzą się w rozpuszczalnikach o małej polarności, [15] i prace tam cytowane.

1.3 Stany trypletowe flawin

Widma fosforescencji flawin

Związki z grupy flawin wykazują fosforescencję w niskich temperaturach z maksimum przy długości fali ok. 600 nm. Grodowski i współpr. [25] podaje, że wydajność przejścia międzysystemowego dla flawin w roztworach w temperaturze pokojowej jest duża i dla lumiflawiny w roztworze etanolowym wynosi $\phi_{ISC} = 0,3$. Obserwowaną fosforescencję charakteryzuje natomiast stosunkowo niska wydajność kwantowa ($\phi_p = 0,0012$ w etanolu, 77 K). Pomimo znacznego udziału przejścia interkombinacyjnego zanik stanu trypletowego w tego typu związkach musi więc odbywać się poprzez procesy nieradiacyjne. Wartość czasu życia fosforescencji w temperaturze 77 K określono na poziomie $\tau \sim 0,1-0,2$ s i zależy ona od rodzaju flawiny i zastosowanego rozpuszczalnika. Heelis [15] podaje, że w kwaśnych szklach etanolowych widmo fosforescencji formy kationowej flawin przesunięte jest w kierunku fal krótszych w stosunku do widma formy obojętnej [15,29].

Dla ryboflawiny pasmo fosforescencji obserwuje się w temperaturze 77 K z maksimum przy długości fali 620 nm, oraz ramieniem przy 660 nm. Czas życia fosforescencji dla ryboflawiny i FMN wynosi około 0,2 s bez względu na zastosowany układ rozpuszczalników, w zakresie temperatury od 77 K do 113 K [30].

Dla flawin w roztworach w temperaturze pokojowej czas życia fosforescencji wynosi 10 – 100 μ s i ulega znacznemu skróceniu na skutek wygaszania przez cząsteczki flawiny w stanie podstawowym. Z badań fosforescencji wynika, że dimery flawin w stanie trypletowym emitują fosforescencję o niższej energii i wykazują krótszy czas życia niż w monomerach [15].

W starszych pracach Sun i współpr. [4] zauważyli, że w rozpuszczalnikach polarnych, w temperaturze pokojowej wydajność kwantowa fluorescencji jest stosunkowo niska, podczas gdy wydajność kwantowa fosforescencji stosunkowo wysoka. Natomiast w rozpuszczalnikach niepolarnych w niskich temperaturach obserwuje się spadek wartości ϕ_{ISC} z jednoczesnym wzrostem wydajności kwantowej fluorescencji, co wskazuje, że na obsadzanie stanów trypletowych istotnie wpływa temperatura oraz polarność rozpuszczalnika [4].

Wyniki dotyczące zasadowości formy podstawowej w stosunku do formy wzbudzonej nie są jednoznaczne. Odwołanie się do rezultatów obliczeń teoretycznych dotyczących gęstości elektronowej wskazuje, że w formie utlenionej [15];

- pozycja N(1) jest najbardziej zasadowa w stanie podstawowym,
- pozycja N(5) jest najbardziej zasadowa we wzbudzonym stanie trypletowym.

Wobec tego, fosforescencja obserwowana w szklwie w 77 K pochodzi od formy protonowanej powstałej jeszcze w stanie podstawowym, gdy proton związany jest w pozycji N(1). W roztworze natomiast flawina jest sprotonowana w pozycji N(5). Określone za pomocą fotolizy błyskowej pK_a odnosi się więc do stanu, gdy flawina jest sprotonowana w pozycji N(5) [15].

Na podstawie danych pomiarów polaryzacji wzbudzenia fosforescencji oraz wykonanych obliczeń teoretycznych Song i współpr. [4] zauważyli, że dla izoalloksazyn stan, z którego zachodzi fosforescencja posiada konfigurację $^3(\pi, \pi^*)$.

Struktura cząsteczki flawiny charakteryzuje się brakiem symetrii, wykazuje odchylenie od planarności oraz posiada dwa atomy węgla o charakterze karbonylowym i dwa atomy azotu o charakterze pirydynowym, co sprawia, że prawdopodobieństwo przejść $n \rightarrow \pi^*$ dla tej cząsteczki jest potencjalnie duże. W cząsteczkach związków heterocyklicznych stany o konfiguracji $n \rightarrow \pi^*$ wpływają na ich całkowitą luminescencję, ponieważ mogą uczestniczyć w sprzężeniu spin-orbita. Dla flawin sugeruje się więc znaczny udział sprzężenia spin – orbita pomiędzy stanami $^1(n, \pi^*)$ a $^3(\pi, \pi^*)$ [4,29].

Grodowski i współpr. [25] wykazali, że w rozpuszczalnikach polarnych wydajność kwantowa przejścia międzysystemowego jest duża, co pozostaje w zgodzie z postulowanym sprzężeniem spin – orbita pomiędzy stanami singletowymi (n, π^*) i trypletowymi o konfiguracji (π, π^*).

Czynnikiem, który decyduje o reaktywności flawin jest niewątpliwie fakt, że posiadają wydajnie obsadzone, długo żyjące stany trypletowe. Wartości stałych szybkości przejścia międzysystemowego dla FMN obliczone przez Salzmann i współpr. [31] (metody DFT/MRCI) wynoszą w roztworze wodnym ($k_{ISC} \sim 10^8 \text{ s}^{-1}$) i dla cząsteczek w stanie gazowym ($k_{ISC} \sim 10^9 \text{ s}^{-1}$). Konfiguracja trypletowych stanów flawin ($\pi-\pi^*$) nie sprzyja udziałowi w reakcjach redoks. Mimo to flawiny wykazują dużą aktywność w procesach utleniania i redukcji indukowanych światłem. Przyczyny tego zjawiska upatruje się w sprzężeniu wibronowym pomiędzy stanami $^3(\pi, \pi^*)$ i $^3(n, \pi^*)$. W związkach tych postuluje się bowiem istnienie blisko położonych najniższych trypletowych stanów wzbudzonych o symetrii $^3(\pi-\pi^*)$ i sąsiadujących z nimi stanów $^3(n-\pi^*)$. Taki układ powoduje, że w cząsteczkach tych związków mamy do czynienia ze stanem trypletowym określonym przez Heelisa jako *hybrydowy* [15,29].

W najnowszych pracach Braslavsky, Marian i współl. [32] sugerują natomiast, że przejście międzysystemowe w cząsteczkach pochodnych flawin (5-deaza-ryboflawina, 7,8-didemetylo-ryboflawina, 8-izopropilo-ryboflawina) w roztworze wodnym zachodzi pomiędzy stanem $S_1^1(\pi,\pi^*)$ a $T_2^3(\pi,\pi^*)$ poprzez sprzężenie spin-orbita.

Widma absorpcji przejściowej flawin

Stosunkowo długi czas życia stanu trypletowego powoduje, że reakcje pochodnych flawinowych w tym stanie posiadają istotne znaczenie z punktu widzenia fotochemii [33].

Grodowski i współpr. [25] zarejestrowali widma absorpcji przejściowej w odtlenionych roztworach wodnych o pH=2,2 dla lumiflawiny i ryboflawiny. Przy wzbudzeniu promieniowaniem o długości fali $\lambda = 347$ nm pojawiają się pasma absorpcji przejściowej, o krótkim czasie zaniku ($\tau_T \sim 10-20$ μ s), leżące w zakresie krótkofalowym ($\lambda \sim 300$ nm) oraz długofalowym ($\lambda \sim 400$ nm i $\lambda \sim 500$ nm). Ponadto zaobserwowano obecność charakterystycznego dla flawin intensywnego pasma przy około 640 nm. Porównanie wyników uzyskanych dla roztworów odtlenionych i nieodtlenionych oraz pomiarów wykonanych w szklkach (77 K), pozwoliło na przypisanie tych pasm jako charakteryzujących stan trypletowy.

Widmo absorpcji przejściowej zarejestrowane dla lumiflawiny w etanolu [25] wykazuje obecność pasma o dużej intensywności, leżącego przy ok. 380 nm. Szczątkowa absorpcja przejściowa $\lambda > 500$ nm, zanika w czasie 50-100 μ s. Pasma długofalowe (przy ok. 570 nm) przypisywane jest rodnikowi semichinonowemu, którego obecność w roztworze etanolowym postuluje się jako rezultat oddziaływania cząsteczek lumiflawiny w stanie trypletowym z cząsteczkami rozpuszczalnika. Pasma długofalowe odpowiada także pasmu opisanemu dla semichinonowego rodnika flawiny, zarejestrowanego w obojętnym roztworze wodnym [25].

Późniejsze badania Lu i współpr. [33,34], dotyczące wodnych roztworów ryboflawiny pokazały różnice w powstającym układzie fotoproduktów. Widmo absorpcji przejściowej uzyskane przy wzbudzeniu długością fali 248 nm składa się z pasm pochodzących od utlenionego rodnika ryboflawiny, uwodnionego elektronu oraz zredukowanego rodnika w stanie trypletowym. Taki rozkład produktów sugeruje powstawanie zarówno ryboflawiny w stanie wzbudzonym jak i reakcję fotojonizacji, a powstający utleniony rodnik ryboflawiny posiada silniejsze właściwości utleniające niż ryboflawina wzbudzona do

stanu trypletowego. Natomiast przy użyciu promieniowania wzbudzającego o długości fali 337 nm zaobserwowano powstawanie jedynie ryboflawiny w stanie trypletowym [33,34].

1.4 Właściwości kwasowo-zasadowe flawin

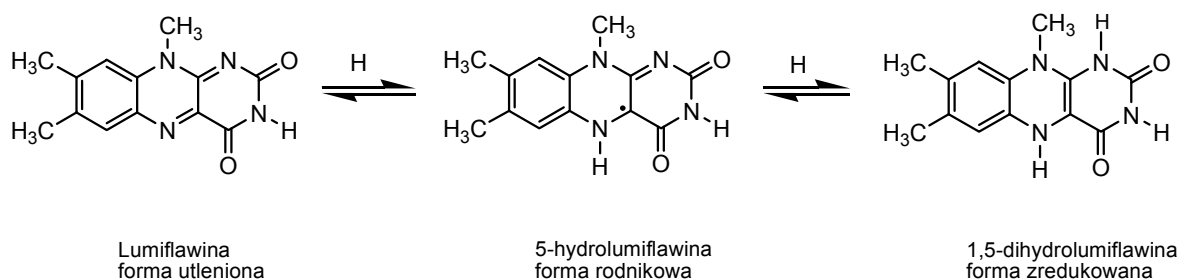
Pochodne ryboflawiny stanowią aktywne części wielu enzymów i jako takie są przedmiotem intensywnych badań, szczególnie w kontekście wyjaśniania ich roli w reakcjach enzymatycznych. Właściwości utleniająco - redukujące flawin badane są m.in., w zależności od podstawników obecnych w cząsteczce.

Układ_izoalloksazynowy, który stanowi podstawowy element strukturalny ryboflawiny i jej pochodnych, posiada skomplikowaną strukturę bogatą w wiele miejsc o potencjalnej aktywności w reakcjach przeniesienia protonu, przyłączenia atomu wodoru i wymiany elektronu.

Warunki protonowania

Związki typu flawin, wykazują tendencję do przyłączania lub odszczepiania protonu w roztworach wodnych. Badanie reakcji protonowania w przypadku flawin jest skomplikowane i trudne, jako że flawiny posiadają kilka miejsc aktywnych w reakcji przyłączania protonu czy atomu wodoru. Jak wspomniano wcześniej (Rozdział 1.1, Schemat 1) flawiny mogą występować w formie utlenionej, obojętnej oraz zredukowanej - całkowicie utleniona forma flawochininowa (Fl_{ox}); rodnik flawosemichinonowy, czerwony w formie anionowej (Fl_{rad}^-) lub niebieski w formie obojętnej ($Fl_{rad}H$); oraz dwuelektronowo-zredukowany flawohydrochinon, również istniejący w dwóch formach anionowej ($Fl_{red}H^-$) lub obojętnej ($Fl_{red}H_2$) [12]. W zależności od wartości pH roztworu, poszczególne formy występują w formie kationów, anionów lub w formie obojętnej (rys.3) [35,35]. W roztworze o pH obojętnym związki te występują w postaci flawochininowej $Fl_{ox}H$. Drössler i współpr. [35] badali zachowanie ryboflawiny w roztworach wodnych o różnym zakresie pH. Na podstawie widm absorpcji pokazano, że w roztworach silnie kwaśnych, $pH < 0.4$, ryboflawina obecna jest w formie kationowej. W zakresie wartości $0.4 < pH < 9.75$ dominuje forma obojętna, a powyżej $pH=9.75$ formia anionowa. W zakresie pH 3-7 widmo pochodzi od formy utlenionej $Fl_{ox}H$; w zakresie pH od 0.1 do -1.09 obecne są dwie formy związku $Fl_{ox}H$ i $Fl_{ox}H_2^+$; w pH 13.35 widmo pochodzi natomiast od formy anionowej Fl_{ox}^- [35].

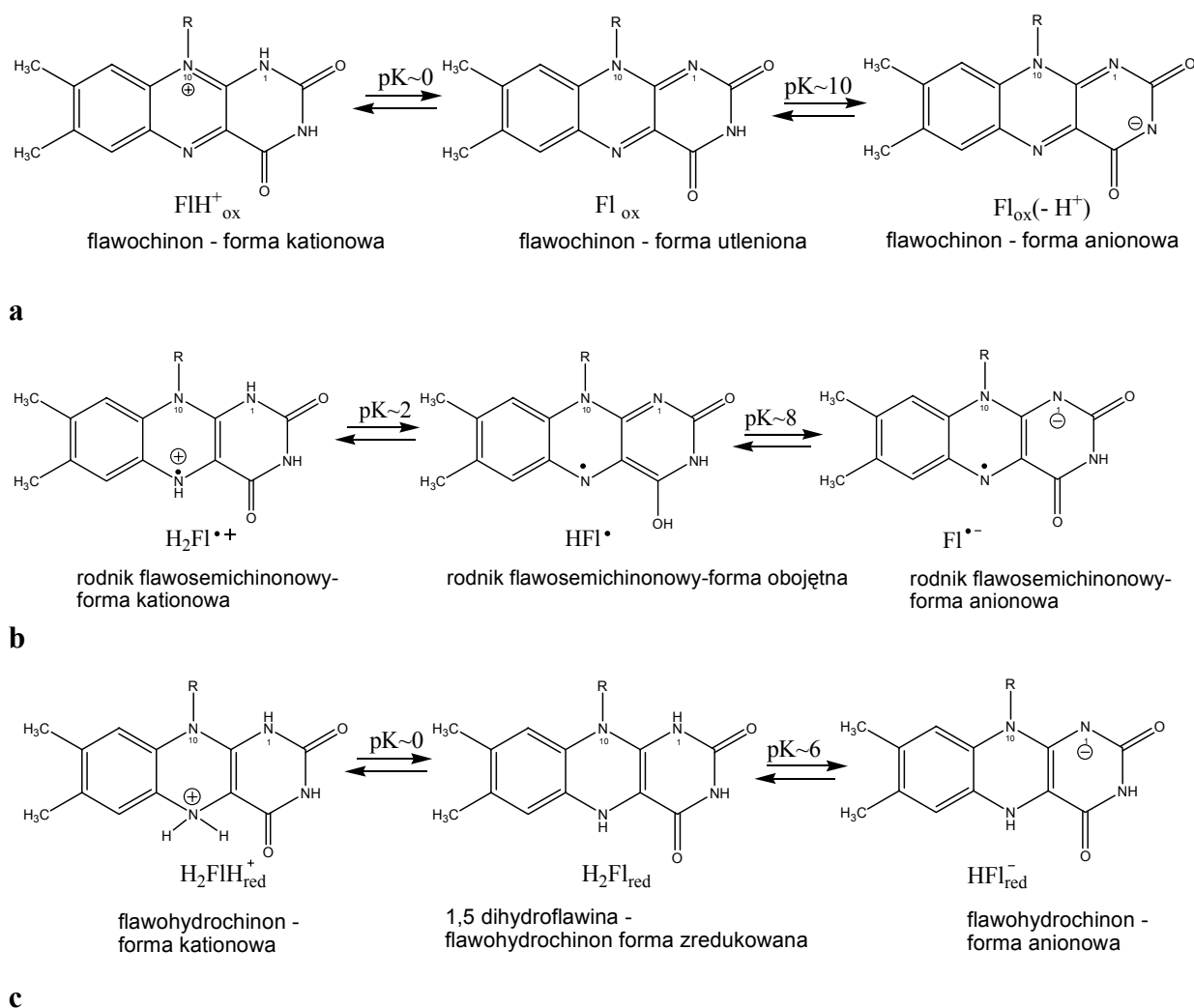
Na rysunku 2 pokazano formy utlenienia lumiflawiny, natomiast rysunek 3 prezentuje strukturę cząsteczki flawiny w różnych formach utlenienia w zależności od pH roztworu wraz z przybliżonymi wartościami pK.



Rysunek 2. Lumiflawina w trzech formach utlenienia, na podstawie [36]

Intensywność fluorescencji flawin i kształt widma zależą od pH roztworu. Przy wartościach $\text{pH} > 9$ obserwowany jest spadek intensywności fluorescencji, natomiast zmiana kształtu widma jest niewielka. W tych warunkach w roztworze cząsteczki flawin są zdeprotonowane zarówno w stanie podstawowym jak i we wzbudzonym stanie singletowym (pK_a i pK_a^* ok. 10). Natomiast w warunkach gdy $\text{pH} < 3.5$ obserwuje się również spadek intensywności fluorescencji, co wskazuje na stosunkowo niskie wartości pK_a . W różnych pH roztworu flawiny występują w formie obojętnej, utlenionej lub zredukowanej. Nie wszystkie formy fluoryzują w temperaturze pokojowej. Na podstawie wyników badań fluorescencji wykonanych metodą rozdzielczą w czasie wykazano, że czas życia formy kationowej $^1\text{FIH}^+$ jest zbyt krótki, aby mógł ustalić się stan równowagi protolitycznej w stanie wzbudzonym. Fluorescencję formy kationowej można zaobserwować w szklkach (77K). Jednakże zauważono, że kowalencyjne wiązanie pomiędzy pozycją N(1) i N(10) pierścienia izoalloksazynowego sprzyja pojawieniu się fluorescencji już w temperaturze pokojowej. Sztywność cząsteczki wpływa na udział procesów nieradiacyjnych w dezaktywacji stanu wzbudzonego cząsteczki. Ponadto zaobserwowano, że flawiny w rozpuszczalnikach niepolarnych fluoryzują z większą wydajnością niż w wodzie [15].

Wartości pK_a izoalloksazyn dla procesu protonowania w stanie podstawowym są znacznie niższe niż we wzbudzonym stanie trypletowym. Potwierdzają to obliczenia teoretyczne, w myśl których pozycja N(1) powinna wykazywać najsilniejsze właściwości zasadowe w stanie podstawowym, natomiast we wzbudzonym stanie trypletowym pozycja N(5) staje się bardziej zasadowa, co czyni ją najbardziej podatną na protonowanie [37-39].



Rysunek 3. Procesy utleniania i redukcji oraz równowagi kwasowo – zasadowe dla związków flawinowych (struktury proponowane przez Heelisa), według [15]

Na podstawie wyników analizy rentgenograficznej przyjmuje się, że cząsteczka w formie utlenionej (rys. 3a) jest płaska i częściowo posiada cechy aromatyczności. Jednakże pomiary spektroskopii NMR sugerują pewne odchylenie atomu N(10) od płaszczyzny cząsteczki obserwowane w rozpuszczalnikach aprotycznych. Dla formy zredukowanej analiza struktury krystalograficznej wykazuje obecność dwóch niemal płaskich części cząsteczki rozdzielonych osią przebiegającą od atomu N(5) do N(10). Podobnie interpretuje się też dane spektroskopowe oraz wyniki obliczeń uzyskane dla tej formy, które jako najbardziej stabilną przyjmują formę pofałdowaną. Przewiduje się, że w tej formie związek nie posiada charakteru aromatycznego. Dokładne określenie struktury formy rodnikowej okazuje się zagadnieniem skomplikowanym, ze względu na jej niestabilność i związane z tym trudności eksperymentalne. Z danych uzyskanych metodą EPR i ENDOR oraz z obliczeń *ab initio* wynika, że pierścień izoalloksazynowy dla formy

rodnikowej powinien posiadać strukturę komplanarną, natomiast obliczenia MINDO/3 wskazują jako najbardziej stabilną strukturę połańdowaną [36,40].

Li i współpr. [41] dowodzą, że pod wpływem protonowania zmienia się konformacja cząsteczek FAD i FMN, a w związku z tym właściwości cząsteczek w stanie wzbudzonym. Widmo absorpcji przejściowej wzbudzonego kationu flawiny różni się od odpowiednich widm dla anionu i dla formy obojętnej, co sugeruje zmiany konfiguracji elektronowej pod wpływem proponowania.

W enzymach (fotolizy) otoczenie białkowe FAD powoduje specyficzny rozkład ładunku, co reguluje elektrono-transferowe właściwości kofaktora flawinowego. Gęstości spinowe i elektronowe są najwyższe w pierścieniu pirazynowym i zewnętrznym pierścieniu pirymidynowym w cząsteczce FADH*. Nakładanie orbitali z układem π elektronowym adeniny jest wtedy największe. Taki układ ułatwia np. przeniesienie elektronu do i od dimerów cyklobutanowych pirymidyn (CPD, *cyclobutane pyrimidine dimer*) w procesie naprawy DNA [42].

Wiązania wodorowe

Wiązania wodorowe stanowią istotne zagadnienie z punktu widzenia aktywności związków flawinowych w reakcjach enzymatycznych. Istnienie możliwości powstawania połączeń o charakterze niekowalencyjnym jest bowiem istotą funkcjonowania organizmów żywych [43]. Oddziaływania niekowalencyjne takie jak wiązania wodorowe, oddziaływania warstwowe π - π i oddziaływania elektrostatyczne w enzymach uważane są za podstawowy czynnik regulujący właściwości utleniająco redukujące cząsteczki FMN i w konsekwencji kontrolujące katalityczną aktywność enzymu [44]. Wiązania wodorowe mogą powstawać pomiędzy cząsteczkami naładowanymi i nienaładowanymi i można je rozpatrywać jako stan przejściowy w procesie przeniesienia atomu wodoru pomiędzy kwasem a zasadą. W układach biologicznych donorem wodoru jest zwykle atom tlenu lub azotu kowalencyjnie związany z atomem wodoru, natomiast w roli akceptora najczęściej występują również atomy tlenu lub azotu pochodzące od innych grup funkcyjnych, np. pomiędzy grupami amidowymi (-NH) i karbonyłowymi (-CO) w cząsteczkach kwasów nukleinowych [43]. Również FMN związany jest w białku poprzez sieć wiązań wodorowych. Niekowalencyjne oddziaływania tego typu muszą wpływać na reaktywność FMN w stanie podstawowym i wzbudzonym [45].

Dwyer i współpr. [46] poszukiwali bezpośredniego dowodu na istnienie wiązania wodorowego wewnątrz cząsteczki koenzymu. Wyjaśniono funkcję jaką pełni wiązanie

wodorowe pomiędzy 4'-rybitylową grupą –OH w łańcuchu bocznym a atomem N(1) w pierścieniu izoalloksazynowym w stabilizowaniu formy zredukowanej flawoproteiny elektrono-transferowej. Analog zawierający flawoproteinę służy jako akceptor elektronu. Jednakże flawoproteina zawierająca 4'-deoxy-FAD nie może być ani donorem, ani akceptorem elektronu pochodzącego od enzymu flawoproteinowo-ubichinonowego, co sugeruje, że wiązanie wodorowe może pośredniczyć w przejściu elektronu pomiędzy dwiema proteinami utleniająco-redukującymi. Wewnątrzflawinowe wiązanie wodorowe stabilizuje formy semichinonową i hydrochinonową wywierając w ten sposób wpływ na utleniająco-redukujące właściwości flawin [46].

Łańcuch rybitylowy często determinuje wiązanie FAD i FMN we flawoenzymach [47,48]. Wykazano też, że ma on bezpośredni udział w procesach katalizowanych za pośrednictwem flawoprotein. Dla pewnych reakcji biochemicznych zachodzących w organizmach żywych wiązanie wodorowe powoduje aktywację substratu poprzez obniżenie wartości pK_a dla α protonu z łańcucha acylowego. Niektóre z badanych reakcji enzymatycznych są całkowicie zablokowane w przypadku zastąpienia w cząsteczce enzymu 2'-analogów FAD analogami FAD. Niektóre 2'-analogi FAD obniżają stabilność pewnych zredukowanych enzymów, co sugeruje znaczne zmiany potencjału redoks flawin [46,49,50]. Widma absorpcji uzyskane dla zmodyfikowanych protein [46], zawierających 4'-deoxy-FAD zachowują co prawda kształt widma natywnego FAD, jednakże maksimum absorpcji jest przesunięte w kierunku fal dłuższych o około 7 nm, a maksimum fluorescencji jest przesunięte o około 30 nm w stronę fal dłuższych [51].

Obecność wiązań wodorowych pomiędzy alloksazyną w stanie podstawowym a cząsteczkami, które mogą katalizować proces przeniesienia protonu, determinuje ten proces w stanie wzbudzonym. [52]. Jak pokazała Sikorska i współpr. [52] dla alloksazyn, kwasowość wiązania N(1) - H odgrywa kluczową rolę w procesie przeniesienia protonu, katalizowanym przez cząsteczki alkoholu. Wiązanie wodorowe powstaje bowiem pomiędzy atomem wodoru alloksazyny w pozycji N(1) a atomem tlenu w cząsteczce alkoholu. Autorzy pracy [52] zauważyli, że 5-deazalumichrom, który tautomeryzuje tylko w obecności kwasu octowego, wykazuje znaczną zasadowość atomu azotu N(10) w stanie podstawowym. Związek ten może tworzyć silniejsze wiązania wodorowe ze związkami protono-donorowymi w stanie podstawowym (kwas octowy), a w konsekwencji w stanie wzbudzonym może ulegać przeniesieniu protonu z większą wydajnością. Cząsteczka kwasu pełni rolę pomostu pomiędzy atomami azotu w pozycjach N(1) i N(10), a powstawanie kompleksu alloksazyna –kwas octowy zależy od właściwości kwasowo –

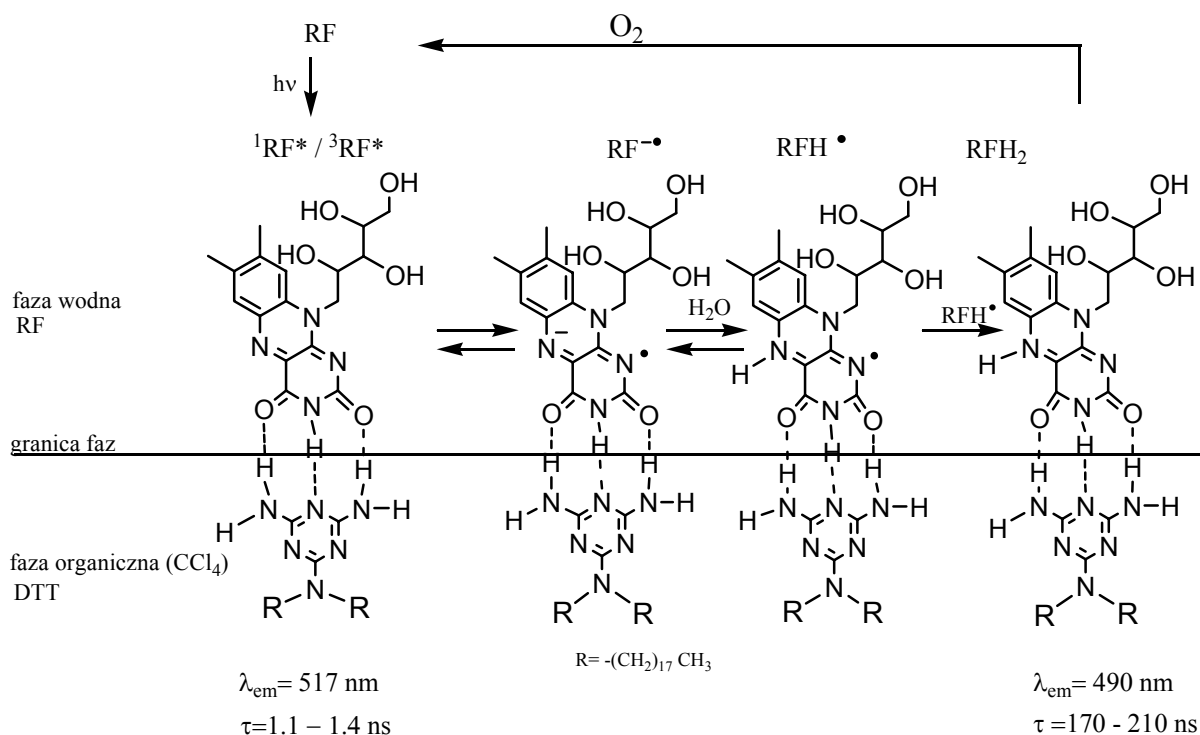
zasadowych w pozycjach N(1) i N(10) pierścienia alloksazynowego [52]. Natomiast wiązanie wodorowe w pozycji N(3) kofaktora flawinowego w mniejszym stopniu wpływa na właściwości utleniająco - redukujące flawoprotein. Zauważono [53], że wiązanie wodorowe pomiędzy atomem wodoru z N(3)H a grupą karboksylową aminokwasu w proteinie stabilizuje flawinę w formie utlenionej. Atom wodoru w pozycji N(5) pierścienia izoalloksazynowego wykazuje dominujący wpływ na stabilizowanie flawiny w stanie zredukowanym, w szczególności obojętnej formy semichinonowej [53].

Ishizaka i Kitamura [45] badali ryboflawinę jako układ modelowy. Wykazali, że indukowany światłem cykl reakcji utleniania i redukcji w cząsteczce ryboflawiny przebiega poprzez tworzenie potrójnego układu wiązań wodorowych pomiędzy ryboflawiną (RF) i pochodną triazynową (DTT, *N,N*-dioktadecyl-[1,3,5]triazyno-2,4,6-triamina) na granicy faz woda / CCl₄. Ponadto wykazano, że donorem protonu są zgromadzone na granicy faz cząsteczki wody, a powstanie kompleksu opartego na wiązaniach wodorowych jest pierwszym etapem w fotoindukowanym procesie przeniesienia elektronu i przeniesienia ładunku (*elektron transfer*) ET/CT (*charge transfer*) w całym opisanym cyklu reakcji redoks (**Schemat 2**, str. 23) [45].

FAD i aniony lumiflawiny badano metodą czasowo-zależnej spektroskopii w podczerwieni [54]. Autorzy zauważyli, że wiązania wodorowe powstające pomiędzy cząsteczkami FAD a cząsteczką rozpuszczalnika modyfikują wyraźnie widmo wibracyjne, powodując przesunięcie pasm w kierunku fal dłuższych. W stanie wzbudzonym system wiązań wodorowych pomiędzy FAD i proteiną ulega reorganizacji, co także powoduje przesunięcie widma w kierunku fal dłuższych.

Badanie flawin metodą spektroskopii ramanowskiej pozwala badać udział grup metylowych w pozycji C(8) pierścienia izoalloksazynowego w funkcji działania proteiny [55].

Schemat 2, według [45]



Fotoindukowany cykl reakcji utleniania i redukcji cząsteczki ryboflawiny
na granicy faz woda/ CCl_4

Na granicy faz wodnej (roztwór ryboflawiny) i organicznej (roztwór DTT) pomiędzy cząsteczkami tych związków powstaje układ trzech wiązań wodorowych. Pod wpływem impulsu światła w roztworze ryboflawiny generowany jest proces ET/CT w wyniku czego tworzy się anionorodnik $\text{RF}^{\bullet-}$. Pod wpływem cząsteczek wody anionorodnik ulega protonacji dając rodnik semichinonowy $\text{RFH}^\bullet$ ($\text{pK}_a \sim 8.4$) [45]. W kolejnym etapie rodnik semichinonowy podlega reakcji dysmutacji dając 1,5-dihydroflawinę RFH_2 i ryboflawinę RF . RFH_2 może ulegać utlenieniu do ryboflawiny pod wpływem tlenu cząsteczkowego obecnego w warunkach reakcji, zamykając w ten sposób cykl reakcji redoks [45].

2. Reakcje przeniesienia protonu w związkach flawinowych

Przeniesienie protonu w stanie wzbudzonym

Cząsteczka związku w różnych stanach elektronowych, podstawowym czy wzbudzonym, singletowym czy trypletowym, stanowi odrębne indywiduum z właściwymi sobie cechami, takimi jak: długość wiązań, kąty między wiązaniami, rozkład ładunku, wreszcie reaktywność chemiczna, stanowiąc zespół izomerów elektronowych [56].

Wzbudzenie impulsem energii powoduje zmianę rozkładu gęstości elektronowej niekiedy przegrupowanie atomów w cząsteczce, implikując zmiany jej właściwości kwasowo-zasadowych, co w końcowym efekcie może prowadzić do tautomeryzacji, czyli zjawiska wewnątrzcząsteczkowego przeniesienia protonu [57-61]. Przeniesienie protonu w cząsteczce związku aromatycznego powoduje znaczne zmiany elektronowe i strukturalne, którym mogą towarzyszyć znaczne zmiany momentów dipolowych i geometrii cząsteczki. Zmiany wewnątrzcząsteczkowe często odzwierciedlane są w obserwowanych efektach spektroskopowych, takich jak znaczne przesunięcie maksimum fluorescencji. Dynamika transformacji układu silnie zależy od natury rozpuszczalnika, głównie od jego zdolności do tworzenia wiązań wodorowych. Tautomery, jako różne indywidua charakteryzują się innymi właściwościami chemicznymi i fotochemicznymi. Tautomeryzacja stanowi więc bardzo istotne zagadnienie nie tylko z punktu widzenia fizyki, ale także chemii i biologii [58,62].

W ramach procesu przeniesienia protonu w stanie wzbudzonym wyróżnia się trzy grupy reakcji:

- międzycząsteczkowe przeniesienie protonu w molekularnych dimerach i heterodimerach, powstałych poprzez utworzenie wiązań wodorowych oraz w heterodimerach,
- przeniesienie protonu w układach aromatycznych z udziałem rozpuszczalnika,
- wewnątrzcząsteczkowe przeniesienie protonu.

Zasadniczą trudność w obrębie podanej klasyfikacji stanowi rozróżnienie procesu wewnątrzcząsteczkowego i efektów rozpuszczalnikowych, gdy te ostatnie są źródłem reakcji konkurujących z przeniesieniem protonu zarówno w stanie podstawowym jak i wzbudzonym, zaburzając obraz samego procesu przeniesienia protonu [63].

Dla większości reakcji wewnątrzcząsteczkowego przeniesienia protonu mamy do czynienia z przeniesieniem protonu pomiędzy następującymi grupami donorowymi i akceptorowymi [58]:

- od atomu tlenu grupy hydroksylowej do atomu tlenu grupy karbonylowej,
- od atomu tlenu grupy hydroksylowej do heterocyklicznego atomu azotu,
- od atomu azotu do heterocyklicznego atomu azotu,
- od atomu azotu do atomu węgla.

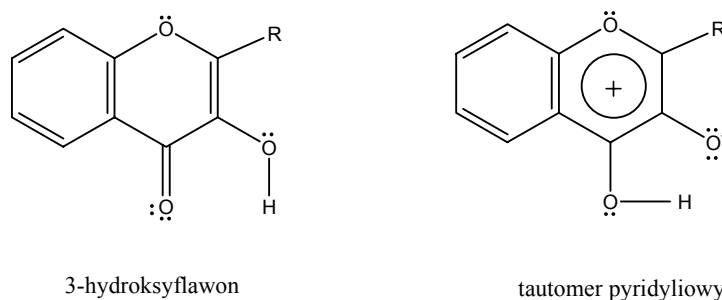
Do opisu zjawiska tautomeryzacji, stosuje się cztery podstawowe mechanizmy, wśród których wyróżnia się [57,57,58].

1. ultra-szybkie przeniesienie protonu wzdłuż wewnątrzcząsteczkowego wiązania wodorowego (*intrinsic intramolecularproton transfers*); obserwowane np. w 3-hydroksyflawonie,
2. jednoczesne przeniesienie dwóch protonów (*concerted biprotonic transfers*); obserwowane np. w dimerze 7-azaindolu,
3. statycznie i dynamicznie katalizowane przeniesienie protonu (*static and dynamic catalysis of proton transfer*); zachodzące np. w lumichromie, adeninie i guaninie),
4. wymiana protonu (*proton relay transfer*), zachodzące np. w 7-hydroksychinolinie).

Cząsteczki tego samego związku mogą ulegać reakcji przeniesienia protonu według kilku różnych mechanizmów w zależności od tego czy zachodzi ona wyłącznie w badanej cząsteczce, czy też z udziałem innych molekuł [57]. Uważa się, że tylko mechanizm ultraszybkiego wewnątrzcząsteczkowego przeniesienia protonu (*intrinsic intramolecular proton transfers*) opisuje rzeczywisty proces wewnątrzcząsteczkowego przeniesienia protonu, pozostałe natomiast charakteryzują międzycząsteczkowe przeniesienie protonu w klatce rozpuszczalnika [58].

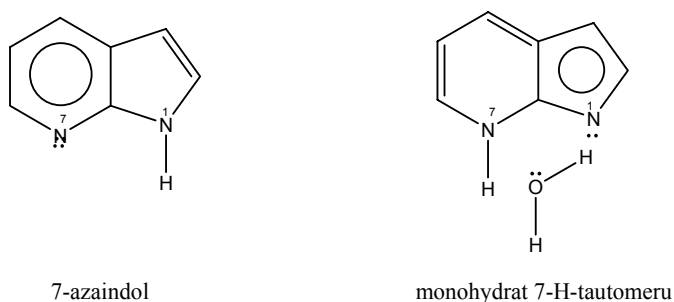
Poniżej zaprezentowano charakterystyczne przykłady dla poszczególnych przypadków.

1. Ultra-szybkie przeniesienie protonu wzdłuż wewnątrzcząsteczkowego wiązania wodorowego (*intrinsic intramolecular proton transfers*) zakłada tworzenie wiązania wodorowego w obrębie cząsteczki pomiędzy grupą donorową i akceptorową (rys. 4).



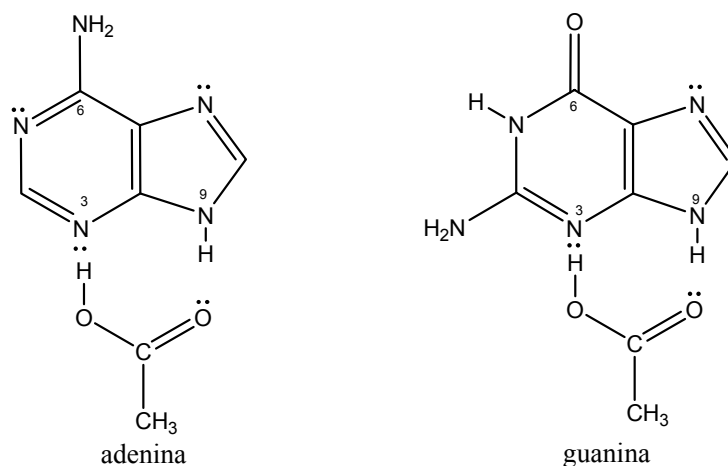
Rysunek 4. Struktury tautomeryczne powstające w czasie procesu przeniesienia protonu w cząsteczce 3-hydroksyflawonu obserwowane w szklach węglowodorowych, według [57]

2. Jednoczesne przeniesienie dwuprotonowe (*concerted biprotonic transfers*), w którym donor protonu znajduje się w znacznej odległości od akceptora i w związku z tym wymaga pośrednictwa cząsteczki rozpuszczalnika lub utworzenia wodorowo związanego dimeru; w cząsteczce 7-azaindolu ten typ tautomerizacji obserwowany jest w etanolu, w eterze etylowym lub dioksanie zawierających niewielką ilość wody, co umożliwia tworzenie monosolwatów (rys. 5) [57,64].



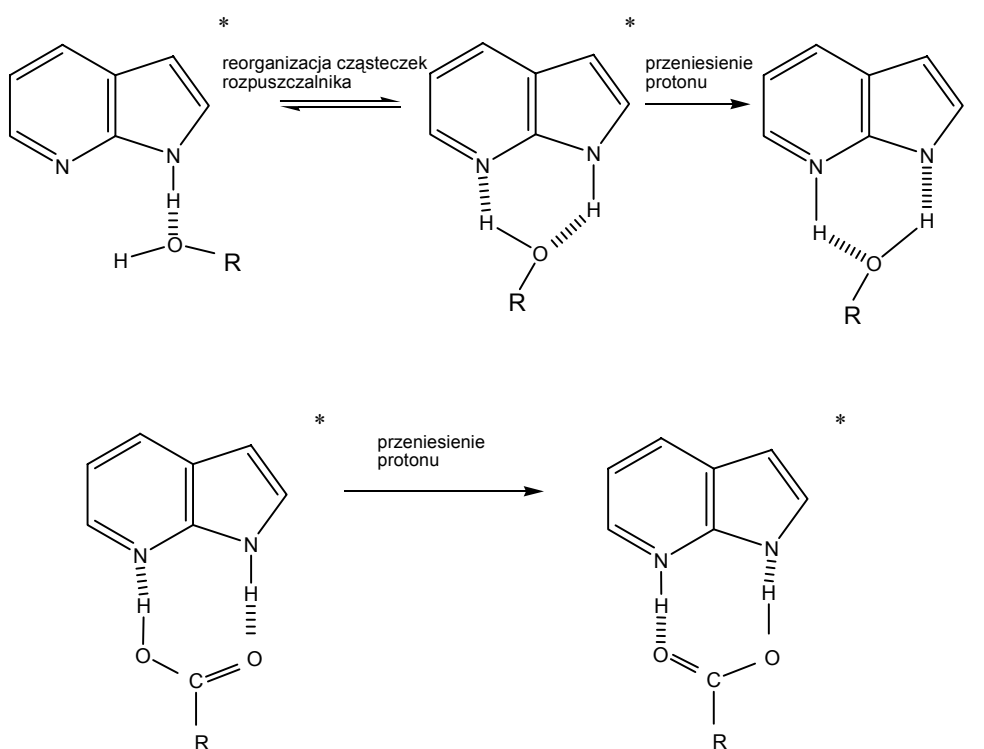
Rysunek 5. Struktury tautomeryczne powstające w czasie procesu przeniesienia protonu w cząsteczce 7-azaindolu, według [57]

3. Statycznie i dynamicznie katalizowane przeniesienie protonu (*static and dynamic catalysis of proton transfer*) obserwowane w przypadku zasad purynowych wymaga silnego katalizatora, w postaci cząsteczki kwasu octowego lub pirydyny (rys.6).



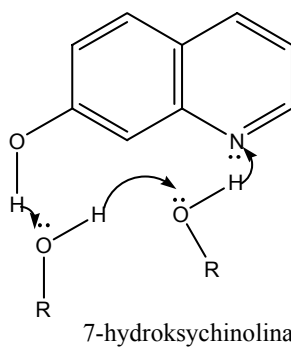
Rysunek 6. Struktury tautomeryczne powstające w czasie procesu przeniesienia protonu w cząsteczce adeniny i guaniny, według [57]

Chang i współpr. [65] donoszą, że 7-azaindol może również ulegać tautomeryzacji według tego mechanizmu w rozpuszczalnikach niepolarnych poprzez kompleksy z cząsteczkami alkoholi i kwasów organicznych (rys.7).



Rysunek 7. Struktury tautomeryczne powstające w czasie procesu przeniesienia protonu w cząsteczce 7-azaindolu poprzez kompleks z alkoholem i z kwasem, według [65]

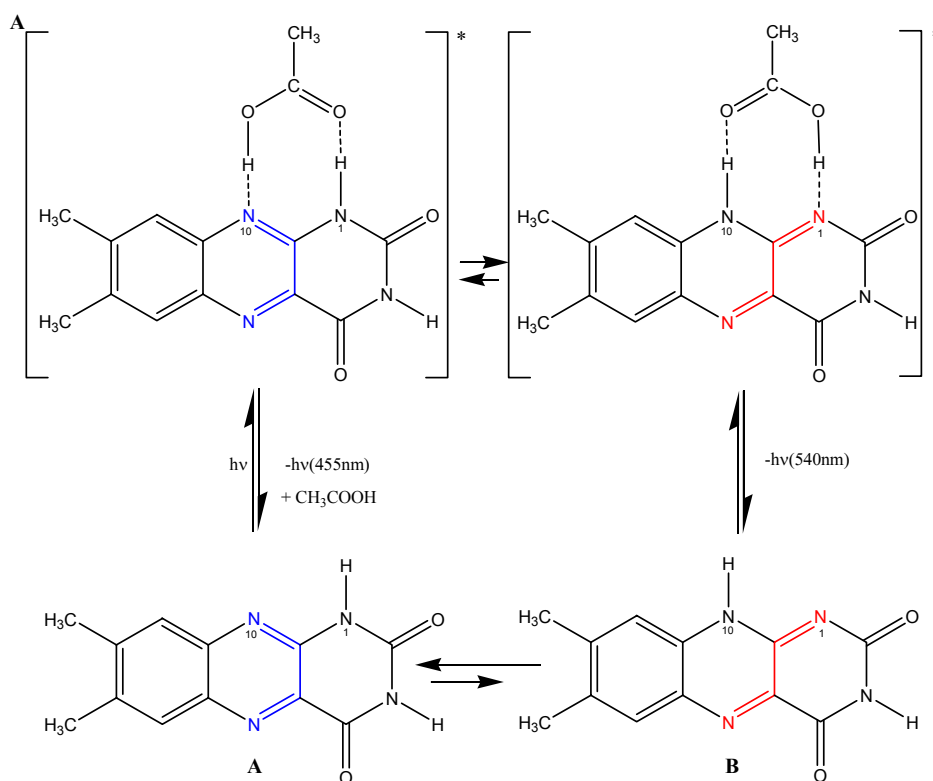
4. Tautomeryzacja poprzez wymianę protonu (*proton relay transfer*), obserwowana jest m.in. w cząsteczce 7-hidroksychinoliny, wymaga udziału co najmniej dwóch cząsteczek metanolu (rys.8).



Rysunek 8. Ilustracja przeniesienia protonu w cząsteczce 7-hidroksychinoliny, według [57]

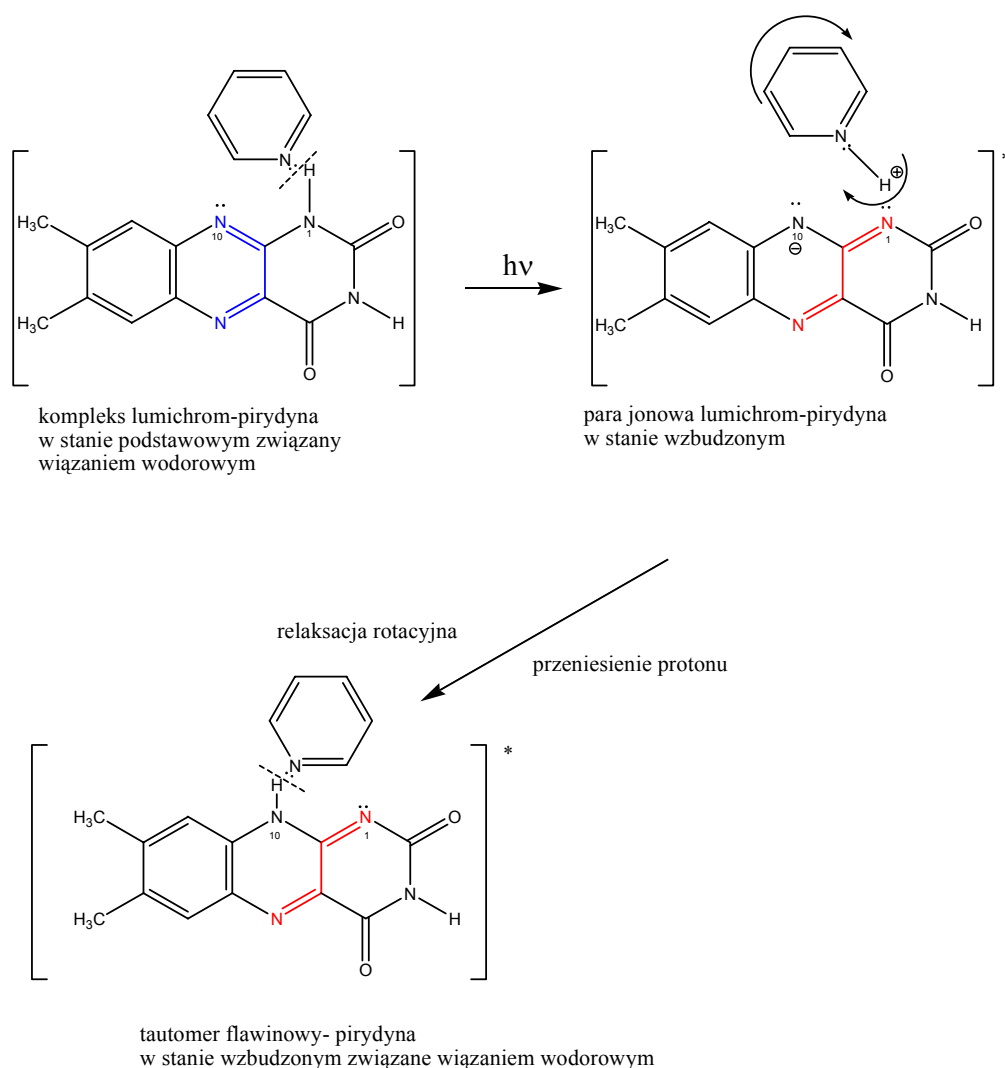
Fototautomeryzacja w związkach flawinowych

Szczególnie interesujący przykład tautomerizacji można zaobserwować w przypadku cząsteczki lumichromu. W tym przypadku mamy do czynienia z mechanizmem zarówno statycznie jak i dynamicznie katalizowanego przeniesienia protonu. W obecności kwasu octowego proces zachodzi według mechanizmu statycznej katalizy, w wyniku której dochodzi do podwójnego przeniesienia protonu (rys.9) [66-68].



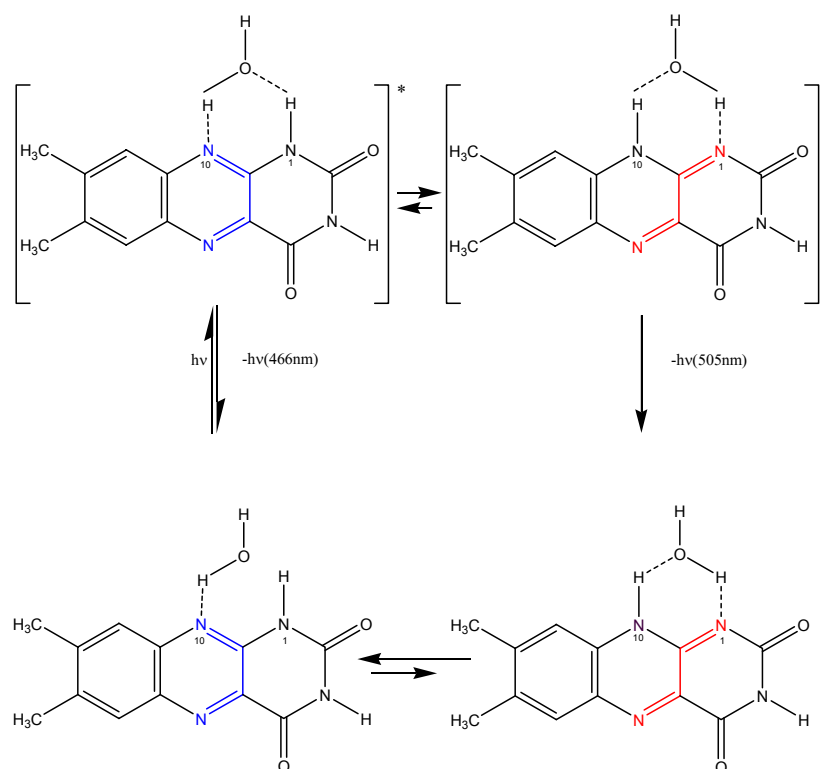
Rysunek 9. Ilustracja procesu fotoindukowanego przeniesienia protonu w cząsteczce 7,8-dimetyloaloksazyny **A** (lumichromu), z utworzeniem tautomeru 7,8-dimetyloizaloksazyny **B**, w obecności kwasu octowego, na podstawie [66]

Natomiast w przypadku zastosowania pirydyny jako czynnika wymuszającego przeniesienie protonu, zachodzi reakcja według mechanizmu dynamicznej katalizy. W stanie podstawowym powstaje wodorowo związany kompleks pomiędzy cząsteczką pirydyny i lumichromu. Po wzbudzeniu lumichromu cząsteczki tworzą parę jonową. W wyniku relaksacji rotacyjnej cząsteczka pirydyny przenosi proton do pozycji N(10) (rys.10) [57,66,69-71].



Rysunek 10. Ilustracja procesu fotoindukowanego przeniesienia protonu w cząsteczce 7,8-dimetyloaloksazyny (lumichromu) w obecności pirydyny, na podstawie [57,66,69]

Przeniesienie protonu w cząsteczce lumichromu w wodzie stanowi odrębne i skomplikowane zagadnienie (rys.11), ponieważ równowagi w stanie wzbudzonym ustalają się w wyniku procesów tautomerii i jonizacji [67,72,73].



Rysunek 11. Ilustracja procesu fotoindukowanego przeniesienia protonu w cząsteczce 7,8-dimetyloaloksazyny (lumichromu) w obecności wody, według [74]

Jedną z cech charakteryzujących tautomery są ich właściwości spektralne. W związku z tym rozwój spektroskopii dotyczącej przeniesienia protonu umożliwia bardziej wnikliwe badanie procesów tautomerizacji. Stosowane są metody stacjonarne i czasowo – zależne, w szczególności takie jak spektroskopia ramanowska czy fotoliza błyskowa, a także metody spektro- elektrochemiczne, pozwalające badać procesy utleniania i redukcji [75]. Jedną z metod dostarczających informacji dotyczących dynamiki procesów przeniesienia protonu w układach z wiązaniem wodorowym jest czasowo-zależna spektroskopia oscylacyjna [63]. Możliwość stosowania metod spektroskopii czasowo-zależnej w szerokim zakresie czasowym, od femtosekund do mikrosekund, umożliwia wyjaśnianie procesów przeniesienia protonu od ultra-szybkich po zaskakująco powolne [57].

Tautomeryzacja alloksazynowo- izoalloksazynowa

Ustalono, że wzbudzona cząsteczka lumichromu ulega indukowanemu światłem przeniesieniu protonu z pozycji N(1) do pozycji N(10) przechodząc w tautomer flawinowy [57].

Zjawisko fotoindukowanej tautomeryzacji wiąże ze sobą związki z grupy alloksazyn, której przedstawicielem jest lumichrom, z grupą izoalloksazyn, która jest przedmiotem prezentowanej rozprawy. Obie grupy związków zaangażowane są w wiele biologicznych i fotochemicznych procesów, a sam lumichrom (alloksazyny) jest głównym produktem biodegradacji ryboflawiny (izoalloksazyny) [76,77]. W stanie podstawowym w obecności pirydyny entalpia procesu tautomeryzacji lumichromu do odpowiedniej pochodnej izoalloksazynowej (7,8-dimetyloizoalloksazyny) wynosi 11,8 kcal/mol [78]. W związku z tak znaczną endotermicznością nie obserwuje się tego procesu w stanie podstawowym. Pod wpływem absorpcji światła wzrasta kwasowość atomu wodoru w pozycji N(1) i rośnie zasadowość pozycji N(10) [78]. Zjawisku przeniesienia protonu w stanie wzbudzonym sprzyja tworzenie wiązań wodorowych z cząsteczką pirydyny i cząsteczkami kwasu octowego. W obecności tych czynników, na skutek absorpcji kwantu światła zostaje zainicjowane przeniesienie protonu pomiędzy pozycją N(1) a pozycją N(10) pierścienia (**Rysunek 9 i 10**, str. 29-30), w wyniku czego ze struktury alloksazynowej powstaje struktura izoalloksazynowa. Tautomer izoalloksazynowy w stanie podstawowym, jako termodynamicznie nietrwały, przechodzi w pochodną o strukturze alloksazynowej [57,66,78,79]. Pasma emisji tautomeru izoalloksazynowego zarejestrowali Koziół i współpr. [66] w widmie lumichromu w 5% roztworze pirydyny w glicerolu.

Widmo emisji anionu zdeprotonowanego w pozycji N(1) jest identyczne jak widmo emisji izoalloksazyn [57]. Tautomeria alloksazynowo-izoalloksazynowa we wzbudzonym stanie singletowym przejawia się m.in. spadkiem intensywności luminescencji z maksimum przy ok. 480 nm ($20,8 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$) i wykształceniem nowego pasma emisji z maksimum przy ok. 525 nm ($19,1 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$).

Jak wspomniano wcześniej, pod wpływem wzbudzenia do stanu trypletowego zauważa się wyraźny wzrost zasadowości zarówno dla cząsteczek alloksazyn i izoalloksazyn, widoczny we wzroście wartości pK_a . (od -2 do 8 dla alloksazyn). Na podstawie wyników obliczeń dotyczących orbitali molekularnych (metodą PPP i CNDO) można oczekiwać, że pozycja N(1) jest najbardziej zasadowa w stanie podstawowym, a w stanie wzbudzonym, wskutek wzrostu gęstości elektronowej większą zasadowość zyskuje pozycja N(5) [17,37,38]. Potwierzają to także badania Salzmanna i Mariana [80], wykonane

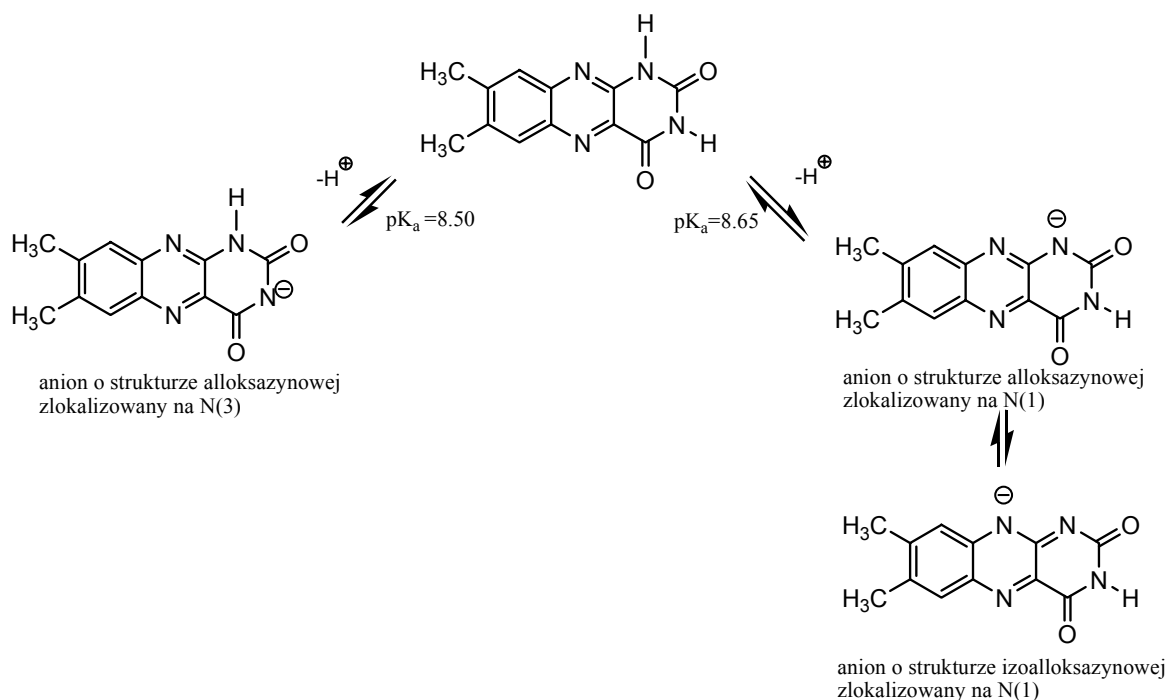
dla cząsteczki lumiflawiny protonowanej w pozycji N(1) i N(5), oraz zdeprotonowanej w pozycji N(3) metodami DFT/MRCI).

Tautomeryzacja w stanie podstawowym jest możliwa jedynie w drastycznym pH roztworu, a otrzymanie na drodze syntezy pochodnej z charakterystycznym dla izoalloksazyn *trans*-diazadienowym układem wiązań i jednocześnie niepodstawioną pozycją N(10) wydaje się niemożliwe [81].

Woda i kwas octowy działają w reakcji tautomeryzacji jako katalizator zarówno kwasowy jak i zasadowy. Tworzą bowiem wiązania wodorowe z cząsteczką alloksazyny w stanie podstawowym z udziałem pozycji N(10). W cząsteczce związanej wiązaniami wodorowymi istnieje inny rozkład ładunku, który powoduje wzrost zasadowości na atomach tlenu. W ten sposób powstają kolejne wiązania wodorowe (z udziałem pozycji N(1) pierścienia). Cząsteczki kwasu octowego i wody pozostają związane wiązaniami wodorowymi w pozycji N(1) tautomeru izoalloksazynowego [72].

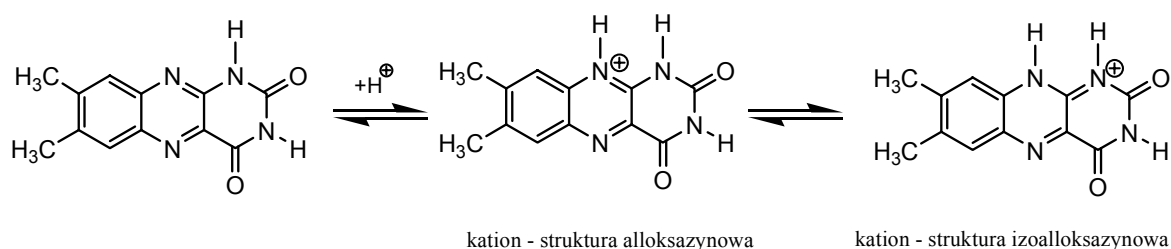
Encinas i współpr. [27,82] badali zachowanie lumichromu w roztworach metanolowych w obecności amin o różnym stopniu zasadowości. Zauważono, że zastosowanie amin o dużej zasadowości ($pK_a > 9$ w wodzie), takich jak butyloamina, powoduje przeniesienie protonu w cząsteczce lumichromu już w stanie podstawowym, a także we wzbudzonym stanie singletowym. Badania wykazały, że lumichrom w obecności amin o mniejszej zasadowości (trietanoloamina, aminy alifatyczne) nie ulega deprotonacji, a podlega przeniesieniu elektronu w stanie wzbudzonym.

Rozkład ładunku w cząsteczce lumichromu w roztworach wodnych zależy od protonacji lub deprotonacji pozycji N(1) i N(10), a więc powstawanie układu izoalloksazynowego może być wynikiem tych procesów. Zmiana rozkładu gęstości elektronowej w powstającym w rezultacie deprotonacji anionie zlokalizowanym w pozycji N(1), (rys.12), prowadzi do powstania struktury izoalloksazynowej [83,84].



Rysunek 12. Schemat procesu dysocjacji protonu w cząsteczce lumichromu w stanie podstawowym z powstającą strukturą izoalloksazynową, na podstawie [83]

Obecność struktury izoalloksazynowej wykazano badając właściwości spektralne powstających anionów zlokalizowanych na N(1) i N(3). Z uzyskanych danych wynika, że widma emisji i wzbudzenia dla formy z ładunkiem zlokalizowanym na atomie N(1) posiadają cechy charakterystyczne dla widma lumiflawiny [37].



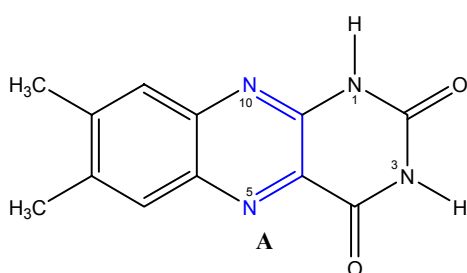
Rysunek 13. Schemat procesu protonowania cząsteczki lumichromu z powstającymi dwoma kationami o strukturze alloksazynowej i izoalloksazynowej, na podstawie [83]

Rysunek 13 przedstawia schemat reakcji protonowania cząsteczki lumichromu w stanie podstawowym. Zmiana gęstości elektronowej pod wpływem protonowania może powodować zmiany w układzie wiązań podwójnych, a powstające kationy mogą mieć strukturę alloksazynową jak i izoalloksazynową. Ich obecność została potwierdzona widmami absorpcji kationów 1-metylo lumichromu i 3-metylo-lumichromu otrzymanych w drastycznych warunkach pH. Ponadto zarejestrowano też widma FT IR i FT Ramana dla

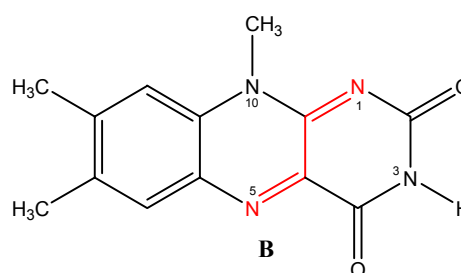
lumichromu zaadsorbowanego na powierzchni jonów srebra, na podstawie których wykazano obecność struktury izoalloksazynowej. Stabilność struktury izoalloksazynowej determinuje więc z jednej strony struktura kationowa, z drugiej anion zlokalizowany na atomie azotu N(1) [83,84].

3. Porównawcza charakterystyka właściwości izo- i alloksazyn

Alloksazyny i izoalloksazyny są związkami o zbliżonej strukturze, choć reprezentują dwie odrębne klasy związków heterocyklicznych. Jak wspomniano wcześniej, podstawowy element struktury cząsteczek alloksazyn i izoalloksazyn stanowi trójczłonowy pierścień, który składa się z pierścienia benzenowego, pirazynowego i pirymidynowego, z centrami aktywnymi w pozycjach N(10), N(5), N(3) i N(1), a w pozycjach C(2) i C(4) posiada również dwa atomy tlenu o charakterze karbonylowym. W związku z tym nazwa systematyczna alloksazyn brzmi (7,8-dimetylo-benzo[g]-pterydyna-2,4-(1*H*,3*H*)-dion). Najbardziej znanym związkiem należącym do tej grupy związków heterocyklicznych jest lumichrom (**Rysunek 14**). Struktura alloksazynowa w określonych warunkach w wyniku foto-indukowanej reakcji tautomerizacji może przechodzić w strukturę izoalloksazynową [66,67,78,85]. Struktury te różnią się między sobą obecnością podstawnika w pozycji N(10) pierścienia (w przypadku izoalloksazyn), a co za tym idzie, innym położeniem układu diazadienowego -N=C-C=N- w cząsteczce. W cząsteczkach alloksazyn występuje on w konfiguracji *cis*, a w izoalloksazynach w konfiguracji *trans*. Nazwa systematyczna izoalloksazyn brzmi więc (10-podstawiona 2,3,4,10-tetrahydro-benzo[g]-pterydyna-2,4-dion) [19]. Na rysunku 14 pokazano przykład struktury alloksazynowej (lumichrom) i izoalloksazynowej (lumiflawina), z zaznaczeniem konfiguracji układu diazadienowego.



A struktura alloksazynowa - Lumichrom



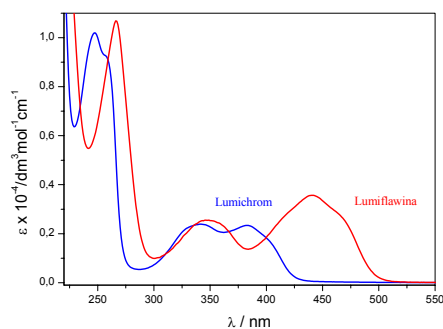
B struktura izoalloksazynowa - Lumiflawina

Rysunek 14. Struktura alloksazynowa (**A**) na przykładzie lumichromu i struktura izoalloksazynowa (**B**) na przykładzie lumiflawiny

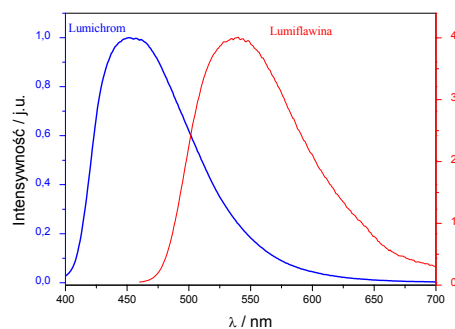
Zarówno związki o strukturze alloksazynowej jak i izoalloksazynowej obecne są w środowisku naturalnym. Są produktami metabolizmu organizmów żywych jako rezultat bakteryjnej, chemicznej lub fotochemicznej degradacji flawin (7,8-dimetylo-pochodnych izoalloksazyny) [76,77,86]. Zarówno pochodne lumichromu jak i flawiny znane są jako czynniki fotosensybilizujące poprzez stan trypletowy utlenianie substancji biologicznych takich jak aminokwasy czy białka [9,79]. Flawiny, związki o strukturze izoalloksazynowej, stanowią też m.in. naturalne koenzymy. Najbardziej znane to FMN i FAD (**Rysunek 1**, str. 2).

Mogłoby się wydawać, że związki o tak zbliżonej strukturze jak alloksazyny i izoalloksazyny, charakteryzowane są przez podobne właściwości spektralne i fotofizyczne. Prowadzone od lat badania pokazują jednak wyraźnie, że związki te wykazują dość istotne różnice w tym zakresie.

W zakresie spektralnym UV-Vis alloksazyny i izoalloksazyny wykazują intensywną absorpcję promieniowania, przy czym pasma izoalloksazyn są przesunięte w kierunku fal dłuższych w stosunku do odpowiednich pasm rejestrowanych dla alloksazyn. Ilustrują to odpowiednie widma absorpcji i emisji na rysunkach 15 i 16 (str.39). Wyraźne różnice obserwuje się również w zakresie fluorescencji tych dwóch klas związków. Izoalloksazyny fluoryzują znacznie intensywniej, wykazując wydajność kwantową fluorescencji dziesięciokrotnie wyższą, niż ich odpowiedniki w grupie alloksazyn. Maksimum pasma fluorescencji dla izoalloksazyn jest przesunięte w kierunku fal dłuższych w porównaniu z odpowiednim maksimum fluorescencji alloksazyn. Lumiflawina wykazuje fluorescencję z maksimum przy 531 nm ($18,8 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$) (w acetonitrylu), natomiast lumichrom (w acetonitrylu) posiada widmo fluorescencji z maksimum przy 453 nm ($22,1 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$). Różnica w położeniu maksimów fluorescencji jest więc dość znaczna i wynosi około 100 nm. Długie czasy życia fluorescencji izoalloksazyn wyraźnie odróżniają tę grupę związków od alloksazyn. Zaniki fluorescencji dobrze opisują krzywe jednowykładnicze [4,85]



Rysunek 15. Widma absorpcji lumichromu i lumiflawiny w metanolu



Rysunek 16. Widma fluorescencji lumichromu i lumiflawiny w metanolu

Na podstawie obliczeń teoretycznych stwierdzono, że zarówno w cząsteczkach alloksazyn jak i izoalloksazyn obecne są stany singletowe $\pi\text{-}\pi^*$ i $n\text{-}\pi^*$ o zbliżonej energii [4,85,87,88]. Sikorska i współpr. [85], na podstawie obliczeń potwierdzili, że przejścia elektronowe o najniższej energii dla izoalloksazyn mają naturę $\pi\rightarrow\pi^*$, w czym upatruje się przyczyny dużych wartości wydajności kwantowej fluorescencji oraz długich czasów życia stanu wzbudzonego. Towarzyszące im przejścia o charakterze $n\rightarrow\pi^*$, ze względu na niewielką siłę oscylatora, nie są widoczne w widmie absorpcji. Jednocześnie wyższe wartości wydajności kwantowej fluorescencji implikują mniejsze stałe szybkości procesów nieradiacyjnych, a wartości stałych szybkości dla procesów radiacyjnych alloksazyn i izoalloksazyn kształtują się w obrębie tego samego rzędu wielkości. Natomiast wpływ rozpuszczalnika na wielkości stałych szybkości procesów radiacyjnych i nieradiacyjnych jest niewielki. Jedynie w przypadku wody obserwuje się wyraźny wzrost wartości wspomnianych stałych szybkości [85].

W przypadku alloksazyn wyraźnie widoczny jest wpływ rozpuszczalnika na procesy fotofizyczne zachodzące w cząsteczkach. Najniższe singletowe stany wzbudzone w przypadku alloksazyn mają konfigurację $n\text{-}\pi^*$, co determinuje znacznie niższe wartości wydajności kwantowych fluorescencji. Dla tej grupy związków Sikorska i współpr. [19] zauważyli wyraźny wpływ podstawnika na charakter przejścia. W przypadku obecności grup metylowych podstawionych w pozycjach C(6) i C(9) pierścienia benzenowego obserwuje się nawet inwersję leżących blisko na skali energii przejść o charakterze $n\text{-}\pi^*$ i $\pi\text{-}\pi^*$ w porównaniu z innymi alloksazynami. Energia przejść typu $n\rightarrow\pi^*$ w niewielkim stopniu ulega wpływom podstawników obecnych w cząsteczce, podczas gdy obserwuje się taką zależność dla najniższych położonych przejść o charakterze $\pi\rightarrow\pi^*$ [19].

W celu zilustrowania zagadnień omawianych w tym rozdziale i ułatwienia dokonania porównań dane spektralne i fotofizyczne dla podstawowych przedstawicieli obu grup związków zamieszczono w Tabeli 1.

Tabela 1. Dane spektralne i fotofizyczne dla alloksazyn i izoalloksazyn w stanie singletowym w metanolu [19]

związek	λ_2 /nm	λ_1 /nm	λ_F /nm	ϕ_F	τ_F /ns	$k_r/10^8 s^{-1}$	$k_{nr}/10^8 s^{-1}$
lumichrom	339	384	453	0.032	1.04	0.30	9.3
lumiflawina	351	442	531	0.13	6.8	0.19	1.3

W cząsteczce lumichromu możliwe jest przyłączenie grupy, która jest donorem protonu w pozycji N(10) i N(5), a w cząsteczce lumiflawiny w pozycji N(1) i N(5). Z analizy wpływu podstawników obecnych w cząsteczkach alloksazyn i izoalloksazyn w wymienianych pozycjach pierścienia wyprowadzono wniosek, że kluczową rolę spełnia wiązanie wodorowe utworzone w pozycji N(5). Zgodnie z tym co podaje Sikorska i współpr. [85] dla alloksazyn wiązania wodorowe powstają w następującej kolejności N(10), N(5), C(2) i C(4) [89], podczas gdy dla izoalloksazyn sugeruje się kolejność N(1), C(2) i C(4), a następnie N(5) [90]. Na podstawie obliczeń teoretycznych sugeruje się, że w cząsteczkach izoalloksazyn obecność wiązań wodorowych w pozycji N(5) powoduje przesunięcie obu długofalowych pasm absorpcji w kierunku fal dłuższych; obecność wiązań wodorowych w pozycji N(1) przesuwa pasmo λ_1 w kierunku fal krótszych, a pasmo λ_2 w kierunku fal dłuższych [91]. Pozwala to wyprowadzić wniosek, że zarówno dla alloksazyn jak i izoalloksazyn w przesunięciu pasma absorpcji odpowiednio przy 334 / 342 nm (Tabela 1) kluczową rolę pełni obecność wiązania wodorowego w pozycji N(5), a w dalszej kolejności N(1) dla izoalloksazyn, a dla alloksazyn wiązanie w pozycji N(10) [85,89-91].

W procesie hydrolizy kationorodniki pochodnych lumichromu są o kilka rzędów wielkości mniej stabilne niż odpowiednie pochodne flawin, chociaż wartości pK_a dla deprotonacji są podobne i wynoszą odpowiednio 5.6 dla 1-metylolumichromu i 6 dla lumiflawiny [92].

W przypadku alloksazyn, wraz ze wzrostem polarności rozpuszczalnika i jego protycznej natury maleją wartości stałych szybkości procesów radiacyjnych i nieradiacyjnych, podczas gdy izoalloksazyny pozostają niewrażliwe na wspomniane

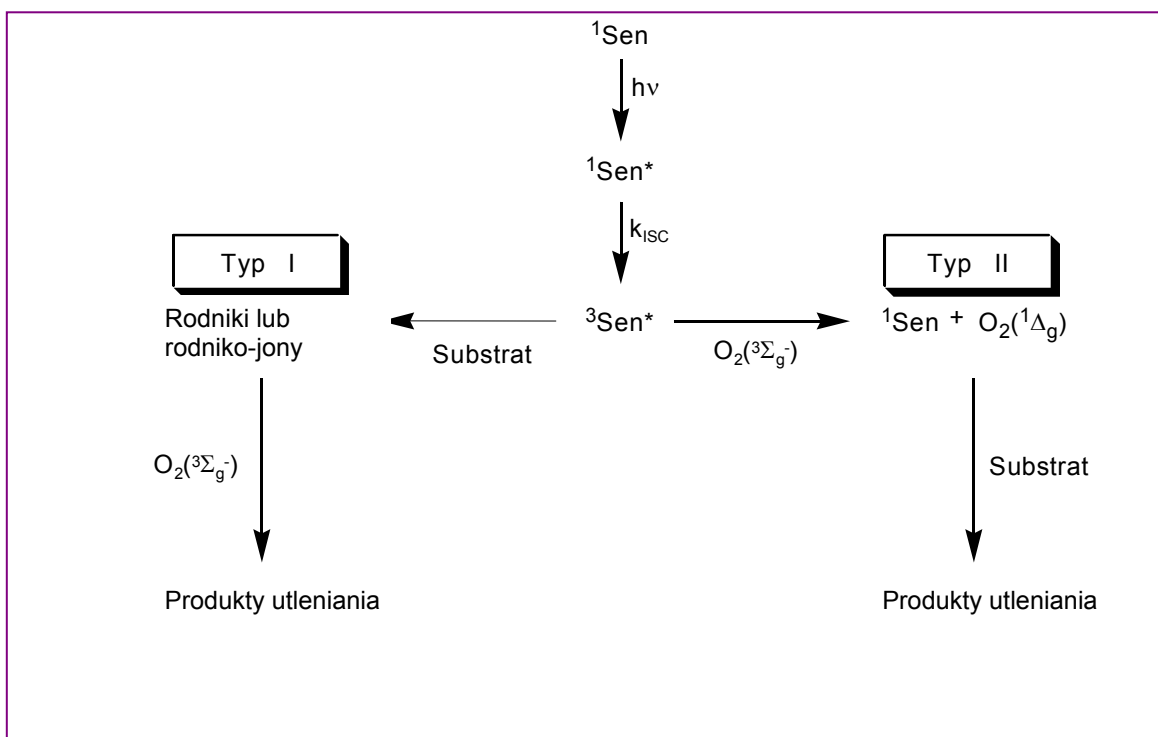
parametry rozpuszczalnika. Jedynie w wodzie dla izoalloksazyn obserwuje się wzrost stałych szybkości procesów radiacyjnych i nieradiacyjnych [19,85].

4. Flawiny jako fotosensybilizatory tlenu singletowego

Fotosensybilizacja i fotosensybilizowane utlenianie

Zjawisko fotosensybilizowanego utleniania leży u podstaw reakcji fotodynamicznych i w związku z tym notuje się znaczne zainteresowanie mechanizmem tego procesu w układach biologicznych zarówno w szkodliwym jak i terapeutycznym aspekcie tego zjawiska [93,94].

W procesie fotosensybilizacji cząsteczka sensybilizatora na skutek absorpcji promieniowania elektromagnetycznego o odpowiedniej długości fali, ulega wzbudzeniu do wyższych stanów elektronowych. Na skutek szybkiej konwersji wewnętrznej uzyskuje stan elektronowo-wzbudzony S_1 , który może ulec dezaktywacji na drodze fluorescencji, konwersji wewnętrznej lub poprzez przejście międzysystemowe może osiągnąć najniższy wzbudzony stan trypletowy T_1 . Dezaktywacja stanu trypletowego jest procesem dość długim (rzędu μs), dzięki czemu cząsteczka, która ten stan osiągnęła może ulegać dalszym reakcjom. W obecności tlenu zachodzą fotosensybilizowane reakcje utleniania, które mogą przebiegać według dwóch podstawowych mechanizmów. Są to: mechanizm I typu, przebiegający poprzez rodnik; oraz mechanizm II typu, w którym formę przejściową stanowi tlen singletowy [93]. Wspomniane typy mechanizmów fotosensybilizowanego utleniania przedstawiono na schemacie 3.

Schemat 3, według [94]

Schemat fotosensybilizowanych reakcji utleniania I i II typu

Reakcje przebiegające według mechanizmu I typu mogą zachodzić poprzez oderwanie atomu wodoru od cząsteczki substratu lub poprzez przeniesienie elektronu między cząsteczką wzbudzoną a substratem. Powstałe w ten sposób wolne rodniki reagują dalej z cząsteczkami tlenu dając aktywne formy tlenu, takie jak anionorodniki nadtlencowe. Mechanizm II typu zakłada proces przeniesienia energii pomiędzy donorem, który stanowi cząsteczka sensybilizatora, a akceptorem - cząsteczką tlenu. Poprzez absorpcję promieniowania fotosensybilizator zostaje wzbudzony do stanu S_1 i dalej na skutek przejścia międzysystemowego przechodzi w stan trypletowy T_1 . W kolejnym etapie następuje przeniesienie energii z cząsteczki fotosensybilizatora w stanie T_1 na cząsteczkę tlenu w stanie podstawowym, która ulega wzbudzeniu do stanu S_1 , dając w ten sposób tlen singletowy $\text{O}_2^* (^1\Delta_g)$ [94,95].

Wydajny sensybilizator powinien charakteryzować się wysokim molowym współczynnikiem absorpcji przy długości fali promieniowania, którym jest wzbudzany; wysoką wydajnością kwantową tworzenia stanu trypletowego ($\phi_T=0,4$); długim czasem życia stanu trypletowego ($\tau > 1\mu s$); odpowiednio dużą energią stanu trypletowego ($E_T \geq 95 \text{ kJ mol}^{-1}$), a także dużą fotostabilnością [96]. Jako sensybilizatory tlenu singletowego znane są takie związki jak błękit metylenowy, róż bengalski, fluoresceina, porfiryny. W tabeli 2 przedstawiono wartości podstawowych wielkości charakteryzujących najbardziej znane sensybilizatory.

Tabela 2. Wydajności kwantowe fluorescencji (ϕ_f), wydajności kwantowe przejścia międzysystemowego (ϕ_{ISC}), oraz wydajności tworzenia tlenu singletowego (ϕ_Δ), dla wybranych sensybilizatorów

Sensybilizator	Rozpuszczalnik	ϕ_f	ϕ_{ISC}	ϕ_Δ
eozyna ^{a, b}	woda	0.19 ^b	0.64 ^a	0.57 ^a
fluoresceina ^{a, b}	woda	0.92 ^b	0.05 ^a	0.06 ^a
naftalen ^{b, c}	benzen	0.21	0.71	$\leq 0.62^c$
róż bengalski ^{a, j}	woda	-	-	0.75
	(izooktan/D ₂ O)	-	0.78 ^j	0.81 ^j
benzofenon ^{c, d}	benzen	0.0 ^d	1.0 ^d	0.35 ^c
porfiryne ^e	-	~ 0.0	~ 1.0	0.85
ryboflawina ^{f, g, h}	metanol	0.39 ^g	0.6 ^h	0.51 ^f
perinaftenon ^{k, l}	-	0.008 ^l	$\sim 1.0^l$	0.95 ^k

Dane zaczerpnięte z literatury: a [97], b [98], c [99], d [56], e [100], f [101], g [102], h [103], i [104], j [105], k [106], l [107]

Wiele endogennych i egzogennych fotosensybilizatorów może wywoływać reakcje fototoksyczne i fotoalergiczne (np. flawiny czy protoporfiryny). Podobnie jest z wieloma sensybilizatorami barwnikowymi, aktywowanymi za pomocą światła. Istotną z punktu widzenia zastosowań biologicznych klasą sensybilizatorów fotoutleniających są trypletowo-wzbudzone ketony, które można generować wewnątrz komórki zarówno poprzez poddawanie działaniu światła chromoforów endogenicznych jak i w wyniku reakcji ciemnych (np. utlenianie enzymatyczne) [93].

Nanosferyczna struktura fulerenów okazała się także niezwykle wydajna w procesie przeniesienia energii pomiędzy cząsteczką związku a cząsteczkami tlenu. Fulereny w

roztworach wodnych i w obecności czynników redukujących produkują zarówno tlen singletowy jak i anion nadtlenny, ze znaczną przewagą tego ostatniego indywiduum [108]. Nie jest do końca jasne, które z wymienionych indywiduów stanowi główny czynnik cytotoksyczny w terapii fotodynamicznej. Jeden z postulowanych mechanizmów dotyczy działania rodnika hydroksylowego, powstającego z nadtlenu wodoru, katalizowany przez jony Fe^{2+} lub Cu^+ . Uważa się, że nadtlenek wodoru powstaje w tkankach w wyniku dysmutacji anionu nadtlenkowego albo w wyniku katalizy enzymatycznej albo samoistnie (w sposób naturalny). W myśl innego postulowanego przez badaczy mechanizmu cytotoksyczna reakcja jest kontrolowana dyfuzją pomiędzy anionem nadtlenkowym i tlenkiem azotu, tworząc wysoce toksyczny nadtlenek azotynu (ONOO^-). Podwyższony poziom tlenu azotu obecny jest zarówno w chorobach nowotworowych jak i w infekcjach, co może wzmacniać działanie selektywne [109,110]. Za wydajny fotosensybilizator tlenu singletowego uchodzi również ryboflawina [110].

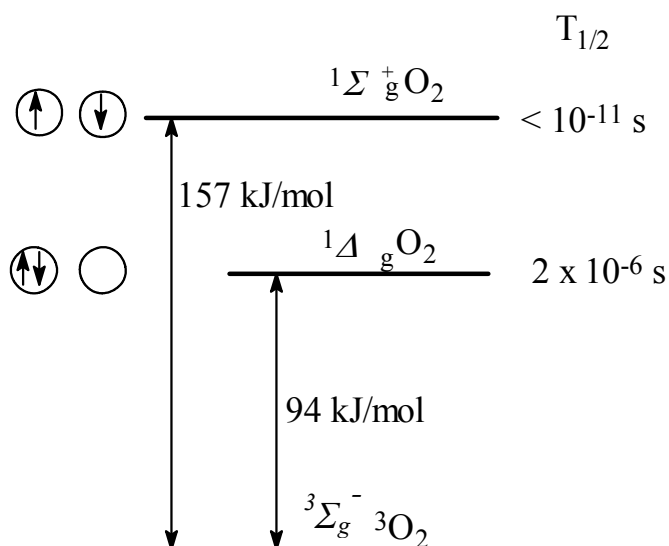
Tlen singletowy

Tlen jako silny czynnik utleniający może uczestniczyć w wielu reakcjach chemicznych. Ponieważ reakcje utleniania są na ogół procesami nieodwracalnymi, a reakcje uboczne mogą generować toksyczne produkty, powszechność występowania tego czynnika może stanowić poważne zagrożenie, bezpośrednie i pośrednie, dla organizmów żywych. Aby tlen mógł być użytecznym reagentem, reakcje jakim ulega muszą być wnikliwie kontrolowane tak, aby zapewnić ich przebieg zgodny z oczekiwaniami. Zagadnienie to stanowi więc pole do aktywnej działalności badawczej w zakresie śledzenia mechanizmów kontrolujących przebieg reakcji biochemicznych zachodzących z udziałem tlenu [111].

Tlen cząsteczkowy posiada niezwykle właściwości, które umożliwiają wydajne wygaszanie stanów wzbudzonych cząsteczek organicznych. Właściwości te dotyczą w szczególności:

- w podstawowym stanie elektronowym cząsteczka tlenu posiada multipletowość trypletową, konfiguracja ta wzmacnia przejście międzysystemowe w cząsteczkach związków organicznych;
- obecności dwóch nisko położonych singletowych stanów wzbudzonych (o energiach odpowiednio 94 i 157 kJ mol⁻¹), które mogą być obsadzone w procesie wygaszania najbardziej wzbudzonego stanu trypletowego lub niektórych wzbudzonych stanów singletowych związków, zachodzącego na drodze przeniesienia energii;
- oraz stosunkowo łatwej redukcji cząsteczki O₂ do anionorodnika nadtlenkowego O₂⁻, który wpływa na stopień wygaszania tlenu i mierzoną wydajność tworzenia tlenu singletowego [112,113].

Stany elektronowe oraz poziomy energetyczny cząsteczki tlenu przedstawia rysunek 17.



Rysunek 17. Stany elektronowe i ich energie dla cząsteczki tlenu, $T_{1/2}$ dla cząsteczki w roztworze wodnym, na podstawie [56,114,115]

Jak wspomniano wcześniej, tlen cząsteczkowy we wzbudzonym stanie singletowym, $O_2(^1\Delta_g)$, odgrywa główną rolę w degradacji wielu różnych materiałów, a także w indukowanej światłem destrukcji komórek żywych. Bezpośrednie przejście od trypletowego stanu podstawowego tlenu, $O_2(^3\Sigma_g^-)$, na singletowy stan wzbudzony, $O_2(^1\Delta_g)$, jest wzbronione. Proces otrzymywania tlenu singletowego może odbywać się poprzez przeniesienie energii od stanu trypletowego fotosensybilizatora do stanu podstawowego tlenu, $O_2(^3\Sigma_g^-)$ [116]. Zjawisko to ma zastosowanie we wspomnianej wyżej terapii fotodynamicznej [117]. Przejście od stanu wzbudzonego $O_2(^1\Delta_g)$ do stanu podstawowego $O_2(^3\Sigma_g^-)$ także jest wzbronione, w związku z tym cząsteczka tlenu w stanie $^1\Delta_g$ jest indywiduum długo – żyjącym (w roztworze od 10^{-6} s w wodzie do 10^{-3} s w CCl_4 , w fazie gazowej pod niskim ciśnieniem ok.45 min.). [56,118]. Określenie *tlen singletowy* odnosi się do cząsteczki tlenu znajdującej się we wzbudzonych stanach singletowych $^1\Delta_g$ lub $^1\Sigma_g^+$ [116]. Pierwszy stan wzbudzony posiada multipletowość singletową, a obydwa elektrony są sparowane na jednym orbitalu (oznaczany $O_2(^1\Delta_g)$, rys. 17) [116]. Ze względu na zakładaną szybką konwersję wewnętrzną pomiędzy stanami singletowymi, pojęcie tlenu singletowego odnosiło się zwykle do pierwszego wzbudzonego stanu singletowego cząsteczki tlenu, ostatnie prace pokazały, że możliwa jest również reaktywność tlenu w drugim stanie wzbudzonym [119,120].

Tlen singletowy powstaje w wyniku wygaszania przez cząsteczki tlenu stanów wzbudzonych, zarówno singletowych jak i trypletowych, cząsteczek związków

organicznych. Wydajność tworzenia tlenu singletowego oraz wielkość stałych wygaszania waha się w dość szerokich granicach i zależy głównie od struktury użytego związku, od rodzaju stanu wzbudzonego, który jest wygaszany oraz od rodzaju użytego rozpuszczalnika [95].

Tlen singletowy uważany jest za główny czynnik cytotoksyczny zaangażowany w terapii fotodynamicznej [93,121,122]. Terapia fotodynamiczna jest nieinwazyjną metodą zwalczania nowotworów przez połączone użycie promieniowania o niskiej energii i leków spełniających rolę fotosensybilizatora. Tlen w procesie terapeutycznym spełnia rolę silnego środka utleniającego i jest wykorzystywany do niszczenia niepożądanych komórek i całych tkanek. Tworzenie tlenu singletowego pociąga za sobą również procesy niepożądane, takie jak fotoutlenianie leków czy biocząsteczek i w ten sposób stanowi jedną z głównych przyczyn ich toksyczności [93,122].

W czasie życia w najniższym stanie wzbudzonym cząsteczka tlenu singletowego w układzie biologicznym dyfunduje na odległości mniejsze niż średnica komórki. Dlatego pożądanym jest znalezienie takich sensybilizatorów, które nie tylko mogą selektywnie atakować chore komórki, ale nawet rozpoznawać odpowiednie organelle komórkowe. Ponadto ważne jest rozwinięcie metod, dzięki którym wydajność produkcji tlenu singletowego w danym procesie mogłaby być selektywnie kontrolowana, aby tym samym zapewnić jego działanie w bezpiecznym zakresie [117].

Terapia fotodynamiczna

Pierwsze wzmianki w literaturze dotyczące zastosowania światła w procesie terapeutycznym sięgają przełomu XIX i XX wieku. kiedy Raab i Tappeiner zauważyli, że akrydyna w połączeniu ze światłem wywołuje efekt toksyczny w stosunku do organizmów żywych. Pierwszy przypadek zaaplikowania fotosensybilizatora u ludzi sięga 1900 roku, kiedy to Prime stosując eozynę w terapii neurologicznej, zauważył na skórze dodatkowy efekt fotouczulania, wywołany działaniem światła. Odkrycie to skłoniło Tappeinera i Jesionka do zastosowania eozyny w połączeniu ze światłem w leczeniu nowotworów skóry. Termin „działanie fotodynamiczne” został wprowadzony przez Hermana von Tappeinera i Jodlbauera w 1907 roku, którzy wskazali na udział tlenu w reakcjach fotosensybilizacji [123].

Terapia fotodynamiczna (PDT, *Photodynamic therapy*) jest metodą leczenia wielu chorób [124]. Stosuje się ją do leczenia zmian patologicznych o charakterze nowotworowym, a także w przypadku innych schorzeń. Zakres stosowania terapii fotodynamicznej został znacznie poszerzony poprzez mechanizm zamykania naczyń krwionośnych (*antivascular effect*) i w związku z tym może być wykorzystywany w leczeniu schorzeń wynikających z neowaskularyzacji, arteriosklerozy czy restenozy po zabiegach angioplastyki oraz w przypadkach artretyzmu [109]. Ponadto metoda może być stosowana w diagnostyce, szczególnie w przypadku niewidocznych zmian chorobowych [125].

W ramach terapii pacjent otrzymuje nietoksyczny lek, który akumuluje się w tkance nowotworowej. Z punktu widzenia fotochemii spełnia on rolę fotosensybilizatora. Zmiany patologiczne poddaje się następnie naświetlaniu promieniowaniem widzialnym o długości fali leżącej w zakresie pasma absorpcji sensybilizatora, które uaktywnia sensybilizator poprzez wzbudzenie jego cząsteczek do stanu singletowego. Dezaktywacja stanu wzbudzonego cząsteczki może zachodzić poprzez fluorescencję, konwersję wewnętrzną lub poprzez przejście międzysystemowe i obsadzenie stanu trypletowego. Z punktu widzenia terapii fotodynamicznej pożądanym jest ten ostatni mechanizm. Cząsteczka sensybilizatora we wzbudzonym stanie trypletowym oddziałuje z cząsteczkami tlenu obecnymi w tkankach, dając w efekcie aktywne formy tlenu, które konieczne są do destrukcji komórek. Proces ten może przebiegać według dwóch mechanizmów - przeniesienia energii, który prowadzi do tlenu singletowego lub przeniesienia elektronu, w wyniku którego powstaje anion nadtlenkowy (**Schemat 4**, str. 53) [109,125]. Uważa się, że

tlen singletowy jest czynnikiem, który w oddziaływaniach z białkami, nienasyconymi tłuszczami czy kwasami nukleinowymi powoduje ich uszkodzenie poprzez utlenianie i w konsekwencji prowadzi do unicestwienia żywych komórek. Terapia fotodynamiczna zabija komórki według mechanizmów bezpośrednich poprzez apoptozę i nekrozę lub też pośrednio poprzez zamykanie naczyń krwionośnych odżywiających chorą tkankę. O tym, który z mechanizmów powoduje śmierć komórki decyduje lokalizacja fotosensybilizatora w komórce (mitochondria, lizosomy, błony plazmatyczne) [126]. W tym zakresie najbardziej pożądana jest apoptoza, inicjowana przez uszkodzenie mitochondriów [109].

Jednym z pierwszych leków o charakterze fotosensybilizatora stosowanym w terapii fotodynamicznej jest pochodna hematoporfiryny, znana jako *Photofrin*[®] [125]. Lek ten należy do tzw. pierwszej generacji fotosensybilizatorów (pochodne hematoporfiryny), które pomimo skuteczności w leczeniu, narażają pacjenta na działanie wielu efektów ubocznych. Od wielu lat poszukuje się kolejnych nowych, bezpieczniejszych dla pacjenta i skuteczniejszych w leczeniu, sensybilizatorów tlenu singletowego [109]. Znane są sensybilizatory drugiej i trzeciej generacji (pochodne ftalocyjaniny, benzoporfiryny, kwasu 5-aminolewulinowego, bakteriochloryny, *etc.*), których właściwości są dobierane z myślą o uniknięciu problemów, które stwarzają wspomniane pochodne hematoporfiryny (leki o znanym składzie i dużej czystości chemicznej, pasmo absorpcji w zakresie 650 – 850 nm, stosunkowo krótka wrażliwość na fotouczulanie po zabiegu) [126]. Badania nad sensybilizatorami trzeciej generacji zmierzają w kierunku poprawy ich właściwości farmakokinetycznych, np. poprawienia selektywnej akumulacji sensybilizatora w chorej tkance, a także przyłączania jego cząsteczek do biomolekuł (przeciwciała monoklonalne, liposomy), co znacznie poprawia skuteczność terapii i zmniejsza ryzyko wystąpienia efektów ubocznych [109].

Pomimo znacznego wkładu pracy i wielu prób czynionych w kierunku uzyskania nowych sensybilizatorów, obecnie do zastosowań klinicznych dopuszczono na świecie zaledwie kilka leków (*Photofrin*, *Visudyne*, *Foscan*, *Levulan*, *Metvix*, *Hexvix*) [126].

Efektywność terapii

Efektywność terapii zależy od wielu czynników. Z punktu widzenia fotochemii szczególnie istotne wydają się: dobór sensybilizatora, ilość tlenu singletowego wytwarzanego w procesie fotosensybilizacji *in vivo* oraz dobór źródła światła.

Dobór sensybilizatora

Dobór sensybilizatora musi uwzględniać wiele czynników, np:

- odpowiednie właściwości fizykochemiczne, które umożliwiają wprowadzenie go do organizmu w postaci leku i decydują o jego lokalizacji w chorej tkance,
- właściwości spektralne, związane z procesem fotosensybilizacji,
- właściwości fotochemiczne związane z jego fotostabilnością i możliwością fotodegradacji, co determinuje bezpieczny sposób usunięcia sensybilizatora z organizmu.

Niezwykle istotne pozostają takie właściwości sensybilizatorów jak ich toksyczność, zdolność do wywołania mutagenezy czy karcinogenezy, selektywność działania, koszt stosowania i wiele innych [127]. Zagadnienia z tym związane stanowią jednak tak rozległy temat, że z konieczności zostały pominięte w prezentowanej pracy.

Jak wspomniano, efektywność terapii zależy w znacznym stopniu od ilości tlenu singletowego powstającego w tkankach, a stosunkowo krótki czas życia tego indywiduum ogranicza działanie cytotoksyczne jedynie do bliskiego otoczenia komórek czy tkanek zawierających wysokie stężenie fotosensybilizatora. Tym samym działanie genotoksyczne jest stosunkowo niewielkie [126,128,129].

Wprowadzanie sensybilizatora

Substancje spełniające rolę fotosensybilizatora mogą selektywnie lokować się w tkance nowotworowej lub metaplastycznej. Postuluje się, że komórki nowotworowe i metaplastyczne (we wcześniejszych stadiach zmian chorobowych) posiadają odmienne właściwości i fizjologię inną niż komórki zdrowe. Procesy proliferacji komórek, ich różnicowania, zawartość mitochondriów czy współczynnik pH w komórkach, pozostają różne dla tkanki zdrowej i tkanki nowotworowej. Takie zróżnicowanie może prowadzić do selektywnej akumulacji i retencji fotosensybilizatora w chorej tkance. Ponadto skomplikowane interakcje pomiędzy wspomnianymi czynnikami zależą od rodzaju schorzenia, jego umiejscowienia oraz stanu zaawansowania. Dzięki temu można powiedzieć, że selektywność akumulacji i retencja niektórych fotosensybilizatorów w

tkankach zmienionych chorobowo mogą mieć charakter enzymatyczny, morfologiczny lub środowiskowy [126].

Jednym z wymienianych w tym kontekście czynników jest współczynnik pH, który dla komórek nowotworowych wykazuje wartości niższe niż dla komórek zdrowych. Wynika to z ich słabszego ukrwienia i w konsekwencji zwiększa ich aktywność glikolityczną. Niska wartość pH powoduje lepszą akumulację substancji fotoaktywnej (sensybilizatora), która w tych warunkach ulega protonacji i zwiększa swoją lipofilowość. Ułatwia to wnikanie sensybilizatora do chorej tkanki wraz z dopływem krwi. Innym czynnikiem, na który zwraca się uwagę, jest obecność makrofagów, które posiadają zdolność trawienia i monomeryzowania agregatów fotosensybilizatora. Na powierzchni komórek nowotworowych obserwuje się też znacznie więcej receptorów lipoproteinowych niż na powierzchni komórek zdrowych. Fotosensybilizatory lipofilowe przyłączają się do lipoprotein obecnych na powierzchni komórek. Komórki nowotworowe posiadają też więcej kolagenu, istotna jest także ilość wody oraz inne parametry fizjologiczne, takie jak słaby drenaż limfatyczny [126].

Istnieje też problem zawartości tlenu, którego w komórkach chorych jest mniej niż w komórkach zdrowych. Ponadto sama terapia powodując uszkodzenia naczyniowe i hamując angiogenezę może selektywnie inaktywować komórki zmienione chorobowo. Pewną rolę odgrywa też stan zapalny powodując, że temperatura w miejscu chorobowo zmienionym zwykle jest podwyższona, a co za tym idzie, wzrasta szybkość biosyntezy odpowiedniej postaci sensybilizatora oraz stopień jego akumulacji w tkance [126].

Dobór źródła światła

Jako metoda nieinwazyjna, PDT wymaga takich źródeł światła, które mogą dostarczyć energię bezpośrednio do miejsca zmienionego chorobowo. Światło docierające do tkanek jest absorbowane przez związki w nich obecne, a więc głównie przez hemoglobinę, melaninę czy wodę. Fakt jak głęboko światło może wnikać w tkanki jest zdeterminowany przez absorpcję chromoforów obecnych w tkankach. „Okno optyczne” żywej tkanki przypada na zakres 600-1300 nm, czyli pomiędzy absorpcją hemu i wody i w ten sposób wyznacza zakres absorpcji dla sensybilizatora [126]. Zakres absorpcji 600 – 1000 nm często określany jest jako zakres terapeutyczny [130]. Szczególnie pożądane są sensybilizatory o intensywnej absorpcji w czerwonej części widma, w zakresie 600 – 800 nm [109]. Źródło światła powinno charakteryzować się emisją pasma leżącego w

zakresie absorpcji fotosensybilizatora. Istotny jest także fakt, jak głęboko światło musi wnikać w tkankę co wynika z umiejscowienia zmian patologicznych [126].

Właściwości spektralne i fotofizyczne fotosensybilizatora w formie monomerycznej różnią się od tych, które posiada on w formie zagregowanej (np. inne widmo absorpcji i wydajność kwantowa fluorescencji). Proces agregacji, któremu mogą ulegać cząsteczki sensybilizatora, jest efektem niepożądanym z punktu widzenia tworzenia tlenu singletowego, uważa się bowiem, że tlen singletowy produkowany jest tylko przez niezagregowane cząsteczki sensybilizatora. Optymalna długość fali emitowana przez źródło światła powinna być tak dobrana, aby otrzymać maksymalną wydajność kwantową tlenu singletowego z uwzględnieniem maksymalnie dużej głębokości na jaką promieniowanie może wnikać do tkanki w celu uzyskania reakcji biologicznej. W terapii fotodynamicznej stosuje się wiele rodzajów źródeł światła. Mogą to być zarówno emiterzy niekoherentne (halogenowe, ksenonowe, fluorescencyjne, diody LED), jak i laserowe źródła światła, pozwalające na dostarczenie promieniowania za pośrednictwem włókien optycznych metodą endoskopową, co pozwala dostarczać promieniowanie bezpośrednio do chorej tkanki. Dobór źródła światła do terapii wymaga uwzględnienia kilku czynników, a mianowicie: zakresu absorpcji fotosensybilizatora, rodzaju i umiejscowienia zmian patologicznych, ich wielkości i dostępności. Ponadto o skuteczności terapii decyduje także dawka promieniowania i czas ekspozycji [126,131,132]. Ponadto w zastosowaniach *in vivo*, należy minimalizować emisję w ultrafiolecie z uwagi na ryzyko mutagenezy, jak również emisję z zakresu podczerwieni, która powoduje przegrzanie tkanki [133].

Pomiędzy fotostabilnością a fotodegradacją

Sensybilizatory charakteryzują się różną fotostabilnością. Wprowadzone do tkanek sensybilizatory hydrofilowe wykazują większą fotostabilność niż lipofilowe. Z kolei przyłączenie cząsteczki fotosensybilizatora do cząsteczki białka powoduje zmniejszenie jego fotostabilności. W formie zagregowanej sensybilizatory są bardziej fotostabilne niż jako monomery, jednakże nieaktywne w tworzeniu tlenu singletowego [126,134,135]. Skuteczność terapii może być także limitowana przez efekt fotowysbielania (*ang. fotobleaching*) i w związku z tym należy uwzględniać go przy wyborze źródła światła i dobieraniu stężenia sensybilizatora. Jednocześnie efekt ten zapobiega uszkodzeniu zdrowych tkanek graniczących z tkanką chorą [126].

Proces fotodegradacji sensybilizatora jest kolejnym istotnym czynnikiem determinującym jego przydatność w terapii metodą PDT. Trzeba bowiem w sposób

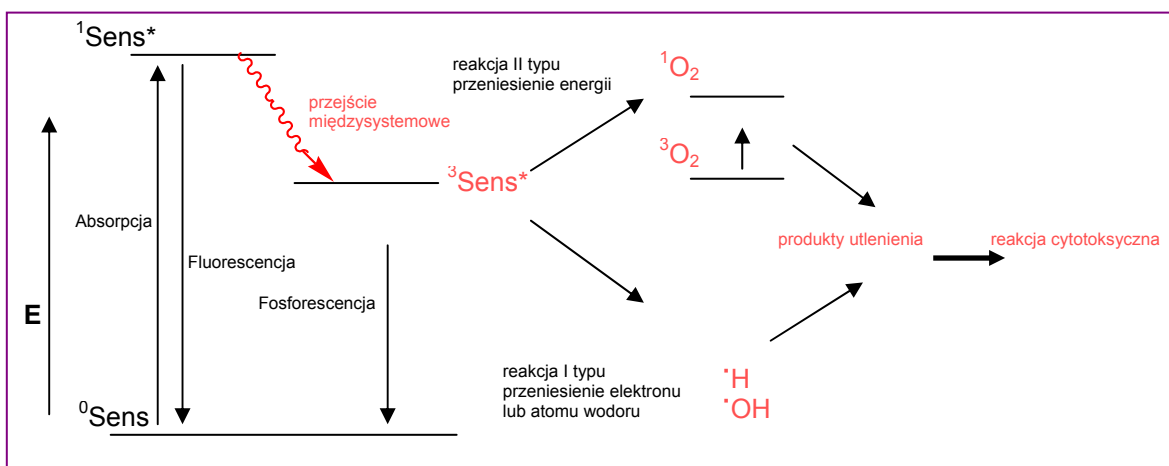
bezpieczny dla pacjenta wyprowadzić z organizmu sam sensybilizator, ale też i produkty jego fotodegradacji muszą zostać zmetabolizowane [127]. Wiele uwagi poświęca się więc poprawie właściwości farmakokinetycznych sensybilizatora.

Jedną z podstawowych zalet terapii fotodynamicznej, która niewątpliwie wyróżnia tę metodę jest jej selektywność w stosunku do chorych tkanek, oraz możliwość dostarczania promieniowania w formie wąskiej wiązki, możliwość wyboru czasu trwania terapii, jak i miejsca w organizmie gdzie prowadzona jest aktywna terapia. Metoda posiada również pewne ograniczenia związane z działaniem efektów ubocznych, takich jak długotrwała wrażliwość skóry na światło, nadmierne uszkodzenie tkanek w miejscu leczonym czy miejscowe zaburzenia w metabolizmie [125].

Na schemacie 4 zaprezentowano mechanizm terapii fotodynamicznej.

Z konieczności w powyższym rozdziale nakreślono jedynie zarys problemów jakie niesie przygotowanie i stosowanie terapii fotodynamicznej. Rozległość zagadnień dotyczących tematu oraz bogactwo literatury pokazuje jak wiele już zrobiono w tej dziedzinie. Zarazem niewielka liczba zaakceptowanych do terapii preparatów pokazuje jak wiele jest jeszcze niewiadomych.

Schemat 4, na podstawie [133,136]



Mechanizm działania terapii fotodynamicznej z uwzględnieniem zmodyfikowanego diagramu Jabłońskiego

Reaktywność pochodnych ryboflawiny w stanie trypletowym

Ryboflawina i jej pochodne zaangażowane są w wiele procesów fotochemicznych i fotobiologicznych, wśród których wymienia się m.in., fototropizm, fototaksję, czy działanie fotodynamiczne. Pochodne ryboflawiny ulegają wydajnemu przejściu międzysystemowemu, a długi czas życia stanu trypletowego czyni je potencjalnym czynnikiem w reakcjach sensybilizacji [34,137,138].

Przeciętne stężenie samej ryboflawiny w tkankach jest zbyt małe dla uzyskania znaczącej aktywności fotochemicznej. Natomiast może ona spełniać funkcję fotosensybilizatora. W tej roli związek staje się promotorem reakcji fotochemicznych takich związków, które nie absorbują promieniowania z zakresu widzialnego [93,122]. Ryboflawina spełnia rolę endogenicznego komórkowego fotosensybilizatora zarówno w układach *in vivo* jak i *in vitro*. Wzbudzenie optyczne potencjalnie może nastąpić w organach i tkankach ekspozowanych na działanie światła, takich jak oczy lub skóra. Zjawisko to może prowadzić do uszkodzeń DNA i organelli komórkowych, powodując w konsekwencji powstawanie stanów zapalnych i przyspieszając procesy starzenia. Grininger i współpr. [139] zauważył, że w organizmach żywych dodecyna (flawoproteina) jest czynnikiem, który powoduje ultraszybkie wygaszanie ryboflawiny w stanie wzbudzonym oraz zapobiega niekontrolowanym reakcjom indukowanym światłem przebiegającym z udziałem ryboflawiny. Dodecyna wiąże nadmiar ryboflawiny, powodując jej degradację do lumichromu. Reakcja przebiega w obrębie cząsteczki białka i jest dla komórki nieszkodliwa [139]. Uważa się, że *in vivo* proces fotosensybilizacji zachodzi poprzez przeniesienie elektronu z cząsteczek zasad DNA do cząsteczki ryboflawiny. Powstają w takich reakcjach utlenione wolne rodniki sensybilizatora, które są istotnym indywiduum przejściowym w procesie aktywacji reaktywnych form prokarcinogenów i promutagenów lub mogą przyłączać się do cząsteczek DNA powodując nieodwracalne zmiany w organizmach żywych [33,34,137,138,140,141].

Stwierdzono, że flawiny w obecności tlenu mogą sensybilizować utlenianie takich substancji jak: aminokwasy, białka, nukleotydy, lipidy, witaminy co stanowi poważne zagrożenie dla organizmów żywych. Zastosowanie zjawisk związanych z procesem sensybilizacji w sposób planowany może stanowić przyczynek do zwalczania wielu szkodliwych substancji czy drobnoustrojów obecnych w środowisku. Corbin [7,142]. sugeruje, że ryboflawina jako endogeniczny fotosensybilizator, może dezaktywować wiele niebezpiecznych wirusów i bakterii w produktach krwiopochodnych z jednoczesnym

zachowaniem aktywności i funkcji tych produktów. Sugeruje się także udział ryboflawiny jako sensybilizatora w reakcji fotodegradacji zanieczyszczeń, takich jak pestycydy, herbicydy, pochodne toluenu i fenolu w otwartych akwenach słodkiej wody [5,6,143-146]. Znana jest także katalityczna rola flawin w syntezie organicznej, przy utlenianiu amin czwartorzędowych. W reakcjach tych katalizatory flawinowe wyróżnia znaczna selektywność i wydajność oraz łagodne warunki utleniania [147].

Z analizy obliczeń teoretycznych Climent i współpr. [148] wynika, że obsadzanie stanu trypletowego jest głównie funkcją pierścienia izoalloksazynowego. Chociaż w cząsteczkach flawoprotein otoczenie białkowe zwiększa szybkość przejścia międzysystemowego, główną rolę w inicjowaniu cyklu fotochemicznego spełnia chromofor izoalloksazynowy, zdolny do wydajnego obsadzania najniższego stanu trypletowego. Właściwość ta leży u podstaw prawidłowego funkcjonowania flawoprotein w przyrodzie [148].

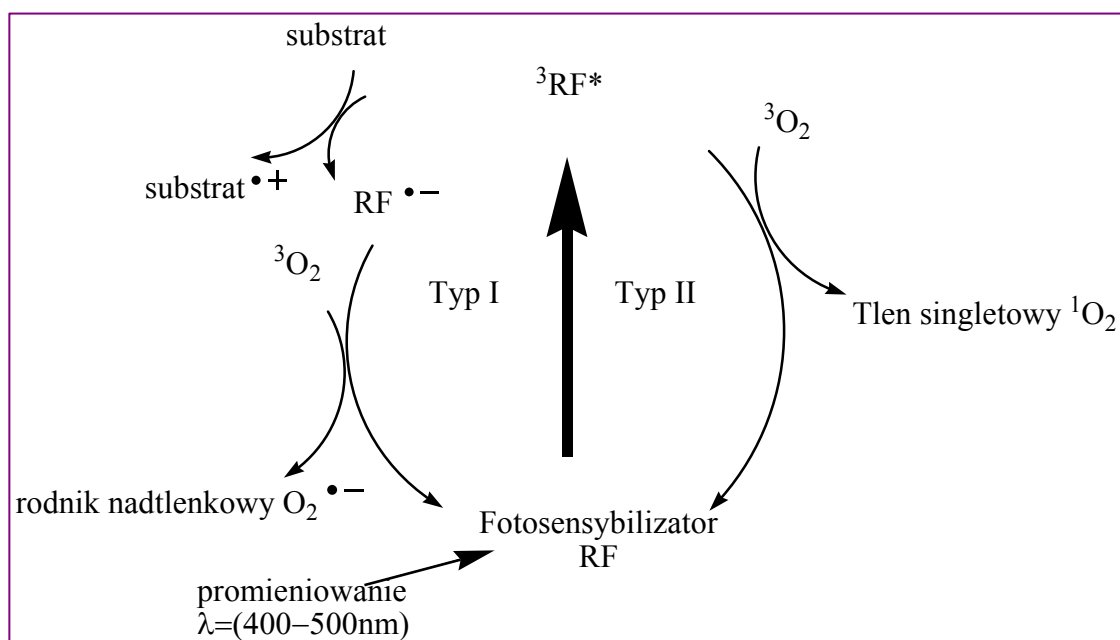
Iqbal i współpr. [93] zaobserwowali różnice w działaniu różu bengalskiego i ryboflawiny jako sensybilizatorów tlenu singletowego w reakcji utleniania acyklowiru. Obydwa sensybilizatory działają zarówno według I jak i II mechanizmu utleniania. Róż bengalski, który reaguje głównie według mechanizmu II typu powoduje powstawanie tlenu singletowego w dużych ilościach, podczas gdy ryboflawina, dla której obserwuje się przewagę mechanizmu utleniania I typu, sensybilizuje powstawanie mniejszych ilości tlenu singletowego. Z różnym udziałem obu mechanizmów wiąże się fakt, że produkty rozkładu acyklowiru są różne dla każdego z zastosowanych sensybilizatorów [93].

Porównanie sensybilizujących właściwości ryboflawiny z odpowiednimi właściwościami błękitu metylenowego, którego zdolność do generowania tlenu singletowego jest powszechnie znana, przeprowadzili Edwards i Silva [149]. Z uzyskanych danych wynika, że dezaktywacja badanych enzymów, takich jak katalaza, HRP (*horse redish peroxidase*) czy lizozym, pod wpływem światła w obecności ryboflawiny była znacznie mniej wydajna niż w obecności błękitu metylenowego. Ponadto poprzez efekt izotopowy potwierdzono udział tlenu singletowego w badanych reakcjach dezaktywacji enzymów. Uzyskane rezultaty wskazują, że błękit metylenowy działa głównie poprzez mechanizm typu II, a więc poprzez tlen singletowy, ponieważ efekt izotopowy zaobserwowany dla błękitu metylenowego był kilkakrotnie większy od tego dla ryboflawiny. Ryboflawina działa zarówno według I jak i II mechanizmu, w zależności od substratów, których reakcje sensybilizuje [150]. Autorzy pokazali, że naświetlanie komórek nowotworowych światłem widzialnym w obecności ryboflawiny powoduje ich

zniszczenie. Aktywność fototoksyczna ryboflawiny wzrasta, gdy środowisko reakcji wzbogacono o zawartość tyrozyny czy tryptofanu w atmosferze azotu. Obecność powstających fotoproduktów dodatkowo powoduje morfologiczne zmiany w naświetlanych komórkach przypominające apoptozę [149,151-153]. Niektóre aminokwasy, takie jak alanina czy fenyloalanina inhibują reakcję fotoutleniania, prawdopodobnie przez wygaszanie stanu trypletowego ryboflawiny, a cysteina przez wygaszanie powstającego w reakcji tlenu singletowego [154].

Schemat 5 przedstawia mechanizm reakcji fotosensybilizowanej I i II typu z udziałem ryboflawiny jako sensybilizatora.

Schemat 5, według [155]



Schemat reakcji fotosensybilizacji przebiegającej z udziałem ryboflawiny jako fotosensybilizatora

Lu i współpr. [33] zaobserwowali w roztworze wodnym postulowane wcześniej przeniesienie elektronu od cząsteczek nukleozydów pirymidynowych i purynowych do jedno-elektronowo utlenionego rodnika ryboflawinowego. Zaobserwowano także fakt, że ze wszystkich zasad kwasów nukleinowych reszty guaninowe były najbardziej podatne na fotoutlenianie za pośrednictwem ryboflawiny, co może być wynikiem niskiego potencjału

utleniania tej reakcji oraz oddziaływań pomiędzy guaniną i ryboflawiną. Uzyskane rezultaty pozostają w zgodzie z wcześniejszymi wynikami i wskazują, że zasady pirymidynowe są mniej podatne na fotodegradację niż zasady purynowe [33] i prace tam cytowane oraz praca [156].

Wyniki otrzymane dla kilku cząsteczek fulerenów o różnych właściwościach hydrofobowych [110] wskazują, że zmiana rozpuszczalnika z organicznego na wodny wpływa szczególnie znacząco na wydajność tworzenia tlenu singletowego, która w pewnych warunkach spada niemal do zera. Przyczyny takiego zachowania upatruje się w tworzeniu agregatów niepolarnych związków w bardziej polarnym rozpuszczalniku. Badania pokazały, że fulereny zależnie od warunków eksperymentu w wyniku naświetlania dają zarówno tlen singletowy jak i anion nadtlenny [110].

Fotoaktywowane fulereny stanowią też czynnik skuteczny w rozpadzie DNA, procesach mutagenicznych, uszkodzaniu błon komórkowych, fotodezaktywacji wirusów i innych drobnoustrojów oraz w niszczeniu komórek nowotworowych ssaków. Reakcje te same w sobie stanowią oddzielne i niezwykle interesujące zagadnienie [108-110].

Wieloletnie badania nad flawinami pozwalają wyróżnić kilka dróg reakcji przebiegających z ich udziałem:

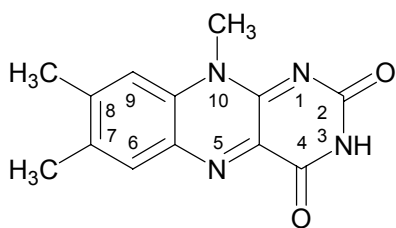
- bezpośrednie przeniesienie energii z cząsteczki flawiny we wzbudzonym stanie trypletowym do cząsteczki substratu, przy założeniu, że energia stanu trypletowego substratu jest niższa od energii stanu trypletowego flawiny ($E_T \sim 200$ kJ/mol),
- przeniesienie energii od cząsteczki flawiny w stanie trypletowym do cząsteczki tlenu z utworzeniem tlenu singletowego; w niektórych przypadkach na skutek przeniesienia elektronu może być generowany anionorodnik nadtlenny $O_2^{\bullet -}$,
- zredukowanie flawiny w stanie trypletowym poprzez przeniesienie elektronu lub atomu wodoru z cząsteczki substratu; reakcja przebiega poprzez mechanizm typu rodnikowego [138].

IV. Omówienie wyników badań własnych

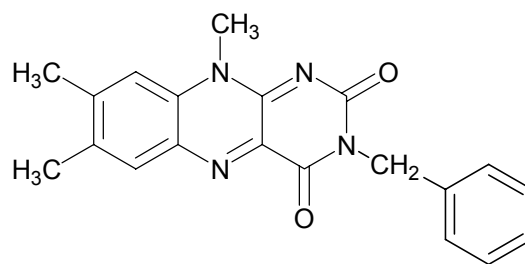
1. Wprowadzenie

Flawiny jako związki o niezwykle atrakcyjnych właściwościach kwasowo - zasadowych, mają szerokie zastosowanie w biologii i medycynie. Powszechność ich występowania i niebagatelna rola jaką pełnią w przyrodzie i w procesach metabolicznych organizmów żywych tym bardziej czynią je interesującym obiektem badań.

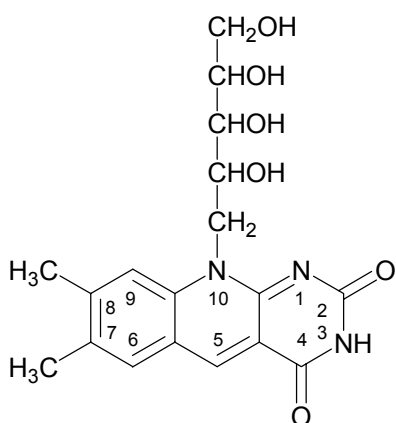
Badania podjęte w ramach niniejszej pracy miały na celu opisanie właściwości spektralnych, fotofizycznych i fotochemicznych wybranych pochodnych ryboflawiny. Z punktu widzenia potencjalnych zastosowań flawin w przemyśle spożywczym, biologii, chemii czy medycynie, znajomość struktury elektronowej, właściwości kwasowo – zasadowych wydaje się być tyleż podstawowa co istotna przy planowaniu eksperymentów, przewidywaniu właściwości i poszukiwaniu nowych funkcji biologicznych. Do badań wybrano kilka pochodnych ryboflawiny, a mianowicie izo-6,7-ryboflawinę, 5-deaza-ryboflawinę, 3-metylo-tetraacetylo-ryboflawinę oraz pochodną lumiflawiny – 3-benzylolumiflawinę (**Rysunek 18**, str. 59). Dobór pochodnych pozwolił na zaobserwowanie m.in. wpływu pozycji i rodzaju podstawnika w pierścieniu izoalloksazynowym na właściwości spektralne i fotofizyczne flawin. Do badań wybrano rozpuszczalniki protyczne i aprotyczne, różniące się polarnością. Wykonano także obliczenia metodą DFT w celu określenia struktury elektronowej oraz położenia wzbudzonych stanów singletowych i trypletowych i ich właściwości. Wybrane flawiny posłużyły również jako fotosensybilizatory w reakcjach prowadzących do tworzenia tlenu singletowego.



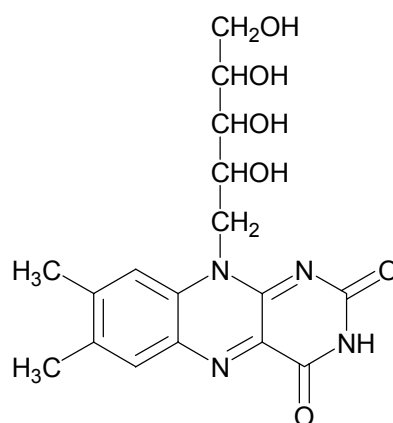
Lfl Lumiflawina



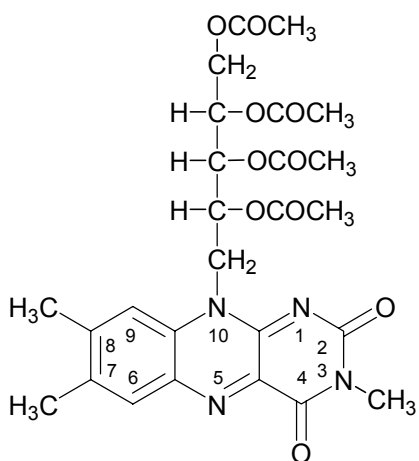
3BLfl 3-benzyl-lumiflawina



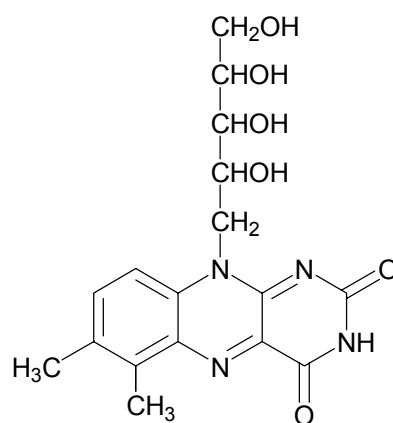
5DRfl 5-deaza-ryboflawina



Rfl Ryboflawina



3MeTARF 3-metylo-tetraacetylo-ryboflawina



IR izo-6,7-ryboflawina

Rysunek 18. Struktury pochodnych ryboflawiny, których właściwości stanowią przedmiot prezentowanej pracy

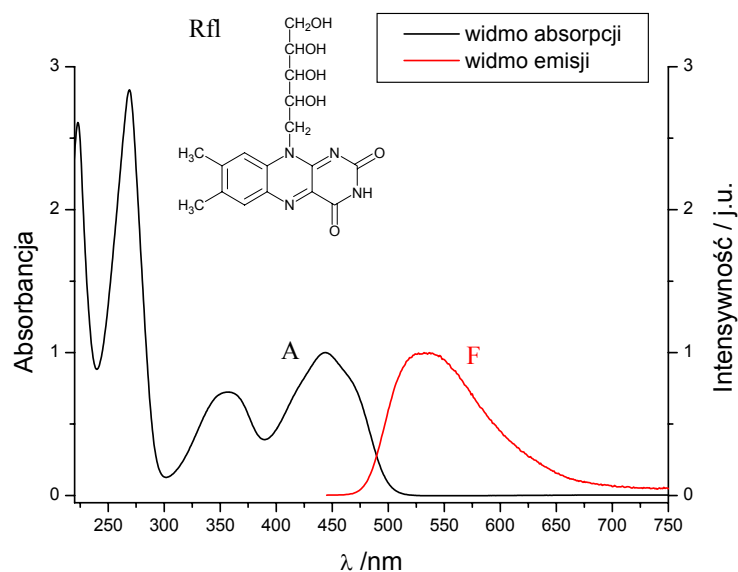
2. Właściwości absorpcyjne i emisyjne

Widma absorpcji

W ramach przedstawionej pracy wyznaczono właściwości absorpcyjne i emisyjne badanych pochodnych ryboflawiny w wodzie, acetonitrylu, alkoholu metylowym, alkoholu etylowym oraz 1,2-dichloroetanie. Otrzymane wyniki wraz z wyznaczonymi stałymi fotofizycznymi przedstawiono w Tabelach 3-6. Rysunek 19 (str. 61) przedstawia widmo absorpcji i widmo emisji samej ryboflawiny w metanolu.

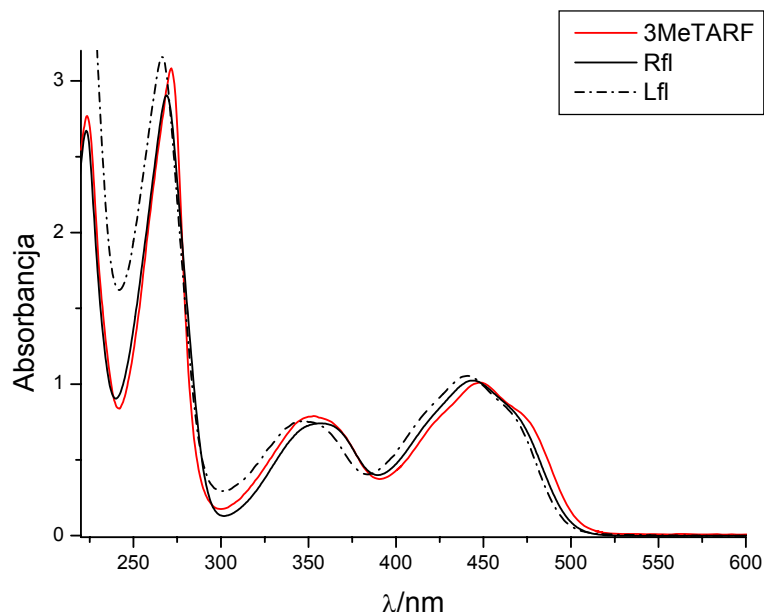
Widma absorpcji badanych związków posiadają dwa stosunkowo silne pasma w zakresie długofalowym, jedno z maksimum przy ok. 350 nm, drugie położone przy ok. 440 nm, oba pasma są charakterystyczne dla związków z grupy flawin.

Widmo absorpcji ryboflawiny w alkoholu metylowym posiada dwa charakterystyczne pasma absorpcji z maksimami położonymi przy długości fali 360 nm ($27,8 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$) i 444 nm ($22,5 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$),,. Dla metylowej pochodnej ryboflawiny acetylowanej dodatkowo w łańcuchu rybitylowym pasma absorpcji ulegają charakterystycznym przesunięciom, a mianowicie pasmo bardziej krótkofalowe jest przesunięte w kierunku fal krótszych o ok. 7 nm, podczas gdy pasmo bardziej długofalowe jest przesunięte nieznacznie w kierunku fal dłuższych, w stosunku do odpowiednich pasm ryboflawiny.



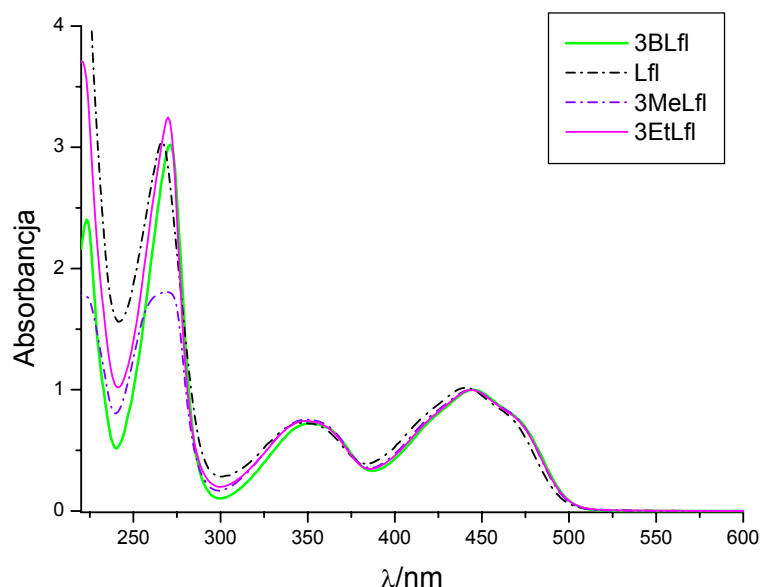
Rysunek 19. Znormalizowane widma absorpcji i emisji ($\lambda_{\text{wzb}} = 450 \text{ nm}$) dla ryboflawiny w metanolu (A-widmo absorpcji, F- widmo fluorescencji)

Porównanie widm absorpcji lumiflawiny, ryboflawiny i 3-metylo-tetraacetylo-ryboflawiny (**Rysunek 20**, str. 62) w metanolu pokazuje jedynie nieznaczne przesunięcia pasm absorpcji od 351 nm ($28,5 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$) dla Lfl, poprzez 353 nm ($28,3 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$) dla 3MeTARF, do 360 nm ($27,8 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$) dla Rfl. Ta sama niewielka różnica (w granicach 2-6 nm) dotyczy pasm bardziej długofalowych w widmach absorpcji analizowanych związków. Jeśli jednocześnie wziąć pod uwagę fakt, że obecność podstawnika metylowego w cząsteczce (Lfl – 3MeLfl, **Tabela 4**, str. 67) nie wpływa na położenie pasm absorpcji, to można zauważyć, że jedynie zamiana grupy metylowej w pozycji N(10) w cząsteczce Lfl na łańcuch rybitylowy w tej pozycji w cząsteczce Rfl jest jedynym czynnikiem wpływającym na przesunięcie pasma absorpcji 351 nm (Lfl) do 360 nm (Rfl). Grupy acetylowe obecne w łańcuchu rybitylowym w cząsteczce 3MeTARF, które czynią tę cząsteczkę bardziej polarną w stosunku do Rfl, powodują nieznaczne przesunięcie maksimum pasma od 360 nm dla Rfl do 353 nm dla 3MeTARF. Równie niewielkie zmiany położenia pasm w widmie absorpcji obserwuje się gdy porównać widma Rfl i 3MeTARF w wodzie (**Rysunek 20**, str. 62).



Rysunek 20. Widma absorpcji lumiflawiny (Lfl), ryboflawiny (Rfl) i 3-metylo-tetraacetylo-ryboflawiny (3MeTARF) w metanolu

Na przykładzie lumiflawiny i jej pochodnych 3-metylo-, 3-etylo- i 3-benzylo-lumiflawiny, można prześledzić wpływ podstawnika w pozycji 3 pierścienia izoalloksazynowego na kształt widma i położenie poszczególnych pasm absorpcji. W przypadku lumiflawiny i jej pochodnych badanych w metanolu, można zauważyć, że najbardziej długofalowe pasmo absorpcji, z maksimum dla Lfl przy około 442 nm ($22,6 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$), tylko w nieznacznym stopniu, aczkolwiek systematycznie, przesuwa się wraz ze wzrostem wielkości podstawnika w kierunku fal dłuższych, osiągając położenie przy 448 nm dla 3-benzylo-lumiflawiny. Molowe współczynniki absorpcji również są podobne i osiągają wartość ok. $13000 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, z wyjątkiem pochodnej 3-metylo-lumiflawiny, dla której wyznaczona wartość to $9900 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (**Tabela 6**, str. 70).



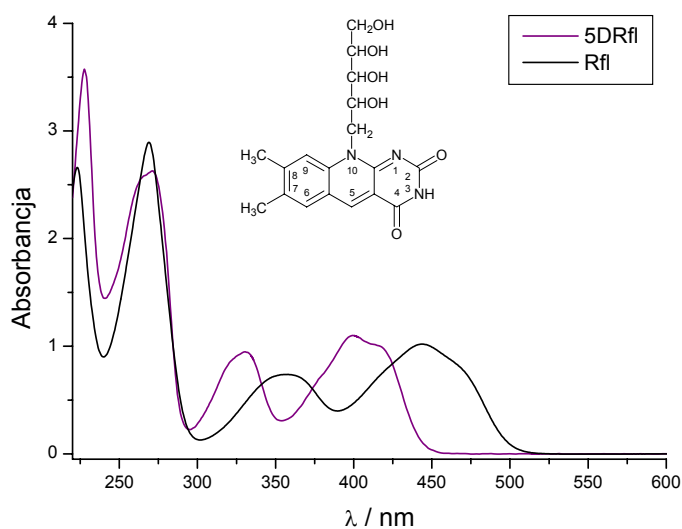
Rysunek 21. Zestawienie widm absorpcji 3-benzyl-lumiflawiny (3BLfl), lumiflawiny (Lfl), 3-metylo-lumiflawiny (3MeLfl) i 3-etylo-lumiflawiny (3EtLfl) w metanolu

Porównanie widma absorpcji izo-6,7-ryboflawiny z widmem ryboflawiny pokazuje, że pozycja podstawników w istotny sposób wpływa na położenie pasma absorpcji z maksimum dla ryboflawiny w metanolu przy ok. 360 nm. Maksimum to ulega znacznemu przesunięciu (o 17 nm), gdy położenie podstawnika metylowego w cząsteczce zmienia się z pozycji C(8) na pozycję C(6), i leży przy ok. 343 nm dla izo-6,7-ryboflawiny w metanolu. Natomiast położenie pasma najbardziej długofalowego tylko w niewielkim stopniu modyfikowane jest przez zmianę pozycji podstawników metylowych – różnica położenia tego maksimum dla obu pochodnych wynosi tylko 3 nm (**Tabela 4**, str. 67).

5-Deaza-ryboflawina

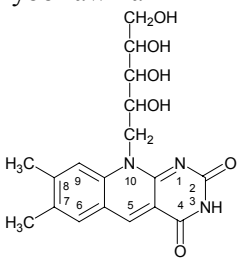
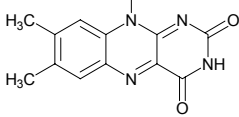
Różnica w strukturze 5-deaza-ryboflawiny w stosunku do ryboflawiny, którą potraktowano w tej pracy jako związek macierzysty, polega na tym, że cząsteczka 5DRfl w miejscu atomu azotu N(5), obecnego w cząsteczce Rfl, zawiera atom węgla C(5). Ta różnica strukturalna warunkuje dość znaczne zmiany w położeniu pasm absorpcji obu związków. Widmo absorpcji 5DRfl posiada dwa intensywne pasma absorpcji w krótkofalowej części widma z maksimami odpowiednio przy 227 nm ($44,0 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$) i 267 nm, ($37,4 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$), oraz dwa mniej intensywne pasma z maksimami przy długości fali 333 nm ($30,0 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$) i w zakresie widzialnym przy około 400 nm ($25,0 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$). Zestawienie widm absorpcji metanolowych roztworów 5-deaza-ryboflawiny i ryboflawiny

(Rysunek 22) wykazuje znaczne przesunięcie pasm absorpcji 5-deaza- pochodnej w kierunku fal krótszych; w przypadku pasma bardziej krótkofalowego o ok. 27 nm, w przypadku pasma bardziej długofalowego o 44 nm (Tabela 3, str. 65). Gdy zestawić widma absorpcji 5DRfl w metanolu z widmem w acetonitrylu daje się zauważyć jedynie nieznaczne przesunięcie maksimum pasma od 333 nm ($30,0 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$) w metanolu w kierunku fal krótszych do 329 nm ($30,4 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$) w acetonitrylu.



Rysunek 22. Zestawienie widm absorpcji 5-deaza-ryboflawiny (5DRfl) i ryboflawiny (Rfl) w metanolu

Tabela 3. Parametry spektralne i fotofizyczne dla 5-deaza-ryboflawiny w zestawieniu z danymi dla ryboflawiny w różnych rozpuszczalnikach

Związek	Rozpuszczalnik	λ_2 /nm	λ_1 /nm	λ_F /nm	ϕ_F	τ_F /ns	k_r / $10^8 s^{-1}$	Σk_{nr} / $10^8 s^{-1}$
5-Deaza-ryboflawina 	acetonitryl	329	399	457	0.11	4.03	0.27	2.21
	metanol	333	400	455	0.11	3.98	0.29	2.22
Ryboflawina 	woda	375	447	537	0.28	5.1	0.55	1.41
	metanol	360	444	532	0.39 ^a	5.21, 6.3 ^a , 5.4 ^b	0.62	0.97

λ_1 , λ_2 reprezentują położenie maksimum w widmie absorpcji dwóch pasm o najniższej energii,

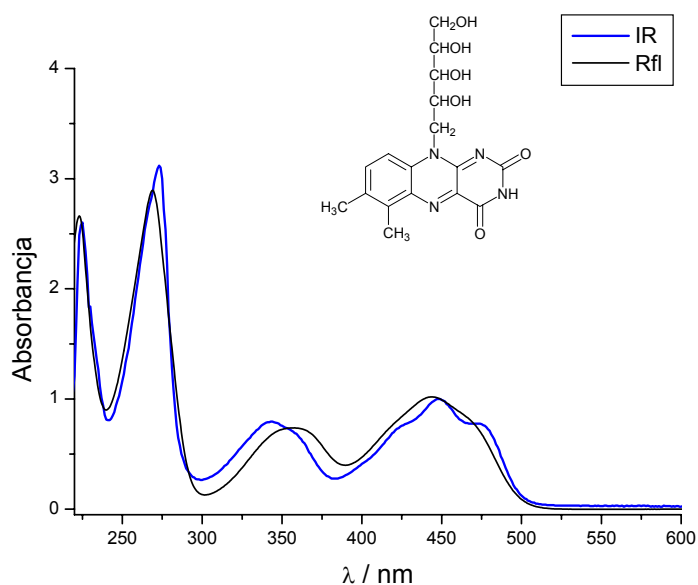
λ_F oznacza położenie maksimum pasma emisji, ϕ_F wydajność kwantowa fluorescencji, τ_F czas życia fluorescencji, k_r stała szybkości procesów radiacyjnych oraz Σk_{nr} suma stałych szybkości procesów nieradiacyjnych

Oszacowany względny błąd dla wartości ϕ_F i τ_F wynosi 10%.

^a dane pochodzą z Ref. [102], ^b dane pochodzą z Ref. [27]

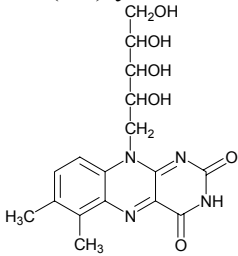
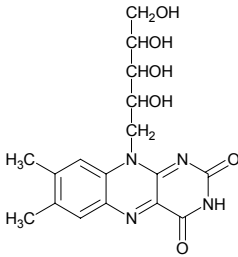
Izo-6,7-ryboflawina

Izo-6,7 – ryboflawina w metanolu wykazuje obecność dwóch charakterystycznych dla izoalloksazyn pasm absorpcji w zakresie długofalowym z maksimum przy około 343 nm ($29,2 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$) w zakresie UV oraz pasmo z maksimum przy 447 nm ($22,4 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$) w widzialnej części widma. Ponadto związek ten posiada dwa intensywne pasma absorpcji w krótkofalowej części widma, z maksimami przy 227 nm ($44,0 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$) oraz 270 nm ($37,0 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$) (**Rysunek 23**). Porównanie z ryboflawiną wskazuje na dość znaczne przesunięcie bardziej krótkofalowego pasma (360 nm dla ryboflawiny) w kierunku fal krótszych w przypadku izo-6,7-ryboflawiny (343 nm). Efekt ten spowodowany jest innym układem podstawników metylowych w cząsteczkach porównywanych związków. Dane spektralne i fotofizyczne przedstawiono w **Tabeli 4**, str. 67.



Rysunek 23. Widma absorpcji izo-6,7-ryboflawiny (IR) i ryboflawiny (Rfl) w metanolu

Tabela 4. Parametry spektralne i fotofizyczne dla izo-(6,7)-ryboflawiny w zestawieniu z danymi dla ryboflawiny w metanolu

Związek	Rozpuszczalnik	λ_2 /nm	λ_1 /nm	λ_F /nm	ϕ_F	τ_F /ns	k_r / $10^8 s^{-1}$	Σk_{nr} / $10^8 s^{-1}$
Izo-(6,7)ryboflawina 	metanol	343	447	552	0.20	4.2	0.48	1.9
Ryboflawina 	metanol	360	444	532	0.39 ^a	5.21 6.3 ^a 5.4 ^b	0.62	0.97

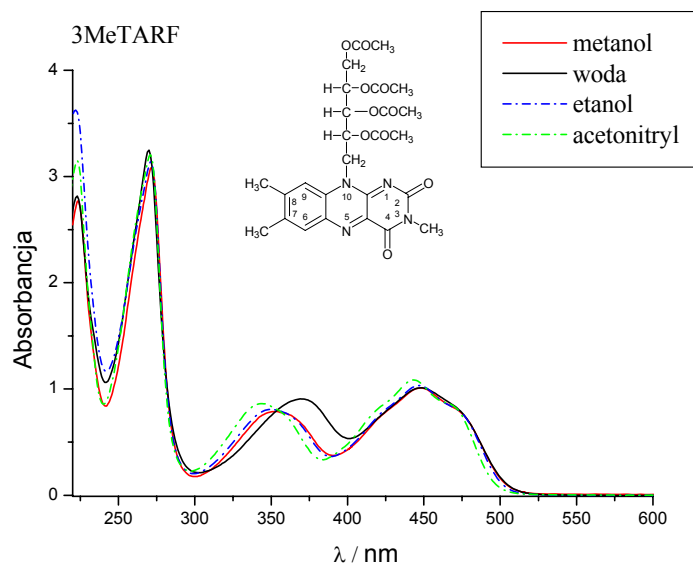
λ_1 , λ_2 reprezentują położenie w widmie absorpcji dwóch pasm o najniższej energii,

λ_F oznacza położenie maksimum pasma emisji, ϕ_F wydajność kwantowa fluorescencji, τ_F czas życia fluorescencji, k_r stała szybkości procesów radiacyjnych oraz Σk_{nr} suma stałych szybkości procesów nieradiacyjnych

^a dane pochodzą z Ref. [102], ^b dane pochodzą z Ref.[27]

3-Metylo-tetraacetylo-ryboflawina

W widmie absorpcji 3MeTARF w roztworze metanolowym obecne są dwa intensywne pasma absorpcji położone w zakresie krótkofalowym przy 227 nm ($46,0 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$) i przy 275 nm ($36,4 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$). Ponadto obecne jest pasmo w zakresie UV 353 nm ($28,3 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$) oraz pasmo w zakresie widzialnym 448 nm ($22,3 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$). Położenie maksimów odpowiednich pasm absorpcji niewiele odbiega od położenia odpowiednich maksimów pasm, charakterystycznych dla ryboflawiny, a nieznaczne różnice są spowodowane jedynie wpływem grupy metylowej w pozycji N(3) pierścienia izoalloksazynowego oraz obecnością grup acetylowych, zastępujących grupy hydroksylowe w łańcuchu rybitylowym. **Rysunek 24** (str. 68) przedstawia widmo absorpcji związku 3MeTARF. Dane spektralne i fotofizyczne 3MeTARF zamieszczono w **Tabeli 5**, (str. 68).



Rysunek 24. Widma absorpcji 3-metylo-tetraacetylo-ryboflawiny (3MeTARF) w metanolu i innych rozpuszczalnikach

Tabela 5. Parametry spektralne i fotofizyczne dla 3-metylo-tetraacetylo-ryboflawiny (3MeTARF) i ryboflawiny w różnych rozpuszczalnikach

Związek	Rozpuszczalnik	λ_2 /nm	λ_1 /nm	λ_F /nm	ϕ_F	τ_F /ns	k_r / $10^8 s^{-1}$	Σk_{nr} / $10^8 s^{-1}$
3MeTARF <chem>CC(=O)OCC(C(=O)OC)C(C(=O)OC)C(C(=O)OC)C1=NC2=C(N1)C(=O)N(C)C=NC2=C3C=C(C)C=C(C)N3</chem>	acetonitryl	345	446	505	0.12	5.8	0.21	1.5
	metanol	353	448	513	0.089	5.4	0.16	1.7
	etanol	351	449	512	0.064	5.5	0.12	1.7
	woda	373	451	520	0.11	4.4	0.25	2.0
Ryboflawina <chem>CC1=C(C(=O)NC2=NC(=O)N(C)C=C2N1C3=CC(=C(C)C=C3C4=CC=CC=C4N4C(=O)CC(O)CC(O)CO4)C</chem>	woda	375	447	537	0.28	5.1	0.55	1.4
	metanol	360	444	532	0.39 ^a	5.21, 6.3 ^a , 5.4 ^b	0.62	0.97

λ_1 , λ_2 reprezentują położenie w widmie absorpcji dwóch pasm o najniższej energii,

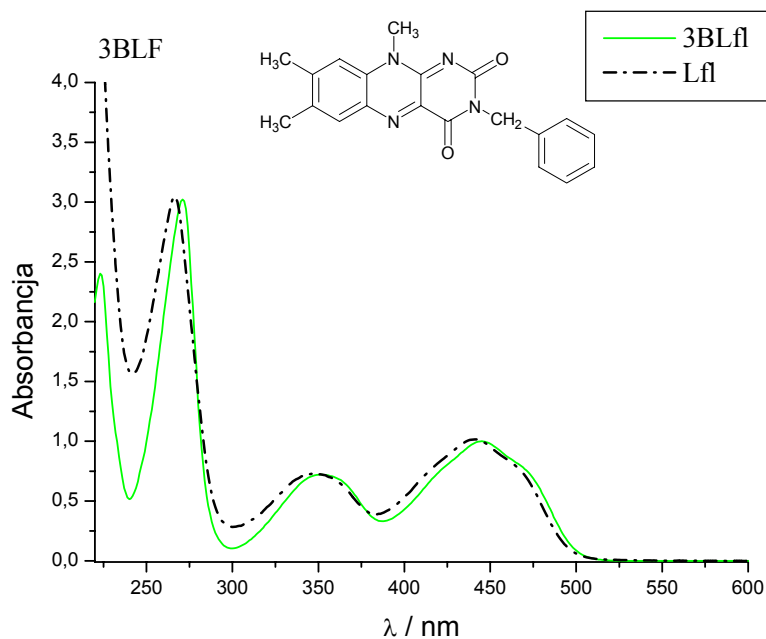
λ_F oznacza położenie maksimum pasma emisji, ϕ_F wydajność kwantowa fluorescencji, τ_F czas życia fluorescencji, k_r stała szybkości procesów radiacyjnych oraz Σk_{nr} suma stałych szybkości procesów nieradiacyjnych;

Oszacowany względny błąd dla wartości ϕ_F i τ_F wynosi 10%.

^a Dane pochodzą z Ref. [102], ^b dane pochodzą z Ref. [27]

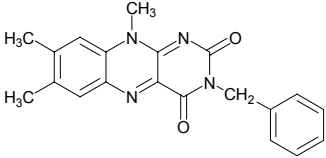
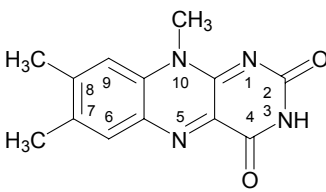
3-Benzyl-lumiflawina

W widmie absorpcji tej pochodnej obserwuje się dwa intensywne pasma absorpcji przy 225 nm ($44,4 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$), 275 nm ($36,3 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$), pasmo przy 350 nm ($28,5 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$) oraz pasmo w zakresie widzialnym przy 450 nm ($22,2 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$), (**Rysunek 25**). Dane spektralne i fotofizyczne dla 3-benzyl-lumiflawiny zamieszczono w **Tabeli 6** (str. 70).



Rysunek 25. Widma absorpcji 3-benzyl-lumiflawiny (3BLfl) i lumiflawiny (Lfl) w metanolu

Tabela 6. Parametry spektralne i fotofizyczne dla 3-benzylo-lumiflawiny w zestawieniu z lumiflawiną i innymi jej pochodnymi w metanolu

Związek	λ_2 /nm	λ_1 /nm ($\epsilon/\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$)	λ_F /nm	ϕ_F	τ_F /ns	k_r / 10^8s^{-1}	Σk_{nr} / 10^8s^{-1}
3-benzylo-lumiflawina							
	353	448 (13000)	534	0.10	5.8	0.17	1.6
3-etylo-lumiflawina *	350	446 (13000)	532	0.11	6.3	0.17	1.4
3-metylo-lumiflawina **	351	444 (9900)	533	0.15	6.3	0.24	1.3
Lumiflawina **							
	351	442 (12200)	531	0.13	6.8	0.19	1.3

λ_1 , λ_2 reprezentują położenie w widmie absorpcji dwóch pasm o najniższej energii, w nawiasach podano molowy współczynnik absorpcji (ϵ),

λ_F oznacza położenie maksimum pasma emisji, ϕ_F wydajność kwantowa fluorescencji, τ_F czas życia fluorescencji, k_r stała szybkości procesów radiacyjnych oraz Σk_{nr} suma stałych szybkości procesów nieradiacyjnych

Oszacowany względny błąd dla wartości ϕ_F i τ_F wynosi 10%.

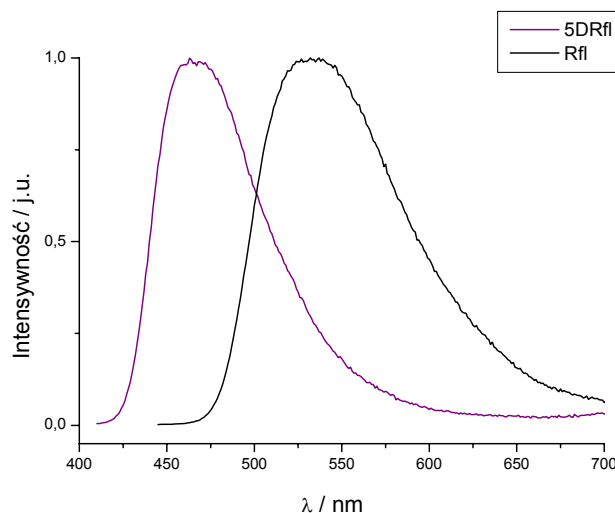
* Dane pochodzą z Ref. [157], ** dane pochodzą z Ref. [85].

Widma emisji

Badane pochodne ryboflawiny fluoryzują w temperaturze pokojowej. Widma emisji charakteryzują się obecnością jednego pasma z maksimum fluorescencji przypadającym na około 530 nm. Ryboflawina w metanolu wykazuje pasmo z maksimum przy długości fali $\lambda = 532 \text{ nm}$ ($18,8 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$). W wodzie pasmo to nieznacznie przesuwają się w kierunku fal dłuższych i jego maksimum przypada przy ok. 537 nm ($18,6 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$). Widma fluorescencji badanych związków zarejestrowano w metanolu, acetonitrylu i w wodzie. Istotne ograniczenie stanowi rozpuszczalność badanych pochodnych w niektórych rozpuszczalnikach. Widma wzbudzenia odpowiadają widmom absorpcji poszczególnych pochodnych. Zanik fluorescencji opisuje funkcja monoeksponencjalna.

5-Deaza-ryboflawina

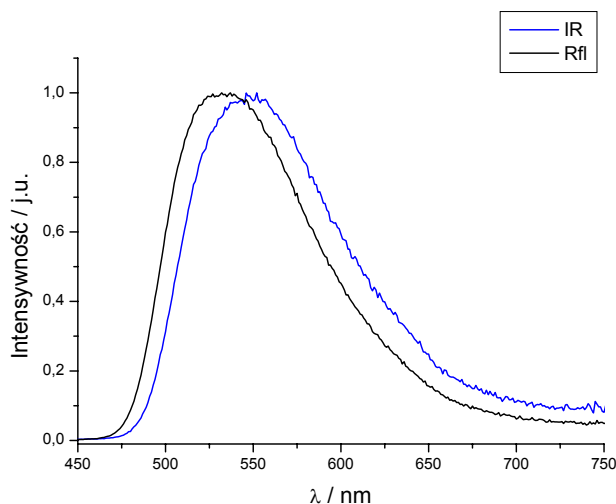
W przypadku pochodnej 5-deaza-ryboflawiny w metanolu (**Rysunek 26**, str. 72) maksimum fluorescencji przypada przy długości fali $\lambda = 455 \text{ nm}$ ($22,0 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$). Zamiana atomu azotu w pozycji N(5) pierścienia izoalloksazynowego, w przypadku ryboflawiny, na atom węgla C(5) w przypadku pochodnej 5-deaza-, powoduje przesunięcie pasma emisji w kierunku fal krótszych aż o 77 nm. Również wydajność kwantowa fluorescencji jest wyraźnie mniejsza dla 5-deaza-ryboflawiny ($\phi = 0,11$) w porównaniu do $\phi = 0,39$ dla ryboflawiny [102] (**Tabela 3**, str. 65). Porównanie czasów życia fluorescencji pochodnej 5-deaza-ryboflawiny z ryboflawiną w metanolu pokazuje, że 5-deaza-ryboflawina w stanie wzbudzonym żyje krócej niż ryboflawina w stanie wzbudzonym. Wyznaczone dla 5DRfl stałe szybkości dezaktywacji stanu wzbudzonego radiacyjne i nieradiacyjne wskazują, że dezaktywacja stanu wzbudzonego 5DRfl zachodzi głównie na drodze bezpromienistej. Odpowiednie stałe szybkości dla ryboflawiny mają wartości zbliżone do siebie. Krzywe zaniku fluorescencji 5DRfl opisano jako monoeksponencjalne, a wartość czasu życia fluorescencji wyznaczono na 3,98 ns. Zmiana rozpuszczalnika z metanolu na acetonitryl nie powoduje istotnych zmian wartości wyznaczonych wydajności kwantowej fluorescencji (ϕ_F), czasu życia fluorescencji (τ_F) oraz wielkości stałych szybkości zaniku radiacyjnego (k_r) i zaników nieradiacyjnych (k_{nr}). W przypadku ryboflawiny zanotowano jej słabą rozpuszczalność w acetonitrylu, i w związku z tym zrezygnowano z pomiarów w tym rozpuszczalniku dla tej pochodnej. W **Tabeli 3** (str.65) zamieszczono omówione dane dla 5-deaza-ryboflawiny w zestawieniu z danymi dla ryboflawiny.



Rysunek 26. Znormalizowane widma emisji 5-deaza-ryboflawiny (5DRfl) i ryboflawiny (Rfl) w metanolu ($\lambda_{wzb} = 425$ nm)

1zo-6,7-ryboflawina

Cząsteczka 1zo-6,7-ryboflawiny różni się od macierzystej cząsteczki ryboflawiny innym układem podstawników metylowych w obrębie pierścienia benzenowego, posiada grupy metylowe w pozycji C(6) i C(7), podczas gdy w cząsteczce ryboflawiny grupy metylowe podstawione są w pierścieniu w pozycjach C(7) i C(8) (**Rysunek 18**, str. 59). Widmo emisji 1zo-6,7-ryboflawiny w metanolu wykazuje maksimum przy $\lambda = 552$ nm ($18,1 \times 10^3$ cm⁻¹), a więc jest przesunięte w stosunku do maksimum pasma emisji ryboflawiny w kierunku fal dłuższych o ok. 20 nm, a kształtem i położeniem pasma nie odbiega od widm innych przedstawicieli tej grupy związków. Stan wzbudzony tej pochodnej charakteryzuje wydajność kwantowa fluorescencji, równa $\phi_F = 0,2$. W zestawieniu z wynikami otrzymanymi np., dla ryboflawiny w wodzie wartość ta jest jednak istotnie niższa. Czas życia fluorescencji 1zo-6,7-ryboflawiny wynosi $\tau_F = 4,2$ ns, a zanik fluorescencji dobrze opisuje funkcja monoeksponencjalna. Stałe zaniku stanu wzbudzonego radiacyjne i nieradiacyjne wynoszą odpowiednio $0,48 \times 10^8$ s⁻¹ oraz $1,9 \times 10^8$ s⁻¹. Takie wartości są charakterystyczne dla wielu związków z grupy flawin. Porównanie tych wartości z odpowiednimi wartościami dla ryboflawiny pokazuje, że stała odpowiadająca za szybkość procesów nieradiacyjnych w przypadku pochodnej 1zo-6,7- w roztworze metanolowym jest dwukrotnie większa niż dla ryboflawiny. Wartości poszczególnych parametrów spektroskopowych i fotofizycznych zebrano w **Tabeli 4** (str.67). Widmo emisji 1zo-6,7-ryboflawiny w metanolu przedstawiono na **rysunku 27**.



Rysunek 27. Widma emisji izo-6,7-ryboflawiny (IR) i ryboflawiny (Rfl) w metanolu ($\lambda_{\text{wzb}} = 355 \text{ nm}$)

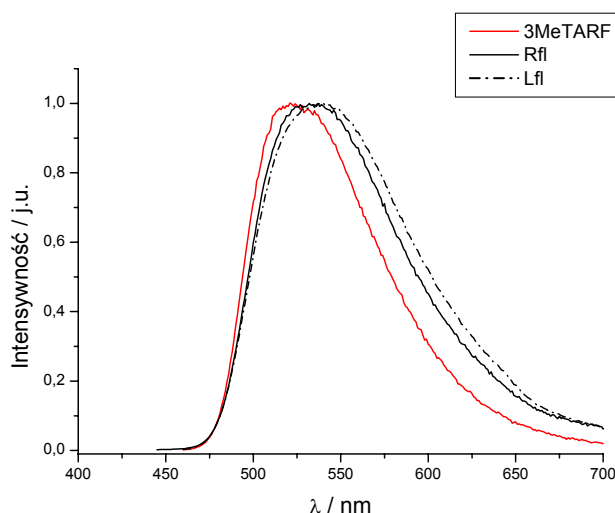
3-Metylo-tetraacetylo-ryboflawina

Cząsteczka 3MeTARF w stosunku do cząsteczki ryboflawiny w swojej strukturze zawiera dodatkowo podstawnik metylowy w pozycji 3 pierścienia izoalloksazynowego oraz grupy acetylowe, obecne w łańcuchu rybitylowym, w miejsce grup hydroksylowych. Taka struktura łańcucha rybitylowego powoduje wzrost polarności cząsteczki w stosunku do ryboflawiny.

3-Metylo-tetraacetylo-ryboflawina wykazuje fluorescencję w temperaturze pokojowej. Emisja w metanolu pojawia się w postaci pojedynczego, pozbawionego struktury pasma, z maksimum przy $\lambda = 513 \text{ nm}$ ($19,5 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$). W stosunku do ryboflawiny maksimum fluorescencji 3MeTARF przesunięte jest w kierunku krótkofalowej części widma. Wydajność kwantowa fluorescencji dla związku w roztworze metanolowym wynosi $\phi_F = 0,089$ i jest czterokrotnie niższa niż odpowiednia wartość dla ryboflawiny. 3MeTARF odznacza się najniższą wydajnością kwantową spośród badanych w ramach tej pracy pochodnych ryboflawiny.

Zanik fluorescencji 3MeTARF w metanolu opisuje funkcja monoeksponencjalna, a wyznaczony czas życia fluorescencji 3MeTARF w metanolu wynosi $\tau_F = 5,4 \text{ ns}$. Analiza danych dotyczących procesów radiacyjnych i nieradiacyjnych opisujących dezaktywację stanu wzbudzonego, wskazuje, że stan wzbudzony cząsteczki 3MeTARF zanika głównie na drodze bezpromienistej. Największe wartości stałe radiacyjne osiągają dla związku rozpuszczonego w acetonitrylu ($k_r = 0,21 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$) oraz w wodzie ($k_r = 0,25 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$).

Dane spektralne i fotofizyczne zebrano w **Tabeli 5** (str.68). Widmo emisji przedstawiono na **rysunku 28**.

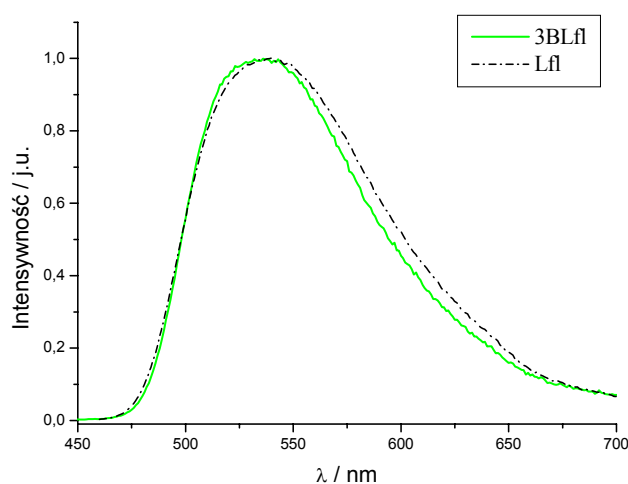


Rysunek 28. Widma emisji 3-metylo-tetraacetylo-ryboflawiny (3MeTARF), ryboflawiny (Rfl) i lumiflawiny (Lfl) w metanolu ($\lambda_{wzb} = 450$ nm)

3-Benzylo-lumiflawina

Związek fluoryzuje w temperaturze pokojowej. Emisja charakteryzuje się widmem w postaci pojedynczego, pozbawionego struktury pasma fluorescencji z maksimum przypadającym przy długości fali $\lambda = 534$ nm ($18,7 \times 10^3$ cm⁻¹). Rozpuszczalnik tylko nieznacznie wpływa na położenie pasma emisji. Krzywe zaniku fluorescencji dobrze opisuje funkcja monoeksponencjalna. Czas życia fluorescencji mieści się w zakresie nanosekundowym i wyznaczony dla związku rozpuszczonego w metanolu wynosi $\tau = 5,8$ ns. Porównano dane spektralne i fotofizyczne 3-benzylo-lumiflawiny z danymi dla cząsteczek pochodnych 3-metylo-, 3-etylo- oraz z cząsteczką macierzystą w stosunku do nich – lumiflawiną. Różnice w położeniu maksimum emisji oraz w wartościach wydajności kwantowych fluorescencji dla tych pochodnych są nieznaczne, i mieszczą się w granicach błędu eksperymentalnego, np., dla 3-benzylo pochodnej wydajność kwantowa fluorescencji wynosi $\phi_F = 0,10$, a dla lumiflawiny $\phi_F = 0,13$ [85,157]. Również stałe szybkości procesów radiacyjnych i nieradiacyjnych, charakteryzujące dezaktywację stanu wzbudzonego, nie wykazują istotnych różnic pomiędzy poszczególnymi pochodnymi. Zważywszy, że stałe nieradiacyjne przewyższają dziesięciokrotnie stałe radiacyjne można stwierdzić, że dezaktywacja stanu wzbudzonego następuje głównie na drodze procesów

bezpromienistych. Można ponadto stwierdzić bardziej ogólnie, że zarówno obecność podstawnika w pozycji 3 pierścienia izoalloksazynowego jak i jego rodzaj nie wpływa istotnie na spektralne i fotofizyczne właściwości pochodnych lumiflawiny. Nie zauważono bowiem istotnej różnicy pomiędzy danymi emisyjnymi i wynikającymi zeń właściwościami fotofizycznymi uzyskanymi dla pochodnych z podstawnikiem metylovym czy etylovym, obecnym w tej pozycji, a także pomiędzy właściwościami emisyjnymi i fotofizycznymi pomiędzy cząsteczką z podstawnikami alkilowymi i podstawnikiem arylovym obecnym w pozycji C(3). Dane spektralne i fotofizyczne przedstawiono w **Tabeli 6** (str.70). Widmo emisji związku zaprezentowano na **rysunku 29**.



Rysunek 29. Widma emisji 3-benzylo-lumiflawiny (3BLfl) i lumiflawiny (Lfl) w metanolu, ($\lambda_{wzb} = 450$ nm)

3. Obliczenia metodą DFT i TD – DFT

Obliczenia metodą DFT

Stosując metodę funkcyjałów gęstości DFT (*Density Functional Theory*) dla badanych cząsteczek obliczono położenie najniższych energetycznie przejść elektronowych singlet-singlet $S_0 \rightarrow S_i$. Otrzymane dane zestawiono z eksperymentalnymi widmami absorpcji. Rozbieżność pomiędzy danymi eksperymentalnymi i uzyskanymi z obliczeń teoretycznych zawiera się w zakresie około 2000 cm^{-1} . Wydaje się, że taka rozbieżność wynika z samego faktu obecnych możliwości teorii obliczeń, jak i faktu przeprowadzania obliczeń przy założeniu fazy gazowej, i ewentualnie ograniczonych możliwości uwzględniania roli rozpuszczalnika. Na rysunkach 30-33 przedstawiono widma absorpcji badanych pochodnych ryboflawiny w zestawieniu z wynikami otrzymanymi z obliczeń wykonanych metodą funkcyjałów gęstości. Jak wynika z wykonanych obliczeń, główne pasma absorpcji reprezentują przejścia $\pi \rightarrow \pi^*$. Ponadto w obliczonych widmach obecne są przejścia o charakterze $n \rightarrow \pi^*$ o niskiej energii oscylatora (**Rysunki 30-33**).

Dla wielu związków azaaromatycznych, w tym również dla izoalloksazyn i alloksazyn, wzbudzone stany singletowe o konfiguracji π, π^* i n, π^* są energetycznie położone blisko siebie, a w niektórych wypadkach są wręcz izoenergetyczne. Pomiędzy tymi stanami możliwe są więc oddziaływania wibronowe, co w konsekwencji może istotnie wpływać na właściwości spektralne i fotochemiczne związków z grupy flawin. W przypadku blisko leżących stanów $\pi-\pi^*$ i $n-\pi^*$ czynniki takie, jak polarność, temperatura, pozycja podstawnika mogą istotnie wpływać na odstęp energetyczny pomiędzy stanami o różnej konfiguracji, czasami prowadząc do ich inwersji [19,85,87,88,157]. Na podstawie obliczeń metodą TD-DFT Zenichowski i współpr. [158] podają, że kilka czynników wpływa na przesunięcie pasm absorpcji w kierunku fal krótszych w stosunku do pasm obserwowanych eksperymentalnie. Najniższe przejścia S_0-S_1 , S_2 , i S_3 mogą ulegać przesunięciu pod wpływem polarności środowiska, tworzenia wiązań wodorowych pomiędzy chromoforem a cząsteczkami otoczenia oraz pod wpływem geometrycznego ułożenia chromoforu wewnątrz proteiny. Eksperymentalnie zauważono, że obecność wiązań wodorowych zdecydowanie silniej wpływa na położenie pasma S_2 , a mniej na położenie pasma S_1 .

Neiss [159] porównał wyniki uzyskane dla uracylu w roztworze wodnym z widmem wykonanym dla uracylu w fazie gazowej. Pasma absorpcji w widmie uracylu w fazie gazowej przesunięte są w kierunku fal krótszych w stosunku do położenia pasm w

widmie zarejestrowanym dla roztworu wodnego. Przesunięcie to zawiera się w granicach $1200 - 2500 \text{ cm}^{-1}$. W aspekcie efektu rozpuszczalnikowego Bruszyńska i in. [160] badali związki z grupy alloksazyn (1,3-dimetylo-lumichrom) i izoalloksazyn (3,7,8,10-tetrametylo-izoalloksazynę). Uzyskane przez autorów rezultaty eksperymentu pokazują, że położenie pasm absorpcji pochodnej izoalloksazynowej w dioksanie nie odbiega znacznie od położenia maksimum pasma absorpcji związku w fazie gazowej ($22,5 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$ w dioksanie, $22,9 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$ w fazie gazowej), z nieznacznym przesunięciem pasm w fazie gazowej w stosunku do pasm w roztworze w kierunku fal krótszych. Położenie pasm absorpcji nie zależy w sposób istotny przy przejściu z fazy gazowej do roztworu dioksanu. Z zestawienia danych uzyskanych z eksperymentu z obliczonymi przez autorów wartościami energii wzbudzenia poszczególnych przejść dla badanej pochodnej izoalloksazynowej (metoda DFT) wynika, że obliczona wartość energii odpowiadająca najniższemu przejściu (symetria (π, π^*)) wynosi $24,5 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$. Rozbieżność danych eksperymentalnych i teoretycznych wynosi więc ok. 2000 cm^{-1} [160].

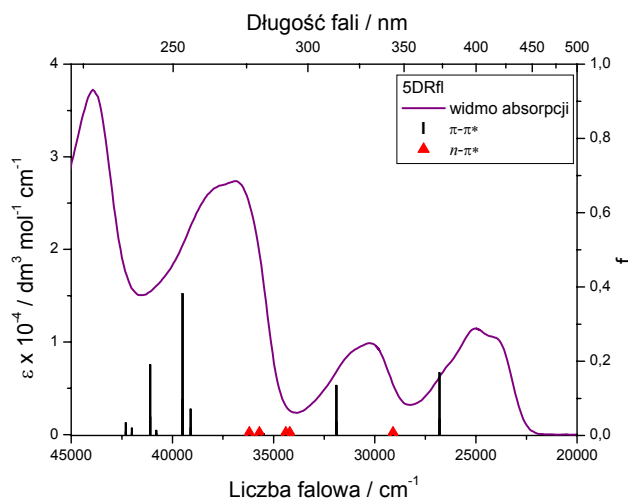
Dla pochodnych izoalloksazyn Kowalczyk i in. [161] pokazali, że przy porównaniu położenia maksimów w eksperymentalnych widmach absorpcji w acetonitrylu z odpowiednimi wartościami obliczonymi metodą DFT, rozbieżności w położeniu pasm mieszczą się w zakresie $1000\text{-}2000 \text{ cm}^{-1}$.

5-Deaza-ryboflawina

Widmo 5-deaza-ryboflawiny w metanolu, w porównaniu z widmem ryboflawiny, wykazuje przesunięcie długofalowego pasma absorpcji w kierunku fal krótszych. Pasma absorpcji w widmie związku położone jest przy długości fali $25,0 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$ i posiada konfigurację π, π^* , a przewidywane na podstawie obliczeń DFT najniższe energetycznie przejście położone jest przy długości fali $26,8 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$ (konfiguracja π, π^*) co wskazuje na dobrą zgodność wyników eksperymentalnych z wynikami uzyskanymi z obliczeń. Ponadto porównanie struktury orbitali HOMO i LUMO pokazuje, że w przejściu $S_0 \rightarrow S_1$ decydującą rolę odgrywa przejście pomiędzy orbitalami typu $\text{HOMO} \rightarrow \text{LUMO}$.

Dla ryboflawiny odległość energetyczna pomiędzy najniższymi wzbudzonymi stanami singletowymi o konfiguracji π, π^* i n, π^* wynosi $0,9 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$ [101], podczas gdy dla 5-deaza- pochodnej przerwa energetyczna jest większa i wynosi $2,3 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$. Dane dla 5-deaza-ryboflawiny dotyczące energii wzbudzenia stanów singletowych ($S_0 \rightarrow S_i$) i trypletowych ($S_0 \rightarrow T_i$) obliczone dla geometrii stanu podstawowego oraz energie wzbudzenia

wyższych stanów trypletowych ($T_1 \rightarrow T_1$) wraz z siłą oscylatora obliczone dla zoptymalizowanej geometrii najniższego stanu trypletowego (T_1) przedstawiono w **Tabeli 7** (str. 79). Dane eksperymentalne zestawiono z wynikami obliczeń i zaprezentowano na **rysunku 30**.



Rysunek 30. Widmo absorpcji 5-deaza-ryboflawiny w metanolu (—) w zestawieniu z wynikami obliczeń teoretycznych (pionowe linie oznaczają pasma $\pi-\pi^*$, czerwone trójkąty – pasma $n-\pi^*$)

Tabela 7. Przewidywane na podstawie obliczeń (B3LYP /6-31G(d)) energie wzbudzenia stanów singletowych ($S_0 \rightarrow S_i$) i trypletowych ($S_0 \rightarrow T_i$) oraz obliczone (UB3LYP /6-31G(d)) energie wzbudzenia od najniższego stanu trypletowego do wyższych stanów trypletowych ($T_1 \rightarrow T_i$) wraz z siłą oscylatora dla **5-deaza-ryboflawiny**

$S_0 \rightarrow S_i$	$E \times 10^{-3}$ / cm^{-1}	f	$S_0 \rightarrow T_i$	$E \times 10^{-3}$ / cm^{-1}	f	$T_1 \rightarrow T_i$	$E \times 10^{-3}$ / cm^{-1}	f
$^1(\pi, \pi^*)$	26.8 (25.0)	0.169	$^3(\pi, \pi^*)$	20.1	0	$\rightarrow T_2$	8.9	<0.001
$^1(n, \pi^*)$	29.1	0.003	$^3(n, \pi^*)$	23.2	0	$\rightarrow T_3$	11.8	0.010
$^1(\pi, \pi^*)$	31.9 (30.4)	0.135	$^3(\pi, \pi^*)$	27.6	0	$\rightarrow T_4$	13.6	0.002
$^1(n, \pi^*)$	34.2	<0.001	$^3(\pi, \pi^*)$	29.5	0	$\rightarrow T_5$	14.1	0.004
$^1(n, \pi^*)$	34.4	0.001	$^3(\pi, \pi^*)$	31.1	0	$\rightarrow T_6$	14.6	0.032
$^1(n, \pi^*)$ 63%	35.5	0.006				$\rightarrow T_7$	15.0	0.003
$^1(n, \pi^*)$	35.7	0.002				$\rightarrow T_8$	15.9	0.068
$^1(n, \pi^*)$	36.2	0.003				$\rightarrow T_9$	16.3	0.009
$^1(\pi, \pi^*)$ 50%	39.1	0.071				$\rightarrow T_{10}$	18.3	0.007
$^1(\pi, \pi^*)$	39.5	0.382				$\rightarrow T_{11}$	21.0	0.054
$^1(n, \pi^*)$ 50%	40.8	0.014				$\rightarrow T_{12}$	22.2	<0.001
$^1(\pi, \pi^*)$	41.1	0.191				$\rightarrow T_{13}$	23.3	0.024
$^1(\pi, \pi^*)$	42.0	0.020				$\rightarrow T_{14}$	24.7	0.146
$^1(\pi, \pi^*)$	42.3	0.034				$\rightarrow T_{15}$	28.5	0.051
$^1(n, \pi^*)$ 73%	45.7	0.063				$\rightarrow T_{16}$	29.4	0.029

Energia pierwszego stanu trypletowego obliczona z użyciem formalizmu

(UB3LYP/6-31G(d)) wynosi $19.7 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$.

Wartości eksperymentalne uzyskane z widm związku w metanolu wyróżniono grubszą czcionką

Izo-6,7-ryboflawina

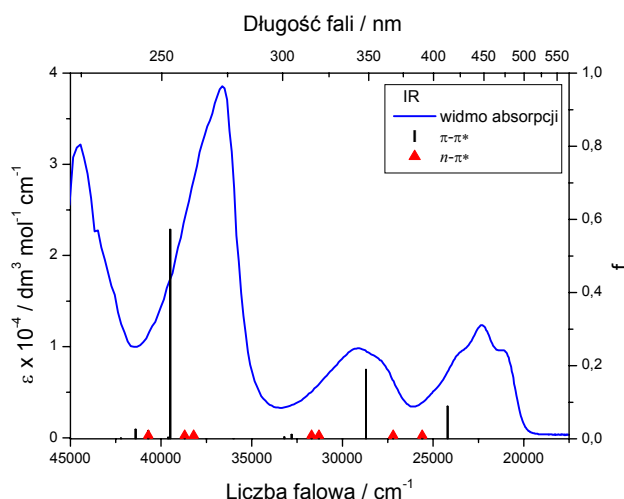
W przypadku izo-6,7-ryboflawiny przewidywane przejścia singlet – singlet o najniższej energii $S_0 \rightarrow S_i$ obliczane były z uwzględnieniem geometrii stanu podstawowego, natomiast energie wzbudzenia dla przejść $T_1 \rightarrow T_i$ oraz ich intensywności określono dla zoptymalizowanej geometrii najniższego stanu trypletowego T_1 . Wszystkie widoczne w widmie absorpcji pasma związane są z przejściami o charakterze $\pi \rightarrow \pi^*$. Różnice pomiędzy położeniem pasm absorpcji uzyskanym z obliczeń a danymi eksperymentalnymi zawierają się w granicach $2000 - 3000 \text{ cm}^{-1}$, przy czym obserwuje się przesunięcie pasm eksperymentalnych w kierunku fal dłuższych. Jedynie pasmo położone przy długości fali $29,2 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$ w eksperymentalnym widmie absorpcji jest nieco przesunięte w kierunku fal krótszych w stosunku do wartości $28,7 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$ uzyskanej ze stosownych obliczeń. Efekt ten może powstawać na skutek poszerzenia eksperymentalnego pasma absorpcji, które związane jest z tym, że blisko położone pasma $n-\pi^*$ i $\pi-\pi^*$ mogą się wzajemnie nakładać, a także na skutek oddziaływania cząsteczek związku z cząsteczkami rozpuszczalnika. Dane eksperymentalne odnoszą się bowiem do układu *substancja rozpuszczona – rozpuszczalnik*, w tym przypadku do roztworu metanolowego badanego związku, podczas gdy obliczenia wykonano dla cząsteczki badanego związku w stanie gazowym. Neiss [159] porównał wyniki uzyskane dla uracylu w roztworze wodnym z widmem wykonanym dla uracylu w fazie gazowej. Pasma absorpcji w widmie uracylu w fazie gazowej przesunięte są w kierunku fal krótszych w stosunku do położenia pasm w widmie zarejestrowanym dla roztworu wodnego. Przesunięcie to zawiera się w granicach $1200 - 2500 \text{ cm}^{-1}$ [159].

Wykonano również obliczenia metodą DFT dla ryboflawiny. Eksperymentalne pasma absorpcji dla ryboflawiny w metanolu położone są przy $22,5 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$ oraz $27,8 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$. Wyniki obliczeń wskazują, że odpowiadające im pasma $\pi-\pi^*$ o najniższej energii położone są przy $24,8 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$ oraz $29,6 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$, są więc przesunięte w kierunku fal krótszych w stosunku do pasm eksperymentalnych (**Tabela 9**, str. 83).

Porównanie orbitali molekularnych HOMO i LUMO otrzymanych w wyniku obliczeń DFT pokazuje, że przejście od najwyższego obsadzonego orbitalu molekularnego do najniższego orbitalu nieobsadzonego, czyli HOMO $\rightarrow$ LUMO jest dominujące we wzbudzeniu $S_0 \rightarrow S_1$. Przejście to może być określone jako dozwolone przejście $\pi \rightarrow \pi^*$.

Dane dla izo-6,7-ryboflawiny dotyczące energii wzbudzenia stanów singletowych ($S_0 \rightarrow S_i$) i trypletowych ($S_0 \rightarrow T_i$) obliczone dla geometrii stanu podstawowego oraz energie wzbudzenia wyższych stanów trypletowych ($T_1 \rightarrow T_i$) wraz z siłą oscylatora obliczone dla

zoptymalizowanej geometrii najniższego stanu trypletowego (T_1) przedstawiono w **Tabeli 8** (str.82). Ponadto dla celów porównawczych w tabeli umieszczono wartości energii uzyskane z eksperymentalnych widm absorpcji związku w metanolu (wyróżniono grubszą czcionką). W **Tabeli 9** (str.83) przedstawiono odpowiednie dane dla ryboflawiny z uwzględnieniem danych eksperymentalnych. Odpowiednie widma w zestawieniu z wynikami obliczeń pokazano na **rysunku 31**.



Rysunek 31. Widmo absorpcji izo-6,7-ryboflawiny w metanolu (—) w zestawieniu z wynikami obliczeń teoretycznych (pionowe linie oznaczają pasma $\pi-\pi^*$, czerwone trójkąty – pasma $n-\pi^*$)

Tabela 8. Przewidywane na podstawie obliczeń (B3LYP /6-31G(d)) energie wzbudzenia stanów singletowych ($S_0 \rightarrow S_i$) i trypletowych ($S_0 \rightarrow T_i$) oraz obliczone (UB3LYP /6-31G(d)) energie wzbudzenia od najniższego stanu trypletowego do wyższych stanów trypletowych ($T_1 \rightarrow T_i$) wraz z siłą oscylatora dla **izo-6,7-ryboflawiny**

$S_0 \rightarrow S_i$	$E \times 10^{-3}$ / cm^{-1}	f	$S_0 \rightarrow T_i$	$E \times 10^{-3}$ / cm^{-1}	f	$T_1 \rightarrow T_i$	$E \times 10^{-3}$ / cm^{-1}	f
$^1(\pi, \pi^*)$	24.2 22.4	0.089	$^3(\pi, \pi^*)$	17.4	0	$\rightarrow T_2$	5.6	0.010
$^1(n, \pi^*)$	25.6	0.004	$^3(\pi, \pi^*)$	20.5	0	$\rightarrow T_3$	7.4	0.000
$^1(n, \pi^*)$	27.2	0.001	$^3(n, \pi^*)$	22.4	0	$\rightarrow T_4$	8.3	0.000
$^1(\pi, \pi^*)$	28.7 29.2	0.190	$^3(n, \pi^*)$	24.4	0	$\rightarrow T_5$	12.9	0.013
$^1(n, \pi^*)$	31.3	0.002	$^3(\pi, \pi^*)$	27.7	0	$\rightarrow T_6$	13.9	0.000
$^1(n, \pi^*)$	31.7	0.002				$\rightarrow T_7$	14.2	0.019
$^1(\pi, \pi^*)$	32.8	0.012				$\rightarrow T_8$	15.1	0.001
$^1(\pi, \pi^*)$	33.2	0.005				$\rightarrow T_9$	16.5	0.015
$^1(\pi, \pi^*)$	36.0	0.001				$\rightarrow T_{10}$	17.9	0.027
$^1(n, \pi^*)$	38.2	0				$\rightarrow T_{11}$	18.9	0.068
$^1(n, \pi^*)$	38.7	0.001				$\rightarrow T_{12}$	20.9	0.015
$^1(\pi, \pi^*)$	39.5	0.573				$\rightarrow T_{13}$	22.3	0.001
$^1(\pi, \pi^*)(54\%)$	39.6	0.004				$\rightarrow T_{14}$	23.5	0.015
$^1(n, \pi^*)$	40.7	0.022				$\rightarrow T_{15}$	24.1	0.000
$^1(\pi, \pi^*)$	41.4	0.026				$\rightarrow T_{16}$	25.9	0.001

Energia pierwszego stanu trypletowego obliczona w odniesieniu do stanu podstawowego wynosi $17.0 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$.

Wartości eksperymentalne uzyskane na podstawie widm związku w metanolu wyróżniono grubszą czcionką

Tabela 9. Przewidywane na podstawie obliczeń (B3LYP /6-31G(d)) energie wzbudzenia stanów singletowych ($S_0 \rightarrow S_i$) i trypletowych ($S_0 \rightarrow T_i$) oraz obliczone (UB3LYP /6-31G(d)) energie wzbudzenia od najniższego stanu trypletowego do wyższych stanów trypletowych ($T_1 \rightarrow T_i$) wraz z siłą oscylatora dla **ryboflawiny**

$S_0 \rightarrow S_i$	$E \times 10^{-3}$ / cm^{-1}	f	$S_0 \rightarrow T_i$	$E \times 10^{-3}$ / cm^{-1}	f	$T_1 \rightarrow T_i$	$E \times 10^{-3}$ / cm^{-1}	f
$^1(\pi, \pi^*)$	24.8 22.5	0.142	$^3(\pi, \pi^*)$	17.3	0	$\rightarrow T_2$	6.4	0.006
$^1(n, \pi^*)$	25.7	0.019	$^3(\pi, \pi^*)$	21.7	0	$\rightarrow T_3$	7.7	0
$^1(n, \pi^*)$	27.6	0.001	$^3(n, \pi^*)$	22.8	0	$\rightarrow T_4$	8.3	0
$^1(\pi, \pi^*)$	29.6 27.8	0.172	$^3(n, \pi^*)$	24.4	0	$\rightarrow T_5$	12.9	0.010
$^1(n, \pi^*)$	31.6	0.0	$^3(\pi, \pi^*)$	27.7	0	$\rightarrow T_6$	13.9	0
$^1(n, \pi^*)$	31.9	0.003				$\rightarrow T_7$	14.3	0.030
$^1(\pi, \pi^*)$	32.8	0.009				$\rightarrow T_8$	15.4	0.002
$^1(n, \pi^*)$	33.5	0.005				$\rightarrow T_9$	16.6	0.018
$^1(n, \pi^*)$	36.2	0.004				$\rightarrow T_{10}$	17.8	0.046
$^1(\pi, \pi^*)$	38.3	0.050				$\rightarrow T_{11}$	18.6	0.066
$^1(\pi, \pi^*)$	38.9	0.089				$\rightarrow T_{12}$	21.0	0.006
$^1(\pi, \pi^*)$	39.4	0.287				$\rightarrow T_{13}$	22.6	0
$^1(\pi, \pi^*)$	40.0	0.071				$\rightarrow T_{14}$	23.6	0.030
$^1(\pi, \pi^*)$	40.3	0.036				$\rightarrow T_{15}$	25.1	0.001
$^1(\pi, \pi^*)$	41.6	0.045				$\rightarrow T_{16}$	26.4	0.001

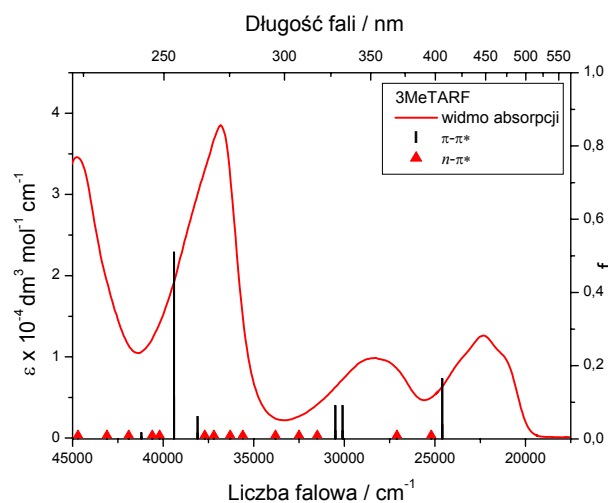
Energia pierwszego stanu trypletowego obliczona w odniesieniu do stanu podstawowego wynosi $16.5 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$.

Wartości eksperymentalne uzyskane na podstawie widm związku w metanolu wyróżniono grubszą czcionką.

3-Metylo-tetraacetylo-ryboflawina

Struktura elektronowa związku została obliczona z użyciem metody DFT i TD-DFT. Przewidywane wartości energii przejść elektronowych, obliczone na bazie teorii DFT, zestawione zostały z widmem absorpcji związku w roztworze metanолоwym (**Rysunek 32**, str. 85). Położenie przejść o charakterze $\pi \rightarrow \pi^*$ zaznaczono na rysunku w postaci pionowych linii, które naniesiono na skalę energii (liczba falowa), w postaci trójkątów zaznaczono pasma reprezentujące przejścia o charakterze $n \rightarrow \pi^*$. Uzyskane eksperymentalnie położenia dwóch intensywnych pasm absorpcji, obecnych przy 353 nm ($28,3 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$) oraz 448 nm ($22,3 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$) odpowiadają wartościom energii przejść uzyskanym w wyniku obliczeń. - odpowiednio 332 nm ($30,1 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$) i 406 nm ($24,6 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$). Rozbieżność między wynikami eksperymentu i obliczeń zawiera się w przedziale $1800 - 2300 \text{ cm}^{-1}$. Konfiguracja najniższych przejść elektronowych, charakteryzujących się najniższą energią wzbudzenia została określona jako π, π^* . Ponadto analiza uzyskanych drogą obliczeń danych (**Tabela 10**, str.86) wskazuje na obecność kilku mniej intensywnych przejść o konfiguracji $n \rightarrow \pi^*$, które leżą blisko przejść $\pi \rightarrow \pi^*$, położone odpowiednio przy $27,1 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$ oraz $25,2 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$. Przejścia te charakteryzują się małą siłą oscylatora i w związku z tym pozostają niewidoczne w eksperymentalnym widmie absorpcji. Ponadto ich bliskie sąsiedztwo z intensywnymi przejściami o konfiguracji $\pi \rightarrow \pi^*$ tym bardziej czyni je trudnymi do zarejestrowania. Co więcej różnica energii pomiędzy stanami $n-\pi^*$ i $\pi-\pi^*$ wynosi tylko $0,6 - 3,0 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$, co jest właściwością bardzo charakterystyczną dla cząsteczek izoalloksazyn [101]. W związku z tym niektóre właściwości związku można tłumaczyć na podstawie wzajemnego oddziaływania singletowych stanów wzbudzonych o konfiguracji π, π^* i n, π^* .

Dane dotyczące energii wzbudzenia stanów singletowych ($S_0 \rightarrow S_i$) i trypletowych ($S_0 \rightarrow T_i$) oraz energie wzbudzenia do wyższych stanów trypletowych ($T_1 \rightarrow T_i$) wraz z siłą oscylatora dla tych przejść obliczone dla zoptymalizowanej geometrii stanu trypletowego T_1 dla 3-metylo-tetraacetylo-ryboflawiny przedstawiono w **Tabeli 10** (str. 86).



Rysunek 32. Widmo absorpcji 3-metylo-tetraacetylo-ryboflawiny w metanolu (—) w zestawieniu z wynikami obliczeń teoretycznych (pionowe linie oznaczają pasma $\pi-\pi^*$, czerwone trójkąty – pasma $n-\pi^*$)

Tabela 10. Przewidywane na podstawie obliczeń (B3LYP /6-31G(d)) energie wzbudzenia stanów singletowych ($S_0 \rightarrow S_i$) i trypletowych ($S_0 \rightarrow T_i$) oraz obliczone (UB3LYP /6-31G(d)) energie wzbudzenia od najniższego stanu trypletowego do wyższych stanów trypletowych ($T_1 \rightarrow T_i$) wraz z siłą oscylatora dla **3-metylo-tetraacetylo-ryboflawiny**

$S_0 \rightarrow S_i$	$E \times 10^{-3}$ / cm^{-1}	f	$S_0 \rightarrow T_i$	$E \times 10^{-3}$ / cm^{-1}	f	$T_1 \rightarrow T_i$	$E \times 10^{-3}$ / cm^{-1}	f
$^1(\pi, \pi^*)$	24.6 22.3	0.165	$^3(\pi, \pi^*)$	16.9	0	$\rightarrow T_2$	7.4	0.006
$^1(n, \pi^*)$	25.2	0.002	$^3(n, \pi^*)$	22.3	0	$\rightarrow T_3$	7.7	0.001
$^1(n, \pi^*)$	27.1	0.002	$^3(\pi, \pi^*)$	22.5	0	$\rightarrow T_4$	8.6	<0.001
$^1(\pi, \pi^*)$	30.1 28.3	0.091	$^3(n, \pi^*)$	24.3	0	$\rightarrow T_5$	11.1	0.005
$^1(\pi, \pi^*)$	30.5	0.091	$^3(\pi, \pi^*)$	25.7	0	$\rightarrow T_6$	13.9	0
$^1(n, \pi^*)$	31.5	0				$\rightarrow T_7$	15.2	0.026
$^1(n, \pi^*)$	32.5	<0.001				$\rightarrow T_8$	16.2	0
$^1(n, \pi^*)$	33.8	0.002				$\rightarrow T_9$	17.3	<0.001
$^1(n, \pi^*)$	35.6	0				$\rightarrow T_{10}$	18.1	0.063
$^1(n, \pi^*)$	36.3	0.002				$\rightarrow T_{11}$	18.5	0.060
$^1(n, \pi^*)$	37.2	0.004						
$^1(n, \pi^*)$	37.7	0.007						
$^1(\pi, \pi^*)$	38.1	0.061						
$^1(\pi, \pi^*)$	39.4	0.510						
$^1(n, \pi^*)$	40.2	0.005						

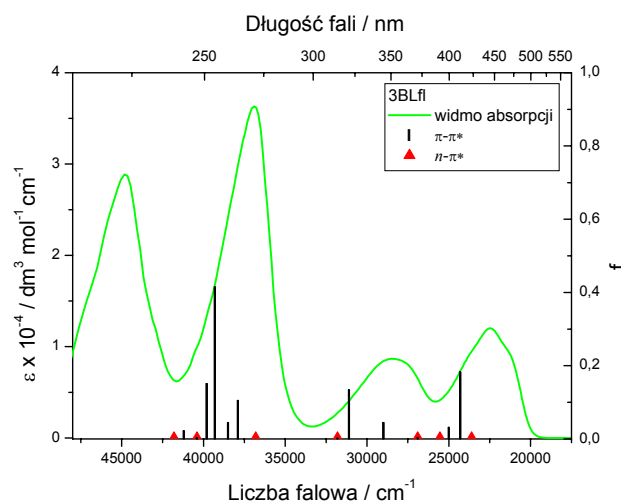
Energia pierwszego stanu trypletowego obliczona z użyciem formalizmu (UB3LYP/6-31G(d)) wynosi $16.0 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$.

Wartości eksperymentalne uzyskane na podstawie widm związku w metanolu wyróżniono grubszą czcionką

3-Benzylolumiflawina

Porównanie widma absorpcji związku zarejestrowanego eksperymentalnie z przewidywanymi na bazie teorii DFT wartościami energii przejść elektronowych (**Rysunek 33**, str. 88) pozwala zauważyć, że pasma w widmie absorpcji przesunięte są w kierunku fal dłuższych w stosunku do danych z obliczeń, przy czym rozbieżność ta nie przekracza wartości 2000 cm^{-1} . Ponadto przewidywana jest obecność dwóch pasm o konfiguracji π, π^* , charakteryzujących się niewielką siłą oscylatora, co czyni je niewidocznymi w widmie absorpcji. Zgodnie z tym co przewidziano poprzez obliczenia pasma te powinny być położone przy 344 nm ($29,0 \times 10^3\text{ cm}^{-1}$) i 400 nm ($25,0 \times 10^3\text{ cm}^{-1}$). Ponadto przy długościach fali 371 nm ($26,9 \times 10^3\text{ cm}^{-1}$), 391 nm ($25,5 \times 10^3\text{ cm}^{-1}$), 424 nm ($23,6 \times 10^3\text{ cm}^{-1}$) obecne są także przejścia o charakterze $n \rightarrow \pi^*$ o małej sile oscylatora, które leżą w bliskim sąsiedztwie stanów $\pi-\pi^*$. Przejście o najniższej energii w tej cząsteczce ma właśnie konfigurację n, π^* , a przerwa energetyczna pomiędzy tym stanem a kolejnym, który posiada konfigurację π, π^* jest niewielka i wynosi zaledwie $0,7 \times 10^3\text{ cm}^{-1}$. Cząsteczki izoalloksazyn takie jak 3-metylo-, czy 3-etylo-lumiflawina [19,85,87,88,157] charakteryzują się układem stanów, w którym najniższy stan wzbudzony ma konfigurację π, π^* , kolejny jest stanem $n-\pi^*$, a przerwa energetyczna między nimi wynosi $0,3 \times 10^3\text{ cm}^{-1}$. Fakt, że najniższym stanem wzbudzonym w cząsteczce 3BLfl jest stan $n-\pi^*$ wyraźnie odróżnia tę cząsteczkę od wspomnianych pochodnych z podstawnikiem metylowym i etylowym. Widmo absorpcji związku w roztworze metanolem zestawione z przewidywanymi na drodze obliczeń wartościami energii przejść elektronowych pokazano na **rysunku 33**. Położenie przejść o charakterze $\pi \rightarrow \pi^*$ zaznaczono na rysunku w postaci pionowych linii, które naniesiono na skalę energii (liczba falowa); w postaci trójkątów zaznaczono pasma reprezentujące przejścia o charakterze $n \rightarrow \pi^*$.

Tabela 11 (str. 89) przedstawia dane uzyskane z obliczeń teoretycznych.



Rysunek 33. Widmo absorpcji 3-benzyl-lumiflawiny w metanolu (—) w zestawieniu z wynikami obliczeń teoretycznych (pionowe linie oznaczają pasma $\pi-\pi^*$, czerwone trójkąty – pasma $n-\pi^*$)

Tabela 11. Przewidywane na podstawie obliczeń (B3LYP /6-31G(d)) energie wzbudzenia stanów singletowych ($S_0 \rightarrow S_i$) i trypletowych ($S_0 \rightarrow T_i$) oraz obliczone (UB3LYP /6-31G(d)) energie wzbudzenia od najniższego stanu trypletowego do wyższych stanów trypletowych ($T_1 \rightarrow T_i$) wraz z siłą oscylatora dla **3-benzylo-lumiflawiny**

$S_0 \rightarrow S_i$	$E \times 10^{-3}$	f	$S_0 \rightarrow T_i$	$E \times 10^{-3}$	f	$T_1 \rightarrow T_i$	$E \times 10^{-3}$	f
	/ cm^{-1}			/ cm^{-1}			/ cm^{-1}	
$^1(n, \pi^*)$	23.6	0.001	$^3(\pi, \pi^*)$	16.7	0	$\rightarrow T_2$	7.2	<0.001
$^1(\pi, \pi^*)$	24.3 22.3	0.183	$^3(n, \pi^*)$	21.7	0	$\rightarrow T_3$	8.1	0.005
$^1(\pi, \pi^*)$	25.0 28.3	0.032	$^3(\pi, \pi^*)$	22.9	0	$\rightarrow T_4$	8.3	<0.001
$^1(n, \pi^*)$	25.5	<0.001	$^3(n, \pi^*)$	23.8	0	$\rightarrow T_5$	8.7	0.003
$^1(n, \pi^*)$	26.9	0.003	$^3(\pi, \pi^*)$	24.1	0	$\rightarrow T_6$	9.3	0.002
$^1(\pi, \pi^*)$	29.0	0.045				$\rightarrow T_7$	10.7	0.003
$^1(\pi, \pi^*)$	31.1	0.134				$\rightarrow T_8$	14.4	0.004
$^1(n, \pi^*)$	31.8	0.002				$\rightarrow T_9$	15.5	0.026
$^1(n, \pi^*)$	36.8	<0.001				$\rightarrow T_{10}$	17.9	0.001
$^1(\pi, \pi^*)$	37.9	0.105				$\rightarrow T_{11}$	18.5	0.129
$^1(\pi, \pi^*)$	38.5	0.045				$\rightarrow T_{12}$	23.2	0.022
$^1(\pi, \pi^*)$	39.3	0.415				$\rightarrow T_{13}$	24.2	0.042
$^1(\pi, \pi^*)$	39.8	0.151				$\rightarrow T_{14}$	26.1	0.001
$^1(n, \pi^*)$	40.4	0.003				$\rightarrow T_{15}$	28.3	0.241
$^1(\pi, \pi^*)$	41.2	0.022				$\rightarrow T_{16}$	28.6	0.002

Energia najniższego stanu trypletowego w odniesieniu do stanu podstawowego wynosi $15.7 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$.

Wartości eksperymentalne uzyskane na podstawie widm związku w metanolu wyróżniono grubszą czcionką

Wykonano też próbę obliczenia energii wzbudzenia z uwzględnieniem oddziaływań z cząsteczkami rozpuszczalnika (metanol). W takim przypadku kolejność najniższych energetycznie stanów wzbudzonych uległa zmianie i tym razem najniższym stanem wzbudzonym jest stan o konfiguracji π, π^* i energii $24,0 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$, a kolejny stan to stan typu $n-\pi^*$ o energii $25,8 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$. Zestawienie wyników obliczeń wykonanych dla cząsteczki izolowanej i dla cząsteczki w obecności rozpuszczalnika pokazuje, że uwzględnienie w obliczeniach cząsteczek rozpuszczalnika nie wpływa w sposób znaczący na energię najniższego przejścia o konfiguracji $\pi \rightarrow \pi^*$ (różnica wynosi tylko $0,4 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$). W przypadku najniższego przejścia $n \rightarrow \pi^*$ zastosowanie takiego porównania pokazuje znacznie większy wpływ na energię, która dla cząsteczki izolowanej wynosi $23,6 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$, a dla cząsteczki w obecności rozpuszczalnika wynosi $25,8 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$, czyli w tym przypadku różnica wynosi $2,2 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$ (**Tabela 12**). Oddziaływanie z rozpuszczalnikiem wpływa także wyraźnie na energię wyższych zarówno o konfiguracji π, π^* jak i n, π^* .

Tabela 12. Przewidywane na podstawie obliczeń metodą (B3LYP) z bazami (6-31G(d)) /6-311G(d,p)) energie wzbudzenia do stanów singletowych ($S_0 \rightarrow S_i$) w porównaniu z wartościami energii obliczonymi z uwzględnieniem makroskopowego efektu rozpuszczalnika (MeOH) w modelu PCM, metodą (B3LYP) z bazami 6-31G(d)) i 6-311G(d,p) wraz z siłą oscylatora dla **3-benzylolumiflawiny**

Cząsteczka izolowana 6-31G(d)			Cząsteczka izolowana 6-311G(d,p)			Cząsteczka w polu rozpuszczalnika (MeOH) 6-31G(d)		
$S_0 \rightarrow S_i$	$E \times 10^{-3}$	F	$S_0 \rightarrow S_i$	$E \times 10^{-3}$	f	$S_0 \rightarrow S_i$	$E \times 10^{-3}$	f
	/ cm^{-1}			/ cm^{-1}			/ cm^{-1}	
$^1(n, \pi^*)$	23.6	0.001	$^1(n, \pi^*)$	23.7	0.005	$^1(\pi, \pi^*)$	24.0	0.175
$^1(\pi, \pi^*)$	24.3	0.183	$^1(\pi, \pi^*)$	24.2	0.201	$^1(n, \pi^*)$	25.8	0.007
$^1(\pi, \pi^*)$	25.0	0.032	$^1(\pi, \pi^*)$	25.1	0.018	$^1(n, \pi^*)$	27.4	<0.001
$^1(n, \pi^*)$	25.5	<0.001	$^1(n, \pi^*)$	25.7	<0.001	$^1(\pi, \pi^*)$	28.2	0.010
$^1(n, \pi^*)$	26.9	0.003	$^1(n, \pi^*)$	26.9	0.003	$^1(n, \pi^*)$	29.0	<0.001
$^1(\pi, \pi^*)$	29.0	0.045	$^1(\pi, \pi^*)$	29.1	0.051	$^1(\pi, \pi^*)$	29.3	0.232
$^1(\pi, \pi^*)$	31.1	0.134	$^1(\pi, \pi^*)$	31.0	0.135	$^1(n, \pi^*)$	31.7	0.005

Obliczenia metodą TD-DFT

W ramach niniejszej pracy zaprezentowano przewidywaną strukturę elektronową stanów trypletowych, charakter orbitali molekularnych zaangażowanych w przejścia $S_0 \rightarrow T_1$ oraz symetrię trypletowych stanów wzbudzonych T_1 . W celu opisanie struktury elektronowej stanów trypletowych wykonano widma absorpcji przejściowej dla poszczególnych pochodnych w roztworze metanolemym i zestawiono je z wynikami obliczeń metodą TD-DFT (*Time-Dependent Density Functional Theory*). W przypadku danych dotyczących przejść typu tryplet – tryplet spójna interpretacja wartości obliczonych i wartości eksperymentalnych stwarza znacznie więcej trudności niż analiza przejść pomiędzy stanami singletowymi. Trudno jest opisać stan trypletowy używając teorii obliczeń (TD-DFT) m.in. ze względu na niedostatki samej teorii obliczeń dla stosunkowo dużych cząsteczek, jakimi niewątpliwie są flawiny, co skutkuje mniejszą dokładnością obliczeń dla przejść T-T. Ponadto w eksperymencie pomiar widm absorpcji przejściowej jest znacznie trudniejszy niż wykonanie standardowych widm absorpcji, a przez to obarczony większą niedokładnością.

Problem wielkości bazy stosowanej w obliczeniach dotyczących izoalloksazyn był dyskutowany przez Neissa i współprac. [159]. Wnioski zaprezentowane przez autorów pokazują, że stosunkowo dobre rezultaty obliczeń uzyskuje się przy użyciu relatywnie małej bazy (6-31G*). Badania Kowalczyk i współprac. [161], z zastosowaniem różnych baz również potwierdzają te spostrzeżenia.

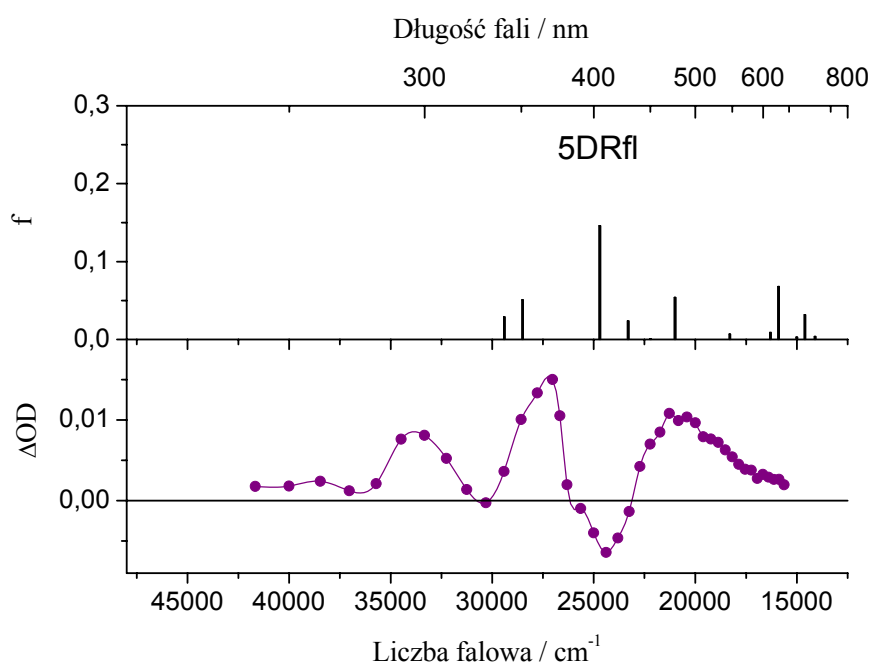
W analizie otrzymanych wyników należy także wziąć pod uwagę fakt, że porównujemy eksperymentalne widmo związku w roztworze z obliczeniami odnoszącymi się do cząsteczek traktowanych jako izolowane w fazie gazowej.

Neiss i współprac. [159] badali wpływ rozpuszczalnika na widma absorpcji związków typu flawin w stanach singletowych i trypletowych. Obliczenia dla modelowej cząsteczki izolumazyny w warunkach izolowanych i w obecności cząsteczek wody pokazały, że wpływ rozpuszczalnika na widma absorpcji związków w stanach trypletowych nie różni się znacząco od wpływu, który obserwuje się dla cząsteczek w stanach singletowych. Dla cząsteczki izolumazyny w stanie trypletowym w otoczeniu cząsteczek wody również obserwuje się przesunięcie maksimum emisji w kierunku fal dłuższych w stosunku do cząsteczki izolowanej. Energie wzbudzenia obliczone przez Kowalczyk i współprac. [161] dla izoalloksazyn w stanach trypletowych pokazują zgodność z wynikami eksperymentu (widma w acetonitrylu) w zakresie 2000-3000 cm^{-1} .

5-Deaza-ryboflawina

Obliczenia metodą DFT pozwalają przewidzieć symetrię orbitali zaangażowanych we wzbudzenia $S_0 \rightarrow T_1$ oraz symetrię odpowiednich orbitali T_i . Zgodnie z wynikami obliczeń przejście $S_0 \rightarrow T_1$ posiada symetrię ${}^3(\pi, \pi^*)$.

W celu określenia struktury elektronowej związku w stanie trypletowym wykonano widmo absorpcji przejściowej 5-deaza-ryboflawiny (5DRfl) w metanolu oraz obliczenia teoretyczne metodą TD-DFT (**Rysunek 34**).



Rysunek 34. Eksperymentalne widmo absorpcji przejściowej (panel dolny), zmierzone dla roztworu 5-deaza-ryboflawiny w metanolu ($\lambda_{\text{ex}} = 355 \text{ nm}$) w zestawieniu z danymi uzyskanymi z obliczeń metodą TD-DFT (panel górny), (pionowe linie reprezentują przewidywane energie przejść tryplet-tryplet dla badanej cząsteczki)

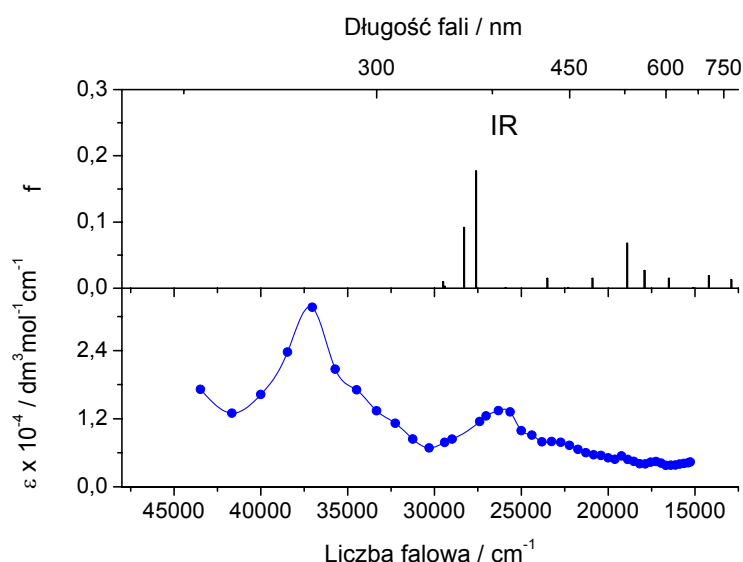
Odpowiednie energie wzbudzenia $T_1 \rightarrow T_i$ i intensywności przejść zostały określone dla zoptymalizowanej geometrii najniższego stanu trypletowego (T_1). Energia stanu T_1 wynosi $19.7 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$. Wyniki obliczeń zamieszczono w **Tabeli 7**, str.79.

Obliczone energie przejść $T_1 \rightarrow T_i$ w zestawieniu z widmem absorpcji przejściowej przedstawia **rysunek 34**. W widmie eksperymentalnym widoczne są trzy intensywne pasma położone przy $21,0 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$, $27,5 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$ oraz $34,0 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$. Na podstawie otrzymanych wyników obliczeń, poza intensywnymi pasmami wymienionymi wyżej, można oczekiwać obecności co najmniej kilku trudnych do zarejestrowania eksperymentalnie przejść tryplet – tryplet o niskiej energii.

Izo-6,7-ryboflawina

Na podstawie obliczeń DFT zaprezentowano przewidywaną konfigurację orbitali molekularnych zaangażowanych w przejścia $S_0 \rightarrow T_1$ oraz symetrię stanów T_1 . Najniższemu energetycznie wzbudzonemu stanowi trypletowemu przypisano konfigurację ${}^3(\pi-\pi^*)$.

Na bazie teorii TD-DFT wykonano analizę struktury cząsteczek w stanach trypletowych, oraz wyznaczono energię przejść $T_1 \rightarrow T_1$ a otrzymane wyniki porównano z eksperymentalnymi widmami absorpcji przejściowej. W widmie absorpcji tryplet-tryplet izo-6,7-ryboflawiny (IR) widoczne są dwa wyraźne pasma obecne przy ok. 270 nm ($37,0 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$) i 385 nm ($26,0 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$). Zestawienie wyników eksperymentu z danymi uzyskanymi z obliczeń pokazuje, że wartości teoretyczne reprezentujące pasma absorpcji przesunięte są w kierunku fal krótszych w stosunku do pasm eksperymentalnych. Znaczna siła oscylatora przypisana została pasmom położonym przy $17,9 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$ i $18,9 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$. Widma otrzymane eksperymentalnie wraz z wyznaczonymi w obliczeniach widmami $T_1 \rightarrow T_1$ przedstawiono na **rysunku 35**. Uzyskane w obliczeniach energie wzbudzenia oraz intensywności przejść określono wychodząc ze zoptymalizowanej geometrii najniższego wzbudzonego stanu trypletowego T_1 . Energia stanu T_1 wynosi $17,0 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$. W **Tabeli 8** (str.82) przedstawiono wyniki obliczeń, uwzględniono również dane dla przejść o mniejszej sile oscylatora, którym trudno przypisać pasma w widmie eksperymentalnym ze względu na ograniczenia, które stwarza aparatura do fotolizy błyskowej, tak pod względem czułości jak i zakresu pomiarowego.

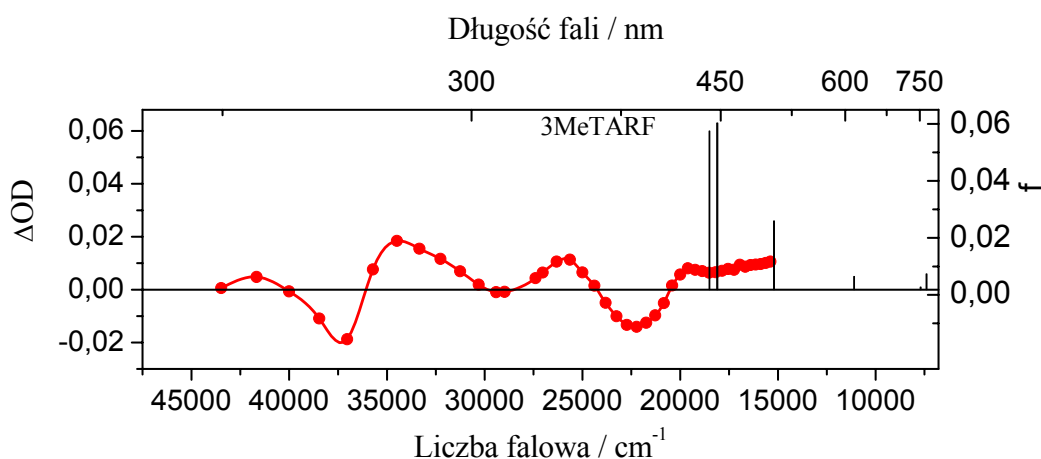


Rysunek 35. Widmo absorpcji T-T (panel dolny) zmierzone dla roztworu izo-6,7-ryboflawiny w metanolu ($\lambda_{\text{ex}} = 355 \text{ nm}$) w zestawieniu z danymi uzyskanymi z obliczeń metodą TD-DFT (panel górny) (pionowe linie reprezentują przewidywane energie przejść tryplet-tryplet dla badanej cząsteczki)

3-Metylo-tetraacetylo-ryboflawina

Stosując wspomniane metody obliczeń DFT i TD-DFT określono wartości energii przejść elektronowych $S_0 \rightarrow T_i$ oraz symetrię orbitali we wzbudzonych stanach trypletowych. Analiza uzyskanych danych pozwala stwierdzić, że przejściu $S_0 \rightarrow T_i$ o najniższej energii wzbudzenia można przypisać konfigurację ${}^3(\pi, \pi^*)$, w którym główny wkład ma wzbudzenie HOMO $\rightarrow$ LUMO.

W celu dokonania opisu struktury elektronowej cząsteczki 3MeTARF w stanie trypletowym zarejestrowano widmo absorpcji przejściowej związku i zestawiono je z wynikami obliczeń teoretycznych. Stosowne obliczenia, obejmujące energie przejść tryplet – tryplet wraz z siłą oscylatora wykonano w oparciu o zoptymalizowaną geometrię najniższego stanu trypletowego (T_1). Wartość energii zoptymalizowanego stanu trypletowego wynosi $16,0 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$. Widmo absorpcji przejściowej w metanolu stwarza jednakże spory problem interpretacyjny (**Rysunek 36**). Znaczna siła oscylatora wyróżnia szczególnie trzy pasma absorpcji, których położenie obliczono na $15,2 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$, $18,1 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$, $18,5 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$. Wartości obliczone dla przejść elektronowych w stanie trypletowym zawiera **Tabela 10**, str.86. Znaczna trudność przy wykonaniu obliczeń stwarza duży rozmiar cząsteczki 3MeTARF, i wiele możliwości konformacyjnych w strukturze tej cząsteczki. W związku z tym możliwe było wyznaczenie jedynie wartości odpowiadających 10 najniższym stanom $T_1 - T_{11}$.



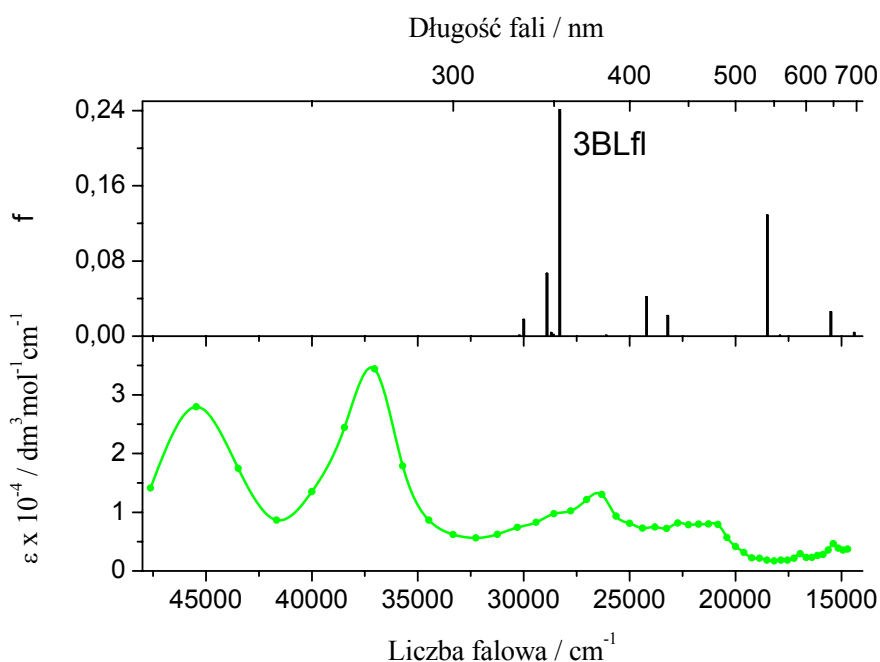
Rysunek 36. Widmo absorpcji przejściowej dla roztworu 3MeTARF w metanolu ($\lambda_{\text{ex}} = 355 \text{ nm}$) w zestawieniu z danymi uzyskanymi z obliczeń metodą TD-DFT (pionowe linie reprezentują przewidywane energie przejść tryplet-tryplet dla badanej cząsteczki)

3-Benzylolumiflawina

W celu określenia struktury elektronowej 3-benzylolumiflawiny (3BLfl) dokonano pomiaru widma absorpcji tryplet – tryplet związku w roztworze metanolowym, a uzyskane wyniki porównano z wynikami obliczeń wykonanych metodą TD-DFT. Obliczenia wykonano w oparciu o zoptymalizowaną geometrię najniższego stanu trypletowego (T_1), którego energię obliczono na $15,7 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$. Wyniki obliczeń przedstawiono w **Tabeli 11** (str. 89). Widmo absorpcji T_1 - T_i 3-benzylolumiflawiny w metanolu zestawiono z danymi uzyskanymi z obliczeń metodą TD-DFT, gdzie pionowe linie reprezentują przewidywane energie przejść tryplet-tryplet dla badanej cząsteczki (**Rysunek 37**).

Widmo absorpcji przejściowej składa się z kilku pasm, które położone są przy $(15,4; 16,9; 20,8; 26,3; 37,0 \text{ i } 45,5) \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$. Odpowiadające tym pasmom obliczone energie przejść elektronowych przesunięte są w kierunku fal krótszych i wynoszą odpowiednio: $(15,5; 18,5; 23,2; 24,2 \text{ i } 28,3) \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$.

Zastosowanie metody TD-DFT pozwala określić kształt orbitali zaangażowanych w przejście elektronowe o najniższej energii, czyli orbitali molekularnych najwyższego obsadzonego orbitalu HOMO i najniższego nie obsadzonego orbitalu LUMO. Kształt orbitali HOMO, HOMO-1 i LUMO przedstawiono na **rysunku 38**, str. 97.

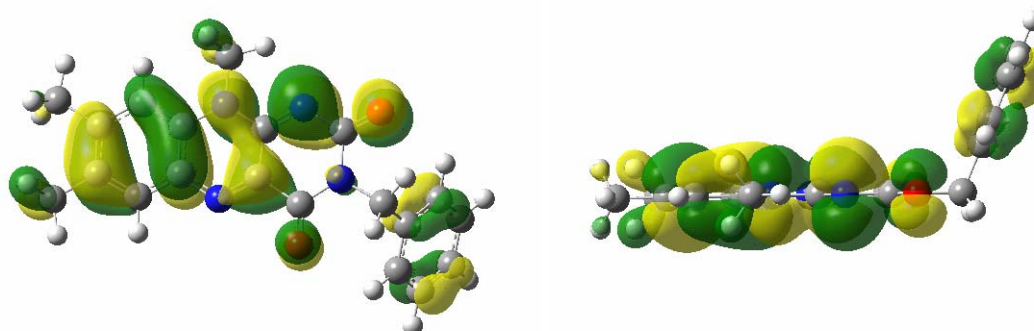


Rysunek 37. Widmo absorpcji (panel dolny) zmierzone dla roztworu 3-benzylolumiflawiny w metanolu ($\lambda_{\text{ex}} = 355 \text{ nm}$) w zestawieniu z danymi uzyskanymi z obliczeń metodą TD-DFT (panel górny) (linie reprezentują przewidywane energie przejść tryplet-tryplet dla badanej cząsteczki)

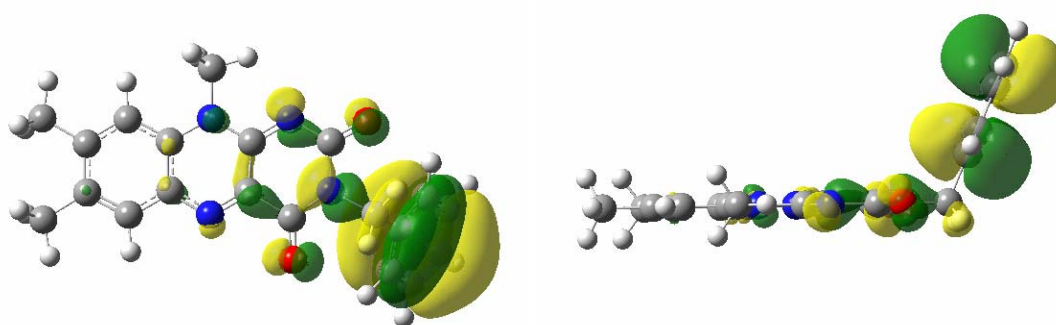
Naturę orbitali molekularnych zaangażowanych we wzbudzenie $S_0 \rightarrow T_i$ oraz symetrię odpowiednich orbitali T_i opisano korzystając z metody DFT. Przejście o najniższej energii $S_0 \rightarrow T_1$ posiada symetrię $^3(\pi, \pi^*)$, a główny udział pochodzi ze wzbudzenia HOMO $\rightarrow$ LUMO. Moment dipolowy wynosi odpowiednio w stanie podstawowym 8.78 D, a w pierwszym wzbudzonym stanie trypletowym 8.17 D.

Pomiędzy danymi pochodzącymi z eksperymentu a wynikami uzyskanymi metodą obliczeń TD-DFT nie sposób nie dostrzec pewnych rozbieżności. Pomimo obserwowanych różnic można jednak stwierdzić, że w miarę dostępności metod zarówno eksperymentalnych jak i obliczeniowych oraz możliwości, które stwarzają (fotoliza błyskowa, wielkość baz, dostępność czasu obliczeniowego, możliwości programowe) osiągnięte rezultaty wykazują dobrą zgodność i dobrze charakteryzują energie i konfiguracje stanów wzbudzonych.

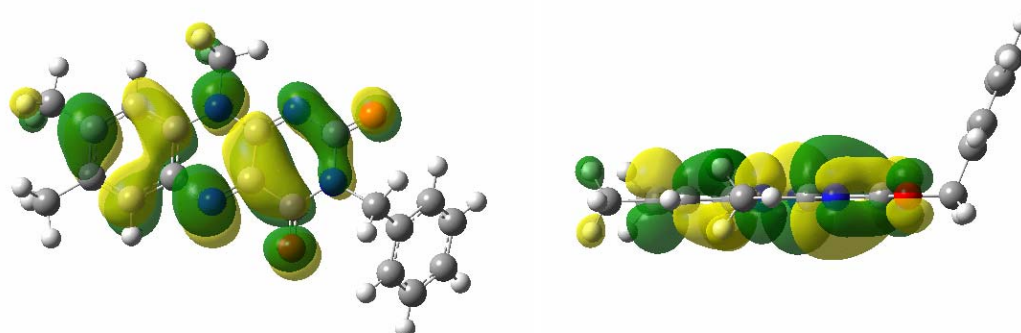
HOMO



HOMO-1



LUMO



Rysunek 38. Kształt orbitali molekularnych HOMO, HOMO-1 i LUMO zaangażowanych w najniższe przejścia energetyczne w cząsteczce 3-benzyl-lumiflawiny

4. Właściwości emisyjne pochodnych flawin w próbkach polikrystalicznych

Wykonano pomiary widm emisji polikrystalicznych próbek badanych pochodnych ryboflawiny. Fluorescencję mierzono w trybie czasowo-zależnym, w celu zaobserwowania ewolucji widm emisji w czasie. Uzyskane wyniki porównano z odpowiednimi danymi dla badanych związków w roztworach. Z analizy uzyskanych danych wynika, że widma emisji związków wykonane dla próbek w stanie stałym charakteryzują się innymi parametrami aniżeli odpowiednie widma wykonane dla próbek w roztworach. W przypadku wszystkich badanych pochodnych w próbkach polikrystalicznych, maksima pasm emisji przesunięte są wyraźnie w kierunku fal dłuższych (**Tabela 13**). Dyfuzyjno-odbiciowe widma absorpcji próbek badanych pochodnych (5DRfl i 3BLfl) pokazują, że krawędź absorpcji podobnie jak maksimum emisji jest również przesunięta w kierunku fal dłuższych.

Widma dyfuzyjno-odbiciowe próbek w stanie podstawowym rejestrowano z zastosowaniem funkcji remisji Kubelka-Munka (górny wykres na **rysunkach 39 i 42**, str. 99 i 101). Widma fluorescencji zarejestrowano w dwóch skalach czasowych, rejestrując widma w odstępach nanosekundowych oraz w odstępach mikrosekundowych. Próbkę wzbudzano błyskiem lasera o długości fali 337 nm. Położenie pasm emisji dla poszczególnych pochodnych ryboflawiny w roztworach i w postaci polikrystalicznej zamieszczono w **Tabeli 13**.

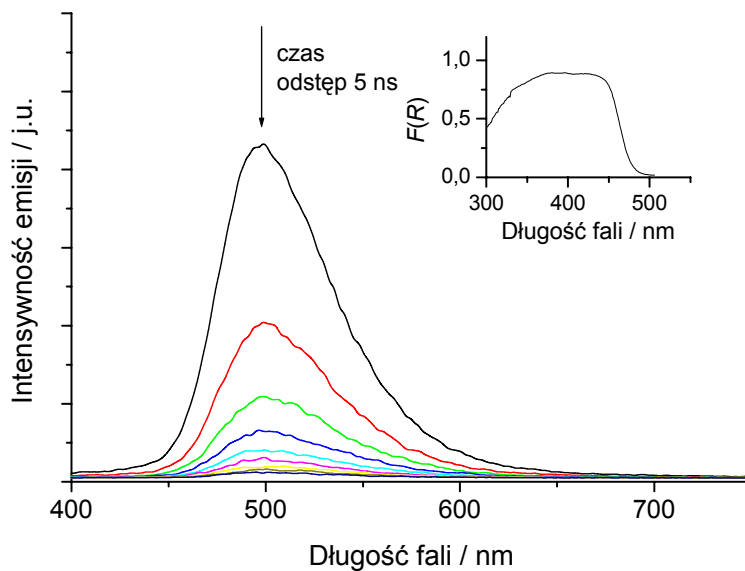
Tabela 13. Położenie maksimów pasm emisji dla ryboflawiny i badanych pochodnych w roztworze metanolowym i w postaci polikrystalicznej

Związek	λ_F w roztworze /nm	λ_F w postaci polikryształów /nm	$\Delta\nu$ /cm ⁻¹
IR	552	570	572
5 DR	455	498	1898
3MeTARF	513	575	2102
3 BLf	534	582	1545
Ryboflawina*	532	560	940

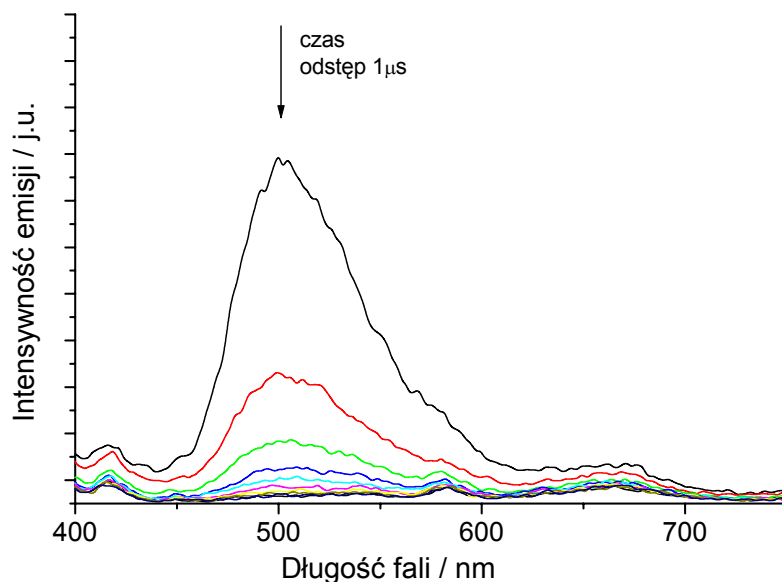
* dane z [3]

W warunkach eksperymentu wykonanego w odstępach czasowych 5 ns 5-deaza-ryboflawina wykazuje maksimum emisji przy 498 nm ($20,1 \times 10^3$ cm⁻¹), które odpowiada głównemu pasmu emisji związku w roztworze metanolowym (455 nm; $22,0 \times 10^3$ cm⁻¹) z odpowiednim przesunięciem w kierunku fal krótszych (**Tabela 13**). Ponadto w skali

mikrosekundowej, dla 5-deaza-ryboflawiny zaobserwowano słabo intensywną emisję z maksimum pasma położonym przy 498 nm ($20,1 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$). Pasma to zostało zinterpretowane jako pasmo fluorescencji opóźnionej.

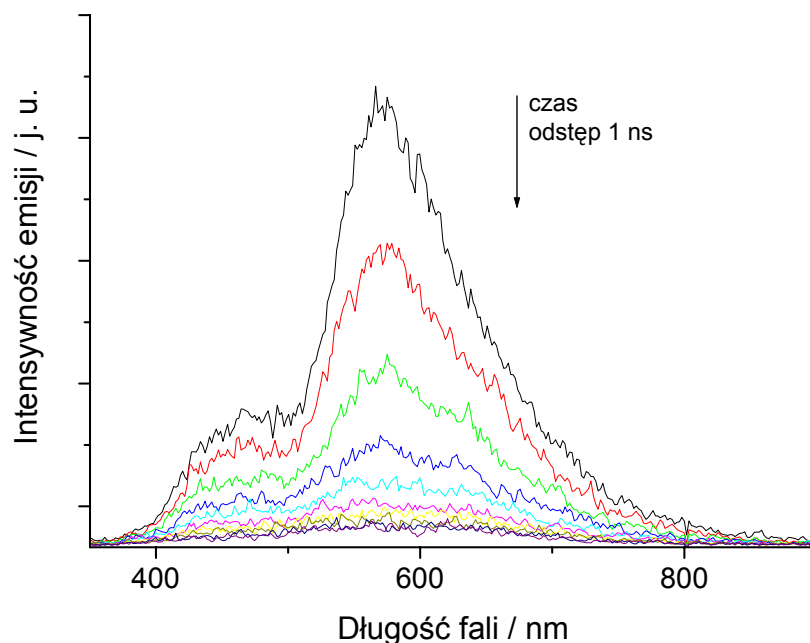


Rysunek 39. Widma fluorescencji polikryształów 5-deaza-ryboflawiny, zarejestrowane w odstępach czasowych 5 ns, wzbudzenie 337 nm; górny wykres przedstawia dyfuzyjno – odbiciowe widmo absorpcji polikryształów 5DRfl



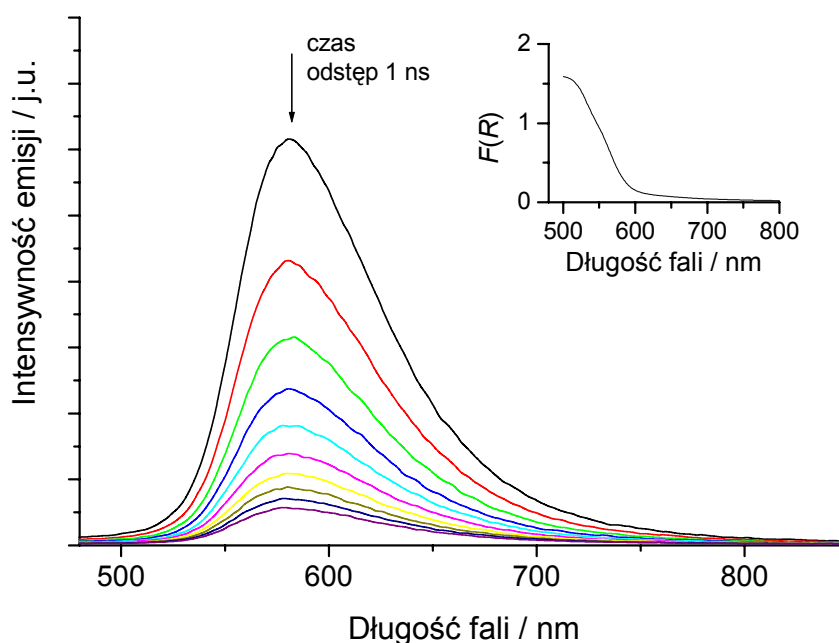
Rysunek 40. Widma fluorescencji polikryształów 5-deaza-ryboflawiny, zarejestrowane w odstępach czasowych 1 μs, wzbudzenie 337 nm

W przypadku izo-6,7-ryboflawiny w stanie polikrystalicznym oprócz głównego pasma emisji 570 nm ($17,5 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$) zaobserwowano pojawienie się dodatkowego pasma emisji w zakresie krótkofalowym przy 452 nm ($22,1 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$). Wynik ten podobny jest do rezultatu uzyskanego przez Wolfa i współpracowników, którzy badali polikrystaliczne próbki ryboflawiny [3]. Autorzy ci zaobserwowali również poza pasmem charakterystycznym dla emisji ryboflawiny przy 560 nm ($17,9 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$) dodatkowe pasmo w zakresie krótkofalowym przy 420 nm ($23,8 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$). Obecność krótkofalowego pasma widocznego w emisji próbek polikrystalicznych ryboflawiny autorzy zidentyfikowali jako emisję pochodzącą od lumichromu, produktu fotodegradacji ryboflawiny. Przez analogię krótkofalowe pasmo emisji widoczne w emisji izo-6,7-ryboflawiny przypisano obecności 6,7 –dimetyloallosazyny, która powstaje pod wpływem foto-indukowanej degradacji izo-6,7-ryboflawiny.



Rysunek 41. Widma fluorescencji polikrystalów izo-6,7-ryboflawiny, zarejestrowane w odstępach czasowych 1 ns, wzbudzenie 337 nm

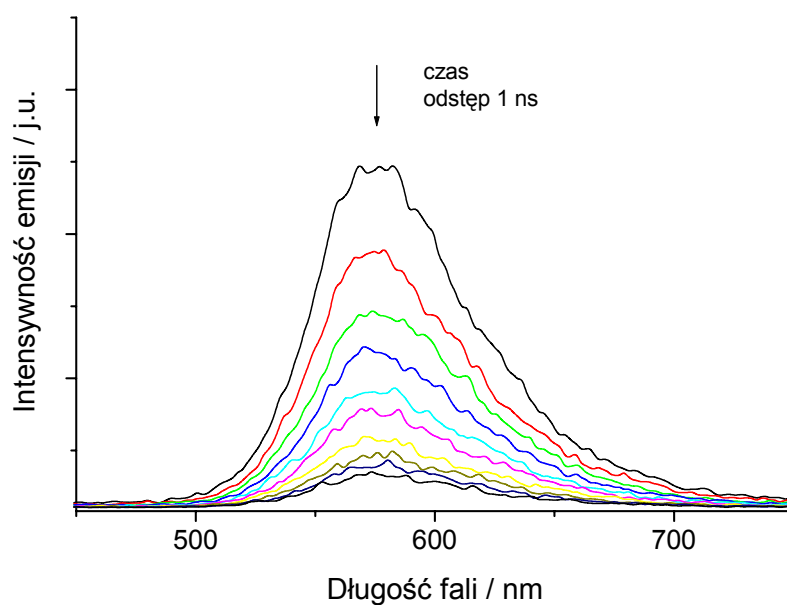
Czasowo-zależne pomiary fluorescencji wykonane dla 3-benzylolumiflawiny w postaci polikrystalicznej wykazały przesunięcie maksimum pasma fluorescencji w kierunku fal dłuższych (**Tabela 13**, str. 98) oraz skrócenie czasu życia fluorescencji (3,5 ns) w stosunku do odpowiednich danych uzyskanych dla związku w roztworze metanolowym (5,8 ns). Wydaje się, że istotny wpływ na zmiany w charakterystyce spektralnej i fotofizycznej mają oddziaływania międzycząsteczkowe w sieci krystalicznej, zdeterminowane oddziaływaniami van der Waalsa oraz π -stacking (oddziaływaniami warstwowymi) pomiędzy sąsiednimi płaskimi fragmentami cząsteczek 3-benzylolumiflawiny (**Rysunek 42**).



Rysunek 42. Widma fluorescencji polikryształów 3-benzylu-lumiflawiny, zarejestrowane w odstępach czasowych 1 ns, wzbudzenie 337 nm; górny wykres przedstawia dyfuzyjno – odbiciowe widmo absorpcji polikryształów 5BLfl

Analogiczne pomiary wykonane dla polikryształów 3MeTARF (**Rysunek 43**, str. 102) wykazały obecność pasma fluorescencji przy 575 nm ($17,4 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$), którego położenie bardziej długofalowe w stosunku do odpowiedniego pasma zarejestrowanego dla 3MeTARF w roztworze (513 nm; $19,5 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$), zdeterminowane jest prawdopodobnie oddziaływaniami poprzez wiązania wodorowe. Taka interpretacja jest spójna dla wszystkich badanych pochodnych ryboflawiny [4-7], jak i dla samej ryboflawiny, dla

której znane są wspomniane wcześniej badania Wolfa i współprac. [3]. W odróżnieniu od ryboflawiny, dla cząsteczki 3MeTARF nie zarejestrowano żadnego dodatkowego pasma emisji, co stanowi dodatkowe potwierdzenie jej znacznie większej fotostabilności również w postaci polikrystalicznej.



Rysunek 43. Widma fluorescencji polikryształów 3MeTARF, zarejestrowane w odstępach czasowych 1 ns, wzbudzenie 337 nm

5. Pochodne flawin jako fotosensybilizatory tlenu singletowego

Działanie tlenu singletowego jako silnego utleniacza zostało wykorzystane w terapii wielu chorób. Osiągnięcia w dziedzinie syntezy nowych fotosensybilizatorów o zróżnicowanej strukturze i właściwościach pozwalających na odmienne działanie w stosunku do różnych linii komórkowych i różnych chorób stworzyły realne możliwości wprowadzenia nowej metody leczenia jaką jest terapia fotodynamiczna. Barwniki posiadające odpowiednie właściwości fotofizyczne pozwalają na zastosowanie metody również do celów diagnostycznych. Właściwości fotouczulające barwników zależą od ich struktury chemicznej, właściwości fizykochemicznych, a także zdolności wnikania oraz retencji w chorej tkance. Trudno jest jednak znaleźć barwniki spełniające jednocześnie wszystkie stawiane wymagania. Poszukiwanie nowych związków zdolnych do sensybilizacji reakcji tworzenia tlenu singletowego stanowi więc istotny kierunek badań [124].

Cząsteczki związków z grupy flawin reagują w stanie wzbudzonym z cząsteczkami tlenu. W tych reakcjach flawiny występują w roli sensybilizatora w efekcie prowadząco powstania cząsteczki tlenu w singletowym stanie wzbudzonym – tlen singletowy.

Podstawowa metoda pomiaru tlenu singletowego polega na detekcji promieniowania emitowanego przez cząsteczki tlenu w stanie wzbudzonym, przy długości fali 1270 nm, A więc przy długości odpowiadającej przejściu $O_2(^1\Delta) \rightarrow O_2(^3\Sigma)$. Można zauważyć, że uzyskana wartość wydajności kwantowej tworzenia tlenu singletowego stanowi górną granicę oszacowanej wydajności przejścia międzysystemowego, jeśli mechanizm oparty jest na przeniesieniu energii ze stanu T_1 .

Porównanie wartości wydajności tworzenia tlenu singletowego dla ryboflawiny (0,51) i dla izo-6,7-ryboflawiny (0,70) (**Tabela 14**, str.106) wskazuje, że zmieniony układ podstawników w cząsteczce izoalloksazyny powoduje znaczną różnicę w wydajności tworzenia tlenu singletowego. Z kolei porównanie wartości ϕ_Δ dla ryboflawiny i lumiflawiny (0,48) wskazuje, że obecność łańcucha rybitylowego w cząsteczce nie wpływa znacząco (jeśli w ogóle) na wartość wydajności tworzenia tlenu singletowego. Odpowiednie dane zamieszczono w **Tabeli 14** (str. 106).

Porównanie wartości ϕ_Δ i ϕ_F dla ryboflawiny (odpowiednio 0,51 i 0,39) i izo-6,7-ryboflawiny (odpowiednio 0,70 i 0,20) wskazuje, że suma tych wartości jest niewiele mniejsza od 1. Tak więc najniższy singletowy stan wzbudzony dezaktywuje się głównie poprzez fluorescencję oraz przejście międzysystemowe.

Chackon i współpr. wykazali, że w przypadku ryboflawiny wydajność kwantowa przejścia międzysystemowego wynosi $\phi_{ISC}=0,6$ [9]. Na tej podstawie można sugerować, że w przypadku ryboflawiny singletowy stan wzbudzony dezaktywuje się głównie poprzez fluorescencję i przejście międzysystemowe. Inne dane dla ryboflawiny w roztworze wodnym o $pH = 7$ opublikowane przez Islama i współpr. [10] wskazują, że konwersja wewnętrzna odgrywa niebagatelną rolę w dezaktywacji stanu singletowego.

W cząsteczkach izoalloksazyn (izo-6,7-ryboflawina, ryboflawina) najniższe wzbudzone stany singletowe mają konfigurację π, π^* , tak samo jak najniższe wzbudzone stany trypletowe. Jak wynika z obliczeń, w cząsteczce izo-6,7-ryboflawiny istnieją stany trypletowe o konfiguracji $^3(\pi, \pi^*)$, położone na skali energii poniżej najniższego wzbudzonego stanu singletowego S_1 , który posiada konfigurację $^1(\pi, \pi^*)$. Zgodnie z regułami wyboru El Sayeda [98] bardziej prawdopodobne jest przejście międzysystemowe pomiędzy stanami o różnej konfiguracji (n.p. od $^1(n, \pi^*)$ do $^3(\pi, \pi^*)$) niż pomiędzy stanami o tej samej konfiguracji (n.p. od $^1(\pi, \pi^*)$ do $^3(\pi, \pi^*)$) [19,101,162].

5-Deaza-ryboflawina

Stała szybkości zaniku stanu trypletowego w roztworze metanolemym, określona na podstawie zaniku widma absorpcji przejściowej przy długości fali $\lambda = 300$ nm w roztworze odtlenionym wynosi $k_T = 6,41 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$. W roztworze o zrównoważonej zawartości tlenu wartość stałej zaniku stanu trypletowego jest o ok. dwa rzędy wielkości większa i wynosi $k_T = 1,83 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$, przy czym stała wygaszania przez tlen przyjmuje wartość $8,4 \times 10^8 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Niska wartość stałej szybkości wygaszania może być spowodowana tworzeniem ekscypleksu pomiędzy stanem trypletowym a cząsteczką tlenu. Wydajność kwantowa fotosensybilizowanej produkcji tlenu singletowego w metanolu wynosi $\phi_\Delta = 0,33$. W porównaniu z ryboflawiną wartość ta jest wyraźnie niższa. Mimo to wydaje się, że związek ten może być uważany za dobry sensybilizator tlenu singletowego. Dane dotyczące pomiarów i oznaczeń tlenu singletowego zamieszczono w **Tabeli 14** (str. 106).

Izo-6,7-ryboflawina

Stała szybkości deaktywacji stanu trypletowego w przypadku izo-6,7-ryboflawiny w metanolu przepłukiwanym azotem wynosi $k_T = 9,2 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$. Dla napowietrzonego roztworu metanolowego stała ta wynosi $k_T = 1,7 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$, natomiast dla roztworu natlenionego otrzymano wartość $k_T = 1,0 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$. Wartość wydajności kwantowej tworzenia tlenu singletowego w roztworze metanolowym wynosi $\phi_\Delta = 0,70$, co oznacza, że izo-6,7-ryboflawina jest bardzo dobrym sensybilizatorem tlenu singletowego.

3-Metylo-tetraacetylo ryboflawina

W celu zaobserwowania różnicy w ilości powstającego tlenu singletowego dla tej pochodnej wyznaczono wydajność tworzenia tlenu singletowego w metanolowych roztworach odtlenionym, napowietrzonego oraz natlenionym. Zauważono, że wzrost stężenia tlenu w roztworze powoduje znaczące zmiany intensywności emisji pochodzącej od powstającego w reakcji fotosensybilizacji tlenu singletowego.

W oparciu o dane uzyskane z eksperymentu w roztworze natlenionym wyznaczono wydajność kwantową tworzenia tlenu singletowego w reakcji fotosensybilizacji oraz jego czas życia. Uzyskany czas życia tlenu singletowego wynosi $\tau_\Delta = 10 \text{ }\mu\text{s}$ i jest typowy dla tlenu singletowego w metanolu [11,12]. Wydajność kwantowa tworzenia tlenu singletowego dla 3MeTARF w metanolu wynosi $\phi_\Delta = 0,61$. Dane uzyskane dla tej pochodnej zestawione z odpowiednimi danymi dla ryboflawiny i innych pochodnych zaprezentowano w **Tabeli 14** (str. 106).

3-Benzylo-lumiflawina

Dla tej pochodnej wyznaczono wydajność tworzenia tlenu singletowego w metanolowym roztworze odtlenionym, w roztworze napowietrzonego i w natlenionym w celu wyznaczenia różnicy w ilości powstającego tlenu singletowego. Wyznaczone dane wynoszą odpowiednio $k_T = 2,86 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$ dla roztworu odtlenionego, $k_T = 2,35 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ dla roztworu napowietrzonego oraz $k_T = 1,19 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$ dla roztworu natlenionego. Wzbudzenie 3BLfl w roztworze natlenionym pozwoliło wyznaczyć wydajność kwantową tworzenia w reakcji fotosensybilizowanej tlenu singletowego oraz jego czas życia. Uzyskana wartość czasu życia wynosi $\tau_\Delta = 10 \text{ }\mu\text{s}$ i jest typowa dla tego indywiduum w metanolu [11,12]. Wartość wydajności kwantowej tworzenia tlenu singletowego wynosi $\phi_\Delta = 0,53$. Porównanie otrzymanej wartości z odpowiednimi wartościami publikowanymi dla

lumiflawiny oraz dla pochodnych zawierających inne podstawniki w pozycji 3 pierścienia izoalloksazynowego, a mianowicie 3-metylo-lumiflawiny i 3-etylo-lumiflawiny [13] wskazuje, że wielkość i rodzaj podstawnika nie wpływa w sposób istotny na wydajność tworzenia tlenu singletowego w reakcji fotosensybilizowanej, przebiegającej z ich udziałem.

Tabela 14. Czas życia stanu trypletowego (τ_T) badanych pochodnych izoalloksazynowych w metanolu, wydajność kwantowa fotosensybilizowanej produkcji tlenu singletowego (Φ_Δ), oraz jego czas życia (τ_Δ), w porównaniu z odpowiednimi danymi dla lumiflawiny i innych jej pochodnych oraz z danymi dla ryboflawiny

związek	$\tau_T/\mu\text{s}$	$\Phi_\Delta/\mu\text{s}$	$\tau_\Delta/\mu\text{s}$
Lumiflawina	17	0.48	10
3-Metylo lumiflawina ^b	-	0.53	10
3-Etylo lumiflawina ^b	9.5	0.55	10
3-Benzylo lumiflawina ^b	34.9	0.53	10
Ryboflawina ^c	3.7	0.51	10
Izo-(6,7)-ryboflawina ^c	11	0.70	10
5-Deaza-ryboflawina ^d	15	0.33	10
3MeTARF [†]	20	0.61	10

[†] Wartość wydajności kwantowej stanu trypletowego dla 3-metylo-tetraacetylo-ryboflawiny została oznaczona w roztworze metanolowym na 0.54

^a dane zaczerpnięte z Ref. [13]; ^b dane zaczerpnięte z Ref. [163]; ^c dane zaczerpnięte z Ref. [101]; ^d dane zaczerpnięte z Ref. [164]

6. Reaktywność fotochemiczna flawin w roztworach metanolowych

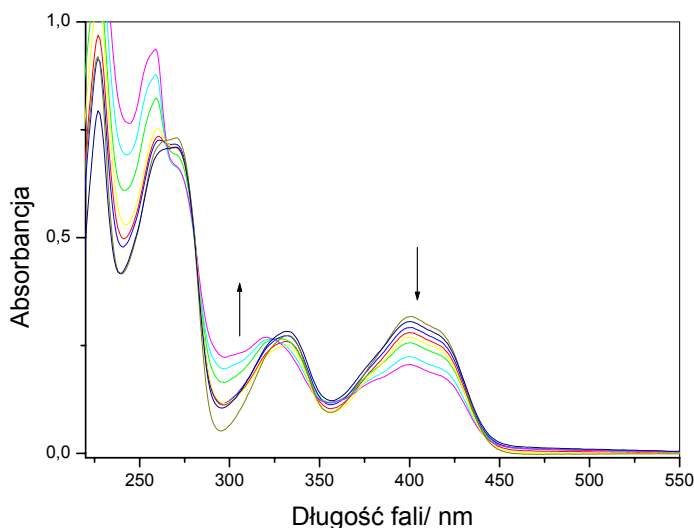
Podobieństwa strukturalne i podobne właściwości spektralne substratów i fotoproduktów powstających w procesie naświetlania ryboflawiny i jej pochodnych stanowi jedną z podstawowych trudności do pokonania przy próbie opisu fotochemii flawin. Fakt, że produkty fotodegradacji flawin absorbują promieniowanie UV-Vis w tym samym zakresie co substraty stanowi podstawową trudność w ustaleniu stopnia przereagowania substratu bezpośrednio w trakcie procesu naświetlania. Ponadto precyzyjne oznaczenie fotoproduktów z użyciem metod spektroskopowych także jest utrudnione. Z doniesień literaturowych wiadomo, że oznacza się dane kinetyczne dotyczące reakcji, jednakże uzyskane wyniki nie są zadowalające [165].

W ramach prezentowanej pracy podjęto próbę oznaczenia wydajności kwantowej reakcji fotolizy badanych pochodnych ryboflawiny oraz oznaczenia fotoproduktów reakcji z użyciem Wysokosprawnej Chromatografii Cieczowej HPLC, która umożliwia rozdzielenie substratu i fotoproduktów. Pozwala to oznaczyć ubytek substratu, wielkość niezbędną do wyznaczenia wydajności kwantowej zaniku substratu. Ponadto wydzielenie fotoproduktów reakcji, umożliwia ich charakterystykę techniką Spektrometrii Mas.

Celem zbadania reaktywności fotochemicznej badanych pochodnych, roztwory metanolowe związków oraz roztwór ryboflawiny poddano naświetlaniu promieniowaniem o długości fali $\lambda = 366$ nm. Przebieg reakcji kontrolowano spektrofotometrycznie, mierząc zmiany w widmie absorpcji UV-Vis oraz chromatograficznie, za pomocą metody HPLC. Fotoliza badanych związków wykazała, że pochodne izo-6,7-ryboflawina, 5-deaza-ryboflawina i 3-benzylo-lumiflawina pod wpływem promieniowania UV ulegają zanikowi fotochemicznemu. Wyznaczone wydajności kwantowe reakcji zaniku, rzędu 10^{-3} - 10^{-4} [mol·einst⁻¹], pokazują, że fotochemiczna degradacja pochodnych ryboflawiny jest procesem dość wydajnym. Zastosowanie różnych warunków naświetlania, w obecności i nieobecności tlenu, pozwoliło zaobserwować stosowne różnice w wartościach wydajności kwantowej (**Tabela 15** (str. 114) i **Tabela 16** (str. 115)). Zależy ona od warunków reakcji i jest wyraźnie wyższa dla roztworów odtlenionych. Taki rezultat sugeruje, że w przebiegu reakcji fotolizy zaangażowane są stany trypletowe poszczególnych cząsteczek. W nieobecności tlenu, który jest wygaszaczem stanów trypletowych, cząsteczki w tych stanach z większą wydajnością ulegają fotolizie. Ponadto w pracy podjęto próbę oznaczenia fotoproduktów powstających w wyniku fotolizy.

5-Deaza-ryboflawina

Rysunek 44 przedstawia zmiany w widmie absorpcji w zakresie UV-Vis dla 5DRfl, zachodzące pod wpływem naświetlania. Obserwuje się wyraźne zmniejszenie absorpcji w zakresie długofalowego pasma absorpcji oraz wzrost absorpcji ok. 300 nm.

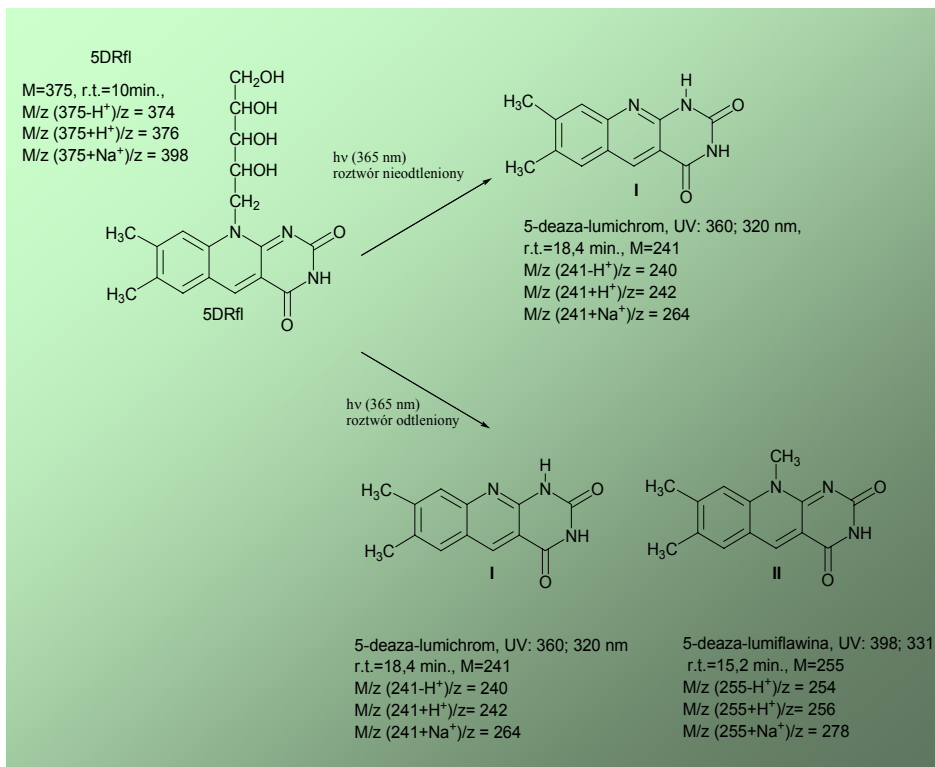


Rysunek 44. Zmiany w widmie absorpcji 5-deaza-ryboflawiny w metanolu, obserwowane podczas naświetlania promieniowaniem $\lambda = 366$ nm

Pochodna 5-deaza-ryboflawina naświetlana w roztworze metanolowym ulega fotolizie z wytworzeniem kilku produktów. Dystrybucja fotoproduktów zależy od warunków naświetlania związanych z obecnością tlenu w roztworze. W warunkach tlenowych obserwuje się jeden główny fotoprodukt, zidentyfikowany jako odpowiednia pochodna alloksazynowa, 5-deaza-lumichrom. Zastosowanie warunków beztlenowych pozwala zaobserwować kilka fotoproduktów. Jako dwa główne obserwuje się 5-deaza-lumichrom i 5-deaza-lumiflawinę (**Schemat 6a**, str. 109). Obecność tych fotoproduktów potwierdzono wykonując widmo MS, oraz poprzez porównanie z wzorcem zarówno czasu retencji, w metodzie chromatograficznej, jak i spektrofotometrycznie poprzez porównanie z wzorcem widm absorpcji w UV-VIS. W oparciu o dane literaturowe [47,167,180] oraz na podstawie wyników uzyskanych w spektrometrii mas i w chromatografii HPLC zaproponowano prawdopodobne struktury trzeciego fotoproduktu, przedstawione na **schemacie 6b** (str. 109) jako struktura III lub struktura IV. Pozostałych fotoproduktów nie zidentyfikowano. Ponadto zaobserwowano, że obecność tlenu wpływa na wydajność kwantową reakcji fotolizy badanej pochodnej. Wartość ta jest kilkakrotnie wyższa w warunkach

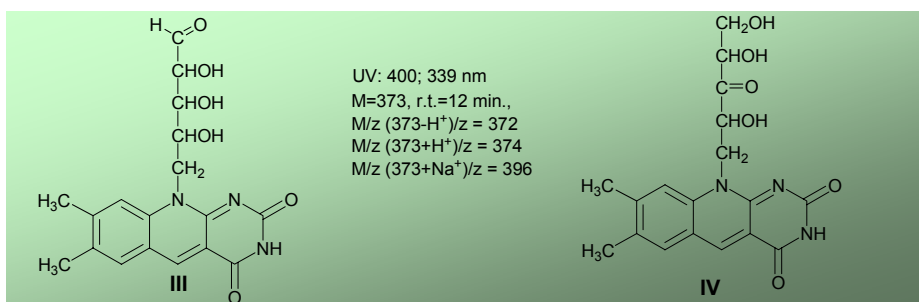
beztlenowych, poza 3-Benzylolumiflawiną, co sugeruje udział stanu trypletowego w badanej reakcji fotochemicznej (**Tabela 15** (str. 114) i **Tabela 16** (str. 115)).

Schemat 6a



Główne fotoprodukty powstające w procesie naświetlania
5-deaza-ryboflawiny w metanolu

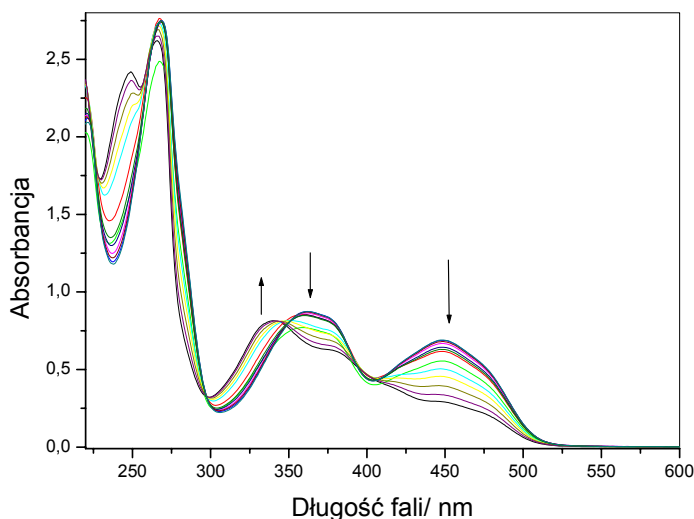
Schemat 6b



Proponowane struktury trzeciego fotoproduktu powstającego w wyniku
naświetlania 5-deaza-ryboflawiny w metanolu

Izo-6,7-ryboflawina

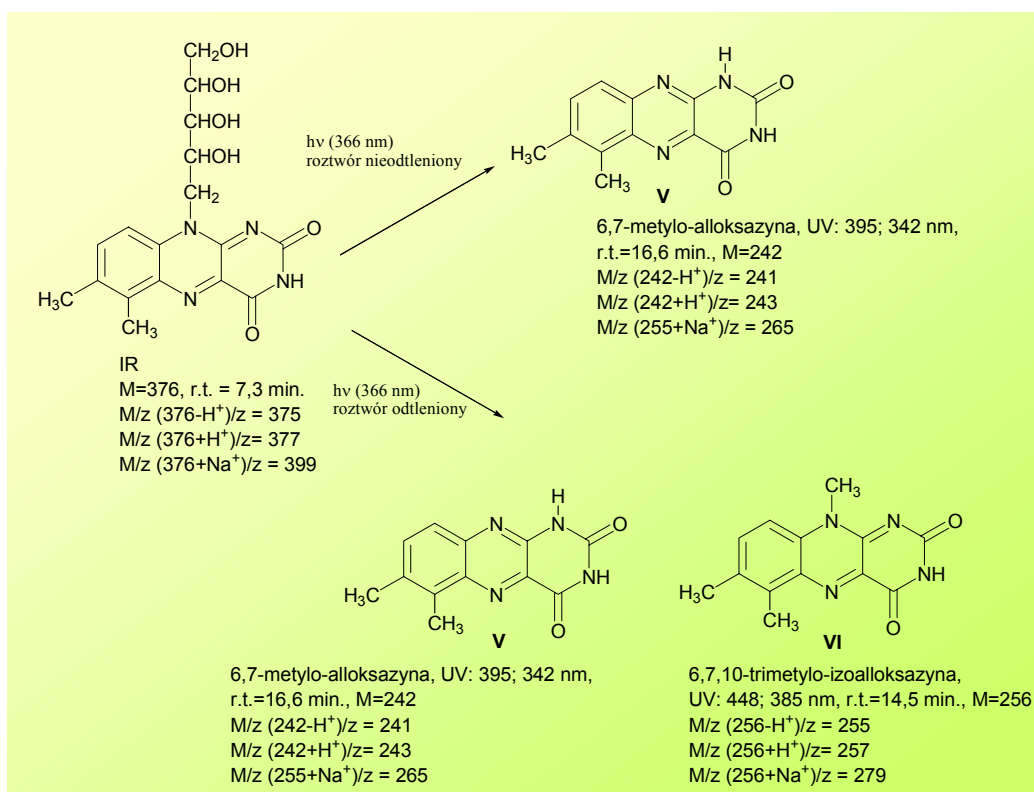
Rysunek 45 przedstawia zmiany w widmie absorpcji w UV-VIS, zarejestrowane w trakcie naświetlania izo-6,7-ryboflawiny (IR) w roztworze metanolowym. W wyniku naświetlania izo-6,7-ryboflawiny obserwuje się wyraźny zanik pasm długofalowych, któremu towarzyszy formowanie pasma absorpcji z maksimum położonym przy ok. $\lambda = 325$ nm



Rysunek 45. Zmiany w widmie absorpcji izo-6,7-ryboflawiny w metanolu, zachodzące pod wpływem naświetlania promieniowaniem o długości fali $\lambda = 366$ nm

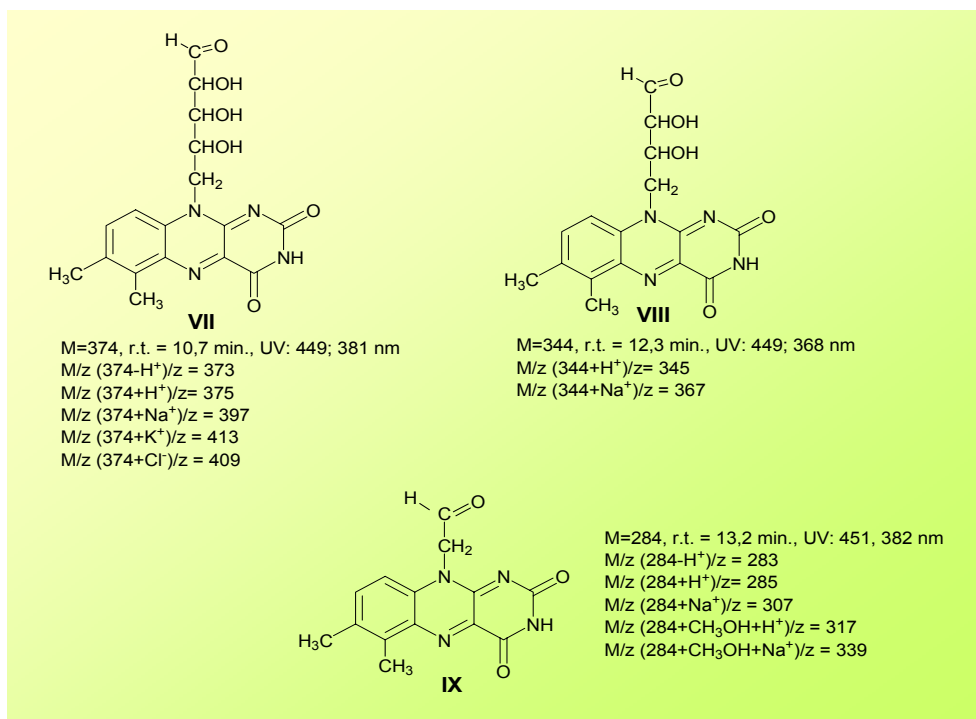
W wyniku fotolizy, metodą chromatograficzną zarejestrowano powstawanie dwóch głównych produktów. Naświetlanie związku w napowietrzonym roztworze prowadzi do powstawania jednego produktu, którym jest odpowiednia pochodna alloksazynowa, 6,7-dimetylo-alloksazyna. Inną dystrybucję fotoproduktów obserwuje się w przypadku naświetlania roztworu odtlenionego. W tych warunkach naświetlania głównym fotoproduktem obok pochodnej alloksazynowej (6,7-dimetylo-alloksazyny) jest pochodna izoalloksazynowa (6,7,10-trimetylo-izoalloksazyna) (**Schemat 7a**, str. 111)). Ponadto obserwuje się powstawanie trzech innych fotoproduktów, dla których zaproponowano struktury (**Schemat 7b**, str. 111). Związki te w widmach absorpcji UV posiadają pasma charakterystyczne dla struktury izoalloksazynowej. Ich czasy retencji wydłużają się w stosunku do czasu retencji substratu, podczas gdy masy wyznaczone w spektrometrii mas maleją. Analiza tych danych wraz z uzyskanymi wartościami w widmach MS pozwoliły na zaproponowanie wspomnianych struktur (struktury V, VI i VII) jako prawdopodobnych dla powstających w fotolizie produktów.

Schemat 7a



Główne fotoprodukty powstające w procesie naświetlania
 izo-6,7-ryboflawiny w metanolu

Schemat 7b

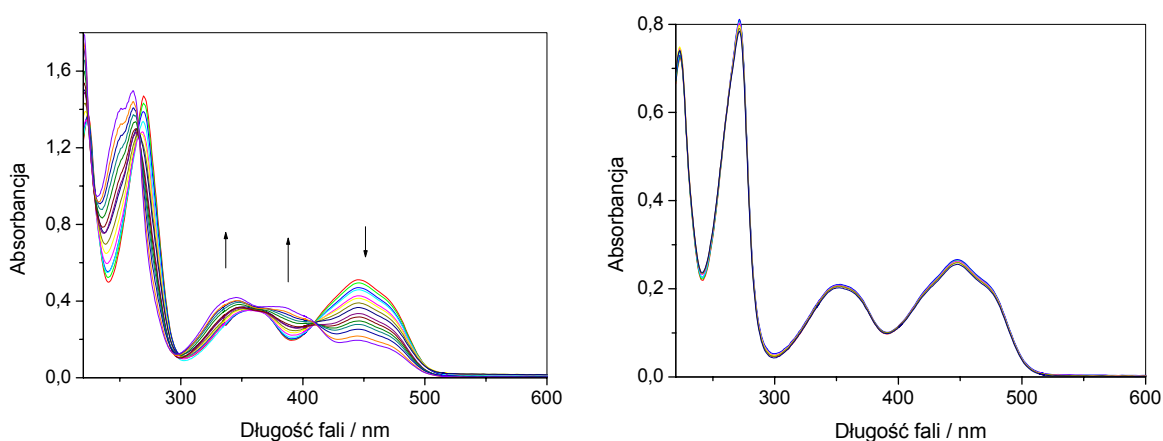


Proponowane struktury dodatkowych fotoproduktów naświetlania izo-6,7-ryboflawiny

Warunki naświetlania związane z obecnością i nieobecnością tlenu w roztworze powodują, że proces zaniku Izo-6,7-ryboflawiny przebiega z inną wydajnością kwantową (odpowiednio $\phi = 1,6 \times 10^{-3}$ i $\phi = 7,2 \times 10^{-4}$). Taki wynik sugeruje, że w reakcji fotolizy pod wpływem promieniowania o długości fali $\lambda = 366$ nm, zaangażowany jest stan trypletowy naświetlanego związku.

3-Metylo-tetraacetylo-ryboflawina

Porównanie zapisu pomiarów spektrofotometrycznych procesu fotolizy 3-metylo-tetraacetylo ryboflawiny oraz ryboflawiny wykonanych w tych samych warunkach eksperymentalnych pokazuje, że acetylowana pochodna ryboflawiny nie wykazuje istotnych zmian w widmie absorpcji UV-VIS pod wpływem naświetlania (**rysunek 46**).

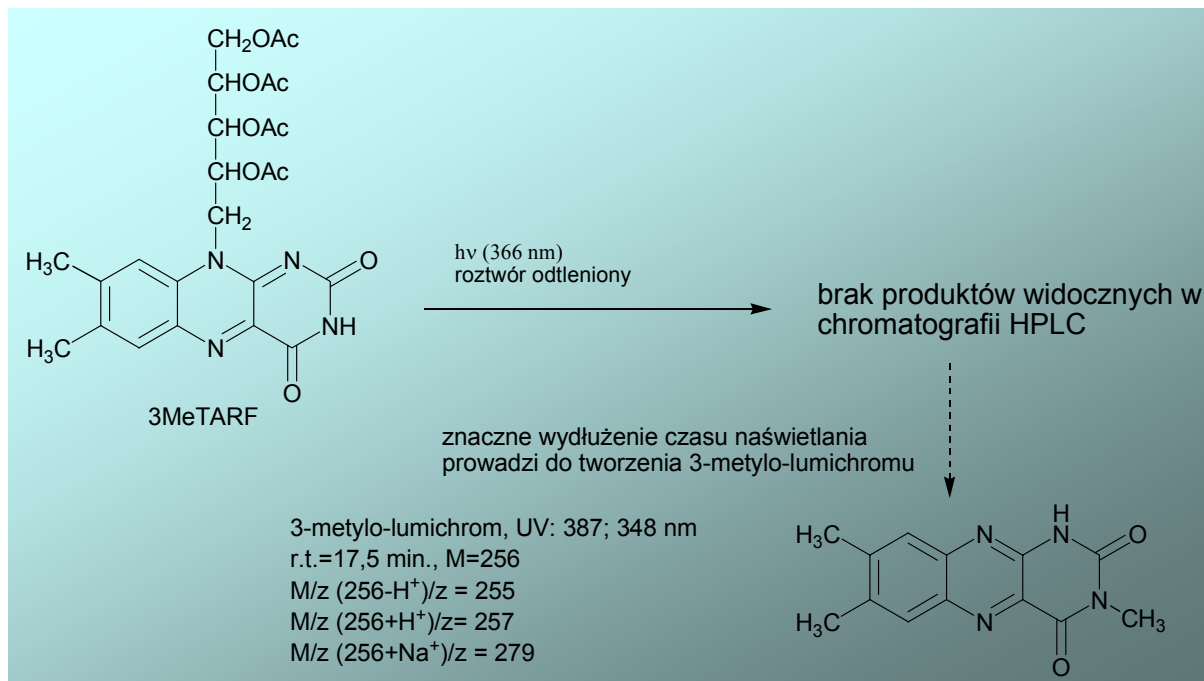


Rysunek 46. Zmiany w widmie absorpcji obserwowane podczas naświetlania roztworu ryboflawiny w metanolu (rys.lewy) i 3-metylo-tetraacetylo ryboflawiny w metanolu, (rys. prawy), $\lambda_{\text{naśw.}} = 366$ nm.

Zaobserwowano, że pochodna ta wykazuje znacznie większą odporność na promieniowanie z zakresu UV. Naświetlanie pochodnej 3-metylo-tetraacetylo-ryboflawiny w roztworze metanolem promieniowaniem o długości fali $\lambda = 366$ nm prowadzi do fotolizy związku z wydajnością kwantową ok. 10-krotnie niższą ($\phi \sim 5 \times 10^{-5}$) niż pozostałych badanych pochodnych ryboflawiny oraz samej ryboflawiny. Taki wynik sugeruje, że obecność grup acetylowych w łańcuchu rybitylowym, zastępujących podstawniki hydroksylowe, zwiększa odporność związku i powoduje, że staje się on mniej podatny na promieniowanie z zakresu UV. W wyniku wydłużenia czasu naświetlania

obserwuje się (metodą chromatografii HPLC) tworzenie niewielkich ilości produktu, który zidentyfikowano jako 3-metylo lumichrom (**Schemat 8**).

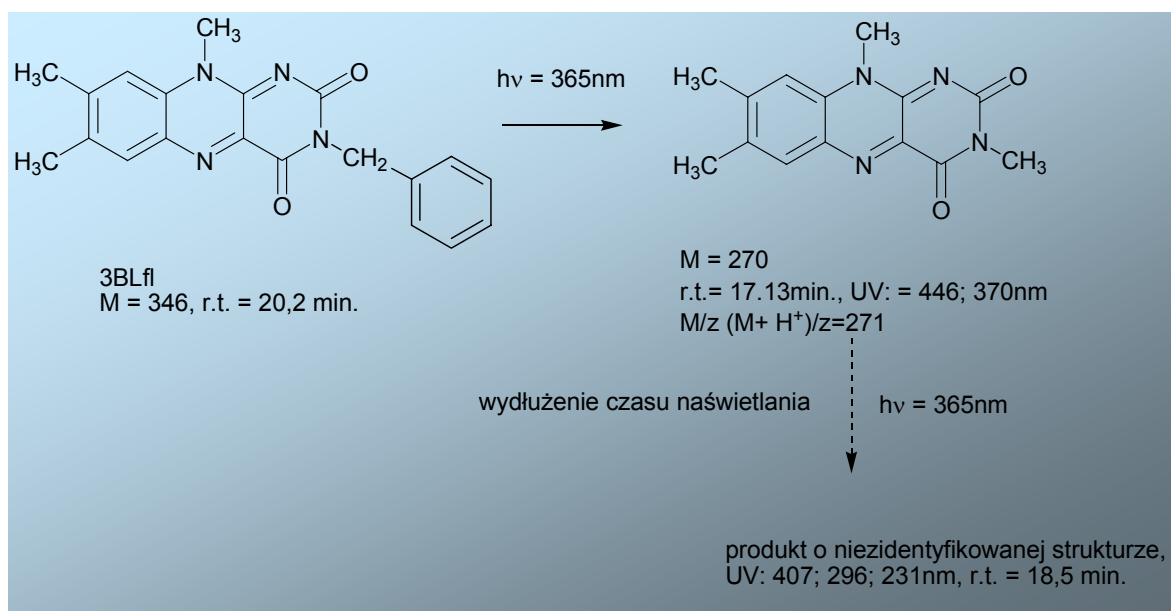
Schemat 8



Schemat procesu naświetlania 3MeTARF w metanolu

3-Benzylo-lumiflawina

Zaobserwowano, że 3-benzylo-lumiflawina naświetlana w nieodtlenionym roztworze metanolewym, promieniowaniem o długości fali $\lambda = 366$ nm ulega fotolizie z wydajnością kwantową $\phi = 2,2 \times 10^{-4}$. Jest to proces fotochemicznie znacznie mniej wydajny niż fotoliza izo-6,7-Rfl i 5DRfl. Wydajność tego procesu jest niezależna od obecności tlenu w roztworze. Zastosowanie warunków beztlennowych wykazało podobny przebieg procesu, który charakteryzuje taka sama wartość wydajności kwantowej (**Tabela 15** (str. 114) i **Tabela 16** (str. 115)). Skoro wygaszanie stanu trypletowego pozostaje bez wpływu na przebieg procesu, można wnioskować, że w reakcji tej nie bierze udziału stan trypletowy związku. W procesie obserwuje się tworzenie jednego głównego fotoproduktu, zidentyfikowanego jako odpowiednia pochodna izoalloksazynowa, 3-metylo-lumiflawina, (**Schemat 9**, str. 114). Wydłużenie czasu naświetlania powoduje powstawanie innego fotoproduktu, którego struktury nie określano w ramach prowadzonego eksperymentu.

Schemat 9

Schemat procesu naświetlania i fotoprodukt powstający w wyniku
fotolizy 3-benzyl-lumiflawiny w metanolu

Poniżej zamieszczono tabele zawierające wartości wydajności kwantowych fotolizy poszczególnych pochodnych ryboflawiny.

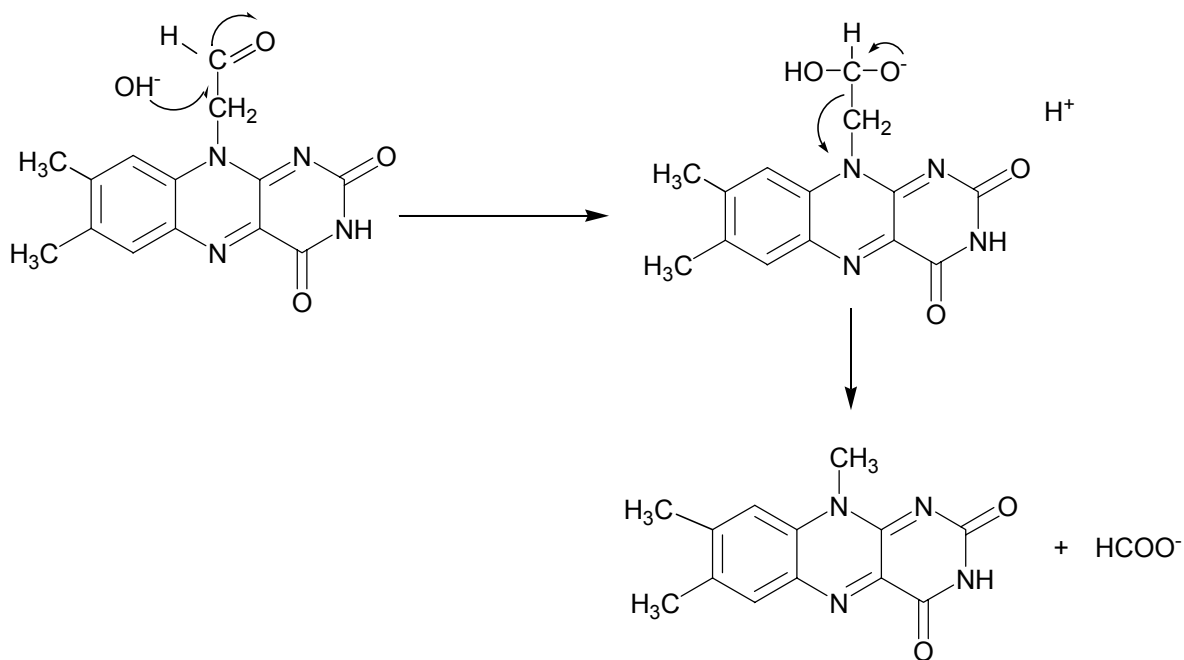
Tabela 15. Wartości wydajności kwantowych wyznaczone dla fotolizy ($\lambda = 366\text{ nm}$) pochodnych ryboflawiny w metanolu w warunkach beztlenowych

Związek (próbka odtleniona)	c_0 /mol/dm ³	ϕ /mol/einst.
Izo-6,7-ryboflawina	$2,33 \times 10^{-5}$	$1,5 \times 10^{-3}$
5-Deaza-ryboflawina	$2,2 \times 10^{-5}$	$3,7 \times 10^{-3}$
3-Metylo-tetraacetylo ryboflawina	$1,01 \times 10^{-4}$	$< 5,0 \times 10^{-5}$
3-Benzyl-lumiflawina	$2,75 \times 10^{-5}$	$2,1 \times 10^{-4}$
3-Benzyl-ryboflawina	$2,76 \times 10^{-5}$	$2,3 \times 10^{-3}$
Ryboflawina	$4,1 \times 10^{-5}$	$2,9 \times 10^{-3}$

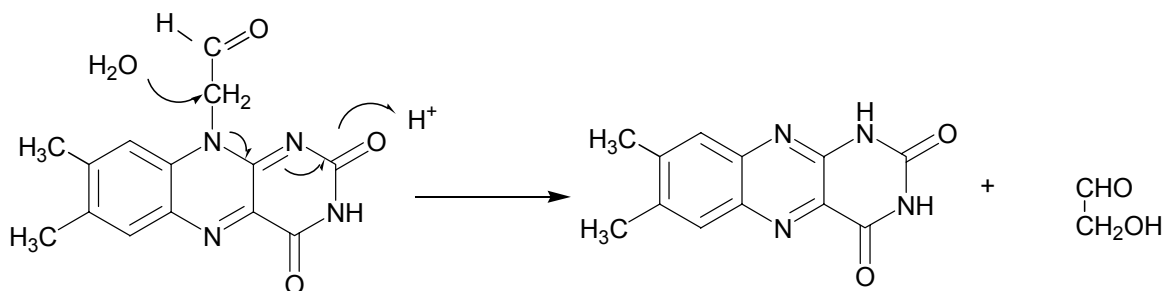
Tabela 16. Wartości wydajności kwantowych wyznaczone dla fotolizy ($\lambda = 366$ nm) pochodnych ryboflawiny w metanolu w warunkach nieodtlenionych

Związek (próbka nieodtleniona)	c_0 /mol/dm ³	ϕ /mol/einst.
Izo-6,7-ryboflawina	$2,33 \times 10^{-5}$	$7,2 \times 10^{-4}$
5-Deaza-ryboflawina	$1,9 \times 10^{-5}$	$6,2 \times 10^{-4}$
3-Benzylo-lumiflawina	$2,75 \times 10^{-5}$	$2,2 \times 10^{-4}$
Ryboflawina	$4,1 \times 10^{-5}$	$1,1 \times 10^{-3}$

Wyniki naświetlania sugerują, że pochodne ryboflawiny ulegają fotolizie ze stosunkowo dużą wydajnością. W wyniku fotolizy związki te tracą łańcuch rybitylowy, a głównymi produktami rozkładu są odpowiednie pochodne alloksazynowe i izoalloksazynowe. Mechanizm alkalicznej hydrolizy FMF i tworzenia lumiflawiny i lumichromu zaprezentowany już w pionierskich pracach Songa i współpr. [166], pokazuje, że produktem pośrednim alkalicznej fotolizy ryboflawiny jest formylometyloflawina (FMF) (Schemat 10a i 10b).

Schemat 10a, według [166]

Mechanizm reakcji tworzenia lumiflawiny w roztworach alkalicznych

Schemat 10b, według [166]

Mechanizm reakcji tworzenia lumichromu w roztworach alkalicznych

Wnikliwe badania pochodnych ryboflawiny zaprezentowane przez Moore'a i Baylora [167] pokazały jak skomplikowane procesy uczestniczą w zaniku fotochemicznym tych związków. Autorzy zaproponowali szereg cyklicznych pochodnych powstających w wyniku naświetlania poprzez przyłączanie łańcucha bocznego do pierścienia izoalloksazynowego. Dla tych reakcji sugeruje się mechanizm wewnątrzcząsteczkowego przeniesienia wodoru z hydroksyalkilowego łańcucha bocznego do pierścienia izoalloksazynowego.

Badania fotolizy ryboflawiny w roztworze wodnym, rozwinięte przez Ahmada i współpr. [168], potwierdziły obecność lumiflawiny, lumichromu oraz formylometyloflawiny i cyklodehydroryboflawiny wśród fotoproduktów. Na udział poszczególnych związków wśród fotoproduktów ma wpływ stężenie katalizatora, jakim mogą być jony fosforanowe H_2PO_4^- , pH roztworu, a także intensywność promieniowania padającego na próbkę.

W rozpuszczalnikach hydroksylowych reakcje fotolizy zachodzą poprzez stan trypletowy. Ponadto zauważono, że ryboflawina, lumiflawina oraz FMN ulegają fotodegradacji, która jest związana z odszczepieniem wodoru z grupy hydroksylowej rozpuszczalnika [169].

Ahmad i współpr. [170] badali także wpływ intensywności światła na dystrybucję fotoproduktów naświetlania. Autorzy sugerują wpływ intensywności światła na wydajność tworzenia stanów singletowych i trypletowych oraz ich udział w inicjowaniu odpowiednich reakcji. Również szybkość reakcji fotodegradacji ryboflawiny zależy silnie

od intensywności światła padającego oraz długości fali promieniowania użytego do naświetlania.

Dla niezjonizowanych cząsteczek flawin obserwuje się wyższe stałe szybkości fotolizy niż dla tych samych cząsteczek zjonizowanych. W zakresach pH, w których cząsteczki flawiny występują w postaci jonów (poniżej pH = 2 i powyżej pH = 10), mamy do czynienia z wygaszaniem ich wzbudzonych stanów singletowych przez cząsteczki kwasu czy zasady [171].

Sugeruje się, że degradacja ryboflawiny pod wpływem promieniowania UV-Vis przebiega poprzez wewnątrzcząsteczkowe procesy fotoredukcji i fotodealkilowania oraz poprzez fotoaddycję. Gdy główne indywiduum przejściowe w wewnątrzcząsteczkowych procesach fotoredukcji i fotodealkilowania w obecności jonów fosforanowych stanowi wzbudzony stan singletowy flawiny, reakcja prowadzi wprost do lumichromu. Udział wzbudzonego stanu trypletowego prowadzi do produktów pośrednich, z których następnie tworzy się lumichrom oraz lumiflawina [168].

Drugi z postulowanych mechanizmów prowadzi do reakcji fotoaddycji, która przebiega z udziałem wzbudzonego stanu singletowego flawiny. Kompleks cząsteczki flawiny z jonami fosforanowymi ułatwia reorientację grup hydroksylowych w pozycji C-2' łańcucha rybitylowego co umożliwia reakcję fotoaddycji [168].

Charakterystyczne zmiany w widmie absorpcji rejestrowane podczas naświetlania dotyczą ubytku absorpcji w zakresie widzialnym widma, charakterystycznym dla flawin ($\lambda = 445$ nm) oraz wzrost absorpcji w zakresie charakterystycznym dla lumichromu ($\lambda = 340-400$ nm) [172]. W wyniku naświetlania cząsteczka flawiny jest wzbudzana do stanu singletowego, a następnie przez przejście międzystemowe obsadzany jest jej stan trypletowy. W kolejnym etapie lawina może ulec albo dezaktywacji do stanu podstawowego, albo reagować z cząsteczką flawiny w stanie podstawowym powodując jej utlenienie. W reakcji tej tworzy się rodnik semichinonowy (FIH $\cdot$) oraz utleniony rodnik (FI $\cdot$). Utleniony rodnik flawinowy reaguje z flawiną w stanie podstawowym dając rodnik semichinonowy oraz lumichrom [172].

Flawina może także stać się donorem wodoru (z pozycji 1'-H) dla flawiny w stanie trypletowym. W następnej reakcji pozostała po usunięciu wodoru cząsteczka reaguje z kolejną cząsteczką flawiny, tworząc lumichrom oraz produkty uboczne [172].

W przypadku izo-6,7-ryboflawiny i 5-deaza-ryboflawiny zauważono różnicę w wydajności procesu fotolizy w zależności od warunków prowadzenia reakcji (tlenowe lub beztlenowe). W nieobecności wygaszacza stanów trypletowych, jakim jest tlen, obserwuje

się kilkakrotny wzrost wydajności procesu. Ponadto zaobserwowano inny udział fotoproduktów wśród produktów fotolizy. Obecność długożyjących stanów trypletowych pozwala na przebieg reakcji z udziałem pośrednich etapów fotolizy, a więc wśród produktów powinny być widoczne takie, które posiadają w łańcuchu bocznym mniejszą ilość atomów węgla niż wyjściowa pochodna ryboflawiny [15,16]. Z analizy widm MS częściowo uzyskano dowody, które poparte analizą czasów retencji i widm absorpcji pozwalają zasugerować taki przebieg procesu. Dodatkowy dowód może stanowić również fakt, że w reakcji prowadzonej w roztworach odtlenionych obserwuje się oprócz odpowiednich pochodnych lumichromu (alloksazyny) również odpowiednie pochodne lumiflawiny (izoalloksazynowe), które w miejsce łańcucha bocznego posiadają podstawnik metylowy. Natomiast naświetlanie w obecności tlenu prowadzi bezpośrednio do fotoproduktów o strukturze alloksazynowej, czyli nie zawierającej podstawnika w pozycji N(10) w miejscu łańcucha rybitylowego. Uzyskany wynik pozostaje w zgodzie z danymi literaturowymi [17]. Naświetlanie flawin w obecności tlenu powoduje, że reakcje przebiegające poprzez stan trypletowy zostają wyeliminowane, wobec czego indywiduum reagującym pozostaje flawina wzbudzona do stanu singletowego, z której może tworzyć się bezpośrednio odpowiednia pochodna alloksazynowa. Wartość wydajności kwantowej uzyskana dla 5DRfl jest podobna jak dla samej ryboflawiny (odpowiednio $3,7 \times 10^{-3}$ i $3,0 \times 10^{-3} \text{ mol einst}^{-1}$).

Pochodna 3MeTARF okazała się bardziej stabilna fotochemicznie niż pozostałe badane związki. Przy zastosowaniu podobnych warunków naświetlania (uwzględniających natężenie promieniowania padającego i czas naświetlania), nie zaobserwowano żadnych istotnych zmian w widmie absorpcji związku w UV-VIS. Analiza HPLC również nie wykazała ubytku substratu ani też pojawienia się produktów ewentualnej fotolizy związku. Znaczne wydłużenie czasu ekspozycji wykazało niewielki ubytek (5% - 7%) 3MeTARF, w zakresie, oraz tworzenie małych ilości fotoproduktu, który zidentyfikowano jako 3-metylo-lumichrom. Precyzyjne określenie wydajności kwantowej zaniku fotochemicznego 3MeTARF jest trudne ze względu na błąd wyznaczenia procentu stopnia przereagowania substratu. Z pewnością można stwierdzić, że cząsteczki 3MeTARF wykazują znacznie większą (nawet o dwa rzędy wielkości) stabilność fotochemiczną niż inne badane w tej pracy pochodne ryboflawiny. Eksperymenty dotyczące fotolizy ryboflawiny w obecności buforu boranowego [18,19] pokazały, że kompleks pomiędzy jonami boranowymi a ryboflawiną angażuje pozycje C-2' i C-3' w łańcuchu rybitylowym, co uniemożliwia tworzenie FMF (formylo-metylo-flawiny). W przypadku 3MeTARF te grupy funkcyjne są

również zablokowane, więc wysoce prawdopodobne jest, że reakcja prowadząca do produktu pośredniego nie zachodzi. Ze wspomnianych wyżej badań Ahmada i współpr. [17] wiadomo, że lumichrom może powstawać bezpośrednio z flawiny wzbudzonej do stanu singletowego. Można więc przyjąć, że obserwowany jako fotoprodukt 3-metylo lumichrom powstaje bezpośrednio ze stanu singletowego, a krótki czas życia tego stanu singletowego i duża wydajność tworzenia stanu trypletowego powoduje, że proces degradacji zostaje znacznie spowolniony. Różnice w obrębie łańcucha rybitylowego, polegające na obecności grup acetylowych powodują więc istotną zmianę właściwości fotochemicznych związku. Właściwość ta pozwala na rozszerzenie zastosowań związku o dodatkową możliwość użycia go jako modelowego w badaniach z zastosowaniem promieniowania UV-Vis ryboflawiny i jej pochodnych.

W przypadku 3-benzylo-lumiflawiny zaobserwowano w widmie MS obecność masy $m/z = 271$. Można sugerować, że w wyniku naświetlania 3BLfl tworzy się 3-metylo-lumiflawina, (schemat 9, str.118).

Uzyskane wyniki pokazują, że fotoliza pochodnych ryboflawiny jest dość wydajnym procesem, choć wydajność ta jest niższa, niż wartości uzyskane dla ryboflawiny (z wyjątkiem 5DRfl). Wydajność kwantowa reakcji zależy od warunków naświetlania i jest wyższa dla roztworów odtlenionych. Wynik taki pozwala wnioskować, że (poza 3BLfl) w reakcji zaangażowany jest stan trypletowy badanych cząsteczek pochodnych ryboflawiny. Dla 3MeTARF wartość wydajności kwantowej reakcji jest co najmniej dwa rzędy wielkości niższa niż dla pozostałych pochodnych.

Informacje uzyskane poprzez badanie fotochemii ryboflawiny i jej pochodnych mogą być istotne w procesie planowania i optymalizacji otrzymywania odpowiednich produktów z udziałem reakcji fotochemicznej, a także w ocenie stabilności leków zarówno na etapie projektowania ich składu [21] oraz w trakcie procesu otrzymywania i przechowywania.

V. Część eksperymentalna

1. Część ogólna

1.1 Odczynniki

Rozpuszczalniki stosowane w eksperymentach charakteryzowały się czystością analityczną przewidzianą dla pomiarów HPLC i pochodziły z firm Aldrich i Merck. Czystość spektralną rozpuszczalników sprawdzano spektrofotometrycznie wykonując widma absorpcji i porównując je z widmami zamieszczonymi w katalogu firmy Merck oraz dodatkowo wykonując widmo fluorescencji korzystając z bardzo czułego spektrofluorymetru. Rozpuszczalniki osuszano stosując odpowiednie sita molekularne.

1.2 Badane izoalloksazyny

Związki użyte do badań : 3-benzyl-lumiflawinę, 3-metylo-tetraacetylo-ryboflawinę, 5-deazaryboflawinę, izo-6,7-ryboflawinę otrzymano jako dar od Pani profesor Anny Koziołowej. Ich syntezę wykonano w Katedrze Analizy Instrumentalnej Wydziału Towaroznawstwa Akademii Ekonomicznej w Poznaniu [66] i prace tam cytowane. Związki dodatkowo oczyszczane były poprzez krystalizację z metanolu. Struktura związków określona została metodami spektroskopowymi: spektroskopii w podczerwieni, spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego, spektrometrii masowej. Ponadto wykonano chromatografię cienkowarstwową w celu potwierdzenia czystości związków. Wykorzystane w badaniach lumiflawina i ryboflawina pochodziły z firmy Fluka i Aldrich.

1.3 Techniki eksperymentalne

Pomiary absorpcji i emisji.

Widma absorpcji UV-Vis wykonano na spektrofotometrze Varian Cary 5E, pomiary wykonywano w kuwetach kwarcowych o grubości $l=1$ cm. Molowe współczynniki absorpcji dla roztworów poszczególnych związków obliczono z prawa Lamberta – Beera. Stacjonarne widma fluorescencji wykonano na spektrofluorymetrze firmy Jobin Yvon-Spex Fluorolog 3-11. Do pomiarów stosowano kuwety kwarcowe ($l=1$ cm). Eksperymenty wykonywano w temperaturze pokojowej. Do pomiarów widm absorpcji i emisji stosowano roztwory badanych związków o stężeniach rzędu 10^{-5} mol dm⁻³. Widma emisji wykonano jako skorygowane.

Wydajność kwantową fluorescencji oznaczono metodą względną, stosując roztwór siarczanu chininy w 0.1n H₂SO₄ jako standard ($\phi=0.52$). Absorbancja roztworów badanych związków jak i standardu wynosiła około 0.05 przy długości fali wzbudzenia. Do wyznaczenia wydajności kwantowej stosowano wzór:

$$\phi_z = \frac{S_z}{S_{wz}} \times \frac{A_{wz}}{A_z} \times \frac{n_z^2}{n_{wz}^2} \times \phi_{wz} \quad 1.1$$

ϕ_z – wydajność kwantowa związku

ϕ_{wz} – wydajność kwantowa wzorca

S_z – pole powierzchni pod skorygowanym pasmem emisji związku

S_{wz} – pole powierzchni pod skorygowanym widmem emisji wzorca

A_z – wartość absorbancji roztworu związku przy długości fali wzbudzenia

A_{wz} – wartość absorbancji roztworu wzorca przy długości fali wzbudzenia

n_z, n_{wz} – współczynniki załamania światła właściwe odpowiednio dla roztworu związku i roztworu wzorca

Dokładność oznaczenia wydajności kwantowych wynosiła 10%.

Czasy życia fluorescencji zmierzono przy długości fali wzbudzenia $\lambda = 450$ nm, metodą czasowo-skorelowanego zliczania pojedynczych fotonów na fluorymetrze IBH model 5000U, ze źródłem wzbudzenia w postaci nanosekundowej lampy błyskowej oraz na pikosekundowym spektrometrze emisyjnym z laserowym źródłem wzbudzenia, które stanowi pico/femtosekundowy laser tytanowo-szafirowy [173]. Detekcję stanowi układ liczenia pojedynczych fotonów. Pomiary wykonano w Centrum Badawczym Ultraszybkiej Spektroskopii Laserowej UAM w Poznaniu z udziałem Panów doktora Jerzego Karolczaka i doktora Krzysztofa Dobka.

Eksperymenty wykonywano w temperaturze pokojowej.

Stałe szybkości dezaktywacji stanów wzbudzonych radiacyjne i nieradiacyjne obliczono z zależności:

$$\text{dla stałych radiacyjnych} \quad k_r = \frac{\varphi}{\tau} \quad 1.2$$

$$\text{dla stałych nieradiacyjnych} \quad k_{nr} = \frac{(1 - \varphi)}{\tau} \quad 1.3$$

k_r – radiacyjna stała szybkości dezaktywacji stanu wzbudzonego

k_{nr} – nieradiacyjna stała szybkości dezaktywacji stanu wzbudzonego

φ – wydajność kwantowa fluorescencji związku

τ – czas życia stanu wzbudzonego

Pomiary absorpcji przejściowej

Widma absorpcji przejściowej wykonano na układzie do nanosekundowej laserowej fotolizy błyskowej, w geometrii prostokątnej (Barcelona). Jako źródło wzbudzenia zastosowano promieniowanie z lasera Nd:YAG Q-switched (Spectron laser system, UK; szerokość pulsu ok. 9 ns) (LKS60 Applied Photophysics) z zastosowaniem trzeciej harmonicznej (355 nm). Źródło promieniowania analizującego stanowiła lampa ksenonowa 300W (LOT Oriel Ltd.) z monochromatorem oraz fotopowielaczem R928 (Hamamatsu). Pomiary zostały wykonane z pomocą Panów prof. J.L. Bourdelande i dr J. R. Herance.

Roztwory badane odtleniano stosując metodę wielokrotnego zamrażania i rozmrażania.

Niektóre próbki były przepłukiwane azotem. (izo-6,7-ryboflawina).

Pomiary absorpcji i emisji dla próbek w stanie stałym

Widma dyfuzyjno-odbiciowe próbek w stanie podstawowym rejestrowano z zastosowaniem funkcji remisji Kubelka-Munka

Pomiary laserowo indukowanej emisji fluorescencji sproszkowanych krystalicznych próbek wykonane zostały w temperaturze pokojowej, w układzie *front-surface*. W stosowanym układzie jako źródła wzbudzenia użyto lasera azotowego Proton Technology Instruments, Model 2000, ok. 600 ps FWHM, 1,3 mJ / puls). Próbki wzbudzano impulsem

laserowym o długości fali 337.1 nm. Promieniowanie powstające pod wpływem naświetlania próbek zbierane jest przez sondę wiązki kolimatora (kolimującej) sprzężoną ze światłowodem. Detekcja odbywa się przez detektor ICCD (Oriel model Instaspec V) sprzężony ze spektrografem (Oriel model FICS 77441). Układ służy zarówno do detekcji całkowitego światła emitowanego przez próbkę, jak i do pomiarów czasowo-zależnych z zastosowaniem urządzenia opóźniającego (Stanford Research Systems, model D6535). Wzmacniacz ICCD dużej szybkości (2,2 ns) pracuje w zakresie długości fali 200-900 nm. Pomiary czasowo-zależne widm absorpcji i emisji dostępne są w zakresie czasowym od nanosekund do sekund. Pomiary wykonano dzięki uprzejmości Pana prof. Luisa F. Vieira Fereira, z udziałem Pani dr Isabel F. Machado.

Detekcja tlenu singletowego

Pomiary związane z oznaczeniem tlenu singletowego wykonano z zastosowaniem wzbudzenia laserowego trzecią harmoniczną (355 nm) przy użyciu błysku lasera Nd:YAG (firmy Lumonics hyper YAG HY200), energia impulsu wynosiła 4 mJ na puls, 8 ns FWHM). Energia wzbudzenia została skorygowana z użyciem roztworu azotynu sodu w wodzie, w celu zapewnienia (spełnienia warunku), że intensywność emisji jest liniową funkcją intensywności lasera. Jako detektor zastosowano detektor fotodiodowy EO – 980P z diodą germanową chłodzoną ciekłym azotem (firmy North – Cast Scientific), z filtrem interferencyjnym 1270 nm (Melles Griot) umieszczonym pomiędzy próbką a detektorem w celu zredukowania promieniowania rozproszonego i promieniowania pochodzącego od sensybilizatora oraz wyodrębnienie fosforescencji pochodzącej od tlenu singletowego. Dane zbierano przy pomocy oscyloskopu z szybkością 250 MS s⁻¹ (Tektronix 2432A), a następnie analizowano przy pomocy programu Microcal Origin. Wydajność kwantową wyznaczano metodą względną. Jako standard zastosowano perinaftenon (Aldrich), charakteryzujący się wydajnością kwantową tlenu singletowego $\phi_{\Delta}=0.95 \pm 0.05$ [106].

Emisja tlenu singletowego mierzona była poprzez śledzenie pasma 1270 nm, które odpowiada przejściu oscylacyjnemu 0-0 fosforescencji tego indywiduum. Intensywność fosforescencji tlenu singletowego dla czasu $t = 0$ otrzymano poprzez dopasowanie krzywej zaniku fosforescencji do funkcji monoeksponencjalnej. Roztwory badane i roztwór odnośnika sporządzono tak, aby ich absorbancja przy długości fali wzbudzenia wynosiła $A = 0.2 \text{ (0.6)} \pm 0.003$ w kuwecie $l = 1 \text{ cm}$. [106]. Pomiary wykonano korzystając z uprzejmości Pana prof. Jose Luisa Bourdelande (Barcelona)

Szczegółowy opis wyznaczania wydajności kwantowej fotosensybilizowanego tworzenia tlenu singletowego (Φ_{Δ}) znajduje się w pracy Wilkinson i in. [116]. Tlen singletowy może być tworzony poprzez przeniesienie energii tak ze stanów singletowych jak i trypletowych (Równanie 1.4). Ze względu na właściwości energetyczne flawin i cząsteczki tlenu praktyczne znaczenie w procesie sensybilizacji tworzenia tlenu singletowego odgrywają tylko stany trypletowe (Równanie 1.5).

Wzór na wydajność tworzenia tlenu singletowego

$$\Phi_{\Delta} = P_S f_S + \Phi_{ISC} P_T f_T \quad 1.4$$

$$\Phi_{\Delta} = \Phi_{ISC} \left(\frac{k_q [O_2]}{k_r + k_{nr} + k_q [O_2]} \right) \left(\frac{k_{en}}{k_q} \right) \quad 1.5$$

Φ_{Δ} - wydajność kwantowa tworzenia tlenu singletowego

P_T - frakcja stanów trypletowych wygaszanych przez tlen

f_T - frakcja stanu trypletowego wygaszanego przez cząsteczki tlenu, dająca tlen singletowy

P_S - frakcja stanów singletowych

f_S - frakcja stanów singletowych

Φ_{ISC} - wydajność kwantowa tworzenia stanu trypletowego

$[O_2]$ - stężenie tlenu

k_r - radiacyjna stała zaniku stanów wzbudzonych

k_{nr} - suma stałych nieradiacyjnych zaniku stanów wzbudzonych

k_q - stała wygaszania

k_{en} - stała przeniesienia energii

Przeliczanie widm absorpcji przejściowej na widma absorpcji tryplet-tryplet.

Eksperymentalne widmo absorpcji T-T obliczono przez skorygowanie widma absorpcji przejściowej dla stanu podstawowego, z użyciem wyznaczonego współczynnika absorpcji w stanie trypletowym przy długości fali absorpcji (określonego stosunku do molowego współczynnika absorpcji wyznaczonego dla benzofenonu), oraz widma absorpcji w stanie stacjonarnym w odpowiednim rozpuszczalniku. W obliczeniach zakładano, że po dezaktywacji pierwszego singletowego stanu wzbudzonego istnieją tylko dwa indywidua

absorbujące, a mianowicie indywiduum w stanie podstawowym i indywiduum w pierwszym wzbudzonym stanie trypletowym. Dokładność oznaczenia molowego współczynnika absorpcji w stanie trypletowym, mierzonego poprzez przeniesienie energii T-T z benzofenonu wynosi ok. $\pm 10\%$ [174].

Obliczenia TD-DFT

Dane dotyczące struktury elektronowej i geometrii cząsteczki 3BLf uzyskano wykonując obliczenia kwantowo-mechaniczne z zastosowaniem metody DFT (*ang. Density Functional Theory*) [175]. Obliczenia wykonano z użyciem funkcjonału B3LYP wraz z dwoma bazami atomowymi typu *split-valence* – mniejszej jakości podwójne zeta 6-31G(d) oraz większej jakości potrójne zeta 6-311G(d,p) [176] oraz modelu polaryzowalnego continuum (PCM) w B3LYP/6-31G(d) w celu uwzględnienia wpływu rozpuszczalnika [177]. Energie wzbudzenia i siła oscylatora w reprezentacji długości dipola zostały obliczone dla zoptymalizowanej geometrii w stanie podstawowym z użyciem czasowo-zależnej (TD, *ang. Time Dependent*) metody jak wprowadzono w programie Gaussian 03 dla programu *ab initio* [178]. Przejścia elektronowe singlet – singlet o najniższej energii $S_0 \rightarrow S_1$, zostały obliczone dla geometrii stanu podstawowego. Energie wzbudzenia obliczone na poziomie teorii TD – DFT B3LYP/ 6-31G(d) zostały oszacowane w zakresie z dokładnością $2000 - 3000 \text{ cm}^{-1}$, i zwykle wykazują przesunięcie pasm absorpcji w kierunku fal dłuższych w stosunku do wyników otrzymanych z eksperymentu. Energie wzbudzenia $T_1 \rightarrow T_i$ oraz intensywności przejść zostały określone dla zoptymalizowanej geometrii najniższego stanu trypletowego (T_1). Zastosowano nieograniczoną metodę UB3LYP w obliczeniach widm $T_1 \rightarrow T_i$.

Obliczenia wykonano w Centrum Superkomputerowo-Sieciowym w Poznaniu (PCSS).

Naświetlanie izoalloksazyn

Naświetlanie:

Naświetlania analityczne prowadzono w kuwecie kwarcowej o długości drogi optycznej $l = 1 \text{ cm}$ i pojemności ok. 3 ml. Jako źródło światła stosowano wysokociśnieniową lampę rtęciową HBO-200 (firmy Narva) wraz z układem filtrów pozwalających na uzyskanie promieniowania monochromatycznego o długości fali $\lambda = 366 \text{ nm}$ (filtr interferencyjny 366 nm (firmy Carl Zeiss Jena) oraz filtr odcinający) oraz układem odtleniającym. Próbkę

odtleniano stosując hel odpowiednio przepuszczany przez kolumnę wypełnioną miedzią osadzoną na szerokoporowym silikażelu.

Roztwór izoalloksazyny w metanolu ($c_0 \sim 2 \times 10^{-5}$ mol/dm³, obj. próbki 2,6 ml) naświetlano na ławie optycznej wysokociśnieniową lampą rtęciową promieniowaniem $\lambda = 366$ nm (filtr interferencyjny 366 nm + filtr odcinający):

- do niskich procentów konwersji (ok. 20%), w celu oznaczenia wydajności kwantowej reakcji fotochemicznej
- do wyższych procentów konwersji, w celu wydzielenia i scharakteryzowania produktów fotolizy

Roztwory badanych związków przygotowywano bezpośrednio przed rozpoczęciem eksperymentu.

Analiza przebiegu reakcji fotochemicznej:

- przebieg naświetlania rejestrowano spektrofotometrycznie
- procent przemiany określano za pomocą chromatografii HPLC, stosując detektor absorpcyjny i fluorescencyjny
- produkty wydzielone metodą chromatografii HPLC poddano analizie metodą spektrometrii masowej (electro-spray), uzyskując masy poszczególnych produktów
- za pomocą analizy chromatograficznej HPLC z użyciem detektora absorpcyjnego (diode array) oraz detektora fluorescencyjnego określono właściwości spektralne (widmo absorpcji, chromatogram fluorescencyjny) substratu i produktów; ponadto w tych samych warunkach przeprowadzono analizę związku sugerowanego jako produkt finalny, uzyskując potwierdzenia widma absorpcji i czasu retencji produktu

Analizę chromatograficzną wykonano metodą Wysokosprawnej Chromatografii Cieczowej (HPLC) na chromatografie cieczowym firmy Waters wyposażonym w fotodiodowy detektor absorpcyjny UV-VIS (Waters) i detektor fluorescencyjny (Waters 470 scanning fluorescence detector). Do rozdzielania użyto kolumny *Atlantis C18*, 3.5 μ m (Waters), stosując elucję gradientową i izokratyczną z przepływem 0,5 ml/min. Jako fazę ruchomą stosowano układ rozpuszczalników metanol – woda, w gradiencie: izokratycznie 30:70 (v:v) przez 1 min., 70:30 (v:v) w ciągu 10 min.

Test fotostabilności wykonano stosując aktynometr chemiczny w postaci soli Reinecke [179] *trans*-tetra tiocyjanodiaminochromian (III) potasu (I) otrzymany z soli amoniowej.

Roztwór soli Reinecke naświetlano w kuwecie długości drogi optycznej 1cm do uzyskania ok. 25% ubytku substratu (ok. 65 s naświetlania) z zachowaniem tych samych warunków jak przy naświetlaniu próbek ($\lambda_{\text{ex}}=366 \text{ nm}$, $c = 10^{-5} \text{ mol/dm}^{-3}$). Wyznaczona liczba kwantów absorbowanych przez roztwór aktynometru (I_{SR}), obliczona z wzoru **1.6**, została przyjęta jako liczba kwantów padających na roztwór próbki poddany naświetlaniu w określonym przedziale czasu (I_0).

$$I_0 = \frac{K \times \Delta c \times v}{\Phi \times t} \quad \left[\frac{\text{einst.}}{\text{s}} \right] \quad \mathbf{1.6}$$

I_0 – natężenie promieniowania emitowanego przez źródło światła (dla $\lambda = 366 \text{ nm}$)

K – współczynnik uwzględniający rozcieńczenie soli Reinecke w roztworze (do pomiaru absorbancji przed i po naświetlaniu)

Δc – różnica stężeń soli Reinecke przed i po naświetlaniu wyznaczona spektrofotometrycznie (z prawa Lamberta - Beera) [$\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$]

v – objętość naświetlanego aktynometru (2,6ml) [dm^3]

Φ – wydajność kwantowa reakcji fotohydratacji soli Reinecke ($\lambda_{\text{wzb}} = 366 \text{ nm}$, $\Phi=0,36$) [$\text{mol} \cdot \text{einst}^{-1}$]

t – czas naświetlania [s]

$$K = \frac{V_{\text{SR}} + V_{\text{ZK}}}{V_{\text{SR}}} = \frac{0,2 + 2,0}{0,2} = 11 \quad \mathbf{1.7}$$

K – współczynnik uwzględniający rozcieńczenie soli Reinecke w roztworze (do pomiaru absorbancji przed i po naświetlaniu)

V_{SR} – objętość soli Reinecke użyta do sporządzenia roztworu w celu wyznaczenia absorbancji aktynometru przed i po naświetlaniu [ml]

V_{ZK} – objętość związku kompleksującego użyta do sporządzenia roztworu w celu zmierzenia absorbancji aktynometru przed i po naświetlaniu [ml]

Wyznaczanie wydajności kwantowej reakcji fotolizy izoalloksazyn

Wartości wydajności kwantowych reakcji fotolizy poszczególnych pochodnych oznaczano korzystając z wzoru 1.8. Procentowy ubytek substratu wyznaczano chromatograficznie metodą HPLC, a następnie obliczono ubytek stężenia naświetlanego substratu (Δc).

$$\varphi = \frac{\Delta c \times v}{I_0 \times t} \quad \left[\frac{\text{mol}}{\text{einst.}} \right] \quad 1.8$$

φ – wydajność kwantowa

Δc – różnica stężeń izoalloksazyny przed i po naświetlaniu z prawa Lamberta - Beera [$\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$], ubytek substratu wyznaczony chromatograficznie

v – objętość naświetlanego roztworu (2,6 ml) [dm^3]

I_0 – natężenie promieniowania emitowanego dla $\lambda = 366 \text{ nm}$ [$\text{einst} \cdot \text{s}^{-1}$]

t – czas naświetlania [s]

$$I_{abs.} = I_0 (1 - 10^{-A}) \quad 1.9$$

I_0 – natężenie promieniowania padającego na próbkę

$I_{abs.}$ – natężenie promieniowania absorbowanego przez próbkę

A – absorbancja roztworu izoalloksazyny dla długości fali, którą ją naświetlano

Spektrometria mas

Widma mas wykonano techniką jonizacji elektrospray na spektrometrze masowym firmy Waters / Micromass (Manchester, UK) ZQ2000 (single quadrupole type instrument, Z-spray, MassLynx V3.5 software). Widma rejestrowano w zakresie mass 100-1000.

2. Część szczegółowa

5-Deaza-ryboflawina

1. Roztwór 5-deaza-ryboflawiny w metanolu, o stężeniu $c_0 = 2.5 \times 10^{-5}$ mol/dm³, odtleniano przez 15 min. helem przepuszczanym przez układ osuszający. Następnie roztwór poddano naświetlaniu promieniowaniem o długości fali $\lambda = 366$ nm. Przebieg naświetlania śledzono spektrofotometrycznie wykonując widma absorpcji w UV-VIS oraz chromatograficznie, wykonując analizę HPLC. Roztwór naświetlano do niskich procentów ubytku substratu (w celu uzyskania danych niezbędnych do wyznaczenia wydajności kwantowej). Charakterystykę głównych fotoproduktów przeprowadzano z analizy roztworu naświetlanego do wyższych procentów konwersji. W wyniku fotolizy związku powstaje kilka produktów. Dwa główne fotoprodukty zidentyfikowano jako 5-deaza lumichrom i 5-deaza lumiflawinę. Dla fotoproduktu 3 zaproponowano strukturę III lub IV. Ostatni z fotoproduktów nie identyfikowany.

substrat 5-deaza-ryboflawina: czas retencji 10,7 min., MS ($m=375$, $M/z = 374$, $M/z = 376$, $M/z = 398$), UV ($\lambda_1 = 401$ nm, $\lambda_2 = 338$ nm),

produkt 1: czas retencji 18,5 min., MS ($m=241$, $M/z = 240$, $M/z = 242$, $M/z = 264$), UV ($\lambda_1 = 360$ nm, $\lambda_2 = 320$ nm), 5-deaza lumichrom,

produkt 2: czas retencji 15,2 min., MS ($m=255$, $M/z = 256$, $M/z = 278$), UV ($\lambda_1 = 401$ nm, $\lambda_2 = 333$ nm), 5-deaza lumiflawina,

produkt 3: czas retencji: 12,0 min., MS ($m=373$, $M/z = 372$, $M/z = 374$, $M/z = 396$), UV($\lambda_1 = 407$ nm, $\lambda_2 = 339$ nm), struktura III,

produkt 4: czas retencji: 16,6 min.,UV($\lambda_1 = 400$, $\lambda_2 = 339$), produkt niezidentyfikowany.

2. Roztwór 5-deaza-ryboflawiny w metanolu, o stężeniu $c_0 = 2.6 \times 10^{-5}$ mol/dm³, z pominięciem etapu odtleniania, poddano naświetlaniu promieniowaniem o długości fali $\lambda = 365$ nm. W wyniku fotolizy związku powstaje jeden fotoprodukt, który zidentyfikowano jako 5-deaza lumichrom.

Substrat: 5-deaza-ryboflawina: czas retencji 10,7 min., MS ($m=375$, $M/z = 374$, $M/z = 376$, $M/z = 398$), UV ($\lambda_1 = 401$ nm, $\lambda_2 = 338$ nm),

produkt 1: czas retencji 18,5 min., MS ($m=241$, $M/z = 240$, $M/z = 242$, $M/z = 264$), UV ($\lambda_1 = 360$ nm, $\lambda_2 = 320$ nm), 5-deaza lumichrom.

Izo-6,7-ryboflawina

1. Roztwór izo-6,7-ryboflawiny w metanolu, o stężeniu $c_0 = 2.5 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$, poddano przez 15 min. odtlenianiu helem, a następnie naświetlano promieniowaniem o długości fali $\lambda = 365 \text{ nm}$. Przebieg naświetlania śledzono spektrofotometrycznie wykonując widma absorpcji w UV-VIS oraz chromatograficznie, wykonując analizę HPLC. Roztwór naświetlano do niskich procentów ubytku substratu (w celu uzyskania danych niezbędnych do wyznaczenia wydajności kwantowej). Naświetlanie do wyższych procentów konwersji pozwoliło na scharakteryzowanie głównych fotoproduktów, które stanowią pochodna alloksazynowa (6,7 – dimetyloalloksazyna) i pochodna izoalloksazynowa (6,7,10 – trimetylo-izoalloksazyna). Ponadto obserwuje się powstawanie mniejszych ilości trzech innych fotoproduktów, dla których zaproponowano struktury V, VI, VII.

substrat 6,7 – izo-ryboflawina: czas retencji 7,1 min., MS ($m=376$, $M/z = 375$, $M/z = 377$, $M/z = 399$), UV ($\lambda_1 = 448 \text{ nm}$, $\lambda_2 = 386 \text{ nm}$),

produkt 1: czas retencji 16,6 min., MS ($m=242$, $M/z = 241$, $M/z = 243$, $M/z = 278$), UV ($\lambda_1 = 394 \text{ nm}$, $\lambda_2 = 342 \text{ nm}$), 6,7-dimetylo alloksazyna,

produkt 2: czas retencji 14,5 min., MS ($m=256$, $M/z = 255$, $M/z = 257$), UV ($\lambda_1 = 448 \text{ nm}$, $\lambda_2 = 384 \text{ nm}$), 6,7,10-trimetylo izoalloksazyna

produkt 3: czas retencji 13,2 min., MS ($m=284$, $M/z = 283$, $M/z = 285$, $M/z = 307$, $M/z = 317$, $M/z = 329$), UV ($\lambda_1 = 451 \text{ nm}$, $\lambda_2 = 382 \text{ nm}$), struktura IX,

produkt 4: czas retencji 12,3 min., MS ($m = 344$, $M/z = 345$, $M/z = 367$), UV ($\lambda_1 = 449 \text{ nm}$, $\lambda_2 = 368 \text{ nm}$), struktura VIII,

produkt 5: czas retencji 10,7 min., MS ($m = 374$, $M/z = 373$, $M/z = 375$, $M/z = 397$, $M/z = 413$, $M/z = 409$), UV ($\lambda_1 = 449 \text{ nm}$, $\lambda_2 = 381 \text{ nm}$), struktura VII.

2. Roztwór izo-6,7-ryboflawiny w metanolu, o stężeniu $c_0 = 2.5 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$, nieodtleniony, naświetlano promieniowaniem o długości fali $\lambda = 366 \text{ nm}$. W wyniku fotolizy związku powstaje jeden fotoprodukt, który zidentyfikowano jako 6,7 – dimetyloalloksazyna.

substrat 6,7 – izo-ryboflawina: czas retencji 7,1 min., MS ($m=376$, $M/z = 375$, $M/z = 377$, $M/z = 399$), UV ($\lambda_1 = 448 \text{ nm}$, $\lambda_2 = 386 \text{ nm}$),

produkt 1: czas retencji 16,6 min., MS ($m=242$, $M/z = 241$, $M/z = 243$, $M/z = 278$), UV ($\lambda_1 = 394 \text{ nm}$, $\lambda_2 = 342 \text{ nm}$),

3-Metylo-tetraacetylo-ryboflawina

Roztwór 3-metylo-tetraacetylo-ryboflawiny metanolu, o stężeniu $c_0 = 1,01 \times 10^{-4}$ mol/dm³, odtleniano przez 15 min. helem, a następnie naświetlano promieniowaniem o długości fali $\lambda = 366$ nm. Przebieg fotolizy kontrolowano spektrofotometrycznie wykonując widma absorpcji w UV-VIS oraz chromatograficznie, wykonując analizę HPLC. W wyniku wydłużenia czasu naświetlania obserwuje się (metodą chromatografii HPLC) tworzenie niewielkich ilości produktu, który zidentyfikowano jako 3-metylo lumichrom.

substrat 3-metylo-tetraacetylo-ryboflawina: czas retencji 18,7 min., MS ($m = 558$, $M/z = 557$, $M/z = 559$, $M/z = 581$), UV ($\lambda_1 = 447$ nm, $\lambda_2 = 360$ nm),

produkt 1: czas retencji 17,5 min., MS ($m = 256$, $M/z = 255$, $M/z = 257$, $M/z = 279$), UV ($\lambda_1 = 387$ nm, $\lambda_2 = 348$ nm).

3-Benzylo lumiflawina

1. Roztwór 3-benzylo-lumiflawiny w metanolu, o stężeniu $c_0 = 2,75 \times 10^{-5}$ mol/dm³, odtleniano 15 min. helem, a następnie naświetlano promieniowaniem o długości fali $\lambda = 366$ nm. Związek ulega fotolizie z wytworzeniem kilku produktów. Przebieg naświetlania śledzono spektrofotometrycznie wykonując widma absorpcji w UV-VIS oraz chromatograficznie, wykonując analizę HPLC. Roztwór naświetlano do niskich procentów ubytku substratu (w celu uzyskania danych niezbędnych do wyznaczenia wydajności kwantowej). Naświetlanie do wyższych procentów konwersji pozwoliło ustalić, że głównym fotoproduktem reakcji fotochemicznej jest odpowiednia pochodna izoalloksazynowa, 3-metylo lumiflawina. Wydłużenie czasu naświetlania powoduje powstawanie innego fotoproduktu, którego struktury nie określano w ramach prowadzonego eksperymentu.

Substrat: 3-benzylo lumiflawina: czas retencji 20,3min., MS ($m=346$, $M/z = 345$, $M/z = 347$, $M/z = 369$), UV ($\lambda_1 = 446$ nm, $\lambda_2 = 359$ nm),

produkt 1: czas retencji 17,2 min., MS ($m = 270$, $M/z = 271$), UV ($\lambda_1 = 445$ nm, $\lambda_2 = 369$ nm) 3-metylo-lumiflawina,

produkt 2: czas retencji 18,6 min., UV ($\lambda_1 = 407$ nm, $\lambda_2 = 295$ nm) produkt niezidentyfikowany.

2. Roztwór 3-benzylo-lumiflawiny w metanolu, o stężeniu $c_0 = 2,75 \times 10^{-5}$ mol/dm³, nieodtleniony, naświetlano promieniowaniem o długości fali $\lambda = 366$ nm. W wyniku

fotolizy związku powstaje jeden fotoprodukt, który zidentyfikowano jako 6,7 – dimetyloalloksazyna.

Substrat: 3-benzylo lumiflawina: czas retencji 20,3min., MS ($m = 346$, $M/z = 345$, $M/z = 347$, $M/z = 369$), UV ($\lambda_1 = 446$ nm, $\lambda_2 = 359$ nm),

produkt 1: czas retencji 17,2 min., MS ($m=270$, $M/z=271$), UV ($\lambda_1 = 445$ nm, $\lambda_2 = 369$ nm).

Aktynometr

Jako aktynometr zastosowano sól Reinecke ($K[Cr(NH_3)_2(SCN)_4]$). Syntezę soli Reinecke przeprowadzono z odpowiedniej soli amonowej, a także syntezę związku kompleksującego ($Fe(NO_3)_3 \times 9 H_2O$) przeprowadzono według procedury opisanej w pracy [179].

Sól potasowa Reinecke: 25g soli amonowej SR rozpuszczono w 500 ml wody w temperaturze 40-50°C, a następnie przesączono przez lejek ze spiekane szkła do roztworu azotanu potasu KNO_3 (50g) podgrzanego do temp. 40°C. Roztwór mieszano w celu rozpuszczenia KNO_3 . W celu szybkiego ochłodzenia powstały roztwór umieszczono w mieszaninie chłodzącej (suchy lód + izopropanol), a następnie przesączono pod próżnią. Osad powstałej soli Reinecke w postaci soli potasowej (*trans* tetratiocyjanodiaminochromian III potasu, $K[Cr(NH_3)_2(SCN)_4]$) krystalizowano z wodnego roztworu KNO_3 , a następnie suszono w eksykatorze nad środkiem suszącym (P_2O_5) bez dostępu światła.

Związek kompleksujący: odważono 5,615g $Fe(NO_3)_3 \times 9 H_2O$, który rozpuszczono w niewielkiej ilości wody. Następnie roztwór przeniesiono do kolby o poj. 500 ml zawierającej 24 ml 60% $HClO_4$ i dopełniono wodą do 500 ml. Otrzymany związek kompleksujący jest wodnym roztworem $Fe(NO_3)_3$ o stężeniu 0,02 mol/dm³ i $HClO_4$ o stężeniu 0,35 mol/dm³. Roztwór przechowywano bez dostępu światła.

Przygotowanie aktynometru i wykonanie pomiarów:

Odważono 0.089g soli Reinecke ($K[Cr(NH_3)_2(SCN)_4]$) i rozpuszczono w 5 ml 0,1 mol/dm³ kwasu siarkowego (bez dostępu światła). Roztwór przesączono. Część roztworu (2,6 ml) umieszczono w kuwecie do naświetlań i poddano naświetlaniu promieniowaniem o długości fali $\lambda = 366$ nm przez 65 s. Zmiany zachodzące pod wpływem naświetlania

śledzono spektrofotometrycznie. W tym celu zmierzono absorbancję soli Reinecke przed i po naświetlaniu przy długości fali $\lambda = 453 \text{ nm}$ (0,2 ml soli Reinecke przed i po naświetlaniu dodawano każdorazowo do 2 ml związku kompleksującego, w kuwecie odniesienia znajdował się roztwór $0,1 \text{ mol/dm}^3$ kwasu siarkowego). Pomiary absorbancji aktynometru przed i po naświetlaniu powtórzono 4-krotnie. Z otrzymanych danych dotyczących ubytku soli Reinecke (Δc) wyznaczono natężenie promieniowania emitowanego przez lampę (I_0).

Dane dla aktynometru:

$$\varepsilon^{453} = 3200 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

$$\varphi = 0,36 \text{ (dla } \lambda_{\text{wzb.}} = 365 \text{ nm)}.$$

VI. Podsumowanie

W ramach przedstawionej pracy zbadano ryboflawinę i cztery jej pochodne, 5-deaza-ryboflawinę, izo-6,7-ryboflawinę, 3-metylo-tetraacetylo-ryboflawinę oraz 3-benzylolumiflawinę. Celem niniejszej pracy było wyznaczenie właściwości spektralnych, fotofizycznych i fotochemicznych ryboflawiny i jej pochodnych oraz sprawdzenie ich jako potencjalnych fotosensybilizatorów tlenu singletowego.

Związki zbadano pod względem właściwości absorpcyjno – emisyjnych w roztworze metanolem, wyznaczono parametry fotofizyczne wymienionych związków, t.j. wydajność kwantową fluorescencji, czas życia fluorescencji, wyznaczono stałe szybkości procesów radiacyjnych i nieradiacyjnych dezaktywujących stan wzbudzony oraz zbadano fotochemię badanych pochodnych izoalloksazynowych w metanolu.

Stwierdzono, że badane pochodne wykazują absorpcję przy długości fali charakterystycznej dla flawin (około 360 nm ($27,8 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$) i 450 nm ($22,2 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$)). Badania spektroskopowe pozwoliły lepiej zrozumieć wpływ podstawników (alkilowych i arylowych) oraz miejsca ich podstawienia (ryboflawina i izo-6,7-ryboflawina) na właściwości spektralne i fotofizyczne cząsteczek. Porównanie widm absorpcji dla pochodnych lumiflawiny zawierających podstawnik w pozycji N(3) (3MeLfl, 3EtLfl, 3BLfl) i samej lumiflawiny wykazało, że ani sama obecność podstawnika w cząsteczce, ani jego wielkość i rodzaj nie wpływają znacząco na właściwości absorpcyjne i emisyjne badanych związków. Dokładna znajomość fotofizyki pochodnych ryboflawiny z podstawnikiem w pozycji N(3) umożliwia stosowanie tego typu związków w układach modelowych, ponieważ podstawnik w tej pozycji w cząsteczce izoalloksazyny ogranicza możliwości tworzenia wiązań wodorowych. Parametry absorpcyjne 3MeTARF w metanolu w porównaniu z odpowiednimi parametrami dla ryboflawiny również pozostają niemal niezmienione. Obecność grup acetylowych w cząsteczce 3MeTARF podstawionych w miejsce grup hydroksylowych w łańcuchu rybitylowym zwiększa jej polarność w stosunku do ryboflawiny, a ponadto powoduje większą fotostabilność związku. Dzięki temu może być on dobrym obiektem w badaniach modelowych prowadzonych dla ryboflawiny.

W cząsteczce 5-deaza-ryboflawiny obecność atomu węgla w miejscu atomu azotu w pozycji 5 układu izoalloksazynowego powoduje znaczne zmiany parametrów absorpcyjnych i emisyjnych. Maksima długofalowych pasm absorpcji, podobnie jak

maksimum pasma fluorescencji jest znacznie przesunięte w kierunku fal krótszych w stosunku do odpowiednich maksimów dla ryboflawiny. Ponieważ atom azotu N(5) w cząsteczkach izoalloksazyn jest miejscem o znacznej reaktywności, ta zmiana strukturalna powoduje, że związek ten może być również atrakcyjnym substytutem ryboflawiny w badaniach prowadzonych na układach modelowych.

Stosunkowo nieznaczna zmiana strukturalna w przypadku cząsteczki izo-6,7-ryboflawiny w stosunku do ryboflawiny, polegająca na innym ułożeniu podstawników metylowych w pierścieniu benzenowym, powoduje wyraźną zmianę położenia maksimum pasma absorpcji w stosunku do położenia odpowiedniego pasma dla ryboflawiny (około 20 nm w kierunku fal krótszych). Maksimum pasma emisji jest również wyraźnie przesunięte w kierunku fal dłuższych w stosunku do ryboflawiny.

Czasy życia fluorescencji mieszczą się w zakresie nanosekundowym.

Widma absorpcji przejściowej dla 5DRfl i 3MeTARF oraz widma absorpcji tryplet-tryplet dla IR i 3BLfl zarejestrowane w metanolu wykazały obecność pasm absorpcji charakterystycznych dla flawin. Widmo absorpcji przejściowej dla 3MeTARF jest szczególnie trudne do interpretacji. Charakteryzuje się obecnością trzech intensywnych pasm absorpcji w zakresie długofalowym. Ponieważ obliczenia dla tak dużej cząsteczki dotyczące przejść pomiędzy stanami trypletowymi stanowią znaczny problem, wyznaczono wartości energii tylko dla pierwszych 10 przejść pomiędzy stanami trypletowymi.

Zestawienie rezultatów obliczeń teoretycznych z wynikami pomiarów eksperymentalnych wykazuje pewne rozbieżności. Obliczone wartości energii są przesunięte w kierunku fal krótszych w stosunku do wyników eksperymentalnych. Dla stanów singletowych rozbieżność pomiędzy danymi eksperymentalnymi i uzyskanymi z obliczeń teoretycznych zawiera się w zakresie około $1500\text{--}2500\text{ cm}^{-1}$. Uzyskana zgodność wyników eksperymentalnych i teoretycznych dla stanów singletowych jest zadowalająca. Natomiast obliczenia dla stanów trypletowych wykazują większe rozbieżności w porównaniu z wynikami eksperymentu. Z jednej strony wiąże się to z trudnościami eksperymentalnymi związanymi z wykonaniem widm absorpcji przejściowej, z drugiej strony z ograniczeniami wynikającymi z teorii obliczeń. Trudny do interpretacji jest także wpływ rozpuszczalnika. Pomimo obserwowanych różnic można jednak stwierdzić, że w miarę dostępności i możliwości metod zarówno eksperymentalnych jak i metod obliczeniowych osiągnięte dla stanów singletowych rezultaty wykazują dobrą zgodność i dobrze charakteryzują energie i konfiguracje stanów wzbudzonych.

Na bazie obliczeń teoretycznych określono charakter przejść pomiędzy stanami singletowymi i trypletowymi, wykazując, że przejścia o najniższej energii mają głównie charakter π, π^* . Jednocześnie stwierdzono, że w pobliżu przejść π, π^* obecne są mniej intensywne przejścia o konfiguracji n, π^* , co jest właściwością charakterystyczną dla cząsteczek izoalloksazyn. W związku z tym niektóre właściwości tych związków można tłumaczyć na podstawie wzajemnego oddziaływania singletowych stanów wzbudzonych o konfiguracji π, π^* i n, π^* .

Fotoliza badanych pochodnych ryboflawiny w roztworze metanolowym jest procesem wydajnym fotochemicznie. Wyznaczone wydajności kwantowe zaniku poszczególnych pochodnych wynoszą $\phi \sim 10^{-3}$ - 10^{-4} mol einst⁻¹. Proces fotolizy badanych pochodnych prowadzony w warunkach beztlenowych jest niemal o rząd wielkości bardziej wydajny niż proces prowadzony w obecności tlenu (dla roztworów odtlenionych $\phi \sim 10^{-3}$ mol einst⁻¹). Uzyskany wynik pozwala wnioskować, że w procesie zaangażowany jest stan trypletowy cząsteczek badanych związków. Degradacja cząsteczki zachodzi w obrębie łańcucha rybitylowego. Głównymi produktami fotolizy są odpowiednie pochodne alloksazynowe i izoalloksazynowe, podobnie jak w przypadku ryboflawiny (lumichrom i lumiflawina). Wydajności kwantowe zaniku fotochemicznego badanych związków są niższe (z wyjątkiem 5DRfl) od wydajności kwantowej zaniku ryboflawiny. W przypadku 3BLfl warunki naświetlania (beztlenowe i w obecności tlenu) nie wpływają na wydajność kwantową reakcji fotolizy tej pochodnej ($\phi = 2,2 \times 10^{-4}$ mol einst⁻¹). W zależności od zastosowanych warunków zaobserwowano inną dystrybucję produktów naświetlania. W wyniku naświetlania 5DRfl i IR w obecności tlenu powstaje tylko pochodna alloksazynowa. Zastosowanie warunków beztlenowych determinuje powstawanie zarówno odpowiedniej pochodnej izoalloksazynowej jak i alloksazynowej. Cząsteczki 3MeTARF wykazują kilkakrotnie większą stabilność fotochemiczną niż ryboflawina. Właściwość ta pozwala na rozszerzenie zastosowań związku o dodatkową możliwość użycia go jako modelowego w badaniach ryboflawiny i jej pochodnych.

Dla próbek polikrystalicznych 5DRfl i 3BLfl dyfuzyjno-odbiciowe widma absorpcji wykazują przesunięcie w kierunku fal dłuższych w stosunku do odpowiednich widm w roztworze metanolowym. W przypadku wszystkich badanych pochodnych w próbkach polikrystalicznych, również maksima pasm emisji przesunięte są wyraźnie w kierunku fal dłuższych. Wydaje się, że istotny wpływ na zmiany w charakterystyce spektralnej i fotofizycznej mają oddziaływania międzycząsteczkowe w sieci krystalicznej. Dla 5DRfl zaobserwowano pasmo fluorescencji opóźnionej. W widmie emisji izo-6,7-ryboflawiny

obecne jest dodatkowe pasmo widoczne w krótkofalowej części widma. Przypisano je obecności 6,7 – dimetyloalloksazyny, która powstaje pod wpływem fotoindukowanej degradacji izo-6,7-ryboflawiny w polikryształach. W przypadku 3MeTARF zarejestrowano tylko podstawowe pasmo emisji związku, a brak dodatkowego pasma pochodzącego od odpowiedniej pochodnej alloksaynowej (tak jak to obserwuje się dla IR i ryboflawiny), stanowi dodatkowe potwierdzenie większej fotostabilności tej cząsteczki również w postaci polikrystalicznej.

Wykazano, że cząsteczki badanych związków w stanach singletowych ulegają przejściu międzysystemowemu, obsadzając wydajnie stany trypletowe. Zwrócono uwagę na możliwość oddziaływania badanych związków z tlenem z wytworzeniem tlenu singletowego w reakcji fotosensybilizacji. Wyznaczono parametry fotofizyczne badanych związków takie jak czas życia stanu trypletowego, wydajność tworzenia tlenu singletowego oraz czas życia tlenu singletowego w metanolu. Wyznaczony w metanolu czas życia tlenu singletowego ($10\mu\text{s}$) jest zgodny z danymi literaturowymi i stanowi dodatkowe potwierdzenie istnienia tego indywiduum w roztworach badanych związków. Czas życia stanu trypletowego dla badanych pochodnych wynosi kilkanaście μs , tylko dla 3BLfl wynosi $34,9\mu\text{s}$. Szczególne zainteresowanie budzi fakt, że związki te, sensybilizują reakcję tworzenia tlenu singletowego z dużą wydajnością kwantową. Wartość wydajności kwantowej (ϕ_{Δ}) tego procesu kształtuje się w zakresie (0.3 – 0.7) dla badanych pochodnych i jest porównywalna z odpowiednią wartością dla ryboflawiny (0.51).

Uzyskane dane pozwalają przypuszczać, że związki te jako dobre sensybilizatory tlenu singletowego mogłyby znaleźć zastosowanie w wielu dziedzinach, w których wykorzystuje się reakcje z silnym utleniaczem jakim jest tlen singletowy. Mogą być też przyczynkiem do dalszych poszukiwań sensybilizatorów z grupy flawin. Atrakcyjność tych związków w kontekście zastosowań zwiększa fakt, że zarówno sama ryboflawina jak i jej pochodne oraz produkty ich fotorozkładu są związkami nietoksycznymi.

Podziękowania

Część przedstawionych wyników została opublikowana w pracach [101,161,163,164] oraz była prezentowana na kilku konferencjach naukowych.

Obliczenia teoretyczne zostały wykonane w ramach realizacji grantu finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego N N204 2659 33, oraz grantu obliczeniowego z Poznańskiego Centrum Superkomputerowo Sieciowego (PCSS).

VII. Literatura

- [1] W.Holzer, J.Shirdel, P.Zirak, A.Penzkofer, P.Hegemann, R.Deutzmann, E.Hochmuth, *Chem. Phys.* **308** (2005) 69-78.
- [2] S.Frago, Medina M., J.I.Martinez, in S.Chapman, R.Perham, N.Scrutton (Eds.), *Flavins and Flavoproteins*, Rudolf Weber, Berlin, 2002, pp. 175-176.
- [3] R.K.Murray, D.K.Granner, P.A.Mayers, V.W.Rodwell, *Harper's Biochemistry*, Prentice - Hall International Inc., 1993.
- [4] M.Sun, T.A.Moore, P.S.Song, *J. Am. Chem. Soc.* **94** (1972) 1730-1740.
- [5] H.Cui, H.M.Hwang, K.Zeng, H.Glover, H.T.Yu, Y.M.Liu, *Chemosphere* **47** (2002) 991-999.
- [6] H.Cui, H.M.Hwang, S.Cook, K.Zeng, *Chemosphere* **44** (2001) 621-625.
- [7] H.L.Reddy, A.D.Dayan, J.Cavagnaro, S.Gad, J.Li, R.P.Goodrich, *Transfusion Medicine Reviews* **22** (2008) 133-153.
- [8] H.I.Ali, N.Ashida, T.Nagamatsu, *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **16** (2008) 922-940.
- [9] C.B.Martin, M.L.Tsao, C.M.Hadad, M.S.Platz, *J. Am. Chem. Soc.* **124** (2002) 7226-7234.
- [10] A.O.Cuello, C.M.McIntosh, V.M.Rotello, *J. Am. Chem. Soc.* **122** (2000) 3517-3521.
- [11] H.Grajek, G.Żurkowska, J.Kuśba, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **80** (2005) 145-155.
- [12] A.Niemz, J.Imbriglio, V.M.Rotello, *J. Am. Chem. Soc.* **119** (1997) 887-892.
- [13] N.Mataga, H.Chosrowjan, Y.Shibata, F.Tanaka, Y.Nishina, K.Shiga, *J. Phys. Chem. B* **104** (2000) 10667-10677.
- [14] B.A.Palfey, Y.-C.Hu, in S.Chapman, R.Perham, N.Scrutton (Eds.), *Flavins and Flavoproteins*, Rudolf Weber, Berlin, 2002, pp. 317-322.
- [15] P.F.Heelis, *Chem. Soc. Rev.* **11** (1982) 15-39.
- [16] J.Koziol, *Experientia* **21** (1965) 189-190.
- [17] G.R.Penzer, G.K.Radda, *Quarterly Reviews* **21** (1976) 43-65.
- [18] A.J.W.G.Visser, F.Muller, *Helv. Chim. Acta* **62** (1979) 593-608.

-
- [19] E.Sikorska, I.V.Khmelninskii, D.R.Worrall, J.Koput, M.Sikorski, *J. Fluorescence* **14** (2004) 57-64.
- [20] F.Bosca, L.Fernandez, P.F.Heelis, Y.Yano, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **55** (2000) 183-187.
- [21] H.Szymusiak, J.Konarski, J.Kozioł, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **2** (1990) 229-236.
- [22] J.Komasa, J.Rychlewski, J.Kozioł, *J. Mol. Struct. (Theochem)* **47** (1988) 205-212.
- [23] A.Weigel, A.L.Dobryakov, M.Veiga, J.L.Pérez Lustres, *J. Phys. Chem. A* **112** (2008) 12054-12065.
- [24] A.Kotaki, K.Yagi, *J. Biochem.* **68** (1970) 509-&.
- [25] M.S.Grodowski, B.Veyret, K.Weiss, *Photochem. Photobiol.* **26** (1977) 341-352.
- [26] N.Nakashima, K.Yoshihara, F.Tanaka, K.Yagi, *J. Biol. Chem.* **255** (1980) 5261-5263.
- [27] G.Porcal, S.G.Bertolotti, C.M.Previtali, M.V.Encinas, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **5** (2003) 4123-4128.
- [28] C.B.Martin, X.F.Shi, M.L.Tsao, D.Karweik, J.Brooke, C.M.Hadad, M.S.Platz, *J. Phys. Chem. B* **106** (2002) 10263-10271.
- [29] P.S.Song, W.E.Kurtin, *Photochem. Photobiol.* **10** (1969) 211-214.
- [30] W.M.Moore, J.C.McDaniels, J.A.Hen, *Photochem. Photobiol.* **25** (1977) 505-512.
- [31] S.Salzmann, J.Tatchen, C.M.Marian, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **198** (2008) 221-231.
- [32] S.Salzmann, V.Martinez-Junza, B.Zorn, S.E.Braslavsky, M.Mansurova, C.M.Marian, W.Gärtner, *J. Phys. Chem. A* **113** (2009) 9365-9375.
- [33] C.Y.Lu, W.F.Wang, W.Z.Lin, Z.H.Han, S.D.Yao, N.Y.Lin, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **52** (1999) 111-116.
- [34] C.Y.Lu, Z.H.Han, G.S.Liu, X.C.Cai, Y.L.Chen, S.Yao, *Science in China Series B-Chemistry* **44** (2001) 39-48.
- [35] P.Drossler, W.Holzer, A.Penzkofer, P.Hegemann, *Chem. Phys.* **282** (2002) 429-439.
- [36] S.A.Vazquez, J.S.Andrews, C.W.Murray, R.D.Amos, N.C.Handy, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **2** (1992) 889-895.
- [37] P.F.Heelis, G.O.Phillips, *J. Phys. Chem.* **89** (1985) 770-774.
- [38] P.S.Song, *Photochem. Photobiol.* **7** (1968) 311-313.

-
- [39] S.Schreiner, H.E.A.Kramer, in T.P.Singer (Ed.), *Flavins and Flavoproteins*, Elsevier, Amsterdam, 1976, p. 793.
- [40] H.Kurreck, N.H.Bretz, N.Helle, N.Henzel, E.Weilbacher, *J. Chem. Soc. Faraday Trans. I* **84** (1988) 3293-3306.
- [41] G.Li, K.D.Glusac, *J. Phys. Chem. A* **112** (2008) 4573-4583.
- [42] S.Weber, K.Mobius, G.Richter, C.W.M.Kay, *J. Am. Chem. Soc.* **123** (2001) 3790-3798.
- [43] L.Stryer, *Biochemia*, Wydawnictwo Naukowe PWN Warszawa, 1997.
- [44] E.Breinlinger, A.Niemz, V.M.Rotello, *J. Am. Chem. Soc.* **117** (1995) 5379-5380.
- [45] S.Ishizaka, N.Kitamura, *Anal. Sci.* **20** (2004) 1587-1592.
- [46] T.M.Dwyer, S.Mortl, K.Kemter, A.Bacher, A.Fauq, F.E.Frerman, *Biochemistry* **38** (1999) 9735-9745.
- [47] W.M.Moore, R.C.Ireton, *Photochem. Photobiol.* **25** (1977) 347-356.
- [48] C.Banekovich, B.Matuszczak, *Tetrahedron Lett.* **46** (2005) 5053-5056.
- [49] S.Engst, P.Vock, M.Wang, J.J.P.Kim, S.Ghisla, *Biochemistry* **38** (1999) 257-267.
- [50] P.Vock, S.Engst, M.Eder, S.Ghisla, *Biochemistry* **37** (1998) 1848-1860.
- [51] K.Sato, Y.Nishina, K.Shiga, F.Tanaka, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **70** (2003) 67-73.
- [52] E.Sikorska, H.Szymusiak, I.V.Khmelniskii, A.Koziolowa, J.Spanget-Larsen, M.Sikorski, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **158** (2003) 45-53.
- [53] L.H.Bradley, R.P.Swenson, *Biochemistry* **40** (2001) 8686-8695.
- [54] M.Kondo, J.Nappa, K.L.Ronayne, A.L.Stelling, P.J.Tonge, S.R.Meech, *J. Phys. Chem. B* **110** (2006) 20107-20110.
- [55] A.S.Eisenberg, J.P.M.Schelvis, *J. Phys. Chem. A* **112** (2008) 6179-6189.
- [56] N.J.Turro, *Modern Molecular Photochemistry*, The Benjamin / Cummings Publishing Co., Inc., 1978.
- [57] M.Kasha, *J. Chem. Soc. Faraday Trans. II* **82** (1986) 2379-2392.
- [58] S.J.Formosinho, L.G.Arnaut, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **75** (1993) 21-48.
- [59] L.G.Arnaut, S.J.Formosinho, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **75** (1993) 1-20.
- [60] S.L.Murov, I.Carmichael, G.L.Hug, *Handbook of Photochemistry*, Marcel Dekker, Inc. New York, 1993.

-
- [61] R.J.Stanley, A.W.MacFarlane, *J. Phys. Chem. A* **104** (2000) 6899-6906.
- [62] H.Sekiya, K.Sakota, *J. Photochem. Photobiol. C: Photochemistry Reviews* **9** (2008) 81-91.
- [63] A.Mordziński, *J. Mol. Struct.* **177** (1988) 385-391.
- [64] P.T.Chou, M.L.Martinez, W.C.Cooper, D.McMorrow, S.T.Collins, M.Kasha, *J. Phys. Chem.* **96** (1992) 5203-5205.
- [65] C.P.Chang, W.C.Hwang, M.S.Kuo, P.T.Chou, J.H.Clements, *J. Phys. Chem.* **98** (1994) 8801-8805.
- [66] P.S.Song, M.Sun, A.Koziolowa, J.Koziol, *J. Am. Chem. Soc.* **96** (1974) 4319-4323.
- [67] J.D.Choi, R.D.Fugate, P.S.Song, *J. Am. Chem. Soc.* **102** (1980) 5293-5297.
- [68] A.Koziolowa, A.J.W.G.Visser, J.Koziol, *Photochem. Photobiol.* **48** (1988) 7-11.
- [69] J.M.MacInnis, M.Kasha, *Chem. Phys. Lett.* **151** (1988) 375-378.
- [70] R.D.Fugate, P.S.Song, *Photochem. Photobiol.* **24** (1976) 479-481.
- [71] P.S.Song, J.D.Choi, *Bull. Korean Chem. Soc.* **1** (1980) 93-97.
- [72] A.Koziolowa, *Photochem. Photobiol.* **29** (1979) 459-471.
- [73] F.Muller, K.H.Dudley, *Helv. Chim. Acta* **54** (1971) 1487.
- [74] Koziołowa A, *Praca habilitacyjna*, Zeszyty Naukowe AE w Poznaniu, seria II, **60**, 1977.
- [75] G.Nöll, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **200** (2008) 34-38.
- [76] M.Y.Jung, Y.S.Oh, D.K.Kim, H.J.Kim, D.B.Min, *J. Agric. Food Chem.* **55** (2007) 170-174.
- [77] R.Huang, H.J.Kim, D.B.Min, *J. Agric. Food Chem.* **54** (2006) 2359-2364.
- [78] Z.Miskolczy, L.Biczok, *Chem. Phys. Lett.* **411** (2005) 238-242.
- [79] P.F.Heelis, B.J.Parsons, G.O.Phillips, E.J.Land, A.J.Swallow, *J. Chem. Soc. Faraday Trans. I* **81** (1985) 1225-1235.
- [80] S.Salzmann, C.M.Marian, *Chem. Phys. Lett.* **463** (2008) 400-404.
- [81] P.Karrer, H.Salomon, K.Schopp, E.Schlitler, H.Fritsche, *Helv. Chim. Acta* **17** (1934) 1010-1013.
- [82] M.V.Encinas, S.G.Bertolotti, C.M.Previtali, *Helv. Chim. Acta* **85** (2002) 1427-1438.
- [83] N.Lasser, J.Feitelson, *Photochem. Photobiol.* **27** (1977) 451-456.

-
- [84] N.S.Lee, *Bull. Korean Chem. Soc.* **15** (1994) 91-93.
- [85] E.Sikorska, I.V.Khmelinskii, W.Prukala, S.L.Williams, M.Patel, D.R.Worrall, J.L.Bourdelande, J.Koput, M.Sikorski, *J. Phys. Chem. A* **108** (2004) 1501-1508.
- [86] I.Ahmad, Q.Fasiliullah, F.H.M.Vaid, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **75** (2004) 13-20.
- [87] E.Sikorska, I.V.Khmelinskii, J.Koput, J.L.Bourdelande, M.Sikorski, *J. Mol. Struct.* **697** (2004) 137-141.
- [88] E.Sikorska, I.V.Khmelinskii, J.Koput, M.Sikorski, *J. Mol. Structure. (Theochem.)* **676** (2004) 155-160.
- [89] M.M.Szafran, J.Kozioł, P.F.Heelis, *Photochem. Photobiol.* **52** (1990) 353-360.
- [90] K.Yagi, N.Ohishi, K.Nishimoto, J.D.Choi, P.S.Song, *Biochemistry* **19** (1980) 1553-1557.
- [91] K.Nishimoto, Y.Watanabe, K.Yagi, *Biochim. Biophys. Acta* **526** (1978) 34-41.
- [92] P.F.Heelis, B.J.Parsons, G.O.Phillips, A.J.Swallow, *J. Phys. Chem.* **93** (1989) 4017-4022.
- [93] J.Iqbal, A.Husain, A.Gupta, *Chem. Pharm. Bull.* **54** (2006) 519-521.
- [94] C.S.Foote, *Photochem. Photobiol.* **54** (1991) 659.
- [95] A.F.Olea, F.Wilkinson, *J. Phys. Chem.* **99** (1995) 4518-4524.
- [96] D.B.Min, J.M.Boff, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **1** (2002) 58-72.
- [97] R.W.Redmond, J.N.Gamlin, *Photochem. Photobiol.* **70** (1999) 391-475.
- [98] J.A.Baltrop, J.D.Coyle, *Fotochemia. Podstawy*, Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa, 1987.
- [99] F.Wilkinson, W.P.Helman, A.B.Ross, *J. Phys. Chem. Ref. Data* **22** (1993) 113-262.
- [100] A.Wiehe, H.Stollberg, S.Runge, A.Paul, M.O.Senge, B.Roder, *Journal of Porphyrins & Phthalocyanines* **5** (2001) 853-860.
- [101] E.Sikorska, I.V.Khmelinskii, A.Komasa, J.Koput, L.F.V.Ferreira, J.R.Herance, J.L.Bourdelande, S.L.Williams, D.R.Worrall, M.Insinska-Rak, M.Sikorski, *Chem. Phys.* **314** (2005) 239-247.
- [102] P.Drossler, W.Holzer, A.Penzkofer, P.Hegemann, *Chem. Phys.* **286** (2003) 409-420.
- [103] J.N.Chacon, J.McLearie, R.S.Sinclair, *Photochem. Photobiol.* **47** (1988) 647-656.

-
- [104] M.Sikorski, E.Sikorska, A.Koziolowa, R.Gonzalez-Moreno, J.L.Bourdelande, R.P.Steer, F.Wilkinson, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **60** (2001) 114-119.
- [105] R.W.Redmond, *Photochem. Photobiol.* **54** (1991) 547-556.
- [106] R.Schmidt, C.Tanielian, R.Dunsbach, C.Wolff, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **79** (1994) 11-17.
- [107] E.Oliveros, S.H.Bossmann, S.Nonell, C.Marti, G.Heit, G.Troscher, A.Neuner, C.Martinez, A.M.Braun, *New J. Chem.* **23** (1999) 85-93.
- [108] Y.Yamakoshi, N.Umezawa, A.Ryu, K.Arakane, N.Miyata, Y.Goda, T.Masumizu, T.Nagano, *J. Am. Chem. Soc.* **125** (2003) 12803-12809.
- [109] P.Agostinis, E.Buytaert, H.Breyssens, N.Hendrickx, *Photochem. Photobiol. Sci.* **3** (2004) 721-729.
- [110] P.Mroz, G.P.Tegos, H.Gali, T.Wharton, T.Sarna, M.R.Hamblin, *Photochem. Photobiol. Sci.* **6** (2007) 1139-1149.
- [111] J.R.Brender, J.Dertouzos, D.P.Ballou, V.Massey, B.A.Palfey, B.Entsch, D.G.Steel, A.Gafni, *J. Am. Chem. Soc.* **127** (2005) 18171-18178.
- [112] F.Wilkinson, D.J.McGarvey, A.F.Olea, *J. Phys. Chem.* **98** (1994) 3762-3769.
- [113] F.Wilkinson, D.J.McGarvey, A.F.Olea, *J. Am. Chem. Soc.* **115** (1993) 12144-12151.
- [114] G.Bartosz, *Druga twarz tlenu*, PWN, Warszawa, 1995.
- [115] E.Sikorska, *Praca doktorska*, 1998.
- [116] F.Wilkinson, W.P.Helman, A.B.Ross, *J. Phys. Chem. Ref. Data* **24** (1995) 663-1021.
- [117] E.Clo, J.W.Snyder, N.V.Voigt, P.R.Ogilby, K.V.Gothelf, *J. Am. Chem. Soc.* **128** (2006) 4200-4201.
- [118] M.C.DeRosa, R.J.Crutchley, *Coord. Chem. Rev.* **233** (2002) 351-371.
- [119] S.Jockusch, N.J.Turro, E.K.Thompson, M.Gouterman, J.B.Callis, G.E.Khalil, *Photochem. Photobiol. Sci.* **7** (2008) 235-239.
- [120] R.Schmidt, M.Bodesheim, *J. Phys. Chem.* **98** (1994) 2874-2876.
- [121] C.Juan, K.Stefflova, M.J.Niedre, B.C.Wilson, B.Chance, J.D.Glickson, Z.Gang, *J. Am. Chem. Soc.* **126** (2004) 11450-11451.
- [122] S.O.McDonnell, M.J.Hall, L.T.Allen, A.Byrne, W.M.Gallagher, D.F.O'Shea, *J. Am. Chem. Soc. - communications* **127** (2005) 16360-16361.
- [123] R.Ackroyd, C.Kelty, N.Brown, M.Reed, *Photochem. Photobiol.* **74** (2001) 656-669.

-
- [124] Praca zbiorowa pod redakcją naukową Alfredy Graczyk, *Fotodynamiczna metoda rozpoznawania i leczenia nowotworów*, Dom Wydawniczy Bellona, Warszawa, 1999.
- [125] A.P.Castano, T.N.Demidova, M.R.Hamblin, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* **1** (2004) 279-293.
- [126] A.Juzeniene, Q.Peng, J.Moan, *Photochem. Photobiol. Sci.* **6** (2007) 1234-1245.
- [127] R.R.Allison, G.H.Downie, R.Cuenca, X.-H.Hu, C.J.H.Childs, C.H.Sibata, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* **1** (2004) 27-42.
- [128] R.W.Boyle, D.Dolphin, *Photochem. Photobiol.* **64** (1996) 469-485.
- [129] E.Kvam, T.Stokke, *Photochem. Photobiol.* **59** (1994) 437-440.
- [130] J.R.Lakowicz, *Principles of fluorescence spectroscopy*, Third edition, Springer, 2006.
- [131] T.S.Mang, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* **1** (2004) 43-48.
- [132] L.Brancalion, H.Moseley, *Lasers in Med. Sci.* **17** (2002) 173-186.
- [133] R.F.Donnely, P.A.McCarron, M.M.Tunney, *Microbiological Research* **163** (2008) 1-12.
- [134] T.S.Mang, T.J.Dougherty, W.R.Potter, D.G.Boyle, S.Somer, J.Moan, *Photochem. Photobiol.* **45** (1987) 501-506.
- [135] J.Moan, *Photochem. Photobiol.* **39** (1984) 445-449.
- [136] Y.N.Konan, R.Gurny, E.Allémann, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **66** (2002) 89-106.
- [137] C.Y.Lu, W.Z.Lin, W.F.Wang, Z.H.Han, Z.D.Zheng, S.D.Yao, *Radiation Physics and Chemistry* **59** (2000) 61-66.
- [138] C.Y.Lu, W.F.Wang, W.Z.Lin, Z.H.Han, S.D.Yao, N.Y.Lin, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **52** (1999) 111-116.
- [139] M.Grninger, H.Staudt, P.Johansson, J.Wachtveitl, D.Oesterhelt, *J. Biol. Chem.* **284** (2009) 13068-13076.
- [140] J.M.King, D.B.Min, *J. Am. Oil Chemists Soc.* **79** (2002) 983-987.
- [141] J.M.King, D.B.Min, *J. Food Sci.* **63** (1998) IV.
- [142] F.Corbin, *International Journal of Hematology* **76** (2002) 253-257.
- [143] S.K.Harrison, R.Venkatesh, *J. Environ. Science and Health Part B-Pesticides Food Contaminants And Agricultural Wastes* **34** (1999) 469-489.
- [144] K.Tatsumi, H.Ichikawa, S.Wada, *J. Contam. Hydrol.* **9** (1992) 207-219.

-
- [145] R.A.Larson, P.L.Stackhouse, T.L.Crowley, *Environ. Sci. Tech.* **26** (1992) 1792-1798.
- [146] E.Haggi, S.Bertolotti, S.Miskoski, F.Amat-Guerri, N.Garcia, *Can. J. Chem.* **80** (2002) 62-67.
- [147] A.A.Linden, L.Kruger, J.E.Backvall, *J. Org. Chem.* **68** (2003) 5890-5896.
- [148] T.Climent, R.González-Luque, M.Merchán, L.Serrano-Andrés, *J. Phys. Chem. A* **110** (2006) 13584-13590.
- [149] A.M.Edwards, E.Silva, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **63** (2001) 126-131.
- [150] D.G.Bradley, H.O.Lee, D.B.Min, *J. Food Sci.* **68** (2003) 491-494.
- [151] E.Silva, S.Furst, A.M.Edwards, M.I.Becker, A.E.DeIoannes, *Photochem. Photobiol.* **62** (1995) 1041-1045.
- [152] A.M.Edwards, E.Silva, B.Jofre, M.I.Becker, A.E.DeIoannes, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **24** (1994) 179-186.
- [153] A.M.Edwards, C.Bueno, A.Saldano, E.Silva, K.Kassab, L.Polo, G.Jori, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **48** (1999) 36-41.
- [154] M.Y.Jung, S.K.Kim, S.Y.Kim, *Food Chem.* **53** (1995) 397-403.
- [155] F.Borle, R.Sieber, J.O.Bosset, *Sciences des Aliments* **21** (2001) 571-590.
- [156] K.Kino, T.Kobayashi, E.Arima, R.Komori, T.Kobayashi, H.Miyazawa, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **19** (2009) 2070-2074.
- [157] E.Sikorska, R.J.Herance, J.L.Bourdelande, I.V.Khmelinskii, S.L.Williams, D.R.Worrall, G.Nowacka, A.Komasa, M.Sikorski, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **170** (2005) 267-272.
- [158] K.Zenichowski, M.Gothe, P.Saalfank, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **190** (2007) 290-300.
- [159] C.Neiss, P.Saalfank, M.Parac, S.Grimme, *J. Phys. Chem. A* **107** (2003) 140-147.
- [160] M.Bruszynska, E.Sikorska, A.Komasa, I.Khmelinskii, L.F.V.Ferreira, J.Hernando, J.Karolczak, M.Kubicki, J.L.Bourdelande, M.Sikorski, *Chem. Phys.* **361** (2009) 83-93.
- [161] M.Kowalczyk, E.Sikorska, I.V.Khmelinskii, J.Komasa, M.Insinska-Rak, M.Sikorski, *J. Mol. Structure. (Theochem.)* **756** (2005) 47-54.
- [162] E.Sikorska, I.V.Khmelinskii, J.L.Bourdelande, A.Bednarek, S.L.Williams, M.Patel, D.R.Worrall, J.Koput, M.Sikorski, *Chem. Phys.* **301** (2004) 95-103.
- [163] M.Insinska-Rak, E.Sikorska, J.R.Herance, J.L.Bourdelande, I.V.Khmelinskii, M.Kubicki, W.Prukala, I.F.Machado, A.Komasa, L.F.V.Ferreira, M.Sikorski, *Photochem. Photobiol. Sci.* **4** (2005) 463-468.

- [164] M. Insinska-Rak, E. Sikorska, J. L. Bourdelande, I. V. Khmelinskii, W. Prukala, K. Dobek, J. Karolczak, I. F. Machado, L. F. V. Ferreira, A. Komasa, D. R. Worrall, M. Sikorski, *J. Mol. Struct.* **783** (2006) 184-190.
- [165] I. Ahmad, F. H. M. Vaid, *Flavins: Photochemistry and Photobiology*, Silva, E.; Edwards; A. M. (editors) Royal Society of Chemistry, 2006.
- [166] P. S. Song, E. C. Smith, D. E. Metzler, *J. Am. Chem. Soc.* **87** (1965) 4181-4184.
- [167] W. M. Moore, J. Baylor, *J. Am. Chem. Soc.* **91** (1969) 7170-7179.
- [168] I. Ahmad, Q. Fasihullah, F. H. M. Vaid, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **78** (2005) 229-234.
- [169] M. Green, G. Tollin, *Photochem. Photobiol.* **7** (1968) 129-143.
- [170] I. Ahmad, Q. Fasihullah, F. H. M. Vaid, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **82** (2006) 21-27.
- [171] I. Ahmad, Q. Fasihullah, A. Noor, I. A. Ansari, Q. N. M. Ali, *Int. J. Pharm.* **280** (2004) 199-208.
- [172] I. Ahmad, Q. Fasihullah, F. H. M. Vaid, *Photochem. Photobiol. Sci.* **5** (2006) 680-685.
- [173] J. Karolczak, D. Komar, J. Kubicki, M. Szymanski, T. Wrozowa, A. Maciejewski, *Bull. Pol. Acad. Chem.* **47** (1999) 361-380.
- [174] I. Carmichael, G. L. Hug, *J. Phys. Chem. Ref. Data* **15** (1986) 1-250.
- [175] E. Gross, J. Dobson, M. Petersilka, *Top. Curr. Chem.* **181** (1996) 81-172.
- [176] A. D. Becke, *J. Chem. Phys.* **98** (1993) 5648-5652.
- [177] R. Ditchfield, W. J. Hehre, J. A. Pople, *J. Chem. Phys.* **54** (1971) 724-728.
- [178] M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, A. J. Jr. Montgomery, T. Vreven, K. N. Kudin, J. C. Burant, J. M. Millam, S. S. Iyengar, J. Tomasi, V. Barone, B. Mennucci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, M. Klene, X. Li, J. E. Knox, H. P. Hratchian, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, P. Y. Ayala, K. Morokuma, G. A. Voth, P. SALVADOR, J. J. Dannenberg, V. G. Zakrzewski, S. Dapprich, A. D. Daniels, M. C. Strain, O. Farkas, D. K. Malick, A. D. Rabuck, K. Raghavachari, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, Q. Cui, A. G. Baboul, S. Clifford, J. Cioslowski, B. B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. L. Martin, D. J. Fox, T. Keith, M. A. Al-Laham, C. Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P. M. W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M. W. Wong, C. Gonzalez, J. A. Pople, Gaussian 03, revision B.05., Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2003.
- [179] E. E. Wegner, A. W. Adamson, *J. Am. Chem. Soc.* **88** (1966) 394-404.

-
- [180] I.Ahmad, S.Ahmed, M.A.Sheraz, F.H.M.Vaid, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **93** (2008) 82-87.