

H. Grajek

ASOCJACJA FLAWIN W ROZTWORACH WODNYCH

W celu zbadania wpływu asocjacji flawin FMN i RF na elektronowe widmo absorpcji tych barwników wyznaczono stężeniową zależność współczynnika ekstynkcji $\varepsilon(\lambda, c)$ w zakresie stężeń od 10^{-5} mol/l do 10^{-3} mol/l. Zaobserwowano zmianę widm absorpcji wraz ze wzrostem stężenia barwnika. Punkt izobestyyczny dla $\lambda = 490$ nm wskazuje na istnienie równowagi między monomerami i dimerami w roztworze. Dla poszczególnych stężeń FMN określono temperaturę, w której zaczyna się proces dimeryzacji.

Wstęp

Flawiny należą do związków biologicznie czynnych. W naturalnych strukturach biologicznych łączą się z białkami tworząc kompleksy zwane flawoproteinami. Ryboflawina (RF) - witamina B_2 , jako flawomononukleotyd FMN, spełnia rolę koenzymu w enzymach flawinowych. Aktywność biologiczna flawin może być wyjaśniona przez dokładne poznanie struktury elektronowej stanu podstawowego i wzbudzonego. Ostatnio ukazało się wiele prac dotyczących oddziaływań flawin z proteinami [1, 2] i aminokwasami [3], a pokazujących wpływ tych kompleksów na elektronowe widmo absorpcji i emisji flawin. Prowadzone są również badania procesu asocjacji flawin, w którym dwie molekuly barwnika oddziałują ze sobą poprzez wiązania wodorowe [4] lub przez utworzenie kompleksu C-T [5, 6]. Struktura tych dimerów oraz mechanizm ich tworzenia nie są jasno wytłumaczone. Niektórzy autorzy twierdzą, że flawiny tworzą "vertically stacked" kompleksy. S e r m a i K a i n o w s h o [8] na podstawie badań NMR utworzyli dwa modele powstawa-

nie takich dimerów, w których dwie molekuly tworzące "sandwich" są przesunięte względem siebie.

Jak dotąd nie ma prac ukazujących wpływ dimeryzacji na elektronowe widmo absorpcji flawin. W tym celu zbadano stężeniową zależność elektronowych widm absorpcji RF i FMN oraz zależność temperaturową współczynnika absorpcji $\alpha_m(\nu T)$ dla $\lambda = 510$ nm z antystokesowskiego przedziału wzbudzenia.

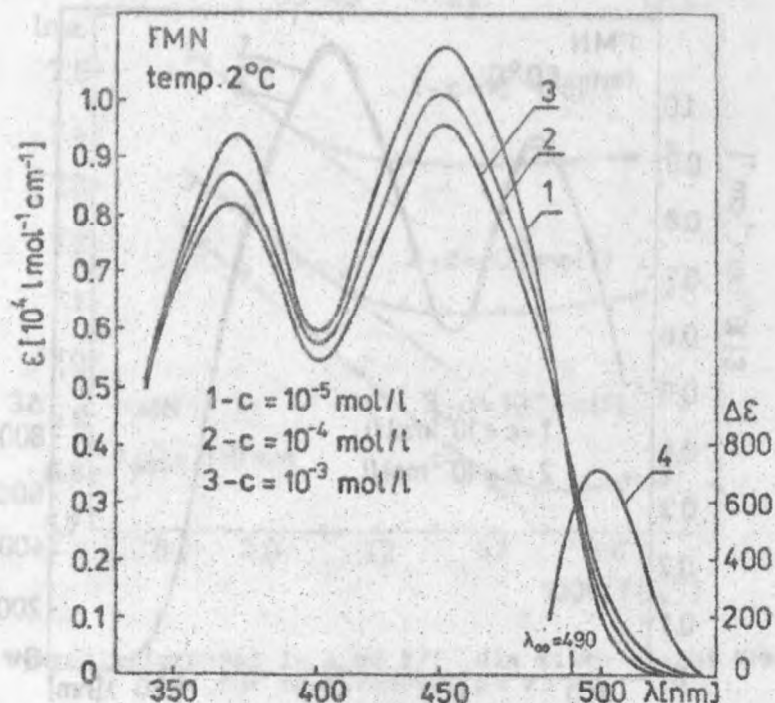
Metody

Zmierzono widmo absorpcji flawomononukleotydu $C_{17}H_{20}N_4NaO_9P$ (FMN) firmy Fluka AG w zakresie stężeń od 10^{-5} mol/l do 10^{-3} mol/l oraz ryboflawiny $C_{17}H_{20}N_4O_6$ (RF) z BDH Chemical Ltd England w zakresie stężeń od 10^{-5} mol/l do $6 \cdot 10^{-4}$ mol/l w buforze fosforanowym (pH 7) używając spektrofotometru "Opton" PMO MM 12 O wyposażonego w termostatowaną obudowę do kuwet. Pomiar absorpcji przeprowadzono w temperaturze $2^\circ C$ i $60^\circ C$.

Dla wybranej długości fali $\lambda = 510$ nm z przedziału antystokesowskiego zmierzono temperaturową zależność współczynnika absorpcji dla kilku stężeń FMN i RF w zakresie temperatur od $2^\circ C$ do $70^\circ C$. Uwzględniono poprawkę na termiczną rozszerzalność kuwety i roztworu.

Wyniki i dyskusja

Elektronowe widma flawin RF i FMN zmieniają się wraz ze stężeniem (rys. 1, krzywe 1-3, dla FMN). Podobne zmiany wykazują widma RF. Punkt izobestyczny występujący przy $\lambda = 490$ świadczy o istnieniu równowagi między dimerami i monomerami w roztworze. W temperaturze $60^\circ C$ widma absorpcji FMN dla stężonego i rozcieńczonego roztworu prawie pokrywają się (rys. 2), co świadczy o tym, że w tak wysokiej temperaturze dimery uległy dysocjacji. Maksimum widma różnicowego (rys. 1, krzywa 4) otrzymanego z różnicy widm absorpcji roztworu o maksymalnym i minimalnym stężeniu leży w antystokesowskim przedziale wzbudzenia flawin (dla FMN $\lambda_{00} = 490$ nm). W związku z tym na tem-



Rys. 1. Stężeniowa zależność współczynnika ekstynkcji $\epsilon(\lambda, c)$ FMN w temperaturze 2°C w buforze fosforanowym (pH 7)

Concentration dependence of the extinction coefficient $\epsilon(\lambda, c)$ of FMN at a temperature of 2°C in phosphate buffer (pH 7)

peraturową zależność współczynnika absorpcji monomeru $\alpha_m(\nu, T)$ w tym przedziale będzie miał wpływ proces dimeryzacji.

Zgodnie z pracą [9] współczynnik monomerowej absorpcji $\alpha_m(\nu, T)$ związany z jednofotonowym przejściem singlet-singlet może być wyrażony:

$$\alpha_m(\nu, T) = \alpha_0(\nu) \cdot \exp\left[\frac{-h(\nu_{00} - \nu)}{kT}\right] \quad (1)$$

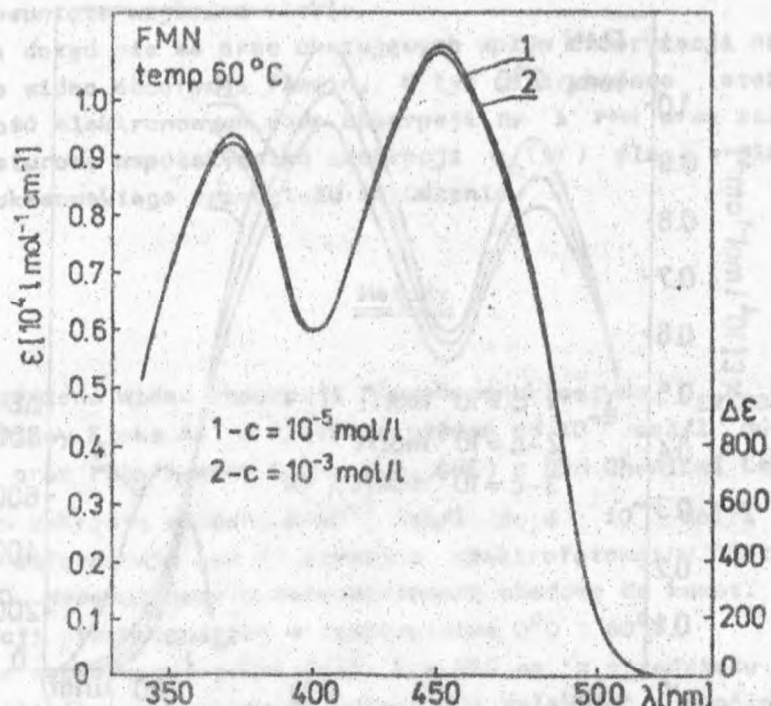
gdzie: ν_{00} - częstość elektronowego przejścia między stanem podstawowym S_0 a wzbudzonym S_1 ;

ν - częstość światła wzbudzającego;

h - stała Plancka;

k - stała Boltzmana;

T - temperatura w K.



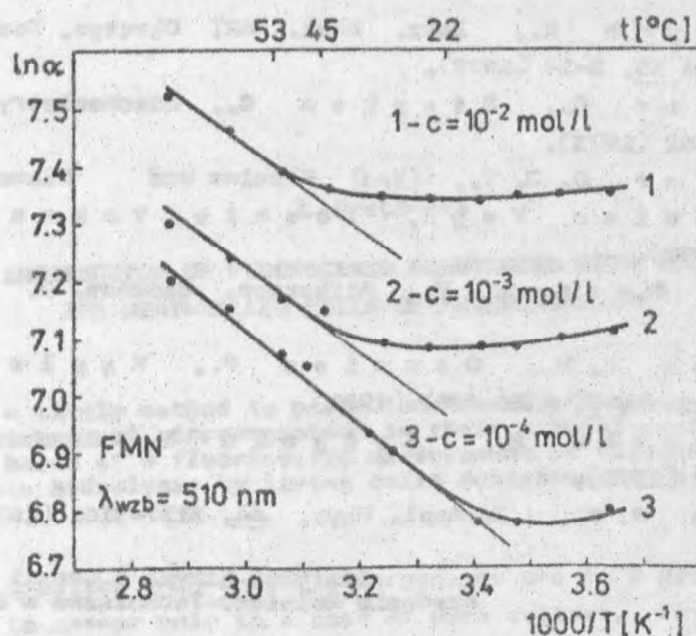
Rys. 2. Stężeniowa zależność współczynnika ekstynkcji $\varepsilon(\lambda, c)$ FMN w temperaturze 60°C w buforze fosforanowym (pH 7)

Concentration dependence of the extinction coefficient $\varepsilon(\lambda, c)$ of FMN at a temperature of 60°C in phosphate buffer (pH 7)

Ponieważ częstość antystokesowskiego wzbudzenia ν jest mniejsza niż ν_{∞} ($\nu < \nu_{\infty}$) współczynnik absorpcji $\alpha_m(\nu, T)$ będzie wykazywać silną eksponencjalną zależność od $1/T$. Po zlogarytmowaniu wyrażenia (1) otrzymujemy:

$$\ln \alpha_m(\nu, T) = \frac{h(\nu_{\infty} - \nu)}{k} \cdot \frac{1}{T} + C \quad (2)$$

Wykres funkcji $\ln \alpha_m(\nu, T)$ w zależności od $1/T$ jest linią prostą o współczynniku kierunkowym $a = -h(\nu_{\infty} - \nu)/k$. Dla FMN zależność ta przy wzbudzeniu $\lambda = 510$ nm pokazana jest na rys. 3. Współczynnik absorpcji monomeru maleje ze spadkiem temperatury. Absorpcja dimeru wzrasta ze spadkiem temperatury. Odchylenie od liniowości wskazuje na pojawienie się dimerów w roztworze.



Rys. 3. Wykres zależności $\ln \alpha_m$ od $1/T$ dla kilku stężeń FMN bufor fosforanowy (pH 7)

Plot of the dependence of $\ln \alpha_m$ on $1/T$ for several concentration of FMN in phosphate buffer (pH 7)

Na podstawie wykresu, dla poszczególnych stężeń FMN określono temperaturę, w której zaczyna się proces dimeryzacji: dla $c = 10^{-2} \text{ mol/l}$ temperatura ta wynosi temp. = $53^{\circ}C$, dla $c = 10^{-3} \text{ mol/l}$, temp. = $45^{\circ}C$ oraz dla $c = 10^{-4} \text{ mol/l}$, temp. = $22^{\circ}C$. Widać, że temperatura ta rośnie wraz ze wzrostem stężenia. Stwierdzono, że w pokojowej temperaturze istnieją dimery przy stężeniach większych niż 10^{-4} mol/l .

LITERATURA

- [1] Yung-Do Choi McCormick B. D., Archiv. Biochem. Biophys. 204, 41-51 (1980).
- [2] Walsh C., Fisher J., Jacobson F., Spencer R., [in:] Flavins and Flavoproteins, eds. Kuino Yagi, Toshio Yamanoto, Tokio (1980).

- [3] Ulbrych K., Zesz. Nauk. ART Olsztyn, Technologia Żywności 15, 3-14 (1979).
- [4] Müller F., Stephen G., Biochemistry 12, 4654-4662 (1973).
- [5] Porter D. J. T., [in:] Flawins and Flawoproteins, eds. Kuino Yagi, Toshio Yamano, Tokio (1980).
- [6] Gibson, Massey V., Altherton, Biochem. J. 85, 369 (1962).
- [7] Sarms R. H., Dannies P., Kaplan N. O., Biochemistry 7, 4359-4367 (1968).
- [8] Kainosho M., Kyogoku Y., Biochemistry 11, 741-752 (1972).
- [9] Jain R. K., J. Appl. Phys. 44, 3157-3161 (1973).

Instytut Fizyki i Chemii Żywności
Akademia Rolniczo-Techniczna w Olsztynie

H. Grajek

FLAVIN ASSOCIATIONS IN AQUEOUS SOLUTIONS

In order to determine the effect of association of flavins (FMN and RF) on the electron absorption spectra of these dyes, concentration dependence of the absorption coefficient $\epsilon(\lambda, c)$ was studied in the concentration range 10^{-5} mol/l up to 10^{-3} mol/l.

A change in absorption spectra was observed with increase of the dye concentration. An isosbestic point at $\lambda = 490$ nm indicates an equilibrium between dimers and monomers in the solution. For chosen FMN concentrations temperatures of onset of the dimerization process were determined.