

Ćwiczenie 4

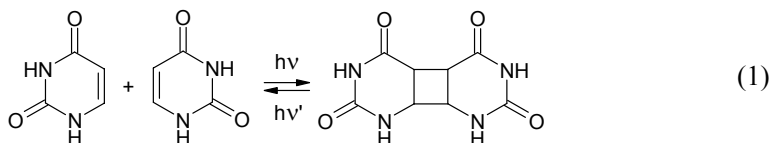
WYZNACZANIE WYDAJNOŚCI KWANTOWEJ REAKCJI FOTOHYDRATACJI URACYLU

Zagadnienia: zasady purynowe i pirymidynowe – struktura i widma absorpcji, fotodimeryzacja, fotohydratacja, fotoaddycja, wydajność kwantowa reakcji fotochemicznej, aktynometry, prawa absorpcji, budowa i zasada działania spektrofotometru UV-Vis.

Część teoretyczna

Podstawowymi elementami budulcowymi cząsteczek kwasów nukleinowych są heterocykliczne zasady azotowe (*puryny i pirymidyny*), reszty cukrowe (ryboza i deoksyryboza) oraz reszty kwasu fosforowego. Grupy cukrowe i fosforanowe absorbują promieniowanie elektromagnetyczne w dalekim UV. Za absorpcję promieniowania w zakresie 230–320 nm odpowiadają natomiast zasady purynowe i pirymidynowe. Ich charakterystyczne pasmo absorpcji przypadające przy około 260 nm jest wynikiem przejścia elektronowego $\pi \rightarrow \pi^*$ o dużym molowym współczynniku absorpcji oraz przejścia $n \rightarrow \pi^*$ o małym molowym współczynniku absorpcji.

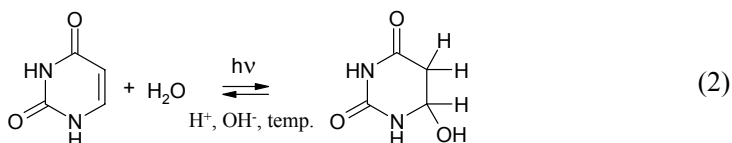
Absorpcja promieniowania UV przez reszty purynowe i pirymidynowe w kwasach nukleinowych zapoczątkuje szereg reakcji fotochemicznych prowadzących do modyfikacji w strukturze cząsteczek DNA i RNA. Z racji stopnia skomplikowania cząsteczek biopolimerów, fotochemię kwasów nukleinowych bada się w oparciu o małe ich fragmenty, to jest puryny i pirymidyny oraz ich nukleozydy i nukleotydy. Zarówno dla wolnych zasad jak i ich polinukleotydów, najbardziej typowymi reakcjami w roztworach wodnych są fotohydratacja, fotodimeryzacja i fotoaddycja. Reakcje te zostały poniżej omówione dla pirymidyn. Analogicznym reakcjom, chociaż ze znacznie mniejszymi wydajnościami kwantowymi, ulegają puryny.



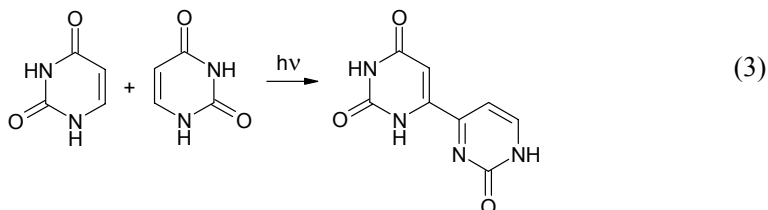
Reakcja *fotodimeryzacji* (1) prowadzi do utworzenia stabilnych chemicznie dimerów cyklobutanowych. Jedynie dimery cytozyny łatwo ulegają przekształceniu w dimery uracylowe. Ze względu na stereochemię powstałego pierścienia cyklobutanowego wyróżnia się stereoisomery *cis* i *trans*. W zależności od wzajemnej orientacji pierścieni

pirymidynowych można mówić o izomerach *syn* i *anti*. Reakcja fotodimeryzacji jest fotochemicznie odwracalna, tzn. naświetlanie fotodimeru promieniowaniem o długości fali 254 nm powoduje rozszczepienie pierścienia cyklobutanowego.

Fotohydratacja (2) polega na inicjowanej światłem addycji cząsteczki wody do wiązania C5–C6 w pirymidynach. Powstaje w ten sposób 6-hydroksy-5,6-dihydropiry-midyna nie absorbująca promieniowania w zakresie 230–290 nm, a więc w zakresie w którym obserwuje się absorpcję pirymidyn. Fotohydraty są stosunkowo nietrwałe. Łatwo tracą cząsteczkę wody po ogrzaniu oraz po zmianie pH.



Fotoaddycja (3) prowadzi do utworzenia trwałych adduktów 4–6' absorbujących promieniowanie o długości fali powyżej 300 nm. W odróżnieniu od fotodimeryzacji, fotoaddycja jest reakcją nieodwracalną.



Reakcję fotochemiczną można schematycznie zapisać w następujący sposób:



Istotnym elementem badań nad daną reakcją fotochemiczną, oprócz określenia produktów przejściowych oraz stanu elektronowo wzbudzonego, z którego reakcja ta zachodzi (T_1 lub S_1), jest wyznaczenie wydajności kwantowych powstających produktów trwałych.

Różniczkowa wydajność kwantowa definiowana jest jako stosunek szybkości danego procesu (zaniku substratu $-d[S]/dt$ lub tworzenia fotoproduktu $d[P]/dt$) do natężenia światła absorbowanego przez substrat:

$$\Phi_S = \frac{-\frac{d[S]}{dt}}{I_a^S} \quad \Phi_P = \frac{\frac{d[P]}{dt}}{I_a^S} \quad (5)$$

Φ_S , Φ_P oznaczają odpowiednio różniczkowe wydajności kwantowe zniknięcia substratu S i tworzenia produktu P ; $[S]$, $[P]$ to stężenia substratu i produktu, a I_a^S [einstein $\text{dm}^{-3} \text{s}^{-1}$] to natężenie promieniowania absorbowanego przez substrat S .

Całkową wydajność kwantową definiuje się w następujący sposób:

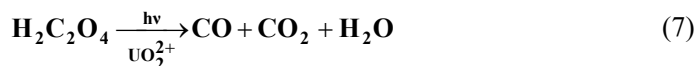
$$\Phi_S = \frac{[S]_t - [S]_0}{\int_0^t I_a^S dt} \quad \Phi_P = \frac{[P]_t}{\int_0^t I_a^S dt} \quad (6)$$

gdzie: Φ_S , Φ_P oznaczają odpowiednio całkowite wydajności kwantowe zaniku substratu S i tworzenia produktu P ; $[S]_0$, $[P]_0$ to stężenia substratu i produktu na początku procesu, natomiast $[S]_t$, $[P]_t$ to stężenia substratu i produktu po czasie t , czyli na końcu procesu. Całka w mianowniku określa ilość promieniowania zaabsorbowanego przez substrat w czasie t trwania reakcji (czasie naświetlania).

Powyższe wydajności kwantowe nazywane są *rzeczywistymi* lub właściwymi, w odróżnieniu od tzw. *pozornych wydajności kwantowych*, w których zamiast I_a^S występuje natężenie światła I_a^U absorbowanego przez cały układ (promieniowanie padające może być absorbowane jednocześnie przez substrat i tworzące się fotoprodukty). Uzyskanie rzeczywistych wydajności kwantowych komplikować mogą również zachodzące w układzie reakcje ciemne (tj. bez udziału światła).

Jak wynika ze wzorów (5) i (6), do wyznaczenia wydajności kwantowej reakcji fotochemicznej konieczne jest zmierzenie natężenia promieniowania zaabsorbowanego przez układ. Odpowiada ono natężeniu promieniowania zaabsorbowanego przez substrat ulegający reakcji fotochemicznej, jeśli żaden inny składnik układu nie absorbuje padającego promieniowania. Do pomiaru natężenia promieniowania służą tzw. *aktywności chemiczne*. Są to zwykle roztwory takich substancji, które pod wpływem padającego promieniowania o określonej długości fali biorą udział w reakcji fotochemicznej o znanej wydajności kwantowej.

Jednym z najczęściej stosowanych aktywności jest *aktywność szczawianowo-uranylowa*. Jego działanie opiera się na reakcji rozkładu kwasu szczawowego fotosensybilizowanej jonem uranylowym (naświetlanie lampą rtęciową niskociśnieniową, $\lambda = 254$ nm). Głównymi produktami rozkładu kwasu szczawowego są CO , CO_2 , i H_2O :



Ubytek szczawianu Δc_A oznacza się z różnicy między ilością KMnO_4 konieczną do zmiareczkowania równoważnych ilości naświetlonych i nie naświetlonych roztworów aktywnościowych. Następnie korzystając ze wzoru (8), znając wydajność kwantową zaniku szczawianu Φ_A i czas naświetlania roztworu aktywności t_A , można obliczyć natężenie promieniowania zaabsorbowanego przez aktywność (I_a^A). Ponieważ roztwór aktywności ma takie stężenie, aby absorbowana była całość padającego na niego promieniowania (transmitancja $< 10\%$), obliczona wartość I_a^A odpowiada natężeniu promieniowania padającego na roztwór aktywności (I_0).

$$I_0 = \frac{\Delta c_A}{\Phi_A \cdot t_A} = \frac{5 \cdot \Delta V_{\text{KMnO}_4} \cdot c_{\text{KMnO}_4}}{2 \cdot V \cdot \Phi_A \cdot t_A} \quad (8)$$

$\Delta V_{KMnO_4} = V_{KMnO_4}^0 - V_{KMnO_4}^t$ – różnica objętości $KMnO_4$ użytego do zmiareczkowania równoważnych ilości naświetlonego i nie naświetlonego roztworu aktynometru [cm^3]

c_{KMnO_4} – stężenie $KMnO_4$ [$mol\ dm^{-3}$]

V – objętość roztworu aktynometru wzięta do miareczkowania [cm^3]

t – czas naświetlania aktynometru [s]

Φ_A – wydajność kwantowa aktynometru (dla $\lambda=254\ nm$ $\Phi_A=0,602\ wg$ [6])

Całkową wydajność kwantową reakcji fotohydratacji uracylu można obliczyć w oparciu o wzór:

$$\Phi_{uracylu} = \frac{\Delta c}{I_a \cdot t} \quad (9)$$

$\Delta c = c_0 - c_t$ – zmiana stężenia uracylu [$mol\ dm^{-3}$]

I_a – natężenie zaabsorbowanego promieniowania [$einstein\ dm^{-3}\ s^{-1}$]

t – czas naświetlania próbki (5, 10, 15... min) [s]

Zmianę stężenia uracylu oznacza się wykorzystując widma absorpcji wykonane po odpowiednim czasie naświetlania. Ze względu na niskie stężenie uracylu w naświetlanym roztworze ($c \sim 0,12 \times 10^{-3}\ mol/dm^3$) nie obserwuje się produktów fotodimeryzacji i fotoaddycji. Powstaje jedynie fotohydrat, który nie absorbuje promieniowania z zakresu 230–290 nm, co pozwala na wyznaczenie stężenia uracylu z pomiarów absorbancji w maksimum pasma absorpcji uracylu ($\lambda_{max} = 258\ nm$; $\epsilon_{258} = 8200\ dm^3\ mol^{-1}\ cm^{-1}$; dane wg G.D. Fasman, *Handbook of Biochemistry and molecular biology, Nucleic Acids*):

$$c = \frac{A_{258}}{\epsilon_{258} \cdot l} \quad (10)$$

c – stężenie uracylu [$mol\ dm^{-3}$]

l – długość drogi optycznej (cm)

A_{258} – absorbancja uracylu przy 258 nm

Natężenie promieniowania zaabsorbowanego przez roztwór uracylu I_a naświetlanego niskociśnieniową lampą rtęciową ($\lambda = 254\ nm$) można obliczyć według poniższego wzoru:

$$I_a = I_0 - I = I_0 \cdot \left(1 - \frac{I}{I_0}\right) = I_0 \cdot (1 - T_{254}) = I_0 \cdot (1 - 10^{-A_{254}}) \quad (11)$$

gdzie:

$$A_{254} = \log \frac{I_0}{I} \quad T_{254} = \frac{I}{I_0}$$

A_{254} – absorbancja przy $\lambda = 254\ nm$

T_{254} – transmitancja przy $\lambda = 254\ nm$

- I_0 – natężenie promieniowania padającego na próbkę [$\text{einstein dm}^{-3} \text{s}^{-1}$]
 I – natężenie promieniowania, które nie zostało zaabsorbowane przez próbkę (promieniowanie przepuszczone)

Jeżeli absorbancja próbki jest odpowiednio duża ($T_{254} < 0,1$), wówczas natężenie promieniowania zaabsorbowanego przez próbkę równe jest w przybliżeniu natężeniu promieniowania padającego na próbkę, którego wartość wyznacza się przy użyciu aktynometru.

Cel ćwiczenia

Celem ćwiczenia jest wyznaczenie wydajności kwantowej reakcji fotohydratacji uracylu podczas naświetlania jego wodnego roztworu w obecności powietrza promieniowaniem o długości fali 254 nm (niskociśnieniowa lampa rtęciowa).

Wykonanie ćwiczenia i opracowanie wyników

- 1) Przygotować 20 ml aktynometru szczawianowo-uranylowego (wodne roztwory $0,02 \text{ mol dm}^{-3} \text{UO}_2\text{SO}_4$ oraz $0,1 \text{ mol dm}^{-3} \text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$ w stosunku objętościowym 1:1).
- 2) Kuwetę z 2 ml aktynometru umieścić na ławie optycznej i naświetlać przez 30 min. wiązką światła o długości fali $\lambda = 254 \text{ nm}$.
- 3) Pobrać 0,5 ml nie naświetlonego roztworu aktynometru, dodać 1 ml H_2SO_4 o stężeniu $c = 1 \text{ mol dm}^{-3}$ i ogrzewając roztwór miareczkować go za pomocą roztworu KMnO_4 o stężeniu $c = 0,001 \text{ mol dm}^{-3}$ aż do uzyskania bladoróżowej barwy. Miareczkowanie powtórzyć trzykrotnie.
- 4) Miareczkowanie (jak w punkcie 3) wykonać dla naświetlonego roztworu aktynometru.
- 5) Zmierzyć widmo absorpcji wodnego roztworu uracylu o przybliżonym stężeniu $c \sim 0,12 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ w zakresie 220–320 nm wobec wody jako odnośnika i na jego podstawie, korzystając ze wzoru (10), obliczyć c_0 .
- 6) Kuwetę pomiarową z 2 ml roztworu uracylu naświetlać wiązką światła o $\lambda = 254 \text{ nm}$. Po 2 min naświetlania zarejestrować widmo absorpcji i kontynuować naświetlanie. Rejestrować widma absorpcji co 2 min. Zakończyć naświetlanie po ok. 20 min (gdy A_{258} spadnie do ok. 40% wartości początkowej).
- 7) Z zarejestrowanych widm absorpcji odczytać wartość absorbancji przy 254 nm (A_{254}) i 258 nm (A_{258}), a odczytane wartości zebrać w tabeli 1.
- 8) Korzystając ze wzoru (8) oraz wyników miareczkowania naświetlonego i nie naświetlonego roztworu szczawianu uranylu obliczyć wartość I_0 .
- 9) Korzystając z równania (10) obliczyć wartości c_t , a następnie Δc i umieścić je w tabeli.
- 10) Obliczyć wartości transmitancji przy 254 nm dla roztworu uracylu po różnym czasie naświetlania.

- 11) Posługując się wzorem (11) obliczyć natężenie I_a promieniowania zaabsorbowanego przez roztwór uracylu po różnym czasie naświetlania. Jeśli transmitancja roztworu $T_{254} < 0,1$, uznać, że $I_a \approx I_0$.
- 12) W oparciu o wzór (9) obliczyć wydajność kwantową reakcji fotohydratacji uracylu dla poszczególnych czasów naświetlania. Otrzymane wydajności kwantowe uśrednić.

Tabela 1

t [min]	A_{258}	c_t [mol dm ⁻³]	Δc [mol dm ⁻³]	A_{254}	T_{254}	I_a [einstein dm ⁻³ s ⁻¹]	$\Phi_{uracylu}$
0							
2							
4							
6							
8							
10							
12							
14							
16							
18							
20							

LITERATURA

- [1] S. Paszyc, *Podstawy fotochemii*, PWN, Warszawa 1992.
- [2] A. Barltrop, J.D. Coyle, *Fotochemia – podstawy*, PWN, Warszawa 1987
- [3] P. Suppan, *Chemia i światło*, PWN, Warszawa 1997.
- [4] W. Szczepaniak, *Metody instrumentalne w analizie chemicznej*, PWN, Warszawa, 1996.
- [5] L. Celewicz, *Reakcje fotochemiczne pochodnych zasad pirymidynowych*, Wydawnictwo Naukowe UAM, Poznań 1999.
- [6] S.L. Murov, J. Carmichael, G.L. Hug, *Handbook of Photochemistry*, Marcel Dekker, New York 1993.