

PRZEMIANY FOTOCHEMICZNE KWASU 5-ETYLOOROTOWEGO

Ewa Kulikowska, Zbigniew Zawadzki, David Shugar

Zakład Biofizyki Instytutu Fizyki Doświadczalnej Uniwersytetu  
Warszawskiego, 02-089 Warszawa, ul. Żwirki i Wigury 93

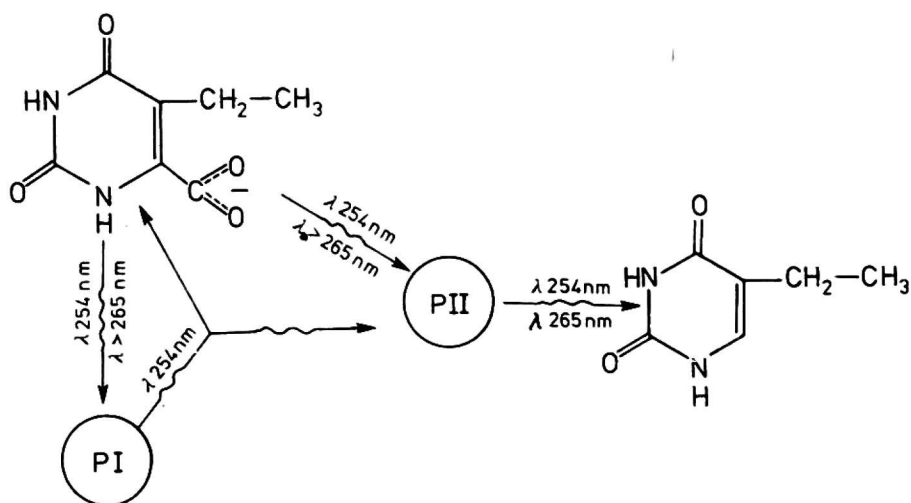
Zakład Biologii Molekularnej Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN,  
02-532 Warszawa, ul. Rakowiecka 36

5-metylo-2,4-dwuketopirymidyny, ich nukleozydy i nukleotydy naświetlane promieniowaniem UV w roztworach wodnych lub w matrycach lodowych ulegają reakcji fotochemicznej prowadzącej do wytworzenia 5,5'-6,6' dimerów cyklobutanowych [6, 8]. Zastąpienie grupy metylowej podstawionej do pierścienia w pozycji C<sub>5</sub> grupą etylową, lub dłuższym podstawnikiem alkielowym sprawia, że dominującą reakcją fotochemiczną tych związków jest wewnątrzcząsteczkowa cyklizacja wokół wiązania C<sub>5</sub>-C<sub>6</sub> prowadząca do powstania odpowiedniej 5,6-dwuhydro-5,6-cyklobutanylo pochodnej [2,5,7]. Ta ostatnia, będąc najbliższym analogiem strukturalnym fotodimeru pirymidynowego, podobnie jak on ulega fotodysocjacji z wysoką wydajnością kwantową, co prowadzi do powstania dealkilowanej pochodnej pirymidynowej i odpowiedniego alkeny. Kwas 5-etyloorotowy naświetlany promieniowaniem UV nie ulega ani reakcji fotodimeryzacji, jak kwas orotowy i 5-metyloorotowy [6], ani fotocyklizacji, jak 5-etylouracyl i jego rybozyd [5].

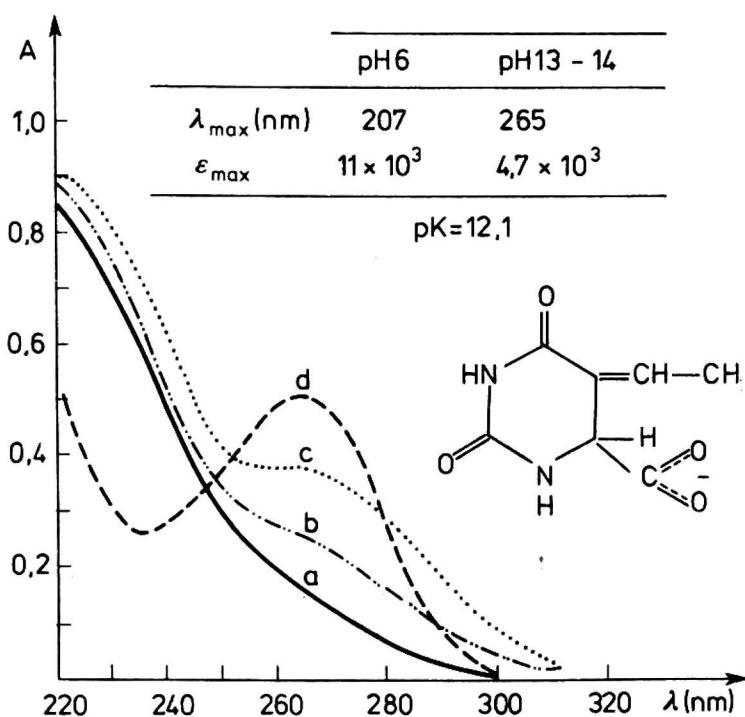
WYNIKI I DYSKUSJA

Kwas 5-etyloorotowy w 10<sup>-4</sup> M, w niebuforowanym roztworze wodnym naświetlany promieniowaniem UV  $\lambda$  254 lub  $\lambda > 265$  nm wykazuje spadek gęstości optycznej w głównym, długofalowym paśmie absorpcji przy 273 nm, z początkową wydajnością kwantową  $\phi_{254\text{nm}} = 0,03$ . Fakt ten związany jest (jak wykazano metodą t.l.c) z powstawaniem dwóch słabo absorbujących fotoproduktów pośrednich, nazwanych ro-

boczo PI i PII (rys. 1). Wyczerpująca fotoliza prowadzi do pojawiania się w roztworze 5-etylouracylu, który jest jednym z fotoproduktów końcowych, a powstaje w wyniku dalszej przemiany fotochemicznej fotoproduktu PII. Drugim fotoproduktem końcowym jest wyjściowy kwas 5-etyloorotowy, bowiem naświetlanie PI promieniami  $\lambda$  254 nm powoduje jego przemianę w mieszaninę kwasu 5-etyloorotowego i PII [3].



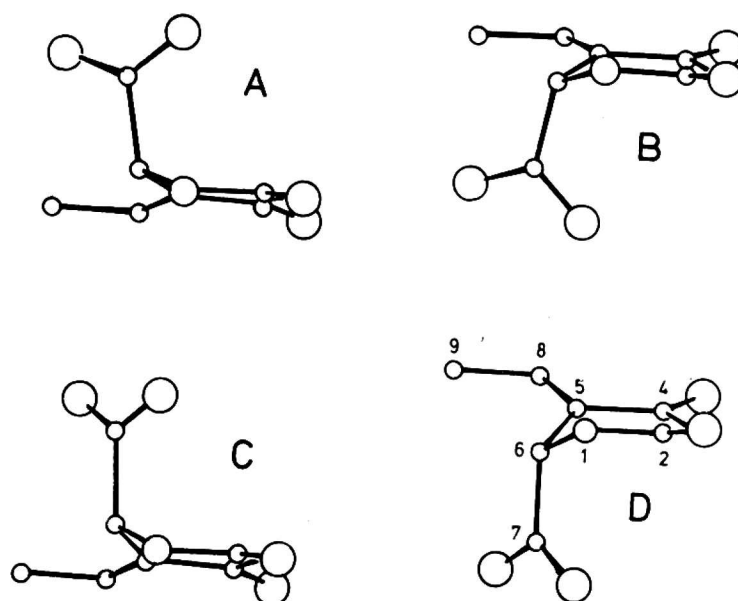
Rys. 1. Schemat przemian fotochemicznych kwasu 5-etyloorotowego w obojętnym roztworze wodnym



Rys. 2. Widma absorpcji w UV fotoproduktu P II - kwasu 5-etylidenuracilu; a - widmo w pH 7; b - widmo w pH 12; c - widmo w pH 13-14; d - krzywa absorpcji pojawiającej się po naświetleniu P II w pH 7 promieniami UV  $\lambda$  254; krzywa d jest identyczna z widmem absorpcyjnym 5-etylouracylu w pH 7

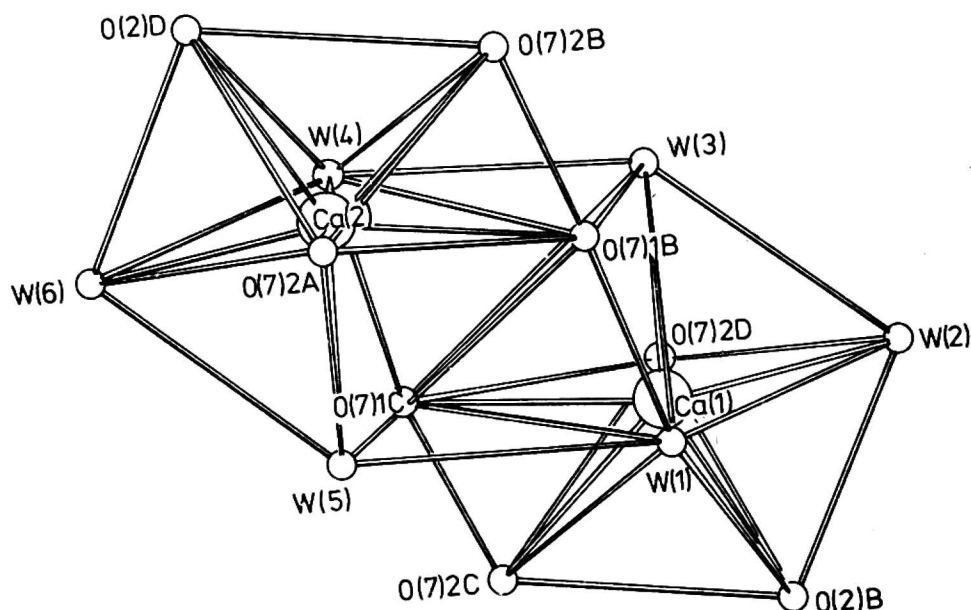
Celem ustalenia struktury fotoproduktów PI i PII wyodrębniono je na skalę preparatywną (stężenie  $10^{-2}$  M/l, UV  $\lambda > 265$  nm, t.l.c na żelu krzemowym, solwent: MeOH-CHCl<sub>3</sub> 1:1, wydajność ok. 5%), doprowadzono do stanu wysokiej czystości, a następnie otrzymano w postaci kryształów odpowiednich do badań rentgeno-strukturalnych.

Na podstawie charakteru widm absorpcji w UV (rys. 2) i innych własności fizykochemicznych oraz w wyniku badań rentgenostrukturalnych ustalono strukturę PII, jako kwasu 5-etylidenhydroorotowego, będącego produktem wewnątrzcząsteczkowego przegrupowania fotochemicznego kwasu 5-etyloorotowego. Powrotne przegrupowanie fotochemiczne połączone z dekarboksylacją, a prowadzące do powstania 5-etylouracylu (rys. 2) przebiega z wydajnością kwantową  $\phi_{254\text{nm}} = 0,20$  i przy zachowaniu punktu izosbestycznego przy 250 nm [3]. Kryształy soli wapniowej PII powstają w układzie jednoskośnym i zawierają 4 cząsteczki, 2 kationy i 3 cząsteczki wody na jednostkę asymetryczną [1].

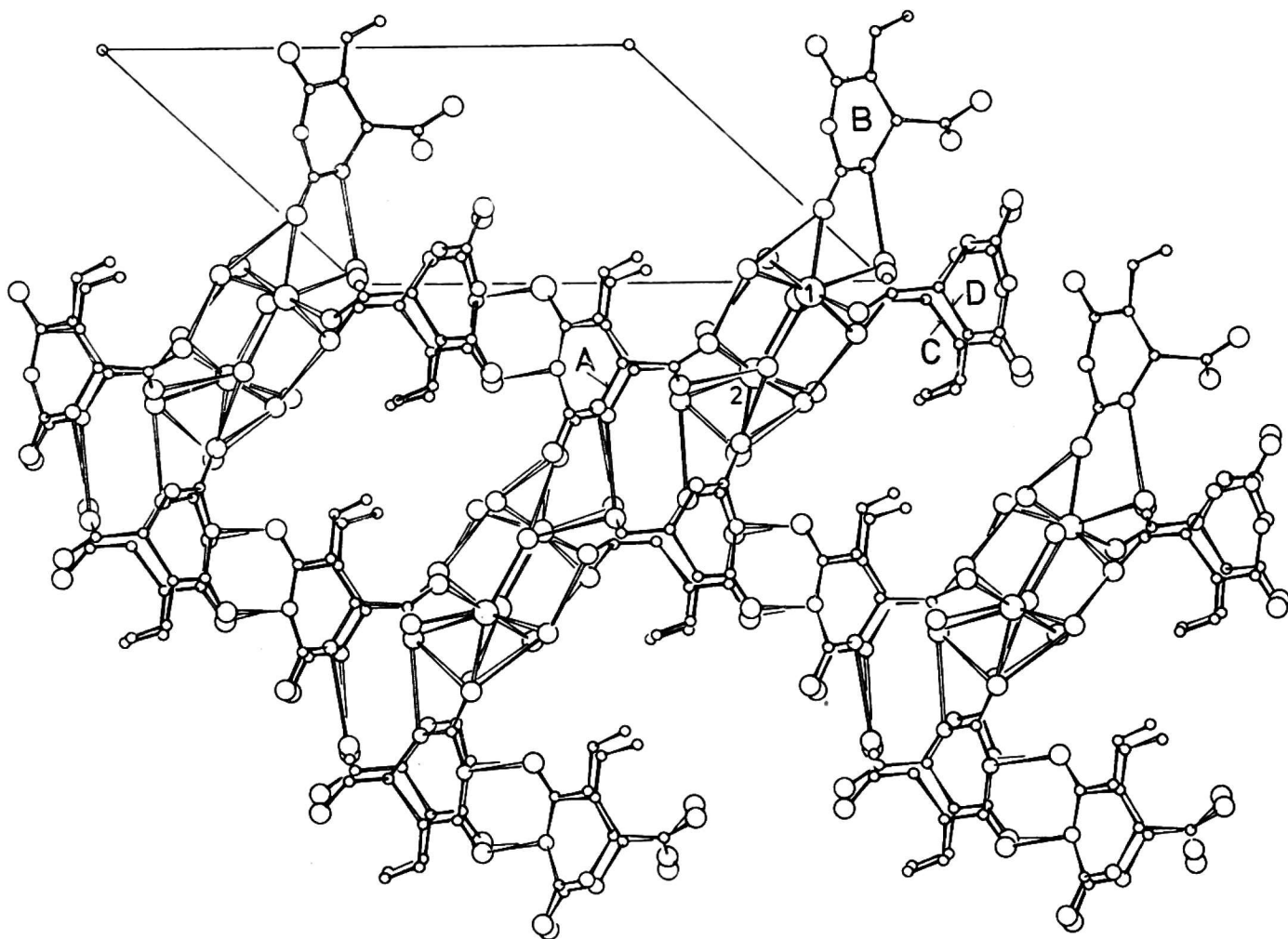


Rys. 3. Położenie dwóch par (A/B i C/D) enancjomerycznych cząsteczek kwasu 5-etylidenhydroorotowego w jednostce asymetrycznej kryształu soli wapniowej; małe kółko = C, duże kółko = O; rzut na płaszczyznę przechodzącą przez atomy N<sub>3</sub>, C<sub>6</sub> i C<sub>7</sub>

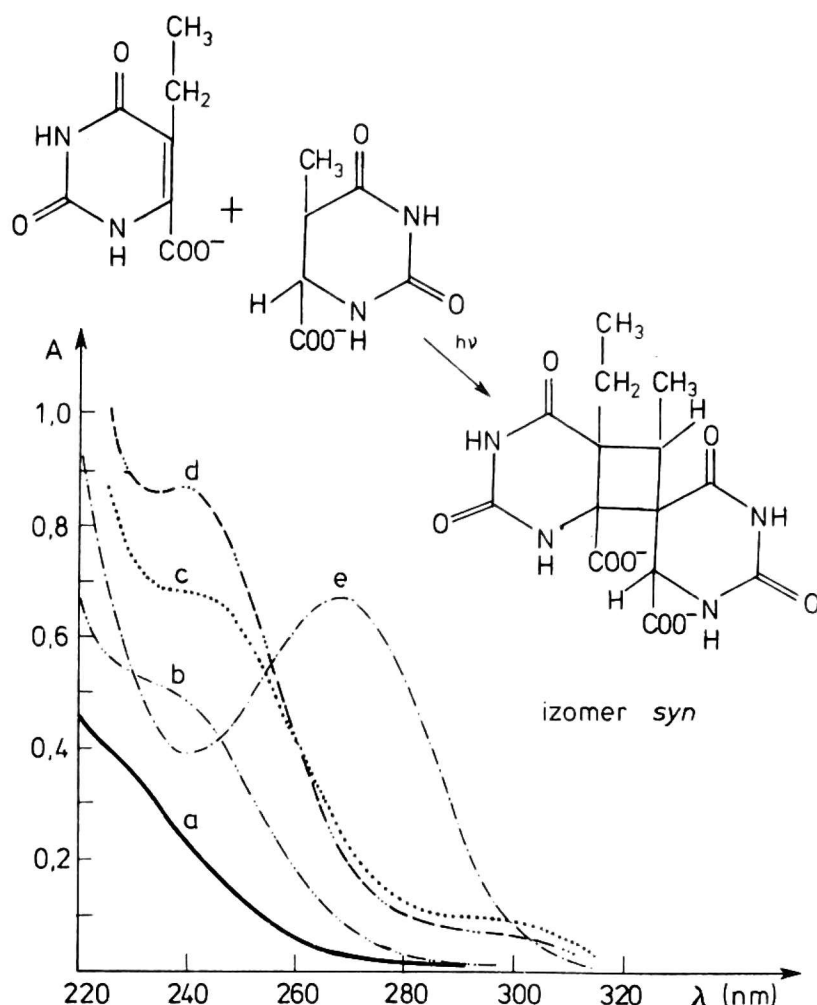
Strukturę PI ustalono na podstawie jego własności fizykochemicznych, a w szczególności: widm absorpcji w UV (rys. 6), cechy rewersji fotochemicznej ( $\phi_{254\text{ nm}} = 0,28$ ) do mieszaniny PII i kwasu 5-etyloorotowego oraz widm <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR. PI posiada strukturę nietypowego dimeru cyklobutanowego (syn lub anti), powstałego w wyniku wysycenia wiązania podwójnego C<sub>5</sub>-C<sup>B</sup> PII [4]. Tlen cząstecz-



Rys. 4. Układ przestrzenny wiązań koordynacyjnych wiążących dwa jony  $\text{Ca}^{2+}$  z atomami tlenu należącymi do wody (W) i do czterech cząsteczek (A, B, C i D) kwasu 5-etylidenuhydroorotowego w kryształce jego soli wapniowej



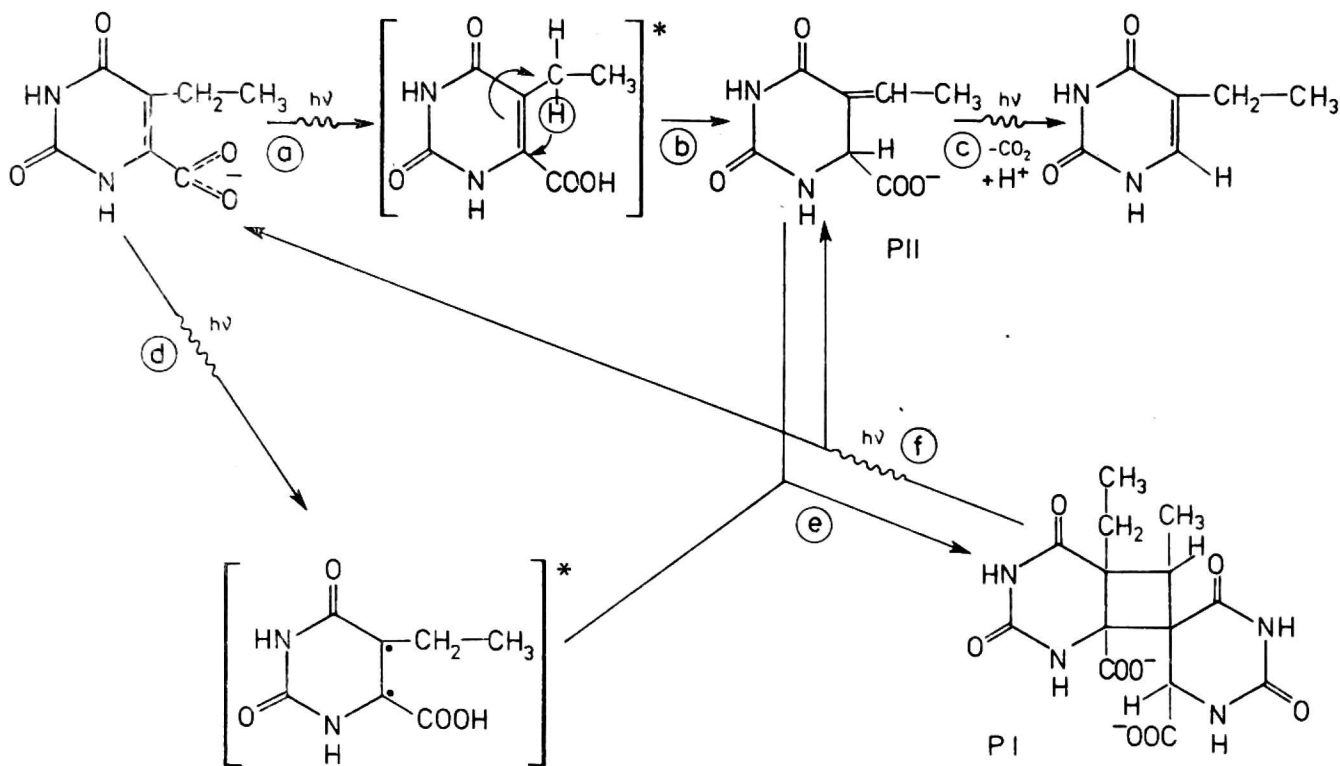
Rys. 5. Struktura kryształu soli wapniowej kwasu 5-etylidenuhydroorotowego; przemienny układ rejonów o charakterze hydrofilowym (jony  $\text{Ca}^{2+}$  i cząsteczki wody) i „kieszoni hydrofobowych” (rejonów grup etyldenowych)



Rys. 6. Widma absorpcji w UV fotoproduktu P I - dimeru mieszanego P II i kwasu 5-etyloorotowego; a - widmo w pH 7; b - widmo w pH 12; c - widmo w pH 13; d - widmo w pH 14; e - krzywa absorpcji pojawiającej się po naświetleniu PI w pH 7 promieniowaniem UV  $\lambda$  254nm krzywa e jest identyczna z widmem w pH 7 mieszaniny 1:1 5-etyloorotylicy i kwasu 5-etyloorotowego

kowy obecny w naświetlanym roztworze kwasu 5-etyloorotowego hamuje powstawanie PI, natomiast nie wpływa na wydajność PII. Może to stanowić wskazówkę, że kontrolowana dyfuzyjnie fotodimeryzacja prowadząca do PI, również i w tym przypadku przebiega przy udziale długożyjącego stanu wzbudzonego trypletowego, natomiast wewnętrzcząsteczkowe przegrupowanie prowadzące do PII - przy udziale stanu wzbudzonego singletowego.

Rysunek 7 przedstawia proponowany pełny schemat przemian fotochemicznych kwasu 5-etyloorotowego. Jeden z możliwych mechanizmów przegrupowania do PII obejmować może migrację jonu wodorowego  $H^+$  od  $C_{\alpha}$  grupy etylowej na atom  $C_6$  pierścienia pirymidynowego, z równoczesnym przemieszczeniem jednej pary elektronowej wiązania  $C_5-C_6$  w kierunku  $C_{\alpha}$ . Mechanizm taki wydaje się możliwy w świetle faktu, że kwasowość aromatycznych kwasów karboksylowych w stanach



Rys. 7. Pełny schemat fotochemicznych przekształceń kwasu 5-etylorotowego; reakcja a-b - przegrupowanie fotochemiczne, reakcja c - przegrupowanie połączone z dekarboksylacją, reakcja d - wytworzenie prekursora rodnikowego, reakcja e - nietypowa fotodimeryzacja, reakcja f - fotodysocjacja dimeru

wzbudzonych jest o 6-8 rzędów wielkości mniejsza niż w stanie podstawowym.

Prekursorami dimeru PI są najprawdopodobniej: cząsteczka PII w stanie podstawowym i cząsteczka kwasu 5-etylorotowego w stanie wzbudzonym, prawdopodobnie o charakterze dwurodnika, na co wskazują dwa fakty doświadczalne:

- naświetlania roztworu kwasu 5-etylorotowego w obecności ekwimolarnego stężenia PII prowadzi do wydatnego wzrostu wydajności chemicznej PI w porównaniu z roztworem nie zawierającym PII przed naświetleniem;

- stosunek ilościowy PI/PII w fotolizacie kwasu 5-etylorotowego nie ulega zmianie w warunkach doświadczalnych, w których cząsteczki PII prawie nie ulegają wzbudzeniu.

Badania rentgenostrukturalne - W. Saenger i B. Hingerty, Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin, Göttingen, RFN. Mikrometody:  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR - I. Miura i K. Nakanishi, Columbia University, New York, USA.

## LITERATURA

1. Hingerty B., Kulikowska E., Saenger W., Shugar D.: Z. Naturforsch., 31c, 518, 1976
2. Krajewska E., Shugar D.: Science, 173, 435, 1971
3. Kulikowska E., Hingerty B., Saenger W., Shugar D.: Z. Naturforsch., 31c ( 514, 1976
4. Kulikowska E., Miura I., Nakanishi K., Zawadzki Z., Shugar D. w przygotowaniu do druku, 1981
5. Pietrzykowska I., Shugar D.: Science, 161, 1248, 1968
6. Sztumpf-Kulikowska E., Shugar D.: Photochem. Photobiol., 4, 719, 1965
7. Sztumpf-Kulikowska E., Shugar D.: Acta Biochim. Polon., 21, 73, 1974
8. Śmietanowska A., Shugar D.: Bull. Acad. Sci. CIII., 9, 375, 1961

Э. Куликовска, З. Завадски, Д. Шугар

## ФОТОХИМИЧЕСКИЕ ПРЕВРАЩЕНИЯ 5-ЭТИЛОРОВОЙ КИСЛОТЫ

## Р е з ю м е

В результате облучения водных растворов 5-этилоротовой кислоты ультрафиолетовым излучением образуются два переходных фотопродукта, структура которых изучалась при помощи физикохимических методов, особенно при помощи ультрафиолетовой спектроскопии, ядерного магнитного резонанса ( $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$ ), а также рентгеноструктурного анализа. Один из этих фотопродуктов - 5-этиленгидрооротовая кислота - образуется в результате внутримолекулярной фотохимической перегруппировки исходного соединения.

Дальнейшее облучение этого фотопродукта связано с обратной перегруппировкой и с процессом декарбоксиляции, в результате чего образуется 5-этилурацил с квантовым выходом  $\Phi_{245} = 0,20$ .

Второй фотопродукт является нетипическим циклобутановым фотодимером, образуемым в результате насыщения связи  $\text{C}_5 - \text{C}_6$  в молекулах 5-этилоротовой кислоты и экзоциклической связи  $\text{C}_5 - \text{C}^8$  в молекулах 5-этиленгидрооротовой кислоты. Облучение этого димера в водном растворе связано с его фотодиссоциацией (с квантовым выходом  $\Phi_{245} = 0,28$ ), ведущей к смеси мономеров, составляющих димер. В работе обсуждаются возможные механизмы этих фотохимических превращений.

E. Kulikowska, Z. Zawadzki, D. Shugar

## PHOTOCHEMICAL TRANSFORMATIONS OF 5-ETHYLOROTIC ACID

## S u m m a r y

Ultraviolet irradiation of 5-ethylorotic acid in aqueous medium led to transformation of the compound to two intermediary photoproducts. The structures of these products were established with the aid of physico-chemical methods: UV,  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy and X-ray diffraction. One of the photoproducts, formed via an intramolecular rearrangement, was 5-ethylidenehydroorotic acid. On further UV irradiation, the product underwent back rearrangement and decarboxylation to 5-ethyluracil (quantum yield  $\phi_{254} = 0,20$ ).

The second photoproduct was identified as a non-typical cyclobutane photodimer formed by saturation of the  $\text{C}_5 - \text{C}_6$  bond of the parent 5-ethylorotic acid and the exocyclic  $\text{C}_5 - \text{C}^8$  bond of 5-ethylidenehydroorotic acid. On UV irradiation in aqueous medium, the heterodimer underwent photodissociation to two parent monomers ( $\phi_{254 \text{ nm}} = 0,28$ ). The probable mechanism of these photochemical transformations are discussed.