

УДК 547;542.06;541.65/654

**Арилиденные производные дициклопентано[b,e]пиридинов – новый класс
флуоресцентных рН-индикаторов с высоким разделением полос в спектре**

В.Ф. Валуик, В.Г. Пивоваренко, А.В. Григорович*, А.О. Дорошенко*

Киевский национальный университет имени Тараса Шевченка, химический
факультет, кафедра органической химии.

01033 Украина, Киев, ул. Владимирская, 64. E-mail: pvg@univ.kiev.ua

* Институт химии при Харьковском национальном университете им. В.Н. Каразина.

61077 Украина, Харьков, Пл. Свободы, 4.

Флуориметрический метод определения рН широко применяется на практике в научных исследованиях химического, биохимического и физиологического характера. Два последние направления из перечисленных обуславливают высокую потребность в флуоресцентных индикаторах, предназначенных для работы в области «биологических» значений рН – от 5 до 8. На настоящий момент предлагается для практического применения несколько типов таких индикаторов [1], подавляющее большинство которых относится к классу ксантеновых люминофоров: производных флуоресцеина, нафтофлуоресцеина или семинафтородамина [2]. Мониторинг кислотно-основных характеристик среды с их использованием основан на интенсометрическом принципе, согласно которому водородный показатель (рН) определяется путем измерения интенсивности флуоресценции на одной длине волны. И только отдельные индикаторы имеют две полосы в спектре испускания, принадлежащие свободной и протонированной формам [2,3]. Подобные индикаторы способны работать по ратиометрическому принципу определения рН – путем измерения соотношения интенсивности флуоресценции на двух или большем числе аналитических длин волн.

Ратиометрический метод измерения показателя рН имеет ряд решающих преимуществ, главное из которых состоит в том, что результат измерений не зависит от формы, объема и размеров аналитической ячейки, а также от концентрации индикатора и вязкости среды, поскольку измеряется не абсолютная интенсивность сигнала, а соотношение интенсивностей на нескольких длинах волн. Вследствие этого появляется возможность анализа объектов переменных или неопределенных размеров, объектов с переменной вязкостью среды и т.п. – начиная от отдельных клеток и клеточных органелл вплоть до объектов водного пространства планеты.

В этом аспекте синтезированные нами недавно арилиденовые производные дициклопентано[b,e]пиридинов [4,5] представляют значительные перспективы. Показано, что положение полосы флуоресценции представителей этого класса существенно изменяется при образовании водородной связи с растворителем.

Поскольку протонирование органических молекул всегда вызывает в несколько раз более сильные спектральные эффекты, нежели образование водородной связи, для дициклопентано[b,e]пиридинов следует ожидать еще более значительных спектральных эффектов при протонировании. Учитывая свойства известных рН-индикаторов пиридинового ряда [3] можно предвидеть, что протонирование дициклопентано[b,e]пиридинов будет происходить в пределах значений рН от 5 до 6. По нашим предварительным оценкам, увеличенная длина сопряженной системы в молекулах дициклопентано[b,e]пиридинов должна привести к увеличению их молярного коэффициента поглощения, к смещению максимума поглощения молекулы в видимую область, а максимума флуоресценции – в красную область спектра. Введение электронодонорных заместителей в *пара*-положение арильных остатков позволит регулировать электронную плотность на атоме азота пиридинового ядра и, следовательно – его основность.

Цель настоящей работы – спектрофотометрическое и флуориметрическое исследование кислотно-основных свойств синтезированных нами дициклопентано[b,e]пиридинов и установление взаимосвязи между строением и спектральными свойствами соединений этого класса.

Экспериментальная часть

Дициклопентано[b,e]пиридины **1a-i** были получены в условиях [5]. После выделения и очистки они представляли собой кристаллические вещества желтого цвета, хорошо растворимые в хлороформе, ДМСО, уксусной кислоте и спиртах. Спектры ^1H - и ^{13}C -ЯМР соединений **1a-i** (измерены на спектрометре Varian Mercury-400) полностью соответствуют их строению. Контроль за чистотой образцов производился методом ТСХ на силикагеле-60, F-254, 5x15 см (Selecto Scientific, USA) в смеси хлороформ-метанол (98:2, 9:1, 85:15, v/v), с использованием УФ-детектора, оборудованного фильтрами пропускания на 254 и 356 нм.

Квантово-химические расчеты геометрии соединений **1a-i** выполнены полуэмпирическим методом AM1 [6] с использованием программы MOPAC 6.0 [7].

Растворители для спектрофотометрических исследований очищали по методике [8]. Спектры поглощения измерены на спектрофотометре HITACHI U-3210, спектры флуоресценции - на спектрофлуориметре HITACHI F-4010. Квантовые выходы флуоресценции (φ_f) определяли относительно раствора флуоресцеина в карбонатном буфере ($\varphi_f=0,85$ [9]) и раствора гидросульфата хинина в 0,05 М серной кислоте ($\varphi_f=0.55$ [10]). Все измерения производились в изотермической кювете при температуре $20\pm 0,1$ °С.

Константы протонирования измерены в смеси вода-этанол (80% этанола, v/v). Для измерений pH использовался иономер универсальный ЭВ-74, откалиброванный по стандартным водным буферным растворам, к показаниям которого прибавлялась поправка в 0,2 ед. pH согласно [11]. Для проведения титрования готовился раствор, содержащий свободную форму исследуемого соединения с концентрацией ($1\cdot 10^{-5}$ моль/л), и серия растворов с той же концентрацией соединения, отличающихся на 2-3 единицы pH. Вариация кислотно-основных характеристик среды производилась путем смешивания определенных количеств приготовленных растворов, после чего измерялся показатель pH раствора, спектры поглощения и флуоресценции.

Результаты и обсуждение

Геометрия молекул дициклопентано[b,e]пиридинов и их основность. Согласно результатам квантово-химических расчетов, а также – конформационного анализа структуры по данным ^1H -ЯМР, УФ-спектроскопии и флуориметрии [5], молекулы **1a-g** в растворах непланарны, за исключением соединений с пятичленными боковыми циклами **1h,i** (для последних в растворах характерна плоская конформация). Вследствие пространственного отталкивания атомов ароматические циклы арилиденовых остатков разворачиваются на угол $35-45^\circ$, из-за чего их сопряжение с центральным пиридиновым ядром ухудшается. Еще более тесным является пространственное окружение ароматического цикла в положении 8, которое вызывает его разворот на угол до $60-70^\circ$. Полученные конформационные состояния позволяют предсказать степень электронного влияния заместителей в

боковых ядрах молекул **1a-i** на пиридиновое ядро, а с этим – и на спектральные и кислотно-основные свойства исследуемых соединений.

В пространственном строении молекул **1a-i** существует еще одна особенность, которая должна существенно отразиться на их кислотно-основных свойствах. Атомы водорода метиновых групп в значительной степени экранируют доступ к атому азота – центру протолитических взаимодействий (см. схему). По данным квантово-химических расчетов расстояние между указанными атомами $r_{H...N}$ составляет $\sim 4\text{Å}$. Для свободного размещения в пространстве между ними еще одного атома водорода $r_{H...N}$ должно быть не менее $4,8\text{Å}$. Следовательно, процесс протонирования атома азота будет связан с дополнительными энергетическими затратами как на изменение конформации молекулы, так и на освобождение протона от сольватной оболочки. Подобное экранирование атома азота должно повлиять на общую основность соединений **1a-i**, существенно понизив ее.

Спектры поглощения. Появление новой полосы как в спектрах поглощения так и в спектрах флуоресценции свидетельствует о протонировании соединений **1a-i** при понижении pH среды (Таблица 1). По сравнению со свободным основанием, максимум поглощения протонированной формы смещен в длинноволновую область на 60-140 нм ($3500-5500\text{ см}^{-1}$). Природа заместителя в ароматических ядрах оказывает существенное влияние на спектр поглощения. Электронодонорные заместители вызывают длинноволновое смещение полос свободной, и в еще большей степени – протонированной формы. Кроме того, они повышают pK_a кислотно-основного перехода более чем на 3 единицы: от 2,51 для **1a** и 3,58 для **1b** до 5,82 для **1f** (Рис. 1). Как можно убедиться при сравнении свойств метокси- и ацетоксипроизводных (**1b** и **1c**) уменьшение π -донорности заместителя существенно не влияет на спектральные характеристики обсуждаемых соединений, однако значительно уменьшает константу протонирования: от 3,58 для **1b** до 2,05 для **1c**. При наличии в молекулах гидроксигруппы, способной к диссоциации в щелочной среде (соединение **1d**), наблюдается дополнительный кислотно-основный переход с $pK_a=10,28$.

Привлекают внимание заниженные на 2-3 единицы значения pK_a всех исследованных соединений в сравнении с известными индикаторами на основе пиридинов [3]. Ожидалось, что величины pK_a будут в пределах значений от 5 (когда R = фенил) до 7 (в случаях соединений с электронодонорными заместителями в боковых кольцах). Вероятно, что наблюдаемое понижение точки кислотно-основного перехода вызвано вышеупомянутым пространственным блокированием атома азота соединений **1a-i** при протонировании.

Спектры флуоресценции. Протонирование соединений **1a-i** ведет к существенному снижению энергии их возбужденного состояния и к батохромному смещению полосы флуоресценции (Табл. 1). Вследствие этого протонированные формы **2b**, **2e-g** и **2i** флуоресцируют в красной области спектра. Для соединений **1d-g** смещение достигает 130 нм (4000 см^{-1}). Наличие изоэмиссионных точек свидетельствует о том, что в кислотно-основном равновесии принимают участие только две формы – нейтральная **1a-i** и монопротонированная **2a-i**.

Степень изменения pK_a при переходе в возбужденное состояние (ΔpK^*) можно оценить по методу Ферстера [12], исходя из смещения 0-0 перехода в электронном спектре ($\Delta\nu_{00}$), вызванного кислотно-основными взаимодействиями:

$$pK^* = pK - 0.625 \cdot \Delta\nu_{00}/T.$$

Точность, обеспечиваемая данной методикой, в большой степени зависит от соблюдения равенства изменения энтропии в основном и возбужденном состояниях при протонировании, а также от возможности корректной оценки энергии электронного перехода. В последнем случае наилучшим приближением является полусумма положений спектров поглощения и флуоресценции.

Согласно произведенным расчетам, основность соединений **1a-i** в S_1 -состоянии должна увеличиваться на 7-9 единиц pH, а флуоресценция их протонированных форм - наблюдаться уже в слабощелочной среде (Табл. 1). Однако, результаты, полученные в эксперименте, не подтверждают расчетных данных. Значения pK^* для исследуемых соединений в S_1 состоянии, оцененные по данным флуориметрического титрования, оказались близкими к

спектрофотометрическим рК, отражая протолитические взаимодействия в S_0 состоянии (Рис. 1). Это почти на 6-8 единиц ниже оценок по методу Ферстера. Что является причиной столь значительных расхождений? Возможно, уменьшенная стерическая доступность центра кислотно-основных взаимодействий соединений **1a-i** – пиридинового атома азота, играет в короткоживущем возбужденном состоянии намного более весомую роль, чем в основном. Этот фактор может обусловить неравенство изменения энтропии при протонировании исследуемых соединений в S_0 и S_1 состояниях, что делает невозможным применение формулы Ферстера. Полученные результаты свидетельствуют, что изменение флуоресцентных характеристик соединений **1a-i** при варьировании рН отражает их прототропные превращения в основном состоянии.

Стоксовы сдвиги полос флуоресценции оснований **1a-i** превышают значения таковых для протонированных форм **2a-i** (Рис. 1). В случае диалкиламинопроизводных **1e,f** и **2e,f** эта разница достигает значений 2200-2800 см^{-1} , в то время как для других соединений она не выходит за пределы 700 см^{-1} . Данный факт свидетельствует о дополнительных релаксационных процессах, происходящих в возбужденном состоянии молекул **1e,f**, которые связаны с существенным внутримолекулярным переносом заряда. Такие процессы характерны для большинства красителей, содержащих диалкиламиногруппу [13]. В то же время для нонаметоксипроизводного **1g**, содержащего три донорных заместителя в каждом боковом цикле, увеличенный стоксов сдвиг флуоресценции наблюдается для обеих форм – как свободной, так и протонированной, что указывает на иную причину его увеличения, нежели для **1e** и **1f**. Учитывая непланарность соединения **1g** в S_0 состоянии [5], можно утверждать, что в данном случае эффект дополнительной стабилизации S_1 состояния путем уплощения молекулы вызывает увеличение стоксова сдвига [14].

Квантовые выходы флуоресценции протонированных форм **2a-i** несколько ниже, чем для оснований **1a-i**, что является результатом сближения уровней энергии S_1 и S_0 состояний при протонировании и связанным с этим возрастанием скорости

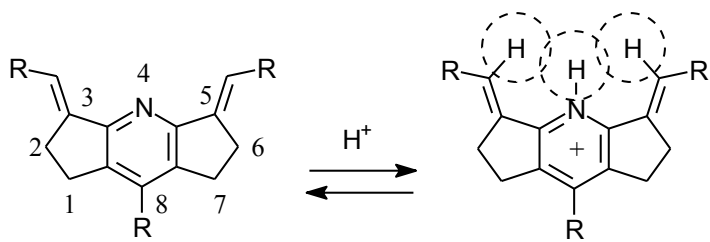
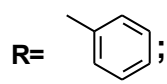
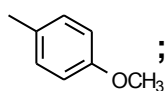
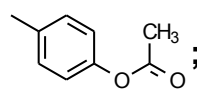
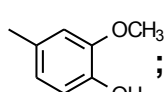
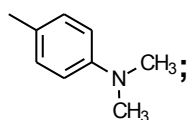
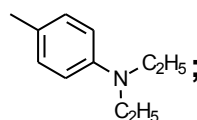
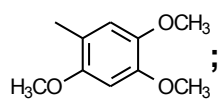
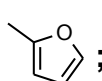
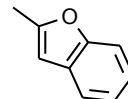
внутренней конверсии, которая в значительной степени регулируется разницей энергии основного и возбужденного состояний [15].

Таким образом, нами показана возможность регулирования в широких пределах как кислотно-основных, так и флуоресцентных свойств нейтральной и протонированной форм дициклопентано[b,e]пиридинов путем изменения π -донорности боковых ароматических циклов молекулы. Вследствие стерических препятствий, возникающих при протонировании пиридинового атома азота, константы протонирования в основном и возбужденном состоянии каждого из соединений имеют близкие значения. Благодаря значительному разделению полос нейтральной и протонированной форм в спектрах поглощения и флуоресценции, дициклопентано[b,e]пиридины могут быть успешно использованы в устройствах для измерения кислотности среды с радиометрическим принципом регистрации аналитического сигнала.

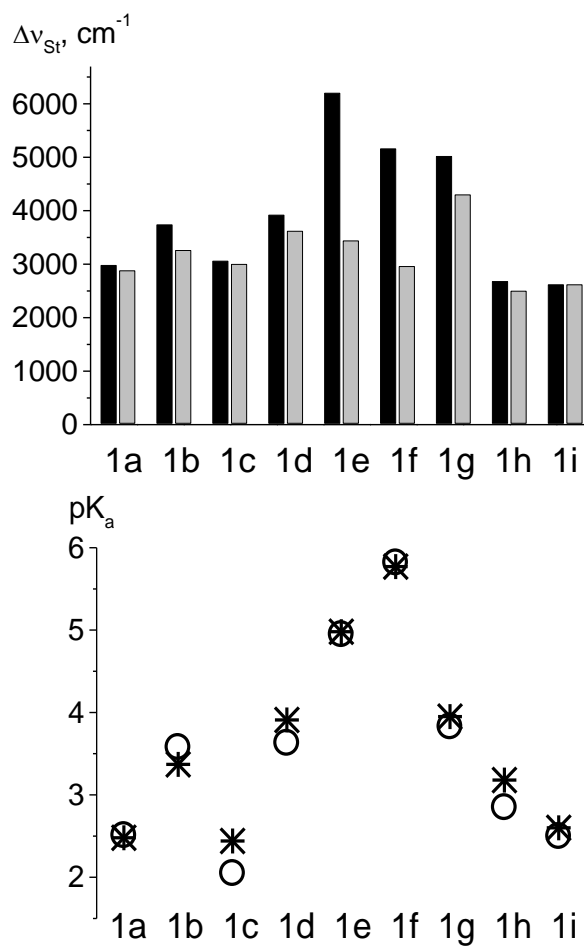
Литература

1. Richard P. Haugland. Handbook of Fluorescent Probes and Research Products. Eighth Edition, Molecular Probes, Inc., 1998.
2. Whitaker J. E., Haugland R. P., Prendergast F. G. // Anal. Biochem. – 1991. – 194.- P. 330-344.
3. Diwu Z., Chen C.S., Zhang C., Klaubert D. H., Haugland R. P. // Chem. Biol. – 1999. - 6. - P. 411-418.
4. Pivovarenko V. G., Grygorovych A. V., and Doroshenko A. O. In: VII Conference on Methods and Applications of Fluorescence Spectroscopy and Fluorescence Probes, Amsterdam, September // Book of Abstracts.-2001. – P. 153.
5. Pivovarenko V. G., Grygorovych A. V., Valuk V. F., and Doroshenko A.O. // J. Fluorescence. –2003. –13, №6. – P. 479-487.
6. Dewar M. J. S., Zebich E. G., Healy E. F. // J. Amer. Chem. Soc. – 1985. - №107.– P. 3902-3908.
7. Stewart J. P. P. MOPAC 6.0. - University of Texas, 1983.

8. Gordon A. J., Ford R. A. The chemist's companion. A handbook of practical data, techniques and references. Wiley-Interscience. – New York-London-Sydney-Toronto, 1972.
9. Demas J. N., Crosby G. A. // J. Phys. Chem. – 1971. – 75. – С. 991-1025.
10. Doroshenko A. O., Kirichenko A. V., Mitina V. G., Ponomaryov O. A. // J. Photochem. Photobiol., A: Chem. – 1996. – 94. – С. 15-26.
11. Александров В. В. Кислотность неводных растворов. - X. : Вища школа, 1981. –152 с.
12. Forster T. // Z. Electrochem.- 1950.- Bd.54, № 1.- S.42-46
13. Grabowski Z. R., Rotkiewicz K., Rettig W. // Chem. Rev., 2003, V.103, P.3899-4031
14. Doroshenko A. O., Kirichenko A. V., Mitina V. G., Ponomaryov O. A. // J. Photochem. Photobiol., A: Chem. – 1996. – V. 94. – P. 15-26.
15. Doroshenko A. O., Pivovarenko V. G. // J. Photochem. Photobiol., A: Chem. – 2003. - V. 156. - № 1-3. - P.55-64.

**1a-i****2a-i****a****b****c****d****e****f****g****h****i**

В.Ф. Валюк, В.Г. Пивоваренко, А.В. Григорович, А.О. Дорошенко**
 Схема



В.Ф. Валюк, В.Г. Пивоваренко, А.В. Григорович, А.О. Дорошенко**

Рисунок 1. Вверху: стоксовы сдвиги флуоресценции $\Delta\nu_{st}$ свободной (черным) и протонированной форм (серым) соединений **1a-1i**. Внизу: константы протонирования соединений **1a-1i**, определенные методами спектрофотометрии ($^\circ$) и флуориметрии (*).

Таблица 1

**Спектральные свойства нейтральных и протонированных форм,
кислотно-основные характеристики соединений 1a-1i**

Соединение	Спектры поглощения		Спектры флуоресценции				
	ν , см^{-1}	pK	ν , см^{-1}	$\Delta\nu_{\text{St}}$, см^{-1}	ϕ	pK*	$\Delta\text{pK}^{\text{F}}$
1a	25660		22680	2980	0.36		
2a	22160	2.51±0.02	19280	2880	0.25	2.48±0.02	6.9
1b	24820		21080	3740	0.28		
2b	20540	3.58±0.02	17280	3260	0.16	3.37±0.01	8.7
1c	25540		22480	3060	0.35		
2c	21900	2.05±0.03	18900	3000	0.21	2.44±0.08	7.0
1d	24340		20420	3920	0.18		
2d	19820	3.63±0.01	16200	3620	0.007	3.91±0.01	9.2
**	22420	10.28±0.05	16080	6340	0.006	10.2±0.2	5.4
1e	23660		17460	6200	0.09		
2e	17860		14420	3440	0.02	4.98±0.02	9.7
1f	22680		17520	5160	0.11		
2f	17240	5.82±0.01	14280	2960	0.062	5.77±0.02	9.7
1g	24260		19240	5020	0.44		
2g	19520	3.83±0.01	15220	4300	0.011	3.95±0.01	9.2
1h	22980		20300	2680	0.37		
2h	19220	2.85±0.01	16720	2500	0.19	3.18±0.03	7.9
1i	21980		19360	2620	0.46		
2i	18340	2.50±0.03	15720	2620	0.16	2.60±0.06	7.8

Примечание. ν - положение максимума в шкалах волновых чисел; pK – константа протонирования, определенная методом спектрофотометрического титрования, $\Delta\nu_{\text{St}}$ – стоксовый сдвиг полосы флуоресценции; ϕ - квантовый выход флуоресценции; pK* - константа протонирования, определенная методом флуориметрического титрования; $\Delta\text{pK}^{\text{F}}$ - константа протонирования в S_1 состоянии, определенная методом Ферстера. ** Данные для анионной формы соединения **1d**.

Подписи к рисункам

Рисунок 1.

Вверху: стоксовые сдвиги флуоресценции $\Delta\nu_{St}$ свободной (черным) и протонированной форм (серым) соединений **1a-i**. Внизу: константы протонирования соединений **1a-i**, определенные методами спектрофотометрии ($^{\circ}$) и флуориметрии (*).

Таблица 1

Спектральные свойства нейтральных и протонированных форм, кислотно-основные характеристики соединений **1a-i**

Арилиденовые производные дициклопентано[b,e]пиридинов – новый класс флуоресцентных рН-индикаторов с высоким разделением полос в спектре

Фамилии авторов

Киевский национальный университет имени Тараса Шевченка, химический факультет, кафедра органической химии:

Виктория Федоровна Валюк

Василий Георгиевич Пивоваренко

Вікторія Федорівна Валюк

Василь Георгійович Пивоваренко

Viktoria F. Valuk

Vasyl G. Pivovarenko

Институт химии при Харьковском национальном университете им. В.Н. Каразина:

Алексей Владиславович Григорович

Андрей Олегович Дорошенко

Олексій Владиславович Григорович

Андрій Олегович Дорошенко

Oleksiy V. Grygorovych

Andrey O. Doroshenko

В.Ф. Валюк, В.Г. Пивоваренко, А.В. Григорович, А.О. Дорошенко**

Аннотация

Батохромные сдвиги полос поглощения и испускания при протонировании дициклопентано[b,e]пиридинов достигают значений 3500-5500 см⁻¹. Обе формы - нейтральная и протонированная, характеризуются высокими квантовыми выходами флуоресценции. Спектральные и кислотно-основные свойства исследованного класса соединений можно регулировать в широких пределах путем введения электронодонорных заместителей в боковые ароматические ядра. Вследствие стерических препятствий, возникающих при протонировании пиридинового атома азота, константы протонирования в основном и возбужденном состоянии каждого из соединений имеют близкие значения.

Ключевые слова: дициклопентано[b,e]пиридины, флуоресцентные рН-индикаторы, электронные спектры поглощения и флуоресценции

Батохромні зсуви смуг поглинання та емісії при протонуванні дициклопентано[b,e]пиридинів досягають значень 3500-5500 см⁻¹. Обидві форми – нейтральна і протонувана характеризуються високими квантовими виходами флуоресценції. Спектральні та кислотно-основні властивості дослідженого класу сполук можна регулювати в широких межах шляхом введення електронодонорних замісників в бокові ароматичні ядра. Внаслідок стеричних перепон, які виникають при протонуванні піридинового атома азоту, константи протонування в основному та збудженому стані кожної зі сполук мають близькі значення.

Bathochromic shifts of absorption and emission bands at protonation of dicyclopenta[b,e]pyridines reach the values of 3500-5500 cm⁻¹. The both forms – neutral and protonated are characterized by high fluorescence quantum yields. Spectral and basic properties of studied compounds can be regulated in wide range by the insertion of electron donor substituents in side aromatic rings. Protonation constants in ground and excited state have close values for each of the compound as a result of steric hindrance appearing at the protonation of pyridine nitrogen atom.