

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

ПИВОВАРЕНКО ВАСИЛЬ ГЕОРГІЙОВИЧ

УДК 547.814+541.143+577.336

**СИНТЕЗ, БУДОВА І ВЛАСТИВОСТІ БАГАТОКАНАЛЬНИХ
ФЛУОРЕСЦЕНТНИХ ЗОНДІВ НА ОСНОВІ 1,3-ДІАРИЛІДЕНКЕТОНІВ,
ДИЦИКЛОПЕНТАНО[*b,e*]ПРИДИНІВ ТА 3-ГІДРОКСИХРОМОНІВ**

02.00.03 – органічна хімія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня доктора хімічних наук

КИЇВ – 2007

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана на кафедрі органічної хімії хімічного факультету Київського національного університету імені Тараса Шевченка

Офіційні опоненти: доктор хімічних наук, професор,
ЄРЕМЕНКО Ганна Михайлівна,
Інститут хімії поверхні НАН України, м. Київ,
провідний науковий співробітник

доктор хімічних наук,
ІЩЕНКО Олександр Олександрович,
Інститут органічної хімії НАН України, м. Київ,
завідувач відділом кольору і будови органічних сполук

доктор хімічних наук, професор,
КУТУЛЯ Лідія Антонівна,
Інститут монокристалів НАН України, м. Харків,
завідувач відділом оптично активних органічних сполук

Провідна установа: **Харківський національний університет
імені В.Н. Каразіна**, м. Харків

Захист відбудеться «___» _____ 200_ р. о ___ годині в ауд. _____ хімічного корпусу на засіданні спеціалізованої вченої ради Київського національного університету імені Тараса Шевченка за адресою: 01033, м. Київ, вул. Володимирська, 58.

З дисертацією можна ознайомитись у науковій бібліотеці Київського національного університету імені Тараса Шевченка за адресою: 01033, м. Київ, вул. Володимирська, 58.

Автореферат розісланий «___» _____ 200_ р.

Вчений секретар

спеціалізованої вченої ради, д.х.н., професор



І. В. Комаров

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Флуоресцентний зонд (ФЗ) є пристроєм для отримання адекватної інформації про об'єкт дослідження на молекулярному та субмолекулярному рівнях. Функції зонда зумовлені його фізико-хімічними властивостями і прямо залежать від його хімічної будови. Більшість існуючих ФЗ є одноканальними пристроями, які передають інформацію шляхом зміни одного параметру флуоресценції. Використання одного каналу призводить до втрати важливих даних про об'єкт. Зонди, робота яких основана на явищах внутрішньомолекулярного фотоперенесення заряду (ВФЗ) або внутрішньомолекулярного фотоперенесення протона (ВФП) демонструють суттєві переваги за кількістю та адекватністю переданої інформації, оскільки вони здатні генерувати багатоканальний сигнал. Явище ВФЗ покладене в основу найбільш ефективних зондів полярності та індикаторів катіонів. Число публікацій з вивчення та практичного застосування явищ ВФЗ та ВФП зараз стрімко зростає. 1,3-Діариліденкетони і дициклопентано[*b,e*]піридини є барвниками, що демонструють ВФЗ, а 3-гідроксихромони у розчинах здатні до ВФП. З розгляду шляхів їх синтезу, з аналізу будови та флуоресцентних властивостей окремих представників випливає, що згадані класи сполук є зручним базисом у розробці ФЗ. Проте досі у такому напрямі наукові дослідження систематично не велись.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Роботу було виконано на кафедрі органічної хімії хімічного факультету КНУ імені Тараса Шевченка в рамках договорів міжнародного наукового співробітництва: за програмою INTAS «Crowned ketocyanine dyes as a new generation of fluorescence probes sensitive to biomembrane surface potential» (грант 96-1225) – з університетом Поля Сабатьє (м. Тулуза, Франція), Вільним університетом м. Амстердам (Нідерланди) та Інститутом біохімії ім. А.В. Паладіна, за програмами міжнародного наукового співробітництва з університетом Луї Пастера (Страсбург, Франція), з Гданським університетом (м. Гданськ, Польща), з Інститутом фізики ім. Б.І. Степанова НАН Білорусі (Мінськ). Частина роботи виконано у рамках науково-дослідної бюджетної теми кафедри № 01БФ-037-03 «Синтез та дослідження біологічно активних гетероциклічних сполук».

Мета і завдання дослідження. Синтез багатоканальних флуоресцентних зондів на основі 1,3-діариліденкетонів, дициклопентано[*b,e*]піридинів та 3-гідроксихромонів. Вивчення хімічних властивостей синтезованих сполук. Встановлення впливу електронної та просторової будови на флуоресцентні властивості, зокрема – встановлення залежності амплітуди спектрального відгуку на зміну параметрів оточення від будови зонда. На основі встановлених закономірностей – розробка шляхів направленої синтезу флуоресцентних зондів з заданими властивостями. Тестування флуоресцентних зондів заданого призначення.

Експериментальні методи. Загальні методи синтезу, виділення, очищення органічних сполук, спектрофлуориметрія їх розчинів і аналіз залежностей структура-властивості становлять основу роботи. Широковживаними є напівемпіричні методи квантово-хімічних розрахунків структури та властивостей сполук (AM1 та PM3), методи імпульсної спектрометрії ^1H -, ^{13}C -ЯМР та методи стаціонарної спектрофотометрії розчинів, тонкошарова хроматографія і мас-спектрометрія. На окремих етапах роботи застосовувались квантово-хімічні розрахунки структури та властивостей методом *ab initio* (базис 6-31G**, методи DFT та TDDFT, B3LYP), колонкова хроматографія продуктів реакції, ІЧ спектроскопія, хромато-мас-спектрометричний аналіз сумішей, імпульсна флуориметрія нано-, піко- та фемтосекундного діапазонів, низькотемпературна спектрофотометрія та флуориметрія, низькотемпературна спектрофотометрія і флуориметрія високого розділення у матрицях Шпольського (спектроскопія Шпольського), електрооптична спектроскопія розчинів (спектроскопія Штарка).

Пошук літературних джерел проведено з допомогою програми «Sci-Finder». Математичну обробку спектральних даних та обчислення констант стабільності комплексів здійснювали у середовищі програм «Spectral Data Lab» та «Origin».

Наукова новизна отриманих результатів. Теоретично розроблено структуру і здійснено синтез рядів сполук класу 1,3-діариліденкетонів, дициклопентано[*b,e*]-піридинів (ДЦП) та 3-гідроксихромонів (ЗГХ) з заданими властивостями багатоканальних флуоресцентних зондів для вивчення фізико-хімічних властивостей рідинних середовищ. Виявлено і вивчено флуоресцентні властивості двох нових класів барвників ДЦП та дифлавонолів. Встановлено залежності спектрально-флуоресцентних властивостей синтезованих сполук від їх будови та від фізико-хімічних параметрів середовища. Виявлено шляхи керування спектральними параметрами флуоресценції сполук (положенням смуг поглинання та емісії, квантовим виходом) за рахунок зміни їх будови. Методом спектроскопії Шпольського встановлено, що донорні замісники в бічному ядрі похідних ЗГХ блокують механізм тунелювання протону, збільшуючи цим вклад механізму температурної активації у процесі ВФП. Розроблено шляхи хімічної модифікації 1,3-діариліденкетонів, ДЦП та ЗГХ у напрямках добудови в молекулах додаткових функціональних елементів флуоресцентного зонду, таких як заряджені групи, рецептори катіонів, ліпофільні та гідрофільні групи, групи для ковалентної іммобілізації зонду тощо. Розроблено новий шлях синтезу 4'-діалкіламінофлавонолів, який полягає в заміщенні атома Флуору на аміногрупу. Синтезовано барвники з одним, двома, трьома та шістьма рецепторами катіонів: монокраун-похідні 1,3-діариліденкетону та 3-гідроксифлавонолу, біскраун-похідні 1,3-діариліденкетону, трискраун-похідну ДЦП, а також три- та гекса(диметиламінометил)-похідні ДЦП. Синтезовано похідні ЗГХ, які, маючи дві системи ВФП демонструють трисмугову

флуоресценцію у розчинах. На основі сполук класів ДЦП та ЗГХ розроблено ратіо-метричні рН індикатори для вимірів рН у широких межах. На основі ЗГХ розроблено зонди для вимірів полярності середовища (як функції діелектричної сталої) та концентрації протонодонора, синтезовано йонний індикатор, максимум поглинання якого демонструє протилежно направлені зміщення при зв'язуванні з катіонами Mg^{2+} та Ba^{2+} , розроблено перший високоселективний флуоресцентний зонд для визначення концентрації аденозинтрифосфату (АТФ) у водних розчинах.

Практичне значення отриманих результатів. Синтезовані зонди класу ЗГХ генерують багатоканальний сигнал у шкалах довжина хвилі – інтенсивність, внаслідок чого мають значні переваги за параметрами чутливості та адекватності передачі інформації у порівнянні з іншими відомими класами. Вони дозволили вирішити ряд нових практичних завдань, зокрема – вимірювати концентрацію АТФ у розчинах, визначати окремо параметри полярності і протонодонорності (гідратованості) середовища. Синтезовані барвники володіють рядом цінних рис, які роблять їх перспективними у різних аспектах практичного застосування і ставлять на чільні місця при застосуванні у якості флуоресцентних зондів та при створенні інших фотоелектронних молекулярних пристроїв для наукових і практичних завдань. Так, дициклопентано[*b,e*]піридини мають високі квантові виходи та флуоресценцію у діапазоні 450-700 нм; вони є ацидохромними сполуками як у поглинанні, так і флуоресценції. Дифлавоноли у розчинах демонструють трисмугову флуоресценцію і, поряд з високими квантовими виходами мають рекордно високу чутливість до полярності оточення, високі Стоксові зсуви і емісію у червоній ділянці спектра. Біс-(аза-15-краун-5)-похідна 1,3-діариліденкетону демонструє рекордно високе розділення смуг флуоресценції вільного барвника та його магнієвого комплексу. Показано, що зонди класу ЗГХ є ефективними у дослідженнях процесів у ліпідних мембранах. Смуга збудження більшості синтезованих барвників не накладається на смугу поглинання складових клітини, що є важливим у дослідженні біологічних об'єктів.

Особистий внесок здобувача в одержанні наукових результатів полягає у формулюванні загального напрямку розвитку науково-дослідної роботи та постановці завдань у окремих циклах досліджень, виконанні квантово-хімічних розрахунків, плануванні синтезів сполук, виконанні частини синтезів, встановленні структури синтезованих сполук, плануванні та проведенні частини спектрофотометричних та флуориметричних досліджень. Обробка та інтерпретація результатів, їх узагальнення і написання наукових статей, а також підготовка презентацій на наукових конференціях виконувались автором як особисто, так і разом зі співавторами публікацій.

Спектрофлуориметричні дослідження виконані з участю наукових груп спектроскопістів фізико-хімічного, фотохімічного та біофізичного напрямків під керівни-

цтвом д.б.н. Олександра Демченка, д.б.н., член-корр НАНУ Сергія Костеріна (*Інститут біохімії ім. В.Н. Палладіна НАНУ, м. Київ*), д.х.н. Андрія Дорошенка, др. хаб. Олександра Рошалья (*Інститут хімії при Харківському національному університеті імені В.Н. Каразіна, м. Харків*), др. хаб. проф. Єжі Блажейовського (Jerzy Blazejowski, *кафедра фізичної хімії хімічного факультету Гданського університету, м. Гданськ, Польща*), проф. Іва Мелі (Yves Mely) та др. Гі Дюпортая (Guy Duportail, *факультет фармації Університету Луї Пастера, Страсбург-Ілкіри, Франція*), д.ф-м.н. Миколи Нємковича (*Інститут фізики НАН Білорусі, Мінськ*), проф. Вольфрама Бауманна (Wolfram Baumann, *Інститут фізичної хімії університету ім. Й. Гутенберга м. Майнц, Німеччина*), проф. Елізабет Роу (Elisabeth Rowe, *факультет біохімії та молекулярної біології Університету Медичного центру штату Канзас, Канзас Сіті, США*), др. Турхана Узтюрка (Turhan Uzturk, *НДІ генної інженерії та біотехнології Турецького наукового центру на Мармуровому морі TUBITAK, Гебзе-Кочайлі, Туреччина*), проф. Ціса Гуйєра (Ceas Gooijer, *лазерний центр факультету аналітичної хімії та прикладної спектроскопії Вільного університету Амстердаму, Амстердам, Нідерланди*), др. Сюзанни Фері-Форгес (Susanne Feri-Forges, *лабораторія молекулярних взаємодій, Університет Поля Сабатьє, м. Тулуза, Франція*), др. Олени Фальковської, *Інститут молекулярної біофізики та Факультет хімії Університету штату Флориди, Талахассі, Флорида, США*), др. Хуана Карлоса дель Валле (Juan Carlos del Valle, *Факультет прикладної фізичної хімії Вільного університету м. Мадрид, Іспанія*). Переважна більшість спектрів ^1H - та ^{13}C -ЯМР отримана групою д.х.н. Олександра Турова (*лабораторія ЯМР спектроскопії хімічного факультету КНУ імені Тараса Шевченка*). Автор щиро вдячний усім учасникам за плідну співпрацю.

Апробація результатів дисертації. Основні результати роботи доповідались і обговорювались на міжнародних конференціях: XVI-XX IUPAC Symposiums on Photochemistry: July, 22-28, 1996, Helsinki, (Finland), July 19-24, 1998, Sitges, Barselona (Spain), July 22-27, 2000, Dresden (Germany), July 14-19, 2002, Budapest (Hungary), 17-22 July, 2004, Granada, (Spain); Terenin Memorial Symposium on Photochemistry and Photophysics, July, 29 -August, 02, 1996, St. Petersburg (Russia), XVIIIth and XX International Conferences on Photochemistry: Warsaw (Poland), 1997, July 27-31; Moscow (Russia), July 30 - August 4, 2001; III, VI, VII and VIII Conferences on Fluorescence Microscopy and Fluorescent Probes, July, 1999, Prague (Czech Rep.), September, 16-19, 2001, Amsterdam, (The Netherlands), August 24-27, 2003, Prague; На Україні: XVIII-XX Українські конференції з органічної хімії, Дніпропетровськ, 1998, Львів, 2000, Одеса, 2004.

Публікації. Основні результати роботи викладено в **62** публікаціях, серед яких **50** – статті у вітчизняних та зарубіжних журналах, **5** патентів України на винахід та **>7** – тези доповідей на наукових конференціях.

Структура і обсяг дисертації. Дисертація складається зі вступу, 5-ти розділів, висновків, списку цитованої літератури (430 посилань) і містить 186 рисунків та 36 таблиць. Аналіз літературних даних наводиться у першому розділі і за необхідності - на початку підрозділу або в ході викладу. Загальний обсяг роботи без урахування ілюстрацій (124 стор. рисунків, 24 стор. таблиць, 50 стор. списку використаних джерел) становить 370 стор.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

1. ОЦІНКА ПЕРСПЕКТИВНОСТІ ЗАСТОСУВАННЯ 1,3-ДІАРИЛІДЕНКЕТОНІВ, ДИЦИКЛОПЕНТАНО[*b,e*]ПІРИДИНІВ ТА 3-ГІДРОКСИХРОМОНІВ У РОЗРОБЦІ ФЛУОРЕСЦЕНТНИХ ЗОНДІВ

У першому розділі на основі зібраних літературних даних проведено аналіз будови та принципів роботи флуоресцентних зондів. Обговорено проблему збільшення числа каналів передавання інформації зондом. Аналіз механізмів формування зондом оптичного сигналу привів до висновку, що явища внутрішньомолекулярного фотоперенесення заряду (ВФЗ) або протона (ВФП) є найбільш зручними у розробці багатоканальних ФЗ. Відомі представники 1,3-діариліденкетонів демонструють ВФЗ у полярних середовищах. Дициклопентано[*b,e*]піридини мають схожу електронну будову, що вказує на перспективність обох класів сполук у розробці флуоресцентних зондів. На час початку роботи існувало лише три публікації, де описувались спектральні властивості діариліденкетонів (2.4 та 2.12, Схема 1). Флуоресцентні властивості дициклопентано[*b,e*]піридинів були невідомими, а їх методи синтезу були недосконалими; існувало лише кілька публікацій з описанням синтезу їх найпростіших представників (3.1, 3.2 і 3.12, Схема 2). Флуоресцентні властивості були опубліковані лише для найпростіших 3-гідроксихромонів (4.1, 4.3 та 4.8, Рис. 10). Залежність цих властивостей від будови для трьох названих класів барвників не була встановленою. Розробка ФЗ на їх основі системно не проводилась. У дисертації зроблено огляд усіх класів барвників, що демонструють ВФП. Показано, що 3-гідроксихромони, як і 1,3-діариліденкетони та дициклопентано[*b,e*]піридини є зручним базисом для розробки багатоканальних флуоресцентних зондів.

2. ФЛУОРЕСЦЕНТНІ ЗОНДИ НА ОСНОВІ 1,3-ДІАРИЛІДЕНКЕТОНІВ

На основі квантово-хімічного аналізу просторової та електронної будови зроблено оцінку 1,3-діариліденкетонів як флуоресцентних барвників. Показано, що особливості їх будови дозволяють полярному оточенню значно змінювати розподіл електронної густини в молекулі, змінюючи цим різницю в енергіях основного та збудженого станів, а з нею – і положення максимумів поглинання та флуоресценції. В молекулі

існують три точки ефективного впливу полярних молекул на флуоресцентні властивості. Вони представлені неподіленими парами електронів атомів Нітрогену ароматичних ядер та Оксигену карбонільної групи (Рис. 1). Для досягнення максимальної амплітуди флуоресцентного сигналу при зв'язуванні з аналітом рецептори аналіту по-

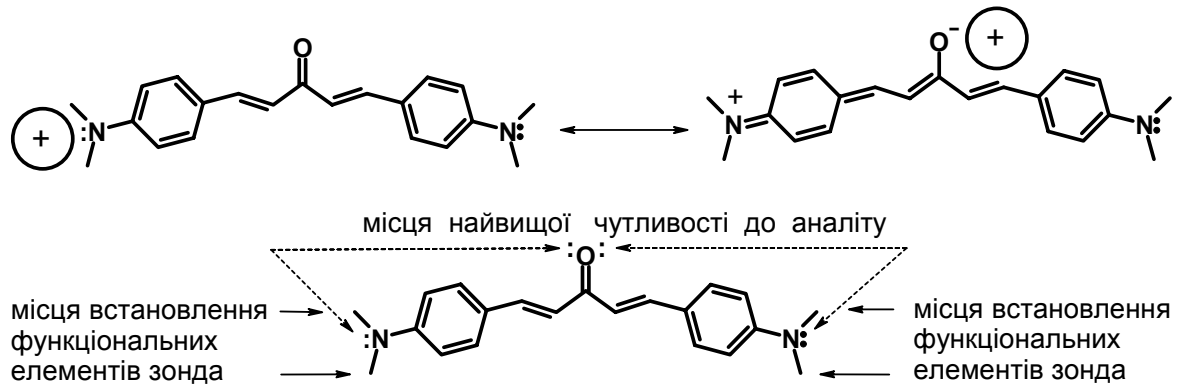


Рис. 1. Мезомерія 1,3-діариліденкетонів (додатково показано катіон аналіту в позиції, коли він масимально сприяє поданому розподілу електронів у молекулі). Внизу – місця встановлення функціональних елементів: рецептора, спейсера, лінкера тощо.

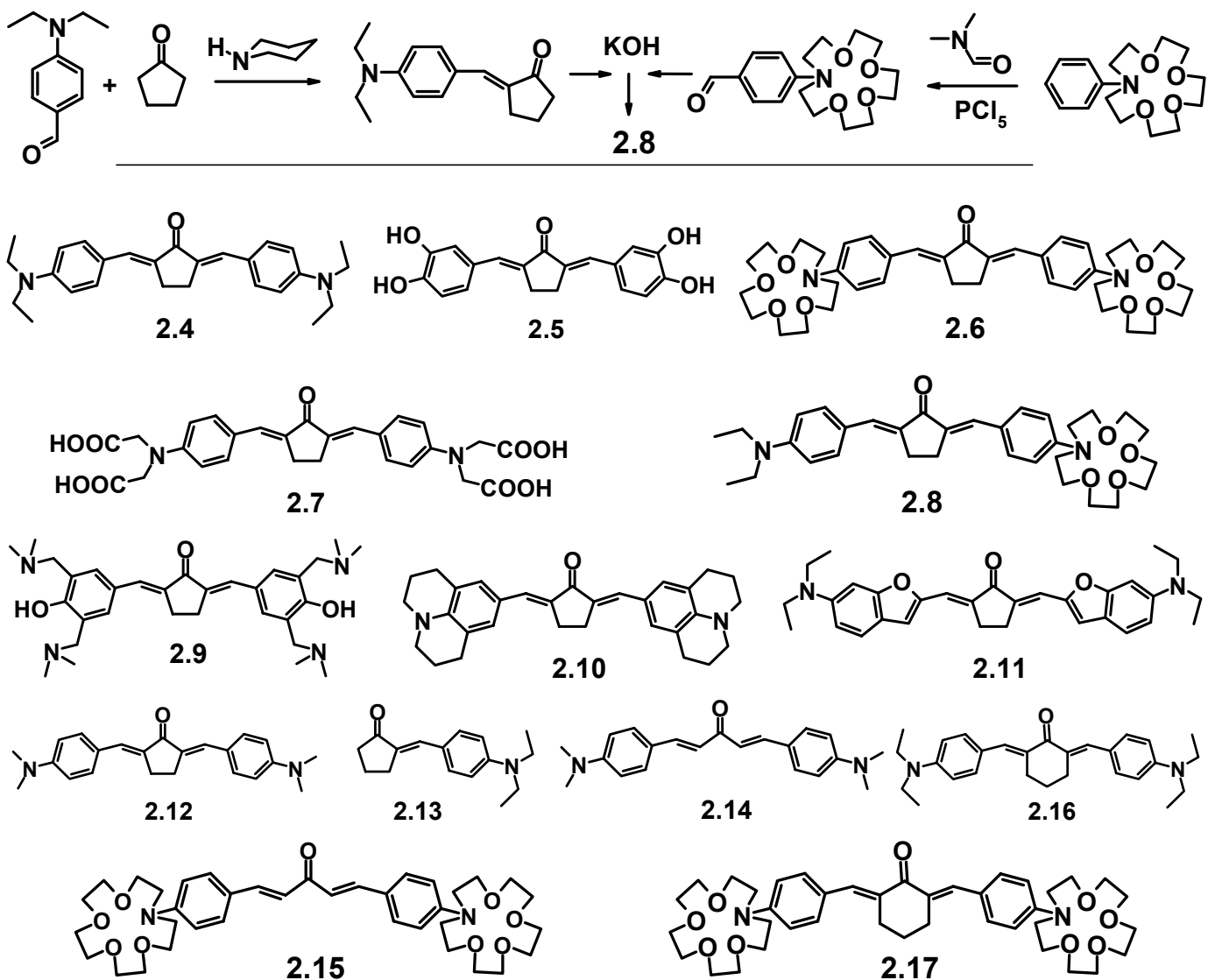


Схема 1. Приклад схеми синтезу та структури синтезованих сполук 2.4-2.17

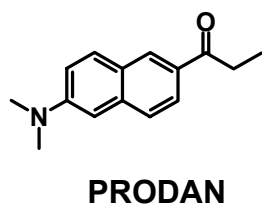
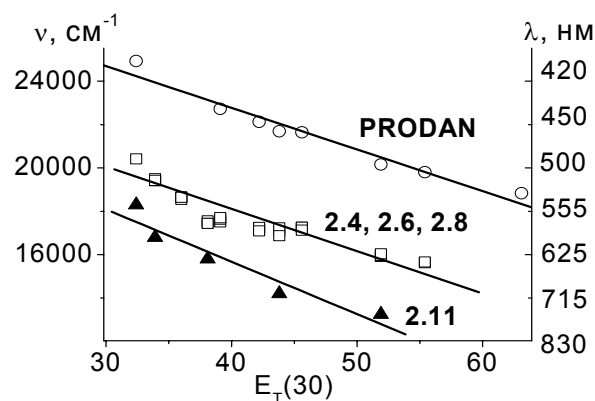
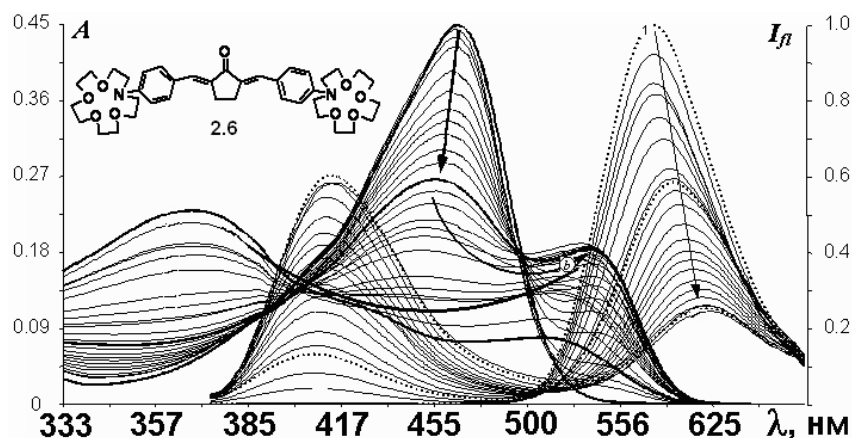


Рис. 2. Залежність положення максимуму емісії від полярності розчинника для зонда PRODAN (○), сполук **2.4, 2.6, 2.8** (□) і **2.11** (▲)



винні бути встановлені поблизу цих пар. Згідно до виконаних розрахунків (метод AM1) похідні ацетону є планарними сполуками, тоді як для 1,3-діариліденциклопентанонів такими є лише похідні з п'ятичленими боковими ядрами. Проте, розрахована величина міжфрагментного кута (24°) та збільшена жорсткість молекули свідчать про перспективність 1,3-діариліденциклопентанонів у розробці ФЗ. Показано, що внаслідок стеричних перепон 1,3-діариліденциклогексанони не є плоскими, оскільки їх планарний стан є дестабілізованим на 3.7 ккал/моль. Величина міжфрагментного кута (44°) вказує на значне погіршення спряження в молекулі і на пов'язані з цим безвипромінювальні втрати при переході в основний стан. Такі ознаки призводять не лише до падіння молярного коефіцієнта екстинкції та квантового виходу флуоресценції, а й до небажаного зміщення смуг поглинання і емісії барвника у короткохвильову область, що вказує на недоцільність використання похідних циклогексанону у роботі. З метою перевірки теоретичних висновків виконано синтез і вивчено спектральні властивості похідних циклопентанону, циклогексанону та ацетону **2.4 – 2.17**. Синтезовані барвники демонструють молярні коефіцієнти екстинкції біля $8 \cdot 10^4$ л·моль $^{-1}$ ·см $^{-1}$ і високу позитивну сольватофлуорохромію, яка у сполук **2.4, 2.6, 2.8, 2.10, 2.12, 2.14** та **2.15** досягає параметрів широкоживаного зонда PRODAN, а у сполуки **2.11** перевищує його (Рис. 2). Така властивість за наявності кількох типів рецепторів катіонів створила можливість для реєстрації флуоресцентної відповіді при зв'язуванні катіонів різного радіусу або молекул-донорів водневого зв'язку. Так, про-

Рис. 3. Зміни у спектрах поглинання та флуоресценції (I_f при $\lambda_{\text{exc}} = 370$ нм) біс-краун-кетоціаніну **2.6** ($\sim 5.8 \cdot 10^{-6}$ моль/л) в ацетонітрилі при зміні концентрації катіонів Mg^{2+}



тонування похідних **2.6**, **2.8** та **2.15** веде до гасіння емісії, тоді як катіони Mg^{2+} викликають батохромний, а катіони Ba^{2+} – гіпсохромний зсув смуги емісії. Для зондів **2.6**, **2.8** та **2.15** зареєстровано рекордно високе (8000 см^{-1}) розділення смуг вільної і протонованої форм у спектрах поглинання, а також смуг вільного ліганда та магнієвого комплексу $(Mg^{2+})_3L$ у спектрах флуоресценції (7000 см^{-1} , Рис. **3**). Ці дані, поряд з простою синтезу, емісією у червоній області спектра, високими квантовими виходами флуоресценції та високою фотостабільністю у протонодонорних середовищах, свідчать про значні перспективи їх практичного використання, у тому числі й у розробці флуоресцентних зондів різного призначення.

У гомогенних рідинних середовищах зонди **2.4**, **2.6**, **2.8**, маючи хромофори однакової будови, мало різняться між собою за спектральними характеристиками. В той же час у ліпідних везикулах ці сполуки відрізняються за квантовими виходами, напівшириною смуги, за формою спектру і положенням максимуму у спектрі емісії, що пов'язано з неоднаковим розташуванням гідрофільних та ліпофільних груп у їх молекулах і викликаною цим різницею в орієнтації та в молекулярному оточенні зонда в мембрані. Сполуки **2.4**, **2.6**, **2.8** виявилися ефективними у дослідженні бінарних систем, що складаються з неполярного (толуен) та полярного протонодонорного (метанол, *n*-бутанол та *трет*-бутанол) компонентів. При збільшенні концентрації спирту поряд з сольватохромним зсувом смуги флуоресценції зонда спостерігається послідовна поява двох інших смуг (Рис. **4**). З урахуванням положення смуг у спектрі вони були віднесені до емісії водневих комплексів C=O групи барвника з однією та двома молекулами або асоціатами молекул спирту. За даними титрування обчислені ефективні константи стабільності комплексів складу 1:1 та 1:2 зі вказаними спиртами.

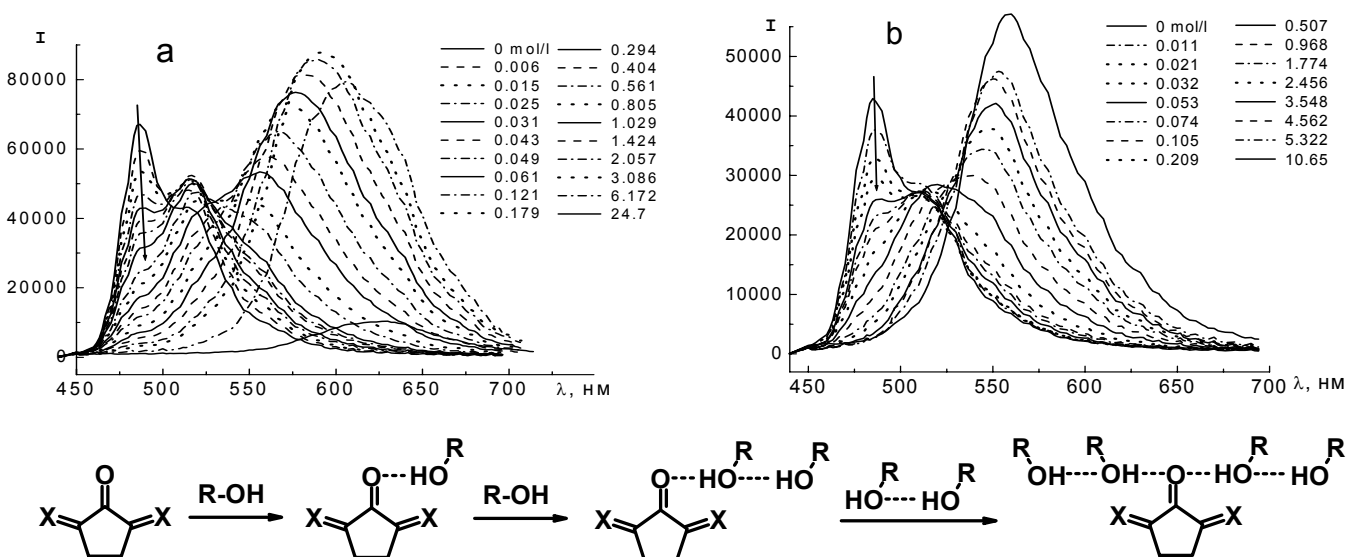


Рис. 4. Спектри емісії барвника **2.4** в толуен-спиртових сумішах та схема утворення водневих зв'язків, що спричиняє спектральні зміни. Цифри справа вказують молярну концентрацію спирту для кожного спектра: (а) – метанолу, (б) – *трет*-бутанолу

Встановлення властивостей зондів у гомогенних розчинах дозволило виконати дослідження ліпідних мембран. На противагу гомогенним розчинам, спектри емісії зондів **2.6**, **2.8** та **2.14** у мембранах еритроцитів значно відрізняються за положенням, напівшириною, формою та інтенсивністю. Це свідчить про різну локалізацію і орієнтацію зондів у мембрані, коли більш гідрофільний зонд займає більш полярні сайти мембрани. З врахуванням полярності оточення здійснено розклад спектрів на компоненти та ідентифіковано три типи сайтів: неполярні, низької гідратації та високогідратовані. Титрування мембран зондами дозволило простежити зміну локалізації кожного зонда при підвищенні його концентрації, обчислити константи зв'язування зонда і оцінити заселеність сайтів різної полярності.

3. ФЛУОРЕСЦЕНТНІ ЗОНДИ НА ОСНОВІ АРИЛІДЕНОВИХ ПОХІДНИХ ДИЦИКЛОПЕНТАНО[*b,e*]ПІРИДИНУ

З метою вивчення спектральних властивостей досліджено умови синтезу барвників **3.1-3.18**. На основі квантово-хімічного аналізу просторової та електронної будови (метод РМЗ) зроблено оцінку похідних дициклопентано[*b,e*]піридину (ДЦП) як флуоресцентних барвників. Показано, що внаслідок стеричних перепон вони є непланарними сполуками (за винятком похідних, де арил - п'ятичленний гетероцикл). Проте, величина міжфрагментного кута (24°) та збільшена жорсткість молекули робить ці похідні перспективним базисом у розробці ФЗ. Рецептори аналізу мають бути розміщені у місцях його найбільшого впливу на флуоресцентні властивості, а саме – біля неподілених пар електронів атома Нітрогену піридинового ядра та біля замісників у *para*-положенні бокових ядер (Рис. **5**). Місцями оптимального розміщення інших функціональних елементів ФЗ є бокові ядра барвників.

Спираючись на дані ^1H -ЯМР спектроскопії, флуоресценції та квантово-хімічного аналізу просторової будови, для синтезованих сполук встановлено *E,E*-конфігурацію, а також конформацію їх молекул у розчинах. На основі порівняння хімічних зсувів протонів для різних похідних показано, що планарну конформацію в розчинах мають

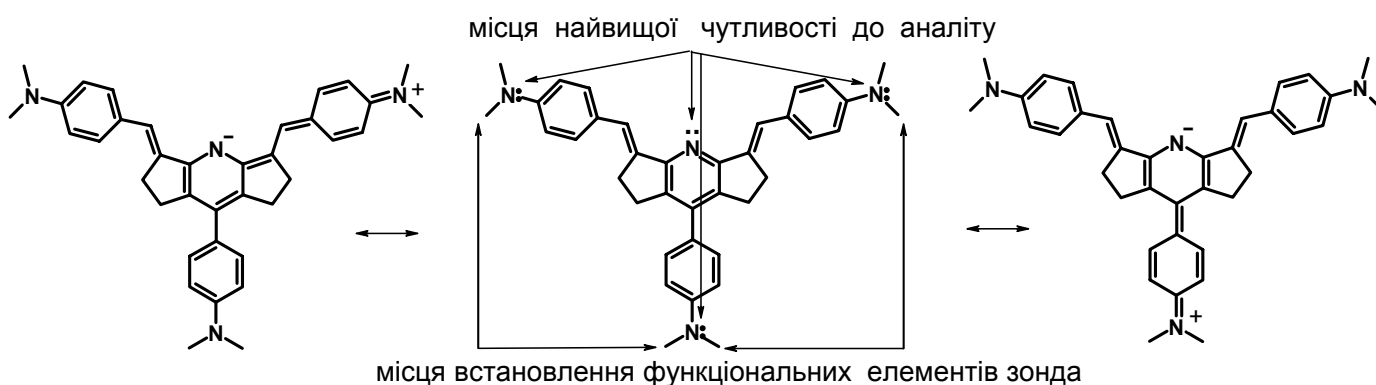


Рис. 5. Мезомерія дициклопентано[*b,e*]піридинів та місця встановлення функціональних елементів зонда: рецептора, спейсера, лінкера тощо.

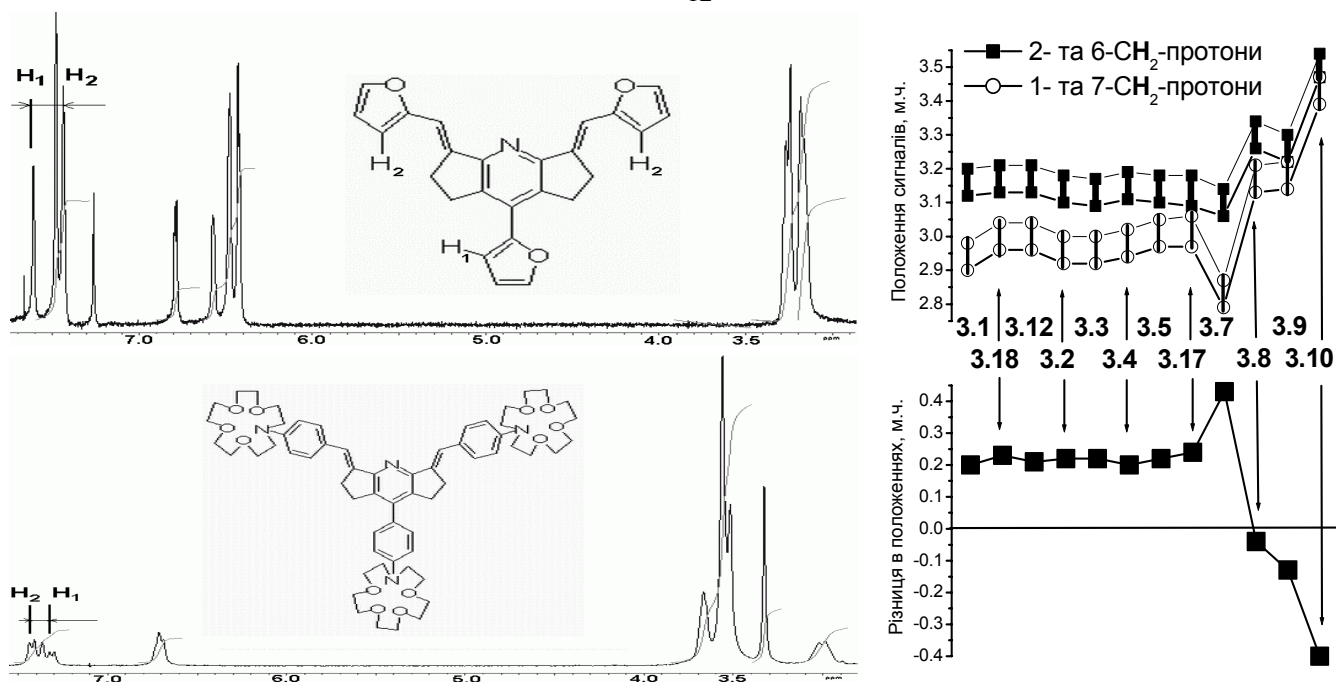
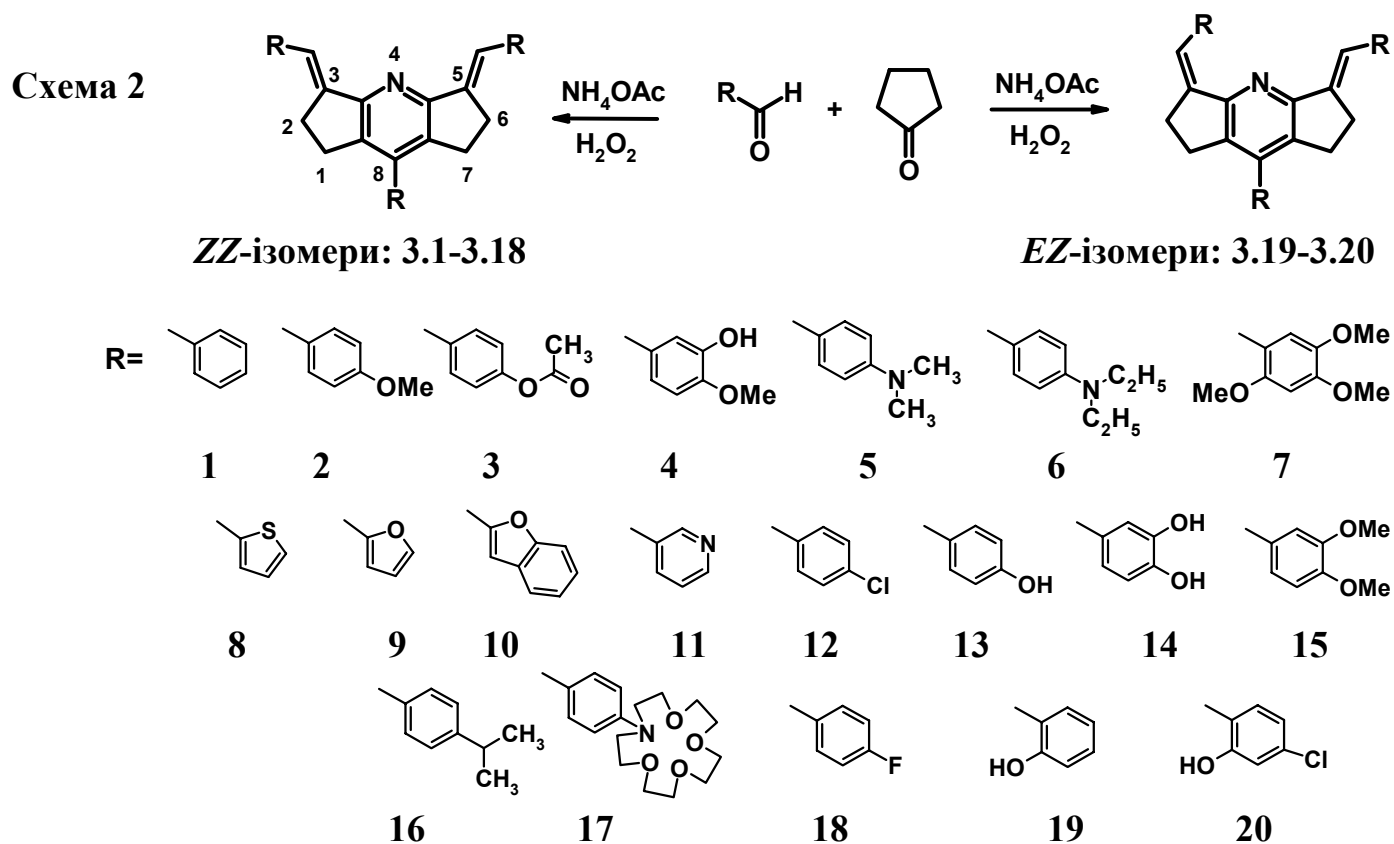
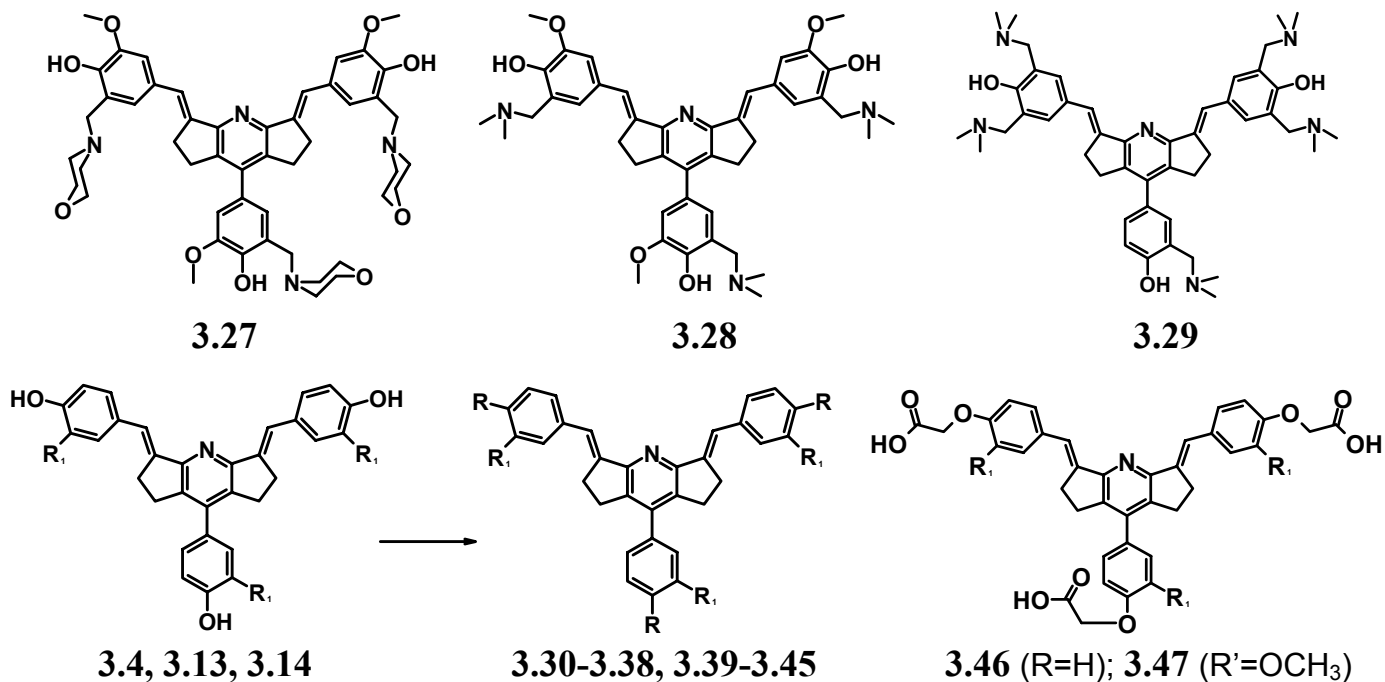


Рис. 6. Спектри 1H -ЯМР похідних дициклопентано[*b,e*]піридину **3.9** і **3.17** та конформаційні ефекти в спектрах сполук **3.1** – **3.18**. Зверху справа: положення сигналів метиленових груп у спектрі в залежності від будови молекули. Внизу справа: різниця хімсзувів сигналів ароматичних *орто*-протонів H_2 стирильних замісників в положеннях 3- та 5- і протона H_1 центрального ядра в залежності від будови молекули



лише ті похідні, де бокове ядро є п'ятичленним циклом. У спектрах 1H -ЯМР цих сполук сигнали метиленових груп зміщені у слабке поле внаслідок дезекранування кільцевими струмами бокових ядер (Рис. 6). Виплощення молекули ДЦП також веде



3.30: R= циклогексилкарбоксі; R₁= H

3.31: R= циклогексилкарбоксі; R₁= OCH₃

3.32: R= 4-CH₃OC₆H₄COO; R₁= H

3.33: R= 4-CH₃OC₆H₄COO; R₁= OCH₃

3.34: R= CH₃COO; R₁= H

3.35: R= CH₃COO; R₁= OCH₃

3.36: R= R₁= CH₃COO;

3.37: R= 2-фурилкарбоксі; R₁= H

3.38: R= фурилкарбоксі; R₁= OCH₃

3.39: C₆H₅CH₂O, R₁= H

3.40: C₆H₅CH₂O, R₁= OCH₃

3.41: CH₃OOCCH₂O, R₁= H

3.42: CH₃OOCCH₂O, R₁= OCH₃

3.43: C₂H₅O, R₁= H

3.44: C₂H₅O, R₁= OCH₃

3.45: C₅H₁₁O, R₁= OH

Рис. 7. Амінометильні, алкокси-, ацилокси- та карбоксиметильні похідні ДЦП.

до зменшення різниці у хімізсувах *орто*-протонів арильного і ариліденових замісників. З метою подальшого флуориметричного дослідження йон- та рН-сенсорних властивостей синтезовано три-(аза-15-краун-5)-похідну **3.17** (Схема **2**), серію три- та гекса-(амі-нометил)похідних **3.27-3.29**, а також трикарбоксіпохідні цього класу барвників **3.46-3.47** (Рис. **7**). Шляхом алкілювання та ацилювання гідроксипохідних синтезовано ряди ДЦП з різною ліпофільністю молекул (Рис. **7**). З триестерів **3.41** та **3.42** отримано трикарбонові кислоти **3.46** та **3.47**. Цим показано шляхи модифікації сполук з метою встановлення додаткових функціональних елементів флуоресцентного зонду.

Синтезовано *EZ*-ізомери **3.19-3.20** (Схема **3**) і доведено їх будову. На відміну від *EE*- та *ZZ*-ізомерів, у спектрах ¹H-ЯМР *EZ*-ізомерів сигнали атомів замісників у положеннях 2 і 6, та 3 і 5 центрального ядра не є еквівалентними. Сигнали протонів гідроксигруп значно розділені за положенням у спектрі: два з них перебувають при 12.3 та 12.4 м.ч., а ще один – при 4.6 м.ч. Сильнопольне положення останнього вказує на значне його екранування кільцевими струмами ароматичного залишку, що можливо для протона гідроксигрупи залишку в положенні 8. Значне зміщення сигналів двох перших протонів у слабке поле, до 12.6 м.ч., а також кольорова реакція з FeCl₃ є свідченням утворення ними внутрішньомолекулярного водневого зв'язку.

Вперше вивчено флуоресцентні властивості сполук класу ДЦП (Рис. 8). *EZ*-Конформери не є люмінофорами, тоді як *ZZ*-конформери у всіх типах органічних розчинників мають високі (30-80%) квантові виходи емісії. Планарна конформація молекул 3.9 та 3.10 у розчинах веде до збільшення квантових виходів емісії. Амінопохідні 4.5 4.6 та 4.17 володіють вираженою сольватохромією, особливо у спиртах, що є результатом утворення внутрішньомолекулярного водневого зв'язку з протонодонором. Максимуми поглинання ДЦП лежать на межі УФ та видимого діапазонів, а максимуми емісії, в залежності від будови сполуки та природи розчинника перебувають при 450-600 нм. Стоксові зсуви смуг емісії коливаються у межах від 2500 до 6500 см^{-1} і мають вищі значення при зростанні π -донорності бокових ядер, або при зменшенні планарності сполуки, а також при утворенні водневого зв'язку з протонодонором.

Досліджено прототропні перетворення сполук 3.1-3.10 спектрометричними методами (Рис. 9-10). Протоновані форми 3.1-3.10, хоч і мають дещо нижчі квантові виходи емісії, здатні до флуоресценції, що є рідкісним явищем, яке надає можливості для ство-

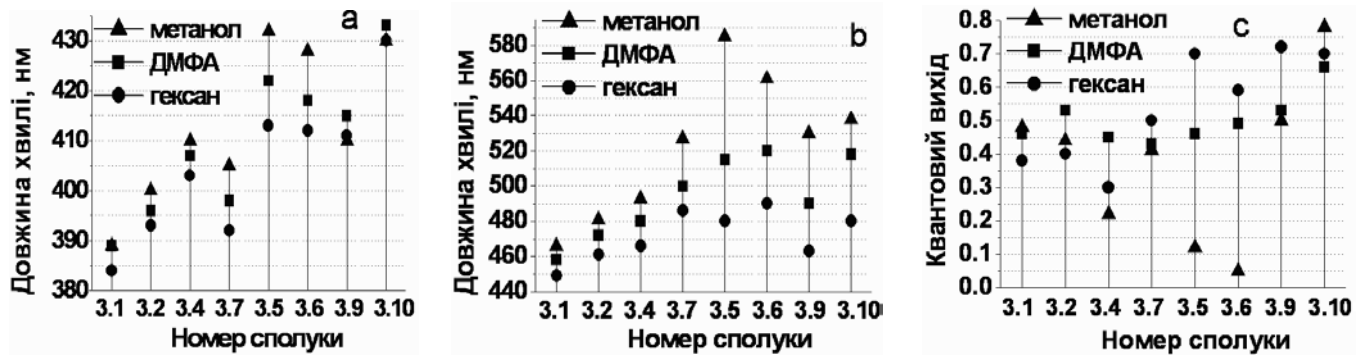


Рис. 8. Положення максимумів поглинання (а), флуоресценції (б) та квантові виходи флуоресценції (с) барвників 3.1-3.10 у гексані, ДМФА та метанолі

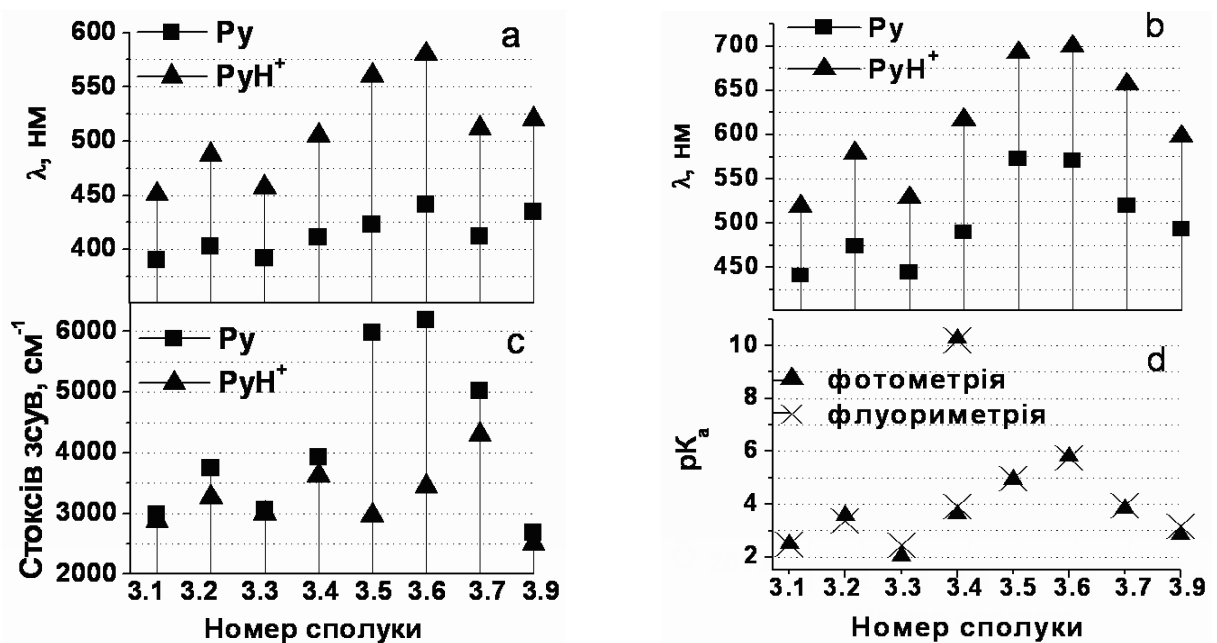


Рис 9. Порівняння положень максимумів поглинання (а), флуоресценції (б), Стоксових зсувів (с) для вільних та протонованих форм барвників 3.1-3.9, а також їх pK_a переходів (д) у 80%-ному водному розчині етанолу

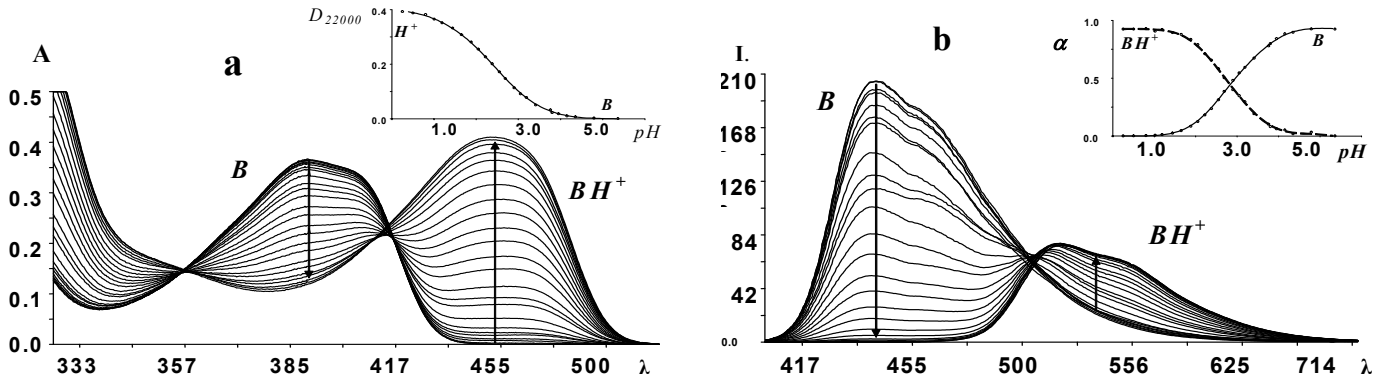


Рис. 10. Спектрофотометричне (а) та флуориметричне (б) титрування барвника **3.1**. Верхні врізки: зміна оптичної густини розчину при $\lambda=455$ нм та коефіцієнтів активності α вільної і протонованої форм при зміні кислотності розчину

рення ратиометричних рН індикаторів на основі цих сполук. Смуги поглинання та емісії при протонуванні зміщуються батохромно на $3500-5500$ cm^{-1} , потрапляючи у жовту та червону ділянки спектру. Положення максимумів поглинання та емісії, а також основність барвника можна змінювати у широких межах шляхом уведення донорних (сполуки **3.4-3.6**) або акцепторних груп у бічні ядра. Так само можна регулювати pK_a цих індикаторів у межах рН від 2 до 10 (Рис. **9d**). Порівняно з іншими похідними піридину подібної будови, ДЦП мають приблизно на дві одиниці нижчі значення pK_a . Іншою аномалією є те, що у S_0 та S_1 станах вони демонструють близькі значення pK_a (Рис. **9d**), Обидві аномалії можуть бути пояснені збільшеними просторовими перешкодами при протонуванні атома Нітрогену дициклопентанопіридинів.

4. ФЛУОРЕСЦЕНТНІ ЗОНДИ НА ОСНОВІ ПОХІДНИХ 3-ГІДРОКСИ-4Н-ХРОМОНУ

Шляхом квантово-хімічних розрахунків проведено конформаційний аналіз ЗГХ із замісниками різного ефективного об'єму у положенні 2. Отримані результати свідчать, що у 2-арил-ЗГХ міжфрагментний кут складає $\sim 27^\circ$. Лише у випадку п'ятичленних циклів молекула ЗГХ займає плоску конформацію, що, як і збільшення ступеня конденсованості молекули, має привести до зростання квантового виходу емісії. Наявність електродонорів у боковому ядрі має збільшити спектральну чутливість сполуки до полярності середовища. Замісник у положенні 5 хромонового ядра, блокуючи

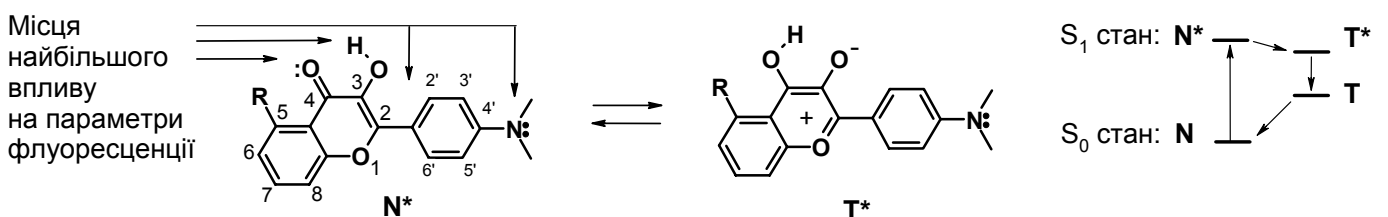
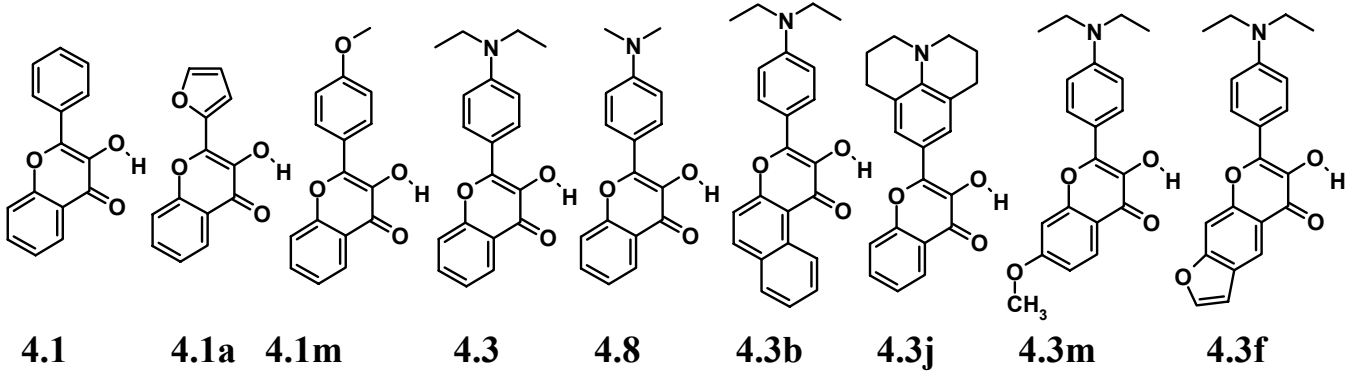
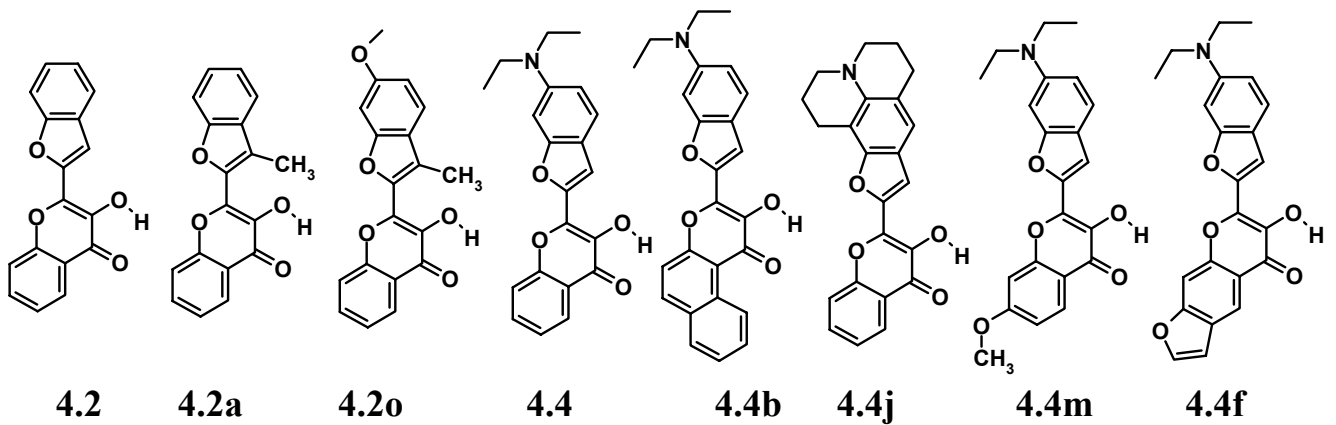


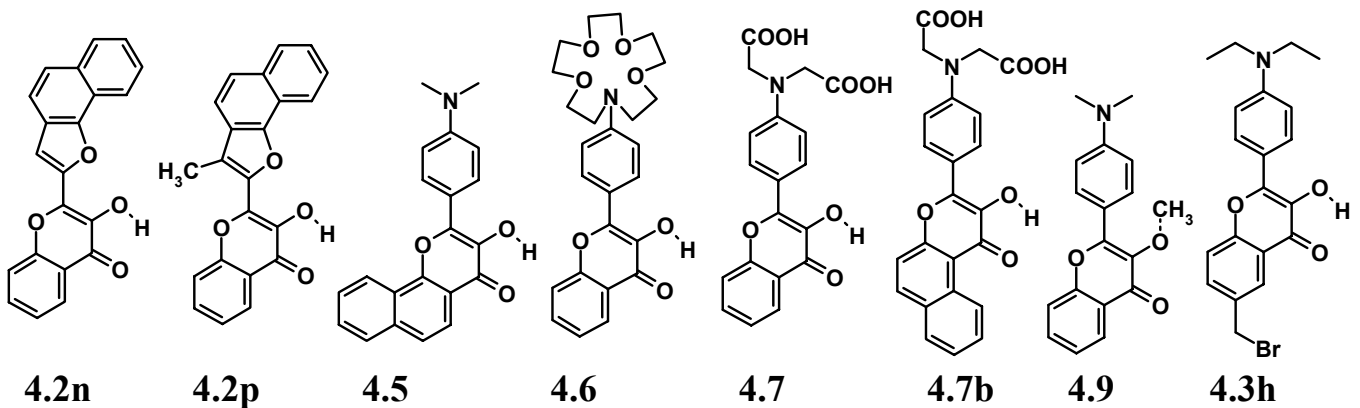
Рис. 11. Флуоресцентні N^* і T^* форми 3-гідроксихрому. T^* -форма є продуктом фотохімічної реакції – внутрішньомолекулярного фотоперенесення протона (ВФП).



(Синтезовані для встановлення впливу електродонорних замісників, ступеня планарності та конденсованості молекули на флуоресцентні властивості)



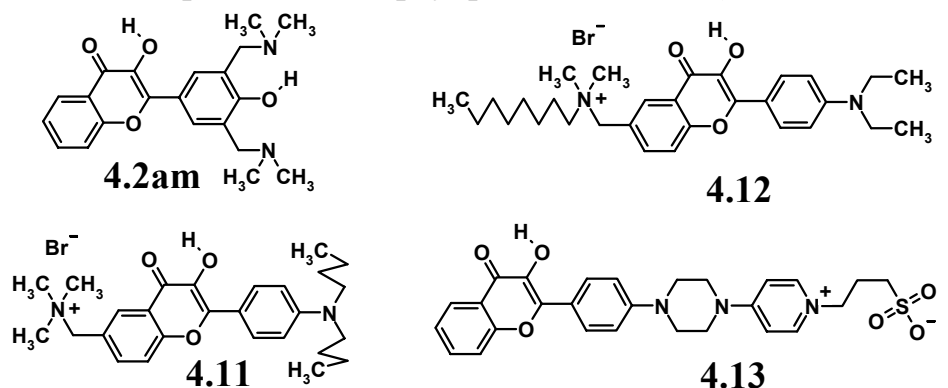
(Синтезовані для встановлення впливу зміни довжини хромофору, планарності та конденсованості молекули на спектрально-флуоресцентні властивості)



(Модельні сполуки у дослідженнях сольватохромізму, впливу ступеня планарності та конденсованості молекули, а також впливу зв'язування з катіонами та аніонами на флуоресцентні властивості. Мембранні зонди, флуоресцентні мітки)

Рис. 12.

Хімічні формули синтезованих похідних 3-гідросихромону (ЗГХ) **4.1-4.13**



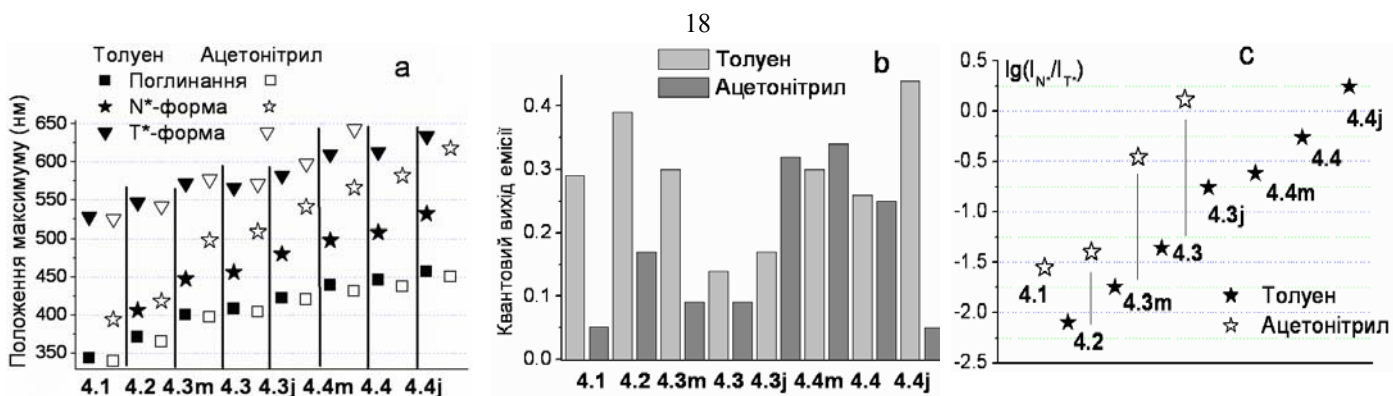


Рис. 13. (а) – Положення максимумів поглинання і флуоресценції ЗГХ 4.1, 4.2, 4.3m, 4.3, 4.3j, 4.4m, 4.4 і 4.4j, в толуені та ацетонітрилі. (б) – Квантові виходи ЗГХ, (с) – Логарифми відношення інтенсивностей смуг N* і T* форм, $\lg(I_{N^*}/I_{T^*})$.

тронних переходах $S_0 \rightarrow S_1$ та $S_0 \leftarrow S_1$. Найвищі квантові виходи емісії мають найбільш планарні сполуки 4.1a, 4.2, 4.4-4.4f. Аннелювання ароматичного ядра в положення 5,6, 6,7 або 7,8 хромона веде до зростання молярного коефіцієнта екстинкції та квантового виходу емісії, проте суттєво не змінює положення смуг поглинання та емісії сполуки (Рис. 14). Відношення інтенсивностей смуг емісії таутомерних форм (I_{N^*}/I_{T^*}) росте при збільшенні довжини хромофору та електронодонорності замісника в боковому ядрі, що є результатом зближення N* і T* станів за енергією. Донорний замісник у ядрі хромона створює протилежний ефект: збільшуючи основність атома Оксигену O-4, він стабілізує T*-форму барвника. Встановлені закономірності були використані при створенні флуоресцентних зондів для прикладних завдань: одночасного визначення полярності та концентрації протонодонора у розчині, аналізу двокомпонентних сумішей розчинників, флуориметричного визначення рН визначення АТФ тощо.

Досліджено залежність спектральних властивостей характерних представників ЗГХ від параметрів розчинника (макроскопічної та мікроскопічної полярності, прото-

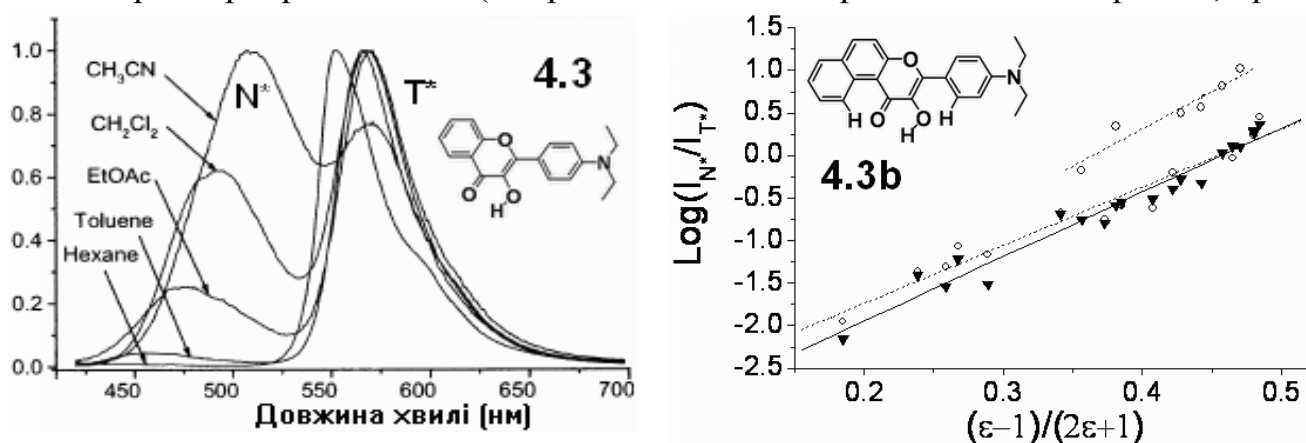


Рис. 14. Спектри флуоресценції барвника 4.3 та залежність $\lg(I_{N^*}/I_{T^*})$ від функції полярності розчинника $f(\epsilon)$ для барвників 4.3 (O) та 4.3b (▼). Суцільна лінія відповідає лінійній залежності для 4.3b. Кореляційне рівняння: $\lg(I_{N^*}/I_{T^*}) = 7.562f(\epsilon) - 3.455$, $r = 0.98$. Дані для зонда 4.3 утворюють дві окремі залежності (пунктирні лінії), отримані в спиртах та хлороформі (верхня) та в інших розчинниках (нижня)

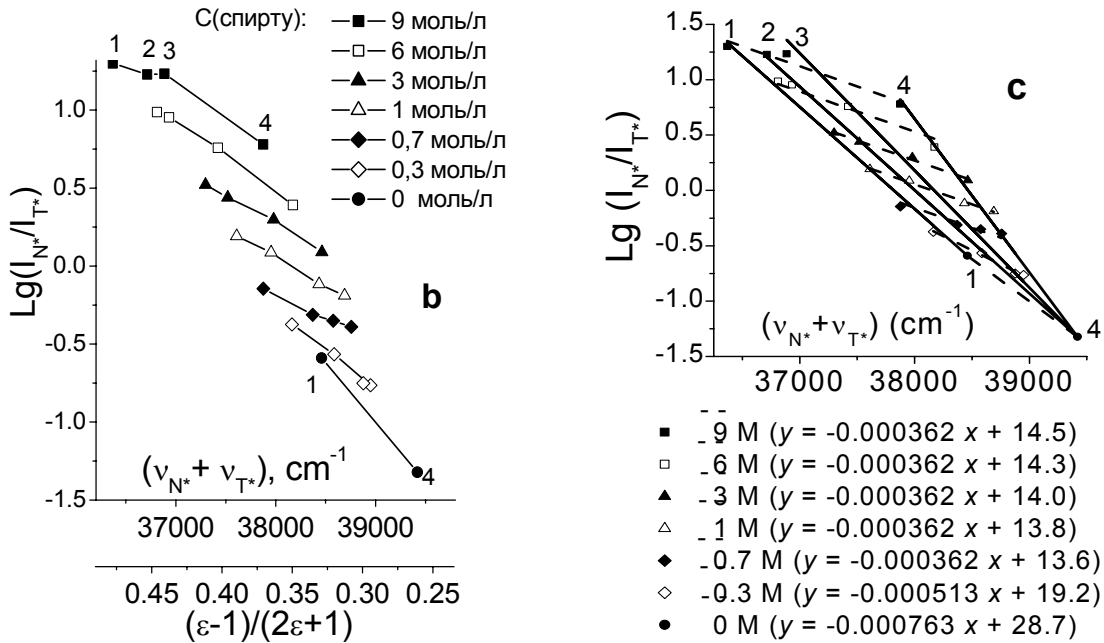


Рис. 15. (а) – Спектри флуоресценції барвника **4.8** у сумішах бензен – *трет*-бутанол. Ізомольні залежності (b) та їх лінійні регресії (c) у координатах $\text{lg}(I_{N^*}/I_{T^*})$ (ордината) – $(\nu_{N^*} + \nu_{T^*})$ (абсциса) для увказаних концентрацій спирту у системах. Пряма 1 – дані у системі MeOH-EtOAc, 2 – MeOH-бензен, 3 – *n*-BuOH-бензен, 4 – *t*-BuOH-бензен

нодонорності, основності тощо). Встановлено, що всі синтезовані сполуки володіють позитивною сольватохромією як у поглинанні, так і в емісії (Рис. 13а). Найбільші сольватохромні зсуви демонструє N^* форма сполук, причому цей ефект росте при збільшенні довжини хромофору або електронодонорності замісника у боковому ядрі. Квантові виходи емісії для ряду сполук **4.1a**, **4.2**, **4.3b**, **4.4b** та **4.5** мало змінюються зі зміною полярності розчинника. Показано, що параметром, найбільш чутливим до полярності середовища є відношення інтенсивностей смуг емісії таутомерів I_{N^*}/I_{T^*} , для якого зареєстровано логарифмічну залежність від функції діелектричної сталої (Рис. 13-15). Рекордно високу чутливість мають сполуки **4.4-4.4f**. Як наслідок вони можуть бути сенсорами у середовищах з $E_T(30) < 39$ і працювати в парі з **4.2**, яка найбільш ефективно працює у полярних середовищах ($E_T(30) > 36$). На основі аналізу властивостей ЗГХ створено серію високочутливих сенсорів полярності середовища **4.1a**, **4.3b-4.3f**, **4.2**, **4.4-4.4f** зі збільшеною яскравістю флуоресценції, смуга поглинання яких розташована у межах 340-460 нм, а смуги емісії – у межах 410-650 нм. Характерною і практично цінною властивістю барвників **4.1-4.13** є високі Стоксові зсуви смуг емісії, які для N^* -форми коливаються в межах 2000-7200 cm^{-1} , а для T^* -форми – від 7000 до 12000 cm^{-1} . Причиною є явища ВФЗ (для N^* -форми) та ВФП – для T^* -форми.

Шляхом квантово-хімічних розрахунків геометрії, ентальпії та ентропії утворення комплексів сполуки **4.8** з донорами (метанол) та акцепторами (ДМСО) водневого зв'язку, а також спорідненності основних атомів сполуки **4.8** до протону встановлено

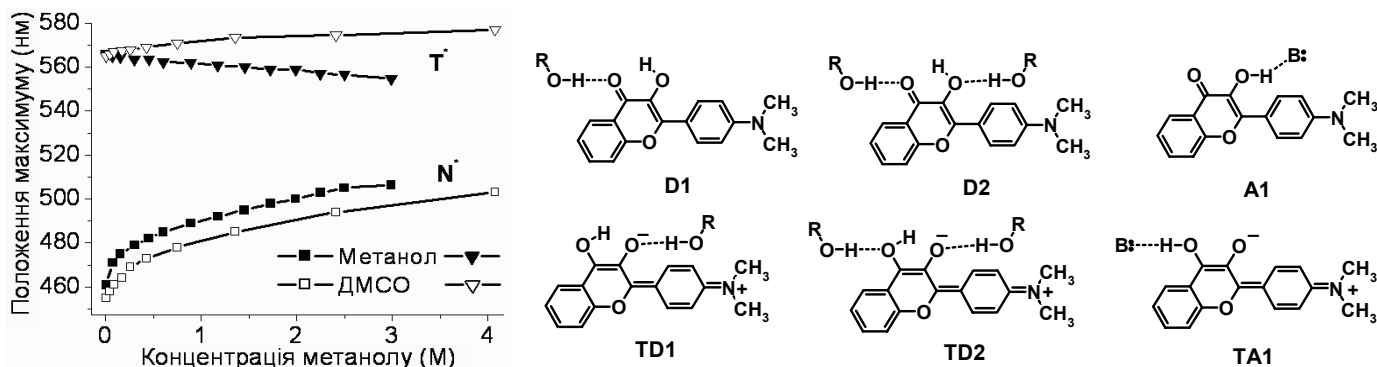


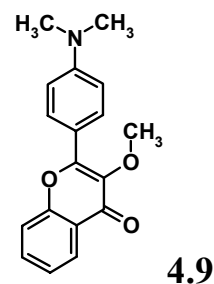
Рис. 16. Залежності положення максимумів емісії N^* і T^* форм сполуки **4.8** від концентрації донора (метанол) та акцептора ВЗ (ДМСО) у бензені. Структури водневих комплексів **4.8** складу 1:1 та 1:2, що мають найнижчі розраховані ентропії утворення

найбільш імовірні структури цих комплексів у основному і збудженому станах (Рис. 16). Особливості будови комплексів **TD1** та **TA1** пояснюють протилежні зміщення максимумів емісії T^* форми при збільшенні концентрації донора та акцептора ВЗ у розчині. На основі аналізу отриманих для сполук **4.3** та **4.8** даних розроблено метод визначення вмісту протондонорного компонента у двокомпонентній суміші (Рис. 15) за чотирма параметрами спектру емісії зонду: за положенням максимумів емісії таутомерних форм (ν_{N^*} , ν_{T^*}) та за їх інтенсивністю (I_{N^*} , I_{T^*}). Водночас ці параметри відтворюють полярність середовища як функцію діелектричної сталості $(\epsilon-1)/(2\epsilon+1)$, оскільки остання перебуває у прямо пропорційній залежності з сумою $\nu_{N^*} + \nu_{T^*}$.

Методом електрооптичної спектроскопії виміряно дипольні моменти зондів **4.1m**, **4.6**, **4.8** та **4.9** у основному S_0 та збудженому (Франк-Кондонівському S_1) станах (відповідно μ_g та μ_e^{FC} , Табл. 1). Величини дипольних моментів μ_g і μ_e^{FC} зменшуються для вивчених сполук у наступній послідовності: **4.9** > **4.6** ≥ **4.8**, що може бути результатом часткової компенсації гідроксигрупою у сполуках **4.6** та **4.8** негативного заряду карбонільної групи в S_0 стані та зменшення ступеня перенесення заряду з аміногрупи у S_1^{FC} стані. Близькі значення дипольних моментів для двох останніх сполук свідчить про несуттєвий вплив алкільних замісників атома Нітрогену на загальну поляризацію молекули. Метокси похідна **4.1m** має найнижчі значення μ_g та μ_e^{FC} , що пов'язано з відсутністю у сполуки **4.1m** потужного донора – діалкіламіногрупи. Як наслідок, поля-

Таблиця 1. Дипольні моменти сполук **4.6**, **4.8** та **4.9** у 1,4-діоксані при 298 К

Сполука	$\mu_g / (10^{-30} \text{ Кл м})$	$\mu_e^{FC} / (10^{-30} \text{ Кл м})$	$\mu_e^{FC} - \mu_g$
4.1m	9.4 ± 0.5	26.3 ± 0.7	19.9 ± 0.5
4.6	15.3 ± 0.4	62.5 ± 1.2	47.1 ± 1.6
4.8	14.1 ± 0.1	59.2 ± 0.95	45.1 ± 0.95
4.9	17.7 ± 0.05	68.1 ± 1.5	50.4 ± 1.6



ризація молекули здійснюється за участю електронних орбіталей, локалізованих на іншій частині молекули. Порівняння величин та кутів розподілення дипольних моментів у S_0 та S_1^{FC} станах дозволило у значній мірі уточнити картину поляризації ЗГХ з різним типом заміщення. Зокрема, показано, що 4'-амінозаміщені похідні за типом поляризації та за природою електронних переходів суттєво відрізняються від інших сполук даного класу, утворюючи окрему спектральну групу. При їх збудженні (перехід $S_0 \rightarrow S_1$) задіяні переважно орбіталі бокового та піронового ядер, тоді як за відсутності 4'-аміногрупи у переході $S_0 \rightarrow S_1$ задіяні електрони на орбіталях ядра хромуна.

Шляхом низькотемпературної спектроскопії Шпольського (матриця кристалічного *n*-октану, 4–20 К) досліджено природу механізмів прямого та зворотного ВФП у ЗГХ та утворення ними водневих зв'язків з протонодонорами. На основі вимірів часів ВФП для сполук **4.1**, **4.1m** та **4.1f** (Рис. 17) встановлено незалежність швидкості ВФП від температури у межах 4-20 К і зроблено висновок, що у похідних ЗГХ цей процес відбувається за механізмом тунелювання. Встановлено, що донорні замісники у бічному ядрі суттєво сповільнюють ВФП, що є результатом збільшення основності атомів Оксигену O-3 та O-4 і викликаного цим збільшення ширини бар'єра ВФП. Отже, за звичайних умов процес ВФП слід розглядати як такий, що відбувається за комбінованим механізмом тунелювання та температурної активації, і вклад механізму тунелювання протону зменшується при появі електронодонорів у бічному ядрі.

У спектрах Шпольського зареєстровано і пояснено ізотопний ефект зсуву ліній збудження та флуоресценції при заміні протію на дейтерій у гідроксигрупі сполук **4.1**, **4.1m** та **4.1f**. Вдвічі більша маса атома D веде до нижчого в $2^{-1/2}$ рази розташування коливальних рівнів одного й того ж типу у порівнянні з протієм. Оскільки у S_1 стані коливальні рівні розташовані тісніше, це приводить до зміщення смуги збудження дейтеропохідного у бік коротких хвиль, а смуги емісії – у довгохвильовий бік. Фура-

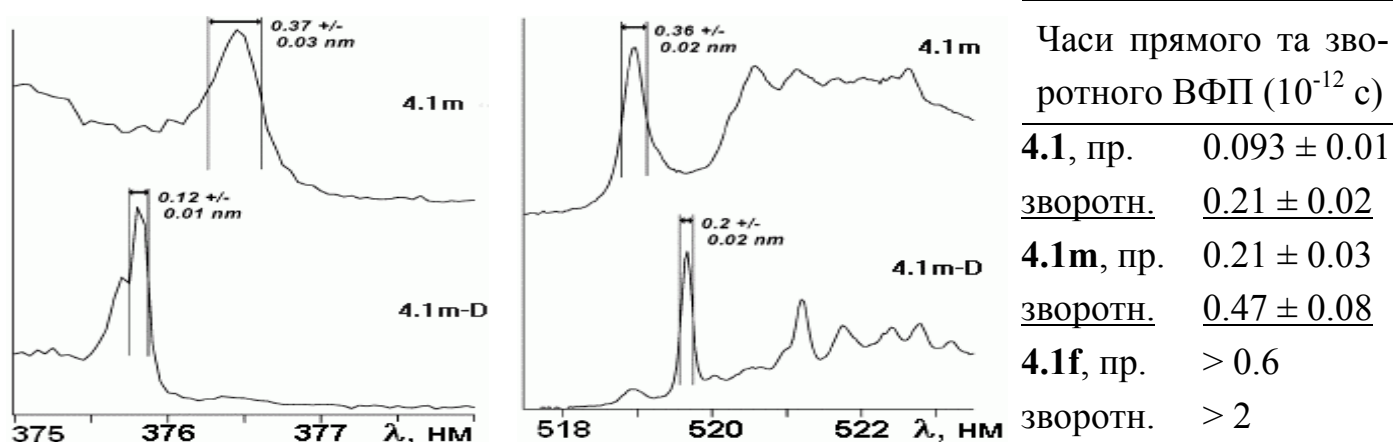


Рис. 17. Ділянка (0,0)-переходу спектрів збудження (зліва) та флуоресценції (у центрі) сполуки **4.1m** та її дейтерованого 3-OD аналога в октановій матриці при 4 К. На основі вказаних напівширин ліній обчислено швидкості процесів прямого та зворотного ВФП (справа). Зміщення ліній дейтеро-**4.1m** – наслідок ізотопного ефекту

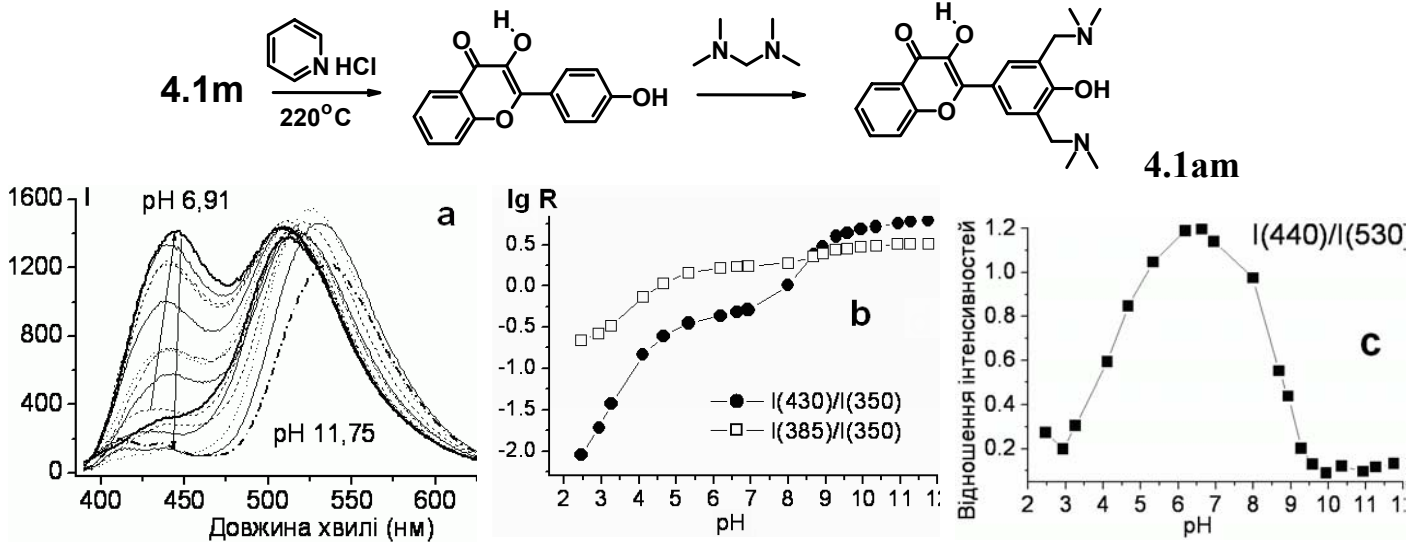


Рис. 18. Схема синтезу та спектри емісії барвника **4.1am** у розчині фосфат-цитрат-боратного буфера в діапазоні рН від 2.46 до 11.75 (а). Логарифм відношення інтенсивностей емісії I_{530} при збудженні на двох довжинах хвиль у залежності від рН (b). Відношення інтенсивностей емісії I_{440}/I_{530} при збудженні на довжині хвилі I_{350} (c)

нові похідні **4.1f**, **4.2** та **4.2n**, порівняно з флавонолом **4.1** завжди мають подвійну кількість ліній у низькотемпературних спектрах збудження та емісії, що може бути результатом заселення двох нерівноцінних за енергіями конформацій, де кути між ядрами хромуна та бокового замісника складають 0 та 180°.

Синтезовано широкодіапазонний флуоресцентний рН-індикатор **4.2am** для вимірювань рН у межах від 2 до 10 (Рис. 18). Наявність основних груп біля групи 4'-ОН зсуває її pK_a до значення 4.4. Депротонування груп $N(CH_3)_2$, та 3-ОН відбувається при рН 7–10. Індикатор **4.2am** не утворює агрегатів у водних розчинах у широких межах рН і генерує ратіометричний сигнал як у спектрах збудження, так і емісії. В останньому випадку виміри рН можливі в двох окремих діапазонах: рН > 7 та рН < 7.

Спрогнозовано структуру і синтезовано зонд **4.3b**, чутливий лише до неспецифічних взаємодій у розчинах і нечутливий до донорів водневого зв'язку. Це є наслідком блокування доступу донорів ВЗ до неподілених електронних пар атомів Оксигену молекули **4.3b**. На противагу до зонду **4.3b** його прототип **4.3**, як і більшість ЗГХ, має високу чутливість до молекул-донорів ВЗ і внаслідок цього утворює дві окремі залежності у координатах $\lg(I_{N^*}/I_{T^*}) = f(\epsilon)$ одна з яких належить донорам ВЗ (Рис. 14).

Синтезовано і досліджено флуоресцентний сенсор **4.6** катіонів різного радіусу (Рис. 19). Наявність у молекулі двох різнотипних рецепторів, розташованих біля протилежних кінців диполя хромофору спричиняє різні зміни у спектрах поглинання і емісії при зв'язуванні катіонів цими рецепторами. Як наслідок, спектральні зміщення смуг сенсора **4.6** мають протилежний характер для катіонів Mg^{2+} та Ba^{2+} у сухому ацетонітрилі, оскільки послідовність їх зв'язування рецепторами є протилежною.

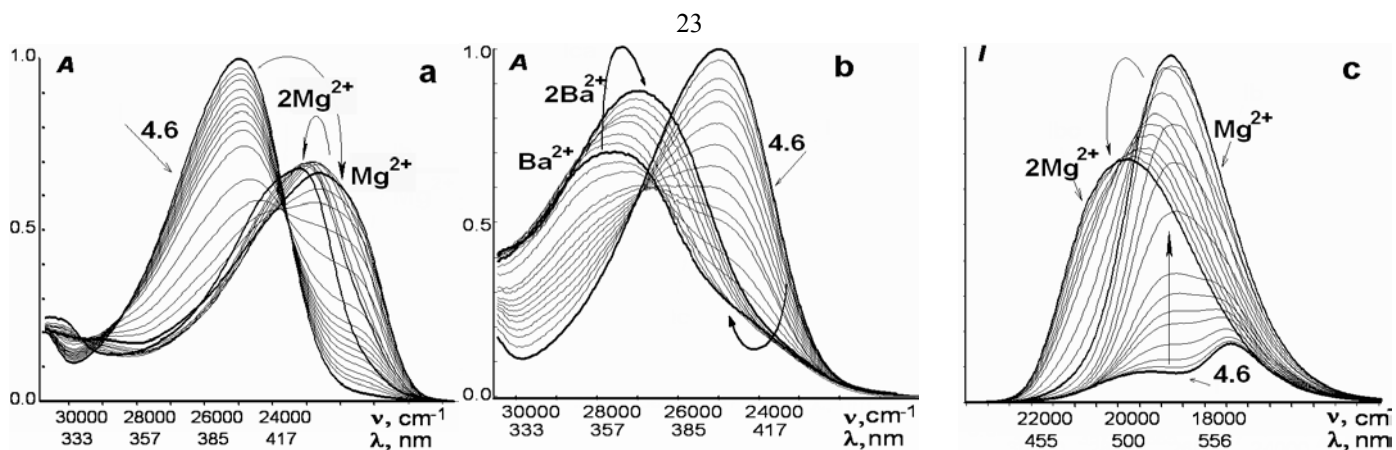
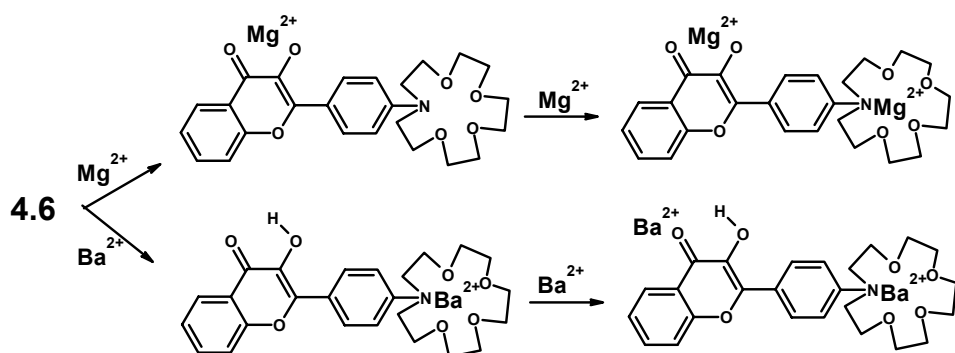


Рис. 19. Спектри поглинання (a,b), емісії (c) та послідовності зв'язування катіонів Mg^{2+} та Ba^{2+} сполукою **4.6** у ацетонітрилі (згідно до спектральних змін)



Зареєстровано і досліджено ефект появи нової смуги у спектрі збудження флуоресценції зонду **4.8** при додаванні у розчин аденозин трифосфату (АТФ, Рис. **20**). Ефект створюється при рН 7 лише аніоном АТФ і є наслідком утворення асоціатів зонд-АТФ, у яких поляризована молекула зонду має певну орієнтацію у електростатичному полі АТФ. Інші нуклеотиди та поліаніони (аденозин ди- та монофосфати тощо) не викликають подібних спектральних змін (Рис. **20b**). На цій основі розроблено метод визначення АТФ у розчинах, у межах його фізіологічних концентрацій.

Показано, що мультипараметричні зонди **4.6** та **4.8** є ефективними у дослідженнях хемо- та термотропних перетворень ліпідних мембран. Висока чутливість зондів до змін гідратованості та в'язкості середовища дозволяє встановити не лише точки

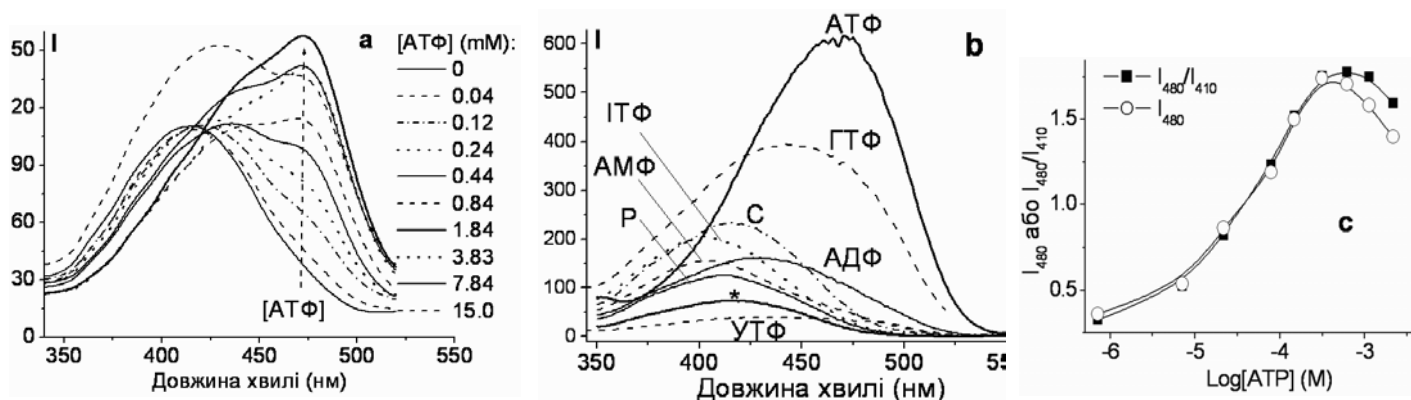


Рис. 20. Спектри збудження зонда **4.8**: (a) у буферному розчині HEPES-карбонат-сахароза (рН 7.4) при різних концентраціях АТФ; (b) - у присутності нуклеозид-фосфатів, цитрату (C) та пірофосфату (P). (c) - інтенсивність флуоресценції зонда при довжині хвилі збудження 480 нм та відношення інтенсивностей флуоресценції при збудженні на довжинах I_{480}/I_{410} як функція логарифму концентрації АТФ у розчині

фазових переходів ліпідного бішару, але й описати зміни характеристик оточення зонду, а реалізація принципу багатоканальності у прийомі інформації дозволяє судити про локалізацію зонду у об'єкті. Так, збільшення концентрації етанолу веде до росту протонодонорності та зменшення в'язкості оточення, про що свідчить збільшення інтенсивності емісії N^* форми та зменшення загальної інтенсивності емісії. Збільшення концентрації холестерину створює протилежні ефекти.

Зареєстровано і досліджено явище утворення впорядкованих структур молекул буфера HEPES на поверхні бішару везикул аніонного ліпиду ЯЖФГ (яєчний фосфатидилгліцерин), у середовищі яких спостерігається дисоціація зонда **4.8** навіть при $pH \leq 7$. Цвіттеріонна природа молекул HEPES веде до їх взаємодії з негативно зарядженою поверхнею везикули та до впорядкованої орієнтації на поверхні. Основні атоми Нірогену молекули HEPES утворюють МВЗ з гідроксигрупою **4.8**, фіксуючи молекулу **4.8** в електростатичному полі створеного шару і викликаючи її дисоціацію. Утворення аніону сполуки **4.8** підтверджено вимірами часів згасання емісії барвника у водному розчині та у везикулах, розміщених у фосфат-цитрат-боратному буфері (ФЦББ) або в HEPES. Лише у випадку системи ліпід-HEPES при $pH 7.0$ зареєстровано складову, яка має час життя $4 \cdot 10^{-9}$ с і відноситься до емісії аніону. У випадку системи ліпід-ФЦББ таку складову емісії зареєстровано лише при $pH > 9$.

Синтезовано перші флуоресцентні зонди на основі ЗГХ **4.11-4.13** з фіксованою локалізацією та орієнтацією в ліпідній мембрані (Рис. 21). Вивчено їх спектральні властивості в розчинниках різної полярності та в ліпідних везикулах, створених з нейтральних та аніонних ліпідів. Різний рівень гасіння для **4.11**, **4.12** та **4.13** парамагнітними сполуками свідчить, що ці зонди мають фіксовану локалізацію і орієнтацію в ліпідному бішарі, тоді як сполука **4.8** змінює глибину свого розташування в широких межах.

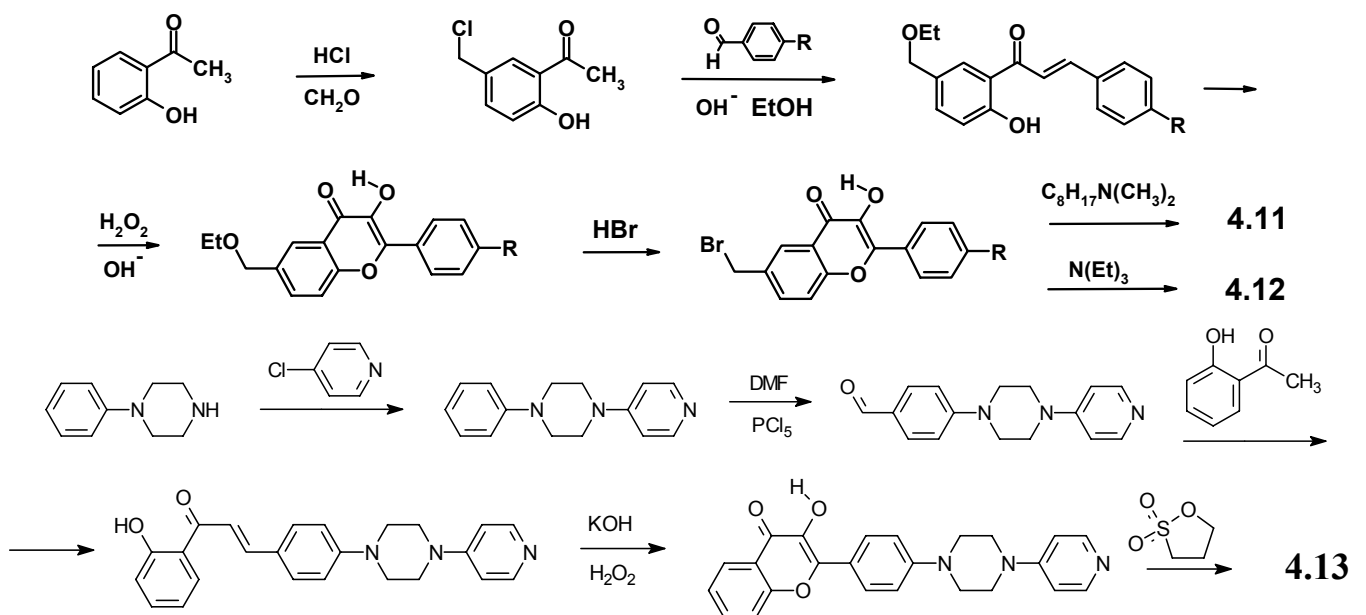


Рис. 21. Схеми синтезу зондів **4.11**, **4.12** і **4.13**.

5. ДИФЛАВОНОЛИ: ТРЕТЯ СМУГА У СПЕКТРІ ФЛУОРЕСЦЕНЦІЇ ЯК СПОСІБ ЗБІЛЬШЕННЯ ЧИСЛА КАНАЛІВ ПЕРЕДАВАННЯ ІНФОРМАЦІЇ

Проведено аналіз можливостей збільшення числа каналів передавання інформації шляхом генерації третьої смуги у спектрі емісії зонду. Спрогнозовано структуру барвників - дифлавонолів, які мають дві системи ВФП у молекулі і внаслідок цього в збудженому стані можуть утворювати три таутомерні форми: NN*, NT* і TT* (Схема 5). На підставі такого припущення здійснено синтез барвників **5.1** – **5.3**. Вперше досліджено їх флуоресцентні властивості у розчинах за температур 77 і 298 К. Порівняно з хромоном **4.1** та **4.3** максимуми у спектрах поглинання сполук **5.1** – **5.3** зміщені батохромно на 30-50 нм і лежать на межі УФ та видимого діапазонів (Табл. 2-3). Донорні замісники у **5.3** порівняно з **5.1** викликають батохромний зсув максимуму на 40-90 нм. Барвники **5.1-5.3** мають два еквівалентні крос-кон'юговані хромофори, внаслідок чого кількість смуг у їх спектрах поглинання є збільшеною (Рис. 22). Дифлавонол **5.3**, маючи у 1.5 рази більший молярний коефіцієнт екстинкції, ніж флавонол **4.3**, проявляє високі (>50%) квантові виходи емісії у апротонних розчинниках (Табл 3). Усі барвники демонструють багатосмугову емісію у розчинах і проявляють високу чутливість до полярності і протонодонорності середовища, змінюючи інтенсивність та положення смуг у спектрах емісії.

Важливим питанням є встановлення природи смуг у спектрах емісії дифлавонолів. Шляхом застосування квантово-хімічних розрахунків (*ab initio*: базис 6-31G**, методи DFT і TDDFT, B3LYP) досліджено процеси синхронного (СП) та послідовного перенесення двох протонів (ПП) у дифлавонолі **5.1** та флавонолі **4.1** в основному (S₀) та збуджених (S₁, S₂ та S₃) станах (Рис. 22). За цими даними, хоча СП у стані S₁ та S₂ і ПП у стані S₂ є екзотермічними процесами, найбільший вигрaш енергії спостерігається-

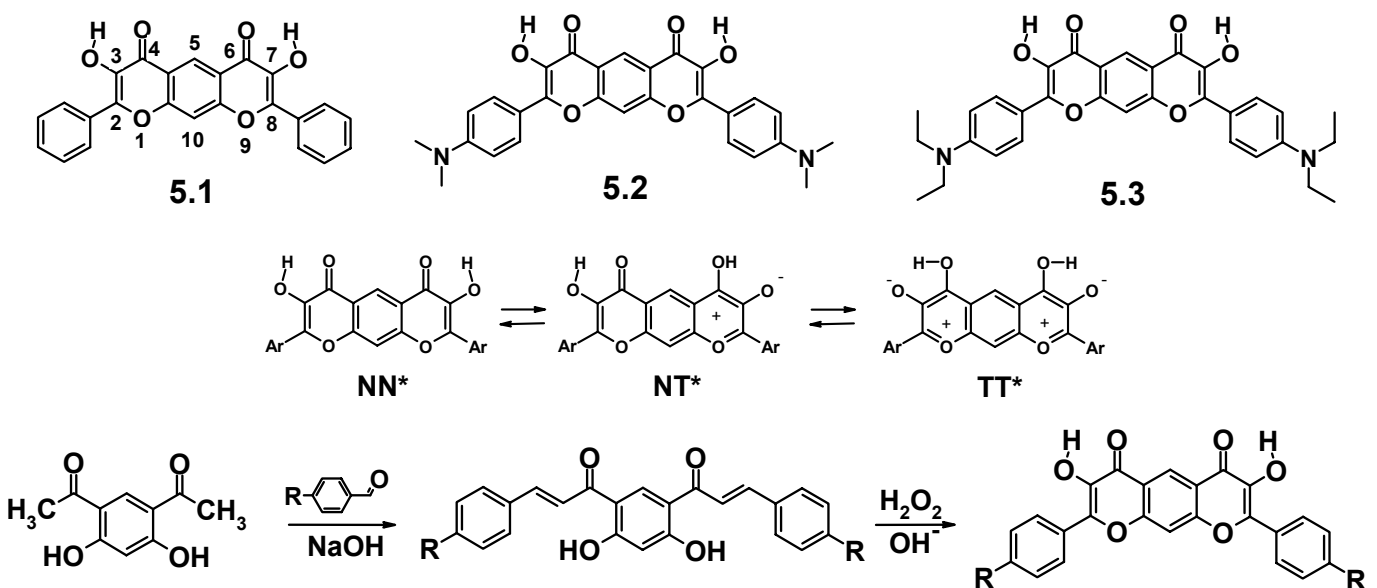


Схема 5. Структура барвників **5.1-5.3**, схема таутомеризації та схема синтезу

ся при перенесенні лише одного протона у стані S_1 , що вказує на реалізацію даного механізму у випадку сполуки **5.1**, як мінімум у неполярному середовищі. В таких умовах смуги у спектрах емісії **5.1** (спектри збудження яких співпадають зі спектром поглинання), слід віднести до NN^* і NT^* форм. Добре вираженою позитивною сольватохромією володіє короткохвильова смуга емісії, в той час як довгохвильова смуга і смуга поглинання є менш чутливими до полярності оточення. Введення електродонорів (діалкіламіногруп) в бокові ядра дифлавонолів радикально збільшує їх сольватохромію: для NN^* -форми сполуки **5.3** вона є вищою, ніж для 3-гідроксихромону **4.3** (Рис. **23**). Параметром, найбільш чутливим до зміни полярності середовища, є від-

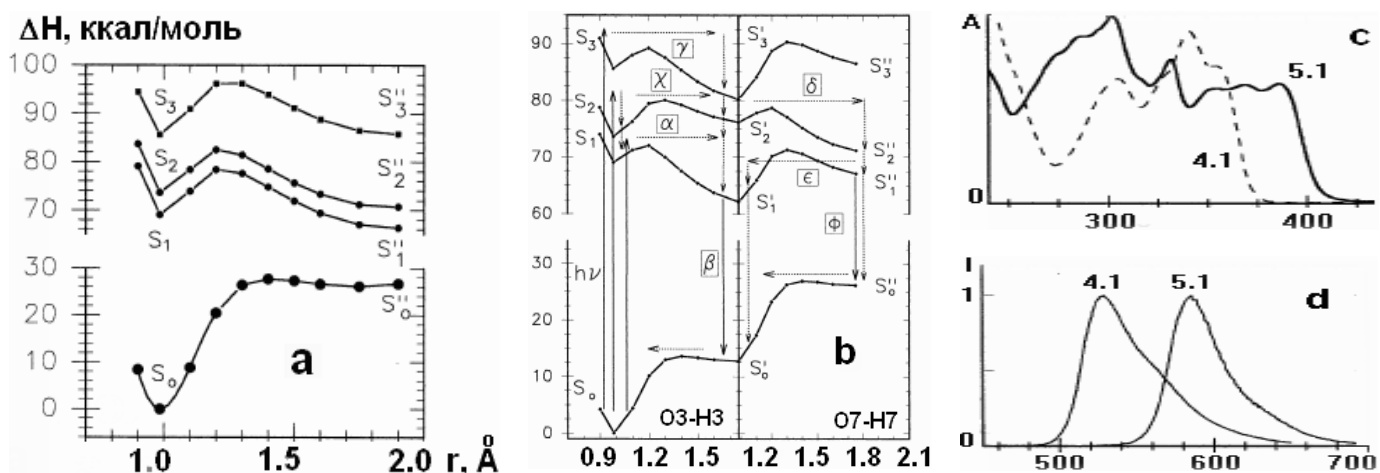


Рис. 22. Енергетичні профілі процесу синхронного (а) та послідовного (б) переносу двох протонів сполуки **5.1** у S_0, S_1, S_2 та S_3 станах. Спектри поглинання (с) та флуоресценції (д) флавонолу **4.1** та дифлавонолу **5.1** у декаліні. Довжини хвилі збудження: 340 нм (для **4.1**) та 370 нм (для **5.1**)

Таблиця 2. Положення максимумів у спектрах сполуки **5.1** при 298 К та при 77 К

Розчинник	Поглинання, 298 К, λ_{\max} , нм	Емісія, 298 К, λ_{\max} , нм	Стоксів зсув ΔS , cm^{-1}	Емісія, 77 К, λ_{\max} , нм
Декалін	386	-/588	8900	
Метилциклогексан	385	-/582	9000	
1,4-Діоксан	386	453/600	3800/9250	
Et ₂ O – МЦГ (2:1)	372, 384	440/599	3310/9350	416, 441/604
Et ₂ O – н-пентан (2:1)	369	439/598	4320/10380	415, 442/605
ЕІЕ (5:5:2)*	357, 375	475/606	5610/10170	422, 444/602
Етанол	360	484/566	7120/10100	442/602
Метано—етанол (9:1)	345, 359	488/564	7360/10120	450/602
Пропіленгліколь	358-374	488/562	6250/8940	445/606

* Суміш Et₂O – ізопентан- етанол (5:5:2). Et₂O – етиловий етер

ношення інтенсивностей двох смуг емісії, яке за величиною для **5.3** змінюється на 4 порядки при переході від *n*-пентану до дихлорометану (Табл **3**). Чутливість барвників **5.1-5.3** до протонодонорів проявляється у шкалі загальної інтенсивності флуоресценції: у спиртах квантовий вихід флуоресценції падає на 2-3 порядки і становить частки відсотків. У спиртах при 298 К довгохвильова смуга **5.1** має кілька складових, а її максимум зміщений від 602 до 562 нм (Табл. **2**). Оскільки спектр емісії у 0.01 М етоксиді натрію має таке ж положення, смугу було віднесено до аніонних форм сполуки (AA* або AT*). Барвники **5.1-5.3** мають смуги емісії у червоній ділянці спектру і високі (6500-8500 см⁻¹) Стоксові зсуви, що є цінним у багатьох аспектах практичного використання. Високі Стоксові зсуви є результатом фотохімічних явищ: ВФЗ (для форми NN*) та ВФП (для форм NT* і TT*).

Спектри збудження барвника **5.3**, отримані на окремих смугах емісії у малополярних апротонних розчинниках співпадають зі спектрами поглинання, що є прямим

Таблиця 3. Спектральні характеристики дифлавонолу **5.3**

Розчинник	λ_{\max}^b (нм)				$\Delta S(\text{см}^{-1})$		Напівшир. (см ⁻¹)	
	Поглин.	Флуор.	I_{fl}	$I_{\text{TT}}/I_{\text{NN}}$	NN-форма	TT-форма	NN-форма	TT-форма
<i>n</i> -Пентан	425	456; 611	0.7	100	1500	7100		790
<i>n</i> -Гексан	427 (4.7)	455; 613	0.7	56	1500	7100	1900	820
CCl ₄	442	475; 618	0.7	34	1600	6500	2010	940
Толуен	441	502; 631	0.7	7.0	2800	6800	2250	1050
Бензен	442	495; 624	0.8	6.6	2400	6600	2260	1040
Ефір		510; 634	0.9	4			2680	1200
1,4-Діоксан		505; 635	0.9	7			2630	1150
Бромобензен		533; 644	0.8	0.76			2680	1200
ТГФ		548; 647	0.8	0.33			3220	1210
Етилацетат	435(4.77)	542; 638	0.8	0.40	4550	7300	3020	1270
CHCl ₃	447	522; 630	1	0.27	3200	6500	2450	1360
CH ₂ Cl ₂	449(4.73)	550; 635	1 ^c	0.07	4000	6500	2590	
Ацетон		580	0.3	~0			3380	
HCOOCH ₃		580	0.3	~0			3340	
Ацетонітрил	439(4.73)	545; 606; 663	0.1	~0	5800		3320	
1-Бутанол		570	0.03	~0			3480	
1-Пропанол	449(4.73)	568	0.018	~0	4700		3420	
Метанол	450(4.65)	564	0.003	~0	4500		4260	

^a Літературні дані. ^b Ig ϵ подано в дужках. ^c Квантовий вихід флуоресценції = 64%.

доказом таутомеризації сполуки у збудженому стані. Віднесення смуг у спектрі емісії до конкретних таутомерів є окремою проблемою, оскільки наявність потужних електронодonorів може змінити природу електронних переходів. Таке віднесення зроблено шляхом аналізу форми, напівширини, Стоксового зсуву смуг (Табл. 3) і залежностей положення максимумів від полярності розчинника (Рис. 22). Наявність двох ділянок на цій залежності для короткохвильової смуги може свідчити про її належність до двох таутомерних форм: NN* та NT*, коли у малополярному середовищі домінує NN* форма, а у полярному та основному – NT* форма. Збільшена напівширина смуг у розчинниках середньої полярності і складна форма смуги емісії в ацетонітрилі дають додаткові докази цьому. Рівність Стоксових зсувів смуг емісії дифлавонолу **5.3** та флавонолу **4.3** у гексані (відповідно 1500 і 7100 см^{-1} для коротко- і довгохвильової смуги) є результатом взаємодії двох однакових хромофорів у **5.3** і вказує на належність смуг до емісії NN* і TT* форм. Таким чином, у неполярних розчинниках спектри барвника **5.3** містять смуги емісії NN* форми (короткохвильова смуга) і TT* форми (довгохвильова смуга). У апротонних та основних розчинниках середньої полярності (тетрагідрофуран, етилацетат, метилформіат, ацетонітрил тощо) короткохвильова смуга включає емісію двох таутомерних форм: NN* і NT*. Отже, для дифлавонолів **5.1** і **5.3** у розчинах зареєстровано три смуги у спектрах флуоресценції, що забезпечує їм рекордно високу спектральну чутливість до природи середовища (природи розчинника, температури тощо) яка виражається у зміні інтенсивності та положення кожної зі смуг.

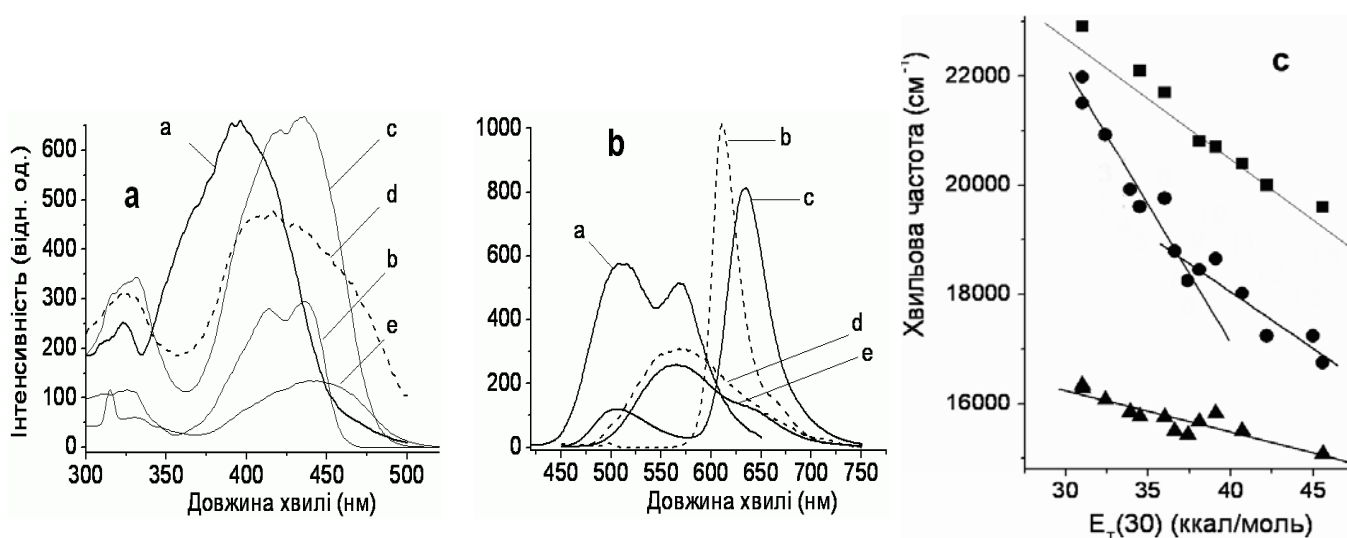


Рис. 23. Спектри збудження (а) та флуоресценції (б) $5 \cdot 10^{-6}$ М розчину флавонолу **4.3** у ацетонітрилі (а) та $2 \cdot 10^{-6}$ М розчину дифлавонолу **5.2** у *n*-пентані (б), 1,4-діоксані (с), 1-бутанолі (д), та 1,2-діацетоксиетані (е). Довжина хвилі збудження: 405 нм для **4.3** та 430 нм для **5.2**. (с) – Положення максимуму N*-смуги у спектрах флуоресценції флавонолу **4.3** (■) та дифлавонолу **5.2** (●,▲) як функція параметру полярності розчинника $E_T(30)$.

ВИСНОВКИ

1. Синтезовано ряди нових флуоресцентних барвників класів 1,3-діриліденкетонів, дициклопентано[*b,e*]піридинів (ДЦП) та 3-гідроксихромонів (ЗГХ), які закономірно різняться за електронодонорністю замісників, довжиною хромофора, планарністю та мірою конденсованості фрагментів молекули. Встановлено залежності параметрів емісії цих сполук (квантового виходу, положення максимумів поглинання та флуоресценції, співвідношення інтенсивності смуг флуоресценції) від названих характеристик їх будови. Зокрема:

1а. Методами квантово-хімічних розрахунків, ^1H -ЯМР спектроскопії та флуориметрії встановлено, що барвники класів ДЦП та ЗГХ з п'ятичленими бічними циклами – у противагу барвникам, що мають шестичленні ядра, у розчинах перебувають у планарних конформаціях. На основі принципу вищої планарності синтезовано серії барвників обох класів зі збільшеною яскравістю флуоресценції.

1б. Для 1,3-діриліденкетонів показано, що похідні ацетону, не зважаючи на більше число обертальних ступенів вільності, мають квантові виходи флуоресценції, які за значеннями близькі до похідних циклопентанону. Показано, що з подовженням спряженої системи 1,3-діриліденкетонів відбувається падіння квантових виходів флуоресценції внаслідок підсилення процесів внутрішньої конверсії.

1в. Для похідних класу ДЦП методами ^1H - та ^{13}C -ЯМР спектроскопії і флуориметрії встановлено *EE*-конфігурацію. Синтезовано представники *EZ*-ізомерів і показано, що флуоресцентними властивостями володіють лише *EE*-ізомери та їх протоновані форми. Положення максимуму поглинання цих сполук можна змінювати в діапазоні 370-440 нм, а для протонованої форми – 440-580 нм шляхом регуляції електронодонорних властивостей замісника в бокових ядрах молекули. Цим же способом можна змінювати положення максимуму емісії *EE*-ізомеру в межах 450-560 нм (для протонованої форми – в межах 520-700 нм).

1г. Встановлено, що бензофуранові похідні 3-гідроксихромону мають найбільш довгохвильове положення максимуму поглинання (440 нм), що дозволяє використовувати для їх збудження емісію титан-сапфірового лазера. Наявність електронодонорного замісника в хромоновому ядрі збільшує різницю в положеннях смуг емісії N^* і T^* форм. Смуги емісії N^* і T^* форм планомірно зміщуються у довгохвильовий бік при зростанні електронодонорних властивостей замісника у боковому ядрі або при подовженні системи спряжених зв'язків у цей бік. При таких змінах структури барвника стрімко зростає відношення інтенсивностей смуг емісії $I_{\text{N}^*}/I_{\text{T}^*}$.

1д. Аннелювання ароматичного ядра за положеннями 5-6, 6-7, або 7-8 молекули хромона суттєво не змінює положення максимумів поглинання та флуоресценції, проте веде до стабільно високих квантових виходів флуоресценції у розчинниках

різної природи, а також до зменшення відношення інтенсивностей смуг емісії I_{N^*}/I_{T^*} .

2. Для барвників класів 1,3-діриліденкетонів, ДЦП та ЗГХ встановлено залежності параметрів поглинання і флуоресценції (квантового виходу, положення максимумів поглинання та флуоресценції, співвідношення інтенсивності смуг флуоресценції) від фізико-хімічних параметрів середовища (діелектричної сталої, емпіричної полярності, концентрації донора ВЗ, основності, рН). Зокрема:

2а. Показано, що 1,3-діриліденкетони мають сольватохромні властивості на рівні флуоресцентного зонду PRODAN, а їх похідні з подовженим хромофором перевищують PRODAN за цим параметром. Сольватохромні властивості сполук класу ДЦП зростають при збільшенні електронодонорності замісників у бокових ядрах.

2б. Встановлено, що амінопохідні 3-гідроксихромонів володіють рекордно високою сольватохромією, яка виражається у тисячекратній зміні відношення інтенсивностей смуг емісії I_{N^*}/I_{T^*} при зміні полярності середовища.

2в. Показано, що властиву всім сольватохромним барвникам спектральну чутливість до молекул-донорів водневого зв'язку можна ліквідувати у похідних ЗГХ шляхом уведення замісників, що блокують доступ до карбонільної групи молекули. При цьому зберігається спектральна чутливість барвника до полярності оточення.

3. Розроблено методи хімічної модифікації 1,3-діариліденкетонів, дициклопентано-[b,e]піридинів та 3-гідроксихромонів у напрямках добудови в молекулі додаткових функціональних елементів флуоресцентного зонду, таких як заряджені групи, рецептори катіонів, ліпофільні та гідрофільні групи, групи для ковалентної іммобілізації зонду тощо. Розроблено новий шлях синтезу 4'-діалкіламінопохідних флавонолів, який полягає в нуклеофільному заміщенні атома Флуору на діалкіламіногрупу.

4. Синтезовано і досліджено моделі багатоканальних флуоресцентних індикаторів з одним, двома та трьома рецепторами катіонів: монокраунпохідні 1,3-діариліденкетону та 3-гідроксифлавонону, біскраунпохідні 1,3-діариліденкетону, трискраунпохідну ДЦП, а також три- та гекса(диметиламінометил)похідні ДЦП.

5. На прикладі синтезованих 3-гідроксихромонів, що містять замісники різної π -донорності у положенні 2 методом спектроскопії Шпольського вивчено механізм внутрішньомолекулярного фотоперенесення протона. На основі результатів вимірювання швидкостей ВФП встановлено, що донорні замісники в бічному ядрі похідних ЗГХ блокують механізм тунелювання протону, збільшуючи цим вклад механізму температурної активації у процесі ВФП.

6. Синтезовано і вивчено властивості нової групи флуоресцентних барвників – дифлавонолів, які містять дві системи ВФП в молекулі, внаслідок чого демонструють

трисмугову флуоресценцію у розчинах. Встановлено, що у спиртах дифлавонол має смуги емісії NN*, NT* та аніонної форми, в той час як у ацетонітрилі та розчинниках середньої полярності діамінопохідна дифлавонолу проявляє емісію NN*, NT* і TT* форм. Показано, що високі Стоксові зсуви смуг флуоресценції дифлавонолів, як і флуоресценція в червоній ділянці спектра є наслідком явища ВФЗ (для NN* форми) та ВФП (для NT* і TT* форм).

7. Реалізація принципу багатоканальності передавання інформації про об'єкт в роботі флуоресцентного зонда дозволила вирішити ряд науково-практичних проблем, які раніше вирішені не були. Зокрема:

- 7а. На основі ЗГХ розроблено перший флуоресцентний зонд для визначення аденозинтрифосфату (АТФ) у межах його фізіологічних концентрацій у водних розчинах. Зонд має високу селективність до АТФ у порівнянні з іншими нуклеозидфосфатами: АДФ, АМФ, ГТФ, ІТФ, УТФ тощо;
- 7б. На основі ЗГХ синтезовано широкодіапазонний рН-індикатор (для вимірів рН у межах від 3 до 11) з ратіометричним принципом генерації сигналу у спектральних діапазонах збудження та флуоресценції;
- 7в. З використанням зонду на основі ЗГХ розроблено метод одночасного визначення концентрації протонодонора (спирту) та полярності середовища (як функції діелектричної сталої) за спектром флуоресценції зонда;
- 7г. На основі ЗГХ синтезовано флуоресцентний зонд, вибірково чутливий лише до неспецифічних взаємодій у розчинах і нечутливий до донорів водневого зв'язку;
- 7д. На основі ЗГХ синтезовано йонний індикатор, який протилежним чином змінює положення максимумів поглинання і збудження флуоресценції при зв'язуванні з катіонами різного радіусу: Mg²⁺ та Ba²⁺;
- 7е. Для біс-(аза-15-краун-5)похідної 1,3-діариліденкетону зареєстровано рекордно високе (7000 см⁻¹) розділення смуг флуоресценції вільного барвника та його магнієвого комплексу, показана висока ефективність у флуориметричному розпізнаванні катіонів різного радіуса та у дослідженні утворення водневих зв'язків з протонодонорами;
- 7ж. На основі дициклопентано[b,e]піридину створено і вивчено ряд флуоресцентних рН-індикаторів для вимірів рН у межах від 2 до 11, з ратіометричним принципом генерації сигналу в спектральних діапазонах збудження та флуоресценції;

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ ДИСЕРТАЦІЇ ВИКЛАДЕНО В ПУБЛІКАЦІЯХ:

1. **Pivovarenko V. G., Vadzyuk O. B., Kosterin S. O.** Fluorometric detection of adenosine triphosphate with 3-hydroxy-4'-(dimethylamino)flavone in aqueous solutions. // J. Fluorescence. - 2006. – 16. – P. 9-15.

2. Валюк В.Ф., **Пивоваренко В.Г.**, Герасьов А.О. Синтез та флуоресцентні властивості властивості 8-арил-3,5-ді[(Е)-арилметиліден]-4-*R*-1,2,3,4,5,6,7,8-октагідродициклопентано[*b,e*]піридинів // Доповіді НАН України. – 2005. – № 3. – С. 125-131.
3. Nemkovich N.A., **Pivovarenko V.G.**, Baumann W., Rubinov A.N., and Sobchuk A.N. Dipole moments of 4'-aminoflavonol fluorescent probes in different solvents // J. Fluorescence. – 2005. - V. 15. – p. 29-36.
4. Valuk V.F., Duportail G., **Pivovarenko V.G.**. A wide-range fluorescent pH-indicator based on 3-hydroxyflavone structure // J. Photochem. Photobiol. A: Chem. - 2005. – V. 175. – p. 226-231.
5. **Pivovarenko V.G.**, Wróblewska A., Błażejowski J., 2-[4-(Dimethylamino)phenyl]-3-hydroxy-4*H*-chromene-4-one: a H-bond-sensitive fluorescent probe for investigating binary mixtures of organic solvents // Anal. Chim. Acta. – 2005. – V. 545 74-78.
6. Zhmud B.V., Golub A.A., **Pivovarenko V.G.** Synthesis and study of ion adsorption and fluorescent properties of silica-grafted bis(crownazo)methane // Inorg. Mater. – 2004. – V. 40. – P. 1006-1013.
7. Shynkar V. V., Klymchenko A. S., Mely Y., Duportail G., **Pivovarenko V. G.** Anion Formation of 4'-(Dimethylamino)-3-hydroxyflavone in Phosphatidylglycerol Vesicles Induced by HEPES Buffer: A Steady-State and Time-Resolved Fluorescence Investigation // J. Phys. Chem. B. – 2004. – V. 108. – P. 18750-18755.
8. Bader A.N., **Pivovarenko V.G.**, Demchenko A. P., Ariese F., Gooijer C. Excited state and ground state proton transfer rates of 3-hydroxyflavone and its derivatives studied by Shpol'skii spectroscopy; the influence of redistribution of electron density // J. Phys. Chem. B. – 2004. – V. 108. – P. 10589-10595.
9. Муньос А., Рошаль А.Д., Ришельме С., Лерой Е., Клапарол С., Григорович А.В., **Пивоваренко В.Г.**. Идентификация и определение строения комплексов щелочноземельных металлов с флавонолами при помощи ФАБ масс-спектрометрии // Журн. Общ. Хим. – 2004. – 74. – P. 482-490.
10. **Pivovarenko V.G.**, Wróblewska A., Błażejowski J. The effect of hydrogen bonding interactions between 2-[4-(dimethylamino)phenyl]-3-hydroxy-4*H*-chromene-4-one in the ground and excited states and dimethylsulfoxide or methanol on electronic absorption and emission transitions // J. Molec. Struct. – 2004. – V. 708. - p. 175-181.
11. Валюк В.Ф., **Пивоваренко В.Г.**, Григорович А.В., Дорошенко А.О. Спектральные и кислотно-основные свойства арилиденовых производных дициклопентано[*b,e*]пиридинов – флуоресцентных рН-индикаторов // Теор. Эксп. Хим. – 2004. – Т. 40. – С. 256-261.

12. Doroshenko A.O., Bilokin' M.D., **Pivovarenko V.G.** New fluorescence dye of dibenzalcylopentanone series possessing increased solvatochromism // *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* – 2004. – V.163. – P. 95 – 102.
13. Falkovskaia E., **Pivovarenko V.G.**, del Valle J.C. Interplay between intra- and intermolecular excited-state single- and double-proton-transfer processes in the biaxially symmetric molecule 3,7-dihydroxy-4H,6H-pyrano[3,2-g]-chromene-4,6-dione // *J. Phys. Chem. A.* – 2003. – V. 107. – P. 3316-3325.
14. **Pivovarenko V.G.**, Grygorovych A. V., Valuk V. F., Doroshenko A. O.. Structurally Rigid 2,6-distyrylpyridines - A New Class of Fluorescent Dyes. 1. Synthesis, Steric Constitution and Spectral Properties // *J. Fluoresc.* -2003. – 13. - p. 479-487.
15. Голуб О.А., **Пивоваренко В.Г.**, Смирнова Н.П., Педь Л.Л., Кудренко В.О., Зуб В.Я. Високоєфективний флуоресцентний сенсор на La^{3+} на основі крауназومتину, іммобілізованого на аеросилі // *Доп. НАН України.* – 2003. - №8. - с. 136-141.
16. Klymchenko S., **Pivovarenko V. G.**, Demchenko A. P. Perturbation of planarity as the possible mechanism of solvent-dependent variations of fluorescence quantum yield in 2-aryl-3-hydroxychromones // *Spectrochim. Acta Part A.* – 2003. – V. 59. – P. 787-792.
17. Doroshenko A.O., **Pivovarenko V.G.**. Fluorescence quenching of the ketocyanine dyes in polar solvents: anti TICT behavior // *J. Photochem. Photobiol., A: Chem.* – 2003. – V. 156. – P. 55 – 64.
18. Bader A.N., **Pivovarenko V.G.**, Demchenko A.P., Ariese F., Gooijer C. Solvent influence on excited-state intramolecular proton transfer in 3-hydroxychromone derivatives studied by cryogenic high-resolution fluorescence spectroscopy // *Spectrochim. Acta Part A.* – 2003. – V. 59. – P. 1593 – 1603.
19. Klymchenko S., **Pivovarenko V. G.**, Demchenko A. P. Elimination of hydrogen bonding effect on the solvatochromism of 3-hydroxyflavones // *J. Phys. Chem. A.* - 2003.- 107.- P. 4211-4216.
20. **Пивоваренко В.Г.** Дизайн флуоресцентних зондів на основі 3-гідроксихромонів та їх аналогів // *Ukr. Bioorg. Acta.* – 2003. – Т. 1. – С. 40-49.
21. Nemkovich N. A., Baumann W., **Pivovarenko V. G.**, A. N. Rubinov. Determination of the dipole moments of the molecules of 4'-substituted 3-hydroxyflavones using the electrooptic absorpton method // *J. Appl. Spectr.* – 2003. – V. 70. - p. 230-237
22. Klymchenko A. S., **Pivovarenko V. G.**, Ozturk T., Demchenko A. P. Modulation of the solvent-dependent dual emission in 3-hydroxychromones by substituents // *New J. Chem.* – 2003. – V. 27. - p. 1336-1343.
23. **Pivovarenko V.G.** 3-Hydroxyflavones as multi-channel fluorescent probes: Design, synthesis, and application. In: *Proc. of 1st Int. Conf. «Oxygen- and sulfur-containing heterocycles»*, Kartsev V.G., Ed., Moscow: IBS PRESS, 2003, V. 1, p. 358-363.

24. Demchenko A. P., Klymchenko A. S., **Pivovarenko V. G.**, Ercelen S., Duportail G., Mely Y. Multiparametric color changing fluorescence probes // *J. Fluoresc.* – 2003. – V. 13. – P. 291-295.
25. Roshal A. D., Moroz V. I., **Pivovarenko V. G.**, Wróblewska A., Błażejowski J. Spectral and Acid-Base Features of 3,7-Dihydroxy-2,8-diphenyl-4H,6H-pyrano[3,2-g]chromene-4,6-dione (Diflavonol) - A Potential Probe for Monitoring the Properties of Liquid Phases // *J. Org. Chem.* – 2003. – V. 68. - p. 5860-5869.
26. Doroshenko A.O., Sychevskaya L.B., Grygorovych A.V., **Pivovarenko V.G.** Fluorescence Probing of Cell Membranes with Azacrown Substituted Ketocyanine Dyes // *J. Fluoresc.* – 2002. – V. 12. - P. 455-464.
27. Klymchenko A.S., Duportail G., Ozturk T., **Pivovarenko V. G.**, Mely Y., and Demchenko A.P.. Novel Two-Band Ratiometric Fluorescence Probes with Different Location and Orientation in Phospholipid Membranes // *Chem. Biol.* 2002. - V. 9. - P. 1199–1208.
28. Demchenko A. P., Klymchenko A. S., **Pivovarenko V. G.**, Ercelen S. Ratiometric probes: design and applications // *Fluorescence Spectroscopy, Imaging and Probes - New Tools in Chemical, Physical and Life Sciences* (Kraayenhof R, Visser AJWG, Gerritsen HC, eds.) Springer Series on Fluorescence Methods and Applications, V. 2, Springer-Verlag, Heidelberg, Germany, 2002, 101-110.
29. Falkovskaia E., **Pivovarenko V.G.** del Valle J.C. Observation of a single proton transfer fluorescence in a biaxially symmetric dihydroxy diflavonol // *Chem. Phys. Lett.* – 2002. – 352. – P. 415-420.
30. Nemkovich N.A., Baumann W., **Pivovarenko V.G.** Dipole moments of 4'-amino-flavonols determined using electro-optical absorption measurements or molecular Stark-effect spectroscopy // *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*- 2002,- V. 140, - p. 19-24.
31. Крученюк Ю.В., Немкович Н.А., **Пивоваренко В.Г.**, Рубинов А.Н.. Механизм внутримолекулярного переноса протона и электрона в возбужденном состоянии 4'-аминопр-х 3-гидроксифлавона // *Ж. прикл. спектр.* – 2002. – Т. 69. - С. 324-330.
32. **Pivovarenko V.G.**, Józwiak L., Błażejowski J. 2,8-Bis[4-(diethylamino)phenyl]-3,7-dihydroxy-4H,6H-pyrano[3,2-g]chromene-4,6-dione – a new liquid-phase-sensitive fluorescent probe utilising intramolecular one- or two-proton transfer phenomena // *Europ. J. Org. Chem.* – 2002. – V. 23. – P. 3979-3985.
33. Klymchenko A. S., Ozturk T., **Pivovarenko V. G.**, Demchenko A. P. A 3-Hydroxychromone with dramatically improved fluorescence properties // *Tetrah. Lett.* 2001. – V. 42. – P. 7967-7970.
34. Kruchenok Yu.V., Nemkovich N.A., Sobchuk A.N., Petrov E.P., Rubinov A.N., **Pivovarenko V.G.**, Baumann W. Red edge excitation effect in intramolecular proton

- transfer in flavonols. In: Proceedings of SPIE – The International Society of Optical Engineering. – 2001. - V. 4749. - p. 413-419.
35. Nemkovich N.A., Kruchenok J.V., Rubinov A.N., **Pivovarenko V.G.**, Baumann W. Site selectivity in excited-state intramolecular proton transfer in flavonols // Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry. - 2001. - V. 139. - P. 53-62.
 36. Klymchenko, A. S.; Ozturk, T.; **Pivovarenko, V. G.**; Demchenko, A. P. Synthesis and Spectroscopic Properties of Benzo/Naphtofuryl-3-hydroxychromones // Can. J. Chem. 2001. – V. 79. – P. 358-363.
 37. Doroshenko A.O., Grigorovich A.V., Posokhov E.A., **Pivovarenko V.G.**, Demchenko A.P., Sheiko A.D. Complex formation between azacrown derivatives of dibenzylidenecyclopentanone and alkali-earth metal ions // Russ Chem. Bull., Intl. Ed.- 2001.- V.50.- P. 404-412.
 38. Demchenko A.P., Klymchenko A.S. **Pivovarenko V.G.** 3-Hydroxyflavones as fluorescence probes for molecular and cellular research // Luminescence. – 2000. – V. 15. – P. 116-118.
 39. **Pivovarenko V.G.**, Klueva A.V., Doroshenko A.O., Demchenko A.P. Bands separation in fluorescence spectra of ketocyanine dyes: evidence for their complex formation with monohydric alcohols // Chem. Phys. Lett. – 2000. – V. 325. – P. 389-398.
 40. Doroshenko A.O., Grigorovich A.V., Posokhov E.A., **Pivovarenko V.G.**, Demchenko A.P. Spectroscopic properties and proton accepting ability of N-alkyl derivatives of dibenzylidenecyclopentanone, prospective fluorescent probes for cell membrane investigation // Func. Mater. – 2000. - V. 7. – P. 323-329.
 41. **Pivovarenko V.G.** Design of fluorescent probes on the basis of ketocyanines and flavonols // Proc. of the 3rd International Training Course “Fluorescence probes in molecular and cellular biophysics”, Gebze, Turkey. – 2000. – P. 23-28.
 42. Klymchenko A.S., Ozturk T., **Pivovarenko V.G.**, Demchenko A.P. Design of fluorescent probes sensitive to membrane potential based on intramolecular excited state proton transfer // Proc. Of Third Conference on Fluorescence Microscopy and Fluorescent Probes. - Prague. – 1999. – P. 153-158.
 43. **Pivovarenko V.G.** Flavonols and crowned flavonols in the design of fluorescent probes // Proc. of Sci. Assoc. Gdanskie Towarz. Naukowe. – Gdansk. – 1999. – P. 90-93.
 44. Roshal A.D., Grigorovich A.V., Doroshenko A.O., **Pivovarenko V.G.**, Demchenko A.P. Flavonols as metal-ion chelators: complex formation with Mg²⁺ and Ba²⁺ cations in the excited state // J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry. – 1999. – V. 127. - p. 89-100.
 45. Doroshenko A.O., Grigorovich A.V., Posokhov E.A., **Pivovarenko V.G.** Demchenko A.P. Bis-Azacrown Derivative of Di-Benzylidene-Cyclopentanone as Alkali Earth Ion

- Chelating Probe: Spectroscopic Properties, Proton Accepting ability and Complex Formation with Mg^{2+} and Ba^{2+} Ions. *Molec. Engineering.* – 1999. – V. 8. - p. 199-215.
46. Marcotte N., Fery-Forgues S., Lavabre D., **Pivovarenko V. G.** Spectroscopic Study of a Symmetrical Bis-crown Fluoroionophore of the Diphenylpentadienone Series // *J. Phys. Chem. A.* – 1999. – V. 103. - 3163-3170.
47. Рошаль А.Д., Григорович А.В., Дорошенко А.О., **Пивоваренко В.Г.**, Демченко А.П. Процеси комплексоутворення 3-*R*-оксифлавононів з катіонами Mg^{2+} в збудженому стані // *Вест. Харьк. Унив.* – 1998. – Хим. - N2. - с. 201-208.
48. Bondar O.P., **Pivovarenko V.G.**, Rowe E.S. Flavonols - new fluorescent membrane probes for studying the interdigitation of lipid bilayers // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1998. – V. 1369. – P. 119-130
49. Roshal A.D., Grigorovich A.V., Doroshenko A.O., **Pivovarenko V.G.**, Demchenko A.P. Flavonols and Crown-Flavonols as Metal Cation Chelators. The Different Nature of Ba^{2+} and Mg^{2+} Complexes // *J. Phys. Chem. A.* – 1998. – V. 102. – P. 5907-5914.
50. **Pivovarenko V.G.**, Tuganova A.V., Klimchenko A.S., Demchenko A.P. Flavonols as models for fluorescent membrane probes. I. The response to the charge of micelles // *Cell. Molec. Biol. Lett.* – 1997. – V. 2. – P. 355-364
51. **Пивоваренко В.Г.**, Вадзюк О.Б., Костерін С.О. Спосіб флуориметричного визначення концентрації аденозин-5'-трифосфату (АТФ) у розчині // Заявка № 2004031886 від 15.03.2004 р. - Патент № 75448 від 17.04.2006 р. - Бюл. № 4.- 2006.
52. **Пивоваренко В.Г.**, Блажейовські Є., Вроблевська А., Павлов Д.О. Спосіб флуориметричного визначення концентрації протонного компонента в рідкій суміші // Заявка № 20031110244 від 13.11.2003 р. - Патент № 74883 від 15.02.2006 р. - Бюл. № 2 - 2006.
53. **Пивоваренко В.Г.**, Дорошенко А.О., Павлов Д.О. Флуоресцентні барвники та спосіб їх отримання // Патент № 2000074047 від 10.07.2000 р. Бюл.- №11.- 2002.
54. **Пивоваренко В.Г.**, Дорошенко А.О., Павлов Д.О. 8-Арил-3,5-ді-[(Е) - арилметиліден]-1,2,3,5-тетрагідродигідродіцикло-пентано[*b,e*]піридини як флуоресцентні барвники та спосіб їх отримання // Патент № 2000074195 від 14.07.2000 р. - Бюл.- №2.- 2003.
55. **Пивоваренко В.Г.**, Павлов Д.О., Йозв'як Л., Блажейовські Є. Біс-(діалкіламіно)-біфлавоноли як флуоресцентні барвники та спосіб їх отримання // Патент № 2000010329 від 20.01.2000 р. - Бюл. - №11.- 2002.
56. **Пивоваренко В.Г.**, Климченко А.С., Демченко О.П. 3-Гідроксихромони як мультипараметричні флуоресцентні зонди для дослідження рідин // XX Українська конференція з органічної хімії. Тези доповідей. - Одеса, 2004. – Т. 1. - с. 73.

57. Klymchenko A.S., **Pivovarenko V.G.**, Duportail G., Mely Y., Ercelen S., Demchenko A.P. Multiparametric fluorescence sensing. // Abstracts of 8th Conference on Methods and applications of fluorescence. - Prague, August 24-27 2003. - p. 114.
58. **Pivovarenko V.G.**, Blazejowski J. Hydrogen Bonding of 4'-aminoflavonols with Protic Solvents // Proc. of XX International Conference on Photochemistry. - Moscow, July 30-August 4, 2001. - p. 423-424.
59. **Pivovarenko V.G.**, Grygorovych A.V., Doroshenko A.O. New Ratiometric pH Indicators with Highly Separated Bands Based on 2,6-Distyrylpyridines // Proc. of VII Conference on Methods and Applications of Fluorescence Spectroscopy and Fluorescence Probes. – Amsterdam. - September, 16-19, 2001. - P153.
60. **Pivovarenko V.G.**, Jozwiak L., Pavlov D.O., Blazejowski J. Diflavonols: a new fluorescent dyes exhibiting high Stokes' shift and sensitivity to the polarity of surroundings // Abstracts of XVIII IUPAC Symposium on Photochemistry. - Dresden, July 22-27. – 2000. – p. 330-331.
61. **Pivovarenko V.G.** 4'-Aminoflavonols – Multi-channel fluorescent probes in the study of lipid membranes // Abstracts of the 3rd Conference on Fluorescence Microscopy and Fluorescent Probes. – Prague. – July. – 1999. - P10.
62. **Pivovarenko V.G.**, Roshal A.D., Demchenko A.P. 3-Hydroxy-4'-(N-aza-15-crown-5)-flavone as a model for fluorescent membrane probe and ion indicator // Proc. of XVII IUPAC Symp. on Photochem. – Helsinki. – 1996. - p.489.

Пивоваренко В.Г. Синтез, будова і властивості багатоканальних флуоресцентних зондів на основі 1,3-діариліденкетонів, дициклопентано[*b,e*]піридинів та 3-гідроксихромонів. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора хімічних наук за спеціальністю 02.00.03 – органічна хімія. – Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, 2007.

Ключові слова: флуоресцентні барвники, кетоціаніни, дициклопентанопіридини, 3-гідроксихромони, 3-гідроксифлаволи, флавоноли, дифлавоноли.

Дисертація присвячена розробці багатоканальних флуоресцентних зондів (ФЗ) на основі поіменованих вище класів барвників. Зроблено аналіз будови та механізмів роботи флуоресцентних зондів, серед яких два найбільш ефективні – внутрішньомолекулярне фотоперенесення заряду (ВФЗ) та протона (ВФП) використані при розробці нових ФЗ. Синтезовано ряд ФЗ зондів класу 1,3-діариліденкетонів. Показана висока ефективність біс-краунпохідних у розпізнаванні катіонів Ba^{2+} і Mg^{2+} . Вперше 1,3-діариліденкетони застосовані у флуориметричному дослідженні утворення водневих зв'язків з протонодонорами. Вивчено властивості нового класу флуоресцентних барвників – 3,5-діарилідендициклопентано[*b,e*]піридинів. Проявляючи емісію діапа-

зоні 450-700 нм, ці барвники мають високі (30-80%) квантові виходи флуоресценції. На їх основі синтезовано ряд флуоресцентних рН індикаторів.

Отримано ряди похідних 3-гідроксихромону заданої структури: синтезовано барвники, що містять замісники різної донорності і мають різну планарність молекули, різну довжину хромофора або фіксовано планарне положення його фрагментів. Встановлено закономірності залежності положення смуг поглинання та флуоресценції сполуки, відношення інтенсивностей смуг флуоресценції, а також квантового виходу від будови молекули барвника. Встановлено закономірності залежності вказаних параметрів від природи молекул оточення барвника у розчині. Створені зонди застосовані у вивченні рідин гомогенної та мікрогетерогенної природи. Вперше ФЗ на основі 3-гідроксихромонів застосовано до вивчення фізико-хімічних процесів у ліпідних мембранах і показано їх значні переваги порівняно з зондами інших класів. Синтезовано широкодіапазонний флуоресцентний рН-індикатор. Розроблено, і досліджено флуоресцентний зонд для визначення концентрації аденозинтрифосфату (АТФ) у водних розчинах. Синтезовано і досліджено властивості нового класу флуоресцентних барвників – дифлавонолів, які містять у молекулі дві системи ВФП.

Пивоваренко В.Г. Синтез, строение и свойства многоканальных флуоресцентных зондов на основе 1,3-диарилиденкетонів, дициклопентано[*b,e*]пиридинов и 3-гідроксихромонів. – Рукопись.

Диссертация на соискание научной степени доктора химических наук по специальности 02.00.03 – органическая химия. – Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, 2007.

Ключевые слова: флуоресцентные красители, кетоцианины, дициклопентанопиридины, 3-гідроксихромони, 3-гідроксифлавоны, флавонолы, дифлавонолы.

Диссертация посвящена разработке многоканальных флуоресцентных зондов (ФЗ) на основе поименованных выше классов органических красителей. Рассмотрены строение и принципы работы флуоресцентных зондов. Два наиболее перспективных механизма – внутримолекулярный фотоперенос заряда (ВФЗ) и протона (ВФП) положены в основу разработки ФЗ. Синтезирован ряд новых ФЗ класса 1,3-диарилиденкетонів. Показана высокая эффективность их бис-краунпроизводных в распознавании катионов Ba^{2+} и Mg^{2+} . Впервые 1,3-диарилиденкетонів применены в исследовании образования водородных связей с протонодонорами. Изучены свойства нового класса флуоресцентных красителей – 3,5-диарилидендициклопентано[*b,e*]пиридинов. Проявляя эмиссию в диапазоне 450-700 нм, эти красители имеют высокие (30-80%) квантовые выходы флуоресценции. На их основе синтезирован ряд флуоресцентных рН

индикаторов. Получены ряды производных 3-гидроксихромона заданного строения: синтезированы красители с разной планарностью молекулы, а также с разной длиной хромофора. Установлены зависимости положения полосы поглощения и эмиссии соединений, отношения интенсивностей полос эмиссии, а также квантового выхода эмиссии от строения молекулы красителя. Установлены зависимости указанных параметров от природы молекул окружения в растворе. Созданные ФЗ применены в исследовании гомогенных и микрогетерогенных жидкостей. На этой основе предложено флуориметрический метод анализа содержания полярного компонента в двухкомпонентной гомогенной системе жидкостей. Впервые ФЗ на основе 3-гидроксихромонов применены для изучения физико-химических процессов в липидных мембранах, где показаны их значительные преимущества в сравнении с зондами других классов. Синтезирован ФЗ, избирательно чувствительный к неспецифическим взаимодействиям в растворах и нечувствительный к наличию молекул-доноров водородной связи. Синтезирован широкодиапазонный флуоресцентный pH-индикатор. Разработан и исследован ФЗ для определения концентрации аденозинтрифосфата (АТФ) в водных растворах. Синтезирован и исследован новый класс флуоресцентных красителей – дифлавонолов, содержащих в молекуле две системы внутримолекулярного фотопереноса протона.

Pivovarenko V.G. Synthesis, structure and properties of multi-channel fluorescence probes on the basis of 1,3-diarylidene ketones, dicyclopenta[*b,e*]pyridines and 3-hydroxychromones. – Manuscript.

Thesis for obtaining the scientific degree of Doctor of Sciences by the speciality 02.00.03 – organic chemistry. National Taras Shevchenko University of Kyiv, Kyiv, 2007.

Keywords: fluorescence probes, fluorescence dyes, ketocyanins, dicyclopenta[*b,e*]pyridines, 3-hydroxychromones, flavonols, diflavonols.

Development of multi-channel fluorescence probes on the basis of mentioned in the title classes of dyes was implemented in the work. Multi-channel fluorescence probes report about the events in studied object by several channels and allow the obtaining of most precise and detailed information. Ratiometric probes application is an example where the collecting of the data is realized using two informational channels. In this case separate channel is presented by some part of excitation or emission spectrum of the probe. After the consideration of probe constitution and mechanisms of probe functioning two of the most prospective mechanisms – an intramolecular charge transfer (ICT) and excited state intramolecular proton transfer (ESIPT) were used in the probe design. The series of new fluorescence probes from 1,3-diarylidene cyclopentanones, diarylidene acetones and diarylidene cyclohexanones were synthesized. High efficiency of bis-crown derivatives in the recognition of Ba²⁺ and Mg²⁺ cations as well as high resolution (7000 cm⁻¹) of fluorescence bands of

the ligand and magnesium complex was registered for them. Diarylidencyclopentanones were applied in the study of hydrogen bonding interactions with proton donor molecules and for the study of polarity of separate sites of lipid membranes. A new group of fluorescence dyes from 3,5-diarylidenedicyclopenta[*b,e*]pyridines was synthesized. The properties of their representatives were studied. It was shown that these dyes have high (30-70%) fluorescence quantum yields, displaying the emission in blue, green, yellow and red regions of spectrum. A series of ratiometric fluorescence pH indicators was synthesized for the measurements of pH in the range from 2 to 11.

A series of 3-hydroxychromone (3HC) derivatives of prescribed structure were synthesized. There were obtained the dyes containing substituents of different π -donating ability, or with different planarity of the molecule as well as with different chromophore length, or with increased chromophore rigidity. The correlations in the structure of dye molecule and the positions of absorption and emission bands, as well as the two emission bands intensity ratio, or the fluorescence quantum yield were estimated and discussed. The dependences of mentioned parameters upon the nature of microsurrroundings were estimated. The synthesized dyes were applied in the study of the properties of homogeneous and microheterogeneous liquids, including cell organelles. A method of fluorometric determination of hydrogen bond donor component in two-component homogeneous liquid together with polarity parameter as a function of dielectric constant was proposed. The 3HC probes were applied in the study of physico-chemical processes in lipid membranes, where their considerable advantages were displayed in comparison with the probes of other types. The probe with high sensitivity to non-specific interactions and no response to hydrogen bond donors in solutions was synthesized and studied. A wide-range fluorescent pH indicator on the basis of 3,4'-dihydroxyflavone was developed and studied, as well as the probe for determination of adenosine triphosphate in aqueous solutions, in its physiological range of concentrations.

The representatives of diflavonols – a new class of dyes were synthesized, and their fluorescence properties were studied. Due to the presence of two ESIPT systems in the molecule these dyes can display single and double proton transfer phenomena and can give three tautomeric forms (NN*, NT* and TT*) in the S_1 state. Theoretical methods were applied for the study of structure, as well as of synchronous and consecutive processes of intramolecular double proton transfer in diflavonols. It was estimated that the dyes of studied class have unique fluorescence properties, such as two- and three-band emission, high (50-60%) quantum yields, record sensitivity to polarity and hydrogen bond donor ability of surroundings, high Stokes shifts (6500-10000 cm^{-1}) and fluorescence in wide region of spectrum (450-650 nm).