

УДК 547;542.06;541.65/654

Спектральные и кислотно-основные свойства арилиденовых производных дициклопентано[b,e]пиридинов — флуоресцентных рН-индикаторов

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

Киевский национальный университет имени Тараса Шевченка
Украина, 01033 Киев, ул. Владимирская, 64. E-mail: pvg@univ.kiev.ua

* **Институт химии** при Харьковском национальном университете им. В. Н. Каразина
Украина, 61077 Харьков, пл. Свободы, 4

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.

Флуориметрический метод определения рН широко применяется на практике в научных исследованиях химического, биохимического и физиологического характера. Два последних 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 радиометрическому принципу определения рН — путем измерения соотношения интенсивности флуоресценции на двух или большем числе аналитических длин волн.

Основное преимущество радиометрического метода измерения показателя рН 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 перспективными являются синтезированные нами недавно арилиденовые производные дициклопентано[b,e]пиридинов [4, 5]. 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, чем 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 pH 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 *para*-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 Ia—и 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 ЯМР ^1H и ^{13}C соединений Ia—и (измерены на спектрометре «Varian Mercury-400») полностью соответствуют их строению. Контроль за чистотой образцов проводили методом ТСХ на силикагеле-60, F-254, 5×15 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.

Квантовохимические расчеты геометрии соединений Ia—и выполнены полуэмпирическим методом AM1 [6] с использованием программы MOPAC 6.0 [7].

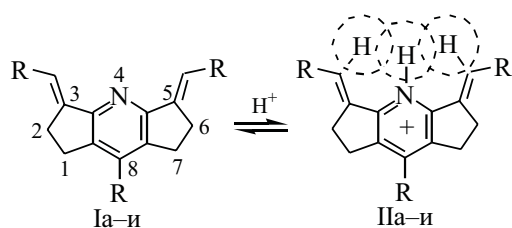
Растворители для спектрофотометрических исследований очищали по методике [8]. Спектры поглощения измерены на спектрофотометре «Hitachi U-3210», спектры флуоресценции — на спектрофлуориметре «Hitachi F-4010». Квантовые выходы флуоресценции (ϕ_f) определяли относительно раствора флуоресцеина в карбонатном буфере ($\phi_f = 0,85$ [9]) и раствора гидросульфата хинина в 0,05 М серной кислоте ($\phi_f = 0,55$ [10]). Все измерения проводили в изотермической кювете при температуре $20 \pm 0,1$ °C.

Константы протонирования измерены в смеси вода — этанол (80 % этанола, v/v). Для измерений pH использовали иономер универсальный ЭВ-74, откалиброванный по стандартным водным буферным растворам, к показаниям которого прибавляли поправку 0,2 единицы pH согласно [11]. Для проведения

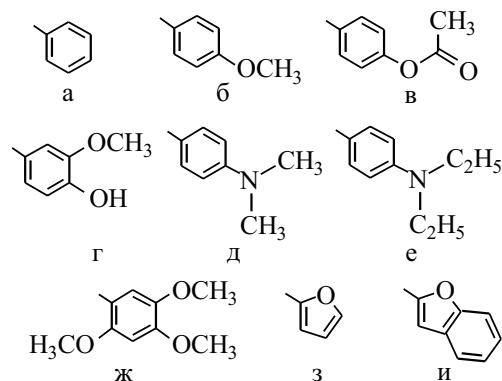
титрования готовили раствор, содержащий свободную форму исследуемого соединения с концентрацией $1 \cdot 10^{-5}$ моль/л, и серию растворов с той же концентрацией соединения, отличающихся на 2—3 единицы pH. Кислотно-основные характеристики среды варьировали путем смешивания определенных количеств приготовленных растворов, после чего измеряли pH раствора, спектры поглощения и флуоресценции.

Результаты и обсуждение

Геометрия молекул дициклопентано[b,e]пиридинов и их основность. Согласно результатам квантовохимических расчетов, а также конформационного анализа структуры по данным ЯМР ^1H , УФ-спектроскопии и флуориметрии [5], молекулы Ia—ж в растворах непланарны, за исключением соединений с пятичленными боковыми циклами Iz, и (для последних в растворах характерна плоская конформация). Вследствие пространственного отталкивания атомов ароматические циклы арилиденовых остатков разворачиваются на угол $35\text{—}45^\circ$, 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 $60\text{—}70^\circ$. Полученные конформационные состояния позволяют предсказать степень электронного влияния заместителей в боковых ядрах молекул Ia—и на пиридиновое ядро, а следовательно, и на спектральные и кислотно-основные свойства исследуемых соединений.



где R



Спектральные свойства нейтральных и протонированных форм, кислотно-основные характеристики соединений Ia—и

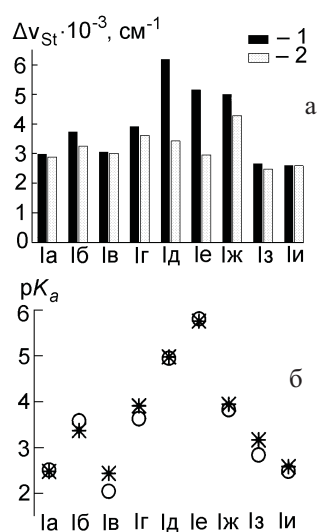
Соединение	Спектры поглощения		Спектры флуоресценции				
	ν , см^{-1}	pK	ν , см^{-1}	$\Delta\nu_{St}$, см^{-1}	ϕ	pK^*	ΔpK^F
Ia	25660	$2,51 \pm 0,02$	22680	2980	0,36	$2,48 \pm 0,02$	6,9
IIa	22160		19280	2880	0,25		
Iб	24820	$3,58 \pm 0,02$	21080	3740	0,28	$3,37 \pm 0,01$	8,7
IIб	20540		17280	3260	0,16		
Iв	25540	$2,05 \pm 0,03$	22480	3060	0,35	$2,44 \pm 0,08$	7,0
IIв	21900		18900	3000	0,21		
Iг	24340	$3,63 \pm 0,01$	20420	3920	0,18	$3,91 \pm 0,01$	9,2
IIг	19820	$10,28 \pm 0,05$	16200	3620	0,007	$10,2 \pm 0,2$	5,4
Iг**	22420		16080	6340	0,006		
Iд	23660	$4,95 \pm 0,01$	17460	6200	0,09	$4,98 \pm 0,02$	9,7
IIд	17860		14420	3440	0,02		
Iе	22680	$5,82 \pm 0,01$	17520	5160	0,11	$5,77 \pm 0,02$	9,7
IIе	17240		14280	2960	0,062		
Iж	24260	$3,83 \pm 0,01$	19240	5020	0,44	$3,95 \pm 0,01$	9,2
IIж	19520		15220	4300	0,011		
Iз	22980	$2,85 \pm 0,01$	20300	2680	0,37	$3,18 \pm 0,03$	7,9
IIз	19220		16720	2500	0,19		
Iи	21980	$2,50 \pm 0,03$	19360	2620	0,46	$2,60 \pm 0,06$	7,8
IIи	18340		15720	2620	0,16		

Примечание. ν — положение максимума в шкалах волновых чисел; pK — константа протонирования, определенная методом спектрофотометрического титрования; $\Delta\nu_{St}$ — стоксовый сдвиг полосы флуоресценции; ϕ — квантовый выход флуоресценции; * константа протонирования, определенная методом флуориметрического титрования; ΔpK^F — константа протонирования в S_1 -состоянии, определенная методом Ферстера; ** анионная форма.

В пространственном строении молекул Ia—и имеется 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 квантовохимических расчетов расстояние между указанными атомами $r_{H...N}$ составляет ~ 4 Å. Для свободного размещения в пространстве между ними еще одного атома водорода $r_{H...N}$ должно быть не менее 4,8 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 Ia—и, существенно понизив ее.

Спектры поглощения. Появление новой полосы как в спектрах поглощения, так и в спектрах флуоресценции свидетельствует о протонировании соединений Ia—и при понижении pH среды (таблица). По сравнению со свободным основанием максимум поглощения протонированной формы смещен в длинноволновую область на 60—140 нм (3500 — 5500 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 Ia и 3,58 для Ib до 5,82



Стоксовы сдвиги флуоресценции ΔV_{St} свободной (1) и протонированной форм (2) соединений Ia—и (а); константы протонирования соединений Ia—и, определенные методами спектрофотометрии (o) и флуориметрии (*) (б).

для Ie (рисунок). Как можно убедиться при сравнении свойств метокси- и ацетоксипроизводных (Iб и Iv), уменьшение π -донорности заместителя существенно не влияет на спектральные характеристики обсуждаемых соединений, однако значительно уменьшает константу протонирования: от 3,58 для Iб до 2,05 для Iv. При наличии в молекулах гидроксигруппы, способной к диссоциации в щелочной среде (соединение Ig), наблюдается дополнительный кислотно-основной 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, наблюдаемое понижение точки кислотно-основного перехода вызвано вышеупомянутым пространственным блокированием атома азота соединений Ia—и при протонировании.

Спектры флуоресценции. Протонирование соединений Ia—и ведет к существенному снижению энергии их возбужденного состояния и к bathochromному смещению полосы флуоресценции (таблица). Вследствие этого протонированные формы Iб, Iд—ж и Iи флуоресцируют в красной области спектра. Для соединений Iг—ж смещение достигает 130 нм (4000 cm^{-1}). Наличие изоэмиссионных точек свидетельствует о том, что в кислотно-основном равновесии принимают участие только две формы — нейтральная Ia—и и монопротонированная IIa—и.

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 (Δv_{00}), вызванного кислотно-основными взаимодействиями:

$$pK^* = pK - 0,625\Delta v_{00}/T.$$

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 Ia—и в S_1 -состоянии должна увеличиваться на 7—9 единиц pH, а флуоресценция их протонированных форм должна наблюдаться уже в слабощелочной среде (таблица). 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 pK , отражая протолитические взаимодействия в S_0 -состоянии (рисунок). Это почти на 6—8 единиц ниже оценок по методу Ферстера. Возможно, причиной столь значительных расхождений является то, что уменьшенная стерическая доступность центра кислотно-основных взаимодействий соединений Ia—и — 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 Ia—и при варьировании pH отражает их прототропные превращения в основном состоянии.

Стоксовы сдвиги полос флуоресценции оснований Ia—и превышают значения таковых для протонированных форм IIa—и (рисунок). В случае диалкиламинопроизводных Iд,e и IIд,e эта разница достигает значений 2200 — 2800 cm^{-1} , в то время как для других соединений она не выходит за пределы 700 cm^{-1} . Данный факт свидетельствует о дополнительных релаксационных процессах, происходящих в возбужденном состоянии молекул Iд,e, которые связаны с существенным внутримолекулярным переносом заряда. Такие процессы характерны для большинства красителей, содержащих диалкиламиногруппу [13]. В то же

время для нонаметоксипроизводного Iж, 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, чем для Id и Ie. Учитывая непланарность соединения Iж 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 IIa—и несколько ниже, чем для оснований Ia—и, 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]пиридина могут быть успешно использованы в устройствах для измерения кислотности среды с радиометрическим принципом регистрации аналитического сигнала.

Литература

1. Haugland R. P. Handbook of fluorescent probes and research products. — 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. et al. // Chem. Biol. — 1999. — **6**. — P. 411—418.
4. Pivovarenko V. G., Grygorovych A. V., Doroshenko A. O. VII Conf. on methods and appl. of fluorescence spectrosc. and fluorescence probes, Amsterdam, Sept. 2001 : Book of abstr. — 2001. — P. 153.
5. Pivovarenko V. G., Grygorovych A. V., Valuk V. F., Doroshenko A. O. // J. Fluorescence. — 2003. — **13**, N 6. — P. 479—487.
6. Dewar M. J. S., Zoebich E. G., Healy E. F. // J. Amer. Chem. Soc. — 1985. — N 107. — P. 3902—3908.
7. Stewart J. P. P. MOPAC 6.0. — Univ. of Texas, 1983.
8. Gordon A. J., Ford R. A. The chemist's companion. A handbook of practical data, techniques and references. — New York, etc. : Wiley, 1972.
9. Demas J. N., Crosby G. A. // J. Phys. Chem. — 1971. — **75**. — P. 991—1025.
10. Doroshenko A. O., Kirichenko A. V., Mitina V. G., Ponomaryov O. A. // J. Photochem. and Photobiol. A. — 1996. — **94**. — P. 15—26.
11. Александров В. В. Кислотность неводных растворов. — Харьков : Вища шк., 1981.
12. Forster T. // Z. Electrochem. — 1950. — **54**, N 1. — S. 42—46.
13. Grabowski Z. R., Rotkiewicz K., Rettig W. // Chem. Rev. — 2003. — **103**. — P. 3899—4031.
14. Doroshenko A. O., Kirichenko A. V., Mitina V. G., Ponomaryov O. A. // J. Photochem. and Photobiol. A. — 1996. — **94**. — P. 15—26.
15. Doroshenko A. O., Pivovarenko V. G. // Ibid. — 2003. — **156**, N 1—3. — P. 55—64.

Поступила в редакцию 25 апреля 2004 г.

Спектральні та кислотно-основні властивості ариліденових похідних дициклопентано[b,e]піридинів — флуоресцентних рН-індикаторів

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

Київський національний університет імені Тараса Шевченка
Україна, 01033 Київ, вул. Володимирська, 64. E-mail: pvg@univ.kiev.ua

* Інститут хімії при Харківському національному університеті ім. В. Н. Каразіна
Україна, 61077 Харків, пл. Свободи, 4

Батохромні зсуви смуг поглинання та емісії при протонуванні дициклопентано[b,e]піридинів 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 електроннодонорних замісників у 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.

Ключові слова: дициклопентано[b,e]піридини, флуоресцентні рН-індикатори, електронні спектри поглинання і флуоресценції.

Taras Shevchenko Kyiv National University
64 Volodymyrska Vul., 01033 Kyiv, Ukraine

* Institute for Chemistry at Kharkov V. N. Karazin National University
4 Pl. Svobody, 61077 Kharkiv, Ukraine

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.

Key words: dicyclopenta[b,e]pyridines, ... absorption and emission spectra.