MŰEGYETEM 1782

Ph.D. ÉRTEKEZÉS

Fluoreszcens jelzőanyagok protolitikus reakciói

Készítette: Hessz Dóra

Témavezető: Dr. Kubinyi Miklós

Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem

Fizikai Kémia és Anyagtudományi Tanszék

Spektroszkópia csoport

Budapest 2021

Köszönetnyilvánítás

Hálával tartozom Kubinyi Miklósnak, hogy témavezetőként doktori munkámat irányította, hogy emberként bízott benne, hogy eljutunk idáig.

Köszönöm Hégely Bencének, Mester Dávidnak és Kállay Mihálynak a munkámhoz szükséges kvantumkémiai számításokban nyújtott segítséget.

Hálával tartozom Bitter Istvánnak és Bojtár Mártonnak a jelzővegyületek szintéziséért, melyek e dolgozat főszereplői.

Köszönöm Drahos Lászlónak és Gömöry Ágnesnek, hogy tömegspektrometriás mérésekkel segítették munkámat.

Köszönöm egykori tanítványaimnak, Paudics Adriennek, Bádogos Stellának és Szakács Zoltánnak, hogy segítettek a kísérletek végrehajtásában.

Köszönöm Vidóczy Tamásnak és Baranyai Péternek a magasszintű matematikai iránymutatást és a sok szakmai segítséget.

Köszönöm páromnak a támogatását és kitartását, és végül köszönöm gyermekeimnek, hogy jó gyerekek. Ha nem így lenne, ez a dolgozat sosem készült volna el.

Tartalomjegyzék

I. Bevezetés **6**

II. Elméleti összefoglaló **9**

II.1. Fluoreszcens jelzővegyületek alkalmazásai **9**

II.2. Gerjesztett elektronállapotok dezaktivációja **10**

II.3. A fluoreszcencia kinetikai leírása **12**

II.4. Oldószer-hatás, szolvatokromizmus **14**

II.4.1. Oldószerek polaritása ***14***

II.4.2. Az abszorpciós és a fluoreszcenciaszínkép oldószerfüggése ***16***

II.5. Jelátviteli mechanizmusok fluoreszcens próbákban **18**

II.6. Savak, sav-bázis egyensúlyok **20**

III. Kísérleti és számítási módszerek **26**

III.1. Felhasznált anyagok **26**

III.1.1. A kumarin 102 vizsgálata során használt anyagok ***26***

III.1.2. A 4'-N,N-dietilamino-3-hidroxiflavon vizsgálata során használt anyagok ***26***

III.1.3. A Brooker-merocianin pillérarén rendszerek vizsgálata során használt anyagok ***27***

III.2. Spektroszkópiai kísérletek **29**

III.2.1. UV-látható abszorpciós spektroszkópia ***29***

III.2.2. Fluoreszcenciaspektroszkópia ***29***

III.2.3. pH mérés ***31***

III.3. Oldatkészítés **31**

III.3.1. A kumarin 102 spektroszkópiai vizsgálata ***31***

III.3.2. A 4'-N,N-dietilamino-3-hidroxiflavon tanulmányozása aceton-víz rendszerben ***32***

III.3.3. Brooker-merocianin pillérarén rendszerek ***32***

III.4. Számítások **33**

III.4.1. Indikátormolekula savi disszociációs állandójának meghatározása ***33***

III.4.2. Komplex stabilitási állandójának meghatározása 1:1 sztöchiometria esetében ***36***

III.5. A kvantumkémiai számítások paraméterei **39**

III.5.1. Kumarin 102 komplexképzése vízzel, protonálódása alap- és gerjesztett állapotban 39
III.5.2. 4'-N,N-dietilamino-3-hidroxiflavon fotofizikai tulajdonságai vizes közegben, komplexképző tulajdonsága aceton-víz elegyben 39

IV. A kumarin 102 szolvatációja és protonálódása vizes közegben 41

IV.1. Irodalmi háttér 41
IV.1.1. A kumarinok szerkezete és előfordulása 41
IV.1.2. 7-aminokumarinok fluoreszcens viselkedése 43
IV.1.3. A kumarin 102 spektroszkópiai tulajdonságai 44
IV.2. Eredmények és értékelésük 46
IV.2.1. Alapállapotú savi disszociációs állandó meghatározása 46
IV.2.2. A savi disszociációs állandó meghatározása fluoreszcencia-színképekből. 47
IV.2.3. Időfelbontásos mérések: kinetikai analízis 48
IV.3. Kvantumkémiai számítások 56
IV.3.1. Molekulaszerkezeti modellek 56
IV.3.2. A semleges molekula és vízkomplexeinek számított spektrumai 57
IV.3.3. A protonált forma számított spektrumai 58
IV.3.4. A savi disszociációs állandók meghatározása számításos kémiai úton 60

V. Hidrogénhidas kölcsönhatások: a 4′-dietilamino-3-hidroxiflavon spektroszkópiai tulajdonságai vízben és aceton-víz elegyben 62

V.1. Irodalmi háttér 62
V.1.1. A flavonok szerkezete, előfordulása 62
V.1.2. A 3-hidroxiflavonok protolitikus egyensúlyai 64
V.1.3. A 3-hidroxi-flavonok fluoreszcens viselkedése 65
V.1.4. A 4'-dietilamino-3-hidroxiflavon spektroszkópiai tulajdonságai 66
V.1.5. A 4'-dietilamino-3-hidroxiflavon szolvatokromizmusa 67
V.1.6. A 4'-dietilamino-3-hidroxiflavon fotooxidációja 70
V.2. Eredmények és értékelésük 72
V.2.1. Az alapállapotú savi disszociációs állandók meghatározása 72
V.2.2. Vizsgálatok aceton-víz elegyben 74
V.2.3. A FET-komplexek vizsgálata elméleti számításai 79
V.2.4. 3-hidroxiflavonok alkalmazása nukleotidszenzorként 83

VI. Brooker-merocianin komplexképzése pillérarénnal 86

VI.1. Irodalmi háttér 86

VI.1.1. A Brooker-merocianin szolvatokromizmusa 86

VI.1.2. A Brooker-merocianin kölcsönhatása makrociklusokkal..... 88

VI.1.3. Pillérarének..... 89

VI.1.4. Lizin és származékai 91

VI.1.5. A Brooker-merocianin transz-cisz izoméríája 92

VI.2. Eredmények és értékelésük 93

VI.2.1. A merocianin-pillér[6]arén rendszer reakciósémája..... 93

VI.2.2. Abszorpciós kísérletek, savi disszociációs állandók meghatározása..... 94

VI.2.3. A WP6-tal alkotott komplexek stabilitási állandói 95

VI.2.4. Egyensúlyi állandók..... 99

VI.2.5. Indikátor-kiszorításos vizsgálatok 100

VI.2.6. Brooker-merocianin és származékainak komplexképzése WP6-tal: fluoreszcencia-vizsgálatok 102

VII. A doktori munka összefoglalása 107

VIII. Függelék..... 111

IX. Irodalomjegyzék..... 114

I. Bevezetés

A fluoreszcenciamérésén alapuló technikák napjainkban igen népszerűek, köszönhetően nagy érzékenységüknek és szelektivitásuknak. A jelenséget számos technika felhasználja kvantitatív és kvalitatív analitikai célokra. Meghatározó szerepe van a modern képalkotás területén, ezt bizonyítja, hogy a XXI. században két kémiai Nobel-díjat is a fluoreszcenciás képalkotásban elért eredményért ítéltek oda: 2008-ban a zöld fluoreszcens fehérje felfedezéséért Martin Chalfie, Osamu Shimomura és Roger Tsien[1], míg 2014-ben a szuperfelbontású fluoreszcencia-mikroszkópiai módszerek kifejlesztéséért Eric Betzig, Stefan Hell és William Moerner nyerte el az elismerést.[2a-c]

A fluoreszcencia-detektáláson alapuló technikák nem nevezhetők rutinmódszereknek, azonban jelentőségük a szerkezetkutatásban, az anyagtudományban és a farmakológiában igen nagy. Ennek megfelelően az igény is nagy új fluoreszcens jelzőmolekulák fejlesztésére. Egy jól megtervezett fluoreszcens festék hozzájárul, hogy bonyolult biológiai folyamatokat követhessünk mikroszkóp alatt, a sejtbiológia tudományának fejlődését segítve.

A fluoreszcencia jelenségéről elsőként Sir John Fredrich William Herschel írt, megfigyeléseit a kinin égszínkék emissziójáról 1845-ben jegyezte le. Ezt követte számos fluoreszcens kismolekula szintézise, melyek lassan a mindennapi életünk részévé váltak (szövegkielemő filctollak, optikai fehérítőt tartalmazó mosószeradalékok, játékszerek).

A fluoreszcencia történetében a következő mérföldkő 1961-re tehető, ekkor izolálta Shimomura Osamu az Aequorea victoria medúzából az első fluoreszcens fehérjét.[3] A felfedezést további természetes fluoreszcens fehérjék felfedezése követte. Továbbá, különféle mutánsokat állítottak elő, az eredtitől eltérő biokémiai és spektroszkópiai tulajdonságokkal. Megoldották a fluoreszcens fehérjék expresszióját sokféle élő szervezetben. Mindez jelentősen hozzájárult a diagnosztika fejlődéséhez, sejtszintű folyamatok megértéséhez.

Az 1980-as évektől ugrásszerűen megnőtt a félvezető nanorészecskék kutatása, majd 1998 után megjelentek az első fluoreszcens félvezető nanorészecskék, az úgynevezett kvantumpöttyök (QD: quantum dot).[4] Ezeknek a részecskéknek a fő összetevője a kadmium-szelenid (CdSe), de más félvezetők is ismertek (leggyakrabban CdS, InP és InAs.). Ezek a 3-6 nm-es átmérőjű részecskék nagy kvantumhatásfokú fluoreszcenciát mutathatnak, emissziós sávuk keskeny, maximumuk a vörös irányba tolódik az átmérő növekedésével.

Napjainkra tehát olyan fluoreszcens jelzővegyületek állnak rendelkezésre, melyek emissziója a szerkezettel hangolható, ezzel új lehetőségeket nyitva számos tudományág fejlődésében.

A jelzőanyagok fejlesztésekor több szempontot is figyelembe kell venni, melyek javarésze a mikroszkópos felhasználáshoz köthető. Alapvető követelmény a festékkel szemben a fotostabilitás, ami mikroszkópos felhasználás esetén különösen nagy jelentőséggel bír a nagy fényintenzitás miatt. A jelzővegyülettel szemben támasztott másik alapkövetelmény az alacsony toxicitás.

Ezen felül előnyös a hosszú fluoreszcencia élettartam és a nagy Stokes-eltolódás, ez utóbbi azért, hogy a gerjesztő és az emittált fény jól elválasztható legyen, például sávszűrőkkel.

A sejteken belül fellelhető vegyületek egy része magában is képes fluoreszkálni (aromás aminosavak, FAD, NADH+), ezért gyakran részesítenek előnyben olyan festékeket, amelyek elnyelési sávja messze esik ezeknek a vegyületeknek az abszorpciós sávjától. A festék elnyelési sávjának emellett összhangban kell lennie a mikroszkóp fényforrásának emissziójával is.

További fontos követelmény a festékekkel szemben a membrán-permeabilitás, mely megszabja az intracelluláris vagy extracelluláris alkalmazások lehetőségeit. Ugyanezen szempontból bír jelentőséggel a festék polaritása is. A biológiai minták jellemzően vizes rendszerek, így ezek vizsgálatában kulcsfontosságú a fluoreszcens festék vízoldhatósága. Az ilyen festékek nagy többségében savas vagy bázikus funkciós csoport van, esetleg mindkettő. Ennek megfelelően elengedhetetlen annak ismerete, hogy ezek a jelzőanyagok miként viselkednek a közeg pH-jának függvényében.

Munkám során három vegyületcsalád öt képviselőjének spektroszkópiai tulajdonságait tanulmányoztam, sav-bázis egyensúlyait jellemeztem. A vizsgált vegyületek közül a kumarin 102 (C102), a 4'-dietilamino-3-hidroxiflavon (FET) és a Brooker-merocianin (M1) jól ismert jelzőanyagok. Szolvatokróm tulajdonságaikkal számos publikáció foglalkozott, és sokféle anyagtudományi és sejtbiológiai kutatásban alkalmazták őket, beleértve vizes oldatokat, vizes kolloid rendszereket és víztartalmú biológiai mintákat. Ehhez képest keveset foglalkoztak a C102 és a FET szerkezetével vizes közegben, beleértve sav-bázis tulajdonságaikat. A C102 és a FET-re vonatkozó kutatásaim célja az volt, hogy feltárjam ezen vegyületek szerkezeti és spektroszkópiai jellemzőit vizes közegben, meghatározzam savi disszociációs állandóikat alap- és gerjesztett állapotban.

A Brooker-merocianin vizes közegbeli fotofizikájáról jelentek meg tanulmányok. Az utóbbi vegyület referenciaként szolgált munkánkban, amelyben összehasonlítottuk M1 tulajdonságait két új származékával (M2 és M3), amelyeknek saverőssége és komplexképző tulajdonsága különbözött M1-étől.

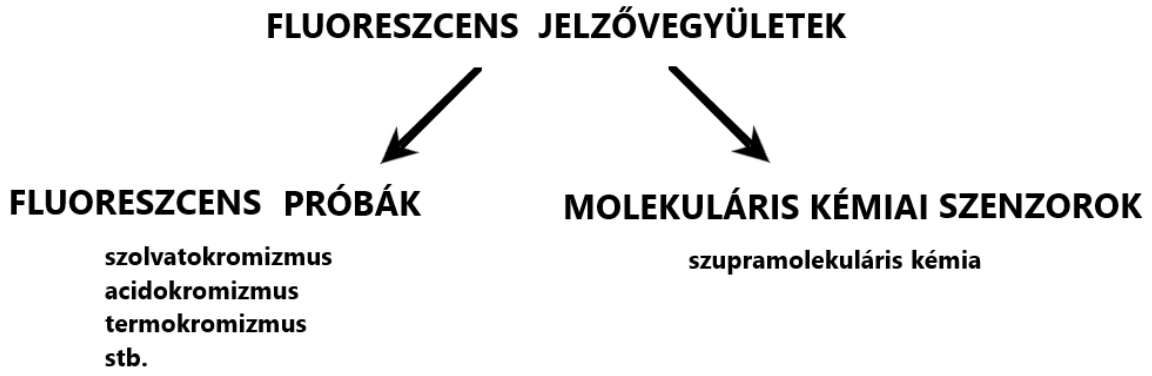
Kutatásaim további célja a jelzőanyagok analitikai alkalmazásaihoz kapcsolódott. A FET-re vonatkozó vizsgálatokat kiegészítettem a FET-ATP (ATP: adenozin-trifoszfát)

komplex fluoreszcenciasajátságainak vizsgálatával, előkészítve egy új szelektív fluoreszcens ATP-szenzor tervezését. Az M3 merocianint felhasználva pedig indikátor-kiszorításos assay-t készítettem, amely alkalmas a trimetil-lizin szelektív kimutatására.

II. Elméleti összefoglaló

II.1. Fluoreszcens jelzővegyületek alkalmazásai

A fluoreszcens jelzővegyületeket alkalmazási terület szerint két csoportra oszthatjuk, dolgozatomban a továbbiakban ezeket fluoreszcens próbáknak és molekuláris kémiai szenzoroknak fogom nevezni (1. ábra).

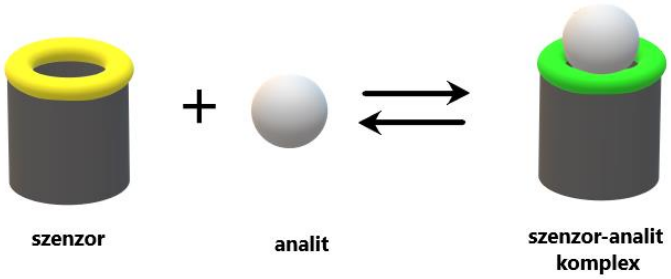


1. ábra: Fluoreszcens jelzővegyületek csoportosítása felhasználásuk alapján

A fluoreszcens próbák közös tulajdonsága, hogy információt adnak a környezetről, emissziójuk megváltozik valamilyen külső tényező hatására. Ez a külső tényező egyszerűbb esetben lehet az oldószer (szolvatokromizmus), a pH (acidokromizmus) vagy a hőmérséklet (termokromizmus).

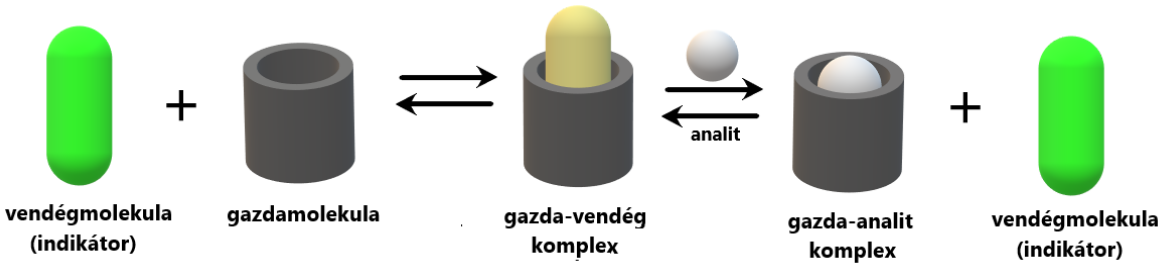
A fluoreszcens jelzővegyületek másik csoportja a szupramolekuláris kémiához köthető, ebben az esetben a külső tényező, amelynek hatására megváltoznak a spektrális tulajdonságok az maga az analit, pontosabban az analittal kialakuló másodlagos kötések. Így a fluoreszcens jelzővegyületek e csoportjának emissziója megváltozik a komplexképződés következtében. A molekuláris szenzorokat tovább bonthatjuk két alcsoportra aszerint, hogy a meghatározás szempontjából fontos analitot közvetlenül (direkt) vagy közvetett (indirekt) módon határozzuk meg.

Előbbi esetben a fluoreszcens szenzor egy fluorofór csoportból és egy koordinációs szférából épül fel, melyek kovalensen vannak kapcsolva. Az analittal másodrendű kötésekkel kapcsolódik, minek következtében megváltoznak fotofizikai tulajdonságai (2. ábra).



2. ábra: Közvetlen detektáláson alapuló fluoreszcens szenzor

Indirekt módszerek esetben (3. ábra) valamilyen kompetitív komplexképzési reakció felelős a (fluoreszcencia) jel megváltozásáért. Ez azt jelenti, hogy valamilyen komplex (leggyakrabban egy makrociklus gazdamolekula és egy fluoreszcens vendég komplexe) fotofizikai tulajdonságai megváltoznak az analit jelenlétében, aminek hátterében egy új gazda-analit komplex kialakulása áll, a jelváltozás pedig a vendégmolekula (vagy más néven indikátor) egyensúlyi koncentrációjával függ össze. Az ilyen indikátor-kiszorításon alapuló mérési módszert fluoreszcens vendégmolekula esetén gyakran az angol rövidítésnek megfelelő FID (fluorescence indicator displacement) betűszóval jelöljük.



3. ábra: Közvetett detektáláson alapuló fluoreszcens szenzor

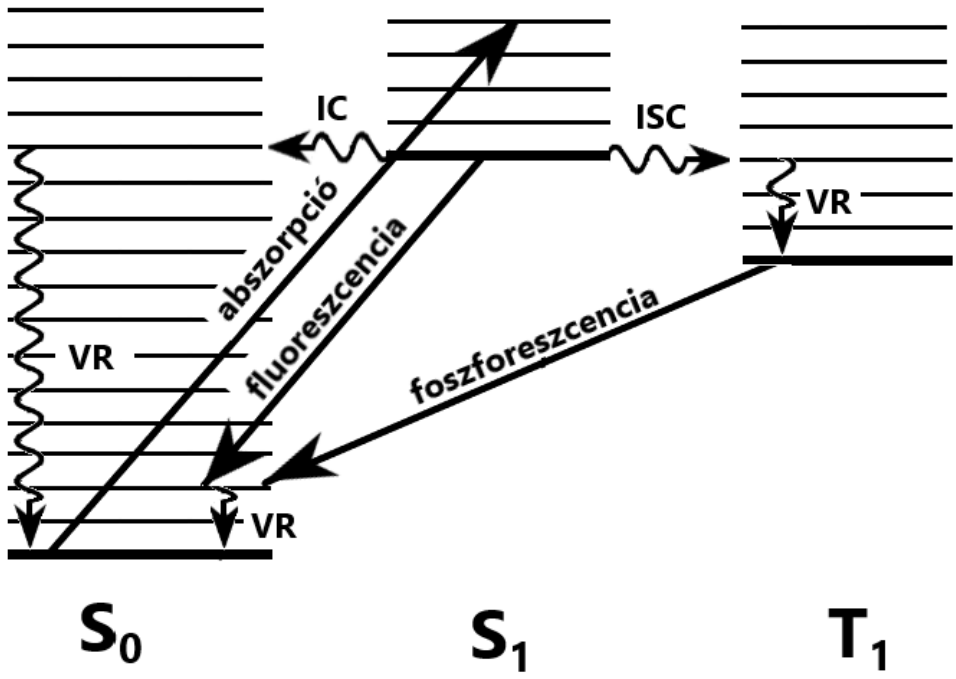
A gyakorlatban tehát a jelzőanyagok és molekuláris szenzorok sokkal inkább felhasználásuk szerint, mint szerkezetük szerint osztályozhatók.

II.2. Gerjesztett elektronállapotok dezaktivációja

Munkám során fluoreszcens jelzőmolekulák fotofizikai tulajdonságaival foglalkoztam, az elektrongerjesztést és az azt követő folyamatokat a Jablonski-diagramon szokás szemléltetni, mely a 4. ábrán látható. [5, 6]

Az alapállapotú (S_0) molekula egy foton elnyelésével gerjesztett állapotba jut, elektronja valamely nagyobb energiájú molekulapályára kerül. Az elektrongerjesztéssel több rezgési állapot is megvalósulhat, azonban a molekula gyors rezgési relaxációval (VR) leadja a többletenergiájának ezt a hányadát és az elektronállapoton belül rezgési alapállapotba kerül. A

rezgési relaxációt követően a gerjesztett állapotú molekula két módon adhatja le többletenergiáját: sugárzásos és sugárzásmentes átmenettel. Amennyiben az emisszió multiplicitás változás nélkül történik, fluoreszcenciáról beszélünk, ez a gyakorlatban a szingulett (legtöbbször az S_1) energiaszintről történik. Sugárzásmentes átmenet esetén a molekula belső konverzióval (IC: internal conversation) az elektrongerjesztési alapállapot egy magasabb rezgési állapotába jut, majd innen VR útján a rezgési alapállapotba. Ritkább esetben a molekula spinváltó átmenettel (ISC: intersystem crossing) triplett állapotba jut (T_1). Mind az IC, mind az ISC izoenergetikus folyamatok, ahogy azt a Jablonski-diagram is mutatja. Rezgési relaxációt követően a molekula a triplett állapot rezgési alapállapotába kerül, majd innen foszforeszcenciával az S_0 szintre jut vagy $T_1 \rightarrow S_0$ spinváltó átmenettel az elektrongerjesztési alapállapot magasabb rezgési nívójára. Végül VR útján visszakerül a rezgési alapállapotba.



4. ábra: Jablonski-diagram

II.3. A fluoreszcencia kinetikai leírása

A fluoreszcencia lecsengését elsőrendű bomlási folyamatnak tekintjük,

$$M^* \rightarrow M + h\nu' \tag{1}$$

ahol M* és M a gerjesztett és alapállapotú molekula,

hν' az emittált foton energiája.

A reakció sebessége a

$$-\frac{d}{dt}[M^*] = k_f^0[M^*] \tag{2}$$

differenciálegyenlettel írható le, amiből az integrált sebességi egyenlet:

$$[M^*] = [M^*]_0 e^{-k_f^0 t} \tag{3}$$

ahol k_f^0 a folyamat sebességi állandója [s^{-1}],

t az idő [s].

A fluoreszcencia időbeni lefutását gyakran jellemezzük a fluoreszcencia-élettartammal, mely az az idő, mely alatt a gerjesztett molekulák száma e-ad részére csökken.

A fluoreszcencia sebességi állandójának reciproka az úgynevezett „természetes" élettartam (τ_f^0 [s]):

$$\tau_f^0 = \frac{1}{k_f^0} \tag{4}$$

A természetes élettartam azt a határesetet jelöli, amikor a gerjesztett molekulák kizárólag fluoreszcencia útján adják le az energiájukat, az egyéb dezaktiválódási csatornák egytől-egyig zártak. A valóságban azonban a fluoreszcencia mellett a molekulák egy része - amennyiben nincs valamilyen kioltó a rendszerben - belső konverzióval jut alapállapotba, illetve spinváltó átmenettel triplett állapot is létrejöhet. A gyakorlatban tehát a gerjesztett molekulák fogyására az alábbi differenciálegyenlet írható fel:

$$-\frac{d}{dt}[M^*] = k_f^0[M^*] + k_{ISC}[M^*] + k_{IC}[M^*] \tag{5}$$

ahol k_{ISC} a spinváltó átmenetet jellemző sebességi állandó,

k_{IC} a belső konverziót jellemző sebességi állandó.

A sebességi állandók közötti összefüggés pedig:

$$k_f = k_f^0 + k_{ISC} + k_{IC} \tag{6}$$

Tehát a kísérletekből nyerhető fluoreszcencia sebességi állandó magában foglalja az összes lehetséges utat amelyen át a gerjesztett állapotú molekula alapállapotba kerülhet.
A mért fluoreszcencia-lecsengési idő (τ_f [s]) a k_f sebességi állandó reciproka ((6) egyenlet), tehát:

$$\tau_f = \frac{1}{k_f} = \frac{1}{k_f^0 + k_{ISC} + k_{IC}} \qquad (7)$$

A sebességi állandókkal kapcsolatban áll a fotofizikában a kvantumhasznosítási tényező. Általánosan megfogalmazva – amennyiben fotokémiai reakció nem játszódik le, - a kvantumhatásfok egy hányados, amely azt mutatja meg, hogy gerjesztést követően a molekulák mekkora része jut alapállapotba egy adott úton. A fluoreszcencia-kvantumhatásfok (Φ_f) ennek megfelelően az emittált fotonok száma az elnyelt fotonok számához viszonyítva.

$$\Phi_f = \frac{\text{emittált fotonok száma}}{\text{elnyelt fotonok száma}}$$

Amennyiben a dezaktiválódás csak fotofizikai úton történik (nincs kémiai reakció), a következő egyenletet írhatjuk fel:

$$\Phi_f + \Phi_{ISC} + \Phi_{IC} = 1 \qquad (8)$$

ahol Φ_f, Φ_{ISC} és Φ_{IC} a fluoreszcencia, spinváltó átmenet és belső konverzió kvantumhatásfoka.

Belátható, hogy a fluoreszcencia kvantumhatásfok nem független a fluoreszcencia sebességi együtthatójától, ezen keresztül a lecsengési időktől, közöttük az alábbi összefüggések teremtenek kapcsolatot:

$$\Phi_f = \frac{k_f^0}{k_f^0 + k_{ISC} + k_{IC}} \qquad (9)$$

valamint

$$\Phi_f = \frac{\tau_f}{\tau_f^0} \qquad (10)$$

Összességében tehát a fluoreszcencia-lecsengési idő és a fluoreszcencia-kvantumhatásfok egyenesen arányosak egymáshoz, ismeretükben pedig számítható a fluoreszcencia lecsengésének sebessége.

II.4. Oldószer-hatás, szolvatokromizmus

II.4.1. Oldószerek polaritása

Az oldószerek polaritását az oldószerek ionokat és dipólus molekulákat szolvatáló képességeként értelmezzük.[7] A szolvatációs energia az oldószer és oldott anyag-molekulák közötti általános (nem-specifikus) és specifikus kölcsönhatások energiájára bontható.[8] Az általános kölcsönhatások leírása során az oldószert folytonos polarizálható közegnek tekintjük. Ennek üregében van a szolutum, amely polarizálhatósága révén, dipólusmomentuma révén és – ha ion – töltése révén elektrosztatikus kölcsönhatásban van az oldószer kontinuummal. A specifikus kölcsönhatások az oldószer- és az oldottanyag-molekulák konkrét kémiai szerkezetével függnek össze. Az ilyen kölcsönhatások leírásánál oldószer-oldottanyag molekulapárokat, vagy molekulacsoportokat tekintünk modellnek. A specifikus kölcsönhatások közé tartozik a hidrogénkötés, a két speciesz Lewis-sav/Lewis-bázis jellegéből adódó kölcsönhatás, és az erősen rendezett oldószerekben fellépő szolvatofób kölcsönhatás.

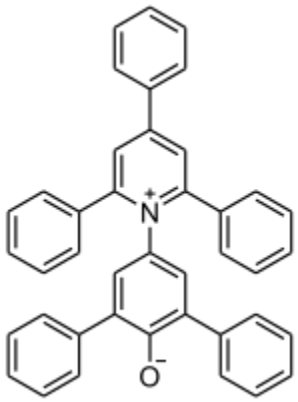
A különböző oldószerek polaritásának összehasonlítására többféle fizikai és kémiai adatot alkalmaznak. A legegyszerűbb a statikus dielektromos állandókat a polaritás mértékének tekinteni, a nagyon poláris víztől (ε_r = 80,1)[9] az apoláris ciklohexánig (ε_r = 2,02).[10] A dielektromos állandó azonban csak a nem-specifikus kölcsönhatásokkal hozható kapcsolatba. Teljesebb képet adnak az oldószerek szolvatációs tulajdonságairól a szolvatokróm összehasonlításos módszerek (solvatochromic comparison method, SCM).[11]

Az SCM-en alapuló polaritásskálák abszorpciós spektroszkópiai adatokat használnak, a polaritást egy, vagy több szolvatokróm szerves vegyület abszorpciós sávjának hullámhosszából számítják, amelyek a specifikus és nem-specifikus kölcsönhatásokra egyaránt érzékenyek. A referenciaként használt festékek szolvatokromizmusa arra vezethető vissza, hogy az S_0 és az S_1 állapotú molekulákban a töltéseloszlás erősen eltérő. Ha az alapállapotban nagyobb a dipólusmomentum, akkor az alapállapotú molekulák energiája erősebben csökken az oldószer polaritásával, mint a gerjesztett állapotúaké, ezért az oldószer polaritásával nő a gerjesztési energia, csökken az abszorpciós sáv hullámhossza. Ez az eset a negatív szolvatokromizmus. Ha a dipólusmomentum nő a gerjesztés során, az pozitív szolvatokromizmusban nyilvánul meg.

Az első SCM típusú polaritás skálát Brooker javasolta, ez a skála ikerionos merocianin szerkezetű festékek negatív szolvatokróm tulajdonságán alapult. Kifinomultabb skála az ún. Z-skála, amelyet Kosower definiált 1985-ben. Az oldószerek Z-értéke az 1-etil-4-karbometoxi-piridínium-jodid legnagyobb hullámhosszú abszorpciós maximumából számítható. A sáv csak

viszonylag tömény oldatokban észlelhető, ahol a só kontakt ionpárt képez, amelynek stabilitása erősen függ a környezete polaritásától.[11]

A ma legszélesebb körben alkalmazott empirikus polaritás skálát Reichardt dolgozta ki, ennek alapja a piridínium-N-fenolát betain festék (Reichard's Dye, Dimroth's Betaine, 5. ábra) spektrális eltolódásának vizsgálata.[12]



5. ábra: Piridínium-N-fenolát betain

Lényege, hogy a Reichardt-festék $S_0 \rightarrow S_1$ átmenethez tartozó abszorpciós maximumából (ν_{max} vagy λ_{max}) többszáz oldószerre meghatározták az átmenetienergia-értékeket az alábbi összefüggéssel:

$$E_T(30) = h \cdot c \cdot \nu_{max} \cdot N_A = \frac{28590}{\lambda_{max}} \qquad (11)$$

ahol h: Planck-állandó ($6{,}67 \cdot 10^{-34}$ J·s),

c: a fény terjedési sebessége vákuumban ($3{,}00 \cdot 10^{8}$ m·s^{-1}),

N_A: Avogadro szám ($6{,}02 \cdot 10^{23}$ db),

λ_{max}-ot nm-ben behelyettesítve $E_T(30)$-at kcal/mol-ban kapjuk.

Az ET(30)-ban a 30-as szám a Reichardt-festék sorszáma volt a témában készült első közleményben.[12]

Hasonló megfontolásokkal, de más indikátorvegyületekkel definiált skálákra számos példa van az irodalomban (Walther E_K skálája[13] vagy Knauer és Napier A_N skálája[14]), azonban ezek mára szinte teljesen kikoptak a használatból.

Az SCM továbbfejlesztésével többparaméteres skálákat is alkottak az oldószerek polaritásának összehasonlítására. A paraméterekkel felbontják az oldószerhatást az általános és a specifikus oldószer – oldott anyag kölcsönhatások hozzájárulásaira. A legismertebb a Kamlet-Taft közelítés, amely három paraméter segítségével jellemzi az oldószereket:[15]

α: az oldószer hidrogénkötés-donor jellegét jellemző paraméter,[16]

β: az oldószer hidrogénkötés-akceptor jellegét jellemző paraméter,[17]

π*: az oldószer dipólus jellege/polarizálhatósága, az oldószer azon képességét méri, mennyire képes stabilizálni egy töltést vagy dipólust.[18]

A Kamlet-Taft közelítésnek is léteznek újabb változatai, ahol a polaritás/polarizálhatóság skála a SPP (solvent polarity/polarizability) míg a protondonor és – akceptor jelleget az SA (solvent acidity) és SB (solvent basicity) skálákkal veszik figyelembe.

Az SPP[19] skála a 2-dimetilamino-7-nitrofluorén (DMANF), míg az SB[20]-skála a 5-nitroindolin (NI) szolvatokromizmusán alapul. Mindkét próbavegyület esetében közel 200 oldószert megvizsgáltak és jellemeztek.

Az SA[21] skála próbavegyülete eredetileg az *o*-terc-butilstilbazolium betain volt, azonban ez nem volt használható a metanolnál savasabb oldószerek esetében, a 3,6-dietiltetrazin próbavegyülettel egészült ki a savas oldószerek jellemzésére szolgáló módszer.[22]

II.4.2 Az abszorpciós és a fluoreszcenciaszínkép oldószerfüggése

A szerves festékmolekulák abszorpciós energiájának oldószerfüggését empirikusan leírhatjuk úgy, hogy az abszorbeált foton energiáját, $E_T^{abs} - t$ az oldószer Reichardt paraméterének, $E_T(30)$-nak a függvényében ábrázoljuk:

$$E_T^{abs} = h \cdot c \cdot \nu_{max}^{abs} \cdot N_A = Z = \frac{28590}{\lambda_{max}^{abs}} \qquad (12)$$

Az $E_T^{abs} - E_T(30)$ függvényt ábrázolva regresszióval megállapítják az illesztési paramétereket, mely paraméterek jellemzik a molekula-oldószer kölcsönhatásokat.

Analóg módon, a fluoreszcencia spektrumokból kapott frekvencia/hullámszám értékekkel a szolvatofluoro-kromizmust jellemzik:

$$E_T^{fl} = h \cdot c \cdot \nu \cdot N_A = Z = \frac{28590}{\lambda_{max}^{fl}} \qquad (13)$$

A Kamlet-Taft oldószermodellt használva egy vegyület spektrális eltolódása a következő egyenlettel becsülhető:

$$\tilde{\nu} = \tilde{\nu}_0 + s\pi^* + a\alpha + b\beta \qquad (14)$$

ahol $\tilde{\nu}_0$, s, a és b illesztési paraméterek.

Az abszorpciós és fluoreszcenciaspektroszkópiai adatokat együttesen a Lippert-Mataga-egyenlet alapján értelmezhetjük:

$$\tilde{\nu}_A - \tilde{\nu}_F = \frac{2}{hc}\left(\frac{\varepsilon - 1}{2\varepsilon + 1} - \frac{n^2 - 1}{2n^2 + 1}\right)\frac{(\mu_E - \mu_G)^2}{a^3} + \text{konst.} \qquad (15)$$

ahol $\tilde{\nu}_A$, ill. $\tilde{\nu}_F$ a fluoreszcens anyag abszorpciós, ill. fluoreszcenciaátmenetének hullámszáma, különbségük a Stokes-eltolódás,

ε: az oldószer statikus dielektromos állandója,

n: az oldószer törésmutatója,

μ_E, μ_G az oldott anyag molekulának dipólusmomentuma gerjesztett, illetve alapállapotban,

a: az Osanger-rádiusz (annak az üregnek a sugara, melyben a fluorofór elhelyezkedik).

A (15.) egyenlet törésmutatótól és dielektromos állandótól függő tényezője az orientációs polarizáció mértéke:

$$\Delta f = \frac{\varepsilon - 1}{2\varepsilon + 1} - \frac{n^2 - 1}{2n^2 + 1} \qquad (16)$$

A Lippert-Mataga-egyenlet – szemben az előző empirikus leírásokkal – elméleti levezetés eredménye. Az oldottanyag-molekulát pontszerű dipólusnak tekinti, az oldószert dielektromos kontinuumnak. A fluoreszcens anyag molekuláiban a gerjesztés során a töltések átrendeződnek, megváltozik a dipólusmomentum, ami változást indukál a környező oldószerkontinuumban: elmozdulnak az oldószermolekulák elektronjai (elektronpolarizáció), és reorientálódnak az oldószermolekulák (irányítási vagy orientációs polarizáció). Ez a két folyamat együtt az oldószerrelaxáció, ami a gerjesztett molekula energiáját csökkenti. A foton abszorpciója nagyon gyors folyamat, 10^{-15} s nagyságrendű idő alatt játszódik le, ezzel párhuzamosan az oldószerrelaxációnak csak az elektronpolarizációs része megy végbe, a reorientációs részfolyamat ehhez képest lassú, tipikusan 10-100 ps alatt játszódik le. Ha az indikátor gerjesztett élettartama elegendően hosszú – ns nagyságrendű – akkor úgy tekinthetjük, hogy az emissziót megelőzően az oldószermolekulák reorientációja is megtörténik, azaz az emisszió kiindulási állapota a teljes oldószerrelaxációs energiával csökkentett S_1 állapotú energia.

A Lippert-Mataga-egyenlet a fenti módon elképzelt relaxációs folyamatok mellett érvényes. Az oldószer és az oldott anyag közötti hidrogénkötéseket és más specifikus kölcsönhatásokat nem veszi figyelembe. Mégis, a tapasztalat szerint, az alkoholokban mért Stokes-eltolódások közelítőleg lineárisan változnak az oldószer orientációs polarizációjával.

II.5. Jelátviteli mechanizmusok fluoreszcens próbákban

A fluoreszcens próbák működése azon alapul, hogy a mikrokörnyezet tulajdonságai hatással vannak a vegyület fotofizikai tulajdonságaira. Hogy a mikrokörnyezet mely tulajdonságára érzékeny a próba, azt végső soron a szerkezete határozza meg.

A fluoreszcens jelzőanyagok működését meghatározó főbb jelátviteli mechanizmusok (6. ábra):

- Intramolekuláris töltéstranszfer (ICT) típusú festékek esetén a gerjesztett állapotú molekula sokkal erősebben, vagy gyengébben poláris, mint az alapállapotú molekula. Az ilyen jelzőanyagok abszorpciós színképe, és sokszor az emissziós színképe is erősen változik a környezet polaritásával.[23] A csavart állapotú intramolekuláris töltéstranszfer (TICT) festékek az ICT típusú festékek egy speciális alcsoportja, melyben gerjesztés hatására nem csak a töltéseloszlás változik meg, hanem konformációváltozás is történik. Mind az ICT, mind a TICT típusú jelzőmolekulák alkalmasak a környezet polaritásának jellemzésére. A TICT típusúak a viszkozitásról is adnak információt.

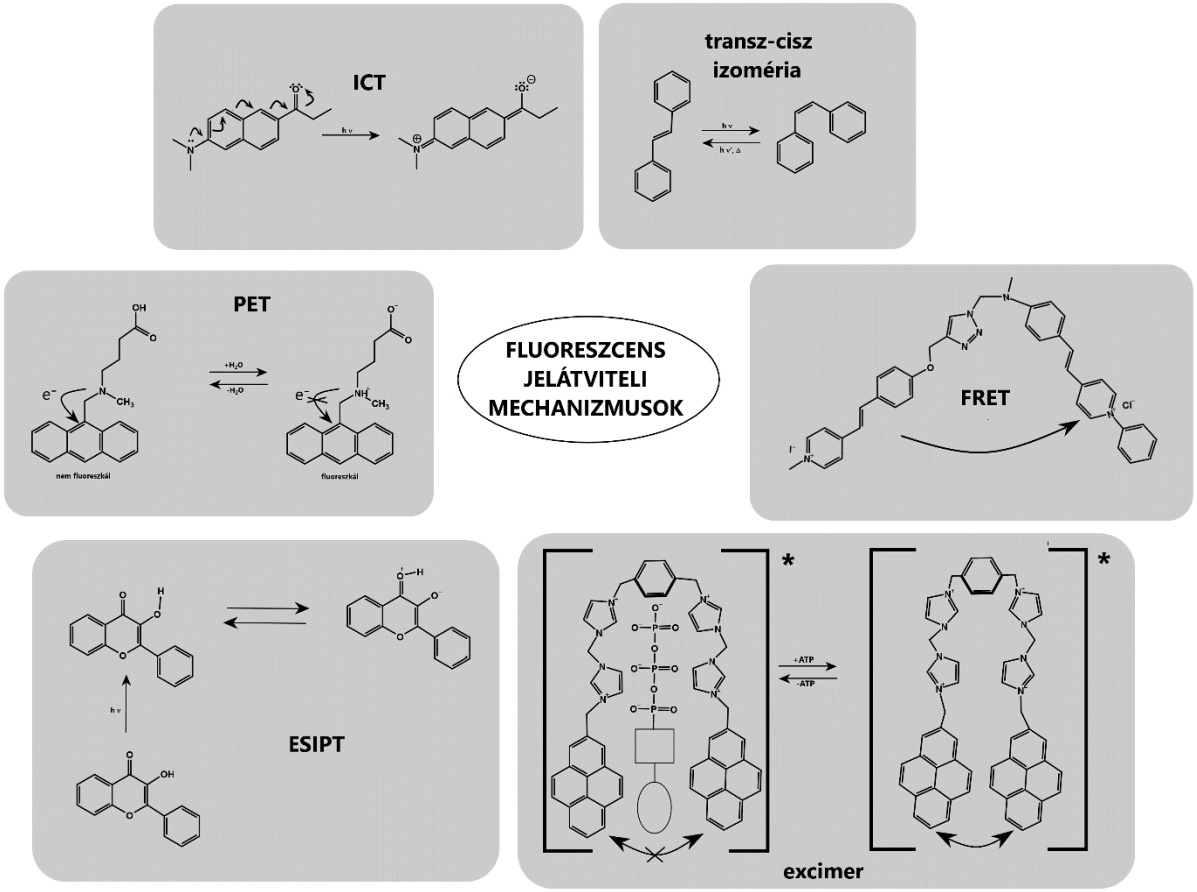
- Konformáció-változást szenvedhet olyan jelzővegyület is, amelynek a polaritása csak kevéssé változik a gerjesztés hatására. Ezek jellemzően kettős kötést tartalmaznak, mely mentén transz-cisz izoméria léphet fel. Gerjesztett állapotban lecsökken az az energiagát, amely alapállapotban túl nagy ahhoz, hogy az izomerizáció felléphessen. Az ilyen jelzővegyületek főleg a viszkozitás jellemzésére alkalmasak.[24] Legismertebb képviselője ennek a jelzőmolekula-családnak a transz-sztilbén.

- Gerjesztett állapotú intramolekuláris proton transzfer (ESIPT) próbák esetén az elektroneloszlás – hasonlóan a töltéstranszfer típusú jelzővegyületekhez – nagymértékben különbözik alap és gerjesztett állapotban. Az ESIPT próbákban van egy protondonor és egy vele szomszédos protonakceptor csoport, amelyek között gerjesztett állapotban protonátadás történik. Elvileg az emissziós spektrumban két sáv várható, a kisebb hullámhosszhoz rendelhető normál forma (N*) sávja, valamint a nagyobb hullámhosszhoz tartozó tautomer forma (T*) sávja. Ahogy az ICT-típusú jelzővegyületek esetében is, úgy itt is elmondható, hogy a mikrokörnyezet polaritásának változására érzékeny a molekula, a két gerjesztett állapotú forma (normál és tautomer forma) aránya, ezen keresztül az emissziós sávok aránya változik.

- Intramolekuláris fotoindukált elektron transzfer (PET) azokra a jelzővegyületekre jellemző, ahol egy fluorofór csoporthoz valamilyen elektrondonor kötődik egy távtartó egység (spacer) közbeiktatásával, ami kioltást okoz. Amennyiben a donor – legtöbbször amino csoport – protonálódik, visszakapjuk az eredeti fluorofór-csoport fluoreszcenciáját.[25]

- A fluoreszcencia rezonancia energiatranszferről (FRET) olyan rendszerek esetében beszélünk, melyekben két fluorofór csoport található: egyik az energiadonor szerepét tölti be, másik az akceptorét. A donor alacsonyabb hullámhossztartományban emittál és ez a sáv átlapol az akceptor abszorpciós sávjával. Az akceptor a gerjesztési energia átvételével a rá jellemző hullámhosszon emittál.[26] Az energiatranszfer hatásfoka a két csoport távolságának hatodik hatványával fordítottan arányos. Minden olyan kölcsönhatás, ami a két csoport közötti távolságot befolyásolja, hatással lesz végső soron az akceptor-egység emissziójára.[27] A jelenségnek kiemelt szerepe van a fehérjekutatásban.

- A fluorofórok egy részére jellemző az excimer képződés. A jelenség során egy gerjesztett állapotú molekula dimert képez egy alapállapotú molekulával, az így kialakult gerjesztett állapotú komplex spektrális tulajdonsága eltérő lesz a monomerhez viszonyítva. A jelenséget olyan molekuláris kémiai szenzoroknál használják fel, melyeknél a komplexképzés kizárja az excimer képződését, így a monomer-excimer sávarányból lehet következtetni az analit mennyiségére.[28]



6. ábra: Jelátviteli mechanizmusok fluoreszcens próbákban

Munkám során három fluoreszcens jelzőmolekula protolitikus reakcióit vizsgáltam: a kumarin 102, az 4'-dietilamino-3-hidroxiflavon és a Brooker-merocianint másik két szubszitituált származékával.

A fluoreszcens próbák közül a kumarinok az ICT-típusú jelzőanyagokhoz sorolhatók. Érzékenyek a környezet polaritására, fluoreszcencia kvantumhatásfokuk széles skálán mozog, akárcsak az emittált fény hullámhossza. Sok képviselője megtalálható a természetben, fűszerek és virágok illat anyagának komponensei.

A 3-hidroxi-flavonok esetében gerjesztett állapotban a hidroxilcsoportról a szomszédos karbonilcsoportra kerülhet a proton, ezek a jelzővegyületek az ESIPT-típusú próbákhoz tartoznak. A hidroxi-flavonok is gyakran előfordulnak növényekben, virágok és gyümölcsök alkotóeleme.

A Brooker-merocianin és származékai ezzel szemben olyan jelzőanyagok, melyek laboratóriumban születtek. Habár szolvatokróm tulajdonsága teszi különlegessé őket, másként viselkednek, mint az ICT-típusú próbavegyületek.

II.6. Savak, sav-bázis egyensúlyok

A savak az életünk szerves részét képezik, a savanyú íz az öt (egyes források szerint hat) alapíz egyike. Habár a H^+ koncentráció és a pH fogalma már évszázadok óta ismert, a savanyú íz érzékeléséért felelős receptort (OTOP1) csak nemrégiben sikerült azonosítani.[29]

Az első ma is használatos sav-bázis elmélet Arrheniustól származik 1884-ból. Az ő besorolása alapján savnak tekinthető minden olyan vegyület, amely proton leadására képes, bázisok pedig azok az anyagok, melyek hidroxid-iont adnak le. Ezt az elméletet finomította Johannes Nicolaus Brönsted dán kémikus 1923-ban egy új sav–bázis elmélet megalkotásával, melyet 1928-ban Thomas Martin Lowry továbbfejlesztett, így napjainkban Brönsted-Lowry elméletként találkozhatunk vele az irodalomban. Ez az elmélet megkülönböztet egyszerű és összetett sav-bázis rendszereket.

A sav-bázis egyensúlyokat rendszerint a disszociáció irányából vizsgáljuk:

$$\mathrm{BH^+ + H_2O \leftrightarrow B + H_3O^+} \tag{17}$$

Amennyiben a disszociáció nem teljes, egyensúlyi reakcióról beszélünk, jelen esetben egy gyenge savról. A disszociáció egyensúlyi állandóját a szokásos módon fejezhetjük ki:

$$K_a = \frac{[\mathrm{H_3O^+}][\mathrm{B}]}{[\mathrm{BH^+}][\mathrm{H_2O}]} \tag{18}$$

Amennyiben a víz – mint leggyakoribb oldószer – protolitikus egyensúlyát nem szükséges figyelembe vennünk, a (17) reakcióegyenlet és a (18) egyensúlyi állandó a következő módon alakul:

$$\mathrm{BH^+} \leftrightarrow \mathrm{B} + \mathrm{H^+} \tag{19}$$

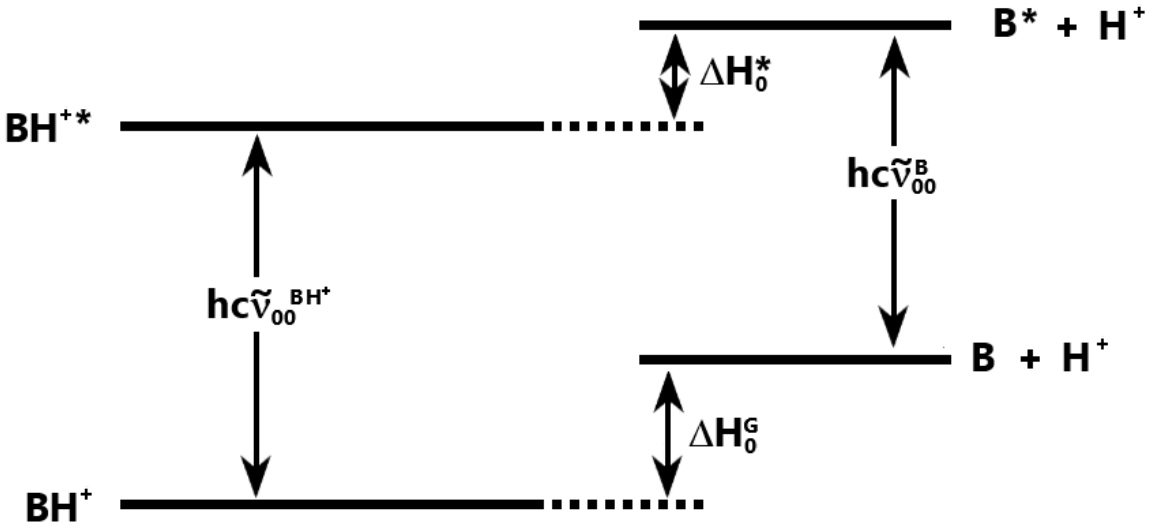
$$K_a = \frac{[\mathrm{H^+}][\mathrm{B}]}{[\mathrm{HB}]} \tag{20}$$

A savi disszociációs állandót – a pH-val analóg módon – a könnyebb kezelhetőség miatt gyakran a pK_a értékkel jellemzik, mely definíció szerint:

$$\mathrm{p}K_a = -\lg K_a \tag{21}$$

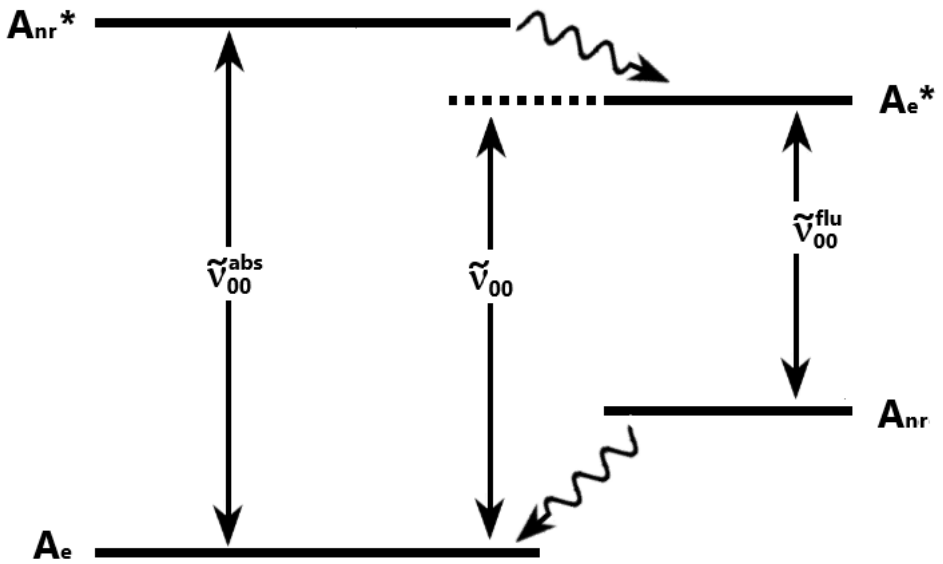
Ha a sav-bázis egyensúlyok mögé nézünk és kvantumkémiai megfontolások alapján vizsgáljuk, a disszociáció során – pontosabban azt megelőzően - a molekula elektronszerkezete megváltozik, melynek során a proton kisebb affinitással tud csak kötődni a molekulához, mígnem elszakad tőle. Könnyű belátni, hogy bármilyen változás, ami egy molekula elektronszerkezetére hatással van, hatással lesz a sav-bázis egyensúlyra is. Ennek érdekes példája az elektrongerjesztés, mely során a molekula az S_0 alapállapotból S_1 gerjesztett állapotba jut. A töltéseloszlás megváltozik a molekulán belül, és amennyiben az jelentősen érinti a molekula proton-donor vagy –akceptor részét, úgy a gerjesztett állapotú savi disszociációs állandó, pK_a^* értéke el fog térni az alapállapotútól. A gerjesztett állapotot jellemző pK_a^* érték becslésére Theodor Förster dolgozott ki egy eljárást, az ún. Förster-ciklust. [30,31]

A Förster-ciklus egy indirekt módszer, ami felhasználja az alapállapot termodinamikai tulajdonságait és a protonált és deprotonált formákra jellemző elektronátmenetek energiáit. A módszer elhanyagolja a moláris entrópia megváltozását, ennek ellenére jó becslést ad. A ciklus energiadiagramját a 7. ábra szemlélteti.



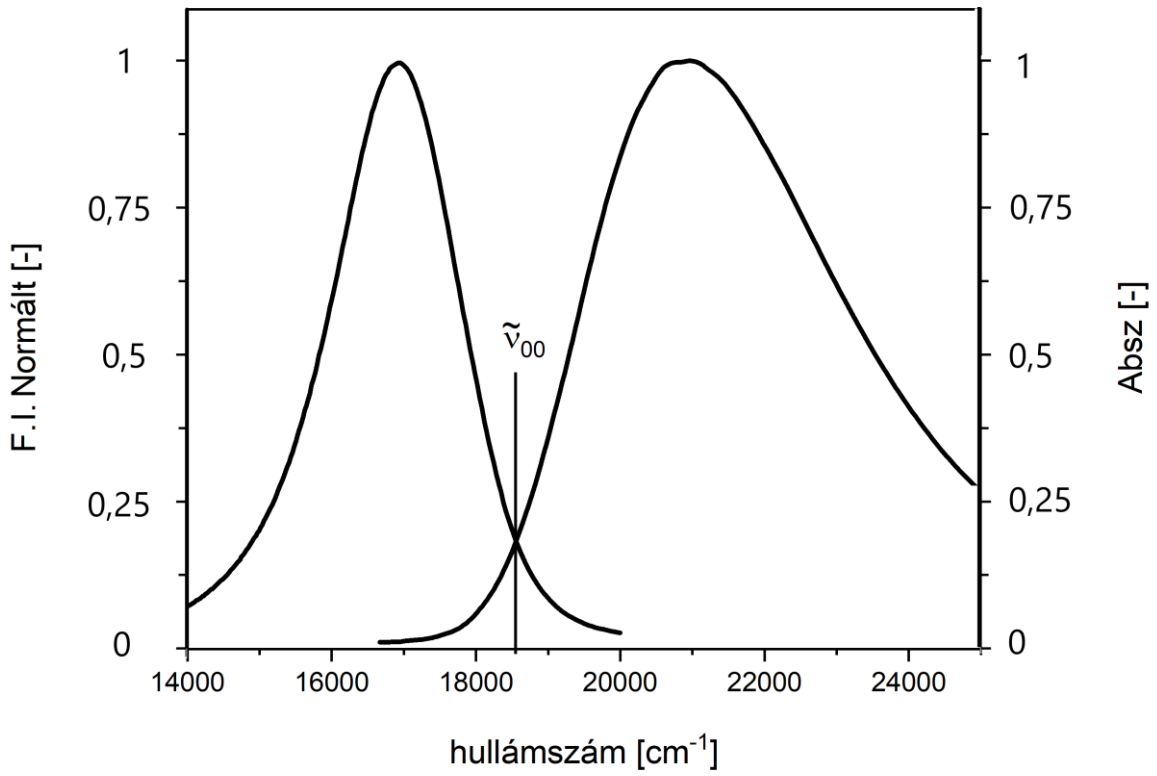
7. ábra: A Förster-ciklus energiadiagramja

A módszer a becsléshez a protonált és deprotonált formákhoz tartozó $S_1 \rightarrow S_0$ tiszta elektronátmeneteit használja fel (8. ábra), amely a gerjesztett és alap állapotú elektron energia-szintek rezgési alapállapotainak különbsége ($h\nu_{00} = hc\tilde{\nu}_{00}$).



8. ábra: Egyensúlyi és nem relaxált állapotok
$\tilde{\nu}_{00}$ az egyensúlyi, relaxált energiaszintek különbsége

A tiszta elektronátmenet energiája kísérleti adatokból közelíthető oly módon, hogy az abszorpciós és emissziós sávot egységnyi értékre normáljuk és közös spektrumon ábrázoljuk. Az energia a két sáv metszéspontjaként adódik (9. ábra).



9. ábra: Tiszta elektronátmenet meghatározásának módja

Amennyiben az elnyelési és emissziós sávok Gauss-görbe szerűek és félértékszélességük nem különbözik jelentősen (az abszorpciós spektrum ezen részét nem torzítja magasabb energiájú átmenet), egyszerűsödik a helyzet. Ekkor a tiszta átmenet jó közelítéssel az abszorpciós és emissziós sávmaximumok átlagaként számítható. Ez alapján a gerjesztett állapotú savi disszociációs állandó az alábbi formulával számítható:

$$\mathrm{p}K_a^* = \mathrm{p}K_a - \mathrm{N_A}\frac{\left[\frac{\left(\Delta E_{abs,BH^+} + \Delta E_{em,BH^+}\right)}{2} - \frac{\left(\Delta E_{abs,B} + \Delta E_{em,B}\right)}{2}\right]}{\ln 10 RT} \qquad (22)$$

ahol $\Delta E_{abs,BH^+}$ és $\Delta E_{em,BH^+}$ a protonált forma abszorpciós és emissziós energiái,

$\Delta E_{abs,B}$ és $\Delta E_{em,B}$ a deprotonált forma abszorpciós és emissziós energiái,

T a hőmérséklet,

R az egyetemes gázállandó,

N_A az Avogadro-szám,

Egy vegyület pK_a* értéke kísérleti úton is meghatározható, erre két fluoreszcencia mérésen alapuló technika áll rendelkezésre. Stacionárius méréssel a különböző pH-jú

oldatokban mért emissziós színképekből illesztéssel határozzuk meg a gerjesztett állapotú savi disszociációs állandó értékét. Amennyiben a gerjesztett állapot élettartama rövid és a sav-bázis egyensúly kialakulásának idejénél gyorsabban bekövetkezik a dezaktiválódás, az emissziós spektrumok az alapállapotot fogják tükrözni, így ez a kísérleti módszer csak korlátok között alkalmazható a gerjesztett állapot jellemzésére.

A másik lehetséges út az időfelbontásos mérés. Ennek során a pH függvényében mérünk lecsengési görbéket, és azokat értékelve kiszámítjuk a gerjesztett állapotban történő protonálódás és disszociáció sebességi állandóit, k^*_{pr}-ot és k^*_{dpr}-ot. Egyensúlyban az ellentétes irányú reakciók sebessége megegyezik,

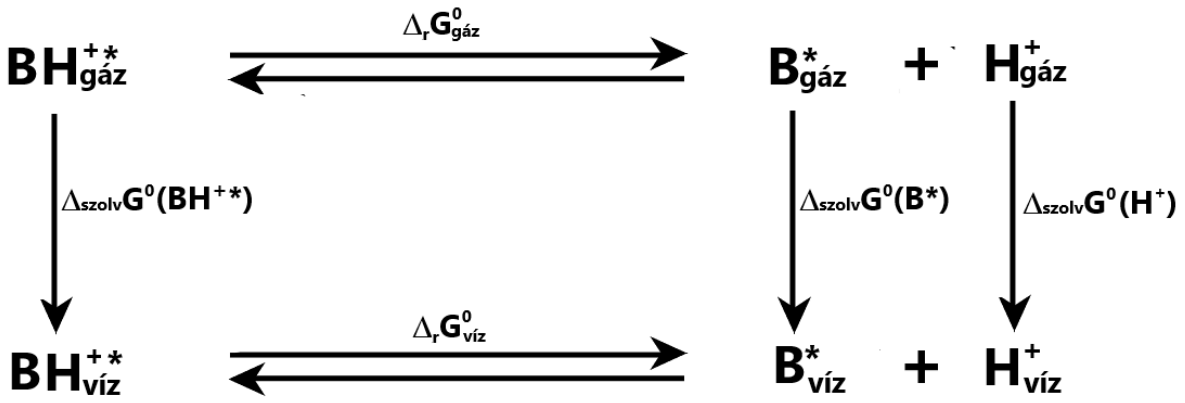
$$k^*_{dpr}[\mathrm{BH}^{+*}] = k^*_{pr}[\mathrm{B}^*][\mathrm{H}^+] \tag{23}$$

Ezért pK_a* a kinetikai adatokból a

$$\mathrm{p}K^*_a = -\lg K^*_a = -\lg \frac{k^*_{dpr}}{k^*_{pr}} \tag{24}$$

összefüggés szerint számítható ki.

Számításos kémiai módszerek is rendelkezésre állnak a gerjesztett állapotú savi disszociációs állandó meghatározására. Az egyik ilyen módszer a már említett Förster-ciklust veszi alapul, a spektrumszámítás során meghatározott $S_0 \rightarrow S_1$ és $S_1 \rightarrow S_0$ átmenetek energiáit felhasználva (22. egyenlet). A másik módszer az ún. termodinamikai ciklus, mely a pK_a* gázfázisban számított szabadentalpia-változását és az egyes specieszek szolvatációs energiáit használja fel (10. ábra).



10. ábra: Termodinamikai ciklus pK_a* érték számítására

A szabadentalpiára, mint termodinamikai állapotfüggvényre érvényes a Hess-tétel, ezért megtehetjük, hogy a kondenzált fázisú protonálódási reakcióra a reakcióban részt vevő specieszek ideális gáz fázisában számított szabadentalpiaváltozását számítjuk ki elsőként, majd

ehhez hozzáadva a specieszek szolvatációs szabadentalpiáját fejezzük ki a kondenzált fázisú reakció reakciószabadentalpiáját.

III. Kísérleti és számítási módszerek

III.1. Felhasznált anyagok

III.1.1. A kumarin 102 vizsgálata során használt anyagok

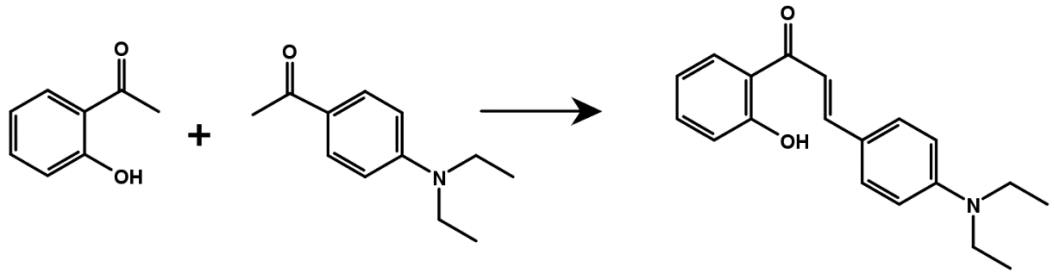
IUPAC nevei: 2,3,6,7-Tetrahidro-9-metil-1H,5H-kinolizino(9,1-gh)kumarin,
8-Metil-2,3,5,6-tetrahidro-1H,4H-11-oxa-3a-aza-benzo(de)antracén-10-on

A kumarin 102 vegyületet az Exciton cégtől vásároltuk és tisztítás nélkül használtuk. A pH beállításához használt HCl oldatot (37% analitikai tisztaságú) a Carlo Erba Reagents cégtől vásároltuk. Az oldatok elkészítéséhez ioncserélt vizet használtam (18 MΩ).
A sósav faktorozásához felhasznált vegyszereket ($KHCO_3$ és metilvörös indikátor) a Reanal Kft.-től vásároltunk.

III.1.2. A 4'-N,N-dietilamino-3-hidroxiflavon vizsgálata során használt anyagok

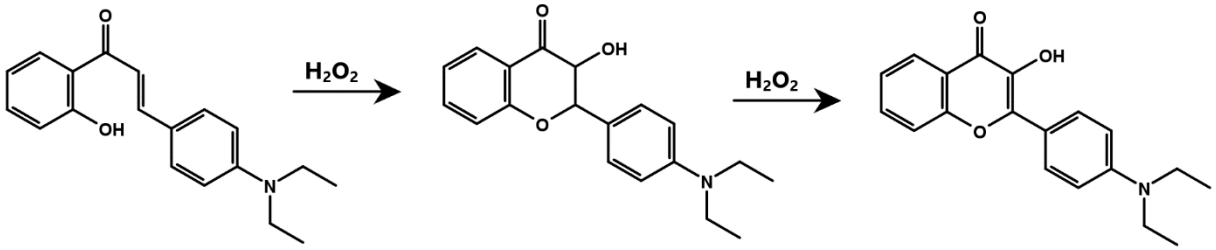
IUPAC neve: 2-[4-(Dietilamino)fenil]-3-hidroxi-4H-kromen-4-on

A kísérletekhez használt 4'dietilamino-3-hidroxiflavont Bitter István és kutatócsoportja állította elő a Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem (BME) Szerves Kémia és Technológia Tanszékén. A FET-et két lépésben állították elő.[32] Elsőként a kalkont állították elő Claisen-Schmidt kondenzációval (11. ábra), 2-hidroxiacetofenon és 4-(dietilamino)-benzaldehid kondenzációs reakciójával.[33,34]



11. ábra: Claisen-Schmidt kondenzáció

A kalkonból Algar-Flynn-Oyamada (AFO)[35,36] reakcióban oxidatív ciklizációval áll elő a heterociklus, amit tovább oxidálva kialakul a kettős kötés (12. ábra).



12. ábra: Az Algar-Flynn-Oyamada reakció sémája

A spektroszkópiai vizsgálatokhoz használt HPLC tisztaságú acetont a Sigma-Aldrich cégtől vásároltuk. Az oldatok elkészítéséhez ioncserélt vizet használtam (18 MΩ).

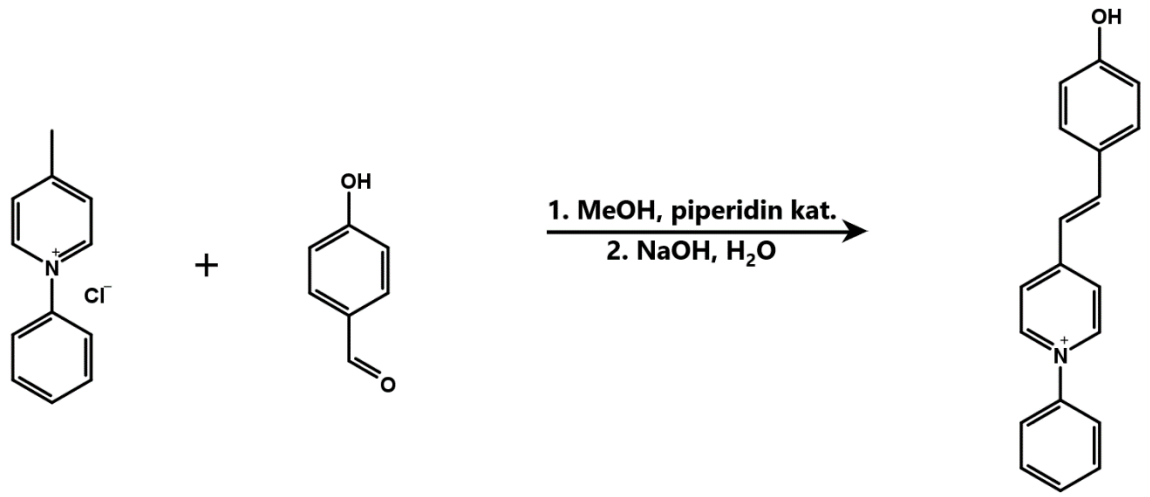
A sav-bázis egyensúlyok vizsgálatát Britton-Robinson pufferben végeztem. Az ehhez szükséges vegyszereket (bórsav, ecetsav, foszforsav és nátrium-hidroxid granulátum, analitikai tisztaságú vegyszerek) a Sigma-Aldrich cégtől vásároltuk.

A kísérletekhez használt nukleotidokat (ATP, ADP, AMP és GTP) a Sigma-Aldrich vállalattól vásároltuk.

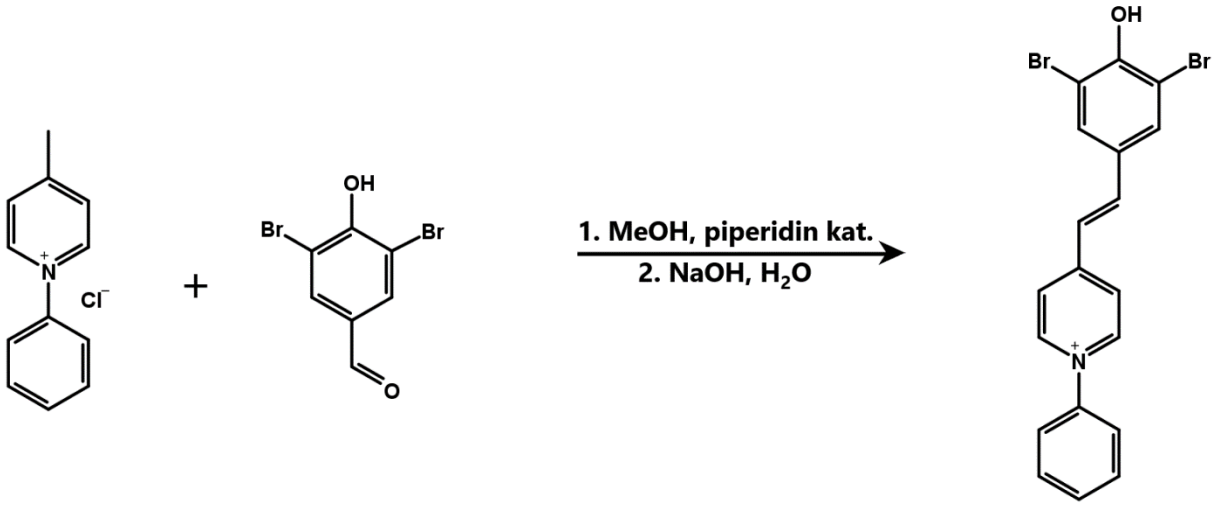
III.1.3. A Brooker-merocianin pillérarén rendszerek vizsgálata során használt anyagok

IUPAC nevek: 1-metil-4-[(oxociklohexadieniliden)etilidén]-1,4-dihidropiridin (M1)
(E)-4-(2-(1-fenilpiridin-1-ium-4-il)vinil)fenolát (M2)
(E)-2,6-dibromo-4-(2-(1-fenilpiridin-1-ium-4-il)vinil)fenolát (M3)

A Brooker-merocianint és azok szubsztituált származékait, valamint a vízoldható pillérarént (WP6) Bojtár Márton, a Természettudományi Kutatóközpont munkatársa állította elő. A szintézis első lépéseként az N-szubsztituált pikolinium-sót reagáltatták különböző benzaldehidekkel, piperidin katalizátort használva (Knoevenagel kondenzáció). A Brooker-merocianin (M1) szintézisére ez a módszer az irodalomból ismert volt.[37] Az M2 és M3 új vegyületek szintézisének sémája az 13. és 14. ábrán látható. 1-fenil-pikolinium-klorid volt a kiindulási vegyület,[38] amit 4-hidroxi-benzaldehiddel, illetve 3,5-dibróm-4-hidroxibenzaldehiddel reagáltattak.



13. ábra: Az M2 merocianin szintézisének reakciósémája



14. ábra: Az M3 merocianin szintézisének reakciósémája

Az 1-fenil-pikolinium-kloridot és a 4-hidroxibenzaldehidet metanolban feloldva pár csepp piperidin mellett forralták, majd az oldószert eltávolították. A kapott anyagot átkristályosították aceton és dietil-éter 1:1 arányú keverékéből, majd szűrték és mosták. A klorid-sót NaOH oldattal reagáltatva megkapták az ikerionos formát.

A vízoldható karboxilátó-pillér[6]arén szintézise Huang módszere alapján történt, a P6A (pillér[6]arén) észteresítésével majd hidrolízisével.[39]

A spektroszkópiai méréseket Britton-Robinson pufferben végeztem, az ionerősséget KCl-dal állítottam be. Az ehhez szükséges vegyszereket a Sigma-Aldrich cégtől vásároltuk.

III.2. Spektroszkópiai kísérletek

III.2.1. UV-látható abszorpciós spektroszkópia

Az abszorpciós mérésekhez Agilent 8435 típusú diódasoros spektrofotométert használtam, termosztálható mintatartóval.

III.2.2. Fluoreszcenciaspektroszkópia

A stacionárius emissziós mérésekhez Perkin Elmer LS50B típusú spektrofluorimétert, valamint Edinburgh Instruments FLS 920 típusú fluorimétert használtam.

A fluoreszcenciaspektrumok korrekciója

A fluoreszcenciaspektrumok esetében – amennyiben kizárható az asszociáció – az intenzitás és koncentráció között a következő összefüggés áll fenn:[40]

$$\mathrm{I_F} = \mathrm{g} \cdot \Phi_\mathrm{f} \cdot \left[1 - 10^{-\varepsilon \mathrm{cl}}\right] \cdot \mathrm{I_0} \qquad (25)$$

ahol g készülékfüggő együttható,

Φ_f a fluoreszcencia-kvantumhatásfok,

ε a moláris abszorpciós koefficiens,

c a minta koncentrációja,

l az úthossz,

I_0 a gerjesztő fény intenzitása.

Ha a minta abszorpciója, $A = \varepsilon cl$ kicsi, akkor $10^{-\varepsilon cl} \approx 1 - \varepsilon cl$, és így I koncentrációfüggése lineárisnak tekinthető:

$$\mathrm{I_F} \approx \mathrm{g} \cdot \Phi_\mathrm{f} \cdot \varepsilon \cdot \mathrm{c} \cdot l \cdot \mathrm{I_0} = \varphi \cdot c \qquad (26)$$

Ahhoz, hogy a (26) egyenlet szerinti egyenes arányosság teljesüljön, fluoreszcenciaspektrumok felvételekor általános szabály, hogy az optikai sűrűség értéke sem a gerjesztési hullámhosszon, sem az emissziós sáv tartományában ne legyen nagyobb OD=0,03 értéknél. Méréseim során amennyiben ez a kritérium valamilyen oknál fogva nem teljesült, a fluoreszcenciaspektrumokat korrigáltam, ami a következő összefüggés felhasználásával történt:[6]

$$\mathrm{I_F^{corr}} = \mathrm{I_F} \cdot 10^{\left[\left(\frac{\mathrm{OD_{ex}} + \mathrm{OD_{em}}}{2}\right)\right]} \qquad (27)$$

ahol $\mathrm{I_F^{corr}}$ a korrigált fluoreszcencia intenzitás,

$\mathrm{I_F}$ a mért fluoreszcencia intenzitás,

$\mathrm{OD_{ex}}$ és $\mathrm{OD_{em}}$ a gerjesztés és az emisszió hullámhosszán mért optikai sűrűség.

Ez a korrekció a belsőszűrő-hatás és az önabszorpció okozta sávtorzulást javítja ki. Amennyiben fluoreszenciaspektrumokat hasonlítunk össze, - a mérési beállítások változatlansága mellett – normálni kell a spektrumokat egységnyi abszorbancia értékre. Erre abban az esetben volt szükség, ha nem volt izobesztikus pont az abszorpciós spektrumban, vagy nem volt lehetőség arra, hogy az emissziós spektrum felvételekor ezen a hullámhosszon gerjesszünk.

Fluoreszcencia-kvantumhatásfok mérése

A fluoreszcencia-kvantumhatásfok értékeket standard oldatok segítségével határoztam meg az alábbi összefüggést felhasználva:[6]

$$\Phi_{f,M} = \Phi_{f,R} \cdot \frac{I_M}{I_R} \cdot \frac{OD_R}{OD_M} \cdot \frac{n_M^2}{n_R^2} \qquad (28)$$

ahol: Φ_f a fluoreszcencia kvantumhatásfok

I az emisszió integrált intenzitása

OD az optikai sűrűség

n az oldószer törésmutatója

M és R index a minta és a referenciavegyületre vonatkozó értékek

Méréseim során igyekeztem az általánosan elfogadott standard oldatokat használni, ilyen a kinin-szulfát 0,1 M-os H_2SO_4 vizes oldatában mérve ($\Phi_f = 0{,}577$),[41] a rodamin 6G etanolos oldata ($\Phi_f = 0{,}94$)[42] valamint a fluoreszcein 0,1M-os vizes NaOH oldatban mérve ($\Phi_f = 0{,}95$).[43]

Időfelbontásos fluoreszcenciamérések

Az időfelbontásos mérésekhez, illetve a fluoreszcencia-élettartam meghatározásához Edinburgh Instruments FLS 920 típusú fluorimétert használtam, 378 és 473 nm-en emittáló diódalézerekkel (impulzushosszuk 130 ps és 100 ps) és Hamamatsu R3809U-50 MCP (multi channel plate) detektorral kiegészítve. A mért lecsengési görbéket a spektrofluoriméter szoftvere dekonvolúcióval értékelte, a készülékfüggvényt Ludox HS-30 oldattal vettem fel.

A fluoreszcencia-élettartamokat a lecsengési görbékből határoztam meg illesztéssel, a lecsengést egy, két, vagy három exponenciális függvénnyel közelítve:

$$I_F(t) = A_1 \exp\left(\frac{-t}{\tau_1}\right) + A_2 \exp\left(\frac{-t}{\tau_2}\right) + A_3 \exp\left(\frac{-t}{\tau_3}\right) \qquad (29)$$

ahol I(t) a fluoreszcencia-intenzitás az idő függvényében,

τ_1, τ_2, τ_3 a fluoreszcencia lecsengési idők [s],

A_1, A_2, A_3 preexponenciális tényezők,

t az idő.

Az illesztőprogramot is a spektrofluoriméter szoftvere tartalmazta.

III.2.3. pH mérés

A pH mérésére Thermo ORION 3 Star típusú pH-mérőt használtam Orion 9157BNMD Triode 3-in-1 pH/ATC Probe típusú elektróddal, minden kísérletsorozat előtt három ponton kalibrálva a műszert.

Az elektród 4 - 10 pH-értékek között mér megbízhatóan. Az erősebben savas, vagy bázisos közegekben, ahol nem volt lehetőség a pH-mérő használatára, titrálással és számítással határoztam meg a közeg pH-ját. Kis ionerősségű oldatokban finomskálás pH-indikátor papírral is ellenőriztem a pH-t, melyet a Sigma Aldrich vállalattól szereztünk be.

III.3. Oldatkészítés

III.3.1. A kumarin 102 spektroszkópiai vizsgálata

Az analitikai mérlegen kimért, néhány mg mennyiségű anyagot 1 l-es mérőlombikba tettem és ioncserélt vízben feloldottam – amennyire az oldhatósága engedte. Ezt követően, néhány óra múlva az oldat tisztáját leöntöttem és ezt 0,45 μm-es fecskendőszűrővel több részletben leszűrtem. Az így kapott oldatból 8-8 ml-nyit kimértem 10 ml-es lombikokba (abszorpciós mérések esetén 40-40 ml-t 50 ml-es lombikba), majd bemértem a pH beállításhoz szükséges mennyiségű hígított sósavat, végül jelig töltöttem a lombikokat.

A pH erősen savas értékeknél nem mérhető megbízhatóan elektróddal. A felhasznált sósav 0,1 M névleges koncentrációjú oldatát az irodalomban ismert módon, $KHCO_3$ felhasználásával, metilnarancs indikátor jelenlétében faktoroztam. [44] A faktort négy párhuzamos mérés átlagaként kaptam és érvényesnek tekintettem a többi sósavoldat esetében is. A pH-t a névleges sósav koncentráció és faktor ismeretében számítottam. A mintakészítés során felhasznált desztillált víz a mérések között nem volt levegőtől elzárva, így abból CO_2 oldódott be. Ennek tudatában vizsgáltam ezt a „desztillált vizes” mintát, amelynek pH-ját mind pH-mérő elektróddal, mind finomskálás pH-papírral ellenőriztem és 5 körüli értéket kaptam. A kísérleteimet kiegészítettem 0,1 M NaOH oldatban mért abszorpciós spektrummal is, és azonos spektrumot kaptam, mint a „desztillált vizes” mintával.

A C102 koncentrációját a moláris abszorpciós koefficiens értékéből számítottam ($c=2,7 \cdot 10^{-6}$ M). A C102 moláris abszorpciós koefficiensét külön kísérletsorozatban határoztam meg, ehhez három független etanolos törzsoldatot készítettem, majd ezekből vizes hígításokat (3-szor 4 hígítás, $c=10^{-6}$ - $5 \cdot 10^{-6}$ M koncentrációtartományban). Az így készített oldatokban az etanol mennyisége rendre 0,5 % alatt volt. Az elegyből az alkoholt nem párologtattam el, mivel az abszorpciós spektrum kevéssé érzékeny az oldószer polaritásának változására, ugyanakkor szerettem volna elérni, hogy a lombik faláról is tökéletesen beoldódjon a bemért anyag. A hígított oldatok spektrumát 10 cm-es úthosszú küvettában mértem, 25 ^{o}C-on.

A fluoreszcencia-kísérleteket 1 cm úthosszú kvarcküvettában végeztem ($c=2,7 \cdot 10^{-6}$ M, t=25 ^{o}C).

III.3.2. A 4'-N,N-dietilamino-3-hidroxiflavon tanulmányozása aceton-víz rendszerben

Mivel a vegyület fényre érzékeny,[45] kísérleteimet a lehető legkisebb fényterhelés mellett végeztem (sötétben, minden esetben új oldattal végezve a vizsgálatokat). A FET vízben gyengén oldódik, ezért fényszórási kísérlettel igazoltam, mekkora az a koncentráció, melyben a vegyület még nem aggregálódik. Ez a koncentráció $c=2 \cdot 10^{-6}$ M-nak adódott, kísérleteimet ezért $c=10^{-6}$ M-os koncentrációjú oldatokkal végeztem. A vegyület protolitikus egyensúlyát Britton-Robinson pufferben tanulmányoztam. Az abszorpciós spektrumokat 10 cm-es úthosszú kvarcküvettában vettem fel.

A fluoreszcenciaspektrumok méréséhez standard 1 cm-es úthosszú küvettát használtam. A mintát kevertettem és a gerjesztési monokromátor résszélességét a lehető legkisebbnek választottam meg, hogy a spektrumfelvétel során ne történjen észlelhető mértékű bomlás. Kísérleteimet 25 ^{o}C-on végeztem.

III.3.3. Brooker-merocianin pillérarén rendszerek

A jelzővegyületekből törzsoldatokat készítettem desztillált víz felhasználásával, melyekből az abszorpciós kísérletekhez $2,5 \cdot 10^{-5}$ M koncentrációjú oldatokat készítettem. Mind a törzsoldat, mind a hígítás elkészítésekor ügyeltem arra, hogy a mintát a lehető legkisebb fényterhelés érje, mivel a Brooker-merocianin esetében ismert volt a protonált forma transz-cisz izomerizációja.[46]

Mind az abszorpciós, mind a fluoreszcencia mérésekhez 1 cm-es úthosszú kvarcküvettát használtam. A kísérleteimet 25 ^{o}C-on végeztem.

III.4. Számítások

III.4.1. Indikátormolekula savi disszociációs állandójának meghatározása

Definíció szerint egy sav disszociációja az alábbi egyenlettel írható le (a víz autoprotolízisét itt nem vesszük figyelembe):

$$\mathrm{XH} \rightleftharpoons \mathrm{X^-} + \mathrm{H^+} \tag{30}$$

Kezdetben:	c^0_{XH}	0	0
Egyensúlyban:	$c^0_{XH} - y$	y	y

ahol c^0_{XH} a sav bemérési koncentrációja,

y a deprotonált sav egyensúlyi koncentrációja.

Az általunk vizsgált próbavegyületek vagy indikátorok esetén praktikusabb felírni az egyensúlyt fordított irányban, mivel a vegyületeink zöme semleges pH-n deprotonált formában van és savadagolás hatására állt elő a protonált forma.

$$\mathrm{I} + \mathrm{H^+} \rightleftharpoons \mathrm{IH^+} \tag{31}$$

Kezdetben:	c^0_I	$[H^+]$	0
Egyensúlyban:	$c^0_I - x$	$[H^+] - x$	x

ahol c^0_I az indikátorvegyület bemérési koncentrációja,

x az indikátor protonált formájának egyensúlyi koncentrációja.

A protonálódási állandó:

$$K_{pr} = \frac{[\mathrm{IH^+}]}{[\mathrm{I}]\cdot[\mathrm{H^+}]} = \frac{x}{(c^0_I - x)\cdot([H^+] - x)} \tag{32}$$

Ez az alábbi másodfokú egyenletté rendezhető, melynek egyik gyöke megadja a protonált forma egyensúlyi koncentrációját:

$$K_{pr}x^2 - \left(K_{pr}\cdot c^0_I + K_{pr}\cdot[H^+] + 1\right)x + K_{pr}\cdot c^0_I\cdot[H^+] = 0 \tag{33}$$

Sokszor a koncentráció-viszonyok megengedik, hogy a hidroxónium-ion fogyását elhanyagoljuk, ekkor az egyenlet a következőképp módosul:

$$K_{pr} = \frac{x}{(c^0_I - x)\cdot[H^+]} \tag{34}$$

Az egyenletből x-et kifejezve a következő egyenletet kapjuk:

$$\frac{K_{pr} \cdot c_I^0 \cdot [H^+]}{1+K_{pr} \cdot [H^+]} = x \qquad (35)$$

Kísérleteimet erős savas környezetben vagy pufferben végeztem, így a spektrális adatok kiértékelése során a (35) egyenletet használtam.

Az abszorpciós spektrum az egyes komponensek abszorbanciáiból additíve tevődik össze:

$$A^\lambda = A_1^\lambda + A_2^\lambda + \cdots + A_n^\lambda \qquad (36)$$

Sav-bázis egyensúlyoknál, amennyiben a vizsgált hullámhossz-tartományban az indikátor mindkét formája elnyel (és más komponens elnyelésével nem kell számolni), a Lambert-Beer-törvényt felhasználva a következő összefüggés írható fel:

$$A^\lambda = A_I^\lambda + A_{IH^+}^\lambda = \left(\varepsilon_I^\lambda \cdot c_I + \varepsilon_{IH^+}^\lambda \cdot c_{IH^+}\right) \cdot l \qquad (37)$$

ahol ε_I^λ és $\varepsilon_{IH^+}^\lambda$ az indikátor semleges és protonált formájának moláris abszorpciós koefficiense λ hullámhosszon,

c_I és c_{IH^+} az indikátor semleges és protonált formájának egyensúlyi koncentrációja,

l az optikai úthossz.

Az indikátor két formájának összege kiadja a c_I^0 bemérési koncentrációt, így a (37) egyenlet – a (32) egyenletben használt jelöléseket átvéve - a következőképp módosul:

$$A^\lambda = \left[\varepsilon_I^\lambda \cdot (c_I^0 - x) + \varepsilon_{IH^+}^\lambda \cdot x\right] \cdot l \qquad (38)$$

továbbá

$$A^\lambda = \left[\varepsilon_I^\lambda \cdot \left(c_I^0 - \frac{K_{pr} \cdot c_I^0 \cdot [H^+]}{1+K_{pr} \cdot [H^+]}\right) + \varepsilon_{IH^+}^\lambda \cdot \frac{K_{pr} \cdot c_I^0 \cdot [H^+]}{1+K_{pr} \cdot [H^+]}\right] \cdot l \qquad (39)$$

A protonálódási állandó meghatározása a gyakorlatban úgy történik, hogy különböző pH-értékeket beállítva – a protonkoncentráció szisztematikus változtatásával – megmérjük az abszorpciós spektrumot, majd egy kiindulási K_{pr} érték megadásával a (39) egyenlet alapján kiszámítjuk az abszorpciós spektrumot (A_{sz}^λ). Az indikátor semleges és protonált formájának moláris abszorpciós koefficiense a legtöbbször kísérleti úton meghatározható, így ezek

konstansok. A K_{pr} érték változtatásával minimalizáljuk a kísérleti és a számított abszorpciós spektrum közötti különbség négyzetét, a négyzetes eltérést (hibát).

$$S_{tot}^{abs} = \sum_{i=1}^{n} \sum_{j=1}^{m} \left(A_j^i - A_{sz,j}^i\right)^2 \tag{40}$$

ahol az i index a hullámhosszt,

a j index a különböző pH értéket jelenti.

A hiba minimalizálását a Microsoft Excel Solver bővítményével végeztem.

A fluoreszcenciaspektrumok értékelése az abszorpciós spektrumokéhoz hasonlóan történt (I^λ), az emisszió additivitását feltételezve:

$$I^\lambda = I_I^\lambda + I_{IH^+}^\lambda = \varphi_I^\lambda \cdot c_I + \varphi_{IH^+}^\lambda \cdot c_{IH^+} \tag{41}$$

ahol φ_I^λ és $\varphi_{IH^+}^\lambda$ a semleges és protonált forma (készülékfüggő) moláris fluoreszcencia-intenzitása.

Amint a II.6. fejezetben röviden említettem, a protonálódás egyensúlyi állandója, mely a (41) egyenletet jellemzi, nem feltétlenül azonos a K_{pr}*-gal. Amennyiben a protoncsere sokkal gyorsabb, mint a fluoreszcencia lecsengés (jellemzően erősen savas oldatokban), egy kvázi-egyensúlyról jön létre, mivel a gerjesztett állapotú molekulák koncentrációja túl kicsi ahhoz, hogy beálljon a dinamikus egyensúly. Ilyen módon a kísérleti spektrumokból meghatározható protonálódási egyensúlyi állandó közel esik a K_{pr}*-hoz.

Ha a protoncsere sokkal lassabb, mint a gerjesztett állapot lecsengése, a fluoreszcencia spektrumok értékelésekor az alapállapotról kapunk információt. A továbbiakban ezért erre az egyensúlyi állandóra $K_{pr,F}$ jelöléssel hivatkozom.[47,48]

Az abszorpciós spektrum esetében levezetett (39) összefüggéshez formailag hasonló egyenletet kapunk, melyben $K_{pr,F}$ értéke ismeretlen:

$$I_F^\lambda = \left[\varphi_I^\lambda \cdot \left(c_I^0 - \frac{K_{pr,F} \cdot c_I^0 \cdot [H^+]}{1+K_{pr,F} \cdot [H^+]}\right) + \varphi_{IH^+}^\lambda \cdot \frac{K_{pr,F} \cdot c_I^0 [H^+]}{1+K_{pr,F} \cdot [H^+]}\right] \tag{42}$$

Az abszorpciós spektrumok számításához hasonlóan, egy kezdeti $K_{pr,F}$ érték felvételével a (42) egyenlet segítségével kiszámítjuk az emissziós spektrumot ($I_{F,sz}^\lambda$) minden alkalmazott pH-érték esetén, majd a mért és számított spektrumokat páronként összevetjük és különbségük négyzetét minimalizáljuk.

$$S_{tot}^{abs} = \sum_{i=1}^{n} \sum_{j=1}^{m} \left(I_{F,j}^i - I_{F,sz,j}^i\right)^2 \tag{43}$$

A (42) egyenlet alkalmazásakor figyelembe kell venni az optikai sűrűséget, valamint az egyes formák moláris abszorpciós koefficiensét (pontosabban ezek arányát) a gerjesztés hullámhosszán.

III.4.2. Komplex stabilitási állandójának meghatározása 1:1 sztöchiometria esetében

Amikor két vagy több molekula másodrendű kölcsönhatásokkal egyesül, komplexképzésről beszélünk. A komplex stabilitását az egyensúlyi állandóval jellemezzük. A komplex összetételére vonatkozóan gyakran feltételezésekkel élünk, a számítási modell alapján tudjuk részben igazolni, hogy a kezdeti feltételezésünk helyes volt-e. Mi legtöbbet ún. gazda-vendég komplexekkel foglalkoztunk, így levezetésemben megtartottam a G és K jelölést, habár munkám során a vízkomplexek stabilitási állandóját is ugyanezt a modellt alkalmazva határoztam meg.

Amennyiben a komplex képződésére 1:1 sztöchiometriát feltételezünk, az alábbi egyenlettel írjuk le a reakciót:

$$\mathrm{G} + \mathrm{V} \rightleftharpoons \mathrm{GV} \tag{44}$$

Kezdetben:	c_G^0	c_V^0	0
Egyensúlyban:	$c_G^0 - z$	$c_V^0 - z$	z

ahol c_G^0 a komplexképző (gazdamolekula) bemérési koncentrációja,

c_V^0 a próbavegyület (vendég) bemérési koncentrációja,

z az egyensúlyi komplex koncentrációja.

A komplex stabilitási állandója:

$$K = \frac{[\mathrm{GV}]}{[\mathrm{G}][\mathrm{V}]} = \frac{z}{(c_G^0 - z)(c_V^0 - z)} \tag{45}$$

Az egyenlet rendezésével egy másodfokú egyenlethez jutunk, melyben a két ismeretlen a *K* és a z.

$$Kz^2 - \left(Kc_G^0 + Kc_V^0 + 1\right)z + Kc_G^0 c_V^0 = 0 \tag{46}$$

A sav-bázis egyensúlyoknál ismertetett (36) egyenlethez hasonló módon az abszorpciós spektrumot a komponensek járulékainak összegeként írjuk fel. A szabad komplexképző, a szabad próbavegyület és a komplex abszorbanciáinak összege:

$$A^\lambda = A_G^\lambda + A_V^\lambda + A_{GV}^\lambda \tag{47}$$

A vizsgált rendszerekben a komplexképző a vizsgált hullámhossztartományban nem nyelt el, így a továbbiakban ezt a tagot elhanyagolom. Amennyiben $c_V^0 << c_G^0$, úgy a komplex egyensúlyi koncentrációját a próbavegyület bemérési koncentrációjából számítjuk ($c_V^0 = c_V + z$).

$$A^\lambda = \left(\varepsilon_{GV}^\lambda \cdot c_{GV} + \varepsilon_V^\lambda \cdot c_V\right) \cdot l = \left(\varepsilon_{GV}^\lambda \cdot z + \varepsilon_V^\lambda \cdot (c_V^0 - z)\right) \cdot l \qquad (48)$$

ahol ε_{GV}^λ és ε_V^λ a komplex, valamint a próbavegyület moláris abszorpciós koefficiense a hullámhossz függvényében,

c_{GV} és c_V a komplex, valamint a próbavegyület egyensúlyi koncentrációja,

c_V^0 a próbavegyület bemérési koncentrációja.

Hasonló összefüggés írható fel az emissziós spektrumokra is:

$$I_F^\lambda = \varphi_{GV}^\lambda \cdot c_{GV} + \varphi_V^\lambda \cdot c_V = \varphi_{GV}^\lambda \cdot z + \varphi_V^\lambda \cdot (c_V^0 - z) \qquad (49)$$

ahol φ_{GV}^λ és φ_V^λ a komplex valamint a próbavegyület moláris fluoreszcencia-intenzitása.

A kísérleti spektrumokra történő illesztés a komplex egyensúlyoknál is azzal kezdődik, hogy a stabilitási állandónak egy kezdeti értéket adunk meg, a (46) egyenlet felhasználásával kiszámítjuk a komplex egyensúlyi koncentrációját, majd a (48) egyenlet segítségével az abszorpciós spektrumot. Végül a kísérleti spektrumot összevetjük a számított spektrummal és négyzetes eltérésüket a már ismertetett módon minimalizáljuk.

Fontos megjegyezni, hogy amennyiben nem ismerjük valamelyik forma moláris abszorpciós koefficiensét és/vagy koncentrációfüggetlen spektrumát, a spektrumillesztés során ezt is megkaphatjuk eredményül, amennyiben az illesztés során ezt az adatot változónak tekintjük.

Amennyiben K értéke minden koncentráció esetén jól írja le a komplex egyensúlyt, a képződő komplex sztöchiometriáját is igazoltuk. Mindazonáltal léteznek a sztöchiometria külön igazolására alkalmas módszerek, ilyen a Job-módszer, melynek lényegét a következő alfejezetben ismertetem.

Job-módszer: folytonos variáció elve

A Job-módszer[49] egy általánosan elfogadott módszer egy komplex sztöchiometriájának igazolására. A módszer elve, hogy $c = c_G + c_V$ összkoncentráció mellett a komplexképző és próbavegyület mólarányát 0 és 1 között változtatjuk és a különböző összetételű oldatok abszorpciós spektrumát mérjük. Egy, a komplexre jellemző hullámhosszon ábrázoljuk az

abszorbanciát az összetétel függvényében. Levezethető, hogy a komplex abszorbanciája annál az összetételnél lesz a legnagyobb, ami a sztöchiometriájára jellemző.

Munkám során olyan komplex egyensúly kezelésére is szükség volt, ahol az 1:1 sztöchiometriájú komplexet kipróbáltuk indikátor-kiszorításos indirekt szenzorként. Ennek részleteit a Függelékben fejtem ki.

III.5. A kvantumkémiai számítások paraméterei

A kísérleti spektroszkópiai eredmények értékeléséhez elméleti számítások eredményét használtuk fel. A számítások Hégely Bence, Mester Dávid és Kállay Mihály, a BME Fizikai Kémia és Anyagtudományi Tanszék munkatársainak munkája volt.

III.5.1. Kumarin 102 komplexképzése vízzel, protonálódása alap- és gerjesztett állapotban

Az alap- és gerjesztett állapotú számításokra a Gaussian 09 programcsomagot használtuk.[50] Az alapállapotú tulajdonságokat DFT[51,52] modellel számítottuk, PBE0 hibrid funkcionált[53] és 6-311++G**[54] bázist alkalmazva. Gerjesztett állapotra idő-függő DFT modellt (TD-DFT) alkalmaztunk ugyanazzal a funkcionállal és bázissal. Az oldószereffektus leírásához kondenzált fázisban mind az alap, mind a gerjesztett állapotban SMD[55] szolvatációs modellt használtunk, ami a PCM modellen alapszik.

A CPCM szolvatációs modellt két közelítéssel alkalmaztunk[56,57] egyensúlyi és nem-egyensúlyi szolvatációt feltételezve: ezek veszik figyelembe, hogy az oldószer molekulának van-e elég ideje a visszarendeződésre.

A vízkomplex szimulálásához az oldószerüregbe egy vízmolekulát helyeztek a kumarin 102 oxo- és aminocsoportjának közvetlen közelébe (implicit-explicit közelítés). Mivel a protonálódási folyamatokban ugyanezek a molekularészek vesznek részt, a protonált kumarinokra történő számítások is ezt a két lehetőséget vették figyelembe.

A számításokból nyert hullámszám-oszcillátor erősség párok felhasználásával spektrumot szimuláltunk, melynek menetét a Függelékben foglaltam össze.

III.5.2. 4'-N,N-dietilamino-3-hidroxiflavon fotofizikai tulajdonságai vizes közegben, komplexképző tulajdonsága aceton-víz elegyben

A FET-oldószer komplexek egyensúlyi geometriáját kvantumkémiai számításokkal határoztuk meg, négy modellt feltételezve: az izolált molekulára, a FET-aceton komplexre, a FET-vízkomplexre valamint a FET-víz-aceton hármas komplexre. Először konformációanalízist végeztünk Marvin programcsomaggal,[58] mely MMFF erőteret használ.[59] A stabil konformerek közül azokat vettük figyelembe, melyeknek energiája a legstabilabb konformeréhez viszonyítva legfeljebb 8 kJ/mol-lal tért el. Ezen konformerek geometriáját optimalizáltuk DFT modellel, M06-2X hibridfunkcionált[60] és 6-31++G**[61] báziskészletet alkalmazva. Az optimált geometriák alapján meghatároztuk alap- és gerjesztett állapotban az intra- és intermolekuláris hidrogénkötések hosszát, előbbi a szomszédos karbonil- és

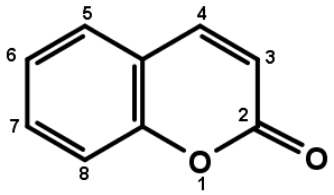
hidroxilcsoport közötti távolság, míg utóbbi az oldószermolekula és a hidroxilcsoport között kialakuló kötés hossza.

IV. A kumarin 102 szolvatációja és protonálódása vizes közegben

IV.1. Irodalmi háttér

IV.1.1. A kumarinok szerkezete és előfordulása

A kumarin (2H-kromén-2-on vagy benzo-α-piron) szerkezetét tekintve egy benzol- és egy piron-gyűrűből áll (15. ábra). Először 1820-ban izolálták tonkababból,[62] neve is innen származik, a francia coumarou szó tonkababot jelent. A tonkabab alkoholos kivonata hamarosan parfümök illatkomponensévé vált és napjainkban is töretlen népszerűségnek örvend.



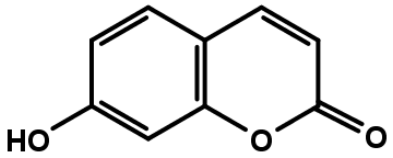
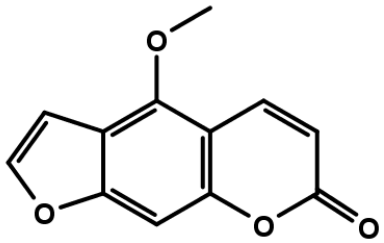
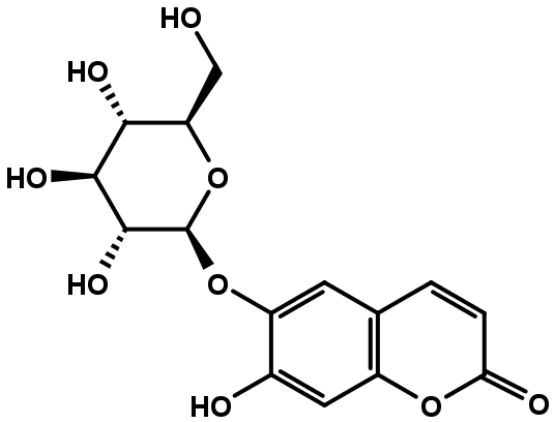
15. ábra: A kumarin szerkezeti képlete és számozása

A kumarinok számos növényben előfordulnak, a zeller-, őszirózsa- és citrusfélék, a pillangós- és ernyősvirágzatúak gyakran tartalmaznak valamilyen kumarinszármazékot. Gyógynövények gyakori komponensei.

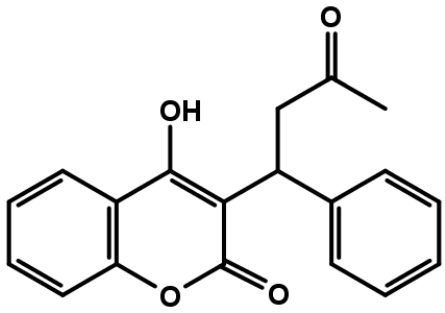
Étvágycsökkentő hatásuk és kesernyés ízük által segítik a növényeket a kártevők elleni védekezésben. Napjainkban rákellenes hatásukat is vizsgálják.[63]

A kaukázusi medvetalpban is megtalálható furanokumarinok fény hatására reagálnak a DNS bázispárjaival, ami súlyos bőrirritációt okoznak (fito-fotodermatitisz).[64] Egyes furanokumarinokat (például pszoralént) fotoszenzibilizátorként bőrbetegségek (vitiligo,[65] pikkelysömör,[66] rák[67]) kezelésére helyileg alkalmaznak. A módszert gyakran a PUVA mozaikszóval rövidítik (psoralen + UV-A),[68] habár a fotoszenzibilizátor gyakran a pszoralén valamilyen származéka (metoxalén, bergaptén). Fontos különbség a fotodinámiás terápiával összevetve, hogy a PUVA-terápiánál fény hatására mérgező vegyület jön létre. Néhány természetben is előforduló kumarinszármazék szerkezete és előfordulása a 1. táblázatban található.

1. táblázat: néhány természetben előforduló kumarin származék

szerkezet	név	előfordulás
	umbelliferon	répafélék, orvosi angyalgyökér, koriander
	bergaptén	bergamott, keserű narancs
	eszkulin	vadgesztenye kérge, gyökere

A hazánkban is honos orvosi somkóró is tartalmaz kumarint, mely a növény gombás fertőzése esetén dikumarollá alakul.[69] Ez utóbbi K-vitamin antagonista, így általánosságban óvatosságra intenek a kumarinszármazékok fogyasztásával kapcsolatban, mivel a legtöbb származék rendelkezik kisebb-nagyobb mértékben antikoaguláns hatással. A kumarinnak gyógyászatban ismert származéka a warfarin (16. ábra), melyet vérhígítóként alkalmaznak.



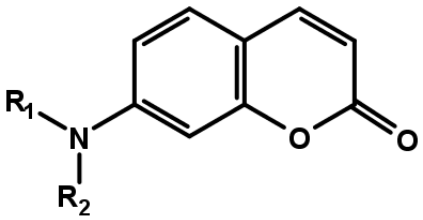
16. ábra: A warfarin szerkezeti képlete

A difenakum[70], brodifakum[71] és bromadiolon[72] rágcsálóirtók szintén kumarinszármazékok, a warfarinhoz hasonlóan gátolják a véralvadást (ezeket a szakirodalom *superwarfarin* néven is említi).

IV.1.2. 7-aminokumarinok fluoreszcens viselkedése

Habár sok természetes kumarin fluoreszkál, spektroszkópiai szempontból sokkal izgalmasabbak az elektrondonor-csoporttal szubsztituált származékok.[73] A kumarinváz karbonilcsoportja elektron-akceptor, így a kumarinból elektronküldő-csoporttal történő szubsztitúció hatására egy CT-típusú szerkezet alakul ki. Ezen a módon a természetes kumarinokkal összehasonlítva a mikrokörnyezetre sokkal érzékenyebb jelzőanyagok állíthatók elő. A leggyakoribb elektrondonor-csoportok közé soroljuk az aminocsoportot. Kísérletek azt mutatták, hogy a 6-os helyzetben amino-szubsztituált kumarinok a 7-aminokumarinokkal összevetve gyengébben fluoreszkálnak és az emissziós sáv a vörös irányba tolódik.[74,75] A 3-as és 4-es helyzetben elektron-akceptorral szubsztituált származékok (-CN, $-CF_3$) tovább erősítik a töltésszeparációt gerjesztett állapotban, ezeknél a vegyületeknél a poláris oldószerek okozta fluoreszcencia-kioltás látványosabb.[76]

A 7-aminokumarin vegyületcsaládot (17. ábra) régóta alkalmazzák fluoreszcens jelzőmolekulaként. A szakirodalom számos példát hoz arra vonatkozóan, miként alkalmazták sejtekben illetve szövetekben a vegyületcsalád egyes tagjait magukban,[77] illetve célirányosan fehérjéhez kapcsolva. A 7-aminokumarinok között számos, általánosan ismert lézerfesték van, amelyek az UV, a kék, vagy a zöld tartományban emittálnak.



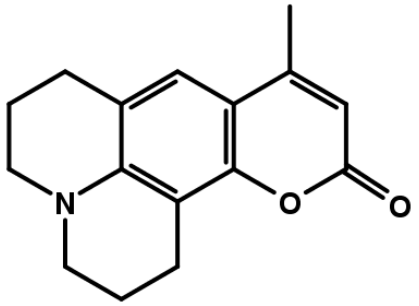
17. ábra: A 7-aminokumarinok általános szerkezete

Az aminokumarinok $S_0 \rightarrow S_1$ gerjesztése töltés-transzfer karakterű, ennek köszönhetően nagyon érzékeny a lokális környezet polaritására. Emellett karbonil- és aminocsoportjuk hidrogénhidas kötést alakíthat ki akceptorként, így a közeg protikusságára is érzékeny. Az aminocsoport szabad rotációja esetén a fluoreszcencia-kvantumhatásfok erősen függ az oldószer polaritásától és protikus jellegétől, amire a legelfogadottabb magyarázat a TICT mechanizmus.[78]

A 7-aminokumarinok protolitikus egyensúlyainak vizsgálata elhanyagolt része a szakirodalomnak, melynek oka abban keresendő, hogy ezeknek a vegyületeknek a pK_a értéke az erősen savas tartományba esik, így biológiai minták esetében nem kell számolni protolízissel. Ami a gerjesztett állapotú viselkedésüket illeti, már a 70-es évek elején bebizonyították, hogy savas közegben gerjesztett állapotban képesek protont felvenni,[79] melyet egy különleges exciplex komplexnek megfelelően írtak le.

IV.1.3. A kumarin 102 spektroszkópiai tulajdonságai

Kísérleteim során zömmel a kumarin 102-vel dolgoztam (18. ábra), mely az egyik legnépszerűbb, legtöbbet vizsgált kumarinszármazék.



18. ábra: A C102 szerkezeti képlete

A C102 aminocsoportja merevített, ezáltal a C-N kötés körüli rotáció gátolt. Ez megakadályozza a gerjesztett állapotú csavart intramolekuláris töltésátviteli (TICT) állapot kialakulását, ami a nem-rögzített aminocsoportos kumarinok fő fluoreszcencia - dezaktiválódási csatornája. Az aminocsoport rögzítésének köszönhetően a legtöbb közegben a C102-nek nagy a fluoreszcencia-hatásfoka.

Gyenge bázis, csak erősen savas közegben protonálódik, ami alkalmassá teszi próbavegyületként való használatát lokális savasság vizsgálatára protontranszfer-membránok kutatásában.[80,81]

A C102 karbonil, ill. aminocsoportja révén protikus oldószerekkel hidrogénhidakat képez. Szerves oldószerekben, az abszorpciós és a fluoreszcencia sáv változása a Kamlet-Taft

paraméter függvényében azt mutatta, hogy a C102 sokkal erősebb hidrogén-kötés akceptor S_1 gerjesztett állapotban, mint alapállapotban.[82]

Alifás alkoholok,[83] fenol[84] jelenlétében a fluoreszcenciasáv sokkal erősebb vörös irányú eltolódást mutat, mint az abszorpciós sáv, a fluoreszcencia-lecsengési görbén feltöltődési szakasz figyelhető meg, ami az oldószer-oldott anyag komplex stabilitásának növekedésével magyarázható. Időfelbontásos rezgési spektroszkópiai kísérletek a C102 fenol,[85,86] anilin[87] és vízkomplexénél[88] azt mutatta, hogy a gerjesztést követően pár száz fs alatt felhasad a hidrogénkötés. Elméleti számítások látszólag ennek ellentmondtak, mert a hidrogénhíd erősödését valószínűsítették a gerjesztést követően.[89,90,91]

1979-ben Campillo és munkatársai cikkükben beszámoltak arról,[92] hogy a kumarin 102-t erős lézerfénnyel besugározva protontranszfer (ESPT) történik. Ez a jelenség a vegyületet alkalmassá teheti gyors pH-változások kivitelezésére, mint bázikus pH ugrásra alkalmasnak tűnő vegyületet. Hasonló megfigyelést írtak le etanolban.[93] A jelenség a protonált forma emisszióján detektált fluoreszcencia-lecsengési görbén figyelhető meg.

A C102-őt széleskörűen használják modell-hatóanyagként fehérje-hatóanyag kölcsönhatársok tanulmányozására,[94,95] tesztanyagként gyógyszerhordozó rendszerekben (micellák,[96,97] liposzómák,[98] mikrokapszulák[99]). A DNS-lánchoz kapcsolva tanulmányozható annak belső dinamikája.[100,101] Hosszú fluoreszcencia-élettartama miatt anizotrópia kísérletek kedvelt próbavegyülete.[102]

Célkitűzés

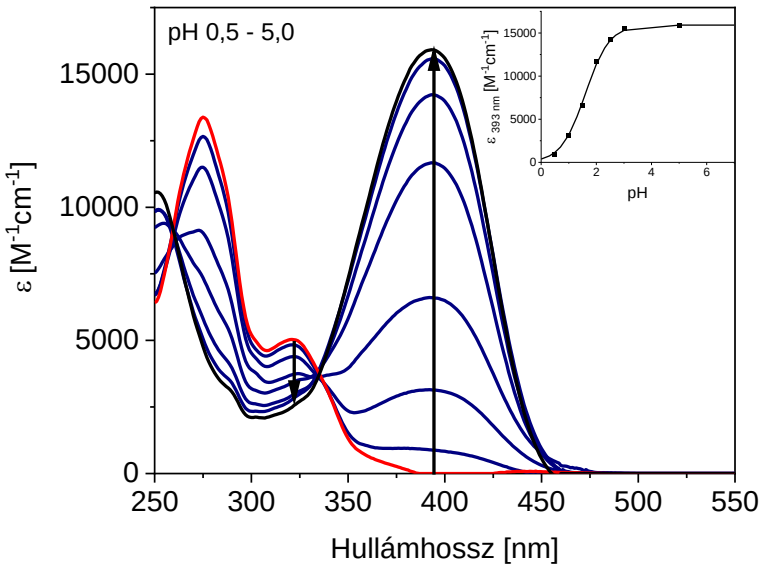
Bár a fenti alkalmazások jelentős részében a C102-t vizes közegben, vagy víztartalmú heterogén rendszerben használják, alig található az irodalomban olyan tanulmány, ami vizes oldatban vizsgálta volna a vegyület fotofizikai tulajdonságait, melynek oka a kis vízoldhatósága lehet. Kutatómunkám során a C102 vegyület abszorpciós és emissziós tulajdonságait vizsgáltam vizes közegben, különböző pH értékeken. Az alap és gerjesztett állapotú tulajdonságok megértését kvantumkémiai számítások segítették. Célom az volt, hogy elősegítsem a C102 fluoreszcens jelzőanyag alkalmazásait vizes rendszerekben, kiterjesztve az alkalmazásokat savas környezetekre is.

IV.2. Eredmények és értékelésük

A következő fejezet alapjául a *Solvation and protonation of Coumarin 102 in aqueous media – a fluorescence spectroscopic and theoretical study* című közlemény szolgál.[103]

IV.2.1. Alapállapotú savi disszociációs állandó meghatározása

Az alapállapotú savi disszociációs állandó meghatározása spektrofotométerrel történt. A kísérleteket 0,5 – 5,0 pH tartományba eső oldatokkal végeztem. Az 5-ös pH-jú oldat desztillált vizes oldat volt, amelyet a levegőből beoldódott CO_2 tett savassá (l. III.3.1. fejezet). A 19. ábrán látható spektrumsorozaton piros illetve fekete színnel jelzett spektrumok a tiszta protonált illetve deprotonált kumarin spektrumai, amelyek az illesztés eredményét mutatják. Az illesztés eredményeként kapott protonálódási állandó értéke K_{pr}=40,5 M^{-1} (pK_a=1,61).



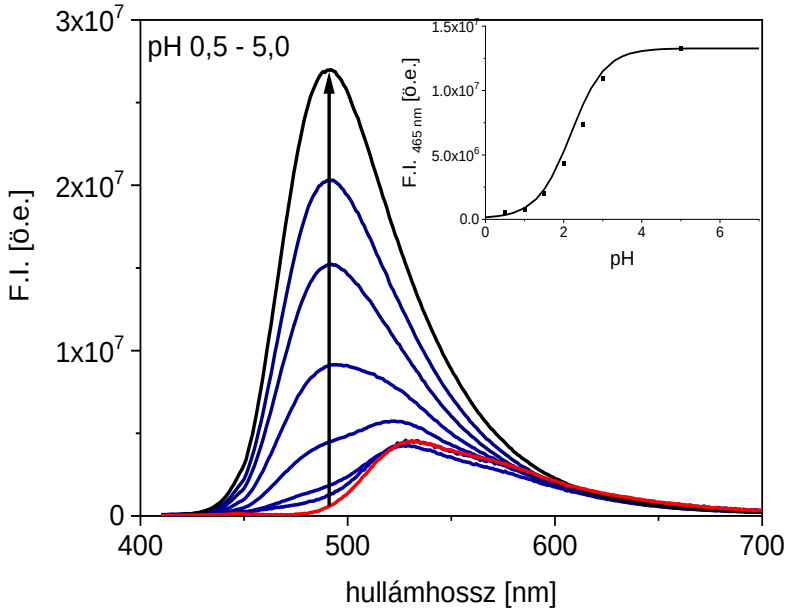
19. ábra: A kumarin 102 vegyület abszorpciós spektruma különböző pH-értékeken (pH=0,5 - 5,0 c_{C102}=2,7 · 10^{-6} M) piros és fekete színnel jelölve az illesztésből nyert protonált és deprotonált forma spektruma

A semleges forma abszorpciós maximuma 393 nm-en, a protonált formáé 321 nm-en jelent meg.

IV.2.2. A savi disszociációs állandó meghatározása a fluoreszcencia-színképekből

A gerjesztett állapot savi disszociációs állandóját először stacionárius fluoreszcencia-méréssel határoztam meg. A spektrumokat 388 nm-es gerjesztési hullámhosszt alkalmazva vettem fel, ahol csak a semleges forma nyel el. Az 20. ábrán látható emissziós spektrumokat normáltam a gerjesztési hullámhosszhoz tartozó abszorbancia értékkel, valamint korrigáltam a belső szűrő hatást (27 egyenlet).

A spektrumsorozaton jól kivehető, hogy a pH csökkenésével megjelenik a nagyobb hullámhosszú tartományban (532 nm) egy másik sáv, ami a protonált formához rendelhető. A piros szín itt is a tiszta protonált forma emissziós spektrumát jelöli, míg a fekete a semleges formáé. Az illesztés eredményeként kapott protonálódási állandó értéke $K_{pr,F}$=155 M^{-1} (p$K_{a,F}$=2,19).



20. ábra: A kumarin 102 vegyület emissziós spektruma különböző pH-értékeken (pH=0,5 - 5, c_{C102}=2,7 · 10^{-6} M, λ_{ex}=388 nm), piros és fekete színnel jelölve az illesztésből nyert protonált és deprotonált forma spektruma

Összevetve az alap és gerjesztett állapotú protonálódási állandókat (K_{pr}=40,5 M^{-1} és K_{pr}*=155 M^{-1}) kijelenthető, hogy az alapállapotú molekula savasabb környezetben képes protonálódni, mint a gerjesztett állapotú molekula, habár a pK_a és p$K_{a,F}$ különbsége kevesebb, mint 1 egység.

Mindazonáltal mind a protonált, mind a semleges forma fluoreszkál, ami lehetőséget ad arra, hogy a vegyületet fluoreszcens pH-indikátorként alkalmazzák savas környezetben.

A protonált forma spektrális jellemzőit a spektrumsorozat kiértékeléséből kaptuk meg, így a speciesz fluoreszcencia kvantumhatásfokát is. A két forma spektrális jellemzőit a 2. táblázat tartalmazza. (A fejezet következő részében táblázatokban, reakciósémákban, kinetikai egyenletekben a C102-re használom a „C” rövidítést.)

2. táblázat: A kumarin 102 protonált és semleges formáinak spektrális jellemzői vizes oldatban

speciesz	λ^{abs}_{max} [nm]	ε_{max} [$M^{-1}cm^{-1}$]	λ^{flu}_{max} [nm]	Φ_f
C	393	16 500	493	0,66[a]
CH+	321	5 000	532	0,14

[a] 104 irodalmi hivatkozás

A vegyület két formájának spektrális jellemzőit összevetve szembetűnő (2. táblázat), hogy a protonált formára jellemző Stokes-eltolódás szokatlanul nagy (12 400 cm^{-1}).

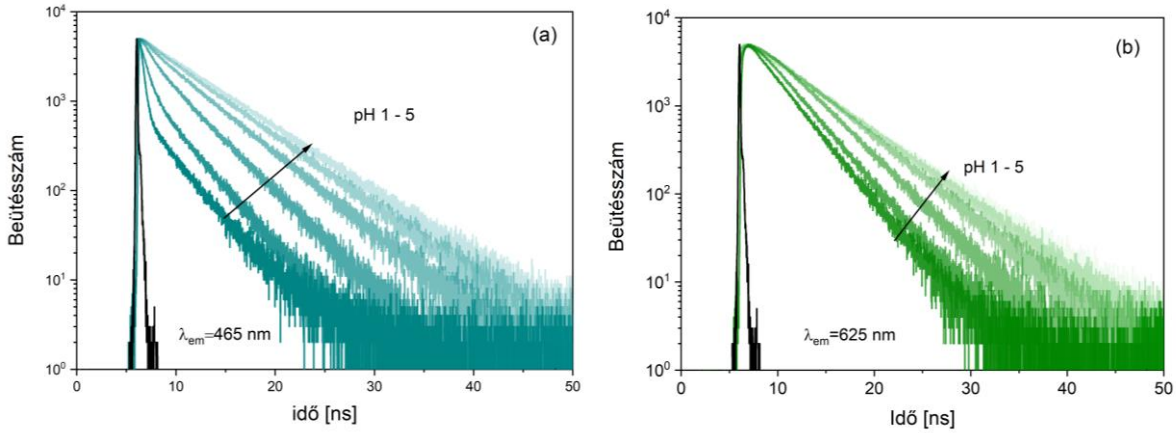
IV.2.3. Időfelbontásos mérések: kinetikai analízis

Fluoreszcencialecsengés savas oldatokban

A gerjesztett molekula és az oldószer közötti sav-bázis egyensúly nem feltétlenül valósul meg, mivel a gerjesztett állapot élettartama rövid (tipikusan 0.5-20 ns közötti), így maximum egy kvázi-egyensúlyról beszélhetünk.[105] Mindazonáltal időfelbontásos fluoreszcencia mérésekkel lehetőségünk nyílt arra, hogy ennek a kvázi-egyensúlynak az időprofilját feltárjuk.

A fluoreszcencia lecsengési időket 0,5-3 pH-jú oldatokban és tiszta vízben mértem. A gerjesztő fényforrás 378 nm-es impulzus diódalézer volt, ezen a hullámhosszon a semleges forma abszorpciója dominál (15. ábra). A két forma moláris abszorpciós koefficiense a gerjesztő lézer hullámhosszán ismert ($\varepsilon^{seml}_{378nm}$ =15 200 $M^{-1}cm^{-1}$ illetve ε^{pr}_{378nm} =190 $M^{-1}cm^{-1}$).

Két detektálási hullámhosszon vettem fel lecsengési görbéket. 465 nm-en csak a semleges forma emittál. A protonált forma szelektív mérésére nem volt lehetőség, mivel fluoreszcenciasávját teljesen lefedi a semleges C102 fluoreszcenciasávja. Mint az a 16. ábrán látható, 625 nm-en a két forma relatív fluoreszcencia-intenzitása összemérhető nagyságú. A minta savasságát növelve a protonált forma fluoreszcenciája válik dominánssá.



21. ábra: A C102 vegyület lecsengési görbéjének pH-függése 465 (a) és 625 nm-es (b) hullámhosszokon detektálva (pH=1 - 5, c_{C102}=2,7 · 10^{-6} M, λ_{ex}=378 nm)

A lecsengési görbék a 21. ábrán láthatók. Értékelésük dekonvolúciós eljárással történt, a lecsengési görbéket exponenciális függvénynek, vagy több exponenciális összegének tekintve. Az illesztéssel kapott időállandókat az egyes pH-értékeken a 3. táblázatba gyűjtöttem össze.

3. táblázat: C102 fluoreszcencia-lecsengési időálladói [ns] savas oldatokban, zárójelben a relatív amplitúdók

pH	0,5	1	1,5	2	2,5	3	semleges
λ_{em}= 465 nm gyors komponens	0,04 (30)	0,4 (41)	0,78 (38)	1,37 (20)	-	-	-
λ_{em}= 465 nm lassú komponens	3,1 (40)	2,96 (52)	3,38 (62)	3,96 (80)	4,83	5,41	5,97
	1,05 (30)	9,7 (7)					
λ_{em}= 625 nm	3,11	3,14	3,39	4,01	5,02	5,55	6,02

A 465 nm-es hullámhossznál detektált lecsengési görbék 2-es pH-érték felett egy exponenciálissal leírhatóak voltak. Savasabb oldatokban a lecsengési görbék két illetve három exponenciális összegének adódtak. A 625 nm-en detektált lecsengési görbék mindegyike a feltöltődési szakaszt követően egy exponenciálissal volt leírható, a lecsengési idők a H^+-ion koncentrációjának növekedésével csökkentek.

A lecsengési adatok kvalitatív értelmezése során az abszorpciós és a fluoreszcencia színképekből meghatározott savi disszociációs állandókból indulhatunk ki: pK_a=1,61;

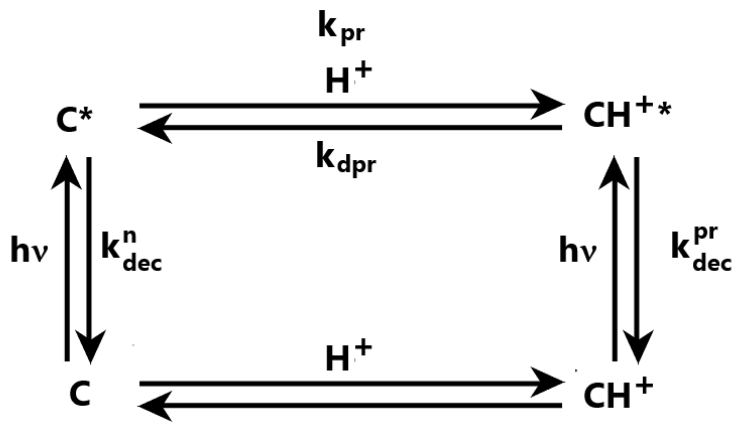
pK_a*=2,19. Ezek alapján az várható, hogy savas oldatokban a kumarin bázist gerjesztve az protonálódik, a pH-tól függő arányban:

$$\mathrm{C} + \mathrm{h}\nu \rightarrow \mathrm{C}^{*} + \mathrm{H}^{+} \rightarrow \mathrm{CH}^{+*} \qquad (50)$$

Ezzel összhangban, a 465 nm-es detektálási hullámhosszon (ahol kizárólag a semleges molekula emisszióját várjuk) felvett lecsengési görbék kezdeti szakaszán egy gyors lecsengésű szakaszt található, míg a 625 nm-en detektált lecsengési görbéken (ahol a protonált forma emissziója dominál) egy feltöltődési szakasz figyelhető meg (17. ábra).

A 465 nm-es görbék lassú komponenseinek időállandói közel estek a 625 nm-en mért lecsengési idők értékeihez. Ez azt mutatja, hogy a gerjesztett állapotú semleges és protonált formák koncentrációjának aránya állandóvá vált.

Reakcióséma



22. ábra: A C102 gerjesztésének és protonálódásának reakciósémája

A fluoreszcencia-lecsengési kísérletek eredményeit a 22. ábrán látható séma alapján értelmeztük, amely a vizsgált rendszer gerjesztési és protonálódási folyamatait összegzi.

A semleges, ill. a protonált festék gerjesztését a diódalézer fényimpulzusával a

$$\mathrm{C} + \mathrm{h}\nu \rightarrow \mathrm{C}^{*} \qquad (51)$$

és a

$$\mathrm{CH}^{+} + \mathrm{h}\nu \rightarrow \mathrm{CH}^{+*} \qquad (52)$$

reakcióegyenletek fejezik ki.

A k_{dec}^{n}, k_{dec}^{pr} és k_{pr} sebességi együtthatók értékére a különböző pH-kon mért időállandókból (3. táblázat) következtetni tudunk.

A semleges gerjesztett molekula dezaktiválódását a

$$C^* \rightarrow C\ (+h\nu') \tag{53}$$

egyenlettel írhatjuk fel. A zárójelbe írt $(+h\nu')$ arra utal, hogy a dezaktívációnak több csatornája van: a fluoreszcencia, azaz a ν' frekvenciájú foton emissziója, és a különböző sugárzásmentes folyamatok. A lecsengés kinetikailag I. rendű reakció,

$$-\frac{d[C^*]}{dt} = k_{dec}^{n} \cdot [C^*] \tag{54}$$

A k_{dec}^{n} sebességi együttható a fluoreszcencia-élettartam reciproka a semleges pH-jú oldatokban, amelyekben a protonált festék aránya elhanyagolható. A táblázatban látható, hogy a semleges oldatban a 465 nm és 625 nm emissziós hullámhossznál mért élettartamok jól egyeznek, a $\tau_F^n = 6{,}00\ ns$ átlagértékből $k_{dec}^{n} = 1{,}67 \cdot 10^8\ s^{-1}$ adódik.
A protonált gerjesztett állapotú speciesz dezaktivációját analóg módon írhatjuk fel,

$$CH^{+*} \rightarrow CH^{+}\ (+h\nu'') \tag{55}$$

Ez a folyamat is első rendű kinetikával írható le:

$$-\frac{d[CH^{+*}]}{dt} = k_{dec}^{pr} \cdot [CH^{+*}] \tag{56}$$

k_{dec}^{pr} közelítő értékét megkapjuk a legsavasabb mintáról felvett, 625 nm-en detektált lecsengési görbéből. Bár ezen a hullámhosszon a kumarin semleges és a protonált formája is emittál, az erősen savas oldatban a protonált forma dominál, ezért a τ=3,11 ns-os fluoreszcencia-élettartam reciprokaként k_{dec}^{pr}~ $3{,}22 \cdot 10^8\ s^{-1}$.
A gerjesztett állapotú semleges molekula protonfelvétele

$$C^* + H^+ \rightarrow CH^{+*} \tag{57}$$

másodrendű kinetikával jellemezhető. A reakció sebessége:

$$-\frac{d[C^*]}{dt} = k_{pr}[C^*] \cdot [H^+] \approx k'_{pr}[C^*] \tag{58}$$

(59) így kifejezi, hogy a sav nagy feleslege miatt a reakció kvázi-elsőrendűnek tekinthető. A gerjesztett kumarin protonálódását a savas oldatokban felvett lecsengési görbék gyorsabb komponense követi, azaz $k'_{pr} = 1/\tau_{465nm}^{gyors}$. Így a k_{pr} sebességi együttható kiszámítható a τ_{465nm}^{gyors} időállandóból és a minta pH-jából:

$$k_{pr} = \frac{k'_{pr}}{[H^+]} = \frac{1}{\tau_{465nm}^{gyors} \cdot [H^+]} \quad (59)$$

Az egyes mintákra meghatároztam a protonálódási sebességi együtthatókat. Az eredmények szórása nagy volt, k_{pr} $3 \cdot 10^{-10}$ és $8 \cdot 10^{-10}$ $M^{-1}s^{-1}$ közé esett, az átlagos érték $k_{pr} \sim 5 \cdot 10^{-10}$ $M^{-1}s^{-1}$ volt.

A gerjesztett állapotú deprotonálódás

$$CH^{+*} \rightarrow C^* + H^+ \quad (60)$$

első rendű reakció,

$$-\frac{d[CH^{+*}]}{dt} = k_{dpr}[CH^{+*}] \quad (61)$$

A sebességi állandó, k_{dpr} meghatározásához nem elegendő az egyes lecsengési görbék szelektív értékelése. A hiányzó sebességi állandót azonban meghatározhatjuk, és a másik három sebességi állandó értékére is pontosabb eredményt kapunk, ha a lecsengési görbéket nem külön-külön, hanem együtt kezeljük. A lecsengési görbék komplex értékelése globális illesztéssel történt, amely magában foglalta a különböző hullámhosszakon és pH értékeken mért lecsengési görbéket.

A sebességi együtthatók számítása globális illesztéssel

Az illesztéshez a 465 és 625 nm-en mért intenzitásokat összehasonlíthatóvá tettük, kompenzálva az egyfotonszámláló detektor eltérő érzékenységét a két hullámhosszon. Továbbá, a 625 nm-en felvett lecsengési görbét felbontottuk C^* és CH^{+*} jelére. (465 nm-en csak C* fluoreszkál.)

Mindezt úgy értük el, hogy a lecsengési görbék felvétele minden esetben azonos intenzitású lézerfénnyel történt, és az adatgyűjtést azonos beütésszámig (10000 beütés a legterheltebb csatornán) végeztük.

A fenti feltételek mellett a lecsengési görbék

$$I_{465}^{mért}(t) = \beta_{465} I_{465}^{n}(t) \quad (62)$$

és

$$I_{625}^{mért}(t) = \beta_{625}\left[I_{625}^{n}(t) + I_{625}^{pr}(t)\right] \quad (63)$$

formában írhatók fel, ahol

$I_\lambda^n(t)$, ill. $I_\lambda^{pr}(t)$ a semleges, ill. a protonált forma járuléka a λ hullámhosszon detektált lecsengési görbéhez,

β_λ az egyfoton-számláló detektorának érzékenysége λ hullámhosszon.

A semleges formából származó intenzitások időbeli lefutása hasonló a két hullámhosszon, arányos változásuk az

$$I_{625}^n(t) = I_{465}^n(t)\frac{I_{625}^{n,st}}{I_{465}^{n,st}}\frac{t_{625}^{gy}}{t_{465}^{gy}} \tag{64}$$

összefüggéssel adható meg, amelyben

$I_\lambda^{n,st}$ a stacionárius spektrum intenzitása adott hullámhosszon

t_λ^{gy} az adatgyűjtés ideje λ detektálási hullámhosszon

Ezt követte az illesztés, amelynek során kiszámítottuk a két gerjesztett forma koncentrációjának időprofilját. Az illesztést az eredeti (konvolvált) lecsengési görbékre végeztük. A (51) és (52) gerjesztési folyamatok formailag másodrendű reakciók. Az abszorpció sebességét mikroszkópikus szinten szokták felírni. Így a semleges kumarin, C, abszorpciójának sebességi egyenlete

$$-\frac{d[N_C]}{dt} = \frac{d[N_{C^*}]}{dt} = B[N_C]\rho_\upsilon(t), \tag{65}$$

amelyben

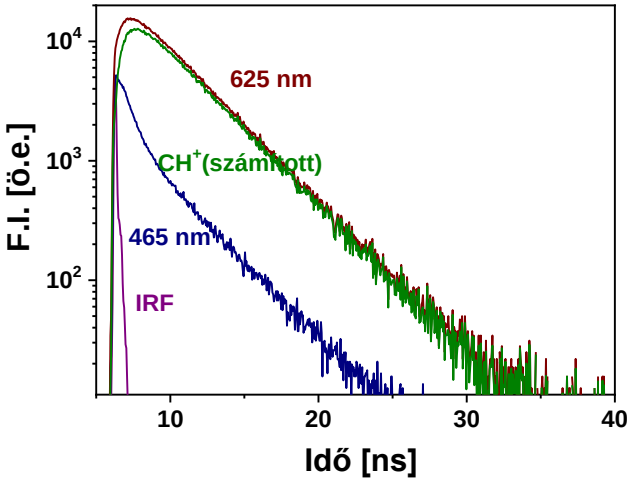
B az abszorpció Einstein-koefficiense,

$[N_C]$ az alapállapotú molekulák száma egységnyi térfogatban,

ρ_υ a fotonok száma egységnyi térfogatban.

A (65) egyenlet paramétereit összekapcsoltuk a makroszkopikus kísérleti adatokkal. A *B* Einstein-koefficiens arányos a moláris abszorpciós koefficienssel.[106] $\frac{[N_C]}{N_A} = [C]$, a semleges kumarin moláris koncentrációja a különböző pH-jú oldatokban, kiszámítható a K_a savas disszociációs állandóból. ρ_υ, a fotonok „koncentrációja" időfüggő, követi a gerjesztő lézerimpulzus időprofilját, amit az IRF-fel közelítettünk.

A gerjesztések fenti módon előállított kinetikai egyenleteiből, a lecsengési folyamatok (54) és (56) kinetikai egyenleteiből, továbbá a protolitikus reakciók (59) és (61) kinetikai egyenleteiből numerikus integrálással kiszámítottuk a $[C^*](t)$ és a $[CH^{+*}](t)$ koncentráció profilokat, és azok összegeként a lecsengési görbéket. A k_{dec}^{pr}, k_{pr} és k_{dpr} sebességi együtthatók voltak az illesztési paraméterek. Mivel a sav koncentrációja nagyságrendekkel nagyobb volt, mint a C102 koncentrációja, a (58) protonálódás is I. rendű reakcióként volt kezelhető.



23. ábra: Fluoreszcencia-lecsengési görbék pH=1,5 oldatban: detektálási hullámhossz 465 nm (kék), detektálási hullámhossz 625 nm (bordó), készülék válaszfüggvény (lila), a protonált C102 számított emissziója 625 nm-en (zöld)

A 23. ábra egy ilyen illesztést mutat be pH=1,5 értéken. A stacionárius úton nyert gerjesztett állapotú savi disszociációs állandó értéke alapján becsülhető, hogy ezen a pH értéken a gerjesztett kumarin molekulák 83%-ban protonált formában vannak jelen. A gerjesztést megelőzően a protonált specieszek mennyisége 56%, tehát 465 nm-en egy gyors komponense van a lecsengési görbének: ez jellemzi a protonálódást. Ezt követi egy lassabb lecsengési szakasz, mely a mérési beállításoknak köszönhetően csak a semleges molekuláktól származhatnak, hiszen a protonált formának ezen a hullámhosszon nincs emissziója. A 625 nm-es detektálási hullámhosszon felvett lecsengési görbén egy rövid felépülő szakasz figyelhető meg, ami a protonálódást jellemzi. A lecsengési szakaszon a protonált és deprotonált forma fluoreszcenciájának eredőjét látjuk, hiszen ezen a detektálási hullámhosszon mindkét speciesz emittál. A sebességi állandók illesztéssel meghatározott értékeit a 4. táblázatban foglaltam össze.

4. táblázat: a kinetikai analízisből nyert sebességi állandók

paraméter	illesztéshez felhasznált pH-tartomány	paraméter értéke
k^{n}_{dec} [s^{-1}]	adalék nélkül, pH~5	$1{,}67 \cdot 10^{8}$
k^{pr}_{dec} [s^{-1}]	1 – 3	$3{,}27 \cdot 10^{8}$
k_{pr} [$M^{-1}s^{-1}$]	1 – 3	$3{,}27 \cdot 10^{10}$
k_{dpr} [s^{-1}]	1 – 3	$2{,}78 \cdot 10^{8}$

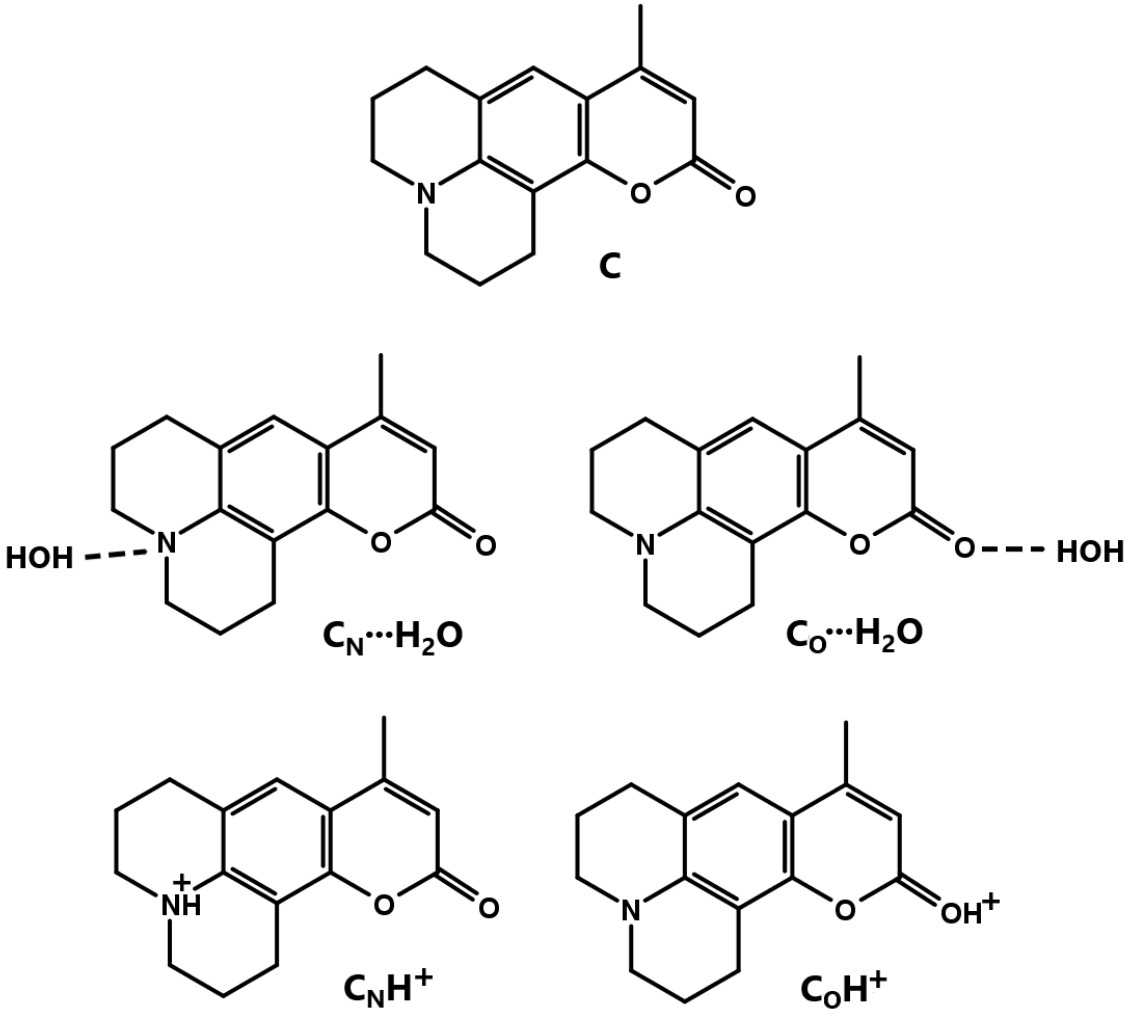
A kinetikai analízisből nyert protonálódási és deprotonálódási sebességi együtthatók hányadosa megadja a gerjesztett állapotbeli protonálódás egyensúlyi állandóját, amire így

K_{pr}*=117 M^{-1}-nek adódik. Összevetve a stacionárius fluoreszcencia mérésből kapott értékkel elmondható, hogy jól egyeznek ($K_{pr,F}$=155 M^{-1}). Jobb egyezést már csak azért sem várhatunk a két úton meghatározott értékben, mivel egyensúlyról nem beszélhetünk a gerjesztett állapot rövid időskálája miatt.

IV.3. Kvantumkémiai számítások

IV.3.1. Molekulaszerkezeti modellek

A kísérletekkel párhuzamosan a C102 semleges és protonált formáinak tulajdonságait kvantumkémiai számításokkal is tanulmányoztuk. A számításokhoz a 24. ábrán látható modelleket használtuk. A szolvatált semleges kumarint a karbonil, ill. az aminocsoportokon kötődö C102-víz komplexekkel modelleztük. A protonált festékmolekula protonja is a C102 karbonil, vagy aminocsoportján helyezkedett el.



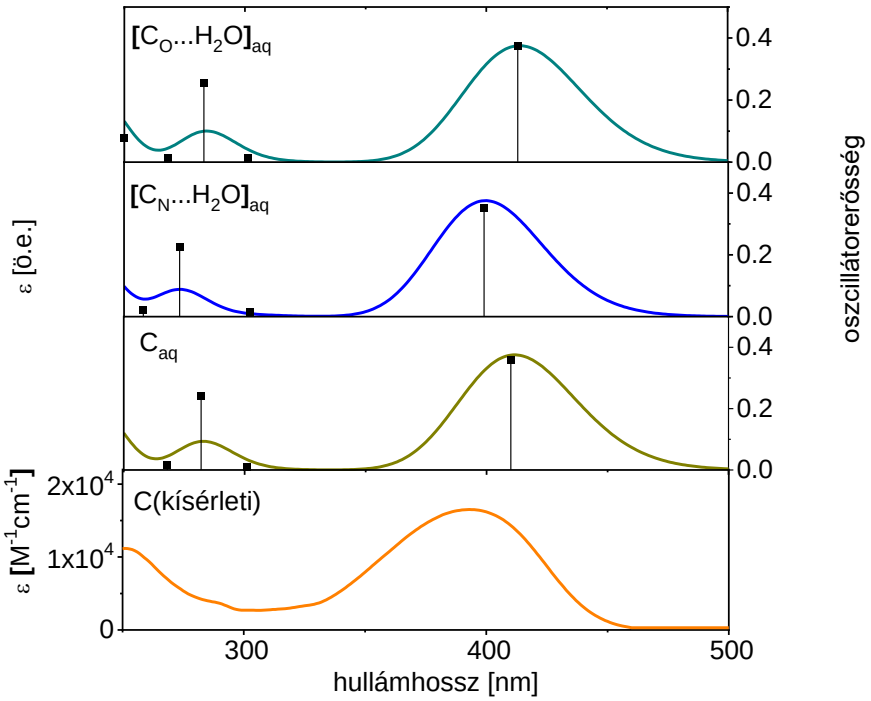
24. ábra: A kumarin 102 vegyület feltételezett vízkomplexei valamint protonált formái

A számításoktól vártunk választ arra a kérdésre is, hogy a protonálódás mely részét érinti a molekulának alap és gerjesztett állapotban. A különböző specieszek optimált geometriái közel planárisak alap és gerjesztett állapotban egyaránt. Jelentős különbség a vízkomplexek esetében a H-kötés hosszában van. A számítások azt mutatták, hogy alapállapotban az amino-

komplexben ez a kötés hosszabb (2,050 Å), mint az oxo-komplex esetében (1,808 Å), és míg gerjesztett állapotban az előbbi kötés felszakad, utóbbiban a kötéstávolság rövidül (1,756 Å), a kötés erősebb lesz.

IV.3.2. A semleges molekula és vízkomplexeinek számított spektrumai

A 25. ábrán a semleges molekula kísérleti és számított abszorpciós spektrumai láthatóak. Az oxigénen kötött és nitrogénen kötött vízkomplexek spektrumai implicit-explicit szolvatációs eljárással számoltuk. Alatta a szabad semleges molekula spektruma implicit szolvatációs módszerrel számolva, végül a kísérleti spektrum látható.

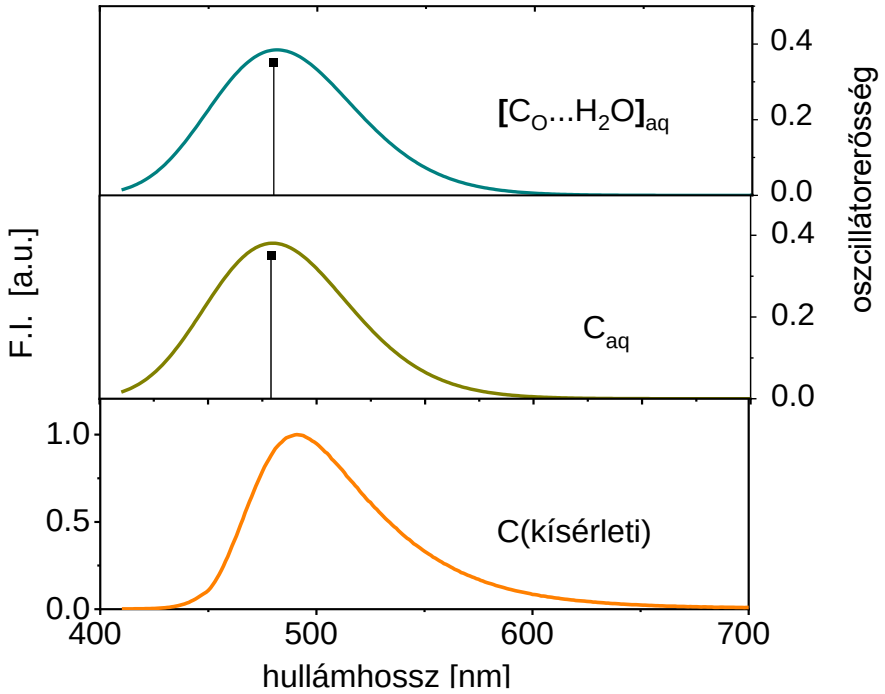


25. ábra: A semleges molekula abszorpciós spektruma vizes oldatban és számított abszorpciós spektrumai

A keletkező vízkomplex kísérleti meghatározására, kimutatására nem volt lehetőség, mivel a számítások azt mutatták, hogy a komplexképződés egyensúlyi állandója kicsi ehhez $\Delta_r G^0_{aq.complex} = 1{,}6\ \mathrm{kcal/mol}$ (~80%-ban a C102 vízkomplexként van jelen az oldatban). Ezen túl, az 5. táblázat a szabad festék és az oxo-komplex számított adatait összevetve látható, hogy az oxo-komplex elnyelési maximuma 414 nm-en jelentkezik, a szabad festéké 412 nm-en (hasonló oszcillátor erőségekkel), tehát a két forma elnyelése nagymértékben átfed egymással.

A három speciesz számított $S_0 \rightarrow S_1$ elektronátmenete közel esik, és habár a kísérleti adathoz a nitrogénen kötött vízkomplex esik legközelebb, a H-kötés erőssége mégis az oxo-komplex létezését igazolta alapállapotban.

A 26. ábrán a számított és kísérleti fluoreszcenciaspektrumok láthatóak.

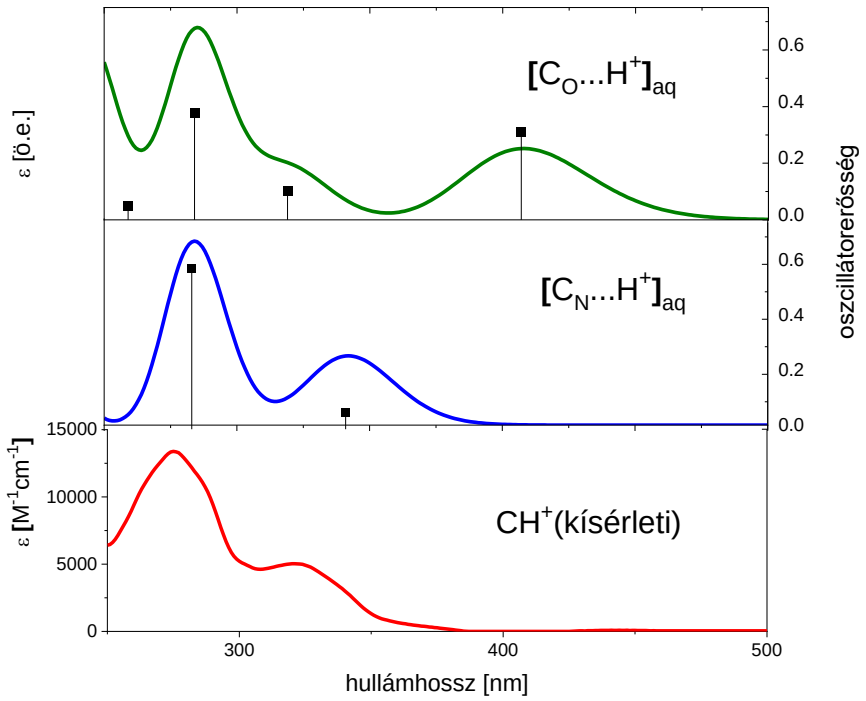


26. ábra: A semleges molekula számított és kísérleti emissziós spektrumai

Ahogy a fejezet elején említettem, a számítások azt mutatták, hogy gerjesztett állapotban az amino-komplex nem valószínű, gerjesztett állapotban leadja a komplex a felvett vízmolekulát. Ennek megfelelően a gerjesztett állapotban csak az oxo-komplex esetében sikerült számítani a spektrumot. A számított egyensúlyi állandó és a H-kötés hosszának lecsökkenése azt mutatja, hogy gerjesztett állapotban a komplex stabilabb, ami egybecseng a korábbi eredményekkel.[107]

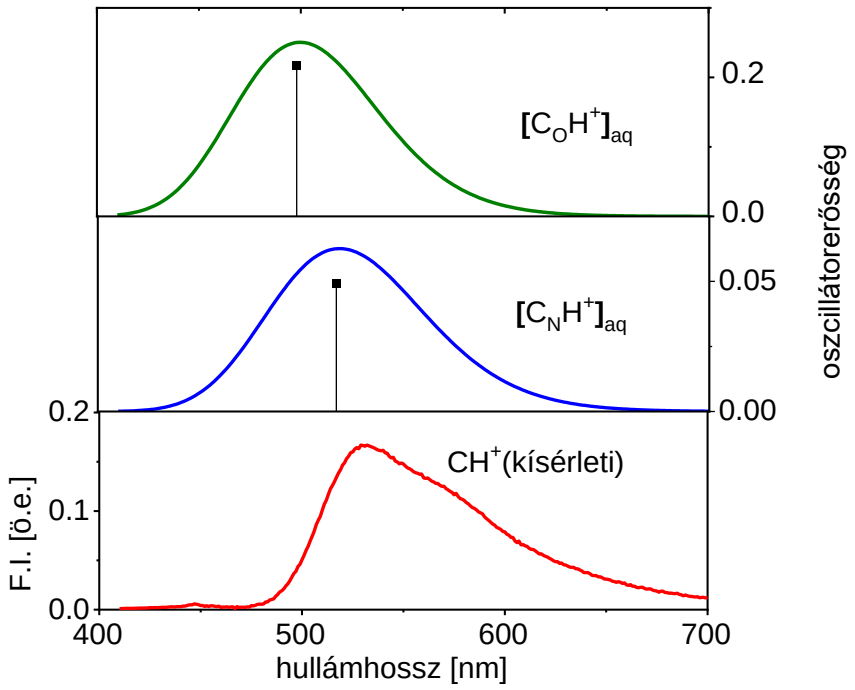
IV.3.3. A protonált forma számított spektrumai

A protonált forma kísérleti és számított abszorpciós spektrumait összevetve látszik, hogy alapállapotban az aminocsoporton valószínű a protonálódás (27. ábra). Az $S_0 \rightarrow S_1$ átmenethez rendelhető hullámhossz kísérleti értéke 321 nm, míg a nitrogénen protonált specieszre számított átmenet hullámhossza 342 nm (az oxigénen protonált forma átmenetére számított hullámhosszérték 408 nm, a kísérleti értéktől távol esik). A $[C_N \cdots H_2O]_{aq}$ számított oszcillátorerőssége (f=0,062) is arra utal, hogy a protonálódás az aminocsoporton történik. A kísérleti spektrumban ennek a sávnak a moláris abszorpciós koefficiense viszonylag kis érték (ε=5 000 $M^{-1}cm^{-1}$).



27. ábra: A protonált forma számított és kísérleti abszorpciós spektrumai

A kísérleti emissziós spektrumokban a protonált forma sávmaximuma 532 nm-re esik (28. ábra). A számítások szerint az oxigénen protonált forma emissziója 500 nm-nél van (*f*=0,217), míg a nitrogénen protonált formáé 519 nm-nél (*f*=0,049).



28. ábra: A protonált forma számított és kísérleti emissziós spektrumai

A kísérleti és számított értékeket az 5. táblázatban gyűjtöttem össze.

5. táblázat: a C102 vegyület semleges és protonált specieszeinek kísérleti és számított spektroszkópiai jellemzői

kísérleti értékek					számított értékek				
speciesz	λ^{abs}_{max} [nm]	ε_{max} [$M^{-1}cm^{-1}$]	λ^{flu}_{max} [nm]	Φ_f	speciesz	λ^{abs}_{max} [nm]	f_{abs}	λ^{flu}_{max} [nm]	f_{flu}
C	393	16 500	493	0,66	C	412	0,359	480	0,352
					$C_N \cdots H_2O$	400	0,535		
					$C_O \cdots H_2O$	414	0,375	481	0,352
CH+	321	5 000	532	0,14	C_NH^+	342	0,062	519	0,049
					C_OH^+	408	0,31	500	0,217

A számítások alapján valószínűsíthető, hogy alapállapotban az molekulák többsége vízkomplex formában van jelen, mely karbonilcsoporton kötött vízkomplex. Gerjesztett állapotban ez a komplex elbomlik.

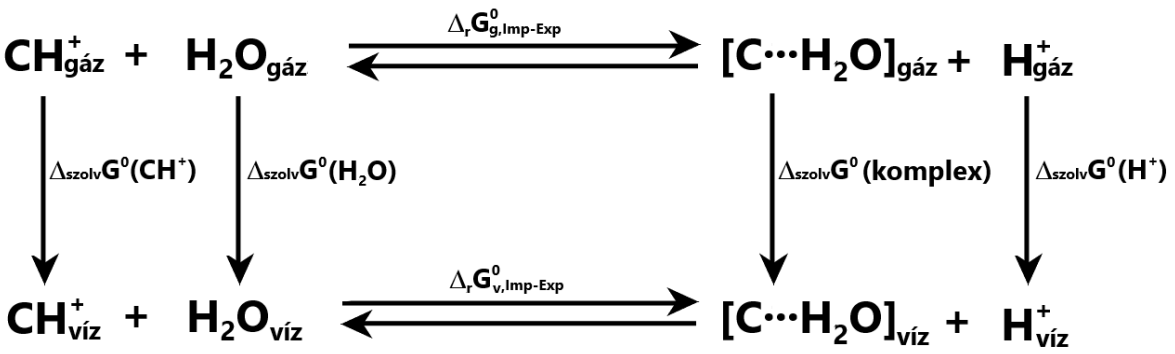
IV.3.4. A savi disszociációs állandók meghatározása számításos kémiai úton

A gerjesztett állapot kondenzált fázisú folyamatainak (mint például a komplexképződés az oldószer molekulával vagy a protontranszfer) kvantumkémiai modellezése kihívást jelentett, mivel az olyan sajátos specieszek, mint a hidroxónium-ion nem írhatók le implicit szolvatációs megközelítéssel, hanem a molekula-oldószer bonyolultabb kezelését igénylik. Egy lehetséges és gyakran alkalmazott megoldás, hogy a szolvatáció szempontjából fontos oldószer-molekulákat kvantummechanikai szinten kezelik és a kontinuumban képzett molekuláris üreg felépítéséhez is használjak. Ez az implicit-explicit eljárás.

A gerjesztett állapotú komplexképzés és protonálódás számítása két különböző közelítéssel történt: a Förster-ciklussal (l.2. fejezet) és a termodinamikai ciklussal.

pK_a* Förster-ciklusos számításában pK_a kísérleti értékét vettük figyelembe, ezt kombináltuk a semleges és a protonált kumarin számított spektroszkópiai adataival.

A termodinamikai ciklus lényege, hogy a kondenzált fázisú sav-bázis reakciókat jellemző standard szabadentalpia változást elméleti módszerekkel két lépésben számítjuk ún. termodinamikai ciklusokkal (10. ábra). Mivel a szabadentalpiára, mint termodinamikai állapotfüggvényre érvényes a Hess-tétel, megtehetjük, hogy a kondenzált fázisú protonálódási reakcióra a reakcióban részt vevő specieszek ideális gáz fázisában számított szabadentalpia-változását számítjuk ki először, majd ehhez hozzáadva a specieszek szolvatációs szabadentalpiáját fejezzük ki a kondenzált fázisú reakció reakció-szabadentalpiáját. Mivel alapállapotban dominál a vízkomplex, így a 10. ábra a 29. ábra szerint módosul.



29. ábra: A C102 pKa értékének elméleti számítására használt termodinamikai ciklus

6. táblázat: Förster és termodinamikai ciklussal számított pK_a értékeket összefoglaló táblázat

protonálódás helye	oldószer modell	termodinamikai ciklus		Förster ciklus
		pK_a	pK_a*	pK_a*
NH^+	Imp	-1,67	-11,98	-2,16
	Imp-Exp	1,01		
OH^+	Imp	-6,12	-1,28	2,28
	Imp-Exp	-4,88	-0,41	2,06
kísérleti adat		1,61	2,19	

A számításokból kiderült, hogy a gerjesztett állapotban az oxocsoport sokkal bázikusabb, az oxo és amino protonálódás pK_a* értékeiben 10 egység az eltérés. Ennek alapján az alapállapotú C102 az aminocsoporton protonálódik, a gerjesztett állapotú kumarinnak viszont a oxocsoporton protonált formája a stabilabb.

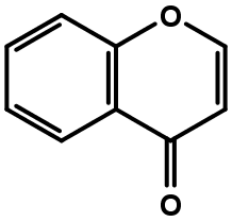
Az alacsony pK_a és pK_a* értékek tehát azt mutatták meg, hogy a protonálódás semleges és enyhén savas közegben nem számottevő, így az esetek túlnyomó többségében farmakokinetikai és biokémiai folyamatok tanulmányozásakor alkalmazható fluoreszcens próbaként.

V. Hidrogénhidas kölcsönhatások: a 4′-dietilamino-3-hidroxiflavon spektroszkópiai tulajdonságai vízben és aceton-víz elegyben

V.1. Irodalmi háttér

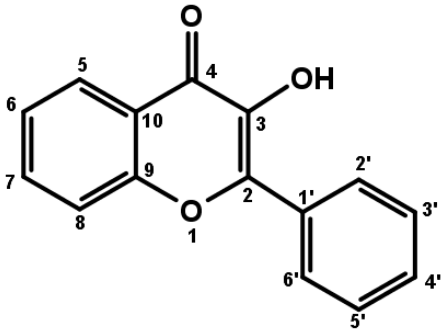
V.1.1. A flavonok szerkezete, előfordulása

A flavonokat felépítő kromon alapváz (30. ábra) a kumarin (15. ábra) izomerének tekinthető, mivel a két vegyület között csupán a karbonilcsoport és kettős kötés helyzetében van eltérés.



30. ábra: A kromon alapváz

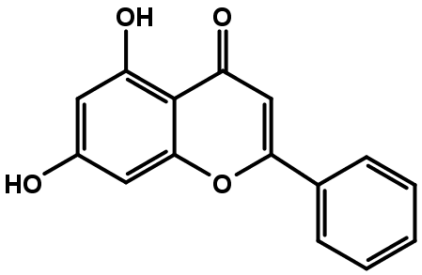
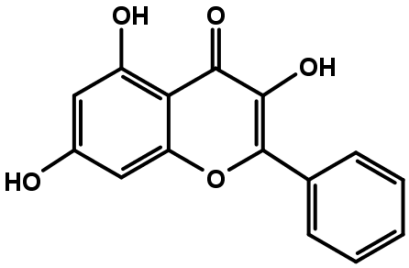
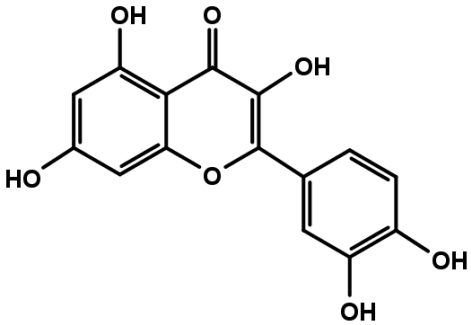
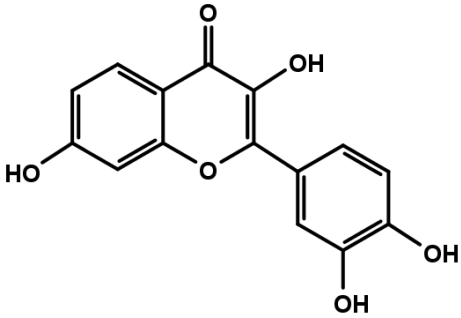
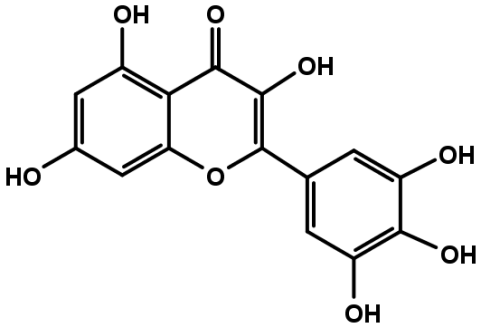
A kromonok és flavonok egymástól egy fenilcsoportban térnek el, (31. ábra, a flavonok kromonvázához a 2-es helyzetben kapcsolódik egy fenilcsoport). Maga a flavon szó a latin flavus szóból ered, melynek jelentése sárga.



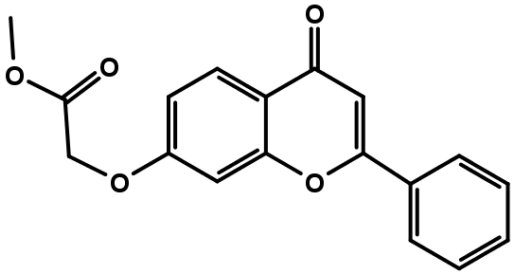
31. ábra: A flavonok vázszámozása

A flavonok és más rokonszerkezetű vegyületek, közös néven flavonoidok a gyógyhatású természetes anyagok fontos csoportja, amelyek szinte minden növényben megtalálhatóak. Legnagyobb mennyiségben a gyümölcsök, zöldségek, és a fűszernövények tartalmazzák őket. Hatékony antioxidánsok, antivirális, rákellenes hatásukról készült tanulmányok sokasága található az irodalomban.[108a-f] Napjainkban táplálékkiegészítőként is árusítják őket. A 7. táblázat néhány természetes flavonszármazékot és azok előfordulását mutatja be.

7. táblázat: Néhány természetes flavonszármazék

szerkezet	név	előfordulás
	krizin	propolisz, golgotavirág, sárgarépa, kamilla
	galangin	propolisz, szalmagyopár
	kvercetin	kapor, leveles kel, lestyán
	fizetin	szamóca, alma, hagyma
	miricetin	paradicsom, narancs, diófélék

A vegyületcsaláddal az orvostudományban is találkozhatunk, az efloxát (32. ábra) értágító gyógyszerek hatóanyaga, szintén flavonvázas vegyület.[109]

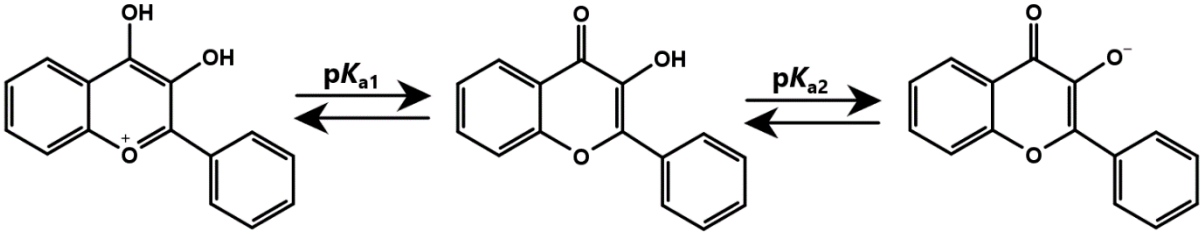


32. ábra: Az efloxát szerkezeti képlete

Különleges fotofizikai tulajdonságai a 3-as és 5-ös helyzetben – a karbonilcsoport közvetlen közelében - szubsztituált hidroxikromonoknak és –flavonoknak vannak, ezek kettős fluoreszcenciát mutatnak.[110,111]

V.1.2. A 3-hidroxiflavonok protolitikus egyensúlyai

A 3-hidroxiflavon (3HF) protonfelvételre és -leadásra is képes, a 33. ábrán látható reakcióegyenletek szerint. Wolfbeis és munkatársai[112] vizes oldatokban felvett abszorpciós és fluoreszcenciaszínképekkel vizsgálták a 3HF protolitikus reakcióit.



33. ábra: A 3HF kationos, semleges és anionos formáinak szerkezete

Az abszorpciós színképekből pK_{a1}= -2,88-at kaptak, tehát a karbonilcsoport csak nagyon savas közegben képes protonálódni. A második savi disszociációs állandó értéke pK_{a2} = 9,6 volt. Az utóbbi értéket a fluoreszcenciaspektrumokból is sikerült meghatározni, és pK_{a2} = 9,8-at kaptak. Az eltérés tehát kicsi az abszorpciós spektrumokból számított értéktől, ami arra utal, hogy a protonfelvétel/leadás lassú a gerjesztett állapot lecsengéséhez képest. Förster-ciklussal becsülve a gerjesztett állapotú savi disszociációs állandó a második egyensúly esetében pK_{a2}^{*}=-1,5, tehát gerjesztett állapotban a 3HF sokkal erősebb sav.[113]

Davila és munkatársai újabb, nagyon gondos kísérletei alapján a 3HF pK_{a2} értéke 8,68.[114] A kísérleti módszer az ő vizsgálataikban is UV-látható spektroszkópia volt, de (a gyenge vízoldhatóságra tekintettel) különböző összetételű víz-acetonitril és víz-etanol elegyekben mértek, és az eredményeket tiszta vízre extrapolálták. Hasonló módon

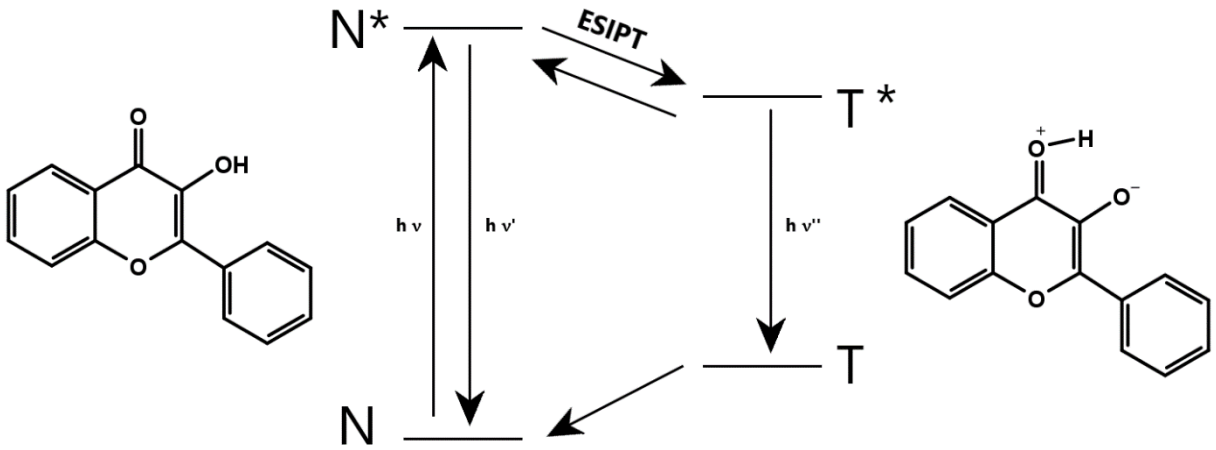
meghatározva, az 5-hidroxiflavon pK_{a2} értéke 7,28, tehát a 3HF savassága gyengébb, mint az 5HF-é.

V.1.3. A 3-hidroxiflavonok fluoreszcens viselkedése

A 3-hidroxiflavonok különleges fluoreszcenciáját és ennek magyarázatát elsőként Sengupta és Kasha jegyezte le.[111] Érdeklődésük először a kvercetinre irányult, vékonyréteg kromatográfiás vizsgálatok során figyeltek fel arra, hogy ez a vegyület sárgászöld emissziót mutat, holott az abszorpciós maximuma 350 nm környékén jelenik meg.

A szokatlanul nagy Stokes-eltolódás magyarázatát keresve a 3HF-el végeztek kísérleteket, mely vegyület a kvercetin (7. táblázat) lecsupaszított váza. Szerves oldószerben a 3HF olyan emissziós spektrumot adott, mely nincs tükörképi viszonyban az abszorpciós sávval (ez utóbbi a vizsgált 2-metilbutánban vibrációs finomszerkezetet mutatott, míg az emissziós sáv nem). Ha az oldatot szobahőmérsékletről 77K-re hűtötték, merőben más volt a vegyület emissziója, alacsonyabb hullámhossztartományban jelentkezett a sávmaximum, a sáv finomszerkezete pedig tükrözte az abszorpciós spektrum alakját. Ennek a kettős fluoreszcenciának a hátterében az ún. ESIPT (excited-state intramolecular proton transfer) jelenség áll (34. ábra). Ennek lényege, hogy gerjesztett állapotban a 3-as helyzetben lévő hidroxilcsoport protonja átugrik a szomszédos oxocsoport oxigénjére. A gerjesztett molekuláknak két alakja van, a normál (N*) és a tautomer (T*) forma. Mindkét forma fluoreszcens, ezért az emissziós spektrumban két sáv jelenik meg.

A 3HF analógjai, amelyek a 2-es helyzetben más aromás szubsztituenst tartalmaznak, a közegtől függően, szintén mutatnak kettős fluoreszcenciát.[115]



34. ábra: A 3HF ESIPT reakciójának fotokémiai ciklusa

Az ESIPT mechanizmusú jelzőmolekulák nagy előnye, hogy mivel két sáv jelentkezik az emissziós spektrumban, így ezek intenzitásának arányából is lehet következtetni a környezet

tulajdonságaira, ami megbízhatóbb eredményt ad, mintha kizárólag egy sáv intenzitásváltozását követnénk (ratiometry, aránymetrikus analízis elve).

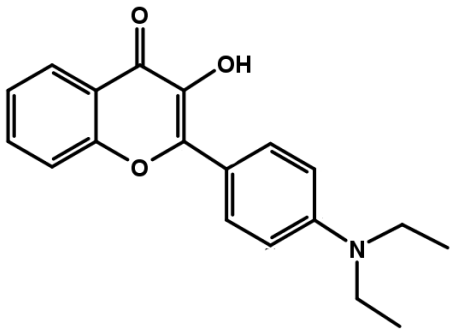
Napjainkig már több száz 3HF-alapú fluoreszcens szenzort konstruáltak. Többségük működése az ESIPT-hez kapcsolódó valamilyen mechanizmuson alapul:[116]

- Az N* és T* gerjesztett izomerek aránya, azaz a két sáv relatív intenzitása függ a lokális környezet polaritásától és hidrogénkötés-donor képességétől.[117] Az effektus többek között fehérjék vizsgálatában használható,[118]
- sok 3HF-vázú fémionszenzort írtak le az irodalomban. Ezekben a 3HF-egység, mint kétfogú ligandum, a C=O és a OH csoporton keresztül koordinálja a fémionokat, ami megakadályozza az ESIPT folyamatot. Így a fémionkoncentráció növelésével a T* izomer aránya visszaszorul,
- a harmadik fő típusban a 3-OH csoporthoz védőcsoportot kapcsolnak, megszüntetve a T* izomer keletkezését. Az analit lehasítja a védőcsoportot, megjelenik a T* sáv.

V.1.4. 4'-dietilamino-3-hidroxiflavon spektroszkópiai tulajdonságai

A 3HF-alapú jelzőanyagok egyik fontos csoportja a 4'-dialkilamino származékok. Gerjesztésüket erős töltéstranszfer kíséri az elektrondonor amino- és az elektronakceptor karbonilcsoport között, azaz nagy a dipólusmomentum-változás, ezért nagy a Stokes-eltolódás. Sok más 3HF származékhoz hasonlóan, képesek az ESIPT-re, továbbá fémionokkal komplexeket képeznek, amelyekben az ESIPT reakció gátolt. Különleges tulajdonságuk, hogy ATP-vel komplexet képeznek.

Kutatócsoportunk a 3HF 4'-dietilamino-szubsztituált (FET) származékát (35. ábra) vizsgálta több aspektusból is, együttműködve Bitter István és Bojtár Márton szerves kémikusokkal.



35. ábra: A FET szerkezeti képlete

Célkitűzés

A kutatások végső célja új fluoreszcens ATP-szenzor kifejlesztése volt, amely 4'-dietilamino-3-hiroxiflavon származék, de amelynek szelektivitása jobb a FET-hez képest egy

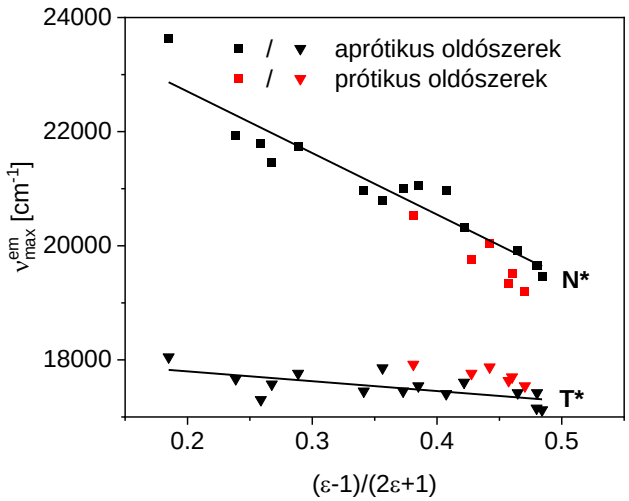
további szubsztituensnek köszönhetően. A témához kapcsolódva tanulmányoztuk a FET fotobomlási reakcióit, amiket a jelzőanyag analitikai és képalkotási alkalmazásaiban figyelembe kell venni. Továbbá, részletesen vizsgáltuk a FET fotofizikai tulajdonságait vizes közegben. A szolvatokróm tulajdonságokról részletes tanulmányok jelentek meg, amelyekben sokféle szerves oldószerben mért spektrumot hasonlítottak össze. [119] A vizes oldatban felvett spektrumokról azonban kevés volt az információ, pedig ezekre szükség volt az ilyen szerkezetű ATP-szenzorok működési mechanizmusának feltárásához, és az új ATP szenzor tervezéséhez.

Mielőtt értekezésemben saját eredményeimre rátérek, a vegyület általános jellemzését valamint lehetséges felhasználási lehetőségeit foglalom össze.

V.I.5. A 4'-dietilamino-3-hidroxiflavon szolvatokromizmusa

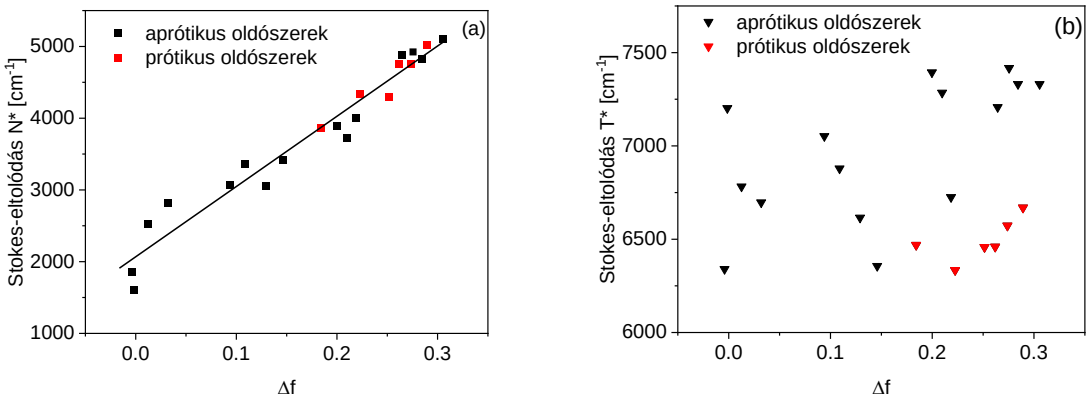
Klymchenko és Demchenko tanulmányukban az általunk is vizsgált FET próbavegyület szolvatokromizmusát írták le.[119] Huszonegy szerves oldószerben vettek fel színképeket, vizes oldattal nem foglalkoztak. Az emissziós spektrumokban rendre két sáv jelent meg, az alacsonyabb hullámhosszú sáv a gerjesztett normál-formához (N*), míg a nagyobb hullámhosszú sáv a gerjesztett tautomer-formához (T*) rendelhető.

Az általános oldószerhatások következményeit a színképekre többféle módon is vizsgálták. Az $f(\varepsilon) = \frac{\varepsilon-1}{2\varepsilon+1}$ polaritás-paraméter ($f(\varepsilon)$) függvényében ábrázolva az N* és T* állapothoz rendelhető sávok maximumát (hullámszámban kifejezve), minden oldószer esetében tapasztalható volt, hogy az N* sáv maximuma a polaritás növekedésével csökken (36. ábra). Ezzel szemben, a T* sáv helyzete nem változott jelentősen az oldószer polaritással.



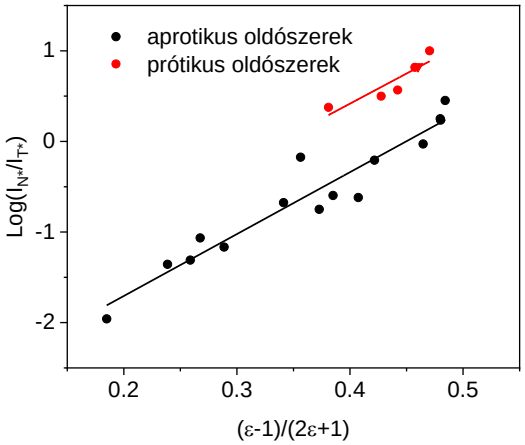
36. ábra: A FET emissziós sávjainak helye a polaritás függvényében (az ábra a 119 hivatkozás alapján készült)

Vizsgálták a Lippert-Mataga-egyenlet érvényességét is (37. ábra). A Stokes-eltolódásokat ábrázolva a Lippert-paraméter függvényében azt találták, hogy az N* sáv maximumából számított Stokes-eltolódás lineárisan változik a Lippert oldószer-paraméterrel, a protikus és aprotikus oldószerekre vonatkozó pontok egy egyenes körül szórnak. Ezzel szemben, a T* sávból számított Stokes-eltolódás nem korrelált Δ*f*-fel.



37. ábra: A FET Stokes-eltolódása a Lippert-paraméter függvényében N* (a) és T* (b) forma esetében (az ábra a 119 irodalom alapján készült)

A FET fluoreszcenciaszínképe a specifikus oldószerhatásokra is érzékeny, mindenekelőtt az oldószer hidrogénkötés-donor/akceptor jellegére. Az N* és T* sávok intenzitásainak aránya (38. ábra), (I_{N*}/I_{T*}) erősen függ *f*(ε)-től, az N* formához rendelhető sáv intenzitása nő a polaritással. A Log(I_N*/I_T*) mennyiséget *f*(ε) függvényében ábrázolva két pontsorozat különül el, a vegyület másként viselkedik aprotikus oldószerekben (amelyek magukban foglalják a H-kötés akceptor oldószereket is), valamint protikus oldószerekben. Protikus oldószerekben csaknem egy nagyságrenddel valószínűbb az N* forma, melynek hátterében a FET karbonilcsoportja és a víz közötti intermolekuláris H-hidas kölcsönhatás áll, mely stabilizálja a N* formát.

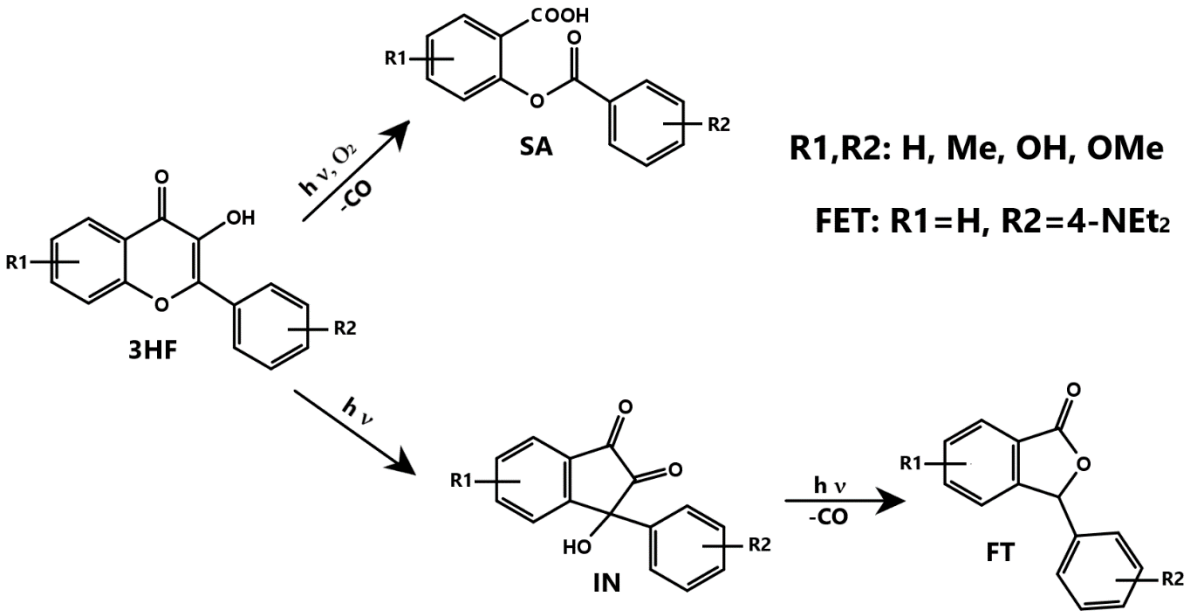


38. ábra: A FET emissziós sávjainak intenzitásaránya a polaritás függvényében (az ábra a 119 hivatkozás alapján készült)

A FET fluoreszcencia-kvantumhatásfoka H-kötés akceptor oldószerekben rendre kisebb, mint a H-kötés donor-oldószerekben. Hidrogénkötést nem képző oldószerek esetében a kvantumhatásfok közepes érték. A H-kötés akceptorok esetében a kvantumhatásfok csökkenése azzal magyarázható, hogy intermolekuláris kölcsönhatás alakul ki a flavon hidroxilcsoportja és az oldószer között, melynek eredményeképp a fenilcsoport kimozdul a kromonváz síkjából. Érdekes módon a fluoreszcencia-kvantumhatásfok értéke független mind a polaritástól, mind a polarizálhatóságtól.

V.1.6. A 4'-dietilamino-3-hidroxiflavon fotooxidációja

A 3HF és több származéka esetében ismert volt, hogy fény hatására irreverzibilis változások történnek a molekulában (oxidáció, illetve átrendeződés). Ekkor háromféle termék képződhet, melyek a 39. ábrán láthatóak. Oxigén jelenlétében O-benzoilszalicilsav (SA) képződik, míg oxigénmentes közegben 3-hidroxi-3-aril-indan-1,2-dion (IN) apoláris, poláris és protikus poláris oldószerekben egyaránt.[120] Néhány IN szénmonoxidot veszítve tovább bomlik 3-aril-ftalidokra (FT).[121]



39. ábra: A 3HF-ek fotooxidációjának lehetséges útjai

Kísérleteink során a FET és Mg^{2+} kelátjának fotooxidációját, ennek kinetikáját és mechanizmusát vizsgáltuk acetonitrilben.[45] Mindkét speciesz UV-sugárzás hatására O-4-dietilamino-benzil-szalicilsavvá oxidálódik.[122]

A magnézium-komplex fotooxidációja jelentősen gyorsabb, mint a szabad festéké. Az abszorpciós spektrumok kinetikai analízise azt mutatta, hogy a gerjesztett állapotú oxidációs folyamat sebességi állandója közel azonos a szabad festék és a Mg^{2+}-komplex esetében, a különbség a reakció kvantumhasznosítási tényezőjének különbségeivel magyarázható (8. táblázat).

8. táblázat: FET és FET-Mg^{2+} komplex fotooxidációjának sebességi állandója és a folyamat kvantumhasznosítási tényezője

	k_{ox} [min^{-1}]	Φ
FET	$2,4 \cdot 10^{7}$	$1,5 \cdot 10^{-4}$
FET-Mg^{2+}	$3,9 \cdot 10^{7}$	$2,3 \cdot 10^{-3}$

Abszorpciós mérésekből meghatároztuk a jelzőmolekula Mg^{2+}-ionnal alkotott 1:1 sztöchiometriájú kelátjának stabilitási állandóját (K_s=110 M^{-1}). Más kétértékű kationokkal (Ca^{2+}, Sr^{2+} és Ba^{2+}) is megvizsgáltuk a FET komplexképzését, ezek mind jóval gyengébb asszociátumok, mint a FET-Mg^{2+}, ami a Mg^{2+} ion kis méretére vezethető vissza, ill. az abból adódó nagy töltéssűrűségre.

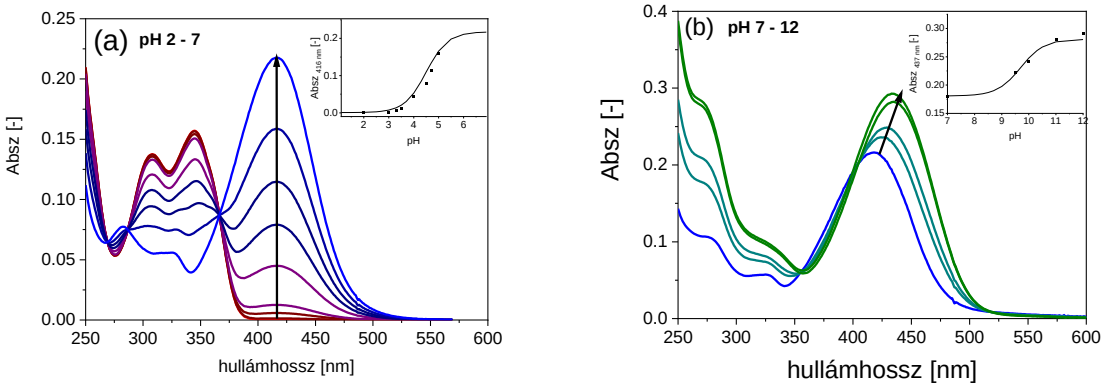
Kutatómunkám során a FET protolízise került középpontba, mely jelentősen befolyásolhatja a jelzőanyag alkalmazását fiziológiás körülmények között. Habár számos publikációban előkerül a vegyület fehérjékhez kapcsolva, polaritásszenzorként alkalmazva,[118] mégsem volt fellelhető az irodalomban olyan munka, amely ennek a vegyületnek a sav-bázis egyensúlyaival foglalkozott volna. A kísérletek során bebizonyosodott, hogy a 3HF-el ellentétben a FET nem mutat vizes oldatban kettős fluoreszcenciát. Erre is igyekeztünk magyarázatot találni, aceton-víz oldószerelegyben vizsgálva a vegyület fluoreszcenciáját.[123]

V.2. Eredmények és értékelésük

A fejezet alapjául a *Hydrogen bonding effects on the fluorescence properties of 4'-diethylamino-3-hydroxyflavone in water and water-acetone mixtures* és az *Uracil-linked hydroxyflavone probe for the recognition of ATP* című közlemények szolgálnak.[123, 124]

V.2.1. Az alapállapotú savi disszociációs állandók meghatározása

Az 40. ábrán az abszorpciós spektrumok láthatóak a pH függvényében a 2-7 valamint a 7-12 pH tartományban.



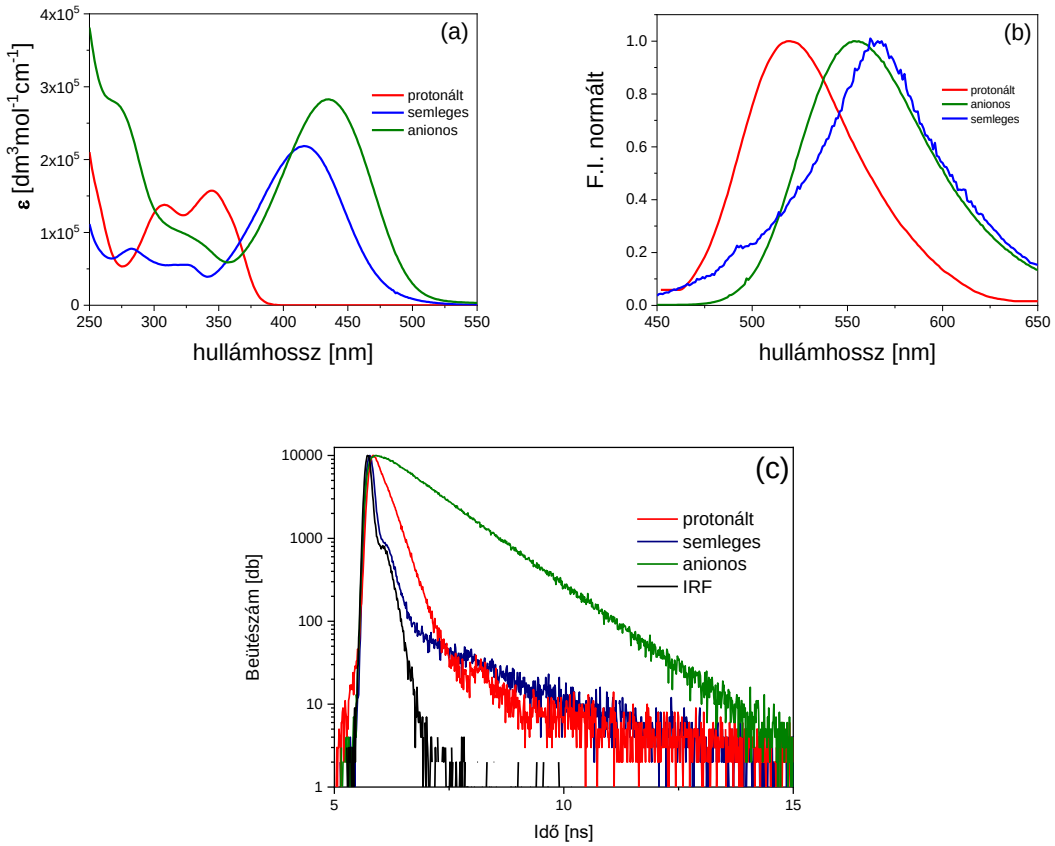
40. ábra: A FET abszorpciós spektruma a pH függvényében ($c_{FET}=10^{-6}$ M, l=10 cm)

A savas oldatok spektrumában 345 nm-en található sáv a protonált formához rendelhető, intenzitása a pH emelésével csökken. Ahogy az jól követhető, a pH növelésével 416 nm-nél megjelenik a semleges forma sávja, majd lúgos közegben 437 nm-nél a deprotonált FET sávja. A spektrumsorozatokat kétlépéses disszociációt feltételezve (41. ábra) értékeltük ki külön-külön.

41. ábra: A FET kétlépcsős disszociációja

Az illesztés eredményeként megkaptuk a molekula két savi disszociációs állandóját. Az aminocsoportra vonatkozó érték pK_{a1}=4,50, míg a hidroxilcsoportra vonatkozó pK_{a2}=9,70. Ez utóbbi érték közel azonos, mint az 3HF vegyületre vonatkozó (pK_{a2}=9,6),[112] tehát az elektrondonor amino-szubsztituens csökkenti a hidroxilcsoport savasságát. A karbonilcsoport a vizsgált pH-tartományban nem protonálódik.[112]

A három forma emissziós spektruma és fluoreszcencia-lecsengési görbéje mérhető volt szelektíven a pH megfelelő megválasztásával (42. ábra). A vizsgálatokat a protonált forma esetében 0,1 M koncentrációjú HCl oldatban, a semleges forma esetében Britton-Robinson pufferben (pH=7,0) és az anionos forma esetében 0,1 M koncentrációjú NaOH oldatban végeztem. Meghatároztam mindhárom forma fluoreszcencia-kvantumhatásfokát, a semleges és az anionos speciesz esetében kumarin 153 etilalkoholos oldatát használva referenciaként, míg a protonált forma esetében kinin-szulfát 0,1 M-os kénsavas oldatát. A spektrális adatokat a 9. táblázatban foglaltam össze.



42. ábra: A FET semleges, kationos és anionos alakjának
(a) abszorpciós spektrumai ($c_{FET}=10^{-6}$ M, l=10 cm),
(b) emissziós spektrumai
[λ_{ex}=345 nm (kationos) λ_{ex}=416 nm (semleges) és λ_{ex}=437 nm (anionos), $c_{FET}=10^{-6}$ M],
(c) lecsengési görbéi [λ_{ex}=378 nm, λ_{em}=517 nm (kationos), λ_{ex}= 473 nm, λ_{em}=526 nm (semleges) és λ_{ex}=473 nm λ_{em}=555 nm (anionos), $c_{FET}=10^{-6}$ M]

Vizsgálataink középpontjában a semleges forma állt. A vizes oldat emissziós spektrumában csak egyetlen sáv látható, mely az N* formától származik – akárcsak etanolban mérve[125] – azonban ez az emisszió három szempontból lényegesen eltér:

- a FET N* sávjának pozíciója követi a Lippert-Mataga-egyenletet, azaz a Stokes-eltolódások ($\nu^*_{abs} - \nu^*_{fl}$) közelítőleg lineárisan változnak az oldószer orientációs polarizációjával, ami a $\Delta f = [(\varepsilon - 1)/(2\varepsilon + 1)] - [(n^2 - 1)/(2n^2 + 1)]$. A protikus, az aprotikus poláris és az apoláris oldószerekben észlelt fluoreszcenciasáv-maximumok a Lippert-ábrázolásban jól illeszkednek egy közös egyenesre.[117] A többi oldószerben mért adatok alapján a FET fluoreszcenciasávja a vizes oldat színképében 530 nm körül volna várható. Ehelyett 565 nm-nél jelenik meg.
- a speciesz fluoreszcencia-kvantumhasznosítási tényezője vízben kicsi, sokkal kisebb, mint szerves oldószerekben.[117] Normál alkoholokban ez az érték jellemzően 0,49 és 0,58 közé esik.
- az alacsony kvantumhatásfok értékkel összhangban, a fluoreszcencia-lecsengési idő rövidebb, mint 30 ps, ami az egyfoton-számlálásos rendszerünk felbontóképessége.

A semleges speciesz gyenge emisszióját tiszta vízben az okozhatja, hogy gerjesztett állapotban a FET karbonilcsoportja és egy vízmolekula között a hidrogénkötés megerősödik. A FET és a víz közötti erős hidrogénkötésen át a gerjesztett FET molekula erősebben kapcsolódik a víz oldószer hidrogénkötéses mátrixához, ami elősegíti, hogy a FET gerjesztési energiája a vízmolekulák intermolekuláris rezgéseinek energiájává alakuljon. Más töltés-transzfer típusú próbákban is fellép ez a hatás, amelyekben van C=O hidrogénkötés-akceptor csoport.[126,127]

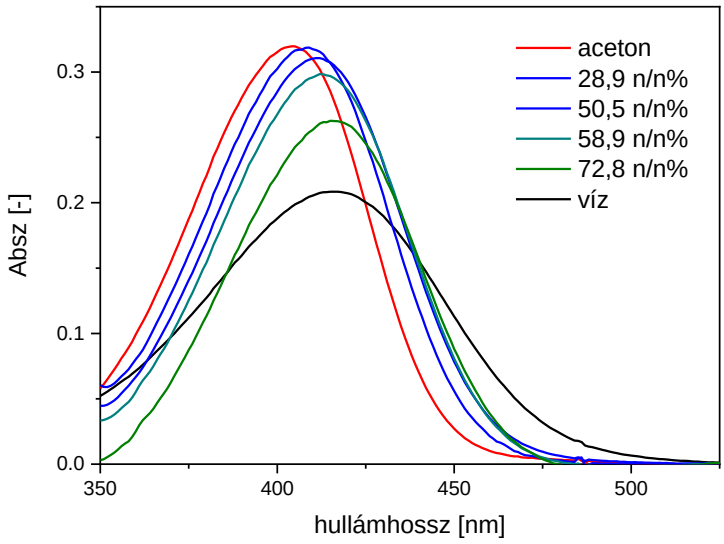
9. táblázat: A FET semleges, kationos és anionos alakjának abszorpciós és fluoreszcencia adatai

speciesz	λ^{abs}_{max} [nm]	ε_{max} [$M^{-1}cm^{-1}$]	λ^{flu}_{max} [nm]	Φ_f	τ [ps] (rel. amplitúdó)
Semleges	416	23 500	565	0,001	<30 (92%), 1680 (8%)
Kationos	345	15 700	517	0,02	230 (98%)
Anionos	437	26 600	555	0,24	1070 (100%)

V.2.2. Vizsgálatok aceton-víz elegyben

A FET vízzel alkotott komplexének tulajdonságait aceton-víz oldószerelegyekben tanulmányoztuk. Korábban Klymchenko és munkatársai vizsgálták a 4'-dimetilamino-3-hidroxiflavon (FME) kölcsönhatását vízzel etilacetát-víz elegyekben.[125] Az aceton-víz rendszer előnye az etilacetát-víz rendszerrel szemben, hogy az aceton és a víz korlátlanul elegyedik, ezért a FET vízkomplexeiről a teljes összetételtartományban kaptunk információt.

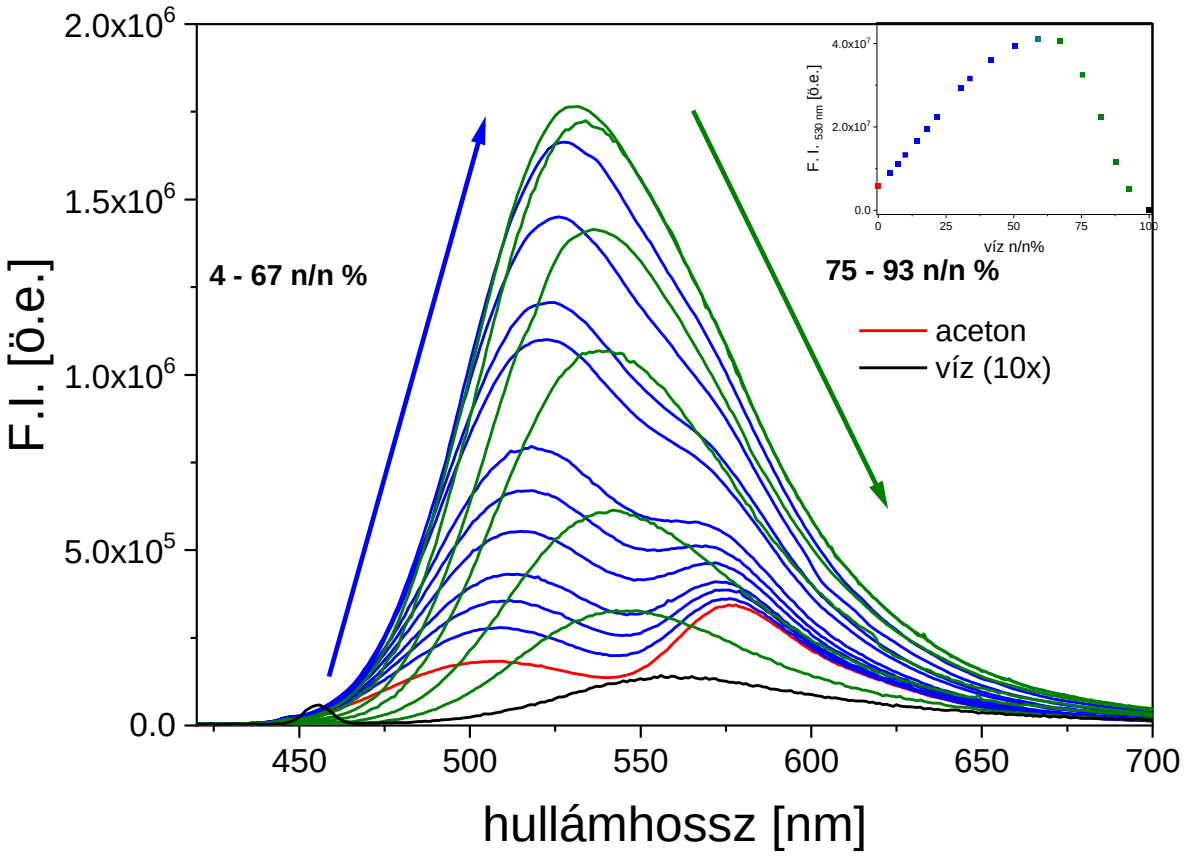
Az abszorpciós spektrumban megfigyelhető, hogy a víz mólarányát növelve a FET abszorpciós sávmaximuma a nagyobb hullámhosszak irányába tolódik, 404 nm-ről 418 nm-re (43. ábra), illetve a sáv intenzitását is befolyásolja az oldószer.



43. ábra: A FET abszorpciós spektruma aceton-víz elegyekben ($c_{FET}=10^{-6}$ M, l=10 cm)

Az emissziós spektrumok mérése során gerjesztési hullámhossznak az acetonban észlelt elnyelési maximumot választottam. Az emissziós spektrumokat normáltam az abszorbancia értékekkel.

Acetonban a FET emissziós spektruma két sávra bontható (44. ábra), az N* formához tartozó sáv 505 nm-en, valamint a T* formához rendelhető sáv 577 nm-en jól elkülöníthető. A spektrumot Gauss-függvényekre bontva ezek a hullámhossz értékek 501 és 582 nm-nek adódtak (Függelék VIII.2. alfejezet). Amennyiben a rendszerhez kis mennyiségű vizet adunk, az N* sáv vörös irányba tolódott és a fluoreszcencia-intenzitás jelentős emelkedését tapasztaltuk mely 67 n/n %-ig monoton növekszik, majd e fölött ismét csökken.



44. ábra: a FET emissziós spektrumai aceton-víz elegyekben, ($c_{FET}=10^{-6}$ M, λ_{ex} =416 nm)

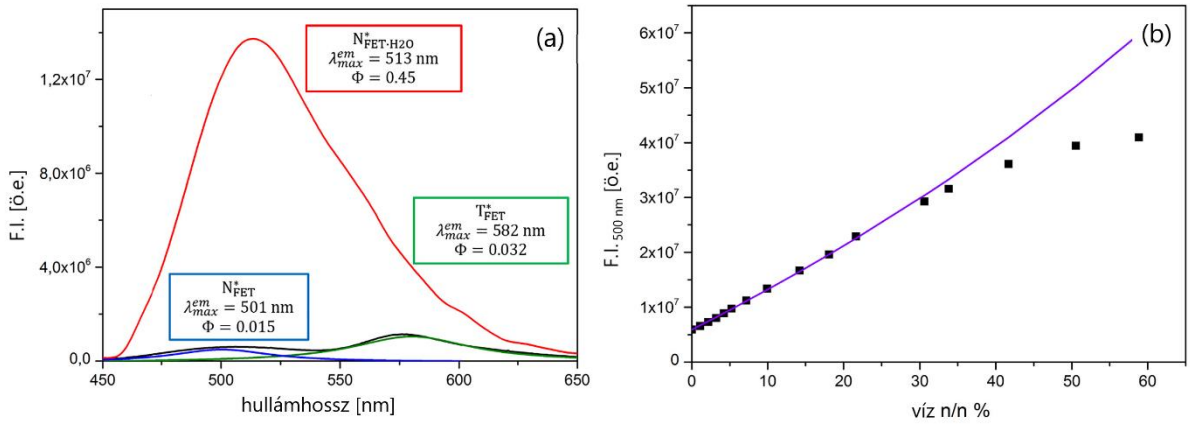
A T* sáv – melynek helyzete kevésbé érzékeny a vízre – arányaiban kisebbé vált, végül belesimult az N* sávba. A víz mennyiségét tovább emelve már csak egy sáv látható a spektrumon, amely a nagyobb hullámhosszak irányába tolódik és intenzitása csaknem teljesen kioltódik tiszta vízben. Ez a változás azt jelzi, hogy a többé-kevésbé izolált FET-víz komplex – amely alacsony vízkoncentrációk esetén domináns – erősen emittál. Ezzel szemben a vízben gazdag, hidrogén-kötésekkel átszőtt közegben a festék alig emittál.

Az intenzitásnövekedés 10 n/n %-ig jól leírható a tiszta festék és az 1:1 arányú vízkomplex emissziójának összegeként.

$$I_{i,j} = c_i^{FET}\phi_j^{FET} + c_i^{FET\cdot H_2O}\phi_j^{FET\cdot H_2O} \qquad (66)$$

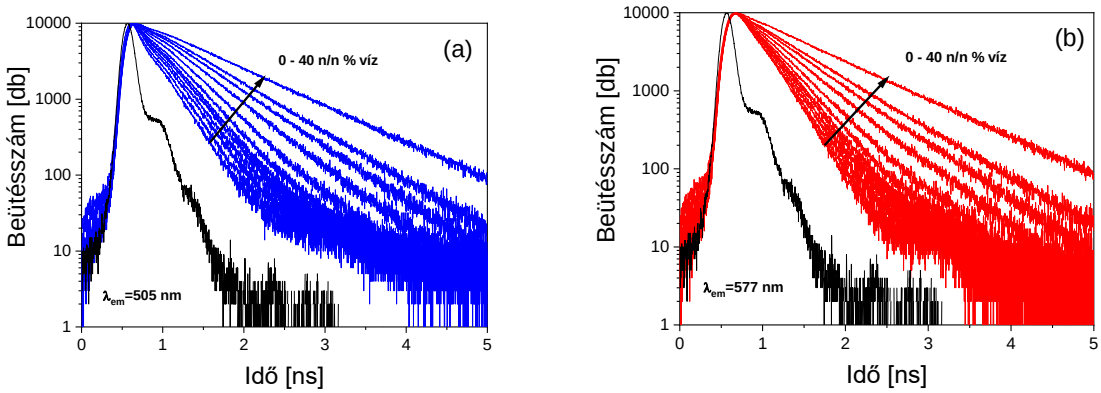
Az emissziós spektrumokat ebben az összetétel-tartományban felhasználva, 1:1 arányú vízkomplexet feltételezve illesztést végeztünk, melynek eredményeként azt kaptunk, hogy a FET:H_2O komplex stabilitási állandója $K=4{,}5\cdot10^{-2}$ M^{-1}. Az illesztés további eredményeként megkaptuk a vízkomplex koncentrációfüggetlen emissziós spektrumát, melyet 45. az ábra szemléltet.

Ennek ismeretében kiszámítható volt a komplex fluoreszcencia kvantumhasznosítási tényezője is ($\Phi_{FET\cdot H2O}$= 0,45), mely az acetonban mért Φ_{FET} = 0,047 kvantumhatásokkal összevetve csaknem tízszer nagyobb érték.



45. ábra: (a) A FET vízkomplexének illesztésből nyert fluoreszcenciaszínképe. Összehasonlításul a tiszta acetonban mért színképet is feltüntettük, ill. annak felbontását az N* és T* formák járulékára. (b) A FET fluoreszcencia intezitása 500 nm-en az oldószerösszetétel függvényében. A folytonos vonal a számított értékeket jelöli (K_a=4,5·10^{-2} M^{-1}), a négyzetek a kísérleti értékek

Hasonló megállapításokra jutottunk a fluoreszcencia lecsengési görbék vizsgálata során (46. ábra) . Detektálási hullámhosszként az aceton N* és T* sávjának maximumát (505 és 577 nm) választottuk. Tiszta acetonban mérve az 505 nm-en detektált lecsengési görbe kezdeti szakaszán egy gyors lecsengű komponens figyelhető meg, míg az 577 nm-en detektál görbénél feltöltődési szakasz látszik. Ennek hátterében az ESIPT folyamat áll. A lecsengési görbék később azonos időállandóval futnak, ami azt jelzi, hogy az N* és T* formák között beállt egy gerjesztett állapotú egyensúly.



46. ábra: A FET fluoreszcencia lecsengési görbéi aceton-víz elegyekben 505 nm (a) és 577 nm (b) detektálási hullámhosszon (c_{FET}=10^{-6} M, λ_{ex}= 473 nm)

A tiszta acetonban felvett lecsengések a két detektálási hullámhosszon két exponenciálissal voltak leírhatók (ugyanazon két időállandóval, τ_1~60 ps és τ_2=230 ps) az alábbi egyenleteket felhasználva:

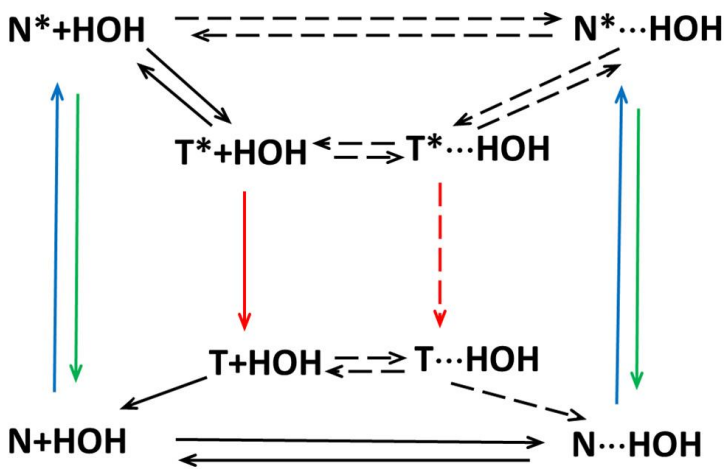
$$I^{N*}(t) = A_1^{N*}\exp\left(-\frac{t}{\tau_1}\right) + A_2^{N*}\exp\left(-\frac{t}{\tau_2}\right) \qquad (67)$$

és

$$I^{T*}(t) = -A_1^{T*}\exp\left(-\frac{t}{\tau_1}\right) + A_2^{T*}\exp\left(-\frac{t}{\tau_2}\right) \qquad (68)$$

A fluoreszcencia lecsengését megvizsgáltuk aceton-víz rendszerekben is, alacsony vízkoncentráció mellett. Ezeket a rendszereket három időállandóval tudtuk jellemezni, melyből a két rövidebb komponens (τ_1 és τ_2) értékét azonosnak tekintettük a korábbi, tiszta acetonban mért értékekkel. A harmadik komponenst a vízkomplexként azonosítottuk, melynek fluoreszcencia lecsengési idejére 400 ps-ot kaptunk. A víz mennyiségét növelve már egy exponenciálissal is jól leírhatóak voltak a lecsengési görbék a detektálási hullámhossztól függetlenül. A megfigyeléseink alapján felállított modellt a 47. ábra szemlélteti.

Folytonos vonal jelzi a fluoreszcencia kísérletekből megfigyelhető folyamatokat, míg a szaggatott vonal a feltételezhető reakcióutakat.



47. ábra: A FET és FET-víz komplex fotoindukált folyamatai. Folytonos nyíllal jelölve a közvetlenül mérhető reakciók, szaggatott nyíllal a hipotetikus folyamatok

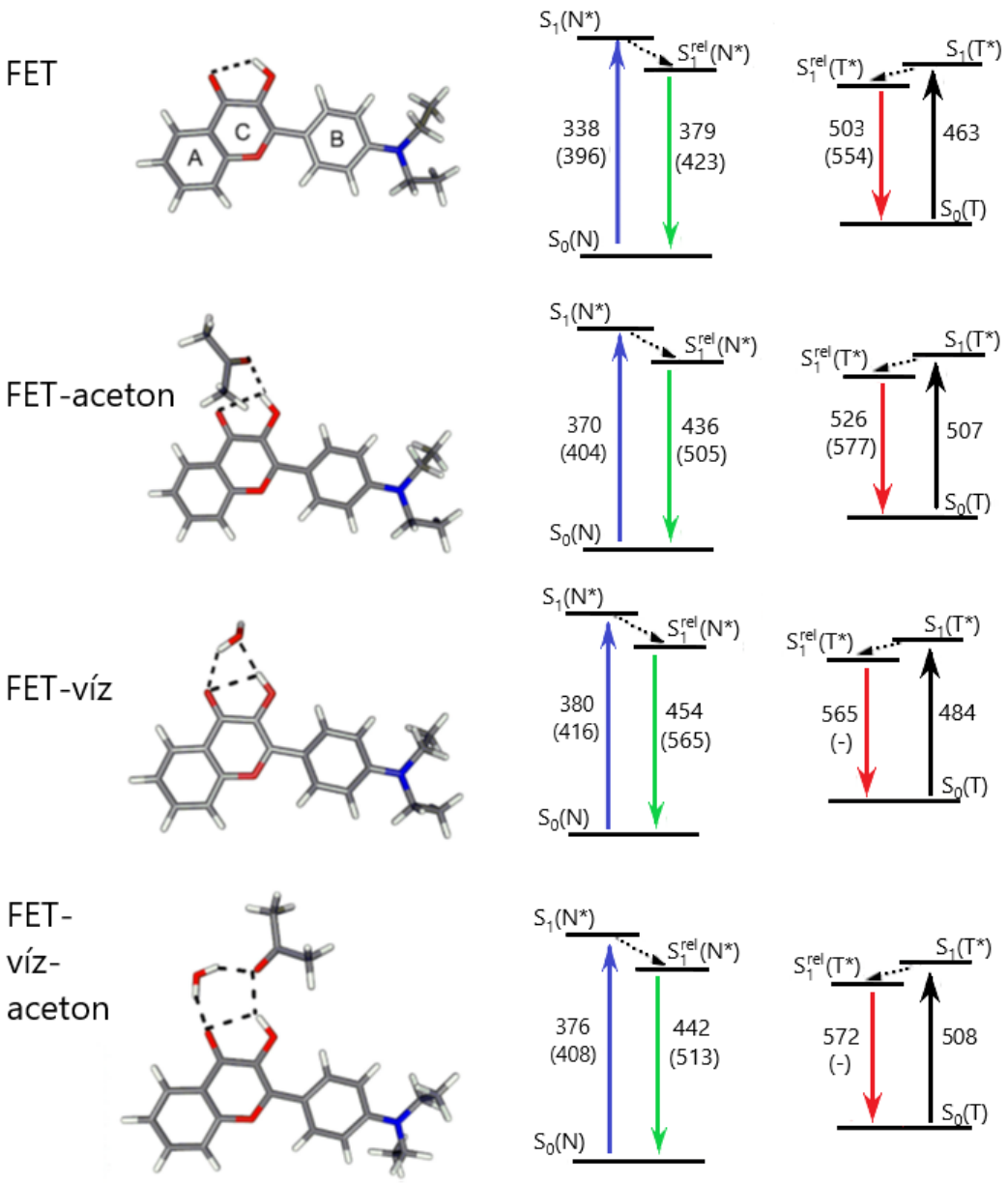
Spektroszkópiai kísérleteinkből arra lehet következtetni, hogy:

- Az N*···HOH gerjesztett komplex főleg az alapállapotból (N···HOH) keletkezik, nincs arra utaló jel, hogy gerjesztett szabad N vizet kössön meg: N* + HOH → N*···HOH
- A T* forma vízkomplexét nem tudtuk azonosítani, feltételezhetően az ESIPT folyamat termodinamikailag és/vagy kinetikailag gátolt.

V.2.3. A FET-komplexek vizsgálata elméleti számításokkal

Az elméleti számításokban a szolvatált festékmolekulát a FET-aceton és a FET-víz komplexszel, valamint a FET-víz-aceton hármas komplexszel modelleztük (47. ábra). A FET-víz komplex legalacsonyabb energiájú szerkezetében két helyen kapcsolódik az oldószer a jelzőmolekulához. A FET-víz-aceton hármas komplex azt az esetet modellezi, amikor a rendszerben kevés víz van az aceton mellett. Referenciaként a nem-szolvatált FET molekula tulajdonságait is kiszámítottuk, melynek eredményét a n-hexánban mért kísérleti adattal vetettük össze.**Hiba! A könyvjelző nem létezik.** Ahogy az 48. ábrán látható, a számítások az abszorpciós és a fluoreszcenciasávokra is szisztematikusan kisebb hullámhossz értékeket adtak eredményül, mint a kísérleti adatok. A számítások azonban jól tükrözték a pozitív szolvatokromizmust: a normál forma esetében ahogy a szolvatációs képesség nő, a gerjesztési energia lecsökken, azaz az abszorpciós hullámhossz a nagyobb hullámhosszak irányába tolódik el. Ezzel párhuzamosan az emisszió is a vörös irányba tolódott.

Az $S_1^{rel}(T^*)$ relaxált állapotú energiák kisebbek voltak a $S_1^{rel}(N^*)$ állapot értékeinél minden modell esetében, a különbség -7,8 kcal/mol volt az izolált molekulára, -4,6 kcal/mol a FET-aceton komplex esetében, -3,7 kcal/mol a FET-víz komplexnél és -2,1 kcal/mol a FET-aceton-víz komplex esetében. Ennél fogva az ESIPT folyamat energetikailag kedvező mindegyik modellben, az energiakülönbséget azonban a vízkomplexben a hidrogénkötés nagymértékben lecsökkenti.



48. ábra: A FET és oldószer-komplexeinek számított alapállapotú szerkezetei, abszorpciós és fluoreszcencia hullámhosszai. A zárójelben a n-hexánban, valamint az acetonban, vízben és aceton-víz elegyben mért-abszorpciós és emissziós hullámhosszak

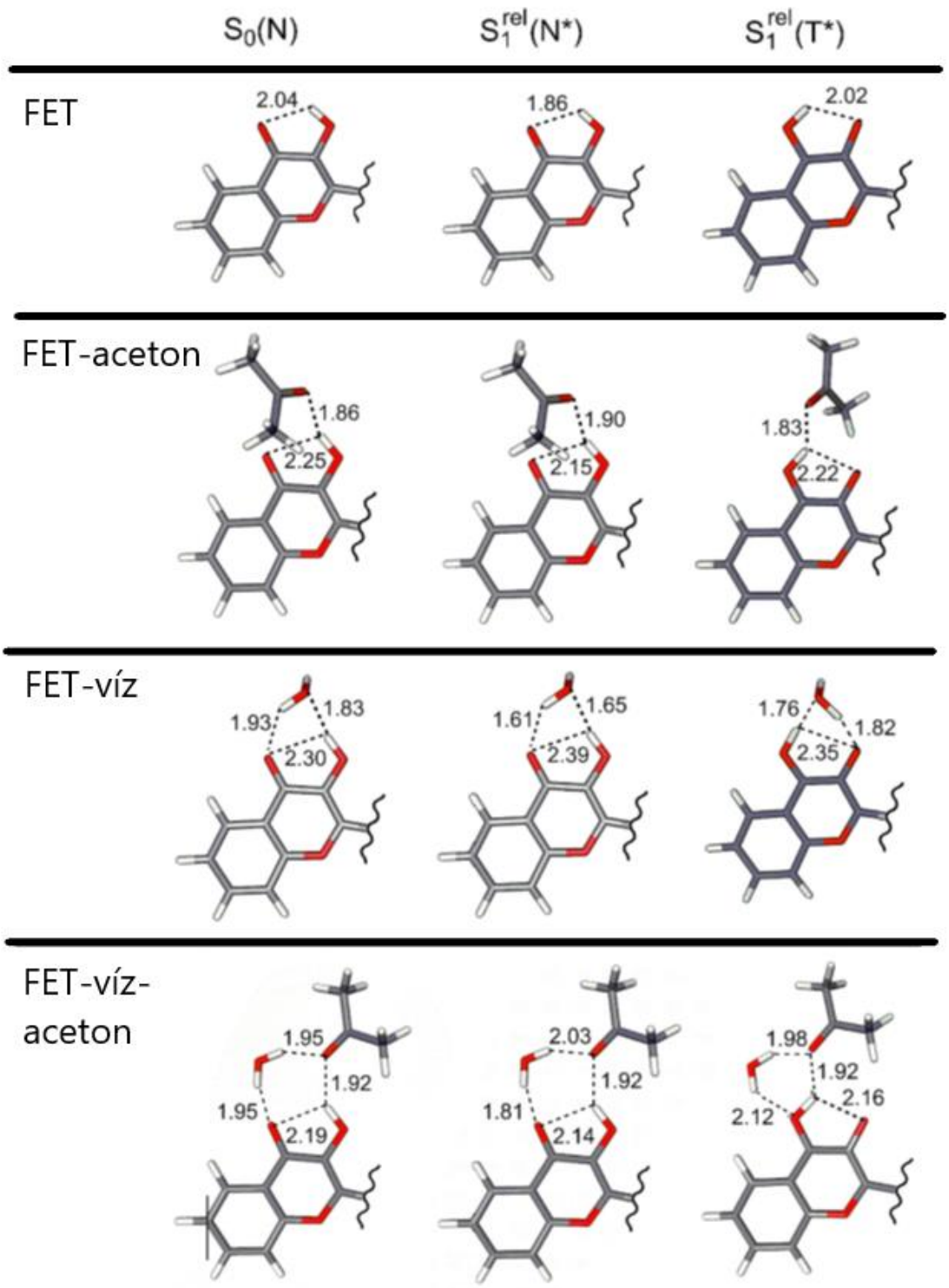
Azonkívül, a számítások megmutatták, hogy az N forma hidrogénkötéses komplexeinek stabilizációs energiája a FET-aceton esetében a gerjesztés hatására csökken (4,7 kcal/mol-ról 3,5 kcal/mol-ra), míg ez az érték nő a FET-víz komplexben (6,6 kcal/mol-ról 7,4 kcal/mol-ra) és a FET-víz-aceton komplexben (7,4 kcal/mol-ról 8,1 kcal/mol-ra). Ez is arra utal, hogy az ESIPT folyamat energetikailag kedvezőbb, ha az oldószer aceton, összhangban a kísérleti megfigyelésekkel.

Az 49. ábrán az intra- és intermolekuláris hidrogénkötések számított hossza látható, melyek szintén összhangban vannak a jelzővegyület acetonban és vízben tapasztalt különböző viselkedésével.

Az acetonkomplexben a gerjesztést az intramolekuláris hidrogénkötés erősödése kíséri, ami kedvez az ESIPT-reakciónak. A vízkomplex esetében az intramolekuláris hidrogénkötések viszonylag gyengék alapállapotban és gerjesztés hatására még tovább gyengülnek, az ESIPT folyamat gátolt lesz.

Ezzel szemben a vízkomplexben az intermolekuláris hidrogénkötés erősebb a gerjesztést követően, stabilizálja a szolvatált molekulát, míg e kötés hossza az aceton-víz komplexben megnyúlik gerjesztés hatására.

Az $S_0 \rightarrow S_1$ gerjesztés olyan változásokat is okoz a FET molekula szerkezetében, amelyek nem érintik a hidrogénkötéseket. A FET flavon-váza alapállapotban nem planáris, a fenilcsoport a kromon egységgel 14°-os szöget zár be. Ezek az egységek koplanárissá válnak az S_1(N*) és S_1(T*) állapotokban. A NEt_2-csoport alapállapotban piramidális, míg mindkét S_1 gerjesztett állapotban közel planáris. Hasonló szerkezeti változások történnek gerjesztés hatására a FET-aceton, FET-víz és FET-víz-aceton komplexben is.



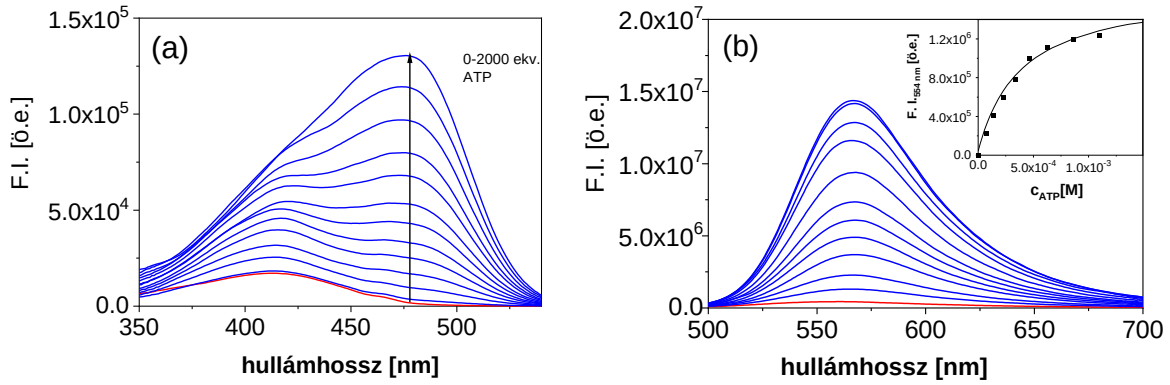
49. ábra: Az intra- és intermolekuláris hidrogén-kötések hosszai (Å) FET-oldószer komplexekben

V.2.4. 3-hidroxiflavonok alkalmazása nukleotidszenzorként

A FET dimetil-analógjáról (FME) Pivovarenko és munkatársai kutatásai nyomán vált ismertté, hogy fluoreszcens nukleotidszenzorként működik.[128,129] Az FME vizes oldatához ATP-t adagolva az abszorpciós, és a gerjesztési spektrumban is új sávot észleltek, amit az FME-t anionos alakban tartalmazó FME-ATP komplexnek tulajdonítottak. A spektrumokból először arra következtettek, hogy az alapállapotú komplexben játszódik le protontranszfer az FME és az ATP(4-) tetraanion között.[128] Későbbi közleményükben az exciplexképződést is megemlítik, mint lehetséges reakciót.[129]

Kutatásainkban a FET komplexképzését vizsgáltuk nukleotidokkal. A minták pH-ja 7,4 volt, amelyen a FET neutrális formája, az ATP-nek pedig a tetraanion alakja dominál.
A FET-ATP rendszerek színképei (50. ábra) hasonlítanak az FME-ATP rendszerek színképeihez, amelyeket Pivovarenko-ék, leírtak, de vannak eltérések is. A gerjesztési spektrumon (50.a. ábra) a FET-re jellemző 416 nm-es sáv mellett megjelenik 474 nm-nél egy új sáv az ATP-vel való kölcsönhatás eredményeként. Az új sáv maximuma nagyobb hullámhossznál van, mint a szabad anioné, de a kölcsönhatás az ATP-vel okozhat ilyen eltolódást. Továbbá, a spektrumokban még nagy ATP feleslegeknél is felismerhető a semleges FET-hez, vagy a semleges FET ATP-komplexéhez rendelhető, rövidebb hullámhosszú sáv.

Az emissziós színképeket (50.b. ábra) a gerjesztési spektrumokban észlelt új sáv hullámhosszán (474 nm) gerjesztettük. Az ATP hatására nagymértékben megnőtt az intenzitás. (2000-szeres ATP hatására 33-szoros intenzitásnövekedés). Feltételezve, hogy 1:1 komplex keletkezik, az emissziós spektrumokból illesztéssel meghatároztuk a kötési állandót, amelyre $K=2{,}3\cdot10^4\ M^{-1}$ -et kaptunk. A fenti értékből visszaszámított intenzitások jól egyeztek a kísérleti értékekkel (49.b. ábra, belső diagram).

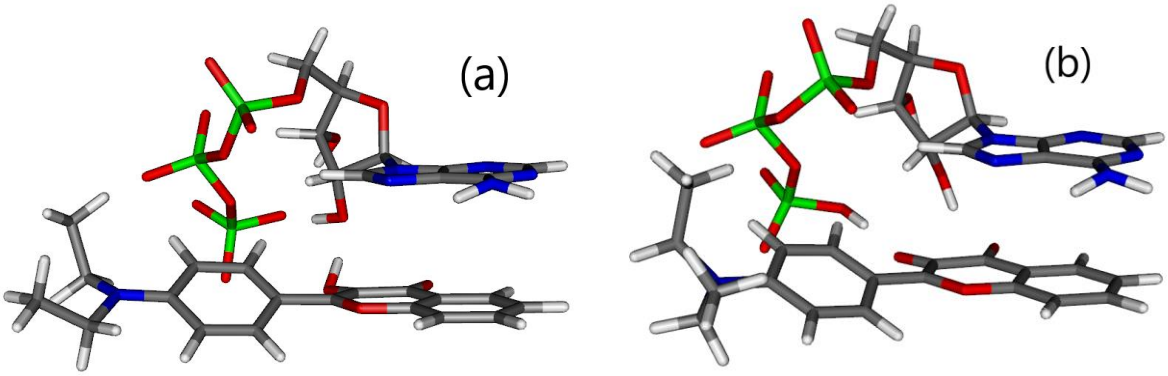


50. ábra: A FET szenzor gerjesztési (a) (λ_{em} = 476 nm) és emissziós (b) (λ_{ex} = 554 nm) spektruma ATP adagolás hatására ($c^0_{FET} = 10^{-6}$ M , $c^0_{ATP} = 0 - 2\cdot10^{-3}$ M)

A FET-ATP rendszerek spektrumaira hatással lehet, hogy a protontranszfer a FET komponensről az ATP(4-) komponensre kedvezőbb a gerjesztett, mint az alapállapotban.
Az ESPT mechanizmust elősegíti, ha a FET protondonor fotoacidikus jellegű. A Förster-ciklussal számolva, a 42. ábrán látható spektrumokból $pK_a^* - pK_a = -1{,}65$. Tehát a FET fotoacidikus, bár sokkal kevésbé, mint a szubsztituálatlan 3-hidroxiflavon, amelyre $pK_a^* - pK_a = -9{,}76$.[130]

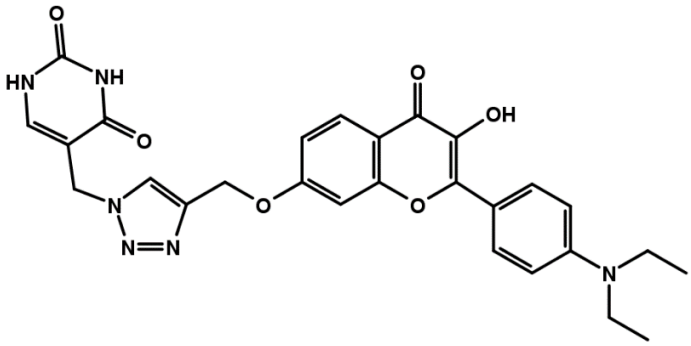
Az eredmények értelmezéséhez elméleti számítással modelleztük a FET-ATP komplex szerkezetét. Az 51. ábrán a FET-ATP komplex szerkezete látható alap- és gerjesztett állapotban. Az ábrán megfigyelhető, hogy gerjesztett állapotban a proton a FET hidroxilcsoportjáról az ATP terminális foszfátcsoportjára kerül.

Összefoglalva, a spektroszkópiai eredmények alapján lehetséges, hogy a FET-ATP komplexben gerjesztett állapotú protontranszfer történik, és ezt a komplex számított szerkezete megerősíti.



51. ábra: FET:ATP komplex szerkezete alap- (a) és gerjesztett állapotban (b).

A FET-ATP rendszer spektroszkópiai vizsgálata megalapozta egy új, szelektív ATP-szenzor fejlesztését.[124] Az U-FET-tel jelölt új szenzor szerkezete az 52. ábrán látható. Tartalmazza a intermolekuláris protontraszferhez szükséges hidroxiflavon-egységet, valamint egy uracilcsoportot, amely a szelektivitást javítja az RNS-ből ismert adenin-uracil bázispárképzés következményeként.



52. ábra: Uracilcsoporttal kapcsolt 3-hidroxiflavon fluoreszcens ATP szenzor (U-FET)

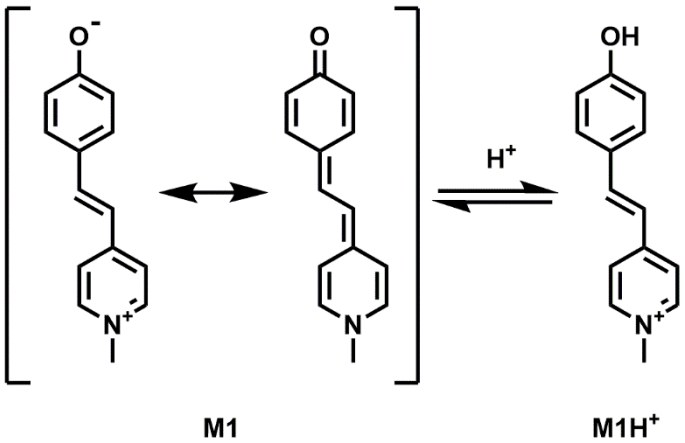
Az U-FET gerjesztési és emissziós fluoreszcenciaszínképe a FET-éhez hasonló módon változott ATP jelenlétében. Az U-FET szelektívnek bizonyult ATP-re a többi vizsgált nukleotiddal szemben (ADP, AMP, adenozin és GTP). Az 1:1 sztöchiometriájú ATP komplex stabilitási állandója $K=2,3\cdot10^4$ M^{-1}, ez hasonló érték, mint a FME:ATP komplexé ($K=2,5\cdot10^4$ M^{-1}).[124] Az U-FET a turn-on típusú szenzorok csoportjába sorolható, a fluoreszcencia komplexképződés hatására mintegy 5,5-szeresére növekedett.

VI. Brooker-merocianinok komplexképzése pillérarénnal

VI.1. Irodalmi háttér

VI.1.1. A Brooker-merocianin szolvatokromizmusa

A Brooker-merocianin (M1 az 53. ábrán) egy piridínium-fenolát festék, melynek legérdekesebb tulajdonsága az erős negatív szolvatokromizmus,[131,132] azaz az $S_0 \rightarrow S_1$ átmenet sávja a kisebb hullámhosszak felé tolódik az oldószer polaritásával. Protikus oldószerekben a gerjesztési energia nő az oldószer hidrogénkötés-donor képességével is. M1 szolvatokróm viselkedésének általánosan elfogadott magyarázata abból indul ki, hogy a molekula két határszerkezettel írható le, az ikerionos aromás (benzoidális) és a semleges kinodiális szerkezettel (53. ábra). Poláris oldószerben az ikerionos aromás forma dominál, apoláris oldószerekben nagyobb a kinoidális határszerkezet súlya.



53. ábra: A Brooker-merocianin fenolát és fenol formája. A fenolát forma az ikerionos és semleges határszerkezettel jellemezhető

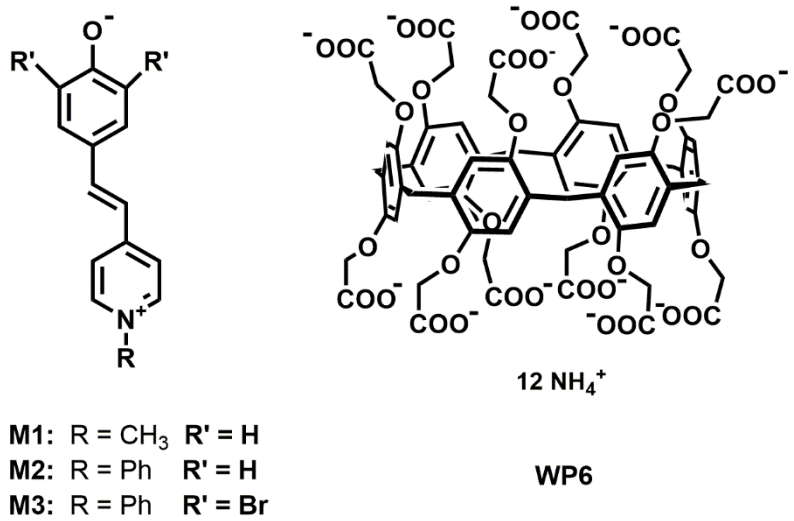
Elméleti számítások is megerősítették, hogy a jelzővegyület szolvatokróm tulajdonságát az oldószer polaritása és hidrogénkötés-donor tulajdonsága is befolyásolja. [133,134,135] A számítások szerint az alapállapotú ikerionos (aromás) formának az energiája erősen csökken az oldószer polaritásával. Az S_1 gerjesztett állapotban az aromás szerkezet dipólumomentuma kisebb lesz. Ezért a gerjesztett állapotú aromás formát a kölcsönhatások a poláris oldószermolekulákkal kevésbé stabilizálják – ez nyilvánul meg a negatív szolvatokromizmusban. Protikus oldószerekben az M1 ikerion fenolátcsoportja és az oldószermolekulák között hidrogénhidak alakulnak ki, ezek is erősebbek M1 alapállapotában, tovább növelve a gerjesztési energiát.
Ellentétben az aromás formával, M1 kinoidális formájának dipólusmomentuma nő az $S_0 \rightarrow S_1$ gerjesztés során, ami alapján kevéssé poláris oldószerekben pozitív szolvatokromizmus várható. A szolvatokromizmus megfordulása (reversed solvatochromism) tiszta oldószerekben

azonban nem figyelhető meg, mivel M1 nem oldódik a legkevésbé poláris oldószerekben. A jelenséget mégis lehet kísérletileg igazolni poláris és apoláris oldószerek elegyében felvett spektrumokkal: M1-nek a tiszta apoláris oldószerekre extrapolált gerjesztési energiái a pozitív szolvatokromizmusnak megfelelően változnak.

Kihasználva a Brooker-merocianin nagy érzékenységét a lokális környezetre, gyakran alkalmazzák szolvatokróm próbavegyületként.

Célkitűzés

A Brooker-típusú merocianinokkal kapcsolatos kutatásaink célja az volt, hogy kihasználva az ilyen anyagok erős szolvatokromizmusát, kolorimetrikus indikátor-kiszorításos assay-t készítsünk biomolekulák detektálásához. Az assay-ként működő komplex gazdamolekulájának a vízoldható WP6 pillérarén makrocilust választottuk (54. ábra). Feltételezhető volt, hogy a merocianinokon és a pillérarénon lévő ellentétes töltések miatt viszonylag stabil komplexek képződnek, és, hogy az erős kölcsönhatások nagy spektrális változást indukálnak. M2 és M3 új vegyületek voltak. Az N-fenil szubsztituenseiktől azt vártuk, hogy M2 és M3 erősebb komplexet képeznek WP6-tal, mint M1. Az M3-on lévő Br-szubsztituensekkel pedig a saverősséget kívántuk növelni, hogy az erősen szolvatokróm ikerionos forma semleges pH-jú oldatokban is domináljon.



54. ábra: A vizsgált merocianin festékek és pillér[6]arén szerkezeti képlete

A kolorometriás szenzor fejlesztése mellett célunk a komplexek működését megvizsgálni fluoreszcenciás szenzorokként is, ezek a vizsgálatok még folyamatban vannak.

VI.1.3. A Brooker-merocianin kölcsönhatás makrociklusokkal

Aromás gyűrűi és ellentétes töltésű végcsoportjai miatt az ikerionos Brooker-merocianin sokféle makrociklussal képezhet komplexet. M1 komplexképzését eddig ciklodextrinekkel,[136,137] kukurbit[8]urillal[138] és kalix[4]pirrollal[139] vizsgálták.

Holt és munkatársai a Brooker-merocianin α-, β- és γ-ciklodextrinnel történő komplexképzését vizsgálták abszorpciós és fluoreszcencia mérésekkel. Azt találták, hogy a merocianin a β-ciklodextrinnel alkotja a legstabilabb 1:1 sztöchiometriájú komplexet. A stabilitási állandó K=430 M^{-1}, tehát még ebben az esetben is egy viszonylag gyenge kölcsönhatásról beszélhetünk. A kisebb üregmérettel rendelkező α-CD-nel és a nagyobb üregű γ-CD-nel még ennél is gyengébb komplex keletkezik (K=110 M^{-1} és 70 M^{-1}).[140,141]

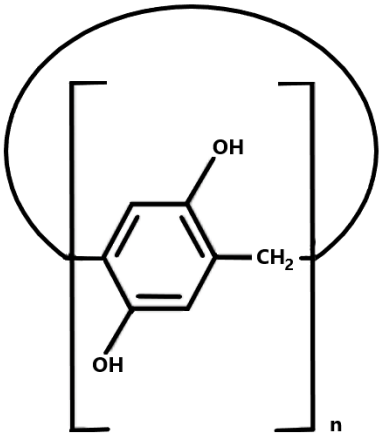
A nyolc tagszámú kukurbituril üregmérete jóval nagyobb, így képes két vendégmolekulával kölcsönhatásba lépni. Kang és munkatársai ezzel a kukurbit[8]uril makrociklussal vizsgálták a Brooker-merocianin komplexképzését. Azt találták, hogy az makrociklus üregében a két vendégmolekula ellentétesen orientálva helyezkedik el. Továbbá, vizsgálták a jelzőmolekula fotodimerizációs reakcióját melyben a kukurbituril katalizátorként működik.

Linn és munkatársai kalix[4]pirrollal (CP) vizsgálták a Brooker-féle merocianin komplexképződését acetonitril oldószerben. A komplexképzés során látványosan jelentkezett a jelzőmolekula szolvatokróm tulajdonsága, acetonitrilben a Brooker-merocianin ibolya színű (λ_{max}=571 nm), míg a CP-lal alkotott komplexe narancssárga (λ_{max}=481 nm). A jelzőmolekula hidrogén-kötésekkel kötődik a CP-hoz, a fenolátcsoport oxigénje kölcsönhat a CP NH-csoportjaival. A komplex 1:1 sztöchiometráját Job-plot-tal bizonyították, a komplex stabilitási állandója K=5,66 ± $0{,}34 \cdot 10^3$ M^{-1}. A komplexet F^-, Cl^- és $H_2PO_4^-$ anionok kimutatására használták kolorimetriás ID (indikátor-kiszorításos) szenzorként.

VI.1.4. Pillérarének

A makrociklusok története 1967-ben kezdődött, amikor Charles Pedersen előállította az első koronaétereket[142] és innen számíthatjuk a szupramolekuláris kémia születését is. A makrociklusok jelentősége – és ezzel együtt az új makrociklusok száma is - évről-évre nő. A legelterjedtebb makrociklusok közé sorolhatjuk a ciklodextrineket, kalixaréneket, és kukurbiturilokat, de az utóbbi évtizedben számos új makrociklus szintézisével bővült a szakirodalom: a bambuszuril[143] és a pillérarén alig 10 éves vegyületek.

A pillér[n]arének a makrociklusok egy új családja,[144] melyben n darab hidrokinon egység kapcsolódik egymással metilénhidakon keresztül (55. ábra). A pillérarén elnevezés a molekula alakjára utal, mely egy oszlopra emlékeztet.



55. ábra: A pillér[n]arének általános szerkezete

A pillérarének előnyös tulajdonsággal rendelkeznek más makrociklusokkal szemben. Szimmetrikusak és merev vázzal rendelkeznek, ez korlátozza a lehetséges vendégmolekulák számát, ezen keresztül javítja a szelektivitást. Elektronban gazdag üregüknek köszönhetően a pillérarének kölcsönhatásba tudnak lépni elektronhiányos vagy akár semleges molekulákkal is.[145,146] A benzolgyűrűn lévő hidroxilcsoportok könnyen funkcionalizálhatók, így növelhető a vízoldhatóság valamint tovább szűkíthető a lehetséges vendégmolekulák köre.

Az utóbbi években sok kutatócsoport vizsgálta a pillérarének gazda-vendég komplexeit,[147,148,149] A vizsgálatok zöme szerves oldószerekben történt, mivel a pillérarének vízoldhatósága gyenge.

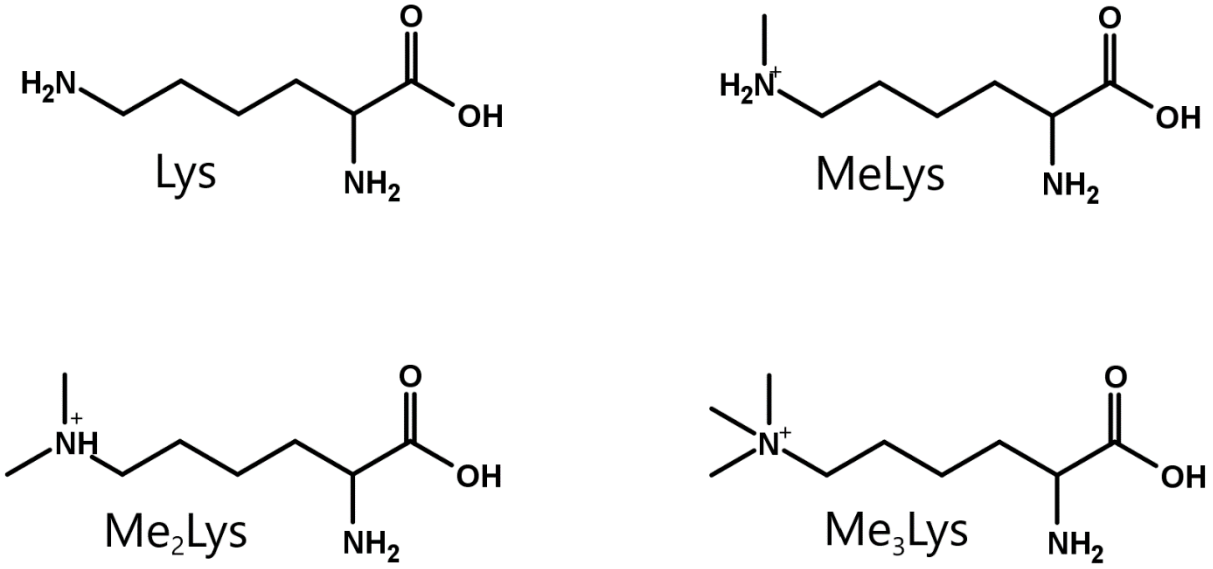
Előállítottak azonban már vízoldható pillérareneket is, amelyek ionos karakterű csoportot tartalmaznak, így karboxiláto-,[150,151] ammónium-,[152,153] imidazólium-[154] és foszforil-csoportokat. [155]

Karboxiláto-pillér[n] aréneket (WPn) Ogoshi és munkatársai szintetizálták elsőként 2010-ben. Ez az anionos makrociklus ideális kationos karakterű, például aminocsoportot tartalmazó vendégek befogadására. NMR-vizsgálatok igazolták, hogy a WP5 karboxiláto pillérarén az aminosavak közül a kationos aminosavakkal képez komplexet.[156]. Az ötletet továbbgondolva kutatócsoportunk is fejlesztett FID szenzorokat kadaverin, putreszcin[157] valamint paraquat kimutatására[158] WP5 makrociklussal. Neurotranszmitterek meghatározására alkalmasabb az egy gyűrűtagszámmal nagyobb WP6 (54. ábra). [159]

VI.1.4. Lizin és származékai

A lizint és metilezett származékait (56. ábra) kutatásainkban modell-analitokként használtuk indikátor-kiszorításos rendszerek tesztelésére. A lizin a bázikus esszenciális aminosavak egyik képviselője, amely fiziológiás pH-értéken pozitív töltésű. A lizin nagy mennyiségben megtalálható az ún. hiszton fehérjékben, melyek nagy jelentőséggel bírnak a DNS-lánc kromoszómává szerveződésében és ezen keresztül a génexpresszióban. [160,161]

A lizin a fehérjeszintézis utolsó lépéseként (poszttranszlációs módosítás) metilálódhat, mely megváltoztatja a fehérje működését, más molekulákkal kialakított kapcsolatát, így adva végső alakot az adott fehérjének.

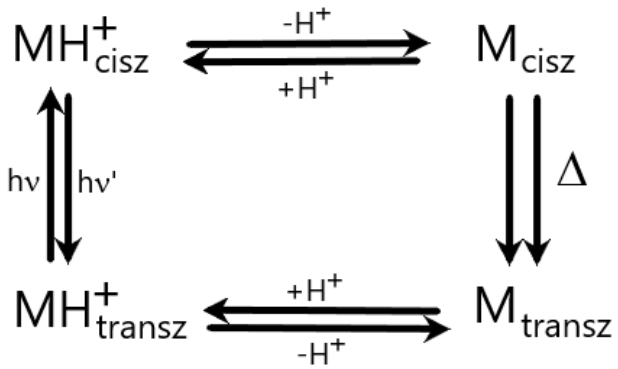


56. ábra: A lizin és metillált származékai

A fehérje lebomlását követően a felszabaduló trimetil-lizin a májban karnitinné alakul. A karnitin a zsírsavakat szállítja a mitokondriumban. A lizin megkülönböztetése a metilált lizinszármazékoktól kulcsfontosságú feladat.[162]

VI.1.5. A Brooker-merocianin transz-cisz izomériája

Egyiptomi és német kutatók a 80-as évek elején vizsgálták a Brooker-merocianin transz-cisz izomériáját vizes oldatban.[46,163] Kísérletükben elkészítették a merocianin savas oldatát fénytől elzárt helyen, majd az abszorpciós spektrum felvétele után halogén lámpával állították elő a cisz-izomert (pontosabban a transz és cisz-forma egyensúlyi keverékét). A vizsgálatok azt mutatták, hogy a MH^{+}_{cisz} forma termikusan stabil. Ezt követően egy csepp 1M NaOH oldattal lúgosítva az oldatot, megmérték a lúgos forma cisz-izomerének elnyelési spektrumát. Az oldatban jelen levő cisz-izomerek spontán visszaalakultak a deprotonált transz-formává. Az 57. ábrán az izomerizáció reakciósémája látható.



57. ábra: A Brooker-merocianin transz-cisz izomerizációjának reakciósémája

Mindezek ismeretében kísérleteimet fénytől elzárva végeztem, és a spektrumot kis fényterhelést okozó diódasoros spektrofotométerrel vettem fel, hogy a fenolos forma (MH^{+}) izomerizációját elkerüljem.

A Brooker-merocianin fenolos és ikerionos formája egyaránt mutat fluoreszcenciát, komplexképzésükkel kapcsolatos kísérleteimben elsősorban az elnyelési tulajdonságaira fókuszáltam, ugyanakkor a fluoreszcenciás vizsgálatokat is megkezdtem. A Brooker-merocianin (M1) savi disszociációs állandója ismert volt az irodalomból.[164]

VI.2. Eredmények és értékelésük

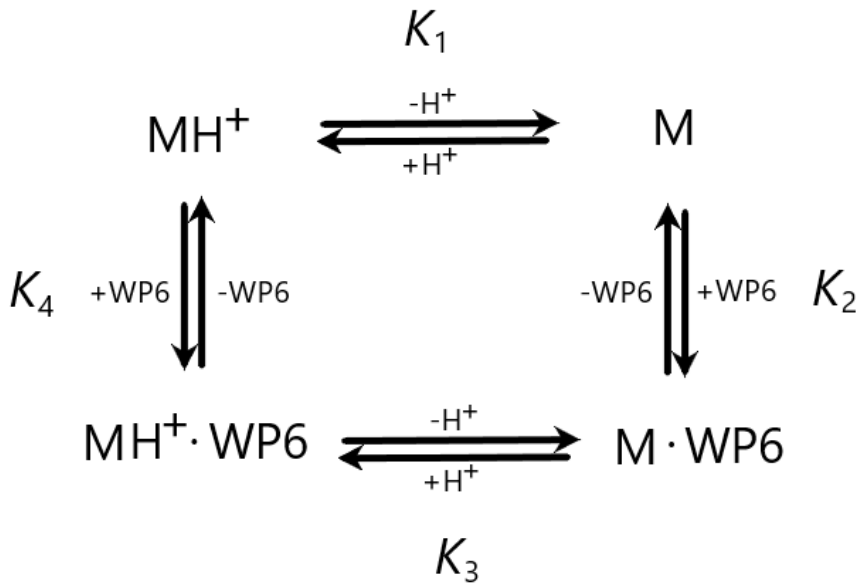
A fejezet alapjául a *Complexes of carboxylato pillar[6]arene with Brooker-type merocyanines: Spectral properties, pK$_a$ shifts and the design of a displacement assay for trimethyl lysine* című közlemény szolgál. [165]

VI.2.1. A merocianin-pillér[6]arén rendszer reakciósémája

A merocianin festék – pillérarén rendszer négy egyensúllyal jellemezhető:

- a kationos fenol-forma savas disszociációja (K_1)
- a fenol-forma komplexképzése pillérarén gazdamolekulával (K_4)
- az ikerionos forma komplexképzése pillérarén gazdamolekukával (K_2)
- fenolos forma komplexének savas disszociációja (K_3)

A négy reakció az 59. ábrán látható módon ciklust alkot.



58. ábra: A merocianin-pillérarén rendszerek reakciósémája

Az egyensúlyi állandók nem függetlenek egymástól, ami a ΔG = -RTlnK összefüggés alapján is belátható. Mivel a G szabadentalpia állapotfüggvény, mindegy, hogy az 58. ábrán látható ciklus két kiválasztott pontja között milyen úton haladunk, ΣΔG-nek, és így ΣlnK-nak ugyanaz lesz az értéke.

Az egyensúlyi állandók között az alábbi kapcsolat van:

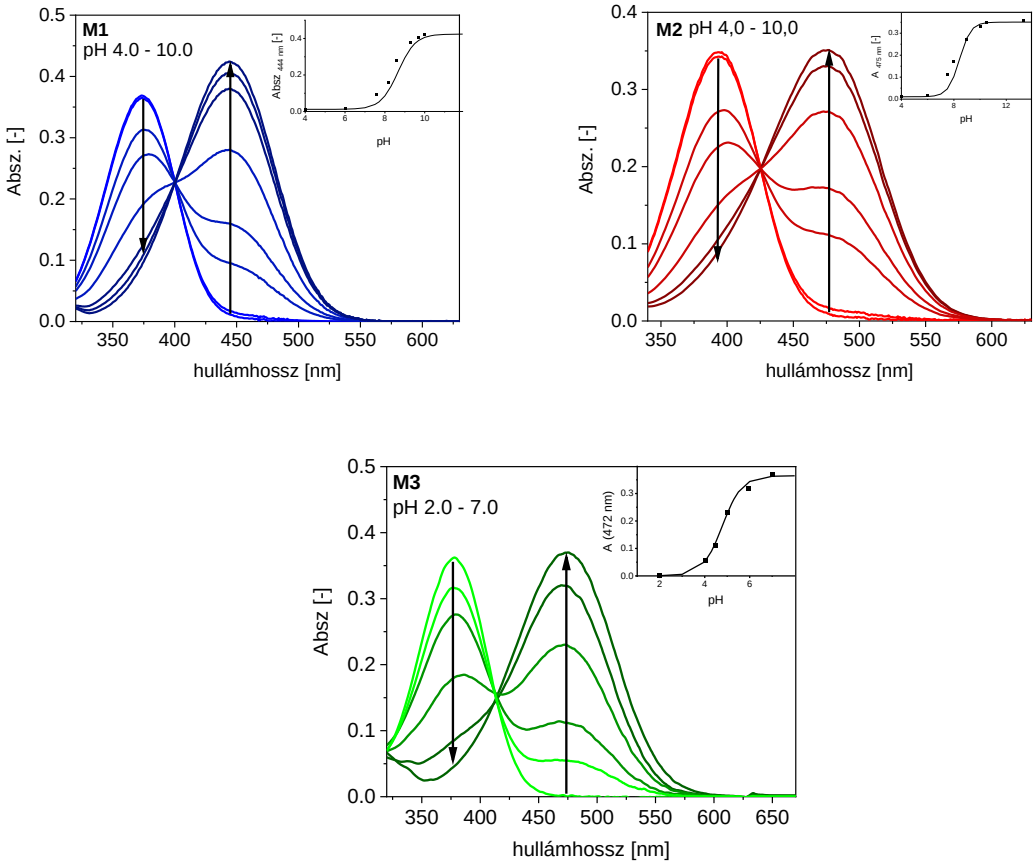
$$\frac{K_1}{K_3} = \frac{K_2}{K_4} \tag{69}$$

Eszerint, a négy egyensúlyi állandó közül bármelyik három ismeretében számítható a negyedik. Azonban a közvetett módon meghatározott egyensúlyi állandó hibája nagy lehet,

így a négy egyensúlyi állandót – ahol erre volt lehetőség – független mérésekből határoztuk meg.

VI.2.2. Abszorpciós kísérletek, savi disszociációs állandók meghatározása

Meghatároztuk a savi disszociációs állandó értékét mindhárom vegyületre abszorpciós kísérletekkel (59. ábra) Britton-Robinson pufferben, az ionerősséget egységesen I= 0,2 M értéken tartva. A három merocianin fenolos alakjának pK_a értékét a 10. táblázatban adtam meg.



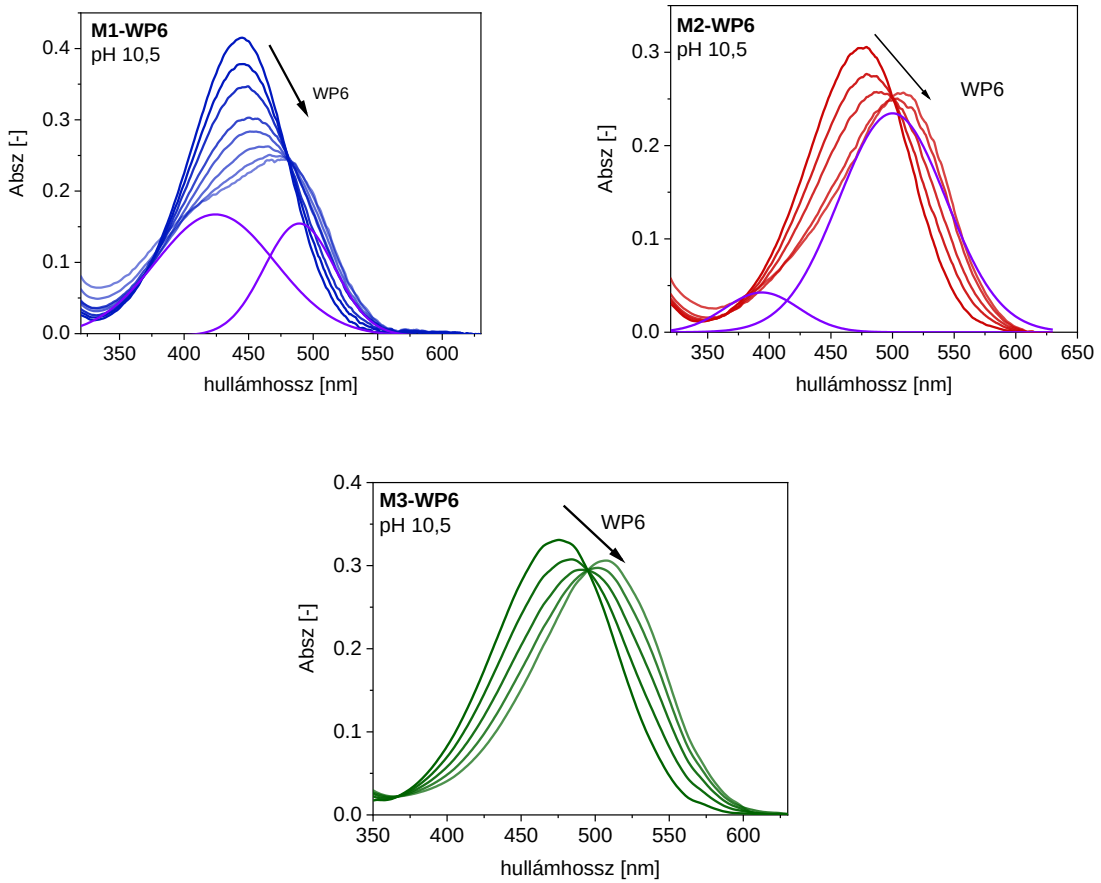
59. ábra: A merocianin jelzővegyületek abszorpciós színképe a pH függvényében ($c_M^0 = 10^{-5}$ M)

M1-re az irodalomban közölttel[164] jól egyező eredményt kaptam. Az *N*-metilpiridinium egységet tartalmazó M1 és az *N*-fenilpiridinium csoportot tartalmazó M2 savi disszociációs állandói között nem volt számottevő különbség: M1 pK_a-ja 8,66, M2 pK_a-ja 8,44 volt. Ezzel szemben a fenolcsoporton történt dibróm-szubsztitúció a disszociáció egyensúlyi állandóját három nagyságrenddel növelte, M3 pK_a-ja 4,79-nek adódott.

VI.2.3. A WP6-tal alkotott komplexek stabilitási állandói

Munkánkban a továbbiakban arra fókuszáltunk, hogy a Brooker-merocianin és két új származéka milyen erős kölcsönhatásba képes lépni WP6-tal.

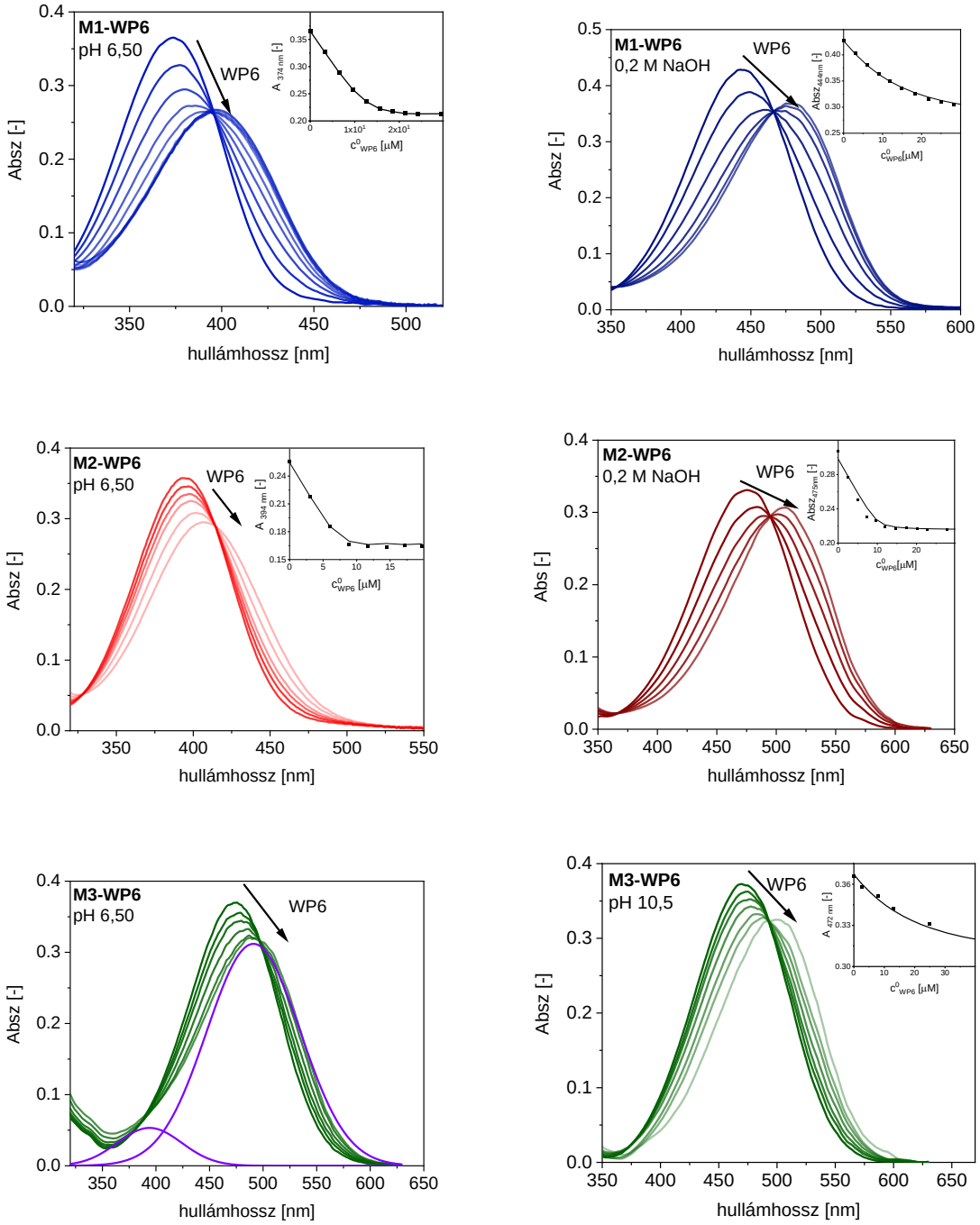
A komplex stabilitási állandók meghatározásakor kezdetben a pH-értéket 10,5-nek választottuk, melyen mind a három jelzőmolekula teljesen deprotonált formában van jelen. A kísérletek során azt tapasztaltuk, hogy a titrálás előrehaladtával az abszorpciós spektrumon két jól elkülönülő sáv jelent meg az M1 és M2 vegyületek esetében (60. ábra), míg az M3 vegyület esetében az abszorpciós sáv csak eltolódik.



60. ábra: A merocianin-WP6 rendszerek abszorpciós színképe pH=10,5 közegben (c_M=10^{-5} M) lila színnel a titrálási sor utolsó spektruma felbontva a két speciesz hozzájárulására

A kísérleti eredmények legvalószínűbb magyarázata az volt, hogy a keletkező komplex jóval gyengébb sav, mint a komplexálatlan jelzővegyület, így a pillérarént a fenolát formához adva a fenol és a fenolát forma komplexe párhuzamosan képződik. Ennek igazolására erősen bázikus (pH=13,3) illetve enyhén savas (pH=6,5) közegben megismételtük a titrálást. A savanyításnak határt szabott a pillérarén protonálódása, ami egyben a vízoldhatóságát is

lecsökkentette.[166] A 61. ábrán a savas illetve bázikus közegben felvett abszorpciós spektrumok láthatóak.



61. ábra: A merocianin-WP6 rendszerek abszorpciós színképe enyhén savas (pH=6,5) és bázikus közegben (pH=13,3 illetve M3-WP6 rendszer esetében pH= 10,5) ($c_M^0 = 10^{-5}$ M), lila színnel a titrálási sor utolsó spektruma felbontva a két speciesz hozzájárulására

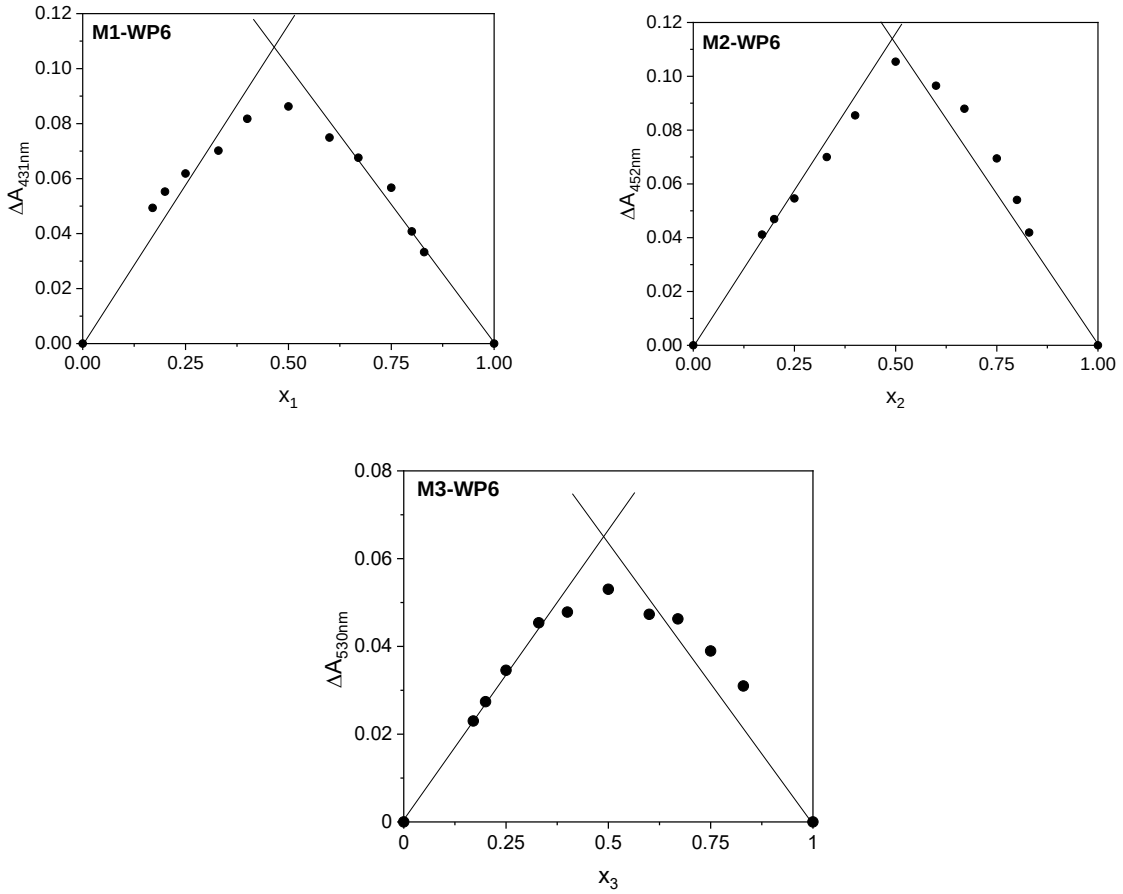
A 10. táblázatban a jelzővegyületek protonált és ikerionos alakjainak arányát adtam meg a kísérletekben alkalmazott pH-kon.

10. táblázat: M1, M2 és M3 jelzővegyületek protonáltsági foka a vizsgált pH értékeken

	pH	6,5		10,5		13,3	
	pK_a	prot (%)	neut (%)	prot (%)	neut (%)	prot (%)	neut (%)
M1	8,66	99,31	0,69	1,42	98,58	-	100
M2	8,44	98,86	1,14	0,86	99,14	-	100
M3	4,79	1,91	98,09	-	100	-	100

Látható, hogy a M3-as vegyület enyhén savas oldatában a semleges forma dominál, tehát a protonált forma komplexképzési tulajdonságáról nem kaphatunk információt kísérleti úton. A másik két vegyület esetében mind a protonált, mind a deprotonált forma komplexképződési állandóját meg tudtuk határozni az abszorpciós spektrumokból, illesztéssel.

A komplexképzés sztöchiometriáját Job-módszerrel igazoltuk a semleges (ikerionos) formák esetében (62. ábra).

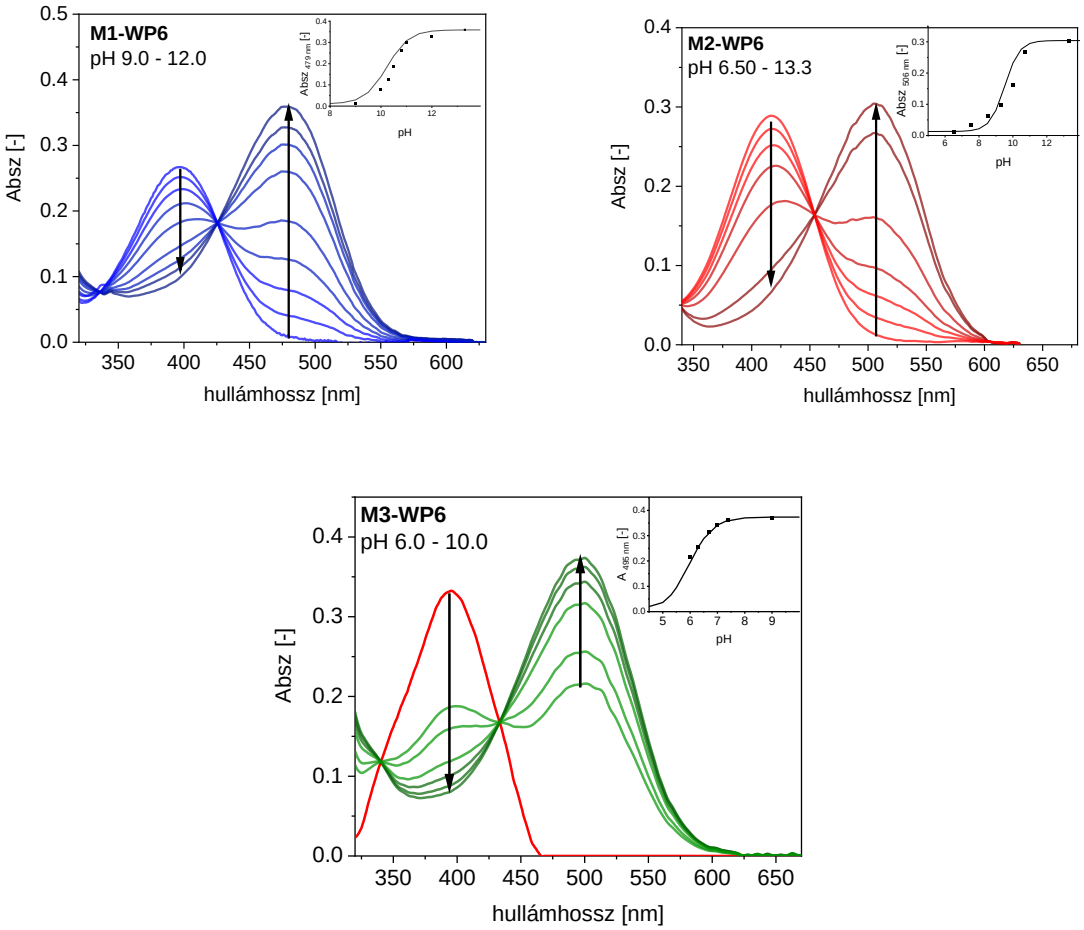


62. ábra: A merocianin-WP6 komplexek sztöchiometriájának vizsgálata Job-módszerrel

A protonált formák esetében szintén valószínűsíthető az 1:1 sztöchiometriájú komplex képződése, mivel a komplexek pH függő spektrumában van izobesztikus pont. Eszerint a

különböző pH-jú mintákban csak kétféle abszorbeáló komponens detektálható, az M:WP6 1:1 komplex mellett a másik komponens nyilván az MH^+:WP6 1:1 komplex.

A kapott stabilitási állandókat figyelembe véve elegendően nagy feleslegű és állandó makrociklus koncentráció mellett meghatároztuk a komplexek savi disszociációs állandóját (63. ábra). Az abszorpciós kísérletekben a makrociklus húszszoros feleslegben volt a jelzőmolekula mellett, így az egyensúly minden pH esetében a komplex irányába volt eltolva. Az M3 vegyület esetében nem tudtuk a komplex protonált formájának spektrumát felvenni a korábban említett oldhatósági problémák miatt, azonban az stabilitási állandó meghatározásakor ez a paraméter is meghatározható volt illesztéssel.



63. ábra: A merocianin- pillérarén komplexek abszorpciós spektrumai a pH függvényében ($c_M=10^{-5}$ M), a (c) ábrán a piros színnel jelölve az illesztésből nyert $M3H^+$:WP6 komplex spektruma

Az abszorpciós mérések alapján az egyes specieszek abszorpciós adatait a 11. táblázatban foglaltam össze.

11. táblázat: a merocianin jelzővegyületek és komplexeik elnyelési maximumai

	MH^+		M		MH^+:WP6		M:WP6	
	λ^{abs}_{max} [nm]	ε_{max} [$M^{-1}cm^{-1}$]	λ^{abs}_{max} [nm]	ε_{max} [$M^{-1}cm^{-1}$]	λ^{abs}_{max} [nm]	ε_{max} [$M^{-1}cm^{-1}$]	λ^{abs}_{max} [nm]	ε_{max} [$M^{-1}cm^{-1}$]
M1	374	36 500	444	42 800	396	26 700	479	36 500
M2	394	35 500	475	35 600	415	29 500	506	30 500
M3	377	36 700	472	37 000	394	33 100	495	37 100

VI.2.4. Egyensúlyi állandók

A K_2 komplexstabilitási állandó mindhárom rendszerre meghatározható volt lúgos oldatban. Az M3-WP6 komplex stabilitási állandóját 10,5-ös pH-jú pufferben határoztuk meg, míg az M1 - WP6 és M2 - WP6 rendszerek a spektrumait 0,2 M NaOH oldatban vettük fel.

A K_4 komplexstabilitási állandó meghatározásakor M1 - WP6 és M2 - WP6 rendszerek spektrumait pH=6,5 pufferben mértük meg. Az M3 jelzőmolekulához tartozó K_4 stabilitási állandó értékét nem tudtuk közvetlen módon megmérni, így értékét a másik három egyensúlyi állandó értékéből számítottuk:

$$K_4 = \frac{K_3 \cdot K_2}{K_1} \qquad (70)$$

Összehasonlítva a K_2 és K_4 értékeket látható, hogy K_4 értéke minden jelzőmolekula esetében egy nagyságrenddel nagyobb, mint K_2 értéke. Ez a különbség annak köszönhető, hogy a pozitív töltésű MH^+ vendégmolekulák erős elektrosztatikus kölcsönhatásba képesek lépni a többszörösen negatív töltésű WP6 gazdamolekulával.

Az M2 vegyület esetében volt a legmagasabb értéke a K_2 és K_4 komplexstabilitási állandóknak. Feltehetően a piridínium-gyűrű nitrogénjéhez kapcsolódó fenilcsoport képes mélyen behatolni a makrociklus üregébe, így a komplexet erős hidrofób kölcsönhatások is stabilizálják.

12. táblázat: az egyensúlyi állandók értékei merocianin-WP6 rendszerekben

Rendszer	Savi disszociációs állandók		Komplexstabilitási állandók (M^{-1})	
	$-\log K_1$	$-\log K_3$	K_2	K_4
M1-WP6	8,66 (8,57)[b]	10,23	$1,24 \cdot 10^5$	$1,26 \cdot 10^6$
M2-WP6	8,44	9,51	$4,90 \cdot 10^6$	$5,25 \cdot 10^7$
M3-WP6	4,79	5,99	$1,05 \cdot 10^5$	$1,66 \cdot 10^6$

[b] 164 – es hivatkozás

Az M3:WP6 és $M3H^+$:WP6 komplexek kevésbé voltak stabilak, mint az M2:WP6. Az M3 vegyületben két nagy térkitöltésű Br-csoport található a fenolátcsoport mellett orto-helyzetben, amelyek sztérikusan gátolhatják a komplexképzést. Emellett a brómcsoportok elektronpárjai elektrosztatikus taszítást fejtenek ki a pillérarén karboxilcsoportjaival szemben, ami szintén a komplex stabilitási állandójának csökkenését okozza.

VI.2.5. Indikátor-kiszorításos vizsgálatok

Megvizsgáltuk annak lehetőségét, hogy az M3 jelzővegyület pillérarénnal alkotott komplexe alkalmas-e különböző analitok kimutatására indikátor-kiszorításon alapuló szenzorként. Ennek a rendszernek előnye a M1:WP6 és M2:WP6 komplexekkel szemben, hogy fiziológiás pH értéken mind a szabad festék, mind a komplex ikerionos fenolát formában van jelen.

Analitként a lizinre (Lys) és ennek metil-szubsztituált származékaira (MeLys, Me_2Lys, Me_3Lys) esett a választásunk, mivel ezek bázikus aminosavak, így várhatóan a sokszoros negatív töltésű WP6-tal viszonylag erős komplexet képeznek.

Az oldat összetétele az alábbi két szimultán reakció egyensúlyi állandóitól függ:

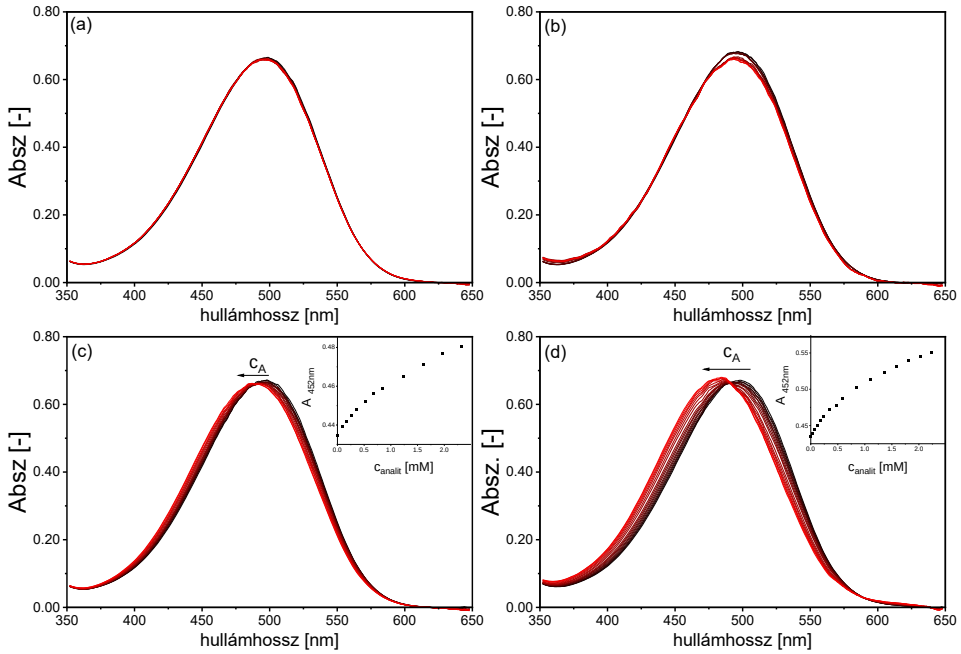
$$\mathrm{M} + \mathrm{WP6} \leftrightarrow \mathrm{M{:}\,WP6} \qquad (71)$$

és

$$\mathrm{A} + \mathrm{WP6} \leftrightarrow \mathrm{A{:}\,WP6} \qquad (72)$$

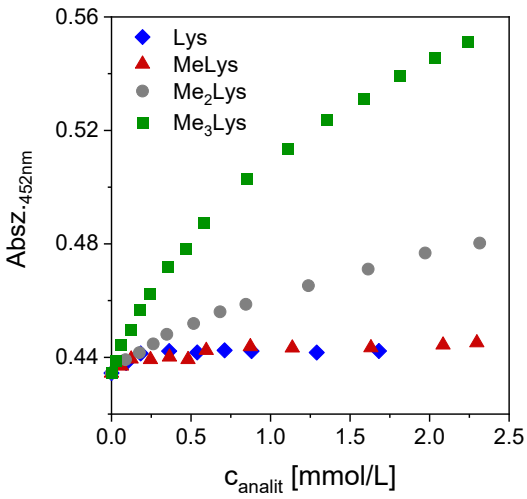
ahol A a lizinszármazék analit.

A kísérletben a jelzőmolekula bemérési koncentrációja $c^0_{M3} = 2 \cdot 10^{-5}$ M volt, a makrociklusé $c^0_{WP6} = 6 \cdot 10^{-5}$ M. A K_2 stabilitási állandó ismeretében (12. táblázat) a titrálás kezdetén ($c^0_{analit} = 0$) az oldatban a jelzővegyület 86%-ban komplexált formában volt. A titrálás során az analit mennyiségét szisztematikusan változtattuk $c^0_{analit} = 0 - 3 \cdot 10^{-3}$M között. Az M3-WP6-lizinszármazék terner rendszerek abszorpciós spektrumai a 64. ábrán tekinthetők meg.



64. ábra: Indikátor-kiszorítás M3-WP6 rendszerben, lizin (a), metil-lizin (b), dimetil-lizin (c) és trimetil-lizin (d) analittal ($c^0_{M3} = 2 \cdot 10^{-5}$ M, $c^0_{WP6} = 6 \cdot 10^{-5}$ M, $c^0_A = 0 - 3 \cdot 10^{-3}$ M)

Mint látható, a lizin és a metil-lizin esetében nem változott a spektrum még nagy mennyiségű analit hozzáadására sem. Dimetil-lizin esetén a spektrum kismértékű eltolódása figyelhető meg a koncentráció emelkedésével, azonban nagy mennyiségű analit hozzáadására sem kaptuk vissza az M3 jelzővegyületre jellemző elnyelési spektrumot. Trimetil-lizin esetében a spektrum eltolódása jóval markánsabb. Az abszorbanciaváltozást az M3 jelzővegyület elnyelési maximumában az 65. ábra szemlélteti.

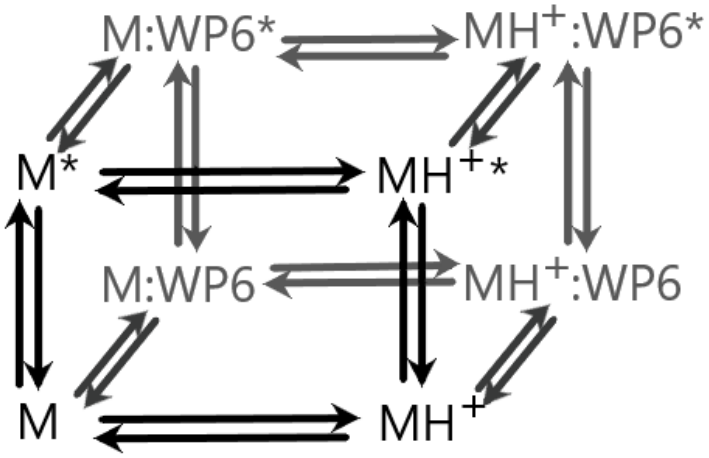


65. ábra: Az M3-WP6 elegy abszorbanciájának változása az analit koncentrációjának függvényében ($c^0_{M3} = 2 \cdot 10^{-5}$ M, $c^0_{WP6} = 6 \cdot 10^{-5}$ M)

A titrálás során kapott spektrumsorozatból illesztéssel meghatároztuk a Me_3Lys:WP6 és a Me_2Lys:WP6 komplex stabilitási állandóit (ennek részletes menete a Függelék VIII.3. részében olvasható). Me_3Lys esetében $K=2{,}7\cdot10^3$ M^{-1}, míg Me_2Lys csaknem egy nagyságrenddel kisebb stabilitási állandót kaptunk eredményül $K=6{,}6\cdot10^2$ M^{-1}. A különbség a stabilitási állandókban abból származhat, hogy a metilszubsztituensek számával nő az aminocsoport hidrofób jellege,[167] a Me_3Lys-WP6 komplexet az elektrosztatikus kölcsönhatások mellett erős hidrofób hatás is stabilizálja. Összehasonlításképp, az eggyel kisebb gyűrű-tagszámú WP5 esetében a Lys sokkal stabilabb komplexet képez, mint a Me_3Lys, ebben az esetben tehát az aminocsoport mérete dönti el a stabilitási állandók sorrendjét.[168]

VI.2.6. A Brooker-merocianin komplexképzése WP6-tal: fluoreszcencia-vizsgálatok

Az M1, M2, M3 merocianinok komplexképzési és protolitikus reakcióira felrajzolt séma (58. ábra) kiegészíthető a gerjesztett állapotú specieszek reakcióival. Így a 66. ábrán látható sémához jutunk, amelyen át tudjuk tekinteni, hogy a fluoreszcenciás vizsgálatokkal milyen specieszekről és milyen folyamatokról kapunk információt.



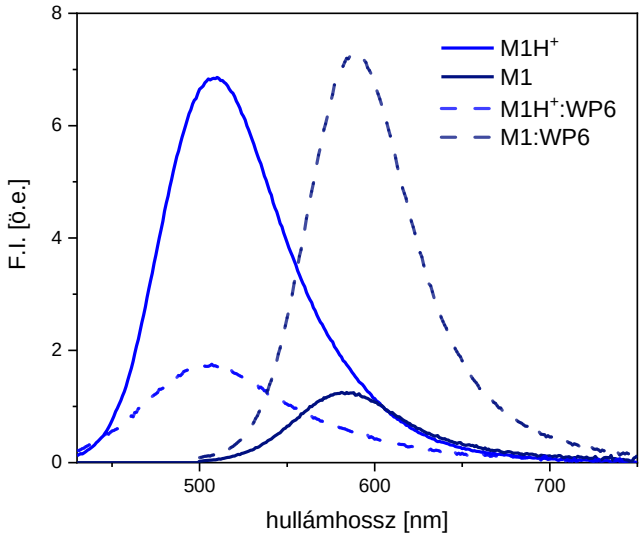
66. ábra: A Brooker-merocianin alap és gerjesztett állapotú protonálódási és komplexképzési egyensúlyai

Az eredményeket az M1 Brooker-merocianin példáján mutatjuk be. M1 fenolos és fenolátos formájának gerjesztett állapotú tulajdonságaival több tanulmányban is foglalkoztak.[164,169,170] Megállapították, hogy

- az ikerionos forma, M1, gerjesztett állapotban stabil, megőrzi transz-szerkezetét,
- a fenolos forma $M1H^+$ a gerjesztést követően részben cisz-izomerré alakul,
- a cisz-$M1H^+$ nem fluoreszkál.

Vizsgálataink során meghatároztuk a négy speciesz, M1, $M1H^+$, M1:WP6 és $M1H^+$:WP6 fluoreszcenciás jellemzőit. Ehhez $2 \cdot 10^{-6}$ M koncentrációjú M1 oldatokat használtunk. A komplexek spektrumának méréséhez használt minták 20 ekvivalens WP6-ot tartalmaztak. Az oldószer 6,5 pH-jú puffer volt (M1, M1:WP6), ill. 0,2 M-os NaOH ($M1H^+$, $M1H^+$:WP6). A gerjesztés a megfelelő minta izobesztikus pontjában történt.

A spektrumokat az 67. ábrán mutatom be. Az abszorpciós adatokat (11. táblázat) kiegészítettem a fluoreszcencia-jellemzőkkel, melyeket a 13. táblázatban gyűjtöttem össze.



67. ábra: Az M1-nek és WP6 komplexének fluoreszcenciaspektruma

13. táblázat: az M1 vegyület formáinak és ezek komplexeinek elnyelési és emissziós maximumai

speciesz	λ^{abs}_{max} [nm]	ε_{max} [$M^{-1}cm^{-1}$]	λ^{flu}_{max} [nm]	Φ_f	Stokes-eltolódás [cm^{-1}]
M1	444	42 800	583	0,002	5 370
$M1H^+$	374	36 500	509	0,013	7 092
M1:WP6	479	36 500	588	0,012	3 870
$M1H^+$:WP	396	26 700	505	0,004	5 451

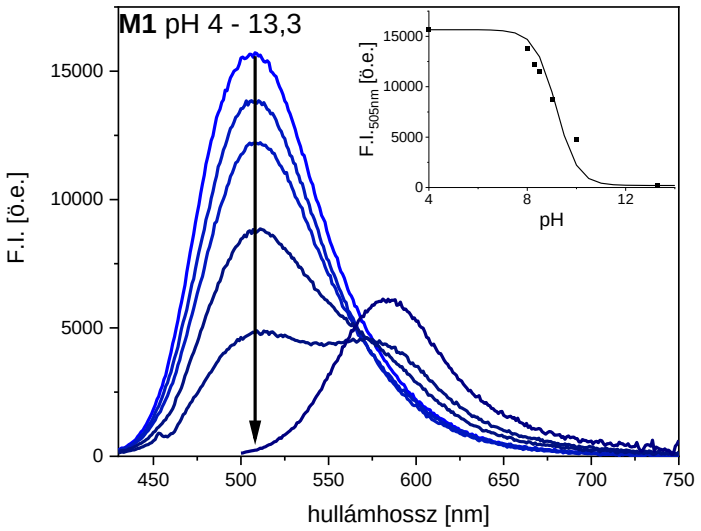
A spektrumok alapján a Brooker-merocianin sokoldalú fluoreszcenciás jelzőanyag. Előnye, hogy két fluoreszkáló protikus alakja van (M1 és $M1H^+$), és, hogy mindkét formának nagy a Stokes-eltolódása. Az M1:WP6 komplex nagy fluoreszcencia-kvantumhatásfoka a szabad M1-éhez képest arra utal, hogy M1 nem csak kolorimetrikus, hanem fluoreszcencia indikátor-kiszorításos assay készítésére is alkalmas. Mértünk fluoreszcenciaszínképeket

glicerin-víz elegyekben is. Ezek azt bizonyították, hogy M1 fluoreszcencia-intenzitása erősen nő a viszkozitással, tehát M1 viszkozitásszenzorként is működik.

A 66. ábrán összefoglalt reakciókat fluoreszcenciaspektroszkópiai kísérletekkel is vizsgáltam. Általános elvként elmondható, hogy a reakcióelegyekről felvett fluoreszcenciaspektrumok sokszor nem a gerjesztett állapotú specieszek reakcióját tükrözik, hanem az alapállapotú specieszek reakcióját, és a fluoreszcenciaintenzitások az alapállapotú komponensek egyensúlyi koncentrációival arányosak. Ugyanis, a kémiai reakciók többsége lassú a gerjesztett állapotú reaktáns/termék dezaktiválódásához képest. Néhány gyors reakció, így a gerjesztett állapotú protontranszfer erősen savas közegben, azért hatással lehet a fluoreszcenciatulajdonságokra.

M1 savas disszociációja

A p$K_{1,F}$-et megkíséreltük megmérni a fluoreszcenciaspektrum pH-függése alapján (68. ábra). Az egyes mintákról több spektrumot is felvettünk, így ellenőrizve, hogy a mérés ideje alatt van-e számottevő transz-cisz fotoizomerizáció, azaz csökken-e a fluoreszcencia-intenzitás. Az intenzitás csak kicsit csökkent. A spektrumokból illesztéssel számított p$K_{1,F}$ = 9,18, ami közel esik az abszorpciós spektrumokból számított pK_a = 8,66 értékhez. Mint erről korábban szó volt, ha a disszociáció lassú a gerjesztett állapot lecsengéséhez képest, akkor p$K_{1,F}$ inkább az alapállapotú Brönsted-sav disszociációját jellemzi.



68. ábra: M1 fluoreszcencia-színképe különböző pH értékeken

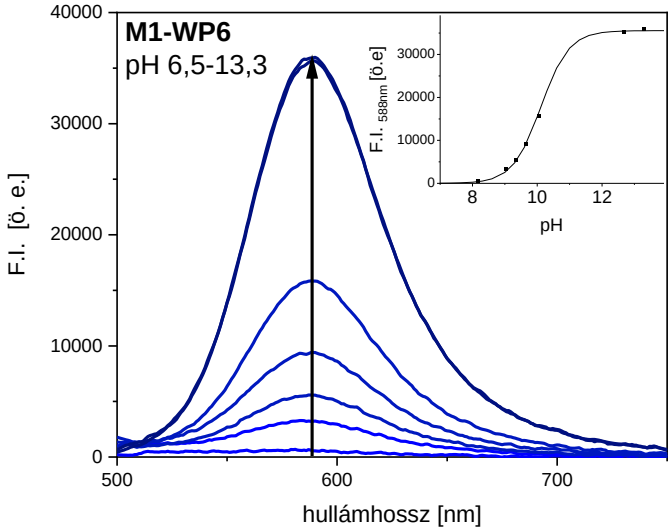
($c_M^0 = 2 \cdot 10^{-6}$ M λ_{ex} =399 nm pH=4 - 13,3)

A spektrumokon megfigyelhető, hogy két sáv aránya változik a pH függvényében. A kisebb hullámhosszon észlelt sávok a protonált formához rendelhetők, a nagyobb hullámhosszú az ikerionos merocianinhoz. Jobb lehetőség pK_1* meghatározására a Förster-ciklus. A 60. ábrán látható abszorpciós színképéből és az 68. ábrán látható fluoreszcenciaszínképéből pK_1* = 1,38-nak adódott. Korábban Kuder és munkatársai hasonló értéket kaptak (pK_1*=1,85).[164] Arra lehet következtetni tehát, hogy M1 erősen fotoacidikus. Ezt a különböző pH-kon mért fluoreszcenciaspektrumokból számított p$K_{1,F}$ nem tükrözte.

Az M1·WP6 komplex savas disszociációja

A fenolos forma komplexének savas disszociációs állandója meghatározható a fluoreszcenciaszínkép pH-függéséből, mivel feltételezhető, hogy a komplexben $M1H^+$ transz-cisz fotoizomerizációja gátolt.

A kísérleteknél a WP6 ötven ekvivalens feleslegben volt a festék mellett, így az egyensúly gyakorlatilag teljesen a komplexképződés irányába toltuk el. A kísérleteket Britton-Robinson puffersorozatban végeztem, melynek ionerősségét KCl-dal állítottam be (I=0,2 M). Az emissziós spektrumok felvételekor olyan gerjesztési hullámhosszat választottam, ahol kizárólag az M1:WP6 nyel el (λ_{ex} = 500 nm).



69. ábra: Az M1·WP6 komplex emissziós spektrumának pH-függése

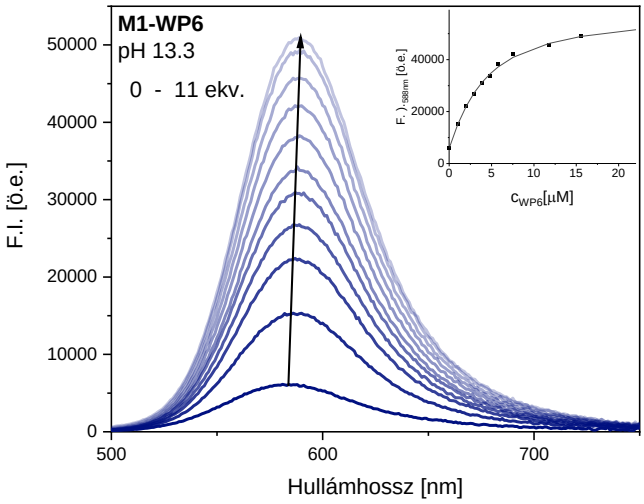
($c_M^0 = 2 \cdot 10^{-6}$ M, λ_{ex} = 500 nm, pH= 6,5 – 13,3)

A spektrumsorozaton megfigyelhető (69. ábra), hogy a sáv intenzitása nő a pH növekedésével. Illesztéssel a komplex p$K_{3,F}$ értéke 10,11, ami közel esik az abszorpciós spektrumokból meghatározott pK_3 = 10,23 értékekhez. Förster-ciklussal kiszámítottuk pK_3*-ot.

Az 63. és 67. ábrán látható spektrumokból a protonált festék komplexének, $M1H^{+}\cdot WP6$ –nak $\tilde{\nu}_{00}$ gerjesztési energiája 22 200 cm^{-1}, míg az ikerionos forma komplexé 18 500 cm^{-1}. Ezekből a komplex gerjesztett állapotú savi disszociációs állandója pK_3^*=2,59. Gerjesztett állapotban tehát a komplex sokkal erősebb sav, mint alapállapotban, de ez a stacionárius fluoreszcenciaszínképekből nem látszik.

Az ikerionos forma komplexképzése

A komplexképződés fluoreszcenciás vizsgálatát M1 0,2 M-os NaOH oldatával végeztem, a festék kiindulási koncentrációja $c_M^0 = 2 \cdot 10^{-6}$ M volt, amelyhez 0 - 11 ekvivalens WP6-ot adagoltam. A gerjesztési hullámhossz az abszorpciós spektrumok izobesztikus pontján, 466 nm-en történt. A spektrumok a 70. ábrán láthatók. A fluoreszcenciasáv 583 nm-ről 588-nm-re tolódott, az intenzitás pedig 8,8-szorosra növekedett.

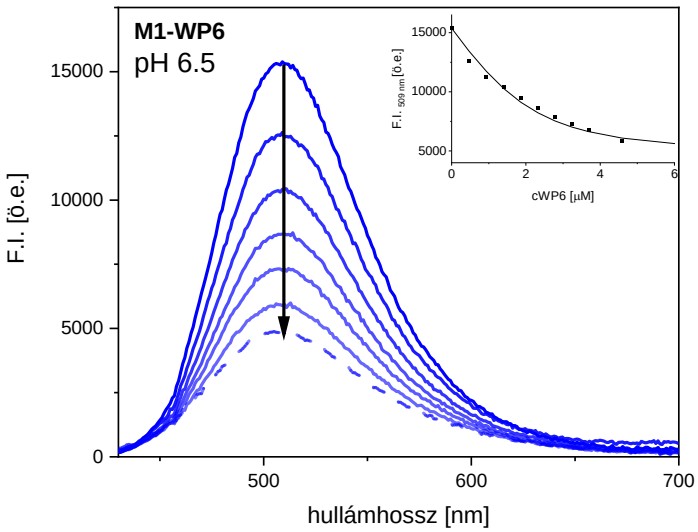


70. ábra: M1 fluoreszcenciaszínképének változása WP6 adagolás hatására ($c_M^0 = 2 \cdot 10^{-6}$ M, $c_{WP6}^0 = 0 - 2,2 \cdot 10^{-5}$ M, λ_{ex}=466 nm)

A spektrumsorozatokból meghatároztam a komplexképződés egyensúlyi állandóját, amire $K_{2,F}$=3.18·10^5 M^{-1} et kaptam. Ez nagyságrendben egyezik az abszorpciós spektrumokból meghatározott K_2=1.24·10^5 M^{-1} értékkel, bár az eltérés nagyobbnak tűnik a mérés hibájánál. A két módon meghatározott egyensúlyi állandó között nem várható számottevő eltérés, mivel nem várható, hogy az alapállapotú komplexképződés és –bomlás dinamikus egyensúlyának megfelelő koncentrációk a fluoreszcenciás mérés során sokat változzanak.

A gerjesztett állapotú fenol-forma komplexképzése

A komplexképződés fluoreszcenciás vizsgálatát 6,5-ös pH-jú Britton-Robinson pufferben végeztem, a festék kiindulási koncentrációja $c_M^0 = 2 \cdot 10^{-6}$ M volt, amelyhez 0 - 5 ekvivalens WP6-ot adagoltam. A gerjesztési hullámhossz az abszorpciós spektrumok izobesztikus pontján, 395 nm-en történt. A kísérleti spektrumok a 71. ábrán láthatók. Az emissziós sáv 509 nm-ről 505 nm-re tolódott, miközben a sáv intenzitása harmadára esett le.



71. ábra: M1H⁺ fluoreszcenciaszínképének változása WP6 adagolás hatására

($c_M^0 = 2 \cdot 10^{-6}$ M, $c_{WP6}^0 = 0 - 10^{-5}$ M, λ_{ex}=395 nm)

A spektrumsorozatból illesztéssel meghatároztuk a komplexképződés stabilitási állandóját, mely $K_{4,F}$=1,76·10^{6}M^{-1}-nek adódott. Összevetve az abszorpciós kísérletből származó értékkel (K_4=1,26·10^{6}M^{-1}) megállapíthatjuk, hogy a fluoreszcencia- és az abszorpciós spektroszkópiai vizsgálat hasonló eredményre vezet. A fluoreszcenciaspektrumok értékelése bizonytalan a fenolforma transz-cisz fotoizomerizációja miatt, így nem várható teljes egyezés a két módszerrel meghatározott stabilitási állandó értékében.

VII. A doktori munka összefoglalása

Doktori kutatómunkám során fluoreszcens próbák protolitikus reakcióit vizsgáltuk abszorpciós és fluoreszcenciaspektroszkópiai módszerekkel. A vizsgált vegyületek közül a kumarin 102 (C102), a 4'-dietilamino-3-hidroxiflavon (FET) és a Brooker-merocianin (M1) jól ismert jelzőanyag, amelyek szolvatokróm tulajdonságaival számos publikáció foglalkozott. Sokféle anyagtudományi és sejtbiológiai kutatásban alkalmazzák őket, amelyekben a minták gyakran vizes oldatok, vizes kolloid rendszerek, vagy víztartalmú növényi és állati szövetek. Mindazonáltal a C102 és a FET szerkezetéről, spektroszkópiai jellemzőiről és sav-bázis reakcióiról vizes oldatban csak kevés ismeret van, kutatásaimmal ezt a hiányt szerettem volna pótolni. A Brooker-merocianin fotokémiai tulajdonságai vizes közegben jobban ismertek, ez az anyag referenciaként szolgált másik két merocianin jelzőanyag vizsgálatában, amelyek új vegyületek voltak, M1-től eltérő szolvatokróm és sav-bázis tulajdonságokkal.

Elsőként a C102 protolitikus tulajdonságait tanulmányoztuk. Meghatároztuk a vegyület pK_a és pK_a* értékét, melynek eredményeként azt találtuk, hogy a vegyület gerjesztett állapotban kevésbé savas karakterű. Gerjesztést követően – amennyiben a pH viszonyok ezt lehetővé teszik - protont vesz fel, és a protonált forma más hullámhosszon mutat emissziót, mint a semleges vegyület. Tehát, a C102 fluoreszcenciás pH-szenzorként működik. A fluoreszcencia lecsengési görbék alapján meg tudtuk határozni a protonálódás kinetikai profilját.

Kísérleti eredményeinket kvantumkémiai számításosokkal egészítettük ki. A számítások részben arra irányultak, hogy alapállapotban létezik-e kumarin-víz komplex, illetve gerjesztett állapotban mi ennek a sorsa. A számítások valószínűsítették, hogy alapállapotban vizes közegben dominál a víz-komplex, melyben a vízmolekula a C102 karbonilcsoportjához kötődik. Gerjesztett állapotban ez a komplex elbomlik. A számításokból arra is következtetni lehet, hogy alapállapotban a protonálódás a C102 aminocsoportján történik, míg gerjesztett állapotban a karbonilcsoportján.

A FET szerves oldószerekben kettős fluoreszcenciát mutató jelzőanyag: a gerjesztéssel közvetlenül létrejövő N* forma intramolekuláris protontranszferrel (ESIPT) a T* fototautomerré alakul. Vizes oldatban csak az N* forma fluoreszcenciáját észleltük. Dolgozatomban a FET sav-bázis egyensúlyaival foglalkoztam, illetve a vegyület vízkomplexének fotofizikai és termodinamikai tulajdonságait igyekeztünk feltárni.

Meghatároztuk vizes oldatban a vegyület két savi disszociációs állandóját (pK_{a1}=4,50 és pK_{a2}=9,70), valamint az egyes specieszek kvantumhatásfokát és élettartamát. Förster-ciklussal megbecsültük a gerjesztett állapotú savi disszociációs állandó értékét (pK_{a2}*=8,05).

A FET vízkomplexét aceton-víz oldószerelegyekben tanulmányoztuk. Azt találtuk, hogy alacsony vízkoncentráció mellett a fluoreszcencia erősödik. Ez olyan FET-víz komplexnek tulajdonítható, melynek a vízmolekulája nem lép kölcsönhatásba a többi vízmolekulával. A víz koncentrációját növelve kioltás tapasztalható, ekkor a FET kölcsönhat a vízmolekulákból álló hidrogénkötéses hálózattal. Meghatároztuk a FET vízzel alkotott komplexének egyensúlyi állandóját ($K=4,5\cdot10^{-2}$ M^{-1}), és a komplex fluoreszcencia kvantumhasznosítási tényezőjét, valamint a lecsengési görbékből a vízkomplex fluoreszcencia élettartamát.

Elméleti számításokat végeztünk, amelyek megmutatták, hogy a gerjesztett FET-víz komplexben gyengébb az intramolekuláris hidrogénkötés és erősebb az intermolekuláris hidrogénkötés, mint alapállapotú komplexben. Mindkét hatás az ESIPT folyamat ellenében hat, ami összhangban van azzal, hogy a vizes oldat fluoreszcenciaszínképében csak az N* forma sávja jelenik meg.

Kutatásaim harmadik részében a Brooker-merocianinnak (M1) és két származékának (M2, M3) protolitikus egyensúlyait vizsgáltuk és komplexképzésüket a vízoldható WP6 pillérarén makrociklussal. Az M2 és M3 merocianinszármazék új vegyületek voltak. A vizsgált merocianinokanak van egy piridinium-fenol (protonált) és egy piridinium-fenolát (ikerionos) protikus formája. A festék-makrociklus rendszerek négy egyensúllyal írhatók le, amelyek az ikerionos szabad merocianin, ill. komplexének protonálódása, $M+H^+ \leftrightarrow MH^+$; $M:WP6+H^+ \leftrightarrow MH^+:WP6$, ill. a komplexképzési reakciók $M+WP6 \leftrightarrow M:WP6$; $MH^+ + WP6 \leftrightarrow MH^+:WP6$. Abszorpciós spektroszkópiai mérésekkel meghatároztuk az egyensúlyi állandókat. A szabad festékek erősebb savnak bizonyultak a komplexeknél, az előbbiek pK_a értéke 1-1,6 egységgel volt kisebb. A protonált merocianinok WP6 komplexének stabilitási állandója néhány nagyságrenddel nagyobb volt, mint az ikerionos merocianinoké.

Az M1 próba esetén a protolitikus és komplexképzési reakciókat fluoreszcenciaspektroszkópiai mérésekkel is vizsgáltuk. Az abszorpciós spektroszkópiai kísérletekkel nyert savi disszociációs állandókhoz és komplex stabilitási állandókhoz hasonló értékeket kaptunk, ami arra utal, hogy a vizsgált kémiai reakciók lassúak a gerjesztett állapot dezaktiválódásához képest.

A FET és az M3 jelzőanyagokat potenciális kémiai szenzorokként is teszteltük. Demonstráltuk, hogy a FET fluoreszcens ATP-szenzorként működik – több más dialkilamino-3-hidroxiflavonhoz hasonlóan. A spektroszkópiai változásokat a FET és az ATP közötti gerjesztett állapotú protontranszfer okozhatja.

Az M3:WP6 rendszert indikátor-kiszorításos assay-ként teszteltük. Előnye, hogy az M3:WP6 komplex pK_a értéke közel áll a fiziológiás értékhez. Analitként a lizint (Lys) és metil-szubsztituált származékait (MeLys, Me_2Lys és Me_3Lys) választottuk. A kísérletek azt mutatták, hogy a Lys és MeLys egyáltalán nem tudta kiszorítani az indikátort a komplexből. A Me_2Lys hatására kismértékű kiszorítás történt, a Me_3Lys esetén a változás markáns volt, szabad szemmel is látható színváltozást okozott.

VIII. Függelék

Abszorpciós és fluoreszcencia-spektrumok szimulálása

A kvantumkémiai számítások megadják az egyes elektronátmenetekhez tartozó gerjesztési energiákat és oszcillátorerősségeket. Ezek ismeretében számítható az abszorpciós és fluoreszcencia spektrum.

Abszorpciós spektrumok szimulálása

Egy adott elektronátmenet oszcillátorerőssége és a spektrumban ehhez rendelhető sáv alatti terület között az alábbi összefüggés áll fent:

$$f = \frac{4 \cdot m_e \cdot c^2 \cdot \ln 10}{N_A \cdot e^2} \cdot A \qquad \text{(F1)}$$

ahol f a számítás eredményeként kapott oszcillátorerősség

Az oszcillátorerősségeket felhasználva a sávokat Gauss-görbékkel közelítettem. Az *i*-ik sáv egyenlete:

$$\varepsilon_i(\tilde{\nu}) = \frac{f}{4{,}319 \cdot 10^{-9} \cdot \Gamma_{1/2,i} \sqrt{\frac{\pi}{2}}} \cdot e^{\frac{-2\left(\tilde{\nu} - \tilde{\nu}_{e,i}\right)^2}{\Gamma_{1/2,i}^2}} \qquad \text{(F2)}$$

ahol $\Gamma_{1/2,i}$ a félértékszélesség (0,2-0,4 eV közötti érték)[171],

$\tilde{\nu}_{e,i}$ az adott elektronátmenethez tartozó gerjesztési energia,

$\tilde{\nu}$ a hullámszám.

A spektrumok az így számított sávok összegeként adódtak.

Fluoreszcenciaspektrumok szimulálása

A fluoreszcenciaspektrumok szimulálásakor az $S_1 \rightarrow S_0$ átmenetre számított oszcillátorerősségből az (F2) egyenletnek megfelelően hullámszám-függvényt szimuláltunk, majd ezt hullámhossz-skálára számítottuk át.

Abszorpciós spektrum esetében a hullámszám-hullámhossz konvertálás egyszerű átskálázást jelent, míg fluoreszcenciaspektrum esetében az alábbi összefüggés érvényes:[6]

$$I_F(\tilde{\nu}) = \lambda^2 I_F(\lambda) \qquad \text{(F3)}$$

ahol $I_F(\tilde{\nu})$ a fluoreszcencia-intenzitás a hullámszám függvényében,

$I_F(\lambda)$ a fluoreszcencia-intenzitás a hullámhossz függvényében,

λ a hullámhossz.

Az abszorpciós és emissziós spektrum felbontása Gauss-görbékre

A vizsgált vegyületek esetében az elektronátmenetek Gauss-görbe-szerű lefutásúak voltak, így két vagy több speciesz relatív mennyiségének meghatározásához a spektrumokat felbontottam.

Abszorpciós spektrum esetén az abszorbancia-hullámhossz függvényt abszorbancia-hullámszám függvénnyé alakítottam, majd megbecsültem a spektrumban az átmenetek számát. Az egyes átmeneteket egy-egy Gauss-görbével közelítettem az (F2) egyenletnek megfelelően, majd a görbéket összegeztem hullámszám szerint és az így számított spektrumot összevetettem a kísérleti spektrummal.

A számított és kísérleti spektrum közötti eltérés négyzetét minimalizáltam iterációs eljárással Microsoft Excel Solver bővítménnyel, az eljárás során a Gauss-görbék paramétereit változtatva.

A fluoreszcenciaspektrumok felbontása hasonlóképpen történt, miután az intenzitás-hullámhossz függvényt intenzitás-hullámszám függvénnyé alakítottam, az (F3) egyenletnek megfelelően.

Egyensúlyok indikátor-kiszorításos rendszerekben

A vizsgált rendszerünkben a kiszorítás eredményeként egyszerre két egyensúly áll fenn: a gazda (G) és a vendég (V), illetve a gazda és az analit (A) között ún. kompetitív egyensúly valósul meg.

Az gazda-vendég komplex képződésére felírható reakcióegyenlet:

$$\mathrm{G} + \mathrm{V} \overset{K_2}{\rightleftharpoons} \mathrm{GV} \qquad \text{(F4)}$$

egyensúlyban: $c_G^0 - x - y \qquad c_V^0 - x \qquad x$

$$K_2 = \frac{[GV]}{[G][V]} = \frac{x}{(c_G^0 - x - y)(c_V^0 - x)} \qquad \text{(F5)}$$

ahol c_G^0 és c_V^0 a gazda- és a vendégmolekula bemérési koncentrációja

[G], [V] és [GV] a gazda-, a vendégmolekula és a gazda-vendég komplex egyensúlyi koncentrációja

Az F4 egyenlettel párhuzamosan megvalósul egy gazda-analit egyensúly, melynek reakcióegyenlete:

$$K_5$$

$$\mathrm{G} \quad + \quad \mathrm{A} \quad \rightleftharpoons \quad \mathrm{GA} \tag{F6}$$

egyensúlyiban: $\mathrm{c_G^0 - x - y}$ $\mathrm{c_A^0 - y}$ y

$$K_5 = \frac{[\mathrm{GA}]}{[\mathrm{G}][\mathrm{A}]} = \frac{\mathrm{y}}{(\mathrm{c_G^0 - x - y})(\mathrm{c_A^0 - y})} \tag{F7}$$

ahol c_A^0 : a vendégmolekula bemérési koncentrációja,

[A] és [GA] az analit és a gazda-analit komplex egyensúlyi koncentrációja.

A két egyensúlyt együtt kezelve a következő harmadfokú egyenletet kapjuk:

$$(K_2 \cdot K_5 - K_2^2) \cdot x^3 + (2 \cdot K_2^2 \cdot \mathrm{c_V^0} + K_2 + K_2 \cdot K_5 \cdot \mathrm{c_A^0} - K_2 \cdot K_5 \cdot \mathrm{c_V^0} - K_2 \cdot K_5 \cdot \mathrm{c_G^0} - K_5 + \\ + K_2^2 \mathrm{c_G^0}) \cdot x^2 + [(K_2 \cdot K_5 \cdot \mathrm{c_V^0} \cdot \mathrm{c_G^0} - K_2 \cdot K_5 \cdot \mathrm{c_A^0} \cdot \mathrm{c_V^0} - K_2 \cdot \mathrm{c_V^0} - 2 \cdot K_2^2 \cdot \mathrm{c_V^0} \cdot \mathrm{c_G^0} - K_2^2 \cdot (\mathrm{c_V^0})^2] \cdot \\ \cdot x + K_2^2 \cdot (\mathrm{c_V^0})^2 \cdot \mathrm{c_G^0} = 0 \tag{F8}$$

A harmadfokú egyenlet általános alakja

$$ax^3 + bx^2 + cx + d = 0 \tag{F9}$$

az (F8) egyenlet együtthatói a következők:

$$a = K_2 \cdot K_5 - K_2^2 \tag{F10}$$

$$b = 2 \cdot K_2^2 \cdot \mathrm{c_V^0} + K_2 + K_2 \cdot K_5 \cdot \mathrm{c_A^0} - K_2 \cdot K_5 \cdot \mathrm{c_V^0} - K_2 \cdot K_5 \cdot \mathrm{c_G^0} - K_5 + K_2^2 \mathrm{c_G^0} \tag{F11}$$

$$c = K_2 \cdot K_5 \cdot \mathrm{c_V^0} \cdot \mathrm{c_G^0} - K_2 \cdot K_5 \cdot \mathrm{c_A^0} \cdot \mathrm{c_V^0} - K_2 \cdot \mathrm{c_V^0} - 2 \cdot K_2^2 \cdot \mathrm{c_V^0} \cdot \mathrm{c_G^0} - K_2^2 \cdot (\mathrm{c_V^0})^2 \tag{F12}$$

$$d = K_2^2 \cdot (\mathrm{c_V^0})^2 \cdot \mathrm{c_G^0} \tag{F13}$$

A harmadfokú egyenlet megoldása bonyolult, jelen dolgozatban nem részletezem.

Az egyes spektrumok értékelésekor $\mathrm{c_V^0}$, $\mathrm{c_G^0}$ és $\mathrm{c_A^0}$ bemérési koncentrációkat ismerjük, K_2 értékét független kísérletből meghatározzuk. K_5 értékét szisztematikusan változtatva megkapjuk azt a spektrumsorozatot, amely a legkisebb hibával írja le a kísérleti spektrumot. Feltételezve, hogy az elegyek abszorpciója a vizsgált tartományban csak a V indikátor vendégmolekula és a GV komplex abszorpciójából adódik, az A analitnak és a GA komplexnek nincs mérhető abszorpciója,

$$\mathrm{A}^\lambda = \mathrm{A_{GV}^\lambda} + \mathrm{A_V^\lambda} = \left(\varepsilon_{\mathrm{GV}}^\lambda \cdot \mathrm{c_{GV}} + \varepsilon_{\mathrm{V}}^\lambda \cdot \mathrm{c_V}\right) l \tag{F14}$$

Az illesztés menete a II.3.1. fejezetben ismertetett módszerrel azonos (38. egyenlet).

IX. Irodalomjegyzék

[1] Shimomura, O.; Chalfie, M.; Tsien, R.Y. *Nobel Lectures: Chemistry: 2006 – 2010* World Scientific Publishing Co. **2014**, pp 124.

[2] (a) Betzig E. *Angew. Chem. Int. Ed*. **2015**, *54*, 8034., (b) Hell S.W. *Angew. Chem. Int. Ed*. **2015**, *54*, 8054., (c) Moerner W.E. *Angew. Chem. Int. Ed*. **2015**, *54*, 8067.

[3] Shimomura, O.; Johnson, F. H. *Biochemistry* **1969**, *8*, 3991.

[4] Bruchez, M.; Moronne, M.; Gin, P.; Weiss, S.; Alivisatos, A.P. *Science* **1998**, *281*, 2013.

[5] Gilbert, A.; Baggott, J. *Essentials of Molecular Photochemisrty*; Blackwell Science Ltd.: Oxford, **1991**, pp. 97.

[6] Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy.* New York: Kluwer; **1999**. pp 53-55.

[7] Müller, P. *Pure Appl. Chem*. **1994**, *66*, 1077.

[8] Reichardt, C.; *Org. Process Res. Dev*. **2007**, *11*, 105.

[9] Flick, E. W., *Industrial Solvents Handbook*; Noyes Data Corporation: Park Ridge, NJ, **1985**.

[10] Reichardt C. *Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry*, 2nd ed. VCH: Weinheim, **1988**.

[11] Kosower, E. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *80*, 3253.

[12] Dimroth, K.; Reichardt, C.; Siepmann, T.; Bohlmann, F. *Liebigs Ann. Chem.* **1963**, *661*, 1.

[13] Walther, D.; *J. Prakt. Chem.* **1974**, *316*, 604.

[14] Knauer, B. R.; Napier, J. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 4395.

[15] Kamlet, M. J.; Abboud, J.-L. M.; Abraham, M. H.; Taft, R. W. *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 2877.

[16] Taft, R. W.; Kamlet, M. J. *J. Am. Chem. Soc*. **1976**, *98*, 2886.

[17] Kamlet, M. J.; Taft, R. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 377.

[18] Kamlet, M. J.; Abboud, J.-L. M.; Abraham, M. H.; Taft, R. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 8325.

[19] Catalán, J.; López, V.; Pérez, P.; Martín-Villamil, R.; Rodríguez, J.-G. *Liebigs Ann.* **1995**, 241.

[20] Catalán, J.; Díaz, C.; López, V.; Pérez, P.; de Paz, J-.L. G.; Rodríguez, J.-G.; *Liebigs Ann.* **1996**, 1785.

[21] Catalán, J.; Díaz, C.; *Liebigs Ann.* **1997**, 1941.

[22] Catalán, J.; Díaz, C. *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, 885.

[23] Baker, G. A.; Crane, N. J.; Mayrhofer, R. C; Betts, T. A. *J. Chem. Educ.* **2002**, *79*, 1261.

[24] Sumitani, M.; Nakashima N.; Yoshihara K.; Nagakura S; *Chem Phys Lett.* **1977** *51*, 183.

[25] Kavarnos GJ. *Fundamentals of photoinduced electron transfer*. VCH Publishers, New York, **1993.**

[26] Förster, T. *Ann. Phys.* **1948**, *2*, 55.

[27] Bojtár, M.; Szakács, Z.; Hessz, D.; L Bazsó, F.; Kállay, M.; Kubinyi, M.; Bitter, I. *Dyes Pigm.* **2016**, *133*, 415.

[28] Xu, Z.; Singh, N. J.; Lim, J.; Pan, J; Kim, H. N.; Park, S; Kim, K. S.; Yoon, J. *J. Am. Chem. Soc*., **2009**, *131*, 15528.

[29] Teng, B.; Wilson, C. E.; Tu, Y.; Joshi, N. R.; Kinnamon, S. C.; Liman, E. R.; *Curr. Biol.*, **2019**, *29*, 3674.

[30] Förster, T. Z. *Elektrochem.* **1950**, *54*, 42.

[31] Grabowski, Z. R.; Grabowska, A.; *Z. Phys Chem.* **1976**, *101*, 197.

[32] Smith, M. A.; Neumann, R. M.; Webb, R. A. *J. Heterocyclic Chem.* **1968**, *5*, 425.

[33] Claisen, L.; Claparède, A. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1881**, *14*, 2460.

[34] Schmidt, J. G. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1881**, 14, 1459.

[35] Oyamada, T. *J. Chem. Soc. Japan*, **1934**, *55*, 1256.

[36] Algar, J.; Flynn, J. P. *Proc. Roy. Irish Acad.* **1934**, *42B*, 1.

[37] Kolev, T.; Koleva, B. B.; Stoyanov, S.; Spiteller, M.; Petkov, I. *Spectrochim. Acta A* **2008**, *70*, 1087.

[38] Coe, B. J.; Harris, J. A.; Asselberghs, I.; Persoons, A.; Jeffery, J. C.; Rees, L. H.; Gelbrich, T.; Hursthouse, M. B. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **1999**, 3617.

[39] Yu, G. C.; Xue, M.; Zhang, Z. B.; Li, J. Y.; Han, C. Y.; Huang, F.H. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 13248.

[40] Damjanovich, S.; Fidy, J.; Szöllősi, J. *Orvosi biofizika* **2007**, Medicina Könyvkiadó Zrt.

[41] Eastman, J.W. *Photochem Photobiol*, **1967**, *6*, 55.

[42] Fischer, M.; Georges J. *Chem. Phys. Lett.* **1996**, *260*, 115.

[43] Brannon, J. H.; Magde D. *J. Phys. Chem.* **1978**, *82*, 705.

[44] Pokol, Gy. Gyurcsányi, E. R.; Simon, A.; Bezúr, L.; Horvai, G.; Horváth, V.; Dudás, K. M. *Analitikai kémia* (egyetemi jegyzet) Typotex kiadó, **2011,** pp 30.

[45] Szakács, Z.; Bojtár, M.; Drahos, L.; Hessz, D.; Kállay, M.; Vidóczy, T.; Bitter, I.; Kubinyi, M. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2016**, *15*, 219.

[46] Abdel-Kader, M. H.; Steiner, U. *J. Chem. Educ.* **1983**, *60*, 160.

[47] Rosenberg, L. S.; Wions, G. J.; Schulman, S. G. *Talanta*, **1979**, *26*, 867.

[48] Kowalczyk, A.; Boens, N.; Van den Bergh, V.; C. De Schryver, F. *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 8585.

[49] Job, P. *Ann. Chim.* **1928**. *9*: 113.

[50] Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G. A.; et al. *Gaussian 09*, revision B.01; Gaussian, Inc.: Wallingford, CT, 2009.

[51] Hohenberg, P.; Kohn, W. *Phys. Rev.* **1964**, *136*, B864.

[52] Kohn, W.; Sham, L. J. *Phys. Rev.* **1965**, *140*, A1133.

[53] Adamo, C.; Barone, V. *J. Chem. Phys*. **1999**, *110*, 6158.

[54] M.J. Frisch, J.A. Pople, J.S. Binkley, *J. Chem. Phys.* **1984**, *80*, 3265.

[55] Marenich, A. V.; Cramer, C. J.; Truhlar, D. G. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 6378.

[56] Cossi, M.; Rega, N.; Scalmani, G.; Barone, V. *J. Comput. Chem.* **2003**, *24*, 669.

[57] Barone, V.; Cossi, M. *J. Phys. Chem. A* **1998**, *102*, 1995.

[58] Marvin 6.1.0. Chemaxon, http://chemaxon.com

[59] Halgren, T. A. *J. Comput. Chem.* **1999**, *20*, 720.

[60] Zhao, Y.; Thrular, G. *Theor. Chem. Acc.* **2008**, *120*, 215.

[61] Frisch, M. J.; Pople, J. A.; Binkley, J. S. *J. Chem. Phys.* **1984**, *80*, 3265.

[62] Vogel, A.; *Ann. Phys.* **1820**, *64*, 161.

[63] Al-Warhia, T.; Sabt, A.; Elkae, E. B.; Eldehnae, W. M. *Bioorg. Chem.* **2020**, *103*, 104163.

[64] Lagey, K., Duinslaeger, L., Vanderkelen, A. *Burns* **1995**, *21*, 542.

[65] Niu, C.; Luab, X.; Aisa, H. A. *RSC Adv.*, **2019**, *9*, 1671.

[66] Conforti, F.; Marrelli, M.; Menichini, F.; Bonesi, M.; Statti, G.; Provenzano, E.; Menichini, F.; *Curr. Drug Ther.* **2009**, *4*, 38.

[67] Atilla, E.; Atilla, P.A.; Bozdag, S.C.; Yuksel, M.K.; Toprak, S.K.; Topcuoglu, P.; Akay, B.N.; Sanli, H;, Akan, H.; Demirer, T.; Beksac, M;, Arslan, O.; Ozcan, M.; Gurman, G.; Ilhan, O.; *Transfus. Clin. Biol.* **2017**, *24*, 454.

[68] Henseler, T.; Honigsmann, H.; Wolff K.; Christophers, E. *Lancet* **1981**, *1*, 853.

[69] Link, K. P. *Circulation* **1959**, *19*, 97.

[70] Bull, J. O. *Proceedings of the Vertebrate Pest Conference*, **1976**, *7*, 72.

[71] Hadler, M.; Shadbolt, R. *Nature* **1987**, *253*, 275.

[72] Meehan, A. P.; *Proceedings of the Vertebrate Pest Conference* **1978**, *8*, 122.

[73] K.H. Drexhage, F.P. Schäfer (Ed.), *Dye Lasers*, Springer-Verlag, New York **1973**, pp. 144-193.

[74] W. Rettig and A. Klock, *Can. J. Chem.*, **1985**, *63*, 1649.

[75] Krystkowiak,E.; Dobek, K.; Maciejewskia, A. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2013**, *12*, 446.

[76] Jones, G. Jackson, W. R.; Halpern, A. M. *Chem. Phys. Lett*. **1980**, *72*, 391.

[77] Wagner, B. D. *Molecules* **2009**, *14*, 210.

[78] Bank, A.; Kumbhakar, M.; Nath, S.; Pal, H. *Chem. Phys.* **2005**, *315*, 277.

[79] Shank, C. V.; Dienes, A,; Trozzolo, A. M.; Meyer, J. A. *Appl. Phys. Letters* **1970**, *16*, 405.

[80] Burai, T. N.; Datta, A. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 15901.

[81] Iyer, E. S. S.; Datta, A. *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 8707.

[82] Molotsky, T.; Huppert, D. *J. Phys. Chem.* **2003**, *107*, 2769.

[83] Liu, Y.-H.; Li, P. *J. Lumin*. **2011**, *131*, 2116.

[84] Barman, N.; Singha, D.; Sahu, K. *J. Phys. Chem. A* **2013**, *117*, 3945.

[85] Chudoba, C.; Nibbering, E. T. J.; Elsaesser, T. *J. Phys. Chem. A* **1999**, *103*, 5625.

[86] Nibbering, E. T. J.; Tschirschwitz, F.; Chudoba, C.; Elsaesser, T. *J. Phys. Chem. A* **2000**, *104*, 4236.

[87] Palit, D. K.; Zhang, T. Q.; Kumazaki, S.; Yoshihara, K. *J. Phys. Chem. A* **2003**, *107*, 10798.

[88] Wells, N. P.; McGrath, M. J.; Siepmann, J. I.; Underwood, D. F.; Blank, D. A. *J. Phys. Chem. A* **2008**, *112*, 2511.

[89] Zhao, G.-J.; Han, K.-L. *J. Phys. Chem. A* **2007**, *111*, 2469.

[90] Liu, Y. F.; Ding, J. X.; Shi, D. H.; Sun, J. F. *J. Phys. Chem. A* **2008**, *112*, 6244.

[91] Miao, C.; Shi, Y. *J. Comput. Chem.* **2011**, *32*, 3058.

[92] Campillo, A. J.; Clark, J. H.; Shapiro, S. L.; Winn, K. R.;Woodbridge, P. K. *Chem. Phys. Lett.* **1979**, *67*, 218.

[93] Bursulaya, B. D.; Druzhinin, S. I.; Uzhinov, B. M. *J. Photochem. Photobiol., A* **1995**, *92*, 163.

[94] Bhattacharya, B.; Nakka, S.; Guruprasad, L.; Samanta, A. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 2143.

[95] Patra, S.; Santhosh, K.; Pabbathi, A.; Samanta, A. *RSC Adv*. **2012**, *2*, 6079.

[96] Frauchiger, L.; Shirota, H.; Uhrich, K. E.; Castner, E. W., Jr. *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 7463.

[97] Lee, H.-I.; Wu, W.; Oh, J. K.; Mueller, L.; Sherwood, G.; Peteanu, L.; Kowalewski, T.; Matyjaszewski, K. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, *46*, 2453.

[98] Halder, A.; Sen, S.; Das Burman, A.; Patra, A.; Bhattacharyya, K. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 2309.

[99] Lim, L. H.; Tan, A.; Simovic, S.; Prestidge, C. A. *Int. J. Pharm.* **2011**, *409*, 297.

[100] Somoza, M. M.; Andreatta, D.; Murphy, C. J.; Coleman, R. S.;Berg, M. A. *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, 2494.

[101] Coleman, R. S.; Berg, M. A.; Murphy, C. J. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 3450.

[102] Grant, C. D.; Steege, K. E.; Bunagan, M. R.; Castner, E. W., Jr. *J. Phys. Chem*. B **2005**, *109*, 22273.

[103] Hessz, D., Hégely, B., Kállay, M., Vidóczy, T., Kubinyi, M. *J. Phys. Chem. A* **2014**, *118*, 5238.

[104] Jones, G., II; Jackson, W. R.; Choi, C.-Y.; Bergmark, W. R. *J. Phys. Chem.* **1985**, *89*, 294.

[105] Förster, T. *Naturwissenschaften* **1949**, *36*, 186.

[106] C. A. Mack, *Appl. Opt*. **1988**, *27*, 4913.

[107] Zhao, W.; Ding, Y.; Xia, Q. J. *Comput. Chem.* **2011**, *32*, 545.

[108] (a) Meyer, J. J. M.; Afolayan, A. J.; Taylor, M.B.; Erasmus, D. *J. Ethnopharmacol.* **1997**, *56*, 165.

(b) Aloud, A. A.; Veeramani, C.; Govindasamy, C.; Alsaif, M. A.; Al-Numair, K. S. *Redox Report*, **2018**, *23*, 29.

(c) Liu,Y.; Song, X.; He, J.;Zheng, X.; Wu, H. *Med. Chem. Res.* **2014**, *23*, 555.

(d) Song, J.-H.; Kwon, B.-E.; Jang, H.; Kang, H.; Cho, S.; Park, K.; Ko, H.-J.; Kim, H. *Biomol. Ther*. **2015**, *23*, 465.

(e) Schnitzler, P.; Neuner, A.; Nolkemper, S.; Zundel, C.; Nowack, H.; Sensch, K. H.; Reichling, J. *Phytother. Res*. **2010**, *24*, 20.

(f) Sun, L.-P.; Chen, A.-L.; Hung, H.-C.; Chien, Y.-H.; Huang, J.-S.; Huang, C.-Y.; Chen,Y.-W.; Chen, C.-N. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 11748.

[109] Latour H.; Grolleau R.; Baissus C. *J.MED.MONTPELLIER* **1973**, *8*, 434.

[110] Martinez, M. L.; Studer, S. L.; Chou, P.-T. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 5881.

[111] Sengupta, P.K.; Kasha, M. *Chem. Phys. Lett.* **1979**, *68*, 382.

[112] Wolfbeis, O. S., Knierzinger, A., Schipfer, R., *J. Photochem*. **1983**, *21*, 67.

[113] Brucker, G. A.; Kelley, D. F. *J. Phys. Chem.* **1989**, *93*, 5179.

[114] Davila, Y. A.; Sancho, M. I.; Almandoz, M. C.; Blanco, S. E. *J. Chem. Eng. Data*, **2013**, *58*, 1706.

[115] Klymchenko, A. S.; Ozturk, T.; Pivovarenko V. G.; Demchenko , A. P. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 7967.

[116] Qin, T.-Y.; Liu, B.; Xu, Z.-Y.; Yao, G.-K.; Xu, H.-H.; Zhao, C. *Sens. Actat. B* **2021**, *336*, 129718.

[117] Klymchenko, A. S.; Kenfack, C.; Duportail, G.; Mély, Y. *J. Chem. Sci.* **2007**, *119*, 83.

[118] Avilov, S. V.; Bode, C.; Tolgyesi, F. G.; Klymchenko, A. S.; Fidy, J.; Demchenko, A. P. *Biopolymers* **2005**, *78*, 340.

[119] Klymchenko, A. S.; Demchenko, A. P. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2003**, *5*, 461.

[120] Fahlman, B. M.; Krol, E. S. *J. Photochem. Photobiol. B.* **2009**, *97*, 123.

[121] Brewer, W. E.; Studer S. L.; Standiford, M.; Chou, P.-T. *J. Phys. Chem.* **1989**, *93*, 6088.

[122] Matsuura, T.; Matsushima, H.; Nakashima, R. *Tetrahedron*, **1970**, *26*, 435.

[123] Hessz, D.; Bojtár, M.; Mester, D.; Szakács, Z.; Bitter, I.; Kállay, M.; Kubinyi, M. *Spectrochim. Acta A* **2018**, *203*, 96.

[124] Bojtár, M.; Janzsó-Berend, P. Z.; Mester, D.; Hessz, D.; Kállay, M.; Kubinyi, M.; Bitter, I. *Beilstein J. Org. Chem.* **2018**, *14*, 747.

[125] Shynkar, V.V.; Klymchenko, A. S.; Piemont, E.; Demchenko, A. P.; Mely, Y. *J. Phys. Chem. A* **2004**, *108*, 8151.

[126] Nagasawa, Y.; Taguri, R.; Matsuda, H.; Murakami, M.; Ohama, M.; Okada, T.; Miyasaka, H. *Phys. Chem. Chem. Phys*. **2004**, *6*, 5370.

[127] Richert, S.; Vasquez, S. M.; Grzybowski, M.; Gryko, D. T.; Kyrychenko, A.; Vauthey, E. *J. Phys. Chem. B* **2014**, *118*, 9952.

[128] Yushchenko, D. A.; Vadzyuk, O. B.; Kosterin, S. O.; Duportail, G.; Mély, Y.; Pivovarenko, V. G. *Anal. Biochem*. **2007**, *369*, 218.

[129] Pivovarenko, V. G.; Vadzyuk, O. B.; Kosterin, S. O. *J. Fluoresc*. **2006**, *16*, 9.

[130] Kumar, S.; Jain, S. K., Sharma, N,; Rastogi, R. C., *Spectrochim. Acta A* **2001**, *57*, 299.

[131] Brooker, L. G. S.; Keyes, G. H.; Heseltine, D. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, *73*, 5350.

[132] Jacques, P. *J. Phys. Chem.* **1986**, *90*, 5535.

[133] Murugan, N. A.; Kongsted, J.; Rinkevicius, Z.; Aidas, K.; Agren, H. *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 13349.

[134] Murugan, N. A.; Kongsted, J.; Rinkevicius, Z.; Agren, H. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13*, 1290.

[135] Manzoni, V.; Coutinho, K.; Canuto, S. *Chem. Phys. Lett*. **2016**, *655*, 30.

[136] Nicolini, J.; Venturini, C. G.; Andreaus, J.; Machado, C.; Machado, V. G. *Spectrosc. Lett.* **2009**, *42*, 35.

[137] de Garcia Venturini, C.; Andreaus, J.; Machado, V. G.; Machado, C. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 1751.

[138] Kang, Y.-T.; Tang, X.-Y.; Yu, H.-D.; Cai, Z.-G.; Huang, Z.-H.; Wang, D.; Xu, J.-F.; Zhang, X. *Chem. Sci.* **2017**, *8*, 8357.

[139] Linn, M. M.; Poncio, D. C.; Machado, V. G. *Tetrahedron Lett*. **2007**, *48*, 4547.

[140] Holt, J. S.; Campitella, A.; Rich, A.; Young, J. L. *J. Inc. Phenom. Macorocycl. Chem.* **2008**, *61*, 251.

[141] Holt, J. S. *J. Mol. Struct.* **2010**, *965*, 31.

[142] Pedersen, C. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 7017.

[143] Svec, J.; Necas, M.; Sindelar, V. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2010**, *49*, 2378.

[144] Ogoshi, T.; S. Kanai, S.; Fujinami, S.; Yamagishi, T. A.; Nakamoto, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 5022.

[145] Ogoshi, T.; Kakuta, T.; Yamagishi, T. *Comprehensive Supramolecular Chemistry II* **2017**, 3, 237.

[146] Xue, M.; Yang, Y.; Chi, X.; Zhang, Z.; Huang, F. *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45*, 1294.

[147] Schönbeck, C.; Li, H.; Han, B.-H.; Laursen B. W. *J. Phys. Chem. B* **2015**, *119*, 6711.

[148] Shu, X.; Fan, J.; Li, J.; Wang, X.; Chen, W.; Jia, X.; Li, C. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 3393.

[149] Strutt, N. L.; Forgan, R. S.; Spruell, J. M.; Botros, Y. Y.; Stoddart, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 5668.

[150] Ogoshi, T.; Hashizume, M.; Yamagishi, T.-A.; Nakamoto, Y. *Chem. Commun.*, **2010**, *46*, 3708.

[151] Yu, G.; Xue, M.; Zhang, Z.; Li, J.; Han, C.; Huang, F. *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, *134*, 13248.

[152] Ma, Y.; Ji, X.; Xiang, F.; Chi, X.; Han, C.; He, J.; Abliz, Z.; Chen, W.; Huang, F. *Chem. Commun.*, **2011**, *47*, 12340.

[153] Yu, G. C.; Zhou, J.; Shen, J.; Tang G. P.; Huang, F. H. *Chem. Sci*., **2016**, *7*, 4073.

[154] Yao, Y.; Li, J.; Dai, J.; Chi, X.; Xue, M. *RSC Adv.*, **2014**, *4*, 9039.

[155] Cheng, W.; Tang, H.; Wang, R.; Wang, L.; Meier, H.; Cao, D. *Chem. Commun*., **2016**, *52*, 8075.

[156] Li, C.; Ma, J.; Zhao, L.; Zhang, Y.; Yu, Y.; Shu, X.; Li, J.; Jia, X. *Chem. Commun.*, **2013**, *49*, 1924.

[157] Bojtár, M.; Paudics, A.; Hessz, D.; Kubinyi, M.; Bitter, I. *RSC Adv*., **2016**, *6*, 86269.

[158] Bojtár, M.; Szakács, Z.; Hessz, D.; Kubinyi, M.; Bitter, I.; *RSC Adv.*, **2015**, *5*, 26504.

[159] Paudics, A.; Kubinyi, M.; Bitter, I.; Bojtár, M. *RSC Adv.*, **2019**, *9*, 16856.

[160] Tőzsér, J.; Emri, T.; Csősz, É.; Tőzsér, J. *Fehérjebiotechnológia* Debreceni Egyetem, **2011**

[161] Deák, V. Általános genetika, 2014, Typotex kiadó

[162] Gruber, T. *ChemBioChem.* **2018**, *19*, 2324.

[163] Steiner, U.; Abdel-Kader, M. H.; Fischer, P.; Kramer, E. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 3190.

[164] Kuder, J. E.; Wychick, D. *Chem. Phys. Lett.* **1974**, *24*, 69.

[165] Hessz, D.; Bádogos, S.; Bojtár, M.; Bitter, I.; Drahos, L.; Kubinyi, M. *Spectrochim. Acta A* **2021**, *252*, 119455.

[166] Yu, G. C.; Xue, M.; Zhang, Z. B.; Li, J. Y.; Han, C. Y.; Huang, F. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 13248.

[167] Gamal-Eldin, M. A.; Macartney, D. H. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 488.

[168] Li, C.-J.; Ma, J.-W.; Zhao, L.; Zhang, Y.-Y.; Yu, Y.-H.; Shu, X.-Y.; Lia, J.; Jia, X.-S. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 1924.

[169] Steiner, U.; Abdel-Kader, M. H.; Fischer, P.; Kramer, H. E. A.; *J. Am. Chem. Soc*. **1978**, *100*, 3190.

[170] Burda, C.; Abdel-Kader, M. H.; Link, S.; El-Sayed, M. A.; *J. Am. Chem. Soc*. **2000**, *122*, 6720.

[171] Stephens, P. J.; McCann, D. M. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 6074.

NYILATKOZAT

Alulírott Hessz Dóra kijelentem, hogy ezt a doktori értekezést magam készítettem és abban csak a megadott forrásokat használtam fel. Minden olyan részt, amelyet szó szerint, vagy azonos tartalomban, de átfogalmazva más forrásból átvettem, egyértelműen, a forrás megadásával megjelöltem.

Budapest, 2021. 09. 13.

……