

ОРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ И СПЕКТРОСКОПИЯ

УДК 543.422.3+544.18+547.972.2

МЕХАНИЗМ ТАУТОМЕРИЗАЦИИ 7-ГИДРОКСИИЗОФЛАВОНОВ В ВОЗБУЖДЕННОМ СОСТОЯНИИ

© 2005 М.И. Львовская, А.Д. Рошаль, А.В. Кириченко, А.О. Дорошенко, В.П. Хиля

Изучены спектральные свойства фототаутомерной формы 7-гидроксиизофлавона. На основании экспериментальных данных, полученных методами стационарной и времяразрешенной флуоресцентной спектроскопии, а также квантово-химических расчетов термодинамических характеристик (AM1) и моделирования молекулярной динамики переноса протона был предложен «катионный» механизм образования фототаутомера.

Введение

Изофлавоны (3-фенилхромоны) – широко распространенные природные соединения, используемые в качестве антиоксидантов и лекарственных препаратов [1]. Поскольку интенсивность флуоресценции изофлавонов в значительной степени зависит от pH, разработка новых спектрофлуориметрических методов анализа этих веществ невозможна без понимания природы, строения и механизма образования их флуоресцирующих кислотно-основных форм.

Отнесение полос в спектрах испускания изофлавонов, зависимость между строением кислотно-основных форм изофлавонов и их спектральными свойствами обсуждались ранее в работах [2, 3]. Наименее исследованы флуоресцентные свойства фототаутомерной формы изофлавонов, а механизм ее образования не изучен.

Целью настоящей работы является изучение спектральных характеристик и механизма образования фототаутомеров изофлавонов. В качестве объектов исследования были использованы синтетические аналоги наиболее распространенных 7-гидроксиизофлавонов, а также природное соединение – 7-гидрокси-4'-метоксиизофлавоны (формонетин). Строение исследованных соединений приведено на схеме 1.

Для определения механизма образования фототаутомеров 7-гидроксиизофлавонов мы применяли как флуоресцентную спектроскопию при стационарном и импульсном излучении, так и теоретические методы – квантово-химический расчет энергий Гиббса для каждой предполагаемой стадии образования фототаутомера и анализ молекулярной динамики переноса протона через растворитель в процессе таутомеризации.

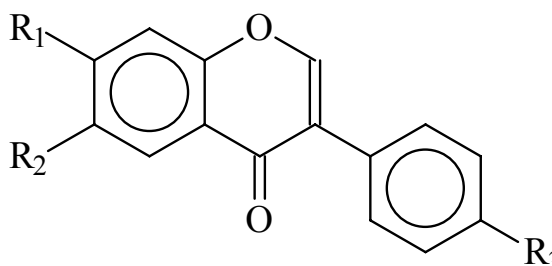


Схема 1. Строение молекул исследуемых изофлавонов.

I – R₁ – OH, R₂ – C₂H₅, R₃ – H

II – R₁ – OH, R₂ – H, R₃ – OCH₃

III – R₁ – OH, R₂ – C₂H₅, R₃ – OCH₃

Экспериментальная часть

7-гидроксиизофлавоны, использованные для исследований, были синтезированы по методике [4]. Чистоту веществ контролировали хроматографически. Строение полученных соединений проверяли с использованием ПМР и ИК-спектроскопии.

Измерения спектров поглощения и флуоресценции проводили с использованием спектрофотометра Hitachi U3210 и спектрофлуориметра Hitachi F4010 соответственно. Времена жизни флуоресцирующих форм и времяразрешенные спектры были измерены на спектрофотометрической установке, описанной в [5], в режиме счета одиночных фотонов. В качестве стандарта

для измерения квантовых выходов флуоресценции был использован бисульфат хинина ($\phi = 54,6\%$) в 1N растворе серной кислоты.

Исследование кислотно-основных форм изофлавонов в интервале pH от 1 до 12 проводили в водно-метанольных растворах (с соотношением вода : метанол – 2 : 8 v/v), используя в качестве титрантов растворы NaOH и HCl в том же растворителе. Измерения в интервале H_0 от 0 до -10 проводили в водных растворах серной кислоты.

Обработку спектров поглощения, стационарных и времяразрешенных спектров флуоресценции, расчет времен жизни молекул в возбужденном состоянии и константы скоростей их взаимопревращений проводили с использованием комплекта программ Spectral Data Lab, разработанного в НИИ химии при Харьковском национальном университете. Эксперименты по определению констант равновесия были проведены в 3-4 параллелях.

Расчеты оптимальной геометрии кислотно-основных форм 7-гидроксиизофлавона *I* и его термодинамических характеристик в возбужденном состоянии проводили методом AM1/CI (200 однократно возбужденных конфигураций) [6], встроенным в пакет программ MOPAC 2002 [7]. Оценку влияния неспецифических взаимодействий растворителя (метанола) на термодинамические параметры изофлавона осуществляли при помощи процедуры COSMO [7, 8]. Проверку адекватности полученных результатов проводили путем сравнения теоретических и экспериментальных спектров поглощения *I*. Так, параметры длинноволновых полос поглощения составляли соответственно 303 и 249 нм в экспериментальных и 315 и 239 нм – в теоретических спектрах. Экспериментальные значения сил осциллятора соответствующих электронных переходов были равны 0,053 и 0,180, в то время как вычисленные – 0,076 и 0,251, соответственно. Как видно из приведенных данных, положения максимумов поглощения и их относительная интенсивность, рассчитанные методом AM1/CI и COSMO достаточно хорошо соответствуют экспериментальным данным.

Расчеты молекулярной динамики в метаноле проводили при помощи пакета программ GRO-MOS96 [9] с использованием силового поля 43A1 [10]. Обработка и представление результатов были сделаны, как в [11].

Обсуждение результатов

7-гидроксиизофлавоны имеют, как правило, три флуоресцирующие формы – анионную (*A*), катионную (*C*) и таутомерную (*T*). Нейтральная форма изофлавонов (*N*) не флуоресцирует: ее низшее возбужденное состояние имеет $\pi\pi$ природу ($\lambda_{n\rightarrow\pi} \approx 330$ нм), что обеспечивает эффективную интеркомбинационную конверсию на ниже лежащие триплетные $\pi\pi$ состояния.

Флуоресценция изофлавонолят-анионов наблюдаются в широком интервале pH от 12 до 0. Образование анионов при низких pH происходит из-за фотодиссоциации изофлавонов, обусловленной резким увеличением константы диссоциации гидроксигруппы молекулы в возбужденном состоянии – от $pK_a = 8,5-9,5$ до $0,9-2,0$. Флуоресценция катионов изофлавилия наблюдается в растворах кислот при $H_0 < -0,5$. Спектральные свойства кислотно-основных форм исследуемых изофлавонов приведены в таблице 1.

Таблица 1. Спектральные свойства изофлавонов*

	$\nu_{abs}, \text{cm}^{-1}$	ν_{fl}, cm^{-1}	$\Delta\nu_{St}, \text{cm}^{-1}$	$\phi, \%$	τ, ns	k_f, s^{-1}	k_d, s^{-1}
нейтральная форма (поглощение), фототаутомер (флуоресценция)**							
<i>I</i>	32480	18900	13580	6,0	0,9	$6,6 \cdot 10^7$	$1,1 \cdot 10^9$
<i>II</i>	33000	16030	16030	0,2	~0,4	$\sim 5,0 \cdot 10^6$	$\sim 2,5 \cdot 10^9$
<i>III</i>	32320	17920	14400	0,2	~0,7	$\sim 2,9 \cdot 10^6$	$\sim 1,4 \cdot 10^9$
анион							
<i>I</i>	28740	20320	8420	12,1	2,2	$5,5 \cdot 10^7$	$4,0 \cdot 10^8$
<i>II</i>	29360	20480	8880	17,5	3,4	$5,2 \cdot 10^7$	$2,4 \cdot 10^8$
<i>III</i>	28740	20380	8360	18,4	1,7	$1,1 \cdot 10^8$	$4,8 \cdot 10^8$
катион							
<i>I</i>	28680	22360	6320	15,3	3,8	$4,0 \cdot 10^7$	$2,2 \cdot 10^8$
<i>II</i>	28000	21600	6400	<0,1	~4,8	- ***	$\sim 2,1 \cdot 10^8$
<i>III</i>	27400	23260	4140	<0,1	~2,2	- ***	$\sim 4,5 \cdot 10^8$

* – ν_{abs} , ν_{fl} – положения максимумов поглощения и испускания, $\Delta\nu_{\text{St}}$ – Стоксовы сдвиги флуоресценции, Φ – квантовый выход флуоресценции, τ – время жизни молекул в возбужденном состоянии, k_f , k_d – константы скорости излучательной и безызлучательной дезактивации форм изофлавонов в возбужденном состоянии.

** – величины Φ , k_f и k_d изофлавона *I* откорректированы с учетом константы скорости образования фототаутомера в возбужденном состоянии, согласно [12]. Для изофлавонов *II* и *III* данные величины не корректировались.

*** – из-за низких значений Φ катионных форм *II* и *III* величины k_f для этих форм не рассчитывались.

Таблица 2. Константы диссоциации и протонирования изофлавонов в основном и возбужденном состояниях*

	pK_a	pK_a^*	pK_b	pK_b^*	Интервал pH/ H_0 существования таутомера
<i>I</i>	$9,03 \pm 0,01$	1,1	$-2,37 \pm 0,09$	5,5	-0,5 – 8,0
<i>II</i>	$8,50 \pm 0,01$	0,9	$-2,86 \pm 0,06$	7,6	-0,5 – 7,0
<i>III</i>	$9,56 \pm 0,01$	2,0	$-2,38 \pm 0,03$	7,9	-0,5 – 5,5

* – pK_a , pK_a^* – показатели констант диссоциации в основном и возбужденном состояниях, pK_b , pK_b^* – показатели констант протонирования в основном и возбужденном состояниях. Величины pK_a^* и pK_b^* рассчитаны по методу Ферстера.

Оценка констант кислотно-основных равновесий по Ферстеру (Таблица 2) показала, что в возбужденном состоянии рассчитанные величины pK_a^* (показатели констант диссоциации гидроксигруппы) меньше, чем pK_b^* (показатели констант протонирования карбонильного фрагмента). Следовательно, в определенном интервале pH, где происходит перекрывание областей существования катионной и анионной форм, возможно появление цвиттер-ионной таутомерной формы. Оцененные по Ферстеру интервалы кислотности, в которых должны образовываться фототаутомеры, приведены в таблице 2.

Теоретически и экспериментально определенные области существования фототаутомера *I* и его других кислотно-основных форм изображены на рисунке 1.

Образование фототаутомеров наблюдалось в случаях соединений, родственных изофлавонам – у 7-гидроксихромонов [13, 14] и 7-гидроксифлавонов [15, 16], однако механизм образования этих форм ранее не изучался. Методами наведенной электронной спектроскопии и двухступенчатой лазерной флуоресцентной спектроскопии 7-гидроксифлавона в метаноле было показано, что таутомер образуется из комплекса нейтральной молекулы изофлавона с двумя молекулами растворителя [16]. Очевидно, что одна из молекул метанола, связанная водородной связью с карбонильным фрагментом, является донором, а другая, связанная с 7-гидрокси группой, – акцептором протона. Тем не менее, строение сольватного комплекса не дает представления о механизме образования фототау-

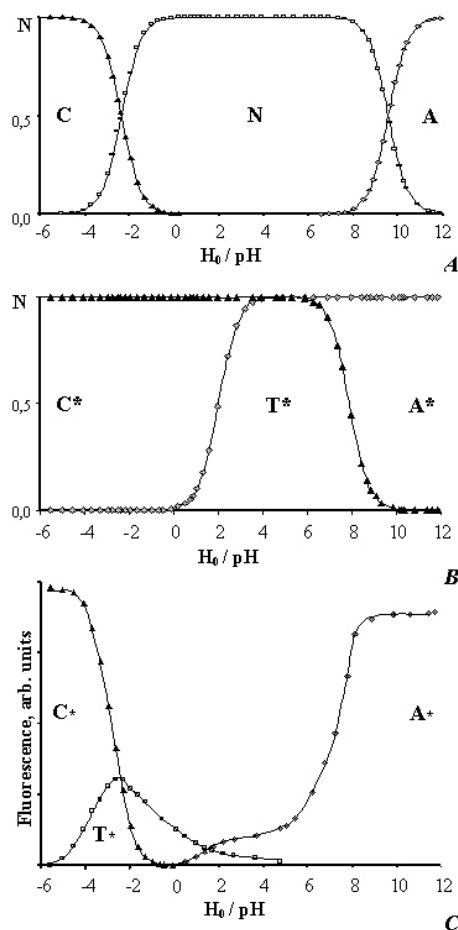


Рис. 1. Области существования кислотно-основных форм изофлавона *I* в основном (*A*) и возбужденном (*B*, *C*) состояниях. *B* – оценка по методу Ферстера, *A* и *C* – экспериментальные данные. Концентрация каждой формы на диаграммах *A* и *B* выражена в мольных долях (N).

томера. Следует также отметить, что, несмотря на близкое строение флавонов и изофлавонов, флуоресценция фототаутомера 7-гидроксифлавона наблюдается в нейтральных метанольных растворах, в то время как для появления фототаутомеров 7-гидроксиизофлавонов в водных и спиртово-водных растворах необходим $pH < 3$. Различия в кислотности гидроксигрупп флавонов и изофлавонов в возбужденном состоянии могут обусловить разный механизм образования их фототаутомерных форм.

Можно предложить два основных пути образования фототаутомера 7-гидроксиизофлавона – «анионный» и «катионный». Согласно первому, в возбужденном состоянии наблюдается фотодиссоциация гидроксигруппы нейтральной молекулы изофлавона и перенос протона на молекулу растворителя. Затем, образовавшаяся анионная форма принимает протон от молекулы растворителя, связанного с карбонильной группой. На примере большого количества объектов [17 - 19] показано, что в случае протекания таутомеризации по «анионному механизму», помимо процесса внутримолекулярного перераспределения электронной плотности, наблюдается также параллельный процесс – перемещение протона по цепочке водородных связей между молекулами растворителя от протонодонорного к протоноакцепторному фрагменту молекулы флуорофора.

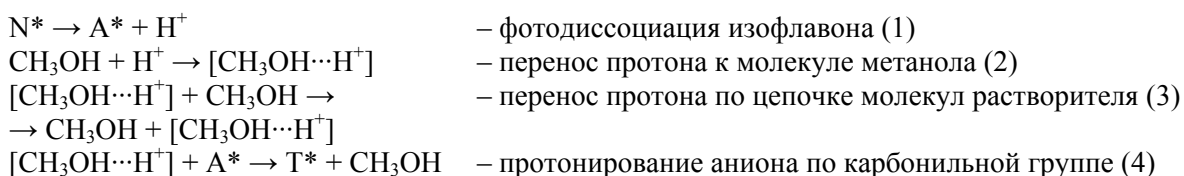
Второй путь образования фототаутомера протекает через промежуточную катионную форму. На первой стадии происходит протонирование изофлавона по карбонильной группе, а затем диссоциация 7-гидроксигруппы изофлавилиевого катиона с образованием фототаутомера.

Двухступенчатое превращение возбужденной нейтральной формы изофлавона в фототаутомер через анионную или катионную форму ($N^* \rightarrow A^* \rightarrow T^*$ или $N^* \rightarrow C^* \rightarrow T^*$) допускает образование фототаутомера и из промежуточных форм ($A^* \rightarrow T^*$ или $C^* \rightarrow T^*$). Таким образом, в зависимости от интервала pH / H_0 спектр возбуждения таутомера должен соответствовать спектру поглощения либо нейтральной, либо промежуточной формы – A^* или C^* .

Измеренный нами спектр возбуждения флуоресценции таутомера I в интервале H_0 от 0 до -0,5, где проявляется эмиссия только этой формы, соответствовал спектру поглощения нейтрального изофлавона, что подтверждает протекание процесса $N^* \rightarrow \dots \rightarrow T^*$. Однако в областях $H_0 < -0,5$ и $pH > 0$ получить спектры возбуждения таутомера не удалось из-за значительного перекрытия полосы испускания таутомера с полосами анионной или катионной форм, имеющих, к тому же, более высокие квантовые выходы флуоресценции. Таким образом, анализ спектров возбуждения флуоресценции фототаутомера не позволил определить природу промежуточной формы.

Термодинамическая оценка возможности образования таутомера по одному из предложенных механизмов была проведена путем вычисления и анализа величин $\Delta_{298}G$ основных стадий таутомеризации.

Для описания «анионного» механизма образования таутомера нами были рассмотрены четыре основных процесса:

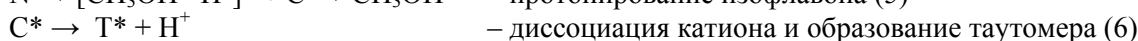


Величина $\Delta_{298}G_{(1)}$ для первого процесса в метаноле равна -91,3 ккал/моль, что подтверждает самопроизвольное протекание диссоциации 7-гидроксиизофлавона в возбужденном состоянии. $\Delta_{298}G_{(2)}$ переноса протона к молекуле растворителя составляет +154,3 ккал/моль. Завышенное положительное значение $\Delta_{298}G_{(2)}$ обусловлено недостаточным учетом специфических взаимодействий протона и растворителя в методе AM1, однако следует отметить, что для многих соединений процесс фотодиссоциации в спиртах ограничивается отщеплением протона и образованием ионной пары с анионом [20]. Для четвертого процесса $\Delta_{298}G_{(4)}$ равна -79,7 ккал/моль. Высокое отрицательное значение $\Delta_{298}G_{(4)}$ говорит о самопроизвольном протекании процесса рекомбинации заряженных частиц и образовании фототаутомерной формы.

Процесс переноса протона по цепочке молекул растворителя от гидроксигруппы к карбонильному фрагменту был рассмотрен при помощи метода молекулярной динамики. Анализ результатов расчета позволил выделить две популяции молекул изофлавонов, в которых протонодонорная и протоноакцепторная группы связаны мостиками из трех (а) и четырех (б) молекул метанола (Рисунок 2).

Следует отметить, что данные популяции очень невелики, соответственно 5 и 8%, и обычно такие величины при анализе переноса протона по цепочке не рассматриваются [18]. Время жизни цепочек из 3-х и 4-х молекул составляет 0,8 пс и 2,5 пс. Принимая во внимание, что время переноса протона в водных и спиртовых растворах колеблется в пределах от 100 до 600 пс [20], найденное время существования цепочек водородосвязанных молекул растворителя представляется недостаточным. Таким образом, перенос протона от 7-гидроксигруппы к карбонильному фрагменту представляется нам маловероятным.

При анализе «катионного» механизма переноса протона нами принимались во внимание следующие процессы:



Величины Δ_{298G} для этих процессов равны -29,6 ккал/моль и -136,7 ккал/моль, соответственно. Таким образом, образование и последующий распад катионной формы протекают самопроизвольно. Необходимо также отметить наличие еще одного процесса, сопровождающего образование таутомера - перенос протона на растворитель (процесс 2). Однако, в отличие от «анионного» пути образования таутомера, перенос протона осуществляется не от аниона, а от нейтральной молекулы, что делает этот процесс более энергетически выгодным.

Таким образом, оценка термодинамических характеристик промежуточных стадий таутомеризации в возбужденном состоянии, позволяет заключить, что наиболее вероятный механизм образования фототаутомера – «катионный». Основным фактором, препятствующим осуществлению «анионного» механизма являются процессы переноса протона – как от аниона на молекулы растворителя, так и между самими молекулами растворителя.

Для прямого наблюдения процесса образования таутомера из промежуточной катионной или анионной формы мы использовали метод времязрешенной флуоресцентной спектроскопии. Измерения проводили при $pH = 1,5$ и $H_0 = -2$, т.е. в условиях когда интенсивности флуоресценции таутомерной и предполагаемых предшествующих форм были приблизительно одинаковыми (Рисунок 1С).

Регистрация спектров в области pH , где одновременно присутствовали анион и таутомер изофлавона **I**, оказались неудачными вследствие низкой концентрации обеих форм: их интенсивности свечения были ниже пределов чувствительности прибора.

Измерения времязрешенных спектров при $H_0 = -2$ позволили зарегистрировать процесс превращения катионной формы в таутомер – $C^* \rightarrow T^*$. Константа скорости процесса образования фототаутомера из катиона ($k_{C \rightarrow T}$) составила $\sim 1,3 \cdot 10^9 \text{ с}^{-1}$.

Принимая во внимание полученный результат, можно допустить, что образование фототаутомера из нейтральной формы также должно протекать по «катионному» механизму $N^* \rightarrow C^* \rightarrow T^*$. Схема взаимопревращений кислотно-основных форм исследованных изофлавонов в этом случае будет иметь вид, изображенный на рисунке 3.

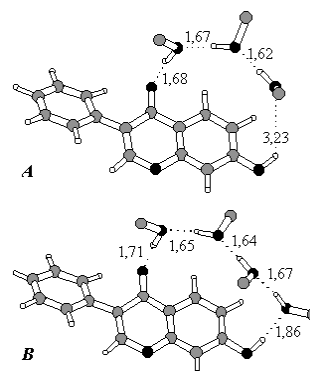


Рис. 2. Популяции молекул изофлавонов с мостиками из трех (А) и четырех (В) молекул метанола. Длины водородных связей даны в Å.

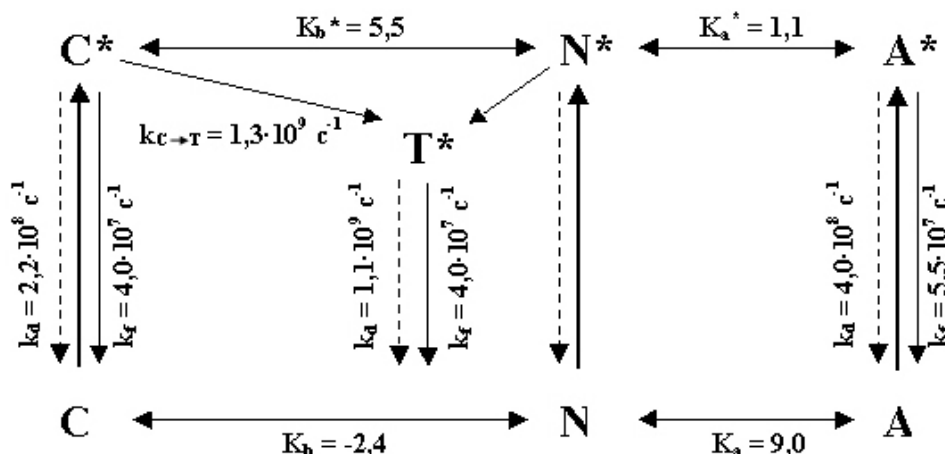


Рис. 3. Схема взаимопревращений кислотно-основных форм изофлавона I в основном и возбужденном состояниях.

Катионные и фототаутомерные формы 7-гидроксиизофлавонов II и III имеют очень низкую интенсивность флуоресценции, что не позволяет определить константы скорости процессов $C \rightarrow T$. Однако II и III имеют сходное строение, близкие величины pK_a и pK_b , подобное распределение зарядов на атомах в возбужденном состоянии. Поэтому для них также можно ожидать образования фототаутомера по «катионному» механизму.

Выводы

Проведенные исследования показали, что таутомерная форма 7-гидроксиизофлавонов может образовываться в возбужденном состоянии из катионной или нейтральной форм. В последнем случае таутомеризация происходит по «катионному» механизму, т.е. через стадию образования катиона.

Протекание фототаутомеризации через анионную форму представляется маловероятным в силу затрудненного переноса протона от гидроксильной группы изофлавона на молекулы растворителя и малой вероятности передачи протона по цепи водородных связей к протонакцепторной группе.

Понимание механизма образования фототаутомера важно не только для объяснения его спектральных свойств, но и позволяет объяснить спектральное поведение катионной формы. Так, сравнение величины $k_{C \rightarrow T}$ с константами кинетическими константами катионной формы показывает, что фототаутомеризация является основным процессом ее безызлучательной дезактивации.

Литература

1. Казаков А. Л., Хиля В. П., Межеричкий В. В., Литкеи Ю. Природные и модифицированные изофлавоноиды. - Ростов: Изд. Ростовского университета, 1985.- 181с.
2. Wolfbeis O. S., Furlinger E., Jha H. C., Zilliken F. *Z. Naturforsch.* Т. В39. 1984. P.238-243.
3. Рошаль О.Д. Изофлавоны: одержання, кислотно-основні і спектральні властивості. Автореф. канд. дисс., Харьков. 1993. 16 с.
4. Хиля В.П., Лукьянчиков М.С., Казаков А.Л., Горбуленко Н.В. *Укр. хим. журн.*, Т.50. 1984. P.1301-1306.
5. Ponomaryov O.A., Doroshenko A.O., Mitina V.G. *Хим. физика.* Т.8. 1989. P.1369-1376.
6. Dewar, M. J. S.; Zuebisch, E. G.; Healy, E. F.; Stewart, J. P. P. *J. Am. Chem. Soc.* V.107. 1985. P.3902.
7. Stewart J. P. P. MOPAC 2002. © Fujitsu: Tokyo. 2002.
8. Klamt A., Schuurmann G. *Z. J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2.* 1993. P.799.
9. Scott W.R.P., Hünenberger P.H., Tironi I.G., Mark A.E., Billeter S.R., Fennen J., Torda A.E., Huber T., Krüger P., van Gunsteren W.F. *J. Phys. Chem. A.* V.103. 1999. P.3596.

10. Duara X., Mark A.E., van Gunsteren W.F. *J. Comput.Chem.* V.15. 1998. P.535.
11. Kyrychenko A., Stepanenko Y., Waluk J. *J. Phys. Chem. A.* V.104. 2000. P.9542-9555.
12. Roshal A.D., Grigorovich A.V., Dorochenko A.O., Pivovarenko V.G., Demchenko A.P. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry.* V.127. 1999. P.89-100.
13. Ефимов А.А., Нурмухаметов Р.Н., Белаиц И.Л., Толмачев А.И. *Опт. Спектроск.*, Т.30. 1971. С.622-627.
14. Wolfbeis O., Knierzinger A. *Z. Naturforsch.*, Т.24a. 1979. S.510-515.
15. Itoh M., Adachi T. *J. Am. Chem. Soc.* V.106. 1984. P.4320-4324.
16. H. Mukaihata, T. Nakagava, S. Kohtani, M. Itoh. *J. Am. Chem. Soc.* V.116. 1994. P.10612-10618.
17. Smedarchina Z., Siebrand W., Fernández-Ramos A., Gorb L., Leszczynski J. *J. Chem. Phys.* V.112. 2000. P.566-573.
18. Mente S., Maroncelli M. *J. Phys. Chem.* V.102. 1998. P.3860-3876.
19. Kyrychenko A., Herbich J., Wu F., Thummel R.P., Waluk J. *J. Am. Chem. Soc.* V.122. 2000. P.2818-2827.
20. Мартынов И.Ю., Демяшкевич А.Б., Ужинов Б.М., Кузьмин М.Г. *Успехи химии.* Т.46. 1977. С.4-31.

Поступила в редакцию 26 августа 2005 г.

Kharkov University Bulletin. 2005. №669. Chemical Series. Issue 13(36). M.I.Lvovska, A.D.Roshal, A.V. Kyrychenko, A.O. Doroshenko, V.P.Khlylia. Mecanism of 7-hydroxy isoflavone tautomerisation in the excited state.

Spectral properties of 7-hydroxyisoflavone phototautomeric forms have been investigated. Proceeding from results of steady-state and time resolved fluorescent spectroscopy, quantum chemical calculations of isoflavone thermodynamic characteristics (AM1), and molecular dynamic simulations of proton transfer, the "cationic" mechanism of phototautomer formation has been proposed.

