

ОРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ И СПЕКТРОСКОПИЯ

УДК 547.787.2+535.33/.34+541.151.11

**СИНТЕЗ И СПЕКТРАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА
НОВЫХ ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫХ СОЕДИНЕНИЙ С РЕАКЦИЕЙ
ВНУТРИМОЛЕКУЛЯРНОГО ФОТОПЕРЕНОСА ПРОТОНА – ПРОИЗВОДНЫХ
2-(*М*-МЕТИЛИЗОХИНОЛОН-1(2*Н*)-4-ИЛ)-3-ГИДРОКСИХРОМОНА**

© 2007 Д. А. Свечкарев, Г. В. Карпушина, А. О. Дорошенко

Получены новые гетероциклические производные 3-гидроксихромоны с *N*-метилизохинононовым фрагментом в положении 2. Исследованы их спектрально-флуоресцентные свойства, а также сольватофлуорохромия и влияние полярности растворителя на процесс внутримолекулярного фотопереноса протона в возбужденном состоянии. Для рассмотренных хромонов объяснена наблюдаемая для них отрицательная сольватофлуорохромия, а также изменение соотношения интенсивности полос флуоресценции нормальной и фототаутомерной форм с ростом полярности среды.

В последнее время широкое распространение получило применение флуоресцентных методов для анализа функциональных характеристик биологических систем на микро-уровне [1,2], при этом особое внимание сосредотачивается на живых клетках, внутриклеточных органеллах и клеточных мембранах. На основе флуоресцентных красителей, чувствительных к различным параметрам своего ближайшего окружения, разрабатываются соответствующие зонды и методики их применения. При этом в большинстве случаев основным аналитическим сигналом является интенсивность флуоресценции, изменяющаяся с изменением параметров окружения молекулы-зонда. Такой подход, однако, имеет существенный недостаток: необходимость градуировки.

Применение в качестве флуоресцентных зондов молекул, имеющих многополосные спектры испускания, открыло новое направление – радиометрический флуоресцентный мониторинг биообъектов, для которого основным аналитическим сигналом является соотношение интенсивности полос в спектре флуоресценции зонда [3,4]. Наиболее широко используемыми в этих целях соединениями являются вещества, в молекулах которых осуществляется внутримолекулярный фотоперенос протона в возбужденном состоянии, в частности, различные производные 3-гидроксихромоны, имеющие выраженные электронодонорные заместители в арильном или гетарильном фрагменте в положении 2 молекулы.

Исследования последних лет показали эффективность 3-гидроксихромонов как индикаторов полярности среды [5]; степени гидратированности, что важно для анализа примесей воды [6] и состава органических растворителей [7]; в исследованиях комплексообразования щелочных и щелочноземельных металлов, в том числе в системах, моделирующих биологические объекты [8] и т.д.

Вследствие того, что влияние окружающей среды на спектрально-люминесцентные свойства органических молекул, особенно - имеющих многополосные спектры флуоресценции, представляет собой многопараметрический комплекс сложных закономерностей [9], систематическое исследование таких эффектов дает шанс успешного решения проблемы создания высокоэффективных радиометрических зондов с заранее заданными свойствами.

В данной работе обсуждается синтез и спектрально-флуоресцентные характеристики новых люминесцентных молекул – производных 3-гидроксихромоны с азотосодержащим гетероциклическим заместителем в положении 2. На примере *N*-метилизохинолон-1(2*Н*)-4-ил замещенных 3-гидроксихромонов показана возможность протекания реакции внутримолекулярного фотопереноса протона у производных, содержащих электроноакцепторные группировки в положении 2 хромонового бицикла, обнаружена нетипичная для известных ранее 3-гидроксихромоновых систем отрицательная сольватофлуорохромия и дано объяснение этому явлению.

Экспериментальная часть

Синтез исследуемых производных 3-гидроксихромона был проведен по следующей схеме. Исходя из изохинолина был получен N-метилизохинолон-1(2H)-4-карбальдегид [10]. Далее следуя модифицированной методике Алгара-Флинна-Оямады [11,12] были получены сначала соответствующие халконы, а затем хромоны.

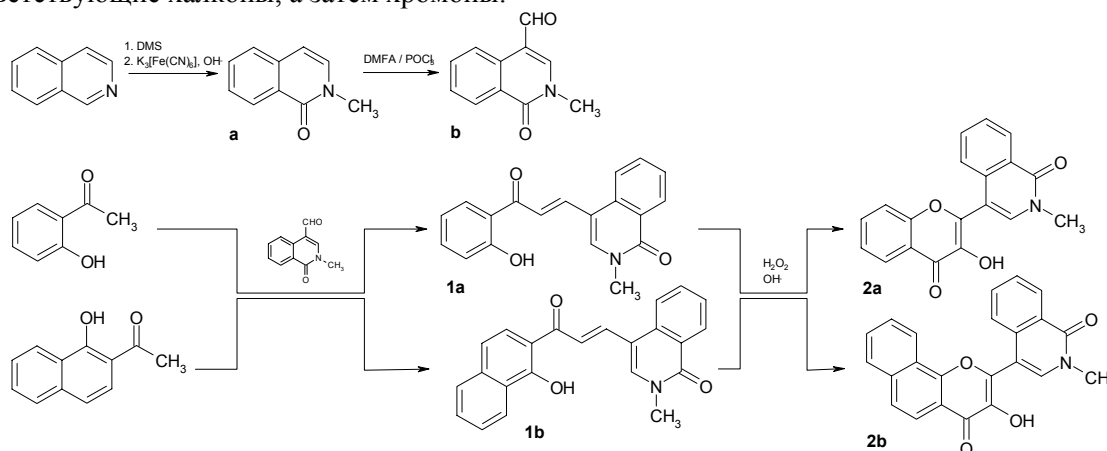


Рисунок 1. Общая схема синтеза производных 2-(N-метил-изохинолон-1(2H)-4-ил)-3-гидроксихромона.

Халконы 1a-b. Смесь 0.0025 моль (0.47 г) N-метилизохинолон-1(2H)-4-карбальдегида и 0.0025 моль соответствующего *орто*-гидрокси-арилметилкетона растворяют в 10 мл этанола, прибавляют 1 мл 50% водного раствора NaOH (наблюдают углубление окраски раствора) и оставляют на ночь. На следующий день к реакционной смеси прибавляют равный объем дистиллированной воды и нейтрализуют 5% раствором HCl до pH = 6. Выпавший осадок фильтруют, промывают этанолом и сушат.

Хромоны 2a-b. К взвеси 0.002 моль предварительно высушенного халкона в 10 мл этанола добавляют 3 мл 50% водного раствора NaOH. После этого небольшими порциями при перемешивании прибавляют 3 мл 35% раствора H₂O₂. Сначала наблюдается образование геля эпоксида, при последующем добавлении перекиси смесь снова становится жидкой. По окончании добавления смесь кипятят в течение 2-3 минут для удаления избытка перекиси. Затем реакционную смесь разбавляют в 2 раза дистиллированной водой и нейтрализуют 5% раствором HCl. Выпавший осадок фильтруют, промывают этанолом и сушат. Перекристаллизация из метанола.

Структура полученных соединений была подтверждена данными масс-спектропии (прибор Varian 1200L, электронный удар, e = 70 эВ), чистота контролировалась методом тонкослойной хроматографии (силикагель, элюент – этилацетат или метанол/изопропанол 1:5).

Таблица 1. Физико-химические характеристики синтезированных соединений

Соед.	Брутто-формула	Молекул. масса	T _{пл} , °C	Выход, %	Молек. ион, M/z
1a	C ₁₉ H ₁₅ NO ₃	305.33	115-123	69	305
1b	C ₂₃ H ₁₇ NO ₃	355.39	127-131	74	355
2a	C ₁₉ H ₁₃ NO ₄	319.31	> 300	64	319
2b	C ₂₃ H ₁₅ NO ₄	369.37	> 300	59	369

Для соединений **1a-b**, **2a-b** были получены электронные спектры поглощения (спектрофотометр Hitachi U-3210) и флуоресценции (спектрофлуориметр Hitachi F-4010). Эталонном для определения квантового выхода флуоресценции служил раствор бисульфата хинина в 0.5 моль/л растворе серной кислоты [13]. Разделение спектров флуоресценции на индивидуальные составляющие было произведено с использованием специальной программы, реализующей алгоритм Флетчера-Пауэлла с аппроксимацией формы индивидуальной полосы асимметричной лог-нормальной функцией Сиано и Метцлера [14].

Обсуждение результатов

Исследуемые халконы (соединения **1a-b**) характеризуются однополосной флуоресценцией и обычными для органических соединений Стоксовыми сдвигами (таблица 2).

Имеющаяся в молекулах **1a-b** внутримолекулярная водородная связь проявляется лишь в небольшом увеличении жесткости их структуры. Квантовые выходы флуоресценции халконов низкие, что традиционно объясняется для этого ряда соединений негативным влиянием $\pi\pi^*$ -уровней карбонильной группы, увеличивающих вероятность интеркомбинационной конверсии, конкурирующей с испусканием флуоресценции [15]. Наличие внутримолекулярной водородной связи должно повышать энергию триплетного $\pi\pi^*$ -уровня и соответственно – уменьшать скорость интеркомбинационной конверсии. По-видимому, этого оказывается недостаточно для получения интенсивной флуоресценции для рассматриваемых в данной работе производных.

Таблица 2. Спектрально-флуоресцентные свойства исследуемых халконов и 3-гидроксихромонов

Соед.	Растворитель	ν_{abs} , см ⁻¹	ν_{fl}^N , см ⁻¹	$\Delta\nu_{ST}^N$, см ⁻¹	ν_{fl}^T , см ⁻¹	$\Delta\nu_{ST}^T$, см ⁻¹	ϕ
1a	толуол	25240	20840	4400	-	-	-
1b	толуол	26700	20820	5880	-	-	-
2a	толуол	28700	23740	4960	18020	10680	0.0100
	1,4-диоксан	30200	24990	5210	17960	12240	0.0200
	этилацетат	30320	25420	4900	18090	12230	0.0200
	1,2-дихлорэтан	30260	25485	4775	18157	12103	0.0300
	ацетон	30220	25242	4978	17850	12370	0.0230
	ацетонитрил	30380	25398	4982	18160	12220	0.0400
2b	толуол	28480	23515	4965	18170	10310	0.0110
	1,4-диоксан	30160	25030	5130	18145	12015	0.0001
	этилацетат	30320	25335	4985	18070	12250	0.0002
	1,2-дихлорэтан	30260	25505	4755	18115	12145	0.0001
	ацетон	30220	25040	5180	18070	12150	0.0001
	ацетонитрил	30400	25155	5245	18170	12230	0.0002

в таблице: ν_{abs} – длинноволновый максимум в спектре поглощения; ν_{fl}^N , ν_{fl}^T – максимумы флуоресценции нормальной и фототаутомерной форм соответственно; $\Delta\nu_{ST}^N$, $\Delta\nu_{ST}^T$ – Стоксов сдвиг флуоресценции нормальной и фототаутомерной форм соответственно; ϕ – квантовый выход флуоресценции.

Напротив, хромоны (соединения **2a-b**) имеют в спектре флуоресценции две полосы, что свидетельствует о протекании в их электронно-возбужденном состоянии реакции внутримолекулярного фотопереноса протона (ESIPT, рисунок 2).

Коротковолновую полосу испускания, находящуюся в области 23700÷25500 см⁻¹, мы относим к флуоресценции нормальной енольной формы, а длинноволновую в области 17800÷18200 см⁻¹ – к испусканию кето-фототаутомера. Стоксов сдвиг флуоресценции фототаутомера, значения которого достигают почти 12400 см⁻¹, может быть классифицирован как аномально большой.

Сольватохромные свойства полученных хромонов были изучены в серии из шести апротонных растворителей различной полярности. В качестве меры полярности растворителей был выбран нормированный индекс Райхардта E_T^N [16], поскольку он позволяет в той или иной степени учесть не только универсальные, но и специфические взаимодействия растворенного вещества с его ближайшим окружением на молекулярном уровне. В спектрах поглощения с ростом полярности растворителя наблюдается незначительный батохромный сдвиг длинноволновой полосы.

По данным спектрофлуориметрических измерений были построены зависимости положения максимумов испускания нормальной и фототаутомерной форм относительно индекса полярности Райхардта (рисунок 3).

Из приведенных графиков видно, что, как и во многих других случаях, положение максимума флуоресценции фототаутомера практически нечувствительно к растворителю. Это объясняется прежде всего тем, что вследствие перераспределения заряда в ходе фотопереноса протона дипольный момент фототаутомера существенно ниже, чем у нормальной формы [9]. Напротив,

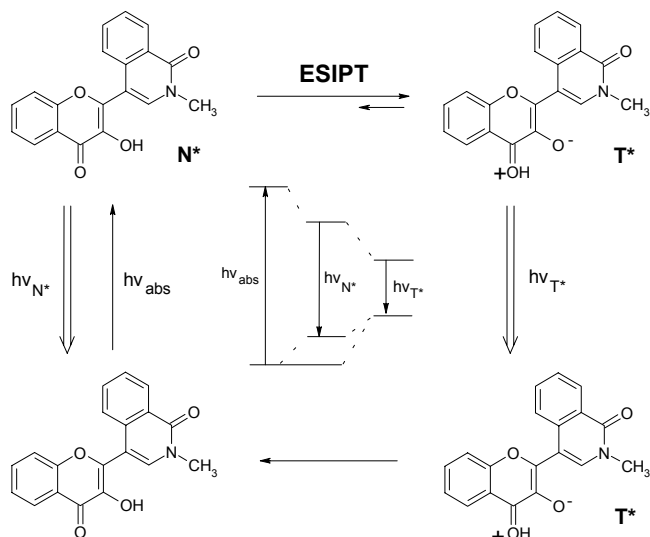


Рисунок 2. Фотохимический цикл и энергетическая схема нижних синглетных состояний реакции внутримолекулярного фотопереноса протона для 2-(N-метилизохинолон-1(2H)-4-ил)-3-гидроксихромола.

для нормальной формы наблюдается гипсохромный сдвиг полосы ее испускания с ростом полярности растворителя. Такое поведение указывает на так называемую отрицательную сольватофлуорохромии, что является прямой противоположностью аналогичному поведению ранее описанных пара-диэтиламинофлавонола [9], диэтиламинобензофурано- [5] и изученного нами ранее бензимидазолил- [17] производных 3-гидроксихромола.

Для выявления причин наблюдаемой отрицательной сольватофлуорохромии нормальной формы изохинолоновых аналогов 3-гидроксихромола нами были проведены расчеты в полуэмпирическом приближении RM1 [18], которое представляет собой недавнюю репараметризацию популярной схемы AM1 [19], осуществленную авторами с целью улучшения совпадения расчетных данных с экспериментом.

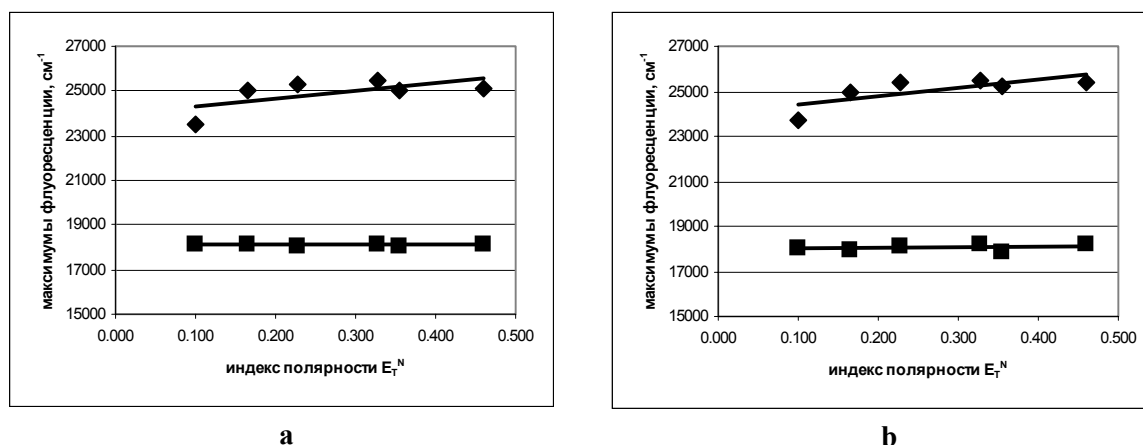


Рисунок 3. Зависимость положения максимумов флуоресценции нормальной формы (♦) и фототаутомера (■) от полярности растворителя для соединений **2a-b**.

Как показали наши расчеты, полярность возбужденной молекулы **2a** действительно несколько уменьшается в ее структурно-релаксированном нижнем возбужденном синглетном состоянии: от ~ 2.8 до ~ 2.5 D. В случае 4'-N,N-диметиламино-замещенного 3-гидроксихромола (DMAF), для которого характерна заметная положительная сольватофлуорохромия [20], имеет место почти двукратное увеличение полярности (от 3.4 до 6.1 D, наши данные, RM1). Выяснить причину подобного нестандартного поведения исследуемых изохинолоновых хромонов удалось при анализе характера перераспределения электронной плотности в молекуле с привлечением чисел локализации электронного возбуждения и чисел переноса заряда [21,22], успешно применявшихся нами ранее для теоретического анализа реакции фотопереноса протона в ряду орто-гидрокси производных оксазола и оксадиазола [23-26]. На рисунке 4 представлены диаграммы перераспределения электронной плотности в молекуле **2a** и модельной молекуле DMAF при переходе в нижнее синглетное возбужденное состояние.

Видно, что в случае соединения **2a** имеет место существенная локализация возбуждения на изохинолоновом бицикле, в то время как участие хромонового фрагмента в формировании возбужденного состояния значительно ослаблено. Перераспределение электронной плотности при переходе в возбужденное состояние также связано в первую очередь с изохинолоновым фрагментом. Таким образом, можно сделать заключение об изменении природы флуорофора у изо-

хинолоновых аналогов 3-гидроксихромоны: главную роль в молекулах этого ряда играет изохинолоновый бицикл, тогда как енольный фрагмент хромоны выступает лишь в качестве заместителя. Отмеченное смещение электронной плотности может быть количественно представлено в виде вектора смещения дипольного момента молекулы при переходе в возбужденное состояние $\Delta \mu$. По своему направлению этот вектор ориентирован противоположно вектору дипольного момента C=O группы хромонового бицикла, который вносит существенный вклад в полярные характеристики молекул **2a-b**. По всей вероятности, именно это обстоятельство обуславливает снижение дипольного момента в S_1 -состоянии и связанную с этим явлением отрицательную сольватофлуорохромную.

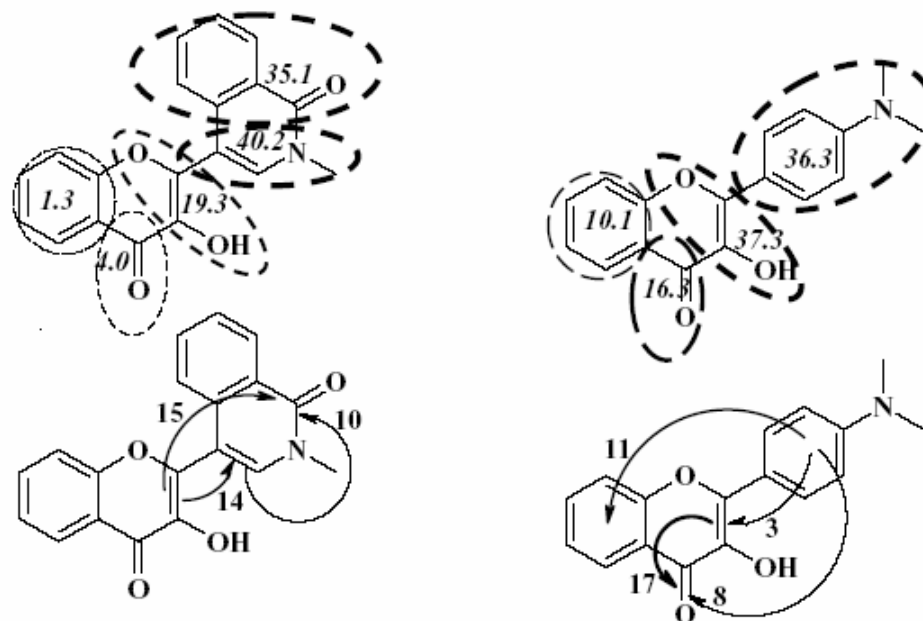


Рисунок 4. Локализация электронного возбуждения на выделенных структурных фрагментах (вверху) и характер перераспределения электронной плотности (нижняя диаграмма) для электронного перехода S_0-S_1 в молекулах **2a** и DMAF.

Тем не менее, в молекуле **2a** при переходе в возбужденное состояние имеет место заметное перемещение электронной плотности с группировки O=C-OH на изохинолоновый фрагмент, в результате чего возрастает кислотность гидроксильной группы. Тем самым создаются условия для протекания реакции фотопереноса протона: как было показано нами ранее, именно возрастание кислотности протонодонорного центра является главной движущей силой реакции внутримолекулярного фотопереноса протона [8,23,25,26].

С точки зрения перспективы использования производных 3-гидроксихромоны в качестве ратиометрических зондов необходимо было проанализировать чувствительность соотношения интенсивностей флуоресценции нормальной формы и фототаутомера к полярным характеристикам растворителя [3,4]. В соответствии с рекомендациями авторов [9], для построения сольватофлуорохромных зависимостей, приведенных на рис. 5, использовался логарифм отношения интенсивностей полос флуоресценции нормальной и фототаутомерной форм соединений **2a-b**.

Как видно, с ростом E_T^N имеет место выраженная тенденция к уменьшению относительной интенсивности испускания фототаутомерной формы. С одной стороны, это может говорить о снижении эффективности процесса внутримолекулярного фотопереноса протона в полярных растворителях, что может быть следствием конкуренции образующихся межмолекулярных H-комплексов с участием молекул растворителя с имеющейся в молекулах **2a** и **2b** внутримолекулярной водородной связью, необходимой для осуществления реакции фотопереноса протона. Вместе с тем, нельзя исключать и описанное в ряде работ [23-26] тушение флуоресценции фототаутомерных форм в полярной среде, также приводящее к увеличению отношения I_{N^*}/I_{T^*} .

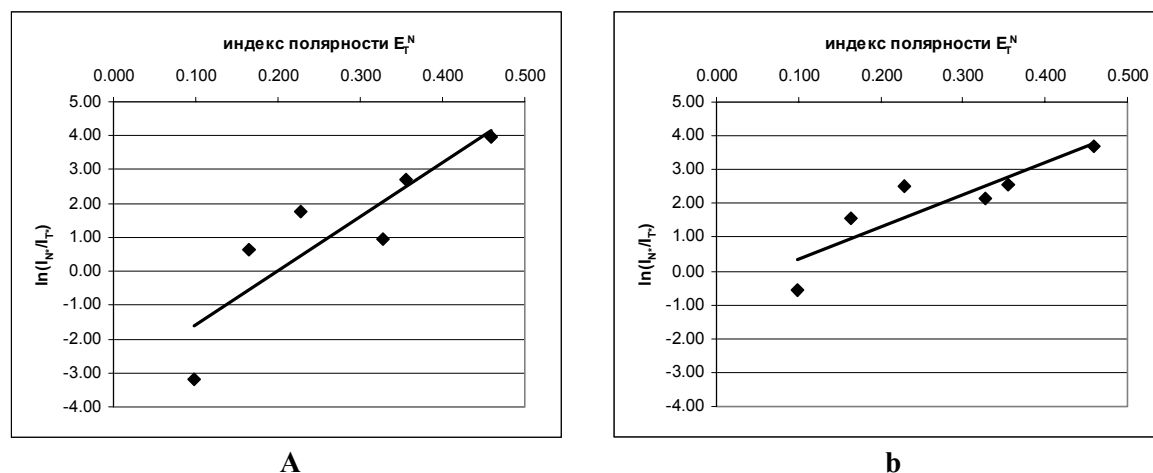


Рисунок 5. Зависимость логарифма отношения интенсивностей флуоресценции нормальной и таутомерной форм от полярности растворителя для соединений **2a-2b**.

В результате проведенных исследований можно сделать заключение, что введение во второе положение молекулы 3-гидроксихромона группировок, проявляющих не электронодонорные, а электроноакцепторные свойства, приводит к получению соединений, характеризующихся слабой отрицательной сольватофлуорохромией. Вместе с тем, подобные структурные изменения не приводят к исчезновению реакции фотопереноса протона. Отмеченные обстоятельства позволяют получать на базе 3-гидроксихромоновых систем новые радиометрические зонды, обладающие набором флуоресцентных свойств, ранее не наблюдавшихся в этом ряду соединений.

Литература

1. *Emptage N. J.* Fluorescent imaging in living systems // *Curr. Opin. Pharmacol.*– 2001.– Vol. 1.– P. 521-525.
2. *Harvath L.* Overview of fluorescence analysis with the confocal microscope // *Methods Mol. Biol.*– 1999.– Vol. 115.– P. 149-158.
3. *Guharay J., Sengupta P. K.* Excited-state proton transfer and dual fluorescence of robinetin in different environments // *Spectrochim. Acta, Part A.*– 1997.– V. 53.– P. 905-912.
4. *Sytnik A., Gormin D., Kasha M.* Interplay between excited-state intramolecular proton transfer and charge transfer in flavonols and their use as protein-binding-site fluorescent probes // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*– 1994.– V. 91.– P. 11968-11972.
5. *Ercelen S., Klymchenko A. S., Demchenko A. P.* Ultrasensitive fluorescent probe for the hydrophobic range of solvent polarities // *Anal. Chim. Acta.*– 2002.– V. 464.– P. 273-287.
6. *Liu W., Wang Y., Jin W., Shen G., Yu R.* Solvatochromogenic flavone dyes for the detection of water in acetone // *Anal. Chim. Acta A.*– 1999.– V. 383.– P. 299-307.
7. *Swinney T. C., Kelley D. F.* Proton transfer dynamics in substituted 3-hydroxyflavones: solvent polarization effects // *J. Chem. Phys.*– 1993.– V. 99.– P. 211-221.
8. *Roshal A. D., Grigorovich A. V., Doroshenko A. O., Pivovarenko V. G., Demchenko A. P.* Flavonols and crown-flavonols as metal cation chelators. Different nature of Ba²⁺ and Mg²⁺ complexes. // *J. Phys. Chem. A.*– 1998.– V. 102, № 29.– P. 5907-5914.
9. *Klymchenko A. S., Demchenko A. P.* Multiparametric probing of intermolecular interactions with fluorescent dye exhibiting excited state intramolecular proton transfer // *Phys. Chem. Chem. Phys.*– 2003.– V. 5.– P. 461-468.
10. *Horning G. E., Lacasse G., Muchovski J. M.* Isocarbostyrils. I. Electrophilic substitution reactions // *Canad. Journ. Chem.*– 1971.– V. 49, № 17.– P. 2785-2796.
11. *Algar J., Flynn J.* New synthesis of flavonols // *Proc. Royal Irish Acad.*– 1934.– V. B42.– P.1-8.
12. *Smith M. A., Neumann R. M., Webb R. A.* A modification of the Algar-Flynn-Oyamada preparation of flavonols // *J. Het. Chem.*– 1968.– V. 5.– P. 425-426.
13. *Melhuish W. H.* Absolute spectrofluorometry // *J. Res. Nat. Bur. Stand. USA.*– 1972.– V. 76A, № 6.– P. 547-560.
14. *Siano D. B., Metzler D. E.* Band shapes of the electronic spectra of complex molecules // *J. Chem. Phys.*– 1969.– V. 51, № 5.– P. 1856-1861.

15. Дукерман С.В., Масленникова В.П., Лаврушин В.Ф. Структура и люминесценция α,β -ненасыщенных кетонов, производных диметиланилина // *Опт. спектр.* – 1967. – Т.23. – С.396-402.
16. Reichardt C. Solvatochromic dyes as solvent polarity indicators // *Chem. Rev.* – 1994. – V. 94. – P. 2319-2358.
17. Svechkarev D. A., Doroshenko A. O., Lukatskaya L. L. Synthesis and spectral properties of new heterocyclic 3-hydroxychromone derivatives // *Proc. of the CNCH-2006 International Conference, Kharkov, Ukraine, 2006.* – P. 216.
18. Rocha G. B., Freire R. O., Simas A. M., Stewart J. J. P. RM1: A reparameterization of AM1 for H, C, N, O, P, S, F, Cl, Br, and I // *J. Comput. Chem.* – 2006. – V. 27, № 10. – P. 1101-1111.
19. Dewar M. J. S., Zoebich E. G., Healy E. F. AM1: a new general purpose quantum mechanical molecular model // *J. Amer. Chem. Soc.* – 1985. – V. 107. – P. 3902-3908.
20. Catalan J., Del Valle J. C., Diaz C., Palomar J., De Paz J. L. G., Kasha M. Solvatochromism of fluorophores with an intramolecular hydrogen bond and their use as probes in biomolecular cavity sites // *Int. J. Quant. Chem.* – 1999. – V. 72. – P. 421-438.
21. Лузанов А. В., Сухоруков А. А., Уманский В. Э. Применение переходной матрицы плотности для анализа возбужденных состояний // *Теор. и эксперим. химия.* – 1974. – Т. 10, № 4. – С. 456-464.
22. Лузанов А. В. Структура электронного возбуждения молекул в квантово-химических моделях // *Успехи химии.* – 1980. – Т. 64, № 11. – С. 2086-2095.
23. Дорошенко А. О., Посохов Е. А., Шершуков В. М., Митина В. Г., Пономарев О. А. Реакция внутримолекулярного фотопереноса протона в возбужденном состоянии в ряду орто-оксипроизводных 2,5-диариллоксазола // *Химия высоких энергий.* – 1997. – Т. 31, № 6. – С.428-435.
24. Doroshenko A. O., Posokhov E. A., Verezubova A. A., Ptyagina L. M. Excited state intramolecular proton transfer reaction and luminescent properties of the ortho-hydroxy derivatives of 2,5-diphenyl-1,3,4-oxadiazole // *J. Physical Organic Chemistry.* – 2000. – V. 13. – P. 253-265.
25. Doroshenko A. O., Posokhov E. A., Verezubova A. A., Ptyagina L. M., Skripkina V. T., Shershuikov V. M. Radiationless deactivation of the excited phototautomer form and molecular structure of ESIP-T-compounds // *Photochemical and Photobiological Sciences.* – 2002. – V. 1, № 2. – P. 92-99.
26. Дорошенко А. О. Физико-химические принципы создания высокоэффективных органо-люминофоров с аномально высоким стоксовым сдвигом // *Теор. и эксперим. химия.* – 2002. – Т. 38, № 3. – С. 133-152.

Поступила в редакцию 25 сентября 2007 г.

Kharkov University Bulletin. 2007. № 770. Chemical Series. Issue 15(38). D. A. Svechkarev, G. V. Karpushina, A. O. Doroshenko. Synthesis and spectral properties of new luminescent compounds with intramolecular proton phototransfer reaction – derivatives of 2-(*N*-methylisoquinolon-1(2H)-4-yl)-3-hydroxychromone.

New heterocyclic derivatives of 3-hydroxychromone with the isoquinolone fragment in position 2 were synthesized. Their spectral and fluorescent properties, as well as solvatofluorochromism and solvent polarity influence on the process of the excited state intramolecular proton transfer are discussed. The observed negative solvatofluorochromism as well as changes in the normal-to-tautomer fluorescence intensity ratio with the increasing medium polarity are clarified for the compounds under study.