

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ УКРАИНЫ
Харьковский национальный университет имени В. Н. Каразина

На правах рукописи

Чейпеш Татьяна Александровна

УДК 544.354.081.7 : 54 – 43 + 544.135 + 544.77.051.6

**Флуоресцеины в растворах: протолитические равновесия,
оптические свойства и применение для исследования каликсаренов**

02.00.04 – физическая химия

Диссертация
на соискание ученой степени кандидата химических наук

Научный руководитель:
Мчедлов-Петросян Н. О.
доктор химических наук, профессор

Харьков – 2015

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ И СОКРАЩЕНИЙ	6
ВВЕДЕНИЕ	11
РАЗДЕЛ 1 ФЛУОРЕСЦЕИНОВЫЕ КРАСИТЕЛИ В ИСТИННЫХ И ОРГАНИЗОВАННЫХ РАСТВОРАХ. ВОДНЫЕ РАСТВОРЫ КАЛИКСАРЕНОВ КАК РАЗНОВИДНОСТЬ КОЛЛОИДНЫХ СИСТЕМ (ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР)	18
1.1 Флуоресцеин и его производные.....	18
1.1.1 Спектральные характеристики ионных форм флуоресцеина и его производных в растворах	19
1.1.2 Кислотно-основные свойства и таутомерия флуоресцеиновых красителей в растворителях различных типов.....	24
1.1.3 Флуоресцеиновые красители в организованных средах.....	29
1.2 Водорастворимые каликсарены.....	34
1.2.1 Агрегация каликсаренов водных растворах.....	36
1.2.1 Взаимодействие каликсаренов с красителями.....	39
1.3 Постановка задачи и выбор систем для исследования	41
РАЗДЕЛ 2 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	46
2.1 Аппаратура и материалы.....	46
2.1.1 Приборы	46
2.1.2 Посуда	47
2.2 Реактивы.....	48
2.2.1 Красители.....	48
2.2.2 Растворители	50
2.2.3 Каликсарены и поверхностно-активные вещества.....	50
2.2.4 Другие реактивы	51
2.3 Методика приготовления растворов и проведения эксперимента	51
2.3.1 Проведение спектрофотометрических исследований.....	51

2.3.2 Расчет квантовых выходов флуоресценции и времен жизни возбужденного состояния.....	52
2.3.3 Определение констант диссоциации красителей в истинных растворах	52
2.3.4 Проведение диализа в коллоидных растворах каликсарена 1CA6.....	54
2.3.5 Определение спектральных характеристик и констант ионизации красителей в присутствии каликсаренов	55
2.3.6 Исследование кинетики обесцвечивания бромфенолового синего и кристаллического фиолетового	56
2.3.7 Исследование кинетики гидролиза дилаурилфлуоресцеина.....	57
РАЗДЕЛ 3 ПРОТОЛИТИЧЕСКИЕ И СПЕКТРАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ЭФИРОВ И АМИНОПРОИЗВОДНЫХ ФЛУОРЕСЦЕИНА В ИСТИННЫХ РАСТВОРАХ. ОБЩАЯ СХЕМА ИОНИЗАЦИИ ФЛУОРЕСЦЕИНОВЫХ КРАСИТЕЛЕЙ.....	58
3.1 Диссоциация производных флуоресцеина в водных растворах и смеси вода – этанол (50% масс.).....	58
3.1.1 Структура метилфлуоресцеина и диметилфлуоресцеина в твердом состоянии	60
3.1.2 Кислотно-основные и спектральные свойства метилового эфира флуоресцеина и других производных в водных и водно-этанольных растворах...	63
3.2 Таутомерия метилфлуоресцеина в различных растворителях.....	69
3.2.1 Таутомерные превращения метилфлуоресцеина в воде и в смеси вода – этанол с массовой долей спирта 50 %	69
3.2.2 Оценка возможности образования моноаниона-лактона в растворителях различных типов.....	73
3.3 Протолитические свойства 4'- и 5'-аминофлуоресцеина в воде и в водно-этанольной смеси (50 % масс.).....	79
3.3.1 Анализ подходов к обработке спектрофотометрических данных при расчете ступенчатых констант ионизации трех- и четырехосновных красителей.	81
3.3.2 Таутомерия аминфлуоресцеинов и спектральные характеристики их ионных и молекулярных форм в водных и водно-этанольных растворах	88

3.4 Процессы поглощения и испускания света, а также переноса протона в растворах аминифлуоресцеинов и родственных соединений в неводных растворителях	97
3.4.1 Таутомерный состав моноаниона некоторых производных флуоресцеина в НДС-растворителях.....	97
3.4.2 Флуоресценция анионов флуоресцеиновых красителей в неводных растворителях	103
3.5 Выводы к разделу 3.....	107
РАЗДЕЛ 4 ФЛУОРЕСЦЕИН И РОДСТВЕННЫЕ СОЕДИНЕНИЯ КАК ИНДИКАТОРЫ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ВОДНЫХ РАСТВОРОВ КАТИОННЫХ КАЛИКСАРЕНОВ	109
4.1 Состояние катионных каликсаренов, содержащих четвертичные аммониевые группы, в водных растворах	109
4.1.1 Размеры, форма и электрокинетический потенциал агрегатов каликсаренов.....	109
4.1.2 Связывание противоионов и различных индикаторов агрегатами катионных каликсаренов	115
4.1.2.1 Оценка концентрации несвязанных хлорид-ионов в растворах каликсаренов 3CA4 и 1CA6 потенциометрическим методом	115
4.1.2.2 Равновесный диализ растворов каликсаренов.....	118
4.2 Кислотно-основные и таутомерные превращения ряда флуоресцеиновых красителей в растворах каликс[6] и каликс[4]аренов разной гидрофобности.	120
4.2.1 Спектры поглощения флуоресцеиновых красителей и характер их локализации в растворах каликсаренов	121
4.2.2 Влияние агрегатов каликсаренов на константы ионизации флуоресцеиновых красителей.....	129
4.2.3 Таутомерные превращения флуоресцеина в присутствии агрегатов каликсаренов.....	134
4.3 Влияние агрегатов катионных дифильных соединений на процессы поглощения и испускания света производных флуоресцеина	137

4.3.1 Флуоресценция анионной формы децилфлуоресцеина в растворах каликсаренов.....	137
4.3.2 Спектральные характеристики дианионов 4'- и 5'-аминофлуоресцеина	139
4.4 Кинетика щелочного гидролиза дилаурилфлуоресцеина.....	148
4.4.1 Гидролиз дилаурилфлуоресцеина в истинных водно-этанольных растворах и в псевдофазе мицелл ЦТАБ	153
4.4.2 Гидролиз дилаурилфлуоресцеина в присутствии агрегатов каликсаренов.....	157
4.5 Некоторые тестовые процессы для выявления различий агрегатов каликсаренов с разной длиной углеводородного радикала и мицелл катионных ПАВ.....	160
4.5.1 Изменение спектральных свойств сольфатохромного бетаина Райхардта $E_T(30)$ в присутствии каликсаренов	160
4.5.2 Влияние агрегатов каликсаренов на равновесие депротонирования бромфенолового синего.....	162
4.5.3 Кинетика щелочного обесцвечивания бромфенолового синего в присутствии катионных каликсаренов.....	164
4.5.4 Кинетика щелочного обесцвечивания кристаллического фиолетового в присутствии катионных каликсаренов.....	167
4.6 Выводы к разделу 4.....	170
ВЫВОДЫ	173
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	175
СПИСОК АВТОРСКИХ ПУБЛИКАЦИЙ	208
Приложение А	211

СПИСОК УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ И СОКРАЩЕНИЙ

R	– универсальная газовая постоянная, Дж·моль ⁻¹ ·К ⁻¹ ;
N_A	– число Авогадро, моль ⁻¹ ;
e	– элементарный заряд, Кл;
D_{eff}	– эффективная диэлектрическая проницаемость в пространстве между двумя группами в растворе;
T	– температура, К;
t	– время, с;
σ	– стандартное отклонение;
n_w	– коэффициент преломления воды;
n_{solv}	– коэффициент преломления растворителя;
E_T^N	– нормализованный параметр Димрота–Райхардта;
δ	– химический сдвиг атома, м.д.;
r	– расстояние между заряженной и диссоциирующей группами, нм;
l	– максимальная длина углеводородной цепи, нм;
n_C	– количество атомов углерода в углеводородной цепи;
Δ	– толщина слоя агрегата, приходящегося на каликсареновые фрагменты, нм;
$[i]$	– равновесная концентрация i -й частицы;
$[i]_t$	– равновесная концентрация i -й частицы, относящаяся к единице объема всего раствора;
$C_{0,i}$	– исходная аналитическая концентрация i -го вещества, моль/л;
C_i	– аналитическая концентрация i -го вещества, моль/л;
n_m	– количество вещества красителя, связанного агрегатами, моль;
n_0	– общее количество вещества красителя;
n	– количество молекул каликсарена (или поверхностно-

активного вещества), взаимодействующая с одной частицей красителя;

I	– ионная сила раствора, моль/л; интенсивность флуоресценции, о.е.;
α_i	– мольная доля i -й частицы, %;
γ_i	– коэффициент активности переноса i -й частицы из воды в псевдофазу агрегата;
$a_{H^+}^*$	– активность ионов H^+ , отнесенная к стандартному состоянию смешанного растворителя.
h	$= 10^{-pH}$ или $= 10^{-p a_{H^+}^*}$;
pH	– показатель активности иона водорода;
pH^w	– показатель активности иона водорода в объемной фазе;
K_{ai}	– термодинамическая константа i -й ступени диссоциации;
K_{ai}^w	– термодинамическая константа i -й ступени диссоциации в воде;
K_a^a	– «кажущаяся» константа ионизации;
K_a^{ac}	– «кажущаяся» константа ионизации в условиях полного связывания субстрата псевдофазой агрегата;
$K_T, K_T^I, K_T^{II}, K_{Tx}$	– константы таутомерных равновесий;
K_D	– константа равновесия диссоциации агрегата красителя с молекулами каликсарена (или поверхностно-активного вещества);
k_i	– «микроскопическая» константа ионизации, характеризующая i -го равновесия между отдельными таутомерами;
k_i'	– константа скорости псевдопервого порядка i -й ступени реакции реакций;
k_i	– истинная константа скорости;
k_w	– константа скорости реакции в воде;
k_m	– константа скорости реакции в псевдофазе агрегата;

ζ	– электрокинетический потенциал, мВ;
Ψ	– электрический потенциал в области локализации красителя, мВ;
β	– степень связывания противоионов агрегатами, %;
$\theta(R_i)$	– степень связывания i -й формы красителя, %;
V_{ex}	– объем внешнего раствора при диализе, мл;
V_{in}	– объем внутреннего (содержащего каликсарен) раствора при диализе, мл;
λ	– длина волны, нм;
λ_{max}	– длина волны в максимуме спектра, нм;
A	– поглощение при определенном pH;
A_i	– поглощение i -й частицы;
$A_{i, calc}$	– поглощение i -го раствора, рассчитанное, исходя из оцененных значений констант ионизации;
$A_{i, obs}$	– поглощение i -го раствора, определенное экспериментально;
$A_{\lambda_i, \infty}$	– поглощения при i -длине волны через большой промежуток времени после начала реакции (при достижении полного превращения участников реакции в продукты);
$A_{\lambda_{ex}, solv}$	– поглощение при длине волны возбуждения исследуемого вещества в неводном растворителе;
$A_{\lambda_{ex}, w}^{st}$	– поглощение при длине волны возбуждения стандартного вещества в воде;
ε_{max}	– максимальный коэффициент молярного поглощения, л·моль ⁻¹ ·см ⁻¹ ;
$\varepsilon_{\lambda_i, p}$	– коэффициент молярного поглощения p -го таутомера при i -й длине волны;
φ	– квантовый выход флуоресценции, %;
φ_{solv}	– квантовый выход флуоресценции исследуемого вещества

	в неводном растворителе, %;
S_{solv}	– площадь под кривой спектра флуоресценции исследуемого вещества в неводном растворителе, о.е.;
φ_w^{st}	– квантовый выход флуоресценции стандартного вещества в воде;
S_w^{st}	– площадь под кривой спектра флуоресценции стандартного вещества в воде;
τ	– время жизни возбужденного состояния, нс;
k_f	– константа скорости излучательной дезактивации возбужденного состояния, s^{-1} ;
k_d	– константа скорости безызлучательной дезактивации возбужденного состояния, s^{-1} ;
$H_m R^l$	– ионные и молекулярные формы красителей (m – количество протонов, способных участвовать в кислотно-основных превращениях, l – заряд частицы);
Ac	– ацильная группа;
L	– лаурильная группа;
FI²⁻	– дианион флуоресцеина;
ИК-спектроскопия	– инфракрасная спектроскопия;
ЯМР	– ядерно-магнитный резонанс;
ДРС	– динамическое рассеяние света;
ТЭМ	– трансмиссионная электронная микроскопия;
HSQC	– гетероядерная одноквантовая корреляционная спектроскопия (heteronuclear single quantum coherence);
HMBC	– гетероядерная корреляционная спектроскопии через несколько связей (heteronuclear multi-bond correlation);
MCR-ALS	– многофакторное разрешение кривых (multivariate curve resolution) с использованием переменного метода наименьших квадратов (alternating least-squares);
ЭДС	– электродвижущая сила, мВ;
ККМ	– критическая концентрации мицеллообразования, моль/л;

ККА	– критическая концентрация агрегации, моль/л;
НДВС	– не являющийся донорами водородных связей;
ДМСО	– диметилсульфоксид;
ДБУ	– 1,8-диазабицикло[5.4.0]ундецен-7;
ПАВ	– поверхностно активное вещество;
ЦТАБ	– <i>N</i> -цетил- <i>N,N</i> -триметиламмоний бромид;
ЦДАПС	– <i>N</i> -цетил- <i>N,N</i> -диметиламмонийпропансульфонат;
ДТДДАБ	– <i>N,N</i> -дитетрадецил- <i>N,N</i> -диметиламмоний бромид;
ЦПХ	– <i>N</i> -цетилпиридиний хлорид;
Гемини-ПАВ	– тетраметилен-1,4-бис(<i>N,N</i> -диметил- <i>N</i> -цетиламмоний бромид);
3СА4	– 5,11,17,23-тетракис(<i>N,N</i> -диметил- <i>N</i> -гидроксиметил-аммоний)-метилен- 25,26,27,28-тетрапропилокси-каликс[4]арена тетрахлорид;
6СА4	– 5,11,17,23-тетракис(<i>N,N</i> -диметил- <i>N</i> -гидроксиметил-аммоний)-метилен- 25,26,27,28-тетрагексилокси-каликс[4]арена тетрахлорид;
8СА4	– 5,11,17,23-тетракис(<i>N,N</i> -диметил- <i>N</i> -гидроксиметил-аммоний)-метилен- 25,26,27,28-тетраоктилокси-каликс[4]арена тетрахлорид;
12СА4	– 5,11,17,23-тетракис(<i>N,N</i> -диметил- <i>N</i> -гидроксиметил-аммоний)-метилен- 25,26,27,28-тетрадодецил-оксикаликс[4]арена тетрахлорид;
1СА6	– 5,11,17,23,29,35-гексакис(<i>N,N</i> -диметил- <i>N</i> -гидроксиэтил-аммоний)-метилен-37,38,39,40,41,42-гексаметокси-каликс[6]арена гексахлорид.
$E_T(30)$	– стандартный индикатор Райхардта, 2,6-дифенил-4-(2,4,6-трифенилпиридиний-1-ил) фенолят;

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы

Флуоресцеин и его производные являются одними из наиболее распространенных люминесцентных реагентов [1–4]. Такое широкое их применение обусловлено в первую очередь ценными оптическими свойствами дианионов красителей. Кроме относительно высокого коэффициента молярного поглощения и квантового выхода флуоресценции, важной особенностью является способность флуоресцеиновых красителей претерпевать кислотно-основные и таутомерные превращения, а также связываться с различными макромолекулами или агрегатами. Это открывает широкие возможности для их применения как рН-чувствительных зондов [4–6]. Параметры протолитических равновесий красителей сильно зависят от характеристик среды, поэтому их определение в истинных, а особенно в организованных растворах является актуальной задачей не только для рационального применения индикаторов как оптических зондов, но и для получения дополнительной информации относительно особенностей их микроокружения [7, 8].

Влияние заместителей на флуоресцентные и кислотно-основные свойства флуоресцеиновых красителей также активно исследуется [9, 10]. Так, было выявлено, что в случае некоторых производных флуоресцеина в водных растворах образуются таутомеры, нетипичные для незамещенного флуоресцеина: лактонная форма моноаниона и дианиона для нитропроизводных [11] или «фенолятный» таутомер с депротонированной гидроксильной и недиссоциированной карбоксильной группами в газовой фазе [12, 13], а также в растворителях, не являющихся донорами водородных связей (НДВС-растворители) [14]. Доказательство универсального характера этих закономерностей и расширение представлений о флуоресцентных свойствах и таутомерных превращениях флуоресцеиновых красителей требуют дополнительных исследований.

Индикаторные красители являются удобным инструментом для исследования «классических» мицеллярных растворов поверхностно-активных веществ (ПАВ) [7, 8], полиэлектролитов [15, 16], в том числе белков [2, 17], а также других типов организованных систем: липосом [18], мицелл гемини-ПАВ [19], наночастиц кремнезема, покрытых ПАВ [20]. Кроме того, в последнее время активно изучаются растворы полостных молекул-рецепторов: дендримеров [21, 22], циклодекстринов [23, 24], каликсаренов [25–27]. Связывание этими соединениями различных субстратов изначально рассматривались в рамках концепции взаимодействий «гость-хозяин». Однако было обнаружено, что некоторые из полостных соединений склонны к образованию агрегатов в растворах [28–32], поэтому можно ожидать, что будут проявляться также мицеллярные эффекты.

Коллоидный характер водных растворов катионных каликсаренов, модифицированных длинными гидрофобными радикалами, исследовался во многих работах [32–35]. Выраженная дифильность этих соединений, а также наличие в молекуле нескольких гидрофобных групп позволяет поставить их в один ряд с димерными и олигомерными ПАВ [34, 36, 37]. Связывание молекул или ионов такими образованиями происходит не только за счет включения в полость каликсарена, но и за счет гидрофобного взаимодействия. Для выяснения особенностей характера агрегации, а также выявления возможных отличий агрегатов от мицелл катионных ПАВ необходимо сопоставить их влияние на связанные зонды.

Связь работы с научными программами, планами, темами

Диссертационная работа является частью плановых исследований, которые проводятся на кафедре физической химии Харьковского национального университета имени В. Н. Каразина в рамках госбюджетной НИР: «21–15–13» № госрегистрации 0112U008338.

Цель и задачи исследования

В данной диссертационной работе была поставлена **цель**: установить особенности таутомерии, кислотно-основных и спектральных свойств простых и сложных эфиров флуоресцеина и его аминопроизводных в водных и НДС-растворителях, а также выяснить характер влияния агрегатов катионных каликсаренов различной гидрофобности на спектральные и протолитические характеристики флуоресцеиновых красителей.

Для достижения цели необходимо было решить следующие основные **задачи**:

1. Определить спектральные и кислотно-основные характеристики аминопроизводных флуоресцеина и ряда модельных соединений в водных и водно-этанольных растворах.
2. Выявить особенности таутомерии производных флуоресцеина, основываясь на сопоставлении спектральных характеристик индивидуальных ионных форм с привлечением результатов ИК- и ЯМР-спектроскопии красителей в твердом состоянии или в растворах.
3. Для выяснения характера влияния растворителя и кислотности среды на флуоресценцию определить квантовые выходы флуоресценции и времена жизни возбужденного состояния аминифлуоресцеиновых красителей в растворителях различных типов.
4. Спектрофотометрически определить константы равновесий многоосновных флуоресцеиновых красителей в присутствии агрегатов катионных каликс[4]- и каликс[6]аренов и сопоставить особенности их влияния на протолитические равновесия с влиянием мицелл катионных ПАВ.
5. Оценить параметры флуоресценции аминифлуоресцеина и децилфлуоресцеина при связывании их агрегатами каликсаренов и оценить возможность применения красителей как флуоресцентных зондов для исследования степени сходства агрегатов и мицелл катионных ПАВ.
6. Определить константы скорости щелочного гидролиза дилаурилфлуоресцеина, а также реакций нуклеофильного присоединения

гидроксид-иона к дианиону бромфенолового синего и катиону кристаллического фиолетового в присутствии агрегатов каликсаренов.

Объект исследования: протолитические равновесия и оптические свойства производных флуоресцеина в различных растворителях, а также в присутствии агрегатов катионных каликсаренов различного строения и гидрофобности в водных растворах.

Предмет исследования: влияние растворителя и агрегатов водорастворимых катионных каликсаренов на спектральные, кислотно–основные характеристики, а также таутомерию флуоресцеиновых красителей.

Методы исследования. Для достижения поставленных задач применялись методы электронной спектроскопии, ИК-спектроскопии, флуоресцентной спектроскопии, наносекундной импульсной флуориметрии, ^1H и ^{13}C ЯМР-спектроскопии, потенциометрии, динамического рассеяния света, трансмиссионной электронной микроскопии, а также рентгеновской дифракции.

Научная новизна полученных результатов.

1. Выявлена ключевая роль водородных связей в процессах внутримолекулярного тушения флуоресценции изомеров дианионов аминифлуоресцеинов.

2. Доказан универсальный характер увеличения доли фенолятного таутомера моноаниона производных флуоресцеина при переходе к НДС-растворителям (диметилсульфоксид (ДМСО), ацетонитрил).

3. В ДМСО для моноаниона 5'-аминофлуоресцеина доминирующим таутомером является моноанион-лактон, что ранее наблюдалось лишь для производных флуоресцеина, содержащих нитрогруппы в ксантеновом фрагменте.

4. Использование многоступенчатых равновесий и таутомерных превращений флуоресцеиновых индикаторов в водных растворах, содержащих агрегаты каликсаренов, позволило выявить их сильное дифференцирующее действие.

Практическое значение полученных результатов:

1. Предложен комплекс методов, позволяющих выявить различия между классическими сферическими мицеллами катионных ПАВ и мицеллоподобными структурами: агрегатами каликсаренов, дендримеров, а также модифицированных мицелл ПАВ. Методы основаны на исследовании флуоресценции и кинетики реакций.

2. Прямой спектрофотометрический контроль концентрации продукта гидролиза дилаурилфлуоресцеина по первой ступени позволяет отдельно оценить константы скорости двух последовательных стадий этого процесса, широко применяемого при исследовании ферментативных систем.

3. Разработан подход к определению степени связывания противоионов агрегатами каликсаренов с помощью ионселективного электрода.

4. Сведения о размерах и электрокинетических свойствах агрегатов каликсаренов в воде и водно-солевых средах необходимы для рационального их использования в супрамолекулярной химии и в сопредельных областях.

Личный вклад соискателя состоит в экспериментальном определении спектральных характеристик и параметров протолитических равновесий красителей и скорости реакций в истинных и организованных растворах, исследовании агрегатов каликсаренов методами потенциометрии и диализа, обработке и интерпретации всего набора экспериментальных данных, анализе литературных данных. Постановка задач исследования, обсуждение результатов и формулирование выводов проведены совместно с научным руководителем, д.х.н., проф. Н. О. Мchedловым-Петросяном.

Автор выражает благодарность н. с. С. В. Шеховцову за синтез метиловых эфиров флуоресцеина и помощь в проведении эксперимента; к. х. н. В. И. Алексеевой (Институт органических полупродуктов и красителей, Москва, Россия) за предоставление препарата децилфлуоресцеина; чл.-корр. НАН Украины, д. х. н. В. И. Кальченко и к. х. н. Р. В. Родику (Институт органической химии, Киев) за предоставление препаратов каликсаренов и обсуждение

некоторых результатов; д. х. н. А. О. Дорошенко и к. х. н. А. Д. Рошалю (НИИ химии при ХНУ имени В. Н. Каразина) за помощь в измерении спектров флуоресценции, определение квантовых выходов флуоресценции и времен жизни возбужденного состояния и участие в обсуждении результатов; д. х. н., В. И. Рыбаченко и к. х. н. А. Н. Редько (Институт физико-органической химии и углехимии им. Л. М. Литвиненко НАН Украины, Донецк) за измерение спектров ЯМР и обсуждение результатов; к. х. н. Д. С. Софронову (ГНУ «НТК «Институт монокристаллов», Харьков) и к. х. н. Д. Ю. Филатову (ООО «Проминвест Пластик», Харьков) за измерение ИК-спектров; д. х. н. О. В. Шишкину и И. В. Омельченко (ГНУ «НТК «Институт монокристаллов», Харьков) за проведение рентгеноструктурного анализа; к. т. н. А. И. Маринину (Национальный университет пищевых технологий, Киев) за проведение исследования распределения коллоидных частиц по размерам; к. ф. - м. н. А. П. Крышталю за получение микрофотографий агрегатов каликсаренов методом трансмиссионной электронной микроскопии; д. х. н. Н. А. Водолазкой за участие в обсуждении результатов исследования аминифлуоресцеиновых красителей, а также студентам Е. С. Загорулько и Ю. В. Таранец за участие в проведении эксперимента.

Апробация результатов диссертации

Основные результаты исследований докладывались на следующих конференциях: II, III, IV, V, VI Всеукраинских научных конференциях студентов и аспирантов «Хімічні Каразінські читання» (Харьков, 2010, 2011, 2012, 2013, 2014), XI, XIII, XIV Всеукраинских научных конференциях студентов и аспирантов «Сучасні проблеми хімії» (Киев, 2010, 2012, 2013), XIV научной конференции «Львівські хімічні читання» (Львов, 2013), XI Всеукраинской конференции молодых ученых и студентов по актуальным вопросам химии (Харьков, 2014), молодежной конференции «Химия и технология новых веществ и материалов» (Сыктывкар, 2014), XIX Украинской конференции по неорганической химии с участием зарубежных ученых (Одесса, 2014).

Публикации

По материалам диссертации опубликованы 5 статей в специализированных научных изданиях («The Journal of Physical Chemistry C» – 1 статья, «Journal of Molecular Liquids» – 1 статья, «Доповіді Національної Академії наук України» – 1 статья, «Вісник Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна» – 2 статьи) и 12 тезисов докладов на конференциях.

Структура и объем работы

Работа состоит из введения, четырех разделов, выводов, списка использованных литературных источников (298 наименований) и одного приложения, содержит 62 рисунка и 24 таблицы. Общий объем диссертации составляет 214 с. В первом разделе рассмотрены литературные данные относительно особенностей влияния растворителя на спектральные и протолитические свойства флуоресцеиновых красителей в истинных и организованных растворах, а также проанализированы основные аспекты поведения каликсаренов в растворах и их взаимодействия с красителями различной природы, описанные в литературе. Второй раздел содержит информацию об использованных материалах и методиках проведения эксперимента. Третий раздел посвящен выявлению закономерностей влияния растворителя на кислотно-основные и таутомерные равновесия простых и сложных эфиров флуоресцеина, а также изомеров аминифлуоресцеина. Также изложены особенности флуоресценции изомеров аминифлуоресцеина в различных растворителях. В четвертом разделе представлены результаты применения флуоресцеина и родственных соединений в качестве индикаторов для исследования водных растворов катионных каликсаренов, различающихся между собой как размером цикла, так и гидрофобностью.

РАЗДЕЛ 1

ФЛУОРЕСЦЕИНОВЫЕ КРАСИТЕЛИ В ИСТИННЫХ И ОРГАНИЗОВАННЫХ РАСТВОРАХ. ВОДНЫЕ РАСТВОРЫ КАЛИКСАРЕНОВ КАК РАЗНОВИДНОСТЬ КОЛЛОИДНЫХ СИСТЕМ (ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР)

1.1 Флуоресцеин и его производные

Первое сообщение о флуоресцеине было опубликовано в 1871 году А. Байером, который в результате конденсации резорцина и фталевого ангидрида получил интенсивно флуоресцирующее вещество красновато-желтого цвета [38, 39].

Флуоресценция красителя обеспечивается наличием ксантенового хромофора, который, благодаря, кислородному мостику имеет достаточно жесткую структуру (рис 1.1). Остаток фталевой кислоты расположен перпендикулярно ксантеновому фрагменту и не сопряжен с ним [40–45].

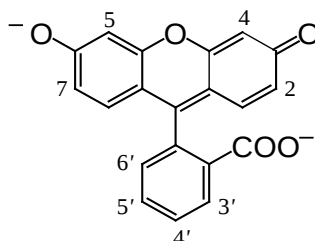


Рисунок 1.1 – Структура дианиона флуоресцеина.

Дианион флуоресцеина имеет три центра, способных протонироваться, вследствие чего для него характерно образование трех ионных и молекулярной форм (уравнения (1.1) – (1.3)): дианиона, $\mathbf{R}^{2-}$, моноаниона, $\mathbf{HR}^-$, нейтральной формы, $\mathbf{H}_2\mathbf{R}$, и катиона, $\mathbf{H}_3\mathbf{R}^+$.





где K_{a0} , K_{a1} и K_{a2} – константы диссоциации.

Среди производных флуоресцеина распространены красители, содержащие заместители на фталеовом фрагменте: изотиоцианат флуоресцеина [46–48] аминифлуоресцеины [49, 50] сукцинимидил эфиры флуоресцеина [51, 52], карбоксипроизводные [10, 53, 54]. Они полезны как эффективные люминесцентные зонды в первую очередь благодаря их способности образовывать ковалентные связи с различными функциональными группами и используются наряду с широко распространенными галогенпроизводными [51, 55–57], различными эфирами [58, 59] и сульфопроизводными флуоресцеина [60].

1.1.1 Спектральные характеристики ионных форм флуоресцеина и его производных в растворах

Как уже было отмечено ранее, полностью депротонированная форма незамещенного флуоресцеина обладает флуоресценцией с квантовым выходом, близким к единице (см. табл. 1.1). Спектр поглощения этой формы в видимой области представляет собой интенсивную и узкую полосу, которая имеет плечо в области коротких длин волн, обусловленное наличием колебательных подуровней возбужденного состояния [39, 51].

Квантовые выходы других ионных форм флуоресцеина в воде определялись многими авторами (табл. 1.1). При этом значение $\phi_{\text{R}^{2-}}$ оценивалось непосредственно, а квантовые выходы остальных форм рассчитывались совместно с их концентрациями из набора спектров испускания растворов с различными значениями pH [52, 61–63] или из зависимости квантового выхода смеси от pH [64].

Квантовые выходы и времена жизни возбужденного состояния ионных и молекулярных форм флуоресцеина в водных растворах

Литературный источник	φ_i , % (τ , нс)			
	R²⁻	HR⁻	H₂R	H₃R⁺
[64]	93	25 – 35	20 – 25	90 – 100 ¹
[61]	93	26	≈ 0	39
[62] ²	100	19	–	–
[52]	93 (4.1)	37 (3.0)	≈ 0	≈ 0
[63]	93 (4.06)	36 (3.37)	29 (2.97)	–

¹ Квантовый выход рассчитан, исходя из значений времен жизни возбужденного состояния и спектров поглощения в концентрированном растворе H₂SO₄ с использованием уравнения Ферстера.

² Указаны относительные квантовые выходы.

Как видно из таблицы 1.1, квантовый выход дианиона существенно превышает соответствующее значение для частицы **HR⁻**. Эта тенденция характерна и для галогенпроизводных флуоресцеина [61].

В кислых водных средах спектр поглощения растворов, содержащих флуоресцеин, представляет полосу с максимумом в области 437 нм, что является проявлением протонирования центрального атома углерода.

Несколько независимых исследовательских групп отмечали изменения спектров поглощения и особенно флуоресценции флуоресцеина в экстремально кислых растворах HClO₄ и H₂SO₄ [61, 64, 65], которые объяснялись либо существенным сдвигом равновесия (1.1) в кислую область в возбужденном состоянии красителя, либо образованием дикатиона флуоресцеина с протонированным атомом кислорода ксантенового мостика. Оба эти предположения нуждаются в дополнительных доказательствах, если учесть, что увеличение концентрации азотной кислоты до 7 моль/л не влияет существенно на спектры поглощения [61]. Возможно, изменения спектральных свойств

флуоресцеина обусловлено специфическими взаимодействиями с анионами кислот.

Были также предприняты попытки оценить константы кислотно-основных равновесий в возбужденном состоянии из зависимостей интенсивности флуоресценции от pH [61, 62]. Для решения этой задачи необходимым условием является то, что длительность всех процессов, сопровождающих отрыв протона и образование новой ионной формы, много меньше времен жизни возбужденного состояния. Однако соблюдение этого условия подвергалось сомнению для равновесий (1.1) и (1.2) из-за большого различия между значениями pK_a в основном и возбужденном состоянии, превышающего разность, рассчитанную из цикла Ферстера [61]. В этом случае резкое изменение интенсивности флуоресценции при изменении pH не характеризует константы диссоциации в возбужденном состоянии. Кроме того, в некоторых работах для создания требуемого pH использовались небуферные растворы сильных кислот или NaOH [64], что может приводить к значительной неопределенности оценок значений показателей констант, в первую очередь pK_{a2} , в основном и возбужденном состоянии.

Влияние неводных растворителей на спектры поглощения и флуоресценции дианиона флуоресцеина также широко изучалось. При замене воды на спирты (метанол – бутанол) происходит батохромный сдвиг полосы поглощения и флуоресценции на 12 – 15 нм [39, 66, 67], однако квантовый выход, также как и времена жизни возбужденного состояния, изменяются незначительно. Многие авторы отмечали полярность среды как ключевой фактор, определяющий изменения флуоресцентных характеристик красителя [68, 69]. В НДВС-растворителях (ДМСО, формахид) увеличение значения $\lambda_{\max}$ достигает 35 нм, и наблюдается тушение флуоресценции на 30 – 40 % [66, 70], что является доказательством значительной роли водородных связей в процессе излучательной деактивации.

В серии работ, посвященных изучению оптических свойств различных ионных форм флуоресцеина, 2,7-дифтор- и 2,7-дибромфлуоресцеина в газовой

фазе, было показано, что флуоресценция дианионов красителей практически не регистрируется [12, 71, 72]. Авторы объясняют данный факт легкостью фотоотщепления электронов как альтернативного пути дезактивации, который, вероятно, в газовой фазе преобладает над флуоресценцией. Катионные формы флуоресцеина и его галогенпроизводных также не флуоресцируют в газовой фазе. Слабая флуоресценция проявляется лишь в случае моноанионов, интенсивность которой увеличивается в ряду флуоресцеин > 2,7-дифторфлуоресцеин > 2,7-дибромфлуоресцеин.

Наличие заместителей на ксантеновом фрагменте значительно влияет на спектральные свойства флуоресцеиновых красителей. Так, введение в молекулу атомов галогенов снижает квантовый выход дианионов, что объясняется увеличением заселенности триплетного уровня [73, 74]. При этом спектры поглощения смещаются на 20 – 25 нм в сторону больших длин волн [39, 75]. Этерификация гидроксильных групп флуоресцеина приводит к образованию хиноидной структуры ксантенового фрагмента и появлению широкой полосы поглощения с несколькими максимумами [44, 76, 77].

Несмотря на отсутствие сопряжения между ксантеновым фрагментом и остатком фталевой кислоты в невозбужденном состоянии, наличие отрицательного заряда на последнем вызывает небольшое уменьшение значения λ_{max} спектра поглощения. Этот факт подтверждается экспериментально, например, для полос поглощения 6-гидрокси-9-фенилфлуорона и флуоресцеина [39] или при эстерификации карбоксильной группы флуоресцеиновых красителей [78], а также с помощью квантово-химических расчетов [79].

Модификация фталевого фрагмента больше всего влияет на флуоресцентные свойства красителей. Так, квантовый выход депротонированной формы 6-гидрокси-9-фенилфлуорона, отличающегося от флуоресцеина отсутствием карбоксильной группы, составляет всего 21 % [64], а 6-гидрокси-9-(карбоксифенил)флуорона – 23 % [66, 80]. Принимая во внимание идентичность строения ксантенового хромофора у этих трех индикаторов, снижение квантового выхода флуоресценции гидроксифенилфлуоронов, по сравнению с

флуоресцеином, объясняли облегчением внутренней конверсии из первого возбужденного состояния с вовлечением молекул растворителя, расположенных вокруг карбоксилатной группы [66, 81]. При отсутствии отрицательного заряда на фталеовом фрагменте, например, для сложных эфиров флуоресцеина в воде или замене карбоксильной группы на метильную, квантовый выход также превышает 70 % [82]. Введение нитрогруппы в положение 4' флуоресцеина приводит к снижению квантового выхода до 29 %, в то время как наличие *трет*-бутильного заместителя или дополнительной карбоксилатной группы в этом положении приводит лишь к небольшому уменьшению значения ϕ до 87 и 74 %, соответственно [45].

Значительно снижает интенсивность флуоресценции введение аминогруппы в положение 4' или 5' [45, 83, 84]. Первоначально такое сильное тушение флуоресценции приписывалось влиянию неподеленной электронной пары аминогруппы [83]. В этой работе указывалось, что при протонировании аминогруппы или превращении ее в изотиоцианатную интенсивность флуоресценции приближается к значению для незамещенного флуоресцеина. Аналогичные закономерности наблюдались при ацетилировании или бензоилировании аминогруппы. При этом, по мнению авторов, атом кислорода карбонильной группы оттягивает электроны от атома азота, уменьшая таким образом резонанс с системой π -электронов и участие неподеленной электронной пары в процессах переноса в возбужденном состоянии [83]. Отмечалось также тушащее влияние фрагментов нитросодержащих ароматических кислот, ковалентно связанных с аминогруппой [83, 85].

На сегодняшний день влияние аминогруппы как электронодонорного заместителя на флуоресценцию подобных производных флуоресцеина исследовались систематически лишь в водных и спиртовых растворах. Поэтому представляет интерес продолжение изучения свойств этой группы красителей в растворителях других типов, в первую очередь – в НДС-растворителях.

Для объяснения сильного влияния фталевого фрагмента на флуоресцентные свойства красителей группой японских исследователей разработан подход,

согласно которому флуоресцеин рассматривается как связанная система донор – акцептор, где остаток фталевой кислоты является донором электронов, а ксантеновый фрагмент – акцептором. Интенсивность флуоресценции зависит от легкости фотоиндуцированного переноса электронов от донора к акцептору [84, 86–88]. Эта теория развивалась также и другими авторами [40, 45, 57, 89, 90].

В некоторых случаях предлагались альтернативные теории, которые применяли в первую очередь для объяснения резкого изменения квантового выхода флуоресценции производных флуоресцеина и родамина при переходе от воды или спиртов к НДВС-растворителям [91, 92], которое не вполне объясняется концепцией фотоиндуцированного переноса электрона.

Кроме того, эта указанная концепция не была подтверждена квантово-механическими расчетами [93]. В последней работе ключевым фактором, влияющим на величину квантового выхода флуоресценции, были названы процессы внутренней конверсии.

1.1.2 Кислотно-основные свойства и таутомерия флуоресцеиновых красителей в растворителях различных типов

В молекуле флуоресцеиновых красителей присутствуют несколько близких по силе функциональных групп, способных участвовать в протолитических превращениях. Кроме того, наличие карбоксильной группы делает возможным образование лактонных структур. Поэтому флуоресцеины могут существовать в растворах в виде смеси нескольких таутомеров (рис. 1.2).

Как было отмечено в предыдущем пункте, спектры поглощения очень сильно зависят от состояния ксантеновой части красителей. Именно поэтому электронная спектроскопия является наиболее чувствительным методом при исследовании кислотно-основных и таутомерных свойств флуоресцеинов [44, 52, 64, 77, 94–97].

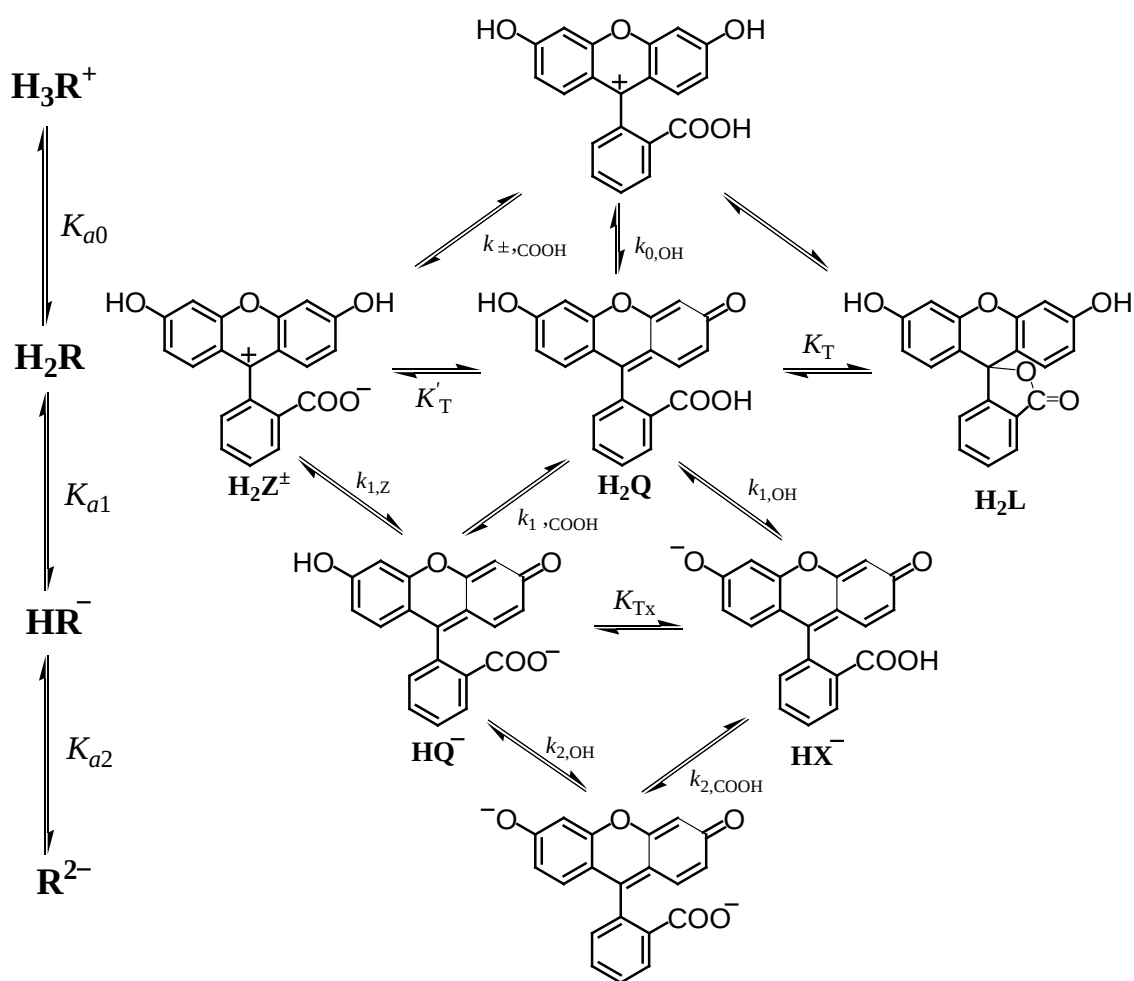


Рисунок 1.2 – Протолитические равновесия флуоресцеина в растворах [39, 98].

Также для идентификации и подтверждения структуры красителей применялась ИК-спектроскопия [42, 99–101], ЯМР-спектроскопия [102], а также методы рентгеновской дифракции [41, 101, 103, 104]. Однако при использовании этих методов необходимы более концентрированные растворы красителей, а выбор растворителей ограничен. Кроме того, методы оказываются непригодными для идентификации структуры минорных таутомеров. Поэтому эта группа методов используется лишь как вспомогательный инструмент для установления структурных особенностей красителей.

Влияние растворителя на константы протолитических равновесий флуоресцеина и его производных изучалось довольно интенсивно (табл. 1.2) [39, 98, 105, 106]. Анализируя приведенные в таблице данные, можно отметить значительное сближение величин pK_{a2} и pK_{a1} при переходе к водно-органическим и неводным растворителям (в некоторых НДВС-растворителях наблюдается даже инверсия этих величин), а также увеличение разности $pK_{a1} - pK_{a0}$.

Таблица 1.2

Параметры протолитических равновесий флуоресцеина в различных растворителях [39, 98]

Растворитель	pK_{a2}	pK_{a1}	pK_{a0}	K_T	$pK_{1,COOH}$	$pK_{0,OH}$
Вода	6.80	4.45	2.14	6.0	3.49	3.10
Метанол	11.5	10.6	3.1	54	8.8	4.8
Этанол (51 %) ¹	7.68	6.85	0.94	29.7	5.38	2.41
Этанол (99.9 %)	12.59	11.72	3.34	58.8	9.94	5.12
ДМСО (91.3 %)	8.98	10.33	-0.51	$5.9 \cdot 10^2$	7.56	2.26
Ацетон (90 %)	11.2	12.5	0.92	$1.9 \cdot 10^3$	9.2	4.20
N,N-диметилформамид	14.8	14.6	0.3	$1.0 \cdot 10^3$	11.6	3.3

¹ В скобках указана массовая доля растворителя в смеси с водой.

Для более подробной интерпретации изменения констант диссоциации в разных средах, а также выявления особенностей дифференцирующего действия растворителей исследовался также таутомерный состав флуоресцеина и его производных. Как было отмечено выше, наиболее удобным методом для идентификации различных таутомеров является спектрофотометрия. При этом предполагается, что форму спектров поглощения отдельных таутомеров определяет лишь строение ксантенового фрагмента, что подтверждается при изучении спектров поглощения различных модельных соединений, в том числе простых и сложных эфиров флуоресцеина [44, 76, 78, 82].

Как видно из рисунка 1.2, нейтральная форма флуоресцеина представлена в растворах тремя таутомерами: лактонным, H_2L , цвиттерионным, $\text{H}_2\text{Z}^\pm$, и хиноидным, H_2Q . Для большинства производных флуоресцеина лактонный таутомер является бесцветным, вследствие размыкания системы сопряженных связей хромофорной системы и перехода центрального атома углерода в состояние sp^3 -гибридизации. Поэтому значительное обесцвечивание нейтральной формы, особенно в НДВС-растворителях, объясняется увеличением доли лактонного таутомера [39, 98, 107, 108].

В водных и водно-органических растворителях анион флуоресцеина и большинство аналогов красителя (за исключением галоген- и нитропроизводных) представлен карбоксилатным таутомером, HQ^- , у которого диссоциирована карбоксильная группа [98].

Эффекты среды, ΔpK_a , которые определяются как разность между соответствующими значениями показателей констант диссоциации, в неводном растворителе и в воде, при условии отсутствия «фенолятного» таутомера, HX^- , могут быть выражены через изменения показателей микроконстант (рис. 1.2), согласно уравнениям (1.4) – (1.6) [39, 98, 109].

$$\Delta pK_{a2} = \Delta pK_{2,\text{OH}} \quad (1.4)$$

$$\Delta pK_{a1} = \Delta pK_{1,\text{COOH}} + \Delta \lg(1 + K_T + K'_T) = \Delta pK_{1,Z} + \Delta \lg(1 + K''_T + (K'_T)^{-1}) \quad (1.5)$$

$$\Delta pK_{a0} = \Delta pK_{0,\text{OH}} - \Delta \lg(1 + K_T + K'_T) = \Delta pK_{\pm,\text{COOH}} - \Delta \lg(1 + K''_T + (K'_T)^{-1}) \quad (1.6)$$

Было показано, что в смесях вода – спирт, вода – 1,4-диоксан, вода – ДМСО, вода – ацетон, а также в спиртах, хлороформе, *N,N*-диметилформамиде энергия Гиббса равновесия $\text{H}_2\text{Z}^{\pm} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{L}$ линейно зависит от нормализованного параметра Райхардта, E_T^N [110]. Таким образом, стабилизации лактонного таутомера способствует снижение полярности и дефицит водородных связей микроокружения молекулы красителя [111].

Как было показано на основании анализа спектров поглощения растворов красителей, «фенолятная» структура моноаниона является доминирующей в случае 2,4,5,7-тетрагалогенпроизводных флуоресцеина [112–114] и сосуществует с карбоксилатной для 2,7-дигалогенфлуоресцеинов [114, 115]. Отметим, что термин «фенолятный таутомер» не вполне точен, т.к. отрицательный заряд не сосредоточен на атоме кислорода, а делокализован в ксантеновом фрагменте [116], однако в дальнейшем для простоты мы будем пользоваться именно этим термином.

Позже было также установлено, что фенолятный таутомер в малых количествах может образовываться даже в случае незамещенного флуоресцеина в НДВС-растворителях [14].

С использованием масс-спектрометрии, адаптированной для получения спектров флуоресценции и электронных спектров действия (electronic action spectra) было получено экспериментальное подтверждение существования в газовой фазе фенолятной структуры моноанионов 2,7-дифтор- и 2,7-дихлорфлуоресцеина и флуоресцеина [12, 71].

Кроме того, новый тип таутомерии был выявлен для производных флуоресцеина, содержащих нитрогруппы в ксантеновом фрагменте. В этом

случае, благодаря наличию сильных электроноакцепторных заместителей, облегчается образование лактонной структуры моноаниона или даже дианиона, которая, несмотря на sp^3 -гибридное состояние центрального атома углерода, имеет желтую окраску, вследствие нитрофенольного фрагмента [11, 117, 118]. Возможность существования нетипичных для флуоресцеина фенольного и лактонного анионных таутомеров также подтверждена квантово-химическими расчетами [116, 119].

Все эти структуры были идентифицированы в случае красителей, содержащих заместители на ксантеновом фрагменте. Однако наличие электронодонорных групп, например, аминогруппы, во фталеовом фрагменте может привести к аналогичным эффектам. Поэтому представляет интерес получение экспериментальных данных относительно особенностей таутомерии подобных производных.

1.1.3 Флуоресцеиновые красители в организованных средах

Еще в 1984 году для обозначения образования микроэмульсий как аналогов мицеллярных систем был применен термин «молекулярная организация» [120]. Позже К. Шинода систематизировал известные на то время растворы дифильных веществ и ввел для них общее определение «организованные растворы» [121], подчеркивая тем самым, что несмотря на существенные различия, для всех них характерны процессы «ориентации, агрегации и структурирования молекул растворенного вещества» [121]. Впоследствии это словосочетание стало широко употребляться для обозначения прозрачных, оптически изотропных растворов, в объемной фазе которых присутствуют наноразмерные частицы, образующие собственную псевдофазу [122–126]. В последнее время к организованным растворам относят не только мицеллярные растворы коллоидных ПАВ, микроэмульсии, суспензии липосом фосфолипидов, которые представляют собой лиофильные наноразмерные дисперсии, но также и растворы полостных молекул-рецепторов: циклодекстринов, дендримеров, каликсаренов и др. [127].

Так как флуоресцеиновые красители являются удобными оптическими зондами, они часто применяются и для исследования мицелл ПАВ [128–130], в том числе и гемини-ПАВ [19, 131], микроэмульсий [107, 114, 115, 132–134], а также мицеллоподобных коллоидных частиц: полиэлектролитов [135, 136], дендримеров [21, 137] и наночастиц, модифицированных ПАВ [20, 97, 138].

Как было показано в многочисленных исследованиях, в присутствии катионных ПАВ спектры поглощения полностью депротонированных форм производных флуоресцеина претерпевают bathochromic сдвиг. Величина этого сдвига немного зависит от природы заместителей в молекуле красителя. Так, для незамещенного флуоресцеина и изотиоцианата флуоресцеина значение $\Delta\lambda$ составляет 20 – 25 нм [130, 139, 140], для 2,4,5,7-тетрабромфлуоресцеина 13 – 17 нм, [128]. Сдвиг несколько увеличивается с ростом длины углеводородного радикала ПАВ [128], кроме того, для всех красителей при их связывании катионными мицеллами наблюдается небольшой hyperchromic эффект. Аналогичные закономерности отмечались также в случае других растворов, содержащих положительно заряженные коллоидные частицы [20, 107, 115, 138].

В мицеллярных растворах ЦТАБ было зафиксировано небольшое возгорание флуоресценции флуоресцеина и его тетрагалогенпроизводных и увеличение времен жизни флуоресценции [8, 82, 141]. Для неионных ПАВ эти эффекты выражены в меньшей степени, в то время как анионные мицеллы не влияют существенно на флуоресценцию, что обусловлено отсутствием связывания красителей одноименно заряженными коллоидными частицами. Интенсивность спектра флуоресценции изотиоцианата флуоресцеина также мало чувствительна к связыванию мицеллами катионных ПАВ [139], а наблюдаемое в другой работе резкое изменение флуоресценции при варьировании концентрации ЦТАБ [142] связано, по-видимому, с неполным превращением красителя в дианион.

Значительные изменения спектров флуоресценции при связывании мицеллами катионных ПАВ были зафиксированы для дианионов изомеров аминифлуоресцеина. Так, в работе Волта с сотрудниками упоминается о

20-кратном возрастании флуоресценции аминифлуоресцеина в мицеллярном растворе ЦТАБ [83]. Эти красители могут стать перспективными для изучения агрегатов различных типов, поэтому этот вопрос требует более тщательного рассмотрения.

Наряду со спектральными свойствами, также интенсивно изучаются протолитические равновесия флуоресцеина и его производных в коллоидных растворах [39, 95, 98, 109, 143, 144]. Так как эти системы являются гетерогенными, то для правильной интерпретации экспериментальных данных относительно равновесий диссоциации в этих системах необходимо уточнить распределение исходных и образовавшихся частиц между объемной фазой и коллоидной частицей.

Наиболее простым и удобным решением данной проблемы оказалось введение величины «кажущейся» константы диссоциации, показатель которой, pK_a^a , определяется соотношением (1.7) [39, 98, 109, 145–147]. Эта величина наиболее часто применяется при исследовании индикаторов, т.к. и первое, и второе слагаемое можно определить экспериментально, например, потенциометрическим и спектрофотометрическим методом, соответственно.

$$pK_a^a = pH^w + \lg \frac{[HR^{n+1}]_t}{[R^n]_t} \quad (1.7)$$

где pH^w – водородный показатель в объемной фазе;

$[HR^{n+1}]_t$ и $[R^n]_t$ – равновесные концентрации сопряженных форм красителя, относящиеся к единице объема всего раствора, символы n и $n+1$ обозначают заряды частиц.

Изменение значений pK_a^a в условиях полного связывания псевдофазой, $pK_a^{a,c}$, по сравнению с показателями термодинамических констант в воде pK_a^w определяется значением электрического потенциала в области локализации

красителя Ψ и отношением коэффициентов активности переноса соответствующих форм из воды в псевдофазу агрегата и может быть выражено следующим соотношением:

$$\Delta pK_a^{ac} = pK_a^{ac} - pK_a^w = \lg \frac{\gamma_{R^n}}{\gamma_{HR^{n+1}}} - \frac{\Psi F}{2.3 RT} \quad (1.8)$$

где pK_a^{ac} – показатель кажущейся константы в условиях полного связывания псевдофазой;

$\gamma_{HR^{n+1}}$ и γ_{R^n} – коэффициенты активности переноса протонированной и депротонированной формы красителя из воды в псевдофазу агрегата;

R – универсальная газовая постоянная;

T – температура.

При выводе уравнения (1.8) предполагалось, что отношение концентрационных коэффициентов активности сопряженных форм красителя в псевдофазе агрегата близки к единице. Такое допущение резонно, если учесть значительную концентрацию электролита в слое Штерна, где, согласно общепринятым представлениям, локализованы зонды [109, 140].

Условие о полном связывании красителя безусловно соблюдается в случае сильно гидрофобных красителей, например, эфиров флуоресцеина, содержащих длинные углеводородные радикалы, или йодпроизводных. В других случаях полное связывание красителя может достигаться лишь в том случае, когда сопряженные формы красителя и поверхность агрегатов имеют противоположный заряд.

Как видно из таблицы 1.3, общее снижение или увеличение значений pK_a^a по сравнению со значениями pK_a^w , в целом обусловлено зарядом поверхности мицелл, однако важную роль играет также зарядовый тип сопряженной кислотно-основной пары, а также возможность таутомерных превращений красителей.

Эффекты среды гидрофобных флуоресцеиновых красителей в мицеллярных растворах различных типов при ионной силе 0.05 моль/л [109]

ПАВ	Децилэозин	Децилфлуоресцеин		Родамин Б
	ΔpK_{a1}^{ac}	ΔpK_{a1}^{ac}	ΔpK_{a0}^{ac}	ΔpK_{a0}^{ac}
Цетилдиметиламмонийпропан-сульфонат	– 0.62	– 0.24	– 1.31	0.3
Цетилпиридиний хлорид	≈ -1.9	– 1.39	– 2.15	–
Додецилсульфат натрия	2.63	2.65	2.23	2.10
Неионное	0.71	0.69	– 0.8	1.0

В целом отмечалось сходство микроокружения мицелл ПАВ и водно-органических или органических растворителей с точки зрения их влияния как на спектральные, так и на сдвиг таутомерных равновесий свойства флуоресцеинов, по сравнению с водой: наблюдается стабилизация лактонного нейтрального таутомера для флуоресцеинов с незамещенной карбоксильной группой, уменьшение доли цвиттерионной частицы $H_2Z^{\pm}$, образование фенолятных таутомеров для галогенпроизводных [11, 140, 148, 149].

Количественные характеристики таутомерных равновесий довольно чувствительны к изменению микроокружения красителя, в первую очередь к степени его гидратированности [98, 109]. Это обстоятельство, а также большое количество экспериментального материала относительно поведения флуоресцеинов в присутствии коллоидных частиц различных типов дает основания утверждать, что эта группа красителей окажется весьма полезной для изучения новых типов коллоидных организованных растворов, например, водных растворов каликсаренов.

1.2 Водорастворимые каликсарены

Каликсарены – это макроциклические соединения, состоящие из повторяющихся ароматических фрагментов, соединенных мостиками. Первые синтезированные каликсарены состояли из фенольных фрагментов, соединенных метиленовыми группами, расположенных в орто-положении относительно гидроксильных групп. Вследствие этого молекула по форме напоминает чашу, (в переводе с греческого «*calix*» означает «чаша») [150]. Широкая часть молекулы называется верхним кольцом (ободом), узкая, включающая мостики, – нижним (рис. 1.3). Для каликсаренов характерно наличие четко структурированной полости, в которой существуют одновременно полярные и неполярные области.

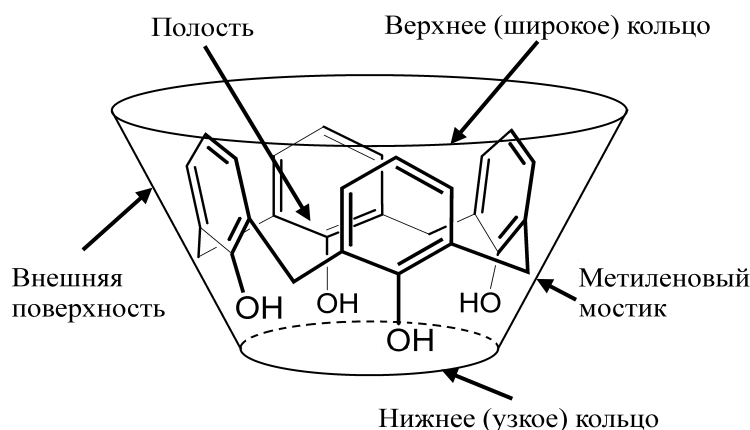


Рисунок 1.3 – Структура каликс[4]арена.

Существует несколько вариантов схем названий каликсаренов, однако большинство из них, включая официально рекомендованные IUPAC и Chemical Abstracts, очень громоздки [150]. Наиболее распространена и удобна номенклатура, предложенная Дэвидом Гутше [151], согласно которой для обозначения данных соединений используют их название «каликсарен», размер цикла указывается числом в квадратных скобках между корнями «каликс» и «арен», а природа и положение заместителей в ароматических циклах уточняются

соответствующими цифрами и дескрипторами. Позже эта номенклатура также приобрела статус официальной [150].

Вследствие подвижного сочленения ароматических фрагментов, большинство каликсаренов конформационно мобильны. Количество образующихся конформеров зависит от размера цикла каликсарена. Например, для каликс[4]арена существует четыре возможные конформации, возникающие в результате вращения фенольных фрагментов вокруг метиленовых групп: «конус» – все фенольные фрагменты направлены в одну сторону, «частичный конус» – один фенольный фрагмент направлен в противоположную сторону, 1,2-альтернат и 1,3-альтернат – в структуре каликсарена имеются по два однонаправленных фрагмента, расположенных рядом и через один, соответственно [150, 152, 153]. Взаимная ориентация фенольных фрагментов определяется условиями проведения реакции, размером цикла, степенью их замещенности, а также длиной соединяющих их мостиков. В случае каликс[6]арена число конформеров увеличивается до восьми, а каликс[8]арена – до шестнадцати. Кроме того, выделяют также многочисленные промежуточные структуры.

Гибкость каликсаренов уменьшается в результате кристаллизации, что позволяет зафиксировать требуемую конформацию, переводя соединение в твердое состояние. Дальнейший контроль конформации можно осуществить посредством введения в верхнее или нижнее кольцо объемных заместителей или мостиков, которые ограничивают вращение вокруг соединительных метиленовых групп [150].

Каликсарены являются одними из самых распространенных органических рецепторов в супрамолекулярной химии. Они легко синтезируются и могут быть модифицированы введением различных заместителей, что позволяет влиять на свойства и структуру полости для селективного связывания различных ионов и молекул [154–157].

Чаще всего функциональные группы вводят в ароматическое кольцо в *пара*-положение относительно гидроксильной группы или модифицируют сами гидроксильные группы [158–163]. Иногда вместо фенольных остатков

каликсарены содержат в качестве повторяющихся элементов кольца резорцина (каликсрезорцинарены) или различные ароматические гетероциклы [150]. Кроме того, известны каликсарены, в которых ароматические фрагменты соединены кетоновыми фрагментами, более длинными алкильными группами [164], а также различными гетероатомами (B, Si, Ge, Sn, O, S) [165].

Широкие возможности для функционализирования каликсаренов открыли перспективы для использования каликсаренов в биологических, биомедицинских отраслях [36, 153, 166–170]. По этой причине особую важность приобретают исследования водорастворимых каликсаренов.

Незамещенные каликсарены практически нерастворимы в воде и малорастворимы в органических растворителях [150]. Введение в молекулу каликсаренов эфирных групп увеличивает растворимость этих соединений в органических растворителях. Водорастворимые каликсарены, содержащие карбоксильные и сложноэфирные группы, были впервые синтезированы Унгаро с сотрудниками [171]. Позже этот класс соединений был расширен другими каликсаренами, содержащими полярные или ионные группы (карбоксильные, амино- или сульфогруппы).

1.2.1 Агрегация каликсаренов водных растворах

В литературе имеются многочисленные подтверждения образования агрегатов катионных и анионных каликсаренов в водных растворах [27, 31, 32, 34, 36, 37, 157, 172–178], причем эта особенность характерна не только для соединений, содержащих гидрофобные заместители [174, 176], но и для их более гидрофильных аналогов [31, 173, 177]. Образующиеся коллоидные частицы изучались при помощи разнообразных методов: кондуктометрии [34, 157, 175, 179], тензиметрии [31, 32, 173, 179], ЯМР-спектроскопии [34, 36, 172, 173, 175], динамического светорассеяния [31, 32, 174, 178], трансмиссионной электронной микроскопии [31, 174, 176], флуоресцентного зонда [32, 177, 179], малоугловой рентгеновской дифракции [180] и др.

Каликсарены, имеющие гидрофобные заместители на верхнем или нижнем кольце, часто рассматриваются как особый тип ПАВ, которые во многом сходны с нециклическими гемини-ПАВ, содержащими два углеводородных радикала и ионные головки, соединенные мостиком [34, 36, 37, 181–183].

Было обнаружено, что гемини-ПАВ присущи свойства, отличающие их от мономерных аналогов, например, бóльшая поверхностная активность, низкие значения критической концентрации мицеллообразования (ККМ), а также в некоторых случаях значительная вязкость растворов [182, 184]. Это дало толчок к развитию направления, посвященного изучению олигомерных (три- и тетрамерных) ПАВ [184–187]. Для этого типа соединений способность к самоассоциации увеличивается с ростом количества углеводородных радикалов, при этом структура и форма агрегатов зависит от структуры исходного ПАВ.

Каликсарены отличаются от упомянутых веществ наличием полости, а также конформационной подвижностью, что дает возможность влиять на взаимное положение гидрофобных групп. Шинкай с сотрудниками показал, что конформация каликсарена является одним из ключевых параметров, влияющих на агрегирующую способность [32]. Эти же авторы обнаружили, что сферические агрегаты образуются преимущественно в случае каликсаренов в конформации «конус».

Как и в случае классических мицеллярных растворов, агрегация каликсаренов имеет черты коллективного процесса и характеризуется критической концентрацией агрегации (ККА), аналогичной ККМ. Значения ККА зависят от природы заместителей и, как правило, на несколько порядков ниже, чем для классических ПАВ.

Для некоторых каликсаренов были зафиксированы везикулярные структуры агрегатов [30, 174]. В случае каликс[8]арена, содержащего фрагменты глюкозы, наблюдалось изменение структуры агрегатов из мицеллярных в везикулярные при pH выше 4.5 [178]. При наличии разветвленных заместителей каликсарены образуют монодисперсные и однородные по структуре сферические мицеллы [176, 188].

На основании систематического исследования характера агрегации каликсаренов, содержащих четвертичные аммониевые или сульфогруппы, с разным размером цикла и длиной углеводородных радикалов Шинкаи с сотрудниками разделили их на три группы [179, 183]:

- не содержащие длинных углеводородных радикалов (например, содержащие лишь метильные группы) каликсарены, для которых не наблюдалась агрегация в водных растворах до концентрации 0.2 моль/л;

- каликсарены с алкильными группами средней длины (бутильные, гексильные, октильные), образующие агрегаты. Для этих соединений значение ККА понижается с увеличением размера цикла и длиной углеводородного радикала и обычно принимает значения $2.5 \cdot 10^{-3} - 1.5 \cdot 10^{-4}$ моль/л;

- каликсарены, содержащие длинные углеводородные радикалы (додецильные), для которых в диапазоне концентраций в среднем $1 \cdot 10^{-5} - 2 \cdot 10^{-3}$ моль/л ККА не была зафиксирована ни тензиметрическим, ни кондуктометрическим методами. Авторы предположили, что эти каликсарены существуют в растворе в виде мономеров или димеров, а четырех или восьми углеводородных радикалов достаточно для формирования мицеллярного ядра. Однако другой возможной причиной является то, что значение ККА этих гидрофобных соединений мало и не принадлежит исследуемому диапазону концентраций. Доказательством последнего предположения является тот факт, что растворы каликсаренов имеют низкие значения удельной электропроводности, по сравнению с растворами менее гидрофобных каликсаренов [179].

В серии относительно недавних работ была продемонстрирована возможность исследования агрегатов каликсаренов с использованием одноосновных индикаторных красителей, по аналогии с «традиционными» мицеллярными растворами [27, 189–191]. Анализ определенных при этом кажущихся констант ионизации показывает, что размер полости каликсарена несущественно влияет на свойства индикаторов, а агрегаты проявляют сходство с мицеллами ПАВ. Однако для получения полной картины взаимодействия агрегат

– краситель необходимо располагать информацией о влиянии каликсарена на равновесия зондов с более сложной системой прототропных превращений, в частности, флуоресцеиновых красителей.

1.2.1 Взаимодействие каликсаренов с красителями

Изначально все исследования в области химии каликсаренов концентрировались именно на создании молекул-гостей, которые обладают рецепторными свойствами. В зависимости от функциональных групп, введенных в молекулы каликсаренов, эти молекулы могут проявлять высокое сродство и селективность по отношению к нейтральным молекулам, органическим катионам или анионам. Существует множество обзоров и монографий, посвященных вопросам связывания субстратов каликсаренами [153, 192–198]. В данной работе остановимся лишь на основных аспектах взаимодействия каликсаренов с красителями и их аналогами.

Чаще всего взаимодействие каликсаренов и красителей связывали с образованием ассоциатов состава 1:1. В некоторых случаях при увеличении концентрации каликсарена было зафиксировано образование комплексов состава 2:1 [25, 199]. Включение красителя в полость каликсарена во многих случаях подтверждалось данными ЯМР-спектроскопии [199, 200].

В растворах катионных каликс[6]аренов наблюдается значительное тушение флуоресценции 1-анилино-нафталин-8-сульфоната натрия [201]. Оцененная по зависимости интенсивности флуоресценции от концентрации каликсарена константа связывания составляет $1.2 \cdot 10^3$ л/моль. Для метилового оранжевого соответствующее значение, определенное по изменению спектров поглощения, составляет $71 \cdot 10^4$ л/моль. В этой же работе отмечалось отсутствие взаимодействия этих зондов с анионными каликсаренами.

На основании спектров поглощения и флуоресценции также были исследованы взаимодействия анионных сульфonatoкаликсаренов с красителями бриллиантовым крезоловым синим [202], куркумином [199], триамтереном [200],

нейтральным красным [26], феноловым голубым [203], метиленовым синим [25, 204] и другими [156].

Было зафиксировано значительное увеличение связывания нейтрального красного при увеличении размера полости каликсарена [26]. Так, для каликс[4]-, каликс[6]- и каликс[8]арена оцененные по тушению флуоресценции красителя константы связывания составляют $3.5 \cdot 10^3$, $3.2 \cdot 10^4$ и $3.1 \cdot 10^6$ л/моль, соответственно. Аналогичные закономерности наблюдались и в случае метиленового синего (в том числе и в смеси вода-метанол) [25, 204] и многих других красителей [156]. Для близких к флуоресцеину по строению родамина Б [205] и бутилродамина [206] при переходе от четырех- к восьмичленному каликсарену константы связывания увеличивались от $1 \cdot 10^3$ до $1.5 \cdot 10^5$ л/моль и от $1.3 \cdot 10^2$ до $2.5 \cdot 10^4$ л/моль, соответственно. При увеличении pH от 5.8 до 8.0 наблюдалось небольшая стабилизация ассоциатов.

В некоторых случаях при образовании комплексов с каликсаренами фиксировалась стабилизация определенных форм красителей [202, 203]. Например, связанный анионными каликсаренами краситель феноловый голубой не подвергается дезаминированию даже при pH 12 – 13 [203].

Также системы краситель – каликсарен перспективны как сенсоры для определения pH среды или катионов некоторых металлов [207, 208].

Так, например, были синтезированы и исследованы мембраны, содержащие *n*-трет-бутилкаликс[6]арен и его эфир с включенным в полость красителем гексадецилакридиновым оранжевый. При добавлении 2-фениламина или других субстратов, описанных в работе, к такой системе, интенсивность флуоресценции в мембране уменьшается. Механизм рассмотренных процессов сильно зависит от pH среды [208]. Также был предложен метод экстракции Gd(III) из раствора комплексом каликс[4]арен–бромтимоловый синий [209].

В последнее время появился ряд работ, использующих красители как зонды для изучения агрегатов каликсаренов [189, 191, 210, 211]. При этом образуются ассоциаты каликсаренов стехиометрического состава 4:1, выходящие за рамки объектов концепции «гость – хозяин». В этом случае, наряду с изменениями

спектральных свойств, был также зарегистрирован сдвиг кислотно-основных равновесий одноосновных индикаторов: метилового оранжевого [27, 191, 212], метилового желтого [27, 212], динитрофенола, бромфенолового синего, диоктадецилпродамина [190, 191], обусловленный влиянием поверхностного потенциала и микроокружения красителей.

Флуоресцеиновые красители относительно редко применялись для изучения агрегации каликсаренов. Изменения спектров поглощения флуоресцеина были использованы для исследования характера агрегации катионных каликсаренов разной гидрофобности с сульфидными мостиками в присутствии нитрата серебра [213].

Был исследован процесс включения флуоресцеина в полость сульфокаликс[4]арена [214]. В этой работе на основании анализа спектров поглощения, флуоресценции и ^1H ЯМР-спектров при варьировании концентрации каликсарена был сделан вывод, о включении фталевого фрагмента флуоресцеина в полость каликсарена. По нашему мнению, характер изменений спектров поглощения и флуоресценции красителя, описанный в данной работе, свидетельствует о сдвиге кислотно-основного равновесия в сторону нейтральной формы. Этим же обусловлены наблюдаемые в работе изменения химических сдвигов протонов флуоресцеина. Учитывая безбуферность большинства исследуемых систем, а также значительный концентрационный диапазон красителя и каликсарена в рабочих растворах, можно предположить, что вывод о столь сильном взаимодействии флуоресцеина с полостью каликсарена нуждается в дополнительных доказательствах.

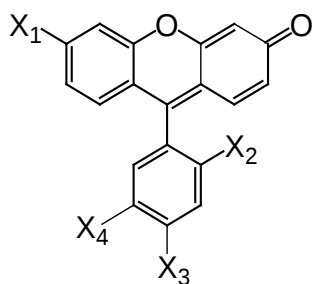
1.3 Постановка задачи и выбор систем для исследования

Ввиду широкой распространенности флуоресцеиновых красителей, представляется важным разработать возможно более полную схему протолитических равновесий и выяснить границы ее применимости для различных производных. Проведенный анализ литературных данных выявил недостаточность сведений относительно закономерностей образования

лактонного и фенолятного моноанионных таутомеров для флуоресцеинов, содержащих различные функциональные группы как на ксантеновом, так и на фталеовом фрагменте.

Для подтверждения схемы таутомерных превращений (рис. 1.2) необходимо определить протолитические и спектральные характеристики более простых модельных соединений, аналогичных по строению флуоресцеину, однако отличающихся от него меньшим количеством центров, способных участвовать в кислотно-основных превращениях. Для решения этой задачи нами были использованы диметилфлуоресцеин, метилфлуоресцеин, этилфлуоресцеин и сульфифлуоресцеин (рис. 1.4).

Среди перечисленных эфиров флуоресцеина особенно интересен метилфлуоресцеин, т.к. лишь он может образовывать лактонные таутомеры. Поэтому таутомерия этого красителя в воде, водно-органических смесях, а также НДВС-растворителях требует подробного изучения с применением комплекса различных методов.



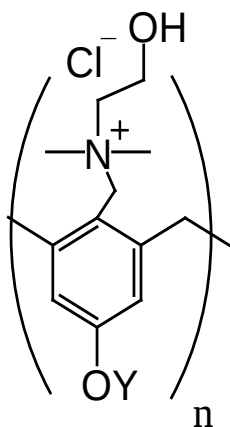
Название	Заместители			
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄
Флуоресцеин	H	COO ⁻	H	H
Диметилфлуоресцеин	CH ₃	COOCH ₃	H	H
Метилфлуоресцеин	CH ₃	COO ⁻	H	H
Этилфлуоресцеин	O ⁻	COOC ₂ H ₅	H	H
Сульфифлуоресцеин	O ⁻	SO ₃ ⁻	H	H
4'-аминофлуоресцеин	O ⁻	COO ⁻	NH ₂	H
5'-аминофлуоресцеин	O ⁻	COO ⁻	H	NH ₂
<i>n</i> -децилфлуоресцеин	O ⁻	COOC ₁₀ H ₂₁	H	H

Рисунок 1.4 – Структура депротонированных форм исследуемых красителей.

Информация, полученная в результате исследования модельных соединений, может служить основанием для изучения аминфлуоресцеиновых красителей – 4'- и 5'-аминфлуоресцеинов, характеризующихся гораздо более сложной схемой протолитических превращений, вследствие наличия дополнительного кислотно-основного центра.

Этот тип флуоресцеиновых красителей особенно важен, т.к. в литературе отмечалась неожиданно малая интенсивность флуоресценции, вызванная наличием аминогруппы на фталеовом фрагменте. Этот процесс, наряду со сдвигом таутомерных равновесий красителей, может оказаться перспективным для исследования микроокружения красителей, например, при связывании их агрегатами дифильных соединений. Поэтому представляется важным выяснить особенности влияния среды на процессы внутримолекулярного тушения флуоресценции изомеров 4'- и 5'-аминфлуоресцеина как в истинных, так и в организованных растворах различных типов.

Актуальным остается вопрос относительно характера агрегации в растворах макроциклических рецепторных молекул, в частности, каликсаренов. Авторы большинства работ рассматривают связывание субстратов каликсаренами исключительно с точки зрения взаимодействий «гость - хозяин», не принимая во внимание коллоидный аспект растворов. В отличие от анионных каликсаренов, интенсивно изучавшихся начиная с 80-х годов, многие особенности поведения катионных каликсаренов в растворах оставались невыясненными до недавнего времени [177, 189, 190, 211]. Для уточнения характера агрегации катионных каликсаренов, а также природы взаимодействий образовавшихся структур с различными молекулами в рамках проводимых на кафедре исследований были использованы шестичленный каликсарен и четыре катионных каликсаренов различной гидрофобности (рис. 1.5). Отметим, что в данной работе критерием, определяющим гидрофобность, служит длина и количество углеводородных радикалов.



Сокращенное обозначение	Заместители и размер цикла	
	n	Y
1CA6	6	CH ₃
3CA4	4	C ₃ H ₇
6CA4	4	C ₆ H ₁₃
8CA4	4	C ₈ H ₁₇
12CA4	4	C ₁₂ H ₂₅

Рисунок 1.5 – Структура исследуемых катионных каликсаренов.

Ранее в качестве индикаторных красителей для исследования растворов этих каликсаренов использовался набор одноосновных красителей разного типа [189, 190]. Применение же флуоресцеиновых красителей, способных к таутомерным превращениям, позволит получить более полную информацию относительно сходства наблюдаемых эффектов с действием мицеллярных растворов. В данной работе для решения этой задачи использовались флуоресцеин, сульфофлуоресцеин, а также децилфлуоресцеин (рис. 1.4).

Кроме того, представлялось необходимым выделить комплекс индикативных методов, с помощью которых можно выявить степень сходства агрегатов каликсаренов с разным размером углеводородного радикала и мицелл ПАВ. Для этого было проанализировано влияние агрегатов каликс[4]аренов и мицелл катионных ПАВ на следующие характеристики и процессы:

- спектры поглощения набора индикаторов, в том числе сольватохромного стандартного индикатора Райхардта $E_T(30)$;
- процессы испускания света аминфлуоресцеина и децилфлуоресцеина;
- скорость реакций гидролиза дилаурилфлуоресцеина и нуклеофильного присоединения гидроксид-иона к красителям различного зарядного типа: дианиону бромфенолового синего и катиону кристаллического фиолетового.

Структурные формулы упомянутых индикаторов приведены на рис. 1.6.

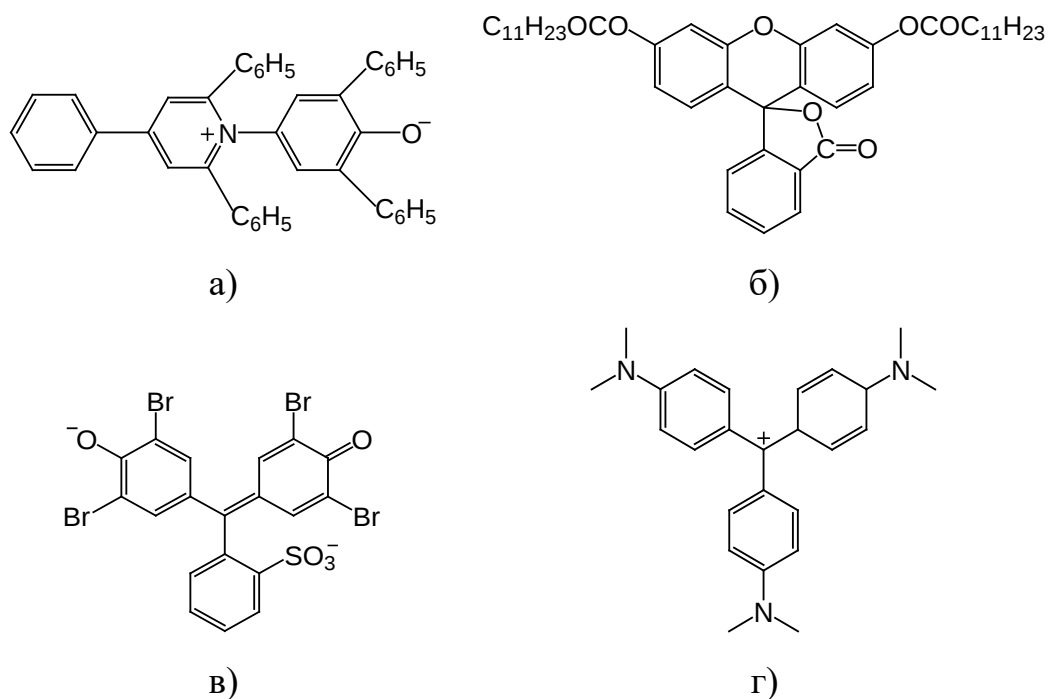


Рисунок 1.6 – Структура индикатора Райхардта $E_T(30)$ (а), дилаурилфлуоресцеина (б), дианиона бромфенолового синего (в), катиона кристаллического фиолетового (г).

Таким образом, решение поставленных задач позволит, с одной стороны, подтвердить схему протолитических превращений для флуоресцеина и его более сложных аналогов и выявить особенности их спектральных свойств в различных растворителях, с другой – существенно расширить представления о водных растворах катионных каликсаренов как представителей организованных сред, а также выявить основные закономерности их влияния на протолитические свойства флуоресцеиновых красителей.

РАЗДЕЛ 2

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1 Аппаратура и материалы

2.1.1 Приборы

Измерения оптического поглощения проводились при помощи спектрофотометров «СФ-46» и «Hitachi U-2000». Шкала длин волн установлена по спектру излучения ртутной лампы, шкала пропускания проверена по набору нейтрально-серых светофильтров.

Для измерения ЭДС цепи с переносом компенсационным методом использовали потенциометр постоянного тока «П 37-1», класс точности 0.01 и рН-метр милливольтметр «рН-121» в качестве нуль-инструмента. Электродом сравнения служил хлорид-серебряный; как индикаторные электроды применялись стеклянный с водородной функцией «ESL-63-07» или хлорид-селективный «CRYTUR 17-17» (Чехословакия, Турнов). Калибровка цепи проводилась по стандартным буферным растворам (рН 9.18; 6.86; 4.01; 1.68) или по 4 растворам KCl с концентрацией от 10^{-5} до 0.1 моль/л, соответственно.

Для термостатирования рабочих растворов использовали водяной ультратермостат «УТ-15» с точностью термостатирования $\pm 0.05^\circ\text{C}$.

^1H ЯМР спектры измерены на спектрометрах «Mercury Varian» на частоте 200 МГц и «Bruker Avance II 400» на частоте 400 МГц, ^{13}C ЯМР спектры измерены на спектрометре «Bruker Avance II 400» при 100 МГц д. х. н., В. И. Рыбаченко (Институт физико-органической химии и углехимии имени Л. М. Литвиненко НАН Украины, Донецк).

ИК спектры красителей в таблетках KBr получены на спектрофотометре «Alpha» (Bruker), оснащенным НПВО-модулем «Alpha-Platinum» Д. Ю. Филатовым (ООО «Проминвест Пластик», Харьков), в растворах в ДМСО ИК-спектры были измерены при помощи спектрометра «SPECTRUM ONE» (PerkinElmer) в диапазоне $400 - 4000\text{ нм}^{-1}$ Д. С. Софроновым (ГНУ «НТК «Институт монокристаллов»).

Рентгеноструктурный анализ проводился на рентгеновском дифрактометре «Xcalibur» (излучение MoK_α , детектор на основе ПЗС, графитовый монохроматор, ω -сканирование, $2\theta_{\text{max}} = 50^\circ$). Структуры расшифровывались прямым методом и уточнялись в анизотропном приближении с использованием программного пакета OLEX2 [215] с модулями SHELXS и SHELXL [216]. Измерения и расшифровка структуры проводилась И. В. Омельченко (ГНУ «НТК «Институт монокристаллов»).

Обработка растворов ультразвуком осуществлялась при помощи прибора «Branson 220» (мощность: 50 Вт, частота: 48 кГц $\pm 10\%$).

Определение размеров агрегатов и электрокинетического потенциала методом динамического рассеяния света проводились на приборе «Zeta Sizer Nano ZS» с использованием лазера He–Ne мощности 4 мВт, 633 нм с оптическим фильтром на 633 и 532 нм к.т.н. А. И. Марининым (Национальный университет пищевых технологий, Киев).

Для трансмиссионной электронной микроскопии применялся микроскоп «Selmi TEM-125K». Изображения регистрировались с помощью камеры, оснащенной ПЗС-матрицей или на пленку.

Спектры флуоресценции измерены на спектрофлуориметре Hitachi F-4010.

Времена жизни флуоресценции были определены с использованием субнаносекундного кинетического спектрометра, оснащенного монохроматором «МДР-12» (ЛОМО, Россия), модуля для коррелированного во времени подсчета одиночных фотонов «TimeHarp 200», пикосекундным светодиодом «PLS 340», управляемым приборами «PDL 800-B» (PicoQuant, Германия) и фотоумножительной трубкой «Hamamatsu H5783P» (Hamamatsu, Япония). Измерения и обработка результатов проводились А. О. Дорошенко и к. х. н. А. Д. Рошалем (НИИ химии при ХНУ имени В. Н. Каразина).

2.1.2 Посуда

Для приготовления рабочих растворов использовались мерные колбы вместимостью 5, 10, 25, 50, 100 и 1000 мл, градуированные пипетки,

вместимостью 0.1, 0.2, 1, 2, 5 и 10 мл, бюретка на 25 мл, мерные цилиндры вместимостью 100 и 200 мл. Вся мерная посуда перед использованием была откалибрована весовым методом по воде при 25°C.

2.2 Реактивы

2.2.1 Красители

Диметилфлуоресцеин был синтезирован по методике, описанной Фишером и Хеппом [217]. Продукт был перекристаллизован из смеси тетрахлорметан – хлороформ (3:1 по объему). ^1H -ЯМР ($(\text{CD}_3)_2\text{S}=\text{O}$) δ , м.д.: 8.19 (1H, dd, $J = 7.1$, $J=2.1$, 3'-H), 7.94-7.68 (2H, m, $J=7.1$, $J=2.1$, 4',5'-H), 7.47 (1H, dd, $J=7.1$, $J=2.1$, 6'-H), 7.21 (1H, d, $J=2.1$, 4-H), 6.95-6.68 (3H, m, 1,2,8-H), 6.36 (1H, dd, $J=9.5$, $J=2.1$, 7-H), 6.21 (1H, d, $J=2.1$, 5-H), 3.88 (3H, s, Ph-O-CH₃), 3.55 (3H, s, Ph-CO-O-CH₃).

^{13}C -ЯМР ($(\text{CD}_3)_2\text{S}=\text{O}$) δ , м.д.: 183.89, 165.21, 163.92, 158.39, 153.60, 150.14, 133.92, 133.24, 130.73, 130.40, 130.08, 129.39, 129.51, 128.88, 116.65, 113.60, 114.31, 104.60, 100.60.

ИК, cm^{-1} , выбранные полосы: 1726, 1642, 1587, 1509, 1453, 1256, 1211, 1105.

Метилфлуоресцеин был получен, согласно методике, описанной в статье [217]. 1.54 г метилфлуоресцеина, 0.8 г NaOH и 15 мл метанола нагревались с обратным холодильником на протяжении 2 часов. После охлаждения в реакционную смесь добавляли 100 мл дистиллированной воды. Получившийся прозрачный раствор был подкислен HCl, образовавшийся желтый осадок отфильтровывали, промывали дистиллированной водой и сушили. Продукт перекристаллизовывали из смеси вода – этанол (50 % об.). ^1H -ЯМР ($(\text{CD}_3)_2\text{S}=\text{O}$) δ , м.д.: 10.14 (1H, s, Ph-OH), 7.98 (1H, d, $J=7.2$, 3'-H), 7.83-7.64 (2H, m, $J=7.2$, 4',5'-H), 7.25 (1H, d, $J=7.2$, 6'-H), 6.91 (1H, d, $J=2.1$, 4-H), 6.73-6.51 (5H, m, 1,2,5,7,8-H), 3.79 (3H, s, Ph-O-CH₃).

^{13}C -ЯМР ($(\text{CD}_3)_2\text{S}=\text{O}$) δ , м.д.: 168.68, 161.03, 159.55, 152.5, 151.88, 151.77, 135.67, 130.16, 129.11, 128.96, 126.03, 124.67, 124.01, 112.79, 111.91, 110.99, 109.44, 102.2, 100.78, 82.71, 55.66.

ИК, cm^{-1} , выбранные полосы: 1718, 1609, 1508, 1430, 1286, 1257, 1171, 1120.

Натриевую соль метилфлуоресцеина получали добавлением к водной суспензии метилфлуоресцеина NaHCO_3 . После выпаривания воды целевой продукт был экстрагирован изопропанолом и высушен. ^1H -ЯМР ($(\text{CD}_3)_2\text{S}=\text{O}$) δ , м.д.: 8.08 (1H, d, $J=4$, 3'-H), 7.58 (2H, m, $J=4$, 4',5'-H), 7.17 (1H, d, $J=4$, 6'-H), 7.08 (1H, s, 5-H), 6.84 (1H, d, $J=8$, 8-H), 6.80 (1H, d, $J=8$, 7-H), 6.74 (1H, d, $J=8$, 1-H), 6.32 (1H, d, $J=8$, 2-H), 6.27 (1H, s, 4-H), 3.86 (3H, s, Ph-O-CH₃).

^{13}C -ЯМР ($(\text{CD}_3)_2\text{S}=\text{O}$) δ , м.д.: 178.55, 168.79, 162.82, 157.15, 153.15, 138.02, 137.15, 130.74, 130.48, 129.66, 129.07, 128.95, 127.66, 124.56, 114.51, 113.27, 112.70, 103.52, 100.31, 56.08.

Сульфифлуоресцеин был синтезирован по методике, описанной в работе [218].

Синтез четырех упомянутых выше красителей проводился С. В. Шеховцовым. Весь набор ЯМР- и ИК- спектров содержится в приложении.

Дилаурилфлуоресцеин предоставлен проф. С. Н. Штыковым (Саратовский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, Россия). Раствор индикатора в ацетоне, а также мицеллярные водные растворы при отсутствии депротонирующих реагентов не поглощал в видимой области, что является свидетельством полного превращения дилаурилфлуоресцеина в лактонную форму, типичную для флуоресцеинов с двумя ацилированными группами на ксантеновой части.

Флуоресцеин был очищен переосаждением и хроматографически в ходе предыдущих исследований на кафедре. Препараты *n*-децилфлуоресцеина и этилфлуоресцеина синтезирован В. И. Алексеевой и Л. П. Саввиной (Научно-исследовательский институт органических полупродуктов и красителей, г. Москва, Россия) по известной методике. Бромфеноловый синий, феноловый красный, метиловый оранжевый, бенгальский розовый Б использовались ранее на кафедре. Эти красители, а также 4' и 5'-аминофлуоресцеин (Sigma-Aldrich) применялись без дополнительной очистки. 2,7,3',4',5',6'-гексафторфлуоресцеин предоставлен доктором К. Р. Ги, («Invitrogen Life Technologies», Юджин, США). Чистоту красителей контролировали спектрофотометрически.

2.2.2 Растворители

ДМСО очищали двукратным вымораживанием с последующей перегонкой под вакуумом. Ацетонитрил квалификации «х.ч.» выдерживали несколько суток над P_2O_5 и перегоняли с безводным карбонатом калия. Этанол (95.5 %) и бутанол-1 перегоняли, собирая среднюю фракцию. Метанол очищали перегонкой с безводным карбонатом калия. Ацетон квалификации «х.ч.» обрабатывали перманганатом калия при комнатной температуре в течение нескольких суток и перегоняли.

Содержание воды в ацетонитриле и ДМСО, определенное по методу Фишера, составляло 0.005 и 0.1 %, соответственно.

2.2.3 Каликсарены и поверхностно-активные вещества.

N-цетил- *N,N*-триметиламмоний бромид, $C_{16}H_{33}(CH_3)_3N^+(Br^-)$ (ЦТАБ), фирмы Sigma-Aldrich, а также *N*-цетил-*N,N*-диметиламмонийпропансульфонат, $C_{16}H_{33}(CH_3)_2N^+(CH_2)_2SO_3^-$ (ЦДАПС), фирмы «Sigma» использовали без предварительной очистки.

N,N-дитетрадецил- *N,N*-диметиламмоний бромид, $(C_{14}H_{29})_2(CH_3)_2N^+(Br^-)$ (ДТДДАБ) и гемини-ПАВ тетраметилен-1,4-бис(*N,N*-диметил- *N*-цетиламмоний бромид), $C_{16}H_{33}(CH_3)_2N^+(Br^-)(CH_2)_4N^+(Br^-)$ $(CH_3)_3C_{16}H_{33}$ (16–4–16) были синтезированы н. с. С. В. Шеховцовым по описанной методике [219].

Препараты каликсаренов – 5,11,17,23-тетракис(*N,N*-диметил-*N*-гидроксиметиламмоний)-метилен- 25,26,27,28-тетрапропилоксикаликс[4]арена тетра-хлорид (3CA4) [190], 5,11,17,23-тетракис(*N,N*-диметил-*N*-гидроксиметил-аммоний)-метилен- 25,26,27,28-тетрагексилоксикаликс[4]арена тетрахлорид (6CA4), 5,11,17,23-тетракис(*N,N*-диметил-*N*-гидроксиметиламмоний)-метилен- 25,26,27,28-тетраоктилоксикаликс[4]арена тетрахлорид (8CA4) [177], 5,11,17,23-тетракис(*N,N*-диметил-*N*-гидроксиметиламмоний)-метилен- 25,26,27,28-тетрадодецилоксикаликс[4]арена тетрахлорид (12CA4), 5,11,17,23,29,35-гексакис(*N,N*-диметил-*N*-гидроксиэтиламмоний)-метилен-37,38,39,40,41,42-гексаметокси-

каликс[6]арена гексахлорид (1CA6) [220] – синтезированы Р. В. Родиком (Институт органической химии, Киев).

2.2.4 Другие реактивы

Тетраборат натрия очищали перекристаллизацией из воды при температуре 60°C, сушили на воздухе. Раствор щелочи готовили из насыщенного раствора NaOH, используя бидистиллированную воду, очищенную от CO₂ кипячением, и хранили без доступа диоксида углерода. Отсутствие в растворе карбонатов проверяли титриметрически. 1,8-диазабицикло[5.4.0]ундецен-7 (ДБУ) фирмы Merck использован без предварительной очистки.

Для приготовления буферных растворов использовались реактивы квалификации «ос.ч.» В качестве компонентов использовались растворы хлороводородной кислоты, ортофосфорная кислота, тетраборат натрия, гидроксид натрия. *o*-бифталат калия, бензоат калия и бензойная кислота были очищены перекристаллизацией.

2.3 Методика приготовления растворов и проведения эксперимента

2.3.1 Проведение спектрофотометрических исследований

Для измерения спектров поглощения депротонированных форм метилфлуоресцеина и диметилфлуоресцеина в различных растворителях (раздел 3, п. 3.2.2) рабочие растворы готовили из исходного ацетонового раствора красителей, добавляя навеску основания ДБУ (концентрация в рабочем растворе составляла приблизительно 0.02 моль/л) или водный раствор NaOH (для систем, содержащих воду) и доводя до метки в мерной колбе растворителем. Объемная доля ацетона в рабочих растворах не превышала 1 %.

Концентрацию растворов красителей определяли по известным коэффициентам молярного поглощения в воде. При этом концентрированные растворы красителей в водно-этанольных и неводных растворителях разбавляли водой так, чтобы объемная доля неводного компонента не превышала 0.1 – 0.5 %.

2.3.2 Расчет квантовых выходов флуоресценции и времен жизни возбужденного состояния

Квантовые выходы флуоресценции рассчитывались согласно описанной ранее процедуре [221]. В качестве стандарта во всех случаях использовался водный раствор флуоресцеина в присутствии 0.1-молярной щелочи NaOH. При определении квантового выхода в других растворителях учитывалась разница коэффициентов преломления воды и растворителя по соотношению (2.1) [222].

$$\varphi_{solv} = \varphi_w^{st} \frac{S_{solv}}{S_w^{st}} \frac{A_{\lambda_{ex},w}^{st} n_{solv}^2}{A_{\lambda_{ex},solv}^{st} n_w^2} \quad (2.1)$$

где φ_{solv} , S_{solv} и $A_{\lambda_{ex},solv}$ – квантовый выход флуоресценции, площадь под кривой спектра флуоресценции и поглощение при длине волны возбуждения исследуемого вещества в растворителе;

φ_w^{st} , S_w^{st} и $A_{\lambda_{ex},w}^{st}$ – квантовый выход флуоресценции, площадь под кривой спектра флуоресценции и поглощение при длине волны возбуждения стандартного вещества в воде;

n_{solv} и n_w – коэффициенты преломления растворителя и воды, соответственно.

Времена жизни возбужденного состояния рассчитывались, согласно подходу, описанному ранее [223].

2.3.3 Определение констант диссоциации красителей в истинных растворах

Исходные растворы красителей, приготовленные в воде с добавлением щелочи или 96 %-ном (масс.) этаноле, смешивали с компонентами буферных растворов (или растворами HCl или NaOH), добавляли необходимое количество раствора NaCl и этанола (для водно-этанольных смесей) и доводили до метки водой при термостатировании. Для предотвращения возможного гидролиза

сложных эфиров в случае диметилфлуоресцеина и этилфлуоресцеина не использовались растворы с концентрацией NaOH свыше 10^{-3} моль/л.

В водно-органическом растворителе для характеристики кислотности среды применяли величину $a_{H^+}^*$ – активность ионов H^+ , отнесенную к стандартному состоянию смешанного растворителя. Для оценки этой величины использовали определенную ранее экспериментально поправку, учитывающую диффузионный потенциал цепи, а также эффект среды протона. Для смеси вода–этанол (50% масс.) данная поправка составляет 0.20 [105]. Таким образом, значение $pa_{H^+}^*$ можно рассчитать исходя из инструментальных значений, $pH_{инстр}$, по формуле $pa_{H^+}^* = pH_{инстр} - 0.20$, предполагая величину поправки неизменной для данного состава растворителя.

Рабочие концентрации красителей составляли $5 \cdot 10^{-6} - 3 \cdot 10^{-4}$ моль/л. При определении значений pK_a для одно-, двух- и четырехосновных красителей использовались серии из 6, 15 – 20 и 23 – 30 рабочих растворов с разным значением pH (или $pa_{H^+}^*$) и как правило постоянной ионной силой, равной 0.05 моль/л.

Значения pK_a рассчитывали с использованием программы CLINP [224] совместно со спектрами поглощения индивидуальных форм красителей в диапазоне длин волн в областях максимумов ионных форм ($\lambda = 420 - 520$ нм). Исходными данными служили спектры равновесных смесей ионных и молекулярных форм с различными значениями pH. Спектры крайних щелочных и кислых форм получали непосредственным измерением.

Разность значений pK_{a1} и pK_{a0} некоторых индикаторов (аминофлуоресцеина, метилфлуоресцеина) в водно-этанольных растворах превышает 5 единиц, и это позволяет получить спектр нейтральной формы непосредственным измерением. В этом случае влияние примесей интенсивно поглощающих частиц катиона и моноаниона оценивалось, исходя из рассчитанных значений констант ионизации.

Термодинамические константы диссоциации красителей оценивали с применением уравнений второго приближения теории Дебая – Хюккеля (радиус максимального сближения принимался равным 0.5 нм, а диэлектрические проницаемости водных и водно-этанольных растворов – 78.4 и 49.0, соответственно).

2.3.4 Проведение диализа в коллоидных растворах каликсарена 1CA6.

Растворы диализировались через полупроницаемую целлофановую мембрану толщиной около 30 мкм, предварительно вымоченную в дистиллированной воде в течение 1 сут. Объемы внешних и внутренних растворов составляли 25 (или 10) и 400 (или 200) мл, соответственно. Диализ проводился при комнатной температуре (18 – 20°C) на протяжении 6 – 7 дней.

Во внутренний раствор вводился раствор каликсарена 1CA6 и красителя, требуемая кислотность раствора достигалась добавками боратного (pH = 9.2), фосфатного (pH = 6.8), фталатного (pH = 4.0) буферного раствора или кислоты HCl. Концентрация 1CA6 составляла $(3.5 - 3.9) \cdot 10^{-3}$ моль/л и приблизительно соответствовала концентрации каликсарена при определении констант ионизации индикаторов. Во всех растворах, за исключением сильноокислых, поддерживалась ионная сила 0.05 моль/л путем введения соответствующего количества NaCl. Внешние растворы содержали те же компоненты, за исключением каликсарена и красителя.

В качестве индикаторных красителей использовались бромфеноловый синий ($c = 9 \cdot 10^{-6}$ моль/л, депротонированная форма – при pH = 9.2, протонированная форма – в 0.1-молярном растворе HCl), феноловый красный ($c = 1.3 \cdot 10^{-5}$ моль/л, депротонированная форма – при pH = 9.2, протонированная форма – при pH = 4.0) и метиловый оранжевый ($c = 4.6 \cdot 10^{-5}$ моль/л, депротонированная форма – при pH = 6.8, протонированная форма – в 0.16-молярном растворе HCl). В случае растворов, содержащих метиловый оранжевый и фосфатный буфер (pH = 6.8) при длительном стоянии наблюдалось осаждение каликсарена, все остальные системы оказались устойчивы к осаждению.

По окончании диализа измерялось поглощение внутреннего и внешнего раствора исследуемых и контрольных систем. Для наиболее гидрофобного красителя бромфенолового синего наблюдалась его адсорбция на целлофановой мембране.

2.3.5 Определение спектральных характеристик и констант ионизации красителей в присутствии каликсаренов

Исходные растворы достаточно гидрофильных красителей флуоресцеина, сульфофлуоресцеина, бромфенолового синего готовили, растворяя навеску красителя в воде с добавлением небольшого количества щелочи ($\text{pH} \approx 11$) или в чистой воде (в случае бромфенолового синего). Для приготовления раствора более гидрофобного децилфлуоресцеина краситель растворяли совместно с необходимым количеством каликсарена и разбавляли водой; полученная система была устойчива к осаждению на широком интервале pH . Во избежание гидролиза сложноэфирной группы растворы с $\text{pH} > 9$ в этом случае не применяли.

Для приготовления исходных растворов каликсаренов навеску предварительно просушенного до постоянной массы при температуре $60 - 80^\circ\text{C}$ вещества растворяли в небольшом количестве воды, нагревая смесь на водяной бане до $40 - 60^\circ\text{C}$. Полученные растворы были прозрачными, однако при длительном стоянии (через 2 – 3 недели) наблюдалось появление небольшого количества осадка. Поэтому, использовали, как правило, растворы каликсаренов, приготовленные не раньше, чем за 3 дня до проведения эксперимента.

В рабочих растворах использовали спектрофотометрические концентрации красителей: $(0.5 - 1) \cdot 10^{-5}$ моль/л, за исключением кислых растворов, ионная сила поддерживалась постоянной (0.05 или 0.5 моль/л, NaCl + компоненты буферных растворов или HCl). Равновесие устанавливалось при термостатировании (25°C).

Константы ионизации красителей определяли в спектрофотометрически с потенциометрическим измерением pH растворов.

Рабочие концентрации каликсаренов составляли $3 \cdot 10^{-3}$ моль/л (для 1СА6) и $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л (для 3СА4 и 8СА4) и были выбраны на основании имеющихся данных о критической концентрации агрегации исследованных каликсаренов [177, 191] и проведенных ранее исследований [189, 190].

Спектры крайних щелочных и кислых форм определялись, как правило, в присутствии NaOH ($c = 0.01$ моль/л) (или боратного буферного раствора, $pH = 9.0$, для децилфлуоресцеина и бромфенолового синего) и HCl ($c = 2 - 3$ моль/л) соответственно. Для создания необходимой кислотности промежуточных растворов применялись фосфатные, ацетатные буферные растворы, а также HCl. В случае трехосновного флуоресцеина использовалась обычно серия из 18 растворов, для двухосновных децилфлуоресцеина и сульфифлуоресцеина – из 10–12 растворов, для одноосновного бромфенолового синего – 5 – 6 растворов.

Процедура расчета значений показателей кажущихся констант ионизации pK_a^a аналогична описанной выше схеме расчета констант диссоциации красителей в истинных растворах.

Для измерения спектров поглощения сольватохромного индикатора $E_T(30)$ 1 мл спиртового раствора красителя вносили в мерную колбу на 10 мл, содержащую раствор соответствующего каликсарена, добавляли боратный буферный раствор ($pH = 10.0$) и доводили до метки при термостатировании.

2.3.6 Исследование кинетики обесцвечивания бромфенолового синего и кристаллического фиолетового

Определение констант скорости обесцвечивания бромфенолового синего в присутствии каликсаренов проводили при концентрации NaOH 0.01 моль/л и $I = 0.05$ М (NaCl). Концентрация красителя составляла $(5-10) \cdot 10^{-6}$ моль/л. Кинетику обесцвечивания кристаллического фиолетового исследовали в боратном буферном растворе ($pH = 10.0$) или в присутствии щелочи ($c = 10^{-4}$ моль/л) без добавления NaCl. Аликвоты красителя, исходного раствора каликсарена или ЦТАБ, а также NaCl смешивали, выдерживали при температуре 25 °С, добавляли щелочь, быстро доводили до метки и перемешивали. За время начала реакции принимали

момент добавления щелочи. Значения светопоглощения в зависимости от времени фиксировали при $\lambda = 590$ нм. Исходя из зависимости логарифма поглощения от времени, определяли константы скорости реакции.

2.3.7 Исследование кинетики гидролиза дилаурилфлуоресцеина

Исходный раствор дилаурилфлуоресцеина в ацетоне смешивали с раствором этанолом (96% об.) или раствором ЦТАБ (каликсарена), выдерживали 15 – 20 мин для установления рабочей температуры и добавляли боратный буферный раствор, предварительно нагретый до той же температуры. Время добавления буферного раствора считали временем начала реакции. В рабочем растворе объемная доля ацетона не превышала 1 – 2 %. Кислотность раствора определяли потенциометрически.

Концентрации красителя в рабочем растворе составляли $(5 - 10) \cdot 10^{-6}$ моль/л. При выборе рабочих концентраций каликсаренов учитывалась необходимость наличия в растворе достаточного количества агрегатов, чтобы минимизировать вероятность связывания одним агрегатом более одной частицы красителя. Сверху диапазон концентраций ограничивается растворимостью каликсаренов в данных системах.

При исследовании фиксировали зависимости оптического поглощения рабочего раствора от времени при одной длине волны, либо получали полный спектр раствора. Время измерения спектра составляло 29 с, что не учитывалось при расчетах. Эксперимент проводили при термостатировании при 25 °С.

РАЗДЕЛ 3

ПРОТОЛИТИЧЕСКИЕ И СПЕКТРАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ЭФИРОВ И АМИНОПРОИЗВОДНЫХ ФЛУОРЕСЦЕИНА В ИСТИННЫХ РАСТВОРАХ. ОБЩАЯ СХЕМА ИОНИЗАЦИИ ФЛУОРЕСЦЕИНОВЫХ КРАСИТЕЛЕЙ

3.1 Диссоциация производных флуоресцеина в водных растворах и смеси вода – этанол (50% масс.)

Для подтверждения схемы равновесий флуоресцеина были определены спектральные и протолитические характеристики ряда его производных, содержащих меньшее количество групп, участвующих в процессах переноса протона. Определение параметров равновесий этих красителей и сопоставление их с аналогичными величинами для флуоресцеина позволит проверить справедливость некоторых допущений относительно таутомерного состава моноаниона красителя, в первую очередь предположение об отсутствии лактонной структуры моноаниона флуоресцеина.

Метилфлуоресцеин отличается от исходного соединения отсутствием одной гидроксильной группы на ксантеновом фрагменте. Это приводит к тому, что схема протолитических равновесий для этого красителя (рис. 3.1), становится проще, чем для флуоресцеина (рис. 1.2), т.к. полностью депротонированная форма метилфлуоресцеина представляет собой однозарядный ион. Это обстоятельство важно, если учесть, что для флуоресцеина в воде и особенно в неводных растворителях выход однозарядного аниона HR^- сравнительно невелик, вследствие чего увеличивается неопределенность оценок констант ионизации, спектра поглощения, а следовательно и таутомерного состава этой формы.

Кроме того, были определены константы ионизации других эфиров флуоресцеина: диметилфлуоресцеина, этилфлуоресцеина и сульфифлуоресцеина (рис. 3.2 – 3.4), которые, также будут полезны для подтверждения схемы таутомерных превращений. Формально сульфифлуоресцеин также является

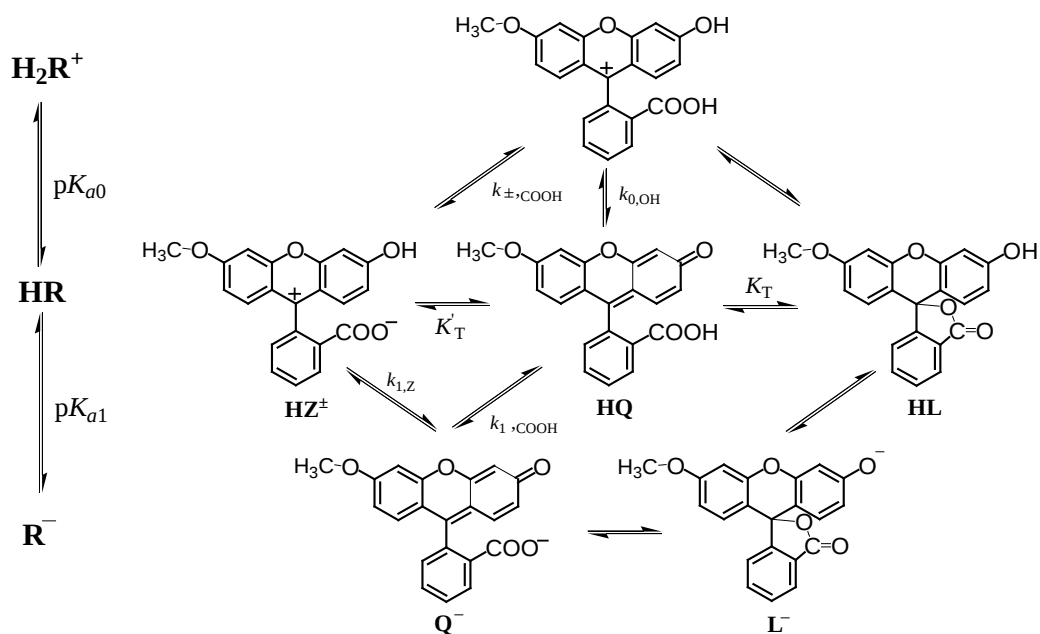


Рисунок 3.1 – Схема протолитических равновесий метилфлуоресцеина.

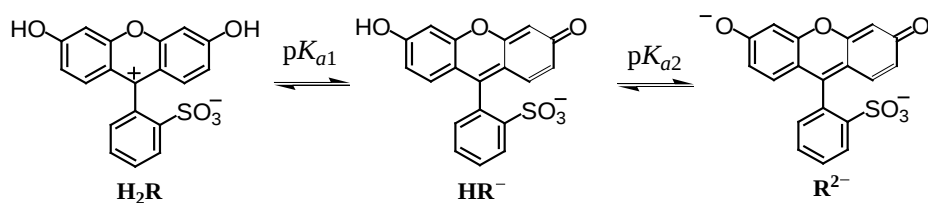


Рисунок 3.2 – Схема кислотно-основных равновесий сульфифлуоресцеина.

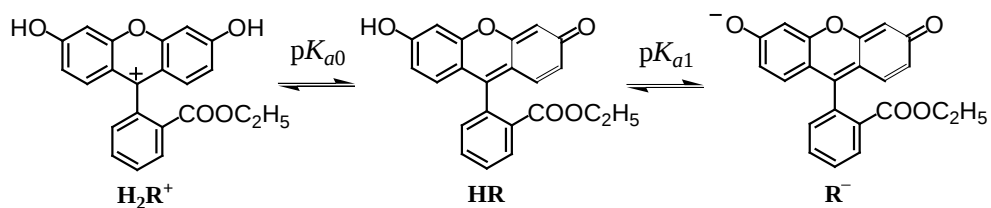


Рисунок 3.3 – Схема кислотно-основных равновесий этилфлуоресцеина.

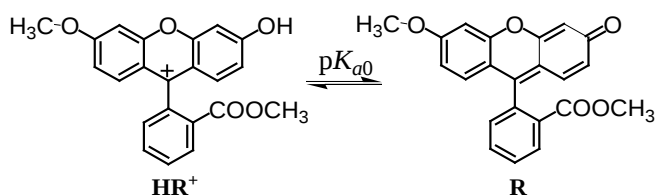


Рисунок 3.4 – Схема депротонирования диметилфлуоресцеина.

трехосновной кислотой, однако равновесие, соответствующее диссоциации сульфогруппы, смещено в сильноокислую область. Так, значения pK_a для бензолсульфоновой кислоты и *n*-толуолсульфокислоты составляет -2.8 и $-(1.06 - 1.34)$, соответственно [225], что подтверждает данное допущение.

3.1.1 Структура метилфлуоресцеина и диметилфлуоресцеина в твердом состоянии

По данным рентгеноструктурного анализа (рис. 3.5), в кристаллическом состоянии метилфлуоресцеин имеет структуру лактона, что типично для этого класса красителей. Однако длина связи $C=O$ ($1.535 \text{ \AA}$) несколько удлинена, по сравнению со связью флуоресцеина и его структурными аналогами (среднее значение $1.508 \text{ \AA}$ [41, 101, 103]). Центральный углеродный атом находится в тетраэдрической конфигурации (углы между связями принимают значения $101.0(3)^\circ - 115.2(4)^\circ$). Ксантеновый фрагмент практически планарен (угол между двумя бензольными кольцами не превышает 6.5°), он перпендикулярен плоскости цикла γ -лактона. Анализируя расстояния между атомами, можно предположить наличие межмолекулярных водородных связей между гидроксильной группой на ксантеновом фрагменте и атомом O лактонной связи $C=O$. Следует особо отметить, что в отличие от флуоресцеина [101], в состав кристаллической решетки метилфлуоресцеина не включены молекулы растворителя, что может быть причиной описанных особенностей структуры метилфлуоресцеина.

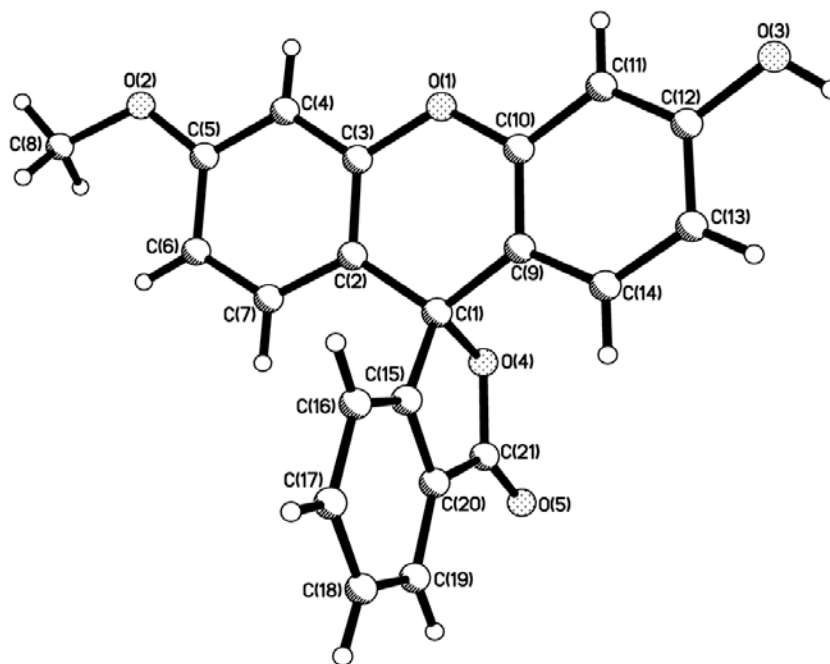


Рисунок 3.5 – Молекулярная структура метилфлуоресцеина, согласно данным рентгеновской дифракции.

В ИК-спектре твердого метилфлуоресцеина (рис. 3.6, а) проявляется интенсивная полоса при 1718 см^{-1} , которая соответствует валентным колебаниям связи $\text{C}=\text{O}$ в лактонном цикле. Отметим, что для флуоресцеина эта полоса характеризуется волновым числом 1750 см^{-1} [101]. Однако такое различие может быть обусловлено также присутствием в кристаллической решетке растворителя метанола. Маркушевский и Диль идентифицировали полосу с максимумом 1730 см^{-1} и плечом $1760 - 1770\text{ см}^{-1}$, которое было отнесено к комплексу флуоресцеина с 1,4-диоксаном [100].

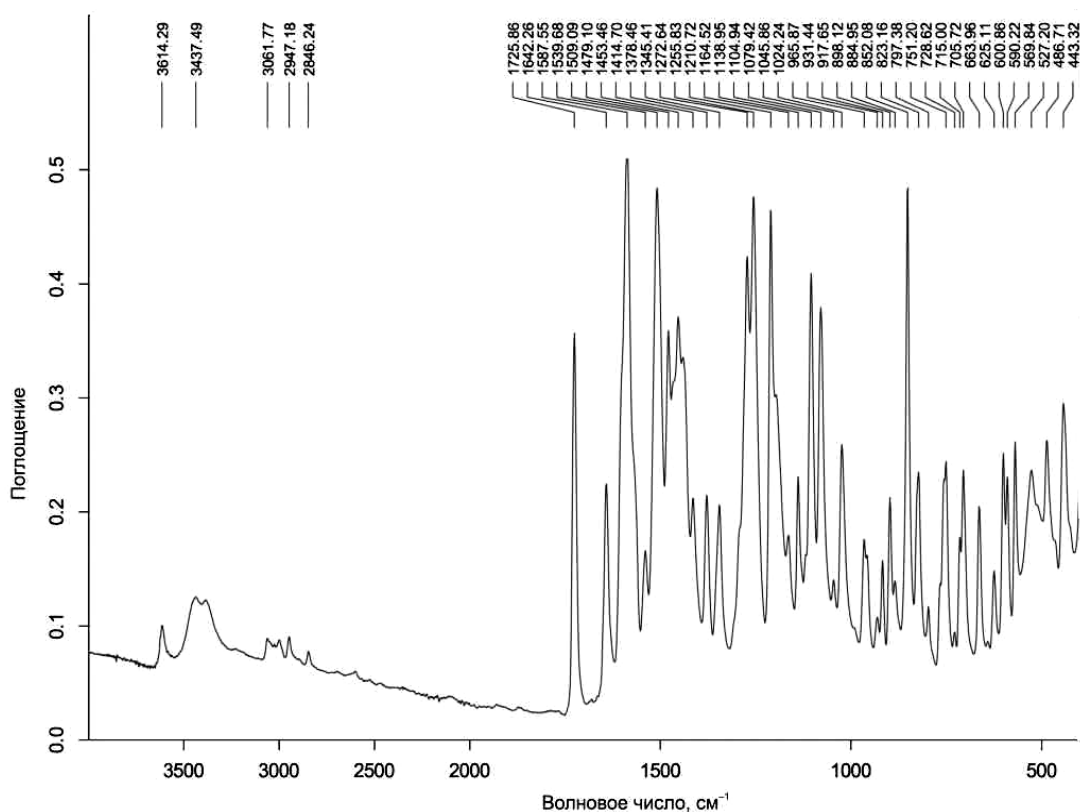
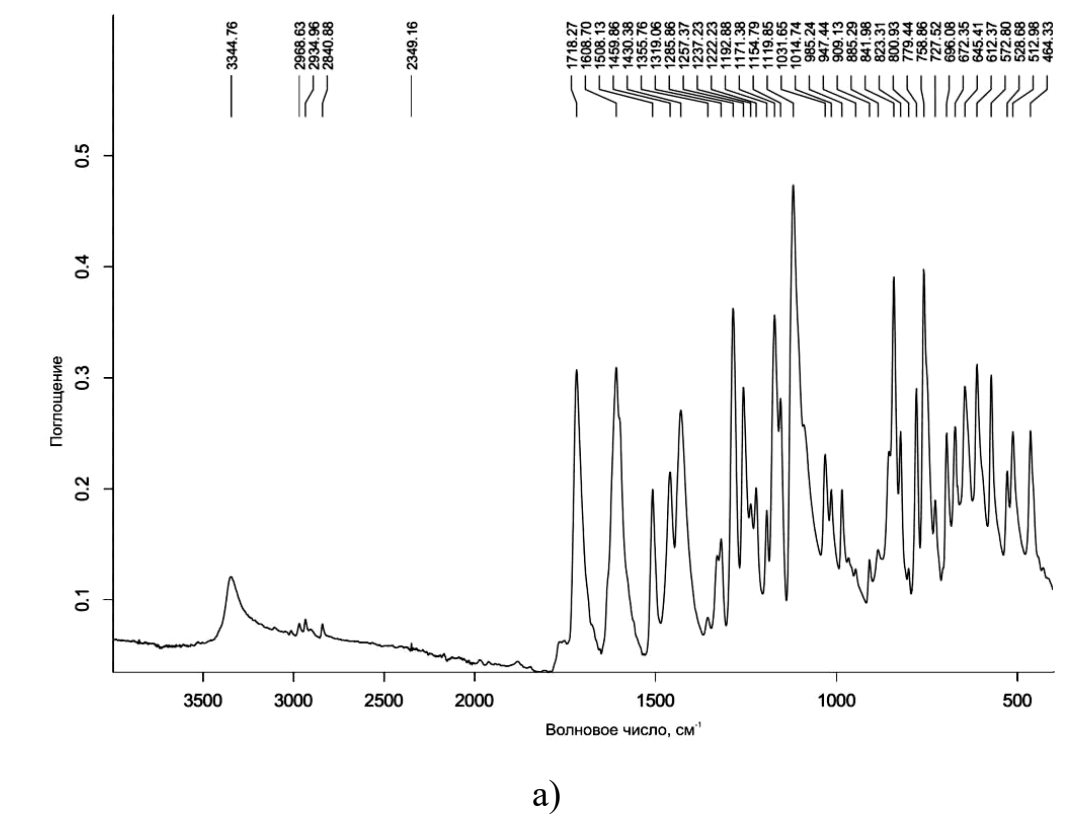


Рисунок 3.6 – ИК-спектры твердого метилфлуоресцеина (а) и диметилфлуоресцеина (б).

В ИК-спектре диметилфлуоресцеина фиксируются две интенсивные полосы при 1726 и 1642 см^{-1} , которые следует отнести к валентным колебаниям связи $\text{C}=\text{O}$ сложноэфирной группы COOCH_3 и хиноидной структуры ксантенового фрагмента, соответственно.

Таким образом, экспериментальные данные подтвердили лактонную кристаллическую структуру метилфлуоресцеина, причем, в отличие от флуоресцеина, без включения молекулы растворителя.

3.1.2 Кислотно-основные и спектральные свойства метилового эфира флуоресцеина и других производных в водных и водно-этанольных растворах

Спектрофотометрическим методом были определены константы диссоциации метилфлуоресцеина в воде и смеси вода-этанол, а также рассчитаны спектры поглощения индивидуальных ионных форм красителя (табл. 3.1, рис. 3.7 и 3.8).

В водных растворах метилфлуоресцеина в диапазоне pH 4.90 – 2.87 наблюдалось медленное уменьшение поглощения, вплоть до полного обесцвечивания через 3 – 4 дня. Это связано с ограниченной растворимостью нейтральной формы красителя, присутствующей в растворах в данном диапазоне pH. Однако процесс обесцвечивания происходил достаточно медленно, поэтому в течение получаса от момента приготовления растворов существенного уменьшения поглощения зафиксировано не было. Но все же следует подчеркнуть, что значения констант ионизации получены для пересыщенных растворов красителя.

В смеси вода–этанол значения pK_{a2} сульфифлуоресцеина (7.63, табл. 3.1) и флуоресцеина (7.66, [39]) практически совпадают. Это означает, что константы соответствуют равновесию одинаковых функциональных групп, т.е. превращение флуоресцеина из двух- в однозарядный анион сопровождается протонированием фенолятной группы. Данный вывод особенно важен при рассмотрении схемы

Таблица 3.1

**Спектральные характеристики ионных и молекулярных форм и показатели термодинамических констант
диссоциации флуоресцеиновых красителей в воде и смеси вода – этанол (50 % масс.)**

Краситель	λ_{max} , нм ($\varepsilon_{\text{max}} \cdot 10^{-3}$, л·моль ⁻¹ ·см ⁻¹)				pK_{a2}	pK_{a1}	pK_{a0}
	Дианион	Моноанион	Нейтральная форма	Катион			
Метилфлуоресцеин ¹	—	452–455 (30.9) 478–481 (27.4)	454–457 (0.33) 481–488 (0.26)	441 (54.5)	—	7.32 ± 0.01	0.39 ± 0.1
Метилфлуоресцеин (в воде)	—	452–456 (31.9) 472–476 (30.7)	432–434 (7.6)	436–438 (54.0)	—	4.73 ± 0.01	1.94 ± 0.01
Диметилфлуоресцеин	—	—	457–459 (29.1), 486 (24.5)	442–443 (56.9)	—	—	2.28 ± 0.01
Этилфлуоресцеин	—	504–505	456–459, 483–487	445	—	6.71 ± 0.01	2.05 ± 0.01
Сульфифлуоресцеин	503 (91.6)	455–458 (30.7) 483–487 (28.3)	445–447 (54.6)	—	7.63 ± 0.01	3.22 ± 0.01	—
Флуоресцеин [39]	495 (88.5)	455 (34.3)	455 (0.978)	445 (62.4)	7.66 ± 0.05	6.82 ± 0.05	0.94 ± 0.05

¹ Если не указано особо, характеристики определялись в водно-этанольной смеси.

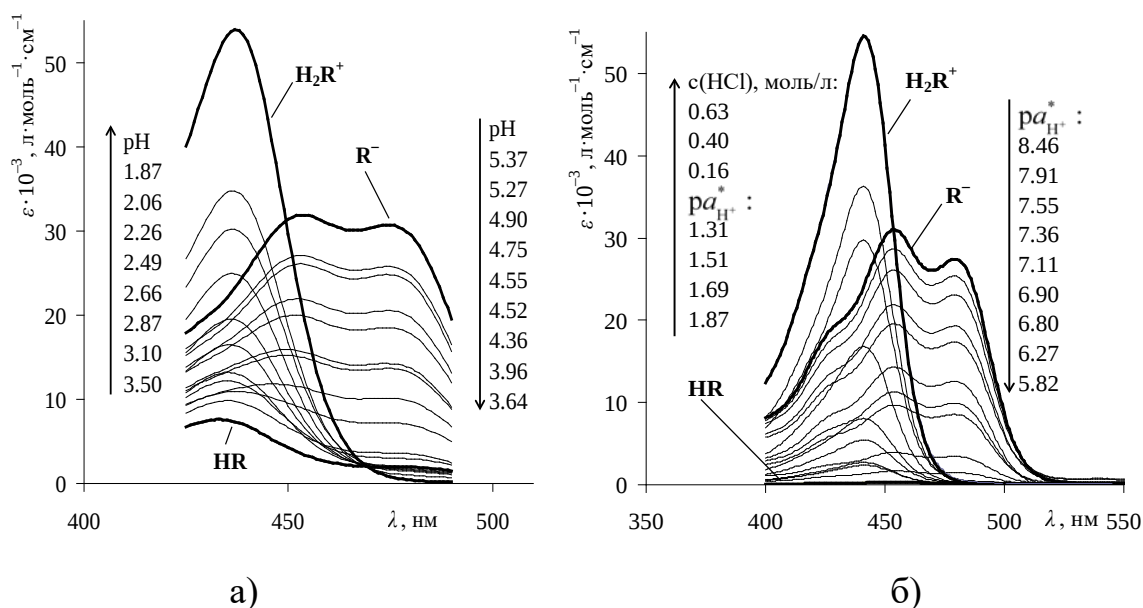


Рисунок 3.7 – Спектры поглощения растворов метилфлуоресцеина при различных значениях pH ($\text{p}K_{\text{H}^+}^*$) и индивидуальных форм красителя (жирные линии) в воде (а) и в смеси вода – этанол (50 % масс.) (б).

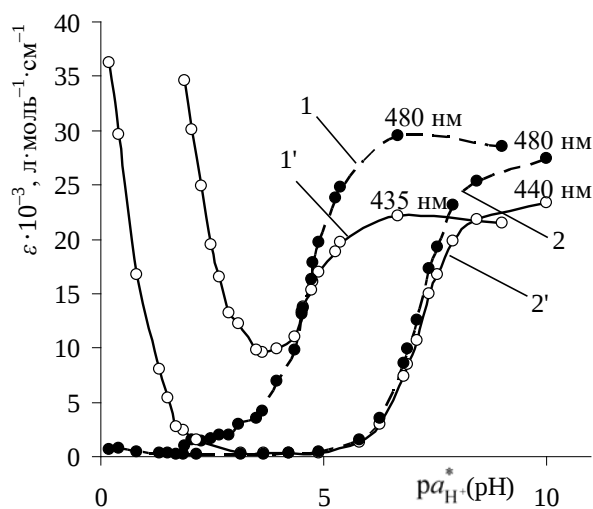


Рисунок 3.8 – Зависимости коэффициента молярного поглощения растворов метилфлуоресцеина от кислотности среды при различных длинах волн в воде (кривые 1, 1') и в смеси вода – этанол (50 % масс.) (кривые 2, 2').

протолитических равновесий флуоресцеина (рис. 1.2), т.к. дает основание пренебречь вкладом фенолятной и лактонной анионных таутомеров.

Присоединение одного протона к аниону этилфлуоресцеина также происходит по фенолятной группе (рис. 3.3). Однако значения pK_{a1} этого красителя меньше, чем pK_{a2} флуоресцеина и сульфифлуоресцеина. Разность, δpK_a , в воде составляет 0.48 [39, 98], а в водно-этанольной смеси достигает значения 0.89.

Такое усиление кислотных свойств группы ОН этилфлуоресцеина, по сравнению с соответствующими группам флуоресцеина и сульфифлуоресцеина, обусловлено отсутствием заряда на фталеовом фрагменте красителя. Количественно этот эффект выражается уравнением Бьеррума – Кирквуда – Вестхаймера [226]:

$$\delta pK_a = \frac{e^2 N_A}{2.303RT \cdot 4\pi \cdot 8.854 \cdot 10^{-12}} \cdot \frac{1}{D_{eff} r} \quad (3.1)$$

где e – элементарный заряд,

N_A – число Авогадро,

r – расстояние между заряженной и диссоциирующей группами,

D_{eff} – эффективная диэлектрическая проницаемость в пространстве между двумя группами в растворе.

При переходе от воды к смеси вода–этанол происходит увеличение разности $pK_{a1} - pK_{a0}$ от 2.76 до 6.93 единиц. Этот эффект, а также обесцвечивание нейтральной формы метилфлуоресцеина иллюстрируют рисунки 3.7 и 3.8. Подобное усиление кислотных свойств индикаторов зарядного типа 0/+ и снижение для индикаторов –/0 при переходе от воды к водно-органическим смесям наблюдается для многих соединений [39, 98]. Эта же тенденция наблюдается и для этилфлуоресцеина (для него значения pK_{a1} и pK_{a0} в воде равны 6.31 ± 0.03 и 2.97 ± 0.07 , соответственно [39]), однако разность

$pK_{a1} - pK_{a0}$ при переходе от воды к водному этанолу увеличивается не столь резко (от 3.34 до 4.66). Причина этого заключается в том, что в случае первого красителя дополнительный вклад в значение $pK_{a1} - pK_{a0}$ дает стабилизация нейтральной формы за счет образования лактонного таутомера (подробнее этот вопрос изложен в подразделе 3.2), тогда как этилфлуоресцеин не способен к таутомерным превращениям, ввиду замены карбоксильной группы на сложноэфирную. В случае флуоресцеина разность $pK_{a1} - pK_{a0}$ также сильно увеличивается (от 2.31 до 5.88 [39]).

Форма спектров исследованных красителей (рис. 3.9) определяется в первую очередь строением их ксантеновой части: при наличии на ней отрицательного заряда спектр поглощения представляет собой интенсивную полосу с плечом в коротковолновой области, отстоящим от максимума на 30 – 35 нм. Положительный заряд на центральном атоме углерода соответствует полосе поглощения с максимумом в области 440 – 445 нм (в смеси вода – этанол), хиноидное строение ксантенового фрагмента обуславливает появление широкой полосы с несколькими максимумами в области 430 – 490 нм. Подобные эффекты для многих эфиров флуоресцеина достаточно подробно были изучены ранее [39, 44, 76, 82, 91, 227] и нашли в настоящей работе дополнительное экспериментальное подтверждение.

Сопоставление спектра нейтральной формы диметилфлуоресцеина со спектром моноаниона метилфлуоресцеина подтверждает эту закономерность: максимумы полос красителей с одинаковым строением ксантеновой части сдвинуты на 3–5 нм в сторону меньших длин волн, если их карбоксильная группа диссоциирована. Совпадение величин $\lambda_{\max}$ молекул диметилфлуоресцеина, этилфлуоресцеина и 6-гидрокси-9-фенилфлуорона ($\lambda_{\max} = 457, 485$ нм, [39]), а также анионов метилфлуоресцеина и флуоресцеина ($\lambda_{\max} = 455$ нм, [39]) тоже свидетельствует в пользу этого утверждения.

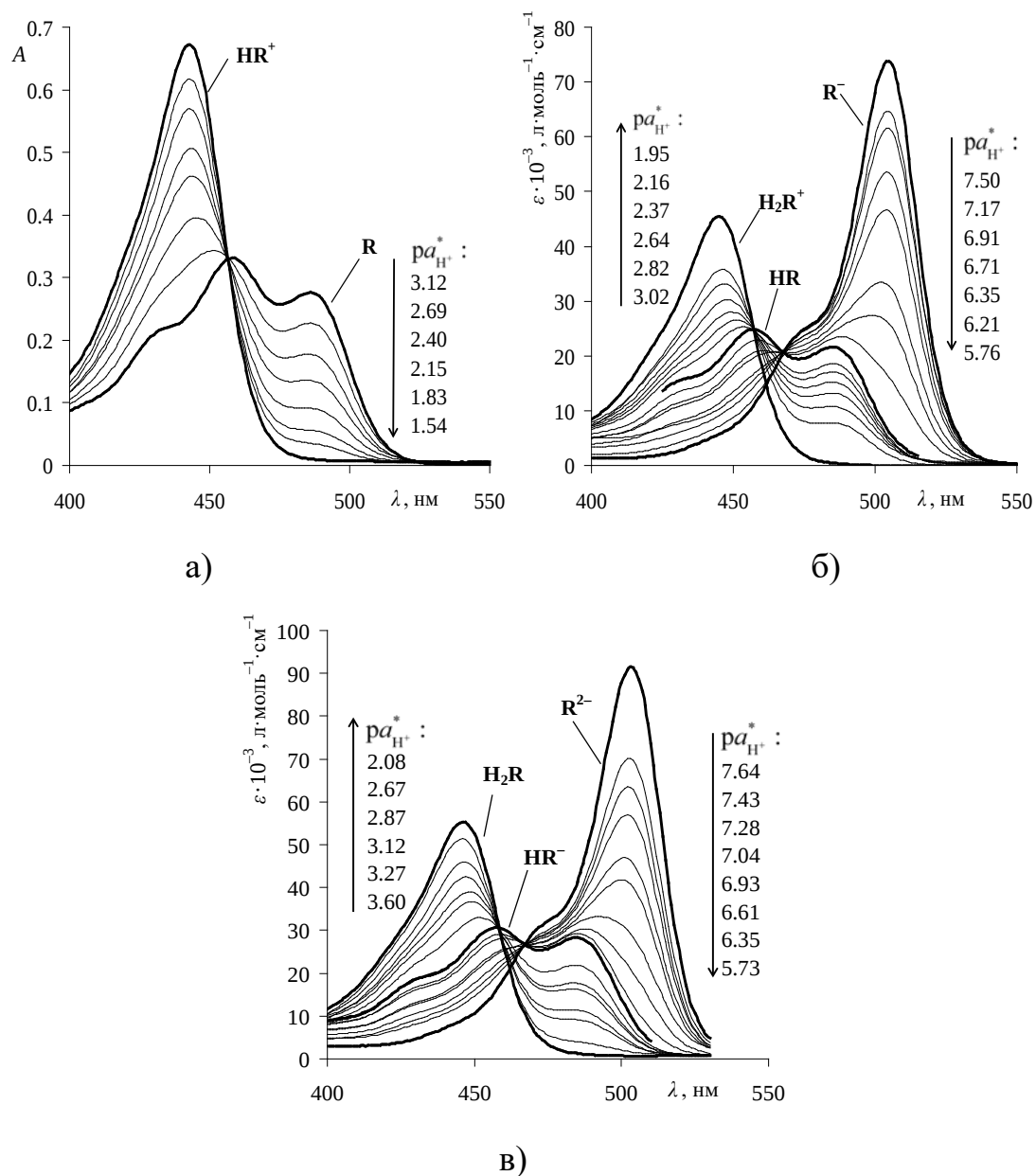


Рисунок 3.9 — Спектры поглощения растворов диметилфлуоресцеина (а), этилфлуоресцеина (б) и сульфифлуоресцеина (в) при различных значениях $pK_{H^+}^*$ и индивидуальных форм красителей (жирные линии) в смеси вода – этанол (50 % масс.).

Так как значения pK_a для разных красителей соответствуют диссоциации различных функциональных групп, а в случае метилфлуоресцеина являются комбинацией соответствующих микроконстант, для последующего анализа данных целесообразно оценить константы таутомерных равновесий, а также доли таутомеров метилфлуоресцеина в различных растворителях.

3.2 Таутомерия метилфлуоресцеина в различных растворителях

3.2.1 Таутомерные превращения метилфлуоресцеина в воде и в смеси вода – этанол с массовой долей спирта 50 %

Согласно предполагаемой схеме таутомерных равновесий метилфлуоресцеина (рис. 3.1), нейтральная форма красителя представлена в виде смеси трех таутомеров. Моноанион теоретически может существовать как хиноидный Q^- или как бесцветный лактонный таутомер L^- . Однако появление последней частицы в заметных количествах в воде или водно-этанольной среде кажется маловероятным, если учесть, что интенсивность полосы поглощения моноаниона практически совпадает с интенсивностью полос красителей, не образующих лактонные структуры (таблица 3.1). Поэтому в дальнейших расчетах, для водных и водно-этанольных сред равновесие $Q^- \rightleftharpoons L^-$ не учитывалось.

Анализ спектров нейтральной формы метилфлуоресцеина в водных растворах существует преимущественно в виде цвиттерионной, $HZ^\pm$, а также меньшего количества хиноидной формы, HQ , красителя (рис. 3.10). Подчеркнем, что максимум поглощения нейтральной формы (430 нм) также меньше чем значение λ_{max} катиона H_2R^+ (434 нм). Это подтверждает наличие группы COO^- на фталеовом фрагменте частицы $HZ^\pm$.

В водно-этанольной среде полоса поглощения молекулы метилфлуоресцеина малоинтенсивна (рис. 3.10), что является следствием стабилизации лактонного таутомера, типичной для флуоресцеиновых красителей в водно-органических смесях [39, 112, 113, 228]. Кроме того, отсутствие

максимума в области 430 нм свидетельствует об уменьшении доли цвиттерионного таутомера.

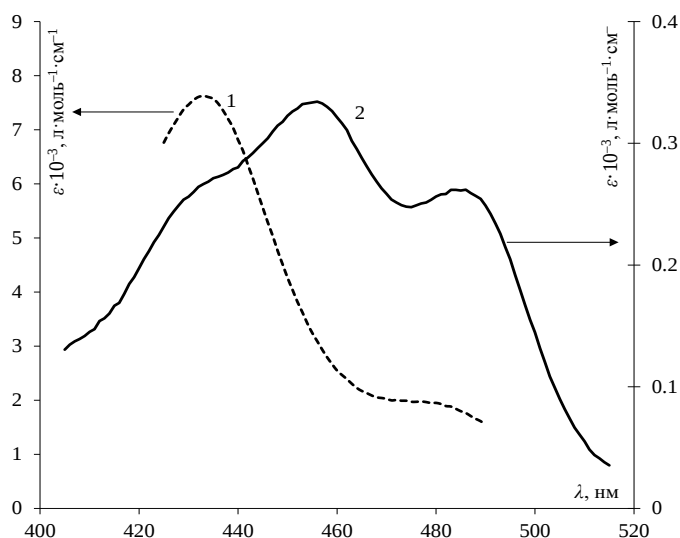


Рисунок 3.10 – Спектры поглощения нейтральных форм метилфлуоресцеина в воде (1) и в смеси вода – этанол (50 % масс.) (2).

Исходя из спектра нейтральной формы **HR**, можно количественно определить мольные доли таутомеров нейтральной формы метилфлуоресцеина, α_i .

$$\varepsilon_{\text{HR}} = \alpha_{\text{HZ}^{\pm}} \varepsilon_{\text{HZ}^{\pm}} + \alpha_{\text{HQ}} \varepsilon_{\text{HQ}} \quad (3.2)$$

$$\alpha_{\text{HZ}^{\pm}} + \alpha_{\text{HQ}} + \alpha_{\text{HL}} = 1 \quad (3.3)$$

Процедура расчетов аналогична подходу, применявшемуся ранее для флуоресцеина и его аналогов [110, 140, 149, 229–231]. При этом учитывалось, что лактонный таутомер не поглощает в видимой области и протонирование карбоксилатной группы, находящейся на несопряженном с ксантеновым хромофором фрагменте, незначительно влияет на форму спектра поглощения красителя, вызывая лишь батохромный сдвиг на 5 нм. Это позволило смоделировать спектры частиц **HZ[±]** и **HQ** спектром катионной, **H₂R⁺**, и анионной формы, **R⁻**, соответственно.

Далее, исходя из рассчитанных значений α_i , вычислялись показатели микроконстант [39], которые связаны с константами диссоциации по уравнениям (3.4) – (3.7).

$$pk_{0,OH} = pK_{a0} + \lg \left\{ 1 + \frac{\alpha_{HL}}{\alpha_{HQ}} + \frac{\alpha_{HZ^+}}{\alpha_{HQ}} \right\} \quad (3.4)$$

$$pk_{\pm,COOH} = pK_{a0} + \lg \left\{ 1 + \frac{\alpha_{HL}}{\alpha_{HZ^+}} + \frac{\alpha_{HQ}}{\alpha_{HZ^+}} \right\} \quad (3.5)$$

$$pk_{1,COOH} = pK_{a1} - \lg \left\{ 1 + \frac{\alpha_{HL}}{\alpha_{HQ}} + \frac{\alpha_{HZ^+}}{\alpha_{HQ}} \right\} \quad (3.6)$$

$$pk_{1,Z} = pK_{a1} - \lg \left\{ 1 + \frac{\alpha_{HL}}{\alpha_{HZ^+}} + \frac{\alpha_{HQ}}{\alpha_{HZ^+}} \right\} \quad (3.7)$$

Как видно из таблицы 3.2, сделанные ранее качественные выводы о таутомерном составе нейтральной формы подтверждаются расчетами мольных долей таутомеров и показателей микроконстант. Отметим, что для флуоресцеина в водных растворах значения $\alpha_{H_2Z^+}$, α_{H_2Q} и α_{H_2L} равны 0.22, 0.11 и 0.67, соответственно [39]. В 50 %-ной смеси вода–этанол у флуоресцеина также значительно уменьшается доля цвиттерионного таутомера, а $\alpha_{H_2L} = 0.967$ [39, 110, 230]. Следовательно, у метилфлуоресцеина способность к образованию лактона выражена в большей степени.

Таблица 3.2

Показатели микроконстант метилфлуоресцеина в воде и в смеси вода – этанол (50 % масс.)

Среда	α_{HZ^+}	α_{HQ}	α_{HL}	$pk_{1,COOH}$	$pk_{1,Z}$	$pk_{0,OH}$	$pk_{\pm,COOH}$
Вода	0.11	0.06	0.83	3.48	3.78	3.19	2.89
Вода – этанол	≈ 0	0.01	0.99	5.40	—	2.31	—

Для оценки мольной доли цвиттерионной формы метилфлуоресцеина в водном этаноле скомбинируем уравнения (3.6) и (3.7), получив выражение (3.8):

$$pK'_T = \frac{\alpha_{\text{HZ}^+}}{\alpha_{\text{HL}}} = pk_{1,Z} - pk_{1,\text{COOH}} \quad (3.8)$$

Принимая во внимание, что величина $pk_{1,Z}$ метилфлуоресцеина приблизительно равна значению pK_{a1} сульфифлуоресцеина, делаем вывод, что $pK'_T = -2.18$. Это означает, что мольная доля лактонного таутомера приблизительно в 150 раз превышает мольную долю цвиттерионного.

Сопоставляя схемы, изображенные на рисунках 1.2 и 3.1, легко заключить, что для флуоресцеина и метилфлуоресцеина микроконстанты с одинаковыми индексами соответствуют равновесиям диссоциации одних и тех же функциональных групп. Следовательно, в одинаковых растворителях их показатели не должны сильно отличаться друг от друга. Это действительно наблюдается в нашем случае (см. табл. 3.2 и 4.7). В 51%-ном водном этаноле величины $pk_{1,\text{COOH}}$ и $pk_{0,\text{OH}}$ флуоресцеина составляют 5.38 и 2.41, соответственно [39].

Исключение составляют значения $pk_{0,\text{OH}}$ и $pk_{1,Z}$, для которых имеет значение статистический фактор, обусловленный наличием двух эквивалентных гидроксильных групп на ксантеновом фрагменте флуоресцеина. Вследствие этого показатели микроконстант этого красителя должны быть на $\lg 2 = 0.301$ единиц больше, чем содержащего одну гидроксильную группу метилфлуоресцеина. Однако величина $pk_{0,\text{OH}}$ метилфлуоресцеина, 2.31, и pK_{a0} диметилфлуоресцеина, 2.28, все же не сильно отличаются от значения $pk_{0,\text{OH}}$ флуоресцеина, 2.41. Это можно объяснить влиянием метоксигруппы, ксантенового фрагмента простых эфиров флуоресцеина, которое способствует небольшому сдвигу равновесия в более кислую область. Увеличение кислотности группы OH метилфлуоресцеина

может облегчать образование лактонного анионного таутомера в некоторых диполярных апротонных растворителях. Аналогичное явление зафиксировано, например, в случае метилового эфира красителя бенгальского розового Б, который содержит атомы Br и I в орто-положении относительно гидроксильной группы [77].

Учитывая это обстоятельство, необходимо проверить допущения об отсутствии моноаниона-лактона в различных средах. Эти наблюдения будут полезны еще и для косвенного доказательства уточнения таутомерного состава моноаниона флуоресцеина, т.к. выход этой формы существенно меньше 100 % даже в воде, и определение спектра моноаниона сопряжено со значительной неопределенностью.

3.2.2 Оценка возможности образования моноаниона-лактона в растворителях различных типов

Так как все лактонные таутомеры флуоресцеиновых красителей, за исключением нитропроизводных, бесцветны, наличие их можно зафиксировать по значительному снижению интенсивности полосы поглощения. Были измерены спектры поглощения депротонированных метилфлуоресцеина и диметилфлуоресцеина в растворителях различных типов при одинаковой концентрации красителей (рис. 3.11).

Как видно из рисунка, интенсивность полосы метилфлуоресцеина остается постоянной лишь в воде и низших спиртах и снижается на 40 % в ацетоне. Форма полосы сильно зависит от природы растворителя. Для диметилфлуоресцеина, не способного образовывать лактонные таутомеры, эти различия выражены слабее: происходит лишь 20 %-ное снижение интенсивности при переходе от водно-этанольного растворителя к ацетону. Однако в обоих случаях эти различия могут быть обусловлены сольватохромными эффектами. Поэтому были применены альтернативные методы установления структуры депротонированной формы диметилфлуоресцеина: ИК- и ЯМР-спектроскопия.

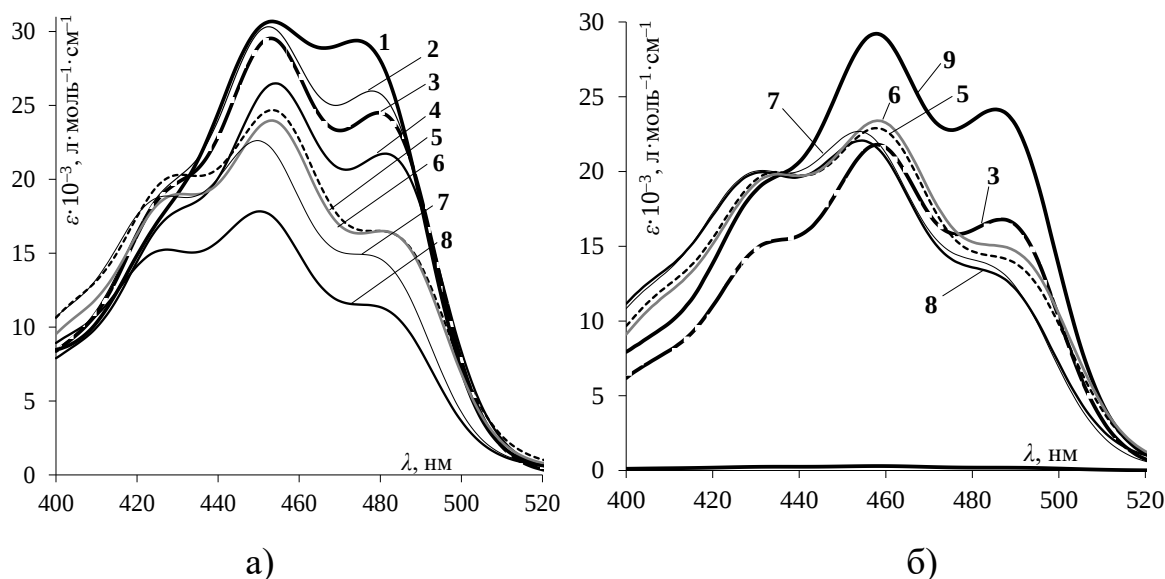
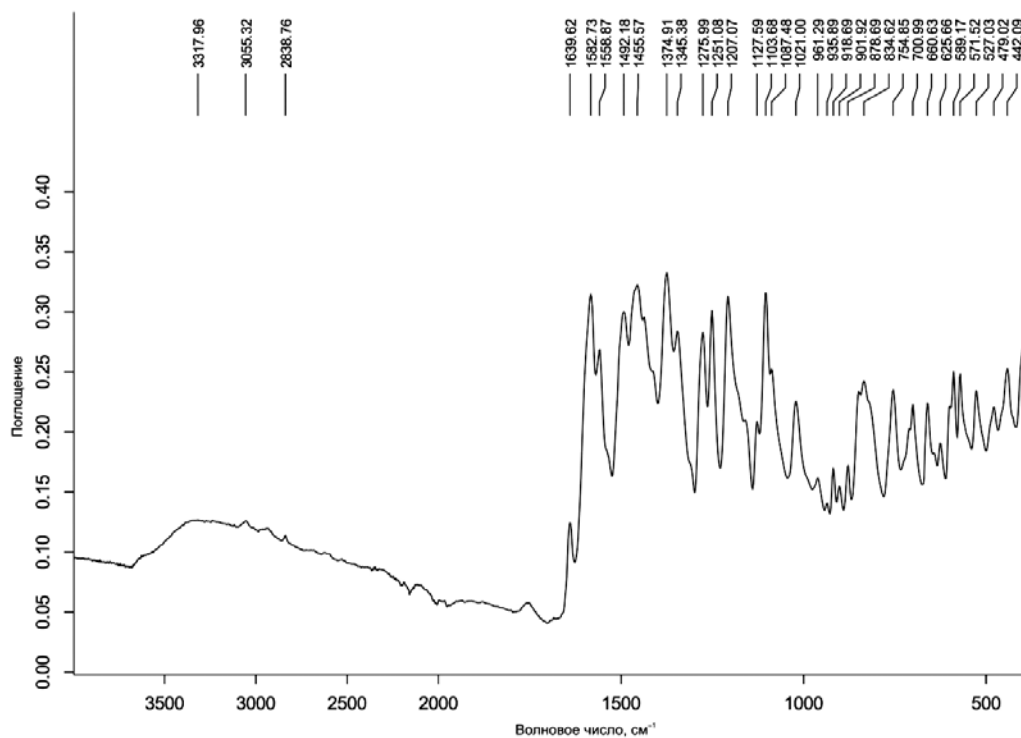


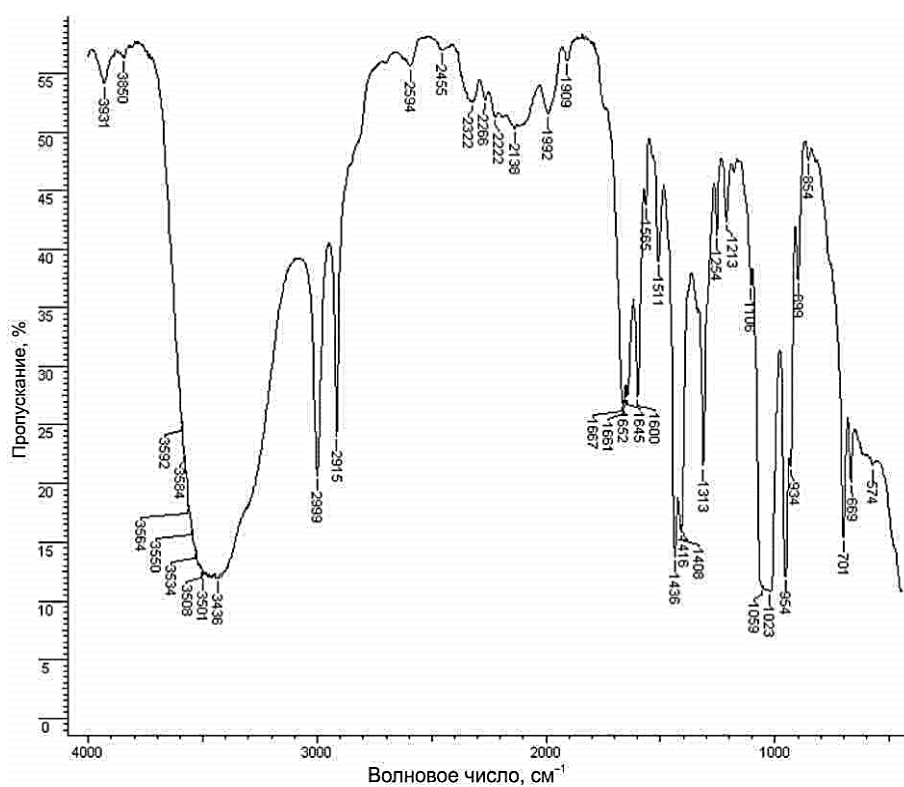
Рисунок 3.11 – Спектры поглощения депротонированных форм метилфлуоресцеина (а) и диметилфлуоресцеина (б) в воде (1), метаноле (2), этаноле (3), бутаноле (4), дихлорметане (5), ДМСО (6), ацетонитриле (7), ацетоне (8) и в смеси вода – этанол (50 % масс.) (9). Растворы 1–7 и 9 содержат 1 об. % ацетона.

Для достижения этой задачи была выделена натриевая соль метилфлуоресцеина. В твердом состоянии, также как и в растворе в ДМСО, в ИК-спектре этого соединения слабо выражена полоса, соответствующая колебаниям связи $C=O$ (рис. 3.12), которая отчетливо проявляется в растворе нейтральной формы метилфлуоресцеина при 1756 см^{-1} (рис. 3.13). При добавлении к раствору нейтральной формы метилфлуоресцеина твердого $NaOH$ интенсивность этой полосы значительно снижается. Отметим, что растворы метилфлуоресцеина в ДМСО практически бесцветны, что свидетельствует о полном превращении частицы **HR** в лактонную форму.

В ^{13}C ЯМР-спектре натриевой соли метилфлуоресцеина не наблюдался сигнал одного атома карбона. Дополнительные исследования с применением методов двумерной корреляционной спектроскопии: HSQC (гетероядерной одноквантовой корреляционной спектроскопии, Heteronuclear Single Quantum Coherence) и HMBC (гетероядерной корреляционной спектроскопии через



а)



б)

Рисунок 3.12. – ИК-спектры натриевой соли метилфлуоресцеина в твердом состоянии (а) и раствора красителя в ДМСО (б).

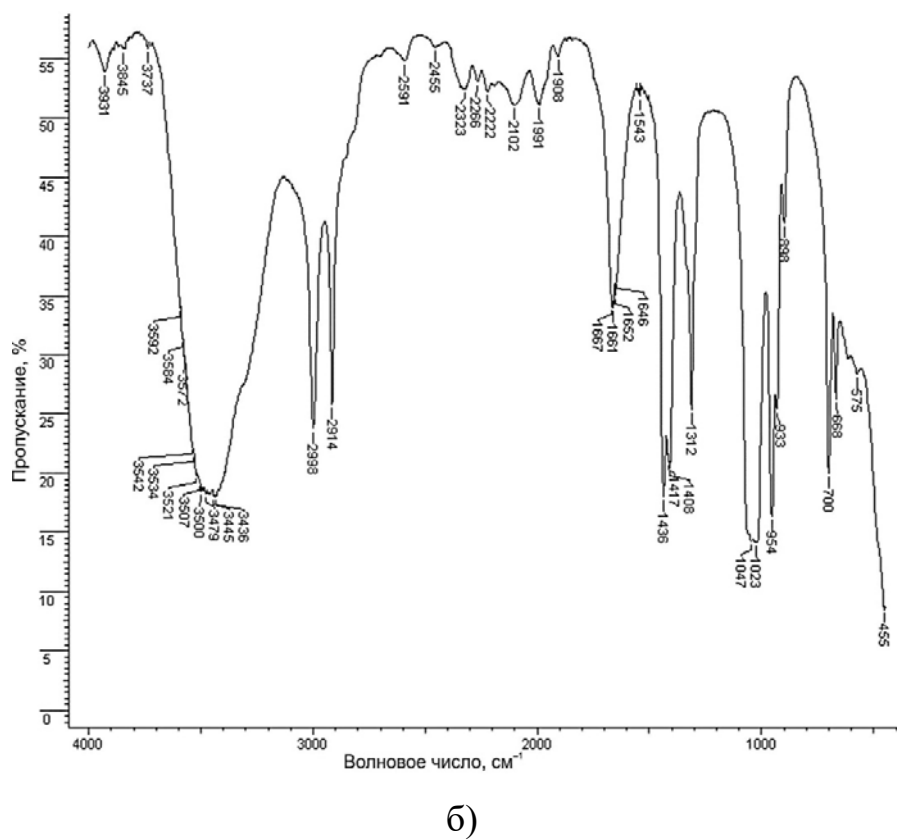
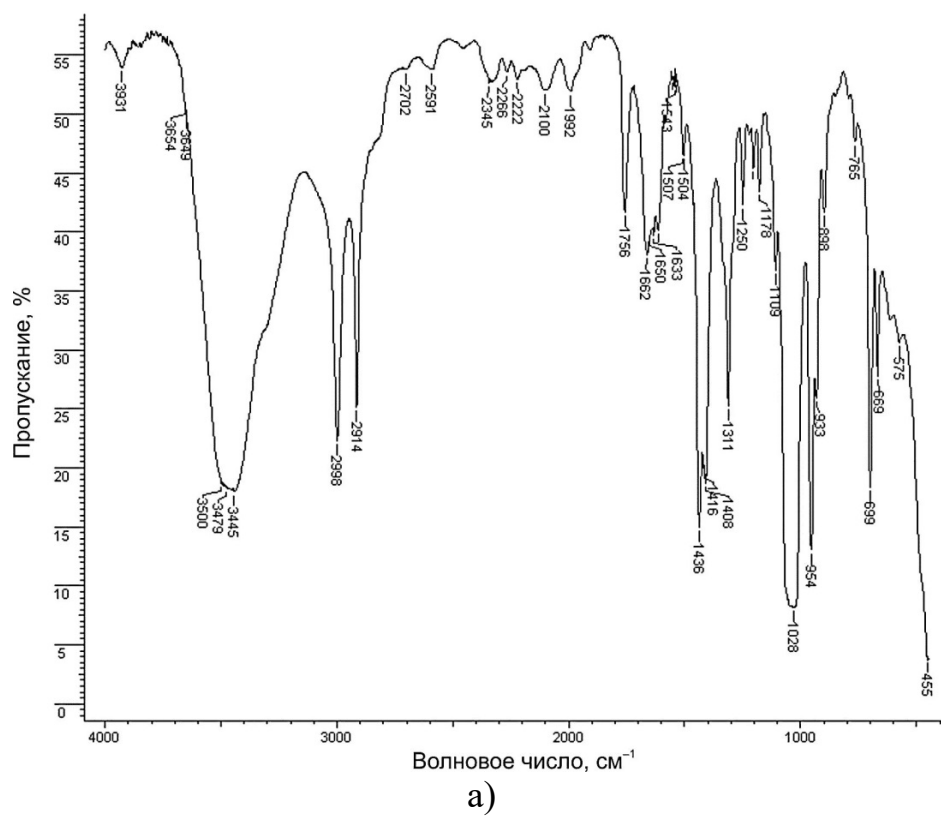


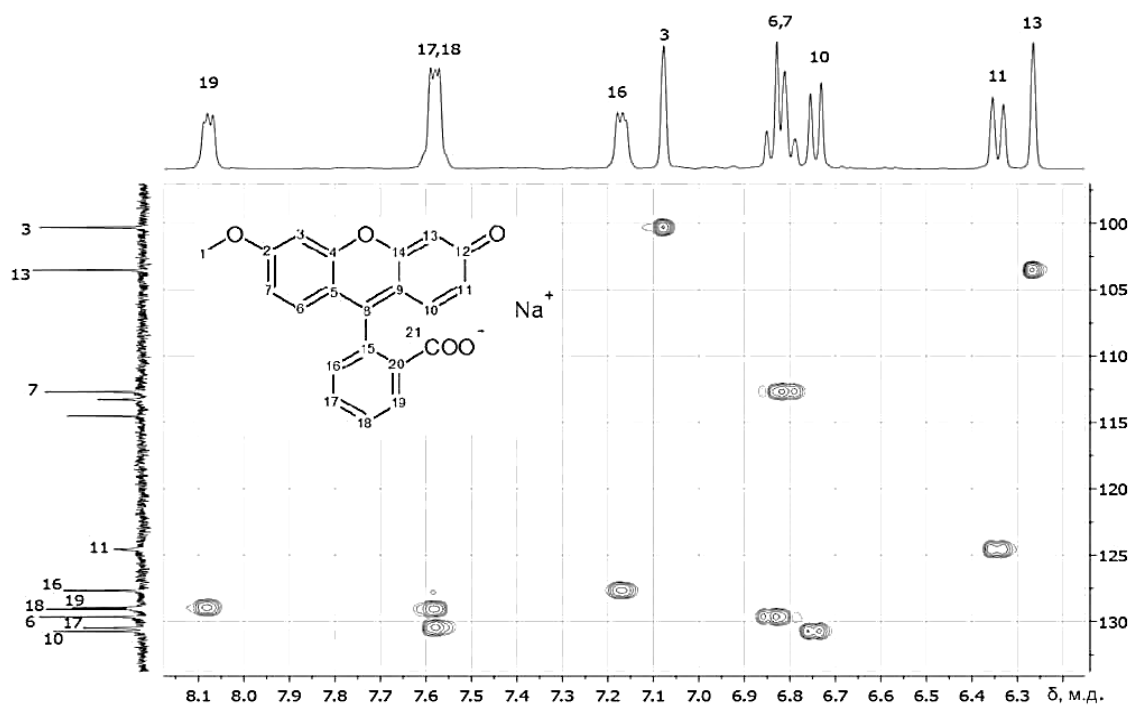
Рисунок 3.13 – ИК-спектры раствора нейтральной формы метилфлуоресцеина ($c = 0.1$ моль/л) в ДМСО (а) и чистого растворителя (б).

несколько связей, Heteronuclear Multi-Bond Correlation) показали, что недостающий сигнал относится к центральному атому (рис. 3.14). Это означает, что в растворе существует равновесие между хиноидной и лактонной структурой метилфлуоресцеина. Последняя может быть как искомым моноанионом, так и продуктом неполного депротонирования красителя или гидролиза остаточным количеством воды в ДМСО, не удаленной при очистке или поглощенной из воздуха [232]. Для доказательства справедливости последнего утверждения к раствору нейтральной формы метилфлуоресцеина в ДМСО добавляли NaOH. Это приводило к появлению сигнала $\delta = 153.33$ м.д., соответствующего полному депротонированию красителя. Химический сдвиг этого сигнала согласуется с сигналом центрального атома углерода диметилфлуоресцеина ($\delta = 150.14$ м.д.).

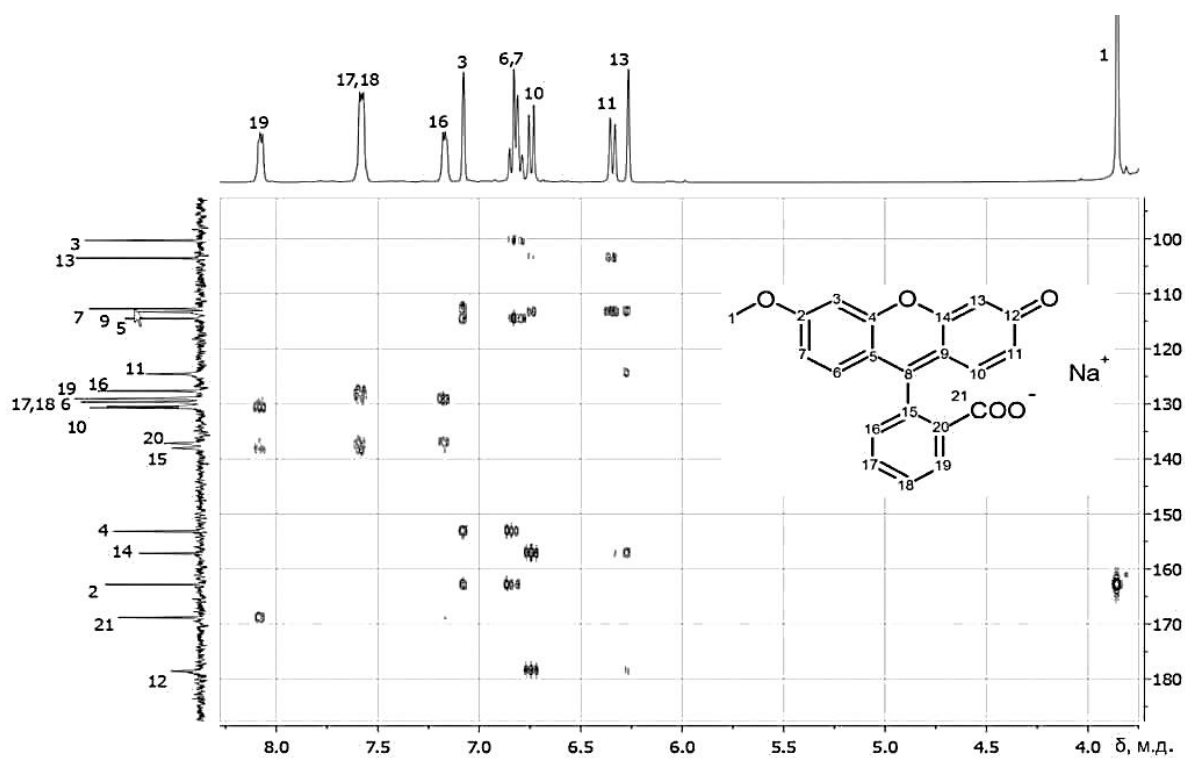
Добавление трифторуксусной кислоты к раствору соли метилфлуоресцеина приводит к восстановлению нейтральной лактонной структуры и появлению сигнала с химическим сдвигом 83.09 м.д. sp^3 -гибридного центрального атома углерода.

Отметим, что при добавлении избытка NaOH, вероятно, происходит разрушение ксантенового фрагмента, что приводит к появлению сигнала 72.63 м.д.

Таким образом, результаты ИК- и ЯМР-спектроскопии не дали подтверждения существования лактонного анионного таутомера L^- метилфлуоресцеина в растворах в ДМСО. Следовательно, вывод об отсутствии аналогичного таутомера можно распространить и на исходное соединение флуоресцеин, для которого прямое измерение спектров моноаниона невозможно.



а)

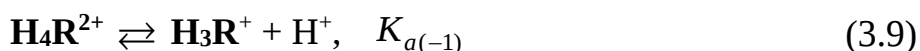


б)

Рисунок 3.14 – HSQC- (а) и HMBC-спектры (б) натриевой соли метилфлуоресцеина в дейтерированном ДМСО.

3.3 Протолитические свойства 4'- и 5'-аминофлуоресцеина в воде и в водно-этанольной смеси (50 % масс.)

Протолитические равновесия более сложных красителей были рассмотрены нами на примере двух изомеров аминафлуоресцеина, содержащих во фталеовом фрагменте группу NH_2 в мета- или пара- положении по отношению к ксантеновому фрагменту. Благодаря наличию дополнительной группы, способной протонироваться, к трем равновесиям аналогичной схемы флуоресцеина (уравнения (1.1) – (1.3)) добавляется четвертое (уравнение (3.9)), а количество таутомеров резко увеличивается.



На рисунке 3.15 представлены все возможные таутомеры красителей, полученные в результате комбинирования протонированных и депротонированных кислотно-основных центров. Принимая во внимание относительную кислотную силу этих групп, можно заключить, что в водных растворах существование некоторых из них (например, $(\text{H}_2\text{X}^+)^0$ или L^{2-}) маловероятно. Но все же вопрос относительно таутомерного состава весьма сложен. Заметим, что некоторые таутомеры могут присутствовать в растворе в малых количествах, поэтому такие методы идентификации структуры соединений как ЯМР- и ИК-спектроскопия оказываются малополезными. Более чувствительным является спектрофотометрический метод, на основании которого, а также анализируя свойства модельных соединений, можно сделать полуколичественные выводы относительно преобладания того или иного таутомера.

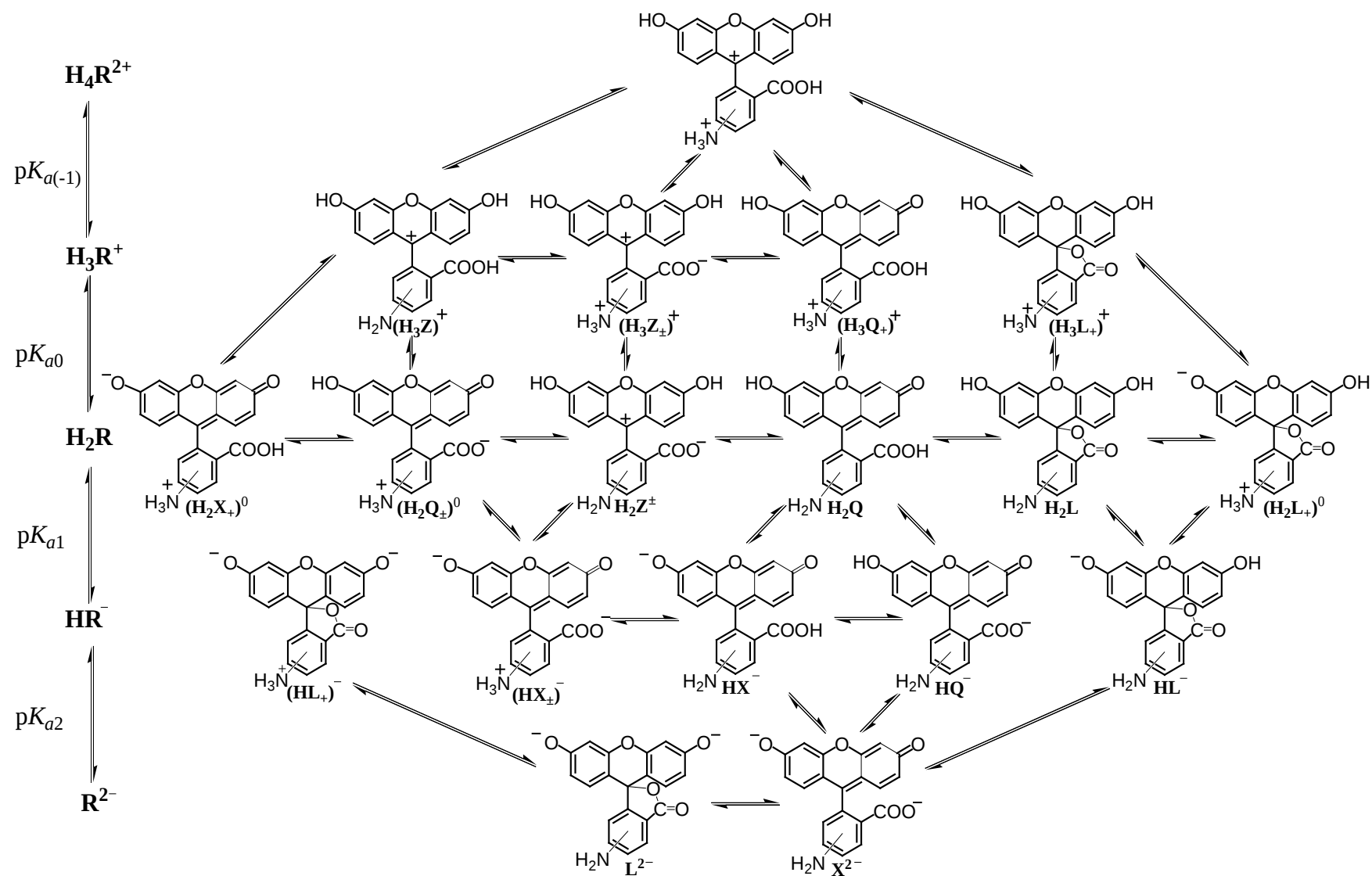


Рисунок 3.15 – Возможные протолитические равновесия 4'- и 5'-аминофлуоресцеина в растворах (нижний индекс в обозначениях отражает состояние фталевого фрагмента).

При обработке спектрофотометрических данных в общем случае ставится задача рассчитать совместно четыре значения pK_a и спектры поглощения трех промежуточных форм аминифлуоресцеинов. При этом следует учесть сложную структуру спектров поглощения индивидуальных форм флуоресцеинов, наложение и низкую интенсивность некоторых из них, а также значительное сближение констант ионизации в неводных и организованных средах [231]. Поэтому важно верифицировать процедуру расчета путем сравнения нескольких наиболее распространенных методов.

3.3.1 Анализ подходов к обработке спектрофотометрических данных при расчете ступенчатых констант ионизации трех- и четырехосновных красителей

Большинство методов, применяемых при обработке полученных спектрофотометрических данных, позволяют совместно рассчитать спектры ионных форм и константы ионизации красителей [118, 233–235]. Однако в некоторых случаях возникает задача оценить лишь спектры промежуточных форм, без привлечения информации о кислотности среды. В этом случае целесообразно применение методов независимого разложения спектров смеси на составляющие, позволяющих оценить спектры индивидуальных форм, исходя лишь из набора спектров поглощения смесей переменного состава [236, 237].

На начальном этапе методы тестировали с помощью модельных данных, полученных путем смешения спектров индивидуальных форм, исходя из известных констант ионизации, на которые были спроецированы указанные ранее особенности трех- и четырехосновных флуоресцеиновых красителей. Кроме того, путем внесения погрешностей, распределенных по закону Лапласа, была учтена возможность появления грубых промахов. При этом оценивалось различие между полученными оценками и исходными параметрами. Далее процедуры расчета были применены к реальным экспериментальным данным – водным растворам флуоресцеина и аминифлуоресцеина.

Модельные данные представлены в виде матрицы размера $m \times n$, в которой объединены спектры m смесей индивидуальных форм переменного состава трех- и четырехосновного красителей (флуоресцеина и аминифлуоресцеина, соответственно) при n длинах волн. Матрицу генерировали, исходя из заданных значений оптического поглощения ионных форм и pK_a . При фиксированной длине волны поглощение раствора четырехосновного красителя вычисляли по уравнению (3.10). Для трехосновного красителя уравнение аналогично.

$$A = \frac{A_{H_4R^{2+}} h^4 + A_{H_3R^+} h^3 K_{a(-1)} + A_{H_2R} h^2 K_{a(-1)} K_{a0} + A_{HR^-} h K_{a(-1)} K_{a0} K_{a1} + A_{R^{2-}} K_{a(-1)} K_{a0} K_{a1} K_{a2}}{h^4 + h^3 K_{a(-1)} + h^2 K_{a(-1)} K_{a0} + h K_{a(-1)} K_{a0} K_{a1} + K_{a(-1)} K_{a0} K_{a1} K_{a2}} \quad (3.10)$$

где $A_{H_4R^{2+}}$, $A_{H_3R^+}$, A_{H_2R} , A_{HR^-} , $A_{R^{2-}}$ – поглощения соответствующих индивидуальных форм,

$$h = 10^{-pH} \text{ или } 10^{-pK_{H^+}^*}.$$

В качестве исходных спектров поглощения, вообще говоря, можно выбрать любые кривые, например, представляющие собой линейную комбинацию кривых Гаусса. Однако в настоящей работе, чтобы приблизить модельные данные к реальным исследуемым системам, использовали спектры индивидуальных форм флуоресцеина и 4'-аминофлуоресцеина (рис. 3.16) рассчитанные из экспериментальных данных с использованием CLINP.

Значения pK_{a2} , pK_{a1} , pK_{a0} и $pK_{a(-1)}$ принимались равными 5.0, 4.5, 2.0 и 1.5 соответственно. Такие величины приблизительно соответствуют экспериментальным значениям pK_a флуоресцеиновых красителей в водных и водно-органических средах [231]. В значения pH, а также в спектры поглощения методом обратной функции вносились погрешности, распределенные по нормальному закону (**G**) или по закону Лапласа (**L**), характеризующиеся нулевым средним, стандартным отклонением 0.01.

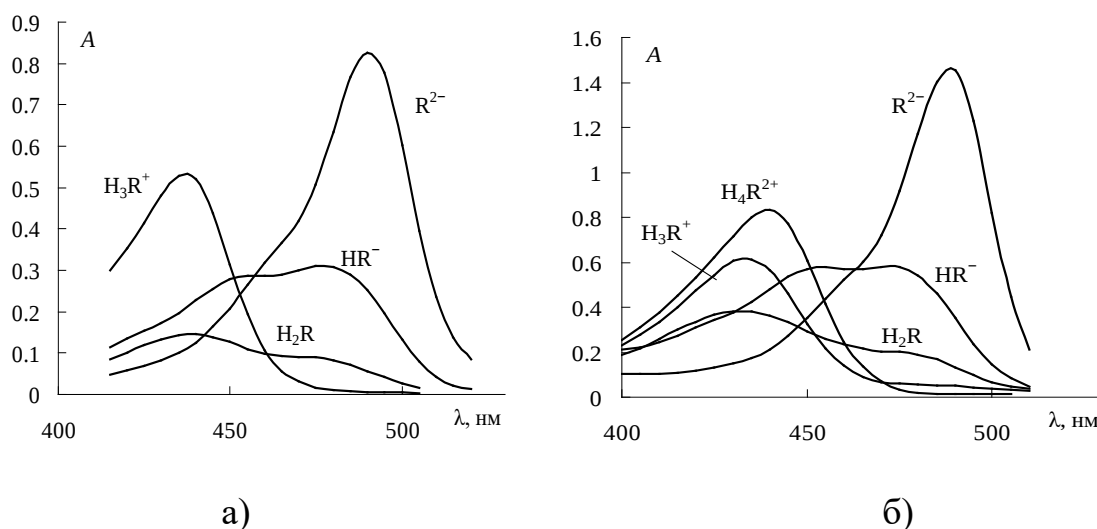


Рисунок 3.16 – Исходные спектры поглощения трехосновного (а) и четырехосновного красителя (б), используемые для создания массива модельных данных.

Значения рассчитанных показателей констант ионизации красителей, а также их стандартные отклонения (в скобках) представлены в таблице 3.3. Для сравнения качества оценки разными методами констант и спектров ионных форм сопоставляли значения поглощения, оцененные из рассчитанных параметров $A_{i,calc}$, с исходными значениями $A_{i,obs}$, вычисляя величину χ^2 :

$$\chi^2 = \sum_i \frac{(A_{i,calc} - A_{i,obs})^2}{A_{i,obs}} \quad (3.11)$$

Расчет констант ионизации по методу Тамера – Фойгта [238] основан на анализе зависимостей поглощения от pH раствора, имеющих экстремум. Данный метод не требует применения специального программного обеспечения, не является итерационным и позволяет вычислить значения двух достаточно близких констант ионизации. Однако при сильном сближении констант ионизации флуоресцеинов или интенсивности полос поглощения ионных форм, когда экстремум зависимости $A = f(\text{pH})$ выражен слабо, использование этого метода

Таблица 3.3

Показатели констант ионизации красителей, рассчитанные с использованием разных расчетных методов

Метод	Трехосновный краситель (флуоресцеин, Фл)						Четырехосновный краситель (аминофлуоресцеин, АФл)					
	Фл- G (14×19) ¹		Фл- L (14×19)		Фл- Exp ² (20×19)		АФл- G (21×19)		АФл- L (21×19)		АФл- Exp ² (22×17)	
	pK_{ai} (σ)	χ^2	pK_{ai} (σ)	χ^2	pK_{ai} (σ)	χ^2	pK_{ai} (σ)	χ^2	pK_{ai} (σ)	χ^2	pK_{ai} (σ)	χ^2
Тамера - Фойгта	5.29 (0.68) 4.23 (0.68) 2.00 (0.10)	1.0	5.25 (0.56) 4.33 (0.56) 2.06 (0.08)	0.84	6.47 (0.37) 4.63 (0.37) 1.88 (0.05)	1.4	4.41 (0.21) 4.25 (0.21)	—	4.37 (0.12) 4.04 (0.12)	—	6.62 (0.25) 4.63 (0.25)	—
MCR- ALS	4.91 (0.018) 4.62 (0.027) 2.05 (0.013)	0.27	5.13 (0.012) 4.31 (0.020) 2.21 (0.014)	0.24	—	—	4.54 (0.006) 3.85 (0.014) 2.67 (0.019) 1.46 (0.015)	0.12	4.48 (0.006) 3.87 (0.012) 2.33 (0.020) 1.42 (0.019)	0.18	—	—
CLINP	4.72 (0.025) 4.68 (0.048) 1.98 (0.014)	0.10	5.20 (0.022) 4.40 (0.032) 2.07 (0.011)	0.060	6.69 (0.012) 4.25 (0.022) 2.14 (0.013)	0.17	4.55 (0.011) 3.91 (0.025) 1.97 (0.054) 1.60 (0.041)	0.071	4.47 (0.012) 3.91 (0.027) 2.05 (0.045) 1.27 (0.073)	0.088	6.60 (0.010) 4.81 (0.11) 3.50 (0.098) 2.09 (0.026)	0.12

¹ В скобках в этой строке дан размер исходной матрицы.² Экспериментальные данные.

может повлечь за собой значительные ошибки расчета. В исследуемых системах данный метод удалось применить лишь для расчета значений K_{a1} и K_{a2} красителей, пренебрегая при этом влиянием частиц H_4R^{2+} и H_3R^+ . При расчетах определяли положения максимумов 2 – 4 зависимостей при длине волны 430 – 450 нм. В случае флуоресцеина рассчитанное для изолированного равновесия (1.1) значение K_{a0} позволило вычесть вклад катиона H_3R^+ в поглощение нейтральной формы. Из рассчитанных констант ионизации вычисляли спектры моноаниона красителей.

Для определения спектров неизвестных форм, исходя лишь из спектров смесей переменного состава, в некоторых случаях прибегают к аппроксимации последних определенным набором кривых Гаусса [239]. В исследуемых системах, ввиду сложности полос поглощения, поставленная задача сводится к совместному определению 11 (для трехосновных) и 14 (для четырехосновных флуоресцеинов) неизвестных параметров для каждого спектра. Решить эту задачу для применяемого набора данных не представляется возможным.

Лучшие результаты можно ожидать при применении группы методов, основанных на методах факторного анализа или главных компонент [54, 95, 118, 240], которые также не требуют априорной информации о схеме ионных равновесий и о структуре спектров поглощения неизвестных форм.

На начальном этапе анализа с применением F-теста Малиновского [241, 242] было определено количество независимых компонент для каждой системы. Во всех случаях эта величина совпадала с количеством ионных и молекулярных форм, предсказанных схемой диссоциации. Это подтверждает адекватность применения методов факторного анализа для данных красителей. После линейного преобразования исходной матрицы исходных данных можно получить совокупность ортонормированных базисных векторов – «матрицу нагрузок», а также «матрицу счетов», содержащую проекции данных на базисные векторы. При вращении базисных векторов элементы двух последних матриц приобретают физический смысл концентраций ионных форм и их спектров. Был использован метод многофакторного разрешения кривых (multivariate curve resolution) с

использованием переменного метода наименьших квадратов (alternating least-squares) – MCR-ALS [243]. При расчетах для спектров поглощения и концентраций применялся алгоритм неотрицательных наименьших квадратов. Затем, зная спектры поглощения и мольные доли поглощающих частиц в смеси и используя значения pH для каждого раствора, рассчитывали константы ионизации и величину χ^2 .

В таблице 3.3 содержатся также оценки констант ионизации и спектров ионных форм, полученные с использованием программы CLINP [224]. Последний метод имеет преимущество перед остальными, так как его итерационная процедура предполагает одновременное определение всех искомых параметров. Это же является причиной значительного снижения значений χ^2 .

Полученные при обработке модельных данных показатели констант ионизации и спектры ионных форм можно сравнить с соответствующими исходными, «истинными» значениями. В спектрах поглощения наибольшие различия наблюдались в случае моноаниона **HR**[–] красителей (рис. 3.17).

Оценки pK_a модельных данных, сделанные по методу Тамера – Фойгта, в большей степени отличаются от исходных значений. Это проявляется также в рассчитанных спектрах поглощения. Спектр поглощения моноаниона **HR**[–] флуоресцеина, представленный кривой (1) на рисунке 3.17, отражает влияние примеси дианиона **R**^{2–}, для которого характерна интенсивная полоса с максимумом в области 490 нм. Аналогичные результаты дает расчет параметров для четырехосновного красителя. Оценки поглощения ионных форм по методу MCR-ALS удовлетворительно описывают модельные данные даже в случае четырехосновного красителя. Различия между рассчитанными и исходными значениями pK_a приблизительно одинаковы для подходов MCR-ALS и CLINP. Однако первый лучше воспроизводит форму спектра.

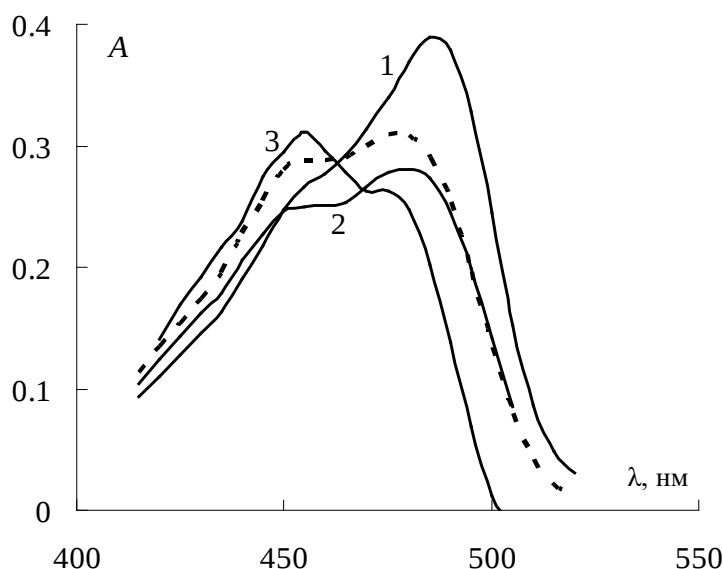


Рисунок 3.17 – Спектры поглощения моноаниона флуоресцеина, рассчитанные из модельных данных Фл-Г по методу Тамера – Фойгта (1), MCR-ALS (2) и с помощью программы CLINP (3). Пунктирной линией обозначен исходный спектр.

В случае экспериментальных данных вполне ожидаемо, что матричный подход, реализованный в программе CLINP, дает лучшие оценки искомых параметров, по сравнению с методом Тамера – Фойгта, о чем можно судить, сопоставляя стандартные отклонения этих величин и значения χ^2 . Попытка применить MCR-ALS для экспериментальных данных была неудачной, ввиду расхождения итерационного процесса. В дальнейшем для решения этой проблемы предполагается использование методов, более эффективно обеспечивающих сходимость. Следовательно, при расчете параметров многоступенчатых равновесий лучшие результаты дает комплексный подход, реализованный в программе CLINP.

3.3.2 Таутомерия аминфлуоресцеинов и спектральные характеристики их ионных и молекулярных форм в водных и водно-этанольных растворах

Наиболее характерные зависимости поглощения от кислотности среды для двух изомеров аминфлуоресцеина наблюдаются, как правило, при $\lambda = 430 - 450$ нм для двух равновесий в кислой области и $\lambda = 460 - 500$ нм – в области высоких pH (рис. 3.18). Можно видеть, что в водном этаноле наблюдается значительное обесцвечивание растворов в широком диапазоне значений pH^* , которое, как и в случае метилфлуоресцеина, обусловлено стабилизацией лактонного тауомера. Это означает, что можно достичь полного выхода нейтральной формы при $pH^* = 4.0 - 4.5$ и упростить расчеты, рассматривая равновесия (1.1) и (3.9) отдельно от равновесий (1.2) и (1.3). В водных растворах полного превращения в нейтральную форму не происходит, поэтому спектры формы H_2R были рассчитаны совместно с показателями констант и спектрами поглощения частиц H_3R^+ и HR^- . Результаты расчетов приведены на рисунке 3.19 и в таблице 3.4.

Совпадение значений pK_{a2} обоих аминфлуоресцеинов и флуоресцеина ($pK_{a2} = 6.8$ [39]) в водной среде означает, что в этой среде происходит протонирование ионов R^{2-} по фенолятной группе ксантенового фрагмента, который не сопряжен с остатком фталевой кислоты и, следовательно, не испытывает влияния аминогруппы. Это дает основание полагать, что диссоциация по уравнению (1.3) в водной среде тождественна равновесию: $X^{2-} \rightleftharpoons HQ^-$.

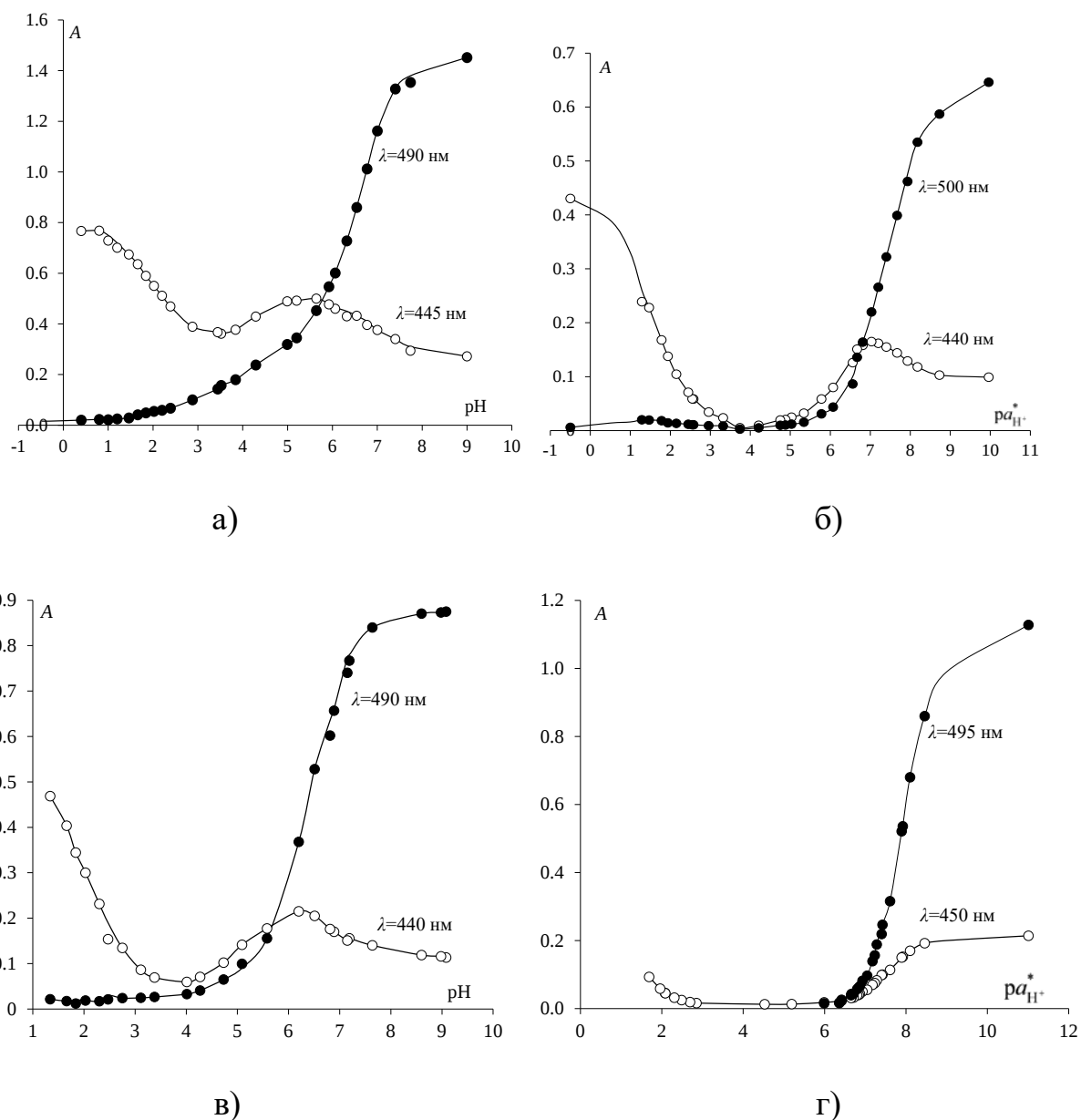
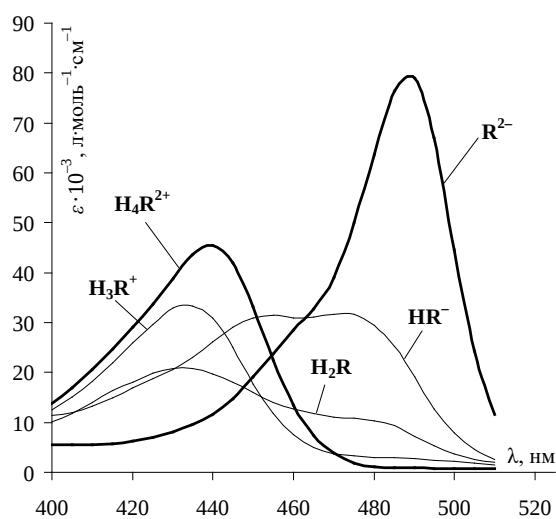
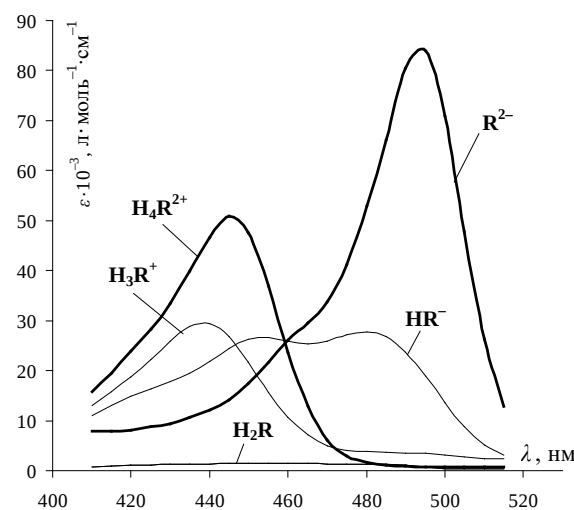


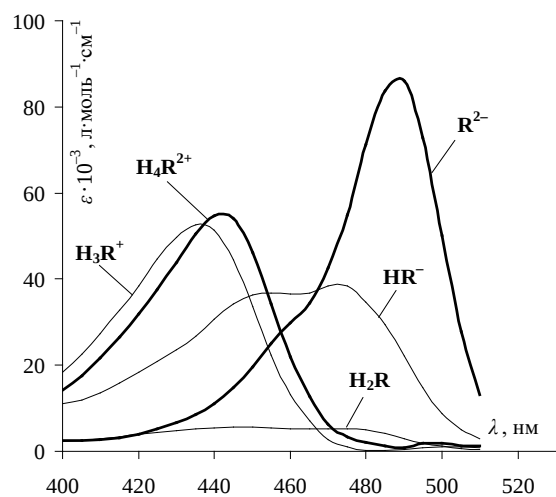
Рисунок 3.18 — Зависимости поглощения растворов 4'-аминофлуоресцеина (а, б) и 5'-аминофлуоресцеина (в, г) от кислотности среды при различных длинах волн в воде (а, в) и в смеси вода – этанол (50 % масс.) (б, г).



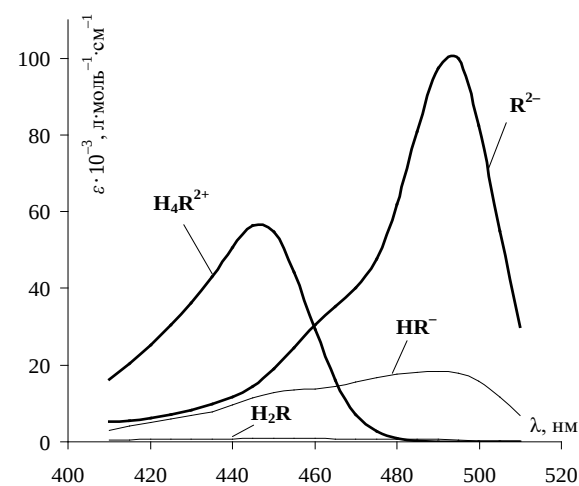
а)



б)



в)



г)

Рисунок 3.19 – Спектры поглощения индивидуальных ионных и молекулярных форм 4'-аминофлуоресцеина (а, б) и 5'-аминофлуоресцеина (в, г) в воде (а, в) и в смеси вода – этанол (50 % масс.) (б, г). Жирные линии соответствуют спектрам, полученным непосредственным измерением.

Таблица 3.4

**Спектральные характеристики ионных и молекулярных форм и показатели термодинамических констант
диссоциации изомеров аминифлуоресцеина в воде и смеси вода – этанол (50 % масс.)**

Краситель	Растворитель	$\lambda_{\max}$, нм ($\varepsilon_{\max} \cdot 10^{-3}$, л·моль ⁻¹ ·см ⁻¹)					pK_{a2}	pK_{a1}	pK_{a0}	$pK_{a(-1)}$
		R²⁻	HR⁻	H₂R	H₃R⁺	H₄R²⁺				
4'-аминофлуоресцеин	Вода	488 (79)	470–475 (31)	430–435 (21);	435 (33)	439 (45)	6.84±0.01	4.48±0.02	2.46±0.01	1.63±0.01
	Вода–этанол	493 (84)	455 (26); 480 (28)	455 (0.15); 475–480 (0.13)	440 (30)	445 (51)	8.08±0.01	6.46±0.02	1.73±0.06	0.08±0.14
5'-аминофлуоресцеин	Вода	488 (86)	470–475 (38)	445–450 (5.5) 470–475 (5.3);	435 (53)	440 (55)	6.80±0.02	5.67±0.03	1.93±0.06	1.27±0.15
	Вода–этанол	493 (100)	485–490 (18)	455 (0.85);	— ¹	445 (57)	8.46±0.01	7.55±0.01	0.78±0.17	— ¹

¹ Характеристику определить не удалось, вследствие смещения равновесия в сильноокислую область.

При переходе от воды к водному этанолу происходит сближение значений pK_{a2} и pK_{a1} и смещение соответствующих равновесий в щелочную область, величины pK_{a0} и $pK_{a(-1)}$, напротив, уменьшаются. Эти тенденции согласуются с имеющимися в литературе данными относительно влияния добавок спирта на диссоциацию органических кислот с точки зрения их зарядного типа [39, 98].

Для более подробной интерпретации влияния растворителя, и также аминогруппы на константы диссоциации индикаторов необходимо рассмотреть их таутомерные равновесия в изученных средах. При этом, по аналогии с другими флуоресцеинами (см. подраздел 3.2), предполагалось, что форма спектра поглощения зависит лишь от строения ксантеновой части. Лактонные таутомеры не окрашены, т.к. при наличии лактонного цикла центральный атом углерода переходит в состояние sp^3 -гибридизации, что приводит к разрушению системы сопряженных связей. Наличие заместителей во фталеовом фрагменте влияет лишь на положение спектра. Так, диссоциация карбоксильной группы флуоресцеина при неизменном строении ксантенового фрагмента приводит к небольшому сдвигу полосы поглощения в сторону меньших длин волн, по сравнению с полосой не содержащего группы COO^- аниона 6-гидрокси-9-фенилфлуорона [79]. В то же время у дианиона изотиоцианата флуоресцеина значение λ_{max} увеличивается на 2–3 нм, по сравнению с незамещенным флуоресцеином [39, 148].

Исходя из вышесказанного, можно утверждать, что изменения спектров поглощения, вызванные протонированием заместителей во фталеовом фрагменте, малы, поэтому получить достоверные оценки долей таутомеров на основании этих данных весьма затруднительно. Однако из спектрофотометрических данных можно все же сделать вывод о преобладании тех или иных таутомеров.

Как можно видеть на рисунке 3.15, дикатион, H_4R^{2+} , имеет лишь одну возможную структуру с четырьмя протонированными кислотно-основными центрами. Положительный заряд на ксантеновой части обуславливает наличие полосы поглощения, для которой значение λ_{max} не зависит от положения

аминогруппы и составляет 440 и 445 нм в воде и в водно-этанольной смеси, соответственно (рис. 3.19, табл. 3.4).

Форма спектра катиона, H_3R^+ , идентична форме полосы дикатиона, что говорит о положительном заряде на ксантеновом фрагменте, т.е. о существовании в растворе таутомеров $(\text{H}_3\text{Z})^+$ и $(\text{H}_3\text{Z}_{\pm})^+$. Гипсохромный сдвиг полосы относительно спектра дикатиона – результат депротонирования карбоксильной группы – позволяет сделать предположение о преобладании таутомера $(\text{H}_3\text{Z}_{\pm})^+$. Это может быть следствием влияния положительного заряда на центральном атоме углерода, который облегчает диссоциацию группы COOH . Образованию цвиттерионных таутомеров способствует высокая относительная диэлектрическая проницаемость растворителя. Действительно, согласно данным ЯМР-спектроскопии, для нейтральной формы 5'-аминофлуоресцеина в ДМСО протонирования аминогруппы не наблюдается.

Полезно также сопоставить свойства 4'- и 5'-аминофлуоресцеина и *m*- и *n*-аминобензойной кислоты, соответственно. Таутомерный состав нейтральной формы этих кислот изучался различными методами. Так, по данным ^{13}C ЯМР-спектроскопии, в водных растворах нейтральная форма *n*-аминобензойной кислоты состоит исключительно из молекулярного таутомера, тогда как ее *мета*-изомер представляет собой смесь молекулярного (41 %) и цвиттерионного (59 %) таутомеров [244]. Аналогичные выводы были сделаны, исходя из калориметрических измерений [245]. Другие авторы, основываясь на результатах спектрофотометрии в ультрафиолетовой области и значениях pK_a модельных веществ, рассчитали долю цвиттериона *m*-аминобензойной кислоты, которая в водных растворах составляет 19.4 % и значительно уменьшается при переходе к смесям вода–этанол [246]. Эти же закономерности зафиксированы также при переходе к хлороформу или диоксану [247].

Уменьшение коэффициента молярного поглощения формы H_3R^+ , по сравнению с H_4R^{2+} , может быть проявлением лактонного таутомера $(\text{H}_3\text{L}_+)^+$, доля которого больше в случае 4'-аминофлуоресцеина. Если пренебречь наличием хиноидной частицы $(\text{H}_3\text{Q}_+)^+$, и принять, что форма спектра частиц $(\text{H}_3\text{Z})^+$, $(\text{H}_3\text{Z}_{\pm})^+$

и H_4R^{2+} совпадает, то можно оценить долю лактонного катиона. Это значение составляет 25 и 41 % для 4'-аминофлуоресцеина в воде и в водном этаноле, соответственно, и 4 % для 5'-аминофлуоресцеина в воде.

Значительное обесцвечивание нейтральной формы, особенно в водно-этанольной смеси, свидетельствует об увеличении доли лактонного таутомера H_2L . Существование частицы $(\text{H}_2\text{L}^+)^0$ менее вероятно, если учесть относительно низкую силу ОН-группы. Исходя из формы спектра нейтральной формы (рис. 3.19, 3.20), можно констатировать уменьшение доли цвиттерийонного таутомера $\text{H}_2\text{Z}^\pm$ при переходе к водно-органическому растворителю.

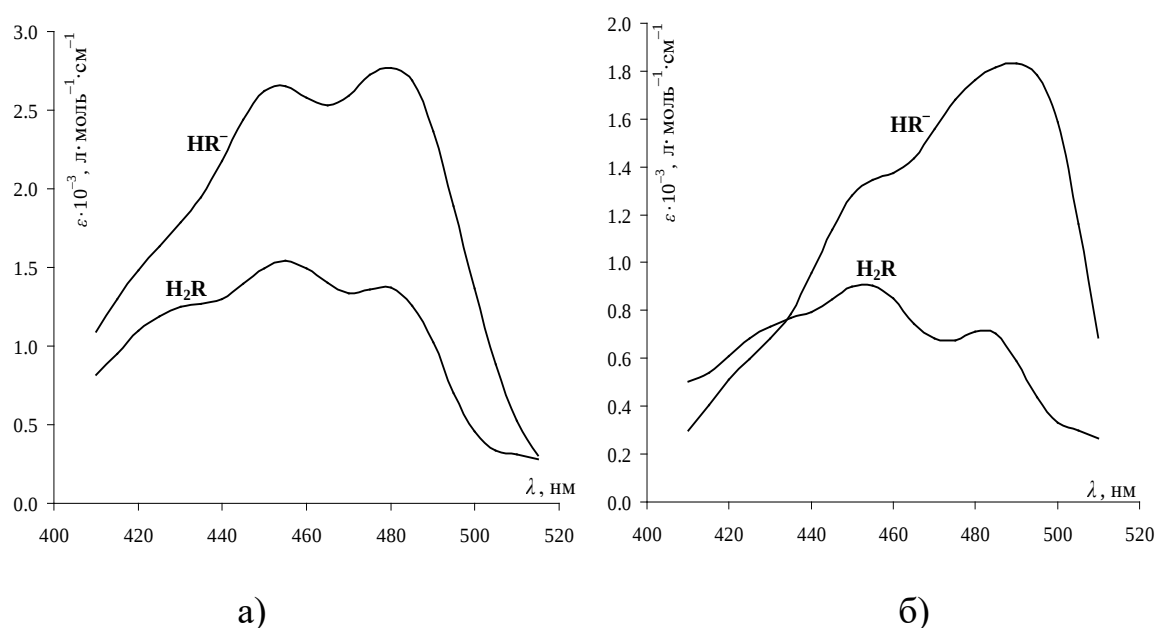


Рисунок 3.20 – Спектры поглощения нейтральной формы и моноаниона 4'-аминофлуоресцеина (а) и 5'-аминофлуоресцеина (б) в смеси вода – этанол. Значения коэффициента поглощения моноанионов уменьшены в 10 раз.

Особый интерес представляет изучение таутомерного состава формы HR^- , т.к. для этой частицы проявляются нетипичные для незамещенного флуоресцеина виды таутомерии, что является следствием влияния аминогруппы.

Широкая полоса с двумя максимумами при 430 – 510 нм, типичная для хиноидной структуры ксантенового фрагмента, наиболее сильно проявляется в водных растворах (рис. 3.19). Это является доказательством полного превращения красителя в таутомер HQ^- . Для всех флуоресцеиновых красителей полоса

моноаниона менее интенсивна, чем для дианиона. Однако отношение $\varepsilon_{\mathbf{R}^{2-}}^{\max} / \varepsilon_{\mathbf{HR}^-}^{\max}$ остается с удовлетворительной точностью постоянным при варьировании растворителя. Например, в случае флуоресцеина в воде и водно-органических смесях эта величина составляет в среднем 2.6 [39]. Для 4'- и 5'-аминофлуоресцеина величина $\varepsilon_{\mathbf{R}^{2-}}^{\max} / \varepsilon_{\mathbf{HR}^-}^{\max}$ в воде составляет 2.5 и 2.3, соответственно, тогда как в водном этаноле возрастает до 3.0 и 5.6. Это доказывает образование лактонного таутомера.

Этот вывод вполне логичен, если учесть положительный мезомерный эффект аминогруппы красителя, который является причиной увеличения электронной плотности на фталеовом остатке. Вследствие этого на центральном углеродном атоме образуется частично положительный заряд. С уменьшением относительной диэлектрической проницаемости среды взаимодействие зарядов усиливается, и происходит замыкание лактонного цикла как энергетически более выгодной структуры в этих условиях.

Следует обратить внимание также на батохромный сдвиг максимума поглощения спектра моноаниона для 5'-аминофлуоресцеина в водном этаноле, по сравнению с водной средой (рис. 3.19). Это может быть следствием образования фенолятного таутомера $\mathbf{HX}^-$ или $(\mathbf{HX}_+)^-$ [14, 79, 114, 115]. Отметим, что квантово-химические расчеты подтвердили возможность образования фенолятного моноаниона для аминофлуоресцеина [116].

Коэффициент молярного поглощения частицы $\mathbf{R}^{2-}$ аминофлуоресцеинов существенно не отличается от соответствующего значения флуоресцеина. Это позволяет заключить, что, в отличие от некоторых нитропроизводных флуоресцеина [11], для аминопроизводных образование частицы $\mathbf{L}^{2-}$ маловероятно.

В соответствии с вышесказанным, можно представить упрощенную схему таутомерных равновесий, без учета маловероятных структур (рис. 3.21).

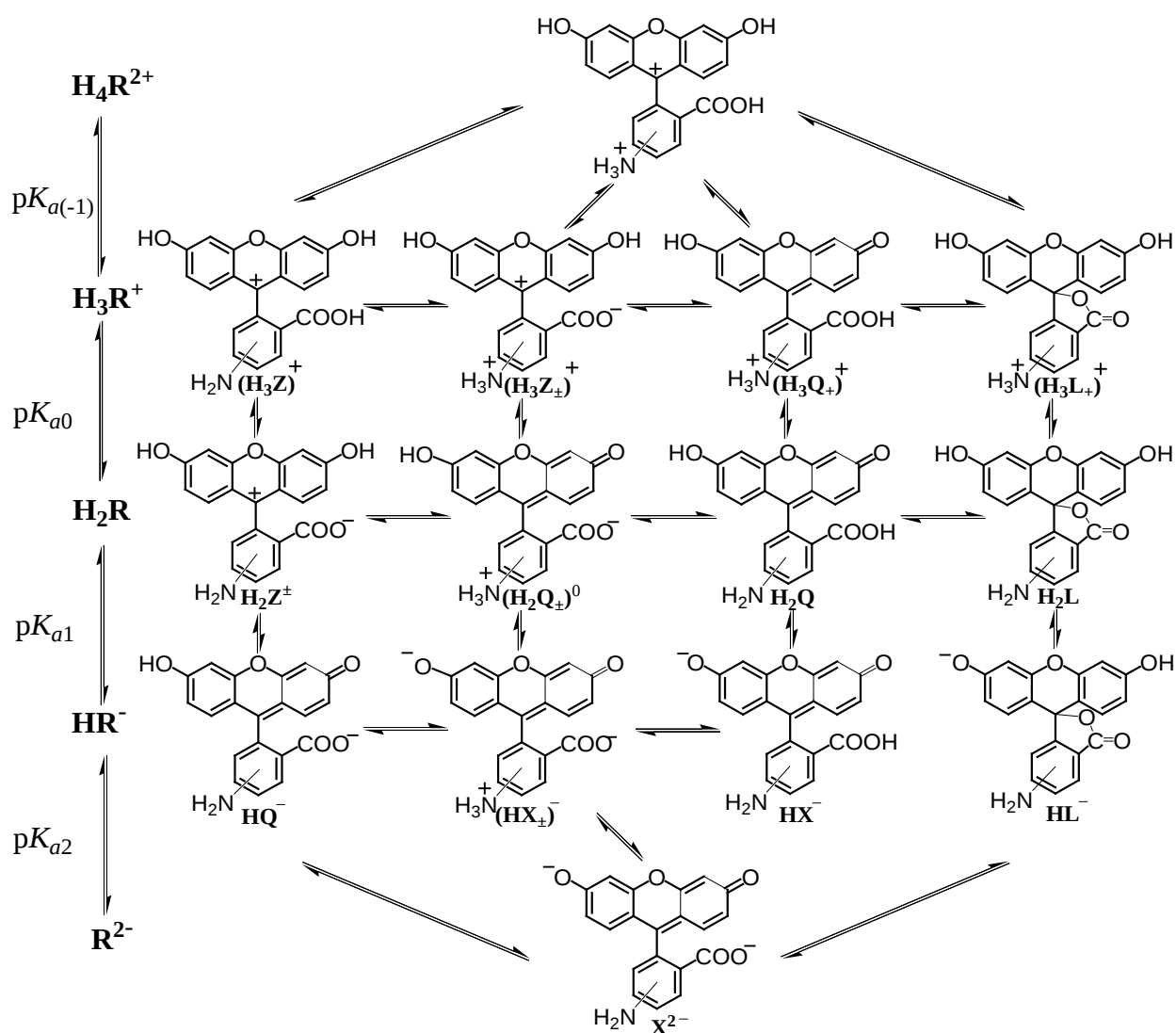


Рисунок 3.21 – Схема протолитических равновесий 4'- и 5'-аминофлуоресцеина в растворах. Таутомеры HX^- или $(HX^\pm)^-$, а также HL^- характерны для 5'-аминофлуоресцеина в смеси вода–этанол.

3.4 Процессы поглощения и испускания света, а также переноса протона в растворах аминфлуоресцеинов и родственных соединений в неводных растворителях

3.4.1 Таутомерный состав моноаниона некоторых производных флуоресцеина в НДС-растворителях

Для проверки сделанного в предыдущем пункте предположения об образовании фенолятного анионного таутомера аминфлуоресцеина, а также выявления общих закономерностей этого явления для других производных флуоресцеина была проведена серия экспериментов в ДМСО. Как было установлено ранее, этот растворитель, также как и ацетонитрил, хорошо стабилизирует фенолятный анион флуоресцеина [14].

Фенолятный таутомер можно зафиксировать по батохромному сдвигу полосы поглощения раствора при уменьшении количества депротонирующего агента. В данной работе в качестве последнего использовался ДБУ или бензоатные буферные растворы. В этих условиях можно наблюдать появление моноаниона, несмотря на значительное сближение pK_{a2} и pK_{a1} , т. к. нейтральная форма в растворителях этого типа практически бесцветна.

У производных флуоресцеина, содержащих атомы галогенов на ксантеновом фрагменте, этот таутомер проявляется уже в водно-органических и даже в водных средах [113]. В этом случае заместители обладают электроноакцепторными свойствами, что приводит к увеличению силы гидроксильной группы красителей. Можно предположить, что наличие электронодонорных заместителей на фталеовом фрагменте также будет способствовать образованию фенолятного таутомера, вследствие ослабления кислотных свойств карбоксильной группы.

Среди двух изомеров аминфлуоресцеина фенолятный таутомер должен быть сильнее стабилизирован для 5'-аминфлуоресцеина, т.к. его аминогруппа расположена в *пара*-положении относительно карбоксильной и в большей степени способствует ее протонированию. Отметим еще раз, что аминогруппа

нейтральной формы 5'-аминофлуоресцеина в ДМСО не протонируется, что было доказано при помощи ЯМР-спектроскопии (см. приложение).

Спектры поглощения 4'- и 5'-аминофлуоресцеина, а также 2,7,3',4',5',6'-гексафторфлуоресцеина и 4'-изотиоцианата флуоресцеина в ДМСО были измерены с добавками ДБУ и в бензоатных буферных растворах (рис. 3.22 и 3.23). Как видно из рисунков, в условиях неполного превращения некоторых красителей из дианиона в нейтральную форму спектр поглощения раствора претерпевает bathochromic shift относительно спектра дианиона. Этот эффект особенно сильно проявляется в случае 5'-аминофлуоресцеина и слабее – для 4'-аминофлуоресцеина и 4'-изотиоцианата флуоресцеина и является свидетельством образования фенолятной структуры HX^- или $(\text{HX}_2)^-$. В случае гексафторфлуоресцеина не было зафиксировано спектров, значение λ_{max} которых превышает значение λ_{max} полосы дианиона. Образование фенолятного таутомера для моноаниона 5'-аминофлуоресцеина замечено также и в ацетонитрильных растворах (рис. 3.24).

Ранее наблюдалось образование фенолятного таутомера в растворах 2,7-дифторфлуоресцеина и 2,4,5,7-тетрафторфлуоресцеина в водно-органических и организованных растворах, которое было закономерным следствием увеличения кислотности фенольной группы под влиянием атомов фтора [11, 114]. Введение же атомов фтора во фталевый фрагмент увеличивает также и кислотную силу группы COOH , поэтому фенолятный таутомер 2,7,3',4',5',6'-гексафторфлуоресцеина не проявляется ни в водно-этанольных смесях, ни в микроэмульсиях [114]. Настоящий эксперимент выявил, что эта тенденция сохраняется также и в ДМСО.

Особо следует отметить снижение коэффициента молярного поглощения 5'-аминофлуоресцеина при малых добавках ДБУ в области максимума спектра нейтральной формы ($\lambda = 420 - 470 \text{ нм}$), которое проявляется как в ДМСО (рис. 3.23), так и в меньшей степени в ацетонитриле (рис. 3.24).

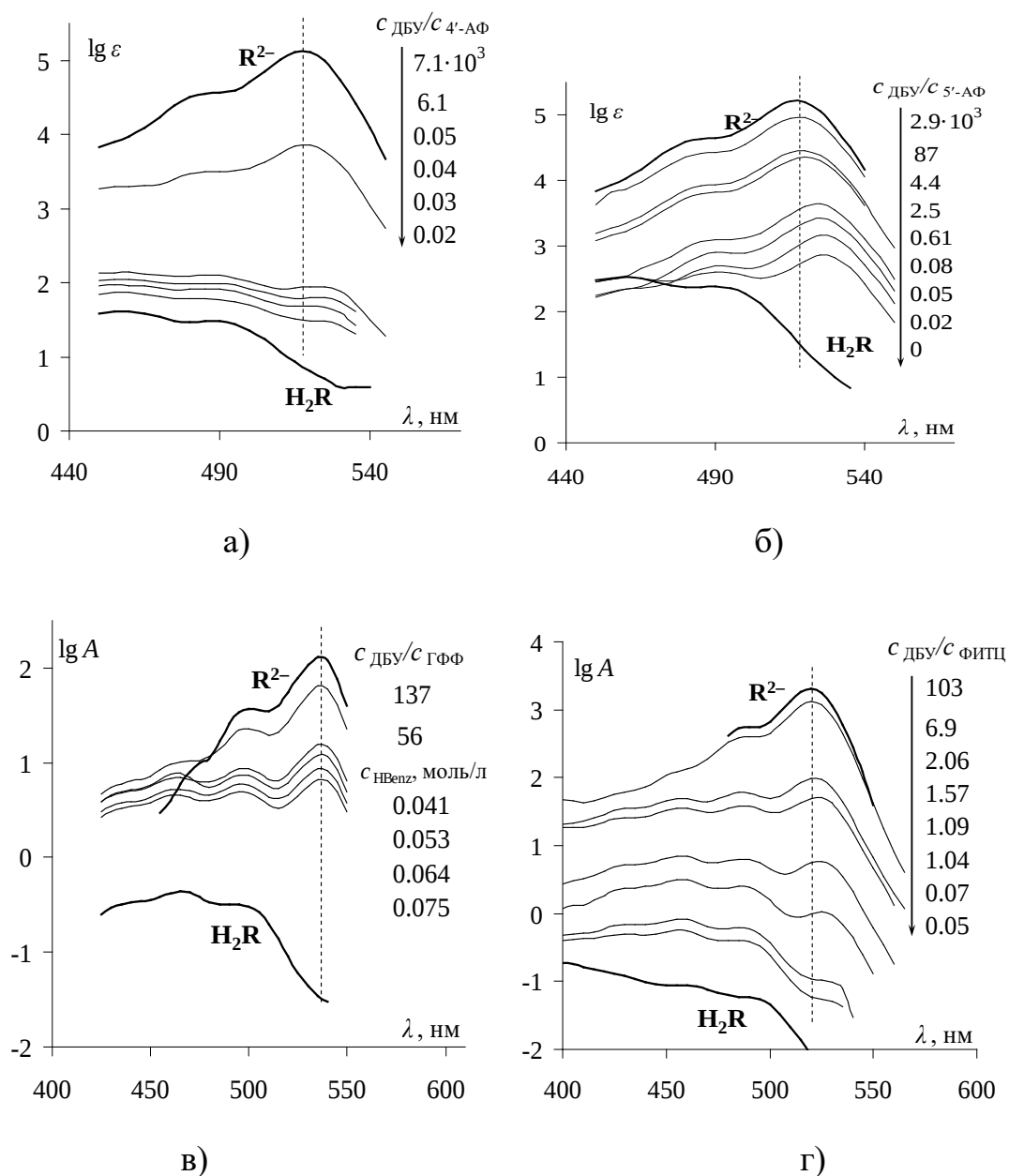


Рисунок 3.22 – Спектры поглощения 4'-аминофлуоресцеина (а), 5'-аминофлуоресцеина (б), 2,7,3',4',5',6'-гексафторфлуоресцеина (в), 4'-изотиоцианата флуоресцеина (г) в ДМСО при варьировании концентрации депротонирующего агента (ДБУ). Все значения поглощения гексафторфлуоресцеина и изотиоцианата флуоресцеина приведены к одной концентрации красителя $1.0 \cdot 10^{-3}$ моль/л. Спектры нейтральных форм получены в растворе бензойной кислоты ($c = 0.10$ моль/л).

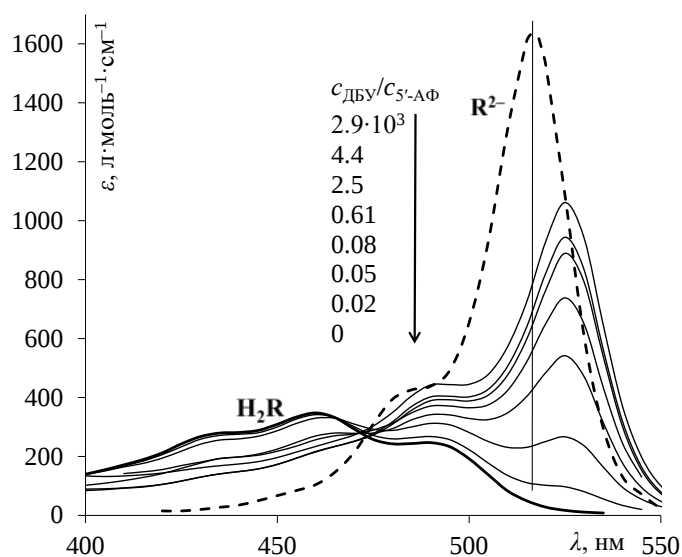


Рисунок 3.23 – Спектры поглощения 5'-аминофлуоресцеина в ДМСО при варьировании концентрации депротонирующего агента (ДБУ). Коэффициенты молярного поглощения дианиона (пунктирная линия) уменьшены в 100 раз. Спектры нейтральной формы получен в растворе бензойной кислоты ($c = 0.10$ моль/л).

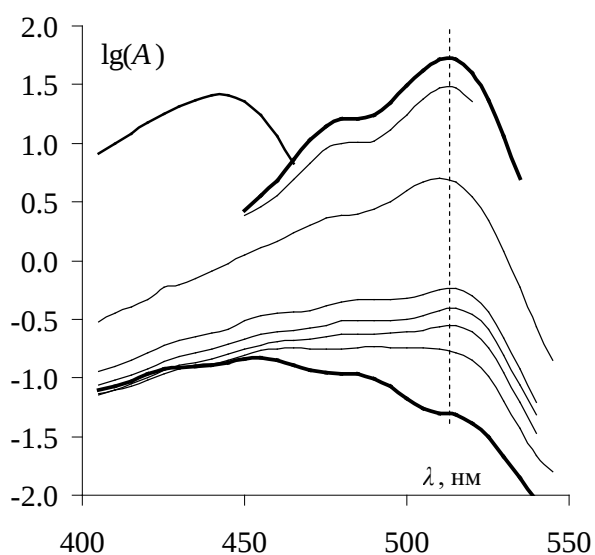


Рисунок 3.24 – Спектры поглощения 5'-аминофлуоресцеина в ацетонитриле при варьировании концентрации депротонирующего агента (ДБУ). Спектр нейтральной и катионной форм получен в растворе бензойной ($c = 0.10$ моль/л) и серной кислот ($c \approx 1$ моль/л).

Эта тенденция не характерна ни для других изученных в данной работе красителей, ни даже для фтор-производных флуоресцеина в смесях спирт – вода или бензол – спирт – вода [114, 115], что является явным доказательством превращения структуры ксантенового фрагмента моноаниона красителя из хиноидной, HQ^- , в бесцветную лактонную, HL^- , или фенолятную, HX^- . Поглощение последней в диапазоне $\lambda = 420 - 470$ нм также мало.

Это обстоятельство можно использовать для оценки таутомерного состава моноаниона в области максимума. Пренебрегая поглощением нейтральной формы красителей при $\lambda = 525$ нм, а также допуская, что при малых концентрациях ДБУ дианион R^{2-} не образуется (это подтверждается неизменностью значений λ_{max} этих растворов, а также наличием изобестической точки, хорошо видимой на рисунке 3.23), можно записать:

$$\frac{\varepsilon_{\lambda_1,2} - \varepsilon_{\lambda_1,1}}{\varepsilon_{\lambda_2,2} - \varepsilon_{\lambda_2,1}} = \frac{\varepsilon_{\lambda_1,\text{HR}^-}}{\varepsilon_{\lambda_2,\text{HR}^-}} - \frac{\varepsilon_{\lambda_1,\text{H}_2\text{R}}}{\varepsilon_{\lambda_2,\text{HR}^-}} \quad (3.12)$$

где $\varepsilon_{\lambda_k,\text{HR}^-}$, $\varepsilon_{\lambda_1,\text{H}_2\text{R}}$, $\varepsilon_{\lambda_k,1}$ и $\varepsilon_{\lambda_k,2}$ – коэффициенты молярного поглощения моноаниона, нейтральной формы красителя и их смеси различного состава, соответственно;

λ_1 и λ_2 – длины волн вблизи максимумов полос поглощения нейтральной формы и моноаниона, соответственно (при расчетах эти величины, как правило, принимались равными 460 и 525 нм).

Величина $\varepsilon_{\lambda_2,\text{HR}^-}$ соответствует поглощению фенолятного таутомера HX^- , строение ксантенового фрагмента которого идентично строению дианиона. Следовательно, можно предположить, что интенсивность полос этих частиц будет приблизительно одинаковой (около $10^5 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$).

Рассчитанное из экспериментальных данных для 6 растворов среднее значение величины $\frac{\varepsilon_{\lambda_1,2} - \varepsilon_{\lambda_1,1}}{\varepsilon_{\lambda_2,2} - \varepsilon_{\lambda_2,1}}$ для 5'-аминофлуоресцеина равно -0.13 . Если

смоделировать спектр фенолятного таутомера HX^- спектром дианиона R^{2-} ($\epsilon_{\text{max}} = 1.6 \text{ моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$), батохромно смещенным на 10 нм (т.е. предположить отсутствие карбоксилатного таутомера), то отношение $\frac{\epsilon_{\lambda_1, \text{HR}^-}}{\epsilon_{\lambda_2, \text{HR}^-}}$ составляет 0.04.

Так как значение $\epsilon_{\lambda_1, \text{H}_2\text{R}}$ известно из экспериментальных данных, то по уравнению (3.12) можно оценить значение $\epsilon_{\lambda_2, \text{HR}^-}$, которое составляет $2000 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$. Такое низкое значение, по сравнению с максимальным коэффициентом молярного поглощения дианиона, свидетельствует о малом выходе фенолятного HX^- и образовании значительного количества лактонного таутомера HL^- .

Если же допустить присутствие карбоксилатного таутомера, для которого спектр должен быть аналогичен спектру нейтральной формы, то отношение $\frac{\epsilon_{\lambda_1, \text{HR}^-}}{\epsilon_{\lambda_2, \text{HR}^-}}$ должно увеличиться, а значение $\epsilon_{\lambda_2, \text{HR}^-}$ снизиться еще больше. Однако эта ситуация кажется маловероятной, т.к. в таком случае для появления столь выраженного спектра моноаниона в смеси (рис. 3.22 и 3.23) необходим значительный его выход (до 80 %), что не реализуется в органических растворителях, ввиду значительного сближения значений $\text{p}K_{a2}$ и $\text{p}K_{a1}$.

Таким образом, предполагая отсутствие значимых количеств карбоксилатного таутомера HQ^- , можно оценить таутомерный состав моноаниона 5'-аминофлуоресцеина: 1.2 % фенолятного и 98.8 % лактонного таутомеров. Эти результаты согласуются с проведенными ранее квантово-химическими расчетами для аминфлуоресцеина [116].

Отметим, что в случае 4'-аминофлуоресцеина с увеличением отношения концентраций ДБУ и красителя поглощение возрастает на всем интервале длин волн, а максимум при длинах волн, больших λ_{max} дианиона, выражен слабо.

Таким образом, в отличие от метилового эфира флуоресцеина, для которого было доказано существование лишь карбоксилатного таутомера моноаниона, Q^- , моноанионы 5'-аминофлуоресцеина в водно-этанольных и неводных

растворителях представлены в виде смеси трех таутомеров: карбоксиалатного HQ^- , фенолятного, HX^- , и лактонного HL^- , что обусловлено сильным влиянием аминогруппы.

3.4.2 Флуоресценция анионов флуоресцеиновых красителей в неводных растворителях

Для получения более полной информации относительно процессов внутримолекулярного тушения флуоресценции аминифлуоресцеина были определены квантовые выходы флуоресценции дианиона этого красителя в неводных растворителях (рис. 3.25). Так как значения поглощения при длине волны возбуждения сильно различаются для разных растворителей, относительная интенсивность спектров испускания показывает лишь тенденцию изменения флуоресцентных свойств. Более корректно сравнивать квантовые выходы флуоресценции (табл. 3.5).

Из таблицы видно, что существует резкое различие между гидроксил-содержащими и НДВС-растворителями. Так, квантовый выход флуоресценции в воде и метаноле мал, в менее полярном бутаноле приблизительно в 10 раз больше. Но при переходе к НДВС-растворителям это значение резко увеличивается до 60 – 70 %, причем эта величина мало зависит от вязкости или полярности растворителя. Это указывает значительную роль водородных связей в процессах тушения флуоресценции. Действительно, было обнаружено, что при добавлении воды к ацетонитрильному раствору квантовый выход флуоресценции снижается. Так, в растворе, содержащем 10 % об. воды, значение ϕ 4'-аминофлуоресцеина составляет 7.8 %.

Как видно из таблицы 3.6, депротонированные формы сульфифлуоресцеина и этилфлуоресцеина, у которых карбоксильная группа заменена на сульфогруппу и сложноэфирную группу, соответственно, одинаково хорошо флуоресцируют как в воде, так и в ДМСО.

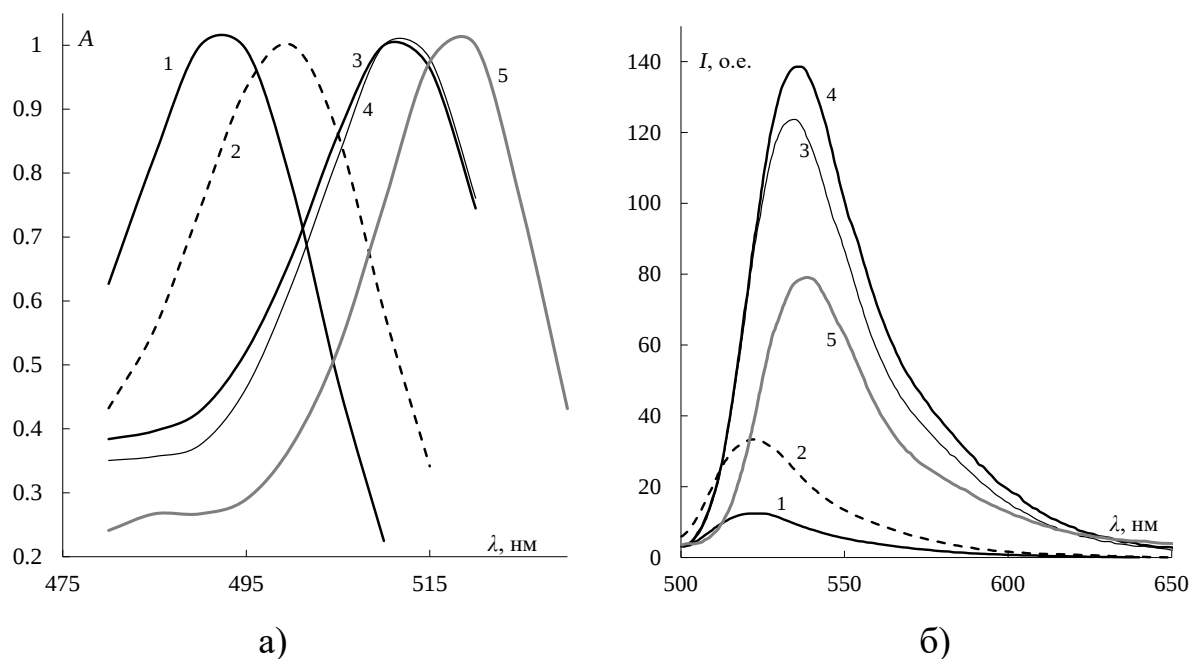


Рисунок 3.25 – Нормализованные спектры поглощения (а) и спектры флуоресценции (б) дианиона 5'-аминофлуоресцеина в метаноле (1), бутаноле (2), ацетонитриле (3), ацетоне (4) и ДМСО (5) в присутствии ДБУ.

Таблица 3.5

Оптические свойства дианиона 5'-аминофлуоресцеина в различных растворителях

Растворитель	Поглощение	Флуоресценция	
	$\lambda_{\max} \pm 2, \text{ нм}$	$\lambda_{\max} \pm 2, \text{ нм}$	$\varphi \pm 1, \%$
Вода	488	518	0.8
Метанол	492	522	4
1-Бутанол	500	522	10
Ацетон	512	536	61
Ацетонитрил ¹	512	534	60
ДМСО	524	540	67

¹Для 4'-аминофлуоресцеина в ацетонитриле квантовый выход составляет 69 %.

Квантовые выходы флуоресценции ионов флуоресцеиновых красителей в воде и ДМСО

Краситель	$\varphi \pm 5, \%$	
	Вода	ДМСО
Флуоресцеин, R^{2-}	93	87
Сульфофлуоресцеин, R^{2-}	80	79
Этилфлуоресцеин, R^{-}	80	76
4'-Аминофлуоресцеин, R^{2-}	0.6	73
5'-Аминофлуоресцеин, R^{2-}	0.8	67
5'-Аминофлуоресцеин, HR^{-}	—	12

Отметим, что Мартин наблюдала более значительное уменьшение интенсивности флуоресценции при переходе от воды к ДМСО (до 60 %) [66]. Возможно, это связано с неполным превращением моноаниона в дианион, вследствие недостатка NaOH, который был использован как депротонирующий агент в упомянутой работе. Кроме того, эти данные не были подтверждены в более поздних исследованиях [70].

Так как водородные связи на фталеовом фрагменте локализованы на карбоксилатной группе, можно предположить, что ее состояние будет сильно влиять на процессы фотоиндуцированного переноса электрона, который, согласно общепринятым представлениям, происходит в анионах флуоресцеиновых красителей, обладающих низкой флуоресценцией [45, 86, 87]. В самом деле, при замене карбоксильной группы на метильную или оксиметильную квантовый выход бутилового эфира карбоксифлуоресцеина, содержащего сложноэфирную группу в положении 5', повышается от 37.8 до 87.7 или 84.2 %, соответственно [10].

Как было показано в подразделе 3.3, для 5'-аминофлуоресцеина характерно образование моноаниона с протонированной карбоксильной группой и ионизированной гидроксильной. Это создает уникальную возможность для

исследования влияния протонирования карбоксилатной группы на процессы внутримолекулярного тушения флуоресценции без изменения структуры ксантеновой части красителя. Несмотря на предполагаемое существенное сближение значений pK_{a2} и pK_{a1} , есть все предпосылки для экспериментального определения квантового выхода моноаниона, т.к. нейтральная форма аминифлуоресцеина практически не поглощает свет при длине волны возбуждения (500 нм), вследствие преобладания лактонного таутомера.

Из таблицы 3.6 видно, что протонирование карбоксилатной группы аминифлуоресцеина приводит к значительному уменьшению квантового выхода флуоресценции в ДМСО. Следовательно, в этом случае внутримолекулярный фотоиндуцированный перенос электрона становится возможным.

Кинетика затухания флуоресценции в ДМСО в присутствии ДБУ удовлетворительно описывается моноэкспоненциальной зависимостью (рис. 3.26). Оцененные времена жизни, τ , составляют 3.26 и 2.78 нс для 4'- и 5'-аминифлуоресцеина, соответственно. В водных растворах наблюдалось биэкспоненциальное затухание с одинаковыми для двух изомеров аминифлуоресцеина временами жизни 0.12 и 3.9 нс, причем вклад короткоживущего компонента составлял около 98 %. Биэкспоненциальное затухание флуоресценции было также отмечено Зангом для растворов 4'-аминифлуоресцеина в метаноле [45]. Значения времен жизни возбужденного состояния согласуются с временем жизни флуоресцеина в воде, которое составляет 4.16 нс и немного увеличивается при переходе к гексанолу и октанолу [248].

Из этих данных по уравнениям (3.13) и (3.14) можно рассчитать константы скорости излучательной (k_f) и безызлучательной (k_d) дезактивации.

$$k_f = \frac{\varphi}{\tau} \quad (3.13)$$

$$k_d = \frac{1 - \varphi}{\tau} \quad (3.14)$$

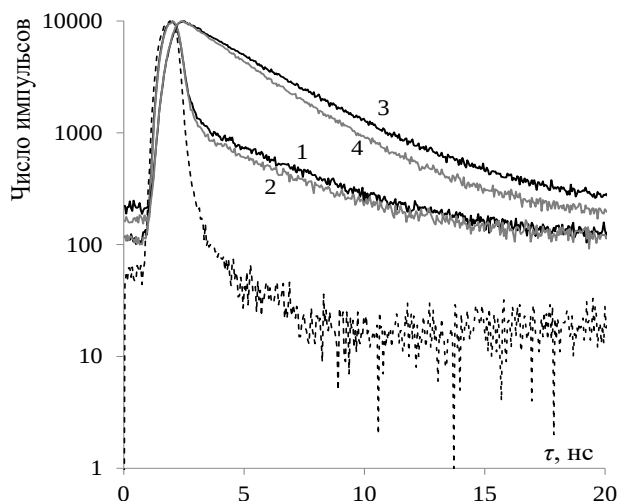


Рисунок 3.26 – Кривые затухания флуоресценции дианионов 4'-аминофлуоресцеина (1, 3) и 5'-аминофлуоресцеина (2, 4) в воде (1, 2) и в ДМСО (3, 4). Пунктирная линия соответствует излучению источника.

В случае 4'-аминофлуоресцеина значения k_f и k_d составляют $2.3 \cdot 10^8$ и $8.0 \cdot 10^7 \text{ с}^{-1}$, соответственно, для 5'-аминофлуоресцеина – $2.4 \cdot 10^8$ and $1.2 \cdot 10^8 \text{ с}^{-1}$, соответственно.

Таким образом, ведущая роль водородных связей, локализованных на карбоксилатной группе, в процессах внутримолекулярного тушения флуоресценции аминфлуоресцеина подтверждается экспериментально. Это открывает перспективы для использования изомеров аминфлуоресцеина для исследования различных супрамолекулярных агрегатов в качестве индикаторов, чувствительных к гидратированности микроокружения.

3.5 Выводы к разделу 3

1. На основании определенных экспериментально спектров поглощения, а также найденных параметров кислотно-основных равновесий модельных соединений – простых и сложных эфиров флуоресцеина и сульфифлуоресцеина в воде и смеси вода–этанол (50 % масс.) – была подтверждена предложенная ранее схема протолитических равновесий флуоресцеина.

2. При переходе от воды к водно-этанольной смеси для метилфлуоресцеина наблюдается увеличение значения pK_{a1} на 2.6 единицы и снижение pK_{a0} на 1.5 единицы на фоне существенной стабилизации лактонной структуры его нейтральной формы.

3. С применением методов электронной, ЯМР- и ИК-спектроскопии было доказано отсутствие лактонной структуры моноаниона метилфлуоресцеина в ДМСО и других НДВС-растворителях.

4. Закономерности изменения значений pK_a четырехосновных 4'- и 5'-аминофлуоресцеина при переходе от воды к водному этанолу согласуются с эффектами среды для более простых флуоресцеиновых красителей: наблюдается уменьшение разности $pK_{a2} - pK_{a1}$ и $pK_{a0} - pK_{a(-1)}$, а также смещение соответствующих равновесий в щелочную и кислую область.

5. Влияние аминогруппы на таутомерный состав красителя отчетливо проявляется в случае 5'-аминофлуоресцеина, для которого зафиксировано образование лактонного и фенолятного таутомера моноаниона даже в водно-этанольной смеси. Эти таутомеры лучше стабилизированы в НДВС-растворителях (ДМСО и ацетонитриле).

6. При переходе от воды к ДМСО квантовый выход флуоресценции дианионов изомеров аминофлуоресцеина увеличивается от 0.8 до 67 % и мало зависит от положения аминогруппы во фталевом фрагменте. Установлено, что ключевую роль в процессах внутримолекулярного тушения флуоресценции аминофлуоресцеина играет наличие водородных связей, локализованных на карбоксилатной группе и в особенности ее протонирование.

Результаты, изложенные в данном разделе опубликованы в работах [А3, А6, А9, А10, А17].

РАЗДЕЛ 4

ФЛУОРЕСЦЕИН И РОДСТВЕННЫЕ СОЕДИНЕНИЯ КАК ИНДИКАТОРЫ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ВОДНЫХ РАСТВОРОВ КАТИОННЫХ КАЛИКСАРЕНОВ

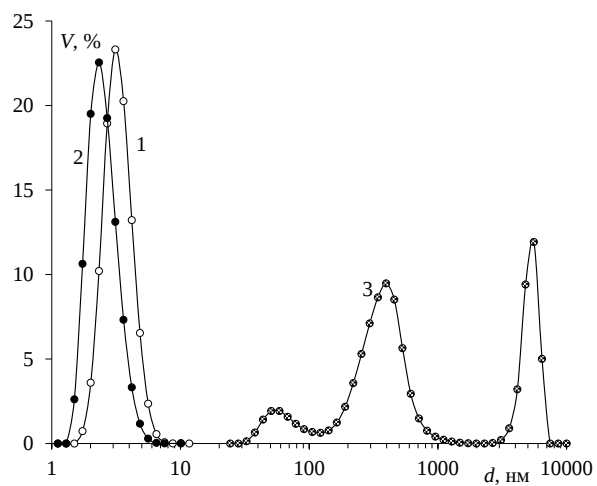
4.1 Состояние катионных каликсаренов, содержащих четвертичные аммониевые группы, в водных растворах

Для выявления характера агрегации каликсаренов в водных растворах применялся комплекс динамических и статических методов, таких как динамическое рассеяние света (ДРС), трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ), диализ. Также с использованием потенциометрического метода с ионселективным электродом была оценена степень связывания противоионов агрегатами.

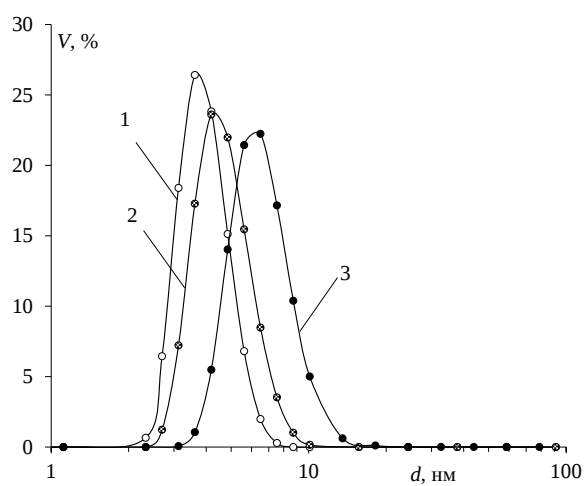
4.1.1 Размеры, форма и электрокинетический потенциал агрегатов каликсаренов

Методом ДРС были определены размеры, а также ζ -потенциалы агрегатов каликсаренов 6СА4, 8СА4, 12СА4 в чистой воде, а также при ионной силе 0.05 моль/л (NaCl). Присутствие соли в растворе было необходимо для воссоздания условий определения констант ионизации красителей, а также кинетических экспериментов. Результаты представлены в таблице 4.1 и на рисунке 4.1. В таблице также приведены параметры агрегатов 3СА4, определенные ранее.

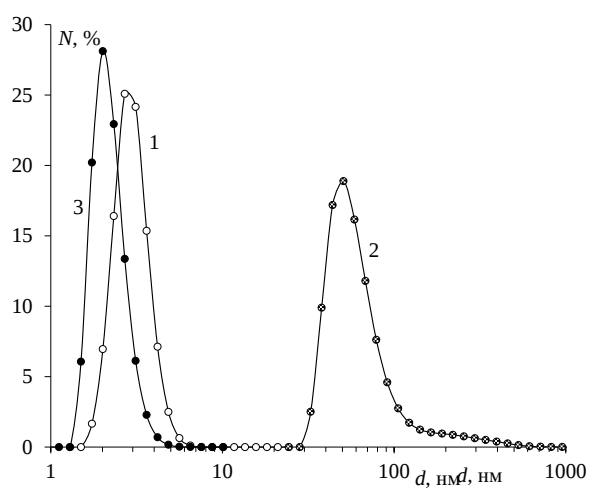
Во всех случаях системы полидисперсны: индекс полидисперсности, который определяется как квадрат отношения стандартного отклонения к размеру частиц, увеличивается в ряду каликсаренов 6СА4, 8СА4, 12СА4 и составляет 0.47 – 0.53 единиц.



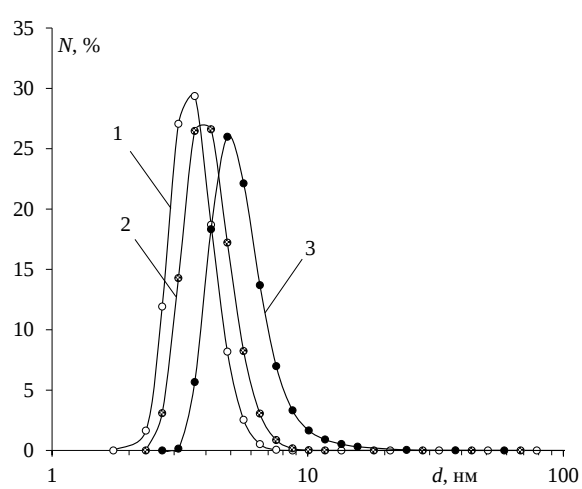
а)



б)



в)



г)

Рисунок 4.1 – Распределение по размерам по объему (а, б) и по количеству частиц (в, г) агрегатов каликсаренов 6СА4 (1), 8СА4 (2), 12СА4 (3) в чистой воде (а, в) и в присутствии NaCl (0.05 моль/л) (б, г).

Размеры и электрокинетические потенциалы агрегатов каликсаренов в водных растворах при ионной силе 0.05 моль/л по данным ДРС

Каликсарен	Диаметр $\pm \sigma^1$, нм		$\zeta \pm \sigma$, мВ
	по объему	по количеству частиц	
3СА4 ($3 \cdot 10^{-3}$ моль/л) [191]	3 – 4	–	+ 42 ²
6СА4 ($1.1 \cdot 10^{-3}$ моль/л)	4.4 ± 1.2	3.6 ± 0.7	+ 13 $\pm$ 9
8СА4 ($1.4 \cdot 10^{-3}$ моль/л)	4.8 ± 1.1	4.2 ± 0.9	+ 17 $\pm$ 12
12СА4 ($1.9 \cdot 10^{-4}$ моль/л)	6.7 ± 1.9	5.7 ± 1.9	+ 12 $\pm$ 19

¹ Стандартное отклонение.

² Величина оценена, исходя из ζ -потенциала агрегатов каликсарена 3СА4 в чистой воде (70 мВ), с учетом экранирования поверхностного заряда в присутствии электролита по формуле, приведенной в работе [58].

В системах, содержащих соль, индекс полидисперсности несколько ниже (0.38 – 0.42), чем при малой ионной силе, а ζ -потенциал уменьшается в среднем в 2–3 раза, что связано с экранированием положительного поверхностного заряда фоновым электролитом.

В чистой воде средний размер частиц с удлинением углеводородных радикалов изменяется немонотонно: в растворах каликсарена 8СА4 наблюдаются крупные агрегаты, диаметром более 300 нм, в то же время, в растворе каликсарена 12СА4 зафиксированы мелкие агрегаты, диаметром около 2 нм. Эти закономерности воспроизводились несколько раз. Электрокинетический потенциал агрегатов 6СА4, 8СА4 и 12СА4 в чистой воде составляет + 29 $\pm$ 9, + 42 $\pm$ 11 и + 50 $\pm$ 12 мВ, соответственно. Везикулярные структуры в растворах каликсаренов 3СА4 и 8СА4 в чистой воде регистрировались на широком диапазоне концентраций также другими авторами [211], однако образование этих структур, даже при низких концентрациях каликсарена ($c \approx 10^{-5}$ моль/л) может быть вызвано наличием контрастирующего вещества.

При продолжительном хранении растворов каликсаренов, особенно в присутствии соли, происходит значительное снижение поверхностного потенциала агрегатов до + 5.8, + 4.1 и + 11.9 мВ для каликсаренов 6СА4, 8СА4 и 12СА4, соответственно. При этом размер агрегатов изменяется незначительно в случае каликсаренов 6СА4 и 8СА4 и увеличивается на 2 нм для 12СА4.

В солевом растворе каликс[4]аренов регистрируются небольшие агрегаты, средний диаметр которых незначительно увеличивается с ростом длины углеводородного радикала. Отметим, что в трис-буфере диаметр агрегатов 8СА4 составляет 6 нм, а ζ -потенциал + 37 мВ [177].

Если принять, что строение агрегатов достаточно гидрофобных каликсаренов аналогично строению мицелл ПАВ, можно предположить, что радиус агрегатов ограничивается сверху суммой максимальной длины углеводородной цепи, l , и длины каликсаренового фрагмента. Значение l (в нм) можно оценить, располагая количеством атомов карбона в углеводородной цепи, n_C , по формуле, предложенной Тенфордом [250]:

$$l = 0.15 + 0.1265n_C \quad (4.1)$$

Предполагая, что в агрегатах длина углеводородной цепи близка к максимальной, можно оценить толщину слоя агрегата, приходящегося на каликсареновые фрагменты, Δ , по уравнению (4.2).

$$\Delta = \frac{d - 2l}{2} \quad (4.2)$$

Рассчитанное таким способом значение Δ составляет 0.89, 0.94 и 1.18 нм для 6СА4, 8СА4 и 12СА4, соответственно. Возможно, увеличение Δ с ростом углеводородной цепи обусловлено конформационной подвижностью каликсаренов: в агрегатах 12СА4 конус каликсарена более высокий, а ионные головки расположены более плотно.

В противоположность четырехчленным каликсаренам, диаметр агрегатов 1СА6 достигает 150 – 300 нм, а ζ -потенциал в чистой воде составляет около +45 мВ. Таким образом, можно предположить, что эти агрегаты более «рыхлые», и содержат включенные молекулы воды, что придает им некоторое сходство с везикулярными образованиями.

С другой стороны, высокая полидисперсность агрегатов и наблюдаемые большие размеры могут быть обусловлены образованием анизометричных агрегатов. Для проверки этого предположения было проведено электронно-микроскопическое исследование. Особенности проведения эксперимента (испарение воды из раствора, нанесенного на карбоновую подложку) могут приводить к образованию более крупных агрегатов, по сравнению с существующими в растворе. Однако можно ожидать сохранения первичных агрегатов, если процесс высушивания проводился достаточно быстро.

Методом ТЭМ исследовались растворы каликсаренов, не содержащие соли, т. к. в процессе испарения растворителя возможно образование кристаллов NaCl, что существенно затруднит наблюдения. Вследствие того, что каликсарены состоят лишь из легких атомов с малым количеством электронов, наиболее мелкие агрегаты каликсарена 3СА4 трудноразличимы на микрофотографиях. Чтобы преодолеть это затруднение, в раствор каликсарена вводили краситель бенгальский розовый Б, содержащий атомы хлора и йода. Этот индикатор является достаточно гидрофобным и находится преимущественно в псевдофазе агрегатов. В свою очередь, наличие в агрегатах таких многоэлектронных атомов способствовало повышению контрастности изображения.

На микрофотографиях видны вторичные агрегаты каликс[4]аренов, которые состоят из аморфных образований неправильной формы диаметром до 10 нм, разделенных прослойками дисперсионной среды (рис. 4.2), что согласуется с результатами ДРС.

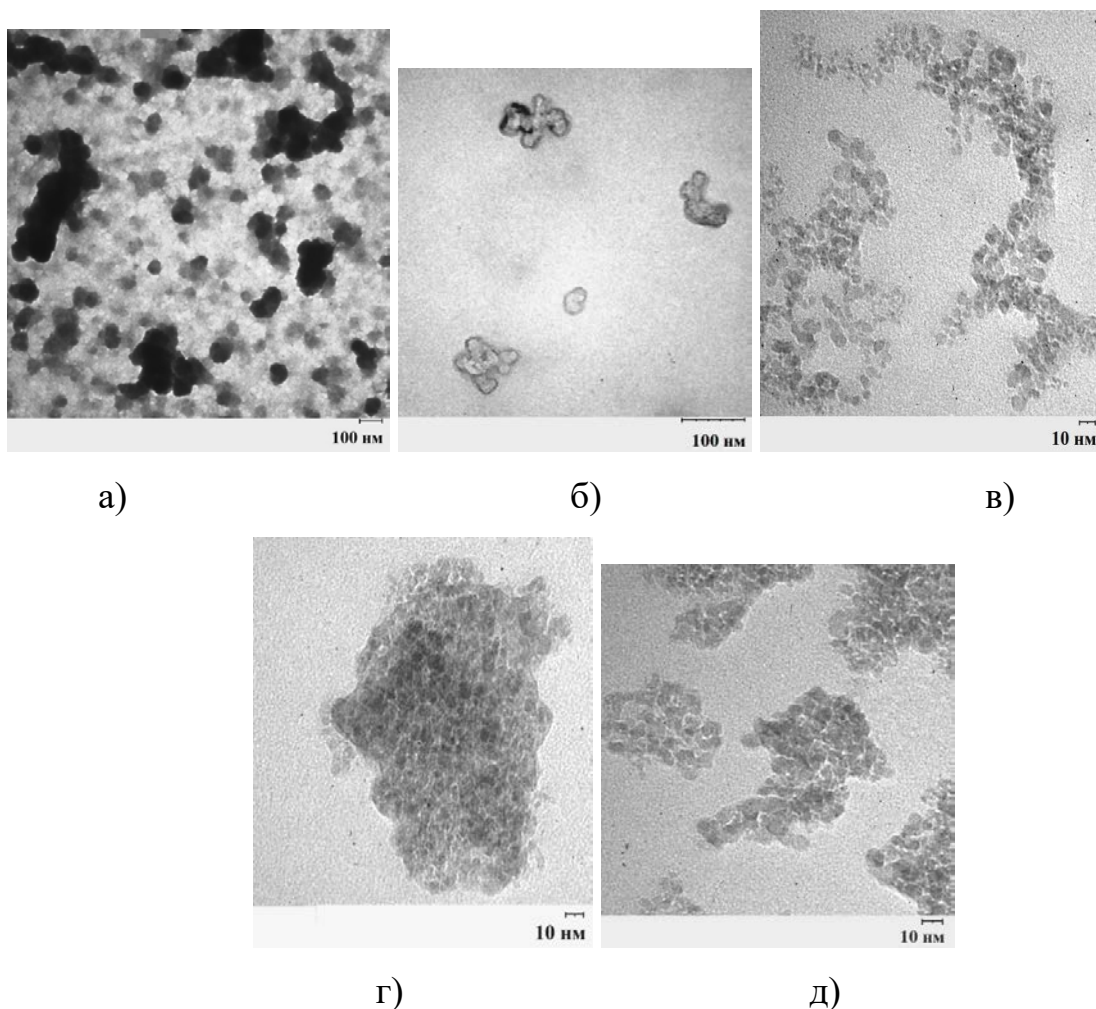


Рисунок 4.2 – Типичные электронные микрофотографии агрегатов каликсаренов 1СА6 (а), 3СА4 (б), 6СА4 (в), 8СА4 (г), 12СА4 (д).

Агрегаты 1СА6 принципиально отличаются от агрегатов четырехчленных каликсаренов. Они представляют собой полидисперсные образования, диаметр некоторых из них превышает 100 нм. Как и для остальных изученных каликсаренов, кристаллическая структура для агрегатов 1СА6 не характерна.

Образование столь больших структур может быть результатом неполного растворения вещества. Если данное предположение верно, то агрегаты должны уменьшаться или вообще исчезать после обработки растворов ультразвуком. Другим способом проверки может стать изучение водных растворов каликсарена 1СА6, приготовленных из концентрированных растворов каликсарена в 96%-ном этаноле или ДМСО, которые, вероятно, являются истинными. Однако, судя по результатам ТЭМ, коллоидные частицы каликсарена 1СА6, образовавшиеся в

результате физической конденсации, сопоставимы по размеру с агрегатами, полученными диспергированием. Это справедливо также и для растворов, подвергшихся воздействию ультразвука.

Таким образом, даже для относительно гидрофильного каликсарена 1СА6, не содержащего длинных алкильных групп, в водных растворах характерно образование агрегатов.

4.1.2 Связывание противоионов и различных индикаторов агрегатами катионных каликсаренов

4.1.2.1 Оценка концентрации несвязанных хлорид-ионов в растворах каликсаренов 3СА4 и 1СА6 потенциометрическим методом

Дополнительную информацию относительно характера агрегации может дать анализ связывания каликсаренами противоионов. Поэтому было проведено потенциометрическое определение концентрации хлорид-ионов в растворах некоторых каликсаренов с использованием хлорид-селективного электрода. Расчет коэффициентов активности проводился итерационно, исходя из второго приближения теории Дебая–Хюккеля, методом простых итераций. Следует отметить, что каждая заряженная группа каликсаренов рассматривалась как независимый ион, тогда как попытки учесть четырех- или шестизарядность катиона каликсарена приводили к результатам, не имеющим физического смысла.

Полученные зависимости рассчитанных равновесных концентраций Cl^- от аналитической концентрации представлены на рисунке 4.3.

Для каликсарена 3СА4 (рис. 4.3, б) можно наблюдать излом при концентрации каликсарена $5 \cdot 10^{-3}$ моль/л. Это согласуется с определенной ранее методом ДРС величиной ККА $4 \cdot 10^{-3}$ моль/л [191]. В той же работе было определено значение ККА в присутствии NaCl при ионной силе 0.05 моль/л, которое составило $1 \cdot 10^{-4}$ моль/л. Следует отметить, что уменьшение ККА при росте ионной силы типично для мицелл ионных ПАВ [27].

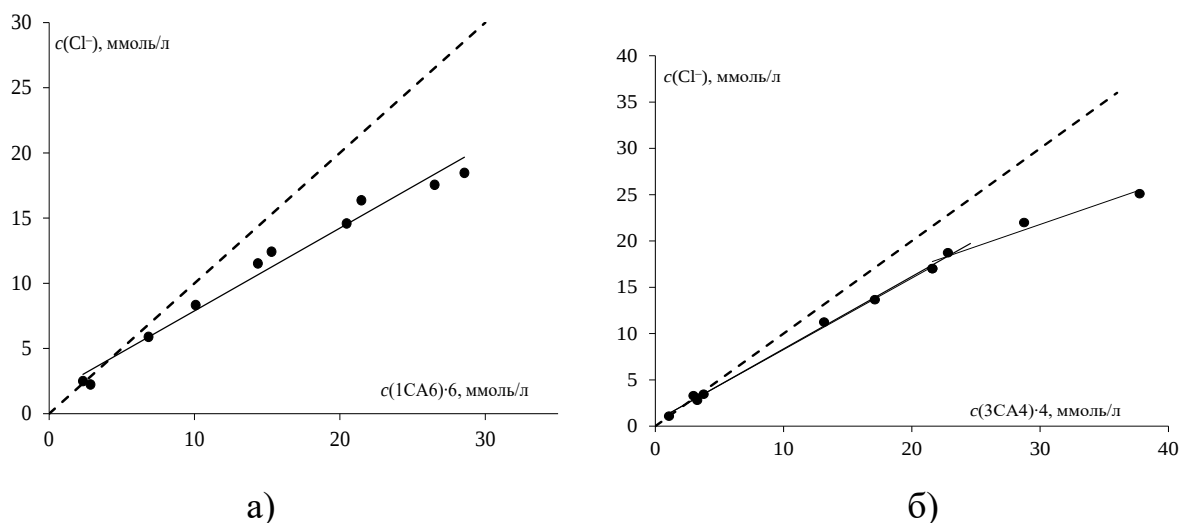


Рисунок 4.3 – Зависимость равновесной концентрации несвязанных хлорид-ионов от концентрации каликсаренов 1CA6 (а) и 3CA4 (б), умноженной на 6 и 4, соответственно. Пунктирные линии соответствуют гипотетической ситуации, когда все противоионы каликсаренов находятся в объемной фазе.

Аналогичное значение для каликсарена 3CA4, определенное В. И. Кальченко и Р. В. Родиком с сотрудниками по возгоранию флуоресценции пирена, заметно ниже. Оно составляет $3.7 \cdot 10^{-4}$ моль/л в чистой воде и уменьшается до $6.7 \cdot 10^{-5}$ моль/л в трис-буфере с концентрацией 0.02 моль/л. Для каликсарена 8CA4 величина ККА равна $4.8 \cdot 10^{-5}$ и $6.2 \cdot 10^{-6}$ моль/л чистой воде и трис-буферном растворе, соответственно [177].

Следует отметить, что метод флуоресцентного зонда может давать несколько заниженные значения ККА, вследствие возможного образования смешанных ассоциатов с достаточно гидрофобным индикатором даже в «домицеллярной» области. Эти эффекты были зафиксированы ранее в случае растворов каликсарена 3CA4 с метиловым оранжевым [189], аналогичные явления наблюдались также в случае растворов катионных ПАВ домицеллярных концентраций [15, 251].

В случае каликсарена 1CA6, в растворах которого большие агрегаты регистрируются даже в разбавленных растворах, резкого излома на зависимости, изображенной на рисунке 4.3,а, не обнаруживается.

При увеличении концентрации каликсаренов проявляются отклонения концентрации несвязанных ионов Cl^- от прямой, соответствующей полной диссоциации каликсаренов, причем эти отклонения наблюдаются даже для растворов каликсарена 3СА4 при концентрациях ниже ККА. Это иллюстрирует наличие электростатического взаимодействия между четырех- или шестизарядными ионами каликсарена с противоионами.

Проводя аналогию между процессами агрегации каликсарена и мицеллообразованием ионных ПАВ и располагая значениями критической концентрации агрегации, ККА, можно оценить степень связывания противоионов агрегатами 3СА4, β , для каждой аналитической концентрации каликсарена, c_0 , по уравнению:

$$1 - \beta = \frac{c(\text{Cl}^-) - 4 \cdot \text{ККА}}{4 \cdot (c_0 - \text{ККА})} \quad (4.3)$$

При этом предполагается, что мономеры каликсарена полностью диссоциированы. Результаты представлены в таблице 4.2. Отметим, что для каликсарена 1СА6 данный подход неприменим, так как в этом случае агрегация по-видимому, носит непрерывный, а не коллективный характер.

Таблица 4.2

Оценочные значения степеней связывания хлорид-ионов агрегатами 3СА4 при разных концентрациях каликсарена

c_0 , ммоль/л	$\beta(\text{Cl}^-)$, %
5.70	56
7.19	58
9.44	55

Как видно, при концентрациях, существенно превышающих ККА, значение $\beta(\text{Cl}^-)$ практически не изменяется, что свидетельствует об отсутствии структурных перестроек в агрегатах каликсарена. Аналогичная величина, оцененная для 3СА4 ранее, исходя из теории псевдофазного ионного обмена, по зависимости показателя кажущейся константы ионизации бромфенолового синего от логарифма концентрации ионов Cl^- составляет $\beta(\text{Cl}^-) \leq 0.5$ [189].

При добавлении к растворам обоих исследуемых каликсаренов избытка KNO_3 наблюдалось увеличение концентрации свободных ионов Cl^- . Этот эффект соответствует представлениям о вытеснении из слоя Штерна гидрофильного хлорид-аниона более гидрофобным нитрат-ионом, которое наблюдается и в растворах катионных ПАВ [109]. Обработка ультразвуком не вызывает существенного изменения концентрации свободных ионов Cl^- .

4.1.2.2 Равновесный диализ растворов каликсаренов

Методом диализа можно доказать наличие агрегатов в растворах каликсаренов, а также оценить степень связывания некоторых красителей. При этом предполагаем, что лишь наиболее крупные агрегаты 1СА6 не будут проникать через мембрану.

Так как диализ – достаточно медленный процесс, в течение эксперимента полное равновесие, возможно, не устанавливалось. Для учета этого обстоятельства одновременно проводился диализ «контрольных» растворов, не содержащих каликсаренов. В последнем случае регистрировалось равномерное распределение всех форм красителей во внешнем и внутреннем растворах. В присутствии каликсарена красители распределялись между внутренним и внешним раствором неодинаково, что дало возможность полуколичественно оценить степень их связывания агрегатом $\theta(R_i)$, которая определяется как отношение количества вещества красителя, связанного агрегатами, n_m , к общему количеству вещества n_0 :

$$\theta(R_i) = \frac{n_m}{n_0} = \frac{c_0 - [R](1 + (V_{ex} / V_{in}))}{c_0} \quad (4.4)$$

где $\theta(R_i)$ – степень связывания i -й формы красителя;

$[R_i]$ – равновесная концентрация этой формы во внешнем растворе, определенная спектрофотометрически,

V_{ex} и V_{in} – объемы внешнего и внутреннего (содержащего каликсарен) растворов, соответственно.

Анализируя полученные данные, приведенные в таблице 4.3, можно заключить, что гидрофобный краситель бромфеноловый синий, содержащий 4 атома брома, связывается в большей степени, чем более гидрофильные красители феноловый красный и метиловый оранжевый. Полученные результаты объясняют, в частности, меньший сдвиг спектров поглощения значений pK_a^a метилового оранжевого и фенолового красного при добавлении каликсарена СА6 к водным растворам, по сравнению с бромфеноловым синим [А1].

Таблица 4.3

Степени связывания различных форм простых красителей агрегатами 1СА6 по результатам диализа

Краситель	$\theta(R_i)$, %
Бромфеноловый синий, R^{2-}	89
Бромфеноловый синий, HR^-	77
Феноловый красный, R^{2-}	36
Феноловый красный, HR^-	≈ 0
Метиловый оранжевый, HR^+	42

Таким образом, с помощью комплекса методов было экспериментально доказано наличие агрегатов каликсаренов в водных растворах. Процесс агрегации является, по-видимому, в значительной мере следствием гидрофобного

взаимодействия и в большинстве случаев имеет пороговый характер, что позволяет провести определенную аналогию между агрегацией каликсаренов и мицеллообразованием с участием дифильных молекул ПАВ [32, 174, 220, 252]. В последующих подразделах предпринята попытка с использованием индикаторных красителей выяснить, насколько глубока данная аналогия.

4.2 Кислотно-основные и таутомерные превращения ряда флуоресцеиновых красителей в растворах каликс[6] и каликс[4]аренов разной гидрофобности.

В предыдущих работах, проводимых на кафедре, было проанализировано влияние агрегатов каликсарена СА6 в водных растворах на значения pK_a простых индикаторов зарядного типа $\pm/-$ и $-/=$, диссоциирующих по одной ступени [189, 190]. Как и большинство положительно заряженных коллоидных частиц, агрегаты СА6 сдвигают равновесие в более кислую область. Однако электрокинетический потенциал агрегатов заметно ниже, чем у мицелл катионных ПАВ, и в чистой воде не превышает значения +50 мВ. Для сравнения, аналогичная величина мицелл ПАВ, содержащих четвертичные аммониевые группы (например, ЦТАБ) при ионной силе < 0.05 моль/л составляет приблизительно 90 мВ [231]. Вследствие этого снижение значений pK_a в присутствии таких агрегатов меньше, чем в случае мицелл катионных ПАВ. Для каликсарена 3СА4 ($\zeta = +42$ мВ) уже были выявлены подобные закономерности [190, 191].

Для проведения исследований были выбраны три каликсарена: 1СА6, 3СА4 и 8СА4, которые различаются между собой как размером цикла, так и гидрофобностью. Так как данные вещества уже изучались ранее с применением простых одноосновных индикаторов [189–191, 220], можно сопоставить полученные результаты и попытаться распространить выявленные закономерности на более сложные зонды – флуоресцеиновые красители.

Некоторые ионные формы флуоресцеина, представленные на рисунке 1.2, могут лишь частично связываться агрегатами каликсаренов, и в этом случае

параметры таутомерных превращений будут не вполне отражать свойства микроокружения зонда. Эта неопределенность может быть преодолена, если использовать гидрофобный аналог – *n*-децилфлуоресцеин:

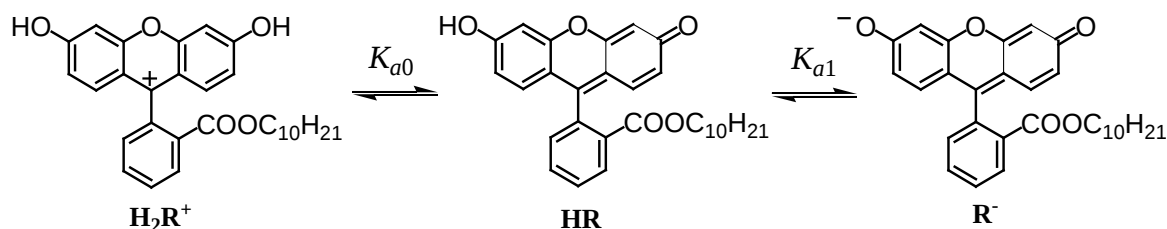


Рисунок 4.4 – Схема ионизации децилфлуоресцеина в растворе

Этот краситель практически нерастворим в воде, и его переход в объемную фазу в изучаемых системах обеспечивается исключительно солюбилизацией агрегатами каликсарена. Это позволяет определить константы ионизации в условиях полного связывания.

В противоположность этому, децилфлуоресцеин, а также некоторые формы флуоресцеина и сульфифлуоресцеина могут частично или полностью находиться в водной фазе, следовательно, значения pK_a^a этих красителей не соответствуют условию полного связывания красителя. Так, для катионных форм следует принять во внимание электростатическое отталкивание положительно заряженными ионными группами каликсарена, а в случае молекул гидрофобных взаимодействий может оказаться недостаточно для полного связывания.

4.2.1 Спектры поглощения флуоресцеиновых красителей и характер их локализации в растворах каликсаренов

Для выяснения особенностей связывания индивидуальных форм красителей были проанализированы положения их полос поглощения в воде и в присутствии агрегатов каликсаренов (табл. 4.4, рис. 4.5 – 4.7). Также для сравнения приведены спектральные характеристики красителей в мицеллярных растворах ЦПХ.

Таблица 4.4

**Положение максимумов полос поглощения и значения коэффициентов
молярного поглощения ионных и молекулярных форм флуоресцеиновых
красителей в истинных и коллоидных водных растворах**

Краситель	Среда	$\lambda_{\max}$, нм ¹ ($\epsilon_{\max} \cdot 10^{-3}$, л·моль ⁻¹ ·см ⁻¹)			
		Дианион	Моно-анион	Нейтральная форма	Катион
Флуоресцеин	Вода ($I \rightarrow 0$) [140]	490.5 (88.0)	454 – 474 (32.7– 33.8)	437 (13.9), 470–475 (3–4)	437 (54.3)
	ЦПХ ($1 \cdot 10^{-3}$ моль/л) ² [140]	504.5 (86.4)	460 (26.2), 490 (30.2)	439, (1.1) 460 (1.2)	438
	1СА6 ($3 \cdot 10^{-3}$ моль/л)	503 (86)	475 (30)	435 (5.6)	438 (62)
	3СА4 ($1 \cdot 10^{-3}$ моль/л)	500 (75)	455 (28), 475 (29)	430 (6.7)	438 (50)
	8СА4 ($1 \cdot 10^{-3}$ моль/л)	506 (100)	458 (23); 486 (23)	436 (0.9)	— ³

¹ Значения $\lambda_{\max}$ крайних форм определялись экспериментально с точностью до 1 нм, спектры промежуточных форм были рассчитаны совместно с константами ионизации.

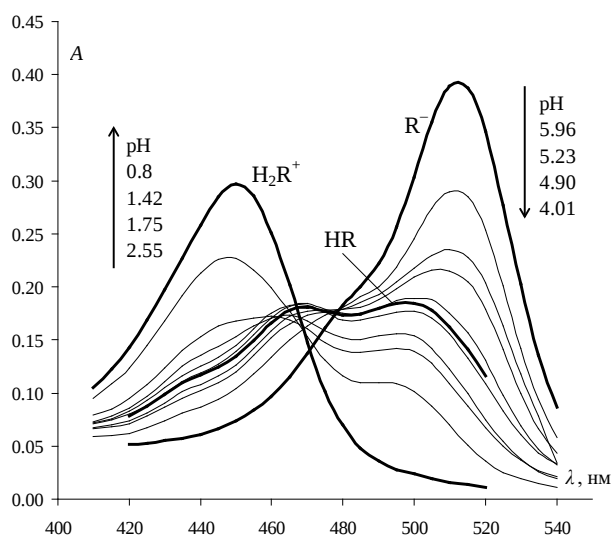
² Если специально не указано, ионная сила системы поддерживалась постоянной ($I = 0.05$ моль/л) добавками NaCl.

³ Достичь полного выхода данной частицы в растворе не удалось, ввиду сдвига соответствующего равновесия в сильноокислую область.

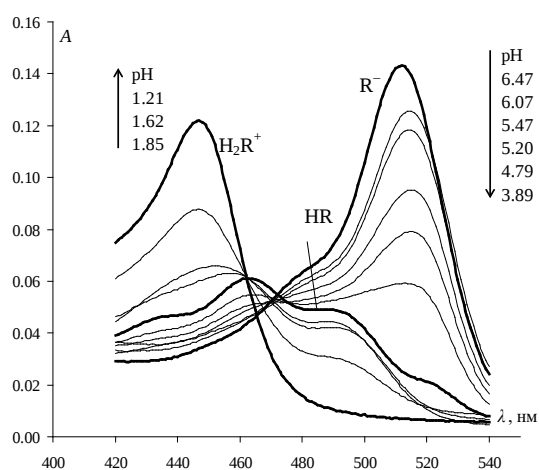
Продолжение таблицы 4.4

Децилфлуоресцеин	Вода ¹ [109]	—	490	450–465	437
	ЦПХ ($1 \cdot 10^{-3}$ моль/л) [253]	—	513	455, 485	447
	ЦПХ ($1 \cdot 10^{-3}$ моль/л, $I = 0.4$ моль/л) [109]	—	516	455, 485	449
	1СА6 ($3 \cdot 10^{-3}$ моль/л)	—	513	470, 495–500	449
	1СА6 ($3 \cdot 10^{-3}$ моль/л, $I = 0.5$ моль/л)	—	513	470, 495–500	449
	3СА4 ($1 \cdot 10^{-3}$ моль/л)	—	511	463	447
	8СА4 ($1 \cdot 10^{-3}$ моль/л)	—	513	462, 491	450
Сульфолфлуоресцеин	Вода [140]	495 (84)	455; 480 (29)	440 (52)	—
	ЦПХ [140]	512	460, 490	445	—
	3СА4 ($1 \cdot 10^{-3}$ моль/л)	510 (71)	458 (29); 481 (27)	442 (52)	—
	8СА4 ($1 \cdot 10^{-3}$ моль/л)	515 (89)	463 (30); 492 (26)	442 (52)	—

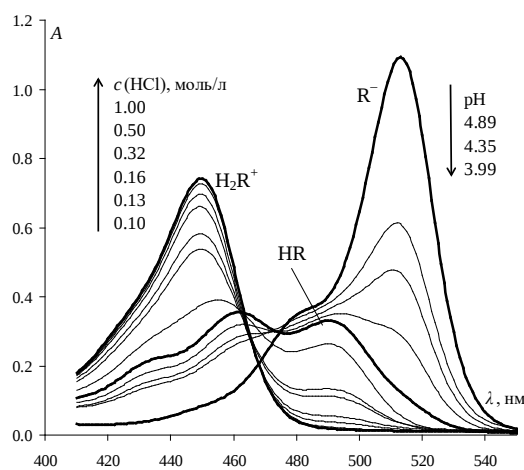
¹ По причине низкой растворимости красителя, для сравнения с соответствующими значениями в воде использовали величины $\lambda_{\max}$ для менее гидрофобного этилфлуоресцеина.



а)



б)



в)

Рисунок 4.5 – Спектры поглощения растворов децилфлуоресцеина при различных значениях pH и индивидуальных форм красителя (жирные линии) в присутствии агрегатов 1CA6 ($3 \cdot 10^{-3}$ моль/л) (а), 3CA4 ($1 \cdot 10^{-3}$ моль/л) (б) и 8CA4 ($1 \cdot 10^{-3}$ моль/л) (в) при постоянной ионной силе 0.05 моль/л (NaCl + компоненты буферного раствора).

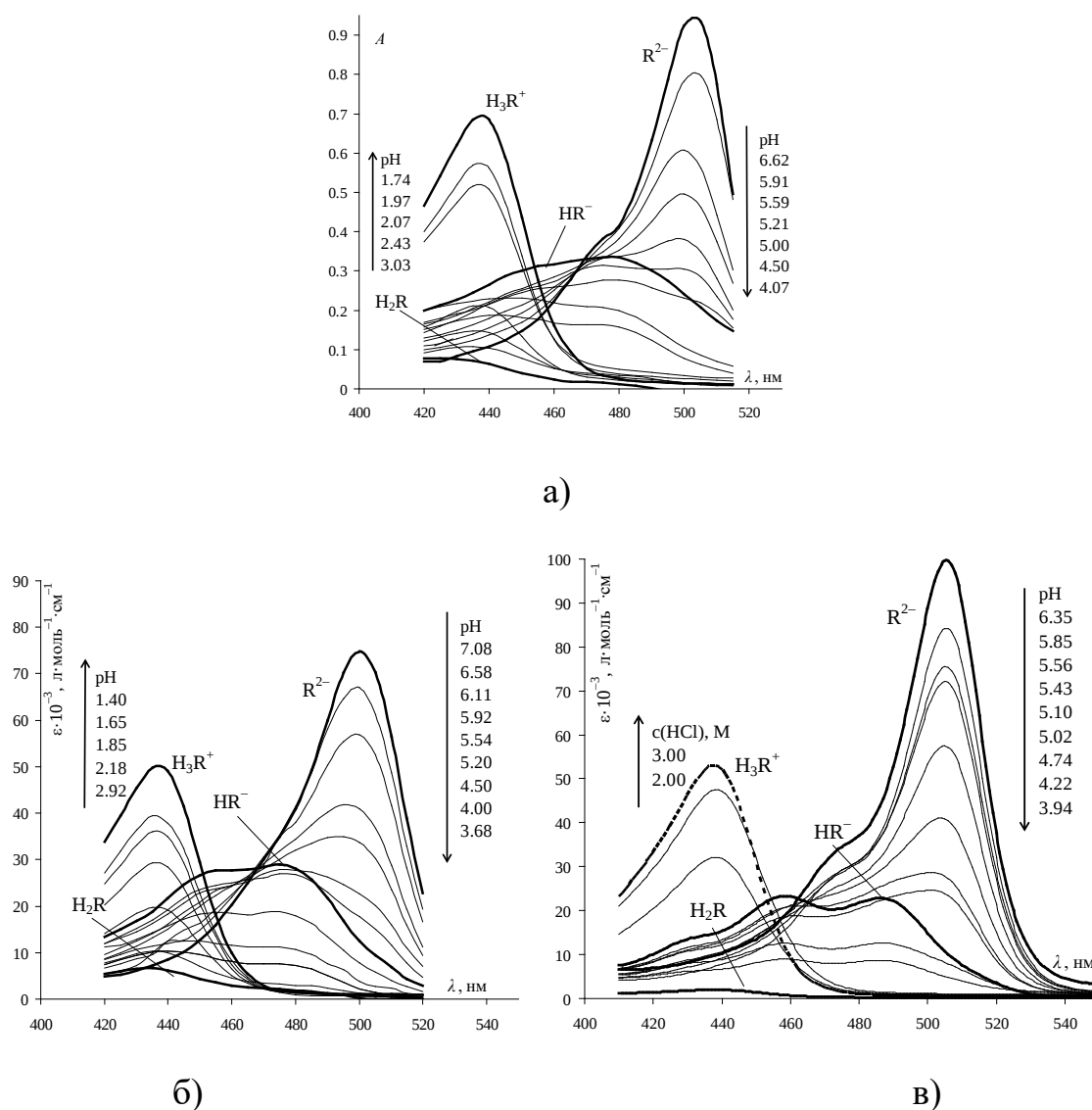


Рисунок 4.6 – Спектры поглощения растворов флуоресцеина при различных значениях pH и индивидуальных форм красителя (жирные линии) в присутствии агрегатов 1CA6 ($3 \cdot 10^{-3}$ моль/л) (а), 3CA4 ($1 \cdot 10^{-3}$ моль/л) (б) и 8CA4 ($1 \cdot 10^{-3}$ моль/л) (в) при постоянной ионной силе 0.05 моль/л (NaCl + компоненты буферного раствора).

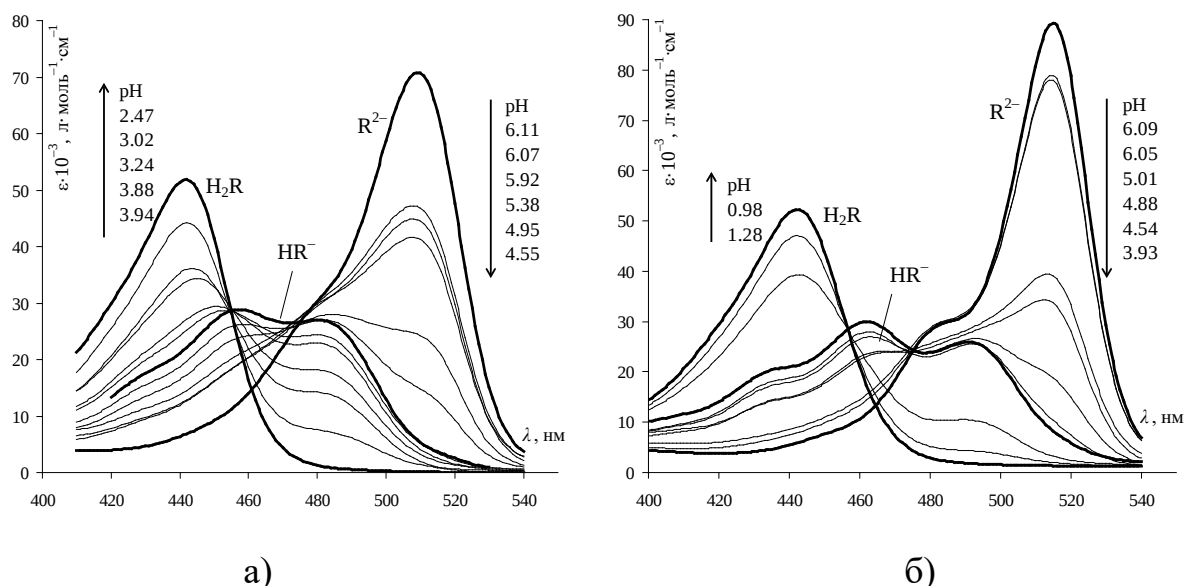


Рисунок 4.7 – Спектры поглощения растворов сульфопфталеина при различных значениях pH и индивидуальных форм красителя (жирные линии) в присутствии агрегатов 3CA4 ($1 \cdot 10^{-3} \text{ моль/л}$) (а) и 8CA4 ($1 \cdot 10^{-3} \text{ моль/л}$) (б) при постоянной ионной силе 0.05 моль/л (NaCl + компоненты буферного раствора).

В случае растворов каликсарена 8CA4 достичь полного выхода крайней кислой формы флуоресцеина не удалось, поэтому, с учетом предположения об отсутствии связывания красителя агрегатами каликсарена, спектр катиона смоделирован спектром H_3R^+ в воде (пунктирная линия на рис. 4.6).

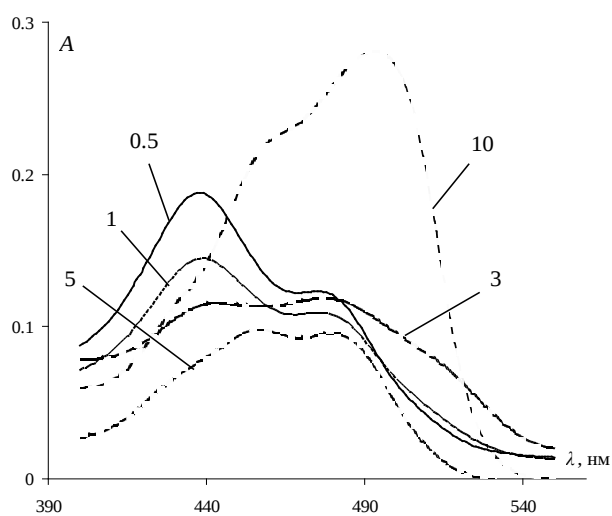
Связывание отрицательно заряженных форм флуоресцеиновых красителей, а также катиона децилфлуоресцеина приводит к батохромному сдвигу их длинноволновых полос поглощения, величина которого составляет 12–26 нм. Отметим, что наибольший сдвиг, немного превышающий даже соответствующее значение в мицеллярных растворах, зафиксирован в присутствии агрегатов 8CA4.

При малых концентрациях каликсарена 3CA4 и 8CA4, сопоставимых с концентрацией красителя, т.е. в присутствии лишь мономерных молекул каликсарена, изменения спектров дианиона флуоресцеина не фиксировались. Это экспериментальное доказательство того, что ксантеновая часть красителя не включается в полость каликсарена. Справедливость последнего утверждения можно доказать, исходя из соответствия размеров полости каликсарена и ксантеновой части красителя [A1].

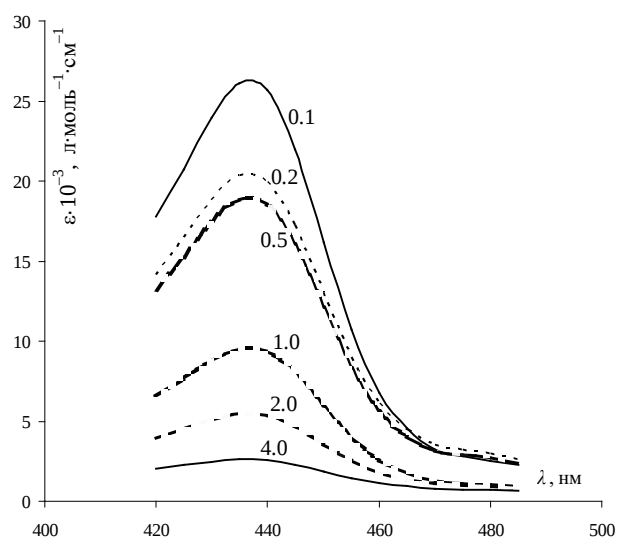
Катион флуоресцеина, положение полосы поглощения которого нечувствительно к наличию каликсаренов в растворе, по всей видимости, находится преимущественно в несвязанном состоянии, т.е. остается в водной фазе.

Для проверки полноты связывания частицы H_2R флуоресцеина дополнительно была исследована зависимость спектров поглощения растворов красителя от концентрации каликсаренов в области преобладания нейтральной формы при $\text{pH} \approx 3 - 2$ (рис. 4.8). В этом случае, если значения констант ионизации K_{a1} и K_{a0} близки, на форму спектра, кроме таутомерного состава, оказывают влияние примеси сильно поглощающих частиц H_3R^+ и HR^- . Однако увеличение разности этих констант ионизации коррелирует с ростом доли лактонного нейтрального таутомера и характерно для красителей, находящихся в менее гидратированном микроокружении [231, 253]. Поэтому тот факт, что форма спектра не зависит от концентрации каликсарена, можно рассматривать как критерий полноты связывания красителя в этих условиях. Обратное утверждение, впрочем, может быть и неверным, т. к. при изменении концентрации возможны структурные перестройки агрегатов, что также приводит к изменению характеристик микроокружения связанного индикатора.

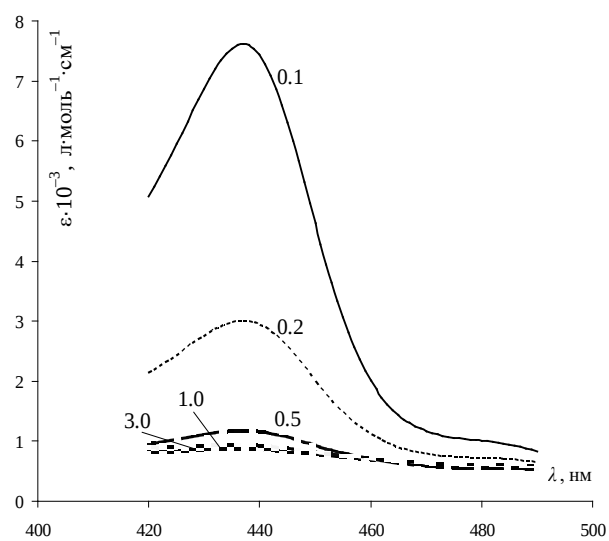
Полоса поглощения нейтральной молекулы флуоресцеина размыта, интенсивность ее мала, а форма сильно зависит от микроокружения красителя. Причиной этого может быть изменение таутомерного состава частицы H_2R при переходе от воды к растворам каликсаренов: увеличения доли бесцветной лактонной формы H_2L и уменьшения доли цвиттерионной $\text{H}_2\text{Z}^{\pm}$ (рис. 1.2). Подробнее этот вопрос рассмотрен в подразделе 4.2.3.



а)



б)



в)

Рисунок 4.8 – Спектры поглощения растворов флуоресцеина в присутствии 1СА6 при рН = 3.30 (а), 3СА4 при рН = 3.20 (б), 8СА4 при рН = 2.20 (в). Числа на графике соответствуют концентрации каликсаренов, в ммоль/л.

Как видно из рисунка 4.8, значительное обесцвечивание растворов в исследуемой области pH наблюдается лишь в случае каликсарена 8CA4, при этом, начиная с концентрации каликсарена $5 \cdot 10^{-4}$ моль/л и выше, спектры исследуемых растворов практически совпадают. Это подтверждает сходство изученной системы с мицеллярными растворами катионных ПАВ и свидетельствует о полном связывании нейтральной формы флуоресцеина агрегатами 8CA4. В растворах каликсаренов 1CA6 и 3CA4, не имеющих длинных углеводородных радикалов, указанные тенденции выражены слабее, что позволяет сделать вывод о значительной гидратированности микроокружения репортерной молекулы.

4.2.2 Влияние агрегатов каликсаренов на константы ионизации флуоресцеиновых красителей

Кажущиеся константы ионизации красителей вычислены, исходя из зависимостей поглощения от pH среды при нескольких наиболее информативных длинах волн (вблизи максимумов спектров поглощения ионных форм). Примеры таких зависимостей изображены на рисунке 4.9.

Полученные значения констант ионизации представлены в таблице 4.5, откуда видно, что присутствие агрегатов каликсаренов, так же как и мицелл ЦПХ, приводит к смещению всех равновесий в более кислую область, по сравнению с водной фазой. Разброс величин $\Delta pK_a^a = pK_a^a - pK_a^w$ составляет от -0.18 до -2.00 в растворах каликсарена 1CA6, от -0.15 до -1.74 в растворах 3CA4, и от -0.27 до 2.5 в растворах 8CA4.

Качественно снижение значений pK_a^a можно объяснить наличием аммониевых групп в молекулах каликсаренов, что обуславливает положительный заряд поверхности агрегатов. В случае полного связывания (для децилфлуоресцеина, а также анионов двух других красителей) оно описывается уравнением (1.8). Для остальных равновесий следует принимать во внимание еще и неполное связывание нейтральных и катионных форм. Действительно,

соответствующие значения ΔpK_a^a для этих двух красителей, как правило, меньше, чем для децилфлуоресцеина.

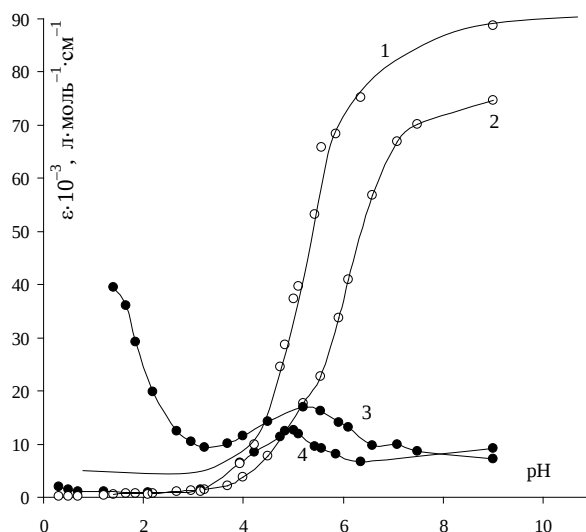


Рисунок 4.9 — Зависимость коэффициента молярного поглощения флуоресцеина от кислотности среды при 500 нм (1, 2) и 435 нм (3, 4) в присутствии 3СА4 (2, 3) и 8СА4 (1, 4).

Первое слагаемое уравнения (1.8) характеризует преимущественную стабилизацию какой-либо формы красителя в псевдофазе и может давать как положительный, так и отрицательный вклад в значение ΔpK_a^a . В нашем случае, особенно для каликсарена 8СА4, отмечается типичное для мицеллярных растворов ПАВ и неводных растворителей расхождение значений pK_{a1}^a и pK_{a0}^a . Это объясняется стабилизацией нейтральной формы и сдвигом таутомерных равновесий флуоресцеина (подробнее это явление будет рассмотрено в следующем разделе). Для децилфлуоресцеина вклады первого и последнего слагаемого уравнения (1.8) нивелируются для ΔpK_{a1}^a и складываются для ΔpK_{a0}^a , поэтому во всех изученных системах pK_{a0}^a децилфлуоресцеина уменьшается сильнее.

Таблица 4.5

Показатели кажущихся констант ионизации флуоресцеиновых красителей в истинных и коллоидных водных растворах при ионной силе 0.05 моль/л

Краситель	Среда	pK_{a2}^a	pK_{a1}^a	pK_{a0}^a
Флуоресцеин	Вода ($I \rightarrow 0$) [140]	6.80 ± 0.01	4.45 ± 0.02	2.14 ± 0.01
	ЦПХ ($1 \cdot 10^{-3}$ моль/л) ¹ [140]	5.54 ± 0.11	3.60 ± 0.05	0.98 ± 0.06
	1СА6 ($3 \cdot 10^{-3}$ моль/л)	5.93 ± 0.12	4.17 ± 0.11	1.96 ± 0.10
	3СА4 ($1 \cdot 10^{-3}$ моль/л)	6.19 ± 0.02	4.30 ± 0.07	1.89 ± 0.01
	8СА4 ($1 \cdot 10^{-3}$ моль/л)	5.33 ± 0.01	4.18 ± 0.03	< 0
Децилфлуоресцеин	Вода ² [109]	—	6.31 ± 0.03	2.94 ± 0.07
	ЦПХ ($1 \cdot 10^{-3}$ моль/л) [253]	—	4.92 ± 0.07	0.79 ± 0.1
	ЦПХ ($1 \cdot 10^{-3}$ моль/л, $I = 0.4$ моль/л) [109]	—	5.52 ± 0.02	1.32 ± 0.01
	1СА6 ($3 \cdot 10^{-3}$ моль/л)	—	5.65 ± 0.07	0.94 ± 0.09
	1СА6 ($3 \cdot 10^{-3}$ моль/л, $I = 0.5$ моль/л)	—	6.20 ± 0.06	1.24 ± 0.03
	3СА4 ($1 \cdot 10^{-3}$ моль/л)	—	5.26 ± 0.03	1.20 ± 0.02
	8СА4 ($1 \cdot 10^{-3}$ моль/л)	—	4.76 ± 0.04	≈ 0.4
Сульфифлуоресцеин	Вода [140]	6.76 ± 0.03	3.22 ± 0.11	—
	ЦПХ ($1 \cdot 10^{-3}$ моль/л) [140]	5.46 ± 0.07	0.9 ± 0.1	—
	3СА4 ($1 \cdot 10^{-3}$ моль/л)	5.83 ± 0.01	3.02 ± 0.01	—
	8СА4 ($1 \cdot 10^{-3}$ моль/л)	5.22 ± 0.01	1.49 ± 0.02	—

¹ Если специально не указано, ионная сила системы поддерживалась постоянной ($I = 0.05$ моль/л) добавками NaCl.

² По причине низкой растворимости красителя, для сравнения с соответствующими значениями в воде использовали величины pK_{a1}^a для менее гидрофобного этилфлуоресцеина.

Строго говоря, уравнение (1.8) неприменимо к неполностью связанным формам красителя (например, к катиону флуоресцеина или нейтральной форме сульфифлуоресцеина). Можно ожидать, что в этом случае значения pK_a^a более близки к «водным», чем это предсказывается уравнением (1.8). Поэтому уменьшение pK_{a0}^a децилфлуоресцеина более существенно, чем pK_{a0}^a флуоресцеина. В последнем случае уменьшение показателя константы обусловлено в первую очередь стабилизацией формы H_2R , а не влиянием поверхностного потенциала.

Увеличение ионной силы приводит к экранированию поверхностного заряда агрегатов, снижению Ψ и, как результат, значения pK_a^a децилфлуоресцеина при увеличении ионной силы снижаются. Эта тенденция является общей для всех катионных агрегатов и отчетливо выражена для мицелл ПАВ [109]. Количественно интерпретировать этот эффект удастся не всегда, так как следует принять во внимание возможные структурные трансформации агрегатов при добавлении электролита. Однако это явление позволяет сделать важное заключение о том, что заряженные группы каликсарена СА6 локализируются преимущественно на поверхности агрегата, хотя, судя по значениям электрокинетического потенциала, поверхностный заряд значительно меньше, чем в катионных мицеллах.

Последняя ступень ионизации, приводящая к образованию крайних щелочных форм красителей, соответствует отщеплению протона от гидроксильной группы ксантеновой части красителей. Для флуоресцеина и сульфифлуоресцеина этот процесс характеризуется значением pK_{a2}^a , которое следует сравнивать со значением pK_{a1}^a децилфлуоресцеина. Однако наличие дополнительного заряда затрудняет ионизацию, и значения pK_{a2}^a флуоресцеина, совпадающие с соответствующими показателями константы ионизации сульфифлуоресцеина, превышают величины pK_{a1}^a децилфлуоресцеина. Их

разность зависит от эффективной диэлектрической проницаемости в соответствии с теорией Бьеррума – Кирквуда – Вестхаймера [226] (уравнение (3.1)).

В растворе ЦПХ и каликсарена 8СА4 значения δpK_a совпадают и превышают значения δpK_a^w (0.57 и 0.49 соответственно) Для каликсарена 1СА6 тенденция противоположна. Возможно, это является следствием более выраженной гидратированности микроокружения красителей-зондов или/и характера их локализации вблизи заряженных групп в агрегатах СА6.

Как видно из таблицы 4.6, при переходе индикаторов из воды в псевдофазу мицелл ЦПХ и агрегатов 8СА4 происходит приблизительно одинаковое для всех красителей увеличение силы гидроксильной группы, не зависящее ни от гидрофобности красителей, ни от природы заместителя на бензольном фрагменте, а обусловленное только различием структуры агрегатов. Из этого факта можно сделать вывод об однородности микроокружения зондов, связанных агрегатами этого типа. Этот же вывод распространяется и на агрегаты каликсарена 1СА6.

Таблица 4.6

**Сдвиги показателей констант ионизации гидроксильной группы
флуоресцеиновых красителей в коллоидных водных растворах**

Среда Краситель	ЦПХ	1СА6	3СА4	8СА4
Флуоресцеин, ΔpK_{a2}^a	-1.26 ± 0.12	-0.87 ± 0.13	-0.61 ± 0.03	-1.47 ± 0.02
Децилфлуоресцеин, ΔpK_{a1}^a	-1.39 ± 0.10	-0.66 ± 0.10	-1.05 ± 0.05	-1.55 ± 0.07
Сульфифлуоресцеин, ΔpK_{a2}^a	-1.30 ± 0.10	—	-0.93 ± 0.04	-1.54 ± 0.04

В случае флуоресцеина значения pK_{a1}^a и pK_{a0}^a не соответствуют ионизации какой-либо одной функциональной группы, а являются функциями от

показателей соответствующих микроконстант. Поэтому для количественного описания наблюдаемых изменений pK_a^a , помимо неполноты связывания некоторых форм красителя, необходимо учесть различную степень стабилизации таутомерных форм.

4.2.3 Таутомерные превращения флуоресцеина в присутствии агрегатов каликсаренов

Нейтральная форма флуоресцеина существует в виде трех таутомеров, соотношение которых может существенно меняться с изменением характеристик среды [39, 109]. Этим обусловлены изменения формы спектра частицы H_2R в различных средах (рис. 4.10).

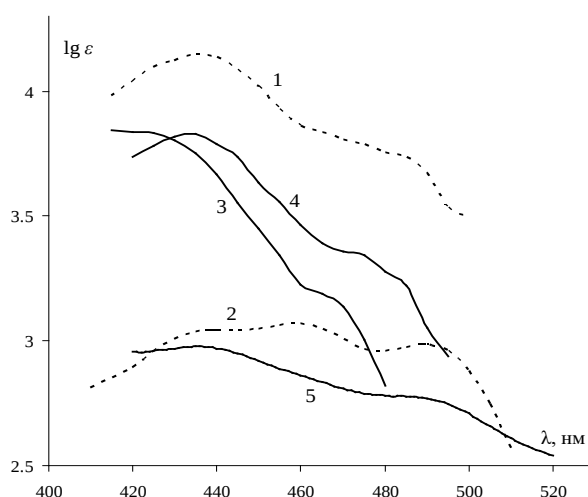


Рисунок 4.10 – Спектры поглощения нейтральной формы флуоресцеина в воде при ионной силе 0.02 моль/л (1), растворе ЦПХ ($1 \cdot 10^{-3}$ моль/л) (2), 1СА6 ($3 \cdot 10^{-3}$ моль/л) (3), 3СА4 ($1 \cdot 10^{-3}$ моль/л) (4) и 3СА4 ($1 \cdot 10^{-3}$ моль/л) (5) при ионной силе 0.05 моль/л NaCl + компоненты буферного раствора).

Так, присутствие в растворе агрегатов ЦПХ и каликсарена 8СА4 приводит к сильному обесцвечиванию растворов, что связано с увеличением доли лактонного таутомера H_2L . О наличии в системе ощутимых количеств цвиттерионного таутомера $H_2Z^{\pm}$ свидетельствует выраженный максимум при 435 – 440 нм,

который проявляется в водных растворах, а также, в меньшей степени, в растворах каликсаренов 1СА6 и 3СА4.

Оцененные, исходя из спектра нейтральной формы, значения мольных долей различных таутомеров, а также показателей микроконстант ионизации представлены в таблице 4.7. Величины pK_i оценивали по уравнениям, аналогичным (3.4) – (3.7), учитывая также, что $pK_{2,OH} = pK_{a2}$.

Таблица 4.7

Мольные доли таутомеров нейтральной формы и показатели микроконстант флуоресцеина в коллоидных водных растворах

Среда	$\alpha_{H_2Z^+}$	α_{H_2Q}	α_{H_2L}	$pK_{2,OH}$	$pK_{1,COOH}$	$pK_{1,Z}$	$pK_{0,OH}$	$pK_{\pm,COOH}$
Вода ($I \rightarrow 0$) [140]	0.22	0.11	0.67	6.80	3.49	3.79	3.10	2.80
ЦПХ ($1 \cdot 10^{-3}$ моль/л) [140]	≈ 0	0.04	0.96	5.54	2.2	(0.9) ¹	2.39	(2.48) ²
1СА6 ($3 \cdot 10^{-3}$ моль/л)	0.11	0.01	0.88	5.85	2.10	2.99	3.75	2.86
3СА4 ($1 \cdot 10^{-3}$ моль/л)	0.11	0.06	0.83	6.19	3.06	3.36	3.13	2.83
8СА4 ($1 \cdot 10^{-3}$ моль/л)	0.01	0.03	0.96	5.33	2.61	3.03	—	—

¹ Так как для данного красителя величина микроконстанты не была определена, значение было смоделировано показателем соответствующей константы (pK_{a1}^a) сульфифлуоресцеина.

² Величина смоделирована показателем соответствующей константы для *N,N*-диоктадецилпроламида [109].

Как и в случае мицелл катионных ПАВ [98], наличие агрегатов каликсаренов дестабилизирует хиноидную форму **H₂Q** флуоресцеина, в то время как доля лактонной формы **H₂L** значительно увеличивается. Однако для каликсаренов 1СА6 и 3СА4 этот эффект все же меньше, чем для мицелл ЦПХ и каликсарена 8СА4.

Показатели микроконстант флуоресцеина, соответствующие превращению нейтральной формы в моноанион, в агрегатах каликсаренов уменьшаются по сравнению с водной средой. Наблюдаемые эффекты совпадают по знаку с соответствующим влиянием мицеллярных растворов катионных ПАВ, однако не превышают их по абсолютной величине. Величины $pK_{0,OH}$ и $pK_{\pm,COOH}$ описывают равновесия в условиях неполного связывания красителя агрегатами, поэтому их снижение наблюдается не столь отчетливо. Это подтверждается также тем фактом, что сдвиг величины pK_{a0}^a децилфлуоресцеина, соответствующей $pK_{0,OH}$, достигает довольно больших значений: от -1.74 в растворе каликсарена 3CA4 до -2.54 в растворе каликсарена 8CA4.

Модифицируя уравнение (1.8), можно оценить вклад сдвига таутомерных равновесий на изменение констант ионизации. Так, предполагая, что катион флуоресцеина, в противоположность остальным формам, находится в несвязанном состоянии, приходим к уравнениям (4.5) и (4.6):

$$\Delta pK_{a1}^a = \lg \frac{\gamma_V}{\gamma_{III}} - \Delta \lg \alpha_{III} - \frac{\Psi F}{2.3RT} \quad (4.5)$$

$$\Delta pK_{a0}^a = \lg \gamma_{III} + \Delta \lg \alpha_{III} \quad (4.6)$$

Следовательно, снижение значений pK_{a1}^a и pK_{a0}^a , помимо поверхностного потенциала, зависят еще и от уменьшения доли таутомера **H₂Q**, который при связывании псевдофазой агрегата

В порядке уменьшения влияния на протолитические равновесия красителей изученные агрегаты каликсаренов можно расположить следующим образом: $8CA4 \geq ЦПХ > 1CA6 \approx 3CA4$. Следовательно, среди этих трех каликсаренов, лишь агрегаты наиболее гидрофобного каликсарена, модифицированного октильными группами, в полной мере воспроизводят свойства мицелл катионных ПАВ.

4.3 Влияние агрегатов катионных дифильных соединений на процессы поглощения и испускания света производных флуоресцеина

Флуоресценция является весьма важным явлением, позволяющим изучать особенности различных супрамолекулярных агрегатов [82, 133, 141, 177]. Это происходит благодаря тому, что параметры флуоресценции красителей особенно чувствительны к характеристикам микроокружения флуоресцентных зондов, таких как полярность, вязкость и др. [254]. В этом подразделе описаны особенности агрегатов каликсаренов с точки зрения их влияния на процессы испускания света депротонированными формами двух производных флуоресцеина: децилфлуоресцеина и аминофлуоресцеина.

4.3.1 Флуоресценция анионной формы децилфлуоресцеина в растворах каликсаренов

Как уже отмечалось в подразделе 4.2, децилфлуоресцеин полностью связывается псевдофазой агрегатов, что приводит к сдвигу максимума полосы поглощения и флуоресценции в сторону больших длин волн, по сравнению с соответствующими значениями для модельного соединения этилфлуоресцеина в воде на 21 – 28 нм (табл. 4.8, рис. 4.11).

Существенные различия в свойствах агрегатов каликсаренов проявляются в их влиянии на интенсивность флуоресценции децилфлуоресцеина (табл. 4.8). Так, среди изученных каликсаренов наибольший квантовый выход флуоресценции фиксируется при связывании красителя агрегатами наиболее гидрофобного 8CA4, тогда как агрегаты 1CA6 заметно тушат флуоресценцию. Интенсивность флуоресценции децилфлуоресцеина в агрегатах 3CA4 практически совпадает с аналогичной величиной в мицеллах ЦТАБ.

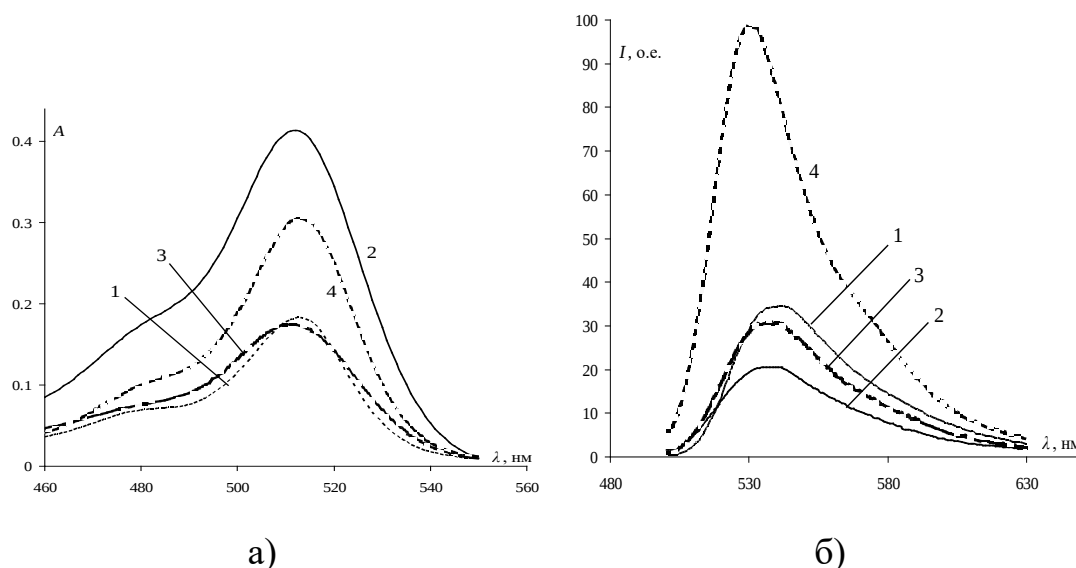


Рисунок 4.11 – Спектры поглощения (а) и флуоресценции (б) аниона децилфлуоресцеина в мицеллярном растворе ЦТАБ ($3 \cdot 10^{-3}$ моль/л) (1), 1СА6 ($1 \cdot 10^{-3}$ моль/л) (2), 3СА4 ($3 \cdot 10^{-3}$ моль/л) (3), 8СА4 ($1 \cdot 10^{-3}$ моль/л) (4) (концентрация красителя в разных растворах не одинакова).

Таблица 4.8

Положения максимумов спектров поглощения и флуоресценции, а также квантовые выходы флуоресценции депротонированной формы децилфлуоресцеина в коллоидных растворах

Система	Поглощение	Флуоресценция	
	$\lambda_{\text{max}} \pm 1, \text{ нм}$	$\lambda_{\text{max}} \pm 2, \text{ нм}$	$\varphi \pm 0.5, \%$
Вода ¹	490	514	79.6
ЦТАБ ($3 \cdot 10^{-3}$ моль/л)	513	542	48.6
1СА6 ($1 \cdot 10^{-3}$ моль/л)	512	536	6.5
3СА4 ($3 \cdot 10^{-3}$ моль/л)	511	538	51.6
8СА4 ($1 \cdot 10^{-3}$ моль/л)	513	538	92.7

¹ По причине низкой растворимости красителя, для сравнения с соответствующими значениями в воде использовали спектральные характеристики менее гидрофобного водорастворимого этилфлуоресцеина.

Возгорание флуоресценции может быть вызвано снижением полярности среды, а также увеличением жесткости микроокружения. Следовательно, если предположить, что краситель локализуется в слое Штерна, то можно заключить, что наиболее компактная и плотная структура его наблюдается в агрегатах 8СА4. Последнее утверждение справедливо также для агрегатов 3СА4, которые проявляют сходство с мицеллами катионных ПАВ.

4.3.2 Спектральные характеристики дианионов 4'- и 5'-аминофлуоресцеина

Как было показано в подразделе 3.4, процессы внутримолекулярного тушения флуоресценции дианиона аминофлуоресцеина чувствительны к микроокружению красителя. Возгорание флуоресценции аминофлуоресцеина при связывании его агрегатами обусловлено преимущественно двумя однонаправленными действующими факторами: увеличением «жесткости» микроокружения красителя, а также уменьшением тушащего влияния аминогруппы, вследствие дефицита водородных связей. Если действие первого фактора может влиять на флуоресцентные свойства ряда других производных флуоресцеина (например, децилфлуоресцеин, п. 4.3.1), то нивелирование действия аминогруппы при изменении характеристик среды является специфической особенностью аминофлуоресцеина. Это дает основания предполагать, что эти индикаторы могут оказаться более перспективным для исследования различных супрамолекулярных ансамблей, чем другие флуоресцеиновые красители.

Последний тезис был подтвержден при исследовании «классических» мицеллярных сред различных видов ПАВ: катионного (ЦТАБ), цвиттерионного (ЦДАПС), а также содержащих две алкильные группы (ДТДДАБ) и гемини-ПАВ (16 – 4 – 16) (рис. 4.12, табл. 4.9). Отметим, что наличие нескольких гидрофобных у групп двух последних ПАВ придает им большее структурное сходство с гидрофобными каликсаренами 8СА4 и 12 СА4.

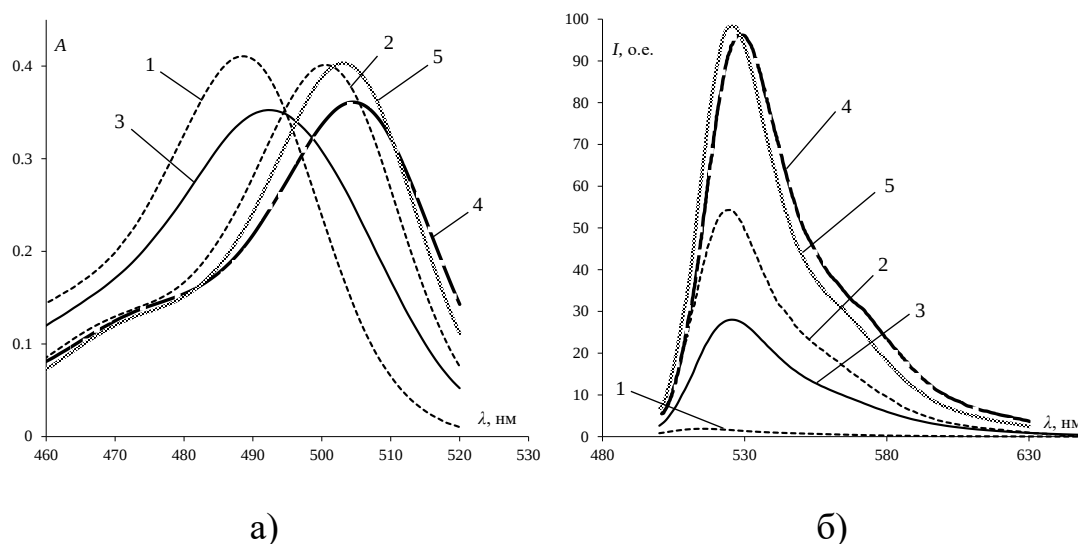


Рисунок 4.12 – Спектры поглощения (а) и флуоресценции (б) дианиона 4'-аминофлуоресцеина в воде (1) и мицеллярных растворах ЦТАБ ($3 \cdot 10^{-3}$ моль/л) (2), ЦДАПС ($1.5 \cdot 10^{-3}$ моль/л) (3), ДТДДАБ ($5 \cdot 10^{-4}$ моль/л) (4), гемини-ПАВ ($5 \cdot 10^{-4}$ моль/л) (5).

Все виды катионных мицелл вызывают bathochromic shift полос поглощения и флуоресценции изомеров аминфлуоресцеина, величина которого незначительно зависит от количества алкильных групп и от строения ПАВ, что является свидетельством связывания красителей в этих условиях.

В случае цвиттерионного ЦДАПС величины $\Delta\lambda_{\max}$ 4'- аминфлуоресцеина меньше, в растворах катионных ПАВ, что, вероятно, является следствием неполного связывания индикатора. При изменении концентрации ЦДАПС от $1.5 \cdot 10^{-3}$ до $1.5 \cdot 10^{-2}$ моль/л $\lambda_{\max}$ поглощения 4'- аминфлуоресцеина увеличивается от 491 до 499 нм. Это подтверждает предположение о том, что дианион красителя в этих условиях связывается не полностью, т.к. происходит ослабление электростатического притяжения из-за влияния отрицательно заряженной сульфонатной группы.

Таблица 4.9

**Положения максимумов спектров поглощения и флуоресценции дианионов
изомеров 4'-аминофлуоресцеина / 5'-аминофлуоресцеина и квантовые
выходы флуоресценции красителей в коллоидных растворах**

Система	Поглощение	Флуоресценция	
	$\lambda_{\max} \pm 2$, нм	$\lambda_{\max} \pm 2$, нм	$\varphi \pm 0.5$, %
Вода	488 / 488	518 / 518	0.6 / 0.8
ЦТАБ ($3 \cdot 10^{-3}$ моль/л)	500 / 500	526 / 528	8.3 / 18
ЦТАБ ($3 \cdot 10^{-3}$ моль/л) + бензоат калия (0.01 моль/л)	498 / 494	526 / 526	6.7 / –
ЦТАБ ($3 \cdot 10^{-3}$ моль/л) + гидросалицилат натрия (0.01 моль/л)	488 / 488	520 / 520	0.8 / –
ЦТАБ ($3 \cdot 10^{-3}$ моль/л) + KCl (4 моль/л)	490 / 490	526 / 526	1.5 / –
ЦДАПС ($1.5 \cdot 10^{-3}$ моль/л)	492 / –	526 / –	–
ДТДДАБ ($5 \cdot 10^{-4}$ моль/л)	504 / –	528 / –	22 / –
Гемини-ПАВ ($5 \cdot 10^{-4}$ моль/л)	502 / –	526 / –	20 / –
Дендример 1 ($1 \cdot 10^{-4}$ моль/л)	498 / 498	526 / 526	0.7 / –
Дендример 2 ($4 \cdot 10^{-4}$ моль/л)	502 / 502	528 / 528	7.1 / –
1СА6 ($3 \cdot 10^{-3}$ моль/л)	498 / 498	522 / 524	0.7 / 0.8
3СА4 ($2 \cdot 10^{-3}$ моль/л)	500 / 498	526 / 528	3.2 / 4.4
6СА4 ($1 \cdot 10^{-3}$ моль/л)	502 / –	524 / –	6.9 / –
8СА4 ($5 \cdot 10^{-4}$ моль/л)	504 / 504	528 / 528	17 / 26
12СА4 ($4 \cdot 10^{-4}$ моль/л)	504 / –	528 / –	7.1 / –

В растворах ЦТАБ домицеллярных концентраций изменений спектров поглощения и флуоресценции, по сравнению с водной средой, не происходит. Из этого можно сделать вывод об отсутствии существенных взаимодействий между красителем и мономерными молекулами ПАВ. В растворах ЦТАБ с концентрациями, превышающими ККМ (в растворе NaOH значение ККМ составляет $5 \cdot 10^{-4}$ моль/л), интенсивность флуоресценции практически не зависит от концентрации ПАВ.

Наибольшее возгорание флуоресценции наблюдается при связывании красителя мицеллами ДТДДАБ и гемини-ПАВ: в этом случае происходит увеличение квантового выхода флуоресценции приблизительно в 30 раз, по сравнению с водной средой, в то время как наличие мицелл ЦТАБ приводит лишь к 20-кратному увеличению значения ϕ (табл. 4.9). Относительно малое увеличение интенсивности флуоресценции в растворах ЦДАПС можно объяснить неполным связыванием красителя.

В предыдущих работах было показано, что структурные перестройки мицелл, приводящие к образованию анизотропных агрегатов, также как и экранирование поверхностного заряда, значительно влияют на спектральные свойства некоторых сольватохромных бетаиновых красителей [255]. Это интерпретируется как проявление вытеснения крупных по размеру дипольных молекул на периферию мицелл катионных ПАВ, которые под действием добавок тозилат-, гидросалицилат-, бензоат- и многих других органических и неорганических ионов перестраиваются в анизометричные структуры [255].

Для того, чтобы выяснить, соблюдается ли это в случае аминифлуоресцеиновых красителей, были исследованы флуоресцентные свойства красителей в растворах ЦТАБ с добавками гидросалицилат- и бензоат-ионов. Ранее было обнаружено, что добавки этих ионов приводят к изменению формы катионных мицелл от сферической к цилиндрической [256–258]. Как показано на рисунке 4.13, в присутствии KCl высокой концентрации, а также гидросалицилат-иона спектры поглощения и флуоресценции 4'- и 5'- аминифлуоресцеина мало отличаются от соответствующих спектров в воде, влияние бензоат-иона выражено

слабее. Аналогичные закономерности регистрировались также в предыдущих работах, где в качестве зондов применялись бетаиновые красители [255]. Таким образом, можно заключить, что в случае изомеров аминифлуоресцеина также происходит вытеснение красителя в более гидратированную область.

Учитывая, что возгорание флуоресценции аминифлуоресцеина происходит в средах с дефицитом водородных связей, можно сделать заключение о существовании ограниченного гидрофобного ядра в мицеллах катионных ПАВ и о меньшей гидратированности микроокружения аминифлуоресцеина при связывании его мицеллами ДТДДАБ и гемини-ПАВ, по сравнению с мицеллами ЦТАБ.

Также, помимо классических мицеллярных растворов, была исследована аналогичная система – суспензия наночастиц кремнезема, покрытых бислоем ЦТАБ. Эти частицы также обнаружили способность влиять на протолитические и спектральные свойства некоторых красителей [20, 138]. Однако в условиях эксперимента наличие этих частиц не вызвало существенного сдвига полос поглощения и флуоресценции (рис. 4.13). Обращает на себя внимание некоторое уширение полосы поглощения 4'-аминифлуоресцеина в присутствии модифицированных наночастиц кремнезема, что может свидетельствовать о множественности мест локализации красителя в системе. Возгорания флуоресценции дианионов аминифлуоресцеина не наблюдается.

Отметим, что положение аминогруппы, расположенной вне ксантенового хромофора, не сказывается существенно на спектральных свойствах аминифлуоресцеина. Следовательно, можно предположить, что при выявлении различий между супрамолекулярными агрегатами спектральные свойства 4'- и 5'-аминифлуоресцеина будут изменяться схожим образом, что и подтверждается экспериментальными данными. Таким образом, возгорание флуоресценции дианиона аминифлуоресцеина можно использовать как критерий сходства классических немодифицированных мицелл ПАВ и других мицеллоподобных агрегатов, в частности, для решения вопроса о характере агрегатов катионных каликсаренов.

В растворах исследуемых каликсаренов полосы поглощения и флуоресценции дианионов 4'- и 5'-аминофлуоресцеина претерпевают сдвиг в сторону бóльших относительно водных растворов (табл. 4.9, рис. 4.14). Величина $\Delta\lambda_{\text{max}}$ коррелирует с длиной алкильной группы каликсаренов и при переходе от 1СА6 до 12СА4 увеличивается от 10 до 16 нм для спектров поглощения и от 4 до 10 нм для спектров флуоресценции. Этот факт является экспериментальным подтверждением связывания дианионов агрегатами.

Существенные различия между каликсаренами разной гидрофобности проявляются в их влиянии на интенсивность флуоресценции дианиона. Так, наибольший квантовый выход флуоресценции, который по величине приближается к соответствующему значению в мицеллах ДТДДАБ и гемини-ПАВ 16 – 4 – 16, регистрируется в случае агрегатов 8СА4. Значительное возгорание флуоресценции наблюдается также в растворах других достаточно гидрофобных каликсаренов: 12СА4 и 6СА4.

Обращает на себя внимание немонотонность изменения квантового выхода флуоресценции с увеличением длины алкильной группы, а именно уменьшение значения φ в растворах каликсарена 12СА4, по сравнению с растворами 8СА4.

Наличие в растворе каликсарена 1СА6 не вызывает увеличения квантового выхода флуоресценции дианиона 4'-аминофлуоресцеина в диапазоне концентраций $(3-30) \cdot 10^{-3}$ моль/л. Для каликсарена 3СА4, напротив, увеличение концентрации от $3 \cdot 10^{-4}$ до $2 \cdot 10^{-3}$ моль/л приводит к 4–5-кратному возрастанию интенсивности флуоресценции 4'-аминофлуоресцеина, что также иллюстрирует различия между характером взаимодействия с мономерными молекулами каликсарена и агрегатом.

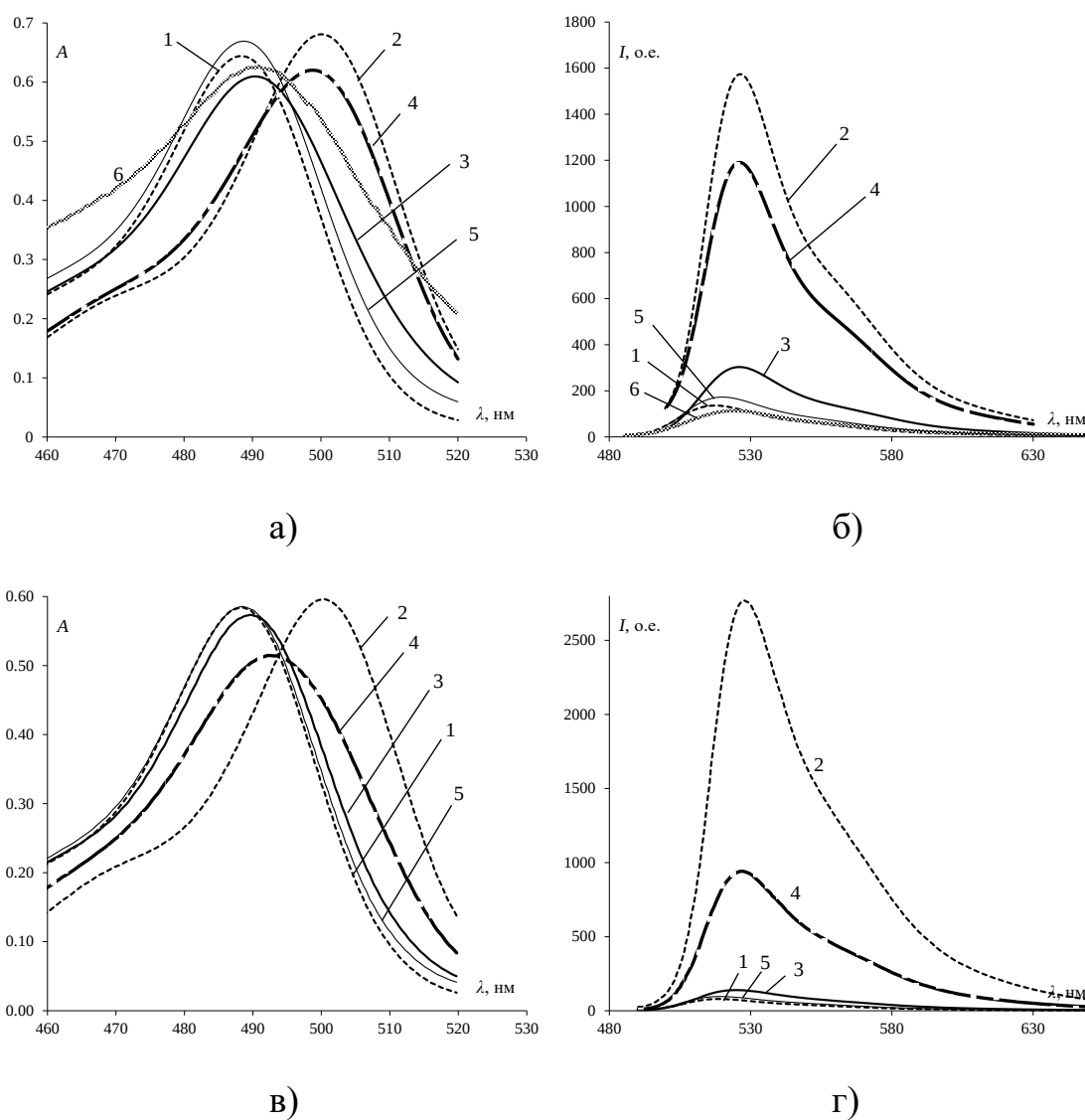


Рисунок 4.13 – Спектры поглощения (а, в) и флуоресценции (б, г) дианионов 4'-аминофлуоресцеина (а, б) и 5'-аминофлуоресцеина (в, г) в воде (1) в растворах ЦТАБ ($3 \cdot 10^{-3}$ моль/л) (2), ЦТАБ ($3 \cdot 10^{-3}$ моль/л) с добавками КСl (4 моль/л) (3), бензоата калия ($1 \cdot 10^{-2}$ моль/л) (4); гидросалицилата натрия ($1 \cdot 10^{-2}$ моль/л) (5), в присутствии наночастиц SiO_2 ($d = 140$ нм), покрытых ЦТАБ (6).

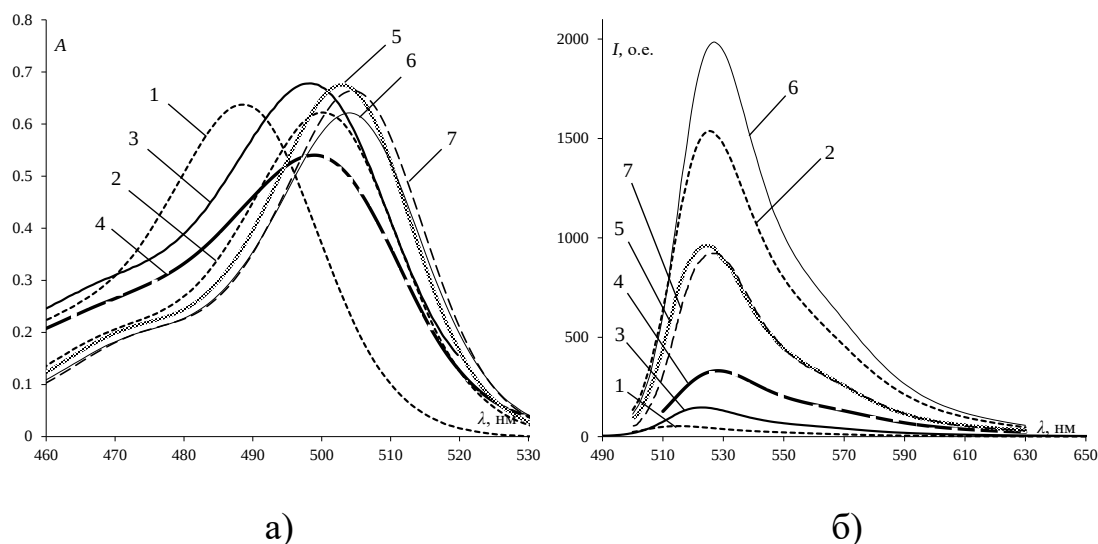


Рисунок 4.14 – Спектры поглощения (а) и флуоресценции (б) дианиона 4'-аминофлуоресцеина в воде (1) и мицеллярном растворе ЦТАБ ($3 \cdot 10^{-3}$ моль/л) (2), 1СА6 ($3 \cdot 10^{-3}$ моль/л) (3), 3СА4 ($2 \cdot 10^{-3}$ моль/л) (4), 6СА4 ($1 \cdot 10^{-3}$ моль/л) (5), 8СА4 ($5 \cdot 10^{-4}$ моль/л) (6), 12СА4 ($4 \cdot 10^{-4}$ моль/л) (7).

Доказательством отсутствия влияния мономерных молекул каликсарена в растворе на спектральные свойства красителя также служит отсутствие сдвига полос поглощения дианионов 4'- и 5'-аминофлуоресцеина в ДМСО при добавлении каликсарена 3СА4 ($c = 1 \cdot 10^{-3}$ моль/л), которое наблюдалось экспериментально. В этом растворителе, ввиду отсутствия гидрофобных взаимодействий, а также относительно высокой полярности, предполагается, что при используемых концентрациях каликсарен существует в виде мономеров.

При исследовании кинетики флуоресценции было обнаружено, что в присутствии мицелл ЦТАБ или агрегатов каликсаренов затухание не может быть удовлетворительно описано моно- или биэкспоненциальной зависимостью (табл. 4.10). Это указывает на наличие флуоресцирующих частиц в разных состояниях, т.е. о множественности мест локализации красителя.

Отметим, что увеличение квантового выхода флуоресценции (табл. 4.9) связано с увеличением доли долгоживущей частицы ($\tau = 1.9 - 3.5$ нс). Можно предположить, что сильно гидратированное микроокружение способствует образованию короткоживущей частицы.

Времена жизни возбужденного состояния дианиона 4'-аминофлуоресцеина в организованных растворах

Система	τ , нс	
	4'-амино-флуоресцеин	5'-амино-флуоресцеин
Вода	0.11 (98%); 3.96 (2%)	0.12 (99%); 3.89 (1%)
ЦТАБ ($c = 3 \cdot 10^{-3}$ моль/л)	0.14 (84 %); 0.55 (16 %);	0.73 (89 %); 0.87 (7 %); 1.90 (4 %)
1СА6 ($c = 3 \cdot 10^{-3}$ моль/л)	0.42 (77 %); 3.68 (23 %)	0.16 (92 %); 2.67 (8 %)
3СА4 ($c = 2 \cdot 10^{-3}$ моль/л)	0.28 (83 %); 3.39 (17 %)	0.28 (81 %); 3.64 (19 %)
8СА4 ($c = 5 \cdot 10^{-4}$ моль/л)	0.24 (92 %); 1.34 (8 %)	0.42 (52 %); 2.52 (48 %)

Таким образом, судя по флуоресцентным свойствам, характер микроокружения дианионов изомеров аминофлуоресцеина, связанных агрегатами каликсаренов, изменяется с изменением гидрофобности каликсаренов. Возгорание флуоресценции аминофлуоресцеина наблюдается при его связывании агрегатами, обладающими хорошо сформированным гидрофобным ядром и уплотненным слоем Штерна, т.е. строением, аналогичным строению мицелл ПАВ.

Агрегаты такого типа обеспечивают эффективное экранирование связанного красителя от молекул воды. Можно заключить, что именно такая структура агрегатов характерна для каликсарена 8СА4, тогда как остальные изученные каликсарены не в полной мере воспроизводят свойства мицелл.

4.4 Кинетика щелочного гидролиза дилаурилфлуоресцеина

Гидролиз сложных диэфиров флуоресцеина, в частности, диацетилфлуоресцеина, часто применяется при исследовании активности ферментов в биологических средах [259–261] или организованных растворах [262, 263]. Помимо диэлектрических и реологических свойств среды, в случае организованных растворов важную роль играет концентрация гидроксильных ионов в области локализации индикатора, которая может существенно отличаться от соответствующего значения этой величины в объемной фазе [109, 264–266]. Поэтому применение подобных реакций как инструмента для выявления особенностей различных наноразмерных агрегатов, может оказаться весьма полезным.

Для исследования кинетики реакций этого типа чаще всего регистрируют изменение оптических свойств индикаторов. Действительно, гидролиз сложноэфирных групп, расположенных в хромофорной ксантеновой части красителей, приводит к значительным изменениям их спектральных свойств, что позволяет проследить ход реакции.

Для сравнения активности ферментов в различных образцах часто оказывается удобным и достаточным зафиксировать степень превращения диэфира в конечный продукт флуоресцеин, применяя, например, метод Шнюрера и Россваля [267]. При этом через определенный промежуток времени после начала реакции ее замедляют добавлением ацетона и измеряют поглощение при длине волны 490 нм, соответствующей максимуму спектра дианиона флуоресцеина в водных растворах. Данный подход реализован, например, при исследовании почв в работах Тейлора [268] и Грина [269] или с небольшими модификациями в работах других авторов [270, 271]. Для этих целей также можно контролировать интенсивность флуоресценции дианиона флуоресцеина [272].

Другие исследователи фиксировали зависимость интенсивности флуоресценции от времени, которая имеет линейный характер в случае как ферментативного, так и неферментативного гидролиза [273–275].

Следует подчеркнуть, что во всех упомянутых выше работах гидролиз диэфиров флуоресцеина рассматривается как одностадийный процесс. Однако, учитывая наличие двух сложноэфирных групп, необходимо рассматривать реакцию как совокупность двух последовательных реакций, как показано на рисунке 4.15 [276–278] (здесь **Ac** – ацильная группа).



Рисунок 4.15 – Схема гидролиза диэфиров флуоресцеина.

Так как эксперимент в большинстве случаев проводится в условиях избытка щелочи или в буферном растворе, то убылью концентрации ионов OH^- за счет реакции можно пренебречь и представить процесс как совокупность последовательных реакций первого порядка [276, 277]. В этом случае константы скорости реакций псевдопервого порядка будут связаны с истинными константами скорости следующим соотношением:

$$k'_i = k_i c_{\text{OH}^-} \quad (4.7)$$

В этом случае текущие концентрации (в мольных долях от общей концентрации красителя, α_i) частиц – участников реакции в каждый момент времени, t , можно выразить в виде уравнений (4.8) – (4.10) [279].

$$\alpha_{\text{L}_2\text{Fl}} = \frac{[\text{L}_2\text{Fl}]}{c_{\text{L}_2\text{Fl}}^0} = e^{-k'_1 t} \quad (4.8)$$

$$\alpha_{\text{LFl}^-} = \frac{[\text{LFl}^-]}{c_{\text{L}_2\text{Fl}}^0} = \frac{k'_1}{k'_2 - k'_1} e^{-k'_2 t} \quad (4.9)$$

$$\alpha_{\text{FI}^{2-}} = \frac{[\text{FI}^{2-}]}{c_{\text{L}_2\text{FI}^-}^0} = 1 - \frac{k_1'}{k_2' - k_1'} e^{-k_1' t} + \frac{k_1'}{k_2' - k_1'} e^{-k_2' t} \quad (4.10)$$

где $c_{\text{R}_2\text{FI}}^0$ – исходная концентрация красителя, в квадратных скобках даны текущие концентрации соответствующих частиц.

Ранее были предприняты попытки определить значения k_1' и k_2' для гидролиза диацетилфлуоресцеина в водных растворах. Так, Зонтаг определял эти значения, исходя из зависимости интенсивности флуоресценции при 516 нм от времени, т. е. контролируя лишь образование ярко флуоресцирующего дианиона FI^{2-} [276]. Расчет двух значений констант скорости, исходя лишь из одной кинетической кривой, может быть источником значительной неопределенности при недостаточном количестве измерений.

Гофман и Зернец [278] предложили другой метод определения k_1' и k_2' , основанный на измерении интенсивности флуоресценции в растворах диацетата и моноацетата флуоресцеина в присутствии фосфатных буферных растворов. При этом уменьшение длины волны возбуждения ($\lambda_{\text{ex}} = 365$ нм) позволило авторам изучить гидролиз по первой ступени в условиях, когда флуоресценция дианиона флуоресцеина пренебрежимо мала. В этой работе также отмечено, что неферментативный гидролиз является реакцией первого порядка. Определение же k_2' было затруднено вследствие быстрого гидролиза моноацетата флуоресцеина и невозможности получить раствор этого вещества без примеси интенсивно флуоресцирующего флуоресцеина.

Перспективным для раздельного определения констант скорости гидролиза может оказаться метод электронной спектроскопии. В ходе реакции в хромофорной части красителя происходят значительные структурные изменения, следовательно, спектры поглощения разных форм значительно различаются (рис. 4.16). В самом деле, растворы диэфиров флуоресцеина в условиях эксперимента существуют в форме лактона, который не поглощает свет в видимой области. Для дианиона флуоресцеина характерна интенсивная полоса

поглощения с максимумом в области 490 – 500 нм. Так как в ходе реакции промежуточная форма – моноэфир флуоресцеина – образуется в небольшом количестве, то получить в чистом виде спектр этой частицы не представляется возможным. Однако можно предположить, что ее полоса поглощения совпадает со спектром моноанионов метилфлуоресцеина или флуоресцеина, которые имеют сходное строение хромофорной ксантеновой части красителя и могут быть измерены экспериментально. Можно допустить, что моноанионная форма существует также в виде бесцветного лактона. Однако доказательств его существования в водных растворах для метилфлуоресцеина и флуоресцеина нами найдено не было (подробнее данный вопрос освещен в разделе 3).

В данной работе спектрофотометрический метод был применен для исследования кинетики гидролиза дилаурилфлуоресцеина как в истинных (водно-этанольных), так и организованных растворах ЦТАБ и каликсаренов.

Дилаурилфлуоресцеин является гидрофобным соединением и полностью связывается мицеллярной псевдофазой в водных растворах. Это обстоятельство позволяет рассматривать этот индикатор в качестве перспективного зонда для исследования различных мицеллоподобных агрегатов. Учитывая отсутствие лактонной структуры моноаниона и бесцветность молекулярной формы, можно записать схему гидролиза дилаурилфлуоресцеина, как показано на рисунке 4.17.

Как видно из рисунка 4.16, имеется диапазон длин волн, в котором два приведенных спектра практически не перекрываются. Это обстоятельство можно использовать для оценки значений k'_1 и k'_2 . Предположим также, что скорость внутримолекулярной перегруппировки, которая приводит к превращению лактонной структуры **LF** в карбоксилатную, очень высока.

Располагая набором спектров поглощения растворов дилаурилфлуоресцеина в щелочной среде, измеренных через разные промежутки времени от начала реакции, с учетом бесцветности дилаурилфлуоресцеина, можно рассчитать текущие концентрации всех форм по уравнениям:

$$\frac{A_{\lambda_i} \varepsilon_{\lambda_i, \text{FI}^{2-}}}{A_{\lambda_i, \infty}} = \alpha_{\text{LFI}^-} \varepsilon_{\lambda_i, \text{LFI}^-} + \alpha_{\text{FI}^{2-}} \varepsilon_{\lambda_i, \text{FI}^{2-}} \quad (4.11)$$

$$\alpha_{\text{L}_2\text{FI}} + \alpha_{\text{LFI}^-} + \alpha_{\text{FI}^{2-}} = 1 \quad (4.12)$$

где A_{λ_i} и $A_{\lambda_i, \infty}$ – светопоглощение при i -й длине волны в данный момент времени и в условиях полного превращения красителя в дианион соответственно, ε_{λ_i} – коэффициент молярного поглощения соответствующей частицы при той же длине волны, которые были получены экспериментально для частицы FI^{2-} и смоделированы спектром метилфлуоресцеина или моноаниона флуоресцеина для частицы LFI^- .

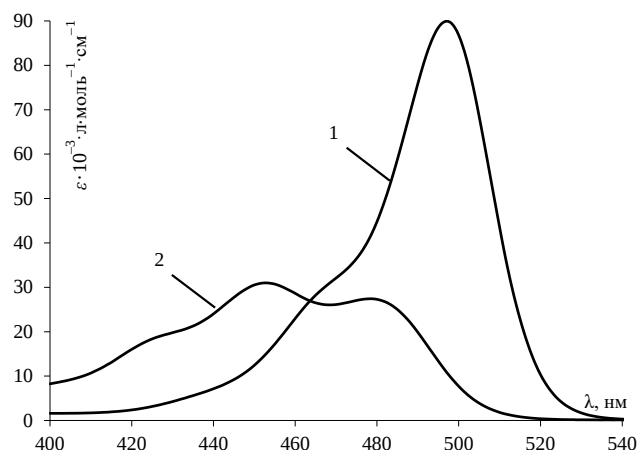


Рисунок 4.16 – Спектры поглощения дианиона флуоресцеина (1) и моноаниона метоксифлуоресцеина (2) в смеси вода – этанол (50 % масс.).

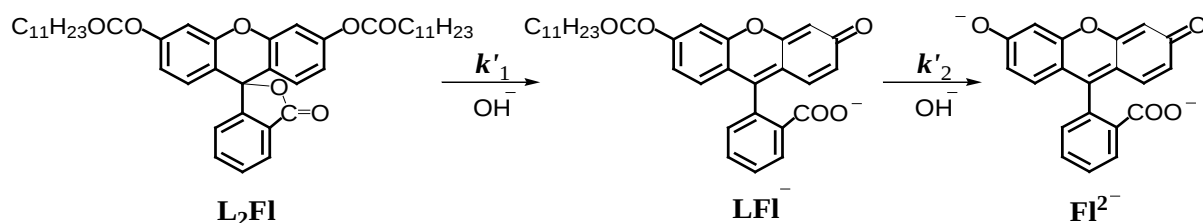


Рисунок 4.17 – Упрощенная схема гидролиза дилаурилфлуоресцеина

Далее, исходя из зависимостей мольных долей трех частиц от времени, по уравнениям (4.8) – (4.10), можно рассчитать константы скорости реакций псевдопервого порядка.

Следует отметить, что данный метод применим лишь в том случае, когда время измерения спектра намного меньше времени протекания реакции. Во всех исследуемых нами системах данное условие соблюдалось: как показали дополнительные расчеты, учет времени измерения спектра (около 29 с) практически не изменяет результатов расчета.

4.4.1 Гидролиз дилаурилфлуоресцеина в истинных водно-этанольных растворах и в псевдофазе мицелл ЦТАБ

На первом этапе адекватность описанного выше подхода проверялась при исследовании реакции гидролиза дилаурилфлуоресцеина в относительно простых и хорошо изученных системах: смесь вода – этанол с массовой долей спирта 50 % и мицеллярном растворе ЦТАБ.

Выбор водно-этанольного растворителя был обусловлен высокой гидрофобностью дилаурилфлуоресцеина и, как следствие, его низкой растворимостью в водных растворах с одной стороны и необходимостью воссоздания микроокружения зонда, в какой-то мере подобного мицеллярному, с другой.

Анализируя серии спектров поглощения в процессе протекания реакции при нормировании спектров к поглощению в области максимума поглощения (рис. 4.18), можно увидеть, что соотношение поглощения при длинах волн 500 и 440 нм изменяется с течением времени, что подтверждает образование обнаружимого количества промежуточного аниона $LF\Gamma$ в ходе реакции. Об этом также свидетельствует наличие максимума на зависимости поглощения при 430 нм от времени (рис. 4.19).

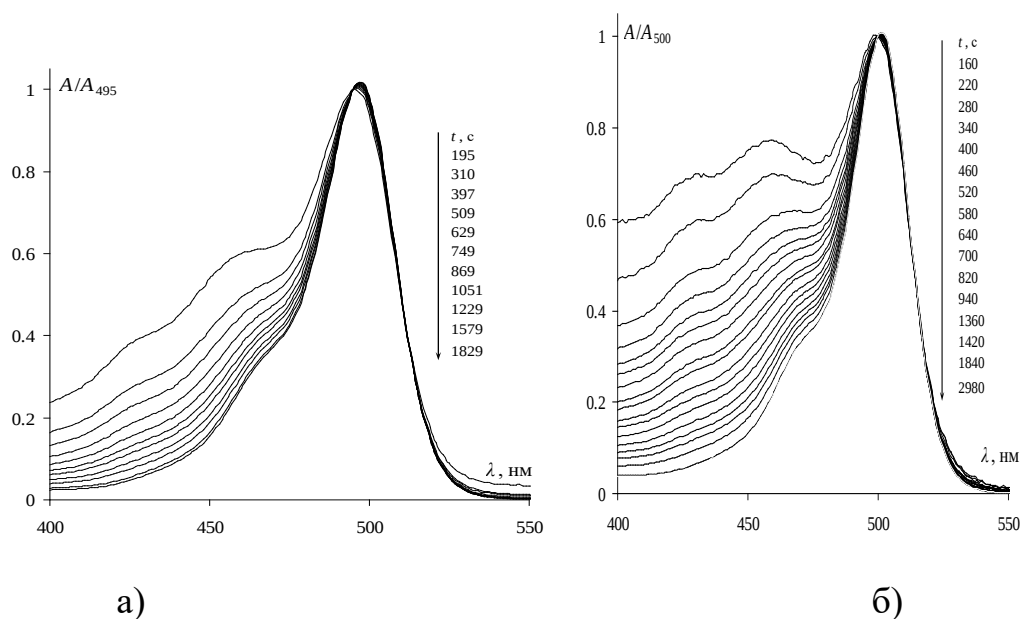


Рисунок 4.18 – Нормированные спектры поглощения раствора дилаурилфлуоресцеина в ходе реакции гидролиза в боратном буферном растворе в смеси вода – этанол (50 % масс., $pH^*_{H^+} = 10.8$) (а) и растворе цетилтриметиламмоний бромида ($c = 3 \cdot 10^{-3}$ моль/л, $pH = 9.0$) (б). На рисунке t – время от начала реакции.

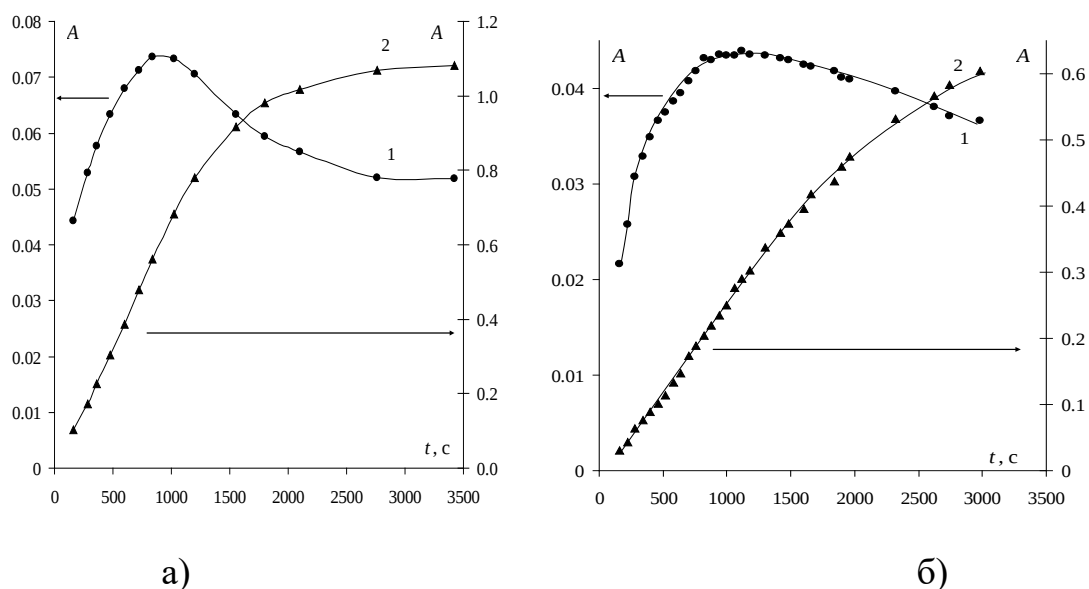


Рисунок 4.19 – Зависимость светопоглощения раствора дилаурилфлуоресцеина в смеси вода – этанол (50 % масс.) (а) и растворе цетилтриметиламмоний бромида ($3 \cdot 10^{-3}$ моль/л) (б) от времени при 430 нм (1) и 500 нм (2).

В результате расчетов получены зависимости мольных долей трех частиц от времени (рис. 4.20). Параметры максимума кривой (2) на рисунке зависят от значений k'_1 и k'_2 :

$$t_{\max} = \frac{\ln k'_2 - \ln k'_1}{k'_2 - k'_1} \quad (4.13)$$

$$\alpha_{\text{LFI}^-}_{\max} = \left(\frac{k'_2}{k'_1} \right)^{\frac{k'_2/k'_1}{1-k'_2/k'_1}} \quad (4.14)$$

О справедливости сделанных допущений и расчетов свидетельствует линейный характер зависимости логарифма доли дилаурилфлуоресцеина от времени (рис. 4.21), который можно прогнозировать из уравнения (4.8). Исходя из данной зависимости, можно рассчитать значение k'_1 .

Аналогично была исследована кинетика гидролиза дилаурилфлуоресцеина в мицеллярной среде ЦТАБ в водных растворах (рис. 4.18 – 4.21). Как видно из таблицы 4.11, гидролиз по второй ступени в водно-этанольной среде проходит быстрее, чем по первой. Для субстрата, локализованного в слое Штерна мицелл ЦТАБ, данная тенденция сохраняется. Качественно это согласуется с полученными ранее результатами для гидролиза диацетилфлуоресцеина в водных растворах в присутствии фосфатного буфера, однако в этом случае скорость гидролиза по второй ступени лишь в 1.5 раза превышает скорость гидролиза по первой ($k'_1 = 1.5 \cdot 10^{-4} \text{ с}^{-1}$, $k'_2 = 2.5 \cdot 10^{-4} \text{ с}^{-1}$ при pH = 7) [278].

Такое ускорение второй ступени гидролиза, по сравнению с первой, кажется необычным, если учесть, что в результате гидролиза по первой ступени образуется отрицательно заряженная частица, и взаимодействие с гидроксид-ионом должно быть затруднено.

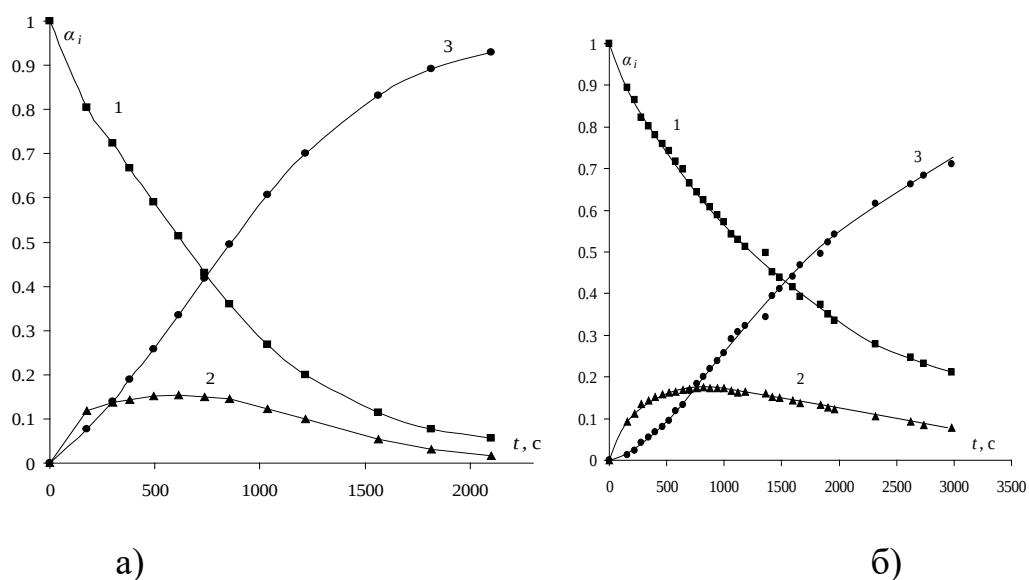


Рисунок 4.20 – Зависимость мольной доли дилаурилфлуоресцеина L_2FI (1), аниона монолаурилфлуоресцеина $LF\Gamma$ (2) и дианиона флуоресцеина FI^{2-} (3) от времени в процессе реакции щелочного гидролиза в смеси вода – этанол (50 % масс.) (а) и растворе цетилтриметиламмоний бромида ($3 \cdot 10^{-3}$ моль/л) (б).

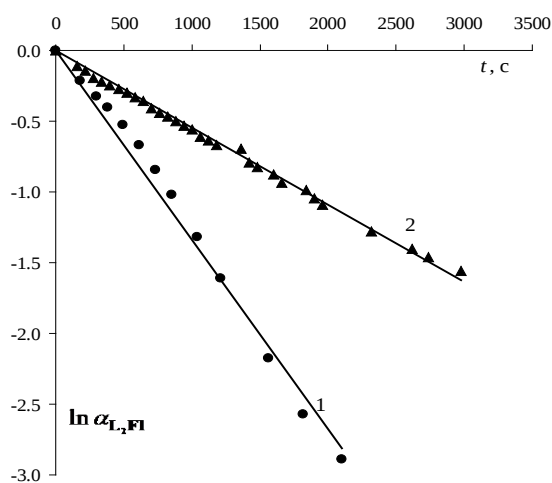


Рисунок 4.21 – Зависимость логарифма мольной доли дилаурилфлуоресцеина L_2FI от времени в процессе реакции щелочного гидролиза в смеси вода – этанол (50 % масс.) (1) и растворе цетилтриметиламмоний бромида ($3 \cdot 10^{-3}$ моль/л) (2).

Константы щелочного гидролиза дилаурилфлуоресцина в истинном и мицеллярном растворах

Среда	$k'_1, \text{с}^{-1}$	$k'_2, \text{с}^{-1}$	k'_2 / k'_1
Смесь вода – этанол (50 % масс.), $p\alpha_{\text{H}^+}^* = 10.6$	$1.3 \cdot 10^{-3}$	$5.6 \cdot 10^{-3}$	4.3
Мицеллярный раствор ЦТАБ, pH = 9.0	$5.5 \cdot 10^{-4}$	$2.0 \cdot 10^{-3}$	3.6

Действительно, в литературе описаны методы получения моноэфиров дикарбоновых кислот, в том числе и янтарной, при гидролизе соответствующих диэфиров с выходом 70 % и более [280, 281], что говорит о существенном замедлении второй стадии реакции. Также в качестве примера можно привести омыление диметилфталата в водной среде, для которого значение k'_1 превышает k'_2 по меньшей мере в 10 раз [282, 283].

Наблюдаемое поведение субстрата можно объяснить стабилизацией нейтральной лактонной формы, которая хорошо выражена в неполярной или малополярной среде. Так, с уменьшением полярности растворителя доля нейтрального лактонного таутомера увеличивается, по сравнению с хиноидным, что затрудняет депротонирование моноаниона. В конечном счете, это приводит в некоторых случаях к инверсии констант ступенчатой диссоциации [253]. В данном случае хорошо прослеживается аналогия между протолитическими равновесиями и кинетикой гидролиза производных флуоресцеина.

4.4.2 Гидролиз дилаурилфлуоресцеина в присутствии агрегатов каликсаренов

При сравнении влияния на кинетику гидролиза дилаурилфлуоресцеина катионных агрегатов ЦТАБ и каликсаренов следует отметить, что наибольшая скорость процесса наблюдается в мицеллярных растворах ЦТАБ (рис. 4.22). В ряду каликсаренов скорость гидролиза ускоряется с увеличением длины радикала,

что подтверждает ожидаемое, хотя и неполное, сходство гидрофобных каликсаренов с мицеллами ПАВ. В случае же каликсарена 1СА6 реакция замедляется, причем настолько сильно, что полное превращение красителя в форму FI^{2-} не достигается даже через 5 суток после начала реакции при $\text{pH} = 9.18$.

Различия между агрегатами каликсаренов и мицелл можно выявить при анализе скорости двух последовательных реакций по отдельности. Так, ни в одном из растворов каликсаренов зависимость поглощения от времени в области 430 нм не имеет максимума. При сравнении спектров поглощения в разные моменты времени, нормированных по длине волны в максимуме дианиона флуоресцеина, можно заключить, что признаков появления формы LFI^- в заметных количествах зарегистрировать нельзя (рис. 4.23).

Следовательно, происходит значительное увеличение отношения k'_2 / k'_1 . Принимая во внимание общее замедление скорости реакции при связывании красителя агрегатами каликсаренов, заключаем, что последние замедляют первую стадию гидролиза, по сравнению с мицеллярной и водно-этанольной средой.

При таком значительном различии между скоростями двух последовательных реакций можно было бы ожидать, что скорость реакции будет подчиняться уравнениям первого порядка. Однако ни в одной системе, содержащей каликсарены, в отличие от водно-этанольных и мицеллярных растворов, зависимость логарифма разности между поглощением в условиях полного превращения красителя и в данный момент времени, $\ln(A_{\lambda_i, \infty} - A_{\lambda_i})$, от времени, t , не имеет линейного характера, иными словами, в присутствии каликсаренов гидролиз не является реакцией первого порядка. Это может быть следствием изменения места локализации индикатора при изменении его гидрофобности в ходе процесса гидролиза. Однако можно сделать качественный вывод, что скорость щелочного гидролиза дилаурилфлуоресцеина при связывании его агрегатами каликсаренов и ЦТАБ уменьшается в ряду: ЦТАБ > 12СА4 > 8СА4 $\approx$ 6СА4 > 3СА4 $\gg$ 1СА6. Это указывает на то, что в этом случае мицеллярные эффекты не проявляются в каликсаренах в полной мере.

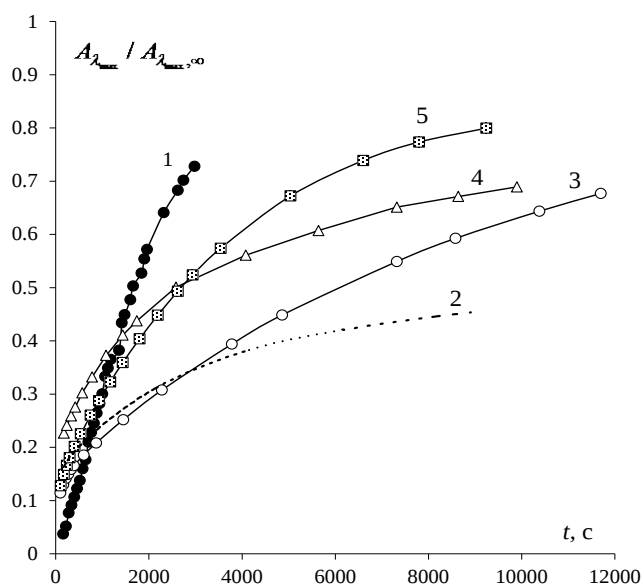


Рисунок 4.22 – Кинетические кривые гидролиза дилаурилфлуоресцеина в присутствии мицелл ЦТАБ (1), агрегатов 3СА4 ($3 \cdot 10^{-3}$ моль/л) (2), 6СА4 ($1 \cdot 10^{-3}$ моль/л) (3), 8СА4 ($1 \cdot 10^{-3}$ моль/л) (4), 12СА4 ($1.8 \cdot 10^{-4}$ моль/л) (5), при рН = 9.0 (или 10.0 в случае 3СА4).

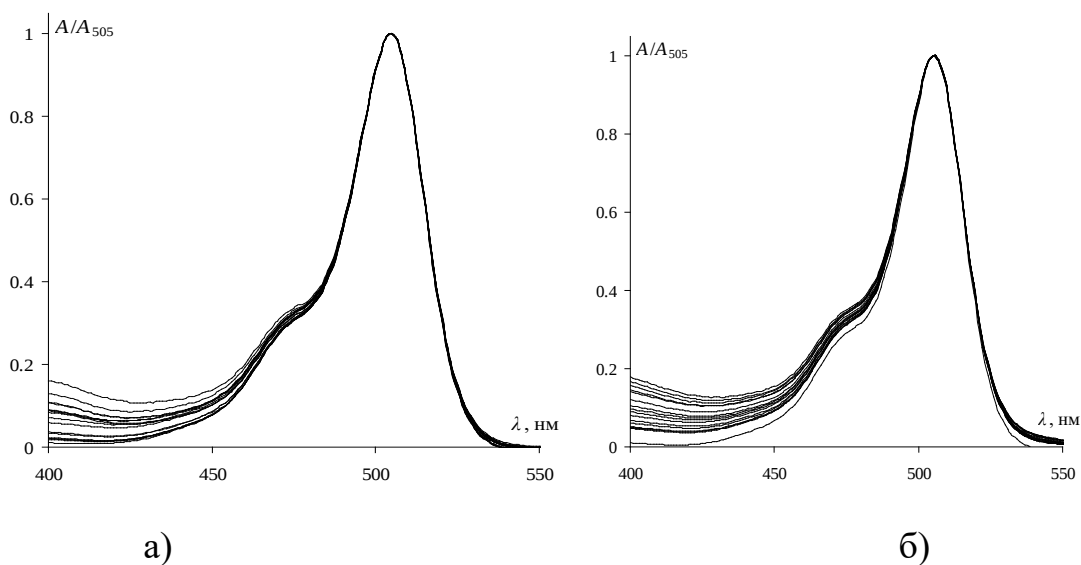


Рисунок 4.23 – Нормированные спектры поглощения раствора дилаурилфлуоресцеина в ходе реакции гидролиза в боратном буферном растворе (рН = 9.0) в присутствии агрегатов 6СА4 ($1 \cdot 10^{-3}$ моль/л) (а), 8СА4 ($1 \cdot 10^{-3}$ моль/л) (б).

4.5 Некоторые тестовые процессы для выявления различий агрегатов каликсаренов с разной длиной углеводородного радикала и мицелл катионных ПАВ

В предыдущих подразделах были выявлены особенности влияния агрегатов каликсаренов на протолитические и спектральные свойства флуоресцеина и его производных, а также на скорость процесса гидролиза. Для выяснения вопроса о том, являются ли выявленные закономерности универсальными, был проведен ряд тестовых экспериментов с красителями других групп.

4.5.1 Изменение спектральных свойств сольфатохромного бетаина Райхардта $E_T(30)$ в присутствии каликсаренов

Бетаиновые индикаторы Райхардта являются красителями, спектральные свойства которых сильно зависят от характеристик их микроокружения, в первую очередь его полярности [111, 284, 285]. Нами были определены максимумы полос поглощения депротонированной формы индикатора $E_T(30)$ в присутствии агрегатов каликс[4]аренов различной гидрофобности (рис. 4.24, табл 4.12).

Наибольшее значения $\lambda_{\max}$ для полосы поглощения $E_T(30)$ наблюдаются при связывании его мицеллами ЦТАБ. Близкими к мицеллам с точки зрения влияния на максимумы спектра поглощения индикатора оказались агрегаты каликсарена 8СА4, в то время как микроокружение в агрегатах каликсарена 3СА4 более полярно, что проявляется в значительном сдвиге спектра в сторону меньших длин волн, по сравнению с остальными системами. Для других растворов каликсаренов значения нормализованного параметра Райхардта также приближается к величине E_T^N мицеллярных растворов.

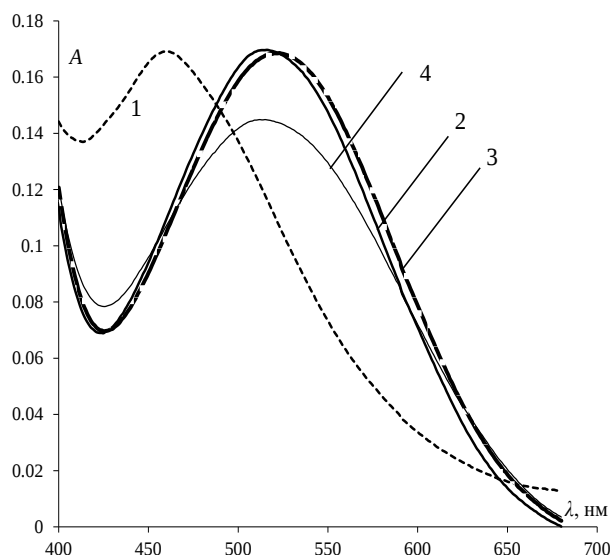


Рисунок 4.24 – Спектры поглощения $E_T(30)$ в присутствии агрегатов 3СА4 ($3 \cdot 10^{-3}$ моль/л) (1), 6СА4 ($1 \cdot 10^{-3}$ моль/л) (2), 8СА4 ($5 \cdot 10^{-4}$ моль/л) (3), 12СА4 ($2 \cdot 10^{-4}$ моль/л) (4), при $pH = 10.0$. Все растворы содержат 5 % этанола.

Таблица 4.12

Значения максимумов полос поглощения депротонированной формы $E_T(30)$ и нормализованные параметры Райхардта в присутствии агрегатов каликсаренов и мицелл ЦТАБ при $pH = 10.0$

Среда ¹	$\lambda_{\max} \pm 2$, нм	E_T^N
ЦТАБ [255]	543	0.678
3СА4	460	0.971
6СА4	516	0.763
8СА4	523	0.740
12СА4	514	0.769
1СА6	— ²	—

¹ Изучаемые растворы каликсаренов содержали 5 об.% этанола.

² В диапазоне длин волн 400 – 685 нм максимума поглощения не наблюдается.

4.5.2 Влияние агрегатов каликсаренов на равновесие депротонирования бромфенолового синего

Если не принимать во внимание экстремально кислые растворы, для бромфенолового синего характерна одна ступень ионизации, представленная на рисунке 4.25. Это относительно простой индикатор зарядного типа $-/=$, которых хорошо связывается катионными агрегатами за счет электростатических, а также гидрофобных сил (степень связывания сопряженных форм этого индикатора агрегатами каликсарена 1CA6 была оценена в п. 4.1.2). Перечисленные выше факторы делают этот краситель весьма удобным инструментом для изучения организованных растворов различных типов [286, 287].

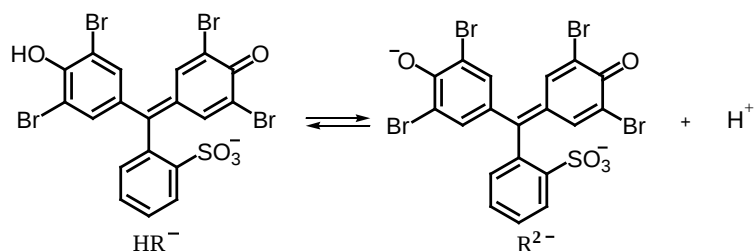


Рисунок 4.25 – Схема ионизации бромфенолового синего.

Связывание красителя агрегатами каликсаренов приводит к характерному батохромному сдвигу полосы поглощения депротонированной формы бромфенолового синего на 12 – 15 нм, величина которого не изменяется при варьировании концентрации каликсаренов. Также происходит сдвиг равновесия депротонирования красителя в более кислую область, что, как и в случае флуоресцеиновых красителей, обусловлено влиянием положительного поверхностного заряда агрегатов и иллюстрирует сходство агрегатов каликсаренов и мицелл катионных ПАВ (см. п 4.2.2). Разность показателей констант ионизации в псевдофазе агрегатов и в воде, ΔpK_a^a , возрастает с увеличением длины углеводородного радикала каликсаренов (табл. 4.13) и во всех случаях превышает соответствующее значение для мицелл ЦТАБ. Также как и для

флуоресцеиновых красителей, изменения pK_a^a бромфенолового синего выявляют сходства агрегатов каликсаренов и мицелл ЦТАБ.

Таблица 4.13

Длины волн максимумов спектров поглощения дианиона и показатели кажущихся констант ионизации бромфенолового синего в истинных и коллоидных водных растворах при ионной силе 0.05 моль/л

Среда	$\lambda_{\max} \pm 1$, нм	pK_a^a
Вода [191]	591	4.05 ± 0.02
ЦТАБ ($1 \cdot 10^{-3}$ моль/л) [191]	600	2.83 ± 0.04
3СА4 ($1 \cdot 10^{-3}$ моль/л) [191]	603	2.64 ± 0.05
6СА4 ($1 \cdot 10^{-3}$ моль/л)	606	2.36 ± 0.05
8СА4 ($1 \cdot 10^{-3}$ моль/л)	605	2.36 ± 0.05
12СА4 ($1.8 \cdot 10^{-4}$ моль/л)	605	2.10 ± 0.03

Также была исследована зависимость значений показателей констант ионизации бромфенолового синего от концентрации каликсаренов 6СА4 и 12СА4 в диапазоне концентраций $(1 - 20) \cdot 10^{-4}$ моль/л и $(1 - 5) \cdot 10^{-4}$ моль/л, соответственно (рис. 4.26). Сверху эти диапазоны ограничивались растворимостью каликсаренов в условиях эксперимента.

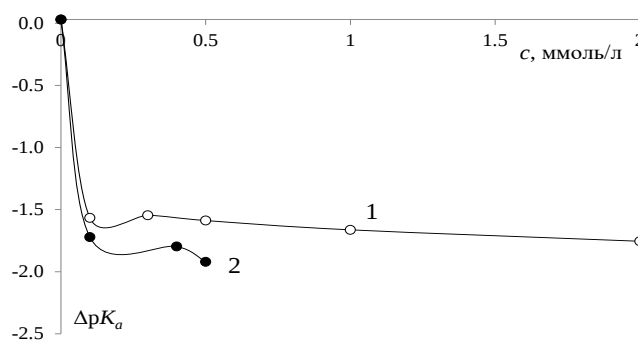


Рисунок 4.26 – Зависимость разности показателей констант ионизации в псевдофазе агрегатов и в воде от концентрации каликсаренов: 6СА4 (1) и 12СА4 (2).

Как было обнаружено в аналогичных исследованиях для 3СА4 и 1СА6, при малых концентрациях каликсаренов происходит постепенное снижение показателей констант, затем после некоторого значения концентрации, соответствующей пороговой, значения pK_a^a выходят на плато [А1]. Это соответствует представлениям о коллективном характере агрегации этих каликсаренов. Однако в случае более гидрофобных 6СА4 и 12СА4 происходит резкое снижение значений pK_a^a бромфенолового синего уже при малых концентрациях каликсаренов, причем константы незначительно зависят от концентрации. Из этого можно сделать вывод об отсутствии изменений микроокружения связанного агрегатами красителя в данном диапазоне концентраций каликсаренов. При ионной силе 0.05 моль/л агрегация гидрофобных каликсаренов 6СА4 и 12СА4 происходит уже при концентрациях $1 \cdot 10^{-4}$ моль/л.

4.5.3 Кинетика щелочного обесцвечивания бромфенолового синего в присутствии катионных каликсаренов

Обесцвечивание бромфенолового синего происходит в результате нуклеофильной атаки гидроксильной группы в щелочной среде на центральный атом углерода дианиона красителя, что приводит к разрыву системы сопряженных связей и обесцвечиванию раствора (рис. 4.27).

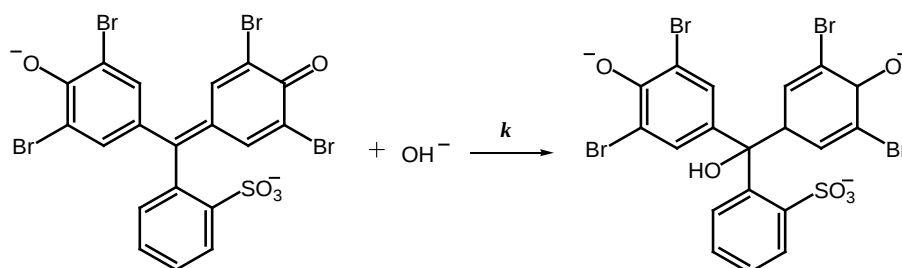


Рисунок 4.27 – Реакция нуклеофильного присоединения гидроксид-иона к дианиону бромфенолового синего в щелочной среде.

В условиях эксперимента реакция имеет псевдопервый порядок, что позволяет оценить соответствующую константу скорости, k' , исходя из зависимостей логарифма поглощения при длине волны, в области максимума поглощения дианиона бромфенолового синего от времени (рис. 4.28).

Ранее было показано, что связывание индикатора агрегатами различных типов оказывает существенное влияние на скорость этого процесса. Так, в присутствии мицелл катионных ПАВ обесцвечивание растворов бромфенолового синего в щелочной среде не фиксируется [288, 289]. Одним из возможных объяснений этого явления может быть затруднение взаимодействия между одинаково заряженными ионами при уменьшении диэлектрической проницаемости микроокружения красителя, обусловленной его переходом в псевдофазу мицеллы. Другие мицеллоподобные агрегаты, например, наночастицы SiO_2 , покрытые ЦТАБ, или агрегаты катионных дендримеров не оказывают такого воздействия [138, 287]. Поэтому данный процесс также может быть критерием различия между мицеллами ПАВ и агрегатами каликсаренов.

Определенное нами значение константы псевдопервого порядка в воде (табл. 4.14) хорошо согласуется с литературными данными ($9.2 \cdot 10^{-4} \text{ с}^{-1}$ в 0.1-молярном растворе NaOH [288]). В присутствии агрегатов каликсаренов уменьшение скорости реакции, по сравнению с водной средой, происходит лишь в случае молекул, содержащих пропильные и гексильные группы, тогда как в растворах 12СА4 реакция даже ускоряется по сравнению с водной средой (табл. 4.14).

Следовательно, значительное замедление реакции, которое проявляется в случае мицелл ЦТАБ, характерно не для всех каликсаренов. Отметим, что наблюдаемые особенности каликсарена 12СА4 фиксировались также и в случае возгорания флуоресценции аминифлуоресцеина.

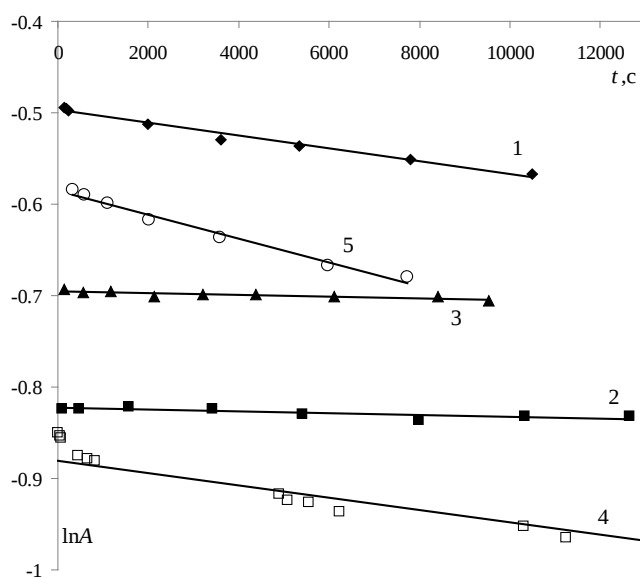


Рисунок 4.28 – Кинетические кривые обесцвечивания бромфенолового синего в присутствии NaOH (0.01 моль/л) при ионной силе 0.05 моль/л в воде (1) и в растворах 3СА4 ($3 \cdot 10^{-3}$ моль/л) (2), 6СА4 ($1 \cdot 10^{-3}$ моль/л) (3), 8СА4 ($5 \cdot 10^{-4}$ моль/л) (4), 12СА4 ($2 \cdot 10^{-4}$ моль/л) (5) (концентрация красителя в разных растворах не одинакова).

Таблица 4.14

Константы скорости реакции псевдопервого порядка обесцвечивания бромфенолового синего в воде и растворах каликсаренов в присутствии NaOH (0.01 моль/л) при ионной силе 0.05 моль/л

Среда	$k', \text{с}^{-1}$
Вода	$(7.03 \pm 0.11) \cdot 10^{-6}$
3СА ($3 \cdot 10^{-3}$ моль/л)	$< 1 \cdot 10^{-6}$
6СА ($1 \cdot 10^{-3}$ моль/л)	$< 1 \cdot 10^{-6}$
8СА ($5 \cdot 10^{-4}$ моль/л)	$(6.7 \pm 0.6) \cdot 10^{-6}$
12СА ($1.8 \cdot 10^{-4}$ моль/л)	$(1.31 \pm 0.11) \cdot 10^{-5}$

4.5.4 Кинетика щелочного обесцвечивания кристаллического фиолетового в присутствии катионных каликсаренов

Кристаллический фиолетовый также часто применяется для исследования наноразмерных агрегатов [288, 290–293]. Это катионный краситель, который в щелочной среде превращается в бесцветную нейтральную молекулу, как показано на рисунке 4.29. Несмотря на то, что индикатор не полностью связывается катионными агрегатами, в присутствии последних все же происходит ускорение этой реакции, которое обычно объясняют значительным увеличением локальной концентрации гидроксид-ионов на поверхности мицелл.

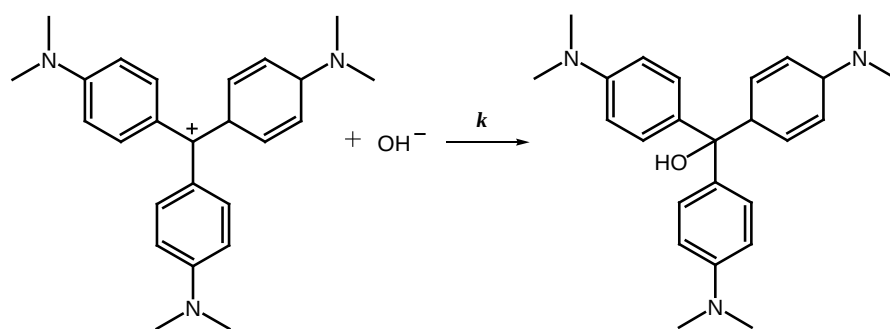


Рисунок 4.29 – Схема нуклеофильного присоединения гидроксид-иона к катиону кристаллического фиолетового в щелочной среде.

Как видно из таблицы 4.15, агрегаты каликсаренов также ускоряют реакцию, по сравнению с водной средой.

Вследствие неполного связывания красителя одноименно заряженными агрегатами константы скорости зависят от концентрации каликсаренов. Поэтому сравнивать их численные значения для разных каликсаренов или мицелл ПАВ не совсем корректно. Более полезную информацию можно извлечь из зависимости от концентрации каликсаренов, которая была получена для наиболее гидрофобного, а, следовательно, наиболее похожего на ПАВ каликсарена 12СА4 (рис. 4.30).

**Константы скорости реакции псевдопервого порядка обесцвечивания
кристаллического фиолетового в воде и растворах каликсаренов в боратном
буферном растворе при рН = 10**

Среда	$k', \text{с}^{-1}$
Вода	$(1.76 \pm 0.16) \cdot 10^{-5}$
3СА ($3 \cdot 10^{-3}$ моль/л)	$(5.108 \pm 0.010) \cdot 10^{-5}$
6СА ($1 \cdot 10^{-3}$ моль/л)	$(1.186 \pm 0.014) \cdot 10^{-3}$
8СА ($1 \cdot 10^{-3}$ моль/л)	$(1.133 \pm 0.012) \cdot 10^{-3}$
12СА ($1.8 \cdot 10^{-4}$ моль/л)	$(5.42 \pm 0.03) \cdot 10^{-4}$

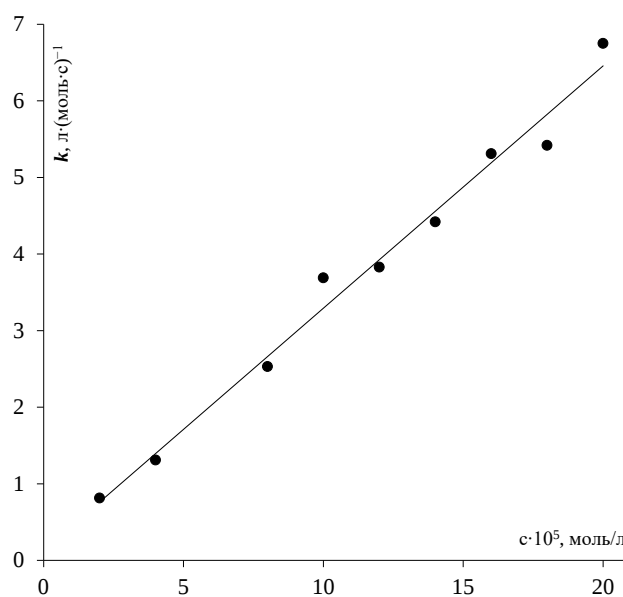
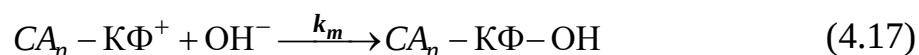


Рисунок 4.30 – Влияние концентрации каликсарена 12СА4 на константу скорости обесцвечивания кристаллического фиолетового при рН = 10.

Для интерпретации зависимости константы скорости от концентрации каликсарена была применена модель Пишкевича [294–296], которая неоднократно применялась для описания зависимости скорости реакции от концентрации в мицеллярных растворах [292, 297].

Механизм обесцвечивания кристаллического фиолетового, КФ, в присутствии молекул ПАВ или каликсарена, СА, отражают уравнения (4.15)–(4.17).



Согласно этому механизму, реакция представляет собой два параллельных процесса взаимодействия с гидроксид-ионом свободного и связанного с n молекулами каликсарена катиона красителя КФ^+ , которые характеризуются константами скорости второго порядка, k_w и k_m , соответственно, K_D – константа равновесия диссоциации агрегата катиона кристаллического фиолетового с молекулами каликсарена.

Из уравнений (4.15) – (4.17) следует, что наблюдаемая константа скорости реакции второго порядка, k , которая связана с константой псевдопервого порядка соотношением (4.7), зависит от концентрации каликсарена, $c_{\text{СА}}$, уравнением (4.18):

$$k = \frac{k_m(c_{\text{СА}})^n + k_w K_D}{K_D + (c_{\text{СА}})^n} \quad (4.18)$$

При $c_{\text{СА}} \rightarrow 0$, с учетом того, что n редко бывает больше 4, величиной $(c_{\text{СА}})^n$ в знаменателе можно пренебречь. Тогда выражение (4.18) упрощается до выражения (4.19).

$$k = k_m (c_{CA})^n K_D^{-1} + k_w \quad (4.19)$$

При достаточно больших концентрациях каликсарена $k \rightarrow k_m$, т.е. зависимость выходит на плато. Это означает, что для достоверного определения k_m необходимо расширить концентрационный диапазон, чтобы зависимость значительно отклонялась от линейной. Однако экспериментально это осуществить невозможно, вследствие малой растворимости каликсарена. Следовательно, оценить величину k_m , с приемлемым доверительным интервалом не представляется возможным, можно утверждать лишь, что это значение велико, по сравнению с наблюдаемыми величинами k .

Зависимость константы скорости реакции от концентрации каликсарена 12СА4 хорошо описывается уравнением (коэффициент корреляции равен 0.992, рис. 4.30). Это свидетельствует о том, что n близко к единице. Аналогичные закономерности наблюдались также и для растворов ЦТАБ [298]. Величина отрезка, отсекаемого прямой на оси ординат, $(0.13 \text{ л} \cdot (\text{моль} \cdot \text{с})^{-1})$ удовлетворительно согласуется с экспериментальным значением k_w .

Согласно модели, по своему физическому смыслу n – количество молекул ПАВ, которые взаимодействуют с данным красителем, и тот факт, что $n = 1$ свидетельствует об отсутствии кооперативного влияния агрегатов в растворе [294–296]. Однако как и для мицелл катионных ПАВ, в том числе и гемини-ПАВ [292, 298], для каликсаренов этот параметр не отличается существенно от единицы даже при концентрациях, значительно превышающих ККМ (или ККА). Следовательно, он не может быть критерием, однозначно указывающим на агрегацию в растворах подобных дифильных соединений.

4.6 Выводы к разделу 4

1. С применением методов динамического светорассеяния и трансмиссионной электронной микроскопии выявлен характер агрегации катионных каликсаренов, содержащих холиновые группы на верхнем ободе, как в чистой воде, так и в присутствии NaCl (0.05 моль/л). Размеры образующихся

агрегатов в солевом растворе монотонно возрастают с увеличением длины углеводородного радикала на нижнем ободке каликс[4]аренов от 3 до 6.7 нм, а электрокинетический потенциал составляет + (13 – 17) мВ.

2. Связывание некоторых нейтральных и анионных форм флуоресцеиновых красителей агрегатами каликсаренов приводит к батохромному сдвигу полосы поглощения депротонированных форм на 12 – 26 нм и изменению формы спектров других форм. Степень связывания сульфоталеиновых красителей и метилового оранжевого агрегатами каликс[6]арена оценена на основании результатов диализа.

3. Сходство агрегатов каликсаренов и мицелл катионных ПАВ проявляется в их влиянии на спектры поглощения, а также на кислотно-основные равновесия двух- и трехосновных флуоресцеиновых красителей. Значения показателей кажущихся констант ионизации, pK_a^a , снижаются, по сравнению с величинами pK_a^w , на 0.18 – 2.00 единиц для каликсарена 1СА6, 0.15 – 1.74 для 3СА4 и 0.27 – 2.5 для 8СА4.

4. Сдвиг таутомерных равновесий флуоресцеина при переходе от воды к псевдофазе агрегатов имеет сходные черты с аналогичным сдвигом в мицеллах катионных ПАВ: наблюдается значительное увеличение доли лактонного таутомера на фоне уменьшения доли цвиттерионного. Эти эффекты ярко выражены в случае длинноцепочечного гидрофобного каликсарена 8СА4 и меньше для каликсаренов 1СА6 и 3СА4.

5. Двадцати-тридцатикратное возгорание флуоресценции депротонированных форм изомеров аминфлуоресцеина при связывании их мицеллами катионных ПАВ и агрегатами наиболее гидрофобных каликсаренов служит критерием, позволяющим отличить эти системы от других катионных агрегатов, где, вследствие большей гидратированности микроокружения, мицеллярные эффекты проявляются не в полной мере. В присутствии анизометрических мицелл, наночастиц кремнезема покрытых ЦТАБ, агрегатов 3СА4 и 1СА6 возрастания интенсивности флуоресценции аминфлуоресцеинов

не происходит. Также увеличение гидрофобности каликсаренов приводит к росту квантового выхода флуоресценции децилфлуоресцеина, связанного с агрегатами каликсаренов.

6. Спектрофотометрическим методом определены значения констант скорости последовательного двухстадийного гидролиза дилаурилфлуоресцеина в смеси вода – этанол (50 % масс.) и мицеллярном растворе. Скорость второй стадии реакции в обеих системах превышает скорость первой в четыре раза. При связывании красителя агрегатами каликсаренов это отношение значительно увеличивается.

7. Различия между агрегатами каликсаренов с различной длиной углеводородных радикалов и мицеллами ЦТАБ проявляются в их влиянии на скорость взаимодействия дилаурилфлуоресцеина, бромфенолового синего с гидроксид-ионами. Мицеллярные эффекты ПАВ (ускорение первой реакции и значительное замедление второй) не воспроизводятся в полной мере агрегатами каликсаренов.

8. Своеобразие свойств агрегатов каликсаренов проявляется в немонотонном изменении как скорости реакции обесцвечивания бромфенолового синего, так и квантового выхода флуоресценции аминифлуоресцеина и децилфлуоресцеина, связанных агрегатами, при переходе от 6CA4 к 12CA4.

9. Все перечисленные эффекты характерны лишь для агрегатов каликсаренов и не фиксируются в присутствии одиночных молекул каликсаренов в растворах. Это выводит на первый план коллоидный аспект их взаимодействий с красителями, нивелируя влияние макроцикла.

Результаты, изложенные в данном разделе опубликованы в работах [A1, A2, A4, A5, A7, A8, A11 – A16]

ВЫВОДЫ

На основании спектроскопических исследований флуоресцеина, его эфиров и аминопроизводных в растворителях различной природы обоснована и расширена общая схема протолитических превращений данного класса красителей и выявлены особенности их оптических характеристик, далее использованных для выявления характера агрегации катионных каликс[6]- и каликс[4]аренов различной гидрофобности.

1. Полученный полный набор параметров ионных и таутомерных равновесий и спектральных характеристик моно- и диметилового эфиров флуоресцеина и доказанный факт отсутствия для них лактонного анионного таутомера позволяет подтвердить схему равновесий флуоресцеина и углубить представления о свойствах этого класса соединений.

2. Известная к настоящему времени общая схема протолитических превращений флуоресцеина применима к количественному описанию равновесий аминифлуоресцеинов в различных растворителях (вода, водный этанол, ДМСО) при условии учета не менее семи дополнительных таутомерных структур. Отмечено образование лактонного и фенолятного таутомера моноаниона 5'-аминифлуоресцеина в безводных и водно-спиртовых растворителях.

3. Зафиксировано увеличение на два порядка квантового выхода флуоресценции дианионов аминопроизводных флуоресцеина при переходе от воды к НДС-растворителям. Обнаружено, что ключевую роль в процессах внутримолекулярного тушения флуоресценции аминифлуоресцеина играет наличие водородных связей, локализованных на карбоксилатной группе, и в особенности ее протонирование, что позволяет использовать данный фотофизический процесс для идентификации степени гидратированности микроокружения красителя.

4. Возгорание флуоресценции депротонированных форм изомеров аминифлуоресцеина и децилфлуоресцеина, наряду с существенным изменением скорости обесцвечивания бромфенолового синего и кристаллического

фиолетового, создает возможность формирования комплекса индикативных процессов, позволяющих выявить степень отличия агрегатов каликсаренов, содержащих алкильные группы различной длины, от мицелл ПАВ.

5. Согласно данным динамического светорассеяния, создание в растворе ионной силы (NaCl, 0.05 моль/л) позволяет получить агрегаты каликс[4]аренов с размерами, монотонно возрастающими от 3–4 до 6.7 нм с увеличением длины углеводородных радикалов в молекуле.

6. Снижение на 0.15–2.00 ед. значений показателей кажущихся констант ионизации двух- и трехосновных флуоресцеиновых красителей в присутствии агрегатов каликсаренов, по сравнению с соответствующими значениями в воде, а также характер изменения спектров поглощения свидетельствуют о сходстве этих агрегатов и мицелл традиционных катионных ПАВ.

7. Продемонстрирована возможность спектрофотометрического раздельного определения значений констант скорости последовательного двухстадийного гидролиза дилаурилфлуоресцеина в смеси вода – этанол (50 % масс.) и в мицеллярном растворе ЦТАБ. Скорость второй стадии реакции в обеих системах превышает скорость первой в четыре раза. При связывании красителя агрегатами каликсаренов это отношение значительно увеличивается.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fluorescent energy transfer nucleic acid probes / [ed. V. V. Didenko]. — Totowa : Humana Press. — 2006. — 389 p.
2. Haugland R. P. Handbook of fluorescent probes and research chemicals / R. P. Haugland, M. T. Z. Spence, I. D. Johnson. — Eugene : Molecular Probes. — 1996. — 950 p.
3. Bencini A. Probing biologically and environmentally important metal ions with fluorescent chemosensors: thermodynamic versus optical response selectivity in some study cases / A. Bencini, V. Lippolis // *Coord. Chem. Rev.* — 2012. — Vol. 256. — No. 1–2. — P. 149–169.
4. Lavis L. D. Bright ideas for chemical biology / L. D. Lavis, R. T. Raines // *ACS Chem. Biol.* — 2008. — Vol. 3. — No. 3. — P. 142–155.
5. The synthesis of some water insoluble dyes for the measurement of pH in water immiscible solvents / L. Brown, P. J. Halling, G. A. Johnston [et al.] // *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1.* — 1990. — Vol. 1. — No. 12. — P. 3349–3353.
6. Li X. Design strategies for water-soluble small molecular chromogenic and fluorogenic probes / X. Li, X. Gao, W. Shi, H. Ma // *Chem. Rev.* — 2014. — Vol. 114. — No. 1. — P. 590–659.
7. Spectrophotometric determination of the dissociation constants of fluorescein in micellar media / A. Niazi, A. Yazdanipour, J. Ghasemi [et al.] // *Croat. Chem. Acta.* — 2009. — Vol. 82. — No. 4. — P. 753–759.
8. Photophysical properties of erythrosin ester derivatives in ionic and non-ionic micelles / D. S. Pellosi, B. M. Estevao, C. F. Freitas [et al.] // *Dyes Pigm.* — 2013. — Vol. 99. — No. 3. — P. 705–712.
9. Highly activatable and rapidly releasable caged fluorescein derivatives / T. Kobayashi, Y. Urano, M. Kamiya [et al.] // *J. Am. Chem. Soc. Com.* — 2007. — Vol. 129. — No. 21. — P. 6696–6697.

10. Creation of superior carboxyfluorescein dyes by blocking donor-excited photoinduced electron transfer / T. Mineno, T. Ueno, Y. Urano [et al.] // *Org. Lett.* — 2006. — Vol. 8. — No. 26. — P. 5963–5966.

11. Mchedlov-Petrosyan N. O. 2,4,5,7-tetranitrofluorescein in solutions: novel type of tautomerism in hydroxyxanthene series as detected by various spectral methods / N. O. Mchedlov-Petrosyan, N. A. Vodolazkaya, Y. N. Surov, D. V. Samoylov // *Spectrochim. Acta, Part A.* — 2005. — Vol. 61. — No. 11 – 12. — P. 2747 – 2760.

12. Yao H. Infrared multiple photon dissociation action spectroscopy and computational studies of mass-selected gas-phase fluorescein and 2',7'-dichlorofluorescein ions / H. Yao, J. D. Steill, J. Oomens, R. A. Jockusch // *J. Phys. Chem. A.* — 2011. — Vol. 115. — No. 34. — P. 9739 – 9747.

13. Tanabe T. Molecular structure conversion of fluorescein monoanions in an electrostatic storage ring / T. Tanabe, M. Saito, K. Noda, E. B. Starikov // *Eur. Phys. J. D.* — 2012. — Vol. 66. — No. 6. — P. 163.

14. In search for the “phenolate” monoanion of fluorescein in solution / N. O. Mchedlov-Petrosyan, N. A. Vodolazkaya, N. V. Salamanova [et al.] // *Chem. Lett.* — 2010. — Vol. 39. — No. 1. — P. 30 – 31.

15. Quadrifoglio F. The interaction of methyl orange and other azo-dyes with polyelectrolytes and with colloidal electrolytes in dilute aqueous solution / F. Quadrifoglio, V. Crescenzi // *J. Colloid Interface Sci.* — 1971. — Vol. 35. — No. 3. — P. 447 – 459.

16. Dutta P. Amino acid based amphiphilic copolymer micelles as carriers of non-steroidal anti-inflammatory drugs: solubilization, in vitro release and biological evaluation. / P. Dutta, J. Dey, V. Perumal, M. Mandal // *Int. J. Pharm.* — 2011. — Vol. 407. — No. 1 – 2. — P. 207 – 216.

17. Yadav R. Static and dynamic aspects of supramolecular interactions of coumarin 153 and fluorescein with bovine serum albumin / R. Yadav, S. Das, P. Sen // *Aust. J. Chem.* — 2012. — Vol. 65. — No. 9. — P. 1305 – 1313.

18. Niesman M. R. Encapsulation of sodium fluorescein for dye release studies / M. R. Niesman, B. Khoobehi, G. A. Peyman // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. — 1992. — Vol. 33. — No. 7. — P. 2113 – 2119.
19. Characterization of monomeric and gemini cationic amphiphilic molecules by fluorescence intensity and anisotropy / P. Quagliotto, N. Barbero, C. Barolo [et al.] // Dyes Pigm. — 2009. — Vol. 82. — No. 2. — P. 124 – 129.
20. The properties of silica nanoparticles modified with cationic surfactant / E. Y. Bryleva, N. A. Vodolazkaya, N. O. Mchedlov-Petrosyan [et al.] // Funct. Mater. — 2006. — Vol. 13. — No. 4. — P. 662 – 668.
21. Aumanen J. Energy transfer to xanthene dyes in dansylated POPAM dendrimers / J. Aumanen, J. Korppi-Tommola // Chem. Phys. Lett. — 2011. — Vol. 518. — P. 87 – 92.
22. Isolation and characterization of precise dye/dendrimer ratios / C. A. Dougherty, J. C. Furgal, M. A. van Dongen [et al.] // Chem. Eur. J. — 2014. — Vol. 20. — No. 16. — P. 4638 – 4645.
23. Li P. A new fret nanoprobe for trypsin using a bridged β -cyclodextrin dimer – dye complex and its biological imaging applications / P. Li, Y. Liu, X. Wang, B. Tang // Analyst. — 2011. — Vol. 136. — No. 21. — P. 4520 – 4525.
24. Flamigni L. Inclusion of fluorescein and halogenated derivatives in α -, β -, and γ -cyclodextrins. a steady-state and picosecond time-resolved study / L. Flamigni // J. Phys. Chem. — 1993. — Vol. 97. — No. 38. — P. 9566 – 9572.
25. Methylene blue – calixarenesulfonate supramolecular complexes and aggregates in aqueous solutions / O. Varga, M. Kubinyi, T. Vidóczy [et al.] // J. Photochem. Photobiol., A. — 2009. — Vol. 207. — P. 167 – 172.
26. Chen M. Intermolecular complexation between p-sulfonated calix[4, 6, 8]arene sodium and neutral red / M. Chen, W. G. Diao // J. Solution Chem. — 2011. — Vol. 40. — P. 481 – 491.
27. Investigation of tetramethylenesulfonated calix[4]resorcinarene interactions with azo dyes in aqueous solution / J. E. Morozova, E. K. Kazakova, D. A. Mironova [et al.] // J. Phys. Chem. B. — 2010. — Vol. 114. — No. 41. — P. 13152 – 13158.

28. Jasmine M. J. Fractal growth of PAMAM dendrimer aggregates and its impact on the intrinsic emission properties / M. J. Jasmine, E. Prasad // *J. Phys. Chem. B.* — 2010. — Vol. 114. — No. 23. — P. 7735 – 7742.

29. Self-assembly of pH-responsive fluorinated dendrimer-based particulates for drug delivery and noninvasive imaging. / J. M. Criscione, B. L. Le, E. Stern [et al.] // *Biomaterials.* — 2009. — Vol. 30. — No. 23 – 24. — P. 3946 – 3955.

30. Self-assembly of amphiphilic calix[4]arenes in aqueous solution / M. Strobel, K. Kita-Tokarczyk, A. Taubert [et al.] // *Adv. Funct. Mater.* — 2006. — Vol. 16. — P. 252 – 259.

31. Evaluation of a cationic calix[4]arene: solubilization and self-aggregation ability / E. V Ukhatskaya, S. V Kurkov, S. E. Matthews [et al.] // *Int. J. Pharm.* — 2010. — Vol. 402. — No. 1 – 2. — P. 10 – 19.

32. Arimori S. Self-assembly of tetracationic amphiphiles bearing a calix[4]arene core correlation between the core structure and the aggregation properties / S. Arimori, T. Nagasaki, S. Shinkai // *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2.* — 1995. — No. 4. — P. 679 – 683.

33. A stimulus-responsive shape-persistent micelle bearing a calix[4]arene building block: reversible pH-dependent transition between spherical and cylindrical forms / S. Fujii, Y. Sanada, T. Nishimura [et al.] // *Langmuir.* — 2012. — Vol. 28. — P. 1 – 6.

34. Basílio N. Calixarene-based surfactants: evidence of structural reorganization upon micellization / N. Basílio, L. Garcia-Rio, M. Martín-Pastor // *Langmuir.* — 2012. — Vol. 28. — P. 2404 – 2414.

35. Koh K. Self-assembled molecular capsule based on the hydrogen-bonding interaction between two different calix[4]arenes / K. Koh, K. Araki, S. Shinkai // *Tetrahedron Lett.* — 1994. — Vol. 35. — No. 44. — P. 8255 – 8258.

36. Lower rim guanidinocalix[4]arenes: macrocyclic nonviral vectors for cell transfection / V. Bagnacani, V. Franceschi, L. Fantuzzi [et al.] // *Bioconjugate Chem.* — 2012. — Vol. 23. — P. 993 – 1002.

37. Basílio N. Calixarene-based surfactants : conformational-dependent solvation shells for the alkyl chains / N. Basílio, L. Garcia-Rio // *ChemPhysChem*. — 2012. — Vol. 13. — P. 2368 – 2376.

38. Baeyer A. Ueber eine neue klasse von farbetoffen / A. Baeyer // *Ber. deut. chem. Gesellschaft*. — 1871. — Vol. 4. — No. 2. — P. 555 – 558.

39. Мчедлов-Петросян Н. О. Флуоресцеиновые красители в растворах – хорошо изученные системы? / Н. О. Мчедлов-Петросян // *Вісник ХНУ : Хімія*. — 2004. — Т. 626, № 11 (34). — С. 221 – 312.

40. Zhang X.-F. Photophysics of halogenated fluoresceins: involvement of both intramolecular electron transfer and heavy atom effect in the deactivation of excited states / X.-F. Zhang, I. Zhang, L. Liu // *Photochem. Photobiol.* — 2010. — Vol. 86. — No. 3. — P. 492 – 498.

41. Osborn R. S. The crystal and molecular structure of the 1:1 complex of acetone with the lactoid form of fluorescein / R. S. Osborn, D. Rogers // *Acta Crystallogr., Sect. B: Struct. Sci.* — 1975. — Vol. 31. — No. 2. — P. 359 – 364.

42. Wang L. Raman and ftr spectroscopies of fluorescein in solutions / L. Wang, A. Roitberg, C. Meuse, A. K. Gaigalas // *Spectrochim. Acta, Part A*. — 2001. — Vol. 57. — No. 9. — P. 1781 – 1791.

43. One- and two-photon absorption of fluorescein dianion in water: a study using S-QM/MM methodology and ZINDO method. / D. L. Silva, R. C. Barreto, E. G. Lacerda [et al.] // *Spectrochim. Acta, Part A*. — 2014. — Vol. 119. — P. 63 – 75.

44. Zhao Z.-G. The absorption and structure of fluorescein and its ethyl derivatives in various solutions / Z.-G. Zhao, T. Shen, H. Xu // *Spectrochim. Acta, Part A*. — 1989. — Vol. 45. — No. 11. — P. 1113 – 1116.

45. Zhang X.-F. The effect of phenyl substitution on the fluorescence characteristics of fluorescein derivatives via intramolecular photoinduced electron transfer / X.-F. Zhang // *Photochem. and Photobiol. Sci.* — 2010. — Vol. 9. — No. 9. — P. 1261 – 1268.

46. Immobilization of fluorescein isothiocyanate on magnetic polymeric nanoparticle using chitosan as spacer / C. Kaewsaneha, P. Opaprakasit, D. Polpanich [et al.] // *J. Colloid Interface Sci.* — 2012. — Vol. 377. — No. 1. — P. 145 – 152.
47. Gui R. An improved method for ratiometric fluorescence detection of pH and Cd^{2+} using fluorescein isothiocyanate-quantum dots conjugates / R. Gui, X. An, W. Huang // *Anal. Chim. Acta.* — 2013. — Vol. 767. — P. 134 – 140.
48. Isolation and characterization of plant growth-promoting rhizobacteria from wheat roots by wheat germ agglutinin labeled with fluorescein isothiocyanate / J. Zhang, J. Liu, L. Meng [et al.] // *J. Microbiol.* — 2012. — Vol. 50. — No. 2. — P. 191 – 198.
49. Pharmacokinetics of 5-aminofluorescein-albumin, a novel fluorescence marker of brain tumors during surgery. / R. Ding, E. Frei, M. Fardanesh [et al.] // *J. Clinical Pharm.* — 2011. — Vol. 51. — No. 5. — P. 672 – 678.
50. Conjugation of amino-bioactive glasses with 5-aminofluorescein as probe molecule for the development of pH sensitive stimuli-responsive biomaterials / V. Aina, G. Malavasi, C. Magistris [et al.] // *J. Mater. Sci. – Mater. Med.* — 2014. — Vol. 5. — No. 10. — P. 2243 – 2253.
51. Sauer M. Handbook of fluorescence spectroscopy and imaging / M. Sauer, J. Hofkens, J. Enderlein. — Weinheim : Wiley-VCH. — 2011. — 281 p.
52. Sjöback R. Absorption and fluorescence properties of fluorescein / R. Sjöback, J. Nygren, M. Kubista // *Spectrochim. Acta, Part A.* — 1995. — Vol. 51. — No. 6. — P. L7 – L21.
53. Synthesis of a fluorescent xanthenic derivative useful for labeling amine residues / L. Crovetto, R. Rios, J. M. Alvarez-Pez [et al.] // *J. Phys. Chem. B.* — 2008. — Vol. 112. — No. 33. — P. 10082 – 10085.
54. Aschi M. Physicochemical properties of fluorescent probes: experimental and computational determination of the overlapping pK_a values of carboxyfluorescein / M. Aschi, A. A. D'Archivio, A. Fontana, A. Formiglio // *J. Org. Chem.* — 2008. — Vol. 73. — No. 9. — P. 3411 – 3417.

55. Gui R. Self-assembly synthesis of magnetic fluorescein derivatives for Cu (II) -assisted off – on fluorescence probe of nitric oxide / R. Gui, Y. Jiang, S. Huang // *Mater. Lett.* — 2014. — Vol. 132. — P. 436 – 439.

56. Красовицкий Б. М. Органические люминофоры / Б. М. Красовицкий, Б. М. Болотин. — Москва : Химия. — 1984. — 336 с.

57. Mottram L. F. The Pennsylvania Green fluorophore: a hybrid of Oregon Green and Tokyo Green for the construction of hydrophobic and pH-insensitive molecular probes / L. F. Mottram, S. Boonyarattanakalin, R. E. Kovel, B. R. Peterson // *Org. Lett.* — 2006. — Vol. 8. — No. 4. — P. 581 – 584.

58. Fluorescein-derived fluorescent probe for cellular hydrogen sulfide imaging / H.-Y. Liu, M. Zhao, Q.-L. Qiao [et al.] // *Chin. Chem. Lett.* — 2014. — Vol. 25. — No. 7. — P. 1060 – 1064.

59. Murale D. P. Rapid and selective detection of Cys in living neuronal cells utilizing a novel fluorescein with chloropropionate – ester functionalities / D. P. Murale, H. Kim, W. S. Choi, D. G. Churchill // *RSC Adv. Comm.* — 2014. — Vol. 4. — No. 11. — P. 5289 – 5292.

60. Improved PeT molecules for optically sensing voltage in neurons / C. R. Woodford, E. P. Frady, R. S. Smith [et al.] // *J. Am. Chem. Soc.* — 2015. — Vol. 137. — No. 5. — P. 1817 – 1824.

61. Leonhardt H. Acid-base equilibria of fluorescein and 2',7'-dichlorofluorescein in their ground and fluorescent states / H. Leonhardt, L. Gordon, R. Livingston // *J. Org. Chem.* — 1971. — Vol. 75. — No. 2. — P. 245 – 249.

62. Yguerabide J. Steady-state fluorescence method for evaluating excited state proton reactions: application to fluorescein / J. Yguerabide, E. Talavera, J. M. Alvarez, B. Quintero // *Photochem. Photobiol.* — 1994. — Vol. 60. — No. 5. — P. 435 – 441.

63. Klonis N. Spectral properties of the prototropic forms of fluorescein in aqueous solution / N. Klonis, W. H. Sawyer // *J. Fluoresc.* — 1996. — Vol. 6. — No. 3. — P. 147 – 157.

64. Martin M. M. The pH dependence of fluorescein fluorescence / M. M. Martin, L. Lindqvist // *J. Lumin.* — 1975. — Vol. 10. — No. 6. — P. 381 – 390.
65. Pant S. Fluorescence lifetime studies on various ionic species of sodium fluorescein (uranine) / S. Pant, H. B. Tripathi, D. D. Pant // *J. Photochem. Photobiol., A.* — 1994. — Vol. 81. — No. 1. — P. 7 – 11.
66. Martin M. M. Hydrogen bond effects on radiationless electronic transitions in xanthene dyes / M. M. Martin // *Chem. Phys. Lett.* — 1975. — Vol. 35. — No. 1. — P. 105 – 111.
67. Zhao P. Fluorescence spectroscopic studies on the multicomponent system Coumarin 1/fluorescein/Rhodamine B in ethanol / P. Zhao, S. Rodriguez // *J. Fluoresc.* — 1997. — Vol. 7. — No. 2. — P. 121 – 130.
68. Zeng H.-H. Fibre-optic sensor for the determination of carboxylic acids based on fluorescence enhancement of lipophilized fluorescein isologues / H.-H. Zeng, K.-M. Wang, X.-H. Yang, R.-Q. Yu // *Anal. Chim. Acta.* — 1994. — Vol. 287. — No. 3. — P. 267 – 273.
69. Syntheses and photophysical properties of amphiphilic dyads of fluorescein and carbazole linked with a flexible or semi-rigid bridge / A. Song, T. Wu, S. Chen [et al.] // *Dyes Pigm.* — 1998. — Vol. 39. — No. 4. — P. 371 – 382.
70. Klonis N. Spectral properties of fluorescein in solvent-water mixtures: applications as a probe of hydrogen bonding environments in biological systems / N. Klonis, A. H. A. Clayton, E. W. Voss, W. H. Sawyer // *Photochem. Photobiol.* — 1998. — Vol. 67. — No. 5. — P. 500 – 510.
71. Yao H. Fluorescence and electronic action spectroscopy of mass-selected gas-phase fluorescein, 2',7'-dichlorofluorescein, and 2',7'-difluorofluorescein ions / H. Yao, R. A. Jockusch // *J. Phys. Chem. A.* — 2013. — Vol. 117. — No. 6. — P. 1351 – 1359.
72. McQueen P. D. On the intrinsic photophysics of fluorescein / P. D. McQueen, S. Sagoo, H. Yao, R. A. Jockusch // *Angew. Chem. Int. Ed.* — 2010. — Vol. 49. — No. 48. — P. 9193 – 9196.

73. Soep B. Study of triplet quantum yields using a tunable dye laser / B. Soep, A. Kellmann, M. Martin, L. Lindqvist // *Chem. Phys. Lett.* — 1972. — Vol. 13. — No. 3. — P. 241 – 244.

74. Picosecond fluorescence studies of xanthene dyes / G. R. Fleming, A. W. E. Knight, J. M. Morris [et al.] // *J. Am. Chem. Soc.* — 1977. — Vol. 99. — No. 13. — P. 4306 – 4311.

75. Lindqvist L. On the internal conversion in fluorescein dyes / L. Lindqvist, G. W. Lundeen, M. Martin // *J. Phys. Chem.* — 1971. — Vol. 55. — No. 6. — P. 3054 – 3055.

76. Chen S.-C. Supplemental studies on relationship between structure and spectrum of fluorescein / S.-C. Chen, H. Nakamura, Z. Tamura // *Chem. Pharm. Bull.* — 1979. — Vol. 27. — No. 2. — P. 475 – 479.

77. Amat-Guerri F. Spectrophotometric determination of ionization and isomerization constants of Rose Bengal, Eosin Y and some derivatives / F. Amat-Guerri, M. M. C. López-González, R. Sastre, R. Martínez-Utrilla // *Dyes Pigm.* — 1990. — Vol. 13. — No. 3. — P. 219 – 232.

78. Lamberts J. J. M. Rose Bengal and nonpolar derivatives / J. J. M. Lamberts, D. C. Neckers // *J. Am. Chem. Soc.* — 1983. — Vol. 105. — No. 25. — P. 7465 – 7467.

79. Mchedlov-Petrosyan N. O. Effect of the solvent on the absorption spectra and protonation of fluorescein dye anions / N. O. Mchedlov-Petrosyan, V. V Ivanov // *Zhurn. Fiz. Khim.* — 2007. — Vol. 81. — No. 1. — P. 117 – 121.

80. Fink D. W. Structure and internal mixing in xanthene dyes / D. W. Fink, C. R. Wills // *J. Chem. Phys.* — 1970. — Vol. 53. — No. 12. — P. 4720 – 4722.

81. Lindqvist L. Radiationless transitions in xanthene dyes / L. Lindqvist, G. W. Lundeen // *J. Chem. Phys.* — 1966. — Vol. 44. — No. 4. — P. 1711 – 1712.

82. Spectral properties and structure of fluorescein and its alkyl derivatives in micelles / A. Song, J. Zhang, M. Zhang [et al.] // *Colloids Surf., A.* — 2000. — Vol. 167. — No. 3. — P. 253 – 262.

83. Munkholm C. Intramolecular fluorescence self-quenching of fluoresceinamine / C. Munkholm, D.-R. Parkinson, D. R. Walt // *J. Am. Chem. Soc.* — 1990. — Vol. 112. — No. 7. — P. 2608 – 2612.

84. Rational design principle for modulating fluorescence properties of fluorescein-based probes by photoinduced electron transfer / T. Miura, Y. Urano, K. Tanaka [et al.] // *J. Am. Chem. Soc.* — 2003. — Vol. 125. — No. 28. — P. 8666 – 8671.

85. Design and synthesis of highly sensitive fluorogenic substrates for glutathione s-transferase and application for activity imaging in living cells / Y. Fujikawa, Y. Urano, T. Komatsu [et al.] // *J. Am. Chem. Soc.* — 2008. — Vol. 130. — No. 44. — P. 14533 – 14543.

86. Rational design of fluorescein-based fluorescence probes. mechanism-based design of a maximum fluorescence probe for singlet oxygen / K. Tanaka, T. Miura, N. Umezawa [et al.] // *J. Am. Chem. Soc.* — 2001. — Vol. 123. — No. 11. — P. 2530 – 2536.

87. Evolution of fluorescein as a platform for finely tunable fluorescence probes / Y. Urano, M. Kamiya, K. Kanda [et al.] // *J. Am. Chem. Soc.* — 2005. — Vol. 127. — No. 13. — P. 4888 – 4894.

88. Evolution of group 14 rhodamines as platforms for near-infrared fluorescence probes utilizing photoinduced electron transfer / Y. Koide, Y. Urano, K. Hanaoka [et al.] // *Chem. Biol.* — 2011. — Vol. 6. — No. 6. — P. 600 – 608.

89. Fluorescence properties of dibenzofluorescein in aqueous solution / X.-F. Zhang, Q. Liu, A. Son [et al.] // *J. Fluorescence.* — 2008. — Vol. 18. — No. 6. — P. 1051 – 1057.

90. Activatable optical imaging with a silica-rhodamine based near infrared fluorophore: a comparison with cyanine based dyes / T. E. McCann, N. Kosaka, Y. Koide [et al.] // *Biocon. Chem.* — 2011. — Vol. 22. — No. 12. — P. 2531–2538.

91. Photophysical behavior of lipophilic xanthene dyes without the involvement of photoinduced electron transfer mechanism / X.-F. Zhang, Q. Liu, H. Wang [et al.] // *J. Photochem. Photobiol., A.* — 2008. — Vol. 200. — No. 2-3. — P. 307 – 313.

92. Fluorescence spectroscopy of Rhodamine 6G: concentration and solvent effects / F. M. Zehentbauer, C. Moretto, R. Stephen [et al.] // *Spectrochim. Acta, Part A*. — 2014. — Vol. 121. — P. 147 – 151.

93. The invalidity of the photo-induced electron transfer mechanism for fluorescein derivatives. / P. Zhou, J. Liu, S. Yang [et al.] // *Phys. Chem. Chem. Phys.* — 2012. — Vol. 14. — No. 43. — P. 15191 – 15198.

94. Diehl H. Studies on fluorescein – V. The absorbance of fluorescein in the ultraviolet, as a function of pH / H. Diehl, N. Horchak-Morris // *Talanta*. — 1987. — Vol. 34. — No. 8. — P. 739 – 741.

95. Gholivand M. B. Spectrophotometric study of the effects of surfactants and ethanol on the acidity constants of fluorescein / M. B. Gholivand, J. B. Ghasemi, S. Saaidpour, A. Mohajeri // *Spectrochim. Acta, Part A*. — 2008. — Vol. 71. — No. 3. — P. 1158 – 1165.

96. Tamura Z. Spectrophotometric estimation of the pK_a values, absorption spectra and structural formulas of molecular species in aqueous solutions of fluorescein and sulfonefluorescein / Z. Tamura, T. Morioka, M. Maeda, A. Tsuji // *Bunseki Kagaku*. — 1994. — Vol. 43. — P. 339 – 346.

97. De S. Spectroscopic studies with fluorescein dye—protonation, aggregation and interaction with nanoparticles / S. De, R. Kundu // *J. Photochem. Photobiol., A*. — 2011. — Vol. 223. — No. 2-3. — P. 71 – 81.

98. Мчедлов-Петросян Н. О. Дифференцирование силы органических кислот в истинных и организованных растворах / Н. О. Мчедлов-Петросян. — Харьков : ХНУ им. В.Н.Каразина. — 2004. — 675 с.

99. Davies M. Infra-red absorptions and molecular structures of phenol, phenolphthalein, fluorescein, and some alkali derivatives / M. Davies, R. L. Jones // *J. Chem. Soc.* — 1954. — P. 120 – 125.

100. Markuszewski R. The infrared spectra and structures of the three solid forms of fluorescein / R. Markuszewski, H. Diehl // *Talanta*. — 1980. — Vol. 27. — No. 11. — P. 937 – 946.

101. The lactone form of fluorescein: crystal structure of 1:1 molecular complex of fluorescein with methanol / I. N. Polyakova, Z. A. Starikova, B. V. Parusnikov [et al.] // J. Struct. Chem. — 1985. — Vol. 25. — No. 5. — P. 752 – 757.

102. Structure of red and orange fluorescein / U. Anthoni, C. Christophersen, P. H. Nielsen [et al.] // Structural Chemistry. — 1995. — Vol. 6. — No. 3. — P. 161 – 165.

103. Advantages of mechanochemical cocrystallisation in the solid-state chemistry of pigments: colour-tuned fluorescein cocrystals / D.-K. Bučar, S. Filip, M. Arhangelskis [et al.] // CrystEngComm. — 2013. — Vol. 15. — No. 32. — P. 6289 – 6291.

104. Tremayne M. Structure determination of a complex organic solid from X-ray powder diffraction data by a generalized monte carlo method: the crystal structure of red fluorescein / M. Tremayne, B. M. Kariuki, K. D. M. Harris // Angew. Chem. Int. Ed. — 1997. — Vol. 36. — No. 7. — P. 770 – 772.

105. Научное наследие Н. А. Измайлова и актуальные проблемы физической химии / [под ред. В. И. Лебеда, Н. О. Мchedлова-Петросяна, Ю. В. Холина]. — Харьков : ХНУ имени В. Н. Каразина — 2007. — 675 с.

106. Потенциометрическое исследование протолитических равновесий трифенилметановых и ксантеновых соединений в смеси бутанола-1 с водой (9:1 по массе) / Н. О. Мchedлов-Петросян, О. Н. Тычина, Н. В. Кислякова [и др.] // Укр. хим. журн. — 2004. — Т. 70, №. 2. — С. 89 – 94.

107. Biswas S. Absorption and emission spectroscopic studies of fluorescein dye in alkanol, micellar and microemulsion media / S. Biswas, S. C. Bhattacharya, P. K. Sen, S. P. Moulik // J. Photochem. Photobiol., A. — 1999. — Vol. 123. — No. 1 – 3. — P. 121 – 128.

108. Mchedlov-Petrosyan N. O. Fluorescein ionization constants / N. O. Mchedlov-Petrosyan // Zhurn. Anal. Khim. — 1979. — Vol. 34. — No. 6. — P. 1055 – 1059.

109. Mchedlov-Petrosyan N. O. Protolytic equilibrium in lyophilic nanosized dispersions: differentiating influence of the pseudophase and salt effects /

N. O. Mchedlov-Petrosyan // Pure Appl. Chem. — 2008. — Vol. 80. — No. 7. — P. 1459 – 1510.

110. Mchedlov-Petrosyan N. O. Dissociation, tautomerism and electroreduction of xanthene and sulfonephthalein dyes in *N,N*-dimethylformamide and other solvents / N. O. Mchedlov-Petrosyan, V. I. Kukhtik, V. D. Bezugliy // J. Phys. Org. Chem. — 2003. — Vol. 16. — No. 7. — P. 380 – 397.

111. Райхардт К. Растворители и эффекты среды в органической химии / К. Райхардт. [пер. с англ. А. А. Кирюшкина]. — Москва : Мир. — 1991. — 763 с.

112. Ionization and tautomerism of oxyxanthene dyes in aqueous butanol / N. O. Mchedlov-Petrosyan, O. N. Tychina, T. A. Berezhnaya [et al.] // Dyes Pigm. — 1999. — Vol. 43. — No. 1. — P. 33 – 46.

113. Mchedlov-Petrosyan N. O. Protolytic equilibria of fluorescein halo-derivatives in aqueous-organic systems / N. O. Mchedlov-Petrosyan, V. I. Kukhtik, S. I. Egorova // Rus. J. Gen. Chem. — 2006. — Vol. 76. — No. 10. — P. 1607 – 1617.

114. Medium effects on the prototropic equilibria of fluorescein fluoro derivatives in true and organized solution / N. O. Mchedlov-Petrosyan, N. A. Vodolazkaya, Y. A. Gurina [et al.] // J. Phys. Chem. B. — 2010. — Vol. 114. — No. 13. — P. 4551 – 4564.

115. A dibasic acid with reversed order of the stepwise ionization constants: 2,7-dichlorofluorescein in the ternary solvent mixture benzene – ethanol – water / N. O. Mchedlov-Petrosyan, N. V Salamanova, N. A. Vodolazkaya [et al.] // J. Phys. Org. Chem. — 2006. — Vol. 19. — No. 6. — P. 365 – 375.

116. Лебедь А. В. Квантово-химическое исследование таутомерных равновесий флуоресцеиновых красителей в ДМСО / А. В. Лебедь, А. В. Бирюков, Н. О. Мчедлов-Петросян // Химия гетероцикл. соед. — 2014. — № 3. — С. 367 – 380.

117. Vodolazkaya N. A. Spectroscopic study of acid – base ionization and tautomerism of fluorescein dyes in direct microemulsions at high bulk ionic strength / N. A. Vodolazkaya, Y. A. Gurina, N. V Salamanova, N. O. Mchedlov-Petrosyan // J. Mol. Liq. — 2009. — Vol. 145. — No. 3. — P. 188 – 196.

118. pK_a determinations of xanthene derivates in aqueous solutions by multivariate analysis applied to UV – Vis spectrophotometric data / V. R. Batistela, D. S. Pellosi, F. D. de Souza [et al.] // *Spectrochim. Acta, Part A*. — 2011. — Vol. 79. — P. 889 – 897.

119. Бирюков А. В. О возможности существования в ряду производных флуоресцеина лактонной формы дианиона / А. В. Бирюков, А. В. Лебедь, Н. О. Мchedlov-Петросян // *Доп. НАН України*. — 2010. — №. 7. — С. 113 – 118.

120. Stilbs E. NMR measurements on microemulsions / E. Stilbs, B. Lindman // *Prog. Colloid Polym. Sci.* — 1984. — Vol. 69. — P. 39 – 47.

121. Shinoda K. The significance and characteristics of organized solutions / K. Shinoda // *J. Phys. Chem.* — 1985. — Vol. 89. — No. 11. — P. 2429 – 2431.

122. Shinoda K. A new concept “ideal organized solution”: comparison of random mixing solutions and ideal organized solution / K. Shinoda // *Langmuir*. — 1991. — Vol. 7. — No. 12. — P. 2877 – 2880.

123. Organized solution: surfactants in science and technology / [ed. S. E. Friberg, B. Lindman]. — New York : CRC Press. — 1992. — 627 p.

124. Mchedlov-Petrosyan N. O. Ionic equilibria of fluorophores in organized solutions : the influence of micellar microenvironment on protolytic and photophysical properties of Rhodamine B / N. O. Mchedlov-Petrosyan, N. A. Vodolazkaya, A. O. Doroshenko // *J. Fluoresc.* — 2003. — Vol. 13. — No. 3. — P. 235 – 248.

125. Штыков С. Н. Химический анализ в нанореакторах: основные понятия и определения / С. Н. Штыков // *Журн. анал. химии*. — 2002. — Т. 57, №. 10. — С. 1018 – 1028.

126. Штыков С. Н. Организованные среды - мир жидких наносистем / С. Н. Штыков // *Природа*. — 2009. — Т. 7. — С. 12 – 20.

127. Водолазкая Н. А. Кисотно-основные равновесия индикаторных красителей в организованных растворах / Н. А. Водолазкая, Н. О. Мchedlov-Петросян. — Харьков : ХНУ им. В. Н. Каразина, 2014. — 460 с.

128. Ganguly B. Study of the interaction between Eosin Y and alkyltrimethylammonium bromide surfactants / B. Ganguly, R. K. Nath // *J. Surf. Interfaces Mater.* — 2013. — Vol. 1. — No. 1. — P. 87 – 92.

129. Ruiz C. C. Fluorescence anisotropy of probes solubilized in micelles of tetradecyltrimethylammonium bromide: effect of ethylene glycol added / C. C. Ruiz // *J. Colloid Interface Sci.* — 2000. — Vol. 221. — No. 2. — P. 262 – 267.

130. Sánchez F. G. Intramolecular energy transfer in aqueous CTAB solutions / F. G. Sánchez, C. C. Ruiz // *J. Lumin.* — 1996. — Vol. 69. — No. 4. — P. 179 – 186.

131. Das S. Influence of temperature and polar organic solvents (isopropanol and 1,4-dioxane) on the micellization of cationic gemini surfactant (14-4-14) / S. Das, B. Naskar, S. Ghosh // *Soft Matter.* — 2014. — Vol. 10. — No. 16. — P. 2863 – 2875.

132. Isaenko Y. V Ionic equilibria of chromophoric reagents in microemulsions / Y. V Isaenko, N. V Salamanova, V. I. Alekseeva, L. P. Savvina // *J. Anal. Chem.* — 2003. — Vol. 58. — No. 11. — P. 1018 – 1030.

133. Arbeloa E. M. Effect of the interface on the photophysics of Eosin-Y in reverse micelles / E. M. Arbeloa, G. V Porcal, S. G. Bertolotti, C. M. Previtali // *J. Photochem. Photobiol., A.* — 2013. — Vol. 252. — P. 31 – 36.

134. Dutt G. B. Do ionic and hydrophobic probes sense similar microenvironment in Triton X-100 nonionic reverse micelles? / G. B. Dutt // *J. Chem. Phys.* — 2009. — Vol. 129. — No. 1. — P. 014501.

135. Huang C.-B. A flow-injection chemiluminescence method for the determination of human serum albumin, using the reaction of fluorescein – human serum albumin – sodium hypochlorite by the enhancement effect of the cationic surfactant cetyltrimethylammonium bromide / C.-B. Huang, K. Zhang, X.-L. Liu, S.-F. Wang // *Luminescence.* — 2007. — Vol. 22. — No. 5. — P. 393 – 400.

136. The binding ability and solvation properties of cationic spherical polyelectrolyte brushes as studied using acid-base and solvatochromic indicators / N. A. Vodolazkaya, N. O. Mchedlov-Petrosyan, E. Y. Bryleva [et al.] // *Funct. Mater.* — 2010. — Vol. 17. — No. 4. — P. 470 – 476.

137. Chai M. Encapsulating fluorescein using adipic acid self-assembly on the surface of PPI-3 dendrimer. / M. Chai, A. K. Holley, M. Kruskamp // *Chem. Com.* — 2007. — No. 2. — P. 168 – 170.

138. Interfacial properties of cetyltrimethylammonium-coated SiO₂ nanoparticles in aqueous media as studied by using different indicator dyes / E. Y. Bryleva, N. A. Vodolazkaya, N. O. Mchedlov-Petrosyan [et al.] // *J. Colloid Interface Sci.* — 2007. — Vol. 316. — P. 712 – 722.

139. Gao H. W. Langmuir aggregation of fluorescein isothiocyanate (FITC) on cetyl trimethylammonium bromide (CTAB) and application to determination of anionic detergent in sewage / H. W. Gao, D. Y. Zhou // *Bul. Korean Chem. Soc.* — 2002. — Vol. 23. — No. 1. — P. 29 – 34.

140. Мchedlov-Петросян Н. О. Влияние катионного поверхностно-активного вещества на протолитические свойства некоторых трифенилметановых красителей / Н. О. Мchedlov-Петросян, В. Н. Клещевникова // *Журн. общ. химии.* — 1990. — Т. 60. — С. 900 – 910.

141. Photophysical properties and interactions of xanthene dyes in aqueous micelles / D. S. Pellosi, B. M. Estevão, J. Semensato [et al.] // *J. Photochem. Photobiol., A.* — 2012. — Vol. 247. — P. 8 – 15.

142. Ghosh S. K. Studies on the interaction of fluorescein isothiocyanate and its sugar analogues with cetyltrimethylammonium bromide / S. K. Ghosh, M. Ali, H. Chatterjee // *Chem. Phys. Lett.* — 2013. — Vol. 561-562. — P. 147 – 152.

143. Kibblewhite J. Lipoidal eosin and fluorescein derivatives as probes of the electrostatic characteristics of self-assembled surfactant/water interfaces / J. Kibblewhite, C. J. Drummond, F. Grieser, P. J. Thistlethwaite // *J. Phys. Chem.* — 1989. — Vol. 93. — No. 21. — P. 7464 – 7473.

144. Yusof N. S. M. Characterization of the structural transitions in CTAB micelles using fluorescein isothiocyanate / N. S. M. Yusof, M. N. Khan, M. Ashokkumar // *J. Phys. Chem. C.* — 2012. — Vol. 116. — No. 28. — P. 15019 – 15027.

145. Funasaki N. Micellar effects on the kinetics and equilibrium of chemical reactions in salt solutions / N. Funasaki // J. Phys. Chem. — 1979. — Vol. 83. — No. 15. — P. 1998 – 2003.

146. Grieser F. The physicochemical properties of self-assembled surfactant aggregates as determined by some molecular spectroscopic probe techniques / F. Grieser, C. J. Drummond // J. Phys. Chem. — 1988. — Vol. 92. — No. 20. — P. 5580 – 5593.

147. Fernández M. S. Lipoid pH indicators as probes of electrical potential and polarity in micelles / M. S. Fernández, P. Fromherz // J. Org. Chem. — 1977. — Vol. 81. — No. 18. — P. 1755 – 1761.

148. Водолазкая Н. А. Кислотно-основные и таутомерные равновесия флуоресцеиновых красителей в водных мицеллярных растворах сульфобетаинового поверхностно-активного вещества / Н. А. Водолазкая, П. В. Шахова, Н. О. Мчедлов-Петросян // Журн. общ. химии. — 2009. — Т. 79, №. 7. — С. 1081 – 1089.

149. Мчедлов-Петросян Н. О. Константы ионизации флуоресцеина / Н. О. Мчедлов-Петросян // Журн. анал. химии. — 1979. — Т. 34, №. 6. — С. 1055 – 1059.

150. Gutsche C. D. Calixarenes: an introduction / C. D. Gutsche. — Cambridge : The Royal Society of Chemistry. — 2008. — 276 p.

151. Gutsche C. D. Calixarenes. 1. analysis of the product mixtures produced by the base-catalyzed condensation of formaldehyde with para-substituted phenols / C. D. Gutsche, R. Muthukrisnan // J. Org. Chem. — 1978. — Vol. 43. — No. 25. — P. 4905 – 4906.

152. Mandolini L. Calixarenes in action / L. Mandolini, R. Ungaro. — London : Imperial College Press. — 2000. — 271 p.

153. Calixarenes in the nanoworld / [ed. J. Vicens, J. Harrowfield, L. Baklouti]. — Dordrecht : Springer. — 2007. — 395 p.

154. Bauer L. J. Calixarenes. 15. the formation of complexes of calixarenes with neutral organic molecules in solution / L. J. Bauer, C. D. Gutsche // *J. Am. Chem. Soc.* — 1985. — Vol. 107. — No. 21. — P. 6063 – 6069.

155. Namor A. F. D. de Thermodynamics of calixarene chemistry / A. F. D. de Namor, R. M. Cleverley, M. L. Zapata-Ormachea // *Chem. Rev.* — 1998. — Vol. 98. — P. 2495 – 2525.

156. Liu Y. Molecular recognition and complexation thermodynamics of dye guest molecules by modified cyclodextrins and calixarenesulfonates / Y. Liu, B.-H. Han, Y.-T. Chen // *J. Phys. Chem. B.* — 2002. — Vol. 106. — No. 18. — P. 4678 – 4687.

157. New water-soluble host calixarenes bearing chiral substituents / T. Arimura, H. Kawabata, T. Matsuda [et al.] // *J. Org. Chem.* — 1991. — Vol. 56. — No. 1. — P. 301 – 306.

158. Gutsche C. D. Calixarenes: paradoxes and paradigms in molecular baskets / C. D. Gutsche, J. S. Rogers, D. Stewart, K.-A. See // *Pure Appl. Chem.* — 1990. — Vol. 62. — No. 3. — P. 485 – 491.

159. Valeur B. Ion-responsive supramolecular fluorescent systems based on multichromophoric calixarenes: a review / B. Valeur, I. Leray // *Inorg. Chim. Acta.* — 2007. — Vol. 360. — No. 3. — P. 765 – 774.

160. Da Silva E. Biopharmaceutical applications of calixarenes / E. Da Silva, A. N. Lazar, A. W. Coleman // *J. Drug Delivery Sci. Tech.* — 2004. — Vol. 14. — No. 1. — P. 3 – 20.

161. Agrawal Y. K. Design and synthesis of calixarene / Y. K. Agrawal, J. P. Pancholi, J. M. Vyas // *J. Sci. Ind. Res.* — 2009. — Vol. 68. — No. 9. — P. 745 – 768.

162. Zheng Y.-S. Inherently chiral calixarenes: a decade's review / Y.-S. Zheng, J. Luo // *J. Inclusion Phenom. Mol. Recognit. Chem.* — 2011. — Vol. 71. — No. 1 – 2. — P. 35 – 56.

163. Calixarenes: versatile molecules as molecular sensors for ion recognition study / S. Patra, D. Maity, R. Gunupuru [et al.] // J. Chem. Sci. — 2012. — Vol. 124. — No. 6. — P. 1287 – 1299.
164. Deska M. Calixarenes containing modified meso bridges / M. Deska, B. Dondela, W. Sliwa // Arkivoc. — 2015. — Vol. 2015. — No. 1. — P. 29 – 47.
165. König B. Heteroatom-bridged calixarenes / B. König, M. H. Fonseca // Eur. J. Inorg. Chem. — 2000. — Vol. 200. — No. 11. — P. 2303 – 2310.
166. Rodik R. V Calixarenes in bio-medical researches / R. V Rodik, V. I. Boyko, V. I. Kalchenko // Current Medicinal Chemistry. — 2009. — Vol. 16. — P. 1630 – 1655.
167. Selective membrane transport of amino acids by functionalised calix[4]arenes / L. Kim, A. Hamdi, D. A. Stancu [et al.] // J. Inclusion Phenom. Mol. Recognit. Chem. — 2010. — Vol. 66. — P. 55 – 59.
168. Oshima T. Complex formation of cytochrome c with a calixarene carboxylic acid derivative: a novel solubilization method for biomolecules in organic media / T. Oshima, M. Goto, S. Furusaki // Biomacromol. — 2002. — Vol. 3. — No. 3. — P. 438 – 444.
169. Douteau-Guevel N. Complexation of basic amino acids by water-soluble calixarene sulphonates as a study of the possible mechanisms of recognition of calixarene sulphonates by proteins / N. Douteau-Guevel, A. W. Coleman, J.-P. Morel, N. Morel-Desrosiers // J. Phys. Org. Chem. — 1998. — Vol. 11. — P. 693 – 696.
170. Perrin R. The potential industrial applications of calixarenes / R. Perrin, R. Lamartine, M. Perrin // Pure Appl. Chem. — 1993. — Vol. 65. — No. 7. — P. 1549 – 1559.
171. Arduini A. *p-t*-butyl-calix[4]arene tetracarboxylic acid. a water soluble calixarene in a cone structure / A. Arduini, A. Pochini, S. Raverberi, R. Ungaro // J. Chem. Soc., Chem. Commun. — 1984. — No. 15. — P. 981 – 982.
172. Rehm M. Water-soluble calixarenes—self-aggregation and complexation of noncharged aromatic guests in buffered aqueous solution / M. Rehm, M. Frank, J. Schatz // Tetrahedron Lett. — 2009. — Vol. 50. — No. 1. — P. 93 – 96.

173. Aggregation and adsorption properties of tetramethylsulfonatoresorcinarenes and their associates with nonionogenic guest molecules in aqueous solutions / J. E. Morozova, E. K. Kazakova, E. P. Gubanov [et al.] // *J. Inclusion Phenom. Mol. Recognit. Chem.* — 2006. — Vol. 55. — No. 1 – 2. — P. 173 – 183.

174. Lee M. Stimuli-responsive supramolecular nanocapsules from amphiphilic calixarene assembly / M. Lee, S. Lee, L.-H. Jiang // *J. Am. Chem. Soc.* — 2004. — Vol. 126. — P. 12724 – 12725.

175. Aggregation and counter ion binding ability of sulfonatomethylcalix[4]resorcinarenes in aqueous solutions / R. R. Amirov, Z. T. Nugaeva, A. R. Mustafina [et al.] // *Colloids Surf., A* — 2004. — Vol. 240. — P. 35 – 43.

176. Self-assembly of structurally persistent micelles is controlled by specific-ion effects and hydrophobic guests / C. M. Jager, A. Hirsch, B. Schade [et al.] // *Langmuir*. — 2010. — Vol. 26. — No. 13. — P. 10460 – 10466.

177. Virus-sized DNA nanoparticles for gene delivery based on micelles of cationic calixarenes / R. V Rodik, A. S. Klymchenko, N. Jain [et al.] // *Chem. Eur. J.* — 2011. — Vol. 17. — P. 5526 – 5538.

178. Vesicle-to-micelle transition in aqueous solutions of amphiphilic calixarene derivatives / N. Micali, V. Villari, G. M. L. Consoli [et al.] // *Phys. Rev. E*. — 2006. — Vol. 73. — No. 5. — P. 051904.

179. Syntheses and aggregation properties of new water-soluble calixarenes / S. Shinkai, T. Arimura, K. Araki [et al.] // *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*. — 1989. — No. 11. — P. 2039 – 1045.

180. Matsuoka H. Small-angle X-ray scattering study of aqueous solutions of sulfonated calix[6]arene derivatives / H. Matsuoka, M. Tsurumi, N. Ise // *Phys. Rev. B*. — 1988. — Vol. 38. — No. 9. — P. 6279 – 6286.

181. Shukla D. Cationic gemini surfactants: a review / D. Shukla, V. K. Tyagi // *J. Oleo Sci.* — 2006. — Vol. 55. — No. 8. — P. 381 – 390.

182. Menger F. M. Gemini surfactants / F. M. Menger, J. S. Keiper // *Angew. Chem. Int. Ed.* — 2000. — Vol. 39. — No. 11. — P. 1906 – 1920.

183. Hexasulfonated calix[6]arene derivatives: a new class of catalysts, surfactants, and host molecules / S. Shinkai, S. Mori, H. Koreishi [et al.] // *J. Am. Chem. Soc.* — 1986. — Vol. 108. — No. 9. — P. 2409 – 2416.

184. Zana R. Dimeric and oligomeric surfactants. behavior at interfaces and in aqueous solution: a review / R. Zana // *Adv. Colloid Interface Sci.* — 2002. — Vol. 97. — No. 1-3. — P. 205 – 253.

185. Menger F. M. Synthesis and properties of multiarmed geminis / F. M. Menger, V. A. Migulin // *J. Org. Chem.* — 1999. — Vol. 64. — No. 24. — P. 8916 – 8921.

186. Yoshimura T. Physicochemical properties of quaternary ammonium bromide-type trimeric surfactants / T. Yoshimura, H. Yoshida, A. Ohno, K. Esumi // *J. Colloid Interface Sci.* — 2003. — Vol. 267. — No. 1. — P. 167 – 172.

187. Aggregation behavior of a tetrameric cationic surfactant in aqueous solution / Y. Hou, Y. Han, M. Deng [et al.] // *Langmuir.* — 2010. — Vol. 26. — No. 17. — P. 28 – 33.

188. The first account of a structurally persistent micelle / M. Kellermann, W. Bauer, A. Hirsch [et al.] // *Angew. Chem. Int. Ed.* — 2004. — Vol. 43. — P. 2959 – 2962.

189. The influence of cationic tetrapropoxycalix[4]arene choline on protolytic equilibria of acid-base indicators in aqueous solutions / N. O. Mchedlov-Petrosyan, N. A. Vodolazkaya, L. N. Vilkova [et al.] // *J. Mol. Liq.* — 2009. — Vol. 145. — P. 197 – 203.

190. The nature of aqueous solutions of a cationic calix[4]arene: a comparative study of dye–calixarene and dye–surfactant interactions / N. O. Mchedlov-Petrosyan, L. N. Vilkova, N. A. Vodolazkaya [et al.] // *Sensors.* — 2006. — Vol. 6. — No. 6. — P. 962 – 977.

191. Агрегация катионных катиксаренов в водном растворе и влияние агрегатов на кислотно-основное равновесие индикаторов / Н. О. Мчедлов-Петросян, Л. Н. Богданова, Р. В. Родик [и др.] // *Доп. НАН України.* — 2010. — №. 3. — С. 148 – 153.

192. Thermodynamic and kinetic data for macrocycle interaction with neutral molecules / R. M. Izatt, J. S. Bradshaw, K. Pawlak [et al.] // Chem. Rev. — 1992. — Vol. 92. — No. 6. — P. 1261 – 1354.

193. Baldini L. Calixarene-based multivalent ligands / L. Baldini, A. Casnati, F. Sansone, R. Ungaro // Chem. Soc. Rev. — 2007. — Vol. 36. — P. 254 – 266.

194. Ludwig R. Review on calixarene-type macrocycles and metal extraction data / R. Ludwig // JAERI-Review. — 1995. — Vol. 27. — No. 11. — P. 1 – 55.

195. Complexation of small neutral organic molecules by water soluble calix[4]arenes / G. Arena, A. Contino, F. G. Gulino [et al.] // Tetrahedron Lett. — 2000. — Vol. 41. — No. 48. — P. 9327 – 9330.

196. Ikeda A. Solution complexes formed from C₆₀ and calixarenes. the importance of the preorganized structure for cooperative interactions / A. Ikeda, M. Yoshimura, S. Shinkai // Tetrahedron Lett. — 1997. — Vol. 38. — No. 12. — P. 2107 – 2110.

197. Star-shaped macromolecules with calixarene core and neutral amphiphilic block copolymer arms: new hosts for ions / A. V Tenkovtsev, M. M. Dudkina, L. I. Scherbinskaya [et al.] // Polymer. — 2010. — Vol. 51. — No. 14. — P. 3108 – 3115.

198. Macrocyclic chemistry: new research and developments / [ed. D. W. Fitzpatrick, H. J. Ulrich]. — New York : Nova Science Publishers, 2010. — 517 p.

199. *p*-sulfonatocalix[4]arene as a carrier for curcumin / P. M. Mareeswaran, E. Babu, V. Sathish [et al.] // New J. Chem. — 2014. — Vol. 38. — P. 1336 – 1345.

200. Molecular and biomolecular spectroscopy investigation of the inclusion interaction of *p*-sulfonatocalix[6]arene with triamterene / J. Chao, Y. Zhang, X. Fan [et al.] // Spectrochim. Acta, Part A. — 2013. — Vol. 116. — P. 295 – 300.

201. Arimura T. Host-guest properties of new water-soluble calixarenes derived from *p*-(chloromethyl)calixarenes / T. Arimura, T. Nagasaki, S. Shinkai, T. Matsuda // J. Org. Chem. — 1989. — Vol. 54. — No. 16. — P. 3766 – 3768.

202. Spectroscopic studies of brilliant cresyl blue/water-soluble sulfonated calix[4]arene complex / Y. Zhang, T. H. Pham, M. S. Peña [et al.] // *Appl. Spectrosc.* — 1998. — Vol. 52. — No. 7. — P. 952 – 957.

203. Tao W. Inhibition of quinone-imine dye deamination by complexation with para-sulfonated calixarenes / W. Tao, M. Barra // *J. Org. Chem.* — 2001. — Vol. 66. — No. 6. — P. 2158 – 2160.

204. Sueishi Y. Effects of pressure on inclusion complexation of methylene blue with water-soluble p-sulfonatocalix[n]arenes / Y. Sueishi, N. Inazumi, T. Hanaya // *J. Phys. Org. Chem.* — 2005. — Vol. 18. — No. 5. — P. 448 – 455.

205. Zhang Y.-J. Interaction of sulfonated calix[n]arenes with Rhodamine B and its application to determine acetylcholine in a real neutral aqueous medium / Y.-J. Zhang, W.-X. Cao, J. Xu // *Chin. J. Chem.* — 2002. — Vol. 20. — No. 4. — P. 322 – 326.

206. Chen M. Complexation thermodynamics between butyl Rhodamine B and calix[n]arenesulfonates ($n = 4, 6, 8$) / M. Chen, T. Shang, J. Liu, G. Diao // *J. Chem. Thermodyn.* — 2011. — Vol. 43. — P. 88 – 93.

207. Liu Y. Layered assembly formed by Benzyl Viologen and *p*-sulfonatothiacalix[4]arene and their complexation thermodynamics / Y. Liu, H. Wang, H. Y. Zhang, L. H. Wang // *Crystal Growth and Design.* — 2005. — Vol. 5. — No. 1. — P. 231 – 235.

208. Kawabata Y. Optode for 2-phenethylamine using calixarene as host molecule / Y. Kawabata, T. Yamashiro, Y. Kitazaki, T. Imasaka // *Sens. Actuators, B.* — 1995. — Vol. 29. — P. 135 – 139.

209. Němcová I. Ternary complexes of lanthanide-calix[4]arene with sulphophthalein dyes / I. Němcová, V. Vondrková, K. Nesměrák // *J. Inclusion Phenom.* — 2006. — Vol. 54. — No. 1-2. — P. 47 – 51.

210. Photomodulated fluorescence of supramolecular assemblies of sulfonatocalixarenes and tetraphenylethene / B. P. Jiang, D. S. Guo, Y. C. Liu [et al.] // *ACS Nano.* — 2014. — Vol. 8. — No. 2. — P. 1609 – 1618.

211. Surface activity and self-aggregation ability of three cationic quaternized aminocalix[4]arenes / E. V. Ukhatskaya, S. V. Kurkov, R. V. Rodik [et al.] // J. Inclusion Phenom. Mol. Recognit. Chem. — 2013. — Vol. 79. — No. 3-4. — P. 473 – 483.

212. Solution behavior of mixed systems based on novel amphiphilic cyclophanes and Triton X100: aggregation, cloud point phenomenon and cloud point extraction of lanthanide ions / A. Mustafina, L. Zakharova, J. Elistratova [et al.] // J. Colloid Interface Sci. — 2010. — Vol. 346. — No. 2. — P. 405 – 413.

213. Andreyko E. A. Supramolecular self-assembly of water-soluble nanoparticles based on amphiphilic p-tert-butylthiacalix[4]arenes with silver nitrate and fluorescein / E. A. Andreyko, P. L. Padnya, I. I. Stoikov // Colloids Surf., A. — 2014. — Vol. 454. — P. 74 – 83.

214. Gawhale S. Study on complex formation of fluorescein-p-sulfonatocalix[4]arene by spectroscopic methods / S. Gawhale, Y. Thakare, D. Malkhede, G. Chaudhari // Optics Photonics J. — 2014. — Vol. 4. — No. 9. — P. 237 – 245.

215. OLEX2: a complete structure solution, refinement and analysis program / O. V. Dolomanov, L. J. Bourhis, R. J. Gildea [et al.] // J. Appl. Crystallogr. — 2009. — Vol. 42. — No. 2. — P. 339 – 341.

216. Sheldrick G. M. A short history of SHELX / G. M. Sheldrick // Acta Crystallogr., Sect. A: Found. Crystallogr. — 2008. — Vol. 64. — No. 1. — P. 112 – 122.

217. Fischer O. Zur Kenntnis der Fluorescein-Methyläther / O. Fischer, E. Hepp // Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft. — 1913. — Vol. 46. — No. 2. — P. 1951 – 1959.

218. Orndorff W. R. Sulfonefluorescein and dihydroxybenzoyl-benzene-ortho-sulfonic acid, and some of their derivatives / W. R. Orndorff, R. S. Vose // J. Am. Chem. Soc. — 1924. — Vol. 46. — No. 8. — P. 1836 – 1837.

219. Пушкаревская Е. В. Кислотно-основные равновесия сульфоталеиновых индикаторов в мицеллярных растворах димерного ПАВ /

Е. В. Пушкаревская, С. В. Шеховцов, Н. А. Водолазкая // Вісник ХНУ : Хімія. — 2013. — Т. 1085, №. 22(45). — С. 99 – 105.

220. Colloidal nature of cationic calix[6]arene aqueous solutions / N. O. Mchedlov-Petrosyan, N. A. Vodolazkaya, R. V Rodik [et al.] // J. Phys. Chem. C. — 2012. — Vol. 116. — No. 18. — P. 10245 – 10259.

221. Doroshenko A. O. Spectral data lab software; / A. O. Doroshenko. — Kharkiv : Kharkiv V.N. Karazin National University . — 1999.

222. Zhang X.-F. Fluorescence lifetimes and quantum yields of ten rhodamine derivatives: structural effect on emission mechanism in different solvents / X.-F. Zhang, Y. Zhang, L. Liu // J. Lumin. — 2014. — Vol. 145. — P. 448 – 453.

223. Doroshenko A. O. Spectral properties and dynamics of the excited state structural relaxation of the ortho analogues of POPOP - effective abnormally large stokes shift luminophores / A. O. Doroshenko, A. V Kirichenko, V. G. Mitina, O. A. Ponomaryov // J. Photochem. Photobiol., A. — 1996. — Vol. 94. — No. 1. — P. 15 – 26.

224. Kholin Yu.V. CLINP 2.1, a software program for computation of stability constants and physicochemical parameters of complex compounds in solutions, extractional and sorptional systems on the base of composition-property dependencies // Yu. V. Kholin, D. S. Konyaev, S. A. Mernyi [электронный ресурс]. — Данные и прогр. — Режим доступа: <http://www-chemo.univer.kharkov.ua/kholin/clinp.html> (01.03.15).

225. Albert A. The determination of ionization constants / A. Albert, E. P. Serjeant. — London : Chapman and Hall. — 1984. — 218 p.

226. Верещагин А. Н. Индуктивный эффект / А. Н. Верещагин. — Москва : Наука. — 1987. — 325 p.

227. Zhang H. Photoinduced intramolecular electron transfer in an anthraquinone-fluorescein-carbazole model / H. Zhang, M. Zhang, T. Shen // J. Photochem. Photobiol., A. — 1997. — Vol. 103. — No. 1-3. — P. 63 – 67.

228. Mchedlov-Petrosyan N. O. Ionization and tautomerism of hydroxyxanthenes and some other dyes in ethanol / N. O. Mchedlov-Petrosyan // *Rus. J. General Chem.* — 2003. — Vol. 73. — No. 2. — P. 267 – 274.

229. Influence of non-ionic polymers on solvent properties of water as detected by studies of acid-base equilibria of sulphonaphthalein and fluorescein dyes / B. Y. Zaslavsky, L. M. Miheeva, N. D. Gulaeva [et al.] // *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* — 1991. — Vol. 87. — No. 7. — P. 931 – 938.

230. Mchedlov-Petrosyan N. O. Ionization and tautomerism of xanthene dyes in water-DMSO mixtures / N. O. Mchedlov-Petrosyan, R. S. Mayorga, Y. N. Surov // *Rus. J. General Chem.* — 1991. — Vol. 61. — No. 1. — P. 225 – 233.

231. Mchedlov-Petrosyan N. O. Influence of the cetyltrimethylammonium chloride micellar pseudophase on the protolytic equilibria of oxyxanthene dyes at high bulk phase ionic strength / N. O. Mchedlov-Petrosyan, V. N. Kleshchevnikova // *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* — 1994. — Vol. 90. — No. 4. — P. 629 – 640.

232. Hui Y. Absorption of water into organic solvents used for electrochemistry under conventional operating conditions / Y. Hui, R. D. Webster // *Anal. Chem.* — 2011. — Vol. 83. — No. 3. — P. 976 – 981.

233. Бернштейн И. Я. Спектрофотометрический анализ в органической химии / И. Я. Бернштейн, Ю. Л. Каминский. — Ленинград : Химия. — 1986. — 198 с.

234. Ang K.-P. A spectrophotometric method for the determination of overlapping ionization constants / K.-P. Ang // *J. Phys. Chem.* — 1958. — Vol. 62. — No. 9. — P. 1109 – 1112.

235. Sager E. E. Overlapping dissociation constants of 4,4'-diaminobenzophenone from spectral-absorbancy measurements / E. E. Sager, I. J. Siewers // *J. Res. Natl. Standards.* — 1952. — Vol. 49. — No. 1. — P. 7 – 12.

236. Gampp H. Calculation of equilibrium constants from multiwavelength spectroscopic data-III. Model-free analysis of spectrophotometric and ESR titrations / H. Gampp, M. Maeder, C. J. Meyer, A. D. Zuberbuhler // *Talanta.* — 1985. — Vol. 32. — No. 12. — P. 1133 – 1139.

237. Determination of acid dissociation constant of Methyl Red by multi-peaks gaussian fitting method based on UV-visible absorption spectrum / J.-H. Zhang, Q. Liu, Y.-M. Chen [et al.] // *Acta Phys. Chim. Sin.* — 2012. — Vol. 28. — No. 5. — P. 1030 – 1036.

238. Thamer B. J. The spectrophotometric determination of overlapping dissociation constants of dibasic acids. the acid constants of isophthalic, terephthalic and chloranilic acids / B. J. Thamer, A. F. Voigt // *J. Phys. Chem.* — 1952. — Vol. 56. — No. 2. — P. 225 – 232.

239. Hu Y. Resolving overlapped spectra with curve fitting / Y. Hu, W. Li, J. Hu // *Spectrochim. Acta, Part A.* — 2005. — Vol. 62. — No. 1-3. — P. 16 – 21.

240. Spectrophotometric investigation of the acidity constants of fluorescein in various water-organic solvent media / A. Niazi, A. Yazdanipour, J. Ghasemi [et al.] // *Chem. Eng. Com.* — 2008. — Vol. 195. — No. 10. — P. 1257 – 1268.

241. Practical guide to chemometrics / [ed. P. J. Gemperline]. — Boca Raton : CRC Press. — 2006. — 520 p.

242. Malinowski E. R. Statistical F-tests for abstract factor analysis and target testing / E. R. Malinowski // *J. Chemom.* — 1989. — Vol. 3. — No. 1. — P. 49 – 60.

243. Jaumot J. A graphical user-friendly interface for MCR-ALS : a new tool for multivariate curve resolution in MATLAB / J. Jaumot, R. Gargallo, A. de Juan, R. Tauler // *Chemom. Intell. Lab. Syst.* — 2005. — Vol. 76. — P. 101 – 110.

244. Laufer D. A. ^{13}C NMR determination of acid-base tautomerization equilibria / D. A. Laufer, R. I. Gelb, L. M. Schwartz // *J. Org. Chem.* — 1984. — Vol. 49. — No. 4. — P. 691 – 696.

245. Christensen J. J. Thermodynamics of proton dissociation in dilute aqueous solution. IX. pK , δH° , and δS° values for proton ionization from *o*-, *m*-, and *p*-aminobenzoic acids and their methyl esters at 25° / J. J. Christensen, D. P. Wrathal, R. M. Izatt, D. O. Tolman // *J. Phys. Chem.* — 1967. — Vol. 71. — No. 9. — P. 3001 – 3006.

246. van de Graaf B. Substituent effects. 7. Microscopic dissociation constants of 4-amino- and 4-(dimethylamino)benzoic acid / B. van de Graaf, A. J. Hoefnagel, B. M. Wepster // *J. Org. Chem.* — 1981. — Vol. 46. — No. 4. — P. 653 – 657.

247. Gopal L. Infra-red spectrum and zwitterion structure of meta aminobenzoic acid / L. Gopal, C. I. Jose, A. B. Biswas // *Spectrochim. Acta, Part A.* — 1967. — Vol. 23. — No. 3. — P. 513 – 518.

248. Magde D. Solvent dependence of the fluorescence lifetimes of xanthene dyes / D. Magde, G. E. Rojas, P. G. Seybold // *Photochem. Photobiol.* — 1999. — Vol. 70. — No. 5. — P. 737 – 744.

249. Ohshima H. Accurate analytic expressions for the surface charge density/surface potential relationship and double-layer potential distribution for a spherical colloidal particle / H. Ohshima, T. W. Healy, L. R. White // *J. Colloid Interface Sci.* — 1982. — Vol. 90. — No. 1. — P. 17 – 26.

250. Tanford C. Micelle shape and size / C. Tanford // *J. Phys. Chem.* — 1972. — Vol. 76. — No. 21. — P. 3020 – 3024.

251. Dutta R. K. Interaction of phenazinium dyes and methyl orange with micelles of various charge types / R. K. Dutta, S. N. Bhat // *Colloids Surf., A.* — 1996. — Vol. 106. — No. 2 – 3. — P. 127 – 134.

252. Becherer M. S. Supramolecular assembly of self-labeled amphiphilic arenes / M. S. Becherer, B. Schade, A. Hirsch // *Chem. Eng. J.* — 2009. — Vol. 15. — P. 1637 – 1648.

253. Mchedlov-Petrosyan N. O. Extraordinary character of the solvent influence on protolytic equilibria: inversion of the fluorescein ionization constants in H₂O-DMSO mixtures / N. O. Mchedlov-Petrosyan, R. S. Mayorga // *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* — 1992. — Vol. 88. — No. 20. — P. 3025 – 3032.

254. Лакович Д. Основы флуоресцентной спектроскопии / Д. Лакович, [пер. с англ. М.В. Козьменко, под ред. М.Г. Кузьмина]. — Москва : Мир. — 1986. — 496 с.

255. Counterion-induced transformations of cationic surfactant micelles studied by using the displacing effect of solvatochromic pyridinium *N*-phenolate betaine dyes /

N. O. Mchedlov-Petrosyan, N. A. Vodolazkaya, A. A. Kornienko [et al.] // *Langmuir*. — 2005. — Vol. 21. — No. 16. — P. 7090 – 7096.

256. Imae T. Size and electrophoretic mobility of C₁₄TASal micelles in aqueous media / T. Imae, T. Kohsaka // *J. Phys. Chem.* — 1992. — Vol. 96. — No. 24. — P. 10030 – 10035.

257. Aswal V. K. Effect of the hydrophilicity of aromatic counterions on the structure of ionic micelles / V. K. Aswal // *J. Phys. Chem. B.* — 2003. — Vol. 107. — No. 48. — P. 13323 – 13328.

258. Gamboa C. Effect of the nature of counterions on the sphere-to-rod transition in cetyltrimethylammonium micelles / C. Gamboa, H. Ríos, L. Sepúlveda // *J. Phys. Chem.* — 1989. — Vol. 93. — No. 14. — P. 5540 – 5543.

259. Li X. Use of multiple carboxylates to increase intracellular retention of fluorescent probes following release from cell penetrating fluorogenic conjugates / X. Li, R. Higashikubo, J.-S. Taylor // *Bioconjugate Chem.* — 2008. — Vol. 19. — No. 1. — P. 50 – 56.

260. Swisher R. Fluorescein diacetate as an estimator of microbial biomass on coniferous needle surfaces / R. Swisher, G. C. Carroll // *Microb. Ecol.* — 1980. — Vol. 6. — No. 3. — P. 217 – 226.

261. Sontag W. Changes of fluoresceindiacetat hydrolysis and transport in mammalian cells after ultra-violet and gamma irradiation / W. Sontag // *Radiat. Environ. Biophysics.* — 1977. — Vol. 14. — No. 1. — P. 13 – 20.

262. Малеваний С. В. Стабілізація холинестерази в мицелярній середі цвиттерионного поверхностно-активного речовини / С. В. Малеваний, Н. А. Водолазкая, Н. О. Мchedlov-Петросян, В. Д. Орлов // *Доп. НАН України*. — 2003. — №. 1. — С. 145 – 148.

263. Малеваний С. В. Діацетилфлуоресцеїн як флуорогенний субстрат холинестерази / С. В. Малеваний, Н. А. Водолазкая, Н. О. Мchedlov-Петросян, В. Д. Орлов // *Вісник ХНУ : Хімія*. — 2000. — Т. 495, №. 6 (29). — P. 34 – 39.

264. Micellar rate effects on reactions of hydroxide ion with phosphate and thiophosphinate esters / A. Blaskó, C. A. Bunton, Y. S. Hong [et al.] // *J. Phys. Org. Chem.* — 1991. — Vol. 4. — No. 10. — P. 618 – 628.

265. Bunton C. A. Micellar rate effects: assumptions and approximations / C. A. Bunton // *Arkivoc.* — 2011. — Vol. 2011. — No. VII. — P. 490 – 504.

266. Bunton C. A. Ion binding and reactivity at charged aqueous interfaces / C. A. Bunton, F. Nome, F. H. Quina, L. S. Romsted // *Acc. Chem. Res.* — 1991. — Vol. 24. — No. 12. — P. 357 – 364.

267. Schnürer J. Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total microbial activity in soil and litter / J. Schnürer, T. Rosswall // *Appl. Environ. Microbiol.* — 1982. — Vol. 43. — No. 6. — P. 1256 – 1261.

268. Taylor J. P. Comparison of microbial numbers and enzymatic activities in surface soils and subsoils using various techniques / J. P. Taylor, B. Wilson, M. S. Mills, R. G. Burns // *Soil Biol. Biochem.* — 2002. — Vol. 34. — No. 3. — P. 387 – 401.

269. Green V. S. Assay for fluorescein diacetate hydrolytic activity: optimization for soil samples / V. S. Green, D. E. Stott, M. Diack // *Soil Biol. Biochem.* — 2006. — Vol. 38. — No. 4. — P. 693 – 701.

270. Adam G. Development of a sensitive and rapid method for the measurement of total microbial activity using fluorescein diacetate (FDA) in a range of soils / G. Adam, H. Duncan // *Soil Biol. Biochem.* — 2001. — Vol. 33. — No. 7 – 8. — P. 943 – 951.

271. Characterization of uptake and hydrolysis of fluorescein diacetate and carboxyfluorescein diacetate by intracellular esterases in *Saccharomyces cerevisiae*, which result in accumulation of fluorescent product. / P. Breeuwer, J.-L. Drocourt, N. Bunschoten [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* — 1995. — Vol. 61. — No. 4. — P. 1614 – 1619.

272. A fluorimetric sensor for detection of one living cell / J. Vitecek, J. Petrlova, V. Adam [et al.] // *Sensors.* — 2007. — Vol. 7. — No. 3. — P. 222 – 238.

273. Synthesis and study on hydrolytic properties of fluorescein esters / F.-Y. Ge, L.-G. Chen, X.-L. Zhou [et al.] // *Dyes Pigm.* — 2007. — Vol. 72. — No. 3. — P. 322 – 326.

274. Eshghi H. Synthesis of fluorescein aromatic esters in the presence of P_2O_5/SiO_2 as catalyst and their hydrolysis studies in the presence of lipase / H. Eshghi, N. Mirzaie, A. Asoodeh // *Dyes Pigm.* — 2011. — Vol. 89. — No. 2. — P. 120 – 126.

275. Rotman B. Membrane properties of living mammalian cells as studied by enzymatic hydrolysis of fluorogenic esters / B. Rotman, B. W. Papermaster // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 1966. — Vol. 55. — No. 1. — P. 134 – 141.

276. Sontag W. A comparative kinetic study on the conversion of fluoresceindiacetate to fluorescein in living cells and in vitro / W. Sontag // *Radiat. Environ. Biophys.* — 1977. — Vol. 14. — No. 1. — P. 1 – 12.

277. Anzo K. Enhanced kinetics of pseudo first-order hydrolysis in liquid phase coexistent with ice / K. Anzo, M. Harada, T. Okada // *J. Phys. Chem. A.* — 2013. — Vol. 117. — No. 41. — P. 10619 – 10625.

278. Hofmann J. A kinetic study on the enzymatic hydrolysis of fluoresceindiacetate and fluorescein-di- β -d-galactopyranoside / J. Hofmann, M. Sernetz // *Analytical Biochem.* — 1983. — Vol. 131. — No. 1. — P. 180 – 186.

279. Эмануэль Н. М. Курс химической кинетики / Н. М. Эмануэль, Д. Г. Кнорре. — Москва : Высшая школа. — 1984. — 463 с.

280. Niwayama S. Highly efficient selective monohydrolysis of symmetric diesters / S. Niwayama // *J. Org. Chem.* — 2000. — Vol. 65. — No. 18. — P. 5834 – 5836.

281. Niwayama S. Influence of co-solvents in the highly efficient selective monohydrolysis of a symmetric diester / S. Niwayama, H. Wang, Y. Hiraga, J. C. Clayton // *Tetrahedron Lett.* — 2007. — Vol. 48. — No. 48. — P. 8508 – 8510.

282. Bahram M. Mean centering of ratio spectra as a new method for determination of rate constants of consecutive reactions. / M. Bahram // *Anal. Chim. Acta.* — 2007. — Vol. 603. — No. 1. — P. 13 – 19.

283. Combined on-line transmission FTIR measurements and BTEM analysis for the kinetic study of a consecutive reaction in aqueous-organic phase medium / M. Tjahjono, C. Huiheng, E. Widjaja [et al.] // *Talanta*. — 2009. — Vol. 79. — No. 3. — P. 856 – 862.

284. Mchedlov-Petrosyan N. O. Reichardt betaines as combined solvatochromic and acid-base indicators in microemulsions / N. O. Mchedlov-Petrosyan, Y. V Isaenko, S. T. Goga // *Rus. J. General Chem.* — 2004. — Vol. 74. — No. 11. — P. 1741 – 1747.

285. Acid/base properties of solvatochromic pyridinium-*N*-phenolate betaine dyes in pure and mixed solvents / N. O. Mchedlov-Petrosyan, Y. V Isaenko, S. T. Goga [et al.] // *Укр. хим. журн.* — 2007. — Т. 73, №. 10. — С. 114 – 119.

286. Bogdanova L. N. The influence of β -cyclodextrin on acid–base and tautomeric equilibrium of fluorescein dyes in aqueous solution / L. N. Bogdanova, N. O. Mchedlov-Petrosyan, N. A. Vodolazkaya, A. V Lebed // *Carbohydr. Res.* — 2010. — Vol. 345. — P. 1882 – 1890.

287. Nature of cationic poly(propylenimine) dendrimers in aqueous solutions as studied using versatile indicator dyes / N. O. Mchedlov-Petrosyan, E. Y. Bryleva, N. A. Vodolazkaya [et al.] // *Langmuir*. — 2008. — Vol. 24. — No. 11. — P. 5689 – 5699.

288. Duynstee E. F. J. Organic reactions occurring in or on micelles. I. Reaction rate studies of the alkaline fading of triphenylmethane dyes and sulfonphthalein indicators in the presence of detergent salts / E. F. J. Duynstee, E. Grunwald // *J. Am. Chem. Soc.* — 1959. — Vol. 81. — No. 17. — P. 4540 – 4542.

289. Study of kinetics of bromophenol blue fading in the presence of SDS, DTAB and Triton X-100 by classical model / B. Samiey, K. Alizadeh, M. A. Moghaddasi [et al.] // *Bull. Korean Chem. Soc.* — 2004. — Vol. 25. — No. 5. — P. 726 – 736.

290. Talman R. Y. Kinetic cosolvent effects on the alkaline fading of crystal violet in the presence of sodium dodecyl sulfate micelles / R. Y. Talman, S. Göktürk, M. Tunçay // *Colloids Surf. A*. — 2005. — Vol. 270-271. — P. 72 – 77.

291. Albrizzio J. Secondary valence force catalysis. XIII. Kinetics of the alkaline fading of crystal violet in the presence of cationic surfactants / J. Albrizzio, J. Archila,

T. Rodulfo, E. H. Cordes // *J. Org. Chem.* — 1972. — Vol. 37. — No. 6. — P. 871 – 874.

292. Samiey B. Kinetics of crystal violet fading in the presence of TX-100, DTAB and SDS / B. Samiey, F. Ashoori // *Acta Chim. Slov.* — 2011. — Vol. 58. — No. 3. — P. 223 – 232.

293. Duynstee E. F. J. Organic reactions occurring in or on micelles. II. Kinetic and thermodynamic analysis of the alkaline fading of triphenylmethane dyes in the presence of detergent salts / E. F. J. Duynstee, E. Grunwald // *J. Am. Chem. Soc.* — 1959. — Vol. 81. — No. 17. — P. 4542 – 4548.

294. Piskiewicz D. Micelle catalyzed reactions are models of enzyme catalyzed reactions which show positive homotropic interactions / D. Piskiewicz // *J. Am. Chem. Soc.* — 1976. — Vol. 98. — No. 10. — P. 3053 – 3055.

295. Piskiewicz D. Cooperativity in bimolecular micelle-catalyzed reactions. inhibition of catalysis by high concentrations of detergent / D. Piskiewicz // *J. Am. Chem. Soc.* — 1977. — Vol. 99. — No. 23. — P. 7695 – 7697.

296. Piskiewicz D. Positive cooperativity in micelle-catalyzed reactions / D. Piskiewicz // *J. Am. Chem. Soc.* — 1977. — Vol. 99. — No. 5. — P. 1550 – 1557.

297. Zhang Y. Micellar catalysis of composite reactions—the effect of SDS micelles and premicelles on the alkaline fading of crystal violet and malachite green / Y. Zhang, X. Li, J. Liu, X. Zeng // *J. Dispersion Sci. Technol.* — 2002. — Vol. 23. — No. 4. — P. 473 – 481.

298. Roshchyna K. V. Micellar rate effects in the alkaline fading of crystal violet in the presence of various surfactants / K. V. Roshchyna, S. V. Eltsov, A. N. Laguta, N. O. Mchedlov-Petrosyan // *J. Mol. Liq.* — 2015. — Vol. 201. — P. 77 – 82.

СПИСОК АВТОРСКИХ ПУБЛИКАЦИЙ

(в тексте отмечены буквой «А», например, [А1] и т.д.)

A1. Colloidal nature of cationic calix[6]arene aqueous solutions / N. O. Mchedlov-Petrosyan, N. A. Vodolazkaya, L. N. Bogdanova, R. V. Rodik, **T. A. Cheipesh**, O. Yu. Soboleva, A. P. Kryshchal, L. V. Kutuzova, V. I. Kalchenko // J. Phys. Chem. C. – 2012. – Vol. 116. – P. 10245 – 10259.

A2. Влияние наноразмерных агрегатов катионного каликс[6]арена на протолитические равновесия флуоресцеиновых красителей в водном растворе / **Т. А. Чейпеш**, Н. О. Мчедлов-Петросян, Е. С. Загорулько, Р. В. Родик, В. И. Кальченко // Доп. НАН України. – 2013. – № 12. – С. 131 – 138.

A3. **Чейпеш Т. А.** Некоторые подходы к обработке спектрофотометрических данных. Расчет ступенчатых констант ионизации трех- и четырехосновных флуоресцеиновых красителей // Вісник Харківського національного університету : Хімія. – 2013. – Т. 1085. – №. 22 (45) – С. 106 – 112.

A4. The difference between the aggregates of short-tailed and long-tailed cationic calix[4]arene in water as detected using fluorescein dyes / **T. A. Cheipesh**, E. S. Zagorulko, N. O. Mchedlov-Petrosyan, R. V. Rodik, V. I. Kalchenko // J. Mol. Liq. – 2014. – Vol. 193. – P. 232 – 238.

A5. **Чейпеш Т. А.** Кинетика щелочного гидролиза дилаурилфлуоресцеина в водно-этанольной смеси и мицеллярном растворе цетилтриметиламмоний бромида / **Т. А. Чейпеш**, Ю. В. Таранец, Н. О. Мчедлов-Петросян // Вісник Харківського національного університету : Хімія. – 2014. – Т. 1123. – №. 23 (45) – С. 106 – 112.

A6. **Чейпеш Т. А.** Протолитические равновесия 6-аминофлуоресцеина в воде и смеси вода–этанол с массовой долей спирта 50% / **Т. А. Чейпеш**, Н. А. Водолазкая // Хімічні Каразінські читання – 2010 : II Всеукр. конф. студентів та аспірантів, 19 – 22 квітня 2010 р. : тези доп. – Харків. – 2010. – С. 256.

A7. **Чейпеш Т. А.** Изменение спектральных характеристик аминифлуоресцеинов в мицеллах катионного ПАВ, растворах дендримеров и каликсаренов / **Т. А. Чейпеш**, Н. А. Водолазкая // Сучасні проблеми хімії : XI

Всеукр. конф. студентів та аспірантів, 19 – 21 травня 2010 р. : тези доп. – Київ. – 2010. – С. 152.

A8. Чейпеш Т. А. Особенности агрегации четырех- и шестичленных катионных каликсаренов в водных растворах / Т. А. Чейпеш // Хімічні Каразінські читання – 2011 : III Всеукр. конф. студентів та аспірантів, 18 – 21 квітня 2011 р. : тези доп. – Харків. – 2011. – С.209 – 210.

A9. О.С. Загорулько. Вплив температури на спектральні властивості та йонні рівноваги флуоресцеїну при йонній силі 0.02 М / О. С. Загорулько., **Т. О. Чейпеш** // Хімічні Каразінські читання – 2012 : IV Всеукр. конф. студентів та аспірантів, 23 – 26 квітня 2012 р. : тези доп. – Харків. – 2012. – С. 267 – 268.

A10. Чейпеш Т. А. Кислотно-основные равновесия 4'-аминофлуоресцеина в воде и смеси вода-этанол (50% масс.) // Сучасні проблеми хімії : XIII Всеукр. конф. з міжнародною участю студентів та аспірантів, 25 – 27 квітня 2012 р. : тези доп. – Київ. – 2012. – С.131.

A11. Загорулько О. С. Кислотно-основні рівноваги флуоресцеїна та децилфлуоресцеїна в присутності катіонного калікс[6]арена у водних розчинах / О. С. Загорулько, **Т. О. Чейпеш** // Сучасні проблеми хімії : XIV Міжнар. конф. студентів та аспірантів, 15 – 17 квітня 2013 р. : тези доп. – Київ. – 2013. – С. 143.

A12. Загорулько О. С. Особливості протолітичних рівноваг флуоресцеїну в присутності агрегатів водорозчинних катіонних калікс[4]аренів різної гідрофобності / О. С. Загорулько, **Т. О. Чейпеш** // Хімічні Каразінські читання – 2013 : V Всеукр. наук. конф. студентів та аспірантів, 22 – 25 квітня 2013 р. : тези доп. – Харків. – 2013. – С. 242–243.

A13. Загорулько О. С. Вплив агрегатів катіонних водорозчинних калікс[4]аренів різної гідрофобності на константи іонізації децилфлуоресцеїну / О. С. Загорулько, **Т. О. Чейпеш** // Львівські хімічні читання – 2013: XIV наук. конф. , 26 – 29 травня 2013 р. : тези доп. – Львів. – 2013. – С. Ф12.

A14. Чейпеш Т. А. Влияние агрегатов катионных поверхностно-активных веществ и каликсаренов на скорость гидролиза дилаурилфлуоресцеина / **Т. А. Чейпеш**, Ю. В. Таранец // XI Всеукраїнська конференція молодих вчених та

студентів з актуальних питань хімії, 14 – 18 квітня 2014 р. : тези доп. – Харків. – 2014. – С.36.

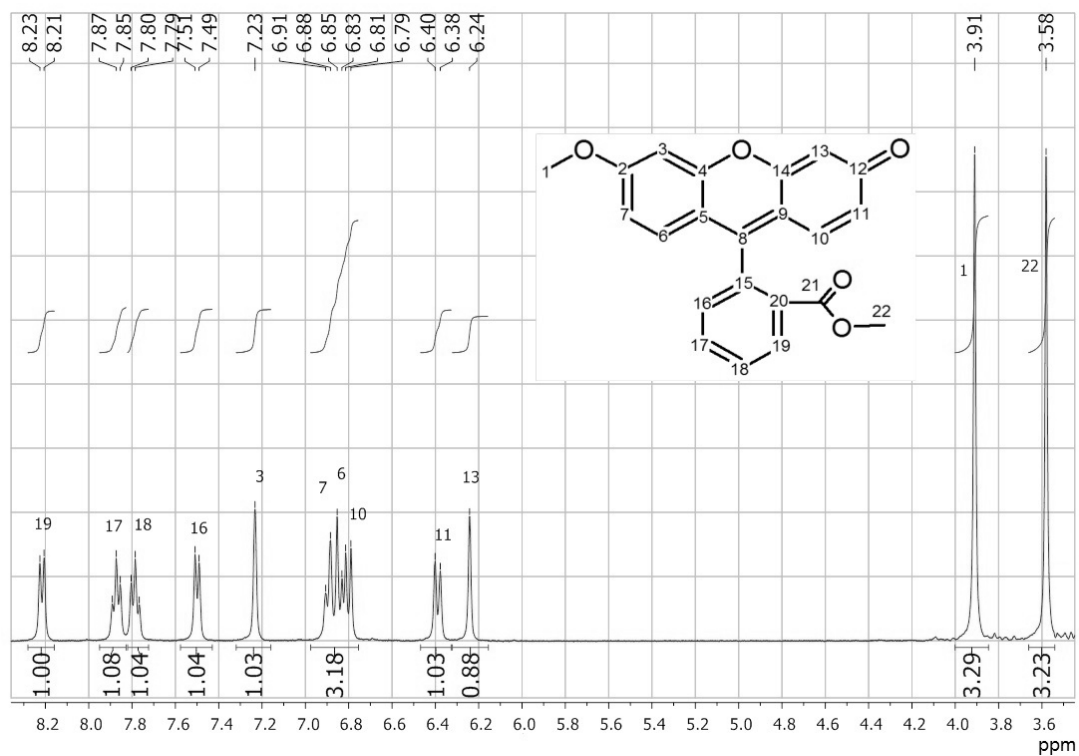
А15.Таранец Ю. В. Влияние агрегатов катионных каликсаренов различной гидрофобности на ионизацию и скорость обесцвечивания бромфенолового синего / Ю. В. Таранец, **Т. А. Чейпеш** // Хімічні Каразінські читання – 2014 : VI Всеукр. наук. конф. студентів та аспірантів, 22 – 24 квітня 2014 р. : тези доп. – Харків. – 2014. – С.280 – 281.

А16.**Чейпеш Т. А.** Обесцвечивание бромфенолового синего в среде наноразмерных катионных агрегатов водорастворимых каликсаренов /**Т. А. Чейпеш**, Ю. В. Таранец // Химия и технология новых веществ и материалов: VI Всерос. молодежная науч. конф., 26 – 30 травня 2014 р. : тезисы докл. – Сыктывкар. – 2014. – С.106 – 109.

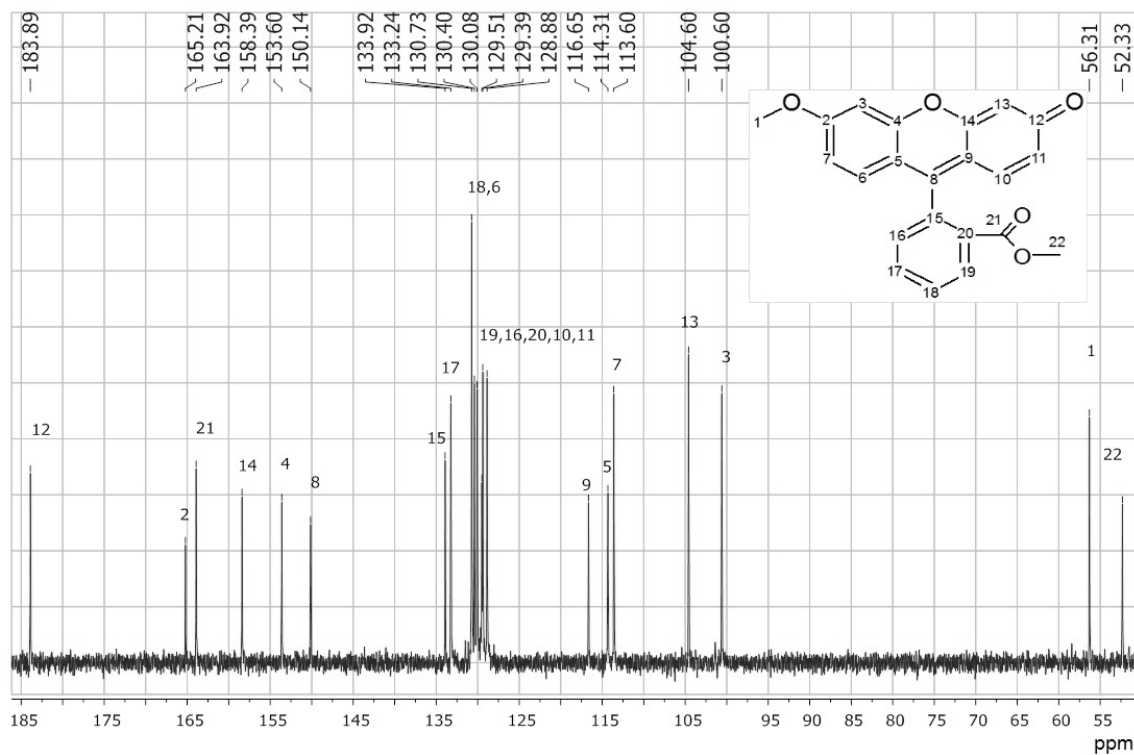
А17.Особенности влияния неводных растворителей на таутомерию и флуоресценцию производных флуоресцеина / **Т. А. Чейпеш**, С. В. Шеховцов, А. Д. Рошаль, Н. О. Мchedlov-Петросян // XIX Укр. конф. з неорг. хімії за участю закордонних учених, 7 – 11 вересня 2014 р. : тези доп. – Одеса. – 2014. – С.259.

Приложение А

ЯМР-спектры эфиров флуоресцеина

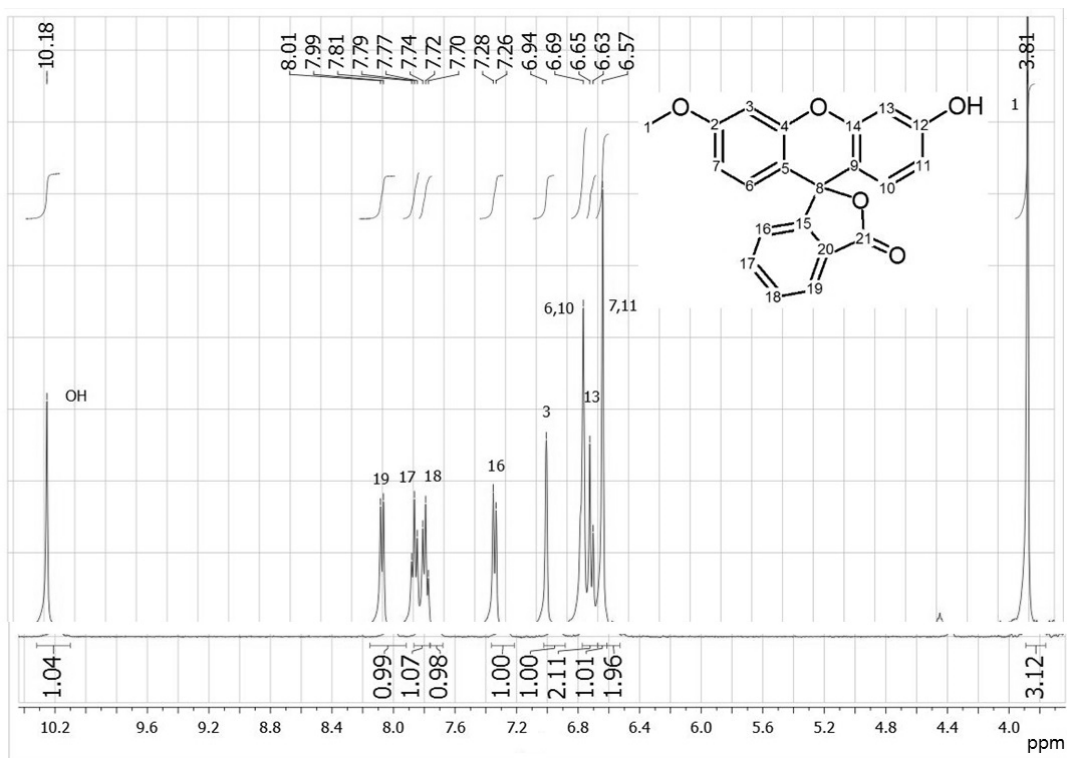


а)

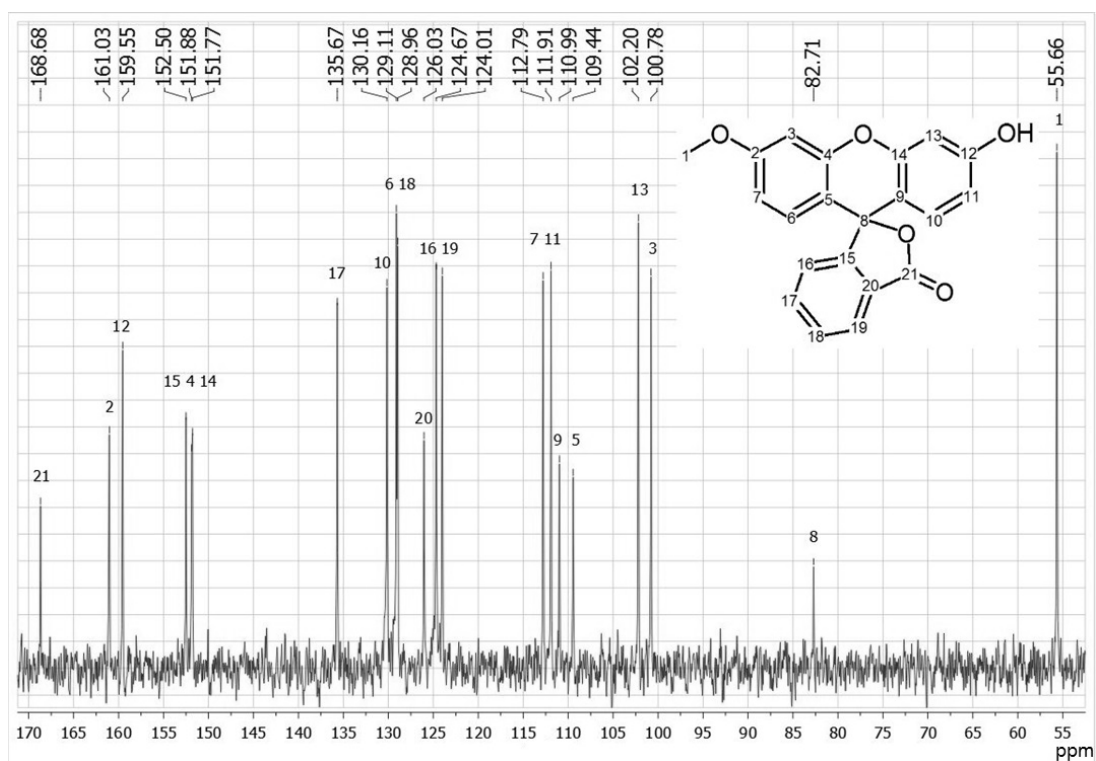


б)

Рисунок А.1 – ¹H- (а) ¹³C-ЯМР-спектры (б) диметилфлуоресцеина в дейтерированном ДМСО.

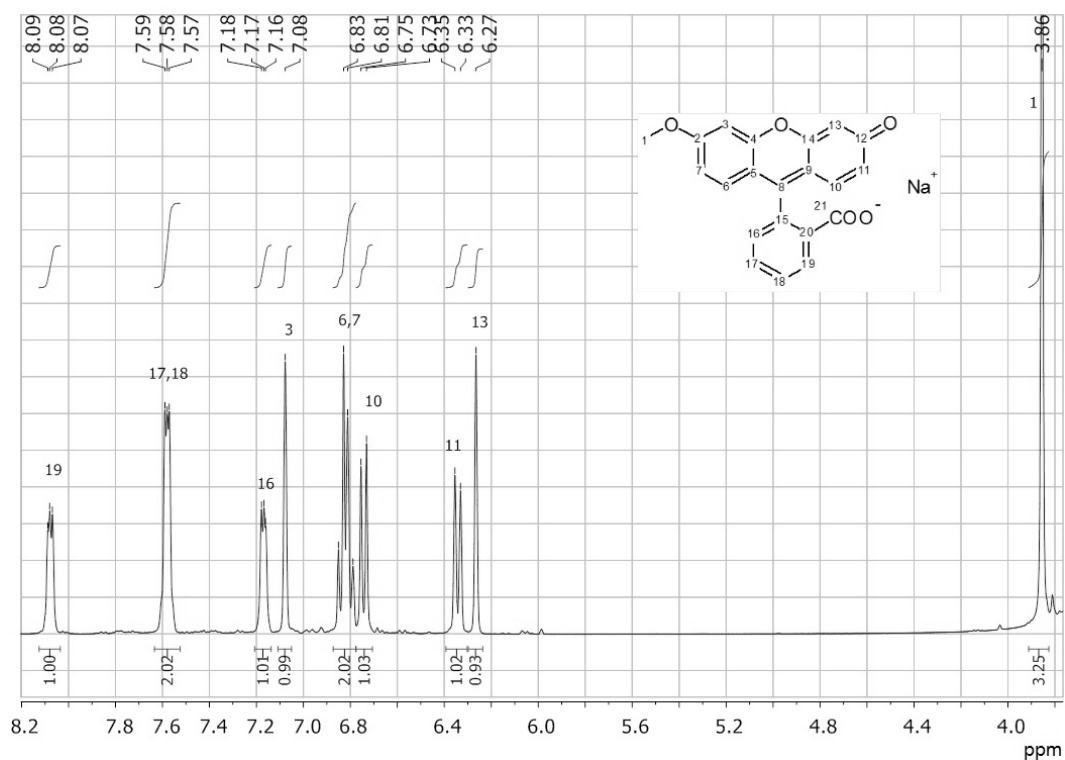


а)

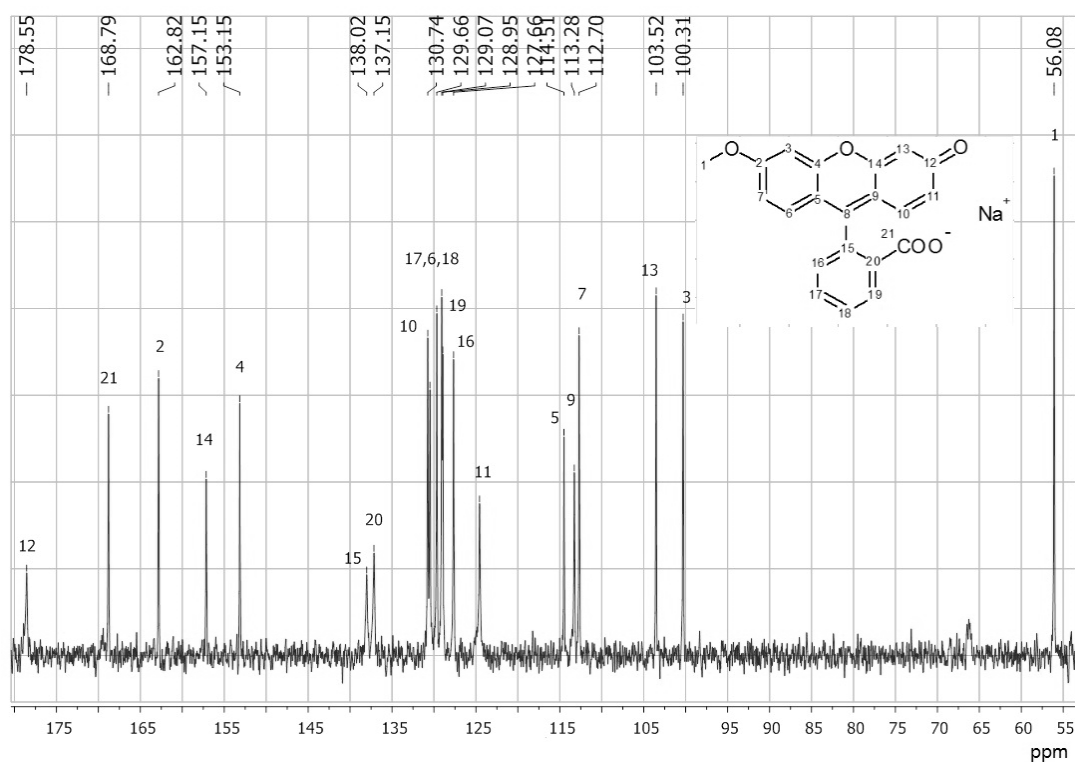


б)

Рисунок А.2 – ¹H- (а) ¹³C-ЯМР-спектры (б) метилфлуоресцеина в дейтерированном ДМСО.



a)



б)

Рисунок А.3 – ¹H- (а) ¹³C-ЯМР-спектры (б) натриевой соли метилфлуоресцеина в дейтерированном ДМСО.

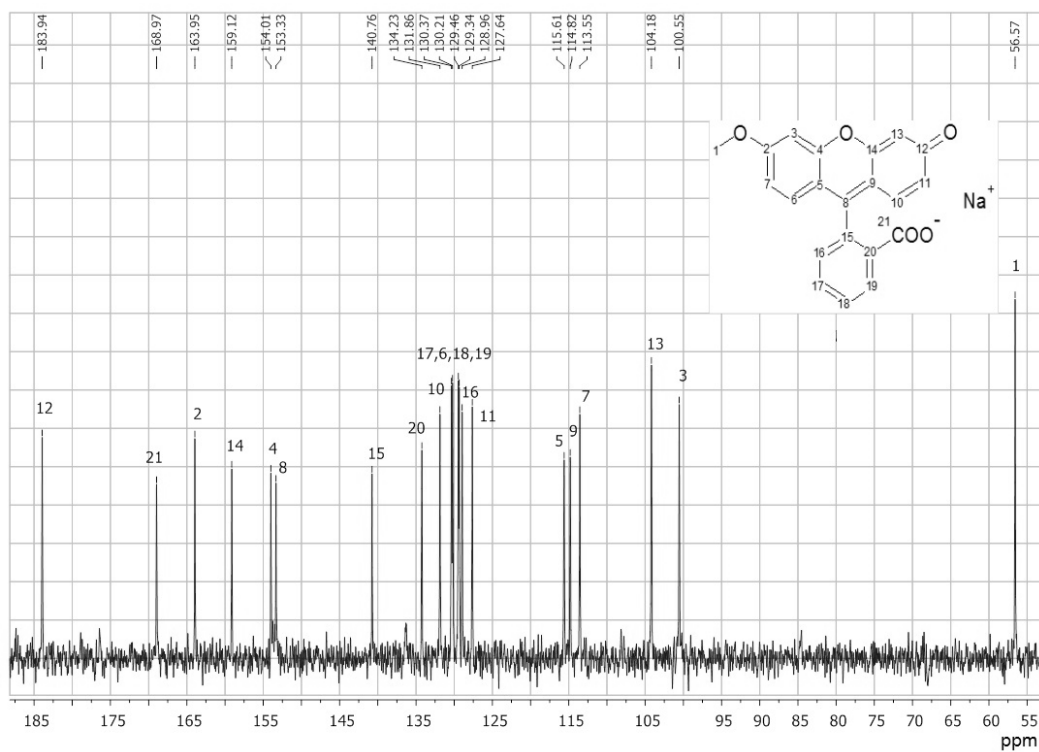


Рисунок А.3 — ^{13}C -ЯМР-спектр натриевой соли метилфлуоресцеина в дейтерированном ДМСО после добавления дополнительного количества NaOH.