

POCHODNE KUMARYNY JAKO MOLEKULARNE SENSORY FLUORESCENCYJNE STOSOWANE DO MONITOROWANIA PROCESÓW FOTOPOLIMERYZACJI

COUMARIN DERIVATIVES AS MOLECULAR FLUORESCENCE PROBES APPLIED FOR MONITORING PHOTOPOLYMERIZATION PROCESSES

Alicja Pudo

Iwona Kamińska

Joanna Ortyl

Politechnika Krakowska

Wydział Inżynierii i Technologii Chemicznej

Katedra Biotechnologii i Chemii Fizycznej

ul. Warszawska 24

31-155 Kraków

e-mail: jortyl@chemia.pk.edu.pl

Abstract: This paper presents research on the use of coumarin derivatives as fluorescent molecular probes for monitoring cationic and free radical photopolymerization processes, using for that purpose modern FPT method (*Fluorescence Probe Technology*). Literature review on the main trends of applications and spectroscopic properties of coumarin derivatives was described. In the following part of publication, relations between change of fluorescence characteristic and physicochemical changes occurring in the polymerizable composition, (both microviscosity and polarity) were explained. This article also presented the basic methodology of studies on the control of the photopolymerization reaction *on-line* and *off-line*, using fluorescence spectroscopy and parameters such as: fluorescence intensity ratio R , number of progress of the reaction β and molecular probe sensitivity S .

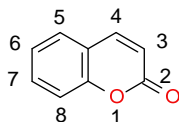
Keywords: fluorescence probes; cationic photopolymerization; radical photopolymerization; coumarin derivatives; FPT; polymerization processes monitoring.

Wprowadzenie

Pochodne kumaryny (benzo- α -pironu) (rys. 1) stanowią bardzo ważną klasę związków chemicznych pochodzenia organicznego. Duża ilość kumaryn występuje naturalnie w niektórych olejkach eterycznych, takich jak olejek cytrynowy czy lawendowy. Związki te można również znaleźć w cykorii, zielonej herbacie oraz trawie żubrówce. Najwięcej znajduje się w roślinach wyższych należących do rodzaju rutowatych i selerowatych. Ich obecność stwierdzono także w mikroorganizmach takich jak *Streptomyces* czy *Aspergillus* [1].

W laboratorium pochodne benzo- α -pironu otrzymuje się w wyniku syntezy organicznej przy wykorzystaniu reakcji Perkina [2, 3], kondensacji Knoevenagela [4], kondensacji Pechmanna [5] oraz reakcji Wittiga [6].

Związki kumarynowe ze względu na ich niską toksyczność mogą być wykorzystywane jako dodatki do produkcji środków farmaceutycznych, wykazują bowiem działanie antybakteryjne, przeciwwirusowe, przeciwnowotworowe, są silnymi antyoksydantami oraz środkami o działaniu przeciwskurczowym i przeciwpalnym. W przemyśle kosmetycznym stosuje się je zwykle jako dodatek do farb i spray'ów, jak również w przemyśle spożywczym do aromatyzacji niektórych produktów [7, 8].



Rys. 1. Struktura chemiczna kumaryny (benzo- α -pironu).

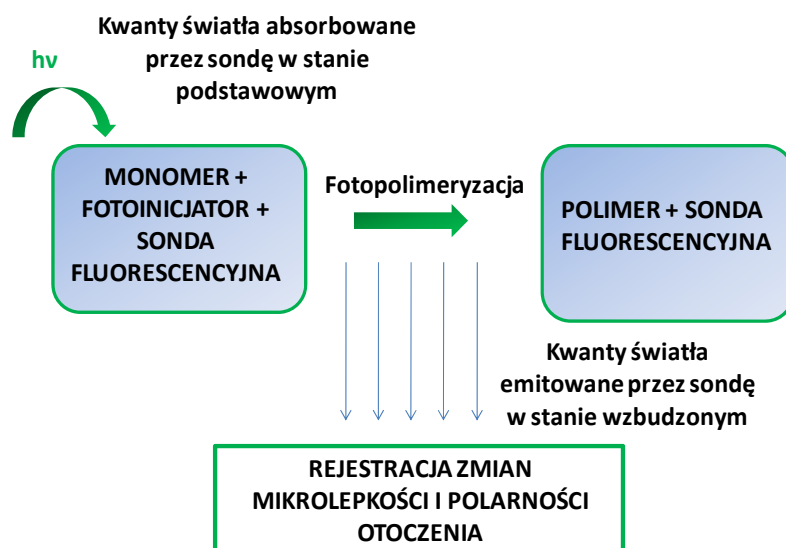
Kumaryny można stosować jako markery fluorescencyjne w układach biologicznych przy oznaczaniu aktywności enzymów oraz żywych komórek [9]. W sektorze chemicznym istnieje sposobność ich wykorzystania jako wysoko wydajnych fluorescencyjnych sensorów do monitorowania zmian pH, wykrywania tlenków azotu, nitroksydów, nadtlenu wodoru oraz kontrolowania procesów fotopolimeryzacji za pomocą technologii molekularnych sond fluorescencyjnych FPT (ang. *Fluorescent Probe Technology*) [10].

Opis zagadnienia

Technologia sond fluorescencyjnych FPT

Technologia FPT jest stosunkowo nową metodą wykorzystywaną do monitorowania procesów fotopolimeryzacji. Bazuje ona na użyciu odpowiednich związków chemicznych, zwanych fluorescencyjnymi sondami molekularnymi, które wykazują zmianę charakterystyki fluorescencji podczas zachodzenia zmian

polarności i mikrolepkości w otaczającym je środowisku. Sonda fluorescencyjna znajdująca się w danym układzie, absorbuje promieniowanie o określonej długości fali. Po naświetleniu następuje przejście jej cząsteczek do elektronowego stanu wzbudzonego. Wzbudzone cząsteczki sondy ulegają następnie relaksacji oraz stabilizacji w wyniku oddziaływania ze środowiskiem, w którym się znajdują. Podczas zmiany właściwości otoczenia, stopień w jakim następuje stabilizacja stanów wzbudzonych oraz ich stopień relaksacji również ulegają zmianie, co można dostrzec poprzez powstanie różnic w stanach energetycznych podczas emisji kwantów promieniowania [11]. Zmiany te rejestrowane są bezpośrednio jako różnica w położeniu widma fluorescencji oraz zmiana intensywności maksimum emisji sondy molekularnej w trakcie powstawania związku wielkocząsteczkowego. Uproszczony schemat zasady działania technologii FPT pokazano na rys. 2.



a)



b)

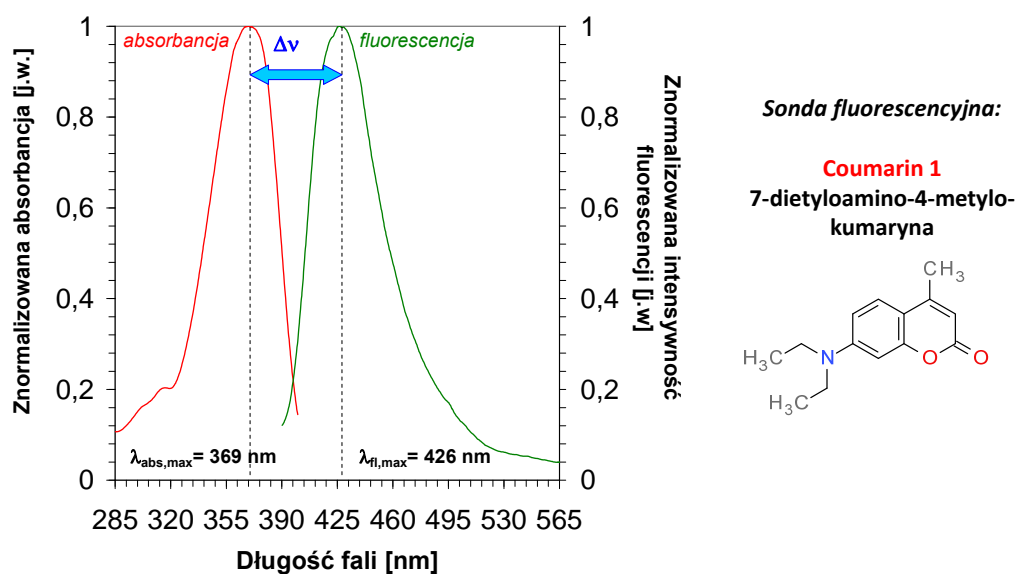
Rys. 2. Technologia FPT: a) uproszczony schemat działania technologii FPT; b) widok pochodnych kumaryny w metanolu po wzbudzeniu promieniowaniem UV.

Właściwości spektroskopowe pochodnych kumaryny

Pochodne kumaryny posiadają bardzo interesujące właściwości spektroskopowe, mianowicie charakteryzuje je zdolność do emisji fluorescencji w zakresie od ultrafioletu do zakresu widzialnego na skutek wzbudzenia cząsteczki na wyższy poziom energetyczny po absorpcji kwantu promieniowania [12]. Podstawienie pierścienia laktonowego w kumarynie różnymi ugrupowaniami wpływa w znaczący sposób na zmiany jej właściwości spektroskopowych [7]. W związku z tym poprzez odpowiedni dobór podstawników w strukturze kumaryny możemy zaprojektować związek chemiczny, który będzie wydajnym emitorem fluorescencji.

W latach 50-tych XX wieku udowodniono, iż substytucja kumaryny niektórymi grupami funkcyjnymi może przyczynić się do znaczącego przesunięcia batochromowego pasma fluorescencji. Doskonałym przykładem są bada-

nia, jakie przeprowadzono w rozpuszczalnikach o różnej polarności podczas, których wykazano, iż addycja grupy metylowej do atomu węgla w pozycji czwartej 7-metoksykumaryny, przez co otrzymujemy 7-metoksy-4-metylokumarynę, powoduje przesunięcie batochromowe widma fluorescencji w stosunku do niepodstawionego układu. Z kolei wprowadzenie grupy elektronodonorowej w pozycji czwartej (C-4), szóstej (C-6) lub siódmej (C-7) lub grupy elektronoakceptorowej w pozycji trzeciej (C-3) również powoduje przesunięcie pasma emisji w kierunku dłuższych fal w stosunku do układu niepodstawionego benzo- α -pironu. Cechą charakterystyczną dla pochodnych kumaryny jest także znaczne przesunięcie Stokes'a ($\Delta\nu_{st}$) (rys. 3), albowiem dla cząsteczek sztywnych, takich jak właśnie układy kumarynowe, wzrasta moment dipolowy towarzyszący wzbudzeniu oraz mają miejsce interakcje pomiędzy rozpuszczalnikiem i wzbudzoną cząsteczką [8].



Rys. 3. Przesunięcie Stokes'a dla Coumarin 1 w dichlorometanie.

Pochodne kumaryny jako sondy fluorescencyjne w technologii FPT

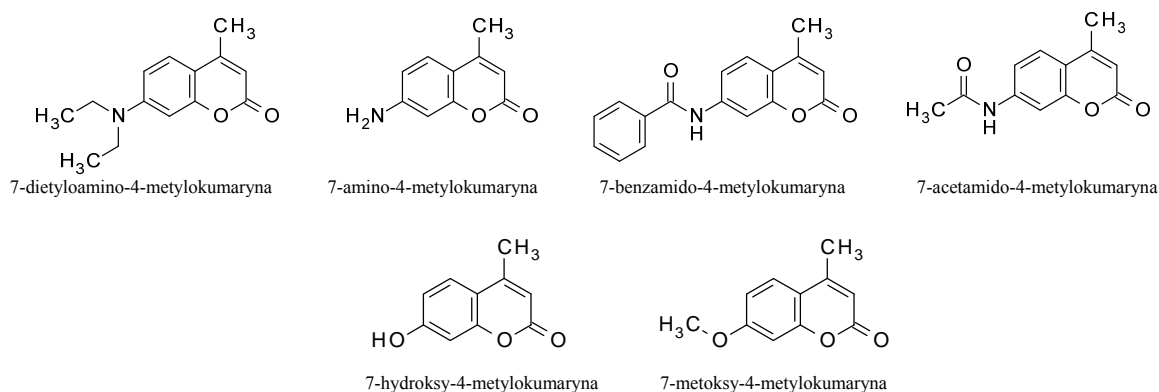
Pochodne kumaryny wykazują szczególną wrażliwość na zmiany polarności i mikrolepkości otaczającego środowiska i w związku z powyższym mogą być z powodzeniem wykorzystywane jako fluorescencyjne sondy molekularne w metodzie FPT. Kumaryny zalicza się głównie do grupy sond fluorescencyjnych typu TICT (*Twisted*

Intramolecular Charge Transfer), czyli związków, które charakteryzują się skręcaniem grupy funkcyjnej lub całej struktury molekuly w stanie wzbudzonej po zajściu wewnątrzcząsteczkowego przeniesienia elektronu. Skręcenie konformacji prowadzi do rozproszenia energii na sposób bezpromienisty lub emisji kwantu promieniowania [11].

Szczególnie interesującą grupę związków stanowią 7-aminokumaryny, które są do tej

pory najszerszej poznanej grupą pochodnych benzo- α -pironu [13]. Do tej rodziny związków należą m.in. 7-dietylamino-4-metylokumaryna (Coumarin 1), która jest znanym wybielaczem optycznym stosowanym zarówno do włókien naturalnych, jak i syntetycznych. Jest ona jednocześnie powszechnym sensorem fluorescencyjnym używanym do monitorowania procesu fotopolimeryzacji rodnikowej [14]. Coumarin 1, a także 7-benzamido-4-metylokumaryna i 7-acetamido-4-metylokumaryna zostały zbadane pod kątem wykorzystania

jako molekularne sondy fluorescencyjne do monitorowania procesu fotopolimeryzacji kationowej monomeru winylowego TEGDVE (eteru diwinylowego glikolu trietylenowego) [14]. Z kolei 7-hydroksy-4-metylokumaryna oraz 7-metoksy-4-metylokumaryna zostały zastosowane do monitorowania procesu utwardzania żywic epoksydowych trietylenotetraaminą z wykorzystaniem parametru stosunku intensywności (R) jako wskaźnika postępu reakcji [15]. Badane związki przedstawiono na rys. 4.



Rys. 4. Pochodne kumaryny stosowane do roli sond molekularnych.

Monitorowanie procesu fotopolimeryzacji

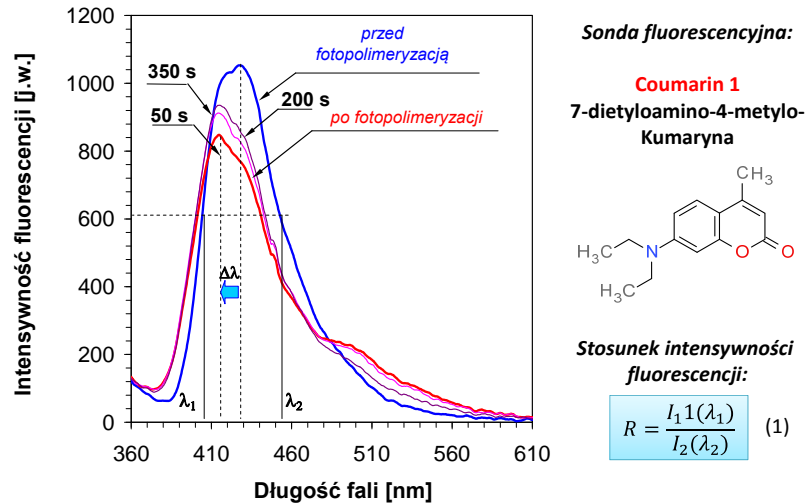
Najczęściej stosowanym, a zarazem najbardziej uniwersalnym parametrem do kontrolowania fotopolimeryzacji jest parametr R wyrażany jako stosunek intensywności fluorescencji mierzonej przy dwóch długościach fali λ_1 i λ_2 rozmieszczonych po obu stronach maksimum widma fluorescencji w połowie jego wysokości. Wykorzystanie tej wielkości pozwala na dokładne mierzenie postępu procesu przebiegającego na linii produkcyjnej (rys. 5) [16].

Jeżeli sonda kumarynowa pod wpływem promieniowania ulega fotolizie, w wyniku której powstaje inny fluoryzujący związek, może dojść do nakładania się widm fluorescencji obu związków. W takim przypadku niemożliwe jest skorzystanie z parametru R . Zalecane jest wprowadzenie innej wielkości, mianowicie znormalizowanej intensywności fluorescencji (I_{max}/I_0), gdzie I_{max} to intensywność fluorescencji w danym

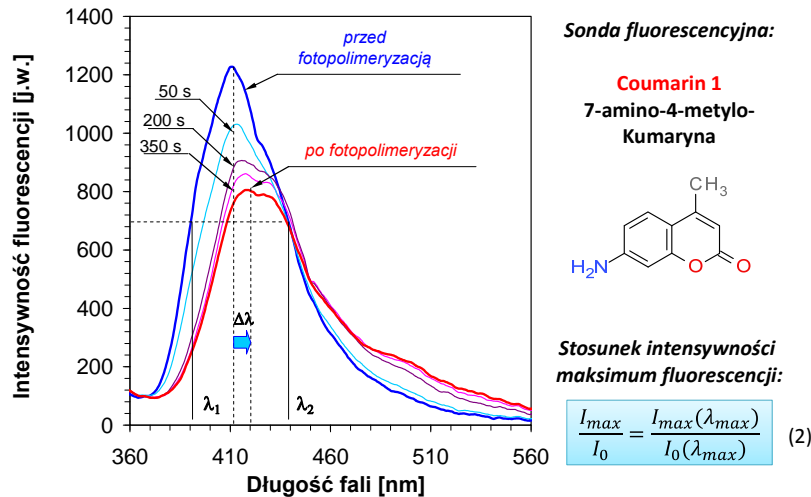
momencie pomiaru, natomiast I_0 to intensywność początkowa (rys. 6).

Użycie znormalizowanej intensywności fluorescencji pozwala na zminimalizowanie wpływu takich czynników jak grubość warstwy, stężenie sondy, odległość próbki od głowicy spektrometru czy też intensywność światła wzbudzenia na dokładność pomiaru. Niestety parametr (I_{max}/I_0) pomimo swoich niewątpliwych zalet nie nadaje się do monitorowania procesu przebiegającego na linii produkcyjnej (*on-line*) [17].

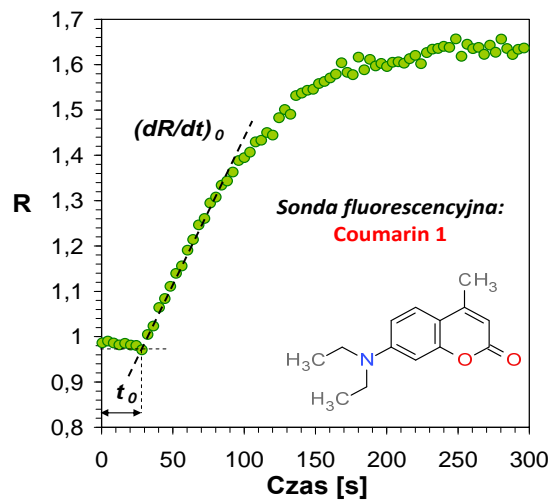
W czasie kontroli jakości monomerów używanych do fotopolimeryzacji oraz w trakcie badania wpływu stężenia sondy i fotoinicjatora na przebieg procesu pomocne są takie parametry jak czas indukcji, nachylenie krzywej konwersji na początku procesu (rys. 7), a także początkowy stosunek intensywności fluorescencji (dR/dt_0), które można wyznaczać z profili kinetycznych otrzymanych w trakcie monitorowania procesu metodą FPT [11].



Rys. 5. Sposób wyznaczania parametru R jako stosunku intensywności fluorescencji.



Rys. 6. Sposób wyznaczania znormalizowanej intensywności fluorescencji (I_{max}/I_0).



Rys. 7. Profil kinetyczny fotopolimeryzacji otrzymany przy wykorzystaniu metody FPT: t_0 – czas indukcji, $(dR/dt)_0$ – początkowa szybkość fotopolimeryzacji, R_0 – początkowy stosunek intensywności fluorescencji.

Wpływ budowy sondy na czułość pomiaru

Badane sondy kumarynowe mogą wykazywać bardzo zróżnicowaną czułość na zmiany zachodzące zarówno w trakcie procesu fotopolimeryzacji rodnikowej jak i kationowej określonego monomeru. Czułość ta jest ściśle uzależniona od rodzaju podstawników zlokalizowanych w konkretnych pozycjach pierścienia kumarynowego, na co wskazuje zróżnicowany zakres zmienności parametru R .

W celu ilościowego porównania, w jaki sposób rodzaj i położenie podstawników w strukturze sondy wpływają na wrażliwość tych układów, definiowana jest względna czułość sond kumarynowych przy użyciu parametru S (ang. *Sensitivity*):

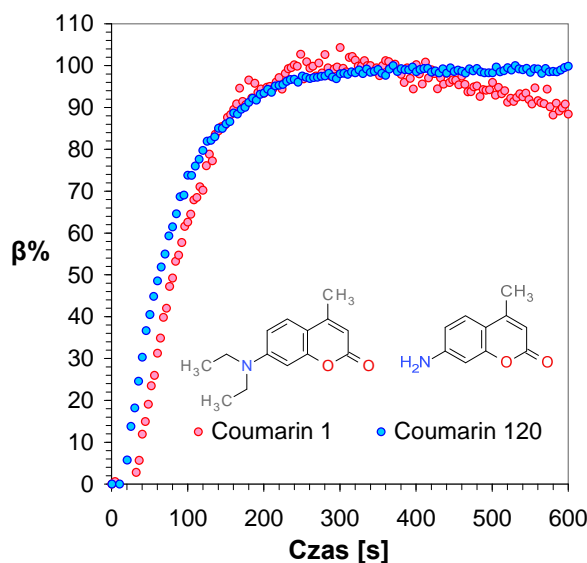
$$S = \frac{|R_k - R_0|}{R_0} \quad (3)$$

gdzie:

R_0 – wartość R dla kompozycji świeżej,
 R_k – wartość R dla kompozycji fotoutwardzonej.

Wpływ struktury pochodnych kumaryny na dokładność pomiaru szybkości fotopolimeryzacji

Odpowiedź każdej z badanych kumarynowych sond fluorescencyjnych na zmiany zachodzące w trakcie procesu fotopolimeryzacji charakteryzuje się różnym zakresem zmienności parametru R . W związku z tym nachylenie krzywych kinetycznych (wyznaczonych jako zależność wielkości R od czasu trwania fotopolimeryzacji) otrzymanych metodą FPT dla tego samego procesu wykazuje zróżnicowanie w zależności od rodzaju użytej sondy.



Rys. 8. Przebieg fotopolimeryzacji kationowej monomeru TEGDVE monitorowanej za pomocą sond fluorescencyjnych - Coumarin 1 oraz Coumarin 120 z wykorzystaniem parametru β jako wskaźnika postępu procesu.

W celu uniezależnienia odpowiedzi pochodnych kumaryny od ich czułości oraz aby móc stosować nachylenie krzywych kinetycznych otrzymanych metodą FPT przy użyciu różnych sond jako wskaźnika szybkości badanego procesu, konieczne jest znormalizowanie krzywych kinetycznych do tego samego zakresu zmienności (rys. 8). W tym celu definiowana jest liczba postępu reakcji (β) wyrażająca się równaniem (4):

$$\beta = \frac{R - R_{min}}{R_{max} - R_{min}} \quad (4)$$

gdzie:

R - stosunek intensywności fluorescencji w danym czasie t ,
 R_{min} - początkowy stosunek intensywności fluorescencji,
 R_{max} - końcowy stosunek intensywności fluorescencji.

Podsumowanie

Większość do tej pory zbadanych pochodnych kumaryny spełnia podstawowe wymagania stawiane związkom fluorescencyjnym, które mogą być wykorzystywane jako molekularne sondy fluorescencyjne. Dodatkową zaletą jest ich duża dostępność oraz stosunkowo prosta synteza,

przez co stają się niezwykle obiecującą grupą związków chemicznych. Obecnie trwają badania znalezienia najbardziej uniwersalnych sond kumarynowych, które nadawałyby się do monitorowania różnych procesów fotopolimeryzacji oraz które mogłyby jednocześnie powodować akcelerację fotopolimeryzacji poprzez wykazywanie działania sensybilizującego.

Literatura

1. Lacy, A., O'Kennedy, R., Studies on coumarins and coumarin-related compounds to determine their therapeutic role in the treatment of cancer, *Curr. Pharm. Design*, 2004, 10, pp. 3797-3811.
2. Majumder, P.L., Majumder, S., Synthesis of novel coumarin derivatives and its biological evaluation, *Eur. J. Med. Chem.*, 1993, 28, pp. 572-578.
3. Weiss, P., Photo-induced polymerization, *Pure Appl. Chem.*, 1967, 15, pp. 587-600.
4. Shaabani, A., Ghadari, R., Rahmati, A., Rezayan A.H., Coumarin synthesis via Knoevenagel condensation reaction in 1,1,3,3-N,N,N',N'-tetramethylguanidiniumtrifluoroacetate ionic liquid, *J. Iran chem. Soc.*, 2009, 6(4), pp. 710-714.
5. Upadhyay, K.K., Mishra, R.K., Kumar, A., A convenient synthesis of some coumarin derivatives using SnCl₂·2H₂O as catalyst, *Catal. Lett.*, 2008, 121, pp. 118-12.
6. Harayama, T., Nakatsuka, K., Nishioka, H., Murakami, K., Hayashida, N., Ishii, H., Convenient synthesis of a simple coumarin from salicylaldehyde and Witting reagent. II: Synthesis of bromo- and (methylcarbonyl) coumarin, *Chem. Pharm. Bull.*, 1994, 42(10), pp. 2170-2173.
7. Braz, J., Photophysical properties of coumarin compounds in neat and binary solvent mixtures: evaluation and correlation between solvatochromism and solvent polarity parameters, *Chem. Soc.*, 2014, 25, 5, pp. 873-88.
8. Li, H., Cai, L., Chen, Z., Coumarin-derived fluorescent chemosensors, *Anal. Lett.*, 2008, 41, pp. 2203-2213.
9. Sahoo, S.S., Shukla, S., Nandy, S., Sahoo, H.B., Synthesis of novel coumarin derivatives and its biological evaluations, *Eur. J. Exp. Biol.*, 2012, 2 (4), pp. 899-908.
10. Morris, J.C., McMurtrie, J.C., Bottle, S.E., Fairfull-Smith, K.E., Generation of profluorescent isoindoline nitroxides Using Click Chemistry, *J. Org. Chem.*, 2011, 17;76(12), pp. 4964-72.
11. Ortyl, J., Popielarz, R., FPT-Fluorescent Probe Technology – innowacyjna technologia monitoringu fotopolimeryzacji w przemyśle powłok polimerowych, [w:] Nauka i przemysł–Wyzwania i bariery, Wydawnictwo Uczelniane PK, Kraków 2009, s. 139-152. ISBN 978-83-7242-516-4.
12. Mattoo, B. N., Absorption and fluorescence spectra of coumarins, *Trans. Faraday Soc.*, 1956, 52, pp. 1184-1194.
13. Wagner, B., The Use of Coumarins as Environmentally-Sensitive Fluorescent Probes of Heterogenous Inclusion Systems, *Molecules*, 2009, 14, pp. 210-237.
14. Ortyl, J., Sawicz, K., Popielarz, R., Performance of Aminocoumarins as Probes for Monitoring of Cationic Photopolymerization of Monomers by Fluorescence Probe Technology, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*, 2010, 48, pp. 4522-4528.
15. Ortyl, J., Sawicz, K., Popielarz, R., Nowe sondy fluorescencyjne do monitorowania procesu utwardzania żywic epoksydowych, *Czasopismo Techniczne*, Ser. Chemia, 1-Ch/2009, s. 119-126.
16. Ortyl J., Popielarz R., Technologia sond fluorescencyjnych (Fluorescence Probe Technology) do badań procesów fotopolimeryzacji, VI Krakowska Konferencja Młodych Uczonych, Kraków, 2011.
17. Sawicz-Kryniger, K., Technika sond fluorescencyjnych do monitorowania procesów sieciowania kompozycji epoksydowych, praca doktorska, Politechnika Krakowska, 2013.

Badania współfinansowane z projektu LIDER Narodowego Centrum Badan i Rozwoju (nr LIDER/014/471/L-4/12/NCBR/2013) oraz z projektu SONATA Narodowego Centrum Nauki (UMO-2012/07/D/ST5/02300)