

# Sole stilbazoliowe jako sondy fluorescencyjne do monitorowania lokalnej lepkości i pH roztworów

Agnieszka BAJOREK, Ilona WRZEŚNIEWSKA, Marek PIETRZAK - Wydział Technologii i Inżynierii Chemicznej, Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy; Bydgoszcz

Prosimy cytować jako: CHEMIK 2011, 65, 4, 255-260

## 1. Wprowadzenie

Pierwszym, dokładnie opisanym fluoryzującym związkiem była chinina, ważna substancja w chemii organicznej i medycynie [1]. Emisja światła przez wodny roztwór chininy została opisana przez Herschela w 1845 r. [2]. Kilka lat później, Stokes wykazał, że zjawisko to polega na pochłanianiu i emisji światła przez chininę i wprowadził termin „fluorescencja” dla opisanego procesu. Proces ten rozpoczyna się, gdy zdolna do fluorescencji cząsteczka absorbuje foton o odpowiedniej energii. Powoduje to przeniesienie jednego elektronu z orbitalu zajętego, na orbital o wyższej energii. Powrót do elektronowego stanu podstawowego może zachodzić z emisją fotonu (fluorescencja) lub w sposób bezpromienisty.

W ostatnich latach barwniki znalazły szerokie zastosowanie jako sondy fluorescencyjne. Sondy fluorescencyjne są spektroskopowym narzędziem, wykorzystywanym w chemii, biologii i fizyce, do monitorowania specyficznych właściwości środowiska, w którym się one znajdują. Jest to możliwe, gdyż fluorescencja takiej cząsteczki zależy od zachodzących w jej otoczeniu zmian: temperatury, polarności, lepkości, potencjału elektrycznego lub pH [3÷6]. Związki te można zatem wykorzystywać do oszacowania polarności i lepkości roztworu, mierząc zmianę w natężeniu emisji lub wartość przesunięcia maksimum emisji. Podstawowe zalety tej techniki, w porównaniu z metodami konwencjonalnymi, to: duża czułość i selektywność; bardzo krótki czas odpowiedzi (ok.  $10^{-9}$  s); brak konieczności pobierania próbek; nieniszczący charakter pomiaru oraz możliwość ciągłego śledzenia zmian w czasie. Sondy fluorescencyjne można podzielić na cztery zasadnicze rodzaje: (1) związki tworzące ekscymery, (2) sondy typu TICT o podwójnej fluorescencji, (3) sondy z wewnątrzcząsteczkowym przeniesieniem elektronu, oraz (4) sole organiczne typu D- $\pi$ -A<sup>+</sup> X<sup>-</sup>. Budowa tych soli jest zbliżona do budowy sond typu (3), jednak ich właściwości fotofizyczne są odmienne. Mechanizm tłumaczący zachowanie się sond typu (4) zakłada, że w stanie podstawowym ładunek dodatni zlokalizowany jest na atomie azotu pirydyny, zaś w stanie wzbudzonym przemieszcza się w kierunku grupy dimetyloaminowej [4]. Do tej właśnie grupy sond należą omawiane w niniejszym artykule sole stilbazoliowe. Fotofizyka i spektroskopia tej grupy związków zostały opisane przez zespoły badawcze Fromherza [7] i Rettiga [8]. Sole stilbazoliowe były z powodzeniem stosowane do pomiaru postępu polimeryzacji metakrylanów [9, 10].

W niniejszym artykule opisano zależności pomiędzy zmianami widm fluorescencji grupy barwników stilbazoliowych o zróżnicowanej budowie w:

- roztworach zawierających wodę i poli(glikol etylenowy) o różnych masach molowych (roztwory znacznie różniące się lepkością lokalną)
- wodnych roztworach o różnym pH.

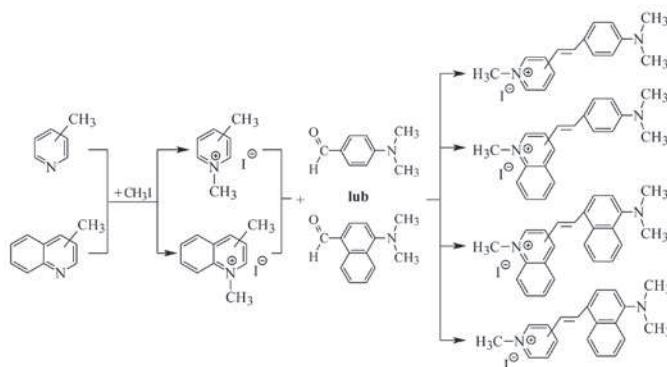
## 2. Część eksperymentalna

### 2.1. Pomiar spektroskopowe

Elektronowe widma absorpcyjne badanych związków zarejestrowano za pomocą spektrofotometru UV-Vis Multispec-1501 firmy Shimadzu, zaś rejestrację widm fluorescencji przeprowadzono przy użyciu spektrofluorymetru F-4500 firmy Hitachi.

### 2.2. Synteza

Sposób syntezy badanych barwników przedstawiono na schemacie 1. Jodki dimetylopirydyny i dimetylocholinoliny otrzymano z 90% wydajnością przez gotowanie mieszaniny odpowiedniej metylopirydyny lub metylocholinoliny (0,05 mol) i jodku metylu (0,05 mol) w acetonie przez 2 h. Wydzielone kryształy odfiltrowano i wysuszono. Kondensację tak otrzymanych jodków z aldehydem 4-(N,N-dimetyloamino)benzoesowym oraz aldehydem 4-(N,N-dimetylamino)-1-naftoesowym przeprowadzono ogrzewając ich metanolowe roztwory (3-4 h) w temperaturze wrzenia, z dodatkiem kilku kropli piperdyny. Po ochłodzeniu, wydzielone barwniki odsączono i wysuszono. Strukturę i czystość otrzymanych produktów potwierdzono wykorzystując spektroskopię NMR oraz chromatografię cienkowarstwową.



Schemat 1. Schemat syntezy jodków styrylopirydyniowych i styrylocholinoliniowych

### 3. Omówienie wyników

Wszystkie testowane barwniki są wystarczająco dobrze rozpuszczalne w wodzie, co umożliwia wykorzystanie ich do monitorowania zmian zachodzących w układach biologicznych. Struktury oraz podstawowe właściwości spektroskopowe stosowanych związków zostały zamieszczone w tabelcy 1.

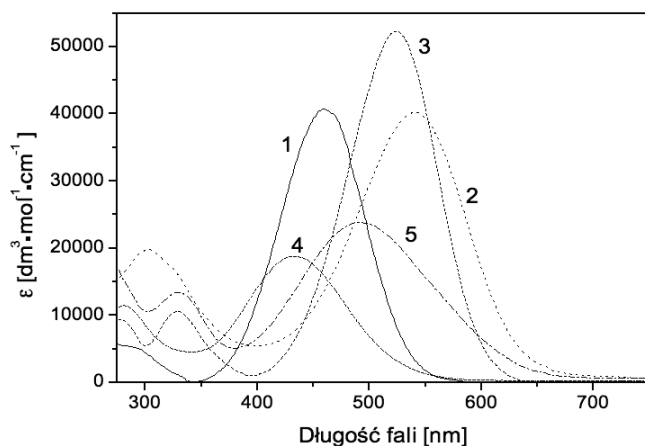
Tabela 1

Wzory strukturalne oraz podstawowe właściwości spektroskopowe badanych barwników w N,N-dimetyloformamidzie (DMF), acetonitrylu (MeCN) oraz tetrahydrofuranie (THF)

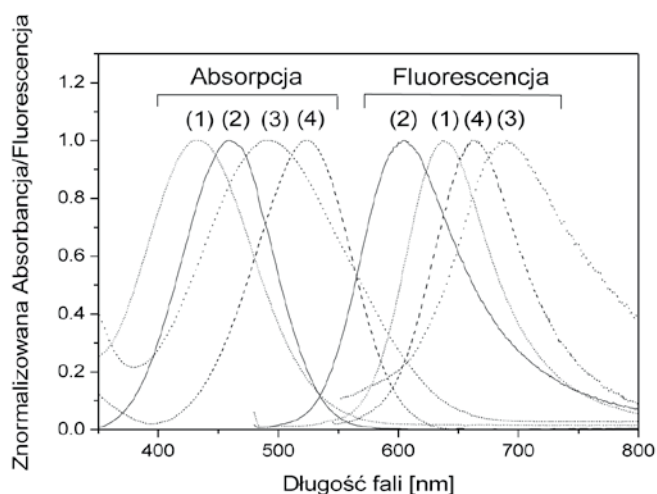
Skrót	Wzór strukturalny	Rożp.	Absorbpcja $\lambda_{\text{abs max}}$ [nm]	Molowy wsp. absorbpcji $\epsilon$ [dm <sup>3</sup> mol <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> ]	Fluorescencja $\lambda_{\text{max}}^{\text{a}}$ [nm]/ przesunięcie Stokesa $\tilde{\nu}$ [cm <sup>-1</sup> ]
AlCh1		DMF MeCN THF	470 471 475	$35,0 \times 10^3$ $45,5 \times 10^3$	629 / 5379 621 / 5128 615 / 4793
AlCh2		DMF MeCN THF	459 456 461	$39,0 \times 10^3$ $43,5 \times 10^3$	605 / 5257 603 / 5346 597 / 4942

Skrót	Wzór strukturalny	Rozp.	Absorbancja $\lambda_{\text{max}}^{\text{abs}} [\text{nm}]$	Molowy wsp. absorbpcji $\epsilon$ [ $\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ]	Fluorescencja $\lambda_{\text{max}}^{\text{em}} [\text{nm}]$ / przesunięcie Stokesa $\tilde{\nu} [\text{cm}^{-1}]$
AlCh3		DMF MeCN THF	541 538 553	$40,2 \times 10^3$ $41,1 \times 10^3$	705 / 4300 700 / 4301 690 / 3590
AlCh4		DMF MeCN THF	523 520 535	$52,3 \times 10^3$ $55,5 \times 10^3$	663 / 4037 666 / 4216 697 / 4345
A2Ch1		DMF MeCN THF	443 449 365	$24,4 \times 10^3$ $25,0 \times 10^3$	662 / 7467 662 / 7166 651 / 12036
A2Ch2		DMF MeCN THF	432 432 375	$18,8 \times 10^3$ $21,2 \times 10^3$	637 / 7449 634 / 7375 620 / 10538
A2Ch4		DMF MeCN THF	488 489 574	$23,8 \times 10^3$ $24,7 \times 10^3$	690 / 5999 690 / 5957 721 / 3552

Elektronowe widma absorpcyjne wybranych barwników w DMF zostały przedstawione na rysunku 1.



Rys. 1. Przykładowe elektronowe widma absorpcyjne badanych barwników w DMF: 1 – AlCh2; 2 – AlCh3; 3 – AlCh4; 4 – A2Ch2; 5 – A2Ch4



Rys. 2. Znormalizowane widma absorpcji i fluorescencji barwników: (1) – A2Ch2; (2) – AlCh2; (3) – A2Ch4; (4) – AlCh4

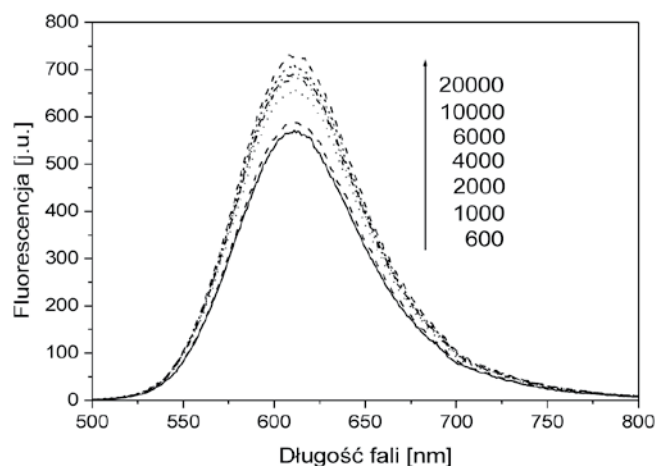
Wszystkie otrzymane widma absorpcyjne zawierają dwa wyraźne pasma, z maksimum przy ok. 300 nm i przy 430-550 nm. Krótkofalowe pasmo przypisać można przejściu  $\pi \rightarrow \pi^*$ , zaś pasmo długofalowe, o dużo wyższym molowym współczynniku absorpcji,

jest związane z wewnątrzcząsteczkowym przeniesieniem elektronu ( $S^0 \rightarrow CT$ ) z pary elektronowej na atomie azotu grupy aminowej do azotu grupy pirydynowej. Wartość przesunięcia Stokesa (od 3,5 do 12 tys.  $\text{cm}^{-1}$ ) świadczy również o tym, że fluorescencja pochodzi ze stanów wzbudzonych dwóch geometrycznie różnych konformacji. Porównanie widm absorpcyjnych, przedstawionych na rysunku 1, a zwłaszcza parametrów widm UV-Vis zebranych w tabeli I wskazuje, że położenie i intensywność pasma CT w znacznym stopniu zależy od struktury cząsteczki barwnika.

Z analizy widm fluorescencji badanych związków wynika, że położenie maksimum fluorescencji w niewielkim stopniu zależy od polarności rozpuszczalnika. Brak solwatochromii może wynikać z faktu, że z elektrostatycznego punktu widzenia, stan podstawowy i w pełni zrelaksowany stan wzbudzony, są w przybliżeniu równoważne, w związku z tym polarność rozpuszczalnika nie wpływa w istotny sposób na długość fali emisji sondy [11].

### 3.1. Widma emisyjne w roztworach poli(glikol etylenowy) – woda

Badania przeprowadzone nad zależnością fluorescencji barwników od lokalnej lepkości nie przyniosły oczekiwanych rezultatów. Pomiary wykonano w roztworach poli(glikol etylenowy)–woda, zmieszanych w stosunku wagowym 1:2,6. Dzięki zastosowaniu poli(glikolu etylenowego) o różnych masach molowych (od 600 do 20000), osiągnięto znaczne różnice w lepkości lokalnej roztworów. Rysunek 3 przedstawia zależność fluorescencji sondy AlCh1 od lepkości lokalnej roztworu. Można tu zauważyć wzrost intensywności fluorescencji ze wzrostem lepkości środowiska, jednak zmiany te są niewielkie i nie mają znaczenia analitycznego. Dotyczy to również pozostałych barwników.

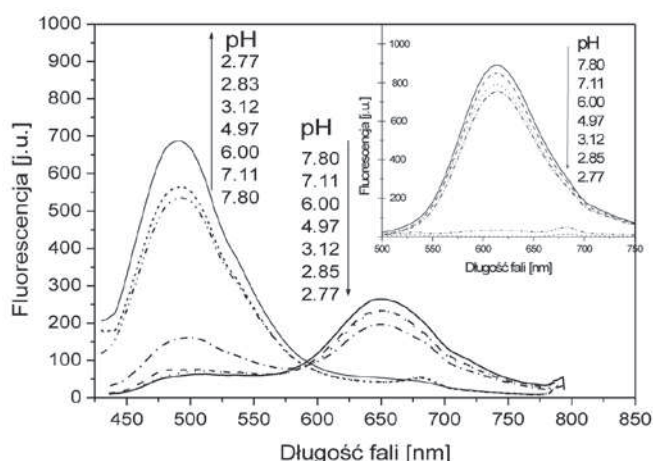


Rys. 3. Widma fluorescencyjne sondy AlCh1 w roztworach poli(glikol etylenowy) – woda zmieszanych w stosunku wagowym 1 do 2,6. Masy cząsteczkowe poli(glikolu etylenowego) podane na rysunku

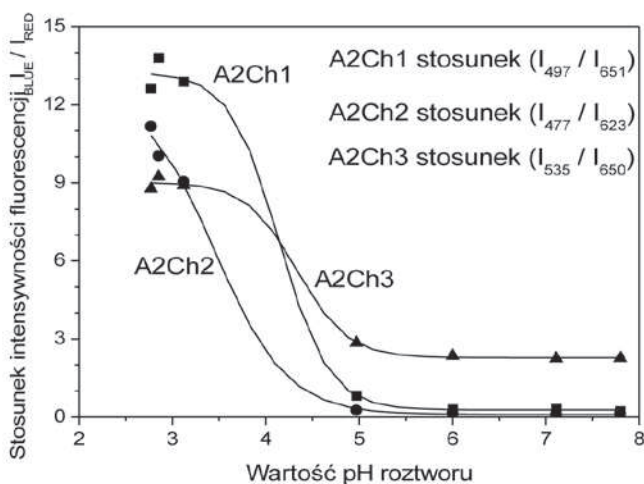
### 3.2. Widma emisyjne w roztworach wodnych o różnej kwasowości

Widma emisyjne wybranych sond w roztworach o różnym pH przedstawione zostały na rysunku 4. Interesujące zależności zaobserwować można w przypadku barwników pochodnych aldehydu 4-(*N,N*-dimetylamino)-1-naftoesowego. Widma emisyjne roztworów tych związków, przy obniżaniu wartości pH wykazują wyraźne zmiany, zależne od pH układu. Wraz ze wzrostem kwasowości zmniejsza się intensywność pasma przy ok. 650 nm, pojawia się natomiast silne pasmo, przesunięte w stronę fal krótszych o ok. 160 nm. Zjawisko takie nie jest obserwowane w przypadku sond pochodnych aldehydu 4-(*N,N*-dimetylamino)benzoesowego. Zmiany stosunku intensywności fluorescencji pasma krótkofalowego do pasma długofalowego w zależności od pH roztworu przedstawiono na rysunku 5.

Uzyskane wyniki pozwalają na stwierdzenie, że barwniki stilbazoliowe, pochodne aldehydu 4-(*N,N*-dimetyloamino)-1-naftoesowego są czułe na zmiany pH roztworów wodnych; mogą więc być stosowane jako sondy fluorescencyjne.



**Rys. 4. Zależność widm fluorescencji sondy A2Ch1 od pH roztworu. Wstawka: analogiczna zależność dla sondy A1Ch1. Wartości pH podane na wykresie**



**Rys. 5. Stosunek intensywności fluorescencji pasma krótkofalowego do pasma długofalowego (przy długościach fali dla maksymalnej wartości intensywności fluorescencji) w zależności od pH roztworu. Wyniki dla sond A2Ch1, A2Ch2 oraz A2Ch3**

#### Podziękowanie

Praca była finansowana przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego w ramach projektu badawczego grant nr N N204 054335 oraz BS-12/2010.

#### Literatura

- Lavis L.D., Raines R.T.: *Bright ideas for chemical biology*. ACS Chemical Biology 2008, **3**, 142-155.
- Herschel J.F.W.: *On a case of superficial colour presented by a homogeneous liquid internally colourless*. Phil. Trans. R. Soc. London 1845, **135**, 143-145.
- Hangland R.P.: *Molecular Probes*. In *Handbook of Fluorescence Probes and Research Chemicals; Molecular Probes*. Eugene, OR, 1989.
- Pączkowski J.: *Sondy fluorescencyjne jako narzędzie badawcze w fotochemii polimerów*. Polimery 2005, **50**, 520-529.
- Bajorek A., Trzebiatowska K., Jędrzejewska B., Pietrzak M., Gawinecki R., Pączkowski J.: *Developing of fluorescence probes based on stilbazolium salts for monitoring free radical polymerization processes. II*. J. Fluoresc. 2004, **14**, 295-307.
- Bosch P., Catalina F., Corrales T., Peinado C.: *Fluorescent probes for sensing processes in polymers*. Chem. Eur. J. 2005, **11**, 4314-4325.
- Fromherz P., Heilmann A.: *Twisted internal charge-transfer in (aminophenyl)pyridinium*. J. Phys. Chem. 1992, **96**, 6864-6866.

- Strehmel B., Sheifert H., Rettig W.: *Photophysical properties of fluorescence probes. 2. A model of multiple fluorescence for stilbazolium dyes studied by global analysis and quantum chemical calculations*. J. Phys. Chem. B 1997, **101**, 2232-2243.
- Wróblewski S., Trzebiatowska K., Jędrzejewska B., Pietrzak M., Gawinecki R., Pączkowski J.: *Development of fluorescence probes based on stilbazolium salts for monitoring free radical polymerization processes*. J. Chem. Soc., Perkin Trans.2 1999, 1909-1917.
- Bajorek A., Kabatc J., Pączkowski J.: *Barwniki styrylochinolinowe jako sondy spektroskopowe w procesie polimeryzacji wolnorodnikowej*. Polimery 2007, **52**, 556-561.
- Jager W. F., Kudasheva D., Neckers D. C.: *Organic Donor- $\pi$ -Acceptor Salts: A New Type of Probe for Monitoring Photopolymerization Processes*. Macromolecules 1996, **29**, 7351-7355.

Dr inż. Agnieszka BAJOREK jest absolwentką Wydziału Technologii i Inżynierii Chemicznej Akademii Techniczno-Rolniczej w Bydgoszczy (1987). Doktorat na Wydziale Chemii UMK w Toruniu obroniła w 1999 r. Obecnie pracuje w Zakładzie Chemii Fizycznej UTP w Bydgoszczy. Zainteresowania naukowe: fotochemia polimerów, fotoinicjowana polimeryzacja, sondy spektroskopowe.

Mgr inż. Ilona WRZEŚNIEWSKA jest absolwentką Wydziału Technologii i Inżynierii Chemicznej Uniwersytetu Technologiczno-Przyrodniczego w Bydgoszczy (2010).

Dr inż. Marek PIETRZAK jest absolwentem Wydziału Technologii i Inżynierii Chemicznej Akademii Techniczno-Rolniczej w Bydgoszczy (1993). Stopień naukowy doktora uzyskał na Wydziale Chemii UAM w Poznaniu w 2000 roku. Obecnie pracuje w Zakładzie Chemii Fizycznej UTP w Bydgoszczy. Zainteresowania naukowe: fotochemia polimerów, fotoinicjowana polimeryzacja, synteza organiczna, sondy spektroskopowe.

### Wydział Technologii i Inżynierii Chemicznej Uniwersytetu Techniczno-Przyrodniczego w Bydgoszczy Zakład Badawczo-Doświadczalny

W 1975 r. na Wydziale Technologii i Inżynierii Chemicznej utworzono Laboratorium Analiz Specjalistycznych. Zgromadzono w nim kosztowną aparaturę, wymagającą wysoko wyspecjalizowanej obsługi, która nie mogła być w pełni wykorzystana w ramach pojedynczych katedr i zakładów. W 1995 r. Laboratorium zmieniło nazwę na Zakład Badawczo-Doświadczalny i dysponuje spektrometrią magnetycznego rezonansu jądrowego, spektrofotometrami IR i UV-Vis, chromatografią gazową i cieczową, analizą termiczną (TG, DTG, DTA), analizą elementarną (CHNO). Opracowano zestaw do automatycznej rejestracji charakterystyk spektralnych reakcji chemicznych. Konstrukcję zestawu do kompensacji zmian przepływu w stałociśnieniowym chromatografie cieczowym. Na wyposażeniu Zakładu znajduje się następujący sprzęt: spektrometr NMR, spektrofotometr ASA, spektrofotometr FT-IR, derywatograf MOM, spektrofotometr UV-Vis, chromatograf cieczowy. Podstawowym zadaniem Zakładu jest wykonywanie analiz specjalistycznych dla pracowników i studentów Wydziału. W miarę możliwości realizuje się także zlecenia innych wydziałów UTP i jednostek pozauczelnianych.