


МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
імені В. Н. Каразіна

**Кафедра фізичної хімії**

УДК 547.633.6

*До захисту допускаю*

\_\_\_\_\_  \_\_\_\_\_ Завідувач кафедри

«\_11\_» 12\_2023 р. д.х.н., проф. М. О. Мchedлов-Петросян

**ДИСОЦІАЦІЯ НІТРОПОХІДНИХ ФЛУОРЕСЦЕЇНУ В РОЗЧИНАХ**

Кваліфікаційна робота магістра

II курсу хімічного факультету

**СОРОКІНОЇ ДАРИНИ  
ВІТАЛІЇВНИ**



Науковий керівник

д.х.н, проф.



М. О. Мchedлов-Петросян

ХАРКІВ 2023

## РЕФЕРАТ

**Курсова робота містить** два розділи, 31 сторінку, 4 рисунки, 4 таблиці, 26 використаних джерел.

**Об'єкт дослідження:** процеси дисоціації та таутомерії в розчинах 2,7-динітро-4,5-дибромфлуоресцеїну.

**Мета роботи:** вивчення спектрів поглинання та визначення констант дисоціації 2,7-динітро-4,5-дибромфлуоресцеїну в ДМСО.

**Результати:** Виміряні спектри поглинання барвника 2,7-динітро-4,5-дибромфлуоресцеїну в диметилсульфоксиді в умовах варіювання кислотності. Одержані значення констант дисоціації цієї сполуки, зроблено висновки щодо таутомерії молекулярної та іонних форм, інтерпретовано співвідношення між константами ступінчастої дисоціації.

**Ключові слова:** флуоресцеїнові барвники; кислотна дисоціація в розчинах; таутомерія; спектри поглинання; диметилсульфоксид; 2,7-динітро-4,5-дибромфлуоресцеїн

## ABSTRACT

**Course work consists of** 2 parts and contains 31 pages, 4 figures, 4 tables, and 26 bibliographical references.

**Object of the study:** Dissociation process and tautomerism phenomenon of 2,7-dinitro-4,5-dibromofluorescein in solution.

**Aim of the work:** Study of the absorption spectra and determination of the dissociation constants of 2,7-dinitro-4,5-dibromofluorescein in DMSO.

**Results:** Absorption spectra of 2,7-dinitro-4,5-dibromofluorescein in DMSO were obtained at different acidities. The dissociation constants were determined, and conclusions concerning the tautomerism of molecular and ionic forms are made. The ratio of the constants of stepwise dissociation is explained.

**Key words:** Fluorescein dyes; acidic dissociation in solution; tautomerism; absorption spectra; dimethyl sulfoxide; флуоресцеїнові барвники; кислотна дисоціація в розчинах; таутомерія; спектри поглинання; 2,7-dinitro-4,5-dibromofluorescein

## ЗМІСТ

ВСТУП.....	5
1.ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД.....	6
1.1 Відомості про флуоресцеїн та його похідні.....	6
1.1.1 Флуоресцеїн та його похідні.....	6
1.1.2 Дисоціація та таутомерія флуоресцеїнових барвників.....	7
1.1.3 Нітропохідні флуоресцеїну в розчині.....	13
1.1.4 Використання флуоресцеїну та його похідних.....	16
2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА.....	17
2.1 Матеріали.....	17
2.2 Апаратура.....	17
2.3 Визначення констант дисоціації.....	17
2.4 Обговорення результатів.....	22
2.4.1 Інтерпретація таутомерії молекул і іонів.....	22
2.4.2 Інтерпретація співвідношення констант дисоціації.....	24
2.5 Охорона праці.....	25
ВИСНОВКИ.....	27
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	28

## ВСТУП

Похідні флуоресцеїну знайшли широке застосування в різних галузях людської життєдіяльності: від флуоресцентного барвника, що застосовується в промисловості для пошуку різних витоків у трубопроводах, до флуоресцентної мітки, яка дозволяє відстежувати шляхи різних біологічних сполук або ліків. Також флуоресцеїн знайшов широке застосування в спектроскопії. Флуоресцеїн відкритий досить давно, і його хімія вивчена досить добре. Але хімія моно та бісформільних похідних флуоресцеїну почала розвиватися порівняно нещодавно [1].

Тому залишається актуальним дослідження різноманітних похідних флуоресцеїну, включаючи їх спектри поглинання та флуоресценції, таутомерію та кислотно-основні рівноваги. З одного боку, хоча добре вивчені галогенпохідні флуоресцеїну, але значно менше опублікованих даних стосуються нітропохідних. З другого боку, переважна більшість результатів стосується водного середовища, а реакції та рівноваги у неводних розчинниках досліджені незначно. Тому на кафедрі фізичної хімії Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна виконуються дослідження кислотно-основних та спектральних властивостей нітропохідних флуоресцеїну в органічних розчинниках. Ця дипломна робота продовжує цей напрям.

## ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

### 1.1 Відомості про флуоресцеїн та його похідні

#### 1.1.1 Флуоресцеїн та його похідні

Флуоресцеїн — це хімічна сполука, синтетичний барвник, який належить до фталейнів помаранчевого кольору, з жовто-зеленою флуоресценцією у розчинах. Колір водного розчину — жовтий "на просвіт" або зелений "збоку". Добре розчиняється в органічних розчинниках, таких як спирти. У воді у присутності основ утворіє добре розчинну аніонну форму. Численні похідні флуоресцеїну застосовуються в біохімії та клітинній біології як флуоресцентні мітки. Молекулярна форма флуоресцеїну у вигляді хіноїдного таутомеру представлена на схемі 1.1

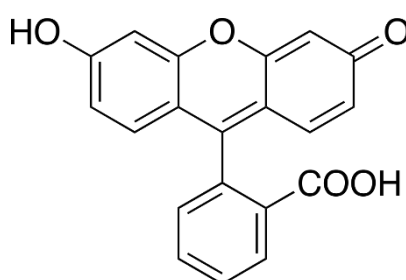


Схема 1.1. Молекулярна структура флуоресцеїну

Отримують флуоресцеїн конденсацією фталевого ангідриду з резорцином у присутності хлористого цинку. Реакція проводиться за температури 175—195°C (схема 1.2).

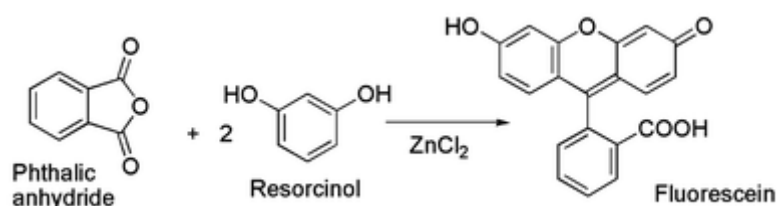


Схема 1.2. Схема отримання флуоресцеїну

Для мічення протеїнів застосовують флуоресцеїн ізотіоціанат та активовані естери карбоксифлуоресцеїну. Багато інших барвників містять скелет флуоресцеїну і додаткові замісники (наприклад, сульфогрупи), що підвищують розчинність та фотостабільність. Похідними флуоресцеїну є також барвники типу еозину (2,4,5,7-тетрабромфлуоресцеїна) [2].

### **1.1.2 Дисоціація та таутомерія флуоресцеїнових барвників.**

Інтерпретація зв'язку між значеннями ступінчастих констант дисоціації органічних кислот є ключовою проблемою фізичної хімії багатоосновних органічних кислот у розчині. Іноді навіть у випадку сполук, що належать до однієї хімічної групи, співвідношення цих констант змінюється в широких межах. Загальноприйнятим підходом є розгляд так званих мікроскопічних констант дисоціації [3–6], що, у свою чергу, вимагає знання констант таутомеризації.

Флуоресцеїн та його похідні є прикладом багатоосновних органічних кислот. Ці сполуки використовуються в сучасних аналітичних процедурах [7–9], включення у наночастинки метакрилату [10] та золь-гелеві матеріали [11]. Останнім часом досліджено флуоресцеїн та його похідні у твердому стані [12], в міцелах ПАР [13] та у поліелектролітних системах [14].

Дослідження, проведені на кафедрі фізичної хімії, показали, що на формування значень констант дисоціації суттєво впливає таутомерія молекул та іонів флуоресцеїнових сполук [15–18]. Дослідження показали, що введення від однієї до чотирьох нітрогруп виявляє надзвичайно сильні ефекти і навіть призводить до появи нових таутомерів, нетипових як для галогенованих флуоресцеїнів, так і для материнської сполуки [16–18].

У попередньому дослідженні, виконаному на кафедрі, було вивчено серію нітрофлуоресцеїнів в чистому диметилсульфоксиді (ДМСО) [18]. Вибір ДМСО як розчинника був доречним, оскільки різниця кислотної сили

різних сполук, як правило, виражена в ДМСО більш чітко, ніж у воді чи спиртах. Крім того, молекулярні форми нітропохідних флуоресцеїну погано розчиняються у воді, що ускладнює дослідження кислотно-основної рівноваги в цьому розчиннику. Термодинамічні значення [(Рівн. (1.1–1.3)) визначали спектрофотометричним методом у буферних розчинах.



Деякі значення показників констант дисоціації, наведені в цьому дослідженні [18], представлені в Таблиці 1.1.

Поряд з іншими результатами виявлено декілька прикладів різких відмінностей у співвідношенні першої та другої констант дисоціації, від 0,2 для флуоресцеїну та 7,9 для 4'- і 5'-нітрофлуоресцеїнів до  $4,0 \times 10^7$  для 2,7-дибром-4,5-динітрофлуоресцеїну. Цей та багато інших ефектів було пояснено через аналіз таутомерії та мікроскопічних констант дисоціації. І для цього було розглянуто загальну схему протолітичних рівноваг флуоресцеїнових сполук. На схемі 1.3 представлені можливі структури молекул і аніонів флуоресцеїнових сполук.

Як було доведено за допомогою модельних сполук (з естерифікованою карбоксильної групою), спектри поглинання в видимій області практично співпадають для структур  $\text{HX}^-$  та  $\text{X}^{2-}$ ,  $\text{H}_2\text{Q}$  та  $\text{HQ}^-$ ,  $\text{H}_3\text{Z}^+$  та  $\text{H}_2\text{Z}^{\pm}$ , з єдиною різницею: дисоціація карбоксильної групи приводить до гіпсохромного зсуву смуги поглинання на декілька нанометрів [16–18]. Причому лактони безбарвні; винятком є діаніони тетра- і пентанітрофлуоресцеїнів [16–18].

Катіони флуоресцеїну та його похідних ми далі не будемо розглядати, оскільки в ДМСО вони існують у дуже кислих середовищах.

**Таблиця 1.1** Показники термодинамічних констант дисоціації барвників у ДМСО [18].

№.	Сполука	$pK_{a1}$	$pK_{a2}$	$pK_{a2} - pK_{a1}$
1	Флуоресцеїн	$13.0 \pm 0.1$	$12.3 \pm 0.1$	-0.7
2	4'-Нітрофлуоресцеїн	$10.7 \pm 0.1$	$11.6 \pm 0.1$	0.9
3	5'- Нітрофлуоресцеїн	$10.7 \pm 0.1$	$11.6 \pm 0.1$	0.9
4	4,5-Динітрофлуоресцеїн	$7.0 \pm 0.1$	$9.9 \pm 0.2$	2.9
5	4,5,4'-Тринітрофлуоресцеїн	$6.3 \pm 0.1$	$8.2 \pm 0.1$	1.9
6	4,5,5'- Тринітрофлуоресцеїн	$6.5 \pm 0.1$	$8.4 \pm 0.1$	1.9
7	4,5-Динітро-2,7- дибромфлуоресцеїн	$1.34 \pm 0.10$	$8.9 \pm 0.1$	7.6
8	2,4,5,7-Тетранітрофлуоресцеїн	$1.30 \pm 0.17$	$4.4 \pm 0.13$	3.1
9	2,4,5,7,4'-Пентанітрофлуоресцеїн	$0.59 \pm 0.03$	$4.42 \pm 0.04$	3.8
10	2,4,5,7,5'- Пентанітрофлуоресцеїн	$0.22 \pm 0.06$	$4.45 \pm 0.03$	4.2

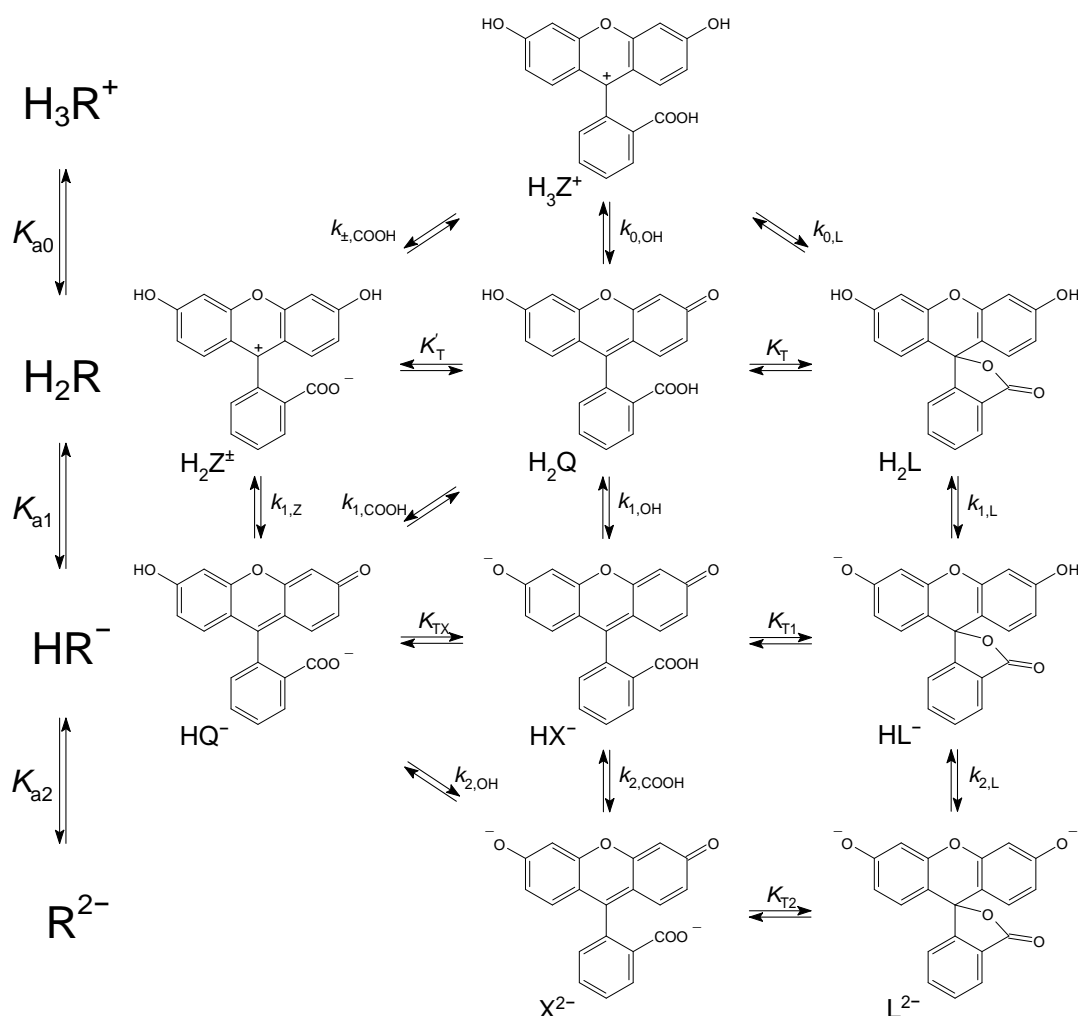


Схема 1.3 Детальна схема дисоціації та таутомерії флуоресцеїнових барвників (замісники не показані).

$$\begin{aligned}
 K_T &= [\text{H}_2\text{L}] / [\text{H}_2\text{Q}]; \quad K'_T = [\text{H}_2\text{Z}^\pm] / [\text{H}_2\text{Q}]; \quad K''_T = [\text{H}_2\text{L}] / [\text{H}_2\text{Z}^\pm]; \quad K''_T = K_T (K'_T)^{-1}; \\
 K_{T_x} &= [\text{HX}^-] / [\text{HQ}^-]; \quad K'_{T1} = [\text{HL}^-] / [\text{HQ}^-]; \quad K_{T1} = [\text{HL}^-] / [\text{HX}^-]; \quad K'_{T1} = K_{T1} K_{T_x}; \quad K_{T2} = [\text{L}^{2-}] / [\text{X}^{2-}] \\
 &; \quad k_{0,\text{OH}} = a_{\text{H}^+}^* [\text{H}_2\text{Q}] / [\text{H}_3\text{Z}^+]; \quad k_{1,\text{COOH}} = a_{\text{H}^+}^* [\text{HQ}^-] / [\text{H}_2\text{Q}]; \quad k_{\pm,\text{COOH}} = a_{\text{H}^+}^* [\text{H}_2\text{Z}^\pm] / [\text{H}_3\text{Z}^+] \\
 &; \quad k_{1,Z} = a_{\text{H}^+}^* [\text{HQ}^-] / [\text{H}_2\text{Z}^\pm]; \quad k_{1,\text{OH}} = a_{\text{H}^+}^* [\text{HX}^-] / [\text{H}_2\text{Q}]; \quad k_{1,L} = a_{\text{H}^+}^* [\text{HL}^-] / [\text{H}_2\text{L}] \\
 &; \quad k_{2,\text{OH}} = a_{\text{H}^+}^* [\text{X}^{2-}] / [\text{HQ}^-]; \quad k_{2,\text{COOH}} = a_{\text{H}^+}^* [\text{X}^{2-}] / [\text{HX}^-]; \quad k_{2,L} = a_{\text{H}^+}^* [\text{L}^{2-}] / [\text{HL}^-].
 \end{aligned}$$

Положення замісників позначені на схемі 1.4.

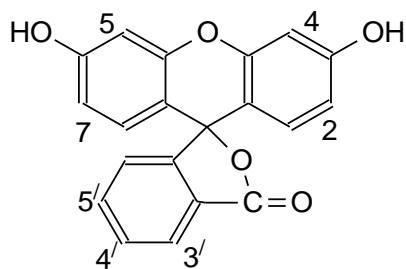


Схема 1.4. Молекулярна структура лактона флуоресцеїну

Відповідно до схеми 1, частки таутомерів,  $\alpha$ , слід виразити за допомогою наведених вище констант таутомеризації, рівняння (1.4–1.6):

$$\alpha_{\text{H}_2\text{Z}^{\pm}} = \frac{1}{1 + K_T'' + (K_T')^{-1}}; \alpha_{\text{H}_2\text{Q}} = \frac{1}{1 + K_T + K_T'}; \alpha_{\text{H}_2\text{L}} = \frac{1}{1 + K_T^{-1} + (K_T'')^{-1}} \quad (1.4)$$

$$\alpha_{\text{HQ}^-} = \frac{1}{1 + K_{T_x} + K_{T_1}'}; \alpha_{\text{HX}^-} = \frac{1}{1 + K_{T_x}^{-1} + K_{T_1}}; \alpha_{\text{HL}^-} = \frac{1}{1 + K_{T_1}^{-1} + (K_{T_1}')^{-1}} \quad (1.5)$$

$$\alpha_{\text{X}^{2-}} = \frac{1}{1 + K_{T_2}}; \alpha_{\text{L}^{2-}} = \frac{1}{1 + K_{T_2}^{-1}} \quad (1.6)$$

(Тут замість активностей використовуються рівноважні концентрації таутомерів.) Тепер експериментально визначені значення можна виразити через мікроскопічні  $pK$  та значення  $\alpha$  наступним чином, рівняння (1.7, 1.8):

$$\begin{aligned} pK_{a1} &= pK_{1,\text{COOH}} - \log \alpha_{\text{H}_2\text{Q}} + \log \alpha_{\text{HQ}^-} = pK_{1,\text{OH}} - \log \alpha_{\text{H}_2\text{Q}} + \log \alpha_{\text{HX}^-} \\ &= pK_{1,Z} - \log \alpha_{\text{H}_2\text{Z}^{\pm}} + \log \alpha_{\text{HQ}^-} = pK_{1,L} - \log \alpha_{\text{H}_2\text{L}} + \log \alpha_{\text{HL}^-} \end{aligned} \quad (1.7)$$

$$\begin{aligned} pK_{a2} &= pK_{2,\text{OH}} - \log \alpha_{\text{HQ}^-} + \log \alpha_{\text{X}^{2-}} = pK_{2,\text{COOH}} - \log \alpha_{\text{HX}^-} + \log \alpha_{\text{X}^{2-}} \\ &= pK_{2,L} - \log \alpha_{\text{HL}^-} + \log \alpha_{\text{L}^{2-}} \end{aligned} \quad (1.8)$$

Інтерпретацію кислотно-основних та таутомерної рівноваг було підтверджено за допомогою модельних сполук із блокованими

гідроксильними або карбоксильними групами,  $\text{OCH}_3$ ,  $\text{COOCH}_3$  та  $\text{COOC}_2\text{H}_5$ , або з групою  $\text{SO}_3\text{H}$  замість групи  $\text{COOH}$ .

Серед цих сполук дуже цікавим виглядає 2,7-дибром-4,5-динітрофлуоресцеїн. У цього барвника максимальне значення коефіцієнту молярного поглинання діаніонної форми  $\text{R}^{2-}$  в ДМСО складає  $30.6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  при 513 нм [18]. Це значно менше, ніж звичайно для іонів  $\text{R}^{2-}$  флуоресцеїну та його галогенпохідних; останнє становить близько  $100 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  в залежності від замісників та розчинника, і в літературі вважається, що таутомер  $\text{X}^{2-}$  є домінуючим в цих останніх випадках. Тому було зроблено висновок щодо існування великої частки практично безбарвного діаніона-лактона  $\text{L}^{2-}$ . А іон  $\text{HR}^-$  2,7-дибром-4,5-динітрофлуоресцеїну в ДМСО характеризується значенням  $96.2 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  при 525 нм [18]. В цьому випадку важко зробити висновок щодо існування суттєвої концентрації лактону  $\text{HL}^-$ . Як результат, було одержано оцінку значення  $\text{p}k_{2,\text{COOH}} = 9.4$  [18].

Раніше вже спостерігалось суттєве зниження інтенсивності світло поглинання діаніону в разі 2,7-динітро-4,5-дибромфлуоресцеїну у 50 % водному етанолі [19] та у мікроемульсіях на основі катіонної ПАР [20]. Для 2,7-дибром-4,5-динітрофлуоресцеїну це було виражено досить суттєво лише у останньому випадку [20]; Таблиця 1.2.

Тому метою даної роботи було вивчення спектрів поглинання та визначення констант дисоціації 2,7-динітро-4,5-дибромфлуоресцеїну в ДМСО. Наявні дані дозволяють очікувати більш виражених ефектів у безводному розчиннику, що дозволить поглибити уявлення щодо протолітичних рівноваг флуоресцеїнових сполук.

**Таблиця 1.2.** Спектральні характеристики динітро-дибромфлуоресцеїнів:

$$\lambda_{\max}, \text{nm} (E_{\max} \times 10^{-3}, \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1})$$

Розчинник	2,7-Динітро-4,5- дибромфлуоресцеїн		2,7-Дибром-4,5- динітро-флуоресцеїн	
	HR <sup>-</sup>	R <sup>2-</sup>	HR <sup>-</sup>	R <sup>2-</sup>
ДМСО [18]	—	—	525 (96.2)	513 (30.6)
50 мас % водний етанол [17]	543 (22.0)	536 (14.4)	514 (81)	505 (80)
Мікроемульсія «бензол – 1- пентанол – цетилтриметиламоній бромід», іонна сила водної фази; 1.0 М КСІ [20]	548 (15.36)	544 (4.38)	514 (51.13)	510 (26.16)

### 1.1.3 Нітропохідні флуоресцеїну в розчині

Приклади спектрів поглинання наведені на рисунках 1.1 і 1.2. Результати, отримані з пікриновою, трифлатною та *n*-толуолсульфонової кислотами, збігаються. У розчинах з низькою концентрацією пікринової кислоти враховували внесок концентрації барвника в матеріальний баланс. Вимірювання проводили проти холостих проб розчинника, що особливо важливо у випадку пікринової кислоти. Картина в схемах подібна до 2,4,5,7-тетранітрофлуоресцеїну. Оскільки значення  $pK_{a1}$  досить низькі, сліди забарвлених аніонів зникають лише при високих концентраціях кислот (сірчаної, *n*-толуолсульфонової або трифлатної). Таким чином, молекулярні форми,  $H_2R$ , безбарвні та існують у формі лактонів,  $H_2L$ .

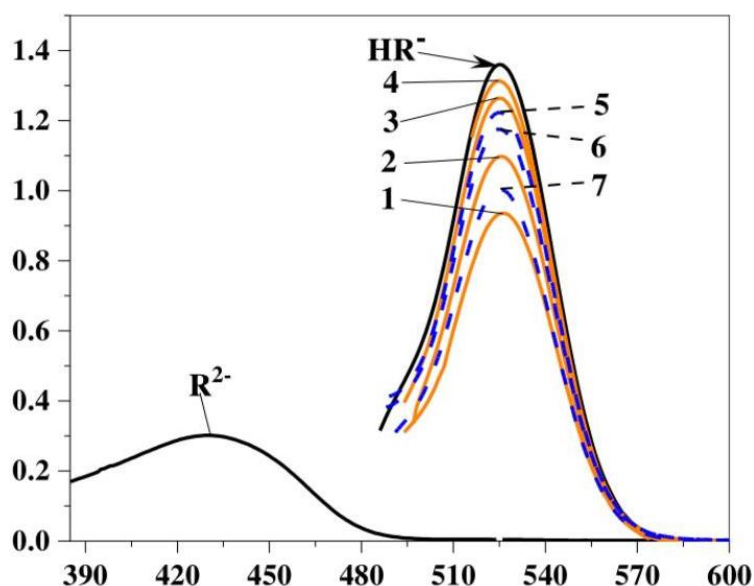


Рисунок 1.1: Спектри поглинання 2,4,5,7,4'-пентанітрофлуоресцеїну,  $1,40 \times 10^{-5}$  М, у ДМСО. Спектр діаніону  $R^{2-}$  вимірювали в 0,02 М розчині DBU; такий же спектр отримано в бензоатних буферних розчинах. Значення для розчинів пікринової кислоти в на шкалі концентрації  $pH_c = -\log[H^+]$ , а на шкалі активності  $\{a_{H^+}^*\}$  такі: 0,35 {0,66} (1); 0,66 {0,93} (2); 1,27 {1,44} (3); 1,81 {1,92} (4); 3,38 {3,40} (5); 3,51 {3,53} (6); 3,98 {3,99} (7); спектр в діапазоні від 1,84 {1,92} до 3,08 {3,11} майже незмінний і відповідає однозарядному аніону  $HR^-$ . (По осі абсцис- довжина хвилі, нм; по осі ординат-адсорбція). Відтворено з публікації [17].

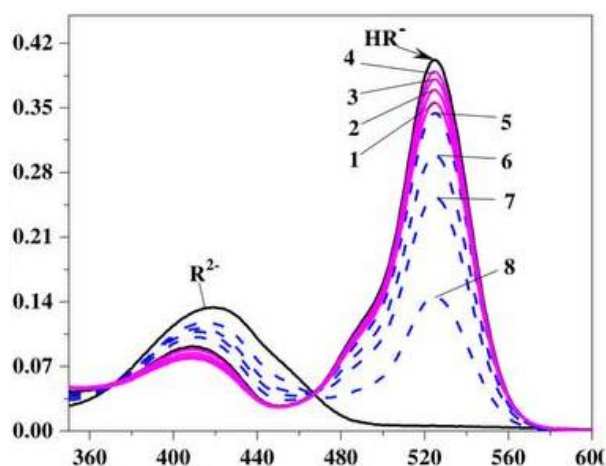


Рисунок 1.2: Спектри поглинання 2,4,5,7,5'-пентанітрофлуоресцеїну,  $4,17 \times 10^{-6}$  М, у ДМСО. Спектр діаніону  $R^{2-}$  вимірювали в 0,02 М розчині DBU; так само спектр отримано в бензоатному буферному розчині. Значення на шкалі концентрації,  $pH_c = -\log[H^+]$ , а в шкалі активності  $\{a^*H^+\}$  є такими: 1,05 {1,26} (1); 1,22 {1,40} (2); 1,40 {1,55} (3); 1,70 {1,82} (4); 3,70 {3,71} (5); 4,00 {4,01} (6); 4,22 {4,23} (7); 4,70 {4,70} (8); спектр в діапазоні від 1,70 {1,82} до 3,52 {3,54} майже незмінний і відповідає однозарядному аніону  $HR^-$ . У кислому середовищі використовували п-ТСК, пікринову та трифліктову кислоти. Це репрезентативний набір точок зі значно більшого масиву даних. Відтворено з публікації [17].

Але у разі змішаних нітробромпохідних флуоресцеїну можна очікувати не настільки вираженого перетворення двозарядного аніону  $R^{2-}$  у лактон  $L^{2-}$ , яке супроводжується повним зникненням смуги поглинання в області 520–540 нм та з'явленням нової смуги в області 400 – 420 нм. Тому нами було вивчено рівноваги 2,7-динітро-4,5-дибромфлуоресцеїну в ДМСО, з метою порівняти результати з іншими, наведеними в Таблиці 1.2.

### 1.1.4 Використання флуоресцеїну та його похідних

Флуоресцеїн відноситься до групи триарилметанових (ксантенових) барвників; фарбує в жовтий колір шовк та шерсть. Флуоресцеїн широко використовується для підфарбовування шампунів, пін та солей для ванн, води в акваріумах та водоймах, інших декоративних цілей. Часто його вшивають у тканину рятувальних жилетів - при попаданні такого жилета у воду утворюється величезна яскраво-зелена пляма, добре помітна з літака. В аналітичній хімії флуоресцеїн використовується як люмінесцентний кислотно-основний індикатор (інтервал переходу - 4,0-5,0). У біохімії та молекулярній біології ізотіоціанатні похідні флуоресцеїну - як біологічні фарби для визначення антигенів і антитіл. Практичне значення мають також деякі галогензаміщені флуоресцеїни, наприклад, еозини.

Флуоресцеїн використовують у теплових мережах для виявлення витоків. Флуоресцеїн (його динатрієва сіль, уранін А) використовується також у гідрології, у тому числі в карстології для виявлення переміщення підземних вод та підземних річок.

Створені інші флуоресцентні барвники, наприклад Oregon Green, Tokyo Green, SNAFL, а також карбоксинафтофлуоресцеїн, поряд з Alexa 488, FluoProbes 488 і DyLight 488, їх використовують для різних хімічних і біологічних експериментів, в яких потрібна підвищена фотостабільність [21].

## ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

### 2.1 Матеріали

Комерційний зразок 2,7-динітро-4,5-дібромфлуоресцеїну, Eosina Bluastra (еозин блакитний), Carlo Erba, Cod. 446602, Color Index 45406, очищено численним переосадженням С. В. Шеховцовим на кафедрі фізичної хімії.

Диметилсульфоксид очищали заморожуванням і переганяли під вакуумом; вміст води становив від 0,016 до 0,023 %, як визначено кулонометричним методом Карла Фішера. Бензойну і саліцилову кислоти очищали сублімацією. Бензоат калію і гідросаліцилат натрію очищали шляхом перекристалізації. Моногідрат *n*-толуолсульфо кислоти двічі перекристалізовували з ацетонітрилу. 95 % і 99 % водні розчини сірчаної кислоти мали аналітичну чистоту. Діазабіцикло[5.4.0]ундец-7-ен (ДБУ) використовувався як придбаний у Merck.

### 2.2 Апаратура

Спектри поглинання барвників вимірювали на приладі Hitachi U-2000 проти розчинника при 25 С°.

### 2.3 Визначення констант дисоціації

Для цього необхідно побудувати шкалу кислотності,  $p_{\text{H}^+}^*$  [22]. Стандартним станом є одно молярний розчин іону ліонію з властивостями нескінченно розведеного розчину в ДМСО. Значення  $p_{\text{H}^+}^*$  були отримані з використанням розчину достатньо сильних кислот або буферної суміші слабкої кислоти; позначає індекси констант дисоціації останнього.

Коефіцієнти іонної активності розраховували за рівнянням Дебая–Хюккеля, другий підхід, рівняння (2.1):

$$\log f_z = -\frac{1.12 z^2 \sqrt{I}}{1 + 2.13 \sqrt{I}} \quad (2.1)$$

Тут  $I$  — іонна сила розчину, а  $z$  — заряд іона. Коефіцієнти активності нейтральних видів прирівнювали до одиниці. *n*-Толуолсульфонова кислота (TSA) вважалася повністю дисоційованою в ДМСО [23]. Рівноважну концентрацію іона ліонію прирівнювали до робочих концентрацій цих кислот. Отже, значення були розраховані, як показано в формулі (2.2):

$$p a_{\text{H}^+}^* = -\log[\text{H}^+] - \log f_1 \quad (2.2)$$

Тут  $f_1$  позначає коефіцієнт активності сольватованого протона. При необхідності проводився облік протонів, що утворюються при дисоціації барвника. У буферних розчинах саліцилату натрію і бензоату калію передбачається повна дисоціація всіх солей. Значення  $I$  дорівнює концентрації солі, яка зазвичай становила 0,005 М. Значення  $pK_{\text{HA}}$  6,8 і 11,1 для саліцилової та бензойної кислот відповідно були одержані Кольтгофом та ін. [24]. Також враховувався процес гомоасоціації. Значення так званих констант утворення,  $K_{\text{HA}_2}^f$ , для цих кислот становлять 30 і 60  $\text{M}^{-1}$  відповідно [25]. В цьому випадку було використано рівняння, запропоноване Кольтгофом та ін. [26]:

$$(a_{\text{H}^+}^*)^2 f_1^2 c_s - a_{\text{H}^+}^* f_1 K_{\text{HA}} [c_a + c_s + K_{\text{HA}_2}^f (c_a - c_s)^2] + K_{\text{HA}}^2 c_a = 0 \quad (2.3)$$

Тут  $c_a$  і  $c_s$  — молярні концентрації кислоти та солі, відповідно. Зазвичай значення  $c_s$  було фіксованим, тоді як значення  $c_a$  було змінним. У результаті при  $c_a > c_s$  розраховані таким чином значення  $p a_{\text{H}^+}^*$  були нижчими, ніж оцінені без урахування процесу гомоасоціації. Результати були протилежними при  $c_a < c_s$ . Строго кажучи, значення  $pK_{\text{HA}}$  буферних кислот визначаються з

точністю до однієї десятої, але проміжні розрахунки проводилися з запасною значущою цифрою.

Значення  $pK_a$  барвників були отримані шляхом обробки спектрів поглинання при різних значеннях. Концентрації барвника, як правило, були на два порядки нижчими, ніж концентрації буферних компонентів, якщо не вказано інше. Для визначення спектру граничної основної форми,  $R^{2-}$ , використовували розчини ДБУ. Високу кислотність створювали за допомогою *m*-толуолсульфо кислоти. Робочі розчини готували в мірних колбах шляхом додавання аліквот барвника та буферних компонентів у вигляді аліквот їх вихідних розчинів або у вигляді зважених кількостей. Усі солі вважалися повністю дисоційованими.

Деякі типові спектри поглинання 2,7-динітро-4,5-дибромфлуоресцеїну в ДМСО в умовах варіювання кислотності представлені на рисунку 2.1.

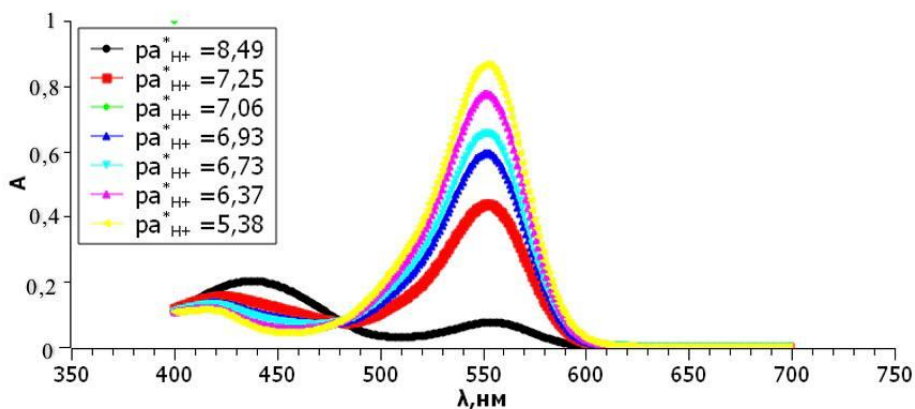


Рисунок 2.1. Спектри поглинання 2,7-динітро-4,5-дибромфлуоресцеїну в ДМСО при різних значеннях  $pH$ .

Залежність поглинання від  $pH$  при декількох довжинах хвиль представлена на рисунку 2.2. Ці дані одержані за допомогою к.х.н. Т.О. Чейпеш.

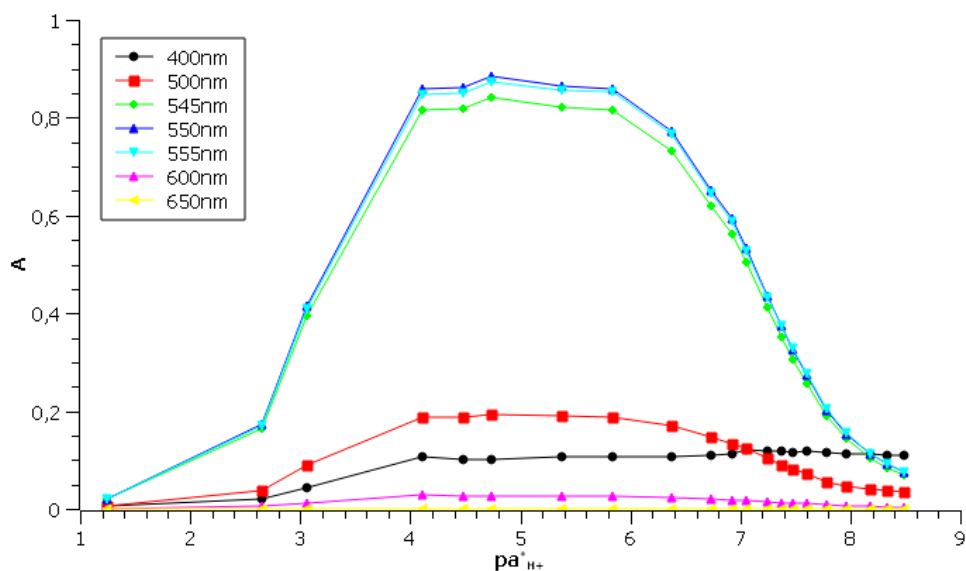


Рисунок 2.2. Залежність поглинання у розчинах 2,7-динітро-4,5-дибромфлуоресцеїну в ДМСО від  $pa_{H^+}^*$

З цієї залежності зрозуміло, що різниця між першим та другим значеннями  $pK_a$  достатня для того, щоб їх можна було розраховувати ізольовано:

$$pK_{a2} = pa_{H^+}^* + \log \frac{A - A_{R^{2-}}}{A_{HR^-} - A} \quad (2.4)$$

$$pK_{a1} = pa_{H^+}^* + \log \frac{A_{HR^-} - A}{A - A_{H_2R}} \quad (2.5)$$

( $A_{H_2R} \approx 0$ ) Експериментальні дані, оптимальні для розрахунків  $pK_{a2}$ , а також результати розрахунків представлені в Таблиці 2.1. Значення  $A$  форми  $HR^-$  вимірювались при  $pa_{H^+}^*$  близько 5.

Термодинамічне значення дорівнює:

$$pK_{a2}^\circ = pK_{a2} - \log f_{R^{2-}} + \log f_{HR^-} \quad (2.6)$$

$$\log f_{HR^-} = -0.069 \quad (2.7)$$

$$\log f_{HR^{2-}} = -0.276 \quad (2.8)$$

**Таблиця 2.1** Дані для розрахунку показника другої константи дисоціації 2,7-динітро-4,5-дибромфлуоресцеїну в ДМСО.

$pa_{H^+}^*$	А при довжинах хвиль, нм:			$pK_{a2}$		
	545	550	555	При 545 нм	При 550 нм	При 555 нм
$R^{2-}$	0,012	0,012	0,0113			
$HR^-$	0,8202	0,8637	0,8554			
8,49	0,0682	0,07385	0,0754	7,36	7,38	7,40
8,33	0,0846	0,09125	0,0930	7,33	7,34	7,36
8,18	0,1032	0,11105	0,1130	7,29	7,30	7,32
7,96	0,1428	0,1536	0,1560	7,25	7,26	7,28
7,78	0,1888	0,2024	0,2048	7,23	7,25	7,26
7,61	0,2563	0,2743	0,2765	7,25	7,26	7,27
7,48	0,3059	0,3260	0,3276	7,23	7,24	7,25
7,38	0,3520	0,3735	0,3733	7,24	7,26	7,28
7,25	0,4118	0,4354	0,4332	7,24	7,25	7,26
7,06	0,5055	0,5325	0,5272	7,25	7,25	7,25
6,93	0,5623	0,5925	0,5870	7,26	7,26	7,26
Середнє:				7,26	7,27	7,28
$pK_{a2}$ (середнє)				7,27±0,02		

Для розрахунку показника першої константи дисоціації іонна сила не постійна і дорівнює концентрації *пара*-толуолсульфокислоти. Перерахунок на термодинамічне значення необхідно робити окремо для кожного розчину барвника. Обробка даних при  $pa_{H^+}^*$  нижче 4 приводить до значення  $pK_{a1} = 3.21 \pm 0.09$ . Результати представлені в Таблиці 2.2.

**Таблиця 2.2.** Параметри рівноваг 2,7-динітро-4,5-дибромфлуоресцеїну в ДМСО.

$pK_{a1}$	$pK_{a2}$	$\lambda_{\max}, \text{нм} / E_{\max} \times 10^{-3}, \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$		
		$R^{2-}$	$HR^{-}$	$H_2R$
3.21±0.09	7.5±0.1	440 / 16.8	552 / 69.3	—
		548 / 0.96		

Таким чином, різниця  $pK_{a2} - pK_{a1}$  дорівнює 4.3. Для інтерпретації цієї різниці треба оцінити характер таутомерних рівноваг даного барвника.

## 2.4 Обговорення результатів

### 2.4.1 Інтерпретація таутомерії молекул і іонів

Нейтральна форма барвника,  $H_2R$ , безбарвна, що відповідає домінуванню лактонної структури,  $H_2L$  (див. схему 1.3). Спроби виміряти спектр нейтральної форми не були успішними, оскільки навіть у 50%-ній сульфатній кислоті в ДМСО помітні сліди аніону  $HR^{-}$  на фоні безбарвної молекулярної форми. Як свідчать дані Таблиці 2.2, діаніон  $R^{2-}$  існує в переважній мірі як лактон  $L^{2-}$ . Наявність полоси при 440 нм узгоджується з цим, оскільки для 2,4,5,7-тетранітрофлуоресцеїна та для пентанітрофлуоресцеїнів це теж спостерігалось [16, 17]. Це пов'язано з «нітрофенолятним» поглинанням аніонних фрагментів. При 548 нм поглинання незначне, але воно все ж таки є, і це є ознакою існування деякої кількості діаніону у вигляді таутомеру  $X^{2-}$  (див. схему 1.3). Нарешті, інтенсивність поглинання моноаніону досить висока (Таблиця 2.2), але важко визначити, в якій мірі ця іонна форма існує у вигляді лактону  $HL^{-}$ .

Для вирішення цієї проблеми нами були використані дані, одержані на кафедрі фізичної хімії ст. н. співр. С.В. Шеховцовим для синтезованого ним метилового естеру 2,7-динітро-4,5-дібромфлуоресцеїну (схема 2.1).

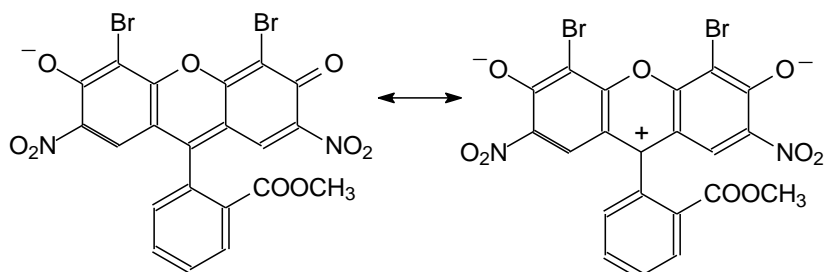


Схема 2.1. Аніонна форма естеру 2,7-динітро-4,5-дібромфлуоресцеїну

Для аніону цього барвника в ДМСО,  $\lambda_{\max} = 556.5$  нм,  $E_{\max} = 81.63 \times 10^3$   $M^{-1}cm^{-1}$ . Якщо цей коефіцієнт молярного поглинання прийняти за стандарт інтенсивності аніонів  $NX^-$  та  $X^{2-}$ , то частки форм  $NR^-$  та  $R^{2-}$  дорівнюють 0,85 та 0,012, відповідно. Таким чином, частки лактонних структур складають 0,15 та 0,988, відповідно.

Одразу ж виникає питання: чому для моноаніону більш стабільна хіноїдна форма, в той час як для діаніона – лактон (схема 2.2)?

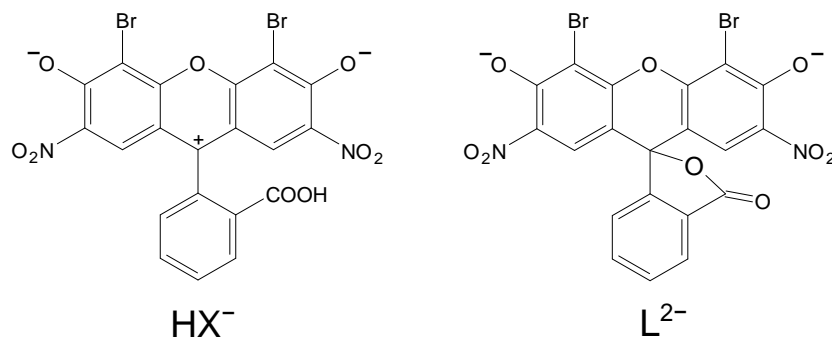


Схема 2.2. Структурні формули глибоко забарвленого хіноїду  $NX^-$  та лактону  $L^{2-}$  2,7-динітро-4,5-дібромфлуоресцеїну.

Однієї з причин є слабка сольватація карбоксилатної групи,  $\text{COO}^-$ , в ДМСО, оскільки цей розчинник не є донором водневих зв'язків. З другого боку, група  $\text{COOH}$  добре сольватується ДМСО, який є протофільним (основним) розчинником. Крім того, симетрична структура ксантенової частини таутомеру  $\text{HX}^-$  сприяє делокалізації негативного заряду, що підвищує стабільність.

## 2.4.2 Інтерпретація співвідношення констант дисоціації

Різниця значень  $\text{p}K_a$  може бути вираженою за допомогою рівнянь, які впливають зі схеми 1.3, враховуючи, що  $\log \alpha_{\text{H}_2\text{L}} = 0$ :

$$\text{p}K_{a2} - \text{p}K_{a1} = \text{p}k_{2,\text{L}} - \text{p}k_{1,\text{L}} - 2\log \alpha_{\text{HL}^-} + \log \alpha_{\text{L}^{2-}} \quad (2.9)$$

$$\text{p}K_{a2} - \text{p}K_{a1} = \text{p}k_{2,\text{COOH}} - \text{p}k_{1,\text{OH}} - 2\log \alpha_{\text{HX}^-} + \log \alpha_{\text{X}^{2-}} + \log \alpha_{\text{H}_2\text{Q}} \quad (2.10)$$

Якщо використовувати перше рівняння, то:

$$\text{p}K_{a2} - \text{p}K_{a1} = \text{p}k_{2,\text{L}} - \text{p}k_{1,\text{L}} + 1,65 \quad (2.11)$$

Оскільки різниця  $\text{p}k_{2,\text{L}} - \text{p}k_{1,\text{L}}$  навіть за відсутності впливу заряду на іоні  $\text{HL}^-$  на дисоціацію другої кислотної групи (хоча такий вплив безумовно є) складає 0.30 зі статистичних міркувань, можна зрозуміти, що різниця  $\text{p}K_{a2} - \text{p}K_{a1}$  становить 4.3.

Якщо використовується рівняння (2.10), то можна записати:

$$4.3 = \text{p}k_{2,\text{COOH}} - \text{p}k_{1,\text{OH}} - 1.8 + \log \alpha_{\text{H}_2\text{Q}} \quad (2.12)$$

Оскільки частка таутомеру  $\text{H}_2\text{Q}$  настільки мала, що її не вдається зафіксувати спектрофотометричним методом, можна вважати, що  $\log \alpha_{\text{H}_2\text{Q}} < -$

3. Таким чином,  $pK_{2,COOH} - pK_{1,OH} > 9$ . Оскільки замісники в ксантеновому фрагменту молекули не впливають суттєво на дисоціацію карбоксильної групи,  $pK_{2,COOH}$  можна прийняти близьким до 10 [18]. Це призводить до оцінки  $pK_{1,OH} \approx 1$ . Якщо  $\log \alpha_{H_2O}$  ще нижче, ніж  $-3$ , то  $pK_{1,OH}$  може бути близько до нуля.

В цілому, одержані кількісні параметри дозволяють одержати адекватну картину кислотно-основної та таутомерної рівноваг 2,7-дінітро-4,5-дібромфлуоресцеїну в ДМСО.

## 2.5 Охорона праці

При проведенні експериментальної роботи необхідно знати, з якими речовинами працюєш, а також техніку безпеки з ними.

1. Усі досліди з токсичними і неприємним запахом речовини проводити у витяжній шафі.
2. При необхідності визначення запаху газу або рідини обережно вдихати повітря, злегка направляючи рукою випарування від сосуда до себе.
3. При розбавленні міцних кислот вливати кислоту в воду, а не навпаки.
4. При наливанні реактивів ніколи не нахилитися над сосудом, щоб запобігти попаданню бризгів на лице та одяг.
5. Не нахилитися над сосудом з рідиною, що нагрівається, оскільки може відбутися викид вмісту в колбі.
6. Якщо на лице чи на руки попадуть розчини кислот чи лугу, то вражену область необхідно негайно промити великою кількістю води, потім протерти слабким розчином соди для нейтралізації кислоти, або слабким розчином уксусної кислоти для нейтралізації лугу.

7. У випадку опіку вражене місце змочити міцним розчином марганцевого калію.
8. Перед включенням електричних приборів слід перевірити їх заземління.
9. При отравленні і сильних опіків слід негайно звернутися до лікаря.
10. При роботі зі скляними приборами слід пам'ятати про хрупкість скла, не допускати биття посуду, що може призвести до травм.
11. Усі досліді з легко займистими летучими рідинами проводити подальше від нагрівальних приборів та у витяжній шафі.
12. При виході з лабораторії перевірити: чи закриті крани водопровідної води, чи виключені нагрівальні електричні прибори.

## ВИСНОВКИ

1. Розглянуто протолітичні рівноваги та структуру нітропохідних флуоресцеїну у розчинах. Узагальнено уявлення щодо кислотної дисоціації та придатності загальної схеми таутомерних рівноваг.
2. Досліджено процеси дисоціації та таутомерії в розчинах 2,7-динітро-4,5-дибромфлуоресцеїну в ДМСО. Визначено константи дисоціації цього барвника та спектри іонних форм.
3. Аналіз характеру спектрів поглинання дозволяє стверджувати, що діаніонна форма існує на 99% у вигляді лактонної структури і лише на 1% як глибоко забарвлений хіноід. Це не є типовим для флуоресцеїну та його галогенпохідних, але характерно для тетра- і пентанітрофлуоресцеїнів. Для моноаніону це співвідношення складає 15 : 85. Нейтральна форма цілком представлена безбарвним лактоном.
4. Кількісна оцінка таутомерного складу дозволяє інтерпретувати співвідношення між першою та другою константами дисоціації 2,7-динітро-4,5-дибромфлуоресцеїну в ДМСО.



## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Breeuwer, P.; Drocourt, J. L.; Bunschoten, N.; Zwietering, M. H.; Rombouts, F. M.; Abee, T. Characterization of Uptake and Hydrolysis of Fluorescein Diacetate and Carboxyfluorescein Diacetate by Intracellular Esterases in *Saccharomyces Cerevisiae*, Which Result in Accumulation of Fluorescent Product. *Appl. Environ. Microbiol.* **1995**, 61 (4), 1614–1619.
2. Rotman, B.; Papermaster, B. W. Membrane Properties of Living Mammalian Cells as Studied by Enzymatic Hydrolysis of Fluorogenic Esters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1966**, 55 (1), 134–141.
3. Borkovic M., Koper G. J. M. A cluster expansion method for the complete resolution of microscopic ionization equilibria from NMR titration. *Anal. Chem.* **2000**, 72, 3272–3279.
4. Garces J. L., Koper G. J. M., Borcovec M. Ionization equilibria and conformational transitions in polyprotic molecules and polyelectrolytes. *J. Phys. Chem. B* **2006**, 110, 10937–10950.
5. Watson M. A., Yu H.S., A. D. Bochevarov A. D. Generation of tautomers using micro- $pK_a$ 's. *J. Chem. Inf. Model. Pattern-free generation and quantum mechanical scoring of ring-chain tautomers. J. Comput.* **2019**, 59, 2672–2689.
6. Levine D. S., Watson M. A., Jacobson L.D., Dickerson C. E., Yu H.S., Bochevarov A. D. Pattern-free generation and quantum mechanical scoring of ring-chain tautomers. *J. Comput. - Aided Mol. Design.* **2021**, 35, 417-431.
7. Hamad A. A. Utility of Cilefa Pink B, a food dye in a facile decoration of the first green molecular-size-based fluorescence probe (MSBFP) for determining trimebutine; application to bulk, dosage forms, and real plasma. *Spectrochim. Acta Part A.* **2023**, 288122187.

8. Liu Y., Li B., Zhang H., Detection of Microcystin-LR in the Cells and Natural Lake Water Samples by A Unique Fluorescence-Based Method. *J. Fluorescence*. **2022** , 32, 505–519.
9. Burirov V. A., Artemenko A. A., Garipova R. I., Amirova R. R., Fatykhova A. M., Borisova J. A., Mironova D. A., Sultanova E. D., Evtugyn V. G., Solovieva S. E., Antipin I. S. New Calixarene—Fluoresceine Conjugate by Click Approach—Synthesis and Preparation of Photocatalytically Active Solid Lipid Nanoparticles. *Molecules*. **2022**, 272436, 1–12;
10. Jarzębski M., Peplińska B., Florczak P., Gapiński J., Flak D., Mała P., Ramanavicius A., Baryła-Pankiewicz E., Kobus- Cisowska J., Sz wajca A. Fluorescein ether-ester dyes for labeling of fluorinated methacrylate nanoparticles. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. **2019**, 382111956.
11. Zdonczyk M., Potaniec B., Skorenski M., Cybinska J. Development of efficient one-pot methods for the synthesis of luminescent dyes and sol–gel hybrid materials, *Materials* . **2022**, 15203.
12. Răducă M., Mădălan A. M. Cocrystals versus Salts of Fluorescein. *Crystals*. **2021**, 1217, 1–16.
13. De Freitas C. F., Vanzin D., Braga T. L., Pellosi D. S., Batistella V. R., Caetano W., Hioka N., Multivariate analysis of protolytic and tautomeric equilibria of Erythrosine B and its ester derivatives in ionic and non-ionic micelles, *J. Mol. Liquids*. **2020**, 313, 113320.
14. Slyusarenko N., Gerasimova M., Atamanova M., Plotnikov A., Slyusarea E. Adsorption of eosin Y on polyelectrolyte complexes based on chitosan and arabinogalactan sulfate. *Colloids and Surfaces A*. **2021**, 610, 125731.
15. Mchedlov-Petrosyan N. O., Cheipesh T. A., Vodolazkaya N. A. Acid-base dissociation and tautomerism of two aminofluorescein dyes in solution. *J. Mol. Liquids* **2017**, 225, 696–705.

16. Mchedlov-Petrosyan N. O., Vodolazkaya N. A. Protolytic Equilibria in Organized Solutions: Ionization and Tautomerism of Fluorescein Dyes and Related Indicators in Cetyltrimethylammonium Chloride Micellar Solutions at High Ionic Strength of the Bulk Phase, *Liquids*. **2021** 1, 1–24.
17. Mchedlov-Petrosyan N.O., Shekhovtsov S.V., Moskaeva E.G., Omelchenko I.V., Roshal A. D., Doroshenko A.O. New fluorescein dyes with unusual properties: Tetra- and pentanitrofluoresceins. *J. Mol. Liquids*. **2022**, 367, 120541.
18. Mchedlov-Petrosyan N. O., Cheipesh T. A., Moskaeva E. G., Shekhovtsov S. V., Ostrovskiy K. I. Towards understanding of stepwise acid-base dissociation in systems inclined to tautomerism: Nitro derivatives of fluorescein in dimethyl sulfoxide. *J. Mol. Liquids*. **2023**, 122540.
19. Samoilov D.V., Mchedlov-Petrosyan N.O., Martynova V.P., El'tsov A.V. Protolytic equilibria of fluorescein nitro derivatives, *Russ. J. Gen. Chem.* **2000**, 70, 1259–1271.
20. Vodolazkaya N.A., Gurina Y.A., Salamanova N.V., Mchedlov-Petrosyan N.O. Spectroscopic study of acid-base ionization and tautomerism of fluorescein dyes in direct microemulsions at high bulk ionic strength. *J. Mol. Liquids*. **2009**, 145, 188–196.
21. Кнунянц І. Л. Флуоресцеїн: стаття // Хімічний енциклопедичний словник Гол. ред. - М.: Радянська енциклопедія, **1983**. С. 624. – 792 с.
22. Bates R. G., Determination of pH (Russian translation). Leningrad: Khimiya; **1972**, p. 400.
23. Alia J. M., Edwards H. G. M., Kiernan B. M. Raman spectroscopy of benzenesulfonic and 4-toluenesulfonic acids dissolved in dimethylsulfoxide, *Spectrochim. Acta A* **2004**, 60,1533–1542.

24. Kolthoff I. M., Chantooni M. K., Bhowmik S. Dissociation Constants of Uncharged and Monovalent Cation Acids in Dimethyl Sulfoxide, *J. Amer. Chem. Soc.* 90 (1968) 23–28.
25. Kolthoff I. M. Acid-Base Equilibria in Dipolar Aprotic Solvents. *Anal. Chem.* 46 (1974) 1992–2003.
26. Kolthoff I. M., Chantooni M. K. Calibration of the Glass Electrode in Acetonitrile. Shape of Potentiometric Titration Curves. Dissociation Constant of Picric Acid. *J. Amer. Chem. Soc.* 87 (1965) 44218–4436.