



Молекулни устройства, задвижвани
от светлина, за бърз мониторинг на
околната среда

Станислава Борисова Йорданова

Дисертацията съдържа 112 страници, в които са включени 25 фигури, 34 реакционни схеми, 6 таблици и 165 цитирани литературни източника.

Дисертационният труд е обсъден и е насочен за защита от Катедрен съвет на Катедра „Органична химия“ във Факултет по химия и фармация на Софийски университет „Св. Климент Охридски“, състоял се на 28.03.2014 г.

Дисертантката е редовен докторант към Катедра „Органична химия“ на Факултет по Химия и фармация на Софийски университет „Св. Климент Охридски“.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на 17.06.2014 г. от 11.30 ч. в зала 202 на ФХФ, СУ “Св. Климент Охридски”. Материалите по защитата са на разположение на интересуващите се в канцеларията на ФХФ, СУ “Св. Климент Охридски”.

Съдържание

СЪДЪРЖАНИЕ	3
1. УВОД	4
2. ЦЕЛ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....	6
3. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ	7
3.1. Изследвани съединения.....	7
3.1.1 Синтез на флуоресцентни мономери	7
3.1.2 Модификация на ПАМАМ дендримери от първа генерация с нафталимидни производни.....	8
3.2. ИЧ и ЯМР спектроскопски характеристики на новосинтезираните съединения ...	12
3.3. Абсорбционни и емисионни свойства	13
3.3.1. Фотофизични характеристики на нискомолекулните нафталимидни производни	13
3.3.2. Фотофизични характеристики на модифицираните ПАМАМ дендримери	17
3.3.3. Влияние на заместителя	20
3.3.4. Влияние на разтворителя	22
3.4. Сензорна активност на изследваните съединения	25
3.4.1. Спектрални свойства в присъствие на целевите метални йони	25
3.4.2. Сензорни приложения при дендримерните макромолекули	29
3.4.3. Влияние на рН на средата при мономери.....	38
3.4.4. Влияние на рН на средата при дендримери	39
3.4.5. Комплексно влияние на протони и медни йони върху флуоресцентните свойства на дендримерите.....	42
3.5. Антибактериална активност на изследваните съединения	44
4. ИЗВОДИ	47
5. ЛИТЕРАТУРА	49

1. УВОД

Съединенията, проявяващи луминесцентни свойства са обект на усилено изследване, поради големия им потенциал в областта на високо-технологичните приложения. През последните десетилетия са синтезирани голям брой ниско- и високомолекулни луминесцентни молекули и са изследвани техните спектрални свойства, с оглед на приложението им като оптични сензори. Понастоящем продължава да се работи в това направление, с цел синтезиране на нови представители с подобрени характеристики. Флуоресцентните съединения се използват при химичния анализ на различни вещества – биологични субстрати, катиони, аниони, пестициди, хранителни продукти, органични молекули, за мониторинг на замърсяването на почвата, водата и въздуха. Флуоресценцията е един от най-чувствителните аналитични методи и позволява откриването на изключително ниски концентрации на анализа (от порядъка на 1×10^{-6} M). Научната работа в тази област е свързана с разработване на високоефективни и селективни сензори, които да могат да се използват в полеви условия, без нужда от квалифициран персонал за обработване на изследвания материал и резултатите от анализа. Важно условие е да има повторемост на резултатите и сензорите да могат да бъдат използвани многократно.

През последните години се разработват и изследват нов тип силно разклонени, триизмерни макромолекули (дендримери) със сравнително тясно молекулно масово разпределение. Структурата на тези молекули е предпоставка за целенасочена модификация на физичните и химичните им свойства. Изборът на 1,8-нафталимидите като флуорофори за модифициране на дендримерите се базира на натрупания опит в изследването на мономерни нискомолекулни флуорофори. Тяхната хромофорна система лесно може да се модифицира с цел получаване на съединения с предварително зададени спектрални свойства, при което флуоресцентният отговор, базиращ се на енергиен или фотоиндуциран електронен трансфер може да се използва за откриване на замърсители от метални йони или протони в околната среда. Разработени са луминесцентни дендримери, съдържащи хромофорни фрагменти в конкретни предопределени позиции на макромолекулата. Те намират приложение в катализа, в химичния анализ, светлоулавящи системи, наподобяващи биологичния фотосинтетичен апарат на растенията, изследва се

потенциалът им в генното инженерство, във фармацията – за транспортиране на лекарствени форми, за изработване на светлоизлъчващи диоди и др.

Развитието на технологиите налага търсенето и синтеза на нови флуоресцентни съединения. От друга страна, реализирането на потенциала им изисква да се изследва влиянието на структурата на молекулите върху фотофизичните им свойства, както и въздействието на конкретната среда върху тези параметри.

2. Цел на дисертационния труд

Целта на дисертационната работа е да се синтезират нови флуоресцентни РАМАМ дендримери, съдържащи 1,8-нафталимидни хромофори с различни заместители при четвъртия въглероден атом на нафталимидното ядро, както и техните мономерни аналози. Изследването на фотофизичните им характеристики с оглед получаване на високоефективни и селективни флуоресцентни сензори за биологично-важни метални йони и протони.

За постигане на тези цели бяха поставени следните задачи:

1. Синтез на:
 - а) 1,8-нафталимидни производни с различни заместители при С4 на нафталимидното ядро;
 - б) модифицирани дендримери от първо поколение с различни хромофори по периферията, аналози на нискомолекулните съединения;
2. Изследване и охарактеризиране на новосинтезираните съединения (ИЧ, ЯМР, ТСХ, електронно-абсорбционна спектроскопия, елементарен анализ, МАЛДИ-ТОФ (за дендримерните молекули).
3. Фотофизично изследване на флуоресцентните мономерни и дендримерни:
 - а) при промяна на заместителя в 4-та позиция;
 - б) при промяна на полярността на средата;
 - в) при промяна концентрацията на средата;
 - г) в присъствие на различни катиони на тежки и преходни метали.
4. Изследване антибактериалната активност на някои представители спрямо 9 различни щама бактерии.

3. Резултати и обсъждане

3.1. Изследвани съединения

3.1.1 Синтез на флуоресцентни мономери

Във връзка с целта на дисертационната работа бяха синтезирани нови нафталиמידни производни, съдържащи електрон-донорен заместител при четвъртия въглероден атом на нафталиמידното ядро (различни amino групи).

Синтезът на целевите продукти протича на два етапа: през първият етап се извършва кондензация на 4-нитро-1,8-нафталов анхидрид с N-(2-аминоетил)-ацетанилид, при което става образуване на имидната структура.

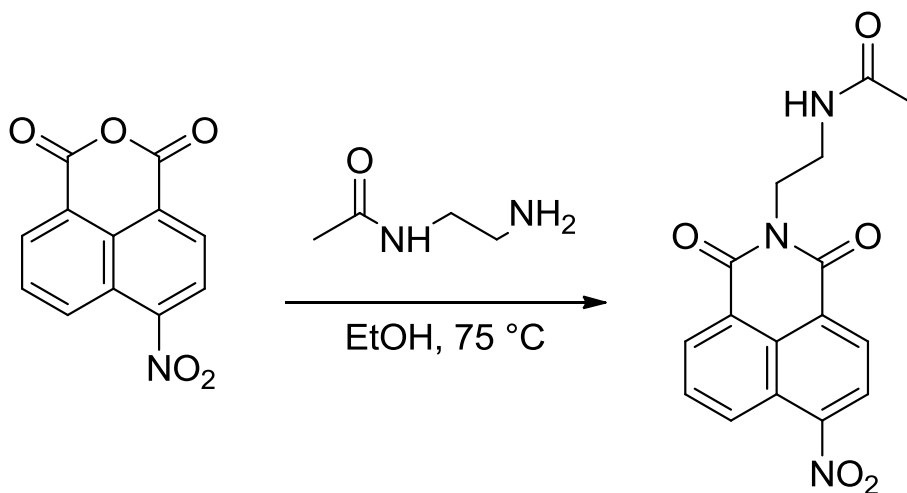


Схема 1. Синтез на M0

Вторият етап – нуклеофилно заместване на нитро групата с електрон-донорна група (A), което се благоприятства от електроно-акцепторните карбонилни групи от имидната структура.

Синтезът на 4-амино заместените N-(2-аминоетил)-ацетанилид-1,8-нафталимиди се извършва в среда от апротен разтворител диметилформамид (ДМФ) при стайна температура, като реакцията протича за 48 часа.

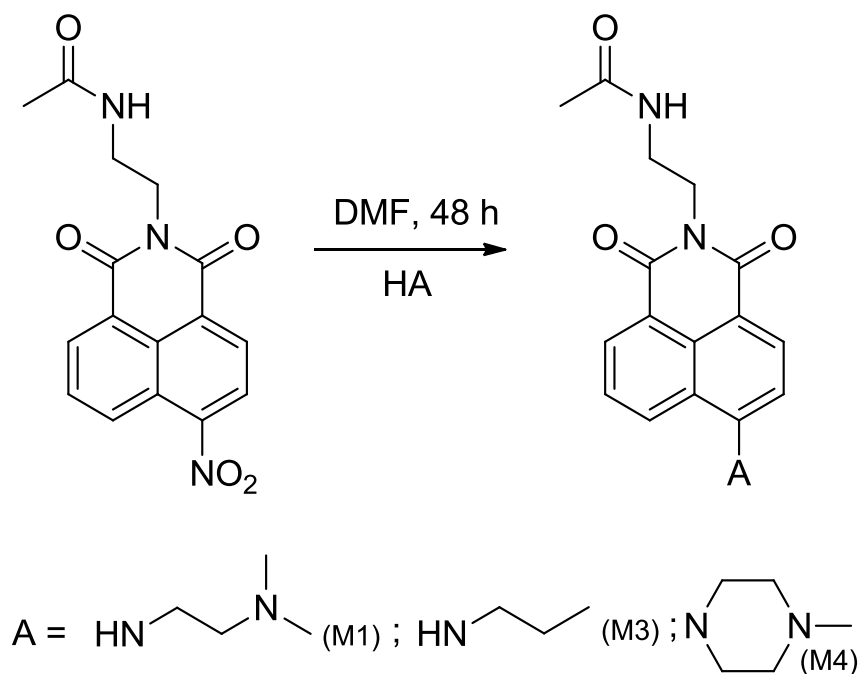


Схема. 2 Синтез на съединения M1, M3 и M4

3.1.2. Модификация на ПАМАМ дендримери от първа генерация с нафталиמידни производни

Изследваните съединения представляват ПАМАМ дендримери от първо поколение, съдържащи различни функционални групи в периферията си.

Таблица 1. Заместители в 4-та позиция на нафталимината структура

Съединение	Д0	Д1	Д2	Д3	Д4
A =	NO_2	$\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N(CH}_3\text{)}$	$\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N(CH}_2\text{)}_2\text{O}$	$\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$	$\text{HN(CH}_2\text{)}_6$

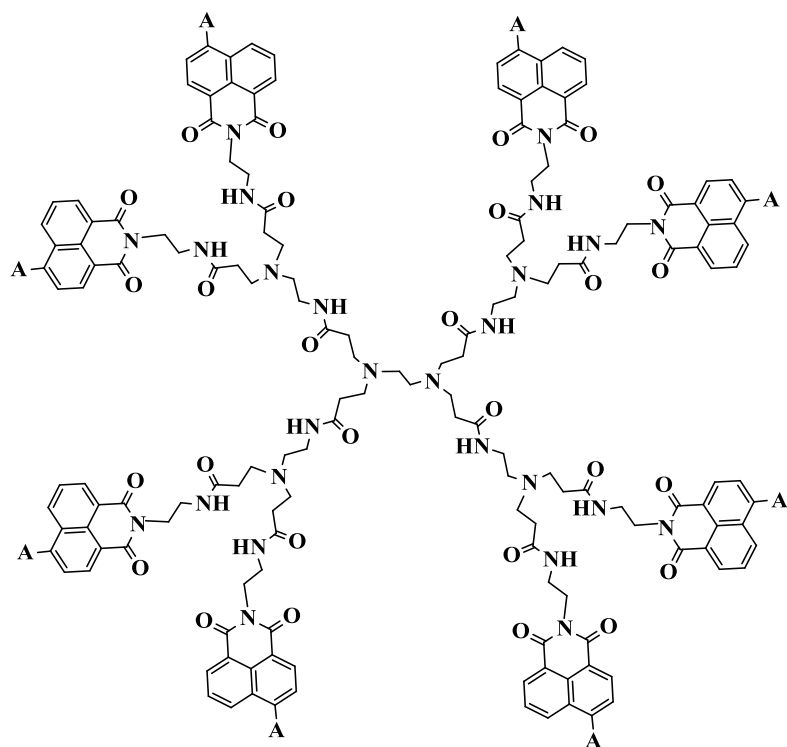


Схема 3. Принцилна схема на ПАМAM 8 дендример

1.2.4. Получаване на ПАМАМ модифициран с нитронафталимид и последващо заместване на нитро групата с различни амино групи

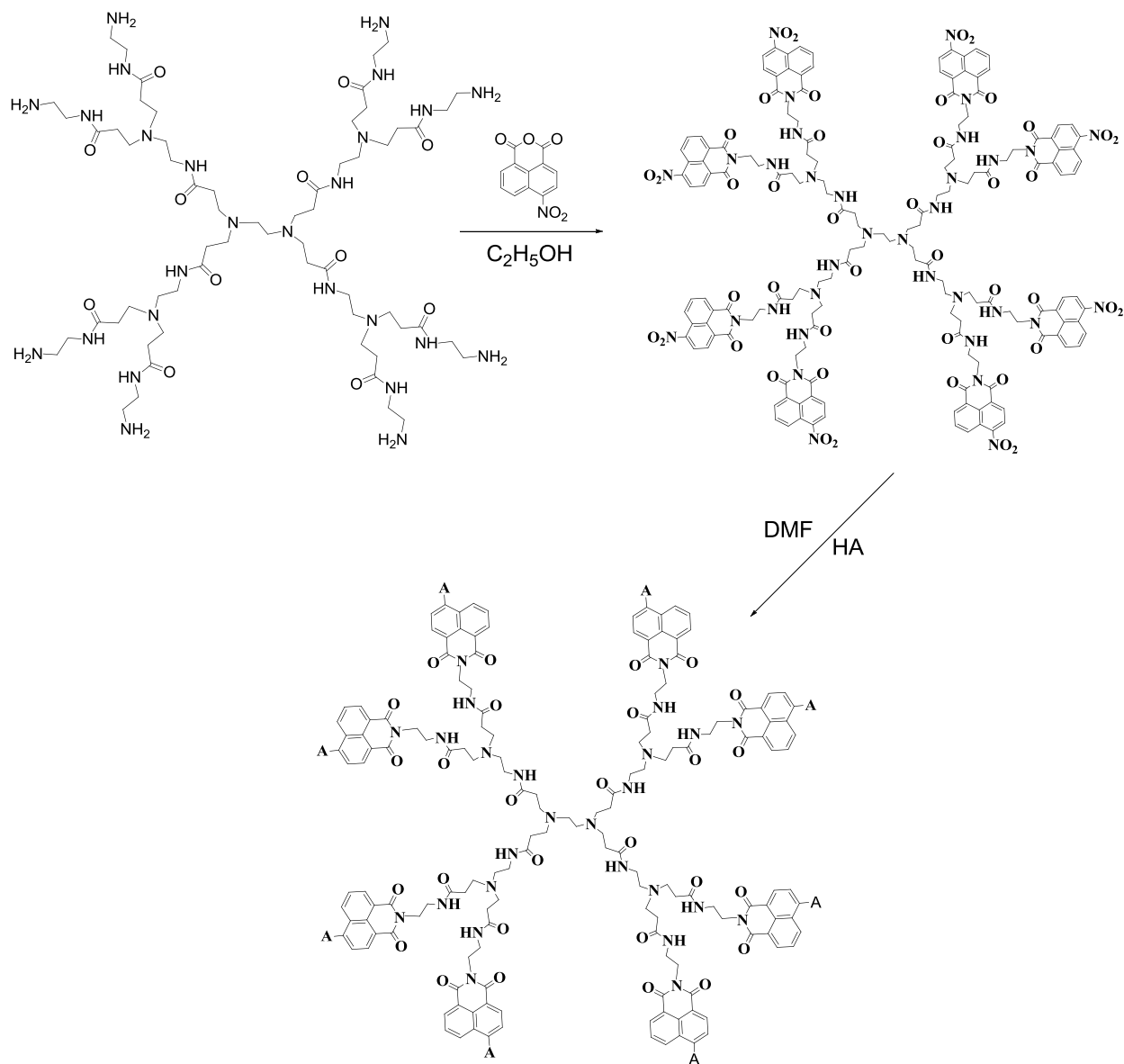


Схема 4. Реакционна схема за получаване на ПАМАМ дендример, модифициран в периферията с 4-амино-1,8-нафталимид

В настоящата дисертационна работа са описани синтезът и фотофизичните характеристики на нови ПАМАМ дендримери от първа генерация, съдържащи 8 4-амино-1,8-нафталимидни единици в периферията си. Синтезът на съединенията се състои от два основни етапа: през първият етап се извършва кондензация на ПАМАМ с 4-нитро-1,8-

нафталов анхидрид. Реакцията протича при слаб излишък от анхидрида в разтвор на метанол, с цел да се осигури пълно заместване в дендримера. Модифицирания дендример се утаява във вода. За отстраняване на нереагиралият анхидрид утайката се обработва с 5 %-тен разтвор на NaOH.

През втория етап се извършва нуклеофилно заместване на нитро групата от нафталимидния фрагмент с електрон-донорни заместители (различни amino групи, представени в Таблица 1). Заместването се благоприятства от електрон-акцепторните карбонилни групи в имидната структура. Реакцията протича в апротен разтворител (ДМФ) при стайна температура за 48 часа на тъмно. Модифицираните дендримери са изолирани чрез утаяване във вода.

Химичната структура на мономерите, както и на модифицираните дендримери е охарактеризирана и доказана чрез ИЧ-, ЯМР-, МАЛДИ ТОФ- и електронно-абсорбционна спектроскопия. Резултатите от проведените анализи са представени в раздел 4.2.

3.2. ИЧ и ЯМР спектроскопски характеристики на новосинтезираните съединения

Синтезираните нискомолекулни нафталимидни производни, както и модифицираните по периферията с нафталимиди дендримери са охарактеризирани с ИЧ спектроскопия и е доказано наличието на функционални групи по техните характеристични ивици.

Химичната структура на синтезираните съединения е доказана с протонен и въглероден ядрено-магнитен резонанс. Протоните на нафталимидното ядро се откриват както в спектрите на нискомолекулните производни, така и в тези на модифицираните ПАМАМ дендримери. При нискомолекулните нафталимидни производни те се регистрират в областта 7.00-8.90 ppm. При дендримерите сигналът на същите протони е отместен към по-силно поле и е в границите 6.60-8.50 ppm.

При нискомолекулните нафталимиди валентните трептения на карбонилните групи се намират в по-високо честотната област. Спектрите на съединения **M0**, **M1**, **M3** и **M4** се различават по ивиците, получени от функционалните групи на заместителите в четвърта позиция на нафталимидната структура. Характерна ивица за всички съединения е тази, съответстваща на връзката C-N, получена при свързването на заместителя с нафталимида. Тя се наблюдава в интервала от 1360 cm^{-1} до 1230 cm^{-1} . Функционалните групи, налични в заместителите на съединения **M1** и **M4** съвпадат по вид, съответно по честота в ИЧ-спектъра с тези от нафталимидната структура. Метиленовите групи от заместителя при съединение **M3** се откриват при $\nu = 2931\text{ cm}^{-1}$. Специфичните честоти на трептене, характерни за нафталимидната структура се откриват в ИЧ – спектрите на всички синтезирани съединения: $\nu_{\text{C-H(Ar)}}$ в интервала $3000\text{-}3100\text{ cm}^{-1}$; $\nu_{\text{C-C(Ar)}}$ = 1616 cm^{-1} ; 1590 cm^{-1} ; 1450 cm^{-1} ; $\nu_{\text{C=O}}$ в интервала от 1633 до 1680 cm^{-1} . Ивицата за карбонилна група е нискочестотно отместена поради спрежението ѝ с ароматното ядро на нафталимидната структура. Трептенето на връзките C-H от нафталимидното ядро са в областта $3000\text{-}3100\text{ cm}^{-1}$. При $1420\text{-}1585\text{ cm}^{-1}$ се регистрират абсорбционните ивици на валентните трептения на връзките C-C в нафталимидното ядро. Карбонилните групи от имидната структура се регистрират в ИЧ област с две характеристични ивици поради взаимодействието на трептенията на C=O групите. Двете ивици отговарят на симетричните и асиметричните валентни трептения на карбонилните групи, като по-високочестотната съответства на

симетричните валентни трептения и се регистрират в областта около 1700 cm^{-1} . Абсорбционната ивица за валентните асиметрични трептения е отместена към по-нискочестотната област и е около 1650 cm^{-1} . Видът на заместителите в 4-та позиция на нафталеновото ядро оказва влияние на честотата на валентните трептения на карбонилните групи.

Общи за всички съединения са и характеристичните честоти на трептене за групите от дендримерната част на молекулата. Характерно за ПАМАМ дендримерите е наличието на амидни групи в разклоненията. Те имат две характеристични ивици: $\nu_{\text{C=O}} = 1635\text{ cm}^{-1}$ и $\delta_{\text{N-H}} = 1546\text{ cm}^{-1}$. И тук се наблюдава нискочестотно отместване на ивиците вследствие от модифицирането на дендримера с нафталимиди. Ивиците за метиловите групи от дендримера се откриват при $\nu^{\text{as}} = 2916\text{ cm}^{-1}$ и при $\nu^{\text{s}} = 2840\text{ cm}^{-1}$. Разликите в спектрите на съединения **Д1**, **Д2**, **Д3** и **Д4** са в ивиците, получени от функционалните групи на заместителите в четвърта позиция на нафталиמידната структура. Характерна ивица за всички съединения отново е тази, съответстваща на връзката C-N, получена при свързването на заместителя с нафталимида. Тя се наблюдава в интервала от 1360 cm^{-1} до 1250 cm^{-1} . Функционалните групи, налични в заместителите на съединения **Д1** и **Д4** съвпадат по вид, съответно по честота в ИЧ-спектъра с тези от нафталиמידната структура и от дендримерното ядро. Морфолиновият пръстен при съединение **Д2** се открива при характерната за цикличен етер ивица $\nu_{\text{C-O-C}}^{\text{as}} = 1246\text{ cm}^{-1}$. Метиленовите групи от заместителя при съединение **Д3** се откриват при $\nu = 2918\text{ cm}^{-1}$. Електрон-донорните заместители отместват валентните трептения на карбонилните групи към по-ниските честоти, както е при модифицираните ПАМАМ дендримери.

3.3. Абсорбционни и емисионни свойства

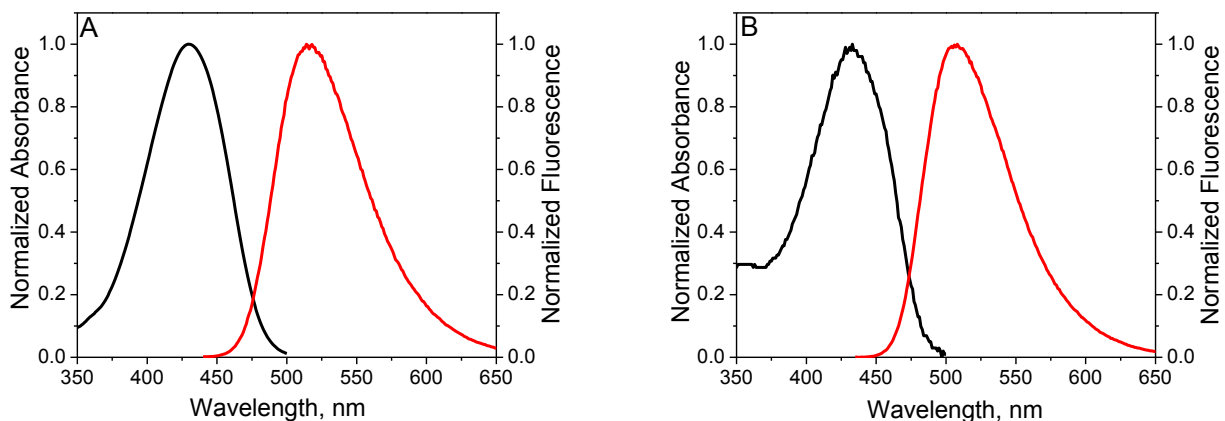
3.3.1. Фотофизични характеристики на нискомолекулните нафталиמידни производни

Към изследвания клас съединения с нафталиמידна структура има повишен интерес, който се определя от няколко фактора:

1. особеният електронен строеж, който се изразява в присъствието на две подсистеми: нафталенова и имидна;

- интерес от спектрална гледна точка предизвиква 4-та позиция на нафталеновото ядро. Това се дължи на π -електронния строеж на 1,8-нафталимидната молекула;
- влиятието на пространствени фактори. Изключителен интерес представляваше изследване на влиянието на различни по природа заместители върху спектралното поведение.

Фотофизичните свойства на 4-заместените-1,8-нафталимиди зависят главно от поляризацията на молекулата. При облъчване с ултравиолетова светлина тя се поляризира в резултат на донорно-акцепторно взаимодействие между заместителя в 4-та позиция на нафталимидното ядро и карбонилните групи от имидната структура. Нафталимидните производни, съдържащи алкиламинови заместители при четвъртия въглероден атом излъчват зелена или жълто-зелена флуоресценция. В Таблица 2 са обобщени фотофизичните характеристики на всяко от изследваните съединения в 9 разтворителя, подредени по намаляване на диелектричната им константа (абсорбционен (λ_{abs}) и емисионен (λ_{flu}) максимум, Стоксово отместване ($\Delta\nu_{\text{St}}$), моларна абсорбируемост (ϵ), квантов добив (Φ_{F}). Регистрираните абсорбционни ивици са в областта от 350 до 550 nm на електромагнитния спектър и между 430 и 650 nm съответно за емисионните. Най-общо максимумите на флуоресценция в отделните разтворители са разположени както следва: в региона 505-523 nm за **M1**, 502-534 nm за **M3** и 499-527 nm за **M4**. Емисионните спектри на изследваните мономерни се отличават с широка, безструктурна ивица и голямо Стоксово отместване. Изходните разтвори на изследваните съединения са в разтворител ацетонитрил с концентрация $1 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$. За определяне на фотофизичните характеристики в съответните разтворители са използвани проби с концентрация $1 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$. На Фигура 1 *A* и *B* съответно са показани представителни електронно-абсорбционни спектри на две от новосинтезираните съединения в хлороформ. Вижда се, че флуоресцентният спектър на нафталимидните производни е огледално симетричен на абсорбционния, което означава, че молекулата на мономерите не търпи структурни промени във възбудено състояние.



Фигура 1. Нормализиран абсорбционен и емисионен спектър съответно на съединение М3 (А) и на М4 (В) в хлороформ

При абсорбция на светлина с дължина на вълната в УВ област в нафталимидната молекула се извършва електронен преход от основно (S_0) в първо възбудено (S_1) синглетно състояние ($\pi \rightarrow \pi^*$). Наличието на електрон-акцепторна група и електрон-донорен заместител, свързани чрез система от спрегнати връзки (система от типа донор- π -акцептор) обуславя характера на прехода от основно във възбудено състояние, а именно – преход с пренос на заряд (СТ-преход).¹ Това променя вида на прехода в $S_0 \rightarrow \text{CT}$, реализиращ се чрез вътрешно-молекулен пренос на заряд (Intramolecular Charge Transfer), засягащ електронната двойка при донора и карбонилните групи от имидната структура. Доказателство за природата на СТ-ивицата е, че тя е интензивна, широка и безструктурна, като позицията на максимума силно зависи от полярността на средата. Друга индикация за наличието на такъв тип преход са високите стойности на моларната абсорбируемост $\epsilon \geq 10000 \text{ mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Това е параметър, характеризиращ абсорбцията на веществата при определена дължина на вълната и е пропорционален на промяната на електронния диполен момент на молекулата в резултат на нейното облъчване. Както се вижда от приложената таблица моларната абсорбируемост на съединение **M1** е значително по-висока от тази на останалите мономерни аналози. Тази характеристика се свързва с промяната на диполният момент на молекулата, ето защо можем да направим заключение,

че молекулата на това съединение е по-силно поляризирана във възбудено състояние в сравнение с останалите мономери.

Таблица 2. Фотофизични характеристики на мономерните нафталимидни производни

	DMSO	DMF	MeCN	MeOH	EtOH	CH ₂ Cl ₂	Dioxane	EtOAc	CHCl ₃
M1									
λ_{abs} (nm)	429	438	432	436	436	434	426	426	433
λ_{flu} (nm)	516	523	509	520	522	509	508	510	505
$\Delta\nu_{St}$ (cm ⁻¹)	3930	3711	3502	3705	3779	3395	3789	3866	3293
$\epsilon \cdot 10^3$ (l mol ⁻¹ cm ⁻¹)	14.3	14.1	14.7	17.0	15.0	17.0	12.7	14.0	15.9
Φ_F	0.008	0.005	0.006	0.010	0.009	0.185	0.141	0.116	0.27
M3									
λ_{abs} (nm)	444	440	434	442	444	432	427	431	433
λ_{flu} (nm)	529	523	521	534	528	508	502	510	502
$\Delta\nu_{St}$ (cm ⁻¹)	3619	3607	3848	3898	3583	3463	3499	3594	3371
$\epsilon \cdot 10^3$ (l mol ⁻¹ cm ⁻¹)	7.5	9.5	9.8	11.3	9.7	11.2	9.2	9.5	10.0
Φ_F	0.59	0.424	0.401	0.259	0.334	0.533	0.551	0.467	0.552
M4									
λ_{abs} (nm)	406	403	399	396	397	406	395	394	402
λ_{flu} (nm)	520	527	525	518	520	514	506	509	499
$\Delta\nu_{St}$ (cm ⁻¹)	5400	5839	6015	5948	5958	5175	5554	5734	4836
$\epsilon \cdot 10^3$ (l mol ⁻¹ cm ⁻¹)	7.1	9.0	10.6	10.9	10.4	11.2	11.2	10.1	10.5
Φ_F	0.007	0.003	0.002	0.008	0.007	0.01	0.054	0.031	0.064

При изследване промяната на моларната абсорбируемост в разтворители с различна полярност бе установено нарастване на стойността на този параметър с намаляване на полярността на средата. Известно е, че хетероциклените π -системи се характеризират с различен диполен момент в основно и възбудено състояние на молекулата, поради извършването на вътрешномолекулен пренос на заряд при абсорбция на

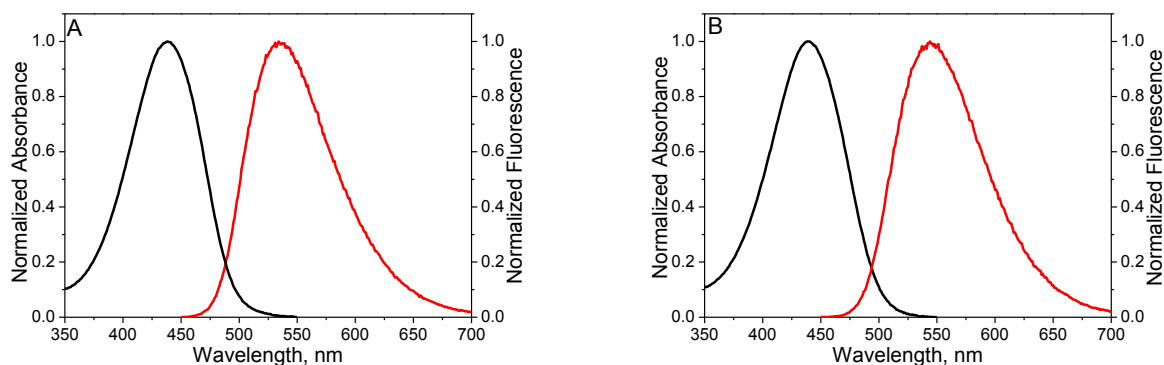
високоенергетична светлина. От получените резултати можем да направим извода, че процесът протича по-ефективно в по-слабо полярни среди. Това най-вероятно се дължи на по-слабите взаимодействия между молекулите на разтворителя и разтвореното вещество в основно състояние.

Количествена характеристика за способността на веществата да излъчват абсорбираната светлинна енергия е флуоресцентния квантов добив. Квантовия добив на изследваните съединения е изчислен на базата на стандарт Кумарин 6 ($Q_F = 0.78$)². В полярни разтворители стойността на този параметър е под 10 %, което е очаквано за съединения, способни да извършват процеса на фотоиндуциран електронен трансфер. Изключение прави квантовият добив на **МЗ**, което играе ролята на референтно съединение. При него стойността на квантовия добив е по-висока, поради отсъствието на третичен азотен атом и съответно реализирането на фотоиндуциран електронен трансфер е блокирано. Този резултат потвърждава очакваните от нас процеси в молекулите на мономерните съединения, а именно възможност за реализиране на процеса ФЕТ. При абсорбция на светлина молекулата преминава от основно във възбудено синглетно състояние, в резултат на преминаването на електрон от НОМО орбиталата на нафталимидния флуорофор на нейната по-високоенергетична LUMO орбитала. Това дава възможност за пренос на електрон от неподделената електронна двойка, заемаща НОМО орбиталата на азота от заместителя към НОМО орбиталата на нафталимидния пръстен. Фотоиндуцираният електронен трансфер възпрепятства емисията при прехода от възбудено в основно състояние и флуоресценцията се гаси. Полярните разтворители благоприятстват процесите на ФЕТ и в тези случаи се наблюдава много слаба емисия.

3.3.2. Фотофизични характеристики на модифицираните ПАМАМ дендримери

Изследвани са също и абсорбционните и емисионни характеристики на новосинтезираните дендримерни молекули. Подобно на мономерните съединения и тук регистрираните абсорбционни ивици са в спектралната област от 350 до 550 nm на електромагнитния спектър и съответно между 450 и 700 nm за емисионните. Най-общо максимумите на флуоресценция са разположени в следните региони: **Д1**: 513-544 nm, **Д2**: 524-550 nm, **Д3**: 511-531 nm и **Д4**: 515-530 nm. Емисионните спектри отново се отличават с широка безструктурна ивица и голямо Стоксово отместване, подобно на мономерите.

Концентрацията на изследваните съединения за определяне на фотофизичните им характеристики в използваните разтворители е 1×10^{-5} mol/l. На Фигура 2 са показани представителни нормализирани абсорбционен и емисионен спектър на съединенията **Д1** в ДМФ (A) и **Д2** в етанол (B).



Фигура 2. Нормализирани абсорбционен и емисионен спектър на Д1 (A) в ДМФ и на Д2 (B) в етанол

Както при мономерните, така и при дендримерните съединения емисионният спектър е огледално симетричен на абсорбционния, което означава, че молекулата на ПАМAM дендример, модифициран с 1,8-нафталимиди не търпи съществени структурни промени във възбудено състояние. В Таблица 3 са обобщени фотофизичните характеристики на всеки от дендримерите в 9 разтворителя отново подредени по намаляване на диелектричната им константа (абсорбционен (λ_{abs}) и емисионен (λ_{flu}) максимум, Стоксово отместване $\Delta\nu_{\text{st}}$ (cm^{-1}), моларна абсорбируемост (ϵ), квантов добив(Φ_{F}).

От представената таблица се вижда, че абсорбционните максимуми на дендримерните молекули са в същия диапазон, както тези на мономерните аналози с аналогични заместители при четвъртия въглероден атом. Моларната абсорбируемост от друга страна има значително по-висока стойност и е около 8 пъти по-висока от тази на съответните мономерни, което съответства на броя на хромофорните фрагменти, съдържащи се в макромолекулите.

Таблица 3. Фотофизични характеристики на дендримерните съединения

	DMSO	DMF	MeCN	MeOH	EtOH	CH ₂ Cl ₂	THF	EtOAc	CHCl ₃
D1									
λ_{abs} (nm)	442	439	440	438	436	433	436	439	436
λ_{flu} (nm)	534	534	536	544	539	527	520	525	525
$\Delta\nu_{\text{St}}$ (cm ⁻¹)	3898	4052	4071	4449	4383	4119	3443	3731	3888
$\epsilon \cdot 10^3$ (l mol ⁻¹ cm ⁻¹)	72.6	70.0	60.3	65.5	65.7	67.7	60.7	60.2	68.2
Φ_{F}	0.021	0.022	0.012	0.015	0.034	0.13	0.028	0.02	0.183
D2									
λ_{abs} (nm)	443	439	441	439	439	435	446	442	435
λ_{flu} (nm)	537	535	540	550	546	524	523	531	524
$\Delta\nu_{\text{St}}$ (cm ⁻¹)	3951	4087	4157	4597	4464	3905	4005	3792	3905
$\epsilon \cdot 10^3$ (l mol ⁻¹ cm ⁻¹)	83.5	74.7	70.3	72.6	71.4	73.8	67.6	69.2	77.6
Φ_{F}	0.028	0.016	0.009	0.019	0.055	0.01	0.057	0.008	0.012
D3									
λ_{abs} (nm)	443	439	441	444	443	437	443	442	437
λ_{flu} (nm)	531	527	524	537	533	520	517	511	522
$\Delta\nu_{\text{St}}$ (cm ⁻¹)	3741	3804	3592	3901	3812	3653	3231	3055	3726
$\epsilon \cdot 10^3$ (l mol ⁻¹ cm ⁻¹)	71.2	69.3	62.8	66.0	63.7	62.4	64.4	62.9	65.6
Φ_{F}	0.065	0.035	0.031	0.075	0.06	0.038	0.061	0.021	0.038
D4									
λ_{abs} (nm)	405	403	404	399	399	405	395	402	404
λ_{flu} (nm)	529	530	526	530	525	517	520	517	515
$\Delta\nu_{\text{St}}$ (cm ⁻¹)	5788	5946	5741	6195	6015	5349	6086	5533	5335
$\epsilon \cdot 10^3$ (l mol ⁻¹ cm ⁻¹)	61.5	63.1	57.4	60.8	58.5	60.2	57.5	62.4	61.2
Φ_{F}	0.007	0.008	0.005	0.008	0.024	0.007	0.025	0.005	0.013

Тази линейна зависимост на моларната абсорбируемост от броя на хромофорните групи е известна като дендримерен ефект и е обичайно явление за дендримерите от по-малка генерация. Тези резултати показват, че дендримерите са монодисперсни, както и, че периферните хромофорни фрагменти не си взаимодействат в основно състояние. Друг важен резултат, който се потвърждава от моларната абсорбируемост е, че всички amino групи от ПАМАМ дендримерите са напълно заместени от 1,8-нафталимидните единици и новосинтезираните дендримери от първо поколение са с висока чистота. Като цяло изследваните съединения не излъчват силна флуоресценция, както в полярни, така и в неполярни разтворители. Този резултат отново се дължи на ФЕТ от крайните amino групи към хромофора. Присъщата слабо интензивна флуоресценция за този тип съединения е желано свойство с оглед на потенциалното им приложение като ФЕТ сензори и доказва, че дизайнът на структурите е постигнал целта си. Квантовият добив на дендримерите също така силно зависи от заместителя при С4, което се дължи на отклонения от планарността на 1,8-нафталимидната структура. Подобни свойства са били наблюдавани и в случаите на ПАМАМ от нулево и второ поколение. Относително ниските стойности на Φ_F в полярни разтворители може да е резултат от възможните конформационни промени в структурата на дендримерите. също така впечатление прави, че квантовият добив на Д4 е дори още по-нисък в сравнение с останалите съединения, което е в съответствие и с ниските стойности на Стоксовото отместване, причинени от *пери-ефекта*.(виж по-надолу)

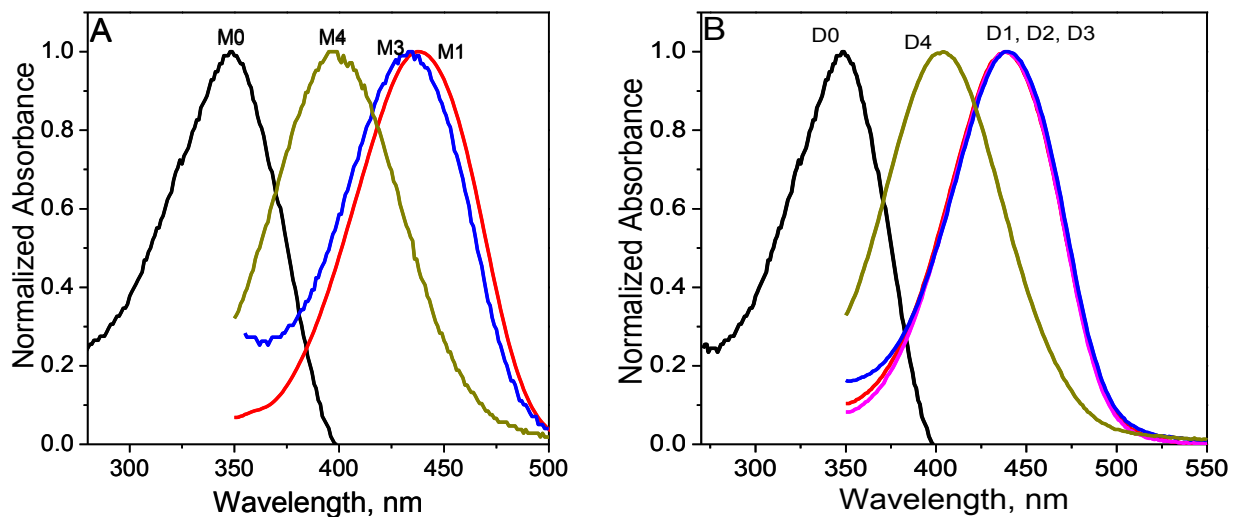
3.3.3. Влияние на заместителя

От приложените таблици за фотофизичните характеристики се вижда, че абсорбцията на мономерните, както и на дендримерните молекули е в областта от 400-450 nm, а излъчваната флуоресценция е в жълто-зелената област с максимум при 510-550 nm. Сравняването между абсорбционните спектри показва строга зависимост на спектралните свойства от поляризацията на молекулата. Абсорбционният максимум при М0 и Д0 е в УВ област при $\lambda = 350$ nm поради електрон-акцепторната природа на нитро групата. Този абсорбционен максимум се дължи на π - π^* преход в хромофорната система. Замяната на нитро групата с различни amino групи води до голямо батохромно отместване на абсорбционните максимуми. Например както се вижда от Фигура 3 абсорбционните максимуми на Д1, Д2 и Д3 са отместени с около $\Delta\lambda = 90$ nm, а за Д4 отместването е около

$\Delta\lambda = 50$ nm. Липсата на максимум в UV област при около 350 nm предполага, че ивицата на останалите дендримери е ивица с пренос на заряд, СТ-ивица.

Ефектът на заместителя е илюстриран на Фигура 3 на мономерните (A) и дендримерните (B) съединения с различни заместители в 4-та позиция в един и същ разтворител (ДМФ). Докато формата и ширината на ивиците не се променя съществено, структурата на заместителя в С4 оказва влияние върху други характеристики на максимума - позиция, Стоксово отместване, квантов добив. Както се вижда от представените фигури електрон-донорните заместители отместват абсорбционната ивица батохромно – метилпиперазинов заместител до около 400 nm и съответно n-пропиламино и диметиламино заместител до около 440 nm.

При съединения **M4** и **D4** третичната amino група води до хипсохромно отместване на максимума с около 40 nm спрямо СТ-ивицата на моноалкилзаместените. Това се дължи на стеричното отблъскване между Н атом в позиция С5 и заместителя при азотния атом, така наречения *пери-ефект*, който води до неравнинна конформация с по-малка степен на спрежение.³ Друг важен резултат, причинен от този ефект са по-високите стойности на Стоксовото отместване за **M4** и **D4**. Това може да се обясни с различните позиции на абсорбционните максимуми, причинени от *пери-ефекта*, докато флуоресцентните максимуми на съединението са със същите енергии, както при останалите съединения от серията, макар и с по-нисък квантов добив. При **M4** и **D4**, заместителят излиза от равнинната плоскост на хромофорната система. От Таблица 2 и Таблица 3 също се вижда, че Стоксовото отместване зависи от средата и стойностите на този параметър са по-високи в случаите на полярни разтворители, когато образуването на Н връзки или дипол-диполните взаимодействия са предпочетени в сравнение с тези в неполярна среда. Резултатите са много сходни с тези, получени за мономерните 1,8-нафталимиди.

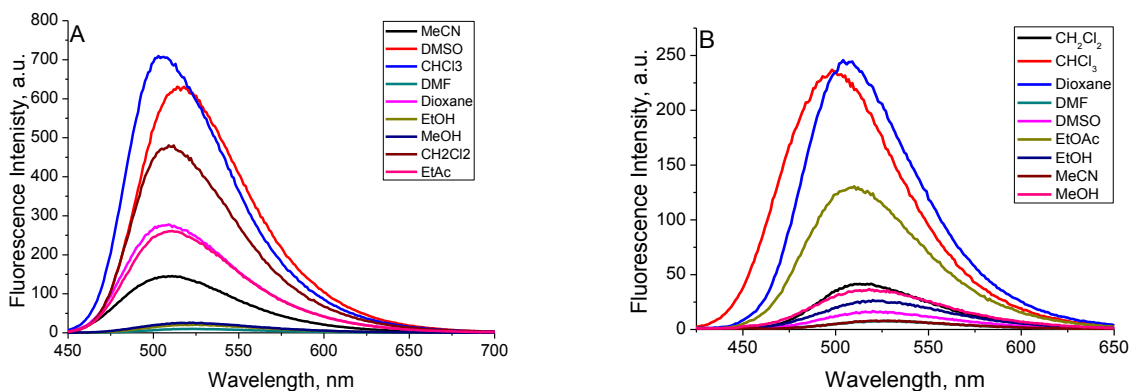


Фигура 3. Нормализирани абсорбционни спектри на мономерите (А) и на дендримерите (В) ДМФ

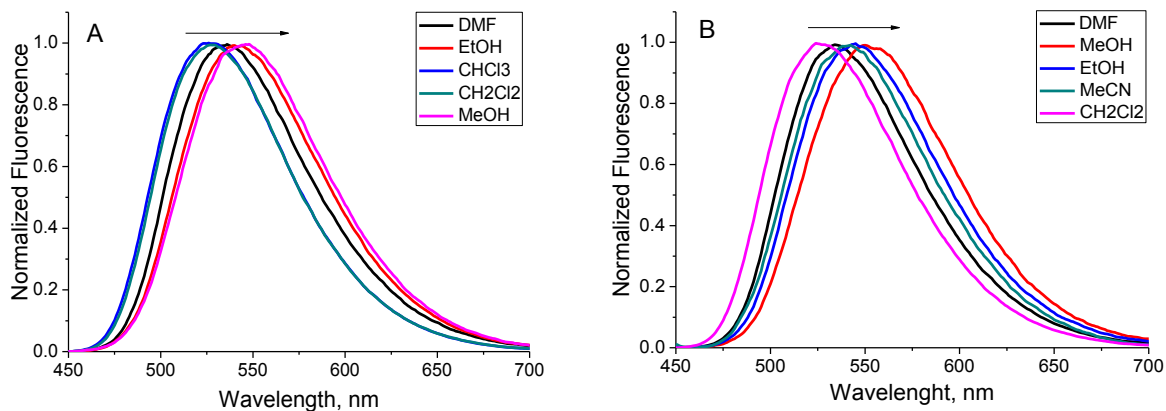
3.3.4. Влияние на разтворителя

При по-детайлното изследване влиянието на разтворителя върху фотофизичните свойства на съединенията се наблюдава ясно изразена зависимост на емисионния максимум от полярността на разтворителя (Фигура 4 и Фигура 5). Формата и фината структура на най-дълговълновата абсорбционна ивица на изследваните съединения не зависят от вида на използвания разтворител, докато позицията на емисионният максимум се отмества батохромно при преминаване от неполярни към полярни разтворители. В този случай батохромното отместване на максимума може да се обясни от гледна точка на факта, че диполният момент на молекулите се повишава по време на възбуждане поради преразпределение на електронната плътност. Молекулата във възбудено състояние е по-добре стабилизирана в полярни разтворители, поради по-строгото взаимодействие с диполите на разтворителите. Тези резултати показват, че изследвани от нас съединения проявяват положителен солватохромизъм, което е в съгласие с намерените в литературата резултати за ПАМАМ дендримери от нулева и втора генерация. Оттук можем да направим извода, че възбуденото състояние е по-полярно от основното. Тези наблюдения се отнасят както за мономерните, така и за дендримерните съединения. Като причина за това явление могат да се посочат дипол-диполните взаимодействия между молекулите на разтворителя

и разтвореното вещество. Тези взаимодействия причиняват по-големи частични заряди на електрон-донорните и електрон-акцепторните групи на флуорофора. Като резултат от това се наблюдава понижаване на енергията на прехода и съответно отместване на емисионния максимум към по-големи дължини на вълната, съответно по-ниски енергии. Освен това се наблюдава и хипохромен ефект от неполярни към полярни разтворители както се вижда от Фигура 4.

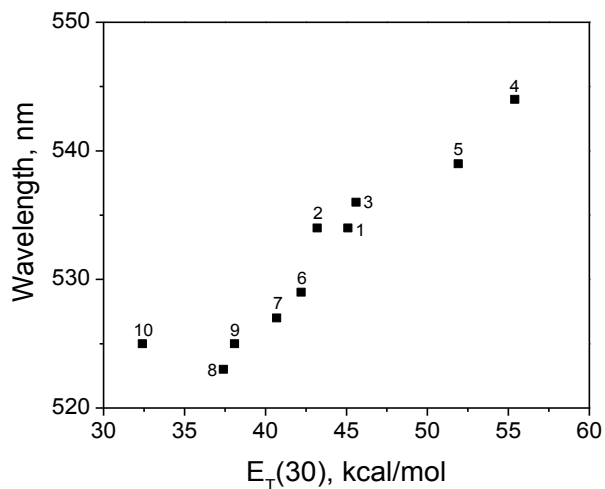


Фигура 4. Нормализирани емисионни спектри на съединения М1 (А) и на М4 (В) в различни разтворители



Фигура 5. Нормализирани емисионни спектри на съединения Д1 (А) и на Д2 (В) в различни разтворители

На Фигура 6 е представена зависимостта на емисионният максимум на Д1 като функция от емпиричния параметър $E_T(30)$. Както ясно се вижда при преминаване от неполярни към полярни разтворители максимумът се отмества батохромно. Такива закономерности са описани в научната литература и от проведените изследвания е установено, че влиянието на външни фактори е по-ясно изразено при промяната на параметрите, характеризиращи излъчвателните процеси, в сравнение с промяната в абсорбционните параметри. Тъй като диполният момент на молекулите във възбудено състояние е по-голям от този в основно, полярните разтворители стабилизират по-силно възбудените молекули. Така част от енергията на възбуденото състояние се изразходва за извършването на безизлъчвателни процеси в резултат на което емисионният максимум се отмества към по-нискоенергетичната част на спектъра. Стоксовото отместване при дендримерите не се различава съществено в сравнение с мономерите, както и от резултатите получени за други флуоресцентни ПАМАМ дендримери с различни заместители в нафталимидния пръстен.^{4,5,6,7,8} Дендримерите имат значително по-нисък квантов добив в сравнение с мономерните си аналози. Тези стойности най-вероятно се дължат на фотоиндуциран електронен или енергетичен пренос от третичните азотни атоми в ядрото и разклоненията на дендримерите към периферните флуорофорни групи. Малко вероятно е конформационни изменения в нафталимидната структура да предизвикват безизлъчвателна дезактивация на възбуденото състояние и съответно по-нисък квантов добив, тъй като тези процеси биха намерили отражение в позицията на емисионния максимум и съответно в стойността на Стоксовото отместване.



Фигура 6. Емисионният максимум на дендример Д1 като функция на емпиричният параметър за полярността на разтворителя $E_T(30)$ kcal/mol

3.4. Сензорна активност на изследваните съединения

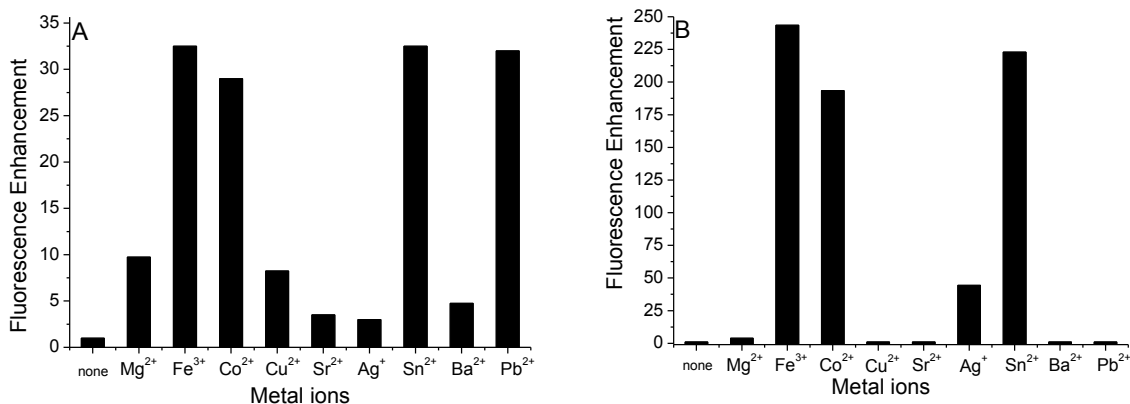
3.4.1. Спектрални свойства в присъствие на целевите метални йони

Сензорни приложения при мономерните флуоресцентни производни на 1,8-нафталимидите

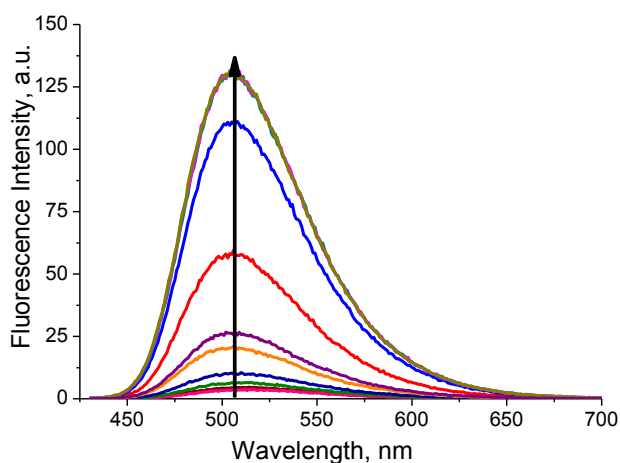
Флуоресцентният анализ на различни субстрати е един от най-чувствителните методи, който се основава на взаимодействие между анализа и сензорната молекула. Този метод позволява откриването на изключително ниски концентрации на анализа от порядъка на 10^{-6} - 10^{-7} М. Селективността на анализа се осигурява от рецепторния фрагмент, който избирателно взаимодейства с даден субстрат. В резултат на това взаимодействие възникват промени във фотофизичните характеристики на флуорофорния фрагмент. Именно поради факта, че това взаимодействие се осъществява на молекулно ниво, чрез този метод могат да се открият изключително ниски концентрации от анализи, което го прави високоефективно.

За нас особен интерес представляваше количественото изследване на способността на новосинтезираните съединения, в резултат от блокирането на присъщия за тях ФЕТ, избирателно да „включват“ или „изключват“ своята емисия в присъствие на анализ.

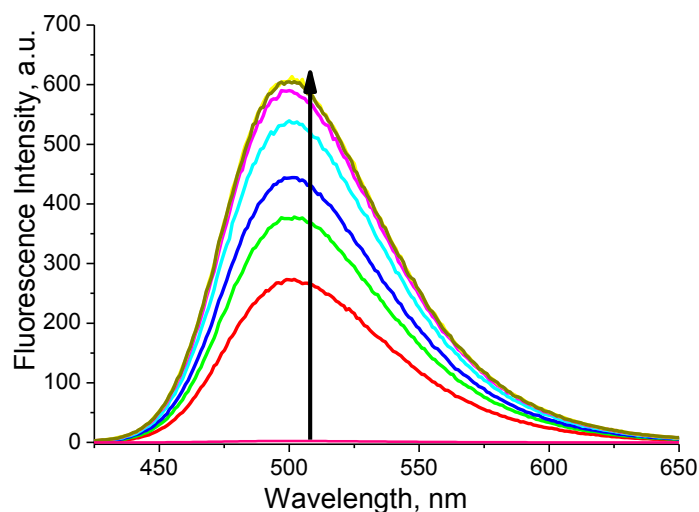
При изследване влиянието на различни биологично-важни метални катиони върху фотофизичните параметри на мономерните нафталимиди бе установено, че интензитетът на флуоресценция нараства в присъствие на аналит. Факторът на нарастване е определен от отношението на флуоресцентния интензитет в присъствие и в отсъствие на метални катиони ($FE = I/I_0$). Установено бе, че този фактор зависи както от природата на рецепторния фрагмент в сензорната молекула, така и от вида на изследвания метален йон (Фигура 7 А и В).



Фигура 7. Фактор на нарастване на флуоресценцията за съединения М1 (А) и М4 (В) в присъствие на целевите метални йони

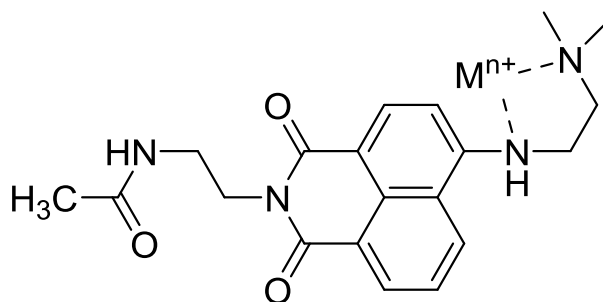


Фигура 8. Влияние на калай (II) йони върху флуоресцентните свойства на съединение М1



Фигура 9. Влияние на желязо(III) йони при емисионните спектри на съединение M4

Нарастването на интензитета на флуоресценция се дължи на комплексобразуване между металните йони и рецепторният фрагмент. На Фигура 10 е показано, че комплексът се образува с участието на неподделената електронна двойка от третичните азотни атоми на диметиламино групата и азотният атом от 4-та позицията на нафталимида. Доказателство за това е, че при съединение **M3**, в което единственото възможно място за образуване на комплекс е при азотните атоми в имидната част, ефект не се наблюдава.



Фигура 10. Предпочетено място за комплексобразуване между лигандите (за пример е използван M1) и металните йони

Различната стойност на фактора FE за всеки от метални катиони се обуславя от стабилността на така образуваният комплекс, което от своя страна зависи от рецепторния

фрагмент и вида на металните йони. От получените резултати се вижда, че сензорните молекули са най-чувствителни спрямо Sn (II), Co (III) и Fe (III).

Изчислени бяха и стабилитетните константи на образуваните комплекси между лигандите (**M1** и **M4**) и металните йони, предизвикващи най-силно увеличение на сигнала. Както се вижда от приложените таблици най-стабилен комплекс **M1** образува с кобалта, а **M4** съответно със сребро. Като цяло здравината на комплексите е в добра корелация с чувствителността към съответния анализ и ефект се наблюдава само при йони характеризиращи се с високи стабилитетни константи. И при двете изследвани съединения обаче най-висока квантова ефективност е регистрирана спрямо калай и желязо. Това ни дава основание да заключим, че чувствителността на флуоресцентния сензорен отговор зависи не само от здравината на получения комплекс, а дори в по-голяма степен от природата на взаимодействието на съответният метален йон с флуорофора.

Таблица 4. Квантова ефективност и константи на свързване за съединение M1

Ions	Binding Constant (β)x10⁻⁶	log β	Quantum Efficiency (M⁻¹)
Co⁺³	3.0	6.5	118.0
Sn⁺²	1.4	6.1	130.0
Fe⁺³	2.0	6.3	129.0

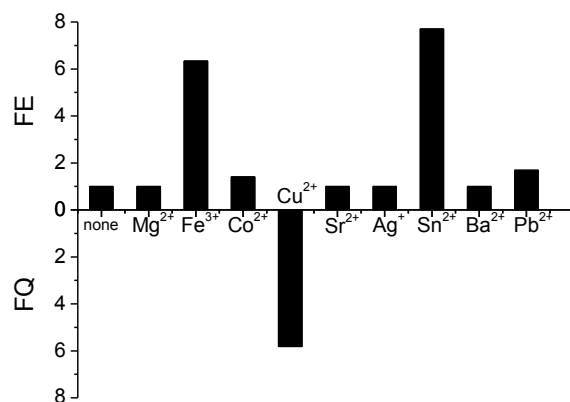
Таблица 5. Квантова ефективност и константи на свързване за съединение M4

Ions	Binding constant (β)x10⁻⁵	log β	Quantum Efficiency (M⁻¹)
Ag⁺	45	6.7	110.0
Co⁺³	2.7	5.4	490.0
Sn⁺²	30	6.5	555.0
Fe⁺³	2.0	5.3	605.0

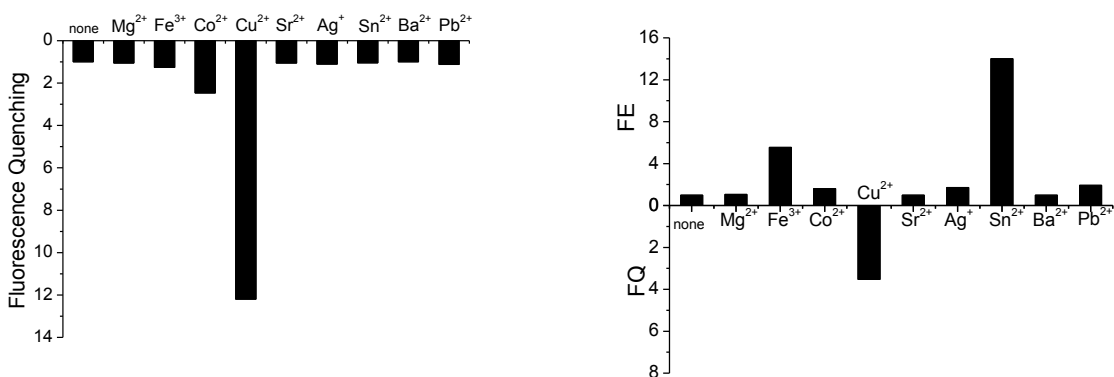
3.4.2. Сензорни приложения при дендримерните макромолекули

Уникалната структура на дендримерите ни дава възможност в една макромолекула да се включат точно определен брой функционални групи – в случая хемосензорни фрагменти, на конкретни позиции на молекулата. Свързването на 1,8-нафталимидни единици към периферията на ПАМAM дендримери им придава нови, интересни функционални свойства. Целта на синтезирането на този вид съединения беше да се изследва влиянието на дендримерната структура върху селективността и чувствителността на флуоресцентния анализ.

От литературата е известно, че в органични разтворители йоните на тежки и преходни метали могат да доведат до гасене или усилване на флуоресцентния сигнал на някои органични съединения, които биват използвани като детектори за метални йони (Mg^{2+} , Pb^{2+} , Sr^{2+} , Fe^{3+} , Ag^+ , Cu^{2+} , Co^{2+} , Ba^{2+} and Sn^{2+}). Потенциалът на изследваните съединения като лиганди за откриване на различни замърсители е изследван в разтворител ДМФ чрез мониторинг на промените във флуоресцентните спектри в присъствие и отсъствие на йони. Изборът на ДМФ като среда за провеждане на измерванията се дължи на факта, че както изходните флуорофори и метални соли, така и образуваните между тях комплекси са добре разтворими в него. Също така в този разтворител съединенията проявяват добри фотофизични характеристики и по този начин може да се изясни механизма на процеса ФЕТ. В този случай интензитетът на флуоресценция е изключително важен в отсъствие на метални катиони. Както вече бе показано изследваните дендримери имат много ниска собствена флуоресценция, причинена от процеса ФЕТ. Прибавянето на металните йони основно води до повишаване интензитета на флуоресценция, тъй като образуването на метален комплекс възпрепятства ФЕТ. Изследвано е влиянието на различни метални йони върху интензитета на флуоресценция на модифицирани ПАМAM дендримери от първа генерация. Тези макромолекули съдържат в разклоненията си третични азотни атоми, способни да участват в процеси на фотоиндуциран електронен пренос, както и amidни групи в сърцевината, които са добри лиганди. За анализа са използвани разтвори на дендримерите в ДМФ с концентрация $3 \times 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$, които излъчват жълто-зелена флуоресценция. На Фигура 11 и Фигура 12 са представени хистограми с влиянието на различните по природа йони върху флуоресцентната интензивност съответно на съединения Д1, Д2 и Д4.



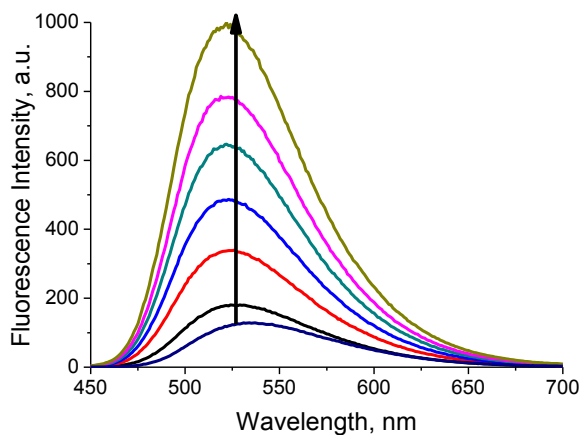
Фигура 11. Влияние на различни метални йони върху флуоресцентната интензивност на Д1



Фигура 12. Влияние на различни метални йони върху флуоресценцията на съединение Д2 (А) и Д4 (В)

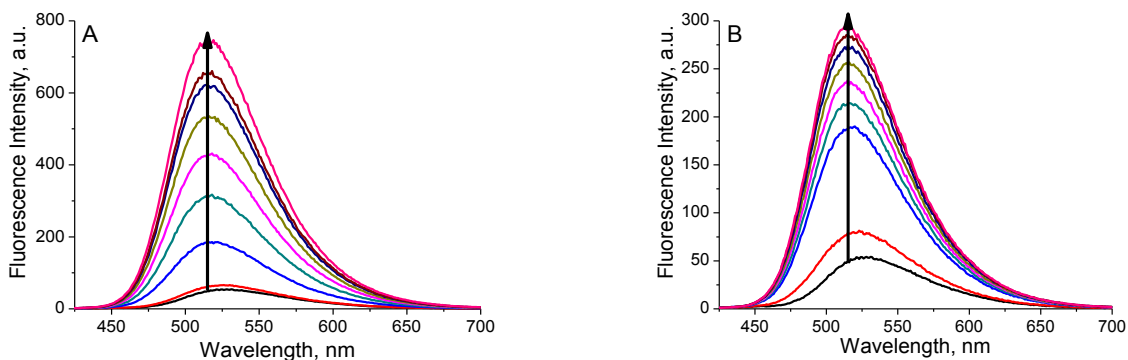
По време на експеримента постепенно се увеличава концентрацията на йоните, като след всяка промяна се сменя флуоресцентния спектър и се наблюдават промените в интензитета. Започва се със снемане спектъра на изходното съединение в ДМФ, следва прибавяне на съответния метален йон с концентрации: 3.3×10^{-5} mol/l; 6.7×10^{-5} mol/l; 1.3×10^{-4} mol/l; 1.7×10^{-4} mol/l; 2.0×10^{-4} mol/l; 2.3×10^{-4} mol/l; 2.7×10^{-4} mol/l. За количествено описание на ефекта на Sn²⁺ проведохме детайлно титруване с различна концентрация на йоните. От Фигура 11 А се вижда, че за съединение Д1 флуоресцентния интензитет се увеличава с нарастване на концентрацията на металния йон при Fe³⁺ и Sn²⁺, като най-

значимо е увеличението при Sn^{2+} йони, което показва добра чувствителност към Sn^{2+} йони. От тук може да кажем, че съединение **Д1** може да се използва като високочувствителен сензор за откриване на Sn^{2+} йони. На Фигура 13 е представена промяната на интензитета на **Д1** в присъствие на Sn^{2+} ($FE = 7.71$ – фактор на нарастване).



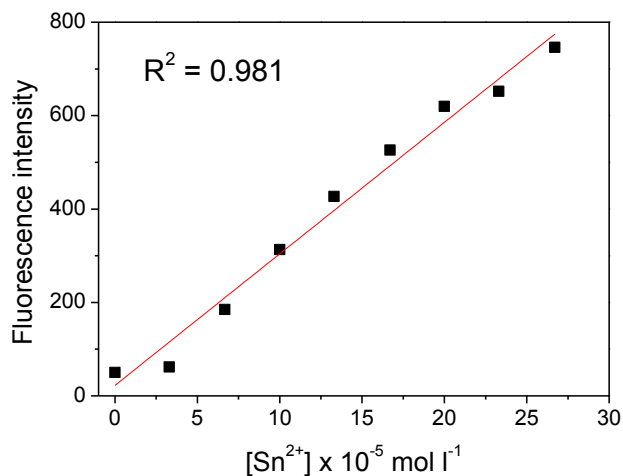
Фигура 13. Влияние на калай (II) йони върху интензитета на флуоресценция на **Д1**

Фигура 14 е представителна за промените на интензитета на дендимер **Д4** в присъствие на различно количество на Sn^{2+} (A) и Fe^{3+} (B) йони. Профилът на интензитета на флуоресценция при титруване показва, че той нараства с достигане на концентрация на йоните $2.67 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$. При по-високи концентрации промяната във флуоресценцията е незначителна.



Фигура 14. Влияние на Sn^{2+} (A) и Fe^{3+} (B) с различна концентрация върху флуоресцентната интензивност на съединение **Д4**

Фигура 15 представя зависимостта между интензитетът на флуоресценция и концентрацията на Sn^{2+} . Както се вижда от графиката наблюдавана е добра линейна зависимост ($R^2 = 0.981$) при концентрации на йоните в региона от 0 до $2.67 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$. Границата на откриване за **Д4** беше открита и има стойност $3.3 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$. За другите два дендримера стойността на този параметър е в същия порядък.



Фигура 15. Линейна зависимост на интензитета на флуоресценция от концентрацията на Sn^{2+} йони за дендример **Д4**

Нарастването на интензитета на флуоресценция се дължи на комплексообразуването на металните катиони с рецепторния фрагмент. На Схема 5 е показан възможният механизъм на комплексообразуване при съединение **Д4**. Участие взема неподделената електронна двойка на третичните азотни атоми и азотните атоми свързани директно с нафталимидното ядро. Независимо от вида на образуваният комплекс, резултатът води до блокиране на ФЕТ от рецептора към флуорофора и възстановяване на флуоресценцията.

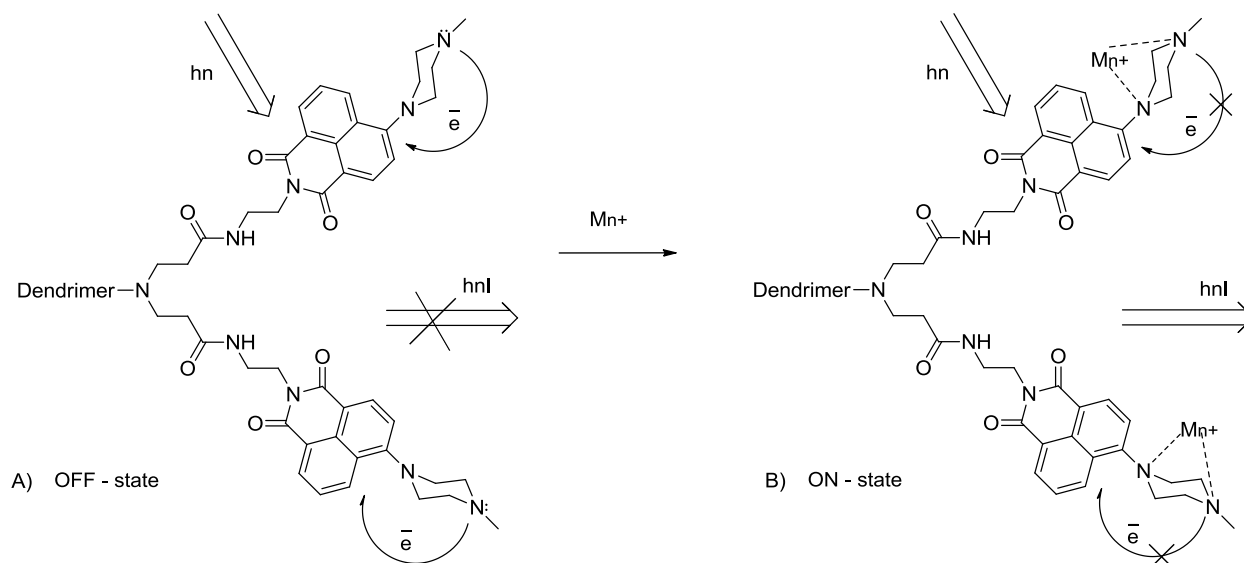
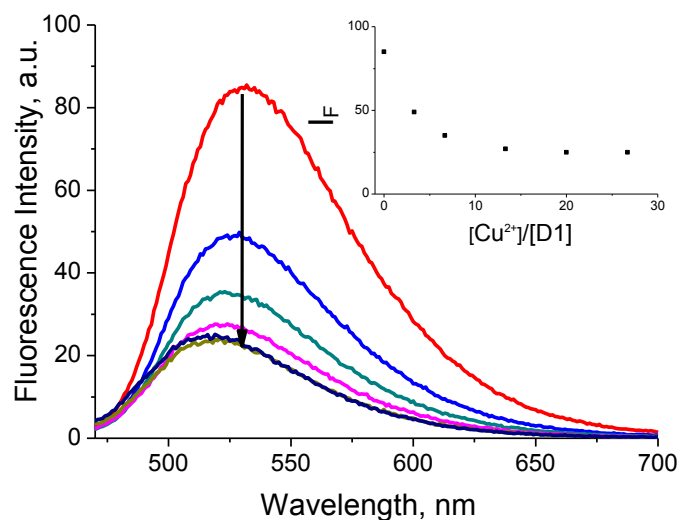


Схема 5. Механизъм на комплексообразване при съединения Д4

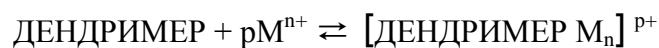
Интересен противоположен ефект се наблюдава в присъствие на мед (II) йони - прибавянето на този тип йони причинява драстично понижаване на флуоресцентния интензитет. В този случай количествена оценка за настъпващите промени се дава с термина флуоресцентно гасене. $FQ = I_o/I$ представлява отношението между началният интензитет (I_o - разтвор на дендримерите без метален йон) и минималният интензитет (I - разтвор на дендримерите след добавяне на последното количество йони).

Флуоресцентните спектри на **Д1** в разтвор на ДМФ в присъствие на Cu^{2+} катиони с различни концентрации са представени на Фигура 16 В. Наблюдава се намаляване на интензитета на флуоресценция при увеличаване концентрацията на медните йони до 3.33×10^{-4} М. При концентрация $3.3 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ на Cu^{2+} ефектът на гасене е 34 %, водещо до интензитет, който е 2/3 от интензитетът при изходния разтвор (в отсъствие на йон). Добавянето на $2 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ от Cu^{2+} катиони редуцира флуоресцентния интензитет с 79 %. По-високи концентрации на медни йони имат незначителен ефект и при 2.67×10^{-4} и $3.33 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ флуоресценцията намалява с 82 %. Също така от фигурата ясно се вижда, че наличието на медни йони причинява хипсохромно отместване на флуоресцентния максимум ($\Delta\lambda_F = 21 \text{ nm}$) от 535 (чисто багрило) до 514 nm (при най-високата концентрация на медни йони).



Фигура 16. Изменение флуоресцентната интензивност на съединение Д1 в присъствие на Cu^{2+} (В)

Фигура 12 А представя FQ стойностите за Д2 при наличието на различни метални йони. Както може да се види стойността на този параметър силно зависи от природата на катионите и тяхната различна способност да координират с дендримерната молекула. При съединение Д2 се наблюдава значително понижаване на интензитета при прибавяне на Cu^{2+} , като гасенето на флуоресценцията се повишава с нарастване на концентрацията на прибавения катион. От тук може да се каже, че това съединение може да се използва като високоефективен и селективен сензор за медни йони. При координирането може да се включи повече от един метален катион за един лиганд както е представено при следното взаимодействие:

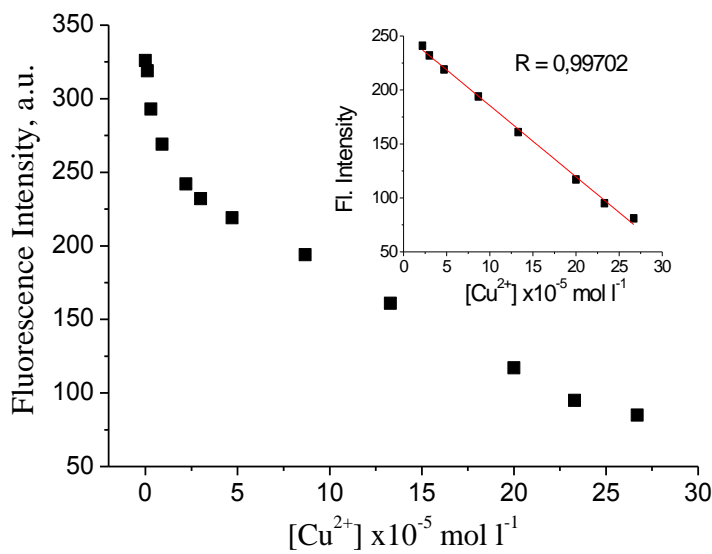


Най-високи стойности за този параметър са изчислени при наличието на медни йони (FQ = 12.26). В присъствие на Co^{2+} катиони FQ = 2.47. Ефектът, причинен от другите изследвани метални йони върху интензитетът на флуоресценция е по-слабо изразен и FQ е в диапазона 1.05-1.82, което доказва, че не се образуват стабилни комплекси с дендримерната молекула. Липсата на значително флуоресцентно гасене, причинено от други йони прави Д2 много полезен като селективен сензор за откриване наличието на Cu^{2+} йони. Този резултат има важно значение, понеже медните йони имат съществена

роля във функционирането на много живи организми, където изпълняват съществена роля в различни аспекти на ензимен и неензимен метаболизъм в биологичните системи.

Наблюдаваните резултати при координирането между Cu^{2+} и **Д2** са причинени от процеса на парамагнитно флуоресцентно гасене или енергиен трансфер към 1,8-нафталимидните единици, което гаси флуоресценцията. Наблюдава се също така и хипсохромно отместване на емисионната ивица ($\Delta\lambda_F = 11 \text{ nm}$) в присъствие на медните йони, което показва че свързването на металния йон може да става с хелатния азотен атом както от рецептора, така и от ароматния амин. Отслабването на електрон-донорната способност на ароматния амин при С4 води до отместване на ивицата към по-малките дължини на вълната. В този случай най-вероятно ефектът на парамагнитното флуоресцентно гасене, причинено от Cu^{2+} йони надделява над други потенциални ефекти като ФЕТ.⁹

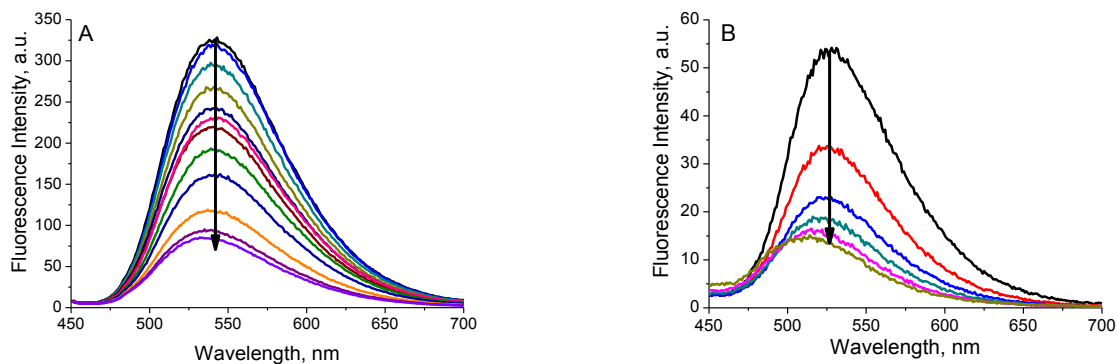
Флуоресцентните спектри на **Д2** ($c = 1 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$) в присъствие на различни концентрации на Cu^{2+} катиони са представени на Фигура 18 А. Наблюдава се ясно изразено намаление на интензитета на флуоресценция с увеличаване концентрацията на йоните до $2.67 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$. Титрувания флуоресцентен профил на **Д2** има граница на откриване $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$. При концентрация на медните йони $3 \times 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ ефектът на гасене е 10 % спрямо първоначалната флуоресценция, което показва добра чувствителност на емисията. Прибавянето на $8.7 \times 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ от Cu^{2+} флуоресцентният интензитет намалява с 22 %. По-високи концентрации ($c = 2.67 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) причиняват до 92% гасене на флуоресценцията. При концентрации на Cu^{2+} катиони в диапазона $2 \times 10^{-6} - 27 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ беше наблюдавана линейна зависимост ($R=0.99702$) (Фигура 17). Подобни граници на откриване и линейни криви са достатъчни, за да се открият медни йони дори и в биологични системи, понеже нормалното съдържание на мед в кръвта е $1.57-2.36 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ ($100-150 \text{ }\mu\text{g/L}$).¹⁰



Фигура 17. Зависимост на флуоресцентния интензитет на Д2 като функция от концентрацията на медни йони.

В случаите с Cu^{2+} катиони формирането на комплексите става в сърцевината на дендримера с участие на amidните групи. Като доказателство за това е липсата на гасене на флуоресцентната интензивност при нискомолекулните аналози при взаимодействие с медни йони. Тези резултати показват, че енергийният трансфер става към 1,8-нафталимидните единици и води до гасене на флуоресценцията. В тези случаи ефектът на парамагнитното флуоресцентно гасене причинено от Cu^{2+} йони надделява над възможността за блокиране на ФЕТ ефекта. Противоположен е ефекта в случаите на Sn^{2+} и Fe^{3+} йони. При тях повишаването на интензитета на флуоресценция може да се обясни с доминиращата роля на блокирането на ФЕТ ефекта, причинено от предпочетеното комплексообразуване с третичните amino групи по периферията на дендримерите. Незначителният ефект, или изцяло липсата на такъв върху интензитета на флуоресценция, причинен от останалите метални йони е поради причината, че дендримерите не образуват стабилни комплекси с тях. Освен това бавната реорганизация на дендримерната структура за да се адаптира постепенно към включването на катионите също има важна роля в процеса на комплексообразуване. Тази реорганизация на молекулата очевидно зависи от големината на дендримера, тъй като изследваните от нас представители от първа

генерация се отличават с поведението си спрямо подобни представители от нулева¹¹ и втора^{12,13} генерация.



Фигура 18. Влияние на Cu^{2+} с различна концентрация върху флуоресцентната интензивност на съединение Д2 (А) и Д4 (В)

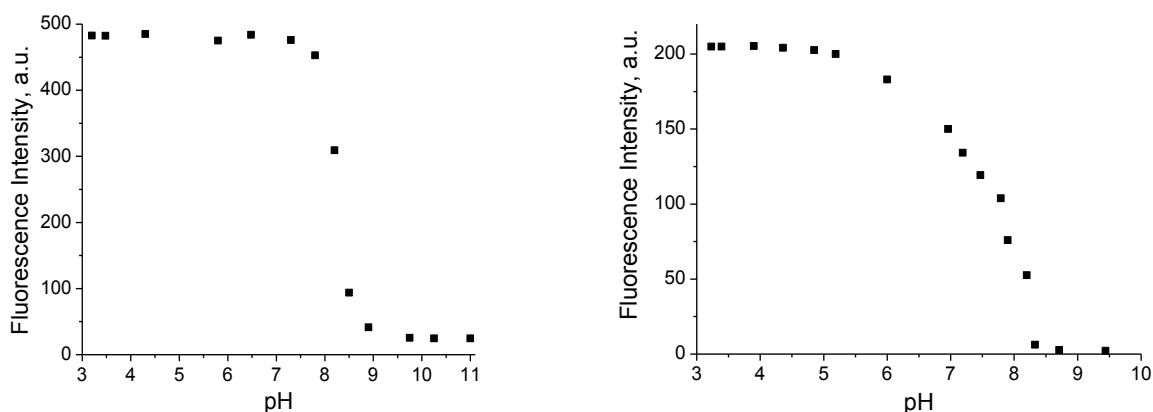
От хистограмите на съответните съединения в присъствието на метални йони с различна концентрация, както и от сравнителните графики за поведението на различните йони, могат да се направят изводи за сензорната активност на изследваните съединения. ПАМАМ дендримерите от първо поколение, модифицирани с 4-заместени нафталимиди проявяват сензорна активност към три вида метални йони (Fe^{3+} , Sn^{2+} , Cu^{2+}). Едно от най-ценните качества, което прави тяхното приложение като сензори възможно е именно това, че чувствителността им към съответните йони се изразява в различна посока и с различна големина на интензитета. Според теоретичните данни фотоиндуцираният електронен трансфер би трябвало да се отрази върху промените в интензитета на флуоресценция на съединения Д1, Д2, Д4 само в присъствие на тези йони, способни да се координират ефективно със заместителя в четвърта позиция на нафталиמידните остатъци по периферията на дендримерната молекула. Поради изключително сложната електронна система на изследваните съединения йоните, инициращи такива промени се определят експериментално, по описания по-горе алгоритъм. Експерименталните данни потвърждават теоретичните предположения и чрез тях определяме йоните, към които изследваните съединения проявяват активност. Съединение Д3 е неспособно да координира метални йони чрез заместителя си в 4-та позиция на нафталиמידния остатък. Този резултат се дължи на липсата на рецепторен фрагмент. Неговото анализиране, наред

с останалите съединения доказва, че причината за сензорната активност на ПАМАМ дендримери, модифицирани с 1,8-нафталимиди трябва да се търси именно в заместителите по периферията им. Експериментите потвърждават това предположение чрез доказаната неефективност на съединение **ДЗ** като сензор за метални йони, което беше желано свойство за това съединение (референтно съединение).

3.4.3. Влияние на рН на средата при мономери

Изследвани бяха и сензорните свойства на мономерните съединения спрямо наличието на протони, които са често срещани замърсители на околната среда. Рецепторният фрагмент, съдържащ третичен азотен атом с неподелена електронна двойка е способен да се протонира. В следствие на това енергията на неговата НОМО орбитала се понижава. При преминаване на молекулата във възбудено състояние не се извършва електронен пренос от азотния атом към нафталиמידното ядро и тя излъчва флуоресценция при прехода си от възбудено в основно състояние.

Изследване за влиянието на концентрацията на протоните върху интензитета на флуоресценция на 4-амино-1,8-нафталиמידните производни е проведено в разтвор на метанол/вода (1:4 обемни части) с концентрация $1 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$. Тези разтвори са титрувани с киселина или съответно основа и след всяка промяна на рН е измерен интензитетът на емисия.



Фигура 19. Влияние на концентрацията на протони върху интензитета на флуоресценция на съединения M1 (A) pKa = 7.5 и M4 (B) pKa = 6.7

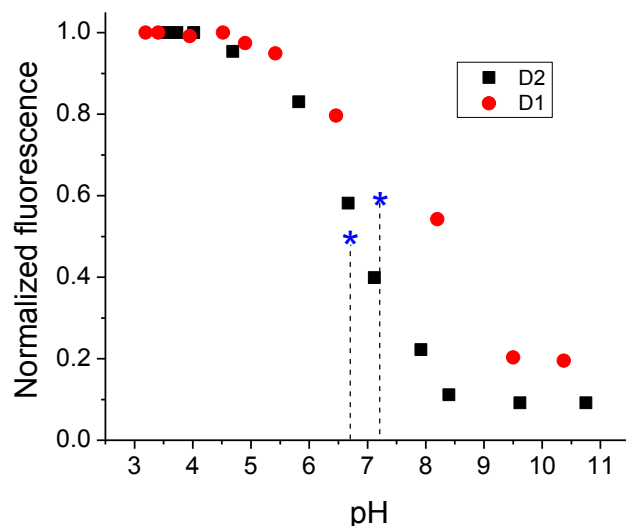
Установено е, че увеличаването на концентрацията на протоните в средата води до нарастване на интензитета на флуоресценция до достигане на определена стойност на рН. При титруване на разтворите на изследваните съединения с киселина се наблюдава рязко повишаване интензитета на флуоресценция в интервала от рН = 9.0-7.0 (**M1**) и съответно рН = 8.0-6.0 (**M4**), след което кривата оформя плато, т.е. при по-нататъшно повишаване концентрацията на протоните интензитетът на флуоресценция не се променя. Можем да обобщим, че в алкална среда изследваните съединения не излъчват емисия, поради извършване на фотоиндуциран електронен пренос. След достигане на определена стойност на рН фотофизичните свойства на нафталимидните производни се променят и интензитетът на флуоресценция рязко нараства. При **M1** и **M4** е установено, че флуоресцентният максимум не променя позицията си под влияние на концентрацията на протоните. От проведените изследвания за съединение **M3** бе установена липса на промяна в интензитета, което е още едно доказателство за протонирането именно на третичните азотни атоми в рецепторните фрагменти на изследваните молекули.

3.4.4. Влияние на рН на средата при дендримери

Изследвано е също така влиянието на концентрацията на протоните върху интензитета на флуоресценция и на дендримерните съединения в диапазона на рН от 3 до 11 в разтворител – смес метанол/вода (1:4 обемни съотношения). Измерванията са проведени по описаната процедура за мономерните съединения. Както е показано на Фигура 20 съединения **D1** и **D4** показват висока чувствителност към присъствието на протони. Както се вижда, повишаването на рН от 3 до 5.0-5.5 не променя флуоресцентната интензивност. При по-високи стойности на рН се наблюдава драстично намаляване на интензивността, като кривата се насища при стойности на рН от 9.5 и 8.5 съответно за съединение **D1** и **D4**. Зависимостта на флуоресцентната интензивност от рН е анализирана чрез следното уравнение:

$$pH - pKa = \log \frac{I_{Fmax} - I_F}{I_F - I_{Fmin}}$$

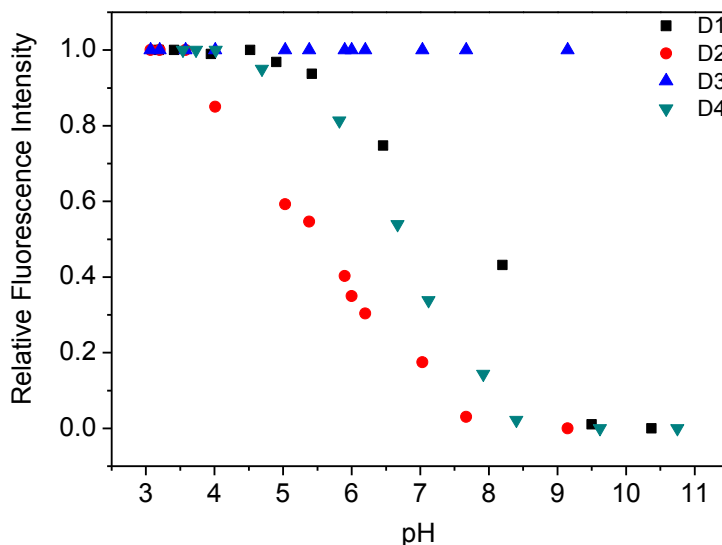
Изчислените стойности за рКа са 7.20 за Д1 и 6.6 за Д2. И при двете съединения флуоресценцията, емитирана при протонираната форма е по-висока отколкото при непротонираната. Зависимостта на флуоресцентната интензивност от рН е по-изразена при съединение Д2. Тези резултати показват, че изследваните дендримери могат да бъдат използвани като рН-сензори, чувствителни на замърсяване във водна среда. Максимална чувствителност се наблюдава при стойности на рН малко под неутралната област.



Фигура 20. Ефект на различни стойности на рН върху флуоресцентната интензивност на съединение Д1 (А) рКа = 7.20 и на съединение Д4 (В) рКа = 6.60

Нарастването на интензитета на флуоресценция при прехода от алкална в кисела среда се дължи на протониране на третичните азотни атоми от ядрото и разклоненията на дендримерите, което гаси фотоиндуцирания електронен пренос от ядрото към периферията и води до възстановяване на флуоресценцията.

Обобщавайки данните на Фигура 21, представящи зависимостта на флуоресцентната интензивност на съединения Д1, Д2, Д3 и Д4 от рН на средата, могат да се направят изводи, аналогични на тези за влиянието на метални йони върху флуоресценцията. Очаквано, при съединения Д1, Д2 и Д4 в кисела среда интензивността е висока поради гасене на ФЕТ, което предизвиква повишаване емисията на съединенията. При съединение Д3 не се наблюдава този ефект поради невъзможността му да координира чрез заместителя си в четвърта позиция на нафталимидната структура.

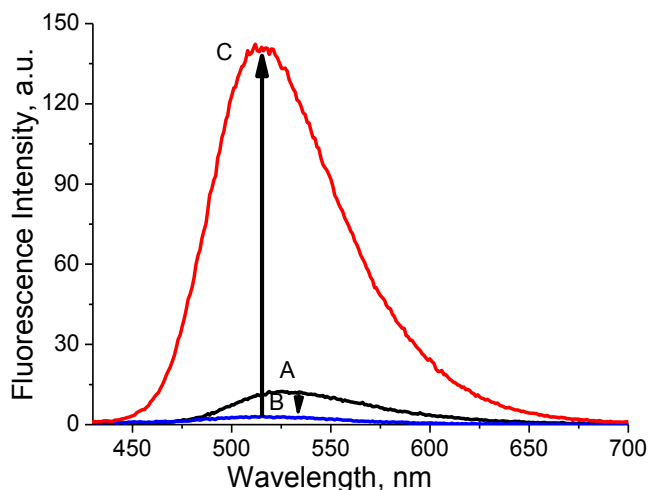


Фигура 21. Ефект на различни стойности на рН върху флуоресцентната интензивност на изследваните съединения

Вероятният механизъм за повишаване на флуоресцентния механизъм в кисела среда на Д2 е представен на Схема 6. По-високият интензитет е причинен от гасенето на ФЕТ процеса в кисела среда. ФЕТ се осъществява от азотния атом на морфолиновия заместител през етиленовия мост към С4-заместеният-1,8-нафталимиден флуорофор. Така се получава гасене на флуоресценцията на 1,8-нафталимидния флуорофор (Схема 6 А). Протонирането на азотния атом от морфолиновия заместител „спира“ електронния пренос и възстановява флуоресцентната емисия на флуорофора (Схема 6 В). Това води до извода, че Д2 е високоефективен “off-on” детектор за промени в рН на средата.

Промените в интензитетът на флуоресценция на Д3 при различно рН на средата са незначителни. В този случай протоните могат да взаимодействат само с третичните азотни атоми от сърцевината на дендримера и бе установено, че протонирането им на практика не оказва ефект върху емисионния интензитет.

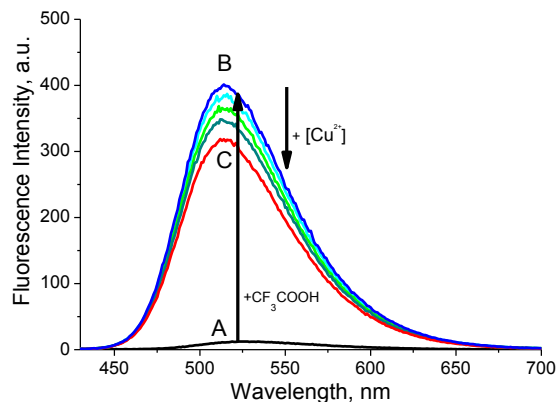
литературата са известни подобни изследвания за дендримери от нулева и втора генерация. Промяната на флуоресцентният интензитет на дендример **Д1** при последователно прибавяне на Cu (II) и киселина е представен на Фигура 22. Когато добавим медни йони към разтвор на дендримерите в разтворител ДМФ (спектър А), флуоресцентният интензитет намалява $FQ = 4.1$ (Спектър В). Добавянето на трифлуороцетна киселина към последната система води до драстично повишаване на интензитета на флуоресценция, $FE = 46.67$. В последния случай диметиламино групите при С4 на нафталимидното ядро са протонирани и ФЕТ процеса е блокиран.



Фигура 22. Флуоресцентни спектри на Д1 (DMF) без Cu^{2+} йони (А), при добавяне на медни йони (В) и последващо прибавяне на трифлуороцетна киселина (С)

Фигура 23 представя промените във флуоресцентната интензивност на дендример **Д1** при добавяне на същите количества киселина и медни йони като в предходния случай, но в обратен ред. Отново спектър А представя емисията на съответните съединения в отсъствие на анализи. Както вече бе подчертано, добавянето на трифлуороцетна киселина (Спектър В) води до много силно увеличаване на интензитета, $FE = 33.3$. Също така бе наблюдавано и отместване на емисионният максимум от 526 на 513 nm, което може да бъде обяснено с протонирането на третичните amino групи в позиция С4. Като се добавят медни йони към тази система флуоресцентната интензивност намалява. С повишаване концентрацията на медните йони флуоресцентният интензитет намалява с 20 % без да се

променя позицията на максимума. Това поведение може да се обясни с комплексообразуване между медните йони и вътрешността на дендримера (ядрото).



Фигура 23. Флуоресцентни спектри на Д1 в DMF без Cu^{2+} йони (A), при прибавяне на трифлуoroacetна киселина (B) и последващо добавяне на медни йони с различна концентрация (C)

Различните спектрални свойства на система C, при която финалните концентрации на всички съединения са еднакви и само реда на добавяне се променя, дава на новосинтезираните дендримери свойствата на логически бариери (a logic gates property).^{14,15,16} Подобни ефекти са наблюдавани за всички изследвани дендримери.

3.5. Антибактериална активност на изследваните съединения

Синтезираните медни комплекси на представители от дендримерните и мономерните съединения бяха изследвани *in-vitro* спрямо девет патогенни индикаторни култури, използвайки конвенционално дифузионно изследване. Използвани бяха следните индикаторни микроорганизми: Грам-положителни бактерии: *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Sarcina lutea* и *Micrococcus luteus*, Грам-отрицателни бактерии: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter johnsonii* и *Xanthomonas oryzae*, както и следния щам дрожди *Candida lipolytica*. Като положителна контрола за сравнение е използван Гентамицин (Gentamycin). Синтезираните комплекси са разтворени в 5 % DMSO, така че да се получат 0.5 % изходни разтвори. Експоненциално нарастващите култури са нанесени върху стерилна среда от хранителен агар във всяко петри. Получени са кладенчета (6 mm в диаметър) в агарната среда и съответно се прибавят по 10, 30 и 50 μl от изходните

разтвори на изследваните съединения. Направени са по три повторения за всяко третиране. Петритата са поставени в инкубатори за 24 часа при температура 28 ± 2 °C, след което се определя размера на получената инхибиторна зона. Резултатите от бактерицидният скрининг на новосинтезираните съединения са представени в Таблица 6.

Таблица 6. Зони на инхибиране (mm в диаметър) за Cu/D1, Cu/M1 и Cu/M4

Индикаторни щамове	Cu/D1	Cu/M1	Cu/M4	G
<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	-	20
<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	10
<i>Sarcina lutea</i>	11	16	16	18
<i>Micrococcus luteus</i>	8	14	14	11
<i>Xanthomonas oryzae</i>	-	-	-	22
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11	24	12	11
<i>Escherichia coli</i>	18	17	17	14
<i>Acinetobacter johnsonii</i>	9	9	9	20
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-	-	20
<i>Candida lipolytica</i> x 10 µl	10	11	11	14
<i>Candida lipolytica</i> x 50 µl	10	17	13	14

(-), не се наблюдава зона на инхибиране

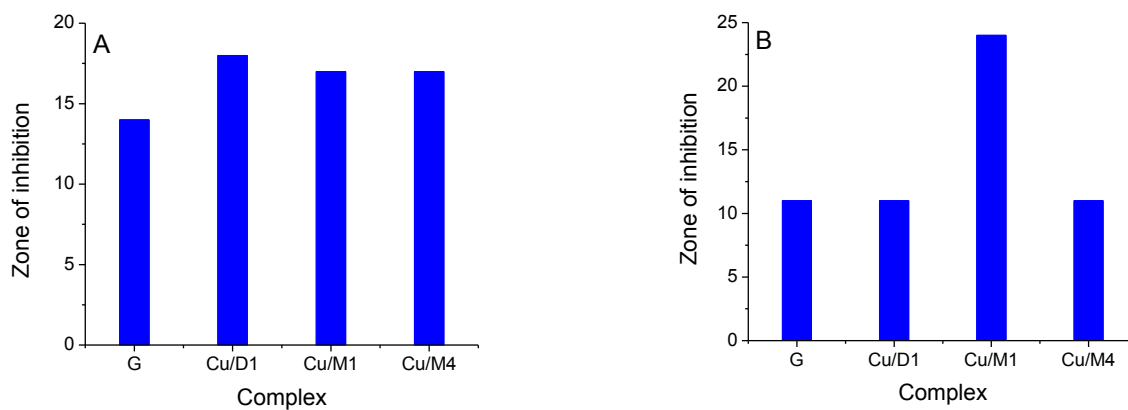
Контрол: **G**, Gentamycin (гентамицин);

Bacillus subtilis, *Bacillus cereus*, *Xanthomonas oryzae*, *Saccharomyces cerevisiae*, комплексите на отделните съединения не показват никаква биологична активност в сравнение с контролата.

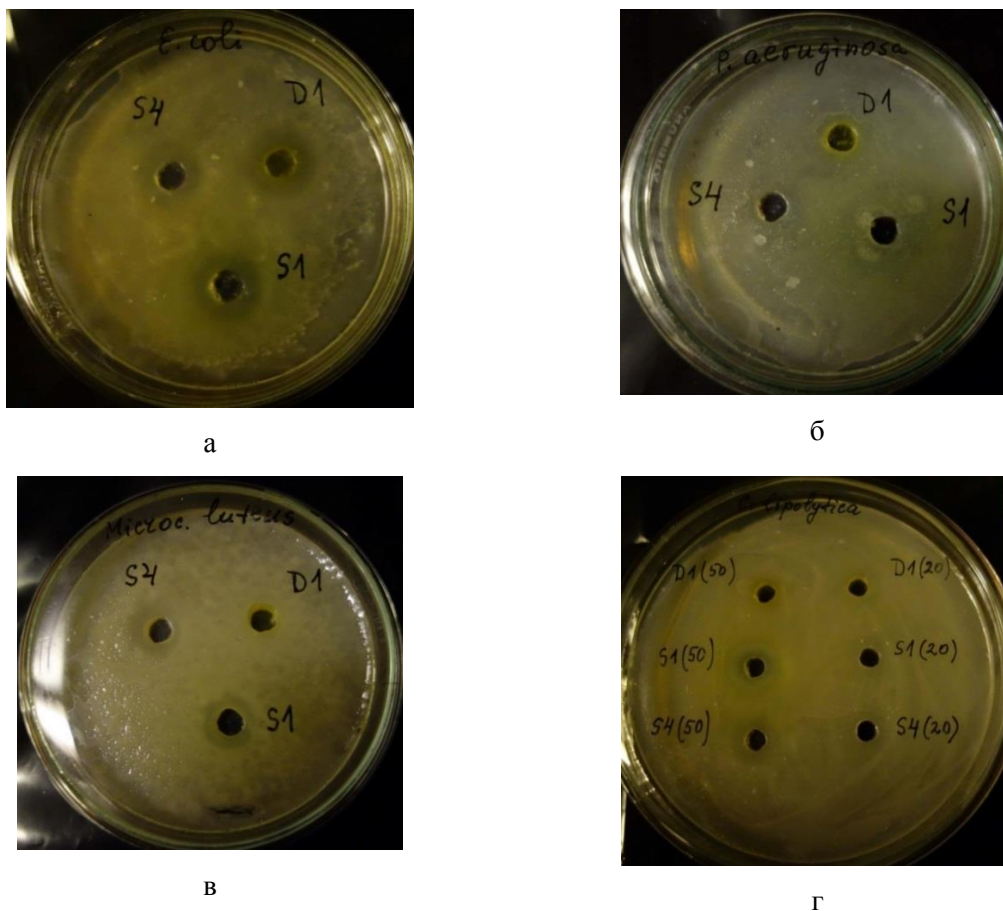
Acinetobacter johnsonii, *Sarcina lutea*, *Candida lipolytica*, *Micrococcus luteus* наблюдава се умерена активност спрямо този вид бактерии.

Pseudomonas aeruginosa, *Escherichia coli* наблюдава се много висока активност, много по-висока спрямо контролата (Фигура 24).

От изследваните съединения най-добра антибактериална активност показва съединение **Cu/M1**. Новосинтезираните съединения проявяват по-висока биологична активност спрямо грам отрицателните бактерии. Тези резултати могат да се обяснят с факта, че положително заредените медни йони атакуват отрицателно заредената мембрана на клетката.



Фигура 24. Зони на инхибиране на медните комплекси спрямо *Escherichia coli* (A) и *Pseudomonas aeruginosa* (B)



Фигура 25. Снимки на зоните на инхибиране на изследваните съединения спрямо: а) *Escherichia coli*; б) *Pseudomonas aeruginosa*; в) *Micrococcus luteus*; г) *Candida lipolytica*

4. Изводи

1. За първи път са синтезирани пет нови, неописани в литературата полиамидоамин дендримери от първа генерация, съдържащи 1,8-нафталимидни флуорофори (с различен заместител в 4-та позиция) в периферията си, както и мономерните им 1,8-нафталимидни аналози;

2. Детайлно са изследвани фотофизичните характеристики на новосинтезираните съединения в органични разтворители с различна полярност, като е доказано, че проявяват положителен солватохромизъм;

3. Изследвано е влиянието на различни метални йони, както и на рН на средата върху флуоресцентните характеристики, като:

3.1. Доказано е мястото на комплексообразуване между нафталимидните производни и различните метални йони;

3.2. Установено е, че изследваните мономерни аналози проявяват сензорна активност към три вида метални йони (Fe^{3+} , Sn^{2+} , Co^{3+}).

3.3. Доказано е, че **Д2** проявява селективност към мед (II) йони чрез гасене на флуоресцентната емисия;

3.4. **Д1** и **Д4** проявяват сензорна активност към три вида метални йони (Fe^{3+} , Sn^{2+} , Cu^{2+}). Едно от най-ценните качества, което прави тяхното приложение като сензори възможно е, че чувствителността им към съответните йони се изразява в различна посока и с различна големина на интензитета.

3.5. Доказано е, че изследваните (мономерни и дендримерни) съединения са високоефективни “off-on” детектори за промени в рН на средата. Изследваните аналози могат да бъдат използвани като рН-сензори, чувствителни на замърсяване във водна среда. Доказано е, че могат да бъдат използвани в биологични среди, тъй като максимална чувствителност се наблюдава при рН стойности близки във физиологичната област.

3.6. Изследвано е комплексното влияние на медни йони и протони върху емисионните свойства на дендримерните молекули, като е доказано, че при еднакви финални концентрации на всички съединения и промяна само в реда им на добавяне, емисионните свойства на получените системи са различни, което дава на новосинтезираните дендримери свойствата на логически бариери;

4. Изследвана бе и антибактериалната активност на медни комплекси на представители от мономерните и дендримерни аналози, при което бе доказана много по-висока активност спрямо някои грам отрицателни бактерии в сравнение с гентамицин като контрола.

5. Литература

- ¹ M.S. Alexiou, V. Tychopoulos, S. Charbanian, J.H.P. Tyman, R.G. Brown, P.I. Prittain, *J of Chem Soc, Perkin transactions*, 2 (5) (1990) 837;
- ² G.A. Reynolds, K.H. Drexhage, *Optics Commun.*13(1975) 222;
- ³ S. Stoyanov, P. Petrov, M. Stoyanova, M. Dangalov, B. Shivachev, R. Nikolova, I. Petkov, *J Photochem and Photob A: Chem* 250 (2012) 92
- ⁴ I. Grabchev, V. Bojinov, J.M. Chovelon, *Polymer* 44 (2003) 4421;
- ⁵ I. Grabchev, X Qian, V. Bojinov, Y. Xiao, W. Zhang, *Polymer* 44 (2002) 5731;
- ⁶ I. Grabchev, J.M. Chovelon, V. Bojinov, G. Ivanova, *Tetrahedron* 59 (2003) 9591;
- ⁷ I. Grabchev, J.P. Soumillion, B. Muls, G. Ivanova, *Photochem Photobiol Sci* 3 (2004) 1032;
- ⁸ I. Grabchev, C. Petkov, V. Bojinov, *Dyes and Pigments* 28 (1995) 41;
- ⁹ M. Formica, V. Fusi, L. Giorgi, M. Micheloni, *Coordination Chemistry*. 256 (2012) 170;
- ¹⁰ W.T. Tak, S.C. Yoon, *Korean J. Nephrol.* 20 (2001) 863;
- ¹¹ I. Grabchev, X. Qian, V. Bojinov, Y. Xiao, W. Zhang, *Polymer* 43 (2002) 5731;
- ¹² I. Grabchev, V. Bojinov, J.-M. Chovelon, *Polymer* 44 (2003) 4421;
- ¹³ I. Grabchev, J.-P. Soumillion, B. Muls, G. Ivanova, *J. Photochem. Photobiol. Science* 3 (2004) 1032;
- ¹⁴ N. I. Georgiev, I. S. Yaneva, A. R. Surleva, A. M. Asiri, and V. B. Bojinov, *Sensors Actuators B Chem.* 184 (2013) 54;
- ¹⁵ V. Bojinov, N. Georgiev, , *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy* 46 (2011) 3;
- ¹⁶ N.B. Sankaran, S. Banthia, A. Das, A. Samanta, *New J. Chem.* 26 (2002) 1529.

Списък на научните публикации, включени в дисертационния труд

1. St. Yordanova, I. Grabchev, St. Stoyanov, V. Milusheva, I. Petkov, „Synthesis and functional characteristics of two new yellow-green fluorescent PAMAM dendrimers periphery modified with 1,8-naphthalimides“, *Inorganica Chimica Acta* 409 (2014) 89–95;

2. St. Yordanova, I. Grabchev, St. Stoyanov, I. Petkov, „New detectors for metal cations and protons based on PAMAM dendrimers modified with 1,8-naphthalimide units“, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 283, (2014), 1–7.

Участия в научни конференции, свързани с темата на дисертационния труд

Участия в конференции:

1. 14-16 Май 2012 г., София, България, XI Национална конференция по химия за студенти и докторанти, "Флуоресцентни сензори на база 1,8-нафталимиди", Ст. Йорданова, Ст. Стоянов, И. Петков, И. Грабчев;

2. 5-8 Септември 2012 г., Варна, България, International Conference Advanced Functional materials, "Synthesis and sensing potential of novel 4-amino-7-nitrobenzofurazans", Ст. Йорданова, Ст. Стоянов, И. Петков, И. Грабчев;

3. 27-29 Ноември 2012 г., София, България, Седма работна среща по биологично активни метали, синтетични съединения и природни продукти, "Нови флуоресцентни дендримери като детектори за биологични важни метални йони", Ст. Йорданова, Ст. Стоянов, И. Петков, И. Грабчев;

4. 04-07 Април 2013 г., Плевен, България, Workshop "Materials for Clean Energy and Optics" . "Spectral investigation of coordination of cuprum cations and protons at PAMAM dendrimers modified with 1,8-naphthalimide units", Ст. Йорданова, Ст. Стоянов, И. Петков, И. Грабчев;

5. 15-17 Май 2013 г. , София, България, XII Национална конференция по химия за студенти и докторанти, "Синтез и спектрални характеристики на нови 1,8-нафталимиди като сензори за метални катиони и протони", Ст. Йорданова, Ст. Стоянов, И. Петков, И. Грабчев, И. Иванов;

6. 22-25 Юни 2013 г., Варна, България, Workshop "Materials for Environmental Protection" . "Sensitivity of a new 1,8-naphthalimide cation sensor as function of PET blocking and complex binding constant", Ст. Йорданова, Ст. Стоянов, И. Петков, Ст. Станимиров, И. Грабчев;

7. 21-25 Октомври 2013 г., Атина, Гърция, COST TD 1102 Training School on "Phototech for Biosensors and Energy", "Sensitivity of a new 1,8-naphthalimide cation sensor as function of PET blocking and complex binding constant", Ст. Йорданова, Ст. Стоянов, И. Петков, Ст. Станимиров, И. Грабчев;

8. 14-16 Май 2012 г., София, България, XI Национална конференция по химия за студенти и докторанти, "Синтез и спектрални свойства на нови рН чувствителни ПАМАМ дендримери", В. Милушева, Ст. Стоянов, И. Петков, Ст. Йорданова, И. Грабчев;

9. 5-8 Септември 2012 г., Варна, България, International Conference Advanced Functional materials, "Detection of biologically important metal ions and protons by fluorescent dendrimers". В. Милушева, Ст. Стоянов, И. Петков, Ст. Йорданова, И. Грабчев;

10. 20 Ноември 2013 г., София, България. V Научна конференция „Предизвикателства пред съвременната химия и фармация“, "Моделни заместители в нафталимиди. Оптични свойства и приложения", Ст. Стоянов, Ст. Йорданова, И. Петков, П. Петров.