



УДК 544.35+547.633.6

© 2010

А. В. Бирюков, А. В. Лебедь, Н. О. Мчедлов-Петросян

О возможности существования в ряду производных флуоресцеина лактонной формы дианиона

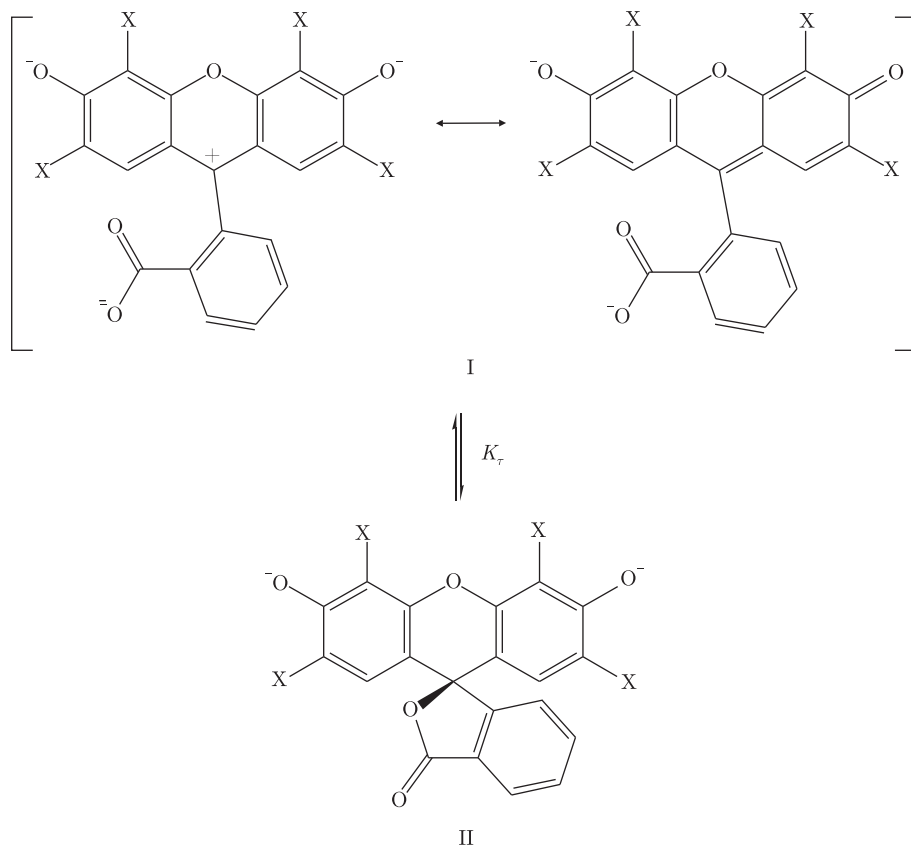
(Представлено академиком НАН Украины Г. Л. Камаловым)

*Теоретично вивчено таутомерні рівноваги двозарядних аніонів флуоресцеїну, еозину й 2,4,5,7-тетранітрофлуоресцеїну. Проведено розрахунки енергії таутомерів у газовій фазі та в розчинах з використанням ab initio квантово-механічного методу B3LYP/6-31++G** і моделі поляризованого континууму. Зроблено висновки стосовно відносної стабільності двох форм діаніона: від повного переважання хіноїдної форми для незаміщеного флуоресцеїну до істотного переважання лактонної форми для 2,4,5,7-тетранітрофлуоресцеїну у водних та диметилсульфоксидних розчинах, що знаходиться у згоді з експериментом.*

Флуоресцеиновые красители находят широкое применение в аналитической химии, биохимии, медицине и других областях [1–3]. Несмотря на огромное число работ, посвященных изучению свойств этих соединений в растворах, внимание исследователей к данному вопросу не ослабевает [4–8].

Флуоресцеин и его производные в зависимости от pH среды могут находиться в растворах в форме катиона, моноаниона, дианиона и нейтральных молекул. При этом нейтральная и анионные формы могут существовать в виде различных таутомеров [1, 6, 9, 10]. В настоящем сообщении рассматриваются дианионы флуоресцеина и его производных, представляющие наибольший интерес в связи с их интенсивной флуоресценцией [1, 9, 10].

До недавнего времени считалось, что дианионы флуоресцеина и эозина в водных и диметилсульфоксидных растворах существуют только в виде глубоко окрашенных и флуоресцирующих хиноидных таутомеров (I), условно представленных на схеме в виде различных граничных структур [1–10]:



Флуоресцеин: X = H; эозин: X = Br; 2,4,5,7-тетранитрофлуоресцеин: X = NO₂;
структура: I — хиноидная, II — лактонная.

Однако появилась публикация [11], в которой гипотетически рассматривается возможность существования лактонного дианиона флуоресцеина (II). В то же время, как стало известно [12], в случае 2,4,5,7-тетранитрофлуоресцеина дианион лактонного строения (II) не только существует, но и является преобладающей структурой в растворах указанного соединения. Это подтверждается также и появлением интенсивной полосы поглощения $\nu(\text{C}=\text{O}) = 1765 \text{ см}^{-1}$ в ИК-спектре диметилсульфидного раствора [12].

Цель данной работы — изучение возможности существования дианиона-лактона в ряду производных флуоресцеина в воде и диметилсульфоксиде (ДМСО) с применением современных квантово-химических подходов и сопоставление результатов расчетов с известными экспериментальными фактами. Для этого нами проведены *ab initio* квантово-механические расчеты указанных структур. Геометрию дианионов красителей оптимизировали в рамках метода теории функционала плотности (DFT) с использованием гибридного функционала B3LYP с базисным набором 6-31++G(d,p). Расчеты выполнены как для вакуума, так и с учетом растворителя, согласно модели поляризованного континуума (PCM) [13]. В рамках этой модели, которая является квантово-механическим развитием модели самосогласованного реактивного поля Онзагера, растворитель представляется как континуум, обладающий определенными значениями диэлектрической проницаемости и поляризуемости, а его микроскопическая структура не учитывается. Для проведения расчетов использован программный пакет Gaussian 03 [14].

Стандартная свободная энергия (ΔG_s^0) каждой структуры в растворе вычислялась как сумма свободной энергии в газовой фазе (ΔG_g^0) и свободной энергии сольватации (ΔG_{solv}^0):

$$\Delta G_s^0 = \Delta G_g^0 + \Delta G_{solv}^0.$$

Под стандартной свободной энергией в данном случае понимается разница в энергии относительно состояния, в котором ядра и электроны полностью разделены в вакууме при температуре 0 К [11].

Стандартную свободную энергию в газовой фазе определяли по формуле

$$\Delta G_g^0 = \Delta E_0 + \Delta(ZPE) + \Delta G_{0 \rightarrow 298}^0.$$

Энергия нулевой точки ($\Delta(ZPE)$) и изменение свободной энергии от 0 к 298 К ($\Delta G_{0 \rightarrow 298}^0$) рассчитывались из колебательных частот. Стандартная свободная энергия сольватации вычислялась с использованием РСМ как разность между значениями энергии сольватации в среде с низкой ($\epsilon = 1$) и высокой диэлектрической проницаемостью ($\epsilon_{H_2O} = 78,39$, $\epsilon_{DMCO} = 46,70$). В РСМ энергию сольватации рассчитывали как сумму трех вкладов:

$$E_{solv} = E_{el} + E_{disp} + E_{cav}.$$

где E_{el} — энергия электростатического взаимодействия между собственными и наведенными зарядами растворенного соединения и молекулами растворителя; E_{disp} — дисперсионная составляющая энергии взаимодействия, учитывающая вандерваальсовское взаимодействие; E_{cav} — так называемая кавитационная энергия, т.е. энергия реорганизации растворителя, необходимая для образования полости, в которой помещается растворенное соединение.

Константу таутомеризации $K_\tau = [II]/[I]$ находили, согласно выражению

$$\ln K_\tau = -\frac{\Delta G_{I \rightarrow II}^0}{RT}.$$

Для незамещенного дианиона флуоресцеина в вакууме, а также в ДМСО и воде расчет показывает наличие лишь формы I. Оптимизация геометрии, производимая от начальной структуры II, приводит к структуре I.

Для дианиона эозина в вакууме наблюдается та же ситуация: расчетом фиксируется только структура хинона. Расчет с учетом сольватации в воде дает стабильные структуры как для хиноидной, так и для лактонной форм с преобладанием первой, с разницей в свободной энергии на $\Delta G = 23,84$ кДж/моль. Соответственно K_τ составляет $6,6 \cdot 10^{-5}$, что говорит о практически полном преобладании структуры I. Для ДМСО результат расчета показывает преобладание хиноидной формы на $\Delta G = 27,47$ кДж/моль; K_τ составляет $1,5 \cdot 10^{-5}$.

Для 2,4,5,7-тетранитрофлуоресцеина в вакууме наблюдается только лактонная форма. Оптимизация геометрии, производимая от начальной структуры I, приводит к структуре II. Таким образом, здесь ситуация противоположна случаю незамещенного флуоресцеина и эозина. Учет сольватной модели воды дает стабильные структуры как для хиноидной, так и для лактонной форм с преобладанием последней, с разницей в свободной энергии на $\Delta G = -18,57$ кДж/моль. Соответственно K_τ составляет $1,8 \cdot 10^3$, что говорит о значительном

Таблица 1. Результаты расчетов свободной энергии для структур I и II флуоресцеина, эозина и 2,4,5,7-тетранитрофлуоресцеина с различными моделями растворителя

Структура	Значение стандартной свободной энергии, кДж/моль			$\Delta G_{I \rightarrow II}$, кДж/моль		K_T	
	вакуум	ДМСО	H ₂ O	ДМСО	H ₂ O	ДМСО	H ₂ O
Флуоресцеин:							
I	-3003309,66	-3003965,59	-3003977,06	—	—	—	—
II	Не обн.	Не обн.	Не обн.	—	—	—	—
Эозин:							
I	-30005563,76	-30006165,15	-30006178,29	—	—	—	—
II	Не обн.	-30006137,68	-30006154,45	27,47	23,84	$1,5 \cdot 10^{-5}$	$6,6 \cdot 10^{-5}$
2,4,5,7-Тетранитрофлуоресцеин:							
I	Не обн.	-5151627,20	-5151641,37	—	—	—	—
II	-5151056,80	-5151647,32	-5151659,94	-20,12	-18,57	$3,3 \cdot 10^3$	$1,8 \cdot 10^3$

преобладании структуры II. Расчет в ДМСО показывает преобладание формы II на $\Delta G = -20,12$ кДж/моль; K_T составляет $3,4 \cdot 10^3$ (табл. 1).

Многочисленные экспериментальные работы [1–10] не фиксируют присутствия структуры II в растворах дианиона флуоресцеина и эозина. Теоретическое исследование [11] также свидетельствует о невозможности существования дианиона-лактона в случае флуоресцеина, а эозин в ней не рассматривался. Напротив, для 2,4,5,7-тетранитрофлуоресцеина экспериментом не фиксируется присутствие хиноидной формы (II) [12].

Наш результат также показывает невозможность существования дианиона-лактона при незамещенном флуоресцеине. Однако в случае эозина может существовать стабильная структура дианиона-лактона, но она энергетически невыгодна настолько, что доля молекул, существующих в растворе в такой форме, экспериментально необнаружима. Вероятно, некоторое оттягивание электронной плотности с центрального атома в сторону заместителя брома несколько стабилизирует структуру дианиона-лактона, позволяя ей быть относительно стабильной, в сравнении со случаем незамещенного флуоресцеина. В полную силу этот эффект проявляется для 2,4,5,7-тетранитрофлуоресцеина дианиона-лактона, который, согласно нашим расчетам, является не только стабильной, но и преобладающей структурой в воде и ДМСО, что и подтверждается экспериментальными исследованиями электронных спектров поглощения, а также ИК-спектров [12] 2,4,5,7-тетранитрофлуоресцеина. В отличие от обычных лактонов соединений ксантенового ряда, бесцветных в связи с sp^3 -гибридизацией центрального атома углерода, двухзарядный анион-лактон этого красителя окрашен в желтый цвет (в зависимости от использованного растворителя максимум поглощения в области 403–441 нм) благодаря наличию нитрофенольных фрагментов.

Следовательно, можно утверждать, что *ab initio* расчет методом DFT B3LYP с базисным набором 6-31++G(d,p) вполне адекватно описывает наблюдаемые в эксперименте формы таутомеров в растворах флуоресцеина, эозина и 2,4,5,7-тетранитрофлуоресцеина.

1. *Haugland R. P.* Handbook of Fluorescent Probes and Research Products. 9th ed. – Eugene: Molecul. Prob., Inc., 2002. – 966 p.
2. *Burdette S. C., Frederickson C. J., Bu W., Lippard S. A. J.* ZP4, an improved neuronal Zn^{2+} sensor of the Zinpyr family // *J. Am. Chem. Soc.* – 2003. – **125**, No 7. – P. 1778–1787.
3. *Zumbuehl A., Jeannerat D., Martin S. E. et al.* An Amphotericin B-Fluorescein Conjugate as a Powerful Probe for Biochemical Studies of the Membrane // *Angew. Chem. Int. Ed.* – 2004. – **43**, No 39. – P. 5181–5185.
4. *Crovetto L., Paredes J. M., Rios R. et al.* Photophysics of a Xanthenic Derivative Dye Useful as an “On/Off” Fluorescence Probe // *J. Phys. Chem. A* – 2007. – **111**, No 51. – P. 13311–13320.
5. *Lavis L. D., Rutkovski T. J., Raines R. T.* Tuning the pK_a of fluorescein to optimize binding assays // *Anal. Chem.* – 2007. – **79**, No 17. – P. 6775–6782.
6. *Aschi M., D’Archivio A. A., Fontana A., Formigli A.* Physicochemical Properties of Fluorescent Probes: Experimental and Computational Determination of the Overlapping pK_a Values of Carboxyfluorescein // *J. Org. Chem.* – 2008. – **73**, No 9. – P. 3411–3417.
7. *Zhang X., Liu Q., Son A. et al.* Photophysical properties of dibenzofluorescein and the presence of its tautomers or prototropic forms in organic solvents // *Photochem. Photobiol. Sci.* – 2008. – **7**, No 3. – P. 299–302.
8. *Niazi A., Yazdanipour A., Ghasemi J. et al.* Spectrophotometric Investigation of the Acidity Constants of Fluorescein in Various Water-organic Solvent Media // *Chem. Eng. Comm.* – 2008. – **195**, No 10. – P. 1257–1268.
9. *Krasovitskii B. M., Bolotin B. M.* Organic Luminescent Materials. – Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft GmbH, 1988. – 331 p.
10. *Mchedlov-Petrosyan N. O., Kukhtik V. I., Bezugliy V. D.* Dissociation, tautomerism and electroreduction of xanthene and sulfonephthalein dyes in N, N-dimethylformamide and other solvents // *J. Phys. Org. Chem.* – 2003. – **16**, No 7. – P. 380–397.

11. Jang Y. H., Hwang S., Chung D. S. Tautomeric Equilibrium of Fluorescein in Solution: Ab Initio Calculations // Chem. Lett. – 2001. – **30**, No 12. – P. 1316–1317.
12. Mchedlov-Petrosyan N. O., Vodolazkaya N. A., Surov Yu. N., Samoylov D. V. 2,4,5,7-Tetranitrofluorescein in solutions: novel type of tautomerism in hydroxyxanthene series as detected by various spectral methods // Spectrochim. Acta. Part A. Mol. Biomol. Spectrosc. – 2005. – **61**, No 11./12. – P. 2747–2760.
13. Barone V., Cossi M., Tomasi J. Ab initio study of ionic solutions by a polarizable continuum dielectric model // J. Chem. Phys. – 1997. – **107**, No 8. – P. 3210–3221.
14. Frisch M. J., Trucks G. W., Schlegel H. B., Scuseria G. E., Robb M. A., Cheeseman J. R., Montgomery J. A., Vreven Jr. T., Kudin K. N., Burant J. C., Millam J. M., Iyengar S. S., Tomasi J., Barone V., Mennucci B., Cossi M., Scalmani G., Rega N., Petersson G. A., Nakatsuji H., Hada M., Ehara M., Toyota K., Fukuda R., Hasegawa J., Ishida M., Nakajima T., Honda Y., Kitao O., Nakai H., Klene M., Li X., Knox J. E., Hratchian H. P., Cross J. B., Adamo C., Jaramillo J., Gomperts R., Stratmann R. E., Yazyev O., Austin A. J., Cammi R., Pomelli C., Ochterski J. W., Ayala P. Y., Morokuma K., Voth G. A., Salvador P., Dannenberg J. J., Zakrzewski V. G., Dapprich S., Daniels A. D., Strain M. C., Farkas O., Malick D. K., Rabuck A. D., Raghavachari K., Foresman J. B., Ortiz J. V., Cui Q., Baboul A. G., Clifford S., Cioslowski J., Stefanov B. B., Liu G., Liashenko A., Piskorz P., Komaromi I., Martin R. L., Fox D. J., Keith T., Al-Laham M. A., Peng C. Y., Nanayakkara A., Challacombe M., Gill P. M. W., Johnson B., Chen W., Wong M. W., Gonzalez C., Pople J. A. Gaussian 03, Revision E. 1. – Pittsburgh, PA: Gaussian, 2003.

Харьковский национальный университет
им. В. Н. Каразина

Поступило в редакцию 16.10.2009

A. V. Biryukov, A. V. Lebed, N. O. Mchedlov-Petrosyan

On the possibility of the existence of the lactonic dianion form in the series of fluorescein derivatives

*We study the tautomeric equilibria of double-charged anions of fluorescein, eosin, and 2,4,5,7-tetranitrofluorescein. The energies of tautomers in the gas phase and a solution are calculated using ab initio quantum-chemical methods B3LYP/6-31++G** and PCM. Conclusions are made concerning the relative stability of two dianionic species: from the complete predominance of the quinoid form for unsubstituted fluorescein to the essential prevalence of the lactonic form for 2,4,5,7-tetranitrofluorescein in both aqueous and DMSO solutions, in line with experimental data.*