



1949

Intelligens fluoreszcens vegyületek előállítása és vizsgálata

Egyetemi doktori (PhD) értekezés

Szerző:

Kovács Sándor Lajos

Témavezető:

Dr. Nagy Miklós

DEBRECENI EGYETEM

Természettudományi és Informatikai Doktori Tanács

Kémia Tudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2021

*Ezen értekezést a Debreceni Egyetem Természettudományi és Informatikai Doktori Tanács **Kémia Tudományok** Doktori Iskola **K/4** programja keretében készítettem a Debreceni Egyetem természettudományi/műszaki doktori (PhD) fokozatának elnyerése céljából.*

Nyilatkozom arról, hogy a tézisekben leírt eredmények nem képezik más PhD disszertáció részét.

Debrecen, 2021 október 21.

a jelölt aláírása

*Tanúsítom, hogy **Kovács Sándor Lajos** doktorjelölt 2018- 2021. között a fent megnevezett Doktori Iskola **K/4**.programjának keretében irányításommal végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult. Nyilatkozom továbbá arról, hogy a tézisekben leírt eredmények nem képezik más PhD disszertáció részét.*

Az értekezés elfogadását javasolom.

Debrecen, 2021 október 21.

a témavezető aláírása

INTELLIGENS FLUORESZCENS VEGYÜLETEK ELŐÁLLÍTÁSA ÉS VIZSGÁLATA

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében
a *kémia* tudományágban

Írta: *Kovács Sándor Lajos* okleveles vegyészmérnök

Készült a Debreceni Egyetem Kémia Tudományok Doktori Iskolája
(*Makromolekuláris és felületi kémia* programja) keretében

Témavezető: *Dr. Nagy Miklós*

Az értekezés bírálói:

.....
.....

A bírálóbizottság:

elnök: Dr.
tagok: Dr.
Dr.
Dr.
Dr.

Az értekezés védésének időpontja: 20.....

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	1
2. Irodalmi áttekintés	4
2.1. <i>Intelligens anyagok</i>	4
2.1.1. Intelligens anyagok típusai	4
2.1.2. Intelligens anyagok csoportosítása	5
2.1.3. Intelligens anyagok alkalmazási területei	5
2.1.4. Fluoreszcens vegyületek, mint intelligens anyagok alkalmazása.....	8
2.2. <i>Fluoreszcencia</i>	8
2.2.2. A Jablonski-diagram.....	11
2.2.3. Fluoreszcens vegyületek kutatásának alapja	12
2.2.4. Szolvatokróm vegyületek	14
2.3. <i>Szolvatokróm effektus kvantitatív leírása</i>	16
2.3.1. Fluoreszcens élettartam és kvantumhasznosítási tényező	16
2.3.2. Fluoreszcencia kioltás	18
3. Eredmények	24
3.1. <i>Egy izocianobifenil alapú, kék fényt emittáló, szolvatokróm fluorofor előállítás és vizsgálata</i>	24
3.1.1. UV-látható optikai tulajdonságok.....	25
3.1.2. Fluoreszcencia mérések.....	27
3.1.3. A szolvatokróm viselkedés matematikai leírása.....	32
3.1.3.1. A termékek oldószer kölcsönhatásának értelmezése a Lippert - Mataga elmélet szerint.....	32
3.1.3.2. A termékek szolvatokróm viselkedésének Kamlet - Taft leírás szerinti értelmezése:	34
3.1.3.3. A termékek szolvatokróm viselkedésének értelmezése a Catalán leírás szerint	36
3.1.4. Az ICAB származékok kvantumkémiai vizsgálata	39
3.2. <i>Izociano-aminoakridin alapú fluoreszcens vegyületcsalád, mint kémiai svájci bicska</i>	42
3.2.1. Optikai tulajdonságok.....	43
3.2.2. Az ICAAc származékok sav-bázis viselkedésének vizsgálata vizes közegben	47

3.2.3.	A pH - függés matematikai leírása	51
3.2.4.	A diMICAAC felhasználása pH meghatározására	52
3.2.5.	Kritikus micellaképződési koncentráció meghatározása	55
3.2.6.	A diMICAAC komplexképzése Ag(I)-ionokkal.	58
3.3.	<i>Hg(II) és Ag(I) ionok kimutatására alkalmas izocianonfataлин alapú szolvatokróm fluoroforok</i>	61
3.3.1.	Az ICAN-származékok viselkedése különböző fémionok jelenlétében	62
3.3.2.	A Hg(II) detektálás lehetséges mechanizmusa	65
3.3.3.	Reakcióidő és stabilitás	66
3.3.4.	Az analitikai tartomány, kimutatási határ és mennyiségi meghatározási határ meghatározása	67
3.3.5.	A módszer tesztelése fogászati amalgámon	70
3.3.6.	Különböző anionok és Bi ³⁺ , Fe ³⁺ és Cu ²⁺ hatása	71
3.3.7.	Hg ²⁺ kimutatása Ag ⁺ mellett.....	72
3.3.8.	Hg ²⁺ detektálása csap- és ásványvízben	72
3.4.	<i>Az ICAN izomerek szubsztitúciós pozíciójának hatása a fotofizikai tulajdonságokra.....</i>	74
3.4.1.	Az ICAN-izomerek UV-látható abszorpciós tulajdonságai	75
3.4.2.	Az ICAN-izomerek fluoreszcens tulajdonságai	78
4.	Anyag és módszer	86
4.1.	<i>Felhasznált anyagok.....</i>	86
4.2.	<i>Alkalmazott módszerek</i>	87
4.2.2.	UV - látható spektroszkópia	87
4.2.3.	Fluoreszcenciás mérés	87
4.2.4.	ESI.....	88
4.2.5.	Job ábra.....	88
4.2.6.	Kimutatási határ (Limit Of Detection, LOD) és meghatározási határ (Limit Of Quantitation LOQ)	88
4.2.7.	Számítási módszerek	89
4.2.8.	Szelektivitás meghatározása	89
4.3.	<i>Szintézis</i>	90
4.3.1.	4-amino-4'-izocianobifenil előállítás.....	90

4.3.2.	4-(N-metilamino)-4'-izocianobifenil (monoMICAB) és 4-(N,N-dimetilamino)-4'-izocianobifenil (diMICAB) szintézise	90
4.3.3.	3-amino-6-izocianoakridin (ICAAc)	91
4.3.4.	3-N-metilamino-6-izocianoakridin (monoMICAAC) és 3-N,N-dimetilamino-6-izocianoakridin(diMICAAC)	92
4.3.5.	1-amino-4-izocianonaftalin előállítása	92
4.3.6.	2-amino-6-izocianonaftalin	93
5.	Összefoglalás	94
6.	Summary	97
7.	Irodalomjegyzék	103

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, *Dr. Nagy Miklós* egyetemi docensnek, hogy mindvégig figyelemmel kísérte a munkámat, és bármilyen szakmai problémával, kérdéssel nyugodtan fordulhattam hozzá.

Köszönetemet fejezem ki, *Prof. Dr. Kéki Sándornak*, az Alkalmazott Kémiai Tanszék vezetőjének, hogy lehetővé tette kutatásaink elvégzését.

Köszönöm *Dr. Rácz Dávid* támogatását, hogy mindvégig figyelemmel kísérte munkámat, és hasznos tanácsokkal látott el.

Hálával tartozom *Dr. Nagy Tibornak*, akire mindig lehetett számítani a tömegspektrometriás vizsgálatoknál. Köszönöm *Dr. Kuki Ákosnak* a folyamatos támogatást és a számtalan hasznos tanácsot.

Hálával tartozom az Alkalmazott Kémiai Tanszék összes többi munkatársának is, hogy a munkám elvégzéséhez baráti légkört biztosítottak, valamint mindazoknak, akik valamilyen formában hozzájárultak ezen dolgozat elkészítéséhez.

Köszönettel tartozom továbbá *Dr. Fehér Péternek* a kvantumkémiai számításokért.

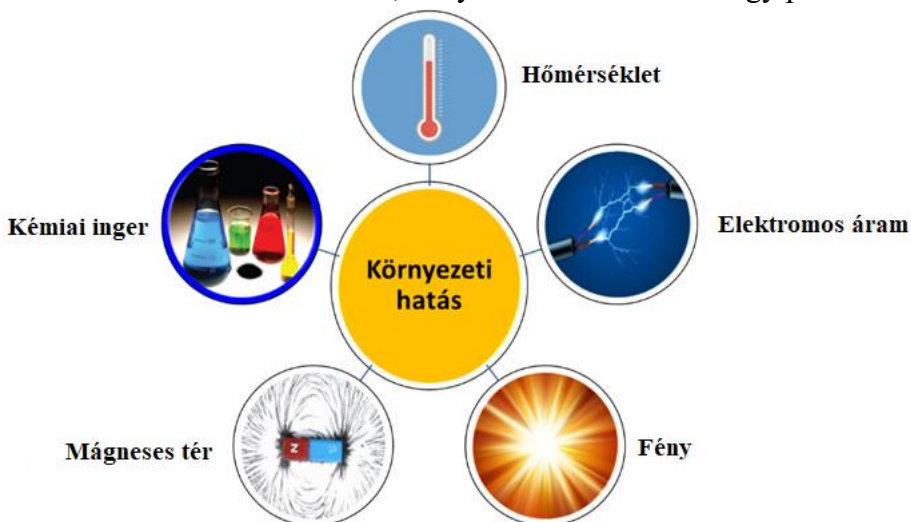
Köszönetemet fejezem ki *családomnak* a nyugodt légkör biztosításáért és a támogatásért, amely nélkül ez a disszertáció nem jöhetett volna létre.

1. Bevezetés

Mindennapi életünkben is egyre inkább előtérbe kerülnek az intelligens anyagok, melyek az élő anyaghoz hasonlóan képesek a környezeti változásokhoz alkalmazkodni.^[1] Széles körben alkalmazzák őket például textíliák bevonására^[2], elektrotechnikában, öngyógyuló rendszerekben, valamint biológiai és kémiai védőeszközökben.^{[3][4]}

Intelligensnek nevezzük azokat az anyagokat, amelyek szabályozott, előre kiszámítható módon reagálnak az őket körülvevő környezetből érkező ingerekre (1. ábra). Ilyen környezeti inger lehet a hőmérséklet, az elektromos áram, a mágneses tér, a fényváltozás stb.

Csoportosításuk leggyakrabban a fenti megállapítások alapján történik, ily módon a teljesség igénye nélkül megemlíthetünk fotokróm-, termokróm-, elektrolumineszcens-, foszforeszcens-, vagy közismertebb néven foszforeszkáló anyagokat, vezető polimereket, piezoelektromos anyagokat, illetve alakemlékező rendszereket, melyek lehetnek fémek vagy polimerek is.



1. ábra: Az intelligens anyagok viselkedését befolyásoló környezeti hatások.

Az elektrolumineszcens anyagok elektromos áram hatására fénylenek, míg a foszforeszcens anyagok UV, röntgen vagy más nagyenergiájú fény besugárzásával világítanak, azonban míg az elektrolumineszcens rendszerek az áramforrás megszűnésével nem világítanak tovább, addig a foszforeszkáló anyagok, változó relaxációs idő alatt, folyamatosan halványulnak el.

A foszforeszcens anyagokhoz nagyon hasonló elven működnek a fluoreszcens rendszerek, azonban a gerjesztő fény megszűnésével (UV, röntgen vagy más nagy energiájú fény) nagyon rövid, pár nanoszekundumos relaxációt követően az intelligens közeg fénye teljes egészében megszűnik. A gerjesztő fény hatására fényemisszióra képes intelligens anyagokat fluoroforoknak nevezük.

Egy további csoportját alkotják az „intelligens” fluoroforoknak azok, amelyek emissziós tulajdonságai, úgymint a kibocsátott fény színe és intenzitása, az oldószer polaritásával^[5] vagy a mikrokörnyezet változásával^[6] arányosan módosulnak. Ezáltal előnyösen alkalmazhatók sejtjelölőként, különféle felületaktív anyagok kritikus micellaképződési koncentrációja (CMC) meghatározására^[7], a biológiai membránok viszkozitásmérésén át^{[8][9]} a fehérje kölcsönhatások monitorozásáig^{[10][11]}. Azon fluoroforokat, melyek fényemissziója különösen érzékeny a polaritásra, mikrokörnyezetük megváltoztatja az általuk kibocsátott fény hullámhosszát, szolvatokróm fluoroforoknak hívják^[12]. Az ilyen molekulák általában egy elektron-donor (donor, D) és egy elektron-szívó (akceptor, A) csoportot tartalmaznak, amelyek között általában egy aromás π -elektronrendszeren keresztül töltésmegoszlás megy végbe. Ilyen rendszerek főként többgyűrűs aromás vázzal, mint pl. naftalin vagy fluorén rendelkeznek.

A szolvatokróm tulajdonság, tehát valamely aromás magon lévő elektronszívó (pl. karboxil, szulfonil), illetve elektronküldő (pl. amino, hidroxil) csoport közti töltésmegoszláson alapszik. Minél nagyobb az alapállapot és a gerjesztett állapot közötti dipólusmomentum különbség, annál nagyobb mértékű a szolvatokróm jelleg az adott molekulára. A dipólusmomentum mértéke a két csoport közötti távolság (axiális tengelyen) növelésével vagy a funkciós csoportok cseréjével módosítható, ahogy ezt Kucherak és munkatársai is bemutatták a PRODAN (2-propionil-6-dimetilaminonaftalin^[13] naftalin vázát fluorén^[14] vázra cserélve. A Stokes-eltolódás így a kiindulási vegyületre számított jellemző dupláját eredményezte.

A D- π -A típusú szolvatokróm fluoroforok működése tehát az elektronsűrűség eltolódásán alapszik a donor csoportról az akceptor részhez a π -rendszeren keresztül. Gerjesztéskor egy úgynevezett intramolekuláris töltésátadásra (ICT) kerül sor^{[15][16][17][18]}, mely növeli a gerjesztett állapot dipólusmomentumát az alapállapothoz viszonyítva. Optikai tulajdonságaik

továbbá nem csak a közeg „tömb” tulajdonságaitól függenek, hanem a rendszer mikrokörnyezetétől is, így alkalmasak fluoreszcens mikroszkópiás alkalmazásra vagy biológiai sejtalkotók szelektív jelölésére is.^{[19][20]}

A szolvatokróm festékanyagoknak, mint intelligens anyagoknak, nem csak a biológiai alkalmazása jelentős, kiválóan alkalmazhatóak szenzorokban, molekuláris elektronikai eszközökben, okos kijelzőkben, fotovoltaiikus rendszerekben stb. Megfelelő analitikus jelenlétében, fluoreszcencia kioltási jelenségeiket kihasználva, akár kvalitatív és kvantitatív meghatározásra^[21] vagy szerkezetvizsgálatra is^[22] használhatók.

Kutatócsoportunk az elmúlt években nagy sikereket ért el egy amino-izocianonaftalin (ICAN) alapú szolvatokróm fluorofor család fejlesztésében. Az 1,5-ICAN a Prodanhoz, az egyik legismertebb szolvatokróm festékhez hasonlóan nagy szolvatokróm és Stokes-eltolódással rendelkezik^[23] és gyakorlati alkalmazhatósága is rendkívül széles egyszerű felépítése ellenére. „Rendszertanilag” az izocianoaminoarének közé sorolható, melyekből egyszerű felépítésük és szintézisük ellenére csupán néhány vegyületet állítottak elő és tanulmányoztak a közelmúltban, valószínűleg az izociano csoportot tartalmazó vegyületek közismerten elviselhetetlen szaga miatt. Ennek ellenére az általunk készített ICAN-származékok szagtalanok. Mivel ezen vegyületcsalád még fehér folt a spektroszkópia térképén, minden itt elért eredmény gyorsan publikálható és/vagy alkalmazható. Véleményünk szerint ezek a vegyületek számos potenciális lehetőséget rejthetnek magukban, melyek alkalmassá tehetik azokat sokoldalú, intelligens festékként történő felhasználáshoz.

Célul tűztük ki ezért a már meglévő 1,5-ICAN festékcsoportunkból kiindulva új, gyakorlati szempontból is fontos izocianoaminoarének előállítását, vagy az aromás mag vagy a szubsztituensek módosításával. Továbbá a kapott vegyületek részletes fotofizikai vizsgálatát, valamint gyakorlati alkalmazások feltérképezését az analitikától, a sejtfestésen át a gyógyászatig.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. *Intelligens anyagok*

Az anyagtudomány fejlődésével számos jó minőségű és költséghatékony anyag kerül alkalmazásra az élet szinte minden területén. Az elmúlt évtizedekben az egyes alapanyagoknak multifunkcióssá kellett válniuk, amely irány főként a kompozitok kialakulásához vezetett. Ez egy forradalmi lépés volt az intelligens anyagok kialakulásához és azok előnyös tulajdonságainak felismeréséhez. Ezek révén a hagyományos szerkezeti és alapanyagok kiszorulnak a mindennapi alkalmazásból és helyüket az intelligens anyagok veszik át. Az ilyen anyagok képesek alkalmazkodni a külső ingerekhez, mint például a környezet megváltozása.^[24] Ilyen környezeti változás lehet a hőmérséklet, nyomás, elektromos- vagy mágneses tér, kémiai inger, radioaktív bomlás vagy a hidrosztatikai nyomás. Ezekre az ingerekre az egyes intelligens anyagcsoportok alakjuk-, rugalmasságuk-, viszkozitásuk megváltozása révén reagálnak.^[25]

Az "intelligens" jelző az anyag önalkalmazkodására, önérzékelésére, memóriájára vagy szerkezetében végbemenő változásra utal. Ezek, mint lehetőségek jelennek meg az alkalmazásuk terén, így számtalan új lehetőség rejlik ezekben az anyagokban.

2.1.1. Intelligens anyagok típusai

Ezen anyagok egy vagy több tulajdonságának célzott megváltoztatását külső ingerek segítségével érhetjük el. Ezek alapján beszélhetünk szenzorokról, szelepekről, valamint irányított mechanizmusokról, melyeknél az inger létrejöttével közel egyidejűleg végbemegy a kívánt változás, majd az inger megszűnésével azonnal, vagy beláthatón rövid időn belül visszatér az anyag eredeti állapotába.

A fenti megállapításnak megfelelnek például a *piezoelektromos* anyagok, melyekben elektromos áram indukálódik mechanikai feszültség hatására. A folyamat visszafelé is lejátszódik: az anyagban nő a mechanikai feszültség (hajlik, megnyúlik, összemegy), ha elektromos áramot vezetünk át rajta.

Az intelligens anyagok egy másik típusát képezik az alakmemória ötvözetek vagy polimerek, amik a hőmérsékeltől függően más és más alakot

vesznek fel. Például a nitinol (nikkel és titán ötvözet) alkalmazható biomechanikai területen is, mivel olyan jó korrózióállósága, mint a rozsdamentes acélnek. Más területeken is alkalmazhatóak alakmemória ötvözetek vagy –polimerek, úgymint termosztátok, értágítók, szuperelasztikus hálók.

A kromogén rendszerek színváltozással reagálnak elektromos-, hő vagy optikai ingerekre. Ide tartoznak az elektrokóm anyagok, amik színüket vagy fényáteresztő képességüket változtatják elektromos áram változására. Leggyakoribb képviselőik a folyadékkristályos kijelzők (LCD). A fotokróm anyagok, hasonlóan az elektrokróm anyagok tulajdonságaihoz, színüket változtatják meg fényváltozás hatására.

2.1.2. Intelligens anyagok csoportosítása

Alapvetően 2 csoportba oszthatóak: aktív- vagy passzív intelligens anyagok. Fairweather és munkatársai^[26] szerint elektromos áram, mágneses tér vagy hőmérsékletváltozás hatására az alakjuk megváltoztatására képes anyagok aktívak. Ilyenek a piezoelektromos anyagok, ER fluidumok, alakmemória ötvözetek vagy –polimerek.

A másik csoportba tartoznak a passzív intelligens anyagok. Ilyenek a száloptikai vezetékek vagy a fluoroforok.

2.1.3. Intelligens anyagok alkalmazási területei

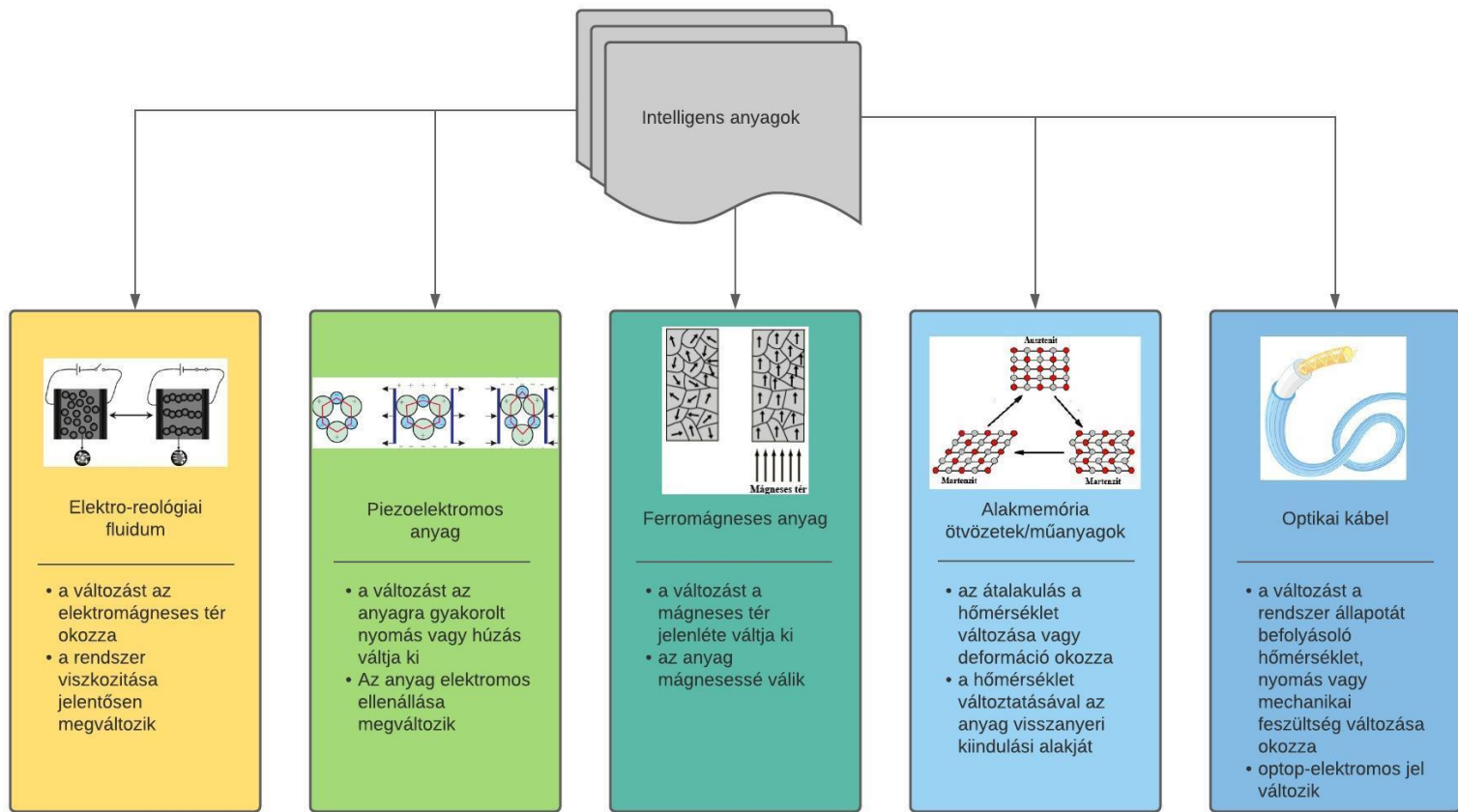
Az intelligens anyagok sokféle területen alkalmazhatóak, mivel a külső ingerekre változatosan reagálnak. Az intelligens anyagok alkalmazási köre magában foglalja az eddig megoldhatatlannak tűnő mérnöki problémákat és lehetőséget kínál merőben új termékek létrehozására. Az intelligens anyagokkal kapcsolatos fontos jellemző, hogy alkalmazásuk az összes tudományos és műszaki területre kiterjed. Az intelligens anyagok műszaki alkalmazásai foglalkoznak száloptikával, hajtóművekkel, érzékelőkkel, mikro-elektromechanikus rendszerekkel (Micro-Electromechanic Systems), rezgésszabályozással, hangszabályozással, alakszabályozással, a termék épségének vagy élettartamának megfigyelésével, valamint gyógyítással beágyazott kompozit anyagokkal. További alkalmazási területek lehetnek a megfigyelés, intelligens feldolgozás, aktív és passzív vezérlés, önjavítás

(öngyógyulás), mesterséges szervek, új indikátorok, tervezett mágnesek, az aeroelasztikus stabilitás és a feszültség eloszlásának csillapítása. Az intelligens anyagokat felhasználhatjuk az autókban, az űreszközökben, rögzített és forgósárnyas repülőgépekben, hadihajókban, polgári építményekben, szerszámgépekben, szabadidős és orvostechikai eszközökben.

Az ezen anyagok által mutatott „intelligencia” általában az anyag összetételével, a speciális feldolgozással, a hibák bevezetésével vagy a mikroszerkezet módosításával programozódik úgy, hogy ellenőrzött módon alkalmazkodjanak az ingerek különböző szintjeihez.

Az intelligens rendszerek érzékelik a környezetet és reagálnak arra, de nem egyetlen anyagból készültek. Ezek tartalmazhatnak okos anyagokat, de a hagyományos technológiával is elkészíthetők. A pacemaker egy intelligens rendszer, amelyet úgy terveztek, hogy a szabálytalan pulzusra reagáljon egy elektromos impulzussal, amely visszaállítja azt az egészséges ütemre. Vardan és munkatársai^[27] arról számoltak be, hogy az intelligens rendszer olyan eszközre vonatkozik, amely érzékeli a környezetében bekövetkező változásokat, és optimálisan képes az anyag tulajdonságainak, geometriájának, mechanikai vagy elektromágneses tulajdonságának megváltozását elérni. Mind az érzékelőt, mind a működtetőt a megfelelő visszacsatolással kell integrálni.

Néhány intelligens anyagot és a hozzájuk kapcsolódó inger-reakciókat a 2. ábra mutatja.



2. ábra: A környezeti változásokhoz rendelt intelligens anyagcsoportok a jellemző tulajdonság változásával.

2.1.4. Fluoreszcens vegyületek, mint intelligens anyagok alkalmazása

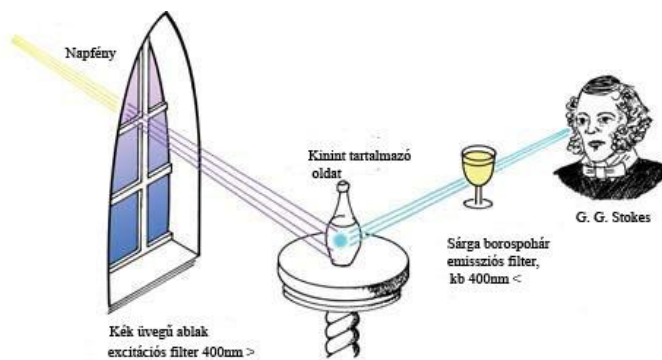
A fluoreszcens anyagok fontos szerepet játszanak a tudományos kutatásban, mivel potenciálisan alkalmazhatók az érzékelők, celluláris képalkotó- és optoelektronikai eszközök területén. A nagy stabilitású és kvantumhozamú, környezetre érzékeny fluoreszcens molekulák iránt egyre nagyobb az igény. A legtöbb hagyományos szerves festékanyag, például a perilén, pirén stb. aggregált- vagy szilárd állapotban nem fluoreszkál, ami korlátozza gyakorlati alkalmazásukat. A fluoreszcencia-intenzitás csökkenését a molekuláris aggregáció által indukált π - π -halmazódás (stacking) okozza. A molekuláris kölcsönhatások finomhangolása új fluoreszcens anyagok kifejlesztéséhez vezethet, amelyek jelentős mennyiségű fényt bocsátanak ki az aggregátumban (nanorészecskék) vagy szilárd állapotban is.

Optoelektronikai területen történő alkalmazásuk is igen ígéretes, hiszen jónéhány szabadalmat találhatunk például mobilba épített fluoreszcens képalkotó kamera^[28], vagy fluoreszcens szkener^[29]. Azonban szélesebb körben alkalmazzák őket analitikai^[30], biológiai^[31] és egészségügyi^[32] célokra is.

2.2. Fluoreszcencia

A fluoreszcenciát már a 19. század közepén felfedezték: Sir John Frederick William Herschel volt az első 1845-ben, aki megfigyelte a jelenséget. A kísérlet során Sir Herschel egy üveg tonikot tett ki a napfényre, aminek a felülete kék színnel világított. Ő az akkori tudományos ismeretek alapján nem tudta a jelenséget megmagyarázni. Ezt a szokatlan jelenséget újrvizsgálta Sir G. G. Stokes 1852-ben, és már magyarázattal is tudott szolgálni. Stokes egy prizma segítségével a napfényt alkotóelemeire bontotta. Amikor egy kininszulfát oldattal teli üveget tett a látható fény útjába, látszólag semmi nem történt, viszont amikor az ibolya spektrumtartomány útjába tette, az oldat kéken világított (3. ábra). Amennyiben az üveget a beeső napfény irányába állítjuk, és kevésbé poláros oldószert, például alkoholt adunk a rendszerhez, annak dielektromos állandója lecsökken, így jobban látható a kék fény. A kinin gerjesztését a napfényben lévő ultraibolya fény teszi lehetővé. Amikor a kinin visszatér alapállapotba, a kibocsátott fény hullámhossza körülbelül 450 nm.

Ez a kísérlet arra engedte következtetni, hogy a fényelnyelést fénykibocsátás követi. Kijelentette, hogy az emittált fény hullámhossza mindig nagyobb, mint a gerjesztő fény hullámhossza. Ez később Stokes-törvényként vált ismeretessé.



3. ábra: Sir G.G. Stokes vizsgálata a kinin tartalmú oldaton.

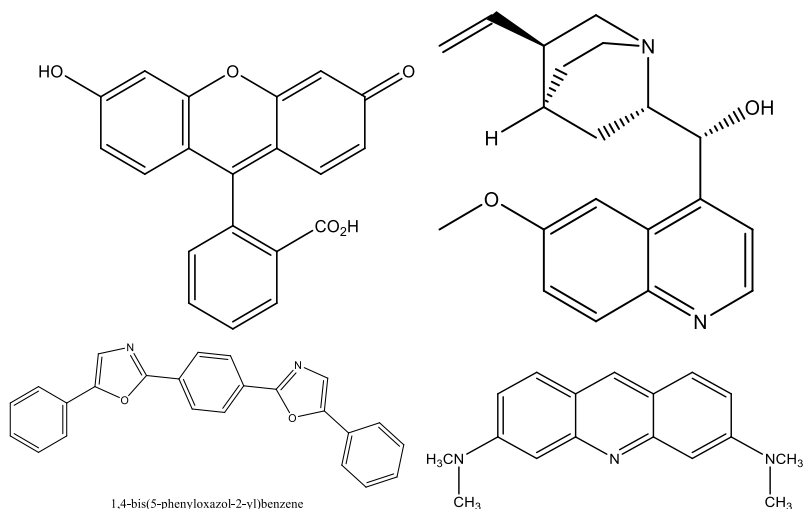
Lumineszcenciának nevezzük azt a folyamatot, amely során valamely anyagból fénykibocsátás történik. Alapvetően két kategóriára bonthatjuk - foszforeszcencia és fluoreszcencia - a gerjesztett állapot természetétől függően, illetve, hogy meddig tart fénykibocsátás. Viszont a lumineszcenciának lehetnek más típusai is (1. táblázat). Gerjesztett állapotban az elektronok nagyobb energiájú pályákra ugranak. Amikor a gerjesztett elektron visszatér az alapállapotba, fény formájában távozik a felszabaduló energia. A fluoreszcenciás fénykibocsátás általában 10^{-8} másodpercig tart, tehát a fluoreszcens részecske élettartama ~ 10 ns. Az élettartam úgy definiálható, mint az az átlag idő, amely a gerjesztett állapotból az alapállapotba történő visszaalakuláshoz szükséges. A fluoreszcencia rövid élettartama miatt az időfelbontásos emissziós méréshez olyan műszerek szükségesek, melyek optikája és elektronikája elég érzékeny.

1. táblázat: A lumineszcencia különböző fajtái.

Jelenség	A gerjesztés módja
Fotolumineszcencia (fluoreszcencia, foszforeszcencia)	Fényelnyelés (fotonok)
Radiolumineszcencia	Ionizáló sugárzás (Röntgen sugarak, α , β , γ)
Katódlumineszcencia	Katódsugarak (elektronnyalábok)
Elektrolumineszcencia	Elektromos mező
Termolumineszcencia	Hevülés után elsődleges energiatároló (radioaktív besugárzás)
Kemolumineszcencia	Kémiai folyamatok (pl. oxidáció)
Biolumineszcencia	Biokémiai folyamatok
Tribolumineszcencia	Súrlódási és elektrosztatikus energiák
Szonolumineszcencia	Ultrahang

Foszforeszcenciás emisszió során is a gerjesztett állapotból történik fénykibocsátás. Az gerjesztés megszűnése után 10^3 - 10^0 s-ig tart az emisszió. Ezek a molekulák néhány percig sugároznak, amíg a gerjesztett anyag vissza nem tér az alapállapotba. Foszforeszcencia nem észlelhető szobahőmérsékleten fluidumban, mivel az emisszióval olyan dezaktiváló folyamatok is versengenek, mint a sugárzásmentes bomlás és bizonyos kioltási folyamatok.

Fluoreszcencia tipikusan aromás molekulák esetében figyelhető meg, ezekben ugyanis vannak konjugált elektronok, amelyek gerjeszthetőek. Ezeket az aromás vegyületeket fluorofor anyagoknak nevezzük.



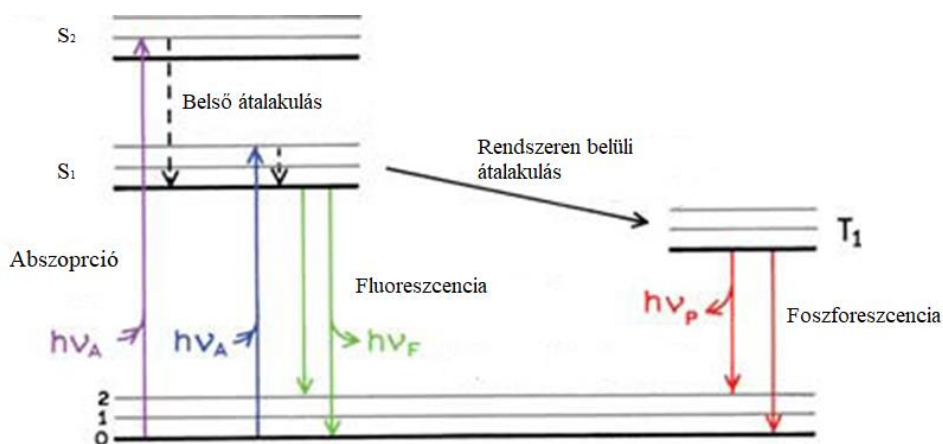
4. ábra: Néhány fluorofor (Fluorescein, Kinin, POPOP, Akridin narancs).

Az első ismert fluorofor, a kinin (4. ábra) vizsgálatával fejlesztették ki az első spektrofluorimétert, amit 1950-ben mutatott be az amerikai Nemzeti Egészségügyi Intézet (National Institutes of Health, NIH).^[33] A kinin mellett számos fluorofor anyaggal is találkozhatunk a hétköznapi életben, mint például a klorofill, amelynek fluoreszcenciája a vörös tartományba tolódik, és a növényekben végbemenő szerves építő folyamatok számára alakítja át a napsugárzást energiává, a fluorescein (oldata zölden emittál), amellyel rejtett vérfoltokat lehet előhívni, illetve a jelölőfestékként használatos fluorit ásvány (folypát, CaF_2), amely kéken emittál.^[34]

2.2.2. A Jablonski-diagram

Az abszorpciót és emissziót kísérő folyamatokat Jablonski-diagramon szokták ábrázolni (5. ábra). Különböző formában használják a Jablonski-diagramot a különféle molekuláris folyamatok ábrázolására, amelyek gerjesztett állapotban játszódnak le. Alexander Jablonski tekinthető a fluoreszcens spektroszkópia megteremtőjének. Munkássága az 1920-30-as évekre tehető, amikor is kiemelkedő kísérleti munkájával jelentős felfedezéseket ért el az oldatok fluoreszcenciájának alapvető vizsgálatában. Annak érdekében, hogy megmagyarázza kísérleteinek az eredményeit, meghatározta az átmeneti állapotot a gerjesztés és az emisszió között, valamint

olyan tényezőket is vizsgált, amelyek felelősek a lumineszcencia depolarizációjáért.



5. ábra: Egy általános felépítésű Jablonski-diagram.

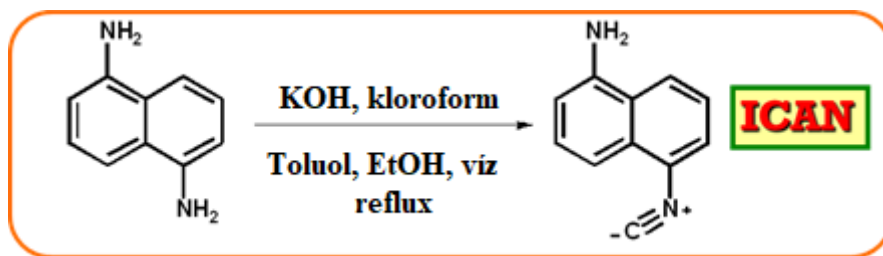
Az alap-, első- és második gerjesztett elektronállapotot az S_0 , S_1 illetve S_2 jelöli. Minden energiaszint felosztható rezgési-energiaszintekre, amiket a számok (0,1,2) jelölnek. Az állapotok közötti átmenetet a függőleges vonalak mutatják, ezzel jelezve a fényabszorpció természetét. Az átmenet időtartama túl kevés az atommag elmozdulásához, így a magtávolság állandó marad. Ezt Frank–Condon elvnek nevezik. Belső átalakulás kétféle módon történhet. Nemsugárzó átmenet történhet akkor, ha a nagyobb és az kisebb energiájú szint vibrációs állapota összekapcsolódik. Amennyiben rendszeren belüli áthaladásról beszélünk az átmenet azonos spinmultiplicitással történik. Szobahőmérsékleten a hőenergia nem elegendő ahhoz, hogy jelentős mértékben elősegítse a gerjesztett állapotot. Az energiakülönbség S_0 és S_1 gerjesztett állapotok között túl nagy ahhoz, hogy azt az S_1 hőállapot betöltse. Emiatt használnak hő helyett fényt a fluoreszcens anyagok gerjesztésére. Az S_1 állapotban lévő molekulák belső átalakulással jutnak át T_1 triplet állapotba. Az innen történő emissziót foszforeszcenciának nevezzük.

2.2.3. Fluoreszcens vegyületek kutatásának alapja

A fluoreszcencia jelenségének az 1800-as évek közepén történt felfedezése óta, az új fluoroforok vizsgálata nagyon izgalmas kutatási területet jelent. Az

elmúlt néhány évtizedben a fluoreszcens spektroszkópia alkalmazása egyre inkább elterjedt a biológiai kutatásokban. A fluoreszcens élettartam vizsgálat a biokémiai és a biofizikai kutatások egyik elsődleges eszközének tekinthető^[35] Régóta ismert, hogy bizonyos anyagok abszorpciós / emissziós spektrumának maximumát, intenzitását és az abszorpciós sávok alakját befolyásolhatja az azokat körülvevő közeg, mint például az oldószer molekulák.^[36] Ezt a jelenséget szolvatokróm effektusnak nevezzük. Azonban nem csupán a szolvatált részecskék esetében figyelhető meg, hanem szilárd anyagok esetében is. A szolvatokróm effektust az oldott részecske alap- és gerjesztett állapota közötti töltésátmenet okozza. A szolvatokróm effektus segítségével a rendszer teljes vagy lokális polaritása meghatározható, ez a képesség teszi a kémiai, biológiai számos más kutatási területen alkalmazhatóvá (pl. membránok stb.) A fluoreszcens vegyületek nagyon érzékeny, roncsolásmentes módszert biztosítanak a biomolekulák és kölcsönhatásaik kimutatására^{[37][38][39]}. Az oldószerpolaritás meghatározásának képessége mellett, a szolvatokróm vegyületek segítségével általában olyan oldatokat készítünk, amelyek meghatározott frekvencián képesek a fényelnyelésre, illetve pH-szenzorként és átmenetifém-kation indikátorként viselkednek.^{[40][41][42][43]} Amikor az oldószerhatást vizsgáljuk, a polarizációt, az oldhatóságot, az oldószer és az oldott anyag közötti hidrogén kötések, valamint az oldott anyag aggregációját kell figyelembe venni^[44] Marini és munkatársai legutóbbi tanulmányukban a jelenség kvantumkémiai megközelítésével foglalkoztak^[45]. Ennek ellenére a szolvatokróm effektus továbbra is nagyrészt ismeretlen tudományterület, a különböző kölcsönhatások komplexitása miatt. A gyakorlatban is alkalmazható fluoreszcens szolvatokróm vegyületek száma csupán néhány tucatra korlátozódik. A naftalinszármazékok, mint pl. a 2-lauroil- és 2-propionil-6-dimetilamino-naftalin, LAURDAN és a PRODAN a leggyakoribb szolvatokróm fluoroforok^[46]. A fluoreszcens jelleget a naftalin vázon lévő 6-dimetilamino és a 2-karbonil-csoportok közötti töltésmegoszlás okozza. Ez a dipólusmomentum gerjesztéskor fokozódik, és az oldószer dipólusmomentumainak átrendeződését okozhatja. Feltételezhetően a töltésmegoszlás akkor is megvalósítható, ha az akceptor-karbonil-csoportot izocianocsoportra cseréljük (6. ábra). Az izocianocsoport az $n \rightarrow \pi^*$ átmenetéről ismert^[47]. Az izocianidok erős proton-akceptorcsoporthként is

viselkedhetnek^[48], mely nemcsak a polaritás változások észlelésére teszi alkalmassá a molekulát, hanem a hidrogén donor csoportok lehetséges detektálására is, mint például a molekula közelében lévő OH és NH csoportokat. Az izocianidok stabil komplexeket képeznek az átmeneti fémionokkal, például Cu^{2+} , Ag^+ és Au^+ ionokkal, amelyek lehetséges szolvatokróm izociano-komplexek előállításához vezetnek.^{[49][50]}

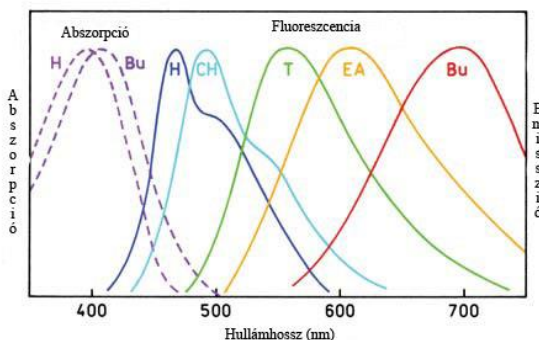


6. ábra: Az 1-amino-5-izocianonafalin (ICAN) előállítása diklór-karbén intermedieren keresztül (felső), valamint a képződött fluorofor által emittált fény $\lambda_{\text{ex}} = 365 \text{ nm}$ -es UV-lámpa alatt, különböző oldószerekben. Az oldatok polaritásindexei jól korrelálnak az emittált fény hullámhosszának vörös eltolódásával.

2.2.4. Szolvatokróm vegyületek

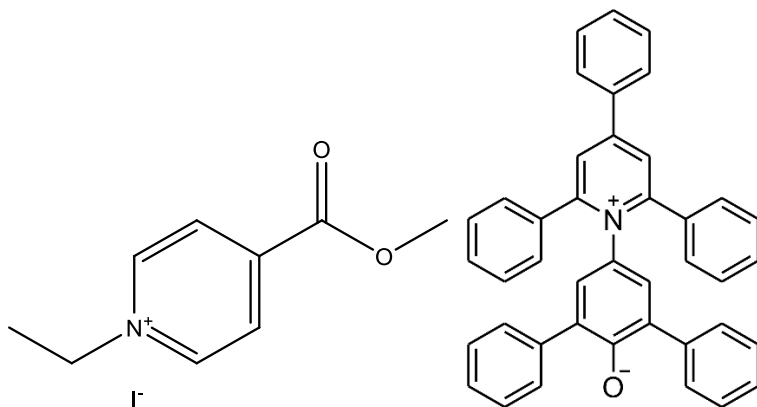
Különböző összetételű vegyületek abszorpciós/emissziós spektrumára hatással van a körülötte lévő közeg, mely befolyásolja az anyag emissziós maximumának pozícióját (7. ábra), intenzitását és az abszorpciós spektrumát. Szolvatokróm effektust a fényemittáló molekula gerjesztett- és alapállapotának különböző szolvatációja eredményez. Meghatározó tényezői a polarizáció, a szolvatáció, az oldószer-oldott anyag közötti hidrogén-kötés, a dipólusmomentum nagysága, valamint az oldott anyag aggregációja.^[51] Mivel olyan helyeken is alkalmazható, ahol nagyon érzékeny és kíméletes eljárások szükségesek, így előszeretettel használják a kémiai és biológiai makrorendszerek kutatásában. Amellett szolvatokróm festékként is használhatóak, mivel az oldószer polaritásának változásával változik az

emittált fény hullámhossza. A jelenség a töltésmegoszláson alapszik, ehhez szükséges egy vegyületen belül elektron donor, valamint elektron akceptor csoport.



7. ábra: A különböző polaritású oldószerekben oldott DNS fényképe és emissziós spektruma H: hexán; CH: ciklohexán; T: toluol; EA: etil-acetát; Bu: butanol.^[34]

A jelenséget először 1862-ben figyelte meg Berthelot és Péan de Saint Gilles^[52]. A molekulák alapállapotának és első gerjesztési szintjének egymástól eltérő solvatációját vizsgálták. Áttörést viszont Meinshutkinn munkája hozott 1890-ben, amikor tercier aminok alkilezését végezte.^[53] 1958-ban Kosower használt először solvatokróm anyagokat oldószerek polaritásainak meghatározására. Erre vonatkozóan megalkotta a Z-skálát, melyet a 4-metoxikarbonil-1-etilpridínium-jodid (8. ábra) solvatokróm eltolódására alapozott. Később Dimrith és Reichardt betain festéket (Betaine 30, 8. ábra) ajánlottak e helyett, amelynek kivételesen nagy negatív solvatokróm tartománya van.



8. ábra: 4-metoxikarbonil-1-etilpridínium-jodid (bal), Betaine 30 (jobb).

Az oldószer polaritásának növekedésével az abszorpciós sáv hipszokróm (kék irányú) eltolódását negatív szolvatokróm hatásnak nevezzük. Ezzel ellentétben a batokróm (vörös irányú) eltolódást pozitív szolvatokróm hatásnak nevezzük. A különböző polaritású oldószerekben oldott szolvatokróm részecskék emissziójának eltolódása tapasztalati polaritás-skála felállítására is használható.^[54]

2.3. Szolvatokróm effektus kvantitatív leírása

2.3.1. Fluoreszcens élettartam és kvantumhasznosítási tényező

A fluoreszcens anyagok élettartama és kvantumhasznosítási tényezője a legfontosabb tulajdonságok közé tartoznak. A kvantumhasznosítási tényező az emittált és az elnyelt fotonok hányadosaként számítható. Az emisszió élettartama azért fontos, mert ebből következtethetünk a fluorofor anyagok egyéni relaxációs folyamatára, ami a gerjesztett állapotból az alapállapotba történő visszatérésért felel.

$$\Phi_f = \frac{\Gamma}{\Gamma + k_m} \quad (1)$$

ahol:

Φ_f kvantumhasznosítási tényező

Γ a fluorofor emissziós hányada

k_m fluorofor sugárzásmentes bomlásainak aránya

A kvantumhasznosítási tényező értéke 1-hez tart, ha a sugárzásmentes bomlások hányada jóval kisebb, mint az emissziós hányad, $k_m \ll \Gamma$. Értéke a relaxáció miatt általában 1-nél kisebb.

A gerjesztett állapot élettartama úgy definiálható, mint az az átlagidő, amely ahhoz szükséges, hogy a gerjesztett állapot visszaalakuljon alapállapottá. Ez általában 10 ns-ig tart.

$$\tau = \frac{1}{\Gamma + k_m} \quad (2)$$

A kibocsátás véletlenszerű esemény. Néhány molekula (körülbelül a molekulák 63%-a) a $t < \tau$ időpillanatban emittál fotont. A fennmaradó 37% $t > \tau$ időben bomlik el. Amennyiben a sugárzásmentes bomlások hányadát (k_m) nullának vesszük, a sugárzásmentes bomlások hiányában kapott időt természetes élettartamnak nevezzük.

$$\tau_t = \frac{1}{\Gamma} \quad (3)$$

A természetes élettartam a gerjesztési és az emissziós spektrumból, valamint a moláris abszorpciós együtthatóból számítható. A sugárzással történő bomlás arányát az alábbi egyenlettel határozhatjuk meg:

$$\Gamma \cong 2,88 \cdot 10^9 n^2 \cdot \frac{\int F(\bar{\nu}) d\bar{\nu}}{\int F(\bar{\nu}) d\bar{\nu}} \cdot \int \frac{\varepsilon(\bar{\nu})}{\bar{\nu}} \cdot d\bar{\nu} = 2,88 \cdot 10^9 n^2 \langle \bar{\nu}^3 \rangle^{-1} \int \frac{\varepsilon(\bar{\nu}) \cdot d\bar{\nu}}{\bar{\nu}} \quad (4)$$

ahol:

$F(\bar{\nu})$ az emissziós spektrum a hullámhossz függvényében ábrázolva

$\varepsilon(\bar{\nu})$ az abszorpciós spektrum

n törésmutató

Az integrálok az S_0 és S_1 átmenetekhez tartozó abszorpciós és emissziós spektrumok esetében értelmezhetők. A fenti kifejezés sok esetben jól alkalmazható, különösen polinukleáris aromás szénhidrogének oldatánál. Példaként Γ értéke perilénre $1,8 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}$, természetes élettartama 5,5 ns^[55]

2.3.2. Fluoreszcencia kioltás

A fluoreszcenciás intenzitás számos úton csökkenthető. A folyamatot, amivel ez elérhető kioltásnak (kvencselésnek) nevezzük, és különböző mechanizmusokkal játszódhat le. Ütközési kioltásról akkor beszélünk, amikor a gerjesztett állapotban lévő fluorofor dezaktiválódik egy másik, oldatban lévő molekulával való ütközése miatt. A folyamatot a Stern – Volmer egyenlettel (5) írhatjuk le:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K[Q] = 1 + k_q\tau_0[Q] \quad (5)$$

ahol:

- K Stern – Volmer kioltási állandó
- k_q bimolekuláris kioltási állandó
- τ_0 a molekulák élettartama kioltás nélkül
- [Q] a kvencselő anyag koncentrációja

Az ütközéskor a gerjesztett molekula átadja energiáját a másik molekulának, ami gyakran hő formájában sugárzódik ki. Ütközési kvencserként viselkedhet az oxigén, a halogének, és egyes, amin tartalmú vegyületek. Az ütközési kvencselés mellett más folyamatok is okozhatják a fluoroforok intenzitásának csökkenését. Ilyen például a komplexképződés, amikor az oldatban a fluorofor olyan komplexet képez, amely nem képes emisszióra.^[56]

2.3.3. Lippert – Mataga egyenlet:

Az emissziós maximumnak az oldószer polaritás-változása miatt bekövetkező eltolódása, vagyis az általános oldószerhatás jellemzésére leggyakrabban a Lippert - Mataga elméletet alkalmazzák. A modell szerint a fluorofor egy homogén, adott dipólusmomentummal rendelkező térben lévő dipól, mely semmiféle kölcsönhatásba nem léphet a környezetével. A fluorofor alap- és gerjesztett állapota közötti energiárés nagyságának az oldószer és a fluorofor közötti kölcsönhatás okozta változását írja le a Lippert - Mataga egyenlet:

$$\bar{\nu}_a - \bar{\nu}_e = \frac{2}{hc} \left(\frac{\varepsilon-1}{2\varepsilon+1} - \frac{n^2-1}{2n^2+1} \right) \frac{(\mu_E - \mu_G)^2}{a^3} + konst. \quad (6)$$

ahol $\bar{\nu}_a$ és $\bar{\nu}_e$ rendre az abszorpciós és az emissziós hullámszámok (cm^{-1} egységben), h ($6,626 \cdot 10^{-34}$ Js) a Planck-állandó, c ($2,99 \cdot 10^8$ m/s) a fénysebesség, ε az oldószer dielektromos állandója, n az oldószer törésmutatója, μ_E és μ_G rendre a fluorofor gerjesztett- és alapállapotának dipólusmomentuma, „ a ” pedig annak a térrésznek a sugara, melyben a fluorofor tartózkodik. Az egyenlet meglehetősen jó közelítést ad aprotikus oldószerekre (tehát amelyek nem képesek hidrogénkötés kialakítására). Az egyenletben szereplő, nagy zárójelben lévő tagot orientációs polarizálhatóságnak nevezik, és „ A_f ”-el szokták jelölni. A zárójelben szereplő első tag a dielektromos állandó szerepét írja le, mely az oldószer dipólusainak átfordulása és az oldószer-molekulákban lejátszódó elektron-átrendeződés okozta spektrális eltolódásokért egyaránt felelős. A zárójelben szereplő különbség második tagja, mely a törésmutató hatását veszi számba, csupán az elektronok átrendeződéséről tájékoztat. Mivel az elektron-átrendeződés nagyon gyors folyamat, az alap- és a gerjesztett állapotot egyformán stabilizálja, így a törésmutatónak viszonylag kis befolyása van a Stokes-eltolódásra.

Egy fluorofor annál érzékenyebb a környezete polaritásának változására, minél nagyobb a különbség az alap- és a gerjesztett állapotának dipólusmomentuma között, ami az ábrán nagyobb meredekségű egyenesként jelenik meg. A Lippert - Mataga elmélet hátránya, az illesztett egyenes körüli

nagy szórás elsősorban a különböző specifikus kölcsönhatások eredménye, amit a modell nem vesz figyelembe, a valóságban azonban ezek általában nem elhanyagolható mértékűek. Ezenkívül (illetve részben a kölcsönhatások okozta eltérés miatt) a modell segítségével meghatározott μ_E - μ_G értéke általában túlbecsült.

A valós rendszerekhez valamivel közelebb áll a Reichardt által kidolgozott elmélet, az oldószerek dielektromos állandója és törésmutatója helyett ugyanis ez az oldószerek mikroszkópikus polaritását veszi figyelembe, melyet E_T^N -el jelölnék, vonatkoztatási alapjai a víz és a tetrametilszilán (TMS), mint a polaritás skála két szélén található oldószerek. Segítségével pontosabban leírhatók a polarizálhatóság és a különböző kölcsönhatások emissziós spektrumra gyakorolt hatásai, a Stokes-eltolódást az E_T^N függvényében ábrázolva általában sokkal jobb egyezést kapunk a kísérleti és a mért eredmények között.^[57]

2.3.4. *A Kamlet - Taft leírás*

Az igazi áttörést a Kamlet - Taft elmélet kidolgozása jelentette, ami az abszorpciós vagy emissziós maximumok, illetve a Stokes - eltolódás értékének multilineáris regresszió-analízis általi meghatározásán alapul. Az vizsgált jellemző számértéke egy adott oldószerben (Y) a jellemző oldószer távollétében (praktikusan gáz fázisban) számított értékét (Y_0), az oldószer polaritását vagy polarizálhatóságát (π^*), savasságát (hidrogénkötés - donáló képesség, α) illetve bázikusságát (hidrogénkötés-akceptáló képesség, β) felhasználva a következő multilineáris egyenlet segítségével számítható:

$$Y = Y_0 + a\alpha + b\beta + c\pi^* \quad (7)$$

A 7. egyenletben szereplő a , b és c együtthatók tulajdonképpen azt adják meg, hogy a vizsgált jellemző egy adott oldószerben milyen mértékben függ az oldószer tulajdonságait leíró α , β és π^* paraméterektől. Az együtthatók mindig az adott fluorofortól függenek, valamint az a és b együtthatók értéke általában lényegesen kisebb a c -énél (tehát az oldószer hidrogénkötés - donáló, illetve – akceptáló képessége kisebb befolyással bír a fluoreszcencia jellemzőire, mint az oldószer és a fluorofor molekulák között kialakuló dipol - dipol

kölcsönhatások). Bár a Kamlet - Taft egyenlettel kapott értékek általában egészen jó egyezést mutatnak a mért értékekkel, az elméletnek van néhány hátránya. A legfontosabb az, hogy az oldószer polaritását és polarizálhatóságát egyetlen paraméter (π^*) írja le. A polarizálhatóságot jellemző $d\delta$ korrekciós tényező bevezetése nem elégséges a probléma megoldására, ugyanis nem nyújt elegendő lehetőséget két hasonló típusú (pl. aromás, alifás, halogénezett) oldószer polarizálhatóságának megkülönböztetésére. Az elmélet másik hátránya, hogy a Kamlet - Taft oldószer-paraméterek meghatározása nem egy jól meghatározott, szabványosított mérési eljárás szerint történik, hanem különböző mintákra kapott értékek átlagát veszi alapul.^[58]

2.3.5. *A Catalán megközelítés*

Az egyik legújabb elméletet Catalán és munkatársai dolgozták ki. Ennek első változata a Kamlet - Taft elmülethez hasonlóan három, kísérleti úton meghatározott polaritás-jellemző lineáris kombinációjával számol, melyek az oldószer savassága (SA), bázikussága (SB) és polaritása/polarizálhatósága (SPP). Az elmélet előnye a Kamlet - Tafttal szemben, hogy az oldószer-paraméterek megállapításához egy jól meghatározott referencia-vegyületpárt használ, így ezek a paraméterek megbízhatóbban írják le a fluorofor környezetének polarizálhatóságát a szolvatokróm jelenség egészét tekintve. Catalán kutatócsoportjának második elmélete már négy tényező lineáris kombinációját veszi figyelembe, melyek közül kettő (SA és SB) a specifikus, kettő (SP és SdP) a nonspecifikus kölcsönhatásokat írja le (SP az oldószer polarizálhatóságát, SdP a dipolaritását jellemzi), így még megbízhatóbb eredményeket kaphatunk a segítségével, mint a korábbi modellekkel.

$$\tilde{\nu} = \tilde{\nu}_{max,0} + a_{SA}SA + b_{SB} \cdot SB + s_{SP}SP + t_{SdP}SdP \quad (8)$$

A gyakorlatban azonban elsősorban a vizsgált fluorofortól függ, melyik modell alkalmazható a legelőnyösebben, általában a két modellel kapott értékek hasonló mértékben korrelálnak a mért adatokhoz, de bizonyos esetekben az SdP paraméter figyelembevétele miatt a Catalán - elmélettel látványosan jobb egyezést érhetünk el.^[59]

2.4. Fluoreszcencia meghatározási módszerek

2.4.1. FRET

A „fluoreszcencia rezonancia-energiaátvitel”, vagy a FRET (más néven „Forster-rezonancia-energiaátvitel”) egy olyan jelenség, amely során gerjesztett állapotban lévő „donor-fluorofor-molekula” nem-sugárzó folyamatban átadja az energiát egy „akceptor-fluorofor-molekula”-nak. Ezt az energiaátadást „nem-sugárzó” -nak nevezzük, mert foton kibocsátása nélkül gerjesztődik le a donor-fluorofor-molekula. Ez az energiaátadás az esetben mehet végbe, ha a gerjesztett állapotban lévő donor-fluorofor molekula fluoreszcencia-emissziós spektruma átfedésben van az akceptor-fluorofor molekula gerjesztési spektrumával (abszorpciós maximummal).^[60]

A FRET a donor és akceptor molekulák között csak akkor fordul elő, ha több feltétel teljesül:

Először, a molekuláknak elég közel kell lenniük egymáshoz - tipikusan <10 nm. A FRET jel a szoros fizikai kapcsolat közvetlen empirikus bizonyítéka, független a képalkotó rendszer felbontásától és más kolokalizációs technikáktól. Forster távolságnak nevezzük azt a molekulák közötti távolságot, amelyen az energiaátvitel hatékonysága 50% (jellemzően 4-7 nm között, az adott donor / akceptor pártól függően). Ez a tulajdonság tipikusan a fluoroforpar potenciális hasznosságának jellemzésére szolgál. Az energiaátvitel hatékonysága exponenciálisan növekszik, amikor a molekulák közelebb kerülnek, így különösen érzékenyek a molekulák közötti távolságra^{[61][62][63][64]}

Másodszor, amint azt korábban említésre került, az akceptor gerjesztési spektrumának átfedésben kell lennie a donor emisszió spektrumával. A nagyobb spektrális átfedés általában nagyobb FRET valószínűséget eredményez, ugyanakkor bonyolítja az adatok elemzését, mivel az átfedés nagysága növeli az ál FRET valószínűségét, mely során az akceptor molekula gerjesztése donor molekula gerjesztési hullámhossz-tartományába eshet.

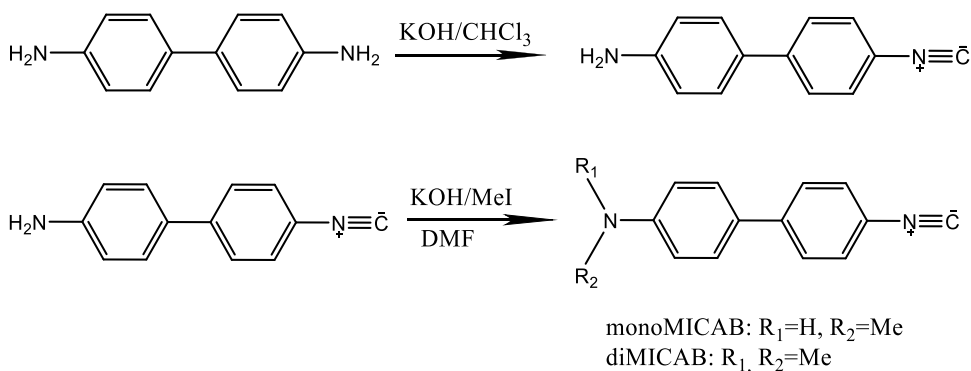
Harmadszor, a donor és az akceptor molekula dipólokat kedvezően kell orientálni, hogy a FRET kialakuljon. A molekuláknak nemcsak kellően közel kell lenniük, hanem azok dipóljainak is kellőképpen igazodniuk kell

egymáshoz. Leggyakrabban ezt a feltételt véletlenszerűen teljesítik a molekulák számának növelésével így a legtöbb FRET-számításnál a dipolorientáció standard értékét használják.^[65]

3. Eredmények

3.1. Egy izocianobifenil alapú, kék fényt emittáló, szolvatokróm fluorofor előállítása és vizsgálata¹

Az általunk korábban kifejlesztett 1-amino-5-izocianonaftalin (ICAN) vegyületcsaládra alapozva a naftalin vázát bifenil vázra cserélve új származékokat állítottunk elő (9. ábra). Alapanyagul a 4,4'-diamino-bifenilt (benzidin) választottuk, melynek egyik amino csoportját izocianiddá alakítva kaptunk egy ICAN analóg vegyületet, ahol az amino csoport az elektrondonor, az izonitril csoport az elektronakceptor.



9. ábra: A 4-amino-4'-izocianobifenil (ICAB) és mono-, valamint dimetil származékainak előállítása benzidinből.

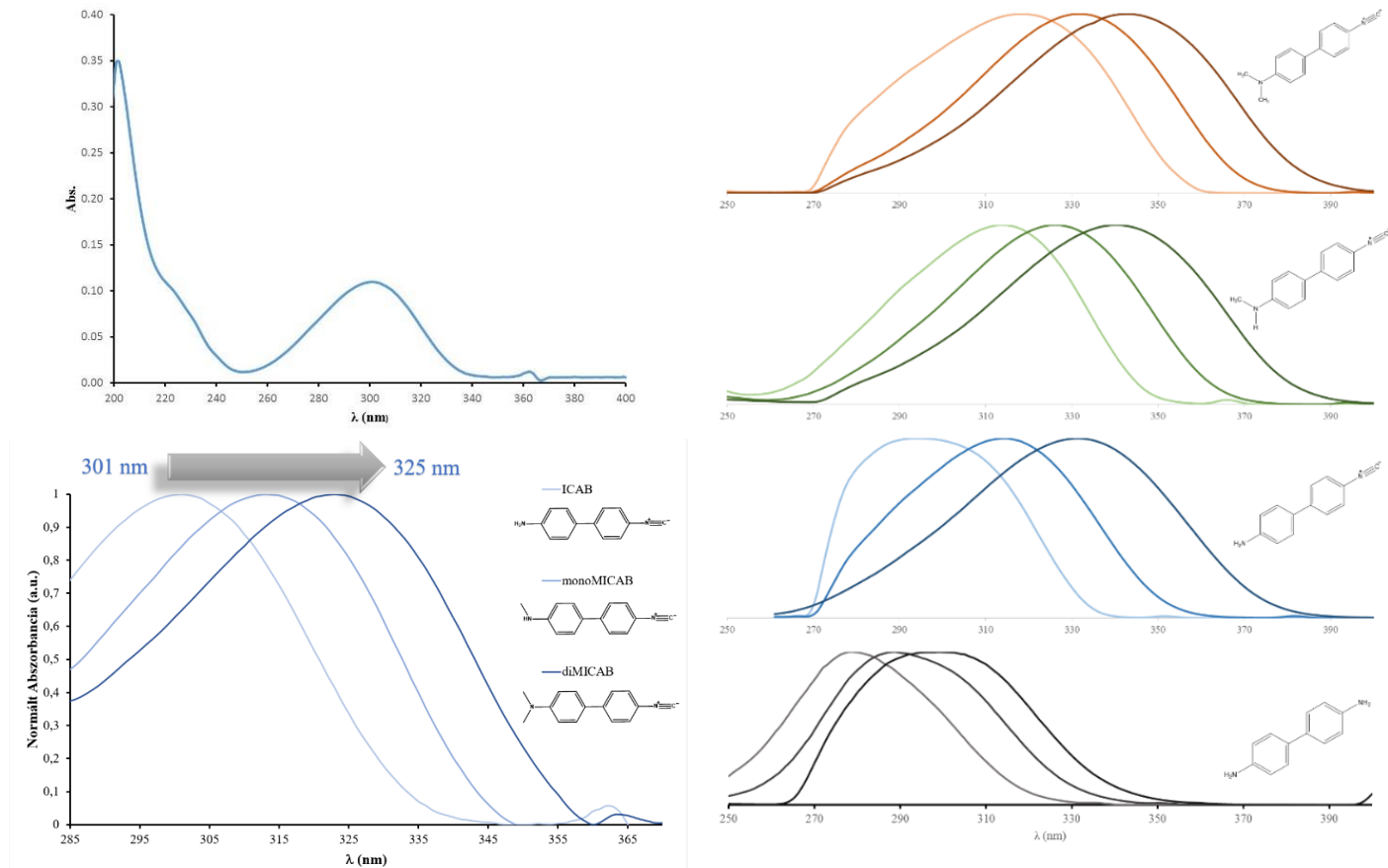
Választásunk azért esett a benzidinre mert olcsó, könnyen hozzáférhető és széles körben használják festékalapanyagként az iparban, bár egészség- és környezetvédelmi okok miatt a kétezres években korlátozták a felhasználását. Szerkezete könnyen módosítható, ami megalapozza fluoreszcens alapanyagként történő felhasználását.

¹ A 3.1 fejezet az alábbi tudományos publikáció alapján készült: Nagy, M; Rác, D; Kovács, SL; Lázár, L; Fehér, PP; Purgel, M; Zsuga, M; Kéki, S: New blue light-emitting isocyanobiphenyl based fluorophores: Their solvatochromic and biolabeling properties JOURNAL OF PHOTOCHEMISTRY AND PHOTOBIOLOGY A-CHEMISTRY 318 pp. 124-134, 11 p. (2016)

3.1.1. UV-látható optikai tulajdonságok

A termékek gerjesztési hullámhosszának meghatározásához UV-látható méréseket végeztünk. Az abszorpciós spektrumok felvétele segített a fluoreszcens méréseknél alkalmazott koncentrációk meghatározásánál is, ugyanis az emissziós méréseket olyan koncentrációknál kell végezni, ahol az abszorbancia értéke 0,1 alatt van, a gerjesztés során fellépő önabszorpciót elkerülendő.^[66] Az ICAB származékok és a kiindulási benzidin különböző oldószerekben felvett abszorpciós spektrumának nagyított részlete (a töltésátviteli, CT, sáv) a 10. ábrán látható.

A spektrum egyszerű felépítésű: egy nagy energiájú elnyelési sávot figyelhetünk meg 200-240 nm között, mely valószínűleg a π - π^* átmenetekhez tartozik. A HOMO-LUMO átmenet széles, kis intenzitású sávként figyelhető meg 300 nm körüli maximummal. A 10. ábrán jól megfigyelhető az izonitril csoport bevitelének hatása a molekulák abszorpciós spektrumára. A benzidin amino csoportjának izonitrilre cserélése az eredetileg 279 nm-nél^[67] található csúcsot ~20 nm-el feljebb 301 nm-re tolja az amino és izonitril csoport közötti töltésátvitel kialakulása miatt. A molekulában az izonitril- elektronszívó, az amino csoport elektronszolgáltató tulajdonságú. Az elektronszolgáltató tulajdonságot az NH_2 -csoport metilézésével fokozhatjuk. Ezúton a töltésmegoszlás nagyobb mértékű lehet, mely a HOMO-LUMO átmenet energiáját csökkenti, ezáltal az abszorpciós csúcs helyzetét nagyobb hullámhosszú tartomány irányába tolja el. Ez a batokróom eltolódás jól megfigyelhető a 10. ábrán: A vegyület amino csoportjához kapcsolt metil csoportokkal további batokróom eltolódást értünk el, szám szerint 301 nm-ről 325 nm-re. A kisebb gerjesztési energia jobb gyakorlati alkalmazhatósággal párosulhat. Továbbiakban fluoreszcens méréseknél ezt a csúcsot használtuk gerjesztésre.



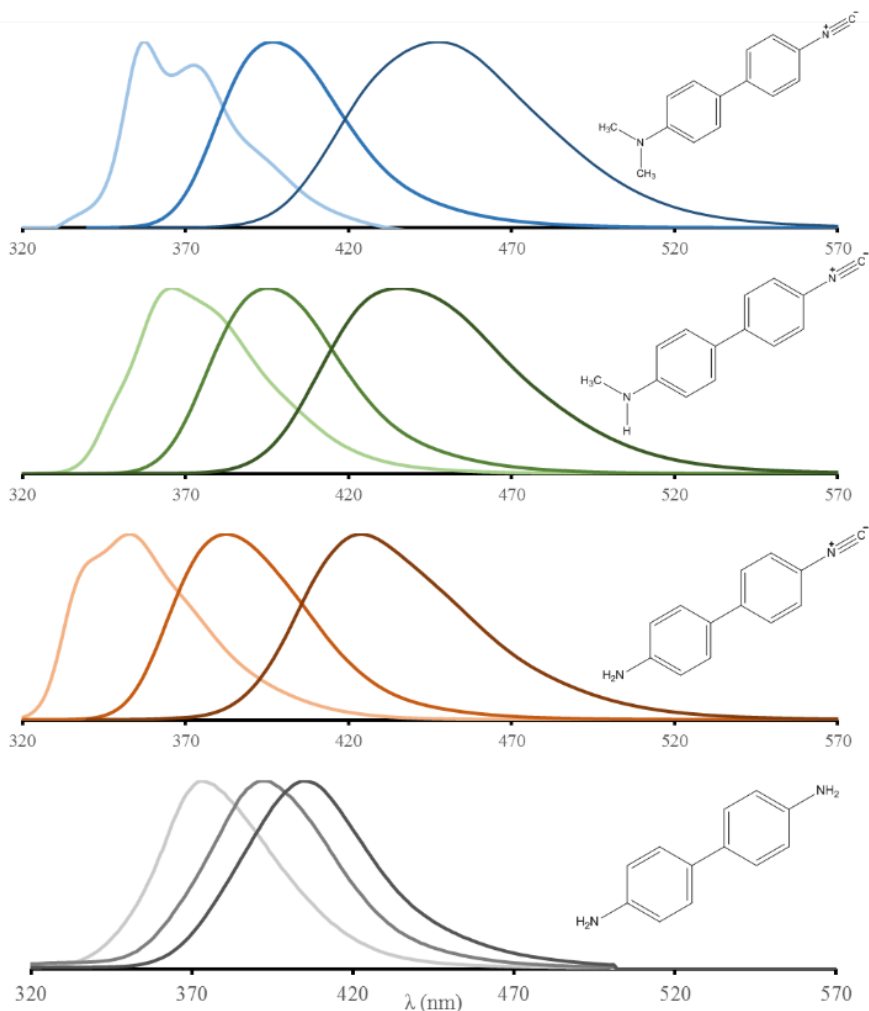
10. ábra: **Jobb oldalon:** A Benzinid, ICAB, monoMICAB, diMICAB hexánban, dioxánban és DMSO-ban (balról jobbra) mért gerjesztési spektrumai. **Bal alsó sarok:** ICAB, monoMICAB, diMICAB hexánban mért abszorpciós spektrumainak CT sávjai. **Bal felső sarok:** Az ICAB abszorpciós spektruma hexánban felvéve. ($20\text{ }^{\circ}\text{C}$, $V = 3\text{ cm}^3$, $c = 4,12 \cdot 10^{-7}\text{ M}$)

3.1.2. Fluoreszcencia mérések

Az UV spektrumok felvétele után minden vegyület esetén meghatároztuk a gerjesztési (excitációs) spektrumot. A HOMO-LUMO átmenet csúcsát használva felvettük az emissziós spektrumokat majd ezek legintenzívebb csúcsait használva meghatároztuk a hozzájuk tartozó gerjesztési spektrumokat. Különböző oldószerekben vizsgálva az excitációs maximum helyzete benzidin esetében 279-306 nm, ICAB esetében 298-329 nm, monoMICAB esetében 305–338 nm, valamint diMICAB esetében 315–340 nm között található.

Az gerjesztési spektrumokon is jól megfigyelhető (10. ábra, jobb oldal), hogy a benzidin egyik NH₂-csoportját izonitrillé alakítva a gerjesztési energia lecsökken. A batokróm eltolódás a jobb konjugációval és az amino- és izonitril-csoport közötti töltésmegoszlás következtében lecsökkent HOMO-LUMO távolsággal magyarázható. Az excitációs maximumok csak kis oldószerfüggést mutatnak, azaz 20-30 nm-es tartományon belül helyezkednek el. Ez jó összhangban van az elmélettel, miszerint az abszorpciós spektrumok alakját csak kevésbé befolyásolják az oldószereffektusok. A Frank-Condon elv szerint ugyanis a gerjesztés pillanatszerű az atommagok mozgásához képest, így az alapállapotú és a gerjesztett állapotú molekulageometria megegyezik, a szolvátburok szerkezete is változatlan marad.

Következő lépésként a gerjesztési maximumok ismeretében megvizsgáltuk az anyagok emissziós spektrumait is: Benzidin esetén a 11. ábrán jól megfigyelhető, hogy az emissziós maximumok az összes vizsgált oldószerben az UV tartományban helyezkednek el. Ezt vizuális megfigyeléseink is alátámasztották: UV-lámpa alatt sem 254 sem 365 nm-es gerjesztéssel nem észleltünk fluoreszcenciát, így erről a sorozatról fényképfelvétel sem készült. A legkisebb emissziós hullámhosszt hexánban mértünk (372 nm), a legnagyobb hullámhosszt pedig DMSO-ban (403 nm), eltolódás mértéke $\Delta\lambda = 31$ nm. Az eltolódás közel azonos az excitációs tartománynál tapasztalt értékkel (~37 nm), ami alapján bátran kijelenthető, hogy a benzidin nem jöhet szóba, mint szolvatokróm molekula gyakorlati alkalmazásoknál.



11. ábra: Benzidin, ICAB, monoMICAB, diMICAB (lentől-fel) hexánban, dioxánban és DMSO-ban (balról-jobbra) mért emissziós spektrumai. ($20\text{ }^{\circ}\text{C}$, $V = 3\text{ cm}^3$, $c = 4,12 \cdot 10^{-7}\text{ M}$)

Az izociano csoport felvitelének hatása legjobban az emissziós spektrumokban jelentkezik. A benzidinnél megfigyelt 30 nm-es szolvatokróm tartomány mindegyik általunk előállított vegyületnél közel, vagy több mint háromszorosára szélesedett. ICAB esetén a legkisebb emissziós maximumhoz tartozó hullámhosszt hexánban (353 nm) mértünk, a legnagyobb hullámhosszt pedig vízben (457 nm), az eltolódás értéke $\Delta\lambda = 107\text{ nm}$.

monoMICAB esetén a legkisebb hullámhosszt hexánban (357 nm) mértünk, a legnagyobb hullámhosszt pedig vízben (458 nm), az eltolódás mértéke $\Delta\lambda = 92\text{ nm}$.

diMICAB esetében a legkisebb hullámhosszt hexánban (357 nm) mértünk, a legnagyobb hullámhosszt pedig DMSO-ban (447 nm), az eltolódás mértéke $\Delta\lambda = 90$ nm. Némileg meglepő, hogy vízben a vártnál jóval kisebb eltolódást ($\lambda_{em,max} = 417$ nm) tapasztaltunk, emiatt a diMICAB szolvatokróm tartománya is szűkebb lett ~10-20 nm-rel az elvártnál. A jelenség valószínűleg annak tulajdonítható, hogy a diMICAB nem tartalmaz szabad NH hidrogént, amely a vízzel kölcsönhatásba tudna lépni, így az oldhatóságot javítani. Feltételezéseink szerint vízben a molekuláink a gyenge oldhatóság miatt asszociálódnak így a környezetük apolárosabb lesz az elvártnál. Hexánban és ciklohexánban kettős csúcsot kaptunk, mely kisebb mértékben már az ICAB spektrumában is megjelent. Az emissziós sáv felhasadása valószínűleg egy N-H, vagy N-C rezgési átmenet megjelenésének tulajdonítható az emissziós spektrumban.

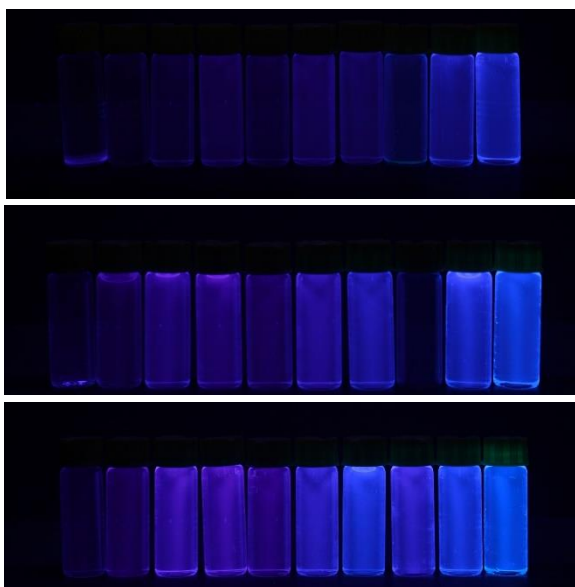
Az adatok összehasonlításával megállapítható, az alapvegyületbe beépítve az elektron szívó csoportot jelentősen megnöveltük az eltolódás mértékét. A metil csoportok hozzáadása némileg csökkentette az eltolódás mértéket, de jelentősen nem befolyásolta azt. Az emissziós spektrumokon (11. ábra) tisztán látható az alapvegyület és a termékek oldószer függése. Látható, hogy az oldószer polaritásának növelésével tolódik el vörös irányba az emittált fény hullámhossza (2. táblázat). Ezt a jelenséget pozitív szolvatokróm effektusnak, vagy batokróm eltolódásnak nevezzük.

Az általunk vizsgált molekulák: benzidin, ICAB, monoMICAB és diMICAB spektrális adatainak szemléletes összesítése a 2. táblázatban kerül bemutatásra.

2. táblázat: Az ICAB vegyületcsalád fotofizikai tulajdonságai (emissziós hullámhossz $\lambda_{(em)}$, gerjesztési hullámhossz $\lambda_{(ex)}$, Stokes eltolódás $\Delta\nu$ és kvantumhasznosítási tényező Φ_F) különböző polarítású oldószerekben meghatározva.

	$\lambda_{(ex)}$ nm				$\lambda_{(em)}$ nm				Stokes shift ($\Delta\nu$, cm-1)				Φ_F (%)		
	<i>Benzidin</i>	<i>ICAB</i>	<i>monoMICAB</i>	<i>diMICAB</i>	<i>Benzidin</i>	<i>ICAB</i>	<i>monoMICAB</i>	<i>diMICAB</i>	<i>Benzidin</i>	<i>ICAB</i>	<i>monoMICAB</i>	<i>diMICAB</i>	<i>ICAB</i>	<i>monoMICAB</i>	<i>diMICAB</i>
<i>Hexán</i>	279	301	313	323	373	353	366	357	9033	4894	4626	2949	13,41	5,51	5,93
<i>Ciklohexán</i>	-	302	316	325	-	354	368	360	-	4864	4472	2991	6,1	7,21	7,43
<i>Toluol</i>	295	310	323	329	295	371	388	387	7857	5304	5187	4555	6,59	6,1	5,82
<i>Diklórmétán</i>	286	307	322	336	384	390	405	412	8923	6932	6365	5490	6,45	12,26	6,73
<i>THF</i>	306	319	331	334	394	396	406	408	7299	6095	5581	5430	7,1	8,42	14,61
<i>Kloroform</i>	305	305	322	331	384	398	400	405	6745	7661	6056	5520	1,9	6,16	2,69
<i>Etil-acetát</i>	285	315	326	330	391	397	403	406	9512	6557	5861	5672	5,91	5,97	6,52
<i>Dioxán</i>	289	315	326	330	392	383	395	397	9092	5636	5358	5114	17,32	8,02	6,63
<i>Aceton</i>	-	329	325	327	-	407	427	422	-	5825	7350	6884	4,58	5,23	5,05
<i>Metanol</i>	281	308	327	333	397	419	422	430	10398	8601	6884	6774	0,84	4,73	1,49
<i>Piridin</i>	-	325	336	340	-	415	421	422	-	6673	6009	5715	0,49	0,32	5,77
<i>Acetonitril</i>	286	310	324	333	393	410	421	429	9520	7868	7111	6720	6,11	8,59	7,64
<i>DMF</i>	299	314	335	339	403	423	435	433	8631	8206	6862	6404	7,23	4,76	15,08
<i>DMSO</i>	292	318	338	340	404	424	436	447	9494	7862	6650	7040	7,32	6,14	6,97
<i>Víz</i>	281	298	305	315	401	457	458	417	10650	11675	10953	7765	0,08	0,08	0,43

Benzidint nem mértünk minden oldószerben, mivel néhány oldószer abszorpciós tartománya átfed a benzidin emissziós tartományával. Kvantumhasznosítási tényezőt sem számoltunk, mivel a benzidin egy ismert molekula, így a fotofizikai tulajdonságai megtalálhatóak az irodalomban. A Stokes-eltolódásokról elmondható, hogy az elvárásoknak megfelelően az oldószer polaritás indexével együtt nőnek. A kvantumhasznosítási tényezőknek nagy szórása van, nem mutatnak függést sem a polarizáció – sem a dipólusmomentum változásával. Általánosan elmondható, hogy nem rendelhető egyik fluoroforhoz sem nagy kvantumhasznosítási tényező. A legnagyobb értéket az ICAB dioxánnal készített oldatával mértük: 17,3%-ot.



12. ábra: ICAB, monoMICAB és diMICAB (fentről-lefelé haladva) oldatsorozat balról jobbra növekvő polaritás szerint, $\lambda = 365$ nm-en gerjesztve. Az oldószer polaritás szerinti sorrendben a következők: hexán, toluol, diklór-metán, tetrahydrofuran, 1,4-dioxán, acetón, acetonitril, piridin, dimetil-formamid és dimetil-szulfoxid. Az oldatok koncentrációja $5,6 \frac{mg}{cm^3}$

A 12. ábrán vizuálisan is jól megfigyelhetők a vizsgált vegyületeink emissziós tulajdonságai. ICAB esetében még csak a két legpolárosabb oldószerben DMF-ben és DMSO-ban tapasztalunk intenzív, látható kék fény-emissziót, monoMICAB esetében már az oldószer felében, míg diMICAB-nál a legapolárosabbakat (pl. hexán) kivéve szinte minden oldószerben. Jegyezzük meg, hogy vizuális észlelésnél nem csak az emissziós maximum

helye, hanem az emissziós csúcs alakja is befolyásolja a látványt. ICAB-tól diMICAB felé haladva az emissziós csúcs egyre nagyobb hányada esik a látható tartományba. A képsorozat nagyszerűen bizonyítja a szolvatokróm viselkedést is, azaz az emittált fény hullámhosszának oldószer polaritás függését is: pl. diMICAB-nál apoláros oldószerben (hexán) az emissziós maximum $\lambda_{\max} = 357$ nm, poláros oldószerben (DMSO) az emissziós maximum $\lambda_{\max} = 447$ nm. Figyeljük meg, hogy ICAB és monoMICAB esetében piridinben (jobbról a harmadik üvegse) a vártnál kisebb az emittált fény intenzitása, gyakorlatilag kioltódást (quenching) tapasztalunk. A jelenség a szabad NH hidrogénen keresztüli hidrogénhidas piridin komplex kialakulásával magyarázható, amire a későbbiekben még visszatérünk. diMICAB esetében, ahol nincs szabad NH hidrogén nem is tapasztalunk kioltódást piridin jelenlétében.

3.1.3 A szolvatokróm viselkedés matematikai leírása

Ahogy már az irodalmi áttekintésben is említettem a szolvatokróm viselkedés leírására több elmélet is született az elmúlt évtizedekben. Ezek között találhatóak szemempirikus megközelítések, ahol a mért és számított spektrális paramétereket hasonlítják össze, valamint a tisztán elméleti, kvantumkémiai megközelítés.

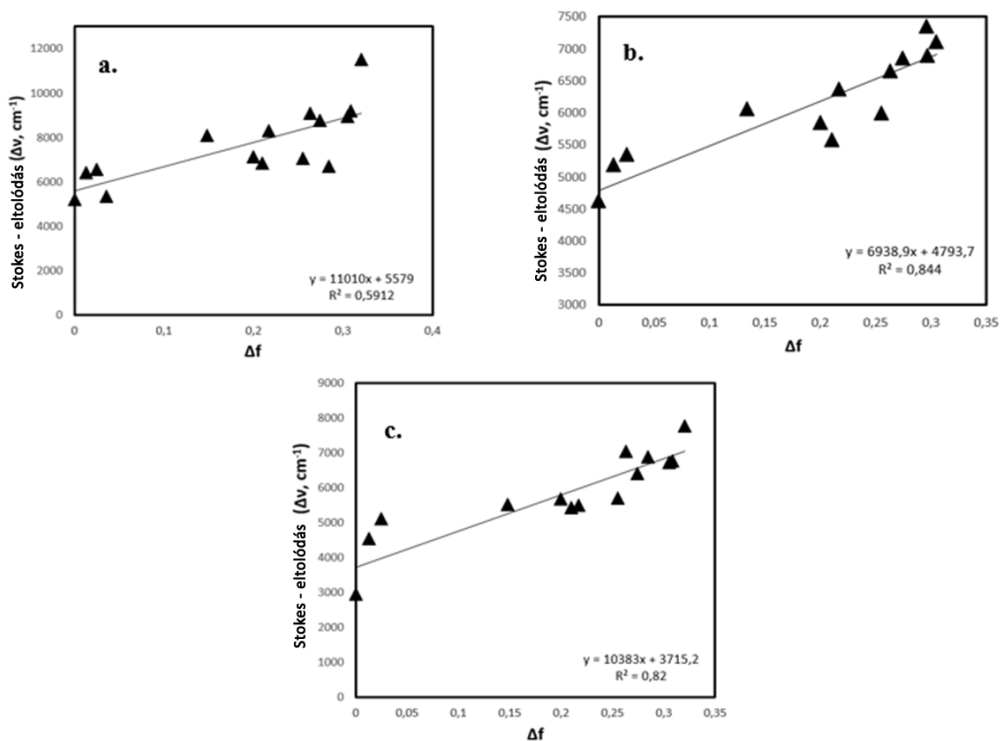
3.1.3.1. A termékek oldószer kölcsönhatásának értelmezése a Lippert - Mataga elmélet szerint

Az emissziós maximumnak az oldószer polaritás-változása miatt bekövetkező eltolódása, vagyis az általános oldószerhatás jellemzésére leggyakrabban a Lippert - Mataga elméletet alkalmazzák. A fluorofor alap- és gerjesztett állapota közötti energiarés nagyságának az oldószer és a fluorofor közötti kölcsönhatás okozta változását írja le a Lippert - Mataga egyenlet:

$$\bar{\nu}_a - \bar{\nu}_e = \frac{2}{hc} \left(\frac{\epsilon-1}{2\epsilon+1} - \frac{n^2-1}{2n^2+1} \right) \frac{(\mu_E - \mu_G)^2}{a^3} + konst., \quad (6)$$

A Stokes-eltolódásokat az orientációs polarizáció függvényében ábrázolva mindhárom vegyület esetén világosan kirajzolódik a lineáris trend, a monoMICAB és diMICAB esetén jó illeszkedéssel, míg az ICAB esetén a pontok nagy szórást mutatnak. Ez az alapvegyület (ICAB) elektrondonor NH₂

csoportján található két hidrogén jelenlétének tulajdonítható, ugyanis specifikus oldószerhatások (H - kötés) kialakítására is lehetőség nyílik, melyeket a Lippert-Mataga egyenlet nem vesz figyelembe. Ezt a magyarázatot támasztja alá az is, hogy legjobb illeszkedést a dimetilezett származéknál (13.b. ábra) kapunk, ahol nincs szabad hidrogén az amino csoporton.



13. ábra: Az ICAB (a.), monoMICAB (c.) és diMICAB (b.) Lippert - Mataga ábrái.

3.1.3.2. A termékek szolvatokróm viselkedésének Kamlet - Taft leírás szerinti értelmezése:

Mivel a Lippert - Mataga elmélet nem alkalmazható a fluorofor–oldószer közötti speciális kölcsönhatások matematikai leírására, ezért egy másik leírásra támaszkodunk. A Kamlet - Taft elmélet az oldószer - oldat közötti savassági - , bázicitási - és polarizáltsági/polaritási tulajdonságok figyelembevételével írja le a fluorofor viselkedését az alábbi multiparaméteres egyenlet (7) felhasználásával:

$$Y = Y_0 + s\pi^* + a\alpha + b\beta \quad (7)$$

E három paraméter figyelembevételével multilineáris regresszió analízissel meghatároztuk a Kamlet - Taft egyenletben szereplő együtthatókat. Ezen együtthatók ismeretében a fenti egyenletek segítségével összehasonlíthatjuk a mért és számolt emissziós maximumokat, illetve a Stokes - eltolódásokat. Az értékeket a víz kivételével az összes vizsgált oldószerre kiszámoltuk és a kísérleti értékek ismeretében ábrázoltuk a 14. ábrán látható módon az alábbi egyenletek felhasználásával:

ICAB

$$v_{em,max}(cm^{-1}) = (27850 \pm 514) - (1285 \pm 600) \cdot \alpha - (2888 \pm 1017) \cdot \beta - (3017 \pm 947) \cdot \pi^* \quad (14a)$$

$$\Delta\nu(cm^{-1}) = (4904 \pm 678) + (2489 \pm 793) \cdot \alpha + (1563 \pm 1343) \cdot \beta + (2426 \pm 1251) \cdot \pi^* \quad (14b)$$

monoMICAB

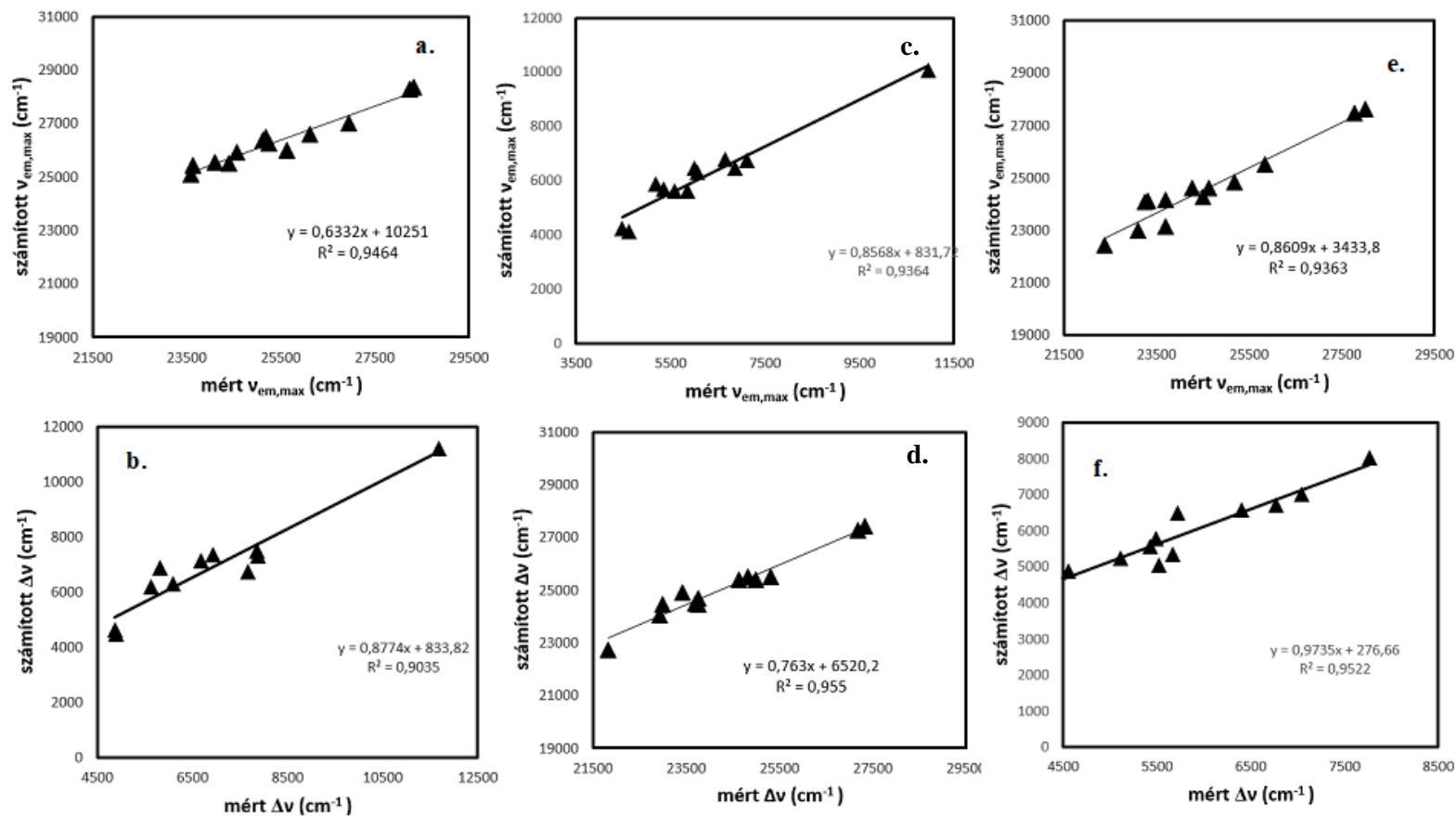
$$v_{em,max}(cm^{-1}) = (27363 \pm 444) - (1024 \pm 518) \cdot \alpha - (2717 \pm 878) \cdot \beta - (2528 \pm 818) \cdot \pi^* \quad (14c)$$

$$\Delta\nu(cm^{-1}) = (4245 \pm 592) + (2442 \pm 692) \cdot \alpha + (1194 \pm 1172) \cdot \beta + (1787 \pm 1092) \cdot \pi^* \quad (14d)$$

diMICAB

$$v_{em,max}(cm^{-1}) = (27363 \pm 444) - (1024 \pm 518) \cdot \alpha - (2717 \pm 878) \cdot \beta - (2528 \pm 818) \cdot \pi^* \quad (14e)$$

$$\Delta\nu(cm^{-1}) = (4245 \pm 592) + (2442 \pm 692) \cdot \alpha + (1194 \pm 1172) \cdot \beta + (1787 \pm 1092) \cdot \pi^* \quad (14f)$$



14. ábra: Az ICAB (a., b.), monoMICAB (c., d.) és diMICAB (e., f.), mért és számolt emissziós maximuma (a., c., e.), Stokes - eltolódása (b., d., f.) a Kamlet - Taft elmélet szerint.

A mért és számolt adatok nagyon jó illeszkedést mutatnak, kis szórással. A regressziós együttható értéke minden esetben meghaladja a legalább a 0,9-et ezért megállapítható, hogy a Kamlet - Taft elmélet alkalmas az ICAB, monoMICAB és diMICAB szolvatokróm tulajdonságának leírására, valamint ezen molekulák valódi szolvatokróm viselkedést mutatnak.

3.1.3.3. A termékek szolvatokróm viselkedésének értelmezése a Catalán leírás szerint

Az elmélet, hasonlóan a Kamlet - Taft elmülethez, ugyanúgy multi- paraméteres egyenlettel írja fel a fluoroforok kölcsönhatását az oldószerekkel. Catalán kutatócsoportjának második elmélete már négy tényező lineáris kombinációját veszi figyelembe, melyek közül kettő (SA és SB) a specifikus, kettő (SP és SdP) a nemspecifikus kölcsönhatásokat írja le (SP az oldószer polarizálhatóságát, SdP a dipolaritását jellemzi), így még megbízhatóbb eredményeket kaphatunk a segítségével, mint a korábbi modellekkel.

$$\tilde{\nu} = \tilde{\nu}_{max,0} + a_{SA}SA + b_{SB} \cdot SB + s_{SP}SP + t_{SdP}SdP \quad (8)$$

Az adatokat szintén multilineáris regressziós adatelemzéssel vizsgáltuk és az alábbi egyenleteket írtuk fel és az illesztett értékeket a 15. ábrán mutatjuk be:

ICAB

$$v_{em,max}(cm^{-1}) = (36072 \pm 1540) - (3298 \pm 781) \cdot SA - (1972 \pm 953) \cdot SB - (9056 \pm 2108) \cdot SP - (4748 \pm 1692) \cdot SdP \quad (15a)$$

$$\Delta\nu(cm^{-1}) = (-2569 \pm 1990) + (4336 \pm 1009) \cdot SA - (501 \pm 1232) \cdot SB + (9206 \pm 2724) \cdot SP + (3761 \pm 2187) \cdot SdP \quad (15b)$$

monoMICAB

$$v_{em,max}(cm^{-1}) = (33345 \pm 1567) - (2361 \pm 794) \cdot SA - (1545 \pm 969) \cdot SB - (5271 \pm 2144) \cdot SP - (5215 \pm 1721) \cdot SdP \quad (15c)$$

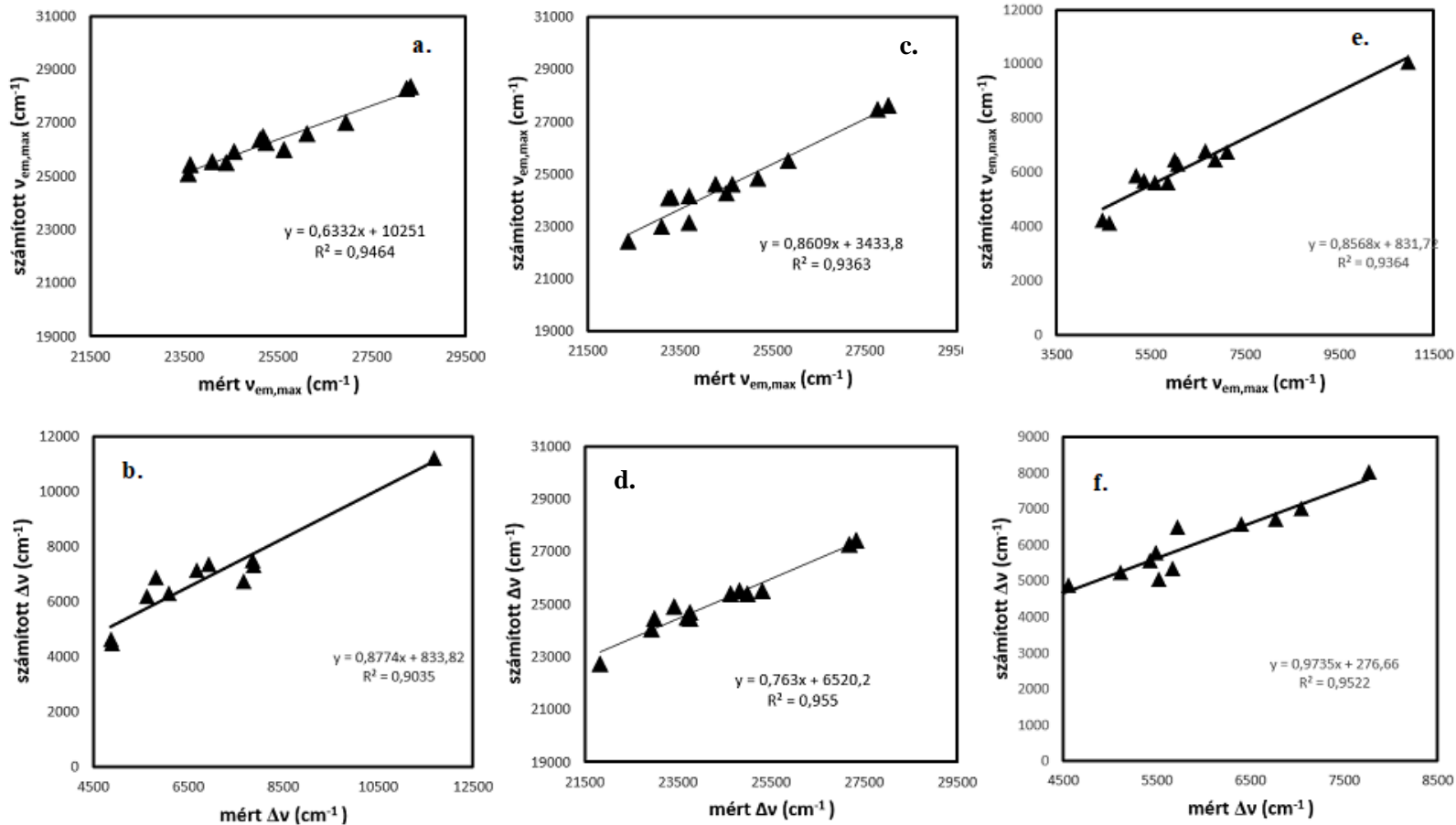
$$\Delta\nu(cm^{-1}) = (689 \pm 1916) + (3174 \pm 972) \cdot SA - (1065 \pm 1186) \cdot SB + (2347 \pm 2623) \cdot SP + (4891 \pm 2106) \cdot SdP \quad (15d)$$

diMICAB

$$v_{em,max}(cm^{-1}) = (34790 \pm 1864) - (1495 \pm 945) \cdot SA - (2909 \pm 1153) \cdot SB - (7299 \pm 2551) \cdot SP - (4061 \pm 2048) \cdot SdP \quad (15e)$$

$$\Delta\nu(cm^{-1}) = (-1648 \pm 1964) + (2288 \pm 996) \cdot SA - (1641 \pm 1215) \cdot SB + (4596 \pm 2688) \cdot SP + (3856 \pm 2158) \cdot SdP \quad (15f)$$

Az egyenletek utáni számok a hozzájuk tartozó diagramokra utalnak, melyek az alábbi ábra részletei:



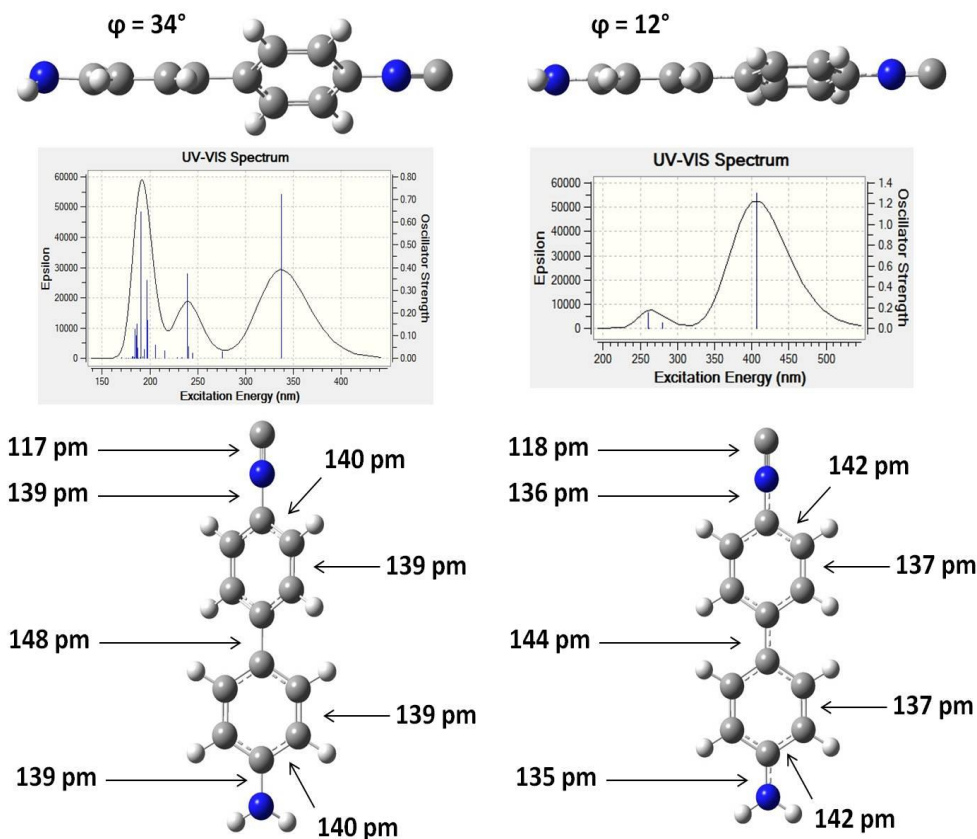
15. ábra: Az ICAB (a., b.), monoMICAB (c., d.), és diMICAB (e., f.) mért és számolt emissziós maximuma (a., c., e.), Stokes – eltolódása (b., d., f.) a Catalán elmélet szerint.

A 15. ábrán látható egyenesekről ugyanaz mondható el, mint a Kamlet-Taft egyenlettel számoltaknál: Nagyon jó illeszkedést tapasztalunk a mért és számolt értékek között 0,9 vagy afölötti R^2 értékekkel. A kiértékelés során rendre a piridin értékeit figyelmen kívül kellett hagynunk, mert nagyon nagy szórása volt. Ennek az oka az lehet, hogy az ICAN-hoz hasonlóan a monoMICAB piridinben komplexet képez, mely jelentős hatással lehet a fluoreszcens tulajdonságokra.

3.1.4. Az ICAB származékok kvantumkémiai vizsgálata

Az optikai tulajdonságok magyarázatára a Debreceni Egyetem Fizikai Kémiai Tanszékének munkatársaival együttműködve kvantumkémiai számításokat végeztünk. Meghatároztuk a vizsgált vegyületek optimált szerkezetét alap- illetve gerjesztett állapotban, dipólusmomentumaikat és kiszámoltuk spektrumaikat.

A dipólusmomentumok várakozásainkkal összhangban mind alap, mind gerjesztett állapotban nagyobbak adódtak ($\mu_g = 8,6$ D ill. $\mu_e = 22$ D), mint a korábban vizsgált ICAN származékok ($\mu_g = 8,23$ és $\mu_e = 14,96$ D) esetében. Az ICAB származékok mégis rosszabb szolvatokróm viselkedést mutattak. Ezt az ellentmondást a molekulaszervezetek kiszámolása után tudtuk feloldani.

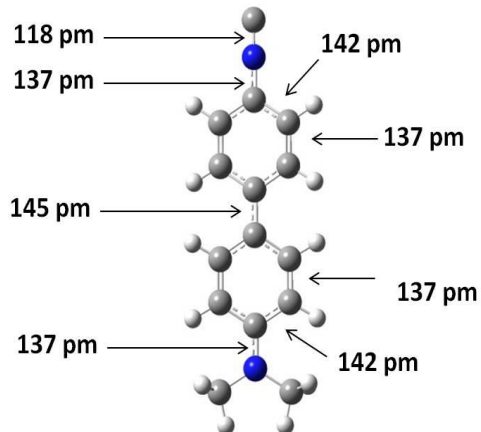
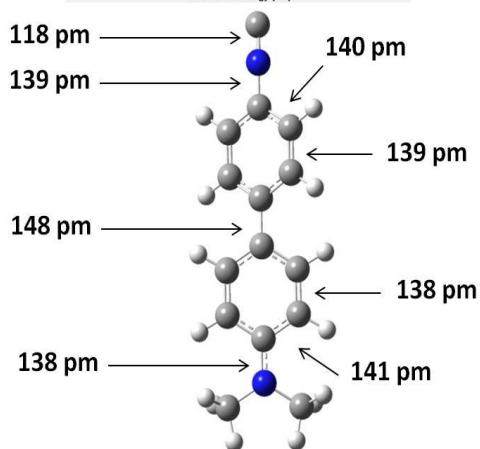
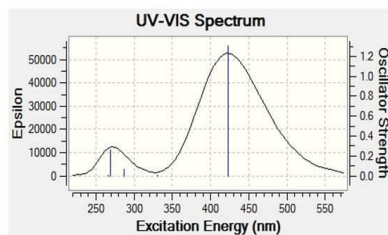
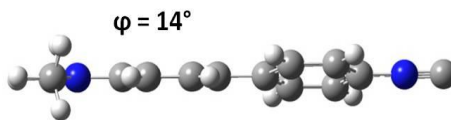
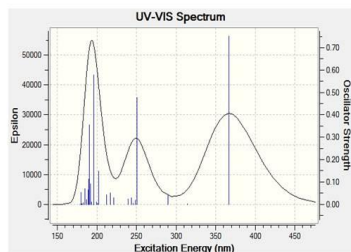
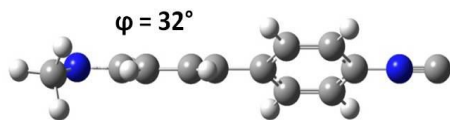


16. ábra: Az ICAB optimált geometriája és számolt adatai.

A 16. ábrán jól megfigyelhető, hogy alapállapotban nem síkalkatú a molekula az ICAB két benzolgyűrűje jelentősen elfordul egymáshoz képest a

diédes szög $\varphi = 34^\circ$. Gerjesztett állapotban a molekula síkabb alkatúvá válik $\varphi = 12^\circ$. A szabad rotáció csökkenti az aromás rendszer delokalizációját a két gyűrű között. Alapállapotban 148 pm a távolság az 1-1' szénatomok között és a program is egyszeres kötéssel jelzi ezt a kötést. Gerjesztett állapotban a kötéstávolság 144 pm-re csökken, ami a kötésrend növekedését jelzi és ez jól megfigyelhető a szerkezetben a konjugációra utaló szaggatott vonal megjelenésével. Az alapállapotú számolt UV-vis spektrum nagyon jó egyezést mutat a mért spektrummal.

A diMICAB számolt szerkezetei (17. ábra) nagy hasonlóságot mutatnak az ICAB esetében kapottakkal. Az alapállapotú diédes szög 2 fokkal csökkent 34-ről 32 fokra, a gerjesztett állapotú, viszont ugyanennyivel nőtt 12-ről 14 fokra. A diMICAB jobb szolvatokróm viselkedését az amino csoport dimetilézés következtében fellépő jobb elektrondonor tulajdonságaival ezáltal a nagyobb töltésmegosztással magyarázhatjuk. Ez a viselkedés nagyon jól megfigyelhető a gerjesztett állapotokra DMSO-ban számolt UV spektrumokon is. ICAB esetében az emissziós maximum ~ 408 nm míg diMICAB-ra ~ 425 nm. Ez jó egyezésben van a mért értékekkel, melyek 424 illetve 447 nm. A különbségek még pontosabbak 17 nm a számolt és 23 nm a mért. Az eltérés a mért és számított értékek között annak tulajdonítható, hogy a szoftver az úgynevezett „polarized medium” megközelítést használja, azaz csak az oldószer polaritását veszi figyelembe és elhanyagolja a speciális oldott anyag–oldószer kölcsönhatásokat.



17. ábra. A diMICAB kvantumkémiai adatai

3.2. *Izociano-aminoakridin alapú fluoreszcens vegyületcsalád, mint kémiai svájci bicska*²

A 3,6-bisz-(dimetilamino)-akridin vagy akridin narancs (AO) fluoreszcens festékként történő első leírása óta^[68], az akridin-diaminok többcélú alkalmazásuk révén az egyik leginkább vizsgált fluorofor osztállyá váltak. Affinitást mutatnak nukleinsavakkal szemben és felhasználhatóak DNS valamint RNS-^{[69][70][71][72][73]} fluorimetriás megkülönböztetésére. Továbbá, bázikus természetének köszönhetően az AO protonálódását jelentős spektrális változások kísérik, így alkalmazható fiziológiás pH szenzorként is.

Az intracelluláris pH pontos mérése rendkívül fontos információkat tárhat fel fiziológiai és patológiai folyamatokról, például elhalt sejtek, rák- és sejtproliferáció tanulmányozása^[74]. Ennek meghatározásához lumineszcens sejtjelölők a legalkalmasabbak^[75], mint például BCECF-ek^{[76][77][78]}, karboxiSNARF-1^{[79][80][81][82]} vagy a 8-hidroxi-pirén-1,3,6-triszulfonsav (HPTS)^{[83][84][85][86]}.

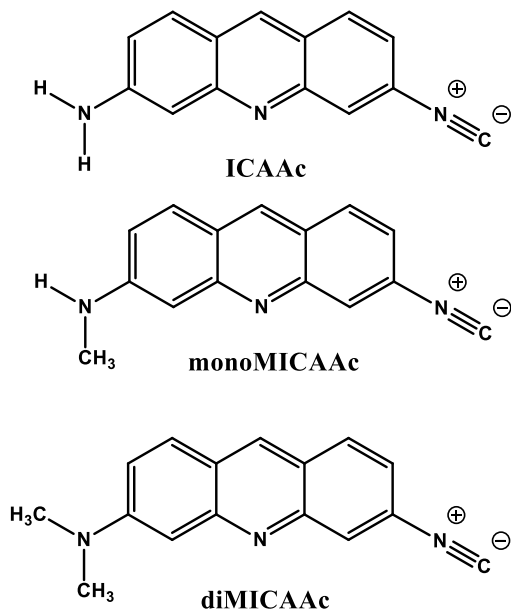
Bár a fentiekben felsorolt (BCECF, karboxiSNARF-1, HPTS) festékek kiváló fiziológiás pH-szenzorok, vannak olyan tényezők, amelyek korlátozzák az alkalmazásukat, mint például a sejtfaon való átjárhatatlanság, a membránon keresztüli szivárgás, a beépíthetőség vagy komplex szerkezet, valamint nem utolsósorban a bonyolult szintézis és az ebből következő magas ár.

Feltételeztük, hogy az AO-hoz hasonló intelligens festékek szintén képesek lesznek detektálni a pH-változást mesterséges és/vagy természetes membránokban ezért az ICAN-származékaink és az AO legjobb tulajdonságainak kombinálásával létrehoztunk egy új fluoreszcens festékcsoportot, az amino-izocianoakridineket (ICAAC). Ezúton egy multifunkcionális izocianoakridin alapú szolvatókrom család jött létre változatos tulajdonságokkal. Megvizsgáltuk a festékek fotofizikai viselkedését, alkalmazhatóságukat fiziológiai pH-szenzorként, micelláris környezetben való viselkedésüket, komplexképződésüket Ag(I)-el. A mérési eredményeket kvantumkémiai számításokkal támasztottuk alá. Ezen felül megvizsgáltuk az ICAAC - származékok vitális sejtfestési képességét is

² A 3.2 fejezet az alábbi tudományos publikáció alapján készült: Miklós Nagy, Dávid Rácz, Zsolt Nagy, Péter Fehér, Sándor Kovács, Csaba Bankó, Zsolt Bacso, Alexandra Kiss, Miklós Zsuga, and Sandor Keki: Amino-isocyanocridines: Novel, Tunable Solvatochromic Acridine Orange Type Fluorophores as Physiological pH Probes and Biosensors, *Scientific Reports*, 9, 8250, (2019)

3.2.1. Optikai tulajdonságok

Izociano származékainkat 3,6-diaminoakridinből (Proflavin) állítottuk elő az előző fejezetben már ismertetett diklór-karbénos reakcióval. A képződött termékek szerkezetét és nevét a 18. ábrán foglaltuk össze.



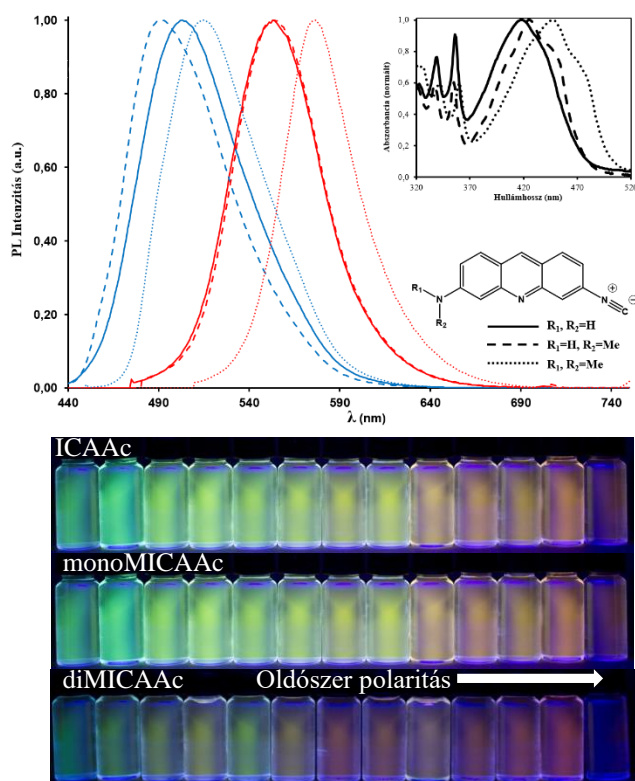
18. ábra: A 3.2. fejezetben ismertetett fluoroforok szerkezete és neve fentről lefelé: 3-amino-6-izocianoakridin (**ICAAC**), 3-N-metilamino-6-izocianoakridin (**monoMICAAC**), 3-N,N-dimetilamino-6-izocianoakridin (**diMICAAC**).

Az ICAAc, monoMICAAC és diMICAAC optofizikai tulajdonságait, különböző oldószerekben, a 19. ábrán és a 3. táblázatban foglaltuk össze.

Az oldószer polaritásától függetlenül, mindhárom fent említett ICAAc származék esetén egy széles abszorpciós sáv található a 370-540 nm-ig terjedő hullámhossz tartományban (19. ábra), amely a donor- (amino) és az akceptor (izociano) csoportok közötti belső töltésvitelnek (ICT) tulajdonítható. Ezt az ICT sávot nagyobb energiáknál (~300–370 nm), strukturált, átfedő sávok kísérik, melyek jellemzőek az akridin gyűrűre és megjelenésük az akridin gyűrű helyileg gerjesztett állapotának (locally excited state (LE)) következménye. Ezek a sávok szintén megtalálhatóak a 2-aminoakridin UV-látható spektrumában is, azonban mind a proflavin, mind az akridin narancs spektrumából hiányoznak. A strukturált sávok ismételt megjelenését a merev, hármaskötésű, elektronszívó izocianid csoport jelenlétével lehet magyarázni, amely megbontja a molekula szimmetriáját az akridin narancshoz képest. Noha

az LE sávok helyzetét nem befolyásolja az oldószer polaritásának megváltoztatása, a nagyobb hullámhosszú abszorpciós sávok (ICT) jelentős vöröseltolódást mutatnak az oldószer polaritásának növekedésével.

Az aminocsoport elektrondonáló képességének metilézéssel történő növelése szintén a nagyobb hullámhosszú abszorpciós sávok batokróm eltolódását eredményezi. Ezen eltolódások meghaladják az oldószer polaritásának megváltoztatásakor megfigyelt értékeket. Vagyis minél nagyobb az amino csoport elektrondonáló képessége, annál nagyobb hullámhosszon helyezkedik el az ICT abszorpciós csúcsa.

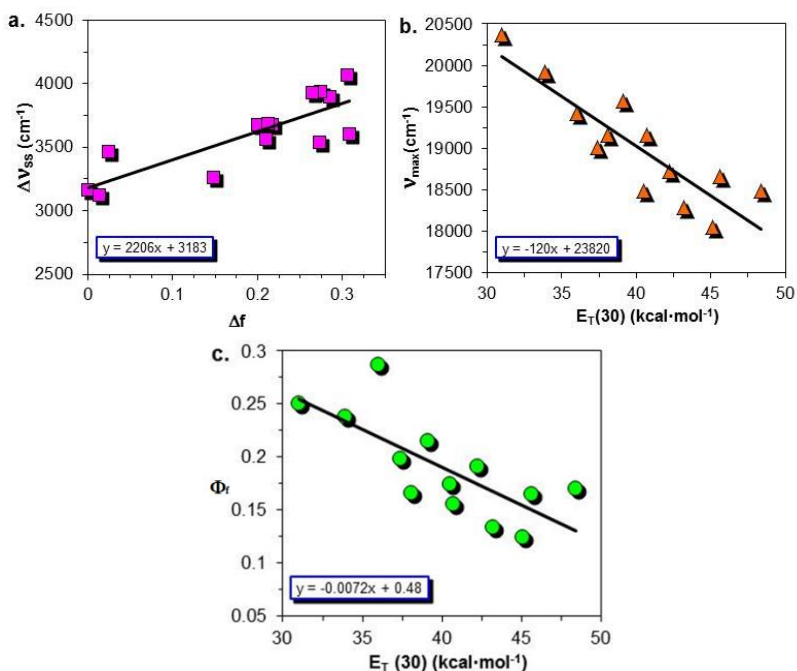


19. ábra: Az ICAAc származékok normált emissziós spektrumai (felső) hexánban (kék) és vízben (piros) mérve. A beszűrt diagramon a hexánban mért normált gerjesztési spektrum látható. Az ICAAc származékok (alsó) különböző polaritású oldószerekben. ($\lambda_{ex} = 365$ nm). Az oldószeres balról jobbra a következők: hexán (1), toluol (2), 1,4- dioxán (3), diklórmetán (4), kloroform (5), THF (6), acetonitril (7), aceton (8), piridin (9), metanol (10), DMF (11), DMSO (12), víz (13).

Amint a 19. ábrán is szembe tűnő, mindhárom származéknak jelentős az emissziós tartománya, mely a zöldtől a narancssárgáig terjed. Vízben a

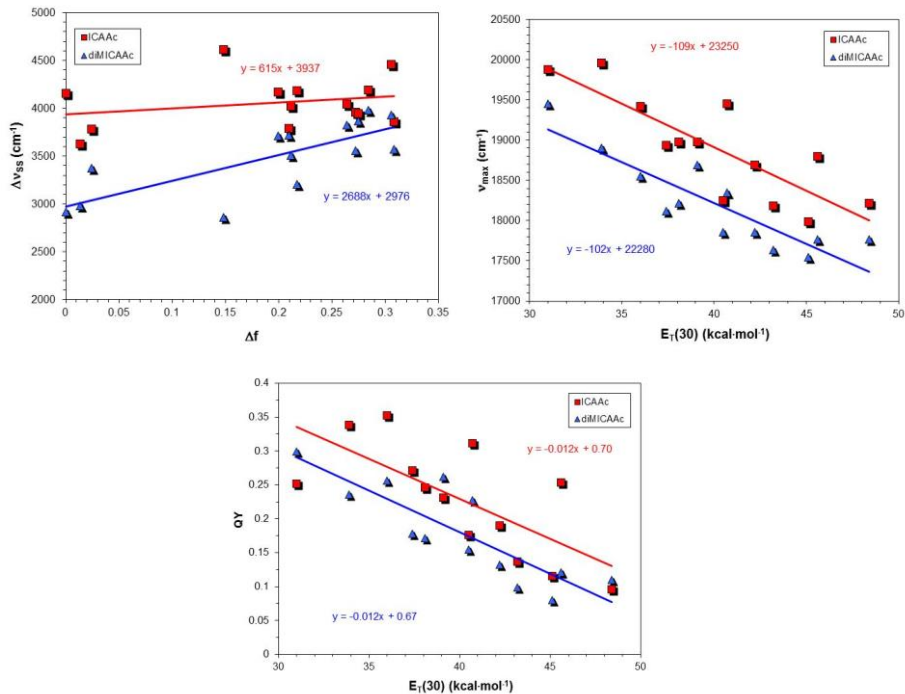
diMICAAC emissziós maximuma 576 nm, amely messze a legnagyobb érték a 3 festék maximumai közül, továbbá ez 50 nm-rel nagyobb, mint az AO-é (526 nm). Míg az AO szolvatokróm tartománya körülbelül 30 nm, addig a monoMICAAC és a diMICAAC esetében ez az érték kétszeresére nő, és meghaladja a 60 nm-t.

Az ICAAC származékok szolvatokróm viselkedésének jobb megértése érdekében Lippert - Mataga és Reichard ábrákat készítettünk a 6. egyenlet szerint és a 20. ábrán mutatjuk be a monoMICAAC-ra kapott illesztéseket, míg a másik két származék eredményeit a 21. ábra mutatja.



20. ábra: A monoMICAAC fotofizikai tulajdonságainak változása az oldószer polaritásának változásával: (a) Stokes eltolódás – orientációs polarizálhatóság; (b) $\lambda_{em\ max}$ – oldószer polaritására jellemző paraméter $E_T(30)$; (c) Φ_f - $E_T(30)$

Az oldószer polaritásának növelésével az emittált fény hullámhossza batokróm irányba változik (20.b. ábra) a gerjesztett állapotban lévő molekula körüli oldószermolekulák átrendeződése miatt, ezzel csökkentve az alap és az gerjesztett állapot közötti energiárést.



21. ábra: Az ICAAc és a diMICAAC fotofizikai tulajdonságainak változása az oldószer polaritásának változásával: **(bal felső)** Stokes eltolódás – orientációs polarizálhatóság; **(jobb felső)** $\lambda_{em\ max}$ – oldószer polarítására jellemző paraméter $E_T(30)$; **(alsó)** Φ_f - $E_T(30)$

Ennek eredményeként a kibocsátott foton energiája szintén csökken - emellett a kvantumhasznosítási tényezők lineáris csökkenést mutatnak az oldószer polaritási paraméter ($E_T(30)$) növekvő értékeivel, ami összhangban áll a 20. ábrán látottakkal. Vizes közegben minden fluorofor oldatában nagyon kicsik a Φ_f -k, melyek közül a diMICAAC értékei a legkisebbek. A vízben mért kis Φ_f előnyös sejtfestési alkalmazásoknál, ahol elengedhetetlen a háttér fluoreszcenciájának elnyomása.

Az ICAAc-származékok széles szolvatokróm tartománya azzal magyarázható, hogy jelentős dipólusmomentum-különbségük van az alap- és az gerjesztett állapot között az elektronszívó izocianid csoport miatt, ami a molekulákat polárosabbá teszi gerjesztett állapotban. A dipólusmomentum különbséget kísérletileg határoztuk meg a Lippert - Mataga modell meredekségének egyenletéből és DFT számítások segítségével is (3. táblázat).

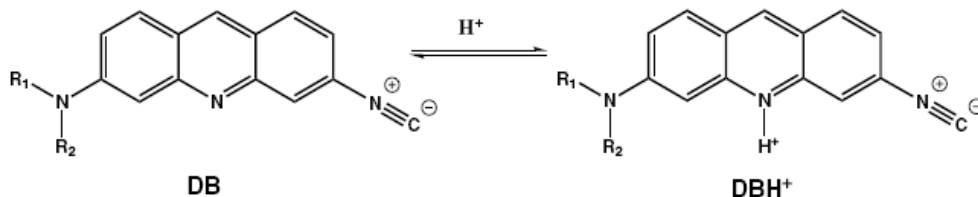
3. táblázat: Az ICAAc származékok különböző polaritású oldószerben mért optikai tulajdonságainak összehasonlítása (Emisszió ($\lambda_{em\ max}$), gerjesztés ($\lambda_{ex\ max}$), Stokes-eltolódás ($\Delta\nu$), kvantumhasznosítási tényező (Φ_F), Moláris abszorbancia (ϵ), elméletben és gyakorlatban meghatározott dipólusmomentum különbségek ($\mu_g-\mu_a$))

		AO	ICAAc	mono-MICAAc	diMICAAc
Hexán (Polaritásiindex=0)	$\lambda_{em\ max}$ (nm)	498	503	491	514
	$\lambda_{ex\ max}$ (nm)	412	418	425	447
	$\Delta\nu$ (cm ⁻¹)	4191	4158	3163	2916
Dioxán (Polaritásiindex=4,8)	$\lambda_{em\ max}$ (nm)	500	515	515	539
	$\lambda_{ex\ max}$ (nm)	426	431	437	456
	$\Delta\nu$ (cm ⁻¹)	3474	3784	3466	3377
Víz (Polaritásiindex=9)	$\lambda_{em\ max}$ (nm)	526	553	554	576
	$\lambda_{ex\ max}$ (nm)	492	466	472	497
	$\Delta\nu$ (cm ⁻¹)	1313	3376	3136	2760
	ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹)	44000	10132	5196	13344
	Φ_F (%)	15	1,8	2,9	0,4
	$\Delta\lambda_{em}$ (nm)	28	53	63	62
$\mu_g-\mu_a$ /D	(DTF)	21	6,1	6,8	7,9
$\mu_g-\mu_a$ /D	(Lippert - Mataga)	2,271	5,6±1,4	8,1±0,8	8,9±1,1

Amint az a 3. táblázat adataiból kitűnik, az ICAAc-származékok gerjesztett állapotbeli dipólusmomentumai legalább háromszor nagyobbak, mint az AO esetén, és egyértelmű kapcsolatot fedezhetünk fel az amino csoport metilezése és a dipólusmomentum növekedése között is.

3.2.2. Az ICAAc származékok sav-bázis viselkedésének vizsgálata vizes közegben

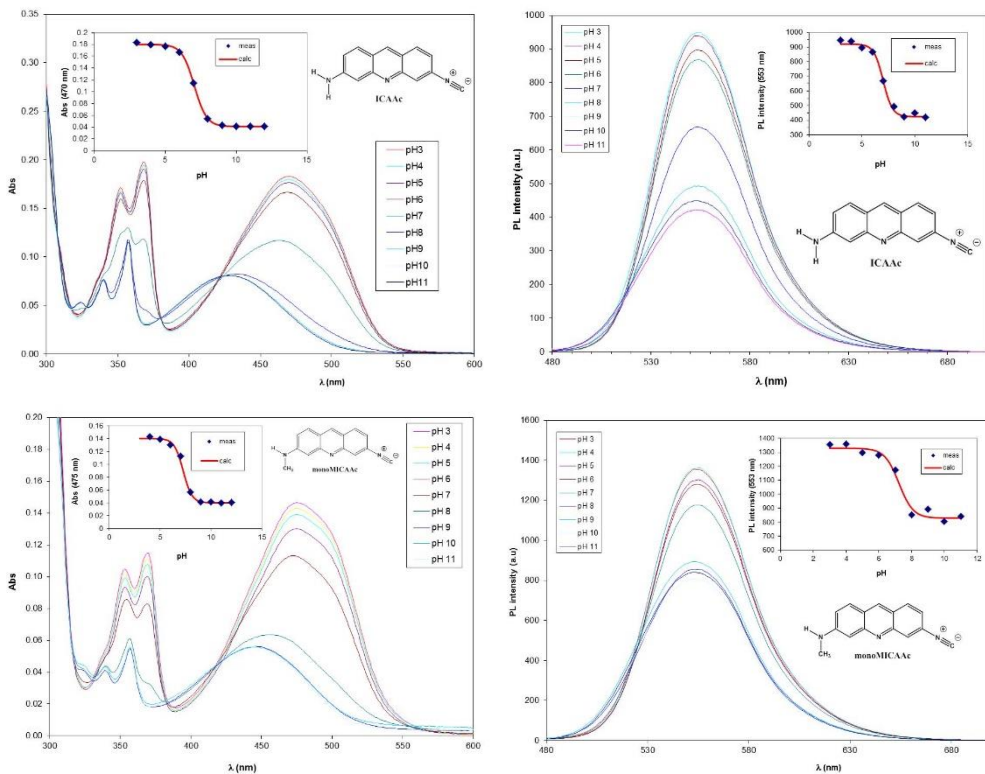
Az akridinbázisú festékek, mint például az AO, vizes közegekben a pH függvényében eltérő fotofizikai viselkedést mutatnak a 22. ábrán szemléltetett sav-bázis egyensúly következtében. Feltételeztük, hogy izocianid származékaink is követik ezt a mintát. Az alap bázis (DB) és a protonált (DBH⁺) formák között az alábbi sav-bázis egyensúly áll fenn.



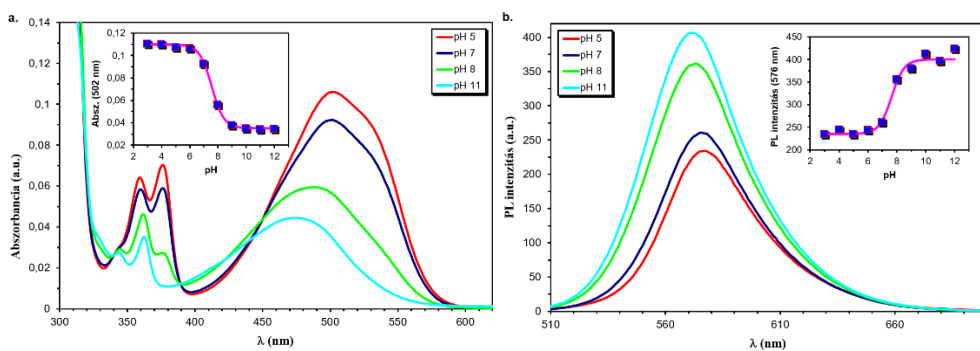
22. ábra: Az ICAAc származékok feltételezett protonált (DBH⁺) és a deprotonált (DB) formái.

Az ICAAc-ok sav-bázis tulajdonságainak jellemzése céljából UV-látható és „steady-state” fluoreszcens méréseket végeztünk pH = 2-12 tartományban, Britton-Robinson "univerzális" pufferben (BRB). Az ICAAc és monoMICAAC mért eredményei a 23. ábrán kerülnek bemutatásra, míg a diMICAAC megfelelő spektrumai a 24. ábrán.

A 23. ábrán jól látható, hogy a mindhárom vegyület protonálódását jelentős spektrális változások kísérik. Az abszorpciós spektrumokban a protonált formához egy széles töltésátviteli sáv rendelhető, melynek maximuma $\lambda_{ex,max} = 470$ nm ICAAc-ra, 475 nm monoMICAAC-ra és 502 nm-re diMICAAC-ra, pH = 3 esetén. A szabad bázis formánál a gerjesztési maximum hipszokróm eltolódás eredményeképp ICAAc-nál $\lambda_{ex,max} = 428$ nm-re, monoMICAAC-ra 446 nm-re és diMICAAC-ra 470 nm-re, amikor a közeg pH-ja 11-re emelkedik. A protonált formák abszorpciós és emissziós csúcsainak intenzitását a pH függvényében ábrázolva jellegzetes titrálási görbéket kapunk, melyek a 24. ábrán figyelhetőek meg. A görbék inflexiós pontja pH = 7-8 között található, mely nagyon ígéretes fiziológiás pH-érzékelés szempontjából.



23. ábra: Az ICAAc (**felül**) és a monoMICAAC (**alul**) UV-látható- (**bal**) és emissziós (**jobb**) spektrumai különböző pH-jú BRB univerzális pufferben ($T = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$, $[\text{ICAAC származék}] = 4,58 \times 10^{-5}\text{ M}$, $V = 3,00\text{ cm}^3$)

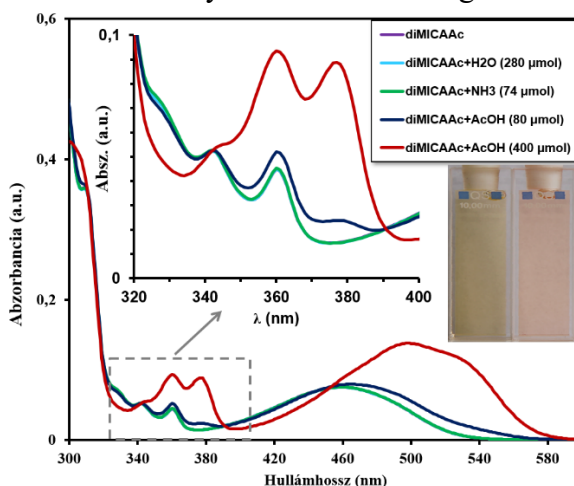


24. ábra: A diMICAAC UV-látható- (**bal**) és emissziós (**jobb**) spektrumai különböző pH-jú BRB univerzális pufferben ($T = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$, $[\text{diMICAAC}] = 4,58 \times 10^{-5}\text{ M}$, $V = 3,00\text{ cm}^3$)

Az akridin narancsot elterjedten használják intracelluláris pH-szenzorként a töltésátviteli sávok eltolódását kihasználva. Ki kell azonban hangsúlyoznunk két különbséget, mely származékaink esetén fennáll: 1. Az AO bázicitása

($pK_a = 10,5$) jelentősen nagyobb, mint ICAAc származékainké ($pK_a = 7-8$), így származékaink várhatóan jobban alkalmazhatók a fiziológiás tartományban, mely a legfontosabb az élő sejteknél. 2. A töltésátviteli sávok mellett a sav-bázis forma közötti átmenet nagyon jól vizsgálható a 320 nm és 400 nm között elhelyezkedő kisebb akridinszerű (LE) abszorpciós sávok alakjának változásával is. Ezek a sávok teljesen hiányoznak az AO abszorpciós spektrumából. A kis intenzitású, három csúcs minden vizsgált oldószerre jellemző (lásd 19. ábra) a víz kivételével.

Annak megállapítására, hogyan függ az LE sávok alakja a közeg kémhatásától az alábbi egyszerű kísérletet végeztük el: diMICAAC-ot oldottunk acetonitrilben és az UV-spektrumát vizsgáltuk víz, ammónia és ecetsav jelenlétében. Az eredményeket a 25. ábrán foglaltuk össze.



25. ábra: A diMICAAC UV spektrumának változása víz, bázis (NH_3) és sav (CH_3COOH) hozzáadása után. Az oldószer acetonitril. A beszűrt ábrán a sárga oldat (bal oldali) a bázikus formához, míg a piros oldat (jobb oldali) a savas formához tartozik.

A 25. ábra alapján az abszorpciós spektrumok nem változnak kis mennyiségű víz vagy bázis (NH_3) hozzáadásával. Azonban kb. 7x mól feleslegben hozzáadott ecetsav jelenlétében új, széles kettős sáv kezd kialakulni, ~ 375 nm-nél, mely csak igen nagy (kb. 35x moláris) ecetsav hozzáadásával lesz jelentős. Ezek alapján megállapíthatjuk, hogy a szabad bázis (DB) UV-látható spektruma ugyanabban a régióban összetettebb abszorpciós mintázatot mutat, amely három, közepes intenzitású csúcsból áll, míg a protonált részecskék spektruma csak két szélesebb és nagyobb intenzitású csúcsot tartalmaz. Miután lemértük az abszorpciós spektrumokat

az $1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-4}$ M koncentráció-tartományban vízben és pufferekben is, nem találtunk eltérést a Lambert-Beer törvénytől, ezzel kizártuk a dimerek képződését.

3.2.3. A pH - függés matematikai leírása

Feltételezve, hogy a DB és a DBH^+ között egyensúly áll fenn, a pH-függést (abszorbancia vagy fluoreszcens intenzitás) Y -nal jelöljük $Y(\lambda, pH)$, a savi-disszociációs állandó (K_a) értéke meghatározható az (9) egyenlettel, melyet az absz. (502) - pH függvény pontjaira illesztünk, ahogyan a 23-24. ábrák diagramjain láthatjuk. Az eredményeket a 4. táblázatban mutatom be.

$$Y(\lambda, pH) = \frac{Y_\lambda}{1+10^{pK_a-pH}} + \frac{Y_{BH^+}(\lambda) \cdot 10^{pK_a-pH}}{1+10^{pK_a-pH}} \quad (9)$$

3. táblázat: Az ICAAc származékok abszorpció ($\lambda_{abs,max}$) és emissziós ($\lambda_{em,max}$) maximumai pH = 3 és pH = 11 értékeknél, BRB pufferben. I_3/I_{11} a pH = 3 és pH = 11-en mért fluoreszcens intenzitás arányt jelenti. pK_a a savi disszociációs állandó logaritmus.

Vegyület	pH=3		pH=11		I_3/I_{11}	pK_a (UV-vis)	pK_a (FL)
	$\lambda_{abs,max}$	$\lambda_{em,max}$	$\lambda_{abs,max}$	$\lambda_{em,max}$			
	(nm)		(nm)				
ICAAc	470	554	428	553	2,25	7,05±0,02	6,96±0,07
monoMICA	475	553	446	553	1,61	7,35±0,07	7,22±0,15
diMICAAC	502	577	470	572	0,58	7,58±0,03	7,71±0,13

A különböző módszerekkel meghatározott pK_a értékek nagyon kis eltérést mutatnak a $pK_a = 7,05$ és $7,58$ (UV-vis) és a $pK_a = 6,96$ és $7,71$ (fluoreszcencia) értékek között. Ezek alapján az ICAAc származékok három nagyságrenddel gyengébb bázisok, mint az AO ($pK_a = 10,5$). Az emittált fény intenzitása is erősen függ a pH-tól: növekszik a savasabb közegben az ICAAc és a monoMICAAC esetében. A pH = 3-as és pH = 11-es közegben mért intenzitásokból számított I_3/I_{11} fluoreszcens intenzitás arány az ICAAc és a monoMICAAC esetében 2,25 és 1,69. A helyzet teljesen más a diMICAAC-nál, ahol a fluoreszcens intenzitás nagyobb pH-nál növekszik, és az I_3/I_{11} csak 0,58.

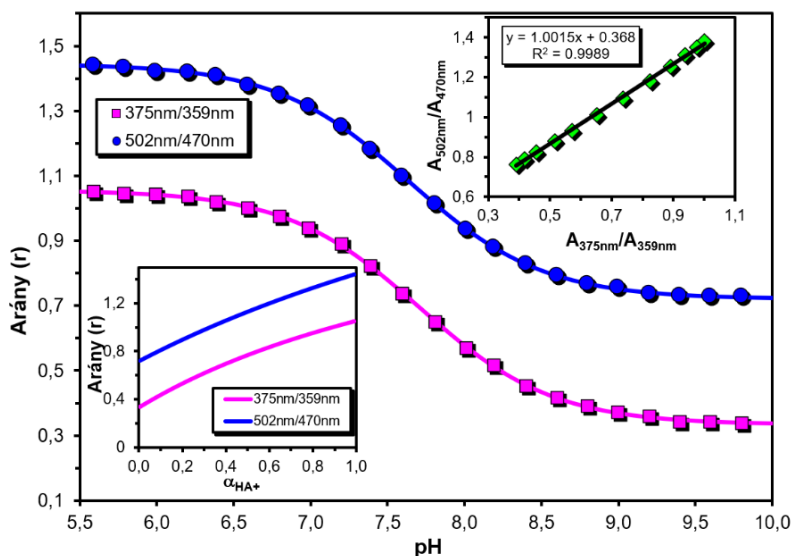
3.2.4. A diMICAac felhasználása pH meghatározására

A diMICAac pKa értéke 7,5, amely a fiziológiai pH-tartományba esik, lehetővé téve a molekulát fluoreszcens bioszenzorként történő alkalmazásra. A pH pontos meghatározásához az (10) egyenlet alapján kalibrációs görbét vettük fel:

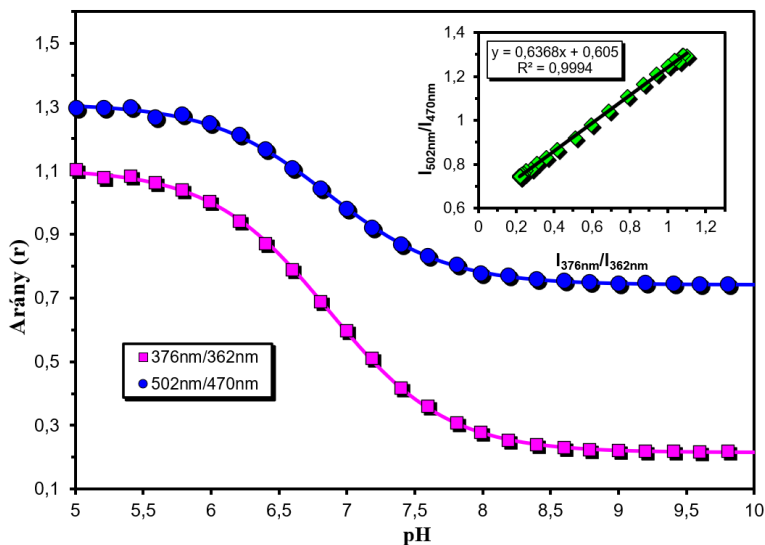
$$r = \frac{b_1 + 10^{-pH}}{b_2 + b_3 10^{-pH}} \quad (10)$$

ahol "r" a különböző hullámhosszokon mért abszorbanciák (vagy fluoreszcens intenzitások) aránya, b_1 , b_2 és b_3 , pedig az illesztéshez használt paraméterek.

A diMICAac-ra meghatározott UV-vis és fluoreszcens excitációból számolt titrálási görbéket a 26. és 27. ábra szemlélteti. Amint az alábbi ábrákon is látszik, a két módszerrel kapott titrálási görbe lefutása nagyon hasonló egymáshoz.



26. ábra: A diMICAac UV-látható titrálás eredményei különböző kémhatású BRB pufferben. A mérési eredményekre a (10)-et illesztettük. A bal oldalon beszűrt ábra az abszorbancia arányokat mutatja a protonált forma koncentrációjának függvényében α_{HA^+} . A jobb oldalon beszűrt ábra a számított abszorbancia arányok és az akridinhez hasonló abszorpciós hullámhosszok közötti korrelációt mutatja. ($T = 20 \text{ }^\circ\text{C}$, $[\text{fluorofor}] = 1,14 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, $V = 3,00 \text{ cm}^3$).



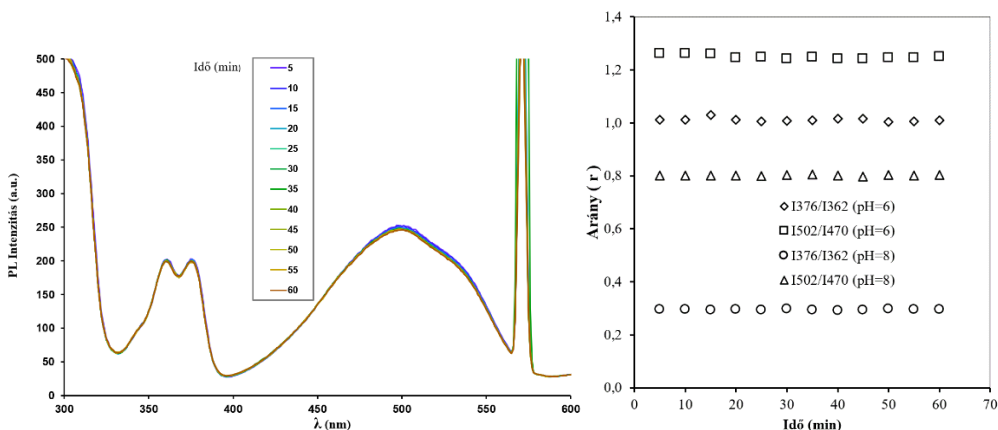
27. ábra: Különböző pH-n mért diMICAAC excitációs és FL-intenzitás görbéi BRB „univerzális” pufferoldatban. Az illesztés (folytonos vonal) a 10. egyenlet alapján történt. A beszűrt ábra (jobb felső) az intenzitásarányokat mutatja. ($T = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$, $[\text{fluorofor}] = 1,14 \times 10^{-5}\text{ M}$, $V = 3,00\text{ cm}^3$) Illesztési paraméterek a I_{502}/I_{470} arányra: $b_1 = 7,78 \cdot 10^{-8}$, $b_2 = 1,05 \cdot 10^{-7}$ és $b_3 = 7,46 \cdot 10^{-1}$ és a I_{376}/I_{362} arányra: $b_1 = 2,65 \cdot 10^{-8}$, $b_2 = 1,23 \cdot 10^{-7}$ and $b_3 = 9,05 \cdot 10^{-1}$.

Az A_{502}/A_{470} arány 1,43-0,73, míg az A_{375}/A_{359} arány 1,05-0,34 között változott az 5,55-10 pH-tartományban. A görbe meredekségében jelentős változás a pH = 6,5-8,5 értékek között látható, ami a fiziológias pH-meghatározáshoz különösen alkalmassá teszi a fluorofort. Ezenkívül meg kell jegyezni, hogy a két intenzitásarány között szinte tökéletes a korreláció, ahogy az a 26. ábrán is látható. Az abszorbancia méréssel ellentétben a fluoreszcencia (gerjesztés) titrálási görbe (27. ábra) körülbelül 1 pH-egységgel balra tolódik el, vagyis a meredekségben végbemenő változás a pH = 5,5-8,0 közötti tartományban azonosítható, így bioszenzorként történő alkalmazása tovább szélesedik a savas tartományban. A módszer alkalmazhatóságának és reprodukálhatóságának vizsgálatára, ami főként az oldatban lévő komponensektől és az ionerősségtől függ, különböző pH-jú és összetételű pufferoldatokban diMICAAC hozzáadása után lemértük az elnyelési és a fluoreszcens spektrumokat. A 10. egyenlet és a 26-27. ábrák felhasználásával a spektrumokból visszszámítottuk a pH-t. Az eredményeket az 5. táblázatban foglaltam össze.

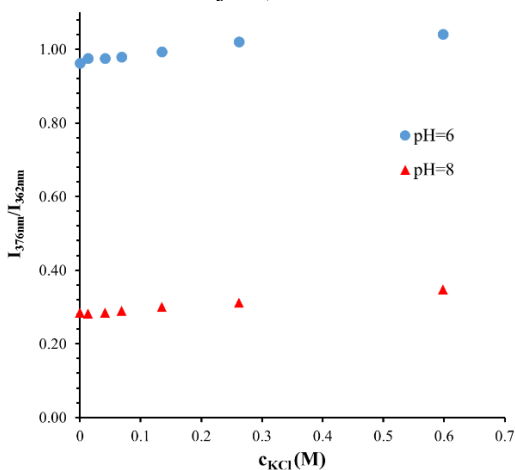
5. táblázat: A pH mérés reprodukálhatóságának vizsgálata különböző pufferekben. A spektroszkópiai méréseket $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (normál betű) és $\text{NaH}_2\text{BO}_3/\text{Na}_2\text{HBO}_3$ (dőlt betű) pufferekben végeztük. A táblázatban a puffer pontos pH-ja ($\text{pH}_{\text{beállított}}$), valamint az UV-látható (pH_{Absz}) és fluoreszcenciás (pH_{PL}) spektrumból meghatározott adatokat tartalmazza.

A_{375}/A_{359}	I_{376}/I_{362}	pH beállított	pH_{Absz}	pH_{PL}
1,031±0,003 <i>1,043±0,002</i>	0,986±0,006 <i>1,005±0,008</i>	6,01	6,24±0,06 5,98±0,02	6,06±0,03 5,97±0,04
1,000±0,002 <i>1,020±0,011</i>	0,814±0,004 <i>0,857±0,008</i>	6,49	6,63±0,01 6,42±0,15	6,55±0,01 6,45±0,02
0,914±0,003 <i>0,934±0,004</i>	0,562±0,002 <i>0,623±0,002</i>	7,00	7,10±0,01 7,02±0,02	7,16±0,00 6,94±0,00
0,772±0,011 <i>0,751±0,006</i>	0,367±0,019 <i>0,365±0,001</i>	7,51	7,52±0,02 7,57±0,03	7,55±0,07 7,56±0,00
0,589±0,006 <i>0,565±0,002</i>	0,272±0,001 <i>0,267±0,002</i>	8,00	7,97±0,02 8,03±0,05	8,03±0,01 8,08±0,02
0,445±0,009 <i>0,440±0,007</i>	0,234±0,001 <i>0,231±0,001</i>	8,50	8,45±0,04 8,47±0,03	8,54±0,03 8,60±0,02
0,395±0,002 <i>0,377±0,006</i>	0,219±0,002 <i>0,219±0,001</i>	9,00	8,75±0,02 8,91±0,06	9,17±0,23 8,29±0,11

A foszfát- és borátpufferek spektrálisan mért pH-értékei jól egyeznek a korábban beállított értékekkel a 6,00–9,00 pH-tartományban. Nem lehetett szelektivitást meghatározni a különböző kémiai komponensek tekintetében. A legnagyobb hiba 2,4%, ami a vizsgálati tartomány széleinél adódott, míg pH = 7,00–8,50 között a hiba mértéke jóval 1% alatt volt mind az UV-látható, mind a fluoreszcenciás módszernél, ami fontos a biológiai alkalmazás esetében. A módszert 0,10 M NaHCO_3 -oldattal, 8,50-ös pH-n is teszteltük. A mért értékek pH = 8,53 ± 0,07 (UV-látható) és pH = 8,59 ± 0,02 (fluoreszcens). A módszer stabilitását foszfátpufferben (pH = 6, illetve 8) egy órán át vizsgáltuk. Ebben az időszakban nem tapasztaltunk szignifikáns változást (a relatív hibák 0,6% pH = 6 és 0,4% pH = 8 esetén), amint azt az 28. ábra szemlélteti.



28. ábra: A diMICAac fluoreszcens stabilitásvizsgálata pH = 6-os foszfát pufferben (bal) és különböző gerjesztési maximumok arányainak változása pH = 6 és 8-as pufferekben (jobb).



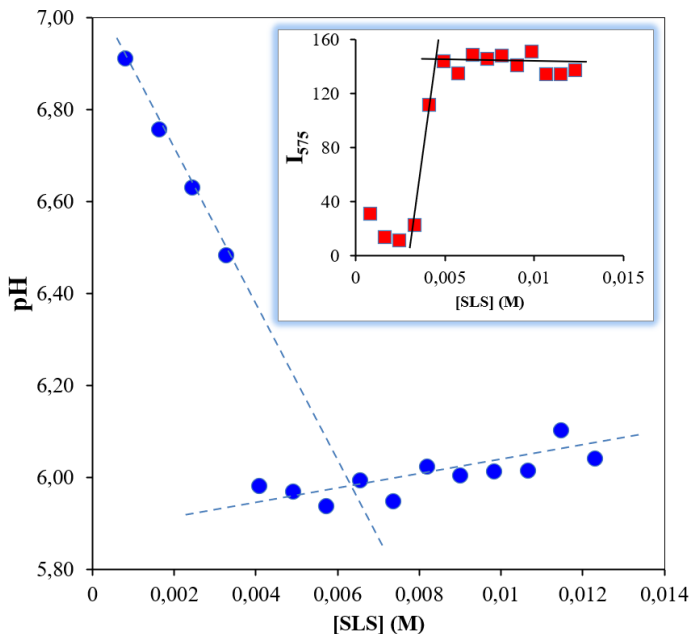
29. ábra: A pH= 6-os és 8-as BRB pufferben mért fluoreszcens intenzitásarányok változása tömény KCl oldat hatására.

Az ionerősség hatásának vizsgálatára a pH = 6 és 8-es BRB-ben oldott mintákat telített KCl oldattal titráltuk. A mérési eredmények a 29. ábrán láthatóak. A módszer robusztusságát jól mutatja, hogy a hibák még 0,5 M KCl koncentráció esetén sem nőnek 1% fölé. Összefoglalva, a módszer stabil és 5 percen belül felhasználható a festéknek a közeggel való keverése után.

3.2.5. Kritikus micellaképződési koncentráció meghatározása

Korábban ismertették^[88] már, hogy az anionos felületaktív anyagokból, például a nátrium-lauril-szulfátból álló micellák Stern-rétegének pH-ja jelentősen eltérhet a közeg kémhatásától. Az irodalomból ismert, hogy az AO

és az SLS-ből képződött micellák között, mind hidrofób, mind elektrosztatikus kölcsönhatás felléphet. Mivel az ICAAc származékok jelentősen polárisak, valamint az aromás gyűrűben lévő nitrogén könnyen protonálódik még semleges pH-n is, sokkal valószínűbb, hogy a molekulák a Stern rétegben maradnak, ahelyett, hogy az apoláros magba vándorolnának át. A származékok micelláris közegben történő viselkedésének vizsgálata céljából a diMICAAC-ot 50 mM BRB pufferben elkészített SLS oldatokban pH = 7 értéken vizsgáltuk (az közeg pH állandóságának érdekében). A pH-értékeket a gerjesztési spektrum alapján számítottuk az I_{376}/I_{362} arány felhasználásával. A fluoreszcens intenzitás csúcsmaximuma 575 nm-nek adódott, mely hullámhosszon az intenzitás változás követése lehetőséget teremt a CMC meghatározására. A mikrokörnyezet pH-jának és az 575 nm-es csúcs koncentrációfüggésének változását a 30. ábra foglalja össze.

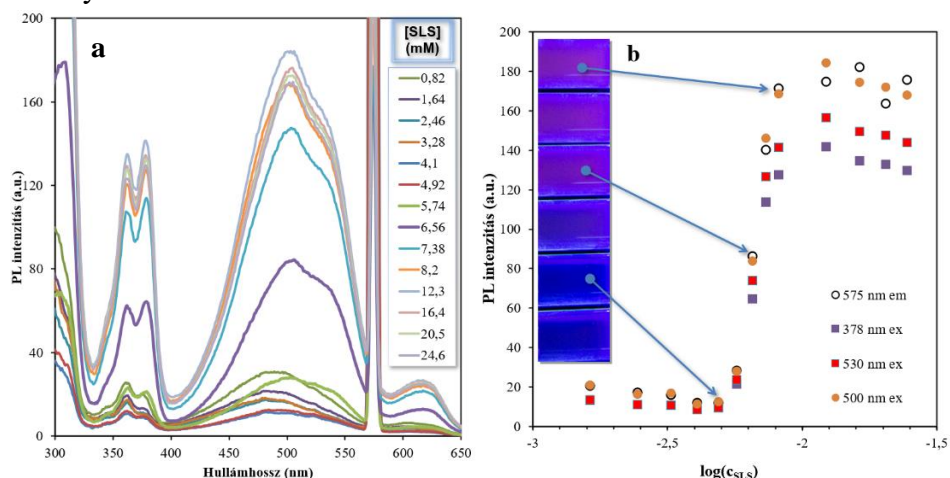


30. ábra: A diMICAAC-ot tartalmazó mikrokörnyezet számított pH változása az SLS koncentráció függvényében BRB oldatban. A beillesztett ábra a $\lambda = 575$ nm-en mért fluoreszcens intenzitás változást mutatja az SLS koncentráció függvényében. ($T = 20$ °C, [fluorofor] = $4,58 \cdot 10^{-6}$ M, $V = 3,00$ cm³)

Amint az a 30. ábrából kitűnik, a mikrokörnyezet pH-ja a pufferre jellemző 7-es értékről lineárisan csökken kis SLS koncentrációknál majd egy pont után pH=6-körül stabilizálódik kis ingadozásokkal. A görbe első, csökkenő és

későbbi, közel állandó részére illesztett egyenesek metszéspontjának x-tengelyre vetített értéke fogja a CMC értékét megadni, mely 7 mM-nak adódott. Mivel a diMICAac nagyon gyengén fluoreszkál vizes közegben ($\Phi_f = 0,4\%$), a micellákkal való kölcsönhatás az fluoreszcencia intenzitásának hirtelen növekedését eredményezi 575 nm-en. A CMC-t itt is a görbe meredeken emelkedő első és az állandó végső szakaszra illesztett egyenesek metszéspontjának vetületéből határozhatjuk meg. A pH és a fluoreszcens intenzitás változás – SLS koncentráció függvények által kapott CMC-k jó egyezést mutatnak (7 és 5 mM). Ezen értékek azonban valamivel kisebbek a tiszta vízben meghatározottnál, azonban a vizsgálatot pufferált közegben végeztük, így a megnövekedett ionerősség kisebb CMC-t eredményezhet.

A kísérletet megismételtük ionmentes víz felhasználásával is. Az eredményeket a 31. ábrán mutatom be.



31. ábra: A diMICAac fluoreszcens spektrumának változása vízben az SLS koncentráció változásával. Az (a) ábra az gerjesztési spektrumot mutatja, míg a (b) ábra az emissziós és excitációs maximumok változását mutatja az SLS koncentráció változtatásának hatására. A (b) ábrába beillesztett képek az oldatok színeit reprezentálják $\lambda = 365$ nm-en történő gerjesztés (UV-lámpa) hatására.

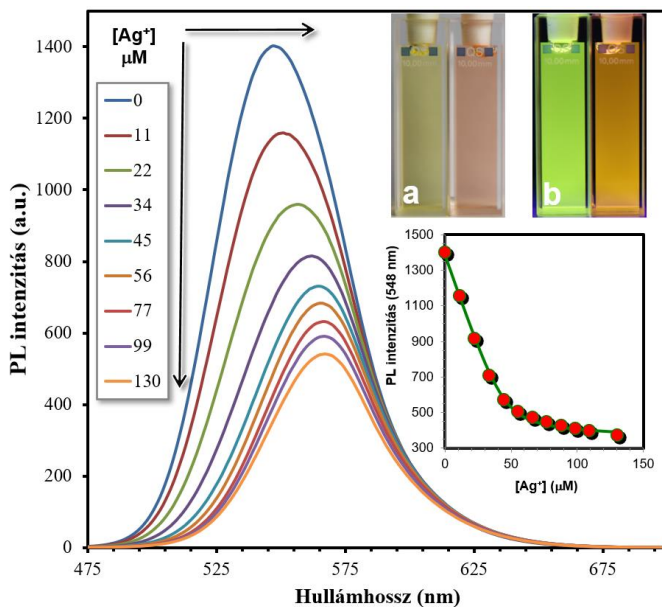
Hasonlóan a pufferelt oldathoz, a CMC alatt a fluoreszcens intenzitás kissé csökken (valószínűleg az SLS szulfonát ionjai hatására), amit hirtelen növekedés követ. A 31. (b) ábrából kitűnik, hogy az intenzitás - SLS koncentrációgörbék több különböző hullámhosszon is azonos lefutásúak és ugyanazt a CMC értéket eredményezik. Függetlenül attól, hogy milyen hullámhosszon vizsgáljuk az oldatokat, ugyanazt a kb. 7 mM SLS-hoz tartozó

CMC-t kapunk, ami jó egyezést mutat az irodalomban talált SLS értékekkel. A 31. (a) ábrából láthatjuk a gerjesztési spektrum változását az SLS koncentráció függvényében. Az alkalmazott hullámhossztól függetlenül az SLS CMC-jét a gerjesztési spektrumokból is jól lehet következtetni. 5,74 és 6,45 mM SLS koncentrációknál (vastag vonallal jelölve) láthatjuk, hogy a spektrum alakja megváltozik, vagyis az 530 nm hullámhossznál váll jelenik meg az ICT sávban, ami majdnem kettős sáv válik szét (dupla csúcs). Ez a változás az intenzitásgörbe növekvő részének kezdetéhez, az SLS koncentráció premiceláris régiójához köthető. A CMC felett az 530 nm-es váll megmarad, de az 503 nm-nél lévő maximum lesz domináns. Meg kell jegyezni, hogy tiszta vízben az emissziós maximum hullámhossza nem változik a CMC felett vagy alatt, ezért a diMICAAC nem valószínű, hogy belép a micella apoláros magjába, inkább a micellák külső Stern-rétegeiben helyezkedik el, ahol az elektrosztatikus kölcsönhatás jellemzőbb. Összefoglalva: a diMICAAC jól alkalmazható mind a CMC meghatározására, mind a mikrokönyezet pH-jának feltérképezésére.

3.2.6. A diMICAAC komplexképzése Ag(I)-ionokkal.

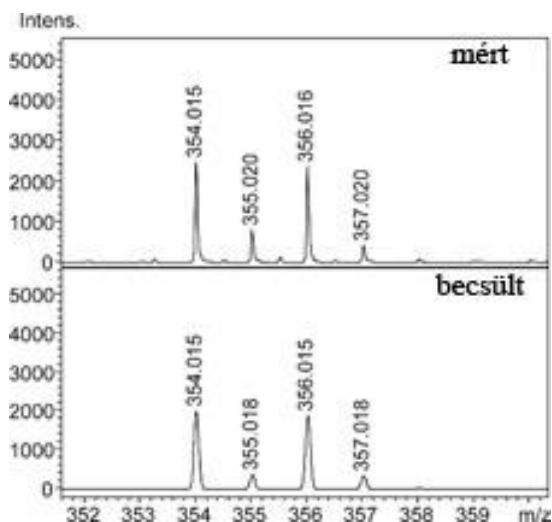
Korábban^[89] már közöltük, hogy az amino-izocianoarének hajlamosak komplexeket képezni Ag(I) ionok jelenlétében, ami jelentős fluoreszcenciás spektrális változással jár.

A diMICAAC dioxánban Ag(I)-el történő „steady-state” fluoreszcens titrálása során hirtelen csökkenést tapasztaltunk a fluoreszcenciás intenzitásban (az eredeti egyharmadára csökkent), növekvő ezüst(I) koncentráció mellett, ami a 32. ábrán jól látható.



32. ábra: A diMICAAC ($c = 4,58 \cdot 10^{-5}$ M) dioxánban mért emissziós spektrumában történő változás az $Ag(I)$ koncentrációjának növelésének hatására. A beillesztett ábra (a) részén az elkészített oldatok (bal oldalon dioxánban, jobb oldalon $130 \mu M$ Ag^+ jelenlétében) természetes fényben, illetve 365 nm hullámhosszú fényel megvilágítva.

Továbbá az emissziós maximum 20 nm-rel tolódott el batokróm irányba ($\lambda_{em, max} = 548$ nm-ről $\lambda_{em, max} = 568$ nm). Ez a változás látható 32. ábra (a) és (b) részén, ahol az oldat zöldes-sárga színe vörösre változik, illetve neonzöldről narancsszínűre $\lambda_{ex} = 365$ nm, UV fényel történő gerjesztés hatására. A 32. ábrán látható beillesztett ábra alakja 1:1 komplex képződését jelzi, amelyet ESI-MS körülmények között ki is mutattunk



33. ábra: Az $\text{Ag}[(\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{N}_3)]^+$ vagy $\text{Ag}:\text{diMICAAC}$ 1:1 komplex számított és mért ESI-MS spektruma.

Az első izotóp csúcs molekulatömege 354,015 Da, amelynek a képlete $[\text{Ag}(\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{N}_3)]^+$. Az ebből az összetételből számított tömeg megtalálható a mért tömegspektrumon és az izotópeloszlás is jól követi a számított spektrumon feltüntetett értékeket (33. ábra). A komplexképződés egyensúlyi állandóját nemlineáris regressziós analízissel határoztuk meg, $a^{[90]}$ alapján. A számolt érték $K = (4,5 \pm 0,9) \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$. Ez az egyensúlyi állandó valamivel kisebb, mint az ICAN-származékoknál számított értékek ($K = 10^6 \text{ M}^{-1}$ és 10^7 M^{-1}). A 10^5 -es nagyságrendű egyensúlyi állandó azonban azt igazolja, hogy az Ag(I) -ion kötődési hajlama a diMICAAC-hoz is jelentős.

3.3. Hg(II) és Ag(I) ionok kimutatására alkalmas izocianonfotalin alapú szolvatokróóm fluoroforok³

A Hg az egyik legmérgezőbb fém, amely természetes vagy ipari forrásból a természetes vizekbe jutva felhalmozódhat és bejutva a táplálékláncba (leginkább Hg(II) formájában), mérgezést okozhat. Ilyen kiterjedt mérgezésre szolgál szomorú példával Minamata és Niigata esete Japánban^[91], ahol ipari forrásból származó metilhigany okozott súlyos mérgezést a környező halászfalvakban. Nagy mennyiségű higany kerül a környezetbe az Amazonas esőerdőjében folytatott illegális aranybányászat miatt Dél-Amerikában is, valamint megdöbbentő módon a permafroszt csaknem kétszer annyi Hg-t tartalmaz, mint az óceánban és a talajban fellelhető higany mennyiségek kombinálva. Ez a Hg könnyen a vízkörfogatba juthat, mivel a következő században a jelentős felmelegedés miatt olvadásra számíthatunk.^[92]

A természetes és humán eredetű Hg egyszerű és hatékony kimutatása és mennyiségi meghatározása csapvízben vagy a testnedvekben, ezért kiemelt jelentőségű. A fluoreszcens módszerek in-situ és valós idejű észlelési képességük, szelektivitásuk és érzékenységük miatt előnyösek a Hg(II) elemzésben. Bár számos fluoreszcens szenzort, például kvantum pontokat^{[93][94][95][96]}, nanorészecskéket^{[97][98][99][100]}, DNS^[101] és szerves molekulákat, melyek természetes^{[102][103]} vagy szintetikus^{[104][105]} eredetűek, fejlesztettek már ki, kereskedelmi alkalmazásuk legtöbb esetben korlátozott magas árak, alacsony detektálási határak, előállítási nehézségük vagy nem megfelelő vízzoldékonyságuk miatt.

Hg(II) detektálása egyszerű szerves molekulák is alkalmasak lehetnek, amennyiben a megfelelő funkciós csoportjuk komplexet képez azzal, például a dopamin a katechin hidroxil csoportján keresztül^[106]. Más módon, például kémiai reakción keresztül is azonosítható a Hg(II), például az N-akrilil-rodamin-B-hidrazid (ARB)^[107] gyűrűfelnylási és hidrolitikus reakcióján keresztül^[108]. A közelmúltban Zhang és munkatársai a Hg(II) szelektív fluoreszcens érzékeléséről számoltak be az izonitrilcsoport redukciójának segítségével. Módszerük széleskörű alkalmazhatóságát azonban a nagy mennyiségű szerves oldószer használata nehezíti meg.

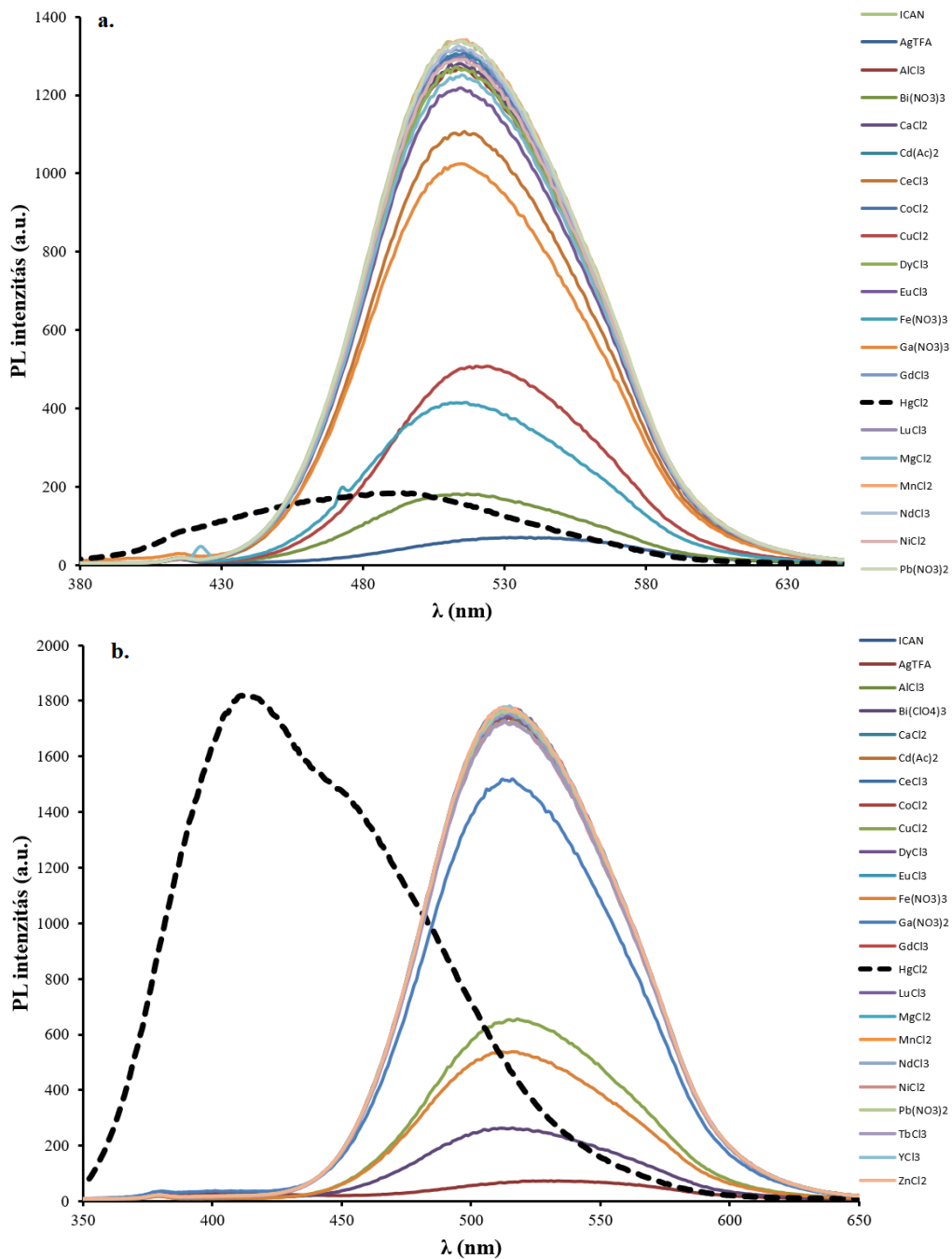
³ A 3.3 fejezet az alábbi tudományos publikáció alapján készült: Miklós Nagy, Sándor Lajos Kovács, Tibor Nagy, Dávid Rác, Miklós Zsuga, Sándor Kéki: Isocyanonaphthalenes as extremely low molecular weight, selective, ratiometric fluorescent probes for Mercury(II), *Talanta* 201 pp 165–173 (2019)

Az izonitrilek is könnyen képeznek komplexeket átmeneti fémionokkal.^[109] A kutatócsoportunk által kifejlesztett amino-izocianonaftalin (ICAN) alapú szolvatókróm fluoroforcsoport^[23], az ezüst analitikában izocianid ligandumként alkalmazható, továbbá ezüstkomplexei fokozzák a kontrasztot a sejtfestés során^{[110][111]}. Ezen vegyületek könnyen és olcsón előállíthatóak.^[112] Az ICAN Ag^+ fémkomplexeinek fluoreszcenciája batokrómmal eltolódáson megy keresztül, továbbá a Hg(II) hatására, víz jelenlétében az izociano csoport redukciója következik be amin csoporttá, ami jelentős hipszokrómmal eltolódást eredményez. Ily módon kaphatunk egy nagyon egyszerű fluoreszcens molekulát, amely szelektív lehet a két legfontosabb fémionra is. Ezen felül, a legjobb tudásunk szerint az ICAN a legegyszerűbb és a legkisebb molekulatömegű fluorofor, amelyet valaha használtak fluoreszcens Hg(II) detektálásra.

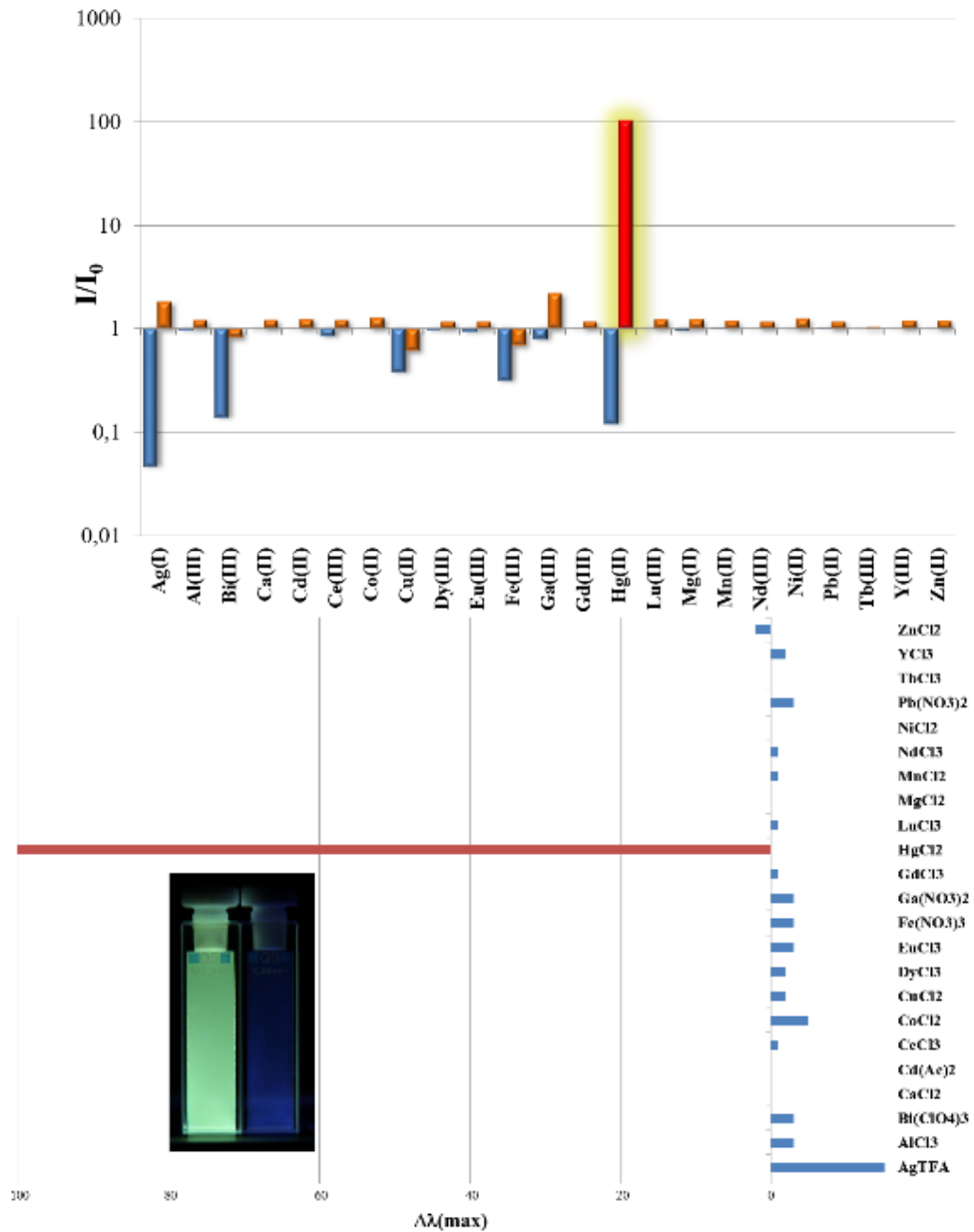
3.3.1. Az ICAN-származékok viselkedése különböző fémionok jelenlétében

Annak vizsgálatára milyen spektrális változások kísérik az ICAN-származékok kölcsönhatását különböző fémionok jelenlétében 3-szoros mólfeleslegben 23 különféle fémiont adtunk vizes oldataikhoz. Az így elkészített oldatoknak $\lambda_{\text{ex}} = 365$ nm gerjesztő fényt alkalmazva felvettük a fluoreszcencia spektrumaikat. Az ICAN eredményeit a 34. ábra mutatja be. Jól látható, hogy Hg^{2+} hozzáadásakor az ICAN emissziós maximuma 513-ról 456 nm-re változott, ami 57 nm hipszokrómmal eltolódásnak felel meg. Az új maximumhoz a $\lambda_{\text{ex,max}} = 337$ nm gerjesztési maximum tartozik. Következésképpen a méréseket 337 nm gerjesztéssel ismételtük meg (34. "b" ábrarészlet). A különbség feltűnő, hiszen az utóbbi gerjesztő hullámhosszal teljesen új csúcs jelent meg Hg^{2+} jelenlétében $\lambda_{\text{em,max}} = 406$ nm-nél, ahol az ICAN gyakorlatilag nem emittál, és az intenzitás az eredetihez képest 104-szeresére nőtt (35. felső ábrarészlet). Ennél is szembetűnőbb, hogy Hg^{2+} hozzáadását követően az emissziós csúcs 102 nm-es hipszokrómmal eltolódása figyelhető meg. A többi ion jelenlétében nem tapasztaltunk jelentős változást, vagy enyhe batokrómmal eltolódás volt jellemző. Ez alapján kijelenthetjük, hogy a módszer Hg^{2+} -re szelektív. Néhány ion (Bi^{3+} , Fe^{3+} és Cu^{2+}) mérsékelt emissziós kioltást gyakorolt az ICAN fluoreszcenciájára, valószínűleg az oldatok savas jellege vagy az amino csoporttal való komplexképződés eredménye lehet. Ezen ionok kölcsönhatását a későbbiekben részletezem.

Hasonló a hatás figyelhető meg az Ag^+ esetében is, amiről már korábban beszámoltunk.^[89]



34. ábra Az ICAN spektrális változása gyakori fémionok jelenlétében. **a)** emissziós spektrumok, amelyeket $\lambda_{\text{ex}} = 365$ nm-nél - **b)** $\lambda_{\text{ex}} = 337$ nm-nél rögzítettük. A szaggatott vonallal jelzett spektrumot Hg^{2+} jelenlétében rögzítettük.

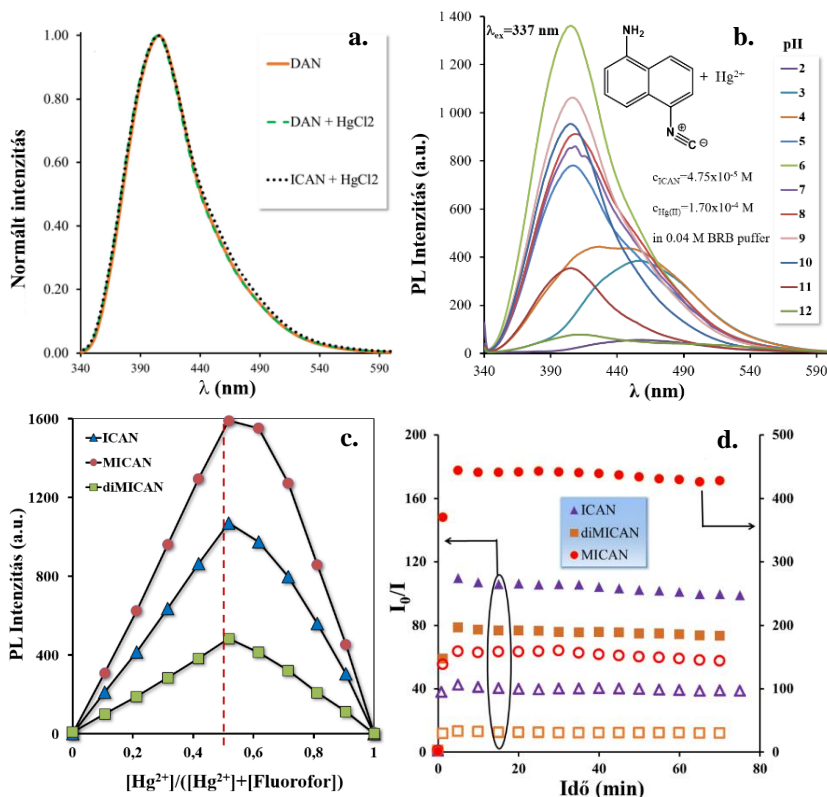


35. ábra: A tiszta ICAN intenzitása (I_0) és a fémionok hozzáadása utáni intenzitás (I) arányainak meghatározása 513 nm-en (kék sávok) és 406 nm-en (narancssárga sávok) (**felső**) és az emisszió maximumok eltolódása (**alsó**). A Hg^{2+} hatása pirossal van kiemelve. Az ábrán látható a vizes oldatot fényképe: ICAN oldata Hg^{2+} hozzáadása előtt (balra) és után (jobbra) $\lambda = 365 \text{ nm}$ UV fényvel gerjesztve (víz: acetonitril, 96:4 v/v, $T = 20 \text{ }^\circ\text{C}$, $[\text{ICAN}] = 4,75 \times 10^{-5} \text{ M}$, $[\text{Fém}^{n+}] = 1,70 \cdot 10^{-4} \text{ M}$)

3.3.2. A Hg(II) detektálás lehetséges mechanizmusa

A két új csúcsmegjelenése 406 nm és 456 nm hullámhosszon az ICAN és a Hg^{2+} kölcsönhatásának tulajdonítható, valószínűleg az izociano csoport redukciója történik primer aminná. Ennek tisztázására felvettük az 1,5-diaminonaftalin (DAN) fluoreszcens spektrumát is azonos körülmények között. Ahogyan a 36. ábrán is látható, a $\text{DAN} + \text{Hg}^{2+}$ és az $\text{ICAN} + \text{Hg}^{2+}$ emissziós maximumai azonosak (406 nm) és az emissziós sávok lefutása is teljesen azonos (36.a. ábra). Az aminoszármazékok jelenlétét megerősítettük ESI-MS mérésekkel is. Ez összhangban van a Zhang és munkatársai^[106] által a közelmúltban közölt hasonló mechanizmussal, ahol a Hg^{2+} hatására szintén megtörtént az izonitrilcsoport redukciója.

Az $\text{ICAN} + \text{Hg}^{2+}$ fotolumineszcencia (PL) spektruma jelentős pH-függést mutat (36.b. ábra), amely nem figyelhető meg a tiszta ICAN származékoknál. A DAN és $\text{DAN} + \text{Hg}^{2+}$ különböző pH-értékeken rögzített PL spektrumaiban szintén két csúcst azonosítottunk. Következésképpen a 456 nm-es csúcset valószínűleg egy protonált részecskéhez rendelhető. A módszer érzékenységének növelése érdekében a további kísérletekhez a pH = 6 értéket választottuk, a protonált részecskék képződésének visszaszorításának érdekében. A reakció sztöchiometriáját Job-módszerrel (36.c. ábra) határoztuk meg és azt kaptuk, hogy az ICAN származékok és a Hg^{2+} 1:1 molarányban reagálnak egymással. A reakció UV - látható spektroszkópiával történő követésére tett erőfeszítéseink sajnos nem lettek eredményesek mert az ICAN és a DAN szinte azonos UV - látható spektrumot ad.



36. ábra. a) DAN, DAN + HgCl₂ és ICAN + HgCl₂ emissziós spektrumai. b) az ICAN + HgCl₂ pH függése. c) Jobb módszer az ICAN, a MICAN és diMICAN jelenlétében d) Reakcióidő és stabilitás az ICAN-származékok + HgCl₂ esetében (Hg²⁺ : ICAN 1:1 (n/n) (kitöltött jelölések) és 1: 0,1 (Hg²⁺ : ICAN) n/n (üres jelölések).

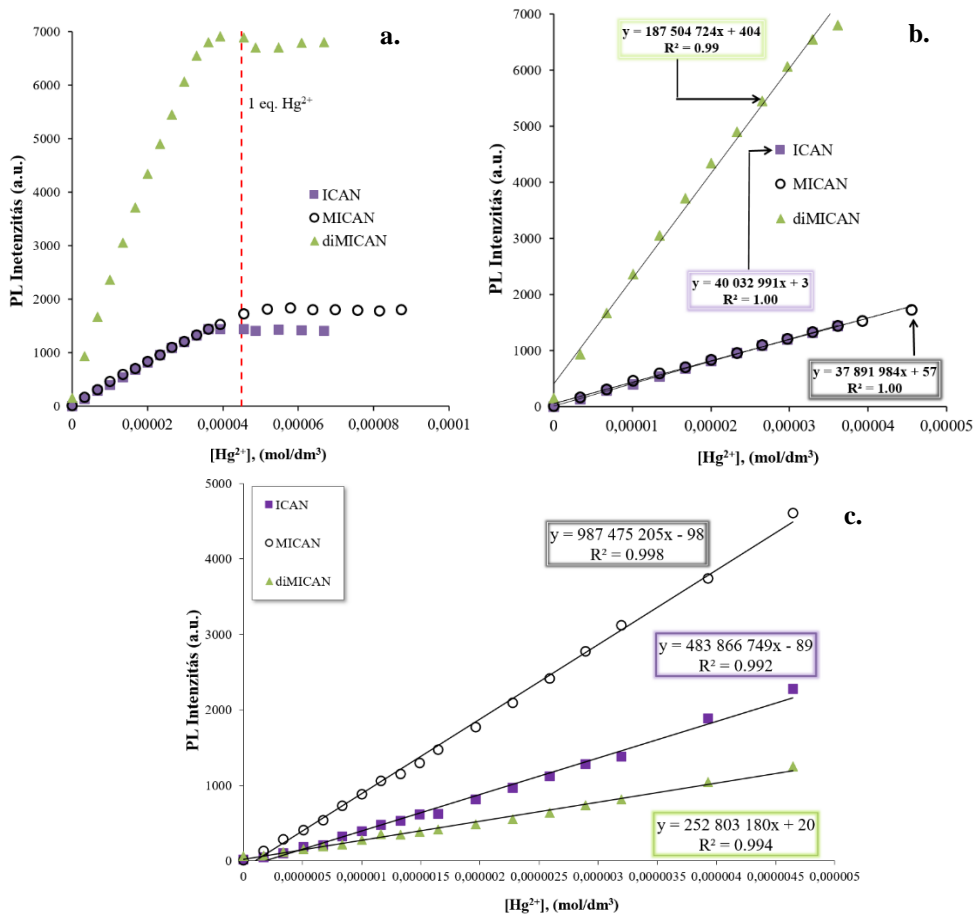
3.3.3. Reakcióidő és stabilitás

Amint az a 36.d. ábrából kitűnik, az amin csúcshoz rendelhető intenzitás 5 percen belül eléri a maximumot, mindhárom ICAN származék esetében, Hg²⁺ hozzáadása után, pH = 6-on, mind (fluorofor: Hg²⁺) 1:1 és 1:0,1 molarányú oldatokban. A maximum elérése után az intenzitásváltozás mértéke nem haladja meg a 10%-ot a vizsgálat időtartama alatt, azaz legalább 70 percig. A méréseket különböző hőmérsékleteken megismételve hasonló eredményeket kaptunk. Ezek alapján megállapíthatjuk, hogy ez a módszer gyors és stabil Hg²⁺ -ra meghatározására. Meg kell jegyeznünk azonban, hogy az ICAN és DAN eltérő hőmérsékleten mért spektrumai más emissziós maximumokat eredményeznek, ezért a pontos eredmények eléréséhez a további méréseket 20 °C-on termosztálva végeztük.

3.3.4. Az analitikai tartomány, kimutatási határ és mennyiségi meghatározási határ meghatározása

Az analitikai tartomány meghatározásához szükséges adatokat fluoreszcens titrálási módszerrel határoztuk meg, amely során a fluorofor koncentrációját $\sim 45 \mu\text{M}$ -nak a $[\text{Hg}^{2+}]_{\text{törzsoldat}} = 1,02 \text{ mM}$ -nak állítottuk be és ezeket használtuk a további mérések során. A képződő amin emissziós maximumához tartozó intenzitást ábrázoltuk a Hg^{2+} koncentráció függvényében (37. ábra). Az intenzitás - koncentráció (37.a. ábra) függvények 1:1 arányú $[\text{Hg}^{2+}]:[\text{ICAN}]$ összetételnél fordulnak telítésbe, további bizonyítékot szolgáltatva a reakció ekvimoláris jellegére. Jól látható továbbá, hogy az amin intenzitások lineáris függvényei a Hg^{2+} koncentrációnak az $50 \mu\text{M}$ - 50 nM tartományban, mindhárom ICAN-származék esetében.

Pontosabb kalibrációs görbékkel vehetünk fel, ha aránymérési (ratiometric) módszert használunk, melynek során a képződő amin emissziós maximumához tartozó intenzitást osztjuk az ICAN származék emissziós maximumának intenzitásával és ezt ábrázoljuk a Hg^{2+} koncentráció függvényében. Az eredményeket a 6. táblázatban és a 38. ábrákon foglaltuk össze. Az aránymérési görbék ugyanúgy lineáris függést mutatnak a Hg^{2+} koncentrációval és ugyanúgy 1:1 (festék:Hg) aránynál mennek telítésbe. Az aránymérés alkalmazásával azonban a módszer nagyban függetlenné tehető a környezeti paraméterek változásától (pl.: hőmérséklet, ionerősség).



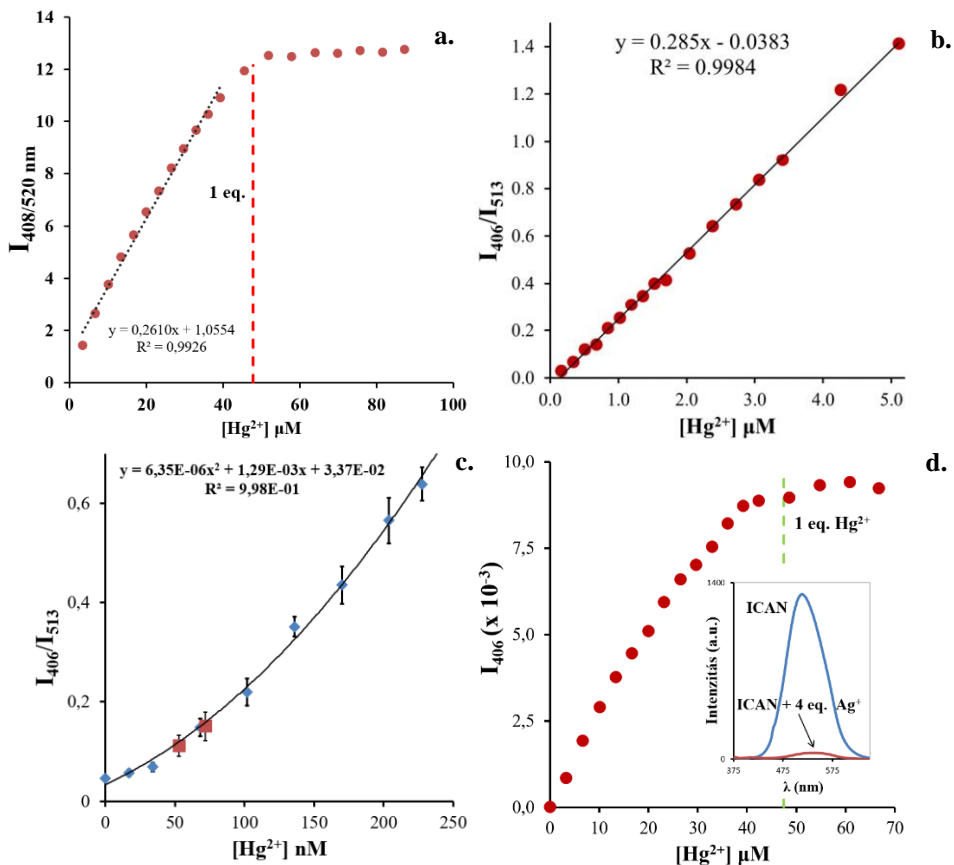
37. ábra: Az amin fluoreszcencia intenzitás kalibrációs görbéi az egyes ICAN-származékoknál. A $\lambda_{em, amin}$ értékei a 6. táblázatban láthatóak. [Fluorofor]: ~ 45 μ M (a, b) és ~ 4,5 μ M (c). (pH = 6 BRB puffer, T = 20 ° C).

A módszer érzékenységének növelése érdekében a titrálást megismételtük hígabb, $[Hg^{2+}]_{törzssoldat} = 51,1 \mu\text{M}$ koncentrációjú oldattal is. A 38.b. ábrából megállapítható, hogy kalibrációs görbe nagyon jól illeszthető egyenessel ($R^2 > 0,99$), a $[Hg^{2+}] = 170 \text{ nM}$ és 5000 nM koncentráció tartományban. Az intenzitás-koncentráció görbék alapján, a LOD általánosan elfogadott $3\sigma/k$ képletet felhasználva (37.c. ábra), a detektálási határ 2-3 nM Hg²⁺. Az előzőekben tett megállapítás azonban nem igaz a titrálási görbe kezdeti (<170 nM $[Hg^{2+}]$) szakaszára, ugyanis a pontokra ezen a szakaszon nem illeszthető egyenes.

6. Táblázat: A Hg^{2+} meghatározási módszer összefoglaló táblázata. Az ICAN származékok ($\lambda_{\text{em,fluorofor}}$), és a képződött aminok ($\lambda_{\text{em,amin}}$) emissziós maximumai, a Hg^{2+} hozzáadást követő hipszokrórm eltolódás nagysága ($\Delta\lambda_{\text{max}}$), az amin származékok legmegfelelőbb gerjesztési hullámhossza (λ_{ex}), a kimutatási határ (LOD), meghatározási határ (LOQ), a kalibrációs görbék koeficiense (R^2), az aránymérési meghatározás során fellépő zaj szórása a tiszta ICAN-ok legkisebb koncentrációjára (SD_{Zaj}) és a molekulatömegek (M).

		Vegyületek					
		ICAN		MICAN		diMICAN	
$\lambda_{\text{em,fluorofor}}$	(nm)	513		520		516	
$\lambda_{\text{em,amin}}$	(nm)	406		408		420	
$\Delta\lambda_{\text{max}}$	(nm)	-107		-112		-94	
λ_{ex}		337		320		330	
Analytikai tartomány	($\cdot 10^{-9}$ M)	17-50000		17-50000		17-50000	
LOD	(nM)	<6		<6		<6	
LOQ	(nM)	<17		<17		<17	
[Festék]	(μM)	47,5	4,75	47,3	4,73	43,9	4,39
A kalibrációs görbe egyenlete		$y = 0,285x - 0,0383$	$y = 6,35 \cdot 10^{-6} x^2 + 0,0035x + 0,0659$	$y = 0,3869x + 0,0198$	$y = 2,44 \cdot 10^{-6} x^2 + 0,0035x + 0,0659$	$y = 0,0509x + 0,0253$	$y = 9,24 \cdot 10^{-7} x^2 + 0,0005x + 0,0506$
R^2		0,998	0,998	0,998	0,992	0,999	0,996
SD_{Zaj}	(n=15)	0,001		0,004		0,004	
M	(g/mol)	168,19		182,22		196,25	

A kezdeti szakasz kalibrációs görbéjének kiméréséhez kisebb fluorofor ($\sim 4,5 \mu\text{M}$) és Hg^{2+} ($5,11 \mu\text{M}$) koncentráció tartományban új méréseket végeztünk. A kiválasztott koncentrációk rendre az eredetiek 1/10-ed része voltak. Mérési eredményeinket a 38.c. ábra foglalja össze. A tizedére csökkentett koncentráció tartományban mért értékekre másodfokú görbe illeszthető, minek alapján a LOD és a LOQ már meghatározható. Az első mért pont $17 \text{ nM} [\text{Hg}^{2+}]$, ahol $I_{406}/I_{513} = 0,057 \pm 0,019$. Az csúcsarány zaj szórása (15 mérésből meghatározva, 6. táblázat) ennél az ICAN koncentrációnál 0,001. Ennek eredményeként a meghatározási (LOQ)- és detektálási (LOD) határok rendre a következők: ICAN esetében $<17 \text{ nM}$ és $<6 \text{ nM}$, MICAN $<17 \text{ nM}$ és $<6 \text{ nM}$, valamint a diMICAN $<17 \text{ nM}$ és $<6 \text{ nM}$ (6. táblázat).



38. ábra a) MICAN-, b) és c) ICAN- és d) ICAN csúcsarány (ratiometric) kalibrációs görbéi (d) ábrarészleten 4 ekv. Ag^+ jelenlétében). [Fluorofor] = $\sim 45 \mu\text{M}$ (a, b, d), valamint $\sim 4,5 \mu\text{M}$ (c). (pH = 6 BRB puffer, T = 20 °C).

3.3.5. A módszer tesztelése fogászati amalgámon

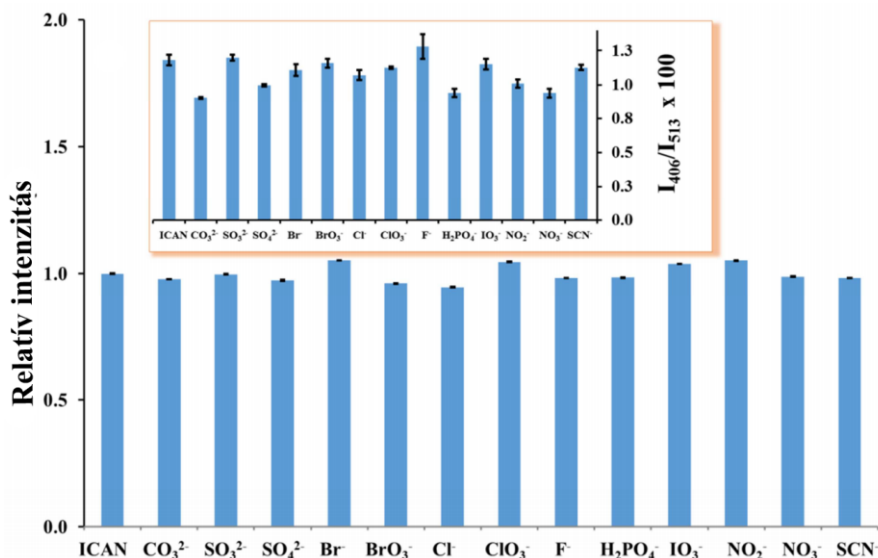
A Hg (II) detektálási módszerét és gyakorlati alkalmazhatóságát az alábbi kísérlettel igazoltuk:

Frissen elkészített fogászati amalgámot 20 ml fiziológiás sóoldatban tároltunk három napig. Az így készült oldatból 100 és 150 μl mintát vettünk a fluoreszcenciás titráláshoz. Az eredmények a 38.c. ábrán láthatóak. A másodfokú trendvonal egyenletének felhasználásával meghatároztuk az amalgámtartalmú oldatok koncentrációját, amik $1,51 \pm 0,25 \mu\text{M}$ és $1,43 \pm 0,16 \mu\text{M}$ -nak adódtak. A koncentrációk átlagosan $295 \mu\text{g/L Hg}^{2+}$ -nak felelnek meg. A minták higanytartalmát ICP-MS módszerrel is meghatároztuk, amely $292 \mu\text{g/L}$ -nek adótt. Az eredmények jó egyezést mutatnak, figyelembe véve,

hogy a Hg^{2+} koncentrációja a vizsgált oldatokban nagyon közel van a módszer LOQ-jához.

3.3.6. Különböző anionok és Bi^{3+} , Fe^{3+} és Cu^{2+} hatása

A módszer validálásának, valamint egyéb ionkölcsonhatás meghatározásának érdekében az eredetileg vizsgált ICAN pufferelt oldatához 3x moláris feleslegben adtunk különböző anyagi minőségű egyszerű- és összetett anionokat. Mint az a 39.a. ábrából nyilvánvaló, egyik anion sem befolyásolta számottevően az ICAN csúcsintenzitását 513 nm-en. Mindazonáltal a 406 nm-es csúcs intenzitásának nagyobb változása a nagyon kis intenzitásának tulajdonítható (közel a zajszinthez) az amin termék hiánya miatt.



39. ábra: Különböző anionok hatása az ICAN fluoreszcenciára

Amint azt a 35. ábrán megmutattuk, a Bi^{3+} , Fe^{3+} és Cu^{2+} ionok mérsékelten kioltják az ICAN fluoreszcenciáját ioncserélt vízben. Az ionok hatásának részletesebb megértéséért megismételtük a mérést pufferált oldatban (pH=6, BRB). Bi^{3+} és Fe^{3+} esetén az amincsúcs intenzitása (406 nm) változatlan marad és ICAN csúcs intenzitása még nagy (~100 μM , 20x kation koncentrációk) feleslegben is csak kismértékben csökken (<20%), míg 5 μM [Hg^{2+}] már jelentős változást okozott. Ezzel szemben nagymennyiségű Cu^{2+} hozzáadása

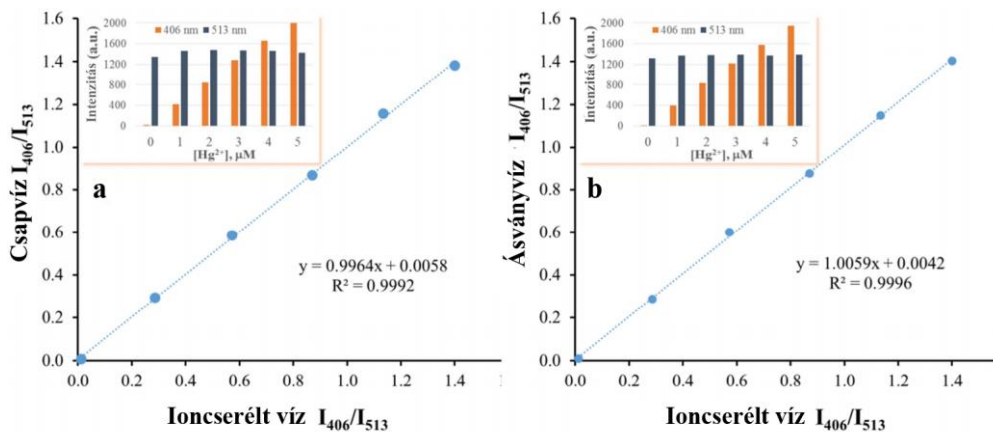
kioltja az amin csoport fluoreszcenciáját (valószínűleg az amino csoporttal történő komplexképződés miatt). A Hg^{2+} a koncentráció ez esetben is sokkal kisebb volt, mint a Cu^{2+} koncentrációja. Ennek ellenére, ICAN, Cu^{2+} és Hg^{2+} azonos koncentrációi mellett ($\sim 50 \mu\text{M}$) nincs számottevő változás az amin fluoreszcenciájában.

3.3.7. Hg^{2+} kimutatása Ag^+ mellett

Amint azt korábban részletesen megmutattuk^[89], az ICAN származékok izonitril csoportjai komplexképződésre hajlamosak Ag^+ -el vizes közegben is. A kölcsönhatást $4x \text{Ag}^+$ felesleggel mutattuk be. Ilyen mennyiségű Ag^+ teljesen kioltja az ICAN fényemisszióját 513 nm-nél, amint az a 38.d. ábrarészlet beillesztett ábráján látható. Az előbb említettek miatt tehát a csúcsarány módszer alkalmazása nem lehetséges. Mindazonáltal ez az erős kioltás és az ICAN-csúcs batokróm eltolódása csak Ag^+ jelenlétében megy végbe. Az Ag^+ jelenléte azonban egy másik egyszerű ICAN-származék, az ACAIN felhasználásával is kimutatható.^[89] A két ion kimutatása egymás mellett lehetséges, ugyanis Ag^+ komplexképződését követően kis mennyiségű HgCl_2 oldat hozzáadásakor azonnal megjelenik az amin csúcs 406 nm-nél és intenzitása lineárisan növekszik 1:1, ICAN: Hg^{2+} arányig, amely után az intenzitás telítésbe tart (38.d. ábra).

3.3.8. Hg^{2+} detektálása csap- és ásványvízben

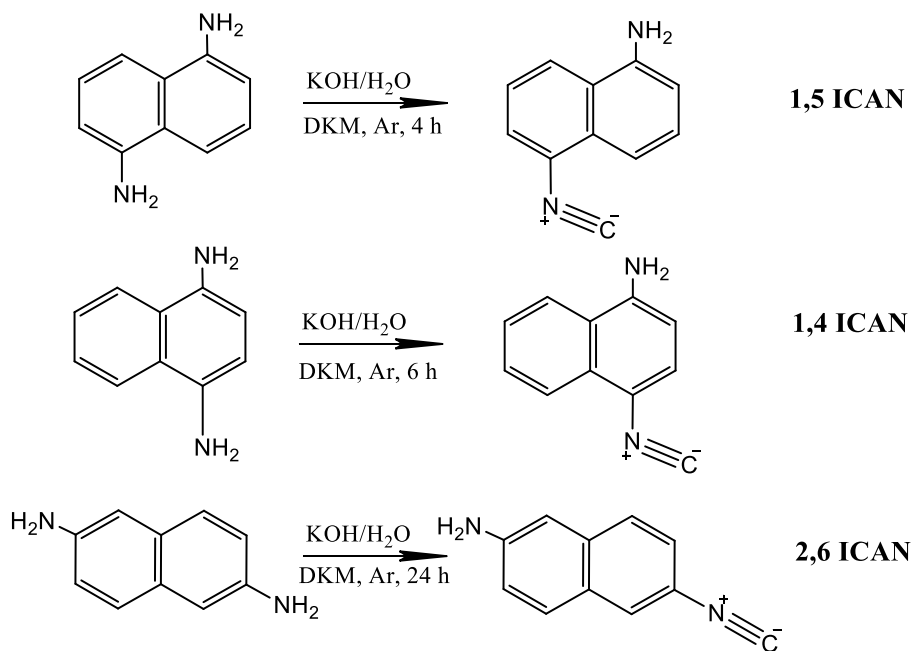
A módszer éles tesztje a valódi mintákon történő vizsgálat. Csapvízben és savas ásványvízben (Szentkirályi, Magyarország) vizsgáltuk az ICAN hatékonyságát Hg^{2+} fluoreszcens kimutatására. Standard addíciós módszerrel az amin csúcs intenzitása (406 nm) lineárisan nőtt a növekvő Hg^{2+} koncentrációval együtt (40. "a" és "b" ábrarészletek). Habár számos egyéb iont is tartalmazott a két minta, a mért pontokra egyenest lehet illeszteni, mely jó egyezésben van a mérési pontokkal, ami azt igazolja, hogy az ICAN képes specifikusan és pontosan kimutatni vizes közegben Hg^{2+} -t. Ezek alapján nagy biztonsággal kijelenthető, hogy ez az általunk fejlesztett fluoreszcens próba ígéretesnek bizonyulhat más forrásból származó vízminták elemzésére is.



40. ábra: A (a) kalibrációs görbe csapvízre, és (b) ásványvízre Hg^{2+} jelenlétében. A beillesztett ábrák mutatják az ICAN (513 nm) és a DAN (406 nm) fluoreszcens intenzitás - koncentráció függvényeit. ([Fluorofor] = 45 μM , [anion] = 135 μM , pH = 6 BRB, T = 20 °C).

3.4. Az ICAN izomerek szubsztitúciós pozíciójának hatása a fotofizikai tulajdonságokra⁴

A szolvatokróm fluoroforok észszerűbb és hatékonyabb megtervezése és fejlesztése a szerkezet-tulajdonság kapcsolatok mélyebb megértését igényli. Az egyik kulcsfontosságú tényező, a szubsztitúciós pozíció hatása még nem volt ismert ICAN származékaink esetén, ezért a megfelelő diaminokból kiindulva 1,4-, 1,5- és 2,6-ICAN-okat készítettünk a 41. ábra szerinti módon.



41. ábra. Az ICAN származékok szerkezetei és előállítási módjaik.

Az 1-amino-4-izocianonaphthalin (1,4-ICAN) és 2-amino-6-izocianonaphthalin (2,6-ICAN) vegyületek fotofizikai tulajdonságait részletesen megvizsgáltuk és kvantumkémiai (DFT) számításokkal támasztottuk alá. A tulajdonságokat összehasonlítottuk a már korábban ismert 1,5-ICAN izomer fotofizikai tulajdonságaival és legnagyobb meglepetésünkre nem a PRODAN esetében megfigyelt legnagyobb funkciós csoport távolság eredményezte a legjobb

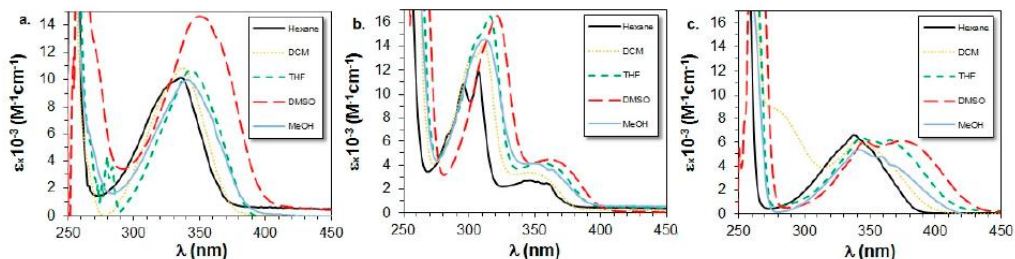
⁴A 3.4. fejezet az alábbi tudományos publikáció alapján készült: Sándor Kovács, Miklós Nagy, Péter Fehér, Miklós Zsuga and Sándor Kéki: Effect of the substitution position on the electronic and solvatochromic properties of isocyanonaphthalene (ICAN) fluorophores, *Molecules*, 24, 2434 (2019)

viselkedést, újabb bizonyítékot szolgáltatva arra, hogy az ICAN-ok egy valóban különleges vegyületcsalád.

3.4.1. Az ICAN-izomerek UV-látható abszorpciós tulajdonságai

Előző kutatásainkban már beszámoltunk az 1,5-ICAN izomer kiváló optikai tulajdonságairól, ezen adatokat összehasonlítás céljából a^[23] hivatkozás tartalmazza. Az izomerek optikai tulajdonságainak könnyebb összehasonlíthatósága érdekében azonban néhány adatot ebben a fejezetben is szerepeltetni fogok.

Az 1,4- és 2,6-ICAN alapállapotának elektronikus tulajdonságait, UV-látható spektroszkópiával vizsgáltuk, különféle oldószerekben, a 200 - 700 nm hullámhossz-tartományban. Az oldószereket úgy választottuk ki, hogy széles polaritástartományt fedjenek le, a hexántól (apoláris) egészen a DMSO-ig (poláris). Az 1,4-ICAN UV - látható spektruma a 2,6-ICAN-nal és 1,5-ICAN-nal együtt különböző oldószerekben a 42. ábrán látható, míg az abszorpciós maximumokat (λ_{Abs}) és a megfelelő moláris abszorpciós együtthatókat (ϵ) a 7. táblázatban foglaltuk össze.



42. ábra: az 1,4 (a), 2,6 (b) és 1,5-ICAN (c) izomerek különböző polaritású oldószerekben mért UV-látható spektrumai.

Amint az a 42. ábrán látható, a 300–400 nm hullámhossz-tartományban, amely az ICAN-izomerek legkisebb energiájú elektronátmeneti sávjaihoz tartozik, az 1,4-ICAN UV-látható spektruma csak egyetlen energiasávot mutat körülbelül 350 nm abszorpciós csúcsnál. Ezzel szemben a 2,6-ICAN izomer két jelentősen eltérő sávot mutat ebben a hullámhossz-tartományban. Az egyik 320 nm körül, míg a második hozzávetőlegesen 350 nm körül látható.

7. táblázat. Az 1,5-ICAN, 1,4-ICAN és 2,6-ICAN izomerek abszorpciós maximumaihoz tartozó hullámhosszak (λ_{Abs}) és a moláris abszorpciós koefficiensek a csúcsmaximumon (ϵ) különböző oldószerekben meghatározva. Az oldószerek dielektromos állandói (ϵ_r) az oldószerek nevei mellett szerepelnek zárójelben.

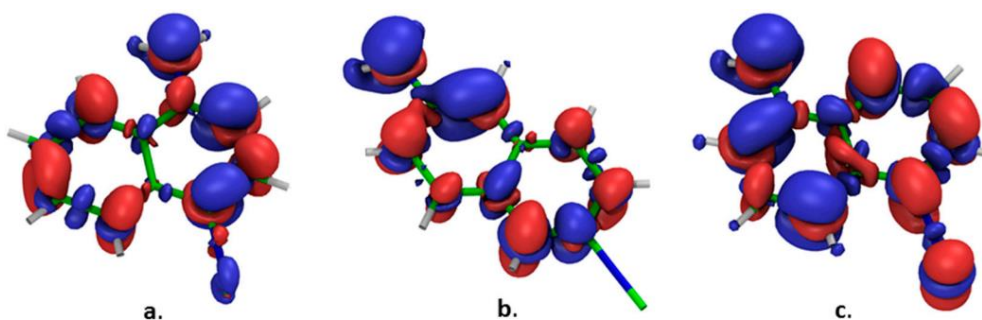
Oldószer (ϵ_r)	1,5-ICAN*		1,4-ICAN		2,6-ICAN	
	λ_{Abs} (nm)	ϵ ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)	λ_{Abs} (nm)	ϵ ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)	λ_{Abs} (nm)	ϵ ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)
n-Hexán (1,89)	338	6730	335	9040	352	2590
Toluol (2,38)	341	6460	339	8070	353	3120
DKM (8,93)	340	6030	334	10200	348	3370
2-propanol (17,9)	343	7820	341	11630	356	3620
THF (7,58)	344	5940	345	10000	359	4120
EtOAc (6,02)	342	7450	341	9640	354	3790
Dioxán (2,25)	343	5200	342	9390	356	3430
Aceton (20,7)	345	6100	341	12800	358	3430
Metanol (32,7)	342	3940	341	9410	353	4040
Piridin (12,4)	347	5700	353	10890	362	4320
Acetonitril (37,5)	342	8140	340	11980	355	3410
DMF (36,7)	346	7220	354	11430	362	3630
DMSO (46,7)	347	6170	359	13270	364	4460
Víz (80,1)	336	8400	333	9330	340	2270

*Az 1,5-ICAN megfelelő értékeit a [23]-as hivatkozásból vettük

Megfigyelhető továbbá, hogy a legkisebb átmenetek kb. 350 nm körül fordulnak elő, valamint az 1,4-ICAN szignifikánsan nagyobb ϵ értékekkel rendelkezik, a másik két izomerhez viszonyítva. Továbbá, a DFT-számításokkal és a kísérleti megfigyelésekkel összhangban, a moláris abszorbancia értékei a következőképpen nőnek: 2,6-ICAN < 1,5-ICAN < 1,4-ICAN. A λ_{Abs} oldószer polaritás függése jól kivehető a 7. táblázat adataiból, valamint az is, hogy az oldószer polaritásának növelésével enyhe batokróm eltolódás figyelhető meg az emissziós maximum esetén. Például az n-hexántól DMSO-ig a batokróm eltolódások mértéke 9-, 24- és 12 nm az 1,5-ICAN, 1,4-ICAN és 2,6-ICAN izomerek esetén. Ezen túlmenően az 1,5-ICAN és az 1,4-ICAN izomerek λ_{Abs} értékei nagyon közel vannak egymáshoz, míg a 2,6-ICAN

izomernél az összes oldószerben az abszorpciós maximumok nagyobb hullámhosszknál találhatók, kivéve DMF-ben és DMSO-ban, ahol a λ_{Abs} értékek a következő sorrendet mutatják: 1,5-ICAN < 1,4-ICAN < 2,6-ICAN.

Az kisenergiájú sávok eltolódása az alapállapot poláris jellegére utal. Ez nagyon jó egyezésben van a DFT-számítások eredményeivel, ugyanis alapállapotban a számított dipólmomentumok 7,2 D, 8,0 D és 8,6 D-nak adódtak az 1,5-ICAN, 1,4-ICAN és 2,6-ICAN izomerek esetében. Érdekes, hogy a 7. táblázatban felsorolt oldószeresek közül a vízben mért λ_{Abs} értékek kisebbek mindhárom izomer esetében, a DMSO-ban mérteknél. A hullámhossz-különbségek ($\lambda_{\text{Abs, DMSO}} - \lambda_{\text{Abs, H}_2\text{O}}$) 11 nm, 26 nm és 24 nm, az 1,5-ICAN, 1,4-ICAN és 2,6-ICAN esetében. Ennek oka lehet az izomerek amino csoportja és a vízmolekulák közötti hidrogén kötés kialakulása, mely jelenséget már korábban kimutattunk piridin esetében^[23]. Ez a H-híd kölcsönhatás csökkenti az elektron sűrűséget az amino csoport N-atomján, ami hipszokróm eltolódást idéz elő. Az ICAN izomerek gerjesztett állapotainak pontosabb leírása érdekében számításokat végeztünk az első gerjesztett állapot és az alapállapot közötti elektronsűrűség-különbségek meghatározására DMSO-ban. Az eredményeket a 43. ábrán tüntettem fel.



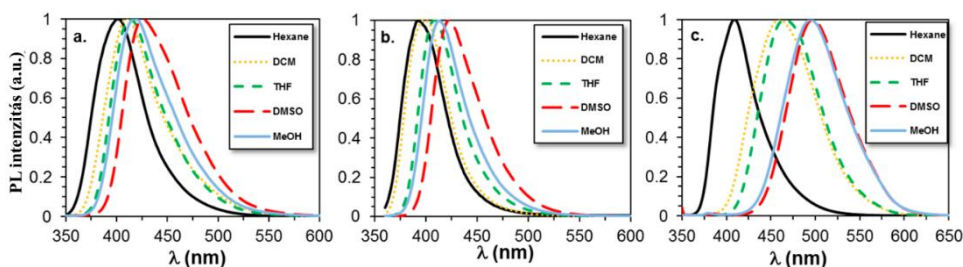
43. ábra: Az első gerjesztett állapot és az alapállapot közti elektronsűrűség-különbségek az 1,4-ICAN (a), 2,6-ICAN (b) és 1,5-ICAN (c) izomerek esetében DMSO-ban.

Azért választottuk a DMSO-t, mert ez a legpolárosabb, aprotikus oldószer, így az átmenet egyszerűen vizsgálható. Látható, hogy az elektronsűrűség csökkenést jelző kék területek jellemzően az amino csoport N atomján, illetve az azt körülvevő szén atomokon azonosíthatók mind a három izomer esetében, míg a vörössel jelzett, nagyobb elektronsűrűségű területek nem azonosak az 1,5-ös és a másik két származéknál. Az 1,5-ICAN esetében ez a régió az

aromás gyűrűn és az izociano csoporton helyezkedik el, míg a másik két (1,4- és 2,6-) származék szinte elhanyagolható változás mutat az izociano csoporton. Ez nagyon fontos megfigyelés, ugyanis a szolvatokróm jelleget meghatározó ICT az amino és az izociano csoportok között alakul ki az 1,5-ICAN-nál. A másik két izomernél az eredmények arra utalnak, hogy bár a töltés minden esetben átadódik az amino csoportról, csak az 1,5-ICAN esetén érkezik meg a kívánt akceptorhoz, míg az másik két esetben lokális változásokat mutat a naftalin gyűrűben.

3.4.2. Az ICAN-izomerek fluoreszcens tulajdonságai

Az 1,4-ICAN és 2,6-ICAN izomerek normalizált fluoreszcencia emissziós spektrumai láthatóak a 44. ábrán. Az emissziós maximumokat ($\lambda_{Em,max}$), a különböző oldószerekben meghatározott kvantumhasznosítási tényezőket (Φ_f) a 8. táblázatban foglaltam össze.



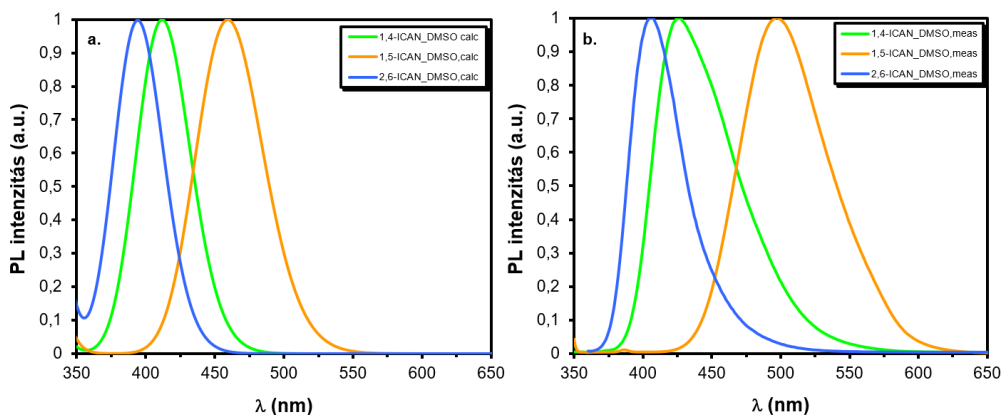
44. ábra: Az 1,4-ICAN (a), 2,6-ICAN (b) és 1,5-ICAN (c) izomerek normalizált fluoreszcencia emissziós spektrumai különböző oldószerekben.

Amint az a 44. ábrán látható, az 1,4-ICAN és a 2,6-ICAN emissziós spektrumai, hasonlóan az 1,5-ös izomeréhez^[23], strukturálatlan, széles, egysávos átmenettel rendelkeznek, jelezve ezzel a pozitív szolvatokróm eltolódást az oldószer polaritásának növelésével. Továbbá, ugyanez megállapítható az emissziós maximumok félérték szélességére is ($\Delta\nu_{1/2}$), ami jelezheti gerjesztéskor az intramolekuláris töltéstöltésátmenet (ICT) mértékét. Például dioxánban, a $\Delta\nu_{1/2}$ mértéke 2,6-ICAN (2660 cm^{-1}) < 1,4-ICAN (3220 cm^{-1}) < 1,5-ICAN (3625 cm^{-1}) szerint növekszik.

8. táblázat: Az 1,5-ICAN, 1,4-ICAN és 2,6-ICAN izomerek emissziós maximumai (λ_{Em}) és a kvantumhasznosítási tényezői (Φ_f), különböző oldószerekben.

Oldószer (ϵ_r)	1,5-ICAN		1,4-ICAN		2,6-ICAN	
	λ_{Em} (nm)	Φ_f	λ_{Em} (nm)	Φ_f	λ_{Em} (nm)	Φ_f
n-hexán (1,89)	409	0,55	402	0,48	395	0,15
Toluol (2,38)	433	0,66	406	0,72	398	0,25
DKM (8,93)	461	0,88	411	0,74	398	0,29
2-Propanol (17,9)	494	0,40	419	0,54	414	0,37
THF (7,58)	465	0,66	413	0,52	409	0,31
EtOAc (6,02)	464	0,45	411	0,64	406	0,24
Dioxán (2,25)	458	0,95	412	0,86	406	0,38
Aceton (20,7)	479	0,50	411	0,41	411	0,30
Metanol (32,7)	494	0,54	419	0,59	413	0,24
Piridin (12,4)	490	0,28	423	0,05	420	0,09
Acetonitril (37,5)	483	0,38	416	0,45	408	0,31
DMF (36,7)	491	0,48	422	0,69	419	0,53
DMSO (46,7)	497	0,74	425	0,7	420	0,51
Víz (80,1)	513	0,04	434	0,63	419	0,21

A 8. táblázat adataiból felismerhetjük azt is, hogy emissziós maximumok valamennyi oldószerben ugyanezt a sorrendet követik, vagyis az λ_{Em} a következő sorrendben növekszik: 2,6-ICAN < 1,4-ICAN < 1,5-ICAN. Ez a megállapítás jó egyezést mutat a TD-DFT számítások eredményeivel, ami a 45. ábrán látható

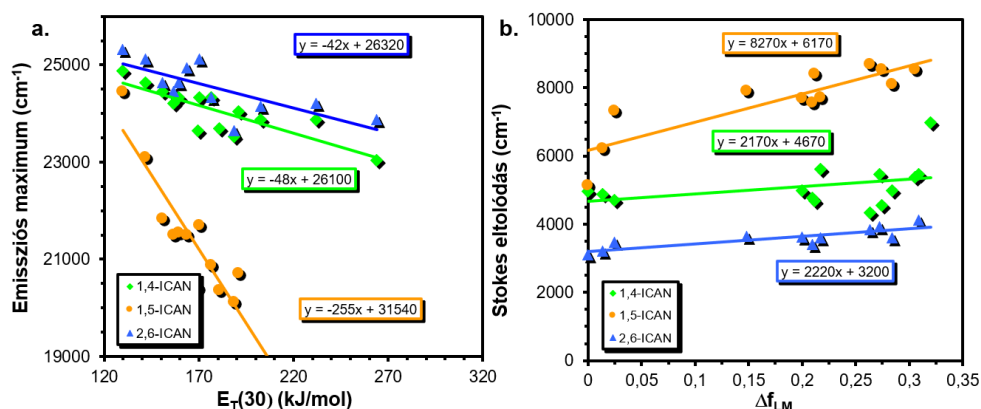


45. ábra: Az 1,4-, 1,5- és 2,6 izomerek DMSO-ban számított (a) és mért (b) emissziós spektrumai. Az 1,5-ICAN emissziós spektruma a [23] hivatkozásból származik.

A 8. táblázat adatai szerint, a szolvatokróm tartomány (Stokes-eltolódás) hexántól DMSO-ig 88 nm, 23 nm és 25 nm az 1,5-ICAN, 1,4-ICAN és 2,6-

ICAN sorrendben. A viszonylag kis szolvatokróm eltolódás meglepő a 2,6-ICAN izomernél annak fényében, hogy a leghosszabb, polarizációs tengellyel ez az izomer rendelkezik. Következésképpen ez a megállapítás rávilágít arra is, hogy hatékony fluoroforok tervezése kizárólag abban az esetben hatékony, amennyiben ismerjük a vegyületek abszorpciós és emissziós tulajdonságait, valamint előzetes vizsgálatokat végzünk azok elektroneloszlásáról. Továbbá, a 8. táblázat adatai mutatják, hogy a kvantumhasznosítási tényezők (Φ_f) jelentősen eltérnek az alkalmazott oldószertől vártaktól. A legnagyobb Φ_f értékeket az 1,5-ICAN izomer esetében kaptuk (0,28–0,95), míg az 1,4-ICAN izomernél a Φ_f kisebb (0,41–0,86), azonban a legkisebb Φ_f értékeket a 2,6-os izomer esetében határoztuk meg (0,15–0,53). Érdekes az is, hogy a legnagyobb Φ_f dioxánban volt az 1,5-ICAN- (0,95) és az 1,4-ICAN-nál (0,86), míg a 2,6-os izomer legnagyobb Φ_f -et a nagyon poláros oldószerekben, például DMF-ben (0,53) és DMSO-ban (0,51) mutat. Érdekesség a kis Φ_f -ben, hogy az 1,5-ICAN legkisebb Φ_f értékét vízben (0,04) számítottuk, azonban a másik két izomer számított értéke jelentősen nagyobb ($\Phi_{f(1,4-ICAN)} = 0,63$), valamint ($\Phi_{f(2,6-ICAN)} = 0,21$) vízben.

A szolvatokróm viselkedés mennyiségi leírására különböző polaritású oldószerek az előző fejezetekben már ismertetett Lippert - Mataga és Reichard módszereket alkalmaztuk, azaz az emissziós maximumokat (ν_{Em}) a polarizációs paraméter (Δf) és az empirikus oldószer polaritás paraméterének $E_T(30)$ függvényében ábrázoltuk a 46. ábrán.



46. ábra: Az 1,4-ICAN, 1,5-ICAN és a 2,6-ICAN izomerek fluoreszcens emisszió maximumai az empirikus oldószer polaritási paraméterrel $E_T(30)$ (a) és Lippert - Mataga (LM) (b) modell alkalmazásával. Az 1,5-ICAN izomerre vonatkozó adatokat a [23] hivatkozásból emeltem ki.

Amint az a 46. ábrából kiderül, az emissziós maximumok és a $E_T(30)$ között lineáris összefüggés figyelhető meg mindhárom fluorofor esetében. Minél nagyobb a meredekség annál nagyobb szolvatokróm tartománnyal rendelkezik a festék. Az illesztett egyenesek meredekségeiből megállapítható, hogy a legnagyobb szolvatokróm eltolódás, azaz a legnagyobb meredekség az 1,5-ICAN izomernél ($255 \text{ kcal}^{-1}\text{cm}^{-1}\text{mol}$) mutatkozik, míg ezen értékek lényegesen kisebbek az 1,4-ICAN ($48 \text{ kcal}^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{ mol}$) és a 2,6-ICAN ($42 \text{ kcal}^{-1}\text{cm}^{-1}\text{mol}$) izomerek esetén. Ez egyezik a 46. ábrán bemutatott számítási eredményekkel. Mennyiségi információt a Lippert-Mataga modell segítségével tudunk szerezni (6. egyenlet) bár a modellnek vannak bizonyos korlátozásai. Ennek ellenére kitűnően alkalmazható a gerjesztett (μ_E) és az alapállapot (μ_G) közötti dipólmomentum különbség meghatározására, ami kulcsfontosságú a fluorofor Stokes-eltolódásának ($\Delta\nu_{SS}$) meghatározásához. A 46.b. ábra alapján az 1,5-ICAN jóval nagyobb meredekséggel (8270 cm^{-1}) rendelkezik, mint az 1,4-ICAN és a 2,6-ICAN izomerek, amelyeknek az LM görbéi nagyon hasonlóak adódtak (meredekség = 2170 és 2220 cm^{-1}). Továbbá a Stokes eltolódások $\Delta f_{LM} = 0$ értéknél, azaz az ábra tengelymetszetében, az LM-grafikonok alapján az 1,5-ICAN > 1,4-ICAN > 2,6-ICAN sorrendben csökkennek. Az LM-diagram felhasználható a gerjesztett és az alapállapot értékei közötti dipólmomentum különbségek becslésére is, azaz a (6) egyenlet szerint $\Delta\mu = \mu_E - \mu_G$. Az egyes LM-grafikonokhoz tartozó $\Delta\mu$ értékének a meghatározáshoz szükséges a molekulák által elfoglalt térrész, azaz az Onsager sugár (a_0) ismerete. Mivel az a_0 meghatározása nem triviális értékét első közelítésben az amino- és az izociano csoportok közötti távolság feleként azonosítottuk az ICAN izomerek megfelelően optimált DFT geometriájából. Az a_0 értékeit ($\mu_E - \mu_G$ és a számított vertikális emisszió), amelyet a DFT számítással és a megfelelő LM-grafikonok alapján határoztunk meg a 9. táblázatban összesítettem.

9. táblázat: Az Onsager sugár (a_o), a gerjesztett és az alapállapot közötti dipólusmomentum különbség ($(\mu_E - \mu_G)_{DFT}$) DFT-vel számítva és Lippert-Mataga egyenlettel meghatározva ($(\mu_E - \mu_G)_{LM}$).

	a_o (pm)	$(\mu_E - \mu_G)_{DFT}$ (D)	$(\mu_E - \mu_G)_{LM}$ (D)
1,5-ICAN	305	4,8	4,9
1,4-ICAN	278	0,7	2,2
2,6-ICAN	388	3,5	3,6

Amint az a 9. táblázat adataiból kitűnik, az LM-grafikonokból meghatározott és a DFT-vel kiszámított $\Delta\mu$ értékek közel esnek egymáshoz, bár az LM-összefüggésből meghatározott értékek erősen függenek az Onsager sugártól. Itt meg kell jegyezni, hogy van egy másik elfogadott módszer a fent említett sugár meghatározására:

$$a_o = \sqrt[3]{\left(\frac{3M}{4\pi N_A \rho}\right)} \quad (11)$$

ahol

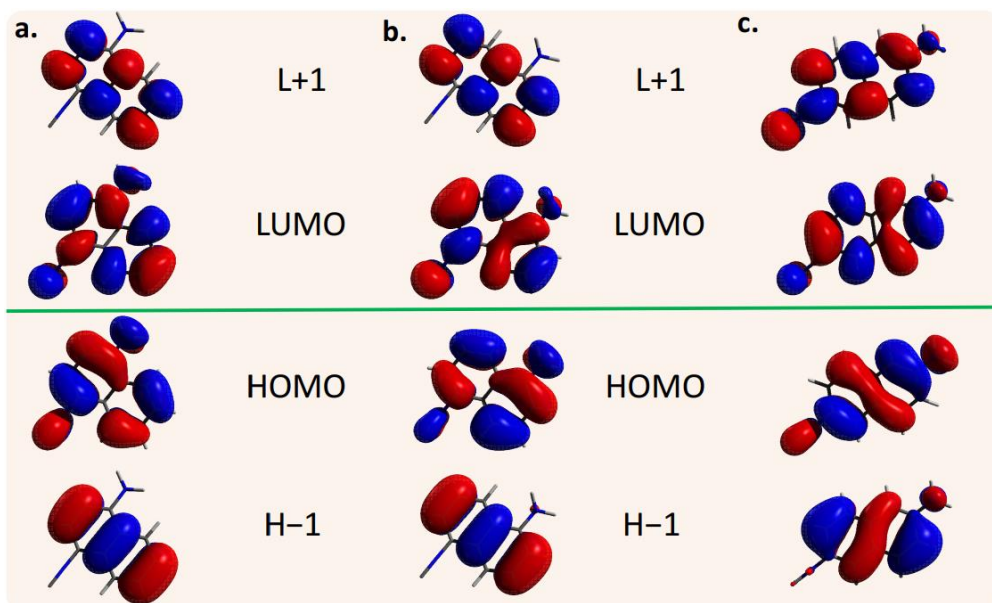
M fluorofor moláris tömege,

N_A Avogadro szám,

ρ fluorofor sűrűsége.

Például az 1,5-ICAN izomerre 1 g/cm^3 sűrűséget feltételezve kiszámolható az $a_o = 400 \text{ pm}$ és a $\Delta\mu = 7,2 \text{ D}^{[23]}$.

Annak érdekében, hogy mélyebb betekintést nyerjünk ezen ICAN izomerek gerjesztett állapotbeli elektronszerkezetébe, további TD-DFT számításokat végeztünk. Az elektronátmenetek kiszámításához mind az alap-, mind a gerjesztett állapotú geometriákat optimalizáltuk. A 47. ábra szemlélteti az 1,4-ICAN, 1,5-ICAN és 2,6-ICAN izomerek számolt molekulapályáit, melyek a Legmagasabb Energiájú Betöltött Molekulapálya (HOMO), a Legalacsonyabb Energiájú Betöltetlen Molekulapálya (LUMO), a HOMO-1 és a LUMO+1.

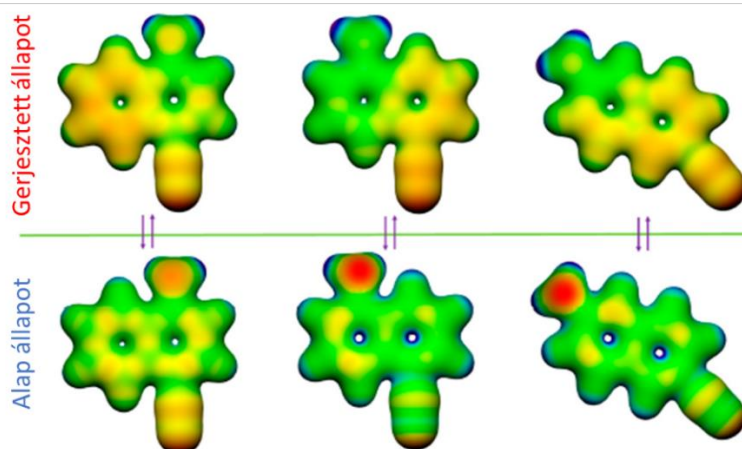


47. ábra: Az ICAN izomerek (1,4 „a”, 1,5 „b”, 2,6 „c”) HOMO, LUMO, HOMO-1 (H-1), LUMO+1 (L+1) molekulapályái

A molekulapályák mindegyik esetben teljesen eloszlanak a molekulán, így ezek további elemzését nem végeztük el.

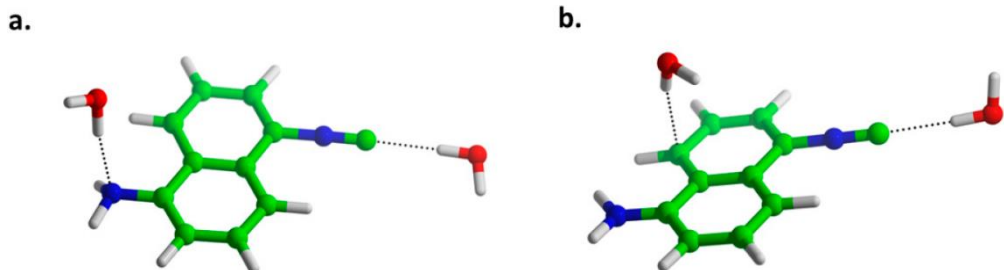
Az elektronok eloszlásával kapcsolatos további információkat azonban az alap- és a gerjesztett állapot elektrosztatikus potenciáljának feltérképezésével nyerhetünk. A vizsgálat eredményei a 48. ábrán láthatóak. Mindegyik esetben jelentős negatív töltés látható az amino csoport N atomján alapállapotban, ami csökken a gerjesztett állapot elérésekor. Ez szintén tükröződik a molekulageometria megváltozásában, amikor az amino csoport „kilapul”, vagy más szavakkal rehibridizálódik sp^2 állapotba, amikor is a nemkötő elektronjai belépnek az aromás gyűrű konjugált π -rendszerébe. Az izociano csoport töltése azonban az 1,4-es izomer esetében teljesen máshogy viselkedik a másik két származékéhoz képest. Az 1,4-ICAN-ban már az alapállapotban az jelentős negatív töltés koncentrálódik az izociano csoporton, az elektroneloszlás pedig csak kissé változik gerjesztett állapotban. Ez alapján az 1,4-ICAN-ban lokális gerjesztés zajlik az amino csoportról a naftalin gyűrűre. Az 1,5-ICAN és 2,6-ICAN izomerek esetében teljes töltésmegoszlást láthatunk az elektron donor (amino) és a gyűrűn távolabb elhelyezkedő elektronakceptor (izocianocsoport) között. Az 1,5-ICAN gerjesztése után gyakorlatilag azonnal elérjük a végleges elektronkonfigurációt, míg a 2,6-os származék esetében ezt

megelőzi a geometria megváltozása is. Ezért a 2,6-ICAN-ban is töltésátmenet megy végbe, azonban erre nem egy emisszív útvonalon, hanem gerjesztett állapotbeli relaxáción keresztül kerül sor. Az 1,4-ICAN-ban a töltés csak lokálisan adódik át, míg a 2,6-ICAN-ban az ICT nem sugárzó módon zajlik le a teljes abszorpciós-emissziós ciklusban.



48. ábra. Az ICAN származékok elektrosztatikus potenciál térképe (ESP) alap- és gerjesztett állapotban balról jobbra 1,4-ICAN, 1,5-ICAN és 2,6-ICAN

Hogy jobban megértsük az ICAN-származékok protikus oldószerekkel, (például víz) való kölcsönhatását, kvantumkémiai számításokat végeztünk, ahol két explicit vízmolekula koordinációját feltételeztük: egyet az amino csoporthoz, egyet pedig az izociano csoporthoz (49. ábra).



49. ábra: Az 1,5-ICAN izomer körüli oldószer átrendeződés az alap(a) és az első gerjesztett állapotban (b).

A vizet (kivéve a két konkrét vízmolekulát) kontinuumként modelleztük IEFPCM szerint (Integral Equation Formalism Polarizable Continuum Model). A gerjesztett állapot geometriájának optimalizálása az amino csoport által kialakított hidrogénkötés átrendeződését mutatta. Ilyen viselkedést, azaz a negatív töltés eltolódását figyelhettünk meg DMSO-ban is a nitrógenről a gyűrűbeli szénekre és az izociano csoportra (48. ábra). A modell képes ezért leírni a specifikus oldószer-oldott anyag közötti kölcsönhatást protikus oldószerekben, amit tovább erősít a karakterisztikus abszorpciós sáv pozíciójának előrejelzése 355 nm-en (~ 6% hibával). Gerjesztett állapotban mind a semleges, mind a protonált (ammónium) állapotokat optimalizáltuk. Az előbbi emissziós sávot produkált 537 nm-en, mely közel esik a megfigyelt hullámhosszhoz (513 nm), míg utóbbi sötét állapotú (közel nulla oszcillátor erősséggel). Bár a semleges forma stabilabb a modell szerint, a protonálódás vagy a protonálódással indukált protoncsere fordulhat elő, mivel a molekulák így könnyebben tudják legyőzni az energiagátakat gerjesztett állapotban, mint alapállapotban, ami a fluoreszcencia elvesztéséhez vezethet.

4. Anyag és módszer

4.1. Felhasznált anyagok

A szintézisekhez használt oldószereket (diklórmetán, hexán, dimetil-formamid (a.r., Sigma-Aldrich, Németország) nátrium-hidridről desztilláltuk.

A szintéziseknél alkalmazott reagenseket (1,4-diaminonaftalin, 2,6-diaminonaftalin, 3,6-diaminoakridin, metil-jodid) további tisztítás nélkül használtuk.

Az optikai vizsgálatokhoz használt analitikai reagens tisztaságú oldószereket (aceton, diklórmetán, hexán, 2-propanol, toluol, kloroform, etil-acetát, etanol (Molar Chemicals, Magyarország), ciklohexán, 1,4-dioxán (Reanal, Magyarország)) felhasználás előtt desztillációval tisztítottuk, a HPLC minősítésűeket (acetonitril, tetrahydrofuran, metanol, dimetil-formamid, dimetil-szulfoxid, piridin (VWR, Németország)), valamint a polimereket (poli(etilén-glikol), poli(propilén-glikol) (Sigma-Aldrich, Németország)) tisztítás nélkül használtuk.

Az 1,5-ICAN fémion függéséhez használt HgCl_2 (Sigma-Aldrich) további tisztítás nélkül használtuk fel. A ritkafém sók vizes oldatai közül a TbCl_3 , a MnCl_2 , a ZnCl_2 , az $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, a NiCl_2 , a NdCl_3 , a GdCl_3 , a MgCl_2 , a CuCl_2 , az AlCl_3 , a CoCl_2 , a CeCl_3 , a DyCl_3 , a CaCl_2 , a LuCl_3 , az EuCl_3 , az YCl_3 , a $\text{Ga}(\text{NO}_3)_2$, a $\text{Bi}(\text{ClO}_4)_3$, a $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ szelektivitás mérésre került felhasználásra. A Na_2CO_3 , Na_2SO_3 , Na_2SO_4 , NaBr , NaBrO_3 , NaCl , NaClO_3 , NaF , NaH_2PO_4 , NaIO_3 , NaNO_2 , NaNO_3 , NaSCN sók vizes oldatai az anion függés vizsgálatához kerültek felhasználásra. A fent említett vegyületeket a Debreceni Egyetem Szervetlen és Analitikai Tanszék biztosította számunkra. A Britton-Robinson (BRB) puffert $100\text{-}100\text{ cm}^3$ $0,04\text{ M H}_3\text{BO}_3$, $0,04\text{ M H}_3\text{PO}_4$ and $0,04\text{ M}$ ecetsav oldatok elegyítésével készítettük, majd a kívánt pH beállításához titeralapanyagként használtuk fel. A pontos kémhatás beállításához $2,0\text{ M}$ NaOH , illetve HCl oldatokat használtunk fel.

4.2. *Alkalmazott módszerek*

4.2.1. Mágneses magrezonancia (NMR) spektroszkópia

Az ^1H (360 MHz) és ^{13}C NMR (90,54 MHz) spektrumokat Avance I 360 MHz típusú spektrométeren vettük fel szobahőmérsékleten, deuterált kloroformban (CDCl_3) illetve dimetil-szulfoxidban (DMSO-d_6) oldva. A kémiai eltolódásokat az oldószerhez adott Me_4Si ($\delta = 0,00$ ppm ^1H esetében) illetve magához az oldószer jeléhez (CDCl_3 : $\delta = 77,00$ ppm ^{13}C esetében) igazítottuk. A 2D Hetero Single Quantum Coherence (HSQC), Rotational Overhauser Effect Spectroscopy (ROESY), Total Correlation Spectroscopy (TOCSY), Heteronuclear Multiple Bond Correlation (HMBC) méréseket Avance II 500MHz (500,13 MHz) készüléken végeztük, 293 K hőmérsékleten.

4.2.2. UV - látható spektroszkópia

Az ultraibolya-látható fotometriás méréseket HP 8453 diódasoros spektrofotométerrel végeztük, 1 cm-es fényúttal rendelkező kvarc küvettában, a méréshez $3,00\text{ cm}^3$ oldatot készítettünk elő.

4.2.3. Fluoreszcenciás mérés

A fluoreszcenciás vizsgálatokat egy Xe-lámpa fényforrással ellátott Jasco FP-8200 spektrofluoriméteren végeztük. Az excitációs és emissziós spektrumokat szobahőmérsékleten rögzítettük 2,5 nm excitációs és 5,0 nm emissziós sáv szélesség, illetve 100 nm/perc pásztázási sebesség mellett kis intenzitáson. A minták koncentrációját úgy állítottuk be, hogy az abszorbanciájuk 0,1 alatt maradjon, az önabszopciót elkerülendő. A kvantumhasznosítási tényező számításához $0,1\text{ mol/dm}^3$ koncentrációjú kinin-szulfát kénsavas oldatát használtuk referenciaoldatként ($\Phi_k = 55\%$).

4.2.4. ESI

Az ESI-MS spektrumokat egy MicroTOF-Q típusú Qq-TOF MS tömegspektrométerrel határoztuk meg (Bruker Daltonik, Bremen, Germany). A tömegspektrumokat DataAnalysis 3.4 szoftverrel értékeltük ki (Bruker). Az elkészített mintákat fecskendő mintaadagolóval (Cole-Palmer ins. Co., Vernon Hills, IL) 3 μL /perc áramlási sebességgel juttattuk a műszerbe. Az elektropray feszültsége 4 kV-ra állítottuk. A szárító (6 L/perc) és porlasztó gáz (200 °C) N_2 volt. A tömegspektrumokat nátrium-trifluoracetáttal (NaTFA) külső kalibrációs módszerrel optimáltuk, valamint 2 GHz-es erősítést használtunk.

4.2.5. Job ábra

A vizsgálathoz 300 mL törzsoldatot készítettünk az egyes ICAN származékok 12 mL törzsoldataiból, valamint 288 mL 0,04 M pH = 6 BRB pufferoldatból. The HgCl_2 törzsoldatot 800 μL MeCN és 19,2 ml 0,04 M pH = 6 BRB pufferoldat és 20 μL $c = 0,0511$ M HgCl_2 oldatok elegyítésével készítettük. Az törzsoldatokból hígítási sort készítettünk külön-külön folyadéküvegekben, melyeket 1 óráig 20 °C állni hagytuk, az egyensúly beállításának érdekében. Ezt követően mértük le az egyes hígított oldatok fluoreszcenciáját.

4.2.6. Kimutatási határ (Limit Of Detection, LOD) és meghatározási határ (Limit Of Quantitation LOQ)

Az 5-50 μM Hg^{2+} koncentrációtartomány vizsgálatához 120 μL ICAN származék törzsoldatait 2880 μL pH = 6 BRB pufferhez adtuk, valamint az adott higanytartalomhoz megfelelő térfogatú $c = 5,11 \cdot 10^{-5}$ M HgCl_2 került hozzáadásra. Az így elkészített oldatokat percig, 20 °C állni hagytuk az egyensúly beállításának érdekében. Ezt követően mértük a fluoreszcens spektrumokat 337, 320 and 330 nm gerjesztő hullámhosszokkal (A gerjesztő hullámhosszak felhasználása a következő származékok esetén, azok sorrendjében használtuk fel: ICAN, MICAN és diMICAN). Kisebb (nM) Hg^{2+} koncentrációtartomány meghatározásának érdekében az alábbi alternatívákkal ismételtük meg a fent leírt mérést: 12 μL ICAN származékok törzsoldatait az adott koncentrációhoz megfelelő térfogatú $c = 5,11 \cdot 10^{-6}$ M HgCl_2 törzsoldatot

elegyítettük 3000 μL pH = 6 BRB pufferoldattal. A méréseket minden származékkal háromszor megismételtük, azokból átlagokat és szórást számítottunk. A háttérzaj meghatározásához 12 μL ICAN származékot tartalmazó törzsoldat fluoreszcenciáját határoztuk meg egymás után 15 alkalommal megszakítás nélkül.

4.2.7. Számítási módszerek

A sűrűségfüggvény elmélet (DFT) számításaihoz a Gaussian09 szoftvercsomagot használtuk fel.^[113] Az 1,4-ICAN, 1,5-ICAN és a 2,6-ICAN molekulák alapállapotainak kiszámítását a PCM^[114] (Polarizable Continuum modell) M06-os függvényével (hexán és DMSO esetében) valamint a TZVP^[115] (Triple Zeta Valence Polarization) alapbeállításával optimalizáltuk. A gerjesztett állapotokat a TD-DFT^[116] (Time-Dependent Density Functional Theory) elmélettel határoztuk meg a már fent említett beállításokkal. Az irodalomban már használ M06-L, M06, M06-2X, M06-HF^[117] függvények közül választottuk az M06, valamint a CAM-B3LYP^[118] függvényeket választottuk, mivel leginkább ez a model reprodukálja a kísérletileg meghatározott emissziós hullámhosszokat.

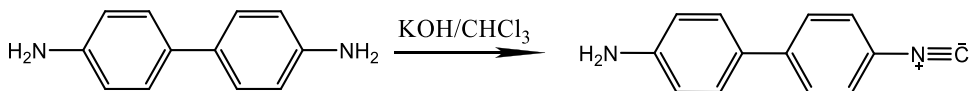
4.2.8. Szelektivitás meghatározása

Körülbelül 3000 μL törzsoldatot készítettünk 120 μL ICAN származék, 2880 μL ioncserélt víz és 2-10 μL Fémⁿ⁺ törzsoldat felhasználásával úgy, hogy a fluorofor/fém koncentrációaránya 1:3 legyen. Az elkészített oldatokat 5 percig állni hagytuk az egyensúly beállításának érdekében. Ezt követően mértük az oldatok fluoreszcenciáját $\lambda_{\text{ex}} = 337 \text{ nm}$ and $\lambda_{\text{ex}} = 365 \text{ nm}$ gerjesztő hullámhosszok felhasználásával. Az anionszelektivitás meghatározása során 120 μL ICAN törzsoldatot, 2780 μL , pH = 6, BRB pufferoldatot és 100 μL aniont tartalmazó oldatot elegyítettünk úgy, hogy a fluorofor/anion koncentrációarány 1:3 legyen.

4.3.Szintézis

4.3.1. 4-amino-4'-izocianobifenil előállítása

Nyomásálló reaktorcsőben végeztük a kísérletet. A kevertetést mágneses keverővel valósítottuk meg. A reaktorcsőbe benzidint (2,00 g, 10,9 mmol), kloroformot (15 ml), kálium-hidroxidot (3,00 g, 53,48 mmol), és vizet (10 ml) tettünk. A reakciót 120 °C-on 3 napig folyamatosan kevertetve végeztük. Lehűlés után az elegyet extraháltuk, a szerves fázist MgSO₄-on szárítottuk, majd bepároltuk. A 2,03 g nyersterméket (sötétbarna, kristályos) normál fázisú szilikagélre párolva, szilikagéllal töltött oszlopra vittük fel és oszlopoztuk diklórmetán eluenssel. 71 mg diizonitrilt és 0,53 g amino-izonitrilt kaptunk. A kitermelés 25%. ¹H NMR (360 MHz, CDCl₃) δ 7.52 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.38 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 6.75 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 3.81 (s, 1H).



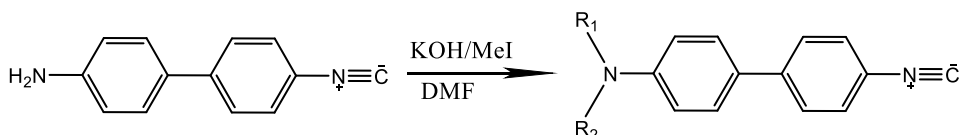
50. ábra: 4-amino-4'-izocianobifenil előállítása benzidindből

4.3.2. 4-(N-metilamino)-4'-izocianobifenil (monoMICAB) és 4-(N,N-dimetilamino)-4'-izocianobifenil (diMICAB) szintézise

A kísérletet egy 100 cm³-es gömblombikban folyamatosan kevertetve végeztük el. A lombikba 4-amino-4'-izocianobifenilt (0,200 g, 1,03 mmol), metil-jodidot (192 µl, 3,09 mmol), kálium-hidroxidot (0,28 g, 5 mmol) és absz. dimetil-formamidot tettünk. 1 nap után már számottevő konverzió és kevés kiindulási anyag látható a vékonyrétegen. Tovább kevertettük 3 napig, így minimális volt a kiindulási anyag mennyisége. A reakcióelegyet kb. 20 ml diklórmetánnal, majd háromszor (sós) vízzel választótölcsérben extraháltuk, a diklórmetános fázist MgSO₄-on szárítottuk, majd bepároltuk. A 190 mg nyersterméket (a kiindulási anyaghoz hasonló halványsárga kristályos anyag) diklórmetán : hexán 1:1 (v/v) elegyével normál fázisú szilikagélen oszlopoztuk. 60 mg (27%) monometil-, 62 mg (28%) dimetil-ICAB származékot sikerült kinyernünk. Mindkét termék fehér, kristályos.

monoMICAB: $^1\text{H NMR}$ (360 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.58 – 7.46 (m, 2H), 7.46 – 7.38 (m, 3H), 7.37 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.25 (s, 0H), 6.73 – 6.56 (m, 2H), 3.89 (s, 1H), 2.88 (s, 3H), 1.58 (s, 0H), 1.25 (s, 0H).

diMICAB ($^1\text{H NMR}$ (360 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.59 – 7.45 (m, 2H), 7.45 (s, 0H), 7.37 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 7.25 (s, 0H), 6.78 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H), 3.00 (s, 3H), 1.58 (s, 0H), 1.25 (s, 0H).

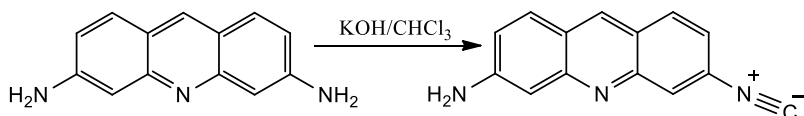


51. ábra: 4-(N-metilamino)-4'-izocianobifenil (monoMICAB) és 4-(N,N-dimetilamino)-4'-izocianobifenil (diMICAB) szintézise

4.3.3. 3-amino-6-izocianoakridin (ICAAC)

A 250 ml-es gömblombikba 3,6-diaminoakridint (1.00 g, 4.07 mmol) és kálium-hidroxidot (2.28 g, 40.7 mmol) mértünk be, amiket 50 ml kloroformban és 50 ml vízben oldottunk fel maradéktartanul. A reakcióelegyet 30 percig kevertettük. Ezt követően a szerves fázis a szervetlentől elválasztottuk extrakcióval és a szerves fázist vízmentes magnézium-szulfáton szárítottuk. A szárított szerves fázist leszűrtük és rotációs bepárló készüléken szárazra pároltuk. A reakcióterméket normál fázisú szilikagélen választottuk el. A mozgó fázis diklórmetán:methanol:aceton 90:5:5 arányú eluens volt. Kitermelés: 0.31 g, 32 % (narancssárga kristály).

$^1\text{H NMR}$ (360 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.77 (s, 1H), 8.14 – 7.95 (m, 2H), 7.86 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 7.44 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 7.16 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 6.92 (s, 1H), 6.36 (s, 2H), 3.35 (s, 1H), 2.51 (s, 1H).



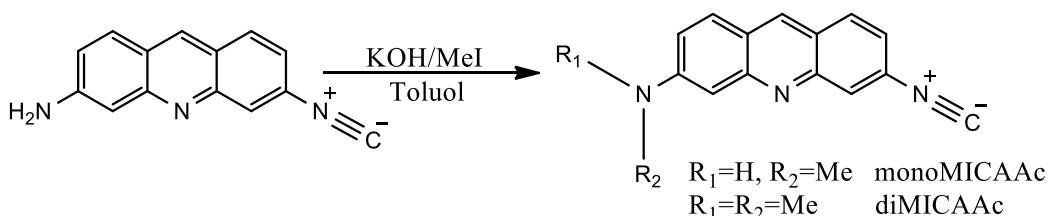
52. ábra: 3-amino-6-izocianoakridin (ICAAC) előállítása

4.3.4. 3-N-metilamino-6-izocianoakridin (monoMICAAC) és 3-N,N-dimetilamino-6-izocianoakridin(diMICAAC)

250 ml-es gömblombikba 3-amino-6-izocianoakridint (1,00 g, 4,80 mmol), kálium-hidroxidot (2,96 g, 52,8 mmol) és frissen szárított (nátriumon) absz. toluol (50 ml) mértünk be. A szilárd fázist maradéktalanul feloldottuk az oldószerben, majd hozzáadtunk feleslegben metil-jodidot. A lombikot ezt követően argon atmoszféra alatt szeptummal lezártuk, a reakció szobahőmérsékleten 2 napig játszódott le, fénytől elzárva. 200 ml metil-klorid és 5%-os ammónia oldattal semlegesítettük a reakcióelegyet, amit 5 alkalommal vízzel extraháltunk. A szerves fázist elválasztottuk a szervesetlen fázistól és vízmentes magnézium-szulfáton szárítottuk. A száraz reakcióelegyet leszűrjük és rotációs desztilláló készüléken szárazra pároltuk. A nyers termékeket normál fázisú szilikagélen, diklórmetán:hexán 1:1 arány eluenssel választottuk el. Kitermelés: 0,36 g, 34 % monoMICAAC (sárga kristály) és 0,29 g, 26 % diMICAAC (narancssárga kristály).

monoMICAAC ^1H NMR (360 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.46 (s, 0H), 8.06 (s, 0H), 7.87 (d, $J = 8.7$ Hz, 0H), 7.71 (d, $J = 9.6$ Hz, 0H), 7.34 – 7.16 (m, 0H), 7.02 – 6.78 (m, 0H), 4.58 – 4.28 (m, 1H), 3.03 (d, $J = 5.1$ Hz, 1H).

diMICAAC ^1H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.48 (s, 0H), 8.05 (s, 0H), 7.86 (d, $J = 8.7$ Hz, 0H), 7.80 (d, $J = 9.4$ Hz, 0H), 7.34 – 7.18 (m, 0H), 7.07 (s, 0H), 3.19 (s, 1H).



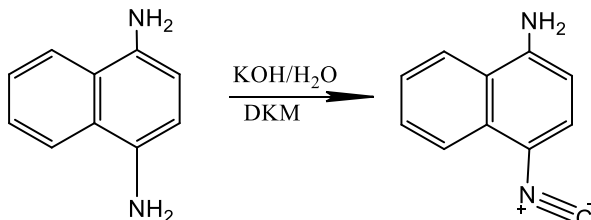
53. ábra: A mono- és a diMICAAC előállításának egyenlete

4.3.5. 1-amino-4-izociano-naftalin előállítása

200 ml-es gömblombikba 1,4-diaminonaftalint-hidroklorid sót, (2,00 g, 12,8 mmol) kloroformot (20 ml), kálium-hidroxidot (10.0 g, 536 mmol) és vizet (5 ml) mértünk be. Az elegyet fűthető mágneses keverőn kevertettük és temperáltuk 40 °C - on 6 óráig Ar atmoszféra alatt. Szobahőmérsékletre hűlés

után a szerves fázis elválasztottuk, majd magnézium-szulfáton szárítottuk. A nyers termék komponenseit normál fázisú szilikagélen választottuk el, diklórmetán eluens felhasználásával. Kitermelés: 25% (0,50g), a termék sárga por.

(¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.14 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.82 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.65 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.55 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.42 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.26 (s, 0H), 6.65 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 4.44 (s, 2H), 1.59 (s, 1H), 1.25 (s, 1H), 0.88 (s, 0H).)

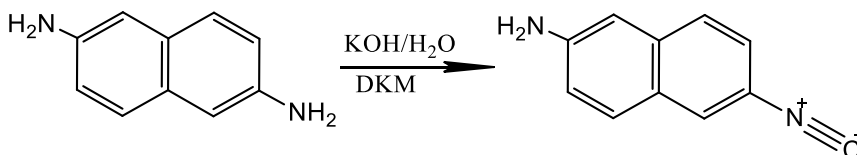


54. ábra: A mono- és a diMICAAc előállításának egyenlete

4.3.6. 2-amino-6-izocianonaftalin

200ml-es gömblombikba bemértük 2,6-diaminonaftalint (0,50 g, 3,16 mmol), kloroformot (80 ml), kálium-hidroxidot (7,00 g, 125 mmol) és vizet (5 ml). Az elegyet fűthető mágneses keverőn kevertettük Ar atmoszféra alatt 40 °C-on. Szobahőmérsékletre lehűtve a szerves fázis elválasztottuk, azt háromszor mostuk át vízzel, majd magnézium-szulfáton szárítottuk. A szárított oldószert rotációs bepárlóval távolítottuk el. A nyers termék komponenseit normál fázisú szilikagélen, diklórmetán eluenssel választottuk el. A termék halványsárga por. Kitermelés: 14% (0,55g)

(¹H NMR (360 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.71 (s, 1H), 7.62 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.55 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.33 – 7.14 (m, 1H), 7.06 – 6.82 (m, 2H), 4.01 (s, 2H), 2.17 (s, 0H), 0.88 (s, 1H).)



55. ábra: A mono- és a diMICAAc előállításának egyenlete

5. Összefoglalás

Kutatásom során egy a kutatócsoportunk által korábban kifejlesztett 1-amino-5-izocianonaftalinhoz (ICAN) hasonló amino-izocianoaréneket állítottam elő és vizsgáltam optofizikai tulajdonságaikat, valamint az eredeti ICAN-nal együtt analitikai alkalmazhatóságukat is. Továbbá megvizsgáltam az intelligens molekulatervezés szempontjából kulcsfontosságú kérdést: hogyan függenek az adott vegyület optikai tulajdonságai a szubsztituensek helyzetétől.

Az ICAN naftalin gyűrűjét bifenilre cserélve előállítottam az 4-amino-4'-izocianobifenilt (ICAB) és metilezett származékait (monoMICAB és diMICAB) szolvatokróm tulajdonságaikat részletesen vizsgáltam. A vegyületcsaládot benzidinből kiindulva állítottam elő, melyek képest mindhárom vegyület jelentős pozitív szolvatokróm tulajdonságot mutat, hasonlóan a korábban publikált 1-amino-5-izocianonaftalin (ICAN) tulajdonságaihoz. Az előállított három származék szolvatokróm tartományai rendre $\Delta\lambda_{em} = 104$ nm (ICAB), 92 nm (monoMICAB) és 90 nm-nek (diMICAB) adódtak. Mindhárom termék kvantumhasznosítási tényezője a legtöbb oldószerben nagy értéket adott, a legnagyobb értéket a dimetilezett származék esetében kaptuk. A szolvatokróm viselkedés matematikai leírására a Lippert - Mataga, Kamlet - Taft és a Catalán modelleket használtuk, melyek alapján a vegyületeink valódi szolvatokróm viselkedést mutattak. Időfüggő sűrűségfüggvényes (DFT) számítások segítségével vizsgáltuk a szerkezet változásának hatását a szolvatokróm tulajdonságra néve, így megállapítottuk, hogy C1-C10 egyszeres kötés körüli rotáció negatív hatással van a szolvatokróm viselkedésre.

Munkám során újszerű, multifunkcionálisan alkalmazható amino-izocianoakridin vegyületcsaládot (ICAAc, monoMICAAC és diMICAAC) hoztunk létre. A fluoroforok szolvatokróm viselkedést mutattak ($\Delta\lambda_{em} = 53-63$ nm), dipólólus momentumaik változása az alap és a gerjesztett állapot között ($\mu_e-\mu_g$) 5,6-8,9 Debye közöttinek adódtak. A várakozásokkal ellentétben a csoportok közötti távolság növelése (hosszabb aromás gyűrű) nem eredményezett szélesebb szolvatokróm tartományt. Azonban az izonitrilcsoport jelenléte csökkentett bázicitást eredményezett ($pK_a = 7,05-7,58$) az alapvegyülethez (akridin-narancs) képest. A vizsgálatok alapján az

ICAAc vegyületcsalád pH-érzékeny abszorpciós sávjai révén ígéretes szenzoroknak mutatkoznak a fiziológiai pH tartományban. UV-vis és fluoreszcencia spektroszkópiával igazoltuk, hogy az ICAAc származékok segítségével különböző puffer oldatok pH-ja nagy pontossággal (2–3% hiba) határozható meg pH = 6–8 között. A spektrális tulajdonságok pH függése alkalmassá teszi ezen vegyületeket mikrokörnyezetek pl. SLS micellák Stern-rétegének a pH meghatározására. Az optikai tulajdonságok Ag(I)-el történő komplexképzéssel is jelentősen módosíthatók, tovább bővítve a vegyületcsalád gyakorlati alkalmazhatóságát.

Kimutattuk, hogy az 1-amino-5-izocianonaftalin izocianocsoportja vizes közegben Hg(II)-sók hatására szelektíven visszaalakul aminocsoporttá. A reakciót az emissziós maximum jelentős hipszokróom eltolódása kíséri, így alkalmassá tehető a Hg²⁺ ion szelektív kimutatására vizes közegben. A Hg(II)-detektálási módszer alkalmazhatóságát 3 ICAN-származékkal, vízben 23 fémion jelenlétében vizsgáltuk, azonban lényeges spektrális változást csak a Hg²⁺ és az Ag⁺ esetében figyeltünk meg. Az oldatokban jelenlévő Hg²⁺ ionok az eredeti emissziós maximumok 107, 112 és 94 nm-es hipszokróom eltolódását eredményezte az ICAN, MICAN és diMICAN esetében. Ezzel szemben azonos mennyiségű Ag⁺ hozzáadása 20 nm és 23 nm vörös irányú eltolódást eredményezett az ICAN és a diMICAN esetében, ami az izocianocsoport 1:1 Ag⁺ komplex képződésének tulajdonítható be.

Az izocianocsoport egyidejű komplexképződése és redukciós reakciója lehetővé teszi, hogy ugyanaz a vegyület még nagy Ag⁺ felesleg jelenléte esetén is kimutassa a Hg²⁺-ot. Ez utóbbi hiányában azonban az Ag⁺ jelenléte kimutatható volt az ICAN-csúcs batokróom eltolódása mellett is.

Mivel a Hg²⁺ kimutatás a naftalin-diaminok képződésén alapul, a vizes oldatot pufferolni kell (pH = 6–10), hogy megakadályozzuk a protonált részecskék képződését, ami csökkentheti a kimutatás érzékenységet. Az amincsúcs intenzitása ($\lambda_{em, amin} = 406, 408$ és 420 nm ICAN, MICAN és diMICAN esetében) és intenzitás-arányuk az eredeti emissziós maximum helyzetének felhasználásával számítva ($\lambda_{em, fluorofor} = 513, 520$ és 513 nm ICAN, MICAN és diMICAN esetében) a Hg²⁺ koncentrációra lineáris függést kaptunk a 170 nM–50 μ M koncentráció tartományban. A módszer kimutatási határát (LOD) és a meghatározási határát (LOQ) az intenzitás arányokból ábrázolt kalibrációs görbe a kis Hg²⁺ koncentrációjú régiójában határoztuk

meg, és LOD <6 nM és LOQ <17 nM-nek adódott. A mátrixhatás vizsgálatokor enyhe interferenciát tapasztaltunk Fe^{3+} és Bi^{3+} esetében, és valamivel jelentősebbet a Cu^{2+} esetében, de csak akkor, ha ezek az ionok többszörös feleslegben voltak a Hg^{2+} ionok koncentrációjához képest. A módszer gyakorlati alkalmazhatóságát frissen elkészített fogászati amalgámon is elvégeztük.

A funkciós csoportok anyagi minősége jelentősen befolyásolja a szolvatokróm tulajdonságot. Kutatásom során vizsgáltam változatlan anyagi minőségű funkciós csoportok relatív helyzetének fotofizikai tulajdonságokra gyakorolt hatását. A vizsgálatokat az alapvegyületen (1,5-ICAN) és két másik izomerén (1,4-ICAN és 2,6-ICAN) keresztül végeztük, ahol a fotofizikai tulajdonságokat hasonlítottuk össze. Vizsgálataim alapján a funkciós csoportok relatív helyzete jelentős mértékben befolyásolja a vegyületek abszorpciós és emissziós maximumaik helyzetét egyes esetekben, továbbá a különféle oldószerekben a moláris abszorpciós együtthatók 1,4-ICAN > 1,5-ICAN > 2,6-ICAN sorrendben csökkennek.

Az-izomereknek a Stokes-eltolódásait a Lippert – Mataga (LM) elmélet alapján értelmeztük, mely alapján a következő sorrendet tuduk felállítani: 1,5-ICAN > 1,4-ICAN > 2,6-ICAN, ahol az értékek balról jobbra csökkennek. Az LM-ábrákból meghatároztuk a gerjesztett és az alapállapot dipólusmomentumok eltéréseit és szintén jó egyezéseket kaptunk a DFT számításokkal. Mindezek alapján elmondhatjuk, hogy az effektív fluoroforok racionális megtervezése előzetes ismereteket igényel az adott vegyületosztály abszorpciós és fluoreszcenciás tulajdonságairól.

6. Summary

During my PhD research, I prepared and investigated the optophysical properties of isocyanoaminoarenes, analogues of our previously developed isocyanoaminonaphthalene (ICAN) solvatochromic fluorophore family. In addition, I investigated their analytical applicability along with the original ICANs. Finally, I studied the dependence of the optical properties upon the substitution position of our original ICAN family.

4-amino-4'-isocyanobiphenyl (ICAB) and its mono- and dialkylated derivatives (monoMICAB and diMICAB) were prepared starting from the easily available benzidine. Not as the starting material benzidine, all three compounds showed enhanced positive solvatochromic properties similar to that of our previously introduced dye: 1-amino-5-isocyanonaphthalene (ICAN). The solvatochromic range were found to be $\Delta\lambda_{\text{max}}=104$ nm (ICAB), 92 nm (monoMICAB) and 90 nm (diMICAB), respectively. All three products showed intense fluorescence with good fluorescence quantum yields in most solvents ($\Phi_{\text{F}} = 0.88$ % in water to $\Phi_{\text{F}} = 89$ % in acetonitrile, the highest yields were obtained in the case of the dimethyl derivative). The emission maximum for the mono- and dimethylated derivatives is located in the blue region of the visible spectrum in most solvents; however this is only true for ICAB in the most polar solvents. Fluorescent properties varying with the solvent polarity could be well described by both the Kamlet-Taft and Catalán equations. High-level DFT calculations revealed the nonplanar structures of the molecules, which is probably due to the single bond character of C1-C1'. The free rotation between the two aromatic rings can be the explanation for the lower emission wavelengths compared to ICAN.

Novel, multifunctional, amino-isocyanoacridines (ICAAc, monoMICAAC and diMICAAC) were prepared by the reaction of 3,6-diaminoacridine with dichlorocarbene. The resulting dyes showed tunable solvatochromic behavior ($\Delta\lambda_{\text{em}}=53-63$ nm) owing to the dipolar nature ($\mu_{\text{e}}-\mu_{\text{g}}$ varies between 5.6-8.9 Debye) of the molecules. The introduction of the electron withdrawing isonitrile group, resulted in a reduced basicity ($\text{pK}_{\text{a}}=7.05-7.58$), which in combination with their unique pH-sensitive vibronic absorption bands make them promising pH-probes in the physiological pH range. It was demonstrated using UV-vis and fluorescence spectroscopy that the pH of different buffer

solutions could be recovered with great precision (2-3% error) between pH=6-8 and the method is stable for at least an hour. The dyes were shown to be able to sense pH change in different microenvironments such as the lowered pH in the Stern layer as it was demonstrated on SLS micelles. Furthermore, the isocyano group is an excellent ligand for complexation with Ag(I), this way the optical behavior of our dyes can be fine-tuned by ions too.

1-amino-5-isocyanonaphthalene (ICAN) and its monomethylated-(MICAN) and dimethylated derivatives (diMICAN) turned out to be highly sensitive ratiometric fluorescent sensors for Hg^{2+} in aqueous solutions. Owing to its easy to preparation through a single step reaction from 1,5-diaminonaphthalene, ICAN is the simplest, lowest molecular weight fluorophore reported for this purpose until now. Its simple structure and nontoxic nature is favorable for commercial applications. The behavior of the ICAN derivatives was investigated in water in the presence of 23 common metal ions and 13 simple and complex anions, but significant spectral shift of the emission maximum happened only in the case of Hg^{2+} and Ag^+ . The addition of 3 molar equivalent Hg^{2+} resulted a hypsochromic shift of 107, 112 and 94 nm for ICAN, MICAN and diMICAN, respectively. This shift is attributed to the appearance of a new diamine emission peak, which is the result of the chemical reaction of Hg^{2+} with the isocyano moiety of the ICAN derivatives. The formation of the diamines was revealed by both fluorimetric and ESI-MS methods. Fluorescence titrations with HgCl_2 showed 1:1 stoichiometry for the reduction reaction of ICANs. In contrast, the addition of the same amount of Ag^+ yielded a 20 nm and 23 nm bathochromic shift for ICAN and diMICAN, which can be attributed to 1:1 complex formation of the isocyano group with Ag^+ as we have shown earlier in detail. This simultaneous complexation and reduction reaction of the isocyano group enables for the same dye to detect Hg^{2+} even in the presence of large excess of Ag^+ . However, in the absence of Hg^{2+} , the presence of Ag^+ could be detected based on its strong quenching effect along with the bathochromic shift of the ICAN peak, which are only characteristic for Ag^+ . Because the Hg^{2+} detection is based on the formation of naphthalene diamines, the aqueous solution must be buffered (pH=6-10) to hinder the formation of protonated species, which lowers the sensitivity. The intensity of the amine peak ($\lambda_{\text{em,amine}}=406, 408$ and 420 nm for ICAN, MICAN and diMICAN, respectively) and their intensity ratios formed

using the position of the original emission maximum ($\lambda_{em,dye}=513, 520$ and 513 nm for ICAN, MICAN and diMICAN, respectively) were found to be a linear function of Hg^{2+} concentration in the range of 170 nM- 50 μ M. The limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ) for the method was determined using the ratiometric calibration curve in the low Hg^{2+} concentration region and were found to be $LOD < 6$ nM and $LOQ < 17$ nM. Slight interference was found in the case of Fe^{3+} and Bi^{3+} , and a more pronounced interference in the case of Cu^{2+} , but only when these ions were in multiple excess compared to Hg^{2+} . The practical applicability of the method was demonstrated on freshly prepared dental amalgam.

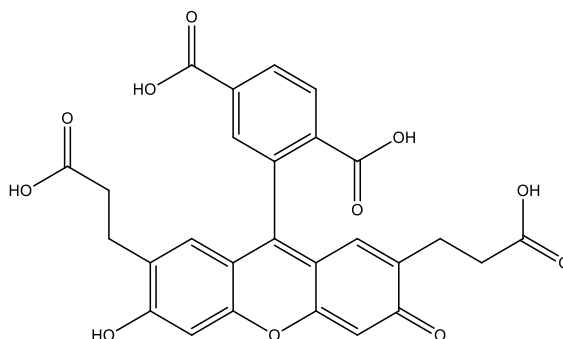
The electronic absorption, solvatochromic and photophysical properties of three different ICAN isomers including 1,5-ICAN, 1,4-ICAN and 2,6-ICAN were studied and compared. It was found that the position of the donor amino and the acceptor isocyanato group markedly affect these properties. The molar absorption coefficients in various solvents were found to decrease in the order of $1,4-ICAN > 1,5-ICAN > 2,6-ICAN$ and this order is in line with the one calculated by high level quantum chemical method (DFT). On the other hand, the Stokes shifts ($\Delta\nu_{ss}$) for these ICAN isomers were interpreted in terms of the Lippert-Mataga (LM) theory and the values of $\Delta\nu_{ss}$ were found to decrease in the order of $1,5-ICAN > 1,4-ICAN \approx 2,6-ICAN$. From the LM-plots, the corresponding differences in the dipole moments of the excited and the ground states were determined and good agreements with the DFT calculations were obtained. In addition, this finding may shed light also on the fact that a rational design of effective fluorophores requires lots of prior knowledge on the electronic absorption and fluorescence emission properties of the given class of compounds.

Rövidítésjegyzék

AO Akridin Orange (Akridin narancs)

AOI Automatic Optical Investigation (Automatikus optikai vizsgálat)

BCECF



2',7'-bisz(2-karboxietil)-5,6-karboxifluoreszcein

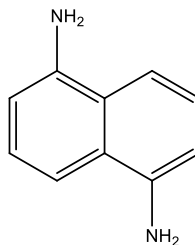
BRB

Britton-Robinson "univerzális" puffer

CMC

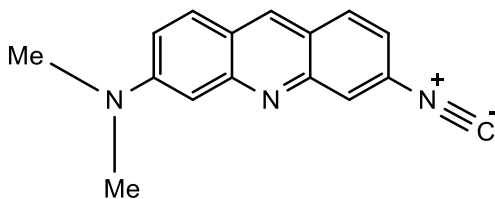
Critical Micellaformation Concentracion (Kritikus Micellaképződési Koncentráció)

DAN



1,5-diaminonaftalin

diMICAac

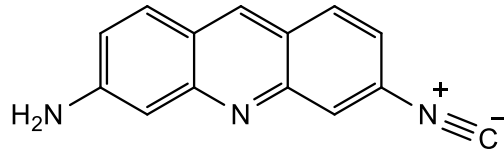


3-N,N-dimetilamino-6-izocianoakridin

Fluorescence resonance energy transfer (fluoreszcens rezgési energia átrendeződés)

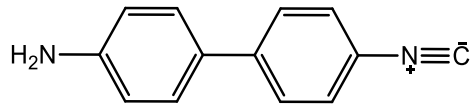
FRET

ICAAc



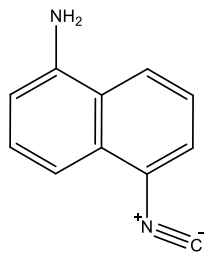
3-amino-6-izocianoakridin

ICAB

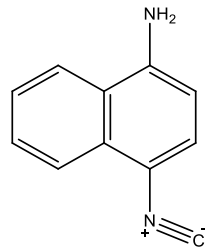


4-amino-4'-izocianonaftalin

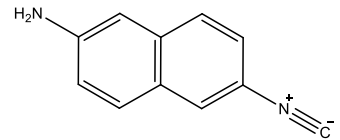
ICAN



1-amino-5-izocianonaftalin



1,4-ICAN

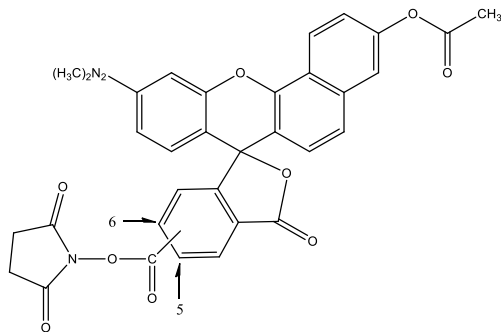


2,6-ICAN

ICT

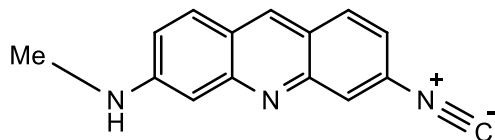
Intermolecular Charge Transfer (Belső töltésátrendeződés)

karboxilSNARF-1



Fluoreszcens festék

monoICAAc



3-N-metilamino-6-izocianoakridin

OLED

Organic Light Emitting Diode (Szerves Fény Emittáló Dióda)

PL / FL

Photoluminescence /Fluorescence (Fluoreszcens (vizsgálat vagy intenzitás)

PMT

Photoelectron Multiplier Tube
(fotoelektronsokszorozó cső)

Φ_f

Quantum Yield (Kvantumhasznosítási tényező)

SLS

Sodium-Lauril-Sulphate (Nátrium-lauril-szulfát oldat)

TIRF

Total Internal Reflection Fluorescence (teljes belsőreflexiós fluoreszcencia)

7. Irodalomjegyzék

- [1] Kim, J. "11 - Multifunctional Smart Biopolymer Composites as Actuators." *Biopolymer Composites in Electronics*. Ed. K. K. Sadasivuni, et al. Elsevier, 2017. 311-331.
- [2] Hu, J. L. "1 - Introduction to Active Coatings for Smart Textiles." *Active Coatings for Smart Textiles*. Ed. Jinlian Hu. Woodhead Publishing, 2016. 1-7. Woodhead Publishing Series in Textiles (2016)
- [3] Beneduci, Amerigo, Giuseppina Anna Corrente, and Giuseppe Chidichimo. "Chapter 9 Electrochromic and Electrofluorescence Liquid Crystals." *Electrochromic Smart Materials: Fabrication and Applications*. The Royal Society of Chemistry, 2019. 261-292.
- [4] Dolez, P. I., and J. Mlynarek. "22 - Smart Materials for Personal Protective Equipment: Tendencies and Recent Developments." *Smart Textiles and their Applications*. Ed. Vladan Koncar. Oxford: Woodhead Publishing, 2016. 497-517. Woodhead Publishing Series in Textiles
- [5] Parasassi, T., F. Conti, and E. Gratton. "Time-Resolved Fluorescence Emission Spectra of Laurdan in Phospholipid Vesicles by Multifrequency Phase and Modulation Fluorometry." *Cellular and molecular biology* 32.1 (1986): 103-8.
- [6] Nabavi Zadeh, Pegah S., et al. "Measuring Viscosity Inside Mesoporous Silica using Protein-Bound Molecular Rotor Probe." *Physical Chemistry Chemical Physics* 20.36 (2018): 23202-13.
- [7] Vasu, Anuji K., and Sriram Kanvah. "Red-Emitting Cationic Fluorophore as a Probe for Anionic Surfactants." *Dyes and Pigments* 142 (2017): 230-6.
- [8] Mika, Jacek T., et al. "Measuring the Viscosity of the Escherichia Coli Plasma Membrane using Molecular Rotors." *Biophysical journal* 111.7 (2016): 1528-40.
- [9] Su, D., et al. "A Simple BODIPY-Based Viscosity Probe for Imaging of Cellular Viscosity in Live Cells." *Sensors (Basel, Switzerland)* 16.9 (2016): 1397.
- [10] Loving, Galen S., Matthieu Sainlos, and Barbara Imperiali. "Monitoring Protein Interactions and Dynamics with Solvatochromic Fluorophores." *Trends in biotechnology* 28.2 (2010): 73-83.
- [11] Nakanishi, Jun, et al. "Imaging of Conformational Changes of Proteins with a New Environment-Sensitive Fluorescent Probe Designed for Site-Specific Labeling of Recombinant Proteins in Live Cells." *Analytical Chemistry* 73.13 (2001): 2920-8.
- [12] Lakowicz, J.R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*; Springer: New York, NY, USA, 2006.
- [13] Weber, Gregorio, and Fay J. Farris. "Synthesis and Spectral Properties of a Hydrophobic Fluorescent Probe: 6-Propionyl-2-(Dimethylamino)Naphthalene." *Biochemistry* 18.14 (1979): 3075-8.
- [14] Kucherak, Oleksandr A., et al. "Fluorene Analogues of Prodan with Superior Fluorescence Brightness and Solvatochromism." *The Journal of Physical Chemistry Letters* 1.3 (2010): 616-20.

- [15] Gelamo, E. L., and M. Tabak. "Spectroscopic Studies on the Interaction of Bovine (BSA) and Human (HSA) Serum Albumins with Ionic Surfactants." *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 56.11 (2000): 2255-71.
- [16] Haskard, Carolyn A., and Eunice Li-Chan. "Hydrophobicity of Bovine Serum Albumin and Ovalbumin Determined using Uncharged (PRODAN) and Anionic (ANS-) Fluorescent Probes." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46.7 (1998): 2671-7.
- [17] Moreno, Fermin, Manuel Cortijo, and José González-Jiménez. "Interaction of Acrylodan with Human Serum Albumin. A Fluorescence Spectroscopic Study." *Photochemistry and photobiology* 70.5 (1999): 695-700.
- [18] Flora, Kulwinder, et al. "Unfolding of Acrylodan-Labeled Human Serum Albumin Probed by Steady-State and Time-Resolved Fluorescence Methods." *Biophysical journal* 75.2 (1998): 1084-96.
- [19] Ntziachristos, Vasilis. "Fluorescence Molecular Imaging." *Annual Review of Biomedical Engineering* 8.1 (2006): 1-33.
- [20] Pu, Yang, et al. "Synthesis of Dye Conjugates to Visualize the Cancer Cells using Fluorescence Microscopy." *Applied Optics* 53.11 (2014): 2345-51.
- [21] Ngi Ho, Chu, Gabor Patonay, and Isiah M. Warner. "Bioanalytical Applications of Fluorescence Quenching." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 5.2 (1986): 37-43.
- [22] Hild, G., et al. "Fluorescence Quenching of the Tryptophan Emission from the F- and G-Forms of Actin." *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 35.3 (1996): 175-9.
- [23] D. Rácz, M. Nagy, A. Mándi, M. Zsuga, S. Kéki, J. Photochem. Photobiol. A 270 (2013) 19–27
- [24] Rogers, C. A., et al. "Demonstration of A Smart Material with Embedded Actuators and Sensors for Active Control"./1/16, (1989)
- [25] Takagi, Toshinori. "Recent Research on Intelligent Materials." *Journal of Intelligent Material Systems and Structures* 7.3 (1996): 346-52.
- [26] Fairweather, James A., and Kevin C. Craig. "Incorporating Finite Element Techniques to Simplify the Impedance Modeling of Active Structures"./7/24, Smart Structures and Materials 1998: Mathematics and Control in Smart Structures., (1988)
- [27] Varadan, V. K., and V. V. Varadan. "Microsensors, Microelectromechanical Systems (MEMS), and Electronics for Smart Structures and Systems." *Smart Materials and Structures* 9.6 (2000): 953-72.
- [28] ZHU, Hongying, Aydogan OZCAN, and Sam MAVANDADI. Compact Wide-Field Fluorescent Imaging on a Mobile Device. Patent EP2656066A4. Nov 8,. 2012
- [29] Gorocs Zoltan, Yu Meng Dai, Ling Yuye, et al. Fluorescent Imaging using a Flatbed Scanner. Patent US9683938B2. Jun 20,.2015
- [30] Zhu, Pan-pan, et al. "Synthesis of the Cu-Doped Dual-Emission Fluorescent Carbon Dots and its Analytical Application." *Langmuir* 34.34 (2018): 9982-9.
- [31] Taraska, Justin W., and William N. Zagotta. "Fluorescence Applications in Molecular Neurobiology." *Neuron* 66.2 (2010): 170-89.

- [32] Liu, Pai, et al. "Application of a Novel "Turn-on" Fluorescent Material to the Detection of Aluminum Ion in Blood Serum." *ACS Applied Materials & Interfaces* 10.28 (2018): 23667-73.
- [33] Benard Valeur: *Molecular Fluorescence Principles and Applications*, 2001, p:7
- [34] Joseph R. Lakowicz: *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Third Edition, Chapter 19, p. 205-235 p.637, 2006
- [35] Epand, Richard M., and Ruud Kraayenhof. "Fluorescent Probes used to Monitor Membrane Interfacial Polarity." *Chemistry and physics of lipids* 101.1 (1999): 57-64
- [36] Reichardt, Christian. "Solvatochromic Dyes as Solvent Polarity Indicators." *Chemical reviews* 94.8 (1994): 2319-58
- [37] Bouvrais, H el ene, et al. "Impact of Membrane-Anchored Fluorescent Probes on the Mechanical Properties of Lipid Bilayers." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1798.7 (2010): 1333-7.
- [38] Bag, Subhendu Sekhar, et al. "Singly and Doubly Labeled Base-Discriminating Fluorescent Oligonucleotide Probes Containing Oxo-Pyrene Chromophore." *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 20.11 (2010): 3227-30.
- [39] Suryawanshi, Vishwas D., et al. "Solvatochromic Fluorescence Behavior of 2-Amino-6-Hydroxy-4-(3,4-Dimethoxyphenyl)-Pyrimidine-5-Carbonitrile: A Sensitive Fluorescent Probe for Detection of pH and Water Composition in Binary Aqueous Solutions." *Journal of Molecular Liquids* 184 (2013): 4-9
- [40] Kaur, Navneet, and Subodh Kumar. "Colorimetric Metal Ion Sensors." *Tetrahedron* 67.48 (2011): 9233-64.
- [41] Baruah, Mukulesh, et al. "Solvent and pH Dependent Fluorescent Properties of a Dimethylaminostyryl Borondipyromethene Dye in Solution." *The Journal of Physical Chemistry A* 110.18 (2006): 5998-6009.
- [42] Hao, Erhong, et al. "Solvent Dependent Fluorescent Properties of a 1,2,3-Triazole Linked 8-Hydroxyquinoline Chemosensor: Tunable Detection from Zinc(II) to Iron(III) in the CH₃CN/H₂O System." *The Journal of Physical Chemistry A* 115.29 (2011): 8234-41.
- [43] Rauf, M. A., and S. Hisaindee. "Studies on Solvatochromic Behavior of Dyes using Spectral Techniques." *Journal of Molecular Structure* 1042 (2013): 45-56.
- [44] Parasassi, Tiziana, et al. "Laurdan and Prodan as Polarity-Sensitive Fluorescent Membrane Probes." *Journal of Fluorescence* 8.4 (1998): 365-73
- [45] Marini, Alberto, et al. "What is Solvatochromism?" *The Journal of Physical Chemistry B* 114.51 (2010): 17128-35.
- [46] Hofstetter, Simmon, et al. "Use of the Fluorescent Probe LAURDAN to Label and Measure Inner Membrane Fluidity of Endospores of Clostridium Spp." *Journal of microbiological methods* 91.1 (2012): 93-100.
- [47] Brown, Z. D., et al. "A Main Group Isonitrile Complex Possessing a (N→Π*) Back-Bonding Interaction and its Conversion to a Hydride/Cyanide Product Via CH Bond Activation Under Mild Conditions." *Journal of the American Chemical Society* 134 (2012): 4045-8.

- [48] Allerhand, Adam, and Paul von Rague Schleyer. "Nitriles and Isonitriles as Proton Acceptors in Hydrogen Bonding: Correlation of ΔV_{OH} with Acceptor Structure." *Journal of the American Chemical Society* 85.7 (1963): 866-70.
- [49] Eagle, Cassandra T., et al. "II-Back-Bonding in Bis(Isonitrile) Complexes of Rhodium(II) Acetate: Structural Analogs for Rhodium Carbenoids." *Organometallics* 17.20 (1998): 4523-6
- [50] Singleton, Eric, and Hester E. Oosthuizen. "Metal Isocyanide Complexes." *Advances in organometallic chemistry* 22 (1983): 209-310.
- [51] Nenajdenko, Valentine. *Isocyanide Chemistry: Applications in Synthesis and Material Science*. John Wiley & Sons, 2012.
- [52] *Solvent Problems in Industry / Edited by George Kakabadse*. London: Elsevier Applied Science Publishers, 1984.
- [53] Fukuda, Ryoichi, et al. "Optical Absorption and Fluorescence of PRODAN in Solution: Quantum Chemical Study Based on the Symmetry-Adapted Cluster-Configuration Interaction Method." *Chemical Physics Letters* 552 (2012): 53-7
- [54] MASTERS, Barry R. "Selected Papers on Multiphoton Excitation Microscopy." *SPIE milestone series* 175 (2003)
- [55] Bakhshiev, N. G. "Universal Intermolecular Interactions and their Effect on the Position of the Electronic Spectra of Molecules in Two-Component Solutions. V. Dependence of the Spectra on the Electrical Properties, Dimensions, and Structure of the Molecules Under Stud." *Optics and Spectroscopy* 13 (1962): 24.
- [56] Nagy, Miklós, et al. "Solvatochromic Study of Highly Fluorescent Alkylated Isocyanonaphthalenes, their π -Stacking, Hydrogen-Bonding Complexation, and Quenching with Pyridine." *Chemphyschem* 15.16 (2014): 3614-25. *MEDLINE*.
- [57] Lippert, E. von. "Spektroskopische Bestimmung Des Dipolmomentes Aromatischer Verbindungen Im Ersten Angeregten Singulettzustand." *Zeitschrift für Elektrochemie, Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie* 61.8 (1957): 962-75.
- [58] Dr. Rác Dávid: Fényemittáló vegyületek előállítása és vizsgálata, Doktori (PhD) értekezés, Debreceni Egyetem Természettudományi Doktori Tanács Kémia Doktori Iskola, 2015, p.11-14
- [59] Catalán, Javier. "Toward a Generalized Treatment of the Solvent Effect Based on Four Empirical Scales: Dipolarity (SdP, a New Scale), Polarizability (SP), Acidity (SA), and Basicity (SB) of the Medium." *The Journal of Physical Chemistry B* 113.17 (2009): 5951-60.
- [60] <https://www.chroma.com/knowledge-resources/about-fluorescence/fluorescence-applications> (2021. július 15.)
- [61] Berney, Claude, and Gaudenz Danuser. "FRET Or no FRET: A Quantitative Comparison." *Biophysical journal* 84.6 (2003): 3992-4010.
- [62] Piston, David W., and Gert-Jan Kremers. "Fluorescent Protein FRET: The Good, the Bad and the Ugly." *Trends in biochemical sciences* 32.9 (2007): 407-14.
- [63] Jares-Erijman, Elizabeth A., and Thomas M. Jovin. "FRET Imaging." *Nature biotechnology* 21.11 (2003): 1387-95.

- [64] Roy, Rahul, Sungchul Hohng, and Taekjip Ha. "A Practical Guide to Single-Molecule FRET." *Nature methods* 5.6 (2008): 507-16.
- [65] Nguyen, Annalee W., and Patrick S. Daugherty. "Evolutionary Optimization of Fluorescent Proteins for Intracellular FRET." *Nature biotechnology* 23.3 (2005): 355-60.
- [66] Homocianu, Mihaela. "Solvent Effects on the Electronic Absorption and Fluorescence Spectra." *Journal of advanced research in physics* 2.1 (2011)
- [67] <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C92875&Mask=400>, megtekintve: 2021.07.30.
- [68] Strugger, Siegfried, and Paul Hilbrich. *Die Fluoreszenzmikroskopische Unterscheidung Lebender Und Toter Bakterienzellen Mit Hilfe Der Akridinorangegefärbung*. na, (1942).
- [69] Pierzyńska-Mach, Agnieszka, Paweł A. Janowski, and Jurek W. Dobrucki. "Evaluation of Acridine Orange, LysoTracker Red, and Quinacrine as Fluorescent Probes for Long-term Tracking of Acidic Vesicles." *Cytometry Part A* 85.8 (2014): 729-37.
- [70] Kapuscinski, Jan, and Zbigniew Darzynkiewicz. "Interactions of Acridine Orange with Double Stranded Nucleic Acids. Spectral and Affinity Studies." *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 5.1 (1987): 127-43.
- [71] Melamed, Myron R., et al. "Flow Cytometry and Sorting." *American Journal of Clinical Oncology* 14.1 (1991): 90.
- [72] Kusuzaki, Katsuyuki, et al. "Acridine Orange could be an Innovative Anticancer Agent Under Photon Energy." *in vivo* 21.2 (2007): 205-14.
- [73] Pitchaimani, Arunkumar, et al. "Photochemotherapeutic Effects of UV-C on Acridine Orange in Human Breast Cancer Cells: Potential Application in Anticancer Therapy." *RSC Advances* 4.42 (2014): 22123-8.
- [74] Han, Junyan, and Kevin Burgess. "Fluorescent Indicators for Intracellular pH." *Chemical reviews* 110.5 (2010): 2709-28.
- [75] Taylor, D. Lansing, and Yu-li Wang. *Fluorescence Microscopy of Living Cells in Culture, Part B: Quantitative Fluorescence Microscopy-Imaging and Spectroscopy*. Academic Press, (1989).
- [76] Rink, T. J., R. Y. Tsien, and T. Pozzan. "Cytoplasmic pH and Free Mg²⁺ in Lymphocytes." *The Journal of cell biology* 95.1 (1982): 189-96.
- [77] Ozkan, Pinar, and Raj Mutharasan. "A Rapid Method for Measuring Intracellular pH using BCECF-AM." *Biochimica et biophysica acta* 1572.1 (2002): 143-8. *PubMed*.
- [78] Boens, Noël, et al. "Photophysics of the Fluorescent pH Indicator BCECF." *The Journal of Physical Chemistry A* 110.30 (2006): 9334-43.
- [79] Haugland, Richard P., and James Whitaker. *Xanthene dyes having a fused (C) benzo ring*. United States patent US4945171 (1990).
- [80] Salerno, Michael, et al. "Characterization of Dual-Wavelength Seminaphthofluorescein and Seminaphthorhodafluor Dyes for pH Sensing Under High Hydrostatic Pressures." *Analytical Biochemistry* 362.2 (2007): 258-67.

- [81] Yogo, Takatoshi, et al. "Selective Photoinactivation of Protein Function through Environment-Sensitive Switching of Singlet Oxygen Generation by Photosensitizer." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105.1 (2008): 28-32.
- [82] Zhujun, Zhang, and W. Rudolf Seitz. "A Fluorescence Sensor for Quantifying pH in the Range from 6.5 to 8.5." *Analytica Chimica Acta* 160 (1984): 47-55.
- [83] Wolfbeis, Otto S., et al. "Fluorimetric Analysis." *Fresenius' Zeitschrift fuer Analytische Chemie* 314.2 (1983): 119-24.
- [84] Sharma, Vijay K., et al. "Excited State Characteristics of Acridine Dyes: Acriflavine and Acridine Orange." *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 59.8 (2003): 1799-804.
- [85] Giuliano, Kenneth A., and Robert J. Gillies. "Determination of Intracellular pH of BALBc-3T3 Cells using the Fluorescence of Pyranine." *Analytical Biochemistry* 167.2 (1987): 362-71.
- [86] Overly, C. C., et al. "Quantitative Measurement of Intraorganelle pH in the Endosomal-Lysosomal Pathway in Neurons by using Ratiometric Imaging with Pyranine." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92.8 (1995): 3156-60.
- [87] Tomita, Giiti. "Absorption and Fluorescence Properties of some Basic Dyes Complexing with Nucleosides Or Nucleic Acids." *Zeitschrift für Naturforschung B* 23.7 (1968): 922-5
- [88] Sarkar, Yeasmin, et al. "Detection of Curvature-Radius-Dependent Interfacial pH/Polarity for Amphiphilic Self-Assemblies: Positive Versus Negative Curvature." *Langmuir* 34.21 (2017): 6271-84
- [89] Nagy, Miklós, et al. "Solvatochromic Isocyanonaphthalene Dyes as Ligands for Silver(I) Complexes, their Applicability in Silver(I) Detection and Background Reduction in Biolabelling." *Sensors and Actuators B: Chemical* 255 (2018): 2555-67.
- [90] O'Connor, Nathan, and Randi B. Silver. "Ratio Imaging: Practical Considerations for Measuring Intracellular Ca² and pH in Living Cells." *Methods in cell biology* 81 (2007): 415-33
- [91] Maruyama, Kimio, et al. "Methyl Mercury Exposure at Niigata, Japan: Results of Neurological Examinations of 103 Adults." *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2012 (2012): 635075.
- [92] Schuster, Paul F., et al. "Permafrost Stores a Globally Significant Amount of Mercury." *Geophysical research letters* 45.3 (2018): 1463-71
- [93] Mu, Qin, et al. "Quantum Dots-Based Ratiometric Fluorescence Probe for Mercuric Ions in Biological Fluids." *Talanta* 119 (2014): 564-71. *PubMed*
- [94] Qu, Chaojie, et al. "Nitrogen and Sulfur Co-Doped Graphene Quantum Dots for the Highly Sensitive and Selective Detection of Mercury Ion in Living Cells." *Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy* 206 (2019): 588-96., *PubMed*
- [95] Roushani, Mahmoud, et al. *Dual Detection of Malation and Hg (II) by Fluorescence Switching of Graphene Quantum Dots*. Ed. the UN FAO of. Elsevier B.V, (2018). *AGRIS* 308-313.
- [96] Gao, Wenli, et al. "Ultrasensitive Determination of Mercury Ions (II) by Analysis of the Degree of Quantum Dots Aggregation." *Talanta* 188 (2018): 644-50.

- [97] Zhang, Pengcheng, et al. "Nanoparticle Stripe Sensor for Highly Sensitive and Selective Detection of Mercury Ions." *Biosensors and Bioelectronics* 117 (2018): 450-6.
- [98] Makam, Pandeewar, et al. "SERS and Fluorescence-Based Ultrasensitive Detection of Mercury in Water." *Biosensors and Bioelectronics* 100 (2018): 556-64.
- [99] Zohora, Nafisa, et al. "Rapid Colorimetric Detection of Mercury using Biosynthesized Gold Nanoparticles." *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 532 (2017): 451-7.
- [100] Satapathi, Soumitra, et al. "Highly Sensitive Detection and Removal of Mercury Ion using a Multimodal Nanosensor." *Nano-Structures & Nano-Objects* 16 (2018): 120-6.
- [101] Xia, Ni, et al. "The Detection of Mercury Ion using DNA as Sensors Based on Fluorescence Resonance Energy Transfer." *Talanta* 192 (2019): 500-7.
- [102] Ncube, Phendukani, Rui W. Krause, and Bhekie B. Mamba. "Fluorescent Sensing of Chlorophenols in Water using an Azo Dye Modified B-Cyclodextrin Polymer." *Sensors* 11.5 (2011): 4598-608.
- [103] Ou, Shengju, et al. "A Sugar-Quinoline Fluorescent Chemosensor for Selective Detection of Hg(II) Ion in Natural Water." *Chemical communications*.42 (2006): 4392-4..
- [104] Dong, Ming, Ya-Wen Wang, and Yu Peng. "Highly Selective Ratiometric Fluorescent Sensing for Hg²⁺ and Au³⁺, Respectively, in Aqueous Media." *Organic letters* 12.22 (2010): 5310-3.
- [105] Gu, Liang, et al. "A Novel Bifunctional Fluorescent and Colorimetric Probe for Detection of Mercury and Fluoride Ions." *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 207 (2019): 88-95.
- [106] Zhang, Xiulan, et al. "One-Pot Synthesis of a Natural Phenol Derived Fluorescence Sensor for Cu (II) and Hg (II) Detection." *Dyes and Pigments* 155 (2018): 100-6.
- [107] Mao, Yan, et al. "Highly Selective and Sensitive Detection of Hg (II) from HgCl₂ by a Simple Rhodamine-Based Fluorescent Sensor." *Journal of Fluorescence* 25.3 (2015): 755-61.
- [108] Zhang, Xicun, et al. "Isocyano-Functionalized, 1, 8-Naphthalimide-Based Chromophore as Efficient Ratiometric Fluorescence Probe for Hg²⁺ in Aqueous Medium." *Sensors and Actuators B: Chemical* 255 (2018): 3074-84.
- [109] Chakrabarty, Suravi, et al. "Catalytic Isonitrile Insertions and Condensations Initiated by RNC–X Complexation." *Advanced synthesis & catalysis* 356.10 (2014): 2135-96.
- [110] Nagy, Miklós, et al. "Novel Fluorochromes Label Tonoplast in Living Plant Cells and Reveal Changes in Vacuolar Organization After Treatment with Protein Phosphatase Inhibitors." *Protoplasma* 255.3 (2018): 829-39..
- [111] Nagy, Zsolt, et al. "MICAN, a New Fluorophore for Vital and Non-Vital Staining of Human Cells." *Toxicology in Vitro* 48 (2018): 137-45.
- [112] Nagy, Miklós, et al. "An Acrylated Isocyanonaphthalene Based Solvatochromic Click Reagent: Optical and Biolabeling Properties and Quantum Chemical Modeling." *Dyes and Pigments* 133 (2016): 445-57.

- [113] Zhao, Yan, and Donald G. Truhlar. "The M06 Suite of Density Functionals for Main Group Thermochemistry, Thermochemical Kinetics, Noncovalent Interactions, Excited States, and Transition Elements: Two New Functionals and Systematic Testing of Four M06-Class Functionals and 12 Other Functionals." *Theoretical Chemistry Accounts* 120.1 (2008): 215-41
- [114] Frisch, M.J.; Trucks, G.W.; Schlegel, H.B.; Scuseria, G.E.; Robb, M.A.; Cheeseman, J.R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Petersson, G.A.; Nakatsuji, H.; et al. Gaussian 09, Revision, E.01; Gaussian Inc.: Wallingford, CT, USA, 2016.
- [115] Miertuš, S., E. Scrocco, and J. Tomasi. "Electrostatic Interaction of a Solute with a Continuum. A Direct Utilizaion of AB Initio Molecular Potentials for the Prevision of Solvent Effects." *Chemical Physics* 55.1 (1981): 117-29.
- [116] Schäfer, Ansgar, Christian Huber, and Reinhart Ahlrichs. "Fully Optimized Contracted Gaussian Basis Sets of Triple Zeta Valence Quality for Atoms Li to Kr." *The Journal of chemical physics* 100.8 (1994): 5829-35.
- [117] Caricato, Marco, et al. "Formation and Relaxation of Excited States in Solution: A New Time Dependent Polarizable Continuum Model Based on Time Dependent Density Functional Theory." *The Journal of chemical physics* 124.12 (2006): 124520. *PubMed*.
- [118] Yanai, Takeshi, David P. Tew, and Nicholas C. Handy. "A New Hybrid Exchange–correlation Functional using the Coulomb-Attenuating Method (CAM-B3LYP)." *Chemical physics letters* 393.1 (2004): 51-7