



FLUORESZCENCIÁS JELZŐANYAGOK KÖLCSÖNHATÁSA
HIDROGÉNKÖTÉST LÉTESÍTŐ ANYAGOKKAL ÉS
MICELLÁKKAL

INTERACTION OF FLUORESCENT PROBES WITH MOLECULES
CAPABLE OF HYDROGEN BONDING AND MICELLES

Doktori (PhD) értekezés tézisei

PhD Thesis Abstract

Miskolczy Zsombor

Debreceni Egyetem
Természettudományi Doktori Tanács
Kémia Doktori Iskola
Debrecen, 2007

1. Bevezetés

Fluoreszcenciás jelzőanyagok egyszerűen alkalmazhatók, olcsók, nagy érzékenyséűek és sokrétű információt szolgáltatnak például alkalmasak a mikrokörnyezetükben végbemenő változások követésére. Alkalmazhatók biológiai, biokémiai kutatásokban, sejten belüli változások és molekulák kötődésének kimutatására, ionok, molekulák szelektív detektálására. A különféle felhasználási területeknek leginkább megfelelő jelzőanyagok kifejlesztése érdekében fontos feltárni, hogy a molekulaszervezet miként befolyásolja a fluoreszcenciás sajátságokat, valamint a gerjesztett molekulák energiavesztési folyamatait. Mivel a fluoreszcencia hullámhossz-eloszlása, élettartama, polarizációfoka erősen függ a mikrokörnyezettől is, így fluoreszkáló csoport beépítésével nemcsak a jelzett molekulák mennyisége határozható meg, hanem információt nyerhetünk a jelző szubsztituens körül kialakult lokális polaritásról, viszkozitásról és hidrogénhíd-kötő anyagok jelenlétéről is.

A fluoreszcenciás technikák fontosságát tükrözi, hogy az utóbbi években különösen gyorsan növekedett a publikációk száma ezen a területen.

2. Előzmények és célkitűzések

2.1 Ionfolyadékok

A levegőn stabil és nedvességre nem érzékeny ionfolyadékok felfedezése 1992-ben lehetőséget teremtett új, környezetbarát ipari

eljárások tervezésére. Az ionfolyadékok nagy előnye a hagyományos oldószerekkel szemben, hogy nem párolognak, nem éghetőek, még 300-400 °C körüli hőmérsékleten is használhatók.

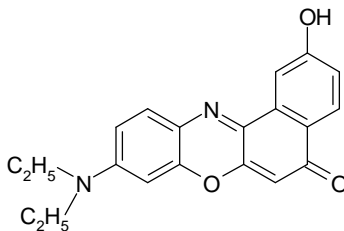
A világszerte tapasztalható intenzív kutatások ellenére, a szakirodalomban nem volt ismert, hogy az ionfolyadékok képeznek-e micellát vízben, illetve alkalmasak-e a hagyományos felületaktív anyagok tulajdonságainak módosítására. Így vizsgálataimmal ezeknek a kérdéseknek a megválaszolására összpontosítottam.

2.2 2-Hidroxid-nílusvörös (HONV)

A laboratóriumunkban végzett korábbi kutatások során a 2-hidroxid-nílusvörös festék igen érzékenynek bizonyult a mikrokörnyezet polaritására, vízben rosszul oldódik és fluoreszcencia kvantumhasznosítási tényezője is kicsi ebben az oldószerben. Ezek alapján úgy gondoltuk, hogy alkalmazható micellák Stern rétegében uralkodó lokális polaritás jellemzésére.

Másrésről a vegyületben jelenlevő hidroxid csoport alkalmas kötőhely lehet hidrogénhíd-akceptor vegyületek, mint például biológiai rendszerekben is előforduló szerves nitrogéntartalmú bázisok számára.

Részletes vizsgálatokat terveztünk annak a kérdésnek a megválaszolására, hogy a nitrogén-heterociklusos molekulákkal alkotott

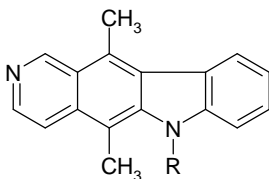


2-hidroxid-nílusvörös (HONV)

komplex fluoreszcenciás sajátságai függnék-e a hidrogénhíd-akceptor komponens báziserősségétől, valamint a mikrokörnyezet polaritásától.

2.3 Ellipticin (E), 6-metil-ellipticin (ME)

Számos ellipticin származék antitumor hatást mutat, mellrák, leukémia kezelésére ígéretesnek látszik. Enzimátikus folyamatok inhibitora, és különböző redox folyamatokban vehet részt. Nagy biológiai fontossága ellenére az irodalomban nagyon kevés eredményt közöltek az ellipticin fotofizikai tulajdonságairól.



R = H ellipticin (E)

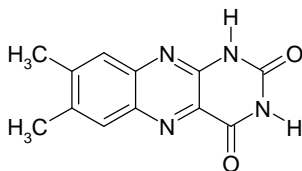
R = CH₃ 6-metil-ellipticin (ME)

A vegyület szerkezetéből adódóan kölcsönhatásba léphet H-híd akceptorral és H-híd donorral egyaránt. Tanulmányozni kívántam az ellipticin és anionok közötti kölcsönhatás fotofizikai következményeit, valamint azt a kérdést hogy mi okozza az ellipticin kettős fluoreszcenciáját metanolban.

2.4 Lumikróm (Lc)

Az alloxazin és izoalloxazin származékok számos biológiai és fotokémiai folyamatban vesznek részt. A riboflavin fotobomlásának és biodegradációjának a fő terméke a lumikróm, amelynek fotofizikai sajátságait széles körben tanulmányozták, mivel az alloxazin víz fotoindukált tautomerizációval izoalloxazin szerkezetűvé alakulhat. Ezt

a fajta tautomerizációt azonban csak tömény ecetsav illetve piridin jelenlétében figyelték meg és kizárólag gerjesztett állapotban.



lumikróm (Lc)

Munkám során olyan vegyületet kerestem, aminek már nyomnyi mennyisége is képes befolyásolni a tautomerizációt.

3. Vizsgálati módszerek és berendezések

Az elnyelési színeképeket Unicam UV 500 kétsugaras spektrofotométerrel vettem fel. A fluoreszcenciaspektrumokat egyfoton-számlálásos detektálást alkalmazó, Jobin Yvon Fluoromax-P nagyérzékenységű spektrofluoriméterrel rögzítettem.

A fluoreszcencia élettartamokat időfelbontott elsőfoton-számlálási technikával mértem. Gerjesztő fényforrásként a Picoquant által forgalmazott 400 nm és 632 nm hullámhosszú diódalézereket, valamint 340 nm hullámhosszú fényt kibocsátó diódát használtam. A lézerefény-impulzus félérték szélessége 80 ps volt. A minta által kibocsátott fluoreszcenciát a beeső fény irányára merőlegesen elhelyezett Oriel monokromátorhoz csatlakoztatott hűthető Hamamatsu fotoelektron-sokszorozó érzékelte. A keletkező jel egy erősítőn keresztül került a Picoquant Timeharp 100 egységbe. A számításokat a Picoquant

FluoFit programmal, nemlineáris legkisebb négyzetösszeg dekonvolúciós módszerrel végeztem.

Az elektromos vezetőképességet egy Consort C832-es műszerrel határoztam meg, melyet KCl oldattal kalibráltam.

4. Eredmények

4.1 Ionfolyadékok

- a) Kimutattam, hogy a 1-butil-3-metilimidazolium-oktil-szulfát ionfolyadék vízben micellát képez ($cmc = 0,031 \text{ mol dm}^{-3}$).
- b) Megállapítottam, ha az ionfolyadék kationja tartalmazza az n-oktil csoportot (1-oktil-3-metilimidazolium-klorid), akkor a vegyület vízdoldékonysága jelentősen lecsökken, 5 mmol dm^{-3} koncentrációnál az oldat zavarossá válik, ami arra utal, hogy nem micella, hanem nagyobb aggregátumok keletkeznek.
- c) Igazoltam, hogy már kis 1-oktil-3-metilimidazolium-klorid koncentrációjú oldatokban is beépül e vegyület a nátrium-dodecil-szulfát micellába, vagyis vegyes micella képződik.
- d) A 2-hidroxid-nílusvörös (HONV) kiváló jelzőanyagnak bizonyult micellák felületi rétegében végbemenő változások kimutatására is. Segítségével megállapítható nemcsak a kritikus micellakonzentráció, hanem a Stern réteg lokális polaritása is.

4.2 2-Hidroxid-nílusvörös kölcsönhatása szerves nitrogénvegyületekkel

- a) Megállapítottam, hogy a HONV fotofizikai paraméterei nagymértékben függenek a hidrogénhíd akceptor jellegű anyagok bázicitásától és az oldószer polaritásától.
- b) Fluoreszcencia intenzitás és élettartam mérések együttes kiértékelésével feltártam a HONV és szerves nitrogénvegyületek között lejátszódó folyamatok mechanizmusát, igazoltam, hogy hidrogénhíd-komplex mind alap, mind gerjesztett állapotban keletkezhet.
- c) Az oldószer polaritása jelentősen megváltoztatja a gerjesztett komplex élettartamát is, ami egyrészt a gyengén fluoreszkáló ionpár képződésével másrészt a belső konverzió felgyorsulásával magyarázható.
- d) A gerjesztett hidrogénhíd-komplex disszociációja csak apoláris oldószerben (pl. toluol) és gyenge bázis jelenlétében (TMPy) következik be, mivel a gerjesztett HONV és a gerjesztett komplex energiája között csak ekkor elég kicsi a különbség. Növelve az oldószer polaritását vagy a bázis erősséget az energiakülönbség nő, és a folyamat irreverzibilissé válik.
- e) A hidrogénhíd-komplex fluoreszcencia bimolekuláris kioltásának sebességi együtthatója a $\text{BuNH}_2 > \text{NMeIm} > \text{TMPy}$ sorban csökken és csak butil-kloridban illetve toluolban megy végbe ez a folyamat, ahol a gerjesztett komplex élettartama elég nagy.
- f) A gerjesztett hidrogénhíd-komplexen belüli protonátmenet jelentős szerepet játszik poláris oldószerekben, mint pl.

acetonitril és diklórmétán, hisz ilyen körülmények között az ionpár képződése kedvezményezett.

4.3 *Ellipticin és 6-metil-ellipticin*

- a) Feltártam az ellipticin kettős fluoreszcenciájának az okát metanolban. Bizonyítottam, hogy nem az irodalomban de Cabo és munkatársai által javasolt oldószer által elősegített tautomerizáció, hanem a piridin gyűrű N-jének a protonállódása okozza a nagyobb hullámhossznál megjelenő fluoreszcenciát.
- b) Kimutattam, hogy az ellipticin és fluorid közötti kölcsönhatás erőssége jelentősen csökken a mikrokozonyzet polarításával. Poláros közegben, mint például acetonitrilben a fluorid ion már alapállapotban deprotonálja az ellipticint.
- c) Kimutattam, hogy két fluoridionnal létrejövő kölcsönhatás hatékonyabban okoz deprotonálódást mint az egyik legerősebb szerves bázis a 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-én.

4.4 *Lumikróm*

- a) Igazoltam hogy a lumikróm acetonitrilben nyomnyi mennyiségű fluorid-, illetve acetátion hatására már alapállapotban tautomerizálódik.
- b) Feltártam a fluoridion hidratációjának hatását az alapállapotú tautomerizációra. Kimutattam, hogy a víz mennyiségének a növekedésével egyre több fluoridionra van szükség a

tautomerizáció előidézéséhez, $0 - 0,5 \text{ mol dm}^{-3}$ víz koncentráció tartományban kétlépcsős egyensúly van, míg $1 - 6 \text{ mol dm}^{-3}$ víz jelenlétében csak 1:1 komplexálódást tapasztaltam.

- c) Megállapítottam, hogy mind az ellipticin mind a lumikróm alkalmas a fluorid illetve acetát ion szelektív kimutatására, hisz sem az elnyelési, sem az emissziós színekben nem tapasztaltunk változást $0,1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ I}^-$, Cl^- , ClO_4^- -től.

Introduction

Fluorescent compounds are valuable probes in the study of both structural and functional aspects of biological systems.

As the spectrum, lifetime and anisotropy of fluorescence strongly depend upon intermolecular interactions, intrinsic fluorescence or fluorescent labeling provides information on the local surroundings of the fluorophore, conformational changes, binding of ligands or other association processes.

In order to develop the most suitable dye for different purpose, it is important to reveal how the molecular structure and microenvironment influence the fluorescence properties and the deactivation rate constants of the excited probe.

The rapidly increasing number of publication in this field proves the importance of fluorescence techniques.

Literature overview and research objectives

Ionic liquid

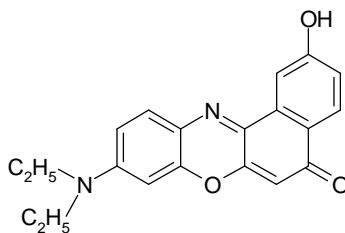
The air and moisture stable room temperature ionic liquids have currently received considerable attention as novel media for chemical synthesis, homogeneous catalysis and separation techniques. Their unique properties offer a great potential for industrial application as nonvolatile, nonflammable, environmentally benign alternatives to conventional organic solvents. In spite of the many publications dealing with ionic liquids, there was no systematic study in the literature on the

aggregation of ionic liquids in water. It was also unknown whether an ionic liquid could modify the characteristics of the micelles of conventional surfactants.

2-Hydroxy Nile Red (HONR)

A previous study has demonstrated that the photophysical properties of HONR fluorescent probe are very sensitive to the polarity of the microenvironment. This dye seemed to be an excellent probe for the study of ionic liquid micelles because of its low solubility and fluorescence quantum yield in water.

Because of the remarkable solvent effect on the photophysical properties of HONR, we studied whether this dye can be utilized for the characterization of the local polarity in micelles.



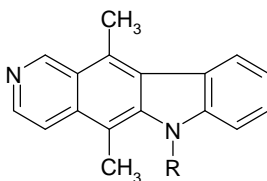
2-hydroxy Nile Red (HONR)

The phenolic OH group of the dye can provide a binding site for hydrogen-bond acceptors such as nitrogen heterocyclic compounds and amines. Before the utilization of HONR as fluorescent probe in biological systems, it is essential to know how the interaction with a base influences its fluorescence and the other excited state relaxation processes.

In this dissertation we reveal the effect of the basicity of the additives and solvent polarity on the kinetics and mechanism of the excited HONR quenching.

Ellipticine and 6-methyl-ellipticine

Ellipticine and its derivatives exhibit high cytotoxic activity against various tumor cells. Several ellipticine derivatives have reached the phase II of clinical trials. Despite the importance of ellipticine in the biomedical field no systematic studies have been performed to unravel the effect of hydrogen-bond acceptors on their photophysical properties. Hence, we studied the fluorescence properties of ellipticine in the presence of hydrogen-bond acceptors such as organic nitrogen compounds, fluoride and acetate anions.



R = H ellipticine (E)

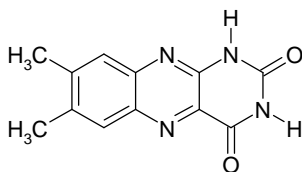
R = CH₃ 6-methyl-ellipticine (ME)

Olivacine, a compound differing from ellipticine only in the position of a methyl group emits dual fluorescence in methanol. This phenomenon was explained in the literature by a long distance, solvent-assisted excited-state proton transfer from the pyrrole to the pyridine moiety.

In this dissertation, we focus on the solvent effect on the photophysical properties of E and ME and unveil the origin of dual fluorescence and the kinetics of light initiated processes in methanol.

Lumichrome

The major product of riboflavin photodecomposition and biodegradation is lumichrome. The tautomerization of this probe was described in literature only in excited state in concentrated acetic acid and pyridine.



lumichrome (Lc)

The main goal of this part of the dissertation has been to find a compound, which could cause the tautomerization of lumichrome even in the ground state.

Experimental methods

The UV-visible absorption spectra were recorded with a Unicam UV 500 spectrophotometer. Corrected fluorescence spectra were obtained on a Jobin-Yvon Fluoromax-P spectrofluorometer. Fluorescence lifetimes were measured with a time-correlated single-photon counting technique. The light of a Picoquant diode laser (wavelength 400 nm or 632 nm), or a LED (330 nm) excited the samples

and the emission was collected at 90^0 angle through an Oriel 0.25 m monochromator located in front of a Hamamatsu R3809U-51 microchannel plate photomultiplier. The output signal was connected to a Picoquant Timeharp 100 computer board module (channel width 36 ps). The fluorescence decay traces were collected until 10^4 counts in the peak channel were reached. Data were analyzed by a nonlinear least-squares reconvolution method using Picoquant FluoFit software.

Electric conductivity was measured with a Consort C832 apparatus, which was calibrated with KCl solution.

Conclusions

Ionic liquid

- a) We have shown that 1-butyl-3-methylimidazolium octyl sulfate ionic liquid forms micelle above 0.031M concentration in aqueous solution.
- b) Markedly different behavior has been found when the cation of the ionic liquid contained n-octyl moiety. 1-methyl-3-octylimidazolium chloride produced inhomogeneous solution above 5mM concentration.
- c) Our results demonstrate that 1-methyl-3-octylimidazolium chloride begins to be incorporated into sodium dodecyl sulfate micelles at fairly low concentration. Thus, ionic liquids could be used to modify the properties of the conventional micelles.

- d) HONR dye proved to be a sensitive probe for the study of the ionic liquid aggregation and the subtle changes of the interfacial layer in aqueous solution.

2-Hydroxy Nile Red (HONR) interaction with organic nitrogen compounds

- a) The fluorescent properties of HONR proved to be highly sensitive to the basicity of hydrogen-bond acceptors and to solvent polarity.
- b) We revealed the detailed mechanism and the kinetics of the fluorescence quenching by organic nitrogen-compounds with the combined analysis of the steady-state and time-resolved spectroscopic data.
- c) The shortening of the fluorescence lifetime of the excited hydrogen-bonded complexes with increasing solvent polarity is due partly to the acceleration of the internal conversion and ion pair formation.
- d) The dissociation of the excited hydrogen-bonded complex into excited HONR and ground-state base was able to compete with the energy dissipation only when 2,4,6-trimethylpyridine was used as hydrogen-bond acceptor in toluene.
- e) The bimolecular quenching of the excited hydrogen-bonded complex played a significant role in apolar solvents.
- f) Photoinduced proton transfer is an important reaction in polar media such as acetonitrile and dichloromethane.

Ellipticine and 6-methyl-ellipticine

- a) The similar photophysical characteristics of E and ME in all solvents prove that long distance, solvent assisted excited-state proton transfer does not occur.
- b) Our results evidenced that the long-wavelength fluorescence in methanol is due to photoinduced protonation by the solvent.
- c) The interaction of ellipticine with fluoride proved to be very sensitive to the polarity of the microenvironment. In contrast with the behaviour in toluene and dichloromethane where ellipticine forms only 1:1 H-bonded complex with F^- , interaction of ellipticine with two fluoride ions caused deprotonation in acetonitrile even in ground state.
- d) We showed that the H-bonding with two fluoride anions has much higher deprotonation power than one of the strongest organic base DBU (1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene).

Lumichrome

- a) I established that lumichrome was able to tautomerize in the presence of a trace amount of fluoride or acetate ions even in the ground state in acetonitrile.
- b) Addition of water significantly influenced the reactivity of fluoride ion with lumichrome. The more water was in the solution, the more fluoride ion was needed to bring about tautomerization.

- c) Because fluoride and acetate ions have a large effect on both the absorption and fluorescence spectra of ellipticine and lumichrome in non-hydroxylic solvents, both of these heterocyclic compounds can be utilized as highly sensitive fluorescent probes.

Az értekezés alapját képző közlemények (Publications related to this dissertation):

- 1.** Zsombor Miskolczy, Krisztina Sebők-Nagy, László Biczók, Sinem Göktürk
„Aggregation and micelle formation of ionic liquids in aqueous solution”
Chemical Physics Letters **400**, 296 (2004)
- 2.** Krisztina Sebők-Nagy, Zsombor Miskolczy, László Biczók
„Interaction of 2-Hydroxy Substituted Nile Red Fluorescent Probe with Organic Nitrogen Compounds”
Photochemistry and Photobiology **81**, 1212 (2005)
- 3.** Zsombor Miskolczy, László Biczók
„Anion-induced changes in the absorption and fluorescence properties of lumichrome: A new off-the-shelf fluorescent probe”
Chemical Physics Letters **411**, 238 (2005)
- 4.** Zsombor Miskolczy, László Biczók
„Fluorescent Properties of Hydrogen-bonded Ellipticine: A Special Effect of Fluorid Anion”
J. Photochem. Photobiol. A, Chemistry **182**, 82 (2006)
- 5.** Zsombor Miskolczy, László Biczók, István Jablonkai

„Effect of Hydroxilic Compounds on the Photophysical Properties of Ellipticine and its 6-Methyl Derivative: The Origin of Dual Fluorescence”

Chemical Physics Letters **427**, 76 (2006)

További közlemények (Other publications):

6. Csaba Gábor Ágoston, Zsombor Miskolczy, Zoltán Nagy and Imre Sóvágó;

„The effect of ring size of fused chelates on the stability constants and spectroscopic properties of nickel (II) and palladium (II) complexes of peptides”

Polyhedron **22**, 2607 (2003)

7. Zsombor Miskolczy, József Nyitrai, László Biczók, Krisztina Sebők-Nagy, Tamás Körtvelyesi

„Photophysical Properties of Novel Cationic Naphthalimides”

J. Photochem. Photobiol. A, Chemistry **182**, 99 (2006)

8. Rozália Vanyúr, László Biczók, Zsombor Miskolczy

„Micelle formation of 1-alkyl-3-methylimidazolium bromide ionic liquids in aqueous solution”

Colloids and Surfaces A, Physicochemical and Engineering Aspects **299**, 256 (2007)

9. Zsombor Miskolczi, László Biczók, István Jablonkai
„Dual fluorescence of 1-hydroxy-substituted Nile Red dye: Excited-state
proton transfer along intramolecular hydrogen bond”
Chemical Physics Letters **440**, 92 (2007)

**Az értekezés anyagához kapcsolódó előadások és poszterek
(Lectures and posters related to this dissertation):**

1. Miskolczi Zsombor, Sebőkné Nagy Krisztina, Biczók László:
„Ionfolyadékok aggregációja és micellaképzése vízben”
VII. Doktori Kémiai Iskola, Tahi 2004.ápr.27-28
2. Sebőkné Nagy Krisztina, Miskolczi Zsombor, Biczók László:
„Benzo[a]fenoxazin-5-on vázú jelzőanyagok alkalmazása felületaktív
anyag oldatok vizsgálatára”
MTA Tudományos Napok, Budapest, 2004. jún. 2-3
3. K. Sebők-Nagy, Zs. Miskolczi, L. Biczók
„A new fluorescent probe for the study of microheterogenous systems”
MTA Kémiai Kutatóközpont Nemzetközi Tudományos Tanácsadó
Testületének tudományos ülése, Budapest, 2004. szept. 1-3
4. Miskolczi Zsombor, Sebőkné Nagy Krisztina, Biczók László:
„2-Hidroxid szubsztituált Nílus vörös fluoreszcenciás jelzőanyag
kölsönhatása szerves nitrogénvegyületekkel és micellákkal”
Munkabizottsági Ülés, Balatonalmádi, 2005. április 28-29

5. Miskolczy Zsombor, Biczók László

„Biológiai fontosságú vegyületek alkalmazása fluoreszcenciás jelzőanyagként”

Munkabizottsági Ülés, Gyöngyöstarján, 2005. október 20-21

6. Zsombor Miskolczy, László Biczók, Krisztina Sebők-Nagy (poszter)

„Interaction of 2-Hydroxy Substituted Nile Red Fluorescent Probe with Organic Nitrogen Compounds”

14th International Conference on Luminescence, Peking, Kína, 2005 július 25-29

7. Biczók László, Miskolczy Zsombor, Megyesi Mónika (poszter)

„Compounds of biological importance as fluorescent probes“

Central European Conference on Photochemistry, Bad Hofgastein, Austria, 2006. március 5-9

További előadások és poszterek (Other lectures and posters) :

8. Zsombor Miskolczy, Sándor Darabont (poszter)

„A $\text{La}_{2/3}\text{Ca}_{1/3}\text{Mn}_{1-x}\text{In}(\text{Al})_x\text{O}_{3\pm\delta}$ előállítás és jellemzése szerkezeti és mágneses szempontból“

VIII. Nemzetközi Vegyészkonferencia, Kolozsvár, Románia, 2002.nov.15-17

- 9.** Miskolczy Zsombor, Ágoston Csaba, Nagy Zoltán, Sóvágó Imre:
„Csatolt kelátgyűrűk hatása a peptidek Cu(II), Ni(II) és Pd(II)
komplexeinek termodinamikai stabilitására és spektrális paramétereire“
XXXVIII. Komplexkémiái Kollokvium, Gyula, 2003.május 21-23
- 10.** Zoltán Nagy, Anikó Magyarai, Zsombor Miskolczy and Imre
Sóvágó (poszter)
„Ternary complexes of palladium(II) with thioether and imidazole
ligands”
28th International Conference on Solution Chemistry, Debrecen, 2003.
aug.23-28
- 11.** Zoltán Nagy, Anikó Magyarai, Zsombor Miskolczy and Imre
Sóvágó (poszter)
„Complexation of monofunctional palladium(II) species with thioether
and imidazole ligands”
IX. International Symposium on Inorganic Biochemistry, Szklarska
Poreba, Poland, 2003.szept.4-7