

Т. А. Чейпеш, Н. О. Мчедлов-Петросян, Е. С. Загорулько,
Р. В. Родик, член-корреспондент НАН Украины В. И. Кальченко

Влияние наноразмерных агрегатов катионного каликс[6]арена на протолитические равновесия флуоресцеиновых красителей в водном растворе

*Обнаружено увеличение констант ионизации флуоресцеина и *n*-децилфлуоресцеина в присутствии агрегатов водорастворимого калликс[6]арена (СА6), содержащего четвертичные аммониевые группы. Этот факт, а также особенности изменения спектральных свойств красителей, связанных агрегатами, и сдвиг таутомерных равновесий флуоресцеина позволяют судить о сходстве и различии агрегатов СА6 и традиционных мицелл катионных поверхностно-активных веществ. Увеличение ионной силы приводит к уменьшению констант ионизации красителя вследствие экранирования поверхностного заряда агрегатов.*

Каликсарены, наряду с другими макроциклическими соединениями, привлекают внимание исследователей, прежде всего благодаря их способности селективно связывать различные молекулы и ионы [1]. Данные соединения легко модифицируемы и малотоксичны, что открывает широкие возможности использования их для управления биохимическими процессами. С этой точки зрения получение информации о состоянии каликсаренов в водных растворах, а также об особенностях их взаимодействия с различными молекулами и ионами становится первоочередной задачей.

Хорошо известна способность водорастворимых каликсаренов образовывать агрегаты в растворах. Этот процесс является, по-видимому, в значительной мере следствием гидрофобного взаимодействия и часто имеет пороговый характер, что позволяет провести определенную аналогию между агрегацией каликсаренов и мицеллообразованием с участием дифильных молекул поверхностно-активных веществ (ПАВ) [2–5].

Для того чтобы выяснить, насколько далеко простирается данная аналогия, мы исследовали влияние водорастворимых каликсаренов на спектры поглощения и протолитические равновесия ряда красителей. В настоящей работе в качестве представителя этой группы каликсаренов был выбран 5,11,17,23,29,35-гексаакис(*N,N*-диметил-*N*-гидроксиэтил-аммоний)-метилен-37,38,39,40,41,42-гексаметокси-каликс[6]арена гексахлорид (СА6), наиболее вероятная конформация которого в растворах представлена на схеме 1.

Ранее [3] нами было обнаружено, что это соединение в широком диапазоне концентраций в водных растворах образует полидисперсную систему со сравнительно большим размером частиц. Последние представляют собой вторичные агрегаты, для которых, согласно данным электронной микроскопии, не характерна кристаллическая структура (рис. 1) [3]. Также было проанализировано влияние агрегатов СА6 в водных растворах на показатель констант ионизации pK_a простых индикаторов зарядного типа $\pm/-$ и $-/=$, диссоциирующих по одной ступени. Как и большинство положительно заряженных коллоидных частиц, агрегаты СА6 сдвигают равновесие в более кислую область. Однако электрокинетический потенциал агрегатов заметно ниже, чем у мицелл катионных ПАВ, и составляет в чистой воде всего около +45 мВ (потенциал определяли в условиях, указанных на рис. 1). Вслед-

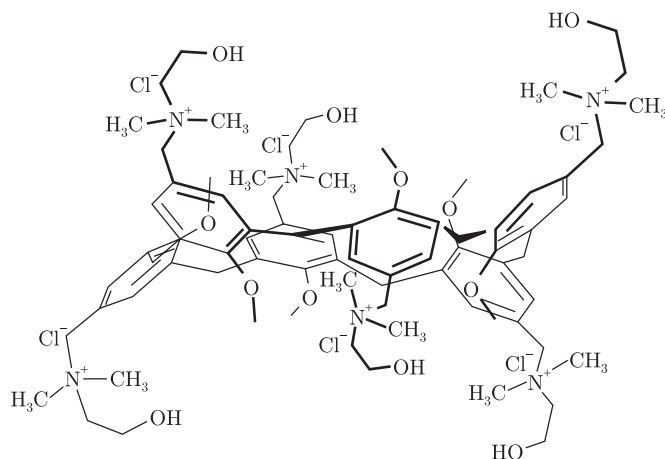


Схема 1

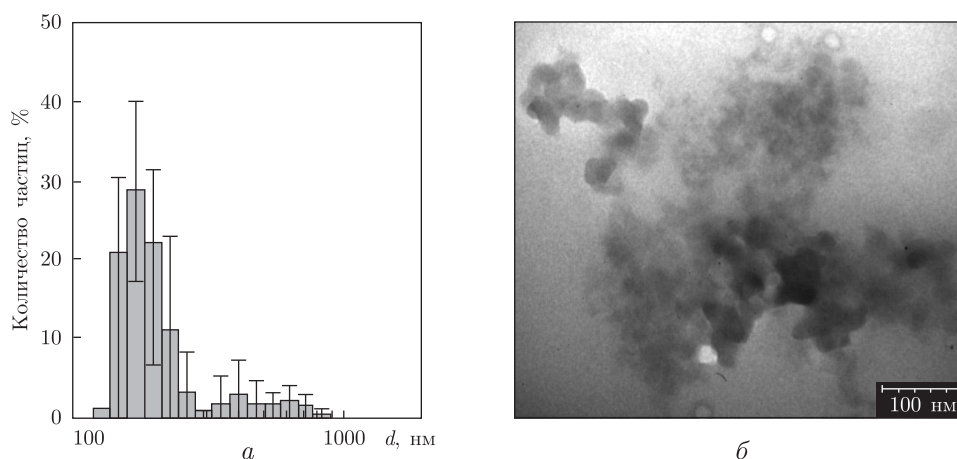


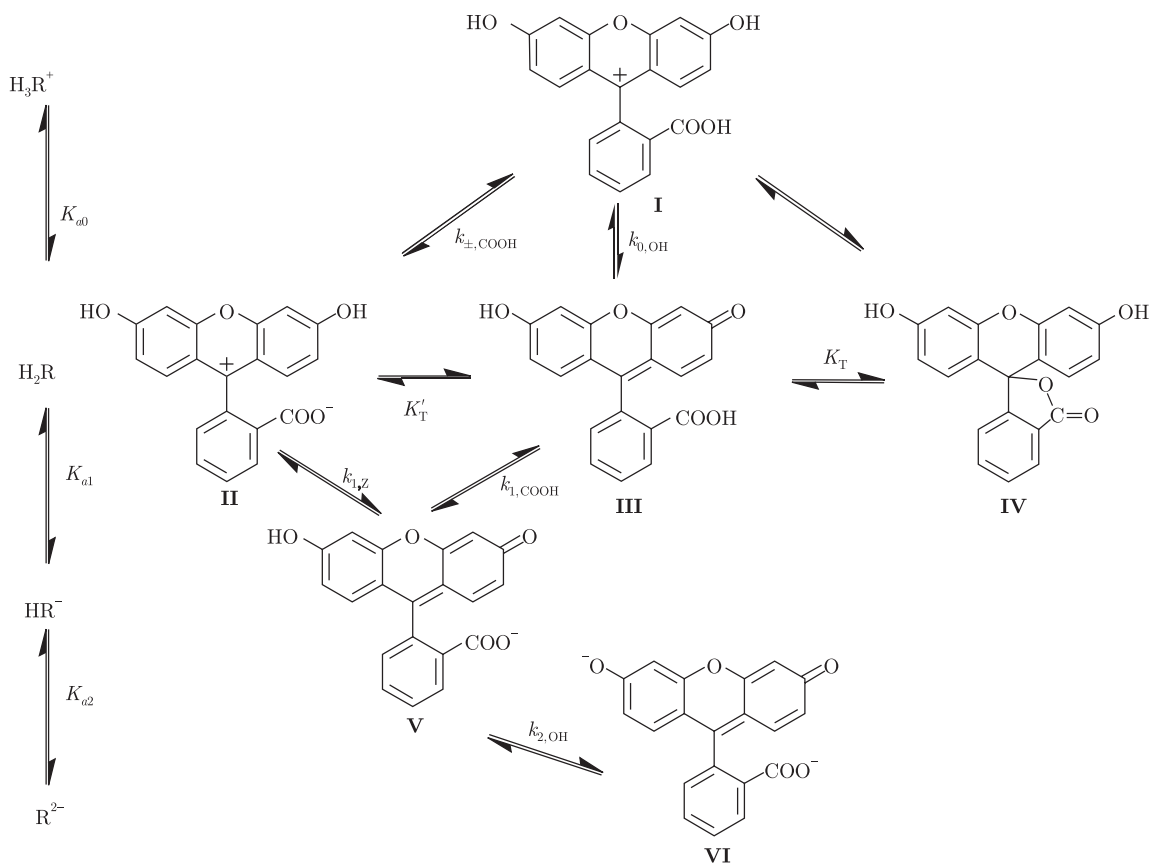
Рис. 1. Распределение количества частиц по размерам (а), согласно данным динамического светорассеяния, и электронная микрофотография (б) агрегатов СА6, соответствующие концентрации каликсарена в водном растворе $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л

ствии этого снижение значений pK_a в присутствии таких агрегатов меньше, чем в случае, например, мицелл катионного ПАВ цетилпиридиний хлорида (ЦПХ).

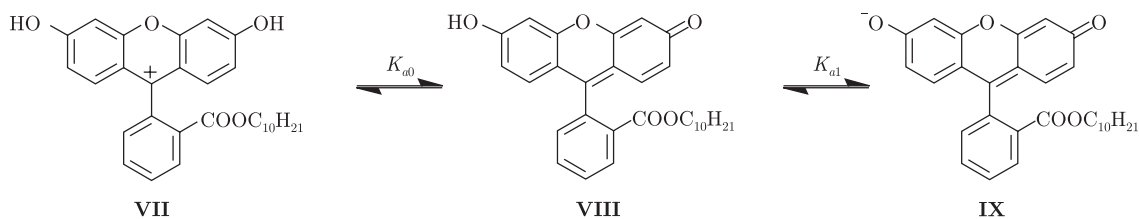
Для получения полной картины взаимодействия агрегат — краситель необходимо получить информацию о влиянии каликсарена на равновесия зондов с более сложной системой прототропных превращений. Для этой цели был выбран флуоресцеин, нейтральная форма которого существует в растворах в виде смеси трех таутомеров. Данный краситель ионизируется в растворах в три ступени (схема 2).

Некоторые ионные формы изучаемого красителя могут лишь частично связываться агрегатами СА6, и в данном случае параметры таутомерных превращений будут не вполне отражать свойства микроокружения зонда. Такая неопределенность может быть преодолена, если использовать гидрофобный аналог — *n*-децилфлуоресцеин (схема 3).

Указанный краситель практически нерастворим в воде, растворимость его в изучаемых системах обеспечивается исключительно солубилизацией агрегатами каликсарена, что позволяет определить константы ионизации в условиях полного связывания.



Экспериментальная часть. Для приготовления исходных растворов флуоресцеин растворяли в водном растворе разбавленной щелочи, а навеску децилфлуоресцеина смешивали с соответствующим количеством каликсарена и разбавляли водой; полученная система была устойчива к осаждению в широком интервале pH. Во избежание гидролиза сложноэфирной группы растворы с pH >9 в этом случае не применяли. В рабочих растворах использовали спектрофотометрические концентрации красителей: $(0,5-1) \cdot 10^{-5}$ моль/л. Ионная сила поддерживалась постоянной (0,05 или 0,5 моль/л, NaCl + компоненты буферных растворов). Концентрация СА6 во всех исследуемых системах составляла $3 \cdot 10^{-3}$ моль/л. Равновесие устанавливалось при термостатировании (25 °С).



Поглощение света измерено на спектрофотометре СФ-46. Значения pH растворов определяли компенсационным методом в цепи с переносом со стеклянным электродом ЭСЛ-63-

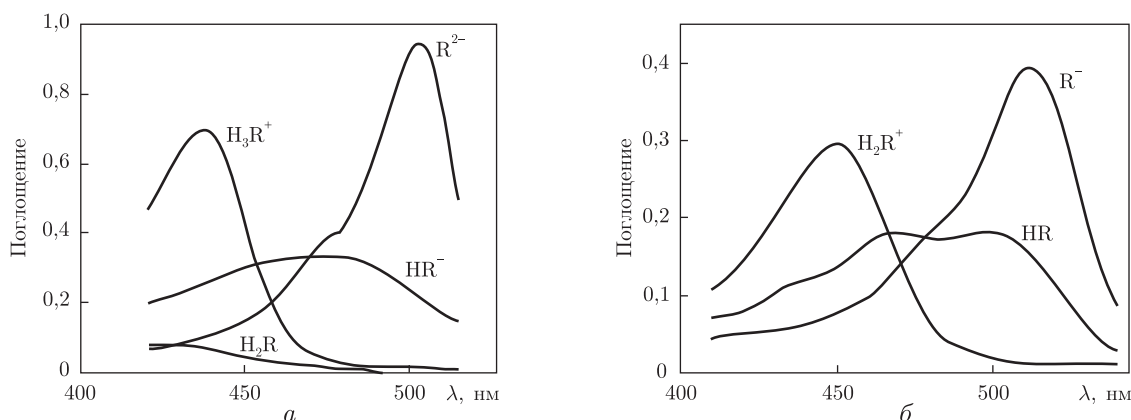


Рис. 2. Спектры поглощения индивидуальных ионных форм флуоресцеина (а) и децилфлуоресцеина (б) в присутствии агрегатов СА6 при $I = 0,05$ моль/л

07 при помощи потенциометра постоянного тока Р 37-1, в качестве нуль-инструмента использовали рН-метр милливольтметр рН 121. Калибровку проводили по стандартным буферным растворам с рН 9,18, 6,86, 4,01 и 1,68.

Показатели “кажущихся” констант ионизации красителей pK_a^a в присутствии агрегатов определяются следующим соотношением:

$$pK_{ai}^a = pH + \log \frac{[H_{(n-i+1)}R^{-i+1}]_t}{[H_{(n-i)}R^{-i}]_t}, \quad (1)$$

где в квадратных скобках — концентрации сопряженных форм красителя на литр всего раствора; n — параметр, равный 2 (для флуоресцеина) или 1 (для децилфлуоресцеина); показатель рН характеризует кислотность объемной фазы. Значения pK_a^a рассчитывали с использованием программы CLINP [6] совместно с коэффициентами молярного поглощения индивидуальных форм красителей в диапазоне наиболее информативных длин волн ($\lambda = 420\text{--}520$ нм). Исходными данными служили спектры равновесных смесей ионных и молекулярных форм (от 9 до 20 растворов с различными значениями рН). Спектры крайних щелочных и кислых форм получали непосредственным измерением (рис. 2).

Изменение значений pK_a^a в условиях полного связывания псевдофазой pK_a^{ac} по сравнению с показателями термодинамических констант в воде pK_a^w зависит от значения электрического потенциала в области локализации красителя Ψ и отношения коэффициентов активности переноса соответствующих форм из воды в псевдофазу агрегата и может быть выражено следующим соотношением:

$$\Delta pK_{ai}^{ac} = pK_{ai}^{ac} - pK_{ai}^w = \log \frac{\gamma_{H_{(n-i)}R^{-i}}}{\gamma_{H_{(n-i+1)}R^{-i+1}}} - \frac{\Psi F}{2,3RT}. \quad (2)$$

При этом предполагается, что отношение концентрационных коэффициентов активности сопряженных форм красителя в псевдофазе агрегата близко к единице. Такое допущение резонно, если учесть значительную концентрацию электролита в области, где, согласно общепринятым представлениям, локализованы зонды [7, 8].

В отличие от децилфлуоресцеина, для которого все значения pK_a^a определены при полном связывании красителя, некоторые формы флуоресцеина могут частично или полностью

находиться в водной фазе. Так, для формы H_3R^+ следует принять во внимание электростатическое отталкивание положительно заряженными ионными группами каликсарена.

Подтверждение этого предположения можно найти при сравнении положения полос поглощения соответствующих индивидуальных форм в воде и в присутствии агрегатов СА6 и мицелл ЦПХ (табл. 1).

Связывание как отрицательно заряженных форм флуоресцеиновых красителей, так и катиона децилфлуоресцеина приводит к батохромному сдвигу длинноволновых полос поглощения, величина которого составляет 12–26 нм. Из этого следует, что катион флуоресцеина, положение полосы поглощения которого оказалось нечувствительным к наличию СА6 в растворе, находится преимущественно в несвязанном состоянии. Полоса поглощения нейтральной молекулы флуоресцеина размыта, интенсивность ее мала, а форма сильно зависит от микроокружения. Дополнительно была исследована зависимость спектров поглощения растворов флуоресцеина в области преобладания нейтральной формы (рН 3,3) от концентрации СА6. В диапазоне $(1-5) \cdot 10^{-4}$ моль/л спектры поглощения при этих условиях мало отличаются от спектров, измеренных в отсутствие каликсарена: отчетливо проявляется поглощение цвиттер-ионной частицы **II** ($\lambda_{\text{max}} = 438$ нм). С увеличением концентрации до $5 \cdot 10^{-3}$ моль/л содержание цвиттер-иона, судя по спектрам, уменьшается, что, как известно [9, 10], свидетельствует об “обезвоживании” микроокружения красителя.

Как видно из уравнения (2), положительный заряд агрегатов СА6 понижает pK_a^a связанных красителей, тогда как стабилизация какой-либо из сопряженных форм в псевдофазе агрегатов может приводить как к повышению, так и снижению констант ионизации. Действительно, менее отрицательное значение ΔpK_{a1}^a флуоресцеина относительно ΔpK_{a2}^a можно объяснить тем, что в агрегатах СА6, по аналогии с мицеллами катионных ПАВ и неводными растворителями, нейтральная форма претерпевает сдвиг таутомерного равновесия [7]. Это приводит к увеличению значения pK_{a1}^a и дополнительному снижению pK_{a0}^a . Следовательно, влияние электростатического потенциала на значение K_{a1}^a частично компенсируется. Катионная форма **I** флуоресцеина практически не связана с псевдофазой, поэтому уменьшение pK_{a0}^a не описывается уравнением (2) и обусловлено в первую очередь стабилизацией формы H_2R .

Количественно эти закономерности выражаются через коэффициенты активности переноса отдельных таутомеров и их доли α_i от общей концентрации нейтральной формы H_2R :

$$\Delta pK_{a1}^{ac} = \log \frac{\gamma_{\text{V}}}{\gamma_{\text{III}}} - \Delta \log \alpha_{\text{III}} - \frac{\Psi F}{2,3RT}, \quad (3)$$

$$\Delta pK_{a0}^a = \log \gamma_{\text{III}} + \Delta \log \alpha_{\text{III}}. \quad (4)$$

Значения α_i можно оценить, исходя из допущения о тождественности спектров поглощения таутомеров с одинаковым строением ксантеновой части (**I** и **II**, **III** и **V**), а также о бесцветности лактонной структуры **IV**. Полученные значения составляют $\alpha_{\text{II}} = 0,11$, $\alpha_{\text{III}} = 0,01$ и $\alpha_{\text{IV}} = 0,88$.

Как и в случае мицелл катионных ПАВ, наличие агрегатов СА6 дестабилизирует хиноидную форму **III** флуоресцеина, в то время как доля лактонной формы увеличивается (в воде $\alpha_{\text{IV}} = 0,671$). Однако этот эффект все же меньше, чем в мицеллярных растворах ЦПХ [10]. Показатели микроконстант флуоресцеина в агрегатах СА6 уменьшаются по сравнению с водной средой: $\Delta pK_{1,\text{COOH}} = -1,39$, $\Delta pK_{2,\text{OH}} = -0,95$, $\Delta pK_{0,\text{OH}} = 0,65$. При этом последняя величина описывает равновесие в условиях неполного связывания краси-

Таблица 1. Константы диссоциации и положение максимумов спектров поглощения флуоресцеина и децилфлуоресцеина в воде в присутствии мицелл ЦПХ ($c = 1 \cdot 10^{-3}$ моль/л) и агрегатов СА6 ($c = 3 \cdot 10^{-3}$ моль/л)

Краситель	Среда	I^* , моль/л (NaCl)	pK_{a0}^a	pK_{a1}^a	pK_{a2}^a	λ_{\max} , нм			
						H_3R^+	H_2R	HR^-	R^{2-}
Флуоресцеин	Вода [7]	$I \rightarrow 0$	2,14	4,45	6,80	437	437, 470–475	454–474	490,5
То же	СА6	0,05	$1,96 \pm 0,10$	$4,17 \pm 0,11$	$5,93 \pm 0,12$	438	440	480	503
”	ЦПХ 20 °С [7]	0,05 (KCl)	$0,98 \pm 0,06$	$3,60 \pm 0,05$	$5,54 \pm 0,11$	438	435, 460, 490	460, 490	504,5
						H_2R^+	H_2R	HR	R^-
Децилфлуоресцеин	Вода** [8]	$I \rightarrow 0$	2,94	6,31	—	437	—	—	490
То же	СА6	0,05	$0,94 \pm 0,09$	$5,65 \pm 0,07$	—	449	—	470; 495–500	513
”	СА6	0,5	$1,24 \pm 0,03$	$6,20 \pm 0,06$	—	449	—	470; 495–500	513
”	ЦПХ [9]	0,05	$0,79 \pm 0,1$	$4,92 \pm 0,07$	—	447	—	455, 485	513
”	ЦПХ [8]	0,4	$1,32 \pm 0,01$	$5,52 \pm 0,02$	—	449	—	455, 485	516

*Ионная сила создавалась добавками NaCl, за исключением системы ЦПХ–KCl; ** в качестве модельного соединения в воде, по причине низкой растворимости красителя, использовали менее гидрофобный этилфлуоресцеин.

теля агрегатами. Полученные значения совпадают по знаку с соответствующими эффектами среды мицеллярных растворов катионных ПАВ, но значительно меньше по абсолютной величине. Соотношение $\Delta p k_{1,COOH} > \Delta p k_{2,OH}$ отражает известный эффект влияния природы ионизирующейся группы на изменение силы кислот при переходе от воды к неводным средам [7, 9, 10].

Ионизация гидроксильной группы моноаниона (HR^-) флуоресцеина характеризуется значением $p k_{2,OH} = p K_{a2}^a$ и соответствует значению $p K_{a1}^a$ децилфлуоресцеина, причем наличие дополнительного заряда затрудняет ионизацию, поэтому значение $p K_{a2}^a$ флуоресцеина выше, чем $p K_{a1}^a$ децилфлуоресцеина. Разность зависит от эффективной диэлектрической проницаемости ϵ_{eff} и расстояния между заряженной и диссоциирующей группами r , в соответствии с теорией Бьеррума-Кирквуда-Вестхаймера [11]:

$$\delta p K_a = \frac{e^2 N_A}{2,303RT \cdot 4\pi \cdot 8,854 \cdot 10^{-12}} \cdot \frac{1}{\epsilon_{eff} r}. \quad (5)$$

В растворе СА6 значение $\delta p K_a$ меньше, чем $\delta p K_a^w$ (0,28 и 0,49 соответственно). Такая тенденция противоположна закономерности в мицеллярных растворах ЦПХ, где значение $\delta p K_a$ равно 0,62. Возможно, это является следствием более выраженной гидратированности микроокружения красителей-зондов или/и характера их локализации вблизи заряженных групп в агрегатах СА6.

Значение $p k_{0,OH}$ соответствует равновесию $I \rightleftharpoons III$ и в присутствии агрегатов СА6 равно 3,74. Эта величина приближается к $p k_{0,OH}^w$ (3,1), в отличие от аналогичного значения $p K_{a0}^a$ децилфлуоресцеина (0,94), что обусловлено отсутствием связывания катиона флуоресцеина.

Увеличение ионной силы приводит к экранированию поверхностного заряда агрегатов и к снижению Ψ и, как результат, значения $p K_{ai}^{ac}$ уменьшаются (см. табл. 1). Эта тенденция является общей для всех катионных агрегатов и отчетливо выражена для мицелл ПАВ [8]. Количественно интерпретировать такой эффект удастся не всегда, так как следует принимать во внимание возможные структурные трансформации агрегатов при добавлении электролита. Однако это явление позволяет сделать важное заключение о том, что заряженные группы СА6 локализируются преимущественно на поверхности агрегата, хотя, судя по величинам электрокинетического потенциала, поверхностный заряд значительно меньше, чем в катионных мицеллах.

Таким образом, свойства микроокружения флуоресцеиновых красителей, связанных агрегатами СА6 в условиях эксперимента, сходны с микроокружением мицелл катионных ПАВ. Однако изменение констант ионизации и таутомеризации в исследуемой системе меньше по абсолютной величине, что позволяет предложить рыхлую структуру агрегата и значительную гидратацию в области локализации красителей.

Авторы выражают благодарность канд. хим. наук Л. В. Кутузовой за выполнение измерения электрокинетического потенциала и распределения частиц по размерам, а также канд. физ.-мат. наук А. П. Крышталю за проведение электронно-микроскопических исследований.

1. Rodik R. V., Boyko V. I., Kalchenko V. I. Calixarenes in bio-medical researches // Current Medicinal Chem. – 2009. – **16** (13). – P. 1630–1655.
2. Becherer M., Schade B., Böttcher C., Hirsch A. Supramolecular assembly of self-labeled amphicalixarenes // Chem. Eur. J. – 2009. – **15**. – P. 1637–1648.
3. Mchedlov-Petrossyan N. O., Vodolazkaya N. A., Rodik R. V. et al. Colloidal Nature of Cationic Calix[6]arene Aqueous Solutions // J. Phys. Chem. C. – 2012. – **116**. – P. 10245–10259.

4. Lee M., Lee S. J., Jiang L. H. Stimuli-responsive supramolecular nanocapsules from amphiphilic calixarene assembly // J. Am. Chem. Soc. – 2004. – **126**. – P. 12724–12725.
5. Arimori S., Nagasaki T., Shinkai S. Self-assembly of tetracationic amphiphiles bearing a calyx[6]arene core. Correlation between the core structure and the aggregation properties // J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2. – 1995. – P. 679–683.
6. <http://www-chemo.univer.kharkov.ua/kholin/clinp.html>.
7. Мчедлов-Петросян Н. О., Клещевникова В. Н. Влияние катионного поверхностно-активного вещества на протолитические свойства некоторых трифенилметановых красителей // Журн. общ. химии. – 1990. – **60**. – С. 900–910.
8. Mchedlov-Petrossyan N. O. Protolytic equilibrium in lyophilic nano-sized dispersions: Differentiating influence of the pseudophase and salt effects // Pure Appl. Chem. – 2008. – **80**, No 7. – P. 1459–1510.
9. Mchedlov-Petrossyan N. O., Salinas Mayorga R. Extraordinary character of the solvent influence on protolytic equilibria: inversion of the fluorescein ionization constants in H₂O-DMSO mixtures // J. Chem. Soc., Faraday Transactions. – 1992. – **88**, No 20. – P. 3025–3032.
10. Mchedlov-Petrossyan N. O., Kleshchevnikova V. N. Influence of the cetyltrimethylammonium chloride micellar pseudophase on the protolytic equilibria of oxuxanthene dyes at high bulk phase ionic strength // Ibid. – 1994. – **90**, No 4. – P. 629–640.
11. Верещакгин А. Н. Индуктивный эффект. – Москва: Наука, 1987. – 325 с.

Институт органической химии НАН Украины, Киев
Харьковский национальный университет
им. В. Н. Каразина

Поступило в редакцию 22.05.2013

Т. О. Чейпеш, М. О. Мчедлов-Петросян, О. С. Загорулько, Р. В. Родік,
член-корреспондент НАН України **В. І. Кальченко**

Вплив нанорозмірних агрегатів катіонного калікс[6]арену на протолітичні рівноваги флуоресцеїнових барвників у водному розчині

Виявлено збільшення констант іонізації флуоресцеїну та n-децилфлуоресцеїну в присутності агрегатів водорозчинного калікс[6]арену (СА6), що містить четвертинні амонієві групи. Цей факт, а також особливості зміни спектральних властивостей барвників, зв'язаних агрегатами, і зсув таутомерних рівноваг флуоресцеїну дозволяють судити про подібність та відмінність агрегатів СА6 і традиційних міцел катіонних поверхнево-активних речовин. Збільшення іонної сили приводить до зменшення констант іонізації барвника внаслідок екранування поверхневого заряду агрегатів.

T. A. Cheipesh, N. O. Mchedlov-Petrossyan, E. S. Zagorulko, R. V. Rodik,
Corresponding Member of the NAS of Ukraine **V. I. Kalchenko**

Influence of nano-sized cationic calix[6]arene aggregates on protolytic equilibria of fluorescein dyes in aqueous solutions

The increase in the ionization constants of fluorescein and n-decylfluorescein in the presence of water-soluble calix[6]arene aggregates, bearing quaternary ammonium groups, is revealed. This finding, as well as the peculiarities of the alteration of the dyes spectra and the shift of the tautomeric equilibria of fluorescein caused by the binding by aggregates, allows us to conclude about the similarity and the difference between calix[6]arene aggregates and common micelles of cationic surfactants. Increase in the ionic strength results in a decrease in the ionization constants due to the screening of the interfacial charge of aggregates.