



UNIWERSYTET
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU
Wydział Chemii

Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
Wydział Chemii

Patryk Rybczyński
Nauki Chemiczne

Praca doktorska

**Projektowanie, synteza i charakterystyka fluoroforów
zawierających grupę BF_2**

Promotor:
prof. dr hab. inż. Borys Ośmiałowski

Promotor pomocniczy:
dr hab. Anna Kaczmarek-Kędziera, prof. UMK

Toruń, 2024

Składam serdeczne podziękowania:

Panu prof. dr hab. inż. Borysowi Ośmiałowskiemu

za wskazanie tematu badań,
ciągłe wsparcie merytoryczne,
cierpliwość i wyrozumiałość

Pani dr hab. Annie Kaczmarek-Kędzierze, prof. UMK

za ciągłe wsparcie,
wskazywanie ścieżek doskonalenia naukowego,
pomoc i otwartość

**Pani dr hab. inż. Joannie Olesiak-Bańskiej, prof. PWr
Pani mgr Agacie Hajdzie i Pani mgr Manueli Grelich-Musze**

z Wydziału Chemii Politechniki Wrocławskiej,
za przeprowadzenie badań właściwości dwufotonowych badanych związków,
i wykorzystania ich do oznaczania amyloidów

Panu Prof. Denisowi Jacqueminowi oraz Pani dr Manon Bousquet

z Uniwersytetu w Nantes (Francja),
za teoretyczny opis przemian fotofizycznych badanych związków

Pracownikom, doktorantom i studentom

Wydziału Chemii UMK,
za miłą i przyjazną atmosferę

Narzeczonej i Rodzicom

za nieustające wsparcie

Spis treści

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | Wprowadzenie | 1 |
| 2 | Mechanizmy dezaktywacji stanu wzbudzonego | 3 |
| 2.1 | Przejścia promieniste | 3 |
| 2.1.1 | Diagram Jabłońskiego | 3 |
| 2.1.2 | Fluorescencja | 5 |
| 2.1.3 | Fosforescencja | 6 |
| 2.1.4 | Termicznie aktywowana opóźniona fluorescencja | 7 |
| 2.2 | Przejścia bezpromieniste | 7 |
| 2.2.1 | Konwersja wewnętrzna | 8 |
| 2.2.2 | Przejścia międzysystemowe | 9 |
| 2.3 | Czas życia i wydajność kwantowa fluorescencji | 10 |
| 2.4 | Rola otoczenia cząsteczki wzbudzonej | 11 |
| 2.4.1 | Efekt solwatochromowy | 12 |
| 2.4.2 | Oddziaływania międzycząsteczkowe | 13 |
| 2.4.3 | Agregacja | 13 |
| 3 | Struktury wybranych barwników fluorescencyjnych i strategie ich projektowania | 17 |
| 3.1 | Barwniki fluorescencyjne - budowa i właściwości | 17 |
| 3.1.1 | Fluorofory z wewnątrzcząsteczkowym przeniesieniem ładunku | 19 |
| 3.2 | Strategie projektowania fluoroforów | 21 |
| 3.2.1 | Benzoannulacja | 22 |
| 3.2.2 | Mostek π -elektronowy | 24 |
| 3.2.3 | Rola podstawnika | 26 |
| 4 | Cel i metodologia badań | 29 |
| 4.1 | Cel pracy | 29 |
| 4.2 | Metodologia | 30 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 4.2.1 | Synteza i charakterystyka związków | 30 |
| 4.2.2 | Pomiary absorpcji i fluorescencji | 32 |
| 4.2.3 | Agregacja | 32 |
| 5 | Wpływ topologii cząsteczki i charakteru podstawników na właściwości fotofizyczne | 35 |
| 5.1 | Seria związków OMeBtR' | 35 |
| 5.2 | Seria związków CF ₃ BtR' | 39 |
| 5.3 | Jednoczesny efekt dwóch podstawników | 43 |
| 5.4 | Wpływ lepkości na właściwości fotofizyczne wybranych barwników . | 48 |
| 5.5 | Wpływ charakteru podstawników na właściwości agregacyjne | 52 |
| 6 | Wpływ struktury silnego donora elektronów na właściwości fotofizyczne | 59 |
| 6.1 | Seria związków z silnym donorem elektronów | 59 |
| 6.2 | Wpływ polarności rozpuszczalnika na właściwości fotofizyczne związków z silnym donorem elektronów | 65 |
| 6.3 | Agregacja cząsteczek z wewnątrzcząsteczkowym przeniesieniem ładunku | 70 |
| 7 | Podsumowanie i wnioski | 75 |
| | Dodatki | 79 |
| A | Katalog związków | 81 |
| B | Lista publikacji | 91 |
| | Bibliografia | 93 |

Spis rysunków

| | | |
|-----|---|----|
| 2.1 | Diagram Jabłońskiego | 4 |
| 2.2 | Schemat przejść między poziomami wibracyjnymi stanu podstawowego S_0 i wzbudzonego S_1 oraz odpowiednie widma absorpcji i fluorescencji | 6 |
| 2.3 | Fragment diagramu Jabłońskiego z zaznaczonymi możliwymi przejściami między stanami S_1 i T_1 | 6 |
| 2.4 | Uproszczony przebieg powierzchni energii potencjalnej dla cząsteczek posiadających tę samą lub różną geometrię stanu podstawowego i wzbudzonego | 9 |
| 2.5 | Schemat procesów zachodzących po wzbudzeniu cząsteczki | 10 |
| 2.6 | Relaksacja otoczki solwatacyjnej wokół fluoroforu o momencie dipolowym rosnącym podczas wzbudzenia | 12 |
| 2.7 | Poziomy energetyczne dimerów w zależności od wzajemnego ułożenia cząsteczek | 14 |
| 3.1 | Wybrane rdzenie fluorescencyjne do zastosowań w bioobrazowaniu | 18 |
| 3.2 | Schemat Jabłońskiego dla barwników TICT ze wskazaniem możliwych przejść promienistych oraz wizualizacja widm emisyjnych DMABN w zależności od rozpuszczalnika | 20 |
| 3.3 | Przykład fluoroforów typu BODIPY z dodatkowymi, sprzężonymi, pierścieniami | 22 |
| 3.4 | Difluorobory z rdzeniem fluorescencyjnym opartym na tiazolu i benzo-tiazolu | 23 |
| 3.5 | Przykłady benzoannulacji w difluoroborach | 24 |
| 3.6 | Barwniki cyjaninowe o różnej długości mostka π -elektronowego w strukturze | 24 |
| 3.7 | Tioflawina T i jej pochodne z różną liczbą grup metinowych | 25 |
| 3.8 | Difluorobory z mostkami π -elektronowymi o różnej długości | 26 |

| | | |
|------|---|----|
| 3.9 | Zależność wydajności kwantowej fluorescencji barwników o różnych podstawnikach w pierścieniu fenyłowym od stałej Hammetta | 27 |
| 3.10 | Zależność długości fali w maksimum emisji barwników o różnych podstawnikach w pierścieniu fenyłowym od stałej Hammetta | 28 |
| 4.1 | Ogólna struktura badanych związków wraz z listą podstawników w każdej z serii | 31 |
| 5.1 | Znormalizowane widma absorpcji i fluorescencji związków z serii OMeBtR' w chloroformie | 36 |
| 5.2 | Znormalizowane widma absorpcji i fluorescencji związków z serii CF₃BtR' w chloroformie | 39 |
| 5.3 | Znormalizowane widma fluorescencji związków CF₃BtF i CF₃Bt3-F w chloroformie | 42 |
| 5.4 | Zależność przesunięcia Stokesa dla pochodnych CF₃BtR' ze stałą podstawnikową Hammetta wyznaczonych dla roztworów w chloroformie | 42 |
| 5.5 | Zależność maksimum absorpcji i fluorescencji oraz wydajności kwantowej fluorescencji od stałej Hammetta dla serii OMe₃BtR' i CF₃BtR' | 45 |
| 5.6 | Wydajność kwantowa fluorescencji w chloroformie dla dziewięciu pochodnych | 47 |
| 5.7 | Wyznaczona teoretycznie geometria cząsteczki CF₃Bt4-CF₃ w punkcie przecięcia powierzchni energii potencjalnej stanu podstawowego i wzbudzonego | 48 |
| 5.8 | Zależność $\log \Phi_F$ od $\log \eta$ dla dziewięciu pochodnych w mieszaninach o różnym stosunku objętościowym metanolu i gliceryny | 50 |
| 5.9 | Zmiana intensywności fluorescencji CF₃Bt4-OMe w czasie dla roztworu zawierającego 75% wody | 53 |
| 5.10 | Zmiana intensywności fluorescencji w zależności od temperatury CF₃Bt4-OMe w roztworze zawierającym 75% wody | 54 |
| 5.11 | Zmiana intensywności fluorescencji dla roztworów związków w zależności od składu rozpuszczalnika | 56 |
| 6.1 | Struktura związków CF₃BtR' z silnymi donorami elektronów | 60 |
| 6.2 | Widma absorpcji i fluorescencji dla pochodnych donor-akceptor | 62 |
| 6.3 | Widma absorpcji związków CF₃BtPhenox i CF₃BtH w chloroformie | 63 |
| 6.4 | Widma absorpcji i fluorescencji dla pochodnej CF₃BtPhenox w zależności od długości fali wzbudzenia | 64 |
| 6.5 | Widma fluorescencji związków CF₃Bt4-NMe₂ , CF₃BtPyr , CF₃BtMor w roztworach o różnej polarności | 67 |
| 6.6 | Krzywe zależności położenia długości fali emisji od składu mieszaniny heksan:THF dla CF₃Bt4-NMe₂ , CF₃BtPyr i CF₃BtMor | 68 |
| 6.7 | Widma fluorescencji związków CF₃BtDPA , CF₃BtCz , CF₃BtPhenox w roztworach o różnej polarności | 68 |
| 6.8 | Krzywe zależności położenia długości fali emisji od składu mieszaniny heksan:THF dla CF₃BtDPA i CF₃BtCz | 69 |
| 6.9 | Zmiana intensywności fluorescencji dla roztworów związków w zależności od składu mieszaniny rozpuszczalników THF i wody | 72 |

| | |
|--|----|
| 7.1 Podsumowanie uzyskanych wyników: kluczowe zmiany strukturalne wpływające na właściwości barwników | 76 |
|--|----|

Spis tabel

| | | |
|-----|---|----|
| 5.1 | Właściwości fotofizyczne związków OMeBtR' w chloroformie | 37 |
| 5.2 | Właściwości fotofizyczne związków CF₃BtR' w chloroformie | 40 |
| 5.3 | Właściwości fotofizyczne związków OMeBtR' , HBtR' , CF₃BtR' w chloroformie | 46 |
| 5.4 | Wartości wydajności kwantowej fluorescencji w metanolu i glicerynie oraz współczynnik kierunkowy liniowej korelacji dla związków badanych w roztworach o różnej lepkości | 49 |
| 5.5 | Czas życia fluorescencji oraz stałe szybkości przejść promienistych i bezpromienistych dla OMeBt4-OMe , OMeBtH , HBt4-OMe w metanolu i glicerynie | 50 |
| 5.6 | Wydajność kwantowej fluorescencji, czas życia fluorescencji, stałe szybkości przejść promienistych i bezpromienistych dla OMeBtH , HBt4-OMe oraz OMeBt4-OMe wyznaczonych po związaniu z amyloidami . | 51 |
| 5.7 | Właściwości fotofizyczne barwników w THF i agregatów w mieszaninie rozpuszczalników | 55 |
| 5.8 | Czas życia fluorescencji oraz stałe szybkości przejść promienistych i bezpromienistych wyznaczonych w THF i dla agregatów | 57 |
| 6.1 | Właściwości fotofizyczne związków CF₃BtR' w chloroformie | 61 |
| 6.2 | Właściwości emisyjne związków z silnym donorem elektronów w heksanie i THF | 66 |
| 6.3 | Czas życia fluorescencji oraz stałe szybkości przejść promienistych i bezpromienistych wyznaczone w heksanie i THF dla związków z silnym donorem elektronów | 67 |
| 6.4 | Właściwości fotofizyczne barwników w THF i agregatach w mieszaninie rozpuszczalników | 71 |
| 6.5 | Czas życia fluorescencji oraz stałe szybkości przejść promienistych i bezpromienistych wyznaczonych w THF i dla agregatów | 72 |

Wprowadzenie

Era wykorzystania barwników fluorescencyjnych rozpoczęła się w połowie XX wieku wraz z powszechnym zastosowaniem spektrofluorometrów. Chinina stała się pierwszym fluoroforem badanym za pomocą tych przyrządów pomiarowych. W czasie II wojny światowej metody spektrofluometryczne były używane do monitorowania leków przeciwmalarycznych zawierających ten właśnie alkaloid. Jednak pierwsze opisy samego zjawiska fluorescencji sięgają ponad 100 lat wcześniej. W 1845 roku John Herschel opisał zachowanie roztworu siarczanu chininy, który był transparentny, gdy nie padało na niego promieniowanie słoneczne. W momencie, gdy na ten sam roztwór padało silne światło, wykazywał on żywą i piękną błękitną barwę [1]. W latach 50. XIX wieku George Stokes, zainspirowany opisami Herschela, ponownie badał roztwory siarczanu chininy. Do tego celu zbudował prosty układ składający się z dwóch filtrów. Pierwszym filtrem był niebieski kawałek witraża, który przepuszczał promieniowanie elektromagnetyczne z zakresu UV. Promieniowanie padało na próbkę siarczanu chininy, powodując powstawanie niebieskiej barwy próbki. Drugi filtr (żółty), transparentny dla promieniowania powyżej 400 nm, umieszczony został między próbką a obserwatorem. W ten sposób Stokes dowiódł, że promieniowanie padające na próbkę ma mniejszą długość fali (wyższą energię) niż promieniowanie emitowane przez próbkę. Różnica energii absorbowanej i emitowanej przez barwnik znana jest obecnie jako przesunięcie Stokesa i stała się fundamentem dla dalszych badań. Stokes jest również autorem pojęcia „fluorescencja”, pochodzącego od fluorytu – szeroko rozpowszechnionego minerału.

Kilka dekad później, w 1933 roku, na łamach czasopisma *Nature* profesor Aleksander Jabłoński, polski fizyk badający absorpcję i emisję światła, opublikował artykuł zawierający niewielki diagram przedstawiający rozkład elektronowych poziomów energetycznych barwników. Po absorpcji promieniowania możliwe jest promieniste

przejście cząsteczki ze stanu wzbudzonego do stanu podstawowego, czemu towarzyszy fluorescencja lub fosforescencja [2]. To najprostszy opis diagramu Jabłońskiego, najpowszechniej wykorzystywanej schematycznej ilustracji zjawisk fotofizycznych.

Niezależnie od energii wzbudzenia cząsteczki, położenie i kształt pasma emisyjnego zwykle nie zmieniają się. Jest to eksperymentalny dowód zachowania się fluorescencyjnej próbki zgodnie z regułą Kashy, która mówi, że po wzbudzeniu cząsteczki do wyższych stanów elektronowych, nadmiar energii jest szybko rozpraszany przez procesy bezpromienne. W rezultacie cząsteczka osiąga najniższy poziom wibracyjny najniższego elektronowego stanu wzbudzonego (S_1), z którego następuje emisja promieniowania. Reguła ta została sformułowana przez amerykańskiego fizyka Michaela Kashę w 1950 roku [3].

Powyższe właściwości dały podwaliny współczesnym technologiom opartym na zjawiskach emisji promieniowania przez cząsteczki organiczne, nieorganiczne [4–6] oraz kompleksy metali [7–10]. Obecnie jako emitery powszechnie stosowane są również białka fluorescencyjne (lata 60. XX wieku) [11–13] oraz kropki kwantowe (lata 80. XX wieku) [14–17]. Nie wyobrażamy sobie życia bez powłok emitujących światło, opartych na technologiach OLED, czy bez mikroskopii fluorescencyjnej, pozwalającej obrazować biostruktury w komórkach.

Dowodem na ogromną przydatność technik fluorescencyjnych niech będzie fakt, że w 2014 roku Nagrodę Nobla w dziedzinie chemii przyznano wspólnie Ericowi Betzigowi, Stefanowi W. Hellowi i Williamowi E. Moernerowi „za rozwój super-rozdzielczej mikroskopii fluorescencyjnej” [18]. Przed ich pracami rozdzielczość konwencjonalnych mikroskopów optycznych mieściła się w zakresie 200–300 nanometrów. Ograniczało to obserwację struktur mniejszych niż ten rozmiar przy użyciu tradycyjnych technik mikroskopii świetlnej. Opracowanie innowacyjnych metod mikroskopii o wysokiej rozdzielczości pozwoliło ominąć to ograniczenie, umożliwiając wizualizację struktur w nanoskali (10–50 nm) [19, 20]. Super-rozdzielcza mikroskopia fluorescencyjna spowodowała znaczny postęp w obrazowaniu i zrozumieniu procesów chorobotwórczej agregacji białek (amyloidów) [21–23].

Powszechnie stosowanym barwnikiem fluorescencyjnym wiążącym się z amyloidami jest Tioflawina T (ThT) [24–27]. Ze względu na położenie maksimum absorpcji i fluorescencji ThT oraz brak selektywności wiązania z białkami, barwnik ten ma ograniczone zastosowanie w badaniach *in vivo*. Przez to istnieje potrzeba opracowania barwników, które będą umożliwiały detekcję markerów chorobotwórczych bezpośrednio w organizmach żywych.

W niniejszej pracy przedstawione zostaną strategie projektowania barwników fluorescencyjnych oraz wyniki badań podstawowych poświęconych poznaniu możliwości wywoływania kontrolowanych zmian ich właściwości fotofizycznych w zależności od otoczenia cząsteczek. Ponadto, otrzymane barwniki zostały poddane testom mającym na celu ocenę ich przydatności w bioobrazowaniu.

Mechanizmy dezaktywacji stanu wzbudzonego

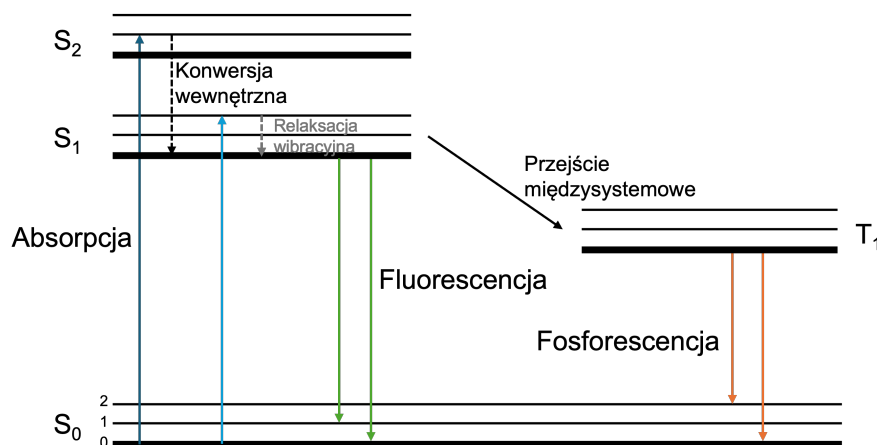
W tym rozdziale zostaną omówione mechanizmy dezaktywacji stanów wzbudzonych cząsteczek, które w wyniku absorpcji promieniowania elektromagnetycznego z zakresu nadfioletu (ang. *UltraViolet*, UV), widzialnego lub bliskiej podczerwieni (ang. *Near Infra-Red*, NIR), zostały wzbudzone z podstawowego elektronowego poziomu energetycznego (S_0) na wyższy. Naturalnym procesem następującym po absorpcji promieniowania jest utrata nadmiaru energii w przejściach promienistych lub bezpromienistych. Dodatkowym sposobem dezaktywacji stanu wzbudzonego są wewnątrz- lub międzycząsteczkowe reakcje fotochemiczne, jednakże nie będą one tu omawiane.

2.1 Przejścia promieniste

Istnieje kilka mechanizmów przejścia cząsteczki ze stanu wzbudzonego do stanu podstawowego, którym towarzyszy emisja fotonu. Zjawiska fotoluminescencji różnią się między sobą przede wszystkim czasem życia cząsteczki w stanie wzbudzonym, po którym następuje emisja promieniowania, co jest powiązane z multipletowością stanu wzbudzonego oraz prawdopodobieństwem i kinetyką przejść pomiędzy odpowiednimi stanami.

2.1.1 Diagram Jabłońskiego

Do zobrazowania przejść pomiędzy poszczególnymi poziomami energetycznymi można wykorzystać diagram Jabłońskiego (Rys. 2.1). Stan podstawowy w zamknię-



Rys. 2.1: Diagram Jabłońskiego

topowłokowych cząsteczkach organicznych zwykle jest stanem singletowym i jest oznaczony jako S_0 . Stany wzbudzone singletowe oznaczone są kolejno jako S_1 , S_2 itd. Stany trypletowe oznaczane są literą T. Dla uproszczenia, na Rys. 2.1 przedstawiono tylko pierwszy trypletowy stan wzbudzony T_1 . Każdemu z tych stanów towarzyszą stany wibracyjne oznaczone jako poziome linie 0, 1, 2 itd. Niebieskie pionowe strzałki oznaczają możliwe przejścia ze stanu podstawowego S_0 do różnych poziomów wibracyjnych stanu S_1 lub S_2 . Zwykle wzbudzenie zachodzi z poziomu wibracyjnego 0 stanu podstawowego. Wynika to z rozkładu Boltzmann'a, zgodnie z którym zdecydowana większość cząsteczek w temperaturze pokojowej znajduje się właśnie w tym stanie. Proces absorpcji promieniowania jest szybki – zachodzi w czasie około 10^{-15} s. Po absorpcji promieniowania następuje relaksacja wibracyjna, co na Rys. 2.1 zostało przedstawione jako szara przerywana linia.

Cząsteczka wzbudzona do wyższego stanu elektronowego S_{1+n} ulega zwykle wewnętrznej konwersji, zmieniając swój stan wzbudzony w kierunku najniższego poziomu oscylacyjnego stanu wzbudzonego S_1 . Zmiany te zachodzą w czasie 10^{-13} – 10^{-11} s. W przypadku, gdy cząsteczka zostanie wzbudzona do wyższego stanu wibracyjnego poziomu S_1 , ulega bezpromienistej relaksacji wibracyjnej do najniższego poziomu wibracyjnego, z którego następnie może nastąpić emisja fotonu. Na diagramie nie zaznaczano możliwej konwersji wewnętrznej ze stanu S_1 do S_0 . Proces ten jednak jest zdecydowanie mniej wydajny niż konwersja z S_2 do S_1 , ze względu na znacznie większą różnicę energii między stanami S_1 i S_0 . Stąd, konwersja wewnętrzna z S_1 do S_0 może konkurować z innymi procesami [28].

Szybkość zajścia danego przejścia pomiędzy stanami elektronowymi określa tzw. złota reguła Fermiego [29, 30]. Jeśli zaburzenie wywołujące przejście pomiędzy stanem początkowym i i końcowym f oznaczymy jako H' , to szybkość przejścia pomiędzy tymi stanami, $k_{i \rightarrow f}$, będzie wprost proporcjonalna do kwadratu sprzężenia pomiędzy tymi stanami $\langle i | H' | f \rangle$, wywołwanego przez owe zaburzenie i odwrotnie proporcjonalna do różnicy energii między nimi, $\Delta E_{if} = E_f - E_i$,

$$k_{i \rightarrow f} \sim \frac{\langle i | H' | f \rangle^2}{\Delta E_{if}}. \quad (2.1)$$

Zatem można sformułować reguły wyboru w spektroskopii, stwierdzając, że jeśli odpowiednie elementy macierzowe w liczniku wyrażenia 2.1 są równe zeru, to dane przejście jest wzbronione, a jeśli mają niezerową wartość, to przejście jest dozwolone. Reguły wyboru dla spektroskopii elektronowej określają orbitalna reguła Laporte'a (dla cząsteczek centrosymetrycznych dozwolone są przejścia ze zmianą parzystości orbitali) oraz reguła spinowa (dozwolone są przejścia bez zmiany multipletowości).

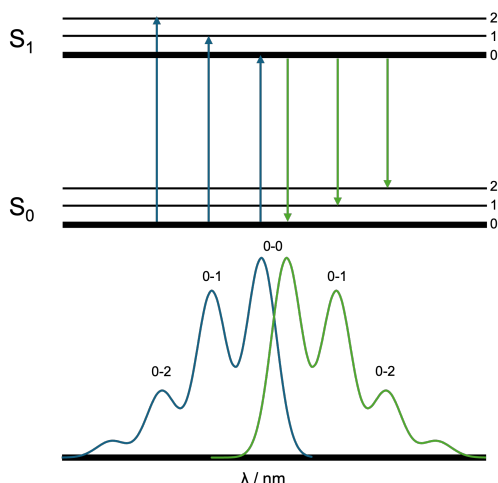
Ponieważ ruchy jąder w cząsteczkach są znacznie wolniejsze niż relaksacja elektronów, można założyć, że pobudzenia elektronowe zachodzą zgodnie z regułą Francka-Condon bez zmiany położeń jąder.

2.1.2 Fluorescencja

Fluorescencja, czyli emisja fotonów, jest wynikiem przejścia ze wzbudzonego stanu singletowego S_1 do stanu podstawowego S_0 . Część energii absorbowanej przez cząsteczkę jest tracona w wyniku relaksacji wibracyjnej do najniższego wibracyjnego poziomu stanu S_1 . Dopiero z niego następuje emisja promieniowania, w wyniku czego cząsteczka może przechodzić do wyższych poziomów wibracyjnych stanu podstawowego S_0 (reguła Kashy [3, 31]). Przejścia te zostały zilustrowane na Rys. 2.2 jako zielone strzałki, kończące się na liniach odpowiadającym różnym stanom wibracyjnym cząsteczki w stanie podstawowym.

Największa intensywność fluorescencji odpowiadać będzie przejściom do wibracyjnego stanu S_0 odpowiadającemu tej samej geometrii cząsteczki, zgodnie z regułą Francka-Condon. Odpowiada to największemu prawdopodobieństwu przejść elektronowych i największej całką nakładania oscylacyjnych funkcji falowych. Przejścia na inne stany wibracyjne są mniej prawdopodobne, ze względu na mniejszą wartość czynnika Francka-Condon, czyli całki nakładania pomiędzy odpowiednimi stanami. W przypadku węglowodorów aromatycznych, gdzie geometria cząsteczki nie różni się znacząco w stanie podstawowym i wzbudzonym przejście do najniższego poziomu wibracyjnego stanu S_0 jest najbardziej prawdopodobne, co widać jako maksimum intensywności fluorescencji. Inne przejścia są mniej prawdopodobne i są one widoczne jako lokalne maksima w widmie fluorescencyjnym. Ze względu na to, że różnice między poziomami wibracyjnymi cząsteczki w stanie podstawowym i wzbudzonym są zbliżone, możemy spodziewać się, że pasmo emisyjne będzie stanowiło lustrzane odbicie kształtu pasma absorpcyjnego.

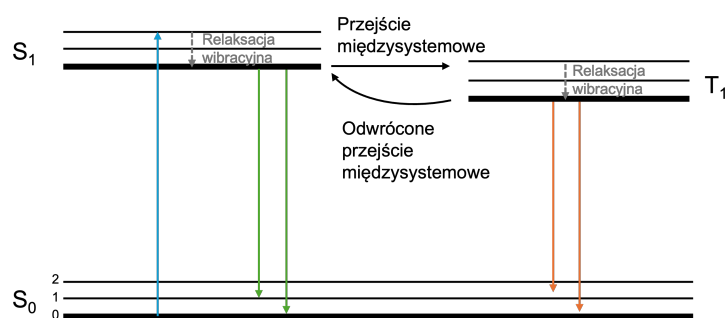
Eksperymentalnie można to zaobserwować w widmach absorpcji i fluorescencji naftalenu [32], antracenu [33] czy perylenu [34], w których pasma absorpcji i emisji różnią się intensywnością składowych pochodzących od przejść do różnych stanów wibracyjnych cząsteczek. Oznacza to, że nie tylko przerwy między wibracyjnymi poziomami energetycznymi są podobne dla cząsteczki w stanie podstawowym i wzbudzonym, ale również prawdopodobieństwo przejść pomiędzy nimi, co odpowiada intensywności poszczególnych składowych. Podobne obserwacje można przeprowadzić także dla innych związków o sztywnej strukturze, np. zawierających grupę BF_2 [35, 36], a w szczególności pochodne 4,4-difluoro-4-boro-3a,4a-diaza-s-indacenów (tzw. BODIPY) [37, 38].



Rys. 2.2: Schemat przejść między poziomami wibracyjnymi stanu podstawowego S_0 i wzbudzonego S_1 oraz odpowiednie widma absorpcji i fluorescencji

2.1.3 Fosforescencja

Drugim rodzajem przejścia promienistego ze stanu wzbudzonego do stanu podstawowego S_0 jest fosforescencja. Emisja promieniowania w tym przypadku musi zostać poprzedzona przejściem międzysystemowym – bezpromienistym przejściem pomiędzy dwoma poziomami o podobnej energii należącymi do stanów elektronowych o różnej multipletowości. Oznacza to, że cząsteczka ze stanu wzbudzonego S_1 , na poziomie wibracyjnym 0 może przejść na energetycznie zbliżony poziom trypletowy T_n , a następnie przez relaksację wibracyjną przejść na najniższy poziom oscylacyjny stanu T_1 . Z tego poziomu może nastąpić spontaniczna emisja promieniowania. Opisane przejście ze zmianą multipletowości jest spinowo wzbronione [39], ale jednak proces ten jest możliwy pod pewnymi warunkami (patrz podrozdział 2.2.2).



Rys. 2.3: Fragment diagramu Jabłońskiego z zaznaczonymi możliwymi przejściami między stanami S_1 i T_1

Ponieważ w przypadku fosforescencji w liczniku wyrażenia (2.1), określającego prawdopodobieństwo przejścia zgodnie ze złotą regułą Fermiego, pojawia się człon opisujący sprzężenie spin-orbita, a w mianowniku – różnica energii pomiędzy stanem singletowym a trypletowym, osiągnięcie niezerowego prawdopodobieństwa przejścia wymaga zwiększenia wartości licznika i/lub zmniejszenia mianownika. W przypadku cząsteczek organicznych, powszechnie stosowaną strategią dla otrzymania

nia związków fosforyzujących poprzez wzrost efektu sprzężenia spinowo-orbitalnego jest wprowadzenie do ich struktury ciężkiego atomu (np. bromu, jodu). W roztworze w temperaturze pokojowej trudno jest obserwować fosforescencję ze względu na wydajne nieradiacyjne procesy przejścia do stanu S_0 . Zupełnie inaczej sytuacja wygląda dla próbek w niskich temperaturach, zwłaszcza w tak zwanym szkliwie, czyli zamrożonym w temperaturze ciekłego azotu roztworze związku w etanolu lub metyloctetrahydrofuranie [40]. Czas życia stanu trypletowego może w tych warunkach być wystarczająco długi, aby zaobserwować fosforescencję w skali czasu od mikrosekund do sekund, a nawet minut [41]. Widmo fosforescencji przesunięte jest w stronę niższych energii w stosunku do widma fluorescencji, ponieważ energia najniższego poziomu wibracyjnego stanu trypletowego T_1 jest zwykle niższa niż energia stanu singletowego S_1 .

2.1.4 Termicznie aktywowana opóźniona fluorescencja

Termicznie aktywowana opóźniona fluorescencja (ang. *Thermally Activated Delayed Fluorescence*, TADF) to zjawisko fluorescencji, poprzedzone przejściem cząsteczki między stanami o różnej multipletowości. Po wzbudzeniu cząsteczki, przechodzi ona ze stanu S_1 do stanu trypletowego T_1 w wyniku przejścia międzysystemowego, a następnie, wyniku odwróconego przejścia międzysystemowego, ze stanu wzbudzonego T_1 do stanu S_1 , z którego następuje emisja promieniowania (Rys. 2.3). Zjawisko TADF zależy od szybkości bezpromienistych procesów związanych z multipletowością stanów, które są konkurencyjne dla innych procesów powodujących bezpromienistą dezaktywację stanu wzbudzonego [42]. Prawdopodobieństwo tych zmian, podobnie, jak w przypadku fosforescencji, można opisać za pomocą złotej reguły Fermiego. Oznacza to, że prawdopodobieństwo (odwrotnego) przejścia międzysystemowego jest wprost proporcjonalne do członu opisującego sprzężenie spin-orbita, i odwrotnie proporcjonalne do różnicy energii pomiędzy stanem singletowym a trypletowym (2.1). Powszechną strategią projektowania emiterów TADF jest zmniejszenie różnicy energii ΔE_{S-T} w cząsteczkach z wewnątrzcząsteczkowym przeniesieniem ładunku powodując zwiększenie wydajności tego procesu [43, 44].

Różnica energetyczna jest kompensowana termicznie, co w konsekwencji prowadzi do wzrostu wydajności procesu wraz ze wzrostem temperatury. Zachowanie to jest odmienne od zachowania większości fluoroforów, dla których wzrost temperatury powoduje zmniejszenie wydajności fluorescencji [45].

2.2 Przejścia bezpromieniste

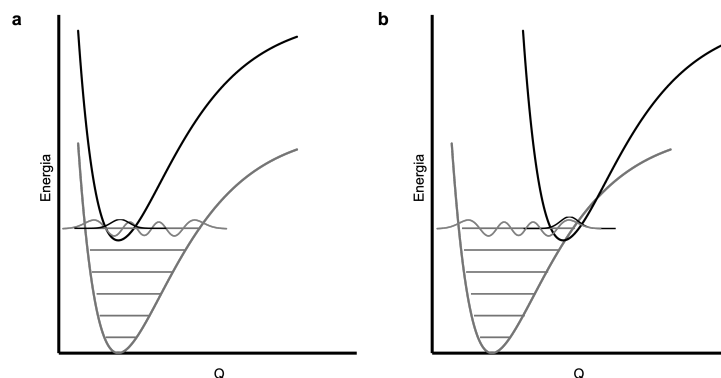
Nie zawsze energia wzbudzenia jest uwalniana w formie promieniowania. Często cząsteczka powraca do stanu podstawowego poprzez szereg procesów, które nie są związane z emisją fotonów. Tego rodzaju przemiany, określane jako procesy bezpromieniste, są kluczowe dla zrozumienia przemian fotofizycznych. W niniejszym rozdziale omówione zostaną fundamentalne procesy bezpromieniste, towarzyszące dezaktywacji elektronowo wzbudzonych cząsteczek: konwersja wewnętrzna oraz przejście międzysystemowe. Oba zjawiska odgrywają kluczową rolę w determino-

waniu losów wzbudzonej cząsteczki, wpływając na wydajność emisji. Konwersja wewnętrzna, polegająca na przekazywaniu energii wzbudzenia pomiędzy różnymi poziomami wibracyjnymi, jest zwykle traktowana jako proces nieodwracalny ze względu na szybkie rozproszenie energii w formie drgań. Przejście międzysystemowe, związane ze zmianą spinu elektronu, jest procesem wolniejszym i w niektórych przypadkach może być częściowo odwracalne, co zostało wyżej wyjaśnione na przykładzie zjawiska termicznie aktywowanej opóźnionej fluorescencji.

2.2.1 Konwersja wewnętrzna

Konwersja wewnętrzna to proces zachodzący pomiędzy stanami energetycznymi o tej samej multipletowości (singletowymi S_n lub trypletowymi T_n). Proces ten może zachodzić zarówno pomiędzy stanami wzbudzonymi, jak również między stanem wzbudzonym a stanem podstawowym. Różnica energii pomiędzy wyższymi stanami wzbudzonymi jest stosunkowo mała w porównaniu do dużej przerwy energetycznej między najniższym stanem wzbudzonym S_1 a stanem podstawowym S_0 . Dodatkowo, wyższe stany wzbudzone często charakteryzują się inną geometrią cząsteczki niż stany energetyczne o niższej energii, co może powodować przecinanie się powierzchni energii potencjalnych dla tych stanów. Te dwa czynniki – małe przerwy energetyczne i przecinanie się powierzchni energii potencjalnej wyższych stanów – sprzyjają bezpromiennym przejściom między nimi. Ogólnie, szybkość i prawdopodobieństwo przejść na drodze konwersji wewnętrznej zależą od kilku czynników, w tym od przecinania się powierzchni energii potencjalnej poszczególnych stanów oraz od nakładania się funkcji falowych poziomów wibracyjnych. Ilustruje to Rys. 2.4. Powierzchnie energii potencjalnej stanu podstawowego (szara linia) i wzbudzonego (czarna linia) cząsteczek mogą być względem siebie przesunięte w różny sposób. Gdy cząsteczka posiada podobną geometrię w stanie podstawowym i wzbudzonym, pobudzenie zachodzi zgodnie z regułą Francka-Condon (Rys. 2.4a), a przecięcie powierzchni energii potencjalnej jest mało prawdopodobne. W takim przypadku prawdopodobieństwo przejścia bezpromienistego jest niskie. Prawdopodobieństwo to dodatkowo maleje wraz ze wzrostem różnicy energii między dwoma stanami. W sytuacji przedstawionej na Rys. 2.4b, minima powierzchni energii potencjalnej w podstawowym i wzbudzonym stanie elektronowym są względem siebie silnie przesunięte, a przecięcie tych powierzchni zachodzi w pobliżu minimum wyższego elektronowego stanu wzbudzonego (S_1) – występuje dobre nakładanie się funkcji falowych stanów wibracyjnych dla S_0 i S_1 , niezależnie od oscylacyjnej liczby kwantowej niższego stanu energetycznego. Wówczas prawdopodobieństwo przejścia bezpromienistego jest wysokie, niewrażliwe na przerwę energetyczną i niezależne od częstotliwości drgań.

W naturze, często możemy spotkać sytuacje jak te przedstawione na Rys. 2.4b, w których minimum energii potencjalnej stanu wzbudzonego znajduje się w pobliżu krzywej energii potencjalnej stanu podstawowego, zaś powierzchnie przecinają się w punkcie o niewielkiej odległości energetycznej od minimum stanu wzbudzonego. W takich przypadkach szybkości przejść bezpromienistych mogą zależeć silnie od zmian temperatury.



Rys. 2.4: Uproszczone przebiegi powierzchni energii potencjalnej dla cząsteczek posiadających tę samą (a) lub różną (b) geometrię stanu podstawowego i wzbudzonego

2.2.2 Przejścia międzysystemowe

Przejście międzysystemowe (ang. *InterSystem Crossing*, ISC) jest procesem bezpromienistym, w którym następuje zmiana multipletowości stanu elektronowego. Zgodnie z regułami mechaniki kwantowej, przejścia elektronowe związane ze zmianą spinu elektronu są formalnie zabronione, ale mogą zachodzić pod pewnymi warunkami (patrz (2.1)). Jednym z kluczowych czynników umożliwiających przejście międzysystemowe jest sprzężenie spinowo-orbitalne. Zwykle sprzężenie to jest słabe, co sprawia, że prawdopodobieństwo przejścia między stanem singletowym a trypletowym jest praktycznie niemożliwe (bliska zeru wartość w liczniku wyrażenia (2.1)). Na efekt sprzężenia spin-orbita ma wpływ wartość liczby atomowej pierwiastków w strukturze związku. Z tego powodu obecność ciężkich atomów bromu lub jodu w cząsteczce sprzyja przejściom międzysystemowym [46–48].

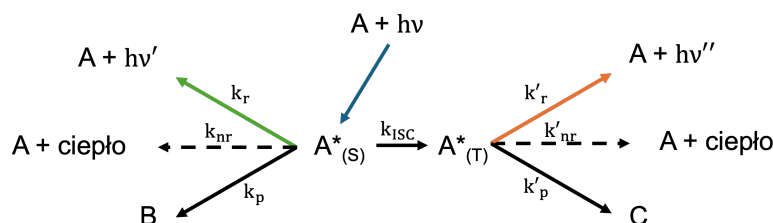
Kolejnym, równie ważnym, czynnikiem wpływającym na prawdopodobieństwo przejść międzysystemowych jest różnica energetyczna między stanami singletowym i trypletowym (ΔE_{S-T}) (mianownik wyrażenia (2.1)). Bliskość energetyczna stanów o różnej multipletowości sprzyja tym przejściom. Jednak w heterocyklicznych cząsteczkach organicznych, niskoenergetyczne stany wzbudzone często związane są z przejściami elektronowymi, w których biorą udział elektrony wiązań sprzężonych π oraz z wolnych par elektronowych n [49, 50]. Elektrony te mogą ulegać wzbudzeniu, przechodząc na orbitale antywiązące π^* lub n^* . Charakter tych przejść wpływa na sprzężenie spin-orbita, jednocześnie zmieniając prawdopodobieństwo przejść międzysystemowych. Pozwoliło to ustalić pewne reguły wyboru dla tych procesów w zależności od przejść między poszczególnymi stanami. Zgodnie z powyższym, najbardziej prawdopodobne przejście międzysystemowe będzie zachodzić między stanami, w których jest ono związane ze zmianą typu orbitali:

$$\begin{array}{ll} {}^1(\pi, \pi^*) \leftrightarrow {}^3(\pi, \pi^*) & {}^1(n, \pi^*) \leftrightarrow {}^3(n, \pi^*) \quad \text{przejście zabronione,} \\ {}^1(n, \pi^*) \leftrightarrow {}^3(\pi, \pi^*) & {}^1(\pi, \pi^*) \leftrightarrow {}^3(\pi, \pi^*) \quad \text{przejście dozwolone.} \end{array}$$

Te reguły zostały zaproponowane przez Mostafę El-Sayedą [51–53] i do dziś wykorzystywane są w projektowaniu m.in. barwników fosforescencyjnych i emiterów TADF [52, 54, 55].

2.3 Czas życia i wydajność kwantowa fluorescencji

Dla roztworu fluoroforu w danej temperaturze możliwe jest wyznaczenie eksperymentalne czasu życia fluorescencji oraz wydajności kwantowej. Wielkości te, obok długości fali w maksimum absorpcji/emisji, dopełniają zbiór najważniejszych danych fotofizycznych dla barwników fluorescencyjnych. Wszystkie one zależą od otoczenia, w którym znajduje się cząsteczka oraz od temperatury.



Rys. 2.5: Schemat procesów zachodzących po wzbudzeniu cząsteczki

W poprzednich częściach rozprawy wskazano możliwe procesy pozwalające wzbudzonej cząsteczce na powrót do stanu podstawowego. Na Rys. 2.5 przedstawiono schematycznie możliwe procesy, zachodzące w następstwie wzbudzenia cząsteczki barwnika. Cząsteczka, która po absorpcji przechodzi do singletowego stanu wzbudzonego może pozbyć się nadmiaru energii w konkurencyjnych procesach o różnych wartościach stałych szybkości: fluorescencji (k_r), konwersji bezpromienistej (k_{nr}) oraz reakcji fotochemicznej (k_p). Kolejnym konkurencyjnym procesem może być przejście międzysystemowe do stanu trypletowego (k_{ISC}). Z tego stanu również mogą zachodzić przejścia promieniste, czyli fosforescencja, (k'_r), konwersja bezpromienista (k'_{nr}) lub cząsteczka może ulegać przemianom fotochemicznym (k'_p) [56]. Dla określenia zachowania danej cząsteczki w stanie wzbudzonym konieczna jest znajomość kinetyki konkurencyjnych przemian. Przy założeniu, że cząsteczka nie zmienia multipletowości w stanie wzbudzonym, czas życia τ molekuł w stanie wzbudzonym A^* można zdefiniować jako:

$$\tau(A^*) = \frac{1}{k_r + k_{nr} + k_p}. \quad (2.2)$$

Równanie to wynika z kinetyki pierwszego rzędu, ponieważ opisane procesy są procesami elementarnymi. Wydajność kwantową każdego z procesów można zdefiniować jako stosunek liczby cząsteczek biorących udział w tym procesie do liczby zaabsorbowanych fotonów. W przypadku fluorescencji, gdzie jedna cząsteczka emituje jeden foton, wydajność kwantowa będzie wyrażała się w stosunku liczby emitowanych (N_r) do liczby zaabsorbowanych fotonów (N_{abs}), które można powiązać ze stałymi szybkości opisanymi procesów w następujący sposób:

$$\Phi_F = \frac{N_r}{N_{abs}} = \frac{k_r}{k_{nr} + k_r + k_p}. \quad (2.3)$$

Przy założeniu, że cząsteczka jest fotochemicznie trwała, można zaniechać rozważań na temat reakcji fotochemicznych, upraszczając równanie 2.3 i uwzględniając jedynie

2.4. Rola otoczenia cząsteczki wzbudzonej

stałe szybkości przejść promienistych k_r i bezpromienistych k_{nr} :

$$\Phi_F = \frac{k_r}{k_{nr} + k_r}. \quad (2.4)$$

Z równania 2.2 (z pominięciem wyrażenia k_p) i 2.4 wynika, że stałą szybkości przejścia ze stanu S_1 do S_0 (fluorescencja) można wyznaczyć z eksperymentalnie zmierzonej wydajności kwantowej Φ_F i czasu życia fluorescencji τ :

$$k_r = \frac{\Phi_F}{\tau(A^*)}. \quad (2.5)$$

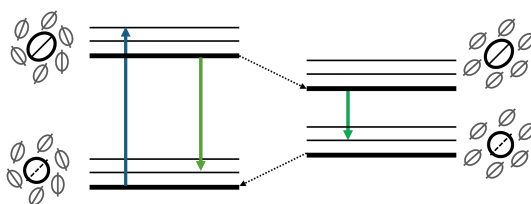
Wydajność kwantowa fluorescencji jest bliska 100%, jeśli stała szybkości procesów promienistych jest znacznie większa niż szybkość zaniku bezpromienistego, czyli $k_r \gg k_{nr}$. W literaturze można znaleźć wiele przykładów związków, których wydajność kwantowa fluorescencji bliska jest tej wartości. Charakterystyczną cechą takich związków jest sztywna struktura oraz – co za tym idzie – niewielkie przesunięcie Stokesa [57–59].

2.4 Rola otoczenia cząsteczki wzbudzonej

W praktyce laboratoryjnej zdecydowana większość eksperymentów prowadzona jest w roztworach, dlatego konieczne jest rozumienie wpływu otoczenia na właściwości cząsteczki w stanie wzbudzonym. Powszechnie wiadomo, że stosowanie różnych rozpuszczalników w znaczący sposób wpływa na właściwości fotofizyczne barwników. Oddziaływania między rozpuszczalnikiem i cząsteczką mogą stabilizować jej stan wzbudzony lub indukować powrót do stanu podstawowego. Zmiany polarności rozpuszczalnika, w którym znajduje się barwnik, mogą faworyzować przejścia elektronowe o różnym charakterze ($n \rightarrow \pi^*$ lub $\pi \rightarrow \pi^*$) [60–62]. Innym zjawiskiem powszechnym w przypadku barwników organicznych rozpuszczonych w bardzo polarnych rozpuszczalnikach, jest tworzenie się agregatów, w których występują silne oddziaływania między cząsteczkami barwnika [63–65]. Agregaty związków fluorescencyjnych charakteryzują się odmiennymi od samych cząsteczek właściwościami fotofizycznymi, zaś agregacja jest jednym z prostszych koncepcyjnie procesów, jakie można efektywnie obserwować z użyciem technik opartych o pomiary fluorescencji. Co więcej, zmiany lepkości, wspomnianej polarności medium lub obecność innych składników, takich jak tlen [66, 67], jony [68, 69], biomolekuły [70], w mikrootoczeniu barwnika i idące za tym zmiany jego właściwości fotofizycznych są podstawą wielu zastosowań technik fluorescencyjnych w biologii, farmacji i medycynie. Dzieje się tak z powodu występowania słabych oddziaływań międzymolekularnych takich jak wiązania wodorowe, halogenowe, czy oddziaływania dyspersyjne prowadzące do odpowiedzi fotofizycznej ze strony sondy fluorescencyjnej. Ponieważ omówione wyżej zmiany w charakterystyce barwników są wywołane obecnością i właściwościami ich otoczenia, następne podrozdziały omawiają je nieco dokładniej.

2.4.1 Efekt solwatochromowy

Zjawisko, w wyniku którego możemy obserwować przesunięcia maksimum oraz zmianę kształtu pasm emisji w zależności od rozpuszczalnika jest nazywane efektem solwatochromowym [71]. Efekt ten zależy nie tylko od rodzaju rozpuszczalnika, ale również od rodzaju przejścia elektronowego w cząsteczce. Absorpcja promieniowania wywołuje zmianę rozkładu elektronów w cząsteczce, czyli zmianę jej momentu dipolowego, zaburzając stan równowagi dla oddziaływań rozpuszczalnik – barwnik. Efekt solwatochromowy jest tym silniejszy, im większa jest różnica między momentem dipolowym w stanie podstawowym μ_p i wzbudzonym μ_w . Ta różnica jest duża dla przejść związanych z wewnątrzcząsteczkowym przeniesieniem ładunku (ang. *Intramolecular Charge Transfer*, ICT) [72]. Jeżeli w stanie wzbudzonym następuje zwiększenie momentu dipolowego fluoroforu ($\mu_p < \mu_w$), następuje gwałtowna reorganizacja cząsteczek rozpuszczalnika pierwszej otoczki solwatacyjnej. Na Rys. 2.6 przedstawiono to zjawisko dla cząsteczki w rozpuszczalniku polarnym. Wzbudzenie cząsteczki powoduje zmianę orientacji dipoli rozpuszczalnika wokół. W tym przypadku, im wyższa polarność rozpuszczalnika, tym niższa energia stanu zrelaksowanego i większe przesunięcie ku czerwieni pasma emisyjnego.



Rys. 2.6: Relaksacja otoczki solwatacyjnej wokół fluoroforu o momencie dipolowym rosnącym podczas wzbudzenia, $\mu_p < \mu_w$

Innym parametrem determinującym efekt solwatochromowy jest lepkość rozpuszczalnika, ponieważ to od niej zależy szybkość relaksacji rozpuszczalnika wokół wzbudzonej molekuly. Jeśli czas wymagany do reorganizacji cząsteczek rozpuszczalnika wokół fluoroforu jest krótki w stosunku do czasu życia stanu wzbudzonego, fotony będą emitowane przez cząsteczki znajdujące się w równowadze z ich powłoką solwatacyjną. Po emisji, substancja rozpuszczona odzyskuje swój początkowy moment dipolowy μ_p , a kolejny proces relaksacji prowadzi do najbardziej stabilnej początkowej geometrii cząsteczki w stanie podstawowym. W przypadku, gdy medium jest zbyt lepkie, niemożliwa jest szybka reorganizacja cząsteczek rozpuszczalnika i emisja odbywa się ze stanu o wyższej energii (jak w przypadku ośrodka niepolarnego), a widmo fluorescencji nie będzie znacząco przesunięte względem pasm absorpcyjnych. Wreszcie, jeśli czas reorganizacji rozpuszczalnika jest rzędu czasu życia stanu wzbudzonego, pierwsze wyemitowane fotony będą odpowiadać długościom fali krótszym niż te emitowane nieco później, ponieważ reorganizacja będzie zachodzić w czasie emisji [73, 74].

Wielkość oraz charakter przesunięć pasm absorpcji i emisji dla związków w różnych rozpuszczalnikach można wykorzystać do opisu charakteru przejść elektronowych cząsteczek. Pasma związane z przejściami $\pi \rightarrow \pi^*$ są najmniej czułe na zmiany polarności otoczenia, ponieważ różnica momentów dipolowych stanu podstawowego i wzbudzonego jest niewielka. W przypadku przejść $n \rightarrow \pi^*$ obserwowane będą

wyraźne przesunięcia pasm absorpcji/emisji, jednak największe przesunięcia będą widoczne dla przejść $\pi \rightarrow \pi^*$ w cząsteczkach posiadających grupy elektronodonorowe i elektronoakceptorowe, których wzbudzenie spowoduje wewnątrzcząsteczkowe przeniesienie ładunku [75].

2.4.2 Oddziaływania międzycząsteczkowe

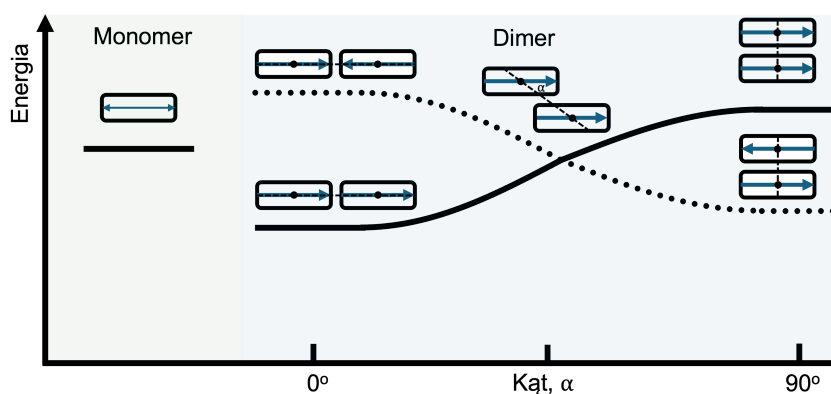
Wpływ rozpuszczalnika na właściwości fotofizyczne cząsteczek może być niewielki w przypadku słabych specyficznych oddziaływań międzycząsteczkowych między cząsteczkami fluoroforu a rozpuszczalnikiem. Ze względu na powszechne występowanie i energię wiązań wodorowych oddziaływania te są najczęściej dyskutowanym przykładem. Niekiedy systematyczne zmiany, związane ze zmianą polarności rozpuszczalnika nie są zachowane dla fluoroforów, które w swojej strukturze posiadają atomy zdolne do tworzenia wiązań wodorowych. Właśnie te oddziaływania niekowalencyjne mogą zmienić naturę przejść elektronowych, a tym samym wpływać na wydajność kwantową fluorescencji [76, 77]. Heterocykliczne układy aromatyczne są wyjątkowo wrażliwe na obecność wiązań wodorowych. W rozpuszczalnikach protycznych (np. alkohole) mogą tworzyć się wiązania wodorowe między heteroatomem barwnika a cząsteczkami rozpuszczalnika. Może to powodować inwersję poziomów energetycznych stanów wzbudzonych cząsteczki. Przykładem takiego związku jest akrydyna, która w rozpuszczalnikach polarnych protycznych wykazuje wysoką wydajność kwantową fluorescencji. Z drugiej strony, w rozpuszczalnikach niepolarnych najniższym stanem wzbudzonym akrydyny jest stan odpowiadający przejściu wzbronionemu $n \rightarrow \pi^*$, z którego prawdopodobieństwo przejść promienistych jest znacznie mniejsze niż ze stanu $\pi \rightarrow \pi^*$. W obecności wiązań wodorowych ograniczone jest przesunięcie gęstości elektronowej z heterocyklicznego atomu azotu na orbital antywiązący π^* , co zwiększa tym samym energię stanu $n \rightarrow \pi^*$. Dla cząsteczek tego typu obserwuje się wzrost wydajności kwantowej fluorescencji, ponieważ przejście $\pi \rightarrow \pi^*$ odpowiada najniższemu wzbudzonemu stanowi energetycznemu cząsteczki, z którego wydajnie następuje przejście promieniste do stanu podstawowego [78]. Badania fotofizyczne mogą służyć również do określania obecności innych specyficznych oddziaływań niekowalencyjnych takich jak wiązania halogenowe [79, 80].

2.4.3 Agregacja

Jak wcześniej wspomniano, w przypadku znacznej zmiany polarności medium, w którym rozpuszczone są cząsteczki fluoroforu, może występować zjawisko agregacji. Proces ten może pojawić się również w roztworach o dużych stężeniach barwników. Agregaty będą wykazywały znaczące zmiany we właściwościach fotofizycznych względem pojedynczych, solwatowanych cząsteczek. Generalnie zmiany te można podzielić na dwie grupy. W pierwszej z grup, w wyniku agregacji będzie dochodziło do wygaszenia fluorescencji (ang. *Aggregation-Caused Quenching*, ACQ). W drugim przypadku, dla powstających agregatów intensywność fluorescencji w porównaniu z wolnymi cząsteczkami w roztworze może znacząco wzrastać (ang. *Aggregation-Induced Emission*, AIE). Proces wygaszania fluorescencji powodowany agregacją jest

niepożądany z punktu widzenia zastosowań. Mechanizm ACQ dotyczy większości fluoroforów, zwłaszcza o płaskiej budowie, takich jak węglowodory aromatyczne.

Gdy układ sprzężony jest płaski, wzmocnienie lub wygaszenie fluorescencji będzie zależało od wzajemnego ułożenia cząsteczek. W przypadku równolegle ułożonych molekuł, gdy odległość między sąsiednimi cząsteczkami jest bliska 3.5 \AA [81], następuje silne wygaszenie fluorescencji ze względu na dominację procesów bezpromienistych, wynikających z silnego oddziaływania pierścieni aromatycznych nakładających się boczenie. Wzbudzona cząsteczka może tworzyć ekscymery, otwierając kolejne drogi przejść bezpromienistych [82]. Dodatkowo, w widmie absorpcji agregatów zaobserwować można przesunięcie pasm w stronę wyższych energii względem pojedynczych cząsteczek w roztworze. Takie zachowanie jest charakterystyczne dla agregatów typu H, które tworzą się między innymi dla perylenu.



Rys. 2.7: Poziomy energetyczny dimerów w zależności od wzajemnego ułożenia cząsteczek (linia przerywana - przejścia wzbronione, linia ciągła - przejścia dozwolone)

Zdarza się jednak, że po agregacji związek wykazuje silną fluorescencję, a jego pasmo absorpcji przesuwa się batochromowo. Jedną z przyczyn takich zmian fotofizycznych może być geometria tworzących się agregatów. Struktury te przyjęło się nazywać agregatami typu J, od nazwiska odkrywcy tego zjawiska, Edwina Jelleya [83]. Najprostszym modelem agregatów są dimery składające się z dwóch cząsteczek fluoroforów. Jak przedstawiono na Rys. 2.7, najniższą energię stanu wzbudzonego mają układy, w których cząsteczki ułożone są względem siebie w konfiguracji „głowa do ogona”. Pierwsze teoretyczne rozważania na temat opisanej geometrii zostały przeprowadzone przez Kaszę i współpracowników już w latach 60. dwudziestego wieku. Wynika z nich, że wzajemne ułożenie cząsteczek, w którym kąt pomiędzy poszczególnymi płaszczyznami jest większy niż $54,7^\circ$, prowadzi do utworzenia struktur o nieemisyjnej naturze. Takie zachowanie jest szczególnie widoczne w przypadku cząsteczek z wewnątrzcząsteczkowym przeniesieniem ładunku [64, 84].

W podrozdziale 2.4.1 omówiono zachowanie cząsteczek rozpuszczalnika po wzbudzeniu cząsteczki, polegające na specyficznym orientowaniu się dipoli rozpuszczalnika względem wzbudzonej cząsteczki. W przypadku agregatów, dipole sąsiednich cząsteczek są już trwale zorientowane, jak w zamrożonej matrycy. Gdy w takim ułożeniu będzie dochodzić do stabilizacji stanu wzbudzonego, któremu towarzyszy zmiana momentu dipolowego, można spodziewać się występowania zjawiska wzmocnienia emisji indukowanej agregacją. Natomiast w przypadku, gdy ułożenie cząsteczek nie

2.4. Rola otoczenia cząsteczki wzbudzonej

sprzyja przejściom ze zmianą momentu dipolowego, agregacja spowoduje wygaszenie fluorescencji [85, 86].

Innym, niezwykle ważnym mechanizmem proponowanym dla wyjaśnienia zjawiska wzmocnienia fluorescencji dzięki agregacji jest ograniczenie ruchów odpowiednich grup funkcyjnych w cząsteczce barwnika (ang. *Restriction of Intramolecular Motion*, RIM). W rozcieńczonych roztworach organiczne fluorofory często wykazują słabą emisję ze względu na bezpromieniste ścieżki utraty energii, ułatwione przez ruchy wewnątrzcząsteczkowe, takie jak rotacje i drgania. Jednakże gdy cząsteczki ulegają agregacji lub krystalizują, ich ruchy wewnątrzcząsteczkowe zostają ograniczone przez otoczenie. To geometryczne ograniczenie hamuje bezpromieniste ścieżki dezaktywacji i prowadzi do emisji energii w postaci promieniowania, co objawia się znacznym wzrostem intensywności fluorescencji.

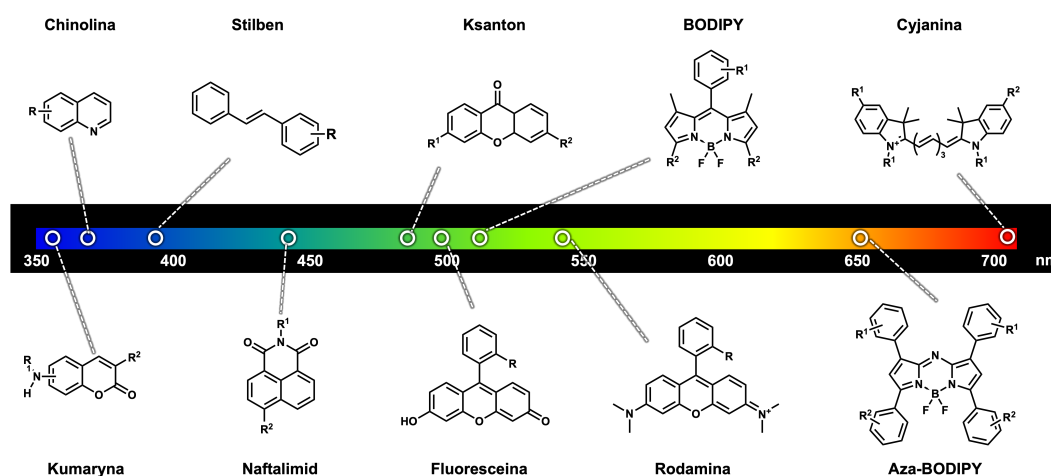
Struktury wybranych barwników fluorescencyjnych i strategię ich projektowania

Bogactwo małowartościowych barwników organicznych wynika z potrzeby dopasowania ich właściwości fotofizycznych do ciągle rozwijających się i nowych technologii. Dostrajanie właściwości fotofizycznych takich jak położenie pasma absorpcji, fluorescencji, wydajności kwantowej i czasu życia fluorescencji oraz właściwości fizykochemicznych (np. rozpuszczalność, stabilność termiczna) opiera się w zasadzie na modyfikacjach strukturalnych niewielkiej liczby rdzeni fluorescencyjnych. To pragmatyczne podejście pozwoliło wprowadzić pewne uogólnienia w relacji struktura-właściwości. Dzięki temu można znaleźć liczne przykłady zastosowania barwników organicznych w bioobrazowaniu [87–91], laserach barwnikowych [92–95], czy urządzeniach OLED [96–99]. Połączenie klasycznych strategii projektowania struktury cząsteczek z nowoczesnymi osiągnięciami w metodach syntezy umożliwiły gwałtowny wzrost liczby nowych fluoroforów.

3.1 Barwniki fluorescencyjne - budowa i właściwości

Na Rys. 3.1 przedstawiono wybrane motywy strukturalne, których nazwy powszechnie pojawiają się w opracowaniach dotyczących fotofizyki związków organicznych [87]. Dla każdej grupy związków zaznaczono typowe położenie pasma absorpcji w zakresie spektralnym od 350 do 700 nm. Chinoliny, kumaryny i stilbeny to grupy barwników absorbujących promieniowanie zwykle w zakresie ultrafioletu. Do pierw-

szej grupy wymienionych związków należy siarczan chinoliny, który jest fotostabilny i posiada wysoką wydajność kwantową fluorescencji, dzięki czemu stosowany jest jako standard do względnego wyznaczania wydajności kwantowej fluorescencji barwników o podobnym położeniu pasm absorpcji i fluorescencji [100, 101]. Inną grupą związków o położeniu maksimum absorpcji w zakresie UV są kumaryny, które stanowią szeroką klasę naturalnych produktów, farmaceutyków i fluoroforów. Ze względu na silny efekt solwatochromowy, te pochodne często wykorzystywane są do badań zmian polarności mikrośrodowiska [102, 103] lub do detekcji jonów [104, 105]. Ciekawą klasę związków stanowią silbeny, które pod wpływem promieniowania mogą ulegać fotoizomeryzacji, zmieniając konfigurację wokół wiązania podwójnego, co znajduje zastosowanie w tzw. przełącznikach molekularnych [106–108].



Rys. 3.1: Wybrane rdzenie fluorescencyjne do zastosowań w bioobrazowaniu

Popularną grupę fluoroforów absorbujących promieniowanie w zakresie widzialnym stanowią naftalimidy. Odpowiednie modyfikacje strukturalne pozwalają na wykorzystanie tej grupy związków np. do selektywnego wykrywania metali ciężkich w żywych komórkach [109, 110]. Inne pochodne znajdują zastosowanie w bioobrazowaniu organelli komórkowych takich jak mitochondria, aparaty Golgiego, czy lizosomy [111].

Najpowszechniej stosowanymi fluoroforami są pochodne ksantenu, do których należy fluoresceina i rodamina. Fluoresceina jest jednym z niewielu barwników dopuszczonych w diagnostyce medycznej. Służy do bioobrazowania naczyń krwionośnych dna oka [112, 113]. Analogiem fluoresceiny jest rodamina, w strukturze której znajdują się grupy aminowe o charakterze silnie elektronodonorowym, powodujące batochromowe przesunięcie maksimum absorpcji. Pochodne rodaminy są powszechnie stosowane w mikroskopii fluorescencyjnej np. do obrazowania mitochondriów komórkowych [114, 115]. Barwniki te charakteryzują się wysoką wydajnością kwantową fluorescencji i biokompatybilnością.

Inną klasą związków o wysokiej wydajności kwantowej fluorescencji są BODIPY, których pasmo absorpcyjne położone jest powyżej 500 nm [116, 117]. Wydajność kwantowa fluorescencji powyżej 90% sprawia, że związki tej grupy znalazły powszechne zastosowanie jako znaczniki fluorescencyjne białek [118–120] i DNA [121]. Wadą tych barwników jest jednak zwykle małe przesunięcie Stokesa, powodujące re-

absorbpcję emitowanego promieniowania. Problem ten nie występuje, gdy atom węgla w pozycji *meso*– zostanie zastąpiony atomem azotu – mamy wówczas do czynienia z tzw. aza-BODIPY. Dzięki wprowadzeniu dodatkowych pierścieni aromatycznych do ich struktury, ich absorpcja znacznie się przesuwają, do ok. 650 – 700 nm [122, 123]. Wadą tych barwników jest natomiast znaczny spadek wydajności kwantowej fluorescencji w odniesieniu do BODIPY-ów [124]. Mimo to pojawiają się doniesienia literaturowe o możliwych aplikacjach w diagnostyce i leczeniu nowotworów za pomocą związków z grupy aza-BODIPY [125, 126].

Kolejnym rdzeniem fluorescencyjnym, którego liczne modyfikacje znajdują potencjalne zastosowanie, jest cyjanina. W zależności od długości mostka π -elektronowego między heterocyklicznymi układami, możliwa jest zmiana położenia pasma absorpcyjnego tych związków [127, 128]. Zielen indocyjanowa stanowi przykład związku fluorescencyjnego, który powszechnie wykorzystywany jest w diagnostyce medycznej. Jej iniekcja dożylna umożliwia obrazowanie naczyń krwionośnych w oku, sercu i wątrobie [129].

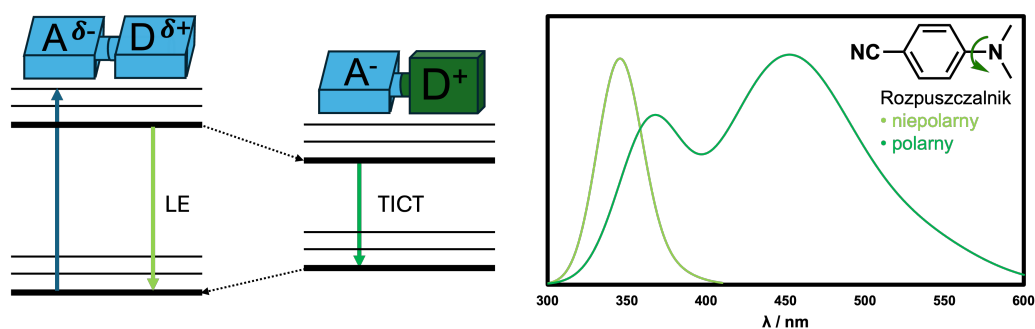
Ten krótki spis podstawowych platform strukturalnych barwników fluorescencyjnych pokazuje ich ogromny potencjał aplikacyjny. Należy jednak wyraźnie podkreślić, że w przypadku bioobrazowania nadal istnieje duże zapotrzebowanie na idealne sondy fluorescencyjne do prowadzenia diagnostyki *in vivo*. Główną przeszkodą w użyciu większości z wyżej wymienionych związków jest położenie maksimum absorpcji, ograniczona selektywność i toksyczność. W celu uniknięcia silnej absorpcji promieniowania wzbudzającego przez tkanki i autofluorescencji komórek konieczne jest przesunięcie maksimum absorpcji sond fluorescencyjnych ku czerwieni. Oznacza to, że położenie maksimum absorpcji barwnika powinno mieścić się w tzw. oknie biologicznym, czyli w zakresie od 650 do 1000 nm [130]. Jest to możliwe do osiągnięcia przez racjonalnie zaplanowane modyfikacje strukturalne zwiększające liczbę elektronów π w układzie sprzężonym, co jednak może obniżyć wydajność kwantową fluorescencji. Innym rozwiązaniem jest wykorzystanie barwników zdolnych do absorpcji dwufotonowej [131–133]. Do wzbudzenia takiej cząsteczki wymagana jest energia fotonów o dwukrotnie mniejszej energii niż przy wzbudzeniu jednofotonowym. Barwniki, które można wzbudzić dwufotonowo powszechnie wykorzystuje się w mikroskopii dwufotonowej. W przypadku ograniczeń wynikających z selektywności i toksyczności konieczna jest synteza barwników, których właściwości fotofizyczne (wydajność kwantowa fluorescencji, położenie pasma emisji) silnie zależą od środowiska (lepkości, polarności, pH), w którym cząsteczka się znajduje. Powoduje to zmniejszenie stężenia barwnika wymaganego do uzyskania dobrej jakości obrazu. Wszystkie te warunki mogą zostać spełnione dla związków z wewnątrzcząsteczkowym przeniesieniem ładunku [134], których przykłady zostały przedstawione poniżej.

3.1.1 Fluorofory z wewnątrzcząsteczkowym przeniesieniem ładunku

Zmiany momentów dipolowych podczas wzbudzenia elektronowego są kluczowym czynnikiem wpływającym na właściwości fotofizyczne barwników fluorescencyjnych. Momenty dipolowe są determinowane przede wszystkim przez redystrybucję ładunku w wyniku wzbudzenia i często wynikającą z tego zmianę geometrii

cząsteczki. Zmiany momentów dipolowych są szczególnie istotne w przypadku pobudzenia cząsteczki ze stanu podstawowego do stanu wzbudzonego wykazującego wewnątrzcząsteczkowe przeniesienie ładunku. Aby zakwalifikować barwnik do grupy ICT, w cząsteczce trzeba móc wyróżnić dwie części: donor (np. $-\text{NMe}_2$, $-\text{OCH}_3$) i akceptor (np. $-\text{CF}_3$, $-\text{CN}$) elektronów. Wzbudzenie takiego układu powoduje niemal natychmiastową zmianę momentu dipolowego. Można to zobrazować na przykładzie aniliny, nitrobenzenu i 4-nitroaniliny analizując, jak różni się moment dipolowy cząsteczki w stanie podstawowym i wzbudzonym. Obecność silnego donora elektronów w anilinie powoduje niewielkie zmiany momentu dipolowego cząsteczki podczas wzbudzenia, $\Delta\mu = 0.84$ D. W przypadku nitrobenzenu różnica momentów dipolowych wynosi 2.37 D. Jednak największa różnica, $\Delta\mu = \mu_w - \mu_p$ uzyskana jest dla 4-nitroaniliny i wynosi 6.62 D [135]. W przypadku ostatniej cząsteczki, zmiana rozkładu ładunku między stanem podstawowym i wzbudzonym jest na tyle duża, że możemy mówić o typowym przejściu elektronowym związanym z wewnątrzcząsteczkowym przeniesieniem ładunku. Co ciekawe, w izomerach 2- i 3-nitroaniliny charakter ICT stanu wzbudzonego nie powoduje tak wyraźnych zmian momentu dipolowego. Pokazuje to, że położenie podstawników ma istotny wpływ na rozkład ładunku w stanach wzbudzonych.

Szczególnym przypadkiem przejść związanych z przeniesieniem ładunku jest sytuacja, gdy stan wzbudzony lokalnie (ang. *Locally Excited*, LE) nie osiąga stanu równowagi z otaczającymi cząsteczkami rozpuszczalnika, jeśli te są polarne. W tej sytuacji może następować rotacja fragmentów cząsteczki prowadząca do ustalenia stanu równowagi między cząsteczką i powłoką solwatacyjną.



Rys. 3.2: Schemat Jabłońskiego dla barwników TICT ze wskazaniem możliwych przejść promienistych oraz wizualizacja widm emisyjnych DMABN w zależności od rozpuszczalnika

Typowym omawianym przykładem związku wykazującego ICT jest 4-*N,N*-dimetyloaminobenzonitryl (DMABN) [136–138]. W stanie podstawowym cząsteczka jest prawie płaska, co odpowiada maksymalnemu sprzężeniu pomiędzy grupą $-\text{NMe}_2$, a pierścieniem fenyłowym. Po wzbudzeniu następuje skręcenie grupy dimetyloaminowej o 90° , co powoduje relaksację rozpuszczalnika. W powstałym skręconym stanie cząsteczki z wewnątrzcząsteczkowym przeniesieniem ładunku (ang. *Twisted Intramolecular Charge Transfer*, TICT) następuje całkowite rozdzielenie ładunku pomiędzy grupą dimetyloaminową i resztą cząsteczki. Stan ten jest stabilizowany przez cząsteczki polarnego rozpuszczalnika. W związku z tym obserwujemy dwa pasma fluorescencji

w rozpuszczalnikach polarnych: jedno wynikające z emisji ze stanu LE, oraz drugie – batochromowo przesunięte pasmo emisyjne, odpowiadające emisji ze stanu TICT [139, 140]. Podwójna fluorescencja i skręcenie pod kątem prostym (wymagane do pełnego rozdzielania ładunków cząstkowych) są stosunkowo rzadko spotykane, jednak mniejsza rotacja odpowiednich fragmentów cząsteczki, towarzysząca relaksacji rozpuszczalnika, zachodzi w wielu fluoroforach [141]. W licznych związkach wykazujących TICT przejścia promieniste pochodzą głównie ze stanu LE, a jednocześnie za przejścia bezpromieniste odpowiada głównie stan TICT, ponieważ przejście z tego stanu jest zwykle wzbronione. Oznacza to, że w większości przypadków rotacja wokół wiązania pojedynczego może prowadzić do bezpromienistych przejść elektronowych. Przykładem takiego związku jest Tioflawina T. W roztworze wodnym Tioflawina T (ThT) wykazuje niską wydajność kwantową fluorescencji. W lepkim środowisku następuje wzrost fluorescencji ThT, wynikający z zachodzenia procesu promienistego szybszego niż odpowiednie procesy bezpromieniste. Właściwość ta została wykorzystana w bioobrazowaniu złogów amyloidowych: cząsteczka barwnika lokująca się w strukturze białka zostaje unieruchomiona, co pozwala na identyfikację konkretnych struktur białkowych dzięki wyraźnemu wzrostowi fluorescencji próbki. Często w literaturze takie związki, posiadające grupę akceptorową/donorową rozdzielone wiązaniem pojedynczym, określa się mianem rotorów molekularnych (ang. *molecular rotors*), pod warunkiem udowodnienia wpływu rotacji na właściwości emisyjne.

3.2 Strategie projektowania fluoroforów

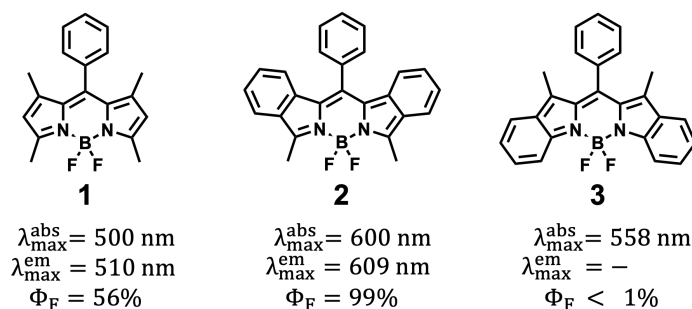
W tym rozdziale przedstawione zostaną wybrane strategie pozwalające otrzymać nowe fluorofory o określonych właściwościach fotofizycznych. Przed rozpoczęciem projektowania barwnika należy odpowiedzieć na zasadnicze pytanie: jakie właściwości są potrzebne? W ogólności należy pamiętać, że nie same zoptymalizowane właściwości fotofizyczne cząsteczki gwarantują możliwość jej stosowania w bioobrazowaniu – należy także brać pod uwagę rozpuszczalność, hydrofilowość, toksyczność i inne cechy badanych związków. Z punktu widzenia praktycznego zastosowania np. w mikroskopii fluorescencyjnej, w celu zapewnienia odpowiedniego obrazu pod mikroskopem, barwnik musi wnikać do odpowiedniej struktury biologicznej, a następnie zmienić swoje właściwości optyczne ze względu na lokalne środowisko [142]. Inne strategie projektowania sond fluorescencyjnych obejmują cząsteczki, które pod wpływem składników środowiska ulegają przemianom chemicznym powodującym pojawienie się fluorescencji. Kolejna strategia polega na chemicznym przyłączeniu wydajnie emitującego fluoroforu do biocząsteczki (DNA, przeciwciała, białka), która z kolei selektywnie trafia do obrazowanego miejsca [143–146]. Jednak do celów niniejszej rozprawy organiczmy rozważania wyłącznie do zagadnień fotofizycznych. W oparciu o dostępne opracowania możliwe jest zebranie pewnych zasad projektowania barwników fluorescencyjnych o właściwościach dopasowanych do potrzeb aplikacyjnych. Następnie synteza i badanie właściwości takich związków pozwalają na weryfikację postawionej hipotezy oraz wprowadzenia uogólnień, co nie zawsze jest zbieżne z intuicją chemiczną.

W podrozdziale 2.3 stwierdzono, że długość fali w maksimum absorpcji i emisji oraz czas życia i wydajność kwantowa fluorescencji to najważniejsze właściwości charakteryzujące barwniki fluorescencyjne w danym środowisku. Zmiany tych właściwości w stosunku do niezmodyfikowanego rdzenia fluorescencyjnego można uzyskać, między innymi, poprzez benzoannulację, wydłużenie układu zdelokalizowanych wiązań π czy wprowadzenie do struktury barwników podstawników o różnych właściwościach elektronowych.

3.2.1 Benzoannulacja

Benzoannulacja to wprowadzenie dodatkowych pierścieni aromatycznych do rdzenia fluorescencyjnego w celu powiększenia sprzężenia π -elektronowego. W wyniku tego zabiegu zwykle dochodzi do przesunięcia maksimum absorpcji i emisji w stronę niższych energii. Tę prostą regułę można zilustrować za pomocą wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych. W szeregu naftalen, antracen, naftacen, pentacen, wraz z ilością sprzężonych pierścieni aromatycznych, zmniejsza się energia między stanem podstawowym a pierwszym stanem wzbudzonym tych cząsteczek. Zatem cząsteczki te emitują odpowiednio promieniowanie ultrafioletowe, odpowiadające barwie fioletowej, zielonej i czerwonej. Z wyjątkiem naftalenu, wymienione związki wykazują stosunkowo wysoką wydajność kwantową fluorescencji [147].

W literaturze można znaleźć liczne przykłady stosowania benzoannulacji i wynikające z niej batochromowe zmiany położenia pasm absorpcji i fluorescencji. Nie zawsze jednak zabieg taki jest efektywny, ze względu na zmianę poziomów energetycznych stanów trypletowych, umożliwiających przejścia bezpromieniste.

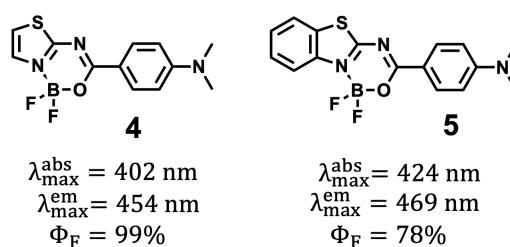


Rys. 3.3: Przykład fluoroforów typu BODIPY z dodatkowymi, sprzężonymi, pierścieniami

Wpływ benzoannulacji na właściwości fotofizyczne cząsteczek ilustruje przykład serii pochodnych BODIPY z Rys. 3.3. Dla związku **1** można wprowadzić dodatkowe pierścienie aromatyczne w pozycji [a], otrzymując związek **2**, albo [b], co prowadzi do związku **3** [148]. Związek **1** wykazuje wysoką wydajność kwantową fluorescencji i długość fali w maksimum absorpcji w THF wynoszącą 500 nm [149]. Dodatkowe dwa pierścienie w strukturze związku w pozycji [a] powodują przesunięcie maksimum absorpcji o 100 nm. Podobną zmianę można zauważyć dla maksimum emisji mierzonej w tetrahydrofuranie (609 vs 510 nm) [150]. Istotna różnica w tej serii cząsteczek widoczna jest w przypadku wydajności kwantowej fluorescencji. Związek **2** wykazuje blisko dwukrotnie większą wydajność kwantową fluorescencji w sto-

3.2. Strategie projektowania fluoroforów

sunku do związku **1**: wynoszą one odpowiednio 99 i 56%. Wynika to z usztywnienia struktury przez wprowadzenie dodatkowych pierścieni aromatycznych. Ponadto, pierścień aromatyczny C₆H₅– w pozycji *meso*– może mieć większą swobodę obrotu w cząsteczce **1** niż w **2**. Niewielka zmiana strukturalna związana z obecnością dodatkowych pierścieni aromatycznych w pozycji [b] związku **3** powoduje batochromowe przesunięcie maksimum absorpcji o 58 nm względem związku **1**, jednak całkowicie wygaszona zostaje fluorescencja tego barwnika. Wyniki obliczeń wskazują, że taki układ pierścieni wykazuje silne sprzężenie spin-orbita, umożliwiając przejścia międzysystemowe, a następnie bezpromienistą konwersję do stanu podstawowego [151].

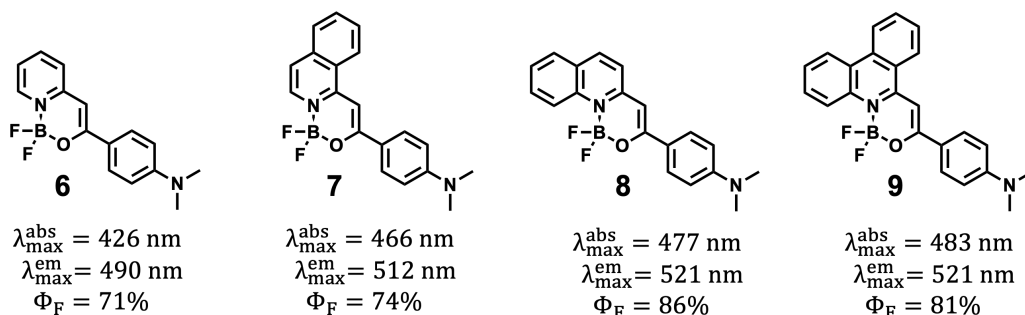


Rys. 3.4: Difluorobory (BF₂) z rdzeniem fluorescencyjnym opartym na tiazolu i benzotiazolu

Kolejnego przykładu zmian właściwości fotofizycznych związanych z obecnością dodatkowego, skumulowanego, pierścienia aromatycznego w cząsteczce dostarczają pochodne tiazolu (związek **4**) i benzotiazolu (związek **5**), przedstawione na Rys. 3.4. Dla tych cząsteczek benzoannulacja powoduje przesunięcie maksimum pasma absorpcyjnego z 402 do 424 nm w THF. Podobne przesunięcie można zaobserwować w przypadku maksimum emisji związków **4** i **5** – wynosi ono 15 nm. Wydajność kwantowa fluorescencji dla obu barwników jest wysoka w THF, jednak istotnie zmniejsza się w rozpuszczalnikach o dużej polarności: w acetonitrylu wynosi 10 i 17% odpowiednio dla związku **4** i **5** [152, 153]. Na podstawie przedstawionych wyników można stwierdzić, że dla tych cząsteczek benzoannulacja nie zmienia istotnie charakteru ICT przejść elektronowych.

W literaturze można znaleźć również przykłady związków o różnym miejscu połączenia dodatkowych pierścieni aromatycznych w rdzeniu fluorescencyjnym cząsteczki. Związki przedstawione na Rys. 3.5, podobnie jak struktury **4** i **5**, należą do klasy difluoroboranów. Związek **6** zawiera pierścień pirydynowy, co w przypadku benzoannulacji prowadzi do otrzymania pochodnej izochinolinowej **7** oraz chinolinowej **8**. Dodanie dwóch dodatkowych pierścieni aromatycznych jednocześnie prowadzi do pochodnej fenantrydynowej **9**. Dla przedstawionych struktur porównano właściwości fotofizyczne w chloroformie. Można zauważyć, że dodatkowe pierścienie aromatyczne wpływają na położenie maksimum absorpcji i fluorescencji, przesuwać je batochromowo. Maksimum absorpcji dla pochodnej pirydynowej **6** wynosi 426 nm. Benzoannulacja „pojedyncza” powoduje przesunięcie maksimum absorpcji o 40 i 51 nm odpowiednio dla pochodnych **7** i **8**. Dla pochodnej fenantrydynowej **9** długość fali w maksimum absorpcji wynosi 483 nm, czyli o 57 nm więcej niż dla pochodnej **6**. Podobne zmiany można zaobserwować w przypadku położenia maksimum emisji. W związku z usztywnieniem cząsteczek spowodowanym benzoannulacją, wy-

dajność kwantowa fluorescencji pochodnych **7**, **8**, **9** wzrosła chloroformie względem struktury **6**. Przesunięcie Stokesa dla tych struktur maleje w szeregu pochodnych od izochinolinowej i chinolinowej do fenantrydynowej. Należy zwrócić uwagę, że efekt podwójnej benzoannulacji nie jest prostą sumą efektów „pojedynczych” obserwowanych w przedstawionej serii związków, zwłaszcza dla właściwości emisyjnych [35, 154].

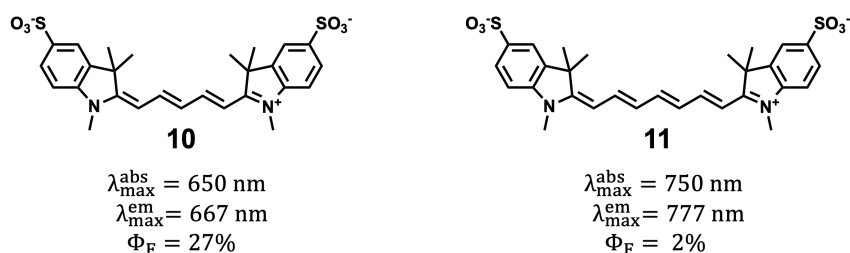


Rys. 3.5: Przykłady benzoannulacji w difluoroborach

Benzoannulacja jest dobrym sposobem na modyfikację właściwości fotofizycznych takich jak położenie pasm absorpcji i emisji, jednak obecność dodatkowych układów π -elektronowych może zmieniać możliwe drogi powrotu wzbudzonej cząsteczki do stanu podstawowego. W przypadku, gdy struktura barwnika jest płaska, obecność dodatkowych pierścieni aromatycznych w strukturze stwarza możliwości łatwej agregacji przy stosunkowo niskich stężeniach, czego wynikiem może być obniżenie lub całkowite wygaszenie emisji (ACQ).

3.2.2 Mostek π -elektronowy

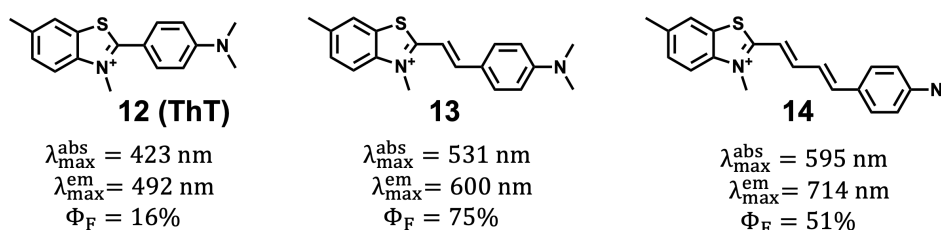
Wydłużenie sprzężonego układu przez dodanie odpowiednich mostków zawierających elektrony π jest kolejną strategią szeroko stosowaną w projektowaniu sond fluorescencyjnych. Podobnie jak w przypadku benzoannulacji, taki mostek może znacząco wpływać na właściwości fotofizyczne barwników. Już w latach 40. ubiegłego wieku pojawiały się prace teoretyczne opisujące, jak długość sprzężonego układu elektronów π wpływa na absorpcję promieniowania elektromagnetycznego [155]. Przykładem mostków π -elektronowych mogą być wiązania podwójne, potrójne lub pierścienie aromatyczne połączone wiązaniami pojedynczymi z kolejnymi fragmentami barwnika. Takimi elementami struktury fluoroforów mogą być również pierścienie heterocykliczne lub inne, bardziej rozbudowane układy.



Rys. 3.6: Barwniki cyjaninowe o różnej długości mostka π -elektronowego w strukturze

3.2. Strategie projektowania fluoroforów

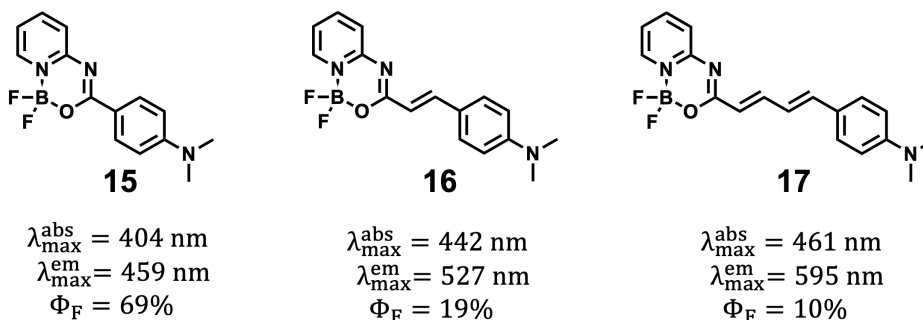
Barwniki cyjaninowe są doskonałą platformą do testowania wpływu wielkości sprzężonego układu elektronów π na właściwości fotofizyczne barwników. W strukturze tych cząsteczek dwie grupy indolowe połączone są ze sobą mostkiem ze sprzężonych wiązań podwójnych. W zależności od liczby wiązań podwójnych w układzie, możliwe jest kontrolowane dostrajanie położenia maksimum absorpcji i fluorescencji. Przyjmuje się, że każde dodatkowe wiązanie podwójne w tych układach przesuwają maksimum absorpcji nawet o 100 nm [156]. Na Rys. 3.6 przedstawiono przykład takich zmian fotofizycznych dla dwóch związków **10** i **11**. Cyjanina **10**, o mostku zbudowanym z trzech jednostek metinowych, wykazuje maksimum absorpcji przy długości fali 650 nm, natomiast **11**, z mostkiem zawierającym cztery wiązania podwójne, przy długości fali 750 nm (zmierzone w buforze fosforanowym, PBS). Ponieważ symetryczne barwniki cyjaninowe wykazują stosunkowo małe przesunięcie Stokesa, zmiana położenia maksimum emisji dla omawianych przykładów przy wydłużaniu sprzężonego układu wiązań π jest podobna, jak dla pasm absorpcyjnych [157]. Wydłużenie mostka π -elektronowego pomiędzy dwiema grupami indolowymi powoduje natomiast spadek wydajności kwantowej fluorescencji w PBS z 27 do 2% odpowiednio w barwnikach **10** i **11**. Podobne zachowanie można zaobserwować dla innych barwników cyjaninowych [158].



Rys. 3.7: Tioflawina T i jej pochodne z różną liczbą grup metinowych

Modyfikacja ilości grup metinowych pomiędzy grupą donorową i akceptorową w cząsteczkach wykazujących wewnątrzcząsteczkowe przeniesienie ładunku umożliwia również zwiększenie czułości barwników na zmiany lepkości roztworu. Takie podejście zaproponowano dla Tioflawiny T (**12**), dla której otrzymano pochodne z jednym (**13**) i dwoma (**14**) wiązaniami podwójnymi między donorem ($-\text{NMe}_2$) i akceptorem (benzotiazolem). Na Rys. 3.7 zestawiono badane struktury wraz z danymi fotofizycznymi zmierzonymi dla ich roztworów w glicerynie. Długość fali w maksimum absorpcji w lepkim rozpuszczalniku zmienia się o 108 nm dla związku **13** w stosunku do ThT (**12**). Różnica $\lambda_{\max}^{\text{abs}}$ między **13** a **14** wynosi 64 nm. Wydajność kwantowa fluorescencji dla tych barwników rośnie w szeregu **12**, **14**, **13** i wynosi odpowiednio 16, 51 i 75%. W tej samej kolejności maleje przesunięcie Stokesa. Przedstawione na Rys. 3.7 fluorofory wykazują bardzo małą intensywność fluorescencji w metanolu i dioksanie. Dopiero w lepkim ośrodku możliwe jest promieniste przejście do stanu podstawowego, bez rotacji i towarzyszącym jej przejściom bezpromienistym [159], co wskazuje na charakter TICT tych związków.

Podobne zmiany właściwości fotofizycznych można zaobserwować w przypadku barwników zawierających grupę BF_2 . W serii związków od **15** do **17** pojawienie się wiązań podwójnych między donorem elektronów a ich akceptorem powoduje zmianę długości fali w maksimum absorpcji, wyznaczonej w chloroformie, z 404 nm do 442

Rys. 3.8: Difluoroboryl z mostkami π -elektronowymi o różnej długości

i 461 nm odpowiednio dla cząsteczek **15**, **16** i **17**. Przesunięcie Stokesa w przypadku tych związków koreluje z liczbą elektronów w mostku π -elektronowym. Dla badanych fluoroforów zmierzono również wydajności kwantowe fluorescencji. W omawianym szeregu, związek **15** charakteryzował się najwyższą wydajnością kwantową fluorescencji, podczas gdy dla **16** zaobserwowano wartość znacznie niższą, 19%. Najniższą wydajności kwantową fluorescencji posiadał związek **17**. W tym przypadku widać wyraźnie, że wydłużenie łącznika π -elektronowego między donorem i akceptorem, powoduje przewidywalne zmiany w widmach absorpcji i emisji. Dodatkowo dla barwnika **17** zaobserwowano największą wrażliwość na zmiany polarności rozpuszczalnika: maksimum fluorescencji przesunęło się batochromowo o 128 nm wraz ze wzrostem polarności, porównując widma zarejestrowane w metylocykloheksanie i dimetyloformamidzie [160].

3.2.3 Rola podstawnika

Podstawienie fluoroforów grupami funkcyjnymi może być podyktowane wieloma względami. Niektóre grupy poprawiają rozpuszczalność w wodzie (np. $-\text{SO}_3\text{Na}$, $-\text{COONa}$), inne powodują, że barwniki są czułe na zmiany pH (np. $-\text{OH}$, $-\text{NH}_2$), zaś podstawniki o dużych rozmiarach mogą uniemożliwiać wygaszenie fluorescencji pod wpływem agregacji, zapobiegając nadmiernemu zbliżaniu się cząsteczek do siebie ($-t\text{Bu}$, $-\text{CPh}_3$). Należy pamiętać, że funkcjonalizowanie rdzeni fluorescencyjnych wpływa na strukturę elektronową cząsteczki, co daje efekt w postaci zmiany właściwości fotofizycznych.

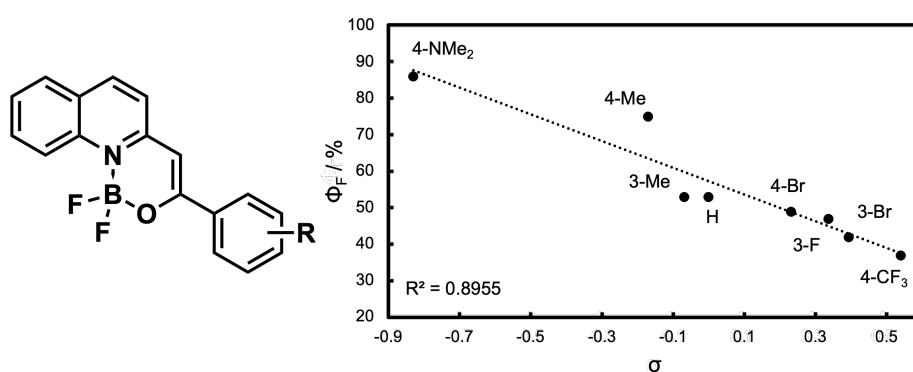
Podstawienie grupami silnie donorowymi w cząsteczkach węglowodorów aromatycznych wywołuje szereg zmian w ich właściwościach spektralnych. Dzięki efektowi rezonansowemu, wolne pary elektronowe atomu azotu grupy aminowej i tlenu grupy hydroksylowej sprzęgają się ze zdelokalizowanymi elektronami π . W związku z tym obserwuje się wzrost molowego współczynnika absorpcji i batochromowe przesunięcie zarówno widm absorpcji, jak i fluorescencji. Dodatkowo zmienia się kształt pasm, które ulegają poszerzeniu i tracą strukturę wibracyjną w porównaniu z widmami niepodstawionych związków. Wynika to z silnego efektu wewnątrzcząsteczkowego przeniesienia ładunku. Związki posiadające podstawniki donorowe zwykle posiadają wysokie wydajności kwantowe fluorescencji i wykazują znaczne zmiany intensywności fluorescencji wraz ze zmianą polarności rozpuszczalnika. W związku z tym, grupa

3.2. Strategie projektowania fluoroforów

aminowa często jest podstawnikiem pierwszego wyboru w projektowaniu nowych sond fluorescencyjnych.

Dla pochodnych zawierających grupy elektronoakceptorowe, takie jak grupa nitrowa lub karbonylowa, na opis przemian fotofizycznych wpływa wiele czynników. Ogólnie przyjmuje się, że obecność grupy $-\text{NO}_2$ w strukturze związków wygasza ich fluorescencję [161]. Stany wzbudzone $\pi \rightarrow \pi^*$ oraz $n \rightarrow \pi^*$ o różnej multipletowości w pochodnych nitrowych mogą posiadać zbliżone energie, co będzie sprzyjało przejściom międzysystemowym i wygaszeniu emisji. Dodatkowo, rotacja grupy nitrowej wokół wiązania węgiel-azot może prowadzić do powstawania przecięć stożkowych między stanami wzbudzonymi a stanem podstawowym [161], otwierając kolejną ścieżkę bezpromienistej dezaktywacji.

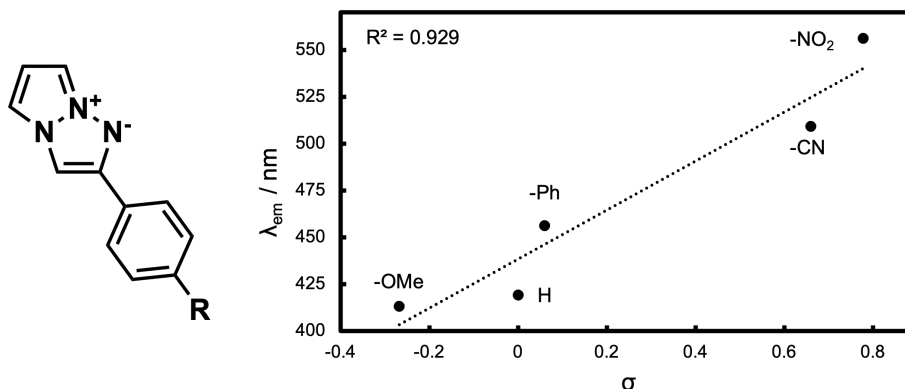
Do interpretacji wpływu podstawnika na właściwości fotofizyczne barwników fluorescencyjnych przydatna okazuje się stała Hammetta, która początkowo służyła do wyznaczenia wpływu podstawnika na szybkość reakcji chemicznych [162]. Przy uporządkowanych badaniach cząsteczek o systematycznie zmieniających się podstawnikach w rdzeniu fluorescencyjnym można zaobserwować, że zmiany fotofizyczne korelują ze stałą podstawnikową opisującą charakter donorowo-akceptorowy odpowiednich grup. Przykładem takiej zależności jest liniowa zmiany wydajności kwantowej fluorescencji dla barwników zawierających w swojej strukturze chinolinę. Dla cząsteczki posiadającej w strukturze donor elektronów, grupę $-\text{NMe}_2$, wydajność kwantowa fluorescencji jest wysoka i wynosi 96%. Najniższą wartość, $\Phi_F = 37\%$, wykazuje związek z podstawnikiem o charakterze akceptorowym, $-\text{CF}_3$. Na Rys. 3.9 wykreślono zmiany wydajności kwantowej fluorescencji w całej serii związków wraz ze zmianą wartości stałej Hammetta σ . Uzyskany współczynnik korelacji między tymi wielkościami wynosi $R^2 = 0.90$ [163]. Równie dobry wynik korelacji z stałą podstawnikową wykazują stałe szybkości przejść bezpromienistych k_{nr} : tu współczynnik korelacji jest większy niż 0.90, natomiast w przypadku stałych szybkości przejść promienistych nie ma wyraźniej zależności ze stałą podstawnikową. Stąd można wysnuć wniosek, że wydajność kwantowa fluorescencji jest ściśle zależna od sumy efektów prowadzących do przejść bezpromienistych.



Rys. 3.9: Zależność wydajności kwantowej fluorescencji Φ_F barwników o różnych podstawnikach w pierścieniu fenylowym od stałej Hammetta σ

W innej serii barwników fluorescencyjnych, zawierających układ triazapentalenu, to długość fali w maksimum emisji, mieszcząca się w przedziale od 413 do 556 nm,

koreluje ze stałą Hammetta. W tym przypadku najniższą wartość odpowiedniej długości fali otrzymano dla pochodnej podstawionej grupą $-OMe$, a najwyższą dla pochodnej nitrowej (Rys. 3.10). W przypadku tych pochodnych nie zauważono liniowej zależności wydajności kwantowej fluorescencji od stałej Hammetta [164].



Rys. 3.10: Zależność długości fali w maksimum emisji barwników o różnych podstawnikach w pierścieniu fenylowym od stałej Hammetta σ

Przedstawione przykłady wskazują możliwe sposoby manipulowania wybranymi właściwościami fotofizycznymi poprzez niewielkie zmiany strukturalne. Niestety nie zawsze zależności tego rodzaju występują, a nawet gdy pojawia się zadowalająca korelacja, nie musi obejmować wszystkich danych fotofizycznych. Pokazuje to, że konieczne jest kontynuowanie badań związanych z wpływem podstawnika na właściwości fotofizyczne barwników fluorescencyjnych.

Cel i metodologia badań

4.1 Cel pracy

Punktem wyjścia do projektowania fluoroforów w ramach niniejszej rozprawy jest struktura Tioflawiny T (ThT, Rys. 3.7), najczęściej stosowanego barwnika fluorescencyjnego, wiążącego się z amyloidami [165]. Tioflawina T należy do rotorów molekularnych, w których podstawnik *N,N*-dimetyloaminowy przyłączony jest do pierścienia fenyłowego, a po jego przeciwnej stronie znajduje się heterocykliczny układ benzotiazolu, pełniący rolę akceptora elektronów. Obecność wiązania pojedynczego C-C łączącego rdzeń heterocykliczny z pierścieniem fenyłowym umożliwia swobodną rotację fragmentów cząsteczki względem siebie. To powoduje wrażliwość tego układu na lepkość i polarność środowiska, co jest kluczowe w przypadku jego potencjalnych zastosowań do detekcji złogów białkowych. Niestety, wykorzystanie Tioflawiny T *in vivo* jest ograniczone ze względu na długość fali absorpcji wynoszącej 412 nm w roztworze [166] oraz 438 nm po związaniu z amyloidami. Dzieje się tak ponieważ tkanki zwierzęce nie są transparentne dla promieniowania w tym zakresie długości fal.

W celu poprawienia właściwości fotofizycznych Tioflawiny T z jednoczesnym zachowaniem jej zalet, zmodyfikowano strukturę do niej zbliżoną poprzez usztywnienie cząsteczki za pomocą znanego fragmentu charakterystycznego dla fluoroforów wykazujących wysoką wydajność kwantową fluorescencji: grupy BF₂. Grupa ta, obecna w strukturze barwników typu BODIPY, ma także charakter akceptora elektronów. Niestety, istotną wadą barwników z rodziny BODIPY jest małe przesunięcie Stokesa (5 - 15 nm), co ogranicza ich wykorzystanie w bioobrazowaniu z powodu możliwej reabsorpcji emitowanego promieniowania [167]. Zatem dla potencjalnych zastosowań biomedycznych, niezbędne jest zaproponowanie dalszych modyfikacji strukturalnych

fluoroforów w celu otrzymania układów absorbujących promieniowanie powyżej 400 nm, które przy zachowaniu wysokiej wydajności kwantowej fluorescencji będą wykazywały jednocześnie duże przesunięcie Stokesa.

Badania przedstawione w kolejnych częściach rozprawy mają stanowić weryfikację następującej hipotezy: *za pomocą odpowiednich zmian struktury cząsteczki chemicznej możliwe jest modyfikowanie właściwości fotofizycznych barwników fluorescencyjnych znajdujących się w środowisku o różnej polarności i lepkości oraz optymalizacja budowy szkieletu barwnika fluorescencyjnego, opartego o strukturę Tioflawiny T, wprowadza nowe możliwości stosowania barwników zawierających fragment benzotiazolowy w bio-obrazowaniu.*

Dla uzyskania odpowiedzi na tak postawione pytania sformułowano następujące szczegółowe cele badawcze:

1. Ocena wpływu podstawników wprowadzanych do struktury fluoroforów na właściwości fotofizyczne barwników.
2. Zbadanie wpływu lepkości i polarności wybranych rozpuszczalników na właściwości fotofizyczne zaprojektowanych związków.
3. Weryfikacja wpływu agregacji fluoroforów na ich właściwości fotofizyczne.
4. Uogólnienie uzyskanych wyników poprzez skorelowanie struktury chemicznej fluoroforów z ich właściwościami fotofizycznymi i zaproponowanie mechanizmów wyjaśniających obserwowane eksperymentalnie zjawiska.
5. Ocena przydatności otrzymanych barwników do zastosowań związanych z detekcją złogów amyloidowych.

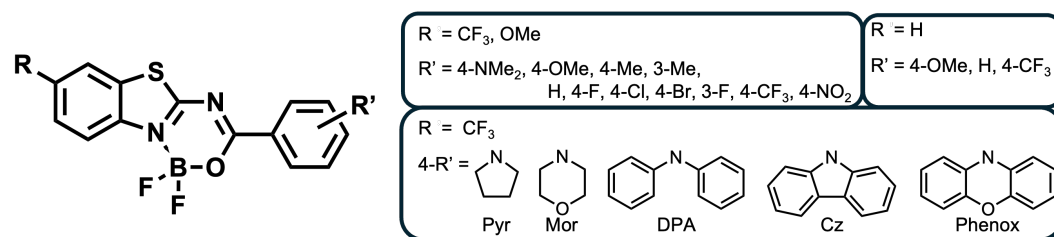
Realizacji tych celów służyły następujące zadania badawcze:

- Zaprojektowanie struktury barwników na podstawie danych literaturowych.
- Synteza trzech serii fluoroforów organicznych z podstawnikami o zróżnicowanych właściwościach donorowo-akceptorowych i wielkości.
- Wykonanie pomiarów fotofizycznych dla badanych serii barwników w rozpuszczalnikach o różnej polarności i ich mieszaninach.
- Wykonanie analogicznych pomiarów fotofizycznych dla wybranych barwników w roztworach o różnej lepkości.
- Analiza zmian właściwości fotofizycznych badanych związków pod wpływem agregacji w połączeniu z rodzajem obecnego w strukturze podstawnika.

4.2 Metodologia

4.2.1 Synteza i charakterystyka związków

Dla ułatwienia identyfikacji diskutowanych w tekście niniejszej pracy cząsteczek, stosowane będą akronimy o ogólnym zapisie **RBtR'**, jednoznacznie odwołujące się do struktury cząsteczki, gdzie **R** wskazuje na podstawnik w części heterocyklicznej



Rys. 4.1: Ogólna struktura badanych związków wraz z listą podstawników w każdej z serii

(benzotiazolu, **Bt**), a **R'** jest podstawnikiem znajdującym się w pierścieniu fenyłowym (Rys. 4.1).

Większość otrzymanych barwników posiada podstawnik **R'** w pozycji *para*. Jedyne cztery fluorofory podstawione są w pozycji *meta* pierścienia fenyłowego. W oznaczeniu związków podany został lokant odpowiedniego podstawnika przez dodanie numeru **3** lub **4** przed symbolem podstawnika. Struktura wszystkich barwników została przedstawiona Rysunku 4.1.

W trakcie realizacji zadań badawczych otrzymano 30 barwników fluorescencyjnych syntezując odpowiednie amidy, a następnie przeprowadzając ich reakcję z eteratem BF₃·OEt₂. Amidy otrzymywano na dwa różne sposoby (metody **A** i **B** opisane poniżej), używając odpowiedniego aminobenzotiazolu oraz pochodnych kwasów karboksylowych. Strukturę otrzymanych fluoroforów potwierdzono za pomocą spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego NMR dla jąder wodoru ¹H, węgla ¹³C, boru ¹¹B i fluoru ¹⁹F, wykonano analizę wysokorozdzielczej spektrometrii mas i rozwiązano strukturę za pomocą dyfrakcji rentgenowskiej. Pomiary widma NMR wykonywano za pomocą spektrometru Bruker AMX 400 MHz lub 700 MHz. Widma masowe wysokiej rozdzielczości uzyskiwano za pomocą AutoSpec Premier (Waters) lub MaldiSYNAPT G2-S HDMS (Waters).

Synteza amidów - metoda A

Roztwór aminobenzotiazolu (1 eq) i trietyloaminy (2 eq) w bezwodnym tetrahydrofuranie (THF) ochładzano w mieszaninie suchego lodu i acetonu. Po uzyskaniu temperatury mieszaniny –75°C wkraplano roztwór chlorku kwasowego (1 eq) w bezwodnym THF, a następnie usuwano mieszaninę chłodzącą. Reakcję prowadzono przez noc. Po tym czasie, na wyparce, usuwano THF i ekstrahowano w układzie dichlorometan/woda. Fazę organiczną oddzielono, suszono za pomocą siarczanu(VI) sodu i odparowywano rozpuszczalnik. Związek oczyszczano z wykorzystaniem chromatografii kolumnowej, gdzie eluentem była mieszanina octanu etylu i heksanu w różnym składzie, który ustalano na bieżąco dla każdej mieszaniny poreakcyjnej.

Synteza amidów - metoda B

Do roztworu aminobenzotiazolu (1 eq) w bezwodnym tetrahydrofuranie wprowadzano porcjami 60% wodorek sodu (2 eq) w oleju mineralnym. Reakcję prowadzono pod argonem w temperaturze 40°C. Następnie do mieszaniny reakcyjnej dodawano odpowiedni ester rozpuszczony w THF. Całość ogrzewano w temperaturze wrzenia

pod chłodnicą zwrotną przez noc. Po ochłodzeniu, do zawiesiny dodawano wodny roztwór chlorku amonu (2 eq). Po 30 minutach usuwano THF pod zmniejszonym ciśnieniem i ekstrahowano produkt dichlorometanem. Po wysuszeniu fazy organicznej bezwodnym siarczanem(VI) sodu, usuwano rozpuszczalnik na wyparce rotacyjnej. Surowy produkt oczyszczano metodą chromatografii kolumnowej, eluując mieszaniną octanu etylu i heksanu, którego skład zmieniał się w zależności od związku i nie był jednakowy dla całej serii.

Synteza barwników

Barwniki syntezowano używając odpowiedniego amidu (1 eq), który rozpuszczano w bezwodnym DCM w atmosferze argonu. Do tak przygotowanej mieszaniny dodawano *N,N*-diizopropylouetyloaminę (DIPEA, 2 eq) i eteratu $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ (3 eq). Mieszaninę pozostawiano na noc w temperaturze pokojowej. Po tym czasie prowadzono ekstrakcję w układzie dichlorometan/wodny roztwór wodorowęglanu sodu. Po oddzieleniu części organicznej, wysuszeniu mieszaniny bezwodnym siarczanem(VI) sodu i odparowaniu rozpuszczalnika, surowy produkt oczyszczano za pomocą chromatografii kolumnowej. Eluentem wykorzystywanym do rozdzielania był dichlorometan.

4.2.2 Pomiary absorpcji i fluorescencji

Wszystkie pomiary absorpcji i fluorescencji wykonywano w kuwetach kwarcowych o drodze optycznej 1 cm. Dla pomiarów absorpcji sporządzano roztwory o stężeniu rzędu 10^{-5} mol/dm³. Widma absorpcji zmierzono za pomocą spektrofotometru Shimadzu UV-1900. Pomiary fluorescencji wykonywano dla próbek o stężeniu odpowiadającym wartości absorbancji w zakresie 0.1–0.2. Odpowiadało to stężeniu związku rzędu 10^{-6} mol/dm³. Standardowo dla wszystkich związków wykonywano pomiary w rozpuszczalniku niepolarnym (heksanie) i o średniej polarności (chloroformie). Pomiary fluorescencji prowadzono z wykorzystaniem spektrofluorymetru FS5 (Edinburgh Instruments). Dla związków wyznaczono wydajności kwantowe fluorescencji z wykorzystaniem sfery integrującej [100]. Dla badanych związków wyznaczono również czas życia fluorescencji metodą zliczania pojedynczych fotonów skorelowaną czasowo (ang. *Time-Correlated Single Photon Counting*, TCSPC). Dla tych pomiarów wykorzystywano lasery o długości fali emisji 375 lub 450 nm, w zależności od położenia maksimum absorpcji badanego związku. Do wyznaczania funkcji odpowiedzi aparatury na impuls wzbudzający (ang. *Instrument Response Function*, IRF) wykorzystywano koloidalny roztwór krzemionki – ludox.

4.2.3 Agregacja

Zjawisko agregacji badano używając w pomiarach fotofizycznych mieszanin woda/THF o różnym stosunku objętościowym, zaczynając od czystego THF, a następnie dodając odpowiednio 10, 20, . . . , 97% objętościowych wody. Do kuwety kwarcowej wprowadzano odpowiednią objętość roztworu barwnika o znanym stężeniu w THF, następnie dodawano obliczoną objętość THF i wody destylowanej. Dla tak przygotowanych roztworów wykonano pomiary widm absorpcji i fluorescencji. Dla roztworów

4.2. Metodologia

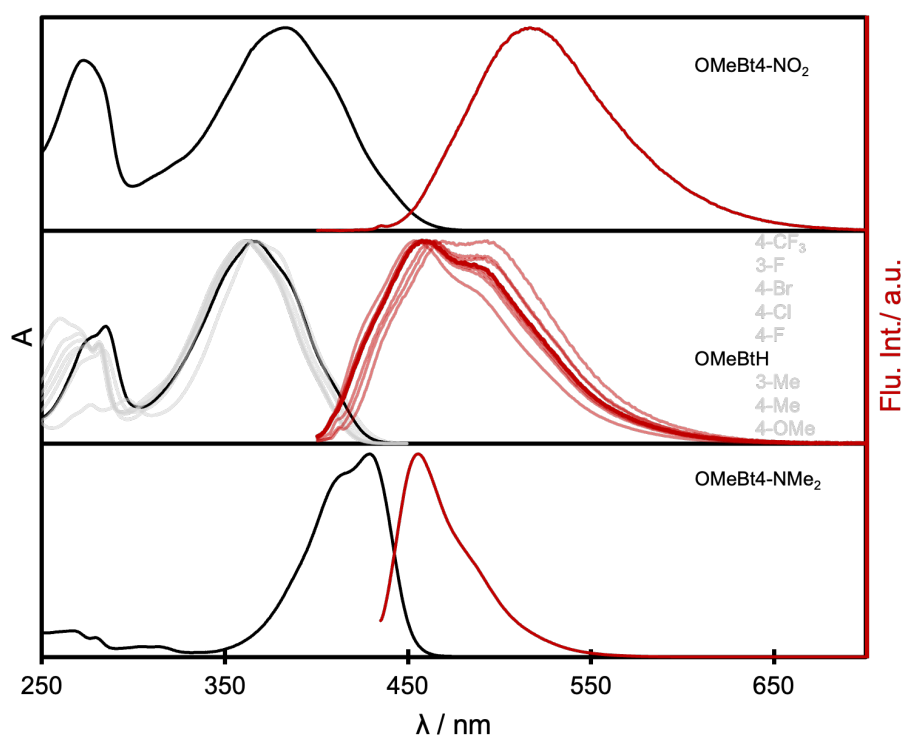
o największej zawartości wody wyznaczono również wydajność kwantową i czas życia fluorescencji.

Wpływ topologii cząsteczki i charakteru podstawników na właściwości fotofizyczne

5.1 Seria związków OMeBtR'

Pierwsza seria związków zawiera dziewięć barwników posiadających w swojej strukturze w części benzotiazolu podstawnik metoksyłowy. Grupa BF₂ obecna w cząsteczce jest grupą akceptorową. W związku z tym, ogólną topologię cząsteczki tej serii można zapisać jako D–A–R', gdzie donorem (D) jest grupa –OMe, akceptorem (A) – grupa BF₂, a trzecia składowa uzależniona jest od charakteru podstawnika R'. Dla dziewięciu pochodnych omawianej serii przeprowadzono badania fotofizyczne w chloroformie. Wszystkie związki wykazują wysoki współczynnik molowy absorpcji, a największą wartość wykazuje pochodna **OMeBt4-NMe₂**. Molowe współczynniki absorpcji zestawiono w katalogu związków (Dodatek A). Pochodna *N,N*-dimetyloaminowa charakteryzuje się również najmniejszą szerokością połówkową pasma absorpcji. Dla pozostałych związków wartość ta zależy istotnie od charakteru podstawnika R' (Rys. 5.1). Największą szerokość połówkową pasma absorpcyjnego w całej serii posiadał związek **OMeBt4-NO₂**. Wartości szerokości połówkowych pasm skorelowano ze stałą Hammetta [168] podstawnika R' otrzymując współczynnik korelacji liniowej $R^2 = 0,90$.

Z wyjątkiem dwóch pochodnych, **OMeBt4-NO₂** i **OMeBt4-NMe₂**, długość fali odpowiadająca położeniu maksimum pasm absorpcyjnych mieści się w wąskim zakresie 361,0 – 368,0 nm. Także kształt pasm absorpcyjnych dla tych struktur jest zbliżony. Po-



Rys. 5.1: Znormalizowane widma absorpcji i fluorescencji związków z serii **OMeBtR'** w chloroformie

nownie dla związków posiadających w swojej budowie najsilniejszy akceptor i donor (skrajne wartości stałej podstawnikowej σ), **OMeBt4-NO₂** i **OMeBtN4-Me₂**, położenie pasma absorpcyjnego i jego kształt zdecydowanie różnią się od pozostałych. Pasma absorpcyjne obydwu fluoroforów przesunięte są batochromowo względem pozostałych. Pochodna nitrowa charakteryzuje się szerokim pasmem absorpcji z maksimum znajdującym się przy 384,0 nm, natomiast dla pochodnej z grupą *N,N*-dimetyloaminową widoczne jest wąskie pasmo absorpcyjne, które jeszcze bardziej przesunięte jest ku czerwieni, do 429,0 nm (Tab. 5.1). Położenie maksimum absorpcji dla badanych związków nie wykazuje korelacji liniowej ze stałą Hammetta (współczynnik korelacji wynosi zaledwie 0,26). Nie jest to wynik zaskakujący ze względu na niewielkie zmiany w położeniu maksimum absorpcji dla większości związków omawianej serii (środkowy panel Rys. 5.1).

Większość właściwości emisyjnych cząsteczek serii **OMeBtR'** jest zbliżonych, zaś związki posiadające podstawniki silnie akceptorowe lub donorowe różnią się od reszty pochodnych. Maksimum emisji dla cząsteczki **OMeBt4-NO₂**, o topologii D–A–A, jest najbardziej przesunięte batochromowo względem pozostałych związków. Natomiast dla **OMeBt4-NMe₂**, którego topologię można zapisać jako D–A–D, maksimum emisji jest przesunięte hipsochromowo względem pozostałych związków i znajduje się przy 455,5 nm. Dla barwników z podstawnikami od 4-CF₃ do 4-OMe pasma fluorescencji posiadają wyraźnie widoczne składowe pochodzące od wibracji cząsteczki.

Dla związku **OMeBt4-CF₃** maksimum emisji obserwowane jest przy 491,5 nm, co odróżnia go od pozostałych związków w sekwencji od **OMeBt3-F** do **OMeBt4-**

5.1. Seria związków OMeBtR'

Tabela 5.1: Właściwości fotofizyczne związków **OMeBtR'** w chloroformie: długość fali w maksimum absorpcji λ_{max}^{abs} [nm], długość fali w maksimum fluorescencji λ_{max}^{em} [nm], przesunięcie Stokesa SS [cm^{-1}], wydajność kwantowa fluorescencji Φ_F [%], czas życia fluorescencji τ [ns], stałe szybkości przejść promienistych k_r i bezpromienistych k_{nr} [10^9 s^{-1}]

| (RBtR') | λ_{max}^{abs} | λ_{max}^{em} | SS | Φ_F | τ | k_r | k_{nr} |
|-------------------------------|-----------------------|----------------------|------|----------|--------|-------|----------|
| OMeBt4-NO₂ | 384,0 | 516,5 | 6680 | 5,6 | 0,22 | 0,26 | 4,29 |
| OMeBt4-CF₃ | 367,0 | 491,5 | 6900 | 0,4 | 0,10 | 0,04 | 9,96 |
| OMeBt3-F | 364,5 | 461,5 | 5770 | 1,8 | 0,08 | 0,22 | 11,98 |
| OMeBt4-Br | 364,5 | 465,0 | 5930 | 4,5 | 0,12 | 0,39 | 8,16 |
| OMeBt4-Cl | 364,5 | 463,5 | 5860 | 2,7 | 0,12 | 0,23 | 8,17 |
| OMeBt4-F | 362,0 | 459,0 | 5840 | 4,5 | 0,13 | 0,35 | 7,52 |
| OMeBtH | 361,0 | 458,5 | 5690 | 0,9 | 0,13 | 0,07 | 7,87 |
| OMeBt3-Me | 361,5 | 459,0 | 5880 | 3,4 | 0,12 | 0,29 | 8,19 |
| OMeBt4-Me | 363,5 | 456,5 | 5600 | 4,1 | 0,16 | 0,25 | 5,92 |
| OMeBt4-OMe | 368,0 | 454,5 | 5170 | 13,1 | 0,46 | 0,29 | 1,89 |
| OMeBt4-NMe₂ | 429,0 | 455,5 | 1360 | 80,0 | 1,68 | 0,48 | 0,12 |

OMe, dla których maksimum emisji mieści się w przedziale od 461,5 do 454,5 nm. Podobnie, jak w przypadku widm absorpcyjnych, korelacja szerokości połówkowych pasm emisyjnych ze stałą Hammetta jest niska ($R^2 = 0,25$).

Duża różnica położenia maksimum emisji związku **OMeBt4-CF₃** w porównaniu do pozostałych barwników w serii powoduje, że i przesunięcie Stokesa dla tej cząsteczki będzie największe. Należy jednak zauważyć, że duże przesunięcie Stokesa dla związku o topologii D–A–A jest spowodowane zmianą względnej wysokości składowych pasm emisyjnych pochodzących od drgań. Powoduje to trudności w korelacji przesunięć Stokesa ze stałą Hammetta: współczynnik korelacji liniowej R^2 , z wyłączeniem pochodnej **OMeBt4-NMe₂**, wynosi 0,69.

Z kolei najmniejsze przesunięcie Stokesa, równe 1360 cm^{-1} , wykazuje pochodna **OMeBt4-NMe₂**. Dla pozostałych związków w serii, od **OMeBt4-CF₃** do **OMeBt4-OMe**, widać tendencję zmian przesunięcia Stokesa wraz ze zmianą charakteru podstawnika jeśli uznać związki od **OMeBt3-F** do **OMeBt3-Me** za bardzo podobne. Przesunięcie Stokesa dla pochodnej **OMeBt4-CF₃** wynosi 6900 cm^{-1} , dla pochodnej bez podstawnika **R'** 5690 cm^{-1} a dla pochodnej **OMeBt4-OMe** 5170 cm^{-1} .

Analizując wydajności kwantowe fluorescencji można zauważyć, że wszystkie, z wyjątkiem pochodnych **OMeBt4-NMe₂** i **OMeBt4-OMe**, wykazują niskie jej wartości (Φ_F , Tab. 5.1). Mieszczą się one w przedziale od 0.4 do 5.6%, a najwyższą wartość wśród nich wykazuje związek **OMeBt4-NO₂**. Należy zauważyć, że wartość wydajności

kwantowej fluorescencji dla pochodnej nitrowej jest wyjątkowe, ponieważ obecność grupy NO₂ zwykle wygasza fluorescencję [161].

Batochromowe przesunięcie pasm absorpcji i emisji dla **OMeBt4-NO₂** w stosunku do związku **OMeBt4-CF₃** wskazuje na wewnątrzcząsteczkowe przeniesienie ładunku w pochodnej nitrowej. Różnica między położeniem omawianych pasm wynika z faktu, że grupa nitrowa jest zdecydowanie silniejszym akceptorem elektronów niż grupa -CF₃. Warto również zwrócić uwagę na parę związków **OMeBt4-Cl** i **OMeBt4-Br**. Wartość stałych podstawnikowych dla grup 4-Cl i 4-Br jest zbliżona i wynosi odpowiednio 0,227 i 0,232. Związki te posiadają pasmo absorpcyjne położone w tym samym miejscu (364,5 nm) oraz bardzo podobne położenie pasm emisyjnych: dla **OMeBt4-Cl** maksimum emisji wynosi 463,5 nm, a dla **OMeBt4-Br** – 465,0 nm. Jednak wydajność kwantowa fluorescencji dla pochodnej posiadającej cięższy atom bromu rośnie nieco w porównaniu z pochodną **OMeBt4-Cl** z 2,7% do 4,5%. Czas życia fluorescencji τ dla tych dwóch związków w przybliżeniu jest taki sam i wynosi 0,12 ns. Wyznaczenie stałych szybkości przejść promienistych i bezpromienistych dla **OMeBt4-Cl** i **OMeBt4-Br** pokazuje jednak, że obecność atomu bromu w związku powoduje wzrost stałej szybkości przejścia promienistego k_r w stosunku do związku z atomem chloru w strukturze, podczas gdy szybkość procesów bezpromienistych dla obu pochodnych pozostaje zbliżona. Dla pozostałych związków z serii **OMeBtR'** czas życia fluorescencji jest równie krótki, wynoszący poniżej 0,5 ns, z wyjątkiem pochodnej **OMeBt4-NMe₂**, dla której wynosi on 1,68 ns. Wyłączając związek z silnym donorem elektronów 4-NMe₂, średni czas życia fluorescencji w całej serii wynosi 0,16 ns. Na podstawie danych eksperymentalnych wydajności kwantowej i czasu życia fluorescencji wyznaczono dla wszystkich związków stałe szybkości przejść promienistych k_r i bezpromienistych k_{nr} . Podobnie jak dla chloro- i bromopochodnych, dla związków uszeregowanych w Tabeli 5.1 od **OMeBt4-NO₂** do **OMeBt4-Ome** szybkość przemian bezpromienistych jest zdecydowanie większa niż szybkość przejść promienistych. Średnio k_r i k_{nr} wynoszą odpowiednio $0,24 \cdot 10^9 \text{ s}^{-1}$ i $7,40 \cdot 10^9 \text{ s}^{-1}$. Jedynie dla związku **OMeBt4-NMe₂** stosunek stałych szybkości jest odwrotny: proces przejścia promienistego zachodzi ze stałą szybkości 4-krotnie wyższą niż stała szybkości przejścia bezpromienistego.

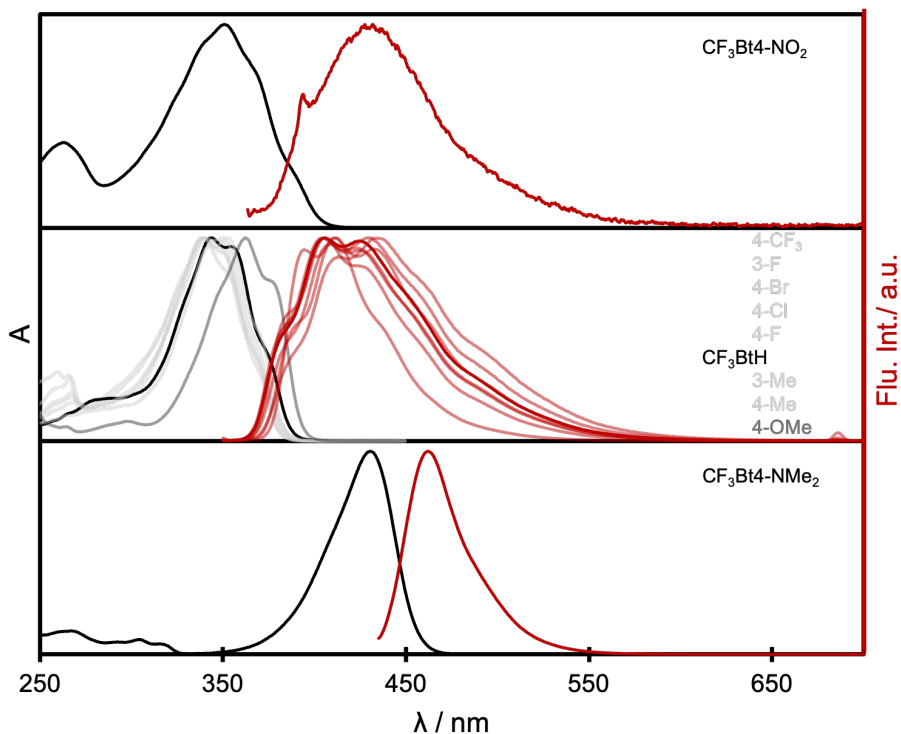
Niska wydajność kwantowa fluorescencji związków w serii od **OMeBt4-NO₂** do **OMeBt4-Ome** wynika z szybkiej konwersji wewnętrznej ze stanu wzbudzonego S₁ do stanu podstawowego, która może być efektem przecięć powierzchni energii potencjalnej obu stanów. Na położenie i dostępność punktu przecięcia tych płaszczyzn nie wpływa istotnie podstawnik w grupie fenylowej. Dominujący wpływ procesów bezpromienistych związanych z drganiami i rotacjami cząsteczki, w tym z obrotami wokół pojedynczego wiązania węgiel-węgiel między grupą fenyłową a rdzeniem benzotiazolowym na wygaszanie stanów wzbudzonych w omawianych cząsteczkach można łączyć z obecnością grupy metoksy podstawionej w benzotiazolu (w kontraście do następnej serii, *vide infra*). Opisane właściwości tłumaczą też poszerzenie pasm emisyjnych w porównaniu do pasm absorpcyjnych dla związków serii **OMeBtR'**.

Właściwości odmienne od całej serii posiada pochodna o topologii struktury D-A-D, **OMeBt4-NMe₂**. Wykazuje ona największą wydajność kwantową fluorescencji ($\Phi_F = 80\%$), a jej pasmo emisyjne stanowi lustrzane odbicie pasma absorpcji. W tym przypadku po wzbudzeniu cząsteczki następuje utrata energii w wyniku szybkiego

przejścia promienistego. Zatem można się spodziewać, że powierzchnia energii potencjalnej stanu podstawowego i wzbudzonego odpowiadają bardzo podobnym geometriom cząsteczki, co uniemożliwia ich przecięcie, otwierając promieniste drogi przejść elektronowych.

5.2 Seria związków $\text{CF}_3\text{BtR}'$

Druga seria badanych fluoroforów, $\text{CF}_3\text{BtR}'$, zawiera pochodne benzotiazolu z takimi samymi podstawnikami R' w pierścieniu fenylowym, jakie wykorzystano w serii pierwszej, OMeBtR' . Zmiana strukturalna względem poprzedniej polegała na wymianie donora elektronów, grupy $-\text{OMe}$, na akceptor (A) elektronów $-\text{CF}_3$ w części heterocyklicznej. Ogólną topologię cząsteczek w tej serii można więc zapisać jako $\text{A-A-R}'$. Opisany wybór podstawnika ma na celu zweryfikowanie znaczenia położenia donora i akceptora w cząsteczce dla charakterystyki fotofizycznej fluoroforów.



Rys. 5.2: Znormalizowane widma absorpcji i fluorescencji związków z serii $\text{CF}_3\text{BtR}'$ w chloroformie

Podobnie jak dla pierwszej serii, dla związków $\text{CF}_3\text{BtR}'$ przeprowadzono badania fotofizyczne w chloroformie. Molowy współczynnik absorpcji dla tych układów mieści się w przedziale od 23 200 do 86 500 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, co jest typową wartością odpowiadającą przejściom $\pi-\pi^*$. Największą wartość molowego współczynnika absorpcji uzyskano dla pochodnej $\text{CF}_3\text{Bt4-NMe}_2$. Obecność grupy $-\text{CF}_3$ w strukturze spowodowała zwiększenie energii przejść do stanu wzbudzonego, w rezultacie maksimum absorpcji w całej serii przesunęło się hipschromowo, średnio o 18 nm, w stosunku do serii OMeBtR' (Tab. 5.2). Z wyjątkiem pochodnej $\text{CF}_3\text{Bt4-NMe}_2$, długość fali

w maksimum absorpcji w całej serii zawiera się pomiędzy 338,5 nm dla **CF₃Bt3-F** a 432,5 nm dla **CF₃Bt4-OMe**. Na środkowym panelu Rys. 5.2 można zauważyć, że dla jednej z pochodnych (**CF₃Bt4-OMe**) pasmo absorpcyjne jest wyraźnie przesunięte względem pozostałych ośmiu związków w stronę dłuższych fal. W całej serii, najbardziej batochromowe przesunięcie pasma absorpcyjnego widoczne jest jednak – podobnie jak w serii **OMeBtR'** – dla cząsteczki podstawionej najsilniejszym donorem, **CF₃Bt4-NMe₂**, a położone jest ono przy 430,5 nm. Dodatkowo, pasmo absorpcyjne pochodnej *N,N*-dimetyloaminowej posiada wyraźnie mniejszą szerokość połówkową w porównaniu z pozostałymi związkami serii (Rys. 5.2). Podobnie jak dla wcześniej omawianych związków, również w tym przypadku brak jest korelacji liniowej między stałą Hammetta i położeniem maksimum absorpcji. Ponadto nie ma również wyraźniej zależności między szerokością połówkową pasm absorpcyjnych a stałą podstawnikową ($R^2 = 0,64$), co także zauważono dla serii **OMeBtR'**.

Tabela 5.2: Właściwości fotofizyczne związków **CF₃BtR'** w chloroformie: długość fali w maksimum absorpcji λ_{max}^{abs} [nm], długość fali w maksimum fluorescencji λ_{max}^{em} [nm], przesunięcie Stokesa SS [cm⁻¹], wydajność kwantowa fluorescencji Φ_F [%], czas życia fluorescencji τ [ns], stałe szybkości przejść promienistych k_r i bezpromienistych k_{nr} [10⁹ s⁻¹]

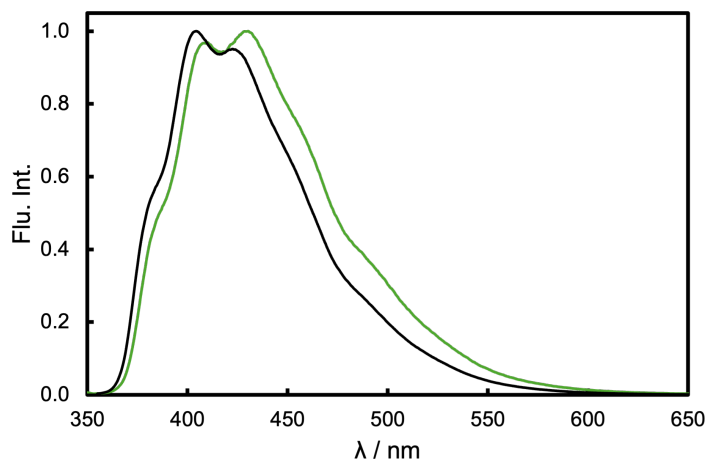
| (RbTR') | λ_{max}^{abs} | λ_{max}^{em} | SS | Φ_F | τ | k_r | k_{nr} |
|--|-----------------------|----------------------|------|----------|--------|-------|----------|
| CF₃Bt4-NO₂ | 351,0 | 432,0 | 5340 | 0,2 | - | - | - |
| CF₃Bt4-CF₃ | 341,0 | 434,5 | 6310 | 4,7 | 0,23 | 0,20 | 4,14 |
| CF₃Bt3-F | 338,5 | 430,5 | 6310 | 14,8 | 0,46 | 0,32 | 1,85 |
| CF₃Bt4-Br | 339,5 | 411,0 | 5120 | 55,3 | 1,15 | 0,48 | 0,39 |
| CF₃Bt4-Cl | 343,0 | 410,5 | 4790 | 41,1 | 1,13 | 0,36 | 0,52 |
| CF₃Bt4-F | 344,0 | 404,5 | 4350 | 51,0 | 1,35 | 0,38 | 0,36 |
| CF₃BtH | 339,5 | 406,0 | 4830 | 28,0 | 1,02 | 0,28 | 0,71 |
| CF₃Bt3-Me | 350,0 | 405,5 | 3910 | 53,7 | 1,32 | 0,41 | 0,35 |
| CF₃Bt4-Me | 353,0 | 406,0 | 3700 | 80,3 | 1,81 | 0,44 | 0,11 |
| CF₃Bt4-OMe | 362,5 | 412,0 | 3320 | 98,0 | 1,65 | 0,59 | 0,01 |
| CF₃Bt4-NMe₂ | 430,5 | 462,0 | 1580 | 94,0 | 1,80 | 0,52 | 0,03 |

Dla dziewięciu z jedenastu fluoroforów serii **CF₃BtR'** kształt pasm absorpcyjnych i fluorescencyjnych jest zbliżony, co widać na środkowym panelu Rys. 5.2. Widoczne są co najmniej dwie składowe, pochodzące od drgań cząsteczki, o podobnej intensywności zarówno w widmach absorpcyjnych, jak i emisyjnych. Na panelu pierwszym i trzecim Rys. 5.2 przedstawiono widma dla **CF₃Bt4-NO₂** i **CF₃Bt4-NMe₂**, których właściwości fotofizyczne istotnie odbiegają od tych obserwowanych dla pozostałych związków serii. Pochodne te posiadają w swojej strukturze podstawniki o skrajnie

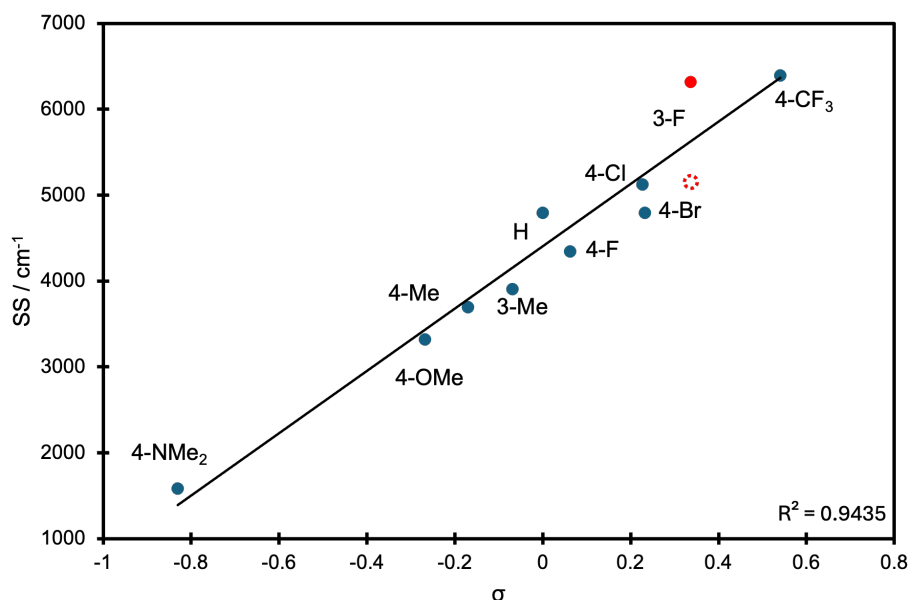
różnych właściwościach akceptorowo-donorowych: pochodna **CF₃Bt4-NO₂** posiada najsilniejszy akceptor elektronów, a **CF₃Bt4-NMe₂** – najsilniejszy donator elektronów. Dla pochodnej nitrowej zarejestrowano bardzo szerokie pasma absorpcyjne i emisyjne o maksimum odpowiednio przy $\lambda_{max}^{abs} = 351,0$ i $\lambda_{max}^{em} = 432,0$ nm chloroformie, zaś przesunięcie Stokesa dla wynosi 5340 cm^{-1} . Zupełnie inaczej wyglądają wyniki dla pochodnej **CF₃Bt4-NMe₂**, dla której przesunięcie Stokesa jest najmniejsze w całej serii i wynosi zaledwie 1580 cm^{-1} , a pasmo emisji znajduje się przy $462,0$ nm. Maksimum emisji dla związków od **CF₃Bt4-CF₃** do **CF₃Bt4-OMe** mieści się w przedziale $404,4$ do $434,5$ nm, a skrajne wartości dla podzbioru odpowiadają pochodnym **CF₃Bt4-F** i **CF₃Bt4-CF₃**.

Różnica w położeniu maksimum emisji w serii **CF₃BtR'** wynika nie tylko z efektu podstawnika, ale również z balansu intensywności składowych wibracyjnych pasm emisyjnych. W zależności od stosunku intensywności tych składowych, maksimum emisji, jak również przesunięcia Stokesa, mogą zachowywać się w sposób nieregularny. W efekcie, korelacja tych danych fotofizycznych ze stałą Hammetta może być bardzo niska. Jak przykład można przytoczyć dwa izomeryczne związki, tj. **CF₃Bt4-F** i **CF₃Bt3-F**. Mimo podobieństwa cząsteczek pozycja maksimum fluorescencji różni się o 26 nm i wynika ze zmiany intensywności składowych widma. Ten szczególny przykład przedstawiony jest na Rys. 5.3. W tym przypadku różnica między stałą podstawnikową jest duża i wynosi $0,28$. Jednak bardzo podobny obraz uzyskamy dla pochodnych **CF₃Bt3-F** i **CF₃Bt4-Br**, gdzie różnica stałych Hammetta jest dużo mniejsza i wynosi $0,11$. Podobnie jak dla poprzedniej pary różnica w położeniu maksimum pasm emisyjnych wynosi $18,5$ nm. Mimo to zauważono korelację liniową między przesunięciem Stokesa i stałą podstawnikową dla związków z serii **CF₃BtR'** ($R^2 = 0,94$), jeśli w dopasowaniu nie uwzględniono pochodnej **CF₃Bt4-NO₂**, znacznie odbiegającej od wyznaczonej liniowej zależności. Na Rys. 5.4 pokazano, że wraz ze zmianą charakteru podstawnika z donora ($-NMe_2$) do akceptora ($-CF_3$) zwiększa się różnica energii między maksimum absorpcji i fluorescencji (przesunięcie Stokesa). Gdyby w korelacji uwzględnić lokalne maksimum fluorescencji odpowiadające składowej wibracyjnej o mniejszej intensywności ($410,0$ nm) dla **CF₃Bt3-F**, to współczynnik korelacji opisywałby lepsze dopasowanie prostej na poziomie $R^2 = 0,96$. Punkt ten został przedstawiony na rysunku przez zakreślenie czerwoną, przerywaną linią. Natomiast wprowadzenie do zestawienia przesunięcia Stokesa dla **CF₃Bt4-NO₂** spowodowałoby spadek współczynnika korelacji do $R^2 = 0,83$.

W przypadku serii **CF₃BtR'** badane fluorofory wykazują znacznie zróżnicowaną wydajność kwantową fluorescencji. Dla topologii A–A–A, w której do grupy fenylovej przyłączony jest silny akceptor $-NO_2$ lub umiarkowanie silny akceptor $-CF_3$, wartości Φ_F wynoszą odpowiednio $0,2$ i $4,7\%$. Dla pochodnej niepodstawionej wydajność kwantowa fluorescencji wynosi 28% , natomiast dla pochodnych o topologii A–A–D wartości te zaczynają się od 54% dla pochodnej **CF₃Bt3-Me**, następnie 80% dla izomeru **CF₃Bt4-Me**, w końcu osiągając blisko 100% dla pochodnych **CF₃Bt4-OMe** i **CF₃Bt4-NMe₂**. Przedstawione wyniki wyraźnie pokazują pewną regularność zmian wydajności kwantowej wraz ze wzrostem elektronodonorowej natury podstawnika w pierścieniu fenylowym w przypadku serii barwników zawierających w części heterocyklicznej podstawnik o charakterze elektronoakceptorowym. Próba skorelowania wartości wydajności kwantowych fluorescencji ze stałą Hammetta pozwoliła uzyskać



Rys. 5.3: Znormalizowane widma fluorescencji związków CF_3BtF i $\text{CF}_3\text{Bt3-F}$ w chloroformie



Rys. 5.4: Zależność przesunięcia Stokesa dla pochodnych $\text{CF}_3\text{BtR}'$ ze stałą podstawnikową Hammetta wyznaczonych dla roztworów w chloroformie

współczynnik korelacji na poziomie 0,80 dla całej serii. W tym przypadku, odrzucenie skrajnych barwników ($\text{CF}_3\text{Bt4-NO}_2$ lub $\text{CF}_3\text{Bt4-NMe}_2$) obniża R^2 , ponieważ zachowują się one regularnie i spójnie z pozostałymi związkami w serii.

W kolejnym etapie badań wyznaczono czasy życia fluorescencji związków serii $\text{CF}_3\text{BtR}'$. Dla pochodnych $\text{CF}_3\text{Bt4-NMe}_2$ i $\text{CF}_3\text{Bt4-Me}$ otrzymano najdłuższy czas życia fluorescencji w serii, wynoszący 1,81 ns. Najkrótszy czas życia fluorescencji uzyskano dla związku $\text{CF}_3\text{Bt4-CF}_3$. Ze względu na niską wydajność kwantową fluorescencji pomiar czasu życia fluorescencji nie był możliwy dla pochodnej nitrowej. Na podstawie wyznaczonych wydajności kwantowych oraz czasów życia fluorescencji obliczono stałe szybkości przejść promienistych i bezpromienistych (Tab. 5.2). Należy

zauważyć, że wzajemna relacja tych stałych zależy od podstawnika w pierścieniu fenylowym. Dla pochodnych o topologii A–A–D proces promienistej dezaktywacji stanu wzbudzonego jest preferowany co widoczne jest w wartościach stałych szybkości przejść promienistych w stosunku do stałej szybkości przejść bezpromienistych. Dla niepodstawionej pochodnej konkurencyjne procesy bezpromieniste zaczynają dominować w przejściach cząsteczek do stanu podstawowego. Trend ten utrzymuje się dla kolejnych związków o topologii A–A–A, z wyłączeniem **CF₃Bt4-F** i **CF₃Bt4-Br**, w których balans stałych szybkości prowadzi do wydajności kwantowych tych związków na poziomie 51,0 i 55,3%. Największą wyznaczoną wartością stałej szybkości przejść bezpromienistych, równą $4,14 \cdot 10^9 \text{ s}^{-1}$, wykazuje pochodna **CF₃Bt4-CF₃**, natomiast k_r wynosi $0,20 \cdot 10^9 \text{ s}^{-1}$.

Podobnie, jak w serii **OMeBtR'**, tu także zauważono wyraźne różnice między związkami podstawionymi atomami chloru i bromu, dla których stała Hammetta jest podobna. Dla **CF₃Bt4-Br** i **CF₃Bt4-Cl** różnica w położeniu maksimum absorpcji i emisji jest niewielka (3,5 i 0,5 nm).

Podstawienie cięższym atomem bromu skutkuje zwiększeniem szybkości przejść promienistych z jednoczesnym zmniejszeniem szybkości przejść bezpromienistych w stosunku do pochodnej z atomem chloru. W konsekwencji, **CF₃Bt4-Br** wykazuje wydajność kwantową fluorescencji większą o 14 punktów procentowych. Oznacza to, że obecność ciężkiego atomu nie prowadzi do efektywnego sprzężenia spin-orbita, co spowodowałoby zmianę multipletowości cząsteczki z jednoczesnym spadkiem wydajności kwantowej fluorescencji [169, 170].

Na podstawie przedstawionych wyników można zauważyć, że wzajemny stosunek stałych szybkości przejść promienistych i bezpromienistych silnie zależy od podstawnika w grupie fenylovej. Prawdopodobieństwo przejść bezpromienistych jest tym większe, im silniejszy akceptor elektronów jest obecny w cząsteczce. Wzrost przesunięcia Stokesa wraz ze spadkiem wydajności kwantowej fluorescencji wskazuje na istotne zmiany geometrii cząsteczki podczas pobudzenia elektronowego. Może to powodować możliwość wystąpienia przecięć powierzchni energii potencjalnej stanu wzbudzonego i podstawowego, otwierając tym samym ścieżkę bezpromienistej konwersji do stanu S_0 .

5.3 Jednoczesny efekt dwóch podstawników

W poprzednich częściach opracowania podjęto próby skorelowania wybranych właściwości fotofizycznych badanych związków ze stałą Hammetta podstawników w pierścieniu fenylowym. Należy jednak podkreślić, że stała podstawnikowa została wyznaczona na podstawie reakcji chemicznych modelowych cząsteczek i wykorzystywana jest zwykle do określenia reaktywności w stanie podstawowym odpowiednio podstawionych związków. Oznacza to, że nie opisuje ona w żaden sposób cząsteczek w elektronowym stanie wzbudzonym. Doskonałym przykładem takich niedostatków modelu są wcześniej opisane przykłady pochodnych podstawionych atomami bromu i chloru. Stała Hammetta niesie jednak użyteczną informację dotyczącą charakteru donorowo-akceptorowego podstawnika, co może z kolei przełożyć się na właściwości fotofizyczne barwników fluorescencyjnych. Z tego powodu przydatne staje się korelowanie wybranych właściwości fotofizycznych ze stałymi podstawnikowymi.

Wyniki omówione w podrozdziałach 5.1 i 5.2 wskazują, że nie tylko podstawnik **R'** znajdujący się w pierścieniu fenyłowym istotnie wpływa na właściwości fotofizyczne badanych związków, ale wymiana donora elektronów –OMe na akceptor –CF₃ w benzotiazolu powoduje wzrost wydajności kwantowych całej serii. Wyjątkiem jest pochodna **CF₃Bt4-NO₂**, w której obecność grupy nitrowej całkowicie wygasza fluorescencję w porównaniu ze związkiem **OMeBt4-NO₂**. Różnice w przesunięciach Stokesa dla nitrowych pochodnych z obu serii (5340 a 6680 cm⁻¹) oraz topologia cząsteczki **OMeBt4-NO₂** wskazują, że niespodziewany wzrost wydajności kwantowej fluorescencji spowodowany jest efektywnym wewnątrzcząsteczkowym przeniesieniem ładunku w stanie wzbudzonym. Dostępność stanu ICT otwiera ścieżkę przejścia promienistego do stanu podstawowego S₀, konkurencyjnego dla innych procesów bezpromienistych [171], podczas gdy dla związku o topologii A–A–A takie przejścia są niemożliwe.

Na Rys. 5.5 przedstawiono położenie maksimum pasma absorpcji i fluorescencji dla dwóch serii badanych związków, **OMeBtR'** i **CF₃BtR'**, oraz odpowiednie wydajności kwantowe fluorescencji w odniesieniu do stałej Hammetta σ . Biorąc pod uwagę pochodne zawierające grupę *N,N*-dimetyloaminową, wydajności kwantowe fluorescencji są bardzo wysokie, niezależnie od podstawnika w rdzeniu fluorescencyjnym, jednak dla topologii A–A–D, czyli dla związku **CF₃Bt4-NMe₂** jest ona o 14 punktów procentowych wyższa niż dla D–A–D, **OMeBt4-NMe₂**. Podobnie jak w przypadku pochodnej nitrowej, obecność donora i akceptora w cząsteczce **CF₃Bt4-NMe₂** zwiększa efektywność przejść elektronowych związanych z wewnątrzcząsteczkowym przeniesieniem ładunku, a całkowita zaabsorbowana przez cząsteczkę energia zostaje wyemitowana w postaci promieniowania elektromagnetycznego z zakresu widzialnego. Co ciekawe, dla pochodnych *N,N*-dimetyloaminowych, podstawnik w heterocyklicznej części barwnika nie wpływa na położenie maksimum absorpcji i fluorescencji: różnica między **CF₃Bt4-NMe₂** i **OMeBt4-NMe₂** wynosi odpowiednio 1,5 i 6,5 nm. Jednak patrząc na całe serie związków, dla grupy **CF₃BtR'** średnia długość fali w maksimum absorpcji jest równa 353,7 nm, a w przypadku emisji – 419,4 nm. Dla **OMeBtR'** w całej serii widać batochromowe przesunięcie względem odpowiednich związków z podstawnikiem –CF₃ w benzotiazolu. Średnia długość fali w maksimum absorpcji i emisji to odpowiednio 371,4 i 467,4 nm. Zmiana taka jest zgodna z oczekiwaniami, ponieważ obecność donorów elektronów w strukturze barwników fluorescencyjnych wiąże się zwykle z obniżeniem energii elektronowych stanów wzbudzonych.

Na górnym panelu Rys. 5.5 można zauważyć, że punkty związane z położeniem maksimum absorpcji i fluorescencji dwóch serii oddalają się od siebie wraz ze wzrostem charakteru elektronoakceptorowego podstawnika. Oznacza to, że przesunięcie Stokesa rośnie wraz ze stałą Hammetta w obu seriach, a większe zmiany widoczne są dla pochodnych zawierających grupę –OMe przyłączoną do benzotiazolu. Możliwość zmiany przesunięcia Stokesa barwników organicznych poprzez zaplanowaną zmianę podstawnika może okazać się przydatna w kontekście potencjalnego zastosowania barwników fluorescencyjnych w bioobrazowaniu. Niestety związki z serii **OMeBtR'** wykazują jednocześnie niską wydajność kwantową fluorescencji w wąskim zakresie 0.4 do 13.1% (z wyjątkiem **OMe₃Bt4-NMe₂**). Dodatkowo, właściwości fotofizyczne tych związków nie są wprost związane z charakterem podstawnika w grupie feny-

Tabela 5.3: Właściwości fotofizyczne związków **OMeBtR'**, **HBtR'**, **CF₃BtR'** w chloroformie: długość fali w maksimum absorpcji λ_{max}^{abs} [nm], długość fali w maksimum fluorescencji λ_{max}^{em} [nm], przesunięcie Stokesa SS [cm^{-1}], wydajność kwantowa fluorescencji Φ_F [%], czas życia fluorescencji τ [ns], stałe szybkości przejść promienistych k_r i bezpromienistych k_{nr} [10^9 s^{-1}]

| (RBtR') | λ_{max}^{abs} | λ_{max}^{em} | SS | Φ_F | τ | k_r | k_{nr} |
|---|-----------------------|----------------------|------|----------|--------|-------|----------|
| OMeBt4-CF₃ | 367,0 | 491,5 | 6900 | 0,4 | 0,10 | 0,04 | 9,96 |
| OMeBtH | 361,0 | 458,5 | 5690 | 0,9 | 0,13 | 0,07 | 7,87 |
| OMeBt4-OMe | 368,0 | 454,5 | 5170 | 13,1 | 0,46 | 0,29 | 1,89 |
| HBt4-CF₃ | 345,0 | 447,0 | 6610 | 0,4 | 0,13 | 0,03 | 7,49 |
| HBtH | 343,0 | 439,5 | 6400 | 6,9 | 0,21 | 0,34 | 4,54 |
| HBt4-OMe | 364,0 | 419,5 | 3640 | 75,6 | 1,71 | 0,44 | 0,14 |
| CF₃Bt4-CF₃ | 341,0 | 434,5 | 6310 | 4,7 | 0,23 | 0,20 | 4,14 |
| CF₃BtH | 339,5 | 406,0 | 4830 | 28,0 | 1,02 | 0,28 | 0,71 |
| CF₃Bt4-OMe | 362,5 | 412,0 | 3320 | 98,0 | 1,65 | 0,59 | 0,01 |

w grupie fenyłowej możliwe jest manipulowanie przesunięciem Stokesa, a zmiana podstawnika w benzotiazolu dodatkowo wzmacnia ten efekt.

Podobne zmiany dla dziewięciu wybranych związków obserwowane są w przypadku wydajności kwantowych fluorescencji wyznaczonych w chloroformie. Jak widać na Rys. 5.6, obecność grupy metoksyłowej w pierścieniu fenyłowym korzystnie wpływa na wydajność kwantową fluorescencji. Jednak wyraźne zmiany Φ_F w szeregu **CF₃Bt4-OMe**, **HBt4-OMe**, **OMeBt4-OMe** z wydajnością kwantową fluorescencji równą odpowiednio 98,0, 75,6 i 13,1% wskazują na równie duże znaczenie podstawnika w części heterocyklicznej fluoroforu. Dla związków o ogólnej topologii R–A–A wydajność kwantowa fluorescencji jest niska, od 0,4% (**OMeBt4-CF₃**, **HBt4-CF₃**) do 4,7% (**CF₃Bt4-CF₃**). Intuicja chemiczna sugeruje, że obecność grupy metoksyłowej w pierścieniu fenyłowym może promować zdolność do tworzenia formy chinonowej, usztywniając w ten sposób cząsteczkę, a w konsekwencji zwiększać wydajność kwantową fluorescencji. Dla pochodnych niepodstawionych lub posiadających akceptor w pierścieniu fenyłowym, spadek wydajności kwantowej fluorescencji wynikałby wówczas z rotacji tej grupy wokół wiązania pojedynczego C-C do pozostałego fragmentu cząsteczki. Jednak obliczenia kwantowo-mechaniczne wykonane przez dr hab. Annę Kaczmarek-Kędzierę, prof. UMK dla badanych struktur, mające na celu wyznaczenie barier energetycznych rotacji grupy fenyłowej w cząsteczce, nie potwierdziły bezpośredniej zależności pomiędzy tym parametrem a wydajnością kwantową fluorescencji. Co więcej, barwnik **CF₃Bt4-OMe**, wykazujący największą wydajność kwantową fluorescencji spośród wszystkich dziewięciu w serii, posiadał najniższą barierę energetyczną rotacji wokół wiązania pojedynczego w stanie wzbudzonym.

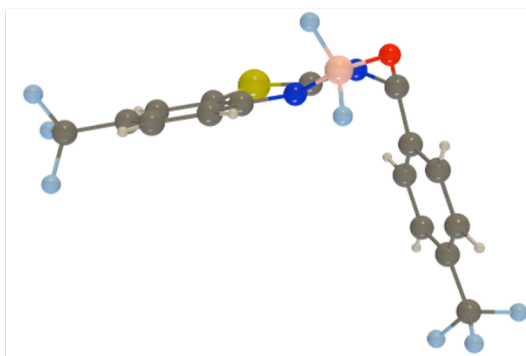
5.3. Jednoczesny efekt dwóch podstawników

Wyniki te wskazują, że rotacja fragmentów cząsteczki, powszechnie przywoływana dla rotorów molekularnych jako dominujący proces dezaktywacji stanów wzbudzonych, w serii omawianych tu związków nie stanowi głównej ścieżki wygaszania stanu wzbudzonego.

| | | Podstawnik w grupie fenylowej | | |
|---------------------------|-----------------|-------------------------------|------|-----------------|
| | | OMe | H | CF ₃ |
| Podstawnik w benzotiazolu | CF ₃ | 98.0 | 28.0 | 4.7 |
| | H | 75.6 | 6.9 | 0.4 |
| | OMe | 13.1 | 0.9 | 0.4 |

Rys. 5.6: Wydajność kwantowa fluorescencji w chloroformie dla dziewięciu pochodnych

W kolejnym etapie teoretycznych rozważań prowadzonych w grupie prof. Denisa Jacquemina (Uniwersytet w Nantes) poszukiwano innych możliwych ścieżek dezaktywacji stanów wzbudzonych, odpowiedzialnych za zmiany wydajności kwantowych fluorescencji w badanych pochodnych. Ze względu na obecność atomu siarki, oceniono możliwość przejść międzysystemowych przez wyznaczenie różnic energetycznych między stanem S_1 a T_1 oraz sprzężenia spin-orbita. Ze względu na duże różnice energetyczne i słabe sprzężenie spin-orbita, wyeliminowano ten proces spośród możliwych procesów bezpromienistych tłumaczących różnice w eksperymentalnie wyznaczonych wydajnościach kwantowych fluorescencji regioizomerów. Brak fosforescencji potwierdzono również eksperymentalnie przez pomiar emisji wybranych związków w temperaturze ciekłego azotu (77 K). Dopiero wyznaczenie punktów przecięcia powierzchni energii potencjalnych stanu podstawowego i wzbudzonego, pozwala uzyskać zgodność interpretacji teoretycznej z eksperymentalnymi wynikami pomiarowymi. Współczynnik korelacji pomiędzy stałymi szybkości przejść radiacyjnych otrzymanymi teoretycznie i wynikami eksperymentalnymi wyniósł 0,87. Co ciekawe, miejsce przecięcia powierzchni energii potencjalnych stanów podstawowych i wzbudzonych odpowiadają silnie zdeformowanej geometrii, w której dwa fragmenty cząsteczki znajdują się pod kątem bliskim 90° (Rys. 5.7). Wyniki teoretyczne jednoznacznie wskazują, że różnica we właściwościach fotofizycznych wraz ze zmianą podstawników w związkach wynika z konkurencyjnych procesów promienistych (fluorescencji) i konwersji wewnętrznej [172].



Rys. 5.7: Wyznaczona teoretycznie geometria cząsteczki $\text{CF}_3\text{Bt4-CF}_3$ w punkcie przecięcia powierzchni energii potencjalnej stanu podstawowego i wzbudzonego [172]

5.4 Wpływ lepkości na właściwości fotofizyczne wybranych barwników

W celu uzyskania eksperymentalnych dowodów na wpływ drgań cząsteczek na wydajność kwantową fluorescencji przygotowano roztwory o różnej lepkości dla dziewięciu barwników posiadających w swojej strukturze podstawniki $-\text{OMe}$ i/lub $-\text{CF}_3$ oraz pochodnej niepodstawionej. Do sporządzenia sekwencji roztworów o zmieniającej się lepkości wykorzystano metanol i glicerynę w mieszaninach o różnym stosunku objętościowym. Każdy z tych rozpuszczalników może tworzyć wiązania wodorowe dzięki obecności grup $-\text{OH}$, dodatkowo zmiana stosunku objętościowego tych rozpuszczalników nie wpływa istotnie na polarność całego układu. Można zatem założyć, że w tak dobranych mieszaninach główną cechą fizykochemiczną wpływającą na zmiany właściwości fotofizycznych barwników pozostaje więc lepkość. Tak przygotowany eksperyment umożliwił weryfikację hipotezy, czy możliwe jest kontrolowanie wydajności kwantowej fluorescencji barwników przez zmianę lepkości rozpuszczalnika i jaki wpływ na te zmiany ma liczba grup $-\text{OMe}$ i $-\text{CF}_3$ w strukturze i topologia cząsteczki.

Dla dziewięciu związków zmierzono Φ_F w roztworach o różnym składzie objętościowym metanol-gliceryna, w kroku co 20%. Z przedstawionych w Tab. 5.4 i na Rys. 5.6 wyników widać, że wydajność kwantowa fluorescencji zmniejsza się przy zmianie rozpuszczalnika z niepolarnego chloroformu, który nie tworzy wiązań wodorowych, na polarny metanol, tworzący silne wiązania wodorowe. Jednak ogólny trend został zachowany: związki o niskiej fluorescencji w chloroformie, wykazują także niską wydajność kwantową fluorescencji w metanolu. Zmiana lepkości roztworu, przy zastosowaniu gliceryny, prowadzi do istotnych zmian dla wszystkich układów z wyjątkiem związku $\text{CF}_3\text{Bt4-OMe}$, dla którego wydajność kwantowa fluorescencji w czystym metanolu wynosi 98.8% i pozostaje praktycznie niezmienna przy przejściu do lepkiego środowiska. W przypadku izomeru tej cząsteczki o odwróconej topologii, OMeBt4-CF_3 , w metanolu Φ_F wynosi 0.8%, natomiast w glicerynie 10.8%, co oznacza trzynastokrotny wzrost wydajności kwantowej fluorescencji wraz ze wzrostem lepkości otoczenia. Największy wzrost wydajności kwantowej fluorescencji w roztwo-

5.4. Wpływ lepkości na właściwości fotofizyczne wybranych barwników

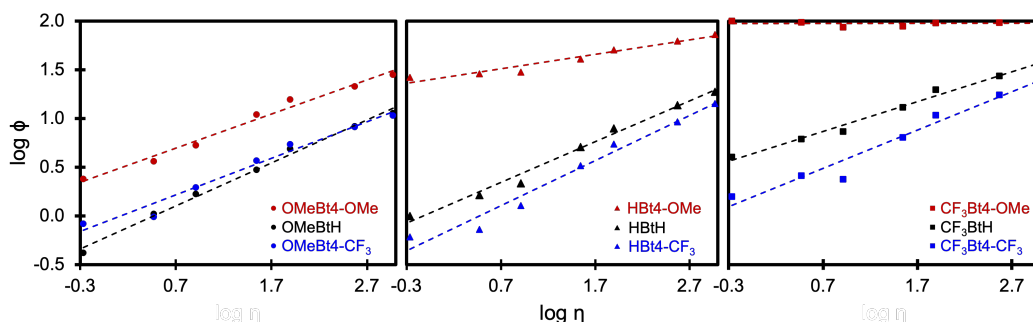
rze gliceryny, w porównaniu z roztworem w metanolu, zaobserwowano dla związków **OMeBtH** i **HBt4-CF₃**: odpowiednio 27- i 23-krotny.

Tabela 5.4: Wartości wydajności kwantowej fluorescencji w metanolu $\Phi_F(m)$ i glicerynie $\Phi_F(g)$ [%] oraz współczynnik kierunkowy liniowej korelacji dla funkcji $\log\Phi_F = a \cdot \log\eta + b$ dla związków badanych w roztworach o różnej lepkości

| Zw. (RBtR') | $\Phi_F(m)$ | $\Phi_F(g)$ | a | R ² |
|---|-------------|-------------|------|----------------|
| OMeBt4-CF₃ | 0,8 | 10,8 | 0,36 | 0,973 |
| OMeBtH | 0,4 | 11,4 | 0,44 | 0,994 |
| OMeBt4-OMe | 2,4 | 28,4 | 0,35 | 0,983 |
| HBt4CF₃ | 0,6 | 14,3 | 0,46 | 0,971 |
| HBtH | 2,0 | 18,9 | 0,35 | 0,988 |
| HBtOMe | 26,5 | 73,3 | 0,15 | 0,952 |
| CF₃Bt4-CF₃ | 1,6 | 24,2 | 0,39 | 0,959 |
| CF₃BtH | 4,0 | 36,0 | 0,30 | 0,987 |
| CF₃Bt4-OMe | 99,8 | 98,2 | 0,01 | 0,000 |

Dla każdej cząsteczki dało się zaobserwować liniową zależność między logarytmem dziesiętnym wydajności kwantowej fluorescencji i logarytmem lepkości (Rys. 5.8). Można stwierdzić, że w przypadku takiej korelacji, współczynnik kierunkowy prostej będzie określał czułość barwnika na zmiany lepkości (Tab. 5.4). Na Rys. 5.8 zamieszczono trzy panele w których znajdują się wyniki eksperymentalne dla badanych związków, a każdy z paneli odpowiada kolejno seriom **OMeBtR'**, **HBtR'** i **CF₃BtR'**. Takie zestawienie podkreśla, jak podstawnik w grupie fenyłowej wpływa na nachylenie prostej zmian logarytmu wydajności kwantowej fluorescencji wraz ze zmianą logarytmu lepkości. W podgrupie **OMeBtR'** (panel pierwszy) nie widać zależności współczynnika kierunkowej prostej od podstawnika w grupie fenyłowej, a największy wzrost wydajności kwantowej fluorescencji ze zmianą lepkości wykazuje pochodna **OMeBtH**. W przypadku podgrupy **HBtR'** widać, że nachylenie prostej zmienia się wraz ze zmianą podstawnika R', największe nachylenie uzyskano dla pochodnej **HBt4-CF₃**, a najmniejsze – dla **HBt4-OMe**. Podobne zmiany widać na panelu trzecim, dla związków **CF₃BtR'**. Współczynnik kierunkowy prostej dla funkcji $\log\Phi_F = a \cdot \log\eta + b$ maleje w szeregu **CF₃BtCF₃**, **CF₃BtH**, **CF₃Bt4-OMe**, a ostatnia pochodna nie zmienia wydajności kwantowej fluorescencji pod wpływem lepkiego środowiska, jak również pod wpływem wiązań tworzących się wodorowych. Związek **HBt4-CF₃** jest zatem najbardziej czuły na zmiany lepkości rozpuszczalnika. Z drugiej strony, związki posiadające grupę metoksyłową w pierścieniu fenyłowym charakteryzowały się najniższą odpowiedzią na zmiany lepkości środowiska (**OMeBt4-OMe**, **HBt4-OMe**) lub jej brakiem **CF₃Bt4-OMe**. Ogólnie, dla związków o najniższej Φ_F

w chloroformie, zauważono największy wzrost wydajności kwantowej fluorescencji wraz ze wzrostem lepkości medium.



Rys. 5.8: Zależność $\log \Phi_F$ od $\log \eta$ dla dziewięciu pochodnych w mieszaninach o różnym stosunku objętościowym metanolu i gliceryny

Dla trzech związków, **OMeBt4-OMe**, **OMeBtH**, **Hbt4-OMe**, wyznaczono czas życia fluorescencji w metanolu i glicerynie. Dla pozostałych związków wyznaczenie tej wielkości dla roztworów w metanolu nie było możliwe z powodu limitu detekcji aparatury. Jednak z Tab. 5.5 wynika, że zmiana nielepkiego metanolu na glicerynę w badanej grupie związków powoduje spadek nieradiacyjnej stałej szybkości o rząd wielkości. Dla pochodnej **OMeBt4-OMe** zmiana ta prowadzi do odwrócenia dominacji procesu bezpromienistego nad procesem promienistym, z czego wynika wzrost wydajności kwantowej fluorescencji z 27 do 73%. Dla pozostałych dwóch związków, mimo tak dużej zmiany stałej szybkości przejść bezpromienistych, nadal pozostaje ona większa od stałych szybkości przejść promienistych. Ogólnie można powiedzieć, że ograniczenie ruchów cząsteczki w stanie wzbudzonym wynikające ze wzrostu lepkości rozpuszczalnika, w którym ona się znajduje, powoduje znaczący spadek stałej szybkości przejść bezpromienistych bez istotnej zmiany stałej szybkości przejść promienistych. Balans między nimi powoduje zatem zwiększenie prawdopodobieństwa przejść promienistych, a tym samym wzrost wydajności kwantowej fluorescencji.

Tabela 5.5: Czas życia fluorescencji [ns] oraz stałe szybkości przejść promienistych i bezpromienistych [10^9 s^{-1}] dla **OMeBt4-OMe**, **OMeBtH**, **Hbt4-OMe** w metanolu i glicerynie

| Zw. (RBtR') | Metanol | | | Gliceryna | | |
|-------------------|---------|-------|----------|-----------|-------|----------|
| | τ | k_r | k_{nr} | τ | k_r | k_{nr} |
| OMeBt4-OMe | 0.14 | 0.18 | 7.23 | 1.15 | 0.25 | 0.62 |
| OMeBtH | 0.12 | 0.04 | 8.45 | 1.08 | 0.11 | 0.82 |
| Hbt4-OMe | 0.68 | 0.39 | 1.08 | 1.58 | 0.46 | 0.17 |

Opis uzyskanych wyników pozwala odpowiedzieć na pytanie stawiane na początku tego podrozdziału, czy za pomocą zmiany ilości i pozycji podstawników $-\text{CF}_3$ i $-\text{OMe}$ możliwe jest sterowanie wydajnością kwantową fluorescencji, a także zamierzona modyfikacja właściwości fotofizycznych poprzez zmiany lepkości środo-

wiska. Ta druga cecha jest niezwykle ważna ze względu na potencjalne aplikacje projektowanych tu związków. Zmniejszenie drgań cząsteczki w stanie wzbudzonej poprzez oddziaływania z biomolekułami może korzystnie wpływać na jej właściwości emisyjne. To zjawisko zostało wykorzystane w badaniach przeprowadzonych w grupie dr hab. inż. Joanny Olesiak-Bańskiej, prof. PWr (Politechnika Wroclawska). Dla barwników **OMeBtH**, **Hbt4-OMe** oraz **OMeBt4-OMe** wykonano testy oddziaływania z agregatami białkowymi. Wybrane barwniki odznaczały się zadowalającą czułością na zmiany lepkości środowiska. Dodatkowo, obecność grup –OMe przesuwala ich absorpcję batochromowo wzgledem pozostałych fluoroforów. Dla każdego z badanych barwników zauważono wzrost Φ_F po związaniu z amyloidami insuliny wołowej. Najwyższą wartość wydajności kwantowej fluorescencji, 94%, osiągnięto dla **Hbt4-OMe**. Co ciekawe, w przypadku tego związku, wydajność kwantowa fluorescencji w glicerynie osiągnęła wartość 73,3%. Dla każdego z trzech związków zauważono wyższą wartość wydajności kwantowej fluorescencji po związaniu z amyloidami w porównaniu z roztworami w glicerynie. Wyznaczone czasy życia fluorescencji (Tab. 5.6) pozwoliły obliczyć stałe szybkości przejść promienistych i bezpromienistych dla roztworów zawierających układy amyloid-białko. Podobnie jak w przypadku roztworów gliceryny, dla związków związanych z amyloidami zaobserwowano spadek wartości stałej szybkości przejść bezpromienistych w stosunku do tych otrzymanych dla roztworów w nielepkich rozpuszczalnikach. Wartości k_{nr} były nawet mniejsze niż dla gliceryny, skąd wynika wyższa wydajność kwantowa fluorescencji wybranych barwników. Cząsteczki związane z białkiem mają ograniczoną swobodę ruchów, co zmniejsza prawdopodobieństwo konwersji wewnętrznej. Wyniki pokazały, że pochodna **OMeBt4-OMe** wykazywała większy wzrost wydajności kwantowej fluorescencji po związaniu z amyloidami niż wzrost obserwowany dla Tioflawiny T.

Tabela 5.6: Wydajność kwantowa fluorescencji Φ_F [%], czas życia fluorescencji τ [ns], stałe szybkości przejść promienistych k_r i bezpromienistych k_{nr} [10^9 s^{-1}] dla **OMeBtH**, **Hbt4-OMe** oraz **OMeBt4-OMe** wyznaczonych po związaniu z amyloidami

| Zw. (RBtR') | Φ_F | τ | k_r | k_{nr} |
|-------------------|----------|--------|-------|----------|
| OMeBt4-OMe | 75,3 | 2,45 | 0,32 | 0,10 |
| OMeBtH | 27,5 | 1,93 | 0,14 | 0,37 |
| HbtOMe | 94,4 | 1,98 | 0,48 | 0,03 |

Zespół z Politechniki Wroclawskiej przetestował również omawiane związki pod wzgledem absorpcji dwufotonowej. W badaniu potwierdzono, że możliwe jest dwufotonowe wzbudzenie cząsteczki. Jest to niezaprzeczalna zaleta proponowanego rdzenia fluorescencyjnego [173]. Zdolność absorpcji dwufotonowej niesie ze sobą ogromny potencjał aplikacyjny, który może zostać wykorzystany w mikroskopii wielofotonowej o wysokich rozdzielczościach. Niestety, położenie maksimum absorpcji, odpowiadającemu energii z zakresu UV, może utrudniać ewentualne wykorzystanie tych związków *in vivo*. Badania jednoznacznie wskazały, że konieczne jest dalsze optymalizowanie właściwości badanych pochodnych w kierunku uzyskania struk-

tur o batochromowo przesuniętej absorpcji i fluorescencji. Z serii związków, które zsyntetyzowano w ramach niniejszej pracy, jak dotąd, największe przesunięcie widoczne było dla pochodnych **OMeBt4-NMe₂** i **CF3Bt4-NMe₂**. Architektura A–A–D i wysoka wydajność kwantowa fluorescencji drugiego związku, podobnie jak pochodnej **CF3Bt4-OMe**, może sugerować, że lepkość rozpuszczalnika nie wpłynie na intensywność fluorescencji, co uniemożliwi planowanie aplikacji w bioobrazowaniu. Jednak zmiana lepkości środowiska to nie jedyny parametr, których zmiany można śledzić za pomocą barwników fluorescencyjnych. Badania przeprowadzone przez Potopnyka i współpracowników wskazują istotne zmiany w położeniu maksimum fluorescencji pod wpływem zmiany polarności rozpuszczalnika [153]. Zmiana właściwości fotofizycznych wraz ze zmianami polarności otoczenia cząsteczki może zostać wykorzystana w projektowaniu odpowiedzi sond fluorescencyjnych na bodźce zewnętrzne. Zatem kolejny krok w podjętych badaniach stanowiło zaprojektowanie związku o strukturze zoptymalizowanej już wprost pod kątem badania agregacji amyloidów.

5.5 Wpływ charakteru podstawników na właściwości agregacyjne

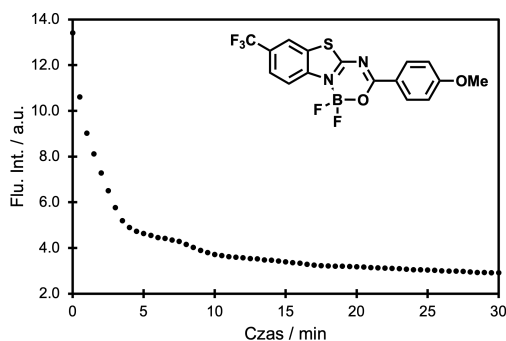
W poprzednich rozdziałach opisano wpływ podstawnika w barwnikach na właściwości emisyjne w roztworze z uwzględnieniem zmian lepkości roztworu, w którym barwnik się znajduje. Zauważono, że dla wybranych związków wzrost lepkości zwiększa wydajność kwantową fluorescencji poprzez hamowanie ruchów cząsteczkowych powodujących bezpromienne przejścia do stanu podstawowego. Innym eksperymentalnym sposobem potwierdzenia hipotezy, że ruchy te odpowiadają za wygaszanie fluorescencji w analizowanych układach może być zbadanie zjawiska agregacji.

Formowanie się agregatów można obserwować w roztworach o dużym stężeniu lub w roztworach wodnych, a także w mieszaninach rozpuszczalników, w których woda jest głównym składnikiem. W dalszej części opracowania zostaną przedstawione wyniki badań właściwości fotofizycznych barwników w roztworach o różnej zawartości wody w mieszaninie z THF. Znaczące zmiany we właściwościach fotofizycznych barwników w roztworach o systematycznie zmienianym stosunku objętościowego rozpuszczalników pozwala na ustalenie takiego składu mieszaniny, w którym zaczynają formować się agregaty w mieszaninie. W kolejnym kroku możliwa jest charakterystyka fotofizyczna agregatów. Niestety, proponowane podejście wprowadza do rozważanego układu dodatkowe stopnie swobody. W przypadku mieszanin z dużym udziałem wody powstają agregaty, czyli skupiska cząsteczek fluoroforu, które otoczone są cząsteczkami dwóch rozpuszczalników – wody i THF. Sama zmiana polarności zastosowanej mieszaniny rozpuszczalników, wynikająca z modyfikacji jej składu, może istotnie wpływać na obserwowane właściwości fotofizyczne barwników. Wprowadzenie barwnika fluorescencyjnego do próbki zawierającej znaczną ilość wody może powodować jego agregację, modyfikując w niekontrolowany sposób właściwości fotofizyczne, co może zostać mylnie interpretowane na przykład jako skuteczne wykrywanie analitu w próbce biologicznej. Z drugiej strony, otrzymywane

5.5. Wpływ charakteru podstawników na właściwości agregacyjne

agregaty barwników mogą służyć jako sonda fluorescencyjna, stąd konieczne jest precyzyjne poznanie ich właściwości.

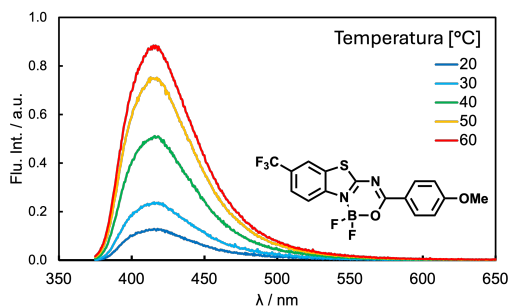
Dla zbadania procesu agregacji badanych związków, znaczenia rozpuszczalników w tym procesie oraz ich wpływu na właściwości fotofizyczne agregatów, przygotowano mieszaniny THF/woda o zawartości wody (objętościowo) od 0 do 90%. Następnie przygotowano roztwory, w których ilość wody zwiększono tak, aby była możliwa rejestracja fluorescencji, zaś barwnik nie uległ wytrąceniu (od 93 do 97% wody).



Rys. 5.9: Zmiana intensywności fluorescencji **CF₃Bt4-OMe** w czasie dla roztworu zawierającego 75% wody

Na uwagę zasługuje fakt, że proces formowania agregatów nie jest natychmiastowy, a mieszanina potrzebuje czasu, aby osiągnąć stan równowagi. Czas ten jest różny w zależności od składu mieszaniny i rodzaju badanego związku. Należy więc ostrożnie podchodzić do wyników uzyskiwanych bezpośrednio po przygotowaniu roztworu. Widać to na przykładzie związku **CF₃Bt4-OMe** w jego roztworze zawierającym 75% wody (Rys. 5.9). Wykres pokazuje zmianę intensywności fluorescencji monitorowanej przy 420 nm w czasie. W ciągu pierwszych 5 minut od rozpoczęcia pomiaru, intensywność fluorescencji bardzo szybko spada. Po 5 minutach spadek ten jest mniej wyraźny, ale utrzymuje się do 30 min. Zatem, w przypadku badań agregacji konieczne było monitorowanie, czy i jak zmienia się widmo emisji w czasie pomiarów. Przedstawiony przykład jest skrajnym wynikiem, uzyskanym podczas prowadzonych eksperymentów. Przy wyższych zawartościach wody w mieszaninie, stan równowagi w roztworze ustalał się znacznie szybciej. Podobne zależności intensywności fluorescencji od czasu zauważono również dla innych związków, przy składzie rozpuszczalników o minimalnej zawartości wody, dla której zachodziła agregacja. Kinetyka tych zmian nie będzie dyskutowana w dalszej części opracowania. Jest to jedynie uwaga, na jakie trudności można się natknąć podczas prowadzenia tego typu eksperymentów.

Położenie stanu równowagi zależy również od temperatury. Dla poprzednio przytoczonego przykładu (**CF₃Bt4-OMe**), który w procesie agregacji wykazuje spadek intensywności fluorescencji, zbadano, jak temperatura wpłynie na zachowanie agregatów oraz właściwości fluorescencyjnych badanych barwników. W tym celu przygotowano roztwór zawierający 75% wody. Roztwór o takim składzie wybrano ze względu to, że przy wspomnianym składzie mieszaniny rozpuszczalników zaobserwowane pierwsze oznaki zmiany intensywności fluorescencji, gdy ilość wody w mieszaninach



Rys. 5.10: Zmiana intensywności fluorescencji w zależności od temperatury $\text{CF}_3\text{Bt4-OMe}$ w roztworze zawierającym 75% wody

była zwiększana. Związek $\text{CF}_3\text{Bt4-OMe}$ w mieszaninie o zawartości wody na poziomie 70% charakteryzował się silną fluorescencją. Zwiększenie tej zawartości do 75% spowodowało znaczny spadek intensywności wywołany formowaniem się agregatów. Po przygotowaniu roztworu zmierzono widmo fluorescencji w 20°C . W następnym kroku ogrzano mieszaninę do 30°C i ponownie zmierzono widmo zauważając znaczny wzrost intensywności. Następnie obserwowano, jak zmienia się intensywność, rejestrując widma fluorescencji kolejno w temperaturach 40, 50 i 60°C . W przypadku podwyższania temperatury intensywność fluorescencji zwiększała się w każdym kroku (Rys. 5.10). W ten sposób udało się wykazać, że wraz ze wzrostem temperatury następuje uwalnianie cząsteczek barwnika z agregatów. Warto zaznaczyć, że efekt ten jest większy niż negatywny wpływ temperatury na emisję, kiedy to zwykle ogrzewanie roztworów barwników powoduje obniżenie intensywności fluorescencji. Na podstawie przedstawionych wyników nie można jednak uznać tego zachowania za ogólną prawidłowość, ponieważ zbadano jedynie jeden skład mieszaniny związku $\text{CF}_3\text{Bt4-OMe}$, nie rozszerzając badań na inne barwniki. Jednak takie zachowanie agregatów wybranego barwnika jest warte odnotowania.

Badania agregacji w roztworach o dużej zawartości wody przeprowadzono dla tych samych dziewięciu związków, które poddano eksperymentom ze zmianami lepkości roztworu. W przypadku wzrostu lepkości rozpuszczalnika wydajność kwantowa fluorescencji wzrastała dla wszystkich barwników, z wyjątkiem $\text{CF}_3\text{Bt4-OMe}$, dla którego wydajność ta była stała bez względu na lepkość i wynosiła blisko 100%. Oznaczało to, że dla pozostałych związków opisanych w podrozdziale 5.4 lepki rozpuszczalnik wpływał na szybkość bezpromienistej konwersji do stanu podstawowego, wynikającą z ruchów cząsteczek. W przypadku agregacji, obserwowano wzrost lub zmniejszenie wydajności kwantowej fluorescencji, a tendencja tych zmian zależała głównie od podstawnika w pierścieniu fenylowym. W serii związków OMeBtR' intensywność fluorescencji w THF i jego mieszaninach z wodą do zawartości 70% wody nie zmieniała się istotnie. Dla zawartości wody 75% związek OMeBt4-CF_3 agregował, w wyniku czego zaobserwowano znaczący wzrost intensywności fluorescencji. Tendencja wzrostowa utrzymywała się do osiągnięcia 90% wody, dla której to mieszaniny osiągnięto 14-krotny wzrost intensywności fluorescencji względem tej zmierzonej dla roztworu przy zawartości wody 70%. Dla pozostałych związków również zaobserwowano wzrost intensywności fluorescencji spowodowane agregacją. Następował on po przekroczeniu zawartości wody 80 i 85% odpowiednio dla związków

5.5. Wpływ charakteru podstawników na właściwości agregacyjne

Tabela 5.7: Właściwości fotofizyczne barwników w THF i agregatów w mieszaninie rozpuszczalników (97% wody)

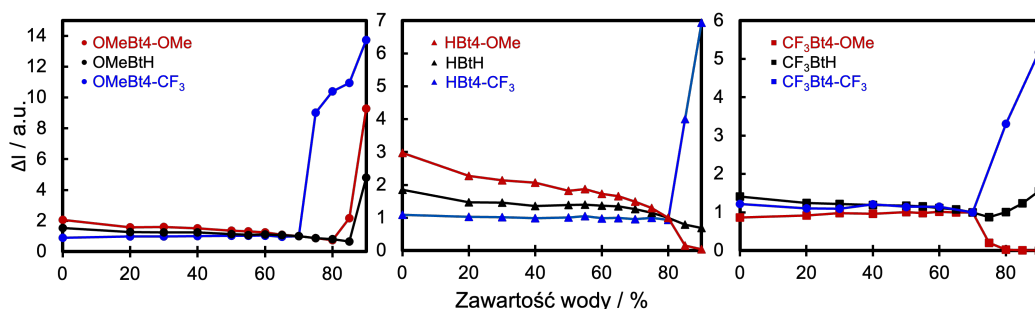
| Zw. (RBtR') | THF | | Agregaty | |
|-------------------------------------|------------------------------------|---------------------|------------------------------------|---------------------|
| | $\lambda_{\text{THF}}^{\text{em}}$ | Φ_{THF} | $\lambda_{\text{agg}}^{\text{em}}$ | Φ_{agg} |
| OMeBt4-CF ₃ | 496,0 | 1 | 483,5 | 61 |
| OMeBtH | 464,0 | 1 | 464,5 | 17 |
| OMeBt4-OMe | 457,5 | 8 | 471,5 | 27 |
| HBt4-CF ₃ | 451,0 | 1 | 453,5 | 53 |
| HBtH | 445,0 | 2 | 450,5 | 25 |
| HBt4-OMe | 419,0 | 48 | 476,5 | 18 |
| CF ₃ Bt4-CF ₃ | 451,5 | 2 | 458,0 | 14 |
| CF ₃ BtH | 428,0 | 9 | 442,5 | 14 |
| CF ₃ Bt4-OMe | 413,0 | 88 | 508,0 | 11 |

ków **OMeBt4-OMe** i **OMeBtH** (Rys. 5.11, lewy panel). Dla agregatów zauważono również zmiany położenia pasma emisyjnego w stosunku do pasm zmierzonych w THF. Dla **OMeBt4-CF₃**, po agregacji następowało hipsochromowe przesunięcie maksimum emisji względem pasma zarejestrowanego w roztworze THF z 495,0 do 483,5 nm. Dla związku **OMeBtH** położenie maksimum emisji zmieniało się jedynie o 0,5 nm dla agregatów w stosunku do widma zarejestrowanego w THF. Największą zmianę w położeniu pasma emisyjnego agregatów zaobserwowano dla **OMeBt4-OMe**, gdzie maksimum emisji batochromowo przesunęło się o 14 nm w stosunku do roztworu THF. Oczywiście jest, że wraz ze zmianami intensywności fluorescencji dla tych związków, wzrastała wydajność kwantowa fluorescencji zmierzona dla agregatów, w porównaniu do roztworów w THF. Największy wzrost Φ_F widać dla **OMeBt4-CF₃**. Dla pochodnej tej w tetrahydrofuranie wydajność kwantowa wynosi 1%, natomiast dla agregatów otrzymanych w roztworze zawierającym 97% wody osiągnęła ona wartość 61%. Dla **OMeBtH** zmiana ta była mniejsza, z Φ_F równej 1% w THF do 17% dla agregatów. Najmniejszy przyrost wydajności kwantowej fluorescencji widoczny jest dla **OMeBtOME**: z $\Phi_F(\text{THF}) = 8\%$ w roztworze, zaś dla zdyspergowanych agregatów wartość Φ_F osiągnęła 27%. Oznacza to, że dla każdej z omawianych pochodnych występuje zjawisko emisji indukowanej agregacją, a jego intensywność zależy od podstawnika w pierścieniu fenylovym.

Dla kolejnych serii, **HBtR'** oraz **CF₃BtR'**, różnice we właściwościach emisyjnych agregatów istotnie zależą od podstawnika **R'**. W serii **HBtR'** wyraźne zmiany fotofizyczne, spowodowane agregacją, zaobserwowano w mieszaninach zawierających powyżej 80% wody. Dla agregatów związków **HBtR'** pasma emisji przesuwają się batochromowo. Największe przesunięcie widoczne jest dla **HBt4-OMe**, z 419 nm w THF do 475,5 nm dla agregatów, a najmniejsze dla **HBt4-CF₃** (3,5 nm). Zmiany

intensywności fluorescencji wraz ze zmianą składu mieszaniny w tej serii (Rys. 5.11, środkowy panel) pokazują, że w zależności od podstawnika **R'** następuje wzrost (dla **HBt4-CF₃**) lub spadek (dla **HBt4-OMe**) fluorescencji po utworzeniu agregatów w roztworze. Podobnie w serii **CF₃BtR'**, w której proces agregacji zauważono w roztworach z zawartością wody powyżej 75%, położenie pasma emisyjnego również przesuwają się w stronę większych długości fal, jak w przypadku związków **HBtR'**. Największe przesunięcie ku czerwieni widoczne jest dla związku oznaczonego **CF₃Bt4-OMe**, (413,0 vs 508,0 nm), a najmniejsze dla **CF₃BtH** (14,5 nm). Dodatkowo, tendencja zmiany intensywności fluorescencji wraz ze zmianą składu mieszaniny (Rys. 5.11, prawy panel) jest taka sama dla **CF₃BtR'**, jak dla **HBtR'**: dla **CF₃Bt4-CF₃** intensywność fluorescencji po agregacji rośnie, a dla **CF₃Bt4-OMe** spada. Podobne różnice widać w wydajnościach kwantowych fluorescencji dla roztworów barwników w THF i roztworów agregatów. Dla pochodnych z podstawnikiem **-OMe** w pierścieniu fenylowym agregacja powoduje wygaszenie fluorescencji. Dla **HBtOMe** wydajność kwantowa fluorescencji spada z 48% w THF do 18% dla agregatów. Podobnie dla **CF₃BtOMe** - tu spadek Φ_F jest 8-krotny, z 88% w roztworze do 11% dla agregatów. Należy zauważyć, że odwrotnie dzieje się, gdy donor elektronów (podstawnik **-OMe**) w grupie fenylovej zastąpiony zostanie akceptorem (podstawnik **-CF₃**). Agregaty **HBt4-CF₃** wykazują wydajność kwantową fluorescencji na poziomie 53%, podczas gdy w roztworze THF wartość ta wynosi 1%. Podobnie dla **CF₃Bt4-CF₃**: wzrost Φ_F jest 7-krotny, z 2% w THF do 14% dla agregatów.

Analizując wyniki wydajności kwantowej fluorescencji dla wszystkich badanych związków, największy jej wzrost zaobserwowano dla **OMeBt4-CF₃**, a następnie kolejno dla **HBt4-CF₃** i **CF₃Bt4-CF₃**. Z przedstawionych danych jasno wynika, że dla tych trzech pochodnych dochodzi do zjawiska wywołania lub wzmocnienia emisji na skutek agregacji, a dla pochodnych **HBt4-OMe** i **CF₃Bt4-OMe** możemy mówić o wygaszaniu fluorescencji spowodowanym agregacją (ACQ). W przypadku pochodnych bez podstawnika w grupie fenylovej również występuje efekt wzrostu wydajności kwantowej fluorescencji w wyniku agregacji. Dla agregatów związków **OMeBtH**, **HBtH**, **CF₃BtH** wydajność kwantowa fluorescencji wynosi odpowiednio 17, 25 i 14%.



Rys. 5.11: Zmiana intensywności fluorescencji dla roztworów związków w zależności od składu rozpuszczalnika

W celu zrozumienia, jak agregacja wpływa na prawdopodobieństwo zajścia procesów promienistych i bezpromienistych, zmierzono czasy życia fluorescencji dla związków rozpuszczonych w THF oraz agregatów. Jak widać w Tab. 5.8 agregacja

5.5. Wpływ charakteru podstawników na właściwości agregacyjne

powoduje wydłużenie czasu życia fluorescencji. Dla związku **CF₃Bt4-OMe** czas ten jest najdłuższy i wynosi 12,4 ns, zaś agregacja nie wpływa na szybkość przejść bezpromienistych (porównywalnej do jej wartości dla roztworu), ale znacząco zmienia stałą szybkości przejść promienistych. Jednak agregacja, oprócz unieruchomienia cząsteczki, powoduje pojawienie się silnych oddziaływań międzycząsteczkowych. Te dwa czynniki bezpośrednio wpływają na stałe szybkości przejść promienistych i bezpromienistych. Dla **CF₃Bt4-OMe** stała szybkości przejść promienistych zmienia się z 0,52 do 0,01 · 10⁹ s⁻¹, co w rezultacie powoduje znaczny spadek wydajności kwantowej fluorescencji. Z wyjątkiem **OMeBt4-CF₃** i **HBt4-CF₃**, stałe szybkości przejść promienistych są niższe dla omawianych związków niż te wyznaczone dla roztworów w THF, co może wynikać z silnych oddziaływań międzycząsteczkowych. Znacznie różnice między szybkościami przejść bezpromienistych zaobserwowano dla barwników w roztworze THF, w porównaniu z ich agregatami. Z wyjątkiem **CF₃Bt4-OMe**, unieruchomienie cząsteczek w agregatach powoduje znaczne obniżenie wartości stałych szybkości przejść bezpromienistych. Wynikać to może, podobnie jak w przypadku lepkich roztworów, z ograniczania drgań cząsteczek, a tym samym zmniejszenia prawdopodobieństwa bezpromienistych przejść w wyniku konwersji wewnętrznej.

Tabela 5.8: Czas życia fluorescencji τ [ns] oraz stałe szybkości przejść promienistych k_{nr} i bezpromienistych k_{nr} [10^9 s⁻¹] wyznaczonych w THF i dla agregatów

| Zw. (RBtR') | THF | | | Agregaty | | |
|---------------------------------------|--------|-------|----------|----------|-------|----------|
| | τ | k_r | k_{nr} | τ | k_r | k_{nr} |
| OMeBtCF₃ | 0,09 | 0,12 | 11,60 | 2,96 | 0,21 | 0,13 |
| OMeBtH | 0,09 | 0,12 | 11,60 | 2,96 | 0,06 | 0,28 |
| OMeBtOMe | 0,29 | 0,28 | 3,19 | 2,42 | 0,11 | 0,30 |
| HBtCF₃ | 0,06 | 0,16 | 15,87 | 2,91 | 0,18 | 0,16 |
| HBtH | 0,09 | 0,23 | 11,44 | 4,98 | 0,05 | 0,15 |
| HBtOMe | 1,22 | 0,39 | 0,43 | 6,74 | 0,03 | 0,12 |
| CF₃BtCF₃ | 0,06 | 0,37 | 17,94 | 3,74 | 0,04 | 0,23 |
| CF₃BtH | 0,38 | 0,24 | 2,42 | 4,49 | 0,03 | 0,19 |
| CF₃BtOMe | 1,68 | 0,52 | 0,07 | 12,37 | 0,01 | 0,07 |

W tym przypadku sterowanie zjawiskami wzmacniania lub wygaszania fluorescencji barwników zawierających różne podstawniki wynika z balansu między oddziaływaniami międzycząsteczkowymi (negatywny wpływ), a ograniczeniem drgań cząsteczek (pozytywny wpływ). W celu ograniczenia znaczenia oddziaływań międzycząsteczkowych można wprowadzić do cząsteczki inny, większy, podstawnik, wywołując w ten sposób zawadę steryczną, przeciwdziałającą zbliżaniu się do siebie cząsteczek barwnika.

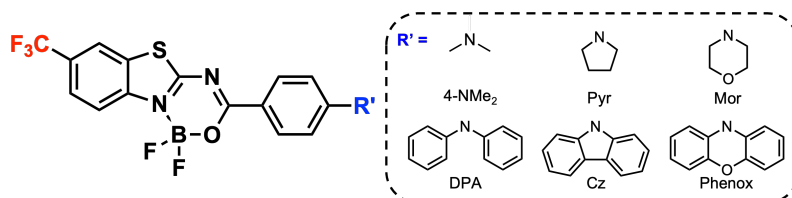
Wpływ struktury silnego donora elektronów na właściwości fotofizyczne

6.1 Seria związków z silnym donorem elektronów

Na podstawie wpływu charakteru podstawników na właściwości fotofizyczne barwników opisanych w poprzednich podrozdziałach, zaproponowano modyfikacje podstawników donorowych. Zabieg miał na celu dalsze przesunięcie batochromowe widm emisyjnych z zachowaniem wysokiej wydajności kwantowej fluorescencji. Ostatecznym celem miało być testowanie otrzymanych związków w bioobrazowaniu.

Doniesienia literaturowe wskazują, że modyfikacje strukturalne grupy aminowej (silnego donora elektronów) mogą wpłynąć na właściwości fotofizyczne barwników, takie jak położenie maksimum absorpcji, emisji oraz wydajność kwantową fluorescencji [174–177]. Podobne zmiany zauważono również dla pochodnej Tioflawiny T (Rys. 3.1) nazwanej Tioflawiną X, w której oryginalną grupę *N,N*-dimetyloaminową zastąpiono piroolidynową. W efekcie uzyskano batochromowe przesunięcie pasm absorpcji i emisji, ale również zmianę stopnia wiązania z amyloidami. Wykazano, że dzięki tak małej zmianie strukturalnej możliwe jest wykrywanie agregatów o mniejszej masie i strukturalnie różnych agregatów białkowych, w porównaniu z Tioflawiną T [178, 179]. Dla innej serii związków o strukturze podobnej do Tioflawiny T zauważono, że zmiana podstawnika -NMe₂ na morfolinowy (por. Rys. 6.1) spowodowała, że możliwe było oznaczenie różnic strukturalnych agregatów białkowych [180].

Zatem do realizacji celu założonego w niniejszej pracy, zaprojektowano i otrzymano serię sześciu barwników o topologii A-A-D, które wykazują wewnątrzcząsteczkowe przeniesienie ładunku. Rolę donora elektronów tym razem pełniły grupy aminowe o różnej architekturze, wynikającej z obecności dodatkowych atomów, usztywnienia struktury i/lub wprowadzenia pierścieni aromatycznych. W rozważaniach uwzględniono pochodne zawierające podstawową grupę *N,N*-dimetyloaminową **CF₃BtNMe₂**, piperolidynową **CF₃BtPyr** oraz pochodną morfolinową **CF₃BtMor**, zawierającą atom tlenu, będący akceptorem wiązań wodorowych. Serię trzech amin alifatycznych dopełniają pochodne z dodatkowymi pierścieniami aromatycznymi, grupy: *N,N*-difenyloaminowa **CF₃BtDPA**, karbazolowa **CF₃BtCz** oraz fenoksazynowa **CF₃BtPhenox** (Rys. 6.1). Grupa *N,N*-difenyloaminowa jest zwykle wprowadzana do struktury barwników w celu uzyskania emisji indukowanej agregacją [181, 182], co pozwala przypuszczać, że pochodna **CF₃BtDPA** będzie mogła być wykorzystana do wykrywania agregatów białkowych [183, 184]. Podobnie cząsteczki zawierające karbazol znalazły zastosowanie w detekcji β -amyloidów [185], stąd można spodziewać się podobnej skuteczności zaproponowanej w tej serii pochodnej **CF₃BtCz**.



Rys. 6.1: Struktura związków **CF₃BtR'** z silnymi donorami elektronów

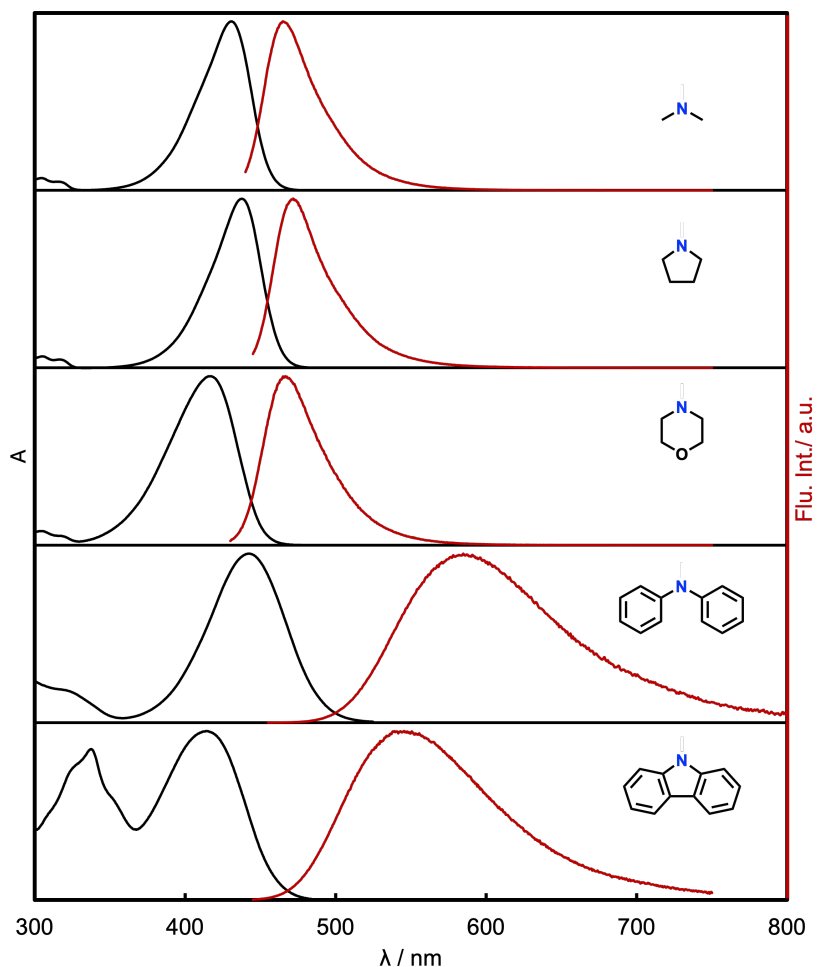
W tabeli 6.1 zestawiono właściwości fotofizyczne sześciu pochodnych z Rys. 6.1, zmierzone w chloroformie i wyraźnie wskazujące na podział serii na dwie podgrupy związków: zawierające alifatyczną oraz aromatyczną grupę aminową. Trzy pierwsze związki z Tab. 6.1, **CF₃Bt4-NMe₂**, **CF₃BtPyr** i **CF₃BtMor**, charakteryzują się stosunkowo niewielkim przesunięciem Stokesa i wysoką wydajnością kwantową fluorescencji. Maksimum absorpcji tych związków mieści się między 415,5 nm dla **CF₃BtMor** a 437,5 nm dla **CF₃BtPyr**. Hipsochromowe przesunięcie pasma absorpcyjnego dla pochodnej morfolinowej wynika z obecności silnie elektroujemnego atomu tlenu w strukturze donora, co powoduje wyraźny efekt indukcyjny, zmniejszając tym samym właściwości donorowe podstawnika. Dodatkowym efektem strukturalnym może być znacznie różna od posatałych alifatycznych podstawników geometria morfoliny, nawiązująca kształtem do cykolheksanu. Tendencja ta nie jest zachowana w przypadku położenia pasma emisyjnego: dla **CF₃Bt4-NMe₂**, **CF₃BtPyr** i **CF₃BtMor** maksimum położone jest odpowiednio przy 462,0, 471,5 i 464,0 nm. Najmniejsze przesunięcie Stokesa odnotowano dla **CF₃Bt4-NMe₂** (1580 cm⁻¹), a największe w tej grupie wyznaczono dla **CF₃BtMor** (2516 cm⁻¹). Dodatkowo, pasma w widmach emisyjnych trzech pierwszych związków (**CF₃Bt4-NMe₂**, **CF₃BtPyr** i **CF₃BtMor**) są wąskie i stanowią niemalże lustrzane odbicie pasm absorpcyjnych, co wskazuje na minimalną reorganizację strukturalną cząsteczek po wzbudzeniu (Rys. 6.2). Największą wydajność kwantową fluorescencji zaobserwowano dla **CF₃BtMor** – wynosiła ona 98%. Związki **CF₃Bt4-NMe₂** i **CF₃BtPyr** wykazywały porównywalną wydajność kwantową fluorescencji, odpowiednio, 94 i 95%. Z monoeksponencjalnych krzywych zaniku

6.1. Seria związków z silnym donorem elektronów

fluorescencji dla tych barwników wyznaczono czas życia fluorescencji, którego wartości są podobne dla i mieszczą się w przedziale od 1,73 do 1,83 ns. Na ich podstawie obliczono stałe szybkości przejść promienistych i bezpromienistych. Dla pochodnej **CF₃BtMor** stałe te wynoszą odpowiednio 0,57 i 0,01, wykazując dominujący wpływ procesu promienistego w relaksacji wzbudzonej cząsteczki do stanu podstawowego. Podobnie sytuacja wygląda dla pochodnych pirolidynowej i *N,N*-dimetyloaminowej.

Tabela 6.1: Właściwości fotofizyczne związków **CF₃BtR'** w chloroformie: długość fali w maksimum absorpcji λ_{max}^{abs} [nm], długość fali w maksimum fluorescencji λ_{max}^{em} [nm], przesunięcie Stokesa SS [cm^{-1}], wydajność kwantowa fluorescencji Φ_F [%], czas życia fluorescencji τ [ns], stała szybkości przejść promienistych k_r [10^9 s^{-1}] i bezpromienistych k_{nr} [10^9 s^{-1}]

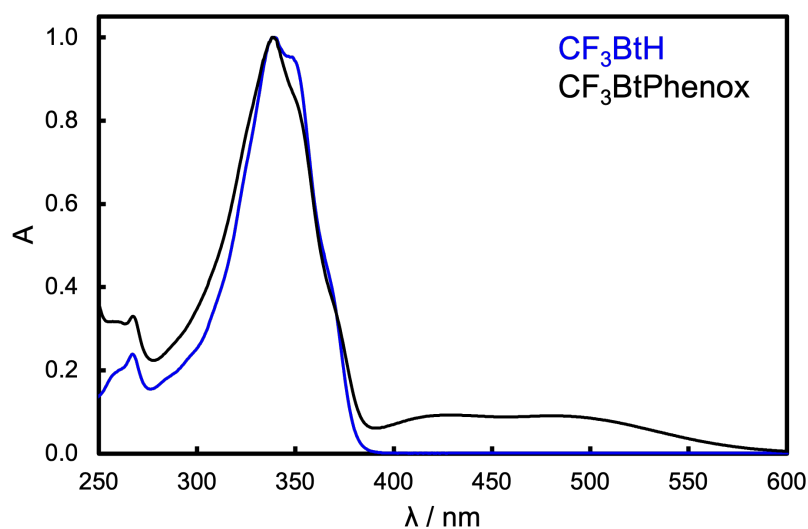
| Zw. (RBtR') | λ_{max}^{abs} | λ_{max}^{em} | SS | Φ_F | τ | k_r | k_{nr} |
|--|-----------------------|----------------------|------|----------|--------|-------|----------|
| CF₃Bt4-NMe₂ | 430,5 | 462,0 | 1580 | 94 | 1,80 | 0,52 | 0,03 |
| CF₃BtPyr | 437,5 | 471,5 | 1648 | 95 | 1,83 | 0,52 | 0,03 |
| CF₃BtMor | 415,5 | 464,0 | 2516 | 98 | 1,73 | 0,57 | 0,01 |
| CF₃BtDPA | 442,5 | 541,5 | 4132 | 63 | 3,94 | 0,16 | 0,09 |
| CF₃BtCz | 413,5 | 584,5 | 5530 | 58 | 6,32 | 0,09 | 0,07 |
| CF₃BtPhenox | 338,0 | 437,0 | 6703 | 0.5 | 1,66 | 0,01 | 0,60 |



Rys. 6.2: Widma absorpcji (czarny) i fluorescencji (czerwony) dla pochodnych donor-akceptor

Dla związków zawierających aromatyczną grupę aminową, **CF₃BtDPA**, **CF₃BtCz** oraz **CF₃BtPhenox**, wyniki uzyskane w chloroformie znacznie różnią się od wcześniej omawianych rezultatów dla pochodnych alifatycznych. W widmie absorpcji **CF₃BtDPA** przedstawionym na czwartym panelu Rys. 6.2 widoczne jest intensywne pasmo, położone przy 442,5 nm, związane z absorpcją związaną ze znacznym wewnątrzcząsteczkowym przeniesieniem ładunku. Dla **CF₃BtCz** w widmie absorpcyjnym obserwuje się dwa, względnie blisko położone pasma: pierwsze, o większej intensywności, położone jest przy 413,5 nm, natomiast maksimum pasma o mniejszej intensywności znajduje się przy 338,6 nm. Dwa pasma na widmie absorpcyjnym można zauważyć również dla związku **CF₃BtPhenox** (Rys. 6.3). Tu intensywne pasmo znajduje się przy 339,0 nm, zaś szerokie pasmo absorpcyjne o małej intensywności, wynikające z wewnątrzcząsteczkowego przeniesienia ładunku – przy 488 nm. Krótkofalowe pasmo widoczne w widmach **CF₃BtCz** i **CF₃BtPhenox** odpowiada prawdopodobnie przejściom elektronowym w części benzotiazolowej. W celu potwierdzenia tej hipotezy na Rys. 6.3 porównano ze sobą widma absorpcji związków **CF₃BtPhenox** i niepodstawionego w pierścieniu fenyłowym **CF₃BtH**. Ich pasma absorpcyjne w znacznym stopniu pokrywają się ze sobą. Sugeruje to słabe sprzężenie

między donorem elektronów a pozostałą częścią cząsteczki **CF₃BtPhenox**, które może być efektem skręcenia grupy fenoksazykowej względem benzotiazolu.



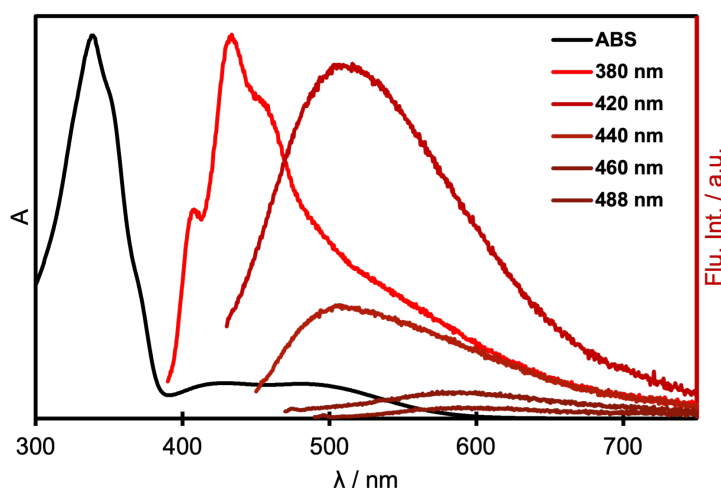
Rys. 6.3: Widma absorpcji związków **CF₃BtPhenox** (czarna linia) i **CF₃BtH** (niebieska linia) w chloroformie

Na Rys. 6.2 pokazano również widma fluorescencji dla **CF₃BtDPA** i **CF₃BtCz**. Dla tych związków pasma emisyjne posiadają znacznie większą szerokość połówkową w stosunku do pasm absorpcji. Poszerzenie pasm emisji w stosunku do pasm absorpcyjnych może wynikać z relaksacji wibracyjnej. Maksimum tych pasm znajduje się przy 541,5 i 584,5 nm odpowiednio dla pochodnej difenyloaminowej i karbazolowej. Zatem **CF₃BtDPA** i **CF₃BtCz** charakteryzują się większym przesunięciem Stokesa niż pochodne bez pierścieni aromatycznych w strukturze donora. Dla **CF₃BtCz** przesunięcie Stokesa wynosiło 5852 cm⁻¹, a dla **CF₃BtDPA** – 4132 cm⁻¹. Może to wskazywać na większy wzrost momentu dipolowego w stanie wzbudzonym, w porównaniu do momentu dipolowego w stanie podstawowym, dla pochodnych **CF₃BtDPA** i **CF₃BtCz** niż dla związków z alifatyczną grupą aminową: **CF₃BtNMe₂**, **CF₃BtPyr** i **CF₃BtMor**.

Różnica między podzbiórami alifatycznych i aromatycznych donorów widoczna jest również w przypadku pozostałych właściwości fotofizycznych. Związki **CF₃BtDPA** i **CF₃BtCz** charakteryzują się znacznie niższymi wydajnościami kwantowymi fluorescencji niż pochodne ich odpowiedniki alifatyczne (odpowiednio 63 i 58%), natomiast czas życia fluorescencji wydłuża się dla cząsteczek pierwszych. Wyznaczone stałe szybkości przejść promienistych i bezpromienistych pokazują, że dla pochodnej difenyloaminowej i karbazolowej prawdopodobieństwo przejść promienistych jest znacznie mniejsze niż dla pochodnych z niearomatycznymi grupami donorowymi. Wzrost stałych szybkości przejść bezpromienistych **CF₃BtDPA** i **CF₃BtCz** w stosunku do poprzednich pochodnych sugeruje, że po wzbudzeniu cząsteczki może następować wzrost kąta dwuściennego między donorem elektronów i rdzeniem benzotiazolowym w cząsteczce. Wzrost kąta między fragmentami cząsteczki powoduje jednak zwiększenie prawdopodobieństwa wewnętrznej konwersji do stanu podstawowego przez przecięcie płaszczyzn energii potencjalnej stanu podstawowego i wzbudzonego. Energia takiego skręconego wzbudzonego stanu singletowego z wewnątrzcząsteczkowym

przeniesieniem ładunku może być bliska energii stanu trypletowego, co może prowadzić do przejść międzysystemowych i otwierać drogę kolejnym bezpromienistym ścieżkom dezaktywacji stanu wzbudzonego.

Związek **CF₃BtPhenox** wykazuje właściwości fotofizyczne zdecydowanie różniące się od pozostałych w serii. Charakteryzuje się on największym przesunięciem Stokesa, wynoszącym aż 6700 cm^{-1} . Wydajność kwantowa fluorescencji tego związku jest bardzo niska ($\Phi_F = 0,5\%$). Słaba emisja pochodnej fenoksazynowej wynika z niekorzystnego stosunku stałych szybkości przejść promienistych i bezpromienistych: k_{nr} jest kilkadziesiąt razy wyższa niż k_r .



Rys. 6.4: Widma absorpcji i fluorescencji dla pochodnej **CF₃BtPhenox** w zależności od długości fali wzbudzenia

Na uwagę zasługują również zaobserwowane zmiany położenia pasm emisyjnych w zależności od długości fali wzbudzenia w **CF₃BtPhenox**. Na Rys. 6.4 zamieszczono widmo absorpcji i widma emisji uzyskane w wyniku wzbudzenia promieniowaniem o różnej energii, co prowadzi do zmian w położeniu i kształcie pasm emisyjnych. W przypadku wzbudzenia światłem o długości fali 380 nm zarejestrowano widmo fluorescencji, w którym pasmo emisyjne położone jest przy 437 nm. Pasma to jest lustrzanym odbiciem krótkofalowego pasma absorpcyjnego. Obniżenie energii wzbudzenia do wartości odpowiadającej długości fali 420 nm spowodowało znaczne przesunięcie maksimum emisji z 437 do 512 nm. Wzbudzenie promieniowaniem o długości fali 440 nm, nie wywołało dalszych zmian w położeniu maksimum emisji, jednak znacząco obniżyło intensywność fluorescencji. Gdy związek wzbudzano promieniowaniem o energii odpowiadającej długości fal 460 nm i 488 nm, czyli lokalnym maksimum absorpcji pasma z przeniesieniem ładunku, maksimum pasma emisyjnego przesuwało się do 627 nm. Niezależnie od długości fali wzbudzenia, intensywność fluorescencji pozostawała na bardzo niskim poziomie. Stała szybkości przejść bezpromienistych dla **CF₃BtPhenox** różniła się o rząd wielkości od odpowiednich stałych dla pozostałych barwników serii. Eksperymentalnie potwierdzono tę hipotezę, przeprowadzając badania w laboratorium prof. Elia Zysmana-Colmana (Uniwersytet w St. Andrews, Wielka Brytania). Dzięki odgazowaniu roztworu związku

6.2. Wpływ polarności rozpuszczalnika na właściwości fotofizyczne związków z silnym donorem elektronów

CF₃BtPhenox uzyskano wzrost intensywności fluorescencji o 23%. Wylimitowanie tlenu z roztworu umożliwiło wyznaczenie biexponencjalnej krzywej zaniku fluorescencji, na podstawie której wyznaczono dwa czasy życia fluorescencji (5,44 i 434 ns). Jednoznacznie wskazuje to na przejście międzysystemowe do stanu trypletowego cząsteczki, który po odgazowaniu nie może być wygaszany przez tlen cząsteczkowy, a następnie powrót do stanu singletowego barwnika w wyniku odwróconego procesu przejścia międzysystemowego (TADF). Potwierdzenie tego mechanizmu, interesujące pod względem poznawczym, nie doprowadzi jednak do praktycznego zastosowania tej pochodnej jako efektywnego emitera TADF, ze względu na niską wydajność kwantową fluorescencji. Procedurę odtlenienia próbki przed pomiarem powtórzono dla barwnika **CF₃BtDPA**, jednak zabieg nie wpłynął istotnie na intensywność fluorescencji, a zmierzona krzywa zaniku fluorescencji pokrywała się z tą wyznaczoną w roztworze zawierającym tlen.

6.2 Wpływ polarności rozpuszczalnika na właściwości fotofizyczne związków z silnym donorem elektronów

Jak pokazano w rozdziale 5.4, lokalna zmiana lepkości w otoczeniu cząsteczki może powodować modyfikacje jej właściwości fotofizycznych, dzięki czemu możliwe jest zastosowanie barwników jako sond fluorescencyjnych. Inną właściwością środowiska wpływającą na fotofizykę cząsteczek chemicznych jest zmiana jego polarności. Efekt solwatochromowy (Rozdz. 2.4.1, [186]), obserwowany dla związków organicznych, może być wykorzystywany nie tylko do wykrywania agregatów białkowych, ale także innych biomolekuł [187–190]. Zatem naturalnym następnym krokiem podjętych badań stało się systematyczne zbadanie wpływu zmian polarności roztworów na właściwości fotofizyczne barwników z różnymi podstawnikami aminowymi. W tym celu przeprowadzono eksperyment polegający na przygotowaniu roztworów fluoroforów w heksanie i w THF oraz w ich mieszaninach o różnych proporcjach objętościowych obu rozpuszczalników, przy zachowaniu stałego stężenia barwnika.

W tabeli 6.2 zestawiono wartości długości fali odpowiadającej położeniu maksimum fluorescencji w heksanie i THF oraz odpowiadające im wydajności kwantowe fluorescencji. Widać, że pochodne zawierające w części donorowej grupy alkilowe wykazują praktycznie niezmienną Φ_F w zakresie od 93% do 100%. W tej podgrupie związków jedynie pochodna **CF₃Bt4-NMe₂** w THF wykazuje nieco niższą wartość Φ_F wynoszącą 83%. Dla związków **CF₃Bt4-NMe₂**, **CF₃BtPyr** i **CF₃BtMor** położenie maksimum emisji w heksanie jest podobne i mieści się w przedziale od 432,0 do 436,5 nm. W tetrahydrofuranie maksimum emisji przesuwają się batochromowo w stosunku do niepolarnego heksanu o ponad 50 nm. Znacznie większe różnice widoczne są w przypadku pochodnych z pierścieniami aromatycznymi w strukturze donora. Z wyjątkiem pochodnej **CF₃BtPhenox**, fluorofory tej grupy wykazują wysoką wydajność kwantową fluorescencji w heksanie, wynoszącą 95 i 88% odpowiednio dla **CF₃BtDPA** i **CF₃BtCz**. Dla **CF₃BtPhenox** wydajność kwantowa fluorescencji wyniosła tylko 1,3%. Dla pochodnych *N,N*-difenylaminowej i karbazolowej w tetrahydrofuranie zaobserwowano z kolei znaczny spadek Φ_F względem pomiarów w heksanie – do odpowiednio 11 i 20%. Związek **CF₃BtPhenox** praktycznie nie wykazywał fluorescencji w roztworze

6.2. Wpływ polarności rozpuszczalnika na właściwości fotofizyczne związków z silnym donorem elektronów

Tabela 6.2: Właściwości emisyjne związków z silnym donorem elektronów w heksanie i THF: długość fali w maksimum emisji λ_{max} [nm] oraz wydajność kwantowa fluorescencji Φ_F [%]

| Zw. (RBtR') | Heksan | | THF | |
|--|----------------------|----------|----------------------|----------|
| | λ_{max}^{em} | Φ_F | λ_{max}^{em} | Φ_F |
| CF₃Bt4-NMe₂ | 432,0 | 95 | 485,0 | 83 |
| CF₃BtPyr | 436,5 | 99 | 489,0 | 100 |
| CF₃BtMor | 435,0 | 100 | 490,0 | 93 |
| CF₃BtDPA | 490,5 | 95 | 616,5 | 11 |
| CF₃BtCz | 468,0 | 88 | 582,0 | 20 |
| CF₃BtPhenox | 640,0 | 1,3 | - | - |

THF. Dla związków **CF₃BtDPA**, **CF₃BtCz** i **CF₃BtPhenox** położenie maksimum emisji w heksanie wynosi odpowiednio 490,5, 468,0, i 640,0 nm. Długość fali przy maksimum emisji w THF wyznaczono jedynie dla **CF₃BtDPA** i **CF₃BtCz**. Pasma emisyjne przesuwają się wyraźnie batochromowo dla tych związków do odpowiednio 616,5 i 582 nm względem położenia maksimum emisji w heksanie.

Na Rys. 6.5 przedstawiono zmiany widm fluorescencji dla roztworów barwników w heksanie, THF oraz ich mieszaninach, które przygotowano dla 10 do 90% objętościowych rozpuszczalników z krokiem co 10%. Na każdym z paneli przedstawiono zestaw widm dla kolejnych związków **CF₃Bt4-NMe₂**, **CF₃BtPyr** oraz **CF₃BtMor**. Na każdym z tych zestawów widm można zaobserwować podobne tendencje. Wąskie pasmo emisyjne o największej intensywności przy najkrótszej długości fali można przypisać roztworowi w heksanie (kolor niebieski). Przy rosnącym udziale tetrahydrofuranu w mieszaninie, maksimum emisji systematycznie przesuwa się w stronę dłuższych fal. Zmienia się również kształt pasma emisyjnego. Już w przypadku mieszaniny zawierającej 10% THF widoczne są znaczne poszerzenie pasma emisyjnego, a jednocześnie spada intensywność emisji w maksimum fluorescencji.

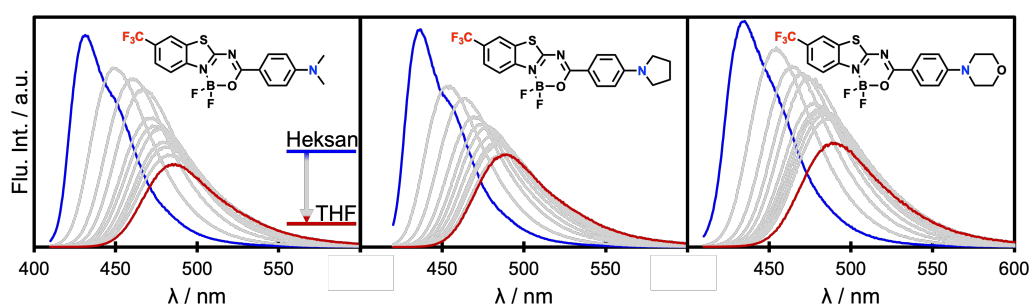
Największy spadek intensywności fluorescencji w widmie pierwszej mieszaniny (10% THF) w porównaniu do widma zmierzonego w heksanie zaobserwowano dla związku **CF₃BtPyr** (środkowy panel, Rys. 6.5), natomiast największe przesunięcie maksimum emisji, 19,5 nm, między heksanem i mieszaniną o zawartości 10% THF uzyskano dla pochodnej **CF₃BtMor**. Wynik ten jest nieznacznie większy dla wyników zarejestrowanych dla pozostałych cząsteczek (odpowiednio 18,5 oraz 17,5 nm dla **CF₃BtNMe₂** i **CF₃BtPyr**). W przypadku kolejnych mieszanin o rosnącej polarności, utrzymuje się tendencja batochromowego przesunięcia maksimum emisji wraz ze zwiększającą się zawartością THF. Zmiany te są systematyczne, pozwalające skorelować położenie maksimum emisji z polarnością roztworu, wyrażoną przez zawartości THF w mieszaninie z heksanem. Zatem, dla sekwencji trzech związków zawierających aminowe podstawniki alifatyczne wykreślono zależność zawartości THF w miesza-

6.2. Wpływ polarności rozpuszczalnika na właściwości fotofizyczne związków z silnym donorem elektronów

Tabela 6.3: Czas życia fluorescencji τ [ns] oraz stałe szybkości przejść promienistych k_r i bezpromienistych k_{nr} [10^9 s^{-1}] wyznaczone w heksanie i THF dla związków z silnym donorem elektronów

| Zw. (RBtR') | Heksan | | | THF | | |
|--|--------|-------|----------|--------|-------|----------|
| | τ | k_r | k_{nr} | τ | k_r | k_{nr} |
| CF₃BtNMe₂ | 1,537 | 0,62 | 0,03 | 1,806 | 0,46 | 0,09 |
| CF₃BtPyr | 1,532 | 0,65 | 0,01 | 1,977 | 0,51 | 0,00 |
| CF₃BtMor | 1,499 | 0,67 | 0,00 | 1,855 | 0,50 | 0,05 |
| CF₃BtDPA | 3,242 | 0,29 | 0,01 | 0,946 | 0,11 | 0,94 |
| CF₃BtCz | 3,495 | 0,25 | 0,04 | 2,612 | 0,08 | 0,30 |
| CF₃BtPhenox | 0,864 | 0,02 | 1,14 | - | - | - |

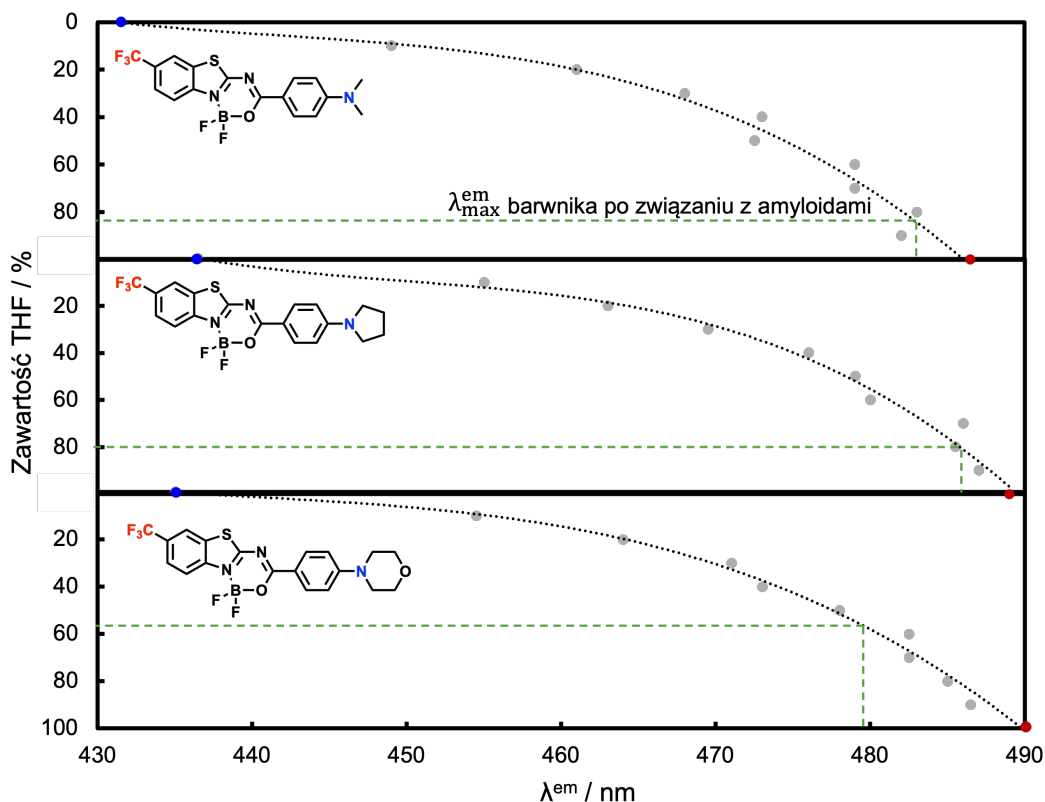
nie od długości fali w maksimum emisji (Rys. 6.6). Zauważono, że przypadku pochodnych z niearomatycznymi grupami aminowymi, struktura donora nie ma wpływu na obserwowane zmiany właściwości fotofizycznych w wyniku zmiany polarności otoczenia. Mimo spadku intensywności fluorescencji i poszerzeniu widm emisyjnych wraz ze zmianą polarności rozpuszczalnika, wydajność kwantowa fluorescencji badanych związków pozostała na wysokim poziomie. Zmiany widoczne w pasmach emisji dla związków w tej serii wynika z dodatniego efektu solwatochromowego opisanego w podrozdziale 2.4.1.



Rys. 6.5: Widma fluorescencji związków **CF₃BtNMe₂**, **CF₃BtPyr**, **CF₃BtMor** w roztworach o różnej polarności, od niepolarnego heksanu (niebieski) do THF (czerwony) i ich mieszaninach (szary)

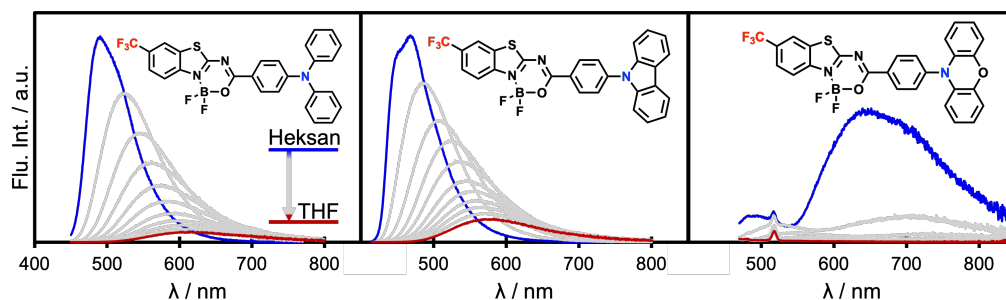
Wyraźnie inaczej zachowują się związki zawierające w strukturze aromatyczną grupę aminową: **CF₃BtDPA**, **CF₃BtCz** i **CF₃BtPhenox**. Wyniki dla **CF₃BtPhenox** pokazują, że w heksanie i mieszaninie zawierającej 10% THF barwnik wykazuje fluorescencję o bardzo niskiej intensywności. W przypadku kolejnych mieszanin i roztworu w tetrahydrofuranie, fluorescencja dla **CF₃BtPhenox** jest całkowicie wygaszona. Znacznie bardziej interesujące jest zachowanie pozostałych dwóch pochodnych. Podobnie jak dla wcześniej omawianych związków z aminową grupą alifa-

6.2. Wpływ polarności rozpuszczalnika na właściwości fotofizyczne związków z silnym donorem elektronów



Rys. 6.6: Krzywe zależności położenia długości fali emisji od składu mieszaniny heksan:THF dla $\text{CF}_3\text{Bt4-NMe}_2$, CF_3BtPyr i CF_3BtMor

tyczną, zwiększenie polarności roztworu powoduje także batochromowe przesunięcie maksimum emisji, jednak zmiany te są znacznie większe dla CF_3BtDPA i CF_3BtCz niż dla związków z donorem niearomatycznym. Odpowiednie zestawienie widm fluorescencji jest przedstawione dla tej grupy związków na Rys. 6.7. Dla CF_3BtDPA i CF_3BtCz , podobnie jak dla związków dyskutowanych powyżej, wzrost polarności rozpuszczalnika spowodował poszerzenie widm emisyjnych i towarzyszący mu znaczny spadek intensywności fluorescencji.

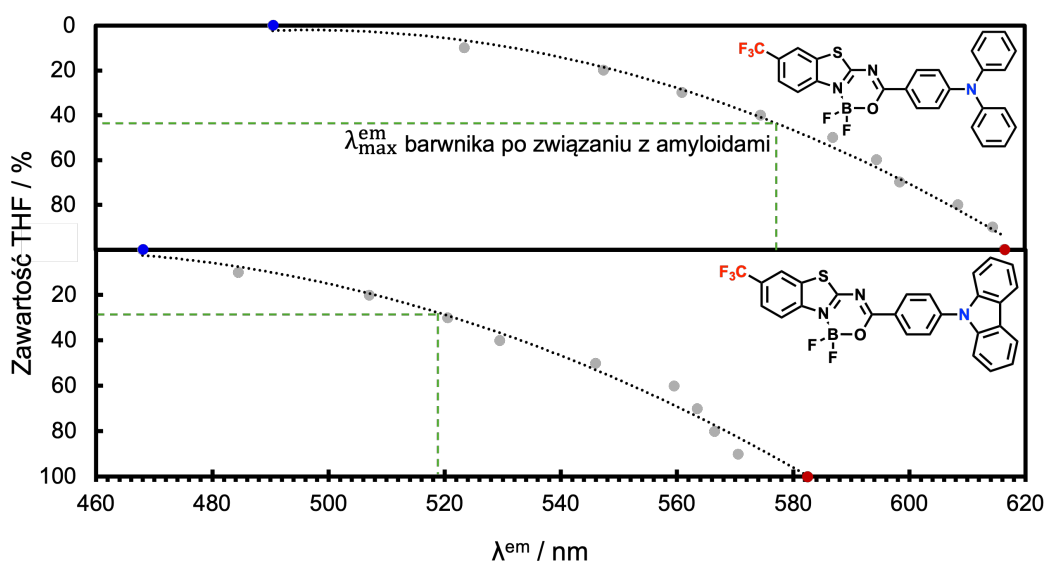


Rys. 6.7: Widma fluorescencji związków CF_3BtDPA , CF_3BtCz , $\text{CF}_3\text{BtPhenox}$ w roztworach o różnej polarności od niepolarnego heksanu (niebieski) do THF (czerwony) i ich mieszaninach (szary)

Zmiana polarności rozpuszczalnika badanych związków wpływa również na stałe szybkości przejść promienistych i bezpromienistych (Tab. 6.3). W przypadku związków

6.2. Wpływ polarności rozpuszczalnika na właściwości fotofizyczne związków z silnym donorem elektronów

ków **CF₃Bt4-NMe₂**, **CF₃BtPyr** i **CF₃BtMor** zwiększenie polarności rozpuszczalnika powoduje zwiększenie czasu życia fluorescencji w THF w stosunku do roztworu w heksanie. Wynika to z niższej wartości stałej szybkości przejść promienistych w tetrahydrofuranie niż w rozpuszczalniku niepolarnym. W roztworach heksanu k_r mieści się w przedziale od 0,62 do $0,67 \cdot 10^9 \text{ s}^{-1}$, a w THF od 0,46 do $0,51 \cdot 10^9 \text{ s}^{-1}$. Stała szybkości przejść bezpromienistych pozostaje niewielka, niezależnie od rozpuszczalnika. W efekcie, dla związków z alifatyczną grupą aminową wydajność kwantowa fluorescencji ma wysoką wartość we wszystkich roztworach. W przypadku pochodnych **CF₃BtDPA** i **CF₃BtCz** wzrost polarności rozpuszczalnika wywołuje silniejsze zmiany wartości stałych szybkości procesów dezaktywacji stanów wzbudzonych. W przypadku pochodnej *N,N*-difenylaminowej zmiana rozpuszczalnika z heksanu na THF powoduje znaczny wzrost stałej szybkości przejść bezpromienistych z jednoczesnym zmniejszeniem stałej szybkości przejść promienistych. Największą zmianę widać dla **CF₃BtDPA**, dla którego w roztworze heksanu szybkość zmian fotofizycznych opisują stałe szybkości $k_r = 0,29$ i $k_{nr} = 0,01 \cdot 10^9 \text{ s}^{-1}$, a w roztworze THF $k_r = 0,11$ i $k_{nr} = 0,94 \cdot 10^9 \text{ s}^{-1}$. Podobne tendencje zachowane są dla **CF₃BtCz**. Taki balans wartości k_r i k_{nr} prowadzi do zwiększenia prawdopodobieństwa bezpromienistej ścieżki dezaktywacji stanu wzbudzonego. Takie same wnioski można wyciągnąć po przeanalizowaniu danych dla **CF₃BtCz**. Wzrost polarności środowiska powoduje zmniejszenie k_r tej pochodnej z jednoczesnym znacznym zwiększeniem wartości k_{nr} .



Rys. 6.8: Krzywe zależności położenia długości fali emisji od składu mieszaniny heksan:THF dla **CF₃BtDPA** i **CF₃BtCz**

Podobnie, jak dla wcześniej diskutowanych pochodnych z donorem alifatycznym, dla **CF₃BtDPA** i **CF₃BtCz** położenie pasm emisyjnych silnie zależy od polarności roztworu. Na uwagę zasługuje fakt, że skala polarności przygotowana w odniesieniu do położenia maksimum emisji tych związków mieści się w przedziale 126 nm w przypadku **CF₃BtDPA** oraz 114 nm dla **CF₃BtCz** dla sekwencji rozpuszczalników od heksanu do tetrahydrofuranu. Dla pochodnych z alifatycznymi grupami donorowymi różnica ta była zdecydowanie mniejsza, wahająca się od 52,5 do 55,0 nm.

Badania aplikacyjne oznaczania amyloidów za pomocą otrzymanych w niniejszej pracy pochodnych benzotiazolu przeprowadzono w zespole dr hab. inż. Joanny Olesiak-Bańskiej, prof. PWr (Politechnika Wrocławska). Zauważono, że po związaniu barwnika z amyloidami insuliny bawolej, zmienia się położenie odpowiedniego pasma emisji. Na Rys. 6.6 i 6.8 zieloną, przerywaną linią zaznaczono, gdzie znajduje się maksimum emisji tak przygotowanej próbki. Dla związków **CF₃Bt4-NMe₂**, **CF₃BtPyr** i **CF₃BtMor** (Rys. 6.6) maksimum emisji znajduje się odpowiednio przy 483,0, 486,0 i 479,6 nm. Dla pochodnej *N,N*-dimetyloaminowej i piroolidynowej wartości te odpowiadają polarnośći porównywalnej do roztworów o zawartości THF ok. 80%. W przypadku pochodnej morfolinowej maksimum emisji odpowiada polarnośći charakteryzującej roztwór o zawartości THF poniżej 60%. W przypadku związków **CF₃BtDPA** i **CF₃BtCz** położenie maksimum emisji próbki po związaniu z amyloidami znajduje się odpowiednio przy 577,0 i 519,0 nm. Dla pochodnej **CF₃BtDPA** wartość położenia pasma emisyjnego odpowiada polarnośći dla mieszaniny zawierającej ponad 40% THF, natomiast dla **CF₃BtCz** jest to długość fali, która odpowiada polarnośći mieszaniny zawierającej ok. 30% THF. Wynik ten sugeruje, że barwniki lokują się w kieszeniach hydrofobowych agregatów białkowych.

Tkanki zwierzęce nie są transparentne dla promieniowania odpowiadającego maksimum absorpcji badanych związków, co uniemożliwia ich wykorzystanie wprost w bioobrazowaniu *in vivo*. Mimo to, można rozważyć ich zastosowanie pod warunkiem, że wykazują one absorpcję dwufotonową. W zespole z Politechnik Wrocławskiej przeprowadzono takie badania. Wstępne pomiary potwierdziły, że zaprojektowane związki zdolne są do efektywnej absorpcji przy długości fali w zakresie od 820 do 880 nm. Wartości te mieszczą się w tzw. pierwszym oknie biologicznym, odpowiadającym długościom fali od 700 do 900 nm. W tym zakresie przepuszczalność światła przez tkanki pozwala na wzbudzenie sondy fluorescencyjnej. Otrzymane wyniki stanowią bardzo obiecujący punkt wyjścia dla potencjalnych dalszych badań podstawowych zmierzających w kierunku optymalizacji struktury barwników mając na celu uzyskanie wysokich przekrojów czynnych na absorpcję dwufotonową.

6.3 Agregacja cząsteczek z wewnątrzcząsteczkowym przeniesieniem ładunku

Ze względu na rozważane praktyczne zastosowanie badanych barwników do wykrywania złogów amyloidowych, charakterystyka tej grupy fluoroforów została uzupełniona o właściwości fotofizyczne agregatów.

W tabeli 6.4 przedstawiono dane związane z położeniem maksimum emisji i wydajnościami kwantowymi fluorescencji w THF i agregatach otrzymanych dla mieszaniny tetrahydrofuranu z wodą, o zawartości wody 90%. Jednak podczas przygotowania roztworów do badań zauważono, że po zwiększaniu zawartości wody w mieszaninie powyżej 90% następowało wytrącanie osadu, widocznego jako zmętnienie próbki.

Przed przystąpieniem do pomiarów spodziewano się efektu wygaszania emisji wynikającej z agregacji dla pochodnej **CF₃Bt4-NMe₂**, ponieważ związek ten został już wcześniej opisany w literaturze i wyznaczono dla niego wydajność kwantową

6.3. Agregacja cząsteczek z wewnątrzcząsteczkowym przeniesieniem ładunku

fluorescencji w cienkiej warstwie. Wynosiła ona zaledwie 3% [153]. Drugą przesłanką dla takiego zachowania omawianej pochodnej był fakt, że w poprzedniej serii związków o analogicznej topologii A-A-D (**CF₃Bt4-OMe**) również wykazywał wygaszenie fluorescencji w agregacie. Dla **CF₃Bt4-OMe** w THF wartość wydajności wynosi 83%, zaś w stanie zagregowanym spada do 2%. Zatem zaproponowane w tym rozdziale barwniki zawierające dużą grupę aminową, czyli zawadę steryczną zapobiegającą nadmiernemu niekontrolowanemu zbliżaniu się do siebie cząsteczek, mogą pozwolić na uniknięcie niepożądanych efektów związanych z wygaszaniem fluorescencji/wytrącaniem osadu.

Związki o alifatycznej strukturze donora, czyli **CF₃BtPyr** i **CF₃BtMor** zachowywały się podobnie do znanej pochodnej **CF₃Bt4-NMe₂**. Zarejestrowano dla nich drastyczny spadek wydajności kwantowej: ze 100 do 1% dla pochodnej pirolidynowej oraz z 93 do 2% dla pochodnej morfolinowej. Dla tych związków zaobserwowano również batochromowe przesunięcie maksimum emisji agregatów w stosunku do roztworów w THF. Dla **CF₃BtPyr** przesunięcie to było największe i wynosiło 59 nm, a dla **CF₃Bt4-NMe₂** i **CF₃BtMor** wynosiło, odpowiednio, 47 i 15 nm. Należy zaznaczyć, że wymienione pochodne zawierają względnie mały alifatyczny podstawnik elektronodonorowy.

Z drugiej strony, właściwości fotofizyczne agregatów związków zawierających podstawniki o większej zawadzie sterycznej, (**CF₃BtDPA** i **CF₃BtCz**), są istotnie różne od powyżej omówionej sekwencji cząsteczek z niewielką grupą aminową. Dla agregatów związków **CF₃BtDPA** i **CF₃BtCz** pasma emisyjne przesunęły się hipsochromowo w stosunku tych zmierzonych w roztworach THF. Dla **CF₃BtDPA** położenie maksimum emisji zmieniło się z 616,5 do 591,0 nm, natomiast dla **CF₃BtCz** z 582,0 do 547,5 nm. Dodatkowo Φ_F w THF dla **CF₃BtDPA** równe jest 11%, natomiast dla otrzymanych agregatów rośnie do 36% (Tab. 6.4. Dla pochodnej **CF₃BtCz** agregaty wykazują jeszcze wyższą wydajność kwantową fluorescencji wynoszącą 57%.

Tabela 6.4: Właściwości fotofizyczne barwników w THF i agregatach w mieszaninie rozpuszczalników (90% wody)

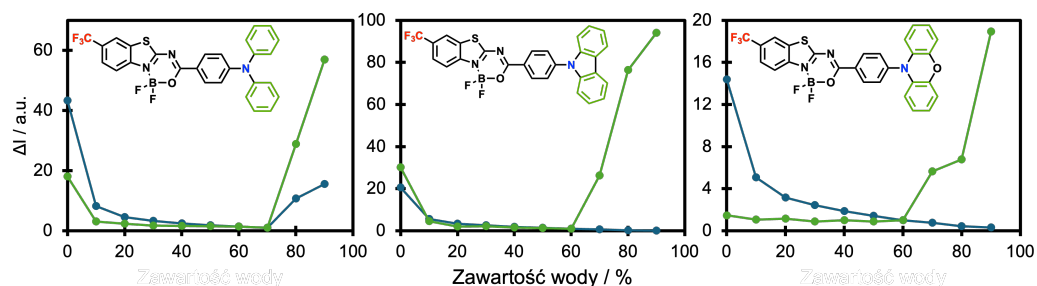
| Zw. (RBtR') | THF | | Agregaty | |
|--|------------------------------------|---------------------|------------------------------------|---------------------|
| | $\lambda_{\text{THF}}^{\text{em}}$ | Φ_{THF} | $\lambda_{\text{agg}}^{\text{em}}$ | Φ_{agg} |
| CF₃Bt4-NMe₂ | 485,0 | 83 | 532,5 | 2 |
| CF₃BtPyr | 489,0 | 100 | 547,0 | 1 |
| CF₃BtMor | 490,0 | 93 | 505,0 | 2 |
| CF₃BtDPA | 616,5 | 11 | 591,0 | 36 |
| CF₃BtCz | 582,0 | 20 | 547,5 | 57 |
| CF₃BtPhenox | - | - | 725,0 | - |

Istotne zmiany widać również w intensywności fluorescencji, zarejestrowanej przy różnym składzie mieszanin THF/woda. Na Rys. 6.9 na trzech panelach zamieszczono

6.3. Agregacja cząsteczek z wewnątrzcząsteczkowym przeniesieniem ładunku

zmiany intensywności fluorescencji ΔI w zależności od składu mieszaniny tak, że na kolejnych panelach znajdują się wyniki dla **CF₃Bt4-NMe₂**, **CF₃BtMor**, **CF₃BtPyr** zaznaczone niebieską linią oraz wyniki dla ich analogów z aromatycznymi donorami (zielona linia). Zmierzona intensywność fluorescencji została znormalizowana dla składu mieszaniny, dla której zaobserwowano agregację związków. Punkt ten stał się odnośnikiem dla wyznaczania względnej intensywności emisji w przypadku pozostałych widm, przy różnym składzie mieszanin rozpuszczalników. Pozwoliło to na prostą identyfikację zjawisk wygaszania lub wzmacniania emisji dzięki agregacji.

Dla wszystkich zbadanych związków zaobserwowano spadek intensywności fluorescencji przy zawartości wody 10% w mieszaninie z THF w porównaniu z czystym rozpuszczalnikiem. Ta tendencja spadkowa utrzymywała się do 70 lub 60% (w zależności od barwnika). Następnie następował wzrost (dla **CF₃Bt4-NMe₂** i **CF₃BtDPA**, pierwszy panel Rys. 6.9 oraz pochodne z aminą aromatyczną na panelach drugim i trzecim) lub jeszcze większy spadek intensywności fluorescencji (pochodna pirolidynowa i morfolinowa – linia niebieska na panelach drugim i trzecim Rys. 6.9). Dla pochodnej *N,N*-difenylaminowej wzrost intensywności fluorescencji jest 60-krotny, a dla **CF₃BtCz** intensywność fluorescencji w agregacie jest ponad 90 razy większa niż zmierzona dla mieszaniny zawierającej 60% wody. W przypadku **CF₃BtPyr** i **CF₃BtMor** w wyniku agregacji następuje wygaszenie fluorescencji.



Rys. 6.9: Zmiana intensywności fluorescencji dla roztworów związków w zależności od składu mieszaniny rozpuszczalników THF i wody

Tabela 6.5: Czas życia fluorescencji τ [ns] oraz stałe szybkości przejść promienistych k_r i bezpromienistych k_{nr} [10^9 s^{-1}] wyznaczonych w THF i dla agregatów

| Zw. (RBtR') | THF | | | Agregaty | | |
|--|--------|-------|----------|----------|-------|----------|
| | τ | k_r | k_{nr} | τ | k_r | k_{nr} |
| CF₃Bt4-NMe₂ | 1,81 | 0,46 | 0,09 | 4,23 | 0,01 | 0,23 |
| CF₃BtPyr | 1,98 | 0,51 | 0,00 | 2,62 | 0,01 | 0,38 |
| CF₃BtMor | 1,86 | 0,50 | 0,05 | 1,82 | 0,03 | 0,51 |
| CF₃BtDPA | 0,95 | 0,11 | 0,94 | 3,82 | 0,09 | 0,17 |
| CF₃BtCz | 2,61 | 0,08 | 0,30 | 7,72 | 0,07 | 0,06 |

W celu określenia, jak proces agregacji wpływa na szybkość przejść promienistych i bezpromienistych, zmierzono czas życia fluorescencji agregatów w roztworach. Dla związków **CF₃Bt4-NMe₂**, **CF₃BtPyr**, **CF₃BtDPA** i **CF₃BtCz**, agregacja powoduje stabilizację stanu wzbudzonego cząsteczek, co powoduje zwiększenie czasu życia fluorescencji w porównaniu z barwnikami w roztworach THF. Dla **CF₃BtPhenox** nie udało się wyznaczyć czasu życia fluorescencji. Największą zmianę czasu życia fluorescencji pod wpływem agregacji widać dla związku **CF₃BtCz**: τ w roztworze THF wynosi 0,95 ns, a dla agregatów 3,82 ns. Dla agregatów związku **CF₃BtMor** czas życia fluorescencji jest nieznacznie krótszy niż ten wyznaczony w roztworze THF (1,86 vs. 1,82 ns). W przypadku agregatów związków **CF₃Bt4-NMe₂**, **CF₃BtMor**, **CF₃BtPyr** znacznie zmniejsza się stała szybkości przejść promienistych, w porównaniu do wolnych cząsteczek w roztworze. W roztworze THF wartość stałej szybkości przejść promienistych jest podobna i mieści się w przedziale od 0,46 do $0,51 \cdot 10^9 \text{ s}^{-1}$ (Tab. 6.5). Agregacja powoduje spadek do wartości odpowiednio od 0,01 do 0,03. Zmianom tych wartości towarzyszy równocześnie wzrost stałych szybkości przejść bezpromienistych. Powoduje to w konsekwencji modyfikację stosunku k_{nr} i k_r , wynikającego z silnego oddziaływania międzycząsteczkowego, co skutkuje zmniejszeniem wydajności kwantowej fluorescencji agregatów w porównaniu z roztworem THF.

W przypadku związków z podstawnikiem zawierającym pierścienie aromatyczne, **CF₃BtDPA** i **CF₃BtCz**, stała szybkości przejść promienistych nie zmienia się istotnie po agregacji w porównaniu z wolnymi cząsteczkami w THF. Dla **CF₃BtDPA** wartość ta zmienia się z $0,11 \cdot 10^9 \text{ s}^{-1}$ na $0,09 \cdot 10^9 \text{ s}^{-1}$, a dla **CF₃BtCz** z $0,08 \cdot 10^9 \text{ s}^{-1}$ na $0,07 \cdot 10^9 \text{ s}^{-1}$. Znacznie większe różnice są widoczne w stałych szybkości przejść bezpromienistych. Dla **CF₃BtDPA** i **CF₃BtCz** zaobserwowany został znaczny spadek tych wartości, największy dla pochodnej *N,N*-difenyloaminowej. W roztworze THF stała szybkości przejść bezpromienistych wynosi $0,94 \cdot 10^9 \text{ s}^{-1}$, a dla agregatów $0,17 \cdot 10^9 \text{ s}^{-1}$. Wynika to z ograniczenia drgań cząsteczek w wyniku agregacji, co zmniejsza prawdopodobieństwo zajścia procesów bezpromienistych.

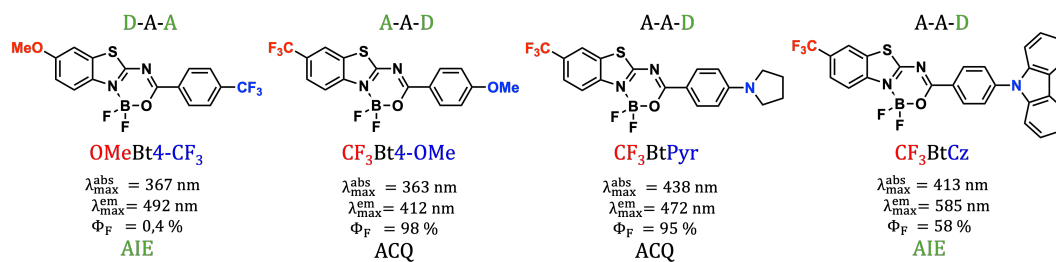
Przedstawione powyżej wyniki otwierają wiele możliwości aplikacyjnych. W szczególności potrzebne są informacje o właściwościach barwników w bardzo polarnym środowisku, jakie występuje w komórkach. Po wprowadzeniu do układu biologicznego barwników fluorescencyjnych, może spowodować ich agregację i ACQ. Takie agregaty będą wykazywały słabą fluorescencję. Jednak, w wyniku silnego powinowactwa barwników z biomolekułami, może następować uwalnianie cząsteczek z agregatów, które będą wiązały się np. z białkami. W następstwie tego procesu może pojawić się silna fluorescencja. Przykładem takiego wykorzystania jest uwalnianie się cząsteczek barwnika z agregatów wykazujących ACQ, które lokują się w niepolarnych kieszeniach białkowych złogów amyloidowych [191]. Pochodne **CF₃BtNMe₂**, **CF₃BtPyr** i **CF₃BtMor** wydają się dobrym wyborem do takiego zastosowania. Wykazują one bardzo słabą wydajność kwantową fluorescencji w agregacie, a bardzo dobre właściwości emisyjne w środowisku niepolarnym i średnio polarnym, w formie niezagregowanej. Natomiast dla związków **CF₃BtDPA** i **CF₃BtCz**, ich agregaty posiadają wysoką wydajność kwantową fluorescencji, co może pozwolić im znaleźć zastosowanie w bioobrazowaniu.

Podsumowanie i wnioski

Hipoteza badawcza niniejszej pracy, postawiona w rozdziale 4.1, zawiera pytanie o możliwość praktycznej realizacji projektowania fotoczułych cząsteczek organicznych pod kątem ich konkretnych zastosowań. W ogólności jest to problem bardzo złożony i wymaga szerokiego i dogłębnego poznania mechanizmów determinujących właściwości i zachowanie cząsteczek w różnych warunkach eksperymentu, w środowiskach o różnej naturze. Niezbędne, aby uzyskać receptę na stworzenie optymalnej struktury i odkryć ogólne prawidłowości, są wnikliwe badania podstawowe danej grupy związków chemicznych. Pomimo dużej ilości danych literaturowych dla fluoroforów różnego rodzaju, ilość czynników, którą należy wziąć pod uwagę w takich rozważaniach, i ich wzajemne relacje, powodują, że wciąż trudno jest sformułować ogólne strategie projektowania barwników. Obecna praca skoncentrowana jest na układach zawierających rdzeń fluorescencyjny inspirowany Tioflawiną T, z wprowadzoną w celu usztywnienia struktury grupą BF_2 . Rdzeń ten stanowi doskonałą platformę badań i testów, ponieważ wprowadzone zmiany strukturalne powodują istotne modyfikacje właściwości fotofizycznych uzyskanych układów: położenia maksimum absorpcji i fluorescencji czy wydajności kwantowej fluorescencji.

W przedstawionej rozprawie doktorskiej zebrano i przedyskutowano wyniki badań otrzymanych barwników w oparciu o trzy kluczowe zmiany strukturalne:

1. zmianę położenia podstawników o różnym charakterze donorowo-akceptorowym w cząsteczce, powodująca zmianę topologii cząsteczki;
2. wzmocnienie charakteru donorowego podstawnika;
3. zmianę wielkości (i natury) silnego donora elektronów.



Rys. 7.1: Podsumowanie uzyskanych wyników: kluczowe zmiany strukturalne wpływające na właściwości barwników

Zastosowane strategie projektowania, wraz z kompilacją najważniejszych uzyskanych podczas badań wyników, przedstawiono schematycznie dla wybranych barwników na Rys. 7.1. Odpowiednio sformułowane zadania pozwoliły na zaprojektowanie i syntezę palety barwników o znacząco różnych właściwościach fotofizycznych, zmieniających się pod wpływem modyfikacji lepkości lub polarności otoczenia. Potwierdza to bez wątpienia, że już taka ograniczona lista czynników strukturalnych dla tylko jednego rdzenia fluorescencyjnego, w połączeniu z kontrolowanym wpływem oddziaływań międzymolekularnych, dostarcza wystarczająco szerokiej i elastycznej gamy możliwości modyfikacji luminoforów do różnorodnych zastosowań. Zatem można stwierdzić, że główny cel badań, polegający na potwierdzeniu możliwości kontrolowanej modyfikacji właściwości fotofizycznych barwników z rdzeniem inspirowanym Tioflawiną T, został osiągnięty.

Wykazano, że wprowadzenie do struktury badanych fluoroforów podstawników elektronodonorowych lub elektronoakceptorowych w części heterocyklicznej i w grupie fenylovej wywiera wyraźny wpływ na właściwości fotofizyczne cząsteczek w roztworach. Jednak już w przypadku tego celu szczegółowego widoczna była czułość związków nie wprost tylko na charakter podstawnika opisywany stałą Hammetta, ale na balans kilku czynników, przedyskutowanych na przykład na podstawie pochodnych **OMeBt4-Cl** i **OMeBt4-Br**. Należy zatem, podczas projektowania cząsteczek fluoroforów, mieć na uwadze, że wielowymiarowość rozważanego zagadnienia generuje nieintuicyjne, na pierwszy rzut oka, zmiany właściwości.

Do podobnych wniosków doprowadziły badania właściwości fotofizycznych analizowanych serii fluoroforów w otoczeniach o różnej polarności i lepkości oraz w agregatach (cele szczegółowe 2 i 3 z Rozdziału 4.1). Widać tu jednoznacznie, że kontrolowanie rodzaju obecnych oddziaływań międzycząsteczkowych i ich wpływu na właściwości barwników stanowi ogromne wyzwanie i wymaga dużej ostrożności. Nawet cząsteczki o takiej samej topologii, z donorem elektronów w jednej z części fluorofora i akceptorem w drugiej (np. regioizomery **OMeBt4-CF₃** i **CF₃Bt4-OMe**) mogą wykazywać skrajnie różne wydajności kwantowe fluorescencji i dodatkowo przeciwne zachowanie pod wpływem agregacji (por. dwa pierwsze panele Rys. 7.1). Jednak niewątpliwie zgromadzone w ramach obecnych prac wyniki pomiarów i doświadczenie badawcze pozwalają na zadowalająco skuteczne przewidywanie właściwości kolejnych związków-kandydatów do badań aplikacyjnych. Stąd należy uznać, że mimo braku jednej i niezmiennej strategii dla kolejnych związków, cel szczegółowy 4. również został osiągnięty.

Za najistotniejsze wyniki uzyskane w niniejszym projekcie należy uznać zmiany właściwości fotofizycznych barwników z silnym wewnątrzcząsteczkowym przeniesieniem ładunku (panele 3 i 4 Rys. 7.1), w których wzmocnienie charakteru donorowego podstawnika zmieniło istotnie położenie maksimum absorpcji, bez zmiany wydajności kwantowej fluorescencji. Widać to wyraźnie na przykładzie cząsteczek **CF₃Bt4-OMe** i **CF₃BtPyr**. Dodatkowo, zmiana wielkości i natury silnego donora elektronów (**CF₃BtPyr** vs **CF₃BtCz**) wpłynęła na wielkość zmian fotofizycznych, wraz ze zmianą polarności rozpuszczalnika. Ta zmiana strukturalna spowodowała, że związek **CF₃BtCz** wykazywał emisję wywołaną agregacją, przeciwnie do **CF₃BtPyr**.

Ponadto uzyskane w ramach niniejszej pracy wyniki okazały się obiecujące nie tylko z poznawczego punktu widzenia dla badań podstawowych w dziedzinie fotofizyki związków organicznych, ale także zyskały już relatywnie duży odzew w środowisku, o czym świadczy m. in. kontynuacja badań we współpracy z grupą teoretyczną z Nantes czy zespołem eksperymentalnym z Politechniki Wrocławskiej. Nawiązana podczas projektu współpraca z grupą Joanny Olesiak-Bańskiej pozwoliła zrealizować cel szczegółowy 5, czyli potwierdzić przydatność zaprojektowanych i otrzymanych związków do badania właściwości biomolekuł.

Należy jednak podkreślić, że zebrane i przedyskutowane w niniejszej rozprawie wyniki nie wyczerpują tematu projektowania fluoroforów organicznych oraz zaplanowanego i celowego manipulowania ich właściwościami fotofizycznymi pod kątem konkretnych zastosowań. Mimo iż przewidywanie położenia maksimum absorpcji i emisji barwników wydaje się być relatywnie proste i przy wspomaganii nowoczesnymi technikami wykorzystującymi np. algorytmy uczenia maszynowego całkiem skuteczne, to temat precyzyjnego ilościowego przewidywania wydajności kwantowej fluorescencji nadal pozostaje wyzwaniem. Wynika to, jak pokazano w niniejszej rozprawie, z faktu że właściwość ta jest bardzo czuła na wzajemne relacje konkurencyjnych procesów promienistych i bezpromienistych, prowadzących do dezaktywacji stanów wzbudzonych cząsteczki. Dezaktywacja ta, z kolei, może zachodzić w różny sposób. Nie jest więc proste ani intuicyjne zaprojektowanie związku o zadanej wartości wydajności kwantowej fluorescencji, nawet jeśli wykorzystamy w tym celu zaawansowane metody chemii kwantowej. Ponadto należy zaznaczyć, że w przypadku aplikacji biomedycznych związków fotoczułych należy brać pod uwagę nie tylko ich charakterystykę fotofizyczną, ale także wiele innych czynników takich jak rozpuszczalność, hydrofilowość, toksyczność, zdolność do przenikania przez błony biologiczne itp., co pozostaje zupełnie poza zakresem badań niniejszej rozprawy.

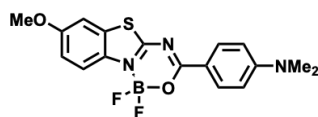
Opisane zależności między strukturą związku i jego właściwościami dotyczą tylko układów z rdzeniem inspirowanym strukturą Tioflawiny T, ale w kompilacji z danymi innych badań mogą posłużyć jako punkt wyjścia do sformułowania analogicznych strategii projektowania dla innych rdzeni fluorescencyjnych.

Dodatki

DODATEK **A**

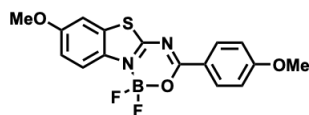
Katalog związków

OMeBt4-NMe₂



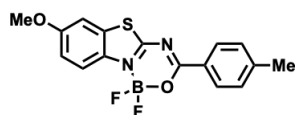
zielone ciało stałe, ϵ (CCl₃, M⁻¹cm⁻¹) 82300, ¹H NMR (400 MHz, TMS, CDCl₃): δ (ppm) 8.23 (d, 2H, J = 9.12 Hz), 7.87 (d, 1H, J = 9.00 Hz), 7.20 (d, 1H, J = 2.44 Hz), 7.11 (dd, 1H, J = 9.08, 2.56 Hz), 6.69 (d, 2H, J = 9.16 Hz), 3.87 (s, 3H), 3.11 (s, 6H). ¹¹B (128 MHz, BF₃·Et₂O, CDCl₃): δ (ppm) 0.539 (t). ¹³C (100 MHz, TMS, CDCl₃) δ (ppm): 172.4, 167.8, 158.0, 154.5, 134.3, 132.7, 128.0, 118.7, 117.2, 116.2, 111.0, 105.4, 55.9, 40.1 ¹⁹F (376 MHz, CFCl₃, CDCl₃): δ (ppm) -138.6. APCI HRMS (m/z) [M]⁺ 376.1111, obliczona: 376.1103

OMeBt4-OMe



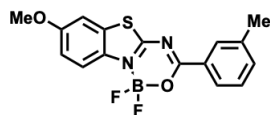
zielone ciało stałe, ϵ (CCl₃, M⁻¹cm⁻¹) 76900, ¹H NMR (700 MHz, TMS, CDCl₃): δ (ppm) 8.36 (d, 2H, J = 9.03 Hz), 7.95 (d, 1H, J = 9.03 Hz), 7.26 (d, 1H, J = 2.52 Hz), 7.18 (dd, 1H, J = 9.10, 2.52 Hz), 7.00 (d, 2H, J = 8.96 Hz), 3.93 (s, 3H), 3.91 (s, 3H). ¹¹B (128 MHz, BF₃·Et₂O, CDCl₃): δ (ppm) 0.576 (t). ¹³C (100 MHz, TMS, CDCl₃) δ (ppm): 172.3, 167.4, 164.8, 134.1, 132.7, 128.4, 123.3, 119.2, 116.8, 114.1, 105.3, 56.0, 55.6. ¹⁹F (376 MHz, from CFCl₃, CDCl₃): δ (ppm) -137.6. EI HRMS (m/z) [M]⁺ 362.0703, obliczona: 362.0708

OMeBt4-Me



zielone ciało stałe, ϵ (CCl₃, M⁻¹cm⁻¹) 33100, ¹H NMR (700 MHz, TMS, CDCl₃): δ (ppm) 8.29 (d, 2H, J = 8.25 Hz), 7.97 (d, 1H, J = 9.07 Hz), 7.33 (d, 2H, J = 7.95 Hz), 7.27 (d, 1H, J = 2.51 Hz), 7.00 (dd, 2H, J = 2.48, 9.00 Hz), 3.92 (s, 3H), 2.48 (s, 3H). ¹¹B (128 MHz, BF₃·Et₂O, CDCl₃): δ (ppm) 0.771 (t). ¹⁹F (376 MHz, CFCl₃, CDCl₃): δ (ppm) -137.3. APCI HRMS (m/z) [M]⁺ 347.0844, obliczona: 347.0837

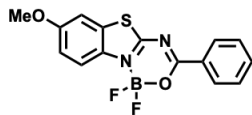
OMeBt3-Me



zielone ciało stałe, ϵ (CCl₃, M⁻¹cm⁻¹) 30600, ¹H NMR (700 MHz, TMS, CDCl₃): δ (ppm) 8.22 (m, 1H), 8.20 (d, 1H, J = 7.84 Hz), 7.98 (d, 1H, J = 9.03 Hz), 7.47 (m, 1H), 7.42 (t, 1H, J = 7.60 Hz), 7.28 (d, 1H, J = 2.45 Hz), 7.21 (dd, 1H, J = 2.38, 9.10 Hz), 3.92 (s, 3H), 2.47 (s, 3H). ¹¹B (128 MHz, BF₃·Et₂O, CDCl₃): δ (ppm) 1.038 (t). ¹³C (75 MHz, TMS, CDCl₃) δ (ppm): 172.2, 167.8, 158.5, 138.5, 135.1, 134.0, 131.0, 130.7, 128.7, 128.5, 127.5, 119.4, 117.0, 105.2, 55.9, 21.3. ¹⁹F (376

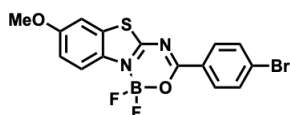
MHz, CFCl₃, CDCl₃): δ (ppm) -137.2. APCI HRMS (m/z) [M]⁺ 347.0842, obliczona: 347.0837

OMeBtH



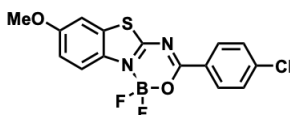
zielone ciało stałe, ϵ (CCl₃, M⁻¹cm⁻¹) 28700, ¹H NMR (400 MHz, TMS, CDCl₃): δ (ppm) 8.40 (d, 2H, *J* = 8.50 Hz), 7.66 (t, 1H, *J* = 7.56 Hz), 7.53 (dd, 2H, *J* = 7.82 Hz), 7.28 (d, 1H, *J* = 2.65 Hz), 7.20 (dd, 1H, *J* = 9.04, 2.16 Hz), 3.92 (s, 3H). ¹¹B (128 MHz, BF₃·Et₂O, CDCl₃): δ (ppm) 1.04 (t). ¹³C (100 MHz, TMS, CDCl₃) δ (ppm): 172.2, 167.7, 158.6, 134.2, 134.0, 131.1, 130.9, 128.6, 119.4, 117.1, 105.2, 56.0. ¹⁹F (376 MHz, from CFCl₃, CDCl₃): δ (ppm) -137.0. EI HRMS (m/z) [M]⁺ 332.0605, obliczona: 332.0602

OMeBt4-Br



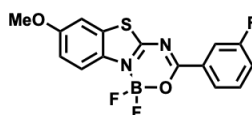
zielone ciało stałe, ϵ (CCl₃, M⁻¹cm⁻¹) 29000, ¹H NMR (700 MHz, TMS, CDCl₃): δ (ppm) 8.25 (d, 2H, *J* = 8.08 Hz), 7.98 (d, 1H, *J* = 9.08 Hz), 7.68 (d, 1H, *J* = 8.56 Hz), 7.22 (dd, 1H, *J* = 9.08, 2.52 Hz), 3.92 (s, 3H). ¹¹B (128 MHz, BF₃·Et₂O, CDCl₃): δ (ppm) 1.012 (t). ¹³C (75 MHz, TMS, CDCl₃) δ (ppm): 171.9, 166.8, 158.6, 133.9, 132.0, 131.6, 130.0, 129.6, 128.8, 119.5, 117.3, 105.1, 55.9. ¹⁹F (376 MHz, CFCl₃, CDCl₃): δ (ppm) -136.9. APCI HRMS (m/z) [M]⁺ 410.9787, obliczona: 410.9786

OMeBt4-Cl



zielone ciało stałe, ϵ (CCl₃, M⁻¹cm⁻¹) 25400, ¹H NMR (700 MHz, TMS, CDCl₃): δ (ppm) 8.33 (d, 2H, *J* = 8.41 Hz), 7.98 (d, 1H, *J* = 8.88 Hz), 7.50 (d, 1H, *J* = 8.88 Hz), 7.28 (m, 1H), 7.28 (dd, 1H, *J* = 9.12, 2.38 Hz), 3.92 (s, 3H). ¹¹B (128 MHz, BF₃·Et₂O, CDCl₃): δ (ppm) 1.011 (t). ¹⁹F (376 MHz, CFCl₃, CDCl₃): δ (ppm) -136.9.

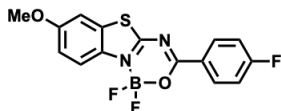
OMeBt3-F



zielone ciało stałe, ϵ (CCl₃, M⁻¹cm⁻¹) 28700, ¹H NMR (700 MHz, TMS, CDCl₃): δ (ppm) 8.19 (d, 2H, *J* = 7.80 Hz), 8.08 (d, 1H, *J* = 9.52 Hz), 7.99 (d, 1H, *J* = 9.10 Hz), 7.51 (m, 1H), 7.36 (m, 1H), 7.29 (d, 1H, *J* = 2.45 Hz), 7.22 (m, 2H), 3.93 (s, 3H). ¹¹B (128 MHz, BF₃·Et₂O, CDCl₃): δ (ppm) 1.029 (t). ¹³C (75 MHz, TMS, CDCl₃) δ (ppm): 171.9, 164.3, 161.0, 158.7, 133.9, 133.3, 130.3, 130.2, 128.9, 125.9, 121.3,

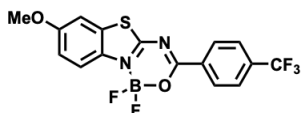
121.0, 119.5, 117.3, 117.0, 116.7, 105.1, 56.0. ^{19}F (376 MHz, CFCl_3 , CDCl_3): δ (ppm) -112.9, -136.8. APCI HRMS (m/z) $[\text{M}]^+$ 351.0592, obliczona: 351.0586

OMeBt4-F



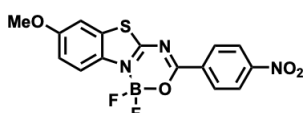
zielone ciało stałe, ϵ (CCl_3 , $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) 42300, ^1H NMR (400 MHz, TMS, CDCl_3): δ (ppm) 8.42 (m, 2H), 7.97 (d, 1H, $J = 9.03$ Hz), 7.26 (d, 1H, $J = 2.45$ Hz), 7.21 (m, 3H), 3.92 (s, 3H). ^{11}B (128 MHz, $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, CDCl_3): δ (ppm) 1.005 (t). ^{13}C (100 MHz, TMS, CDCl_3) δ (ppm): 172.0, 168.3, 166.4, 164.9, 158.6, 133.9, 133.0, 132.8, 128.7, 127.3, 119.4, 117.1, 116.0, 115.7, 105.2, 55.9. ^{19}F (376 MHz, CFCl_3 , CDCl_3): δ (ppm) -104.1, -137.1. APCI HRMS (m/z) $[\text{M}]^+$ 351.0590, obliczona: 351.0586

OMeBt4-CF₃



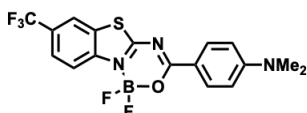
zielone ciało stałe, ϵ (CCl_3 , $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) 26000, ^1H NMR (400 MHz, TMS, CDCl_3): δ (ppm) 8.51 (d, 2H, $J = 8.08$ Hz), 8.01 (d, 1H, $J = 9.08$ Hz), 7.80 (d, 2H, $J = 8.20$ Hz), 7.31 (d, 1H, $J = 2.36$ Hz), 7.24 (dd, 1H, $J = 9.12, 2.52$ Hz), 3.94 (s, 3H). ^{11}B (128 MHz, from $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, CDCl_3): δ (ppm) 0.64 (t). ^{13}C (100 MHz, TMS, CDCl_3) δ (ppm): 171.7, 166.1, 158.8, 135.3, 135.1, 134.5, 133.9, 130.5, 129.1, 125.6, 124.4, 122.8, 119.7, 117.5, 105.1, 56.0. ^{19}F (376 MHz, from CFCl_3 , CDCl_3): δ (ppm) -64.1, -136.6. EI HRMS (m/z) $[\text{M}]^+$ 400.0478, obliczona: 400.0476

OMeBt4-NO₂



żółte ciało stałe, ϵ (CCl_3 , $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) 12900, ^1H NMR (400 MHz, TMS, CDCl_3): δ (ppm) 8.54 (d, 2H, $J = 8.96$ Hz), 8.34 (d, 2H, $J = 8.92$ Hz), 8.00 (d, 1H, $J = 9.12$ Hz), 7.29 (d, 1H, $J = 2.48$ Hz), 7.23 (dd, 2H, $J = 9.12, 2.52$ Hz), 3.92 (s, 3H). ^{11}B (128 MHz, $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, CDCl_3): δ (ppm) 0.647 (t). ^{13}C (100 MHz, TMS, CDCl_3) δ (ppm): 171.4, 165.2, 159.0, 151.0, 136.7, 133.8, 131.1, 129.3, 123.7, 119.8, 117.8, 105.1, 56.0. ^{19}F (376 MHz, CFCl_3 , CDCl_3): δ (ppm) -136.2. APCI HRMS (m/z) $[\text{M}]^+$ 378.0537, obliczona: 378.0531

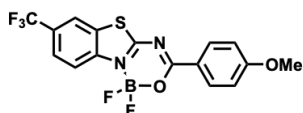
CF₃Bt4-NMe₂



żółte ciało stałe, ϵ (CCl_3 , $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) 86500, ^1H NMR (700 MHz, TMS, CDCl_3):

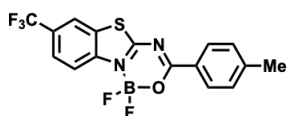
δ (ppm) 8.28 (d, 2H, $J = 9.32$ Hz), 8.05 (d, 1H, $J = 8.52$ Hz), 8.02 (s, 1H), 7.78 (dd, 1H, $J = 8.27, 1.75$ Hz), 6.77(d, 2H, $J = 9.20$ Hz), 3.15 (s, 3H). ^{11}B (128 MHz, $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, CDCl_3): δ (ppm) 0.512 (t). ^{13}C (100 MHz, TMS, CDCl_3) δ (ppm): 175.0, 168.9, 154.6, 142.7, 133.4, 128.2, 127.8, 126.9, 125.1, 125.1, 119.6, 119.6, 118.1, 117.3, 111.6, 40.5. ^{19}F (376 MHz, CFCl_3 , CDCl_3): δ (ppm) -62.8, -138.2.

CF₃Bt4-OMe



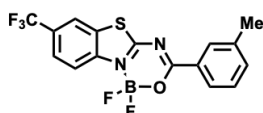
zielone ciało stałe, ϵ (CCl_3 , $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) 63500, ^1H NMR (700 MHz, TMS, CDCl_3): δ (ppm) 8.38 (d, 2H, $J = 8.89$ Hz), 8.12 (d, 1H, $J = 8.61$ Hz), 8.08 (s, 1H), 7.83 (dd, 1H, $J = 8.70, 1.42$), 7.00 (d, 1H, $J = 9.10$ Hz), 3.93 (s, 3H). ^{11}B (128 MHz, $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, CDCl_3): δ (ppm) 0.66 (t). ^{13}C (100 MHz, TMS, CDCl_3) δ (ppm): 175.6, 169.2, 165.2, 142.5, 133.3, 128.7, 127.2, 125.3, 122.8, 119.7, 118.7, 114.3, 55.65. ^{19}F (376 MHz, from CFCl_3 , CDCl_3): δ (ppm) -62.85. EI HRMS (m/z) $[\text{M}]^+$ 400.0478, obliczona: 400.0476

CF₃Bt4-Me



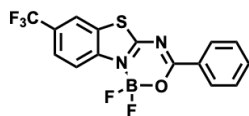
bezbarwne ciało stałe, ϵ (CCl_3 , $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) 40000, ^1H NMR (700 MHz, TMS, CDCl_3): δ (ppm) 8.33 (d, 2H, $J = 8.32$ Hz), 8.17 (d, 1H, $J = 8.67$ Hz), 8.12 (s, 1H), 8.70 (dd, 1H, $J = 8.84, 1.37$ Hz), 7.36 (d, 2H, $J = 8.01$ Hz), 2.50 (s, 3H). ^{11}B (128 MHz, $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, CDCl_3): δ (ppm) 0.693 (t). ^{13}C (100 MHz, TMS, CDCl_3) δ (ppm): . ^{19}F (376 MHz, CFCl_3 , CDCl_3): δ (ppm) -62.9, 136.7. APCI HRMS (m/z) $[\text{M}]^+$ 385.0612, obliczona: 385.0605

CF₃Bt3-Me



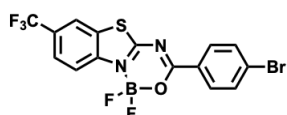
bezbarwne ciało stałe, ϵ (CCl_3 , $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) 41700, ^1H NMR (700 MHz, TMS, CDCl_3): δ (ppm) 8.26 (s, 1H), 8.25 (d, 1H, $J = 8.33$ Hz), 8.18 (d, 1H, $J = 8.61$ Hz), 8.14 (s, 1H), 7.88 (dd, 1H, $J = 8.92, 1.31$ Hz), 7.52 (m, 1H) 7.45 (m, 1H) 2.49 (s, 3H). ^{11}B (128 MHz, $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, CDCl_3): δ (ppm) 0.624 (t). ^{13}C (100 MHz, TMS, CDCl_3) δ (ppm): 175.8, 169.7, 142.3, 138.7, 135.9, 131.2, 130.5, 129.0, 128.8, 128.7, 128.1, 127.4, 125.5 125.5, 124.2, 122.7, 119.9, 119.9, 119.8, 118.9, 21.3. ^{19}F (376 MHz, CFCl_3 , CDCl_3): δ (ppm) -62.9, -136.5. APCI HRMS (m/z) $[\text{M}]^+$ 385.0612, obliczona: 385.0605

CF₃BtH



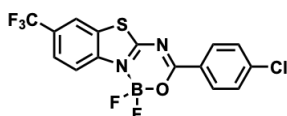
bezbarwne ciało stałe, ϵ (CCl₃, M⁻¹cm⁻¹) 43700, ¹H NMR (400 MHz, TMS, CDCl₃): δ (ppm) 8.44 (d, 2H, $J = 8.08$ Hz), 8.19 (d, 1H, $J = 9.08$ Hz), 8.14 (m, 1H), 7.88 (dd, 1H, $J = 8.78, 1.31$ Hz), 7.71 (m, 1H), 7.57 (m, 2H), 3.94 (s, 3H). ¹¹B (128 MHz, BF₃·Et₂O, CDCl₃): δ (ppm) 0.73 (t). ¹³C (100 MHz, TMS, CDCl₃) δ (ppm): 175.8, 169.5, 142.3, 135.1, 130.8, 130.6, 129.1, 128.8, 128.7, 127.4, 125.6, 125.3, 121.7, 119.9, 119.0, 118.1. ¹⁹F (376 MHz, from CFCl₃, CDCl₃): δ (ppm) -62.9, -136.6. EI HRMS (m/z) [M]⁺ 370.0375, obliczona:370.0371

CF₃Bt4-Br



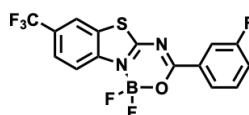
bezbarwne ciało stałe, ϵ (CCl₃, M⁻¹cm⁻¹) 43100, ¹H NMR (700 MHz, TMS, CDCl₃): δ (ppm) 8.29 (d, 2H, $J = 8.72$ Hz), 8.19 (d, 1H, $J = 8.64$ Hz), 8.15 (s, 1H), 7.89 (dd, 1H, $J = 8.74, 1.34$ Hz), 7.71 (d, 2H, $J = 8.68$ Hz). ¹¹B (128 MHz, BF₃·Et₂O, CDCl₃): δ (ppm) 0.701 (t). ¹³C (100 MHz, TMS, CDCl₃) δ (ppm): 175.6, 168.6, 142.2, 132.2, 132.1, 130.7, 129.5, 129.3, 128.9, 128.6, 127.5, 125.6, 125.6, 125.6, 124.8, 122.1, 120.0, 119.9, 119.9, 119.9, 119.1. ¹⁹F (376 MHz, CFCl₃, CDCl₃): δ (ppm) -62.9, -136.2. APCI HRMS (m/z) [M]⁺ 448.9557, obliczona: 448.9554

CF₃Bt4-Cl



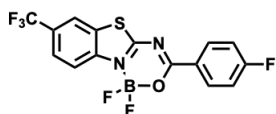
bezbarwne ciało stałe, ϵ (CCl₃, M⁻¹cm⁻¹) 40100, ¹H NMR (700 MHz, TMS, CDCl₃): δ (ppm) 8.37 (d, 2H, $J = 8.77$ Hz), 8.18 (d, 1H, $J = 9.44$ Hz), 8.15 (s, 1H), 7.89 (dd, 1H, $J = 8.77, 1.34$ Hz), 7.54 (d, 2H, $J = 8.58$ Hz). ¹¹B (128 MHz, BF₃·Et₂O, CDCl₃): δ (ppm) 0.715 (t). ¹⁹F (376 MHz, CFCl₃, CDCl₃): δ (ppm) -62.9, -136.2.

CF₃Bt3-F



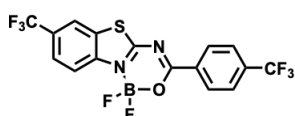
bezbarwne ciało stałe, ϵ (CHCl₃, M⁻¹cm⁻¹) 31400, ¹H NMR (400 MHz, TMS, CDCl₃): δ (ppm) 8.24 (m, 1H), 8.21 (d, 1H, $J = 8.74$ Hz), 8.16 (m, 1H), 8.12 (m, 1H), 7.90 (d, 2H, $J = 8.43$ Hz), 7.55 (m, 1H), 7.41 (m, 1H). ¹¹B (128 MHz, BF₃·Et₂O, CDCl₃): δ (ppm) 0.618 (t). ¹⁹F (376 MHz, CFCl₃, CDCl₃): δ (ppm) -62.9, -112.4, -136.1. APCI HRMS (m/z) [M]⁺ 389.0354, obliczona: 389.0355

CF₃Bt4-F



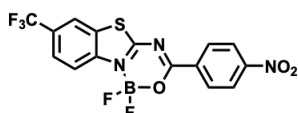
bezbarwne ciało stałe, ϵ (CCl₃, M⁻¹cm⁻¹) 30300, ¹H NMR (400 MHz, TMS, CDCl₃): δ (ppm) 8.47 (m, 2H), 8.18 (d, 1H, $J = 8.82$ Hz), 8.15 (s, 1H), 7.89 (dd, 1H, $J = 8.89, 1.78$ Hz), 7.24 (m, 2H). ¹¹B (128 MHz, BF₃·Et₂O, CDCl₃): δ (ppm) 0.593 (t). ¹⁹F (376 MHz, CFCl₃, CDCl₃): δ (ppm) -62.9, -125.1. APCI HRMS (m/z) [M]⁺ 389.0357, obliczona: 389.0355

CF₃Bt4-CF₃



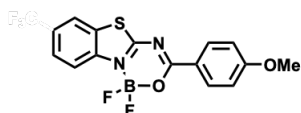
bezbarwne ciało stałe, ϵ (CHCl₃, M⁻¹cm⁻¹) 30300, ¹H NMR (400 MHz, TMS, CDCl₃): δ (ppm) 8.53 (d, 2H, $J = 8.23$ Hz), 8.20 (d, 1H, $J = 8.83$ Hz), 7.80 (d, 1H, $J = 8.20$ Hz), 7.31 (m, 1H), 7.24 (dd, 1H, $J = 8.77, 1.19$ Hz), 7.80 (d, 2H, $J = 8.49$ Hz). ¹¹B (128 MHz, BF₃·Et₂O, CDCl₃): δ (ppm) 0.65 (t). ¹³C (100 MHz, TMS, CDCl₃) δ (ppm): 175.6, 168.0, 142.2, 136.1, 134.0, 131.0, 129.1, 127.7, 125.8, 124.8, 122.1, 120.0, 119.3. ¹⁹F (376 MHz, from CFCl₃): δ (ppm) -64.2, -62,9 -135.8. EI HRMS (m/z) [M]⁺ 438.0239, obliczona: 438.0244

CF₃Bt4-NO₂



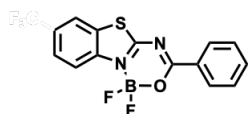
żółte ciało stałe, ϵ (CCl₃, M⁻¹cm⁻¹) 23200, ¹H NMR (700 MHz, TMS, CDCl₃): δ (ppm) 8.59 (d, 2H, $J = 8.90$ Hz), 8.37 (d, 2H, $J = 8.94$ Hz), 8.37 (d, 1H, $J = 8.64$ Hz), 8.18 (s, 1H), 7.91 (dd, 1H, $J = 8.61, 1.34$ Hz). ¹¹B (128 MHz, BF₃·Et₂O, CDCl₃): δ (ppm) 0.744 (t). APCI HRMS (m/z) [M]⁺ 415.0225, obliczona: 415.0221

HBt4-OMe



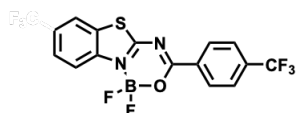
zielone ciało stałe, ϵ (CCl₃, M⁻¹cm⁻¹) 46700, ¹H NMR (400 MHz, TMS, CDCl₃): δ (ppm) 8.39 (d, 2H, $J = 9.02$ Hz), 8.06 (d, 1H, $J = 8.08$ Hz), 7.81 (d, 1H, $J = 8.36$ Hz), 7.61 (m, 1H), 7.49 (m, 1H), 7.02 (d, 2H, $J = 9.02$ Hz) 3.94 (s, 3H). ¹¹B (128 MHz, BF₃·Et₂O, CDCl₃): δ (ppm) 1.03 (t). ¹³C (100 MHz, TMS, CDCl₃) δ (ppm): 174.0, 168.1, 165.0, 140.1, 132.9, 131.7, 128.2, 126.2, 123.1, 122.1, 118.4, 114.1, 55.6. ¹⁹F (376 MHz, from CFCl₃, CDCl₃): δ (ppm) -137.4. EI HRMS (m/z) [M]⁺ 332.0601, obliczona: 332.0602

HBtH



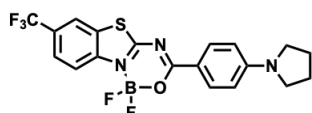
bezbarwne ciało stałe, ϵ (CCl₃, M⁻¹cm⁻¹) 32100, ¹H NMR (400 MHz, TMS, CDCl₃): δ (ppm) 8.42 (dd, 2H, J = 8.55 Hz), 8.09 (d, 1H, J = 9.08 Hz), 7.83 (d, 1H, J = 8.68 Hz), 7.67 (m, 1H), 7.63 (m, 1H), 7.54 (m, 2H) 7.51 (m, 1H). ¹¹B (128 MHz, BF₃·Et₂O, CDCl₃): δ (ppm) 1.10 (t). ¹³C (100 MHz, TMS, CDCl₃) δ (ppm): 174.0, 168.5, 140.1, 134.5, 131.0, 128.7, 128.4, 127.2, 126.6, 122.2, 118.7. ¹⁹F (376 MHz, from CFCl₃, CDCl₃): δ (ppm) -136.7. EI HRMS (m/z) [M]⁺ 302.0501, obliczona: 302.0497

HBt4-CF₃



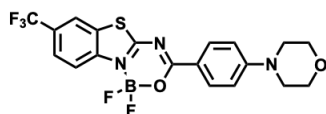
bezbarwne ciało stałe, ϵ (CCl₃, M⁻¹cm⁻¹) 27100, ¹H NMR (400 MHz, TMS, CDCl₃): δ (ppm) 8.52 (d, 2H, J = 8.15 Hz), 8.12 (d, 1H, J = 8.17 Hz), 7.86 (d, 2H, J = 8.20 Hz), 7.80 (d, 2H, J = 2,36 Hz), 7.67 (dd, 1H, J = 7.58 Hz), 7.67 (dd, 1H, J = 7.32 Hz). ¹¹B (128 MHz, BF₃·Et₂O, CDCl₃): δ (ppm) 1.10 (t). ¹³C (100 MHz, TMS, CDCl₃) δ (ppm): 166.8, 139.9, 135.6, 135.1, 134.3, 130.6, 128.6, 125.6, 125.5, 125.3, 122.2, 121.7, 118.8. ¹⁹F (376 MHz, from CFCl₃, CDCl₃): δ (ppm) -64.1, -136.6. EI HRMS (m/z) [M]⁺ 370.0375, obliczona:370.0371

CF₃BtPyr



żółte ciało stałe, ϵ (CCl₃, M⁻¹cm⁻¹) 98800, ¹H NMR (400 MHz, TMS, CDCl₃): δ (ppm) 8.26 (d, 2H, J = 9.10 Hz), 8.04 (d, 1H, J = 8.60 Hz), 8.00 (s, 1H), 7.77 (dd, 1H, J = 8.63, 1.30 Hz), 6.58 (d, 2H, J = 9.20 Hz), 3.45 (s, 4H), 2.08 (s, 4H). ¹¹B (128 MHz, BF₃·Et₂O, CDCl₃): δ (ppm) 0.493 (t). ¹³C (100 MHz, TMS, CDCl₃) δ (ppm): 174.9, 169.0, 152.7, 142.5, 133.6, 127.7, 126.8, 125.0, 125.0, 124.9, 122.3, 119.5, 119.5, 117.9, 116.0, 111.5, 47.8, 25.4. ¹⁹F (376 MHz, from CFCl₃, CDCl₃): δ (ppm) -62.8, -138.5. APCI (m/z) [M]⁺ 440.1035, obliczona: 440.1027

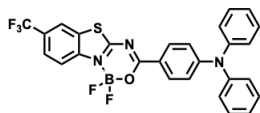
CF₃BtMor



żółte ciało stałe, ϵ (CCl₃, M⁻¹cm⁻¹) 78100, ¹H NMR (700 MHz, TMS, CDCl₃): δ (ppm) 8.30 (d, 2H, J = 9.17 Hz), 8.08 (d, 1H, J = 8.62 Hz), 8.04 (s, 1H), 7.78 (dd, 1H, J = 8.75, 1.21 Hz), 6.92 (d, 2H, J = 9.28 Hz), 3.88 (m, 4H) 3.43 (m, 4H). ¹¹B

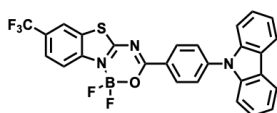
(128 MHz, $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, CDCl_3): δ (ppm) 0.516 (t). ^{19}F (376 MHz, from CFCl_3 , CDCl_3): δ (ppm) -62.8, -137.7. APCI (m/z) $[\text{M}]^+$ 456.09983, obliczona: 456.0976

CF_3BtDPA



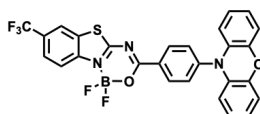
żółte ciało stałe, ϵ (CCl_3 , $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) 55700, ^1H NMR (700 MHz, TMS, CDCl_3): δ (ppm) 8.20 (d, 2H, $J = 9.07$ Hz), 8.08 (d, 1H, $J = 8.62$ Hz), 8.05 (s, 1H), 7.78 (dd, 1H, $J = 8.75, 1.21$ Hz), 7.37 (m, 4H) 7.21 (m, 6H) 7.79 (d, 2H, $J = 9.07$ Hz). ^{11}B (128 MHz, $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, CDCl_3): δ (ppm) 0.533 (t). ^{13}C (100 MHz, TMS, CDCl_3) δ (ppm): 175.3, 168.7, 154.1, 145.8, 142.6, 132.7, 129.8, 129.5, 128.5, 128.1, 127.1, 126.6, 125.6, 125.2, 125.2, 124.9, 122.2, 121.1, 119.7, 119.6, 118.7, 118.4. ^{19}F (376 MHz, from CFCl_3 , CDCl_3): δ (ppm) -62.8, -137.6. APCI (m/z) $[\text{M}]^+$ 538.1193, obliczona: 538.1184

CF_3BtCz



żółte ciało stałe, ϵ (CCl_3 , $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) 28000, ^1H NMR (700 MHz, TMS, CDCl_3): δ (ppm) 8.66 (d, 2H, $J = 8.67$ Hz), 8.19 (d, 1H, $J = 8.84$ Hz), 8.02 (m, 3H), 7.89 (dd, 1H, $J = 8.68, 1.34$ Hz), 7.81 (d, 2H, $J = 8.68$ Hz), 7.55 (d, 2H, $J = 8.13$ Hz), 7.46 (m, 2H) 7.34 (m, 2H). ^{11}B (128 MHz, $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, CDCl_3): δ (ppm) 0.682 (t). ^{13}C (100 MHz, TMS, CDCl_3) δ (ppm): 175.6, 168.5, 144.1, 140.0, 132.6, 126.4, 125.6, 124.1, 121.0, 120.6, 119.9, 119.0, 109.9. ^{19}F (376 MHz, from CFCl_3 , CDCl_3): δ (ppm) -62.9, -136.3. APCI (m/z) $[\text{M}]^+$ 536.1034, obliczona: 536.1027

$\text{CF}_3\text{BtPhenox}$



ciemnoczerwone ciało stałe, ϵ (CCl_3 , $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) 43900, ^1H NMR (700 MHz, TMS, CDCl_3): δ (ppm) 8.63 (d, 2H, $J = 8.72$ Hz), 8.19 (d, 1H, $J = 8.67$ Hz), 8.15 (s, 1H), 7.89 (dd, 1H, $J = 8.89, 1.52$ Hz), 7.56 (d, 2H, $J = 8.72$ Hz), 6.73 (m, 4H), 6.64 (m, 2H), 6.04 (dd, 1H, $J = 7.80, 1.34$ Hz). ^{11}B (128 MHz, $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, CDCl_3): δ (ppm) 0.677 (t). ^{13}C (100 MHz, TMS, CDCl_3) δ (ppm): 175.6, 168.4, 145.7, 144.3, 133.4, 133.4, 130.9, 130.8, 130.2, 129.3, 128.9, 127.5, 125.7, 123.4, 122.2, 120.0, 119.9, 119.1, 115.9, 113.7. ^{19}F (376 MHz, from CFCl_3 , CDCl_3): δ (ppm) -62.9, -136.2. APCI (m/z) $[\text{M}]^+$ 552.0983, obliczona: 552.0976

Lista publikacji

B.1 Publikacje związane z tematem rozprawy

1. **Patryk Rybczyński**, Manon H. E. Bousquet, Anna Kaczmarek-Kędziera, Beata Jędrzejewska, Denis Jacquemin, Borys Ośmiałowski „Controlling the Fluorescence Quantum Yields of Benzothiazole-difluoroborates by Optimal Substitution”, *Chem. Sci.* **2022**,13, 13347-13360.
2. **Patryk Rybczyński**, Tadeusz Muzioł, Anna Kaczmarek-Kędziera, Borys Ośmiałowski, „Topology Switch between AIE and ACQ A Balance of Substituents”, *J. Phys. Chem. C* **2024** 128, 13, 5651–5658.
3. Agata Hajda, Manuela Grelich-Mucha, **Patryk Rybczyński**, Borys Ośmiałowski, Robert Zalesny, Joanna Olesiak-Bańska „BF₂-Functionalized Benzothiazole Amyloid Markers: Effect of Donor Substituents on One- and Two-Photon Properties”, *ACS Appl. Bio Mater.* **2023**, 6, 12, 5676–5684.

B.2 Pozostałe publikacje

1. **Patryk Rybczyński**, Anna Kaczmarek-Kędziera, Alex Iglesias-Reguant, Damian Plażuk, Borys Ośmiałowski, „Tautomeric Equilibrium in 1-Benzamidoisoquinoline Derivatives”, *Molecules* **2023**, 28, 3, 1101.
2. **Patryk Rybczyński**, Aleksander Smolarkiewicz-Wyczachowski, Jarosław Pi-skorz, Szymon Bocian, Marta Ziegler-Borowska, Dariusz Kędziera, Anna Kaczmarek-Kędziera, „Photochemical Properties and Stability of BODIPY Dyes”, *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, 22, 6735.

3. **Patryk Rybczyński**, Anna Kaczmarek-Kędziera, „BODIPY dimers Structure, Interaction, and Absorption Spectrum”, *Struct. Chem.* **2021**, 32, 953.
4. Kinga Mylkie, Paweł Nowak, **Patryk Rybczyński**, Marta Ziegler-Borowska, „Polymer-Coated Magnetite Nanoparticles for Protein Immobilization”, *Materials* **2021**, 14, 248.
5. Dorota Chełminiak-Dudkiewicz, **Patryk Rybczyński**, Aleksander Smolarkiewicz-Wyczachowski, Dariusz T. Młynarczyk, Katarzyna Węgrzynowska-Drzymalska, Anna Ilnicka, Tomasz Gośliński, Michał P. Marszał, Marta Ziegler-Borowska, „Photosensitizing Potential of Tailored Magnetite Hybrid Nanoparticles Functionalized with Levan and Zinc (II) Phthalocyanine”, *Appl. Surf. Sci.* **2020**, 524, 146602.
6. Marta Ziegler-Borowska, Kinga Mylkie, Paweł Nowak, **Patryk Rybczyński**, Adam Sikora, Dorota Chełminiak-Dudkiewicz, Anna Kaczmarek-Kędziera, „Testing for Ketoprofen Binding to HSA Coated Magnetic Nanoparticles Under Normal Conditions and After Oxidative Stress”, *Molecules* **2020**, 25, 1945

Bibliografia

- [1] B. Valeur, M. N. Berberan-Santos, „A Brief History of Fluorescence and Phosphorescence Before the Emergence of Quantum Theory”, *J. Chem. Educ.* **2011**, *88*, 731–738, <https://doi.org/10.1021/ed100182h>.
- [2] A. Jablonski, „Efficiency of Anti-Stokes Fluorescence in Dyes”, *Nature* **1933**, *131*, 839–840, <https://doi.org/10.1038/131839b0>.
- [3] M. Kasha, „Characterization of Electronic Transitions in Complex Molecules”, *Discuss. Faraday Soc.* **1950**, *9*, 14–19, <http://dx.doi.org/10.1039/DF9500900014>.
- [4] T. Jüstel, H. Nikol, C. Ronda, „New Developments in the Field of Luminescent Materials for Lighting and Displays”, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 3084–3103, <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/%28SICI%291521-3773%2819981204%2937%3A22%3C3084%3A%3AAID-ANIE3084%3E3.O.CO%3B2-W>.
- [5] F. Yang, Q. Zhang, S. Huang, D. Ma, „Recent Advances of Near Infrared Inorganic Fluorescent Probes for Biomedical Applications”, *J. Mater. Chem. B* **2020**, *8*, 7856–7879, <http://dx.doi.org/10.1039/D0TB01430C>.
- [6] C. Feldmann, T. Jüstel, C. Ronda, P. Schmidt, „Inorganic Luminescent Materials: 100 Years of Research and Application”, *Adv. Func. Mat.* **2003**, *13*, 511–516, <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/adfm.200301005>.
- [7] Y. Y. Chia, M. G. Tay, „An Insight Into Fluorescent Transition Metal Complexes”, *Dalton Trans.* **2014**, *43*, 13159–13168, <http://dx.doi.org/10.1039/C4DT01098A>.
- [8] V. W.-W. Yam, A. K.-W. Chan, E. Y.-H. Hong, „Charge-transfer Processes in Metal Complexes Enable Luminescence and Memory Functions”, *Nat. Rev. Chem.* **2020**, *4*, 528–541, <https://doi.org/10.1038/s41570-020-0199-7>.

- [9] L. Armelao, S. Quici, F. Barigelletti, G. Accorsi, G. Bottaro, M. Cavazzini, E. Tondello, „Design of Luminescent Lanthanide Complexes: From Molecules to Highly Efficient Photo-emitting Materials”, *Coord. Chem. Rev.* **2010**, *254*, 487–505, <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0010854509002069>.
- [10] X. Li, Y. Xie, Z. Li, „Diversity of Luminescent Metal Complexes in OLEDs: Beyond Traditional Precious Metals”, *Chem.-Asian J.* **2021**, *16*, 2817–2829, <https://aces.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/asia.202100784>.
- [11] M. Wang, Y. Da, Y. Tian, „Fluorescent Proteins and Genetically Encoded Biosensors”, *Chem. Soc. Rev.* **2023**, *52*, 1189–1214, <http://dx.doi.org/10.1039/D2CS00419D>.
- [12] M. Zimmer, „Green Fluorescent Protein (GFP): Applications, Structure, and Related Photophysical Behavior”, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 759–782, <https://doi.org/10.1021/cr010142r>.
- [13] F. Tian, G. Xu, S. Zhou, S. Chen, D. He, „Principles and Applications of Green Fluorescent Protein-Based Biosensors: a Mini-Review”, *Analyst* **2023**, *148*, 2882–2891, <http://dx.doi.org/10.1039/D3AN00320E>.
- [14] L. Manna, „The Bright and Enlightening Science of Quantum Dots”, *Nano Lett.* **2023**, *23*, 9673–9676, <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.3c03904>.
- [15] K. D. Wegner, N. Hildebrandt, „Quantum Dots: Bright and Versatile in vitro and in vivo Fluorescence Imaging Biosensors”, *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 4792–4834, <http://dx.doi.org/10.1039/C4CS00532E>.
- [16] Y. Shu, X. Lin, H. Qin, Z. Hu, Y. Jin, X. Peng, „Quantum Dots for Display Applications”, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59*, 22312–22323, <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/anie.202004857>.
- [17] B. Zhao, Z. Tan, „Fluorescent Carbon Dots: Fantastic Electroluminescent Materials for Light-Emitting Diodes”, *Adv. Sci.* **2021**, *8*, 2001977, <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/advs.202001977>.
- [18] L. Möckl, D. C. Lamb, C. Bräuchle, „Super-Resolved Fluorescence Microscopy: Nobel Prize in Chemistry 2014 for Eric Betzig, Stefan Hell, and William E. Moerner.”, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*.
- [19] M. Hauser, M. Wojcik, D. Kim, M. Mahmoudi, W. Li, K. Xu, „Correlative Super-Resolution Microscopy: New Dimensions and New Opportunities”, *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 7428–7456, <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00604>.
- [20] T. Yang, Y. Luo, W. Ji, G. Yang, „Advancing Biological Super-resolution Microscopy Through Deep Learning: a Brief Review”, *Biophys. Rep.* **2021**, *7*, 253–266, <http://www.biophysics-reports.org/en/article/doi/10.52601/bpr.2021.210019>.

- [21] X. Zhu, Q. Chen, H. Zhao, Q. Yang, Goudappagouda, M. Gelléri, S. Ritz, D. Ng, K. Koynov, S. H. Parekh, V. K. Chetty, B. K. Thakur, C. Cremer, K. Landfester, K. Müllen, M. Terenzio, M. Bonn, A. Narita, X. Liu, „Intrinsic Burst-Blinking Nanographenes for Super-Resolution Bioimaging”, *J. Am. Chem. Soc.* **2024**, *146*, 5195–5203, <https://doi.org/10.1021/jacs.3c11152>.
- [22] D. Pinotsi, A. K. Buell, C. Galvagnion, C. M. Dobson, G. S. Kaminski Schierle, C. F. Kaminski, „Direct Observation of Heterogeneous Amyloid Fibril Growth Kinetics via Two-Color Super-Resolution Microscopy”, *Nano Letters* **2014**, *14*, 339–345, <https://doi.org/10.1021/nl4041093>.
- [23] M. Zhang, H. D. Pinholt, X. Zhou, S. S.-R. Bohr, L. Banetta, A. Zaccone, V. Foderà, N. S. Hatzakis, „Direct Observation of Heterogeneous Formation of Amyloid Spherulites in Real-Time by Super-Resolution Microscopy”, *Communications Biology* **2022**, *5*, 850, <https://doi.org/10.1038/s42003-022-03810-1>.
- [24] C. Xue, T. Y. Lin, D. Chang, Z. Guo, „Thioflavin T as an Amyloid Dye: Fibril Quantification, Optimal Concentration and Effect on Aggregation”, *R. Soc. Open Sci.* **2017**, *4*, 160696, <https://royalsocietypublishing.org/doi/abs/10.1098/rsos.160696>.
- [25] P. Hanczyc, P. Fita, „Laser Emission of Thioflavin T Uncovers Protein Aggregation in Amyloid Nucleation Phase”, *ACS Photonics* **2021**, *8*, 2598–2609, <https://doi.org/10.1021/acsp Photonics.1c00082>.
- [26] M. I. Sulatsky, O. V. Stepanenko, O. V. Stepanenko, I. M. Kuznetsova, K. K. Turoverov, A. I. Sulatskaya, „Prediction of the Feasibility of Using the Gold Standard Thioflavin T to Detect Amyloid Fibril in Acidic Media”, *Anal. Chem.* **2024**, *96*, 2158–2164, <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.3c05118>.
- [27] M. Biancalana, S. Koide, „Molecular Mechanism of Thioflavin-T Binding to Amyloid Fibrils”, *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteom.* **2010**, *1804*, 1405–1412, <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1570963910000993>.
- [28] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3 wyd., (red.: J. R. Lakowicz), Springer New York, **2006**, s. XXVI, 954, <https://doi.org/10.1007/978-0-387-46312-4>.
- [29] E. Fermi, *Nuclear Physics*, University of Chicago Press, **1950**.
- [30] P. A. M. Dirac, N. H. D. Bohr, „The Quantum Theory of the Emission and Absorption of Radiation”, *Proc. R. Soc. Lond. Ser. A-Contain. Pap. Math. Phys. Character* **1927**, *114*, 243–265, <https://royalsocietypublishing.org/doi/abs/10.1098/rspa.1927.0039>.
- [31] J. C. del Valle, J. Catalán, „Kasha’s Rule: a Reappraisal”, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2019**, *21*, 10061–10069, <http://dx.doi.org/10.1039/C9CP00739C>.
- [32] J. B. Birks, D. J. Dyson, B. H. Flowers, „The Relations Between the Fluorescence and Absorption Properties of Organic Molecules”, *Proc. R. Soc. A: Math. Phys. Eng. Sci.* **1963**, *275*, 135–148, <https://royalsocietypublishing.org/doi/abs/10.1098/rspa.1963.0159>.

- [33] S. Sambursky, G. Wolfsohn, „On the Fluorescence and Absorption Spectra of Anthracene and Phenanthrene in Solutions”, *Trans. Faraday Soc.* **1940**, *35*, 427–432, <http://dx.doi.org/10.1039/TF9403500427>.
- [34] C. Qiu, G. J. Blanchard, „Orientational and Vibrational Relaxation Dynamics of Perylene in the Cyclohexane-Ethanol Binary Solvent System”, *J. Phys. Chem. B* **2014**, *118*, 10525–10533, <https://doi.org/10.1021/jp5061123>.
- [35] B. Ośmiałowski, A. Zakrzewska, B. Jędrzejewska, A. Grabarz, R. Zaleśny, W. Bartkowiak, E. Kolehmainen, „Influence of Substituent and Benzoannulation on Photophysical Properties of 1-Benzoylmethyleneisoquinoline Difluoroborates”, *J. Org. Chem.* **2015**, *80*, 2072–2080, <https://doi.org/10.1021/jo502244j>.
- [36] Y. Kubota, T. Tsuzuki, K. Funabiki, M. Ebihara, M. Matsui, „Synthesis and Fluorescence Properties of a Pyridomethene-BF₂ Complex”, *Org. Lett.* **2010**, *12*, 4010–4013, <https://doi.org/10.1021/ol101612z>.
- [37] S. Chibani, B. Le Guennic, A. Charaf-Eddin, A. D. Laurent, D. Jacquemin, „Revisiting the Optical Signatures of BODIPY With ab initio Tools”, *Chem. Sci.* **2013**, *4*, 1950–1963, <http://dx.doi.org/10.1039/C3SC22265A>.
- [38] M. Poddar, R. Misra, „Recent Advances of BODIPY Based Derivatives for Optoelectronic Applications”, *Coord. Chem. Rev.* **2020**, *421*, 213462, <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0010854520302514>.
- [39] G. Baryshnikov, B. Minaev, H. Ågren, „Theory and Calculation of the Phosphorescence Phenomenon”, *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 6500–6537, <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00060>.
- [40] M. Baroncini, G. Bergamini, P. Ceroni, „Rigidification or Interaction-Induced Phosphorescence of Organic Molecules”, *Chem. Commun.* **2017**, *53*, 2081–2093, <http://dx.doi.org/10.1039/C6CC09288H>.
- [41] F. Clabau, X. Rocquefelte, T. Le Mercier, P. Deniard, S. Jobic, M.-H. Whangbo, „Formulation of Phosphorescence Mechanisms in Inorganic Solids Based on a New Model of Defect Conglomeration”, *Chem. Mater.* **2006**, *18*, 3212–3220, <https://doi.org/10.1021/cm052728q>.
- [42] H. Uoyama, K. Goushi, K. Shizu, H. Nomura, C. Adachi, „Highly Efficient Organic Light-Emitting Diodes from Delayed Fluorescence”, *Nature* **2012**, *492*, 234–238.
- [43] J. Eng, T. J. Penfold, „Understanding and Designing Thermally Activated Delayed Fluorescence Emitters: Beyond the Energy Gap Approximation”, *Chem. Rec.* **2020**, *20*, 831–856, <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/tcr.202000013>.
- [44] T. J. Penfold, F. B. Dias, A. P. Monkman, „The Theory of Thermally Activated Delayed Fluorescence for Organic Light Emitting Diodes”, *Chem. Commun.* **2018**, *54*, 3926–3935, <http://dx.doi.org/10.1039/C7CC09612G>.

- [45] P. Sudhakar, A. K. Gupta, D. B. Cordes, E. Zysman-Colman, „Thermally Activated Delayed Fluorescence Emitters Showing Wide-Range Near-Infrared Piezochromism and their Use in Deep-Red OLEDs”, *Chem. Sci.* **2024**, *15*, 545–554, <http://dx.doi.org/10.1039/D3SC05188A>.
- [46] J. Li, Q. Yao, L. Wu, Z. Hu, B. Gao, X. Wan, Q. Liu, „Designing Light-Element Materials with Large Effective Spin-Orbit Coupling”, *Nat. Commun.* **2022**, *13*, 919, <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28534-y>.
- [47] M. Mońka, I. E. Serdiuk, K. Kozakiewicz, E. Hoffman, J. Szumilas, A. Kubicki, S. Y. Park, P. Bojarski, „Understanding the Internal Heavy-Atom Effect on Thermally Activated Delayed Fluorescence: Application of Arrhenius and Marcus Theories for Spin–Orbit Coupling Analysis”, *J. Mater. Chem. C* **2022**, *10*, 7925–7934, <http://dx.doi.org/10.1039/D2TC00476C>.
- [48] W. Shao, H. Jiang, R. Ansari, P. M. Zimmerman, J. Kim, „Heavy Atom Oriented Orbital Angular Momentum Manipulation in Metal-Free Organic Phosphors”, *Chem. Sci.* **2022**, *13*, 789–797, <http://dx.doi.org/10.1039/D1SC05689A>.
- [49] T. J. A. Wolf, R. H. Myhre, J. P. Cryan, S. Coriani, R. J. Squibb, A. Battistoni, N. Berrah, C. Bostedt, P. Bucksbaum, G. Coslovich, R. Feifel, K. J. Gaffney, J. Grilj, T. J. Martinez, S. Miyabe, S. P. Moeller, M. Mucke, A. Natan, R. Obaid, T. Osipov, O. Plekan, S. Wang, H. Koch, M. Gühr, „Probing Ultrafast $\pi\pi^*/n\pi^*$ Internal Conversion in Organic Chromophores via K-edge Resonant Absorption”, *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 29, <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00069-7>.
- [50] D. Zhong, S. Liu, L. Yue, Z. Feng, H. Wang, P. Yang, B. Su, X. Yang, Y. Sun, G. Zhou, „Achieving Pure Room Temperature Phosphorescence (RTP) in Phenoselenazine-Based Organic Emitters through Synergism Among Heavy Atom Effect, Enhanced $n \rightarrow \pi^*$ Transitions and Magnified Electron Coupling by the A–D–A Molecular Configuration”, *Chem. Sci.* **2024**, *15*, 9112–9119, <http://dx.doi.org/10.1039/D4SC01200C>.
- [51] M. A. El-Sayed, „Triplet State. Its Radiative and Nonradiative Properties”, *Acc. Chem. Res.* **1968**, *1*, 8–16, <https://doi.org/10.1021/ar50001a002>.
- [52] B. Wu, H. Su, A. Cheng, X. Zhang, T. Wang, G. Zhang, „The El-Sayed’s Rule Analogy Enables Long-lived Room Temperature Phosphorescence in Twisted Biphenyls”, *Cell Rep. Phys. Sci.* **2023**, *4*, 101245, <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2666386422005719>.
- [53] „El-Sayed rules”, **2019**, <https://doi.org/10.1351/goldbook.ET07369>.
- [54] Z. Wu, J. Nitsch, J. Schuster, A. Friedrich, K. Edkins, M. Loebnitz, F. Dinkelbach, V. Stepanenko, F. Würthner, C. M. Marian, L. Ji, T. B. Marder, „Persistent Room Temperature Phosphorescence from Triarylboranes: A Combined Experimental and Theoretical Study”, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59*, 17137–17144, <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/anie.202007610>.

- [55] H. Min, I. S. Park, T. Yasuda, „Blue Thermally Activated Delayed Fluorescence with Sub-Microsecond Short Exciton Lifetimes: Acceleration of Triplet–Singlet Spin Interconversion via Quadrupolar Charge-Transfer States”, *Adv. Opt. Mater.* **2022**, *10*, 2200290, <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/adom.202200290>.
- [56] V. Balzani, P. Ceroni, A. Juris, *Photochemistry and Photophysics: Concepts, Research, Applications*, Wiley, **2014**, <https://books.google.pl/books?id=dAgDAwAAQBAJ>.
- [57] I. S. Yadav, R. Misra, „Design, Synthesis and Functionalization of BODIPY Dyes: Applications in Dye-Sensitized Solar Cells (DSSCs) and Photodynamic Therapy (PDT)”, *J. Mater. Chem. C* **2023**, *11*, 8688–8723, <http://dx.doi.org/10.1039/D3TC00171G>.
- [58] R. Kubin, A. Fletcher, „Fluorescence Quantum Yields of Some Rhodamine Dyes”, *J. Lumin.* **1982**, *27*, 455–462, <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/002223138290045X>.
- [59] V. Gray, D. Dzebo, A. Lundin, J. Alborzpour, M. Abrahamsson, B. Albinsson, K. Moth-Poulsen, „Photophysical Characterization of the 9,10-Disubstituted Anthracene Chromophore and Its Applications in Triplet–Triplet Annihilation Photon Upconversion”, *J. Mater. Chem. C* **2015**, *3*, 11111–11121, <http://dx.doi.org/10.1039/C5TC02626A>.
- [60] K. Kalyanasundaram, J. K. Thomas, „Solvent-Dependent Fluorescence of Pyrene-3-carboxaldehyde and Its Applications in the Estimation of Polarity at Micelle-Water Interfaces”, *J. Phys. Chem.* **1977**, *81*, 2176–2180.
- [61] G. P. Sahoo, D. Das, P. S. Sheet, H. Beg, G. Salgado-Morán, A. Misra, „Morphology Directing Synthesis of 1-Pyrene Carboxaldehyde Microstructures and their Photo Physical Properties”, *RSC Adv.* **2014**, *4*, 10903–10911, <http://dx.doi.org/10.1039/C3RA47203E>.
- [62] B. Valeur, M. N. Berberan-Santos, *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*, Wiley, **2012**, <https://books.google.pl/books?id=NdySsFt8TN8C>.
- [63] P. Verma, H. Pal, „Aggregation Studies of Dipolar Coumarin-153 Dye in Polar Solvents: A Photophysical Study”, *J. Phys. Chem. A* **2014**, *118*, 6950–6964, <https://doi.org/10.1021/jp506138w>.
- [64] S. Ma, S. Du, G. Pan, S. Dai, B. Xu, W. Tian, „Organic Molecular Aggregates: From Aggregation Structure to Emission Property”, *Aggregate* **2021**, *2*, e96, <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/agt2.96>.
- [65] Y. Huang, J. Xing, Q. Gong, L.-C. Chen, G. Liu, C. Yao, Z. Wang, H.-L. Zhang, Z. Chen, Q. Zhang, „Reducing Aggregation Caused Quenching Effect through Co-Assembly of PAH Chromophores and Molecular Barriers”, *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 169, <https://doi.org/10.1038/s41467-018-08092-y>.
- [66] M. Arik, N. Çelebi, Y. Onganer, „Fluorescence Quenching of Fluorescein with Molecular Oxygen in Solution”, *J. Photochem. Photobiol. A* **2005**, *170*, 105–111, <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1010603004003417>.

- [67] K. Kikuchi, C. Sato, M. Watabe, H. Ikeda, Y. Takahashi, T. Miyashi, „New Aspects of Fluorescence Quenching by Molecular Oxygen”, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 5180–5184, <https://doi.org/10.1021/ja00065a033>.
- [68] S.-H. Park, N. Kwon, J.-H. Lee, J. Yoon, I. Shin, „Synthetic Ratiometric Fluorescent Probes for Detection of Ions”, *Chem. Soc. Rev.* **2020**, *49*, 143–179, <http://dx.doi.org/10.1039/C9CS00243J>.
- [69] W. Chen, X. Ma, H. Chen, S. Hua Liu, J. Yin, „Fluorescent Probes for pH and Alkali Metal Ions”, *Coord. Chem. Rev.* **2021**, *427*, 213584, <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0010854520306093>.
- [70] Z. Wang, Y. Liu, W. Wang, C. Zhao, W. Lin, „A Single Small Molecule Fluorescent Probe for Imaging RNA Distribution and Detecting Endogenous SO₂ through Distinct Fluorescence Channels”, *New J. Chem.* **2021**, *45*, 19812–19817, <http://dx.doi.org/10.1039/D1NJ03588F>.
- [71] C. Reichardt, „Solvatochromic Dyes as Solvent Polarity Indicators”, *Chem. Rev.* **1994**, *94*, 2319–2358, <https://doi.org/10.1021/cr00032a005>.
- [72] S. Franzese, N. Saker Neto, W. W. H. Wong, „Extended Reichardt’s Dye–Synthesis and Solvatochromic Properties”, *Chem. Eur. J.* **2024**, *30*, e202400314, <https://chemistry-europe.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/chem.202400314>.
- [73] J. R. Lakowicz, S. Keating-Nakamoto, „Red-Edge Excitation of Fluorescence and Dynamic Properties of Proteins and Membranes”, *Biochem.* **1984**, *23*, 3013–3021, <https://doi.org/10.1021/bi00308a026>.
- [74] M. Vincent, J. Gallay, A. P. Demchenko, „Solvent Relaxation around the Excited State of Indole: Analysis of Fluorescence Lifetime Distributions and Time-Dependence Spectral Shifts”, *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 14931–14941, <https://doi.org/10.1021/j100041a006>.
- [75] W. Hu, Q. Wang, X. Miao, L. Bai, L. Li, G. S. He, J. Li, S. Yao, T. He, X. Lu, W. Huang, P. N. Prasad, Q. Fan, „Heteroatom-Containing Organic Molecule for Two-Photon Fluorescence Lifetime Imaging and Photodynamic Therapy”, *J. Phys. Chem. C* **2018**, *122*, 20945–20951, <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.8b05460>.
- [76] R. F. Landis, M. Yazdani, B. Creran, X. Yu, V. Nandwana, G. Cooke, V. M. Rotello, „Solvatochromic Probes for Detecting Hydrogen-bond-donating Solvents”, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 4579–4581, <http://dx.doi.org/10.1039/C4CC00805G>.
- [77] Y. Wang, Y. Chen, Y. Huang, Q. Zhang, Y. Zhang, J. Li, C. Jia, „A Switch-on Fluorophore Using Water Molecules via Hydrogen Bonding and its Application for Bio-imaging of Formaldehyde in Living Cells”, *Anal. Methods* **2019**, *11*, 2311–2319, <http://dx.doi.org/10.1039/C9AY00281B>.
- [78] Y. Rozhkova, A. A. Gurinov, P. M. Tolstoy, G. S. Denisov, I. G. Shenderovich, V. I. Korotkov, „Acridine – a Promising Fluorescence Probe of Non-Covalent Molecular Interactions”, *Z. fur Phys. Chem.* **2013**, *227*, 857–868, <https://doi.org/10.1524/zpch.2013.0390>.

- [79] A. Iglesias-Reguant, J. Zielak-Milewska, T. Misiaszek, R. Zalesny, J. M. Luis, B. Osmiałowski, „Unveiling Halogen-Bonding Interactions between a Pyridine-Functionalized Fluoroborate Dye and Perfluorohaloarenes with Fluorescence Spectroscopy”, *J. Org. Chem.* **2022**, *87*, 15159–15165, <https://doi.org/10.1021/acs.joc.2c01660>.
- [80] A. J. Taylor, R. Hein, S. C. Patrick, J. J. Davis, P. D. Beer, „Anion Sensing through Redox-Modulated Fluorescent Halogen Bonding and Hydrogen Bonding Hosts”, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2024**, *63*, e202315959, <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/anie.202315959>.
- [81] N. J. Hestand, F. C. Spano, „Photophysics of Molecular Aggregates Beyond the Kasha Model: New Design Principles for Organic Materials”, *Acc. Chem. Res.* **2016**, *49*, 465–474.
- [82] J. Mei, N. L. C. Leung, R. T. K. Kwok, J. W. Y. Lam, B. Z. Tang, „Aggregation-Induced Emission: Together We Shine, United We Soar!”, *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 11718–11940.
- [83] E. E. Jelley, „Spectral Absorption and Fluorescence of Dyes in the Molecular State”, *Nature* **1936**, *138*, 1009–1010, <https://doi.org/10.1038/1381009a0>.
- [84] P. Rybczynski, A. Kaczmarek-Kędziera, „BODIPY Dimers: Structure, Interaction, and Absorption Spectrum”, *Struct. Chem.* **2021**, *32*, 953–965, <https://doi.org/10.1007/s11224-021-01759-1>.
- [85] X. Chang, M. Balooch Qarai, F. C. Spano, „Intermolecular Charge Transfer in H- and J-Aggregates of Donor–Acceptor–Donor Chromophores: The Curious Case of Bithiophene-DPP”, *J. Phys. Chem. C* **2022**, *126*, 18784–18795, <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.2c05910>.
- [86] Z. Peng, Y. Ji, Z. Huang, B. Tong, J. Shi, Y. Dong, „A Strategy for the Molecular Design of Aggregation-Induced Emission Units Further Modified by Substituents”, *Mater. Chem. Front.* **2018**, *2*, 1175–1183, <http://dx.doi.org/10.1039/C8QM00096D>.
- [87] J. V. Jun, D. M. Chenoweth, E. J. Petersson, „Rational Design of Small Molecule Fluorescent Probes for Biological Applications”, *Org. Biomol. Chem.* **2020**, *18*, 5747–5763, <http://dx.doi.org/10.1039/D00B01131B>.
- [88] T. Terai, T. Nagano, „Small-molecule Fluorophores and Fluorescent Probes for Bioimaging”, *Pflg. Arch. Eur. J. Phy.* **2013**, *465*, 347–359, <https://doi.org/10.1007/s00424-013-1234-z>.
- [89] L. D. Lavis, R. T. Raines, „Bright Building Blocks for Chemical Biology”, *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9*, 855–866, <https://doi.org/10.1021/cb500078u>.
- [90] L. D. Lavis, R. T. Raines, „Bright Ideas for Chemical Biology”, *ACS Chem. Biol.* **2008**, *3*, 142–155, <https://doi.org/10.1021/cb700248m>.
- [91] K. Li, S. Xu, M. Xiong, S.-Y. Huan, L. Yuan, X.-B. Zhang, „Molecular Engineering of Organic-Based Agents for in situ Bioimaging and Phototherapeutics”, *Chem. Soc. Rev.* **2021**, *50*, 11766–11784, <http://dx.doi.org/10.1039/D1CS00408E>.

- [92] D. Liu, J. De, H. Gao, S. Ma, Q. Ou, S. Li, Z. Qin, H. Dong, Q. Liao, B. Xu, Q. Peng, Z. Shuai, W. Tian, H. Fu, X. Zhang, Y. Zhen, W. Hu, „Organic Laser Molecule with High Mobility, High Photoluminescence Quantum Yield, and Deep-Blue Lasing Characteristics”, *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142*, 6332–6339, <https://doi.org/10.1021/jacs.0c00871>.
- [93] I. D. W. Samuel, G. A. Turnbull, „Organic Semiconductor Lasers”, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 1272–1295, <https://doi.org/10.1021/cr050152i>.
- [94] A. J. C. Kuehne, M. C. Gather, „Organic Lasers: Recent Developments on Materials, Device Geometries, and Fabrication Techniques”, *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 12823–12864, <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00172>.
- [95] H.-H. Fang, J. Yang, J. Feng, T. Yamao, S. Hotta, H.-B. Sun, „Functional Organic Single Crystals for Solid-State Laser Applications”, *Laser & Photonics Rev.* **2014**, *8*, 687–715, <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/lpor.201300222>.
- [96] Y. Liu, C. Li, Z. Ren, S. Yan, M. R. Bryce, „All-Organic Thermally Activated Delayed Fluorescence Materials for Organic Light-Emitting Diodes”, *Nature Rev. Mater.* **2018**, *3*, DOI 10.1038/natrevmats.2018.20.
- [97] Y.-Z. Shi, H. Wu, K. Wang, J. Yu, X.-M. Ou, X.-H. Zhang, „Recent Progress in Thermally Activated Delayed Fluorescence Emitters for Nondoped Organic Light-Emitting Diodes”, *Chem. Sci.* **2022**, *13*, 3625–3651, <http://dx.doi.org/10.1039/D1SC07180G>.
- [98] M. Y. Wong, E. Zysman-Colman, „Purely Organic Thermally Activated Delayed Fluorescence Materials for Organic Light-Emitting Diodes”, *Adv. Mater.* **2017**, *29*, 1605444, <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/adma.201605444>.
- [99] T. Zhang, Y. Xiao, H. Wang, S. Kong, R. Huang, V. Ka-Man Au, T. Yu, W. Huang, „Highly Twisted Thermally Activated Delayed Fluorescence (TADF) Molecules and Their Applications in Organic Light-Emitting Diodes (OLEDs)”, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2023**, *62*, e202301896, <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/anie.202301896>.
- [100] C. Würth, M. Grabolle, J. Pauli, M. Spieles, U. Resch-Genger, „Relative and Absolute Determination of Fluorescence Quantum Yields of Transparent Samples”, *Nat. Protoc.* **2013**, *8*, 1535–1550.
- [101] A. M. Brouwer, „Standards for Photoluminescence Quantum Yield Measurements in Solution (IUPAC Technical Report)”, *Pure Appl. Chem.* **2011**, *83*, 2213–2228, <https://doi.org/10.1351/PAC-REP-10-09-31>.
- [102] X.-y. Sun, T. Liu, J. Sun, X.-j. Wang, „Synthesis and Application of Coumarin Fluorescence Probes”, *RSC Adv.* **2020**, *10*, 10826–10847, <http://dx.doi.org/10.1039/C9RA10290F>.
- [103] G. Tian, Z. Zhang, H. Li, D. Li, X. Wang, C. Qin, „Design, Synthesis and Application in Analytical Chemistry of Photo-Sensitive Probes Based on Coumarin”, *Crit. Rev. Anal. Chem.* **2021**, *51*, 565–581, <https://doi.org/10.1080/10408347.2020.1753163>.

- [104] D. Cao, Z. Liu, P. Verwilt, S. Koo, P. Jangjili, J. S. Kim, W. Lin, „Coumarin-Based Small-Molecule Fluorescent Chemosensors”, *Chem. Rev.* **2019**, *119*, 10403–10519.
- [105] Pooja, H. Pandey, S. Aggarwal, M. Vats, V. Rawat, S. R. Pathak, „Coumarin-Based Chemosensors for Metal Ions Detection”, *Asian. J. Org. Chem.* **2022**, *11*, e202200455, <https://aces.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ajoc.202200455>.
- [106] H. Meier, „The Photochemistry of Stilbenoid Compounds and Their Role in Materials Technology”, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1992**, *31*, 1399–1420, <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/anie.199213993>.
- [107] F. Xu, J. Sheng, C. N. Stindt, S. Crespi, W. Danowski, M. F. Hilbers, W. J. Buma, B. L. Feringa, „All-Visible-Light-Driven Stiff-Stilbene Photoswitches”, *Chem. Sci.* **2024**, *15*, 6763–6769, <http://dx.doi.org/10.1039/D4SC00983E>.
- [108] Z. L. Pianowski, „Recent Implementations of Molecular Photoswitches into Smart Materials and Biological Systems”, *Chem. Eur. J.* **2019**, *25*, 5128–5144, <https://chemistry-europe.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/chem.201805814>.
- [109] S. Mahata, S. Kumar, S. Dey, B. B. Mandal, V. Manivannan, „A Probe with Hydrazinecarbothioamide and 1,8-Naphthalimide Groups for “Turn-On” Fluorescence Detection of Hg²⁺ and Ag⁺ Ions and Live-Cell Imaging Studies”, *Inorg. Chim. Acta.* **2022**, *535*, 120876, <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0020169322000883>.
- [110] M. Su, C. Liu, Y. Liang, Y. Zhang, X. Rong, X. Wang, X. Li, K. Wang, H. Zhu, M. Yu, W. Sheng, B. Zhu, „A Novel Water-Soluble Naphthalimide-Based Turn-On Fluorescent Probe for Mercury Ion Detection in Living Cells and Zebrafish”, *New J. Chem.* **2022**, *46*, 10951–10956, <http://dx.doi.org/10.1039/D2NJ01314B>.
- [111] H. Yu, Y. Guo, W. Zhu, K. Havener, X. Zheng, „Recent Advances in 1,8-Naphthalimide-Based Small-Molecule Fluorescent Probes for Organelles Imaging and Tracking in Living Cells”, *Coord. Chem. Rev.* **2021**, *444*, 214019, <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0010854521002939>.
- [112] X. Shen, T. Zhou, Z. Sun, Y. Zheng, B. Lin, Y. Huang, „Trends in Application of Fundus Fluorescein Angiography in Fundus Diseases During a Recent Ten-Year Period”, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **2024**, *46*, 104029, <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1572100024000681>.
- [113] M. Okada, T. F. C. Heeren, P. J. Mulholland, P. M. Maloca, M. Cilkova, V. Rocco, M. Fruttiger, C. A. Egan, R. S. Anderson, A. Tufail, „High-Resolution In Vivo Fundus Angiography Using a Nonadaptive Optics Imaging System”, *Transl. Vision Sci. Technol.* **2019**, *8*, 54.
- [114] S. Zeng, X. Liu, Y. S. Kafuti, H. Kim, J. Wang, X. Peng, H. Li, J. Yoon, „Fluorescent Dyes Based on Rhodamine Derivatives for Bioimaging and Therapeutics: Recent Progress, Challenges, and Prospects”, *Chem. Soc. Rev.* **2023**, *52*, 5607–5651, <http://dx.doi.org/10.1039/D2CS00799A>.

- [115] L. Wang, W. Du, Z. Hu, K. Uvdal, L. Li, W. Huang, „Hybrid Rhodamine Fluorophores in the Visible/NIR Region for Biological Imaging”, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58*, 14026–14043, <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/anie.201901061>.
- [116] G. Ulrich, R. Ziessel, A. Harriman, „The Chemistry of Fluorescent Bodipy Dyes: Versatility Unsurpassed”, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 1184–1201, <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/anie.200702070>.
- [117] A. Loudet, K. Burgess, „BODIPY Dyes and Their Derivatives: Syntheses and Spectroscopic Properties”, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 4891–4932, <https://doi.org/10.1021/cr078381n>.
- [118] T. Kowada, H. Maeda, K. Kikuchi, „BODIPY-Based Probes for the Fluorescence Imaging of Biomolecules in Living Cells”, *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 4953–4972, <http://dx.doi.org/10.1039/C5CS00030K>.
- [119] K. Zlatic, M. Cindric, I. Antol, L. Uzelac, B. Mihaljevic, M. Kralj, N. Basaric, „Wavelength Dependent Photochemistry of BODIPY–Phenols and their Applications in the Fluorescent Labeling of Proteins”, *Org. Biomol. Chem.* **2021**, *19*, 4891–4903, <http://dx.doi.org/10.1039/D1OB00278C>.
- [120] S. Adhikari, J. Moscatelli, E. M. Smith, C. Banerjee, E. M. Puchner, „Single-Molecule Localization Microscopy and Tracking with Red-Shifted States of Conventional BODIPY Conjugates in Living Cells”, *Nature Commun.* **2019**, *10*, 3400, <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11384-6>.
- [121] D. Dziuba, R. Pohl, M. Hocek, „Bodipy-Labeled Nucleoside Triphosphates for Polymerase Synthesis of Fluorescent DNA”, *Bioconj. Chem.* **2014**, *25*, 1984–1995, <https://doi.org/10.1021/bc5003554>.
- [122] Z. Shi, X. Han, W. Hu, H. Bai, B. Peng, L. Ji, Q. Fan, L. Li, W. Huang, „Bioapplications of Small Molecule Aza-BODIPY: From Rational Structural Design to in vivo Investigations”, *Chem. Soc. Rev.* **2020**, *49*, 7533–7567, <http://dx.doi.org/10.1039/D0CS00234H>.
- [123] M. Kaur, A. Janaagal, N. Balsukuri, I. Gupta, „Evolution of Aza-BODIPY Dyes-A Hot Topic”, *Coord. Chem. Rev.* **2024**, *498*, 215428, <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0010854523004174>.
- [124] C. Schäfer, J. Mony, T. Olsson, K. Börjesson, „Effect of the Aza-N-Bridge and Push–Pull Moieties: A Comparative Study between BODIPYs and Aza-BODIPYs”, *J. Org. Chem.* **2022**, *87*, 2569–2579, <https://doi.org/10.1021/acs.joc.1c02525>.
- [125] D. Pinjari, Y. Patil, R. Misra, „Near-Infrared Absorbing Aza-BODIPY Dyes for Optoelectronic Applications”, *Chem. Asian J.* **2024**, *19*, e202400167, <https://aces.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/asia.202400167>.
- [126] Z. Mao, J. H. Kim, J. Lee, H. Xiong, F. Zhang, J. S. Kim, „Engineering of BODIPY-Based Theranostics for Cancer Therapy”, *Coord. Chem. Rev.* **2023**, *476*, 214908, <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0010854522005033>.

- [127] J. Zhang, W. Wang, J. Shao, J. Chen, X. Dong, „Small Molecular Cyanine Dyes for Phototheranostics”, *Coord. Chem. Rev.* **2024**, *516*, 215986, <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0010854524003321>.
- [128] A. Mishra, R. K. Behera, P. K. Behera, B. K. Mishra, G. B. Behera, „Cyanines During the 1990s: A Review”, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 1973–2012, <https://doi.org/10.1021/cr990402t>.
- [129] J. T. Alander, I. Kaartinen, A. Laakso, T. Patila, T. Spillmann, V. V. Tuchin, M. Venermo, P. Välisuo, „A Review of Indocyanine Green Fluorescent Imaging in Surgery”, *Int. J. Biomed. Imaging* **2012**, *2012*, 940585, <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1155/2012/940585>.
- [130] Y. Wang, Q. Chen, W. Yang, Z. Ji, L. Jin, X. Ma, Q. Song, A. Boltasseva, J. Han, V. M. ShalaeV, S. Xiao, „High-Efficiency Broadband Achromatic Metalens for Near-IR Biological Imaging Window”, *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 5560, <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25797-9>.
- [131] M. Pawlicki, H. A. Collins, R. G. Denning, H. L. Anderson, „Two-Photon Absorption and the Design of Two-Photon Dyes”, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 3244–3266, <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/anie.200805257>.
- [132] L. Xu, J. Zhang, L. Yin, X. Long, W. Zhang, Q. Zhang, „Recent Progress in Efficient Organic Two-Photon Dyes for Fluorescence Imaging and Photodynamic Therapy”, *J. Mater. Chem. C* **2020**, *8*, 6342–6349, <http://dx.doi.org/10.1039/D0TC000563K>.
- [133] P. Luu, S. E. Fraser, F. Schneider, „More Than Double the Fun with Two-Photon Excitation Microscopy”, *Commun. Biol.* **2024**, *7*, 364, <https://doi.org/10.1038/s42003-024-06057-0>.
- [134] J. Shaya, P. R. Corridon, B. Al-Omari, A. Aoudi, A. Shunnar, M. I. H. Mohideen, A. Qurashi, B. Y. Michel, A. Burger, „Design, Photophysical Properties, and Applications of Fluorene-Based Fluorophores in Two-Photon Fluorescence Bioimaging: A Review”, *J. Photochem. Photobiol. C: Photochem. Rev.* **2022**, *52*, 100529, <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S138955672200048X>.
- [135] A. Kawski, B. Kukliński, P. Bojarski, „Excited S1 State Dipole Moments of Nitrobenzene and p-Nitroaniline from Thermochromic Effect on Electronic Absorption Spectra”, *Chem. Phys.* **2006**, *330*, 307–312, <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301010406004885>.
- [136] Z. R. Grabowski, K. Rotkiewicz, W. Rettig, „Structural Changes Accompanying Intramolecular Electron Transfer: Focus on Twisted Intramolecular Charge-Transfer States and Structures”, *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 3899–4032, <https://doi.org/10.1021/cr9407451>.
- [137] K. Rotkiewicz, K. Grellmann, Z. Grabowski, „Reinterpretation of the Anomalous Fluorescence of p-n,n-dimethylamino-benzonitrile”, *Chem. Phys. Lett.* **1973**, *19*, 315–318, <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0009261473803677>.

- [138] M. A. Kochman, B. Durbeej, A. Kubas, „Simulation and Analysis of the Transient Absorption Spectrum of 4-(N,N-Dimethylamino)benzonitrile (DMABN) in Acetonitrile”, *J. Phys. Chem. A* **2021**, *125*, 8635–8648, <https://doi.org/10.1021/acs.jpca.1c06166>.
- [139] J. Dreyer, A. Kummrow, „Shedding Light on Excited-State Structures by Theoretical Analysis of Femtosecond Transient Infrared Spectra: Intramolecular Charge Transfer in 4-(Dimethylamino)benzonitrile”, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 2577–2585, <https://doi.org/10.1021/ja992095e>.
- [140] S. Sasaki, G. P. C. Drummen, G.-i. Konishi, „Recent Advances in Twisted Intramolecular Charge Transfer (TICT) Fluorescence and Related Phenomena in Materials Chemistry”, *J. Mater. Chem. C* **2016**, *4*, 2731–2743, <http://dx.doi.org/10.1039/C5TC03933A>.
- [141] C. Wang, W. Chi, Q. Qiao, D. Tan, Z. Xu, X. Liu, „Twisted Intramolecular Charge Transfer (TICT) and Twists Beyond TICT: From Mechanisms to Rational Designs of Bright and Sensitive Fluorophores”, *Chem. Soc. Rev.* **2021**, *50*, 12656–12678, <http://dx.doi.org/10.1039/D1CS00239B>.
- [142] I. Saridakis, M. Riomet, O. J. V. Belleza, G. Coussanes, N. K. Singer, N. Kastner, Y. Xiao, E. Smith, V. Tona, A. de la Torre, E. F. Lopes, P. A. Sánchez-Murcia, L. Gonzalez, H. H. Sitte, N. Maulide, „PyrAtes: Modular Organic Salts with Large Stokes Shifts for Fluorescence Microscopy”, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2024**, *63*, e202318127, <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/anie.202318127>.
- [143] K. Kikuchi, L. D. Adair, J. Lin, E. J. New, A. Kaur, „Photochemical Mechanisms of Fluorophores Employed in Single-Molecule Localization Microscopy”, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2023**, *62*, e202204745, <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/anie.202204745>.
- [144] Y. Zheng, Z. Ye, X. Zhang, Y. Xiao, „Recruiting Rate Determines the Blinking Propensity of Rhodamine Fluorophores for Super-Resolution Imaging”, *J. Am. Chem. Soc.* **2023**, *145*, 5125–5133, <https://doi.org/10.1021/jacs.2c11395>.
- [145] R. Lincoln, M. L. Bossi, M. Rimmel, E. D’Este, A. N. Butkevich, S. W. Hell, „A General Design of Caging-Group-Free Photoactivatable Fluorophores for Live-Cell Nanoscopy”, *Nature Chem.* **2022**, *14*, 1013–1020.
- [146] I. A. Thompson, J. Saunders, L. Zheng, A. A. Hariri, N. Maganzini, A. P. Cartwright, J. Pan, S. Yee, C. Dory, M. Eisenstein, J. Vuckovic, H. T. Soh, „An Antibody-Based Molecular Switch for Continuous Small-Molecule Biosensing”, *Sci. Adv.* **2023**, *9*, eadh4978, <https://www.science.org/doi/abs/10.1126/sciadv.adh4978>.
- [147] F. P. Schwarz, S. P. Wasik, „Fluorescence Measurements of Benzene, Naphthalene, Anthracene, Pyrene, Fluoranthene, and Benzo[e]Pyrene in Water”, *Anal. Chem.* **1976**, *48*, 524–528, <https://doi.org/10.1021/ac60367a046>.
- [148] J. Wang, N. Boens, L. Jiao, E. Hao, „Aromatic [b]-Fused BODIPY Dyes as Promising Near-Infrared Dyes”, *Org. Biomol. Chem.* **2020**, *18*, 4135–4156, <http://dx.doi.org/10.1039/D00B00790K>.

- [149] M. Kollmannsberger, K. Rurack, U. Resch-Genger, J. Daub, „Ultrafast Charge Transfer in Amino-Substituted Boron Dipyrromethene Dyes and Its Inhibition by Cation Complexation: A New Design Concept for Highly Sensitive Fluorescent Probes”, *J. Phys. Chem. A* **1998**, *102*, 10211–10220, <https://doi.org/10.1021/jp982701c>.
- [150] Z. Shen, H. Röhr, K. Rurack, H. Uno, M. Spieles, B. Schulz, G. Reck, N. Ono, „Boron–Diindomethene (BDI) Dyes and Their Tetrahydrobicyclo Precursors—en Route to a New Class of Highly Emissive Fluorophores for the Red Spectral Range”, *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 4853–4871, <https://chemistry-europe.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/chem.200400173>.
- [151] N. Xu, Y. Xiao, Z. Ni, L. Gai, Z. Zhou, H. Lu, „Rationalizing The Effect of Benzo-Fusion at [a] and [b] Positions of BODIPY on Fluorescence Yields”, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2021**, *23*, 17402–17407, <http://dx.doi.org/10.1039/D1CP03160K>.
- [152] M. A. Potopnyk, R. Lytvyn, Y. Danyliv, M. Ceborska, O. Bezvikonnyi, D. Volyniuk, J. V. Gražulevičius, „N,O π -Conjugated 4-Substituted 1,3-Thiazole BF₂ Complexes: Synthesis and Photophysical Properties”, *J. Org. Chem.* **2018**, *83*, 1095–1105, <https://doi.org/10.1021/acs.joc.7b02239>.
- [153] M. A. Potopnyk, D. Volyniuk, M. Ceborska, P. Cmoch, I. Hladka, Y. Danyliv, J. V. Gražulevičius, „Benzo[4,5]thiazolo[3,2-c][1,3,5,2]oxadiazaborinines: Synthesis, Structural, and Photophysical Properties”, *J. Org. Chem.* **2018**, *83*, 12129–12142, <https://doi.org/10.1021/acs.joc.8b02098>.
- [154] A. M. Grabarz, B. Jędrzejewska, A. Zakrzewska, R. Zalesny, A. D. Laurent, D. Jacquemin, B. Ośmiałowski, „Photophysical Properties of Phenacylphenantridine Difluoroboranyls: Effect of Substituent and Double Benzannulation”, *J. Org. Chem.* **2017**, *82*, 1529–1537, <https://doi.org/10.1021/acs.joc.6b02732>.
- [155] H. Kuhn, „A Quantum-Mechanical Theory of Light Absorption of Organic Dyes and Similar Compounds”, *J. Chem. Phys.* **1949**, *17*, 1198–1212.
- [156] C. S. Abeywickrama, „Large Stokes Shift Benzothiazolium Cyanine Dyes with Improved Intramolecular Charge Transfer (ICT) for Cell Imaging Applications”, *Chem. Commun.* **2022**, *58*, 9855–9869, <http://dx.doi.org/10.1039/D2CC03880C>.
- [157] A. P. Demchenko, *Advanced Fluorescence Reporters in Chemistry and Biology I: Fundamentals and Molecular Design*, Springer Science & Business Media, **2010**, s. 390.
- [158] R. C. Benson, H. A. Kues, „Absorption and Fluorescence Properties of Cyanine Dyes”, *J. Chem. Engin. Data* **1977**, *22*, 379–383, <https://doi.org/10.1021/je60075a020>.
- [159] S. Ye, H. Zhang, J. Fei, C. H. Wolstenholme, X. Zhang, „A General Strategy to Control Viscosity Sensitivity of Molecular Rotor-Based Fluorophores”, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60*, 1339–1346, <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/anie.202011108>.

- [160] A. M. Grabarz, A. D. Laurent, B. Jędrzejewska, A. Zakrzewska, D. Jacquemin, B. Ośmiałowski, „The Influence of the π -Conjugated Spacer on Photophysical Properties of Difluoroboranyls Derived from Amides Carrying a Donor Group”, *J. Org. Chem.* **2016**, *81*, 2280–2292, <https://doi.org/10.1021/acs.joc.5b02691>.
- [161] Y. M. Poronik, G. V. Baryshnikov, I. Deperasińska, E. M. Espinoza, J. A. Clark, H. Ågren, D. T. Gryko, V. I. Vullev, „Deciphering the Unusual Fluorescence in Weakly Coupled bis-nitro-pyrrolo[3,2-b]pyrroles”, *Commun. Chem.* **2020**, *3*, DOI 10.1038/s42004-020-00434-6, <https://doi.org/10.1038/s42004-020-00434-6>.
- [162] L. P. Hammett, „The Effect of Structure upon the Reactions of Organic Compounds. Benzene Derivatives”, *J. Am. Chem. Soc.* **1937**, *59*, 96–103, <https://doi.org/10.1021/ja01280a022>.
- [163] A. Zakrzewska, R. Zaleśny, E. Kolehmainen, B. Ośmiałowski, B. Jędrzejewska, H. Ågren, M. Pietrzak, „Substituent Effects on the Photophysical Properties of Fluorescent 2-Benzoylmethylenequinoline Difluoroboranes: A Combined Experimental and Quantum Chemical Study”, *Dyes Pigm.* **2013**, *99*, 957–965, <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0143720813003008>.
- [164] K. Namba, A. Osawa, S. Ishizaka, N. Kitamura, K. Tanino, „Direct Synthesis of Fluorescent 1,3a,6a-Triazapentalene Derivatives via Click–Cyclization–Aromatization Cascade Reaction”, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 11466–11469, <https://doi.org/10.1021/ja203917r>.
- [165] A. Aliyan, N. P. Cook, A. A. Martí, „Interrogating Amyloid Aggregates using Fluorescent Probes”, *Chem. Rev.* **2019**, *119*, 11819–11856, <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.9b00404>.
- [166] A. A. Maskevich, V. I. Stsiapura, V. A. Kuzmitsky, I. M. Kuznetsova, O. I. Povarova, V. N. Uversky, K. K. Turoverov, „Spectral Properties of Thioflavin T in Solvents with Different Dielectric Properties and in a Fibril-Incorporated Form”, *J. Prot. Res.* **2007**, *6*, 1392–1401, <https://doi.org/10.1021/pr0605567>.
- [167] M. Zhu, G. Zhang, Z. Hu, C. Zhu, Y. Chen, T. D. James, L. Ma, Z. Wang, „A BODIPY-Based Probe for Amyloid- β Imaging in vivo”, *Org. Chem. Front.* **2023**, *10*, 1903–1909, <http://dx.doi.org/10.1039/D2Q002032G>.
- [168] C. Hansch, A. Leo, R. W. Taft, „A Survey of Hammett Substituent Constants and Resonance and Field Parameters”, *Chem. Rev.* **1991**, *91*, 165–195, <https://doi.org/10.1021/cr00002a004>.
- [169] W. Li, L. Li, H. Xiao, R. Qi, Y. Huang, Z. Xie, X. Jing, H. Zhang, „Iodo-BODIPY: a Visible-Light-Driven, Highly Efficient and Photostable Metal-Free Organic Photocatalyst”, *RSC Adv.* **2013**, *3*, 13417–13421, <http://dx.doi.org/10.1039/C3RA40932E>.

- [170] P. Xu, Q. Qiu, X. Ye, M. Wei, W. Xi, H. Feng, Z. Qian, „Halogenated Tetraphenylethene with Enhanced Aggregation-Induced Emission: an Anomalous anti-Heavy-Atom Effect and Self-Reversible Mechanochromism”, *Chem. Commun.* **2019**, 55, 14938–14941, <http://dx.doi.org/10.1039/C9CC07045A>.
- [171] R. López-Arteaga, A. B. Stephansen, C. A. Guarín, T. I. Sølling, J. Peon, „The Influence of Push–Pull States on the Ultrafast Intersystem Crossing in Nitroaromatics”, *J. Phys. Chem. B* **2013**, 117, 9947–9955, <https://doi.org/10.1021/jp403602v>.
- [172] P. Rybczyński, M. H. E. Bousquet, A. Kaczmarek-Kędziera, B. Jędrzejewska, D. Jacquemin, B. Ośmiałowski, „Controlling the Fluorescence Quantum Yields of Benzothiazole-Difluoroborates by Optimal Substitution”, *Chem. Sci.* **2022**, 13, 13347–13360, <http://dx.doi.org/10.1039/D2SC05044G>.
- [173] A. Hajda, M. Grelich-Mucha, P. Rybczyński, B. Ośmiałowski, R. Zalesny, J. Olesiak-Bańska, „BF₂-Functionalized Benzothiazole Amyloid Markers: Effect of Donor Substituents on One- and Two-Photon Properties”, *ACS Appl. Bio-Mater.* **2023**, 6, 5676–5684, <https://doi.org/10.1021/acsabm.3c00815>.
- [174] B. Jędrzejewska, A. Skotnicka, A. D. Laurent, M. Pietrzak, D. Jacquemin, B. Ośmiałowski, „Influence of the Nature of the Amino Group in Highly Fluorescent Difluoroborates Exhibiting Intramolecular Charge Transfer”, *J. Org. Chem.* **2018**, 83, 7779–7788, <https://doi.org/10.1021/acs.joc.8b00664>.
- [175] X. Lv, C. Gao, T. Han, H. Shi, W. Guo, „Improving the Quantum Yields of Fluorophores by Inhibiting Twisted Intramolecular Charge Transfer Using Electron-Withdrawing Group-Functionalized Piperidine Auxochromes”, *Chem. Commun.* **2020**, 56, 715–718, <http://dx.doi.org/10.1039/C9CC09138F>.
- [176] W. Qin, M. Baruah, M. Van der Auweraer, F. C. De Schryver, N. Boens, „Photophysical Properties of Borondipyrrromethene Analogues in Solution”, *J. Phys. Chem. A* **2005**, 109, 7371–7384, <https://doi.org/10.1021/jp052626n>.
- [177] T. Matulaitis, P. L. dos Santos, Y. Tsuchiya, D. B. Cordes, A. M. Z. Slawin, C. Adachi, I. D. W. Samuel, E. Zysman-Colman, „Donor Influence on the Optoelectronic Properties of N-Substituted Tetraphenylimidazole Derivatives”, *Chem. Sel.* **2023**, 8, e202300274, <https://chemistry-europe.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/slct.202300274>.
- [178] L.-M. Needham, J. Weber, J. A. Varela, J. W. B. Fyfe, D. T. Do, C. K. Xu, L. Tutton, R. Cliffe, B. Keenlyside, D. Klenerman, C. M. Dobson, C. A. Hunter, K. H. Müller, K. O’Holleran, S. E. Bohndiek, T. N. Snaddon, S. F. Lee, „ThX – a Next-Generation Probe for the Early Detection of Amyloid Aggregates”, *Chem. Sci.* **2020**, 11, 4578–4583, <http://dx.doi.org/10.1039/C9SC04730A>.
- [179] D. Emin, Y. P. Zhang, E. Lobanova, A. Miller, X. Li, Z. Xia, H. Dakin, D. I. Sideris, J. Y. L. Lam, R. T. Ranasinghe, A. Kouli, Y. Zhao, S. De, T. P. J. Knowles, M. Vendruscolo, F. S. Ruggeri, F. I. Aigbirhio, C. H. Williams-Gray, D. Klenerman, „Small Soluble α -synuclein Aggregates are the Toxic

- Species in Parkinson's Disease", *Nature Commun.* **2022**, *13*, 5512, <https://doi.org/10.1038/s41467-022-33252-6>.
- [180] L.-M. Needham, J. Weber, C. M. Pearson, D. T. Do, F. Gorka, G. Lyu, S. E. Bohndiek, T. N. Snaddon, S. F. Lee, „A Comparative Photophysical Study of Structural Modifications of Thioflavin T-Inspired Fluorophores”, *J. Phys. Chem. Lett.* **2020**, *11*, 8406–8416, <https://doi.org/10.1021/acs.jpcclett.0c01549>.
- [181] H. Wang, Q. Li, P. Alam, H. Bai, V. Bhalla, M. R. Bryce, M. Cao, C. Chen, S. Chen, X. Chen, Y. Chen, Z. Chen, D. Dang, D. Ding, S. Ding, Y. Duo, M. Gao, W. He, X. He, X. Hong, Y. Hong, J.-J. Hu, R. Hu, X. Huang, T. D. James, X. Jiang, G.-i. Konishi, R. T. K. Kwok, J. W. Y. Lam, C. Li, H. Li, K. Li, N. Li, W.-J. Li, Y. Li, X.-J. Liang, Y. Liang, B. Liu, G. Liu, X. Liu, X. Lou, X.-Y. Lou, L. Luo, P. R. McGonigal, Z.-W. Mao, G. Niu, T. C. Owyong, A. Pucci, J. Qian, A. Qin, Z. Qiu, A. L. Rogach, B. Situ, K. Tanaka, Y. Tang, B. Wang, D. Wang, J. Wang, W. Wang, W.-X. Wang, W.-J. Wang, X. Wang, Y.-F. Wang, S. Wu, Y. Wu, Y. Xiong, R. Xu, C. Yan, S. Yan, H.-B. Yang, L.-L. Yang, M. Yang, Y.-W. Yang, J. Yoon, S.-Q. Zang, J. Zhang, P. Zhang, T. Zhang, X. Zhang, X. Zhang, N. Zhao, Z. Zhao, J. Zheng, L. Zheng, Z. Zheng, M.-Q. Zhu, W.-H. Zhu, H. Zou, B. Z. Tang, „Aggregation-Induced Emission (AIE), Life and Health”, *ACS Nano* **2023**, *17*, 14347–14405, <https://doi.org/10.1021/acsnano.3c03925>.
- [182] J. Ochi, K. Tanaka, Y. Chujo, „Recent Progress in the Development of Solid-State Luminescent o-Carboranes with Stimuli Responsivity”, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59*, 9841–9855, <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/anie.201916666>.
- [183] Y. Hong, L. Meng, S. Chen, C. W. T. Leung, L.-T. Da, M. Faisal, D.-A. Silva, J. Liu, J. W. Y. Lam, X. Huang, B. Z. Tang, „Monitoring and Inhibition of Insulin Fibrillation by a Small Organic Fluorogen with Aggregation-Induced Emission Characteristics”, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 1680–1689, <https://doi.org/10.1021/ja208720a>.
- [184] C. W. T. Leung, F. Guo, Y. Hong, E. Zhao, R. T. K. Kwok, N. L. C. Leung, S. Chen, N. N. Vaikath, O. M. El-Agnaf, Y. Tang, W.-P. Gai, B. Z. Tang, „Detection of Oligomers and Fibrils of α -synuclein by AIEgen with Strong Fluorescence”, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 1866–1869, <http://dx.doi.org/10.1039/C4CC07911F>.
- [185] W. Yang, Y. Wong, O. T. W. Ng, L.-P. Bai, D. W. J. Kwong, Y. Ke, Z.-H. Jiang, H.-W. Li, K. K. L. Yung, M. S. Wong, „Inhibition of Beta-Amyloid Peptide Aggregation by Multifunctional Carbazole-Based Fluorophores”, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 1804–1810, <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/anie.201104150>.
- [186] C. Reichardt, „Solvatochromic Dyes as Solvent Polarity Indicators”, *Chem. Rev.* **1994**, *94*, 2319–2358, <https://doi.org/10.1021/cr00032a005>.

- [187] W. Wan, L. Zeng, W. Jin, X. Chen, D. Shen, Y. Huang, M. Wang, Y. Bai, H. Lyu, X. Dong, Z. Gao, L. Wang, X. Liu, Y. Liu, „A Solvatochromic Fluorescent Probe Reveals Polarity Heterogeneity upon Protein Aggregation in Cells”, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60*, 25865–25871, <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/anie.202107943>.
- [188] A. S. Klymchenko, „Solvatochromic and Fluorogenic Dyes as Environment-Sensitive Probes: Design and Biological Applications”, *Acc. Chem. Res.* **2017**, *50*, 366–375, <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.6b00517>.
- [189] F. Fueyo-González, J. A. González-Vera, I. Alkorta, L. Infantes, M. L. Jimeno, P. Aranda, D. Acuña Castroviejo, A. Ruiz-Arias, A. Orte, R. Herranz, „Environment-Sensitive Probes for Illuminating Amyloid Aggregation In Vitro and in Zebrafish”, *ACS Sens.* **2020**, *5*, 2792–2799, <https://doi.org/10.1021/acssensors.0c00587>.
- [190] T. Tanaka, A. Matsumoto, A. S. Klymchenko, E. Tsurumaki, J. Ikenouchi, G.-i. Konishi, „Fluorescent Solvatochromic Probes for Long-Term Imaging of Lipid Order in Living Cells”, *Adv. Sci.* **2024**, *11*, 2309721, <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/advs.202309721>.
- [191] F. Peccati, J. Hernando, L. Blancafort, X. Solans-Monfort, M. Sodupe, „Disaggregation-Induced Fluorescence Enhancement of NIAD-4 for the Optical Imaging of Amyloid- β Fibrils”, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2015**, *17*, 19718–19725, <http://dx.doi.org/10.1039/C5CP02728D>.