

# Финальный отчёт по проекту «ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЕ СВОЙСТВА ЭНАНТИОМЕРНОЧИСТЫХ, РАЦЕМИЧЕСКИХ И НЕРАЦЕМИЧЕСКИХ СМЕСЕЙ ПРИРОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ ДОПИРОВАННЫХ ИОНАМИ ЛАНТАНОИДОВ — НОВЫЙ ПОДХОД К ХИРАЛЬНОМУ АНАЛИЗУ»

Баронский Марк Германович, Костюков Антон Иванович, Тарасевич Аркадий Викторович

## ВВЕДЕНИЕ

Получение хиральных веществ в энантиомерночистом виде и исследование биологической активности всех оптических изомеров потенциальных лекарственных средств является одним из важнейших требований современной фармакологической промышленности, а также становится всё более весомым и для агрохимического сектора (Reddy&Mehvar, *Chirality in Drug Design and Development*, Marcel Dekker, Inc. **2004**). Для справки можно упомянуть, что на данный момент уже около 70-80% новых лекарственных средств составляют именно хиральные энантиомерночистые субстанции (отчёт компании DIACEL за **2015** г.), а их годовой объем продаж в последние годы исчисляется сотнями миллиардов долларов (Jóźwiak et al., *Drug Stereochemistry: Analytical Methods and Pharmacology*, 3<sup>rd</sup> ed. CRC Press **2006**; Shafaati *Iran. J. Pharm. Res.* **2007**, 6, 73). Среди подходов для получения энантиомерночистых веществ ключевую роль играют каталитические асимметрические реакции с применением (i) комплексов металлов с хиральными лигандами и (ii) хиральных органокатализаторов (см. напр.: Ojima, *Catalytic Asymmetric Synthesis*, 3<sup>rd</sup> ed. Wiley-VCH **2010**; Gruttadauria & Giacalone, *Catalytic Methods in Asymmetric Synthesis. Advanced Materials, Techniques, and Applications*, Wiley-VCH **2011**; Berkessel & Gröger, *Asymmetric Organocatalysis – From Biomimetic Concepts to Applications in Asymmetric Synthesis*, Wiley-VCH **2005**). Одними из наиболее широко используемых органокатализаторов являются природные аминокислоты и их производные.

Так как энантиомеры, как правило, проявляют совершенно различную биологическую активность, хиральный анализ продуктов является принципиальной стадией как при разработке асимметрических методов синтеза, так и на производстве. Классические физико-химические методы хирального анализа энантиомеров включают в себя: (i) оптические и спектральные измерения с помощью поляризованного излучения; (ii) проведения анализа в асимметричной среде или (iii) применение внешних хиральных вспомогательных реагентов (Busch, *Chiral Analysis*, Elsevier **2006**). Так, в случае с оптическими и спектральными методами, анализируется изменение поляризации излучения в зависимости от энантиомерного избытка (вращение плоскости поляризации света, дисперсия оптического вращения, циркулярный дихроизм); а в хроматографии используются хиральные носители; в ЯМР — оптически

активные растворители или хиральные сдвигающие реагенты. Перевод энантиомеров в диастереомерные пары позволяет анализировать их ахиральными физическими методами (хроматография, ЯМР и т.д.).

По различным оценкам, около 90-95% всех рацематов кристаллизуются в форме истинных рацемических соединений, которые обладают физическими свойствами отличающимися от чистых энантиомеров (Jacques et al., *Enantiomers, Racemates and Resolutions*, Krieger **1994**). Среди физических методов, которые позволяют проводить отличие между энантиомерами и истинными рацематами *в твёрдой фазе*, можно упомянуть порошковую дифракцию рентгеновских лучей, ЯМР, инфракрасную (Jacques et al. *ibid.*), Рамановскую (Lima et al. *J. Raman Spectr.* **2010**, 41, 808) и терагерцовую спектроскопию THz-TDS (Yamaguchi et al. *Appl. Phys. Lett.* **2005**, 86, 053903), дифференциальную сканирующую калориметрию (DSC), термogrавиметрию и др. В ряде случаев различие в гомо- и гетерохиральных взаимодействиях между энантиомерами настолько сильны, что это может быть обнаружено не только в твёрдой, но и *в газовой фазе* — масс-спектрометрически (Yang et al. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 17074), *в растворах* — методом ЯМР (Nieminen et al. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, 7, 537; Hui et al. *Pharm. Biochem. Behav.* **1991**, 40, 491) и ахиральной хроматографией, что даже было использовано в препаративных целях (Soloshonok et al. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, 41, 4180).

Отдельно разрабатываются чувствительные и сверхчувствительные методы анализа низкого энантиомерного избытка (меньше или значительно меньше 1% *ee*), такие как: двумерная газовая хроматография GCxGC-ToFMS (Meinert&Meierhenrich *Ang. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 10460); индуцированный циркулярный дихроизм в спиральных полимерах (Nonokawa&Yashima *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 1278); обнаружение «криптохиральности» может быть осуществлено с использованием реакции Соаи, являющейся примером феноменального асимметрического автокатализа (Sato et al. *Ang. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 315; Kawasaki&Soai *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2011**, 84, 879). Среди недавних трендов в области физической сегрегации энантиомера от истинного рацемата интересно отметить применение магнитной левитации (Yang et al. *Chem. Commun.* **2014**, 50, 7548), сублимации (Soloshonok et al. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 12112; Tarasevych et al. *Orig. Life Evol. Biosph.* **2013**, 43, 129; Tarasevych et al. *J. Org. Chem.* **2013**, 78, 10530; Tarasevych et al. *Chem. Comm.* **2015**, 51, 7054), гравитационных полей (Mastai et al. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 2426).

*Таким образом, детальный анализ литературы показал, что способы хирального анализа, основанные на различных физических свойствах энантиомерночистых (гомохиральных) и рацемических (гетерохиральных) образований, до сегодняшнего дня отсутствуют.*

Люминесцентная спектроскопия — один из самых чувствительных физических методов. Предел обнаружительной способности анализируемого соединения достигает не менее  $10^{-12}$  моль/л и вплоть до  $10^{-18}$  моль/л. Возможности использования её для хирального анализа до сих пор были ограничены либо использованием циркулярной-поляризованной люминесценции (CPL), либо флуоресцентно-детектируемым циркулярным дихроизмом (FDCD), как, например, это продемонстрировано в недавних отдельных работах, (Okutani et al. *Inorg. Chem.* **2014**, 53, 5527; Iwamura et al. *Inorg. Chem.* **2012**, 51, 4094; Muller et al. *Chem. Commun.* **2005**, 3615). Энантиомерный избыток (*ee*) в данном случае может быть напрямую связан эллиптичностью возбуждаемого или излучаемого света, что принципиально не отличает данный подход от циркулярного дихроизма.

**ЦЕЛЬ РАБОТЫ:** Разработка простого и эффективного метода хирального анализа, основанного на физических различиях истинного рацемического соединения и чистого энантиомера. Исследование энантиомерночистых, рацемических и нерацемических смесей модельных хиральных соединений — природных  $\alpha$ -аминокислот, методом люминесцентного зондирования ионами переходных металлов, в частности лантаноидами.

#### **ОСНОВНЫЕ ЗАДАЧИ:**

1. Оптическая спектроскопия гомо- и гетерохиральных взаимодействий между энантиомерами индивидуальных  $\alpha$ -аминокислот и смесей допированных ионами редкоземельных элементов. 2. Изучение электронной структуры, локального строения и симметрии окружения лантаноидного зонда в нерацемических смесях индивидуальных хиральных соединений с помощью люминесцентных методов. 3. Выявление зависимости характеристик спектров от энантиомерной чистоты образца. 4. Определение порога чувствительности метода. 5. Сравнение полученных результатов с классическими подходами хирального анализа (хиральная газовая хроматография). 6. Оценка потенциального использования метода для рутинного хиральных анализа и изучения механизмов каталитических асимметрических реакций.

#### **МЕТОДЫ И ПОДХОДЫ:**

Допирование различных гомо- и гетерохиральных смесей  $\alpha$ -аминокислот ионами переходных металлов и последующее изучение их люминесцентных характеристик. Основное внимание уделяется допированию ионами лантаноидов. Предлагаемый метод основан на хорошо известной способности ионов лантаноидов координировать со многими функциональными группами органических соединений, являющихся основаниями Льюиса. Большинство ионов лантаноидов, в силу особенностей электронной структуры, обладают поразительными люминесцентными характеристиками, меняющимися в зависимости от окружения иона (кристал-

лическая решётка, координационное число, тип лигандов, симметрия), что используется в данной работе.

На данном этапе работы осуществлялся подбор пары «4*f*-ион — аминокислота» с выявлением и расшифровкой электронной структуры комплекса за счет эффекта “тяжелого катиона”, определение места и симметрии локализации катиона по электронным переходам. Были проведены люминесцентные исследования различных хиральных форм аланина (L, DL, D, неацемиические смеси), допированных ионами переходных металлов (европия, тербия, гадолиния, лантана, уранила). Проведены предварительные эксперименты с фенилаланином — аминокислотой обладающей собственной люминесценцией. Осуществлены низкотемпературные спектральные исследования, позволяющие на порядок повысить чувствительность метода и визуализировать фосфоресценцию.

Для хирального анализа смесей энантиомеров классическим методом была использована газовая хроматография (GC-FID) на хиральном носителе (диметилполисилоксан-циклодекстрин).

**ОБОРУДОВАНИЕ:** стенд спектроскопических измерений на базе автоматизированного спектрально-вычислительного комплекса UV-vis открытой архитектуры; стандартные спектрофлуориметры Cary Eclipse (Agilent, США); газовый хроматограф Кристалл 5000.2 с масс-спектрометрическим (Thermo ISQ Single Quadrupole MS) и пламенно-ионизационными детектором; капиллярная колонка для хирального анализа (Agilent CP-Chirasil-Dex CB).

### **ПОЛУЧЕННЫЕ НАУЧНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ:**

Для достижения поставленных целей данного проекта нами были сформулированы шесть основных задач (см. раздел «Основные задачи»).

В первую очередь, для решения первой из поставленных задач (п. 1 «Оптическая спектроскопия гомо- и гетерохиральных взаимодействий между энантиомерами индивидуальных α-аминокислот и смесей допированных ионами редкоземельных элементов»), нами проведены люминесцентные исследования различных хиральных форм модельных соединений:

- аланина (Ala) в свободном состоянии (без люминесцентных зондов) и допированного ионами 3*d* элемента – лантана ( $\text{La}^{3+}$ , 3*d*<sup>0</sup>), 4*f* элементов – лютеция ( $\text{Lu}^{3+}$ , 4*f*<sup>14</sup>), гадолиния ( $\text{Gd}^{3+}$ , 4*f*<sup>7</sup>), европия ( $\text{Eu}^{3+}$ , 4*f*<sup>6</sup>), тербия ( $\text{Tb}^{3+}$ , 4*f*<sup>8</sup>) и 5*f* элемента – уранила ( $\text{UO}_2^{2+}$ , электронная структура рассмотрена напр. в работах Fillaux et al. *PhysChemChemPhys* **2010**, 12, 14253; Su et al. *Inorg. Chem.* **2011**, 50, 2082);

– фенилаланина (Phe) в свободном состоянии и допированного ионами 4*f* элемента гадолиния ( $\text{Gd}^{3+}$ , 4*f*<sup>7</sup>).

За время работы над проектом всего было подготовлено порядка 70 образцов. Нами были проведены детальные спектроскопические измерения: измерены и проанализированы спектры собственной фотолюминесценции и фотолюминесценции при допировании выбранными ионами, в том числе, в режимах флуоресценции и фосфоресценции; спектры возбуждения фотолюминесценции; кинетика затухания и времена жизни фотолюминесценции.

Следует обосновать выбор данных ионов в качестве люминесцентных зондов и выбранную нами их рабочую концентрацию, которая в большинстве случаев составляла 0.1 молярных процента. Выбор зонда напрямую зависит от собственного электронного строения аланина и фенилаланина. При этом известно, что аланин имеет максимум поглощения в водных растворах при 275 нм (Kumar et al. *J. Mol. Str.* **2006**, 791, 23), которое относят к его синглетному возбуждённому состоянию  $S_1$ , и сильное поглощение в кристаллическом состоянии начиная с 245 нм и ниже (Lydia Caroline et al. *Mat. Chem. Phys.* **2009**, 114, 490). Данные о положении триплетного возбуждённого состояния аланина, насколько нам известно, в литературе отсутствуют. Соответствующий выбор зонда может ответить на вопрос о положении его триплетного уровня (С. Паркер, *Фотолюминесценция растворов*. МИР - **1972** - 510 с.).

#### ОБОСНОВАНИЕ ВЫБОРА ИОНОВ В КАЧЕСТВЕ ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫХ ЗОНДОВ

В качестве люминесцентных зондов нами в основном были использованы ионы  $4f$  элементов – лантаноидов (Золин&Коренева, *Редкоземельный зонд в химии и биологии*, Наука **1980**; Bünzli&Piguet *Chem. Soc. Rev.* **2005**, 34, 1048; Bünzli&Eliseeva *Chem. Soc. Rev.* **2013**, 4, 1939). Использование в качестве тяжёлых катионов, ионов, относящихся к лантаноидам, является выигрышным по целому ряду причин. В отличие от  $3d$  элементов, электронные переходы ионов лантаноидов очень слабо реагируют на изменения в кристаллическом поле, в частности, в силу того, что  $f-f$  переходы (также, запрещённые по чётности) хорошо экранированы  $s$  и  $p$ -электронами. Наряду с такой защищённостью  $f-f$  переходов, запрет на люминесцентные переходы может быть нарушен, как за счет спин-орбитального взаимодействия с окружением, так и за счет подмешивания к электронному переходу колебательных возмущений. Наличие того и другого, хотя и не является необходимым условием, но существенно влияет на возникновение люминесценции у ионов лантаноидов и её интенсивность не только в диссоциированном состоянии, но и при наличии координации с различными функциональными группами. Примечательным является то, что люминесценция ионов лантаноидов носит «атомный характер», т.е. люминесценция соответствующих катионов в комплексах мало отличается по положению линий свободных ионов, например, находящихся вне кристаллического поля. При этом, в электронных переходах проявляются спектроскопические детали

тонко отражающие особенности формирования связей выбранного иона редкоземельного элемента (РЗЭ) с лигандом. За счет подмешивания состояний  $s$  и  $p$ -электронов,  $f-f$  переходы становятся чувствительны к окружению.

Такое спектроскопическое поведение ионов РЗЭ в качестве зонда является тонким инструментом исследования. С другой стороны, под влиянием асимметрии окружения, ионы лантаноидов поляризуются, что вызывает изменение интенсивности оптических переходов и отражает малейшие вариации в симметрии окружения. **В спектрах излучения ионов лантаноидов, находящихся в centrosymmetric окружении, из  $f-f$  переходов разрешены только магнитно-дипольные, а по мере увеличения асимметрии окружения, в связи с подмешиванием волновых функций электронных конфигураций противоположной чётности, увеличивается вероятность электронно-дипольных переходов.** Соотношение интенсивностей между магнитно-дипольными и электро-дипольными переходами может служить критерием нарушения локальной симметрии (Золин&Коренева, *Редкоземельный зонд в химии и биологии*, Наука 1980).

Наш выбор редкоземельных ионов был сделан с учетом электронного строения аланина и с учетом количества электронов на  $f$ - уровне, наличием резонансного перехода, положением излучательного уровня по отношению к молекулярному триплету, и рядом других параметров. В частности, ионы лантана (III) и лютеция (III) не имеют характерной люминесценции вследствие пустой ( $4f^0$ ) и полностью заполненной ( $4f^{14}$ ) для оболочки  $La^{3+}$  и  $Lu^{3+}$ , соответственно. Однако, их способность к комплексообразованию с функциональными группами органических соединений может способствовать снятию запрета на переход  $T \rightarrow S_0$ , что, как следствие, приводит к выявлению не только флуоресценции, но и фосфоресценции.

В качестве одного из зондов нами был использован ион гадолиния (III), который значительно отличается от других лантаноидов.  $Gd^{3+}$ , занимая промежуточное значение в подгруппе лантаноидов, имеет наполовину заполненную оболочку ( $4f^7$ ). Энергетический зазор, между основным уровнем и ближайшим возбужденным состоянием  $Gd^{3+}$  соответствует люминесцентному переходу в ближней ультрафиолетовой области на длине волны 310-312 нм. В силу того, что основное состояние иона гадолиния соответствует терму  $^8S_{7/2}$ , а нижайшее возбужденное —  $^6P_{7/2}$ , они различаются тем, что два электрона имеют перевернутый спин. Как следствие, этот переход является резонансным. Также, в принципе, могут наблюдаться и другие состояния, лежащие близко к нижайшему излучательному уровню  $^6P_{7/2}$ :  $^6P_{5/2}$  и  $^6P_{3/2}$ . Величина расщепления для основного состояния иона гадолиния при комнатной температуре оставляет не более  $2 \text{ см}^{-1}$ , чем можно пренебречь.

Так же как и  $Gd^{3+}$ , ионы трёхвалентных *европия* и *тербия* имеет долгоживущее возбуждённое состояние. В отличие от иона гадолиния, люминесценция которого может тушиться вследствие передачи возбуждения на более низко расположенные возбуждённые уровни лигандов, у ионов  $Eu^{3+}$  и  $Tb^{3+}$  наблюдается люминесценция в диапазоне  $17000 - 11000 \text{ см}^{-1}$  ( ${}^5D_0 - {}^7F_1$  переходы) и  $21000 - 15000 \text{ см}^{-1}$  ( ${}^5D_4 - {}^7F_1$  переходы), соответственно. У  $Eu^{3+}$  обычно наиболее интенсивны  ${}^5D_0 - {}^7F_{2,4}$  переходы (люминесценция в красной области), а у тербия –  ${}^5D_4 - {}^7F_5$  (зеленая область). В соединениях, координированных с ионами  $Eu^{3+}$ , люминесценцию обуславливают главным образом переходы с  ${}^5D_0$  уровня, что значительно упрощает интерпретацию его спектров. Спектры люминесценции соединений с тербием содержат девять компонент. Вследствие этого  $Eu^{3+}$  являются одним из наиболее удобных люминесцентных зондов. С другой стороны,  $Tb^{3+}$  обладает максимальным квантовым выходом люминесценции (С. Паркер, *Фотолюминесценция растворов*. МИР - 1972 - 510 с.).

Также в качестве зонда нами был испытан ион актиноида — *уранила* ( $UO_2^{2+}$ ), в котором в зависимости от окружения по разному проявляются колебательные (U-O) переходы (Su et al. *Inorg. Chem.* **2011**, 50, 2082).

В силу того, что излучательные уровни трёхвалентных ионов гадолиния, европия и тербия отличаются, то их использование может позволить с высокой вероятностью выявить в молекуле аланина положение триплетного уровня.

### ОЦЕНКА РАССТОЯНИЯ МЕЖДУ ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫМИ ЗОНДАМИ

Известно, что при близких расстояниях между люминесцентными зондами проявляются эффекты тушения люминесценции (менее  $10 \text{ \AA}$  – Декстеровский безызлучательный перенос энергии;  $\sim 50 \text{ \AA}$  – индуктивно-резонансный механизм безызлучательных переходов Фёрстера, Галанина, Свешникова — Ермолаева). Ниже приведена оценка расстояний между ионами в допированных образцах L-аланина при концентрации 0.1% молярн., исходя из предположения, что зонды равномерно распределены в его кристаллической решётке:

Плотность L-Ala  $1.374 \text{ г/см}^3$ . Масса стандартной навески аминокислоты составляла 600 мг.  $[L-Ala] = 89,09318 \text{ г/моль}$ ,  $\nu(Ala) = 6.73452 \text{ ммоль}$ , что составляет  $0.43668 \text{ см}^3$ . 0.1 % моль люминесцентного зонда  $\equiv 6.73452 \text{ мкмоль}$  в  $0.43668 \text{ см}^3 \equiv 15.4220508 \text{ мкмоль/см}^3$ . Умножая это значение на число Авогадро получаем  $9.287 \cdot 10^{18} \text{ частиц/см}^3$ .

Далее, применяя подход статистической термодинамики для оценки среднего расстояния ( $r$ ) между равномерно распределёнными молекулами газа при их известной концентрации ( $n$ ) (Паршин&Зегря *Физика: Статическая термодинамика, лекция 13, стр. 2.*):

$$r = 2(3/4\pi n)^{1/3} \approx 1.24n^{-1/3},$$

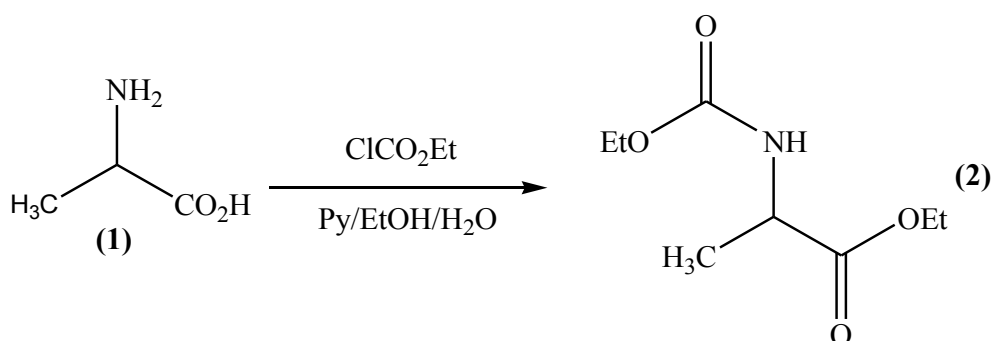
можно рассчитать расстояние между люминесцентными зондами:

$1.24/\sqrt[3]{(9.287 \cdot 10^{18} \text{ частиц/см}^3)} = 1.24 \cdot (4.757 \cdot 10^{-7} \text{ см}) = 1.24 \cdot (4.757 \text{ нм}) \approx 58 \text{ \AA}$ . Таким образом, среднее расстояние между вводимыми ионами в L-аланине составляет около **58 \AA**.

DL-Ala имеет плотность  $1.399 \text{ г/см}^3$  и соответствующее расстояние между зондами составляет **59 \AA**. Для L-Phe ( $M = 165.19 \text{ г/моль}$ ,  $\rho = 1.32 \text{ г/см}^3$ ) и для DL-Phe ( $\rho = 1.32 \text{ г/см}^3$ ) расстояние  $r = 73 \text{ \AA}$ . Итак, можно утверждать, что выбранные концентрации наверняка позволяют избежать Декстеровского концентрационного тушения и с большой вероятностью индуктивно-резонансного взаимодействия между люминесцентными зондами.

### МЕТОДИКА ВВЕДЕНИЯ ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫХ ЗОНДОВ

Образцы L, DL и D аланина перед введением люминесцентных зондов подвергались дополнительной очистке путём сублимации в вакууме масляного насоса ( $< 0.1 \text{ мм рт. ст.}$ ) в стандартном лабораторном сублиматоре с проточным водяным охлаждением. Температура сублимации для всех форм составила около  $170^\circ \text{ C}$ , что в течении  $\sim 15$  часов позволяло сублимировать мультиграммовые количества. Контроль химической (для L, DL и D) и хиральной (для L и D) чистоты осуществлялся по спектрам  $^1\text{H}$  ЯМР в  $\text{D}_2\text{O}$  и методом хиральной газовой хроматографии, соответственно. Для газ-хроматографического анализа требовалась предварительная дериватизация — перевод свободных энантиомеров аланина в более летучие N-этиксикарбонил этиловые эфиры. Для этого аланин вводился в реакцию с этил хлорформиатом в водно-спиртовом растворе в присутствии пиридина (по модифицированной методике, описанной в работе Nušek *J. Chromat.* **1991**, 552, 289; см. **Схема 1**). Оба физических метода показали очень высокую чистоту используемых реактивов. L-Ala не содержал детектируемых количеств D-энантиомера (хиральная чистота  $\sim 100\% ee$ ); тогда как энантиомерная чистота сублимированного D-аланина составила  $99.3\%$  (следовые количества L-энантиомера).



**Схема 1.** Реакция образования летучих производных аланина, пригодных для хирального газ-хроматографического анализа.



Фенилаланин был использован без предварительной очистки.

Стандартную навеску аланина (600 мг, 6.735 ммоль) растворяют при перемешивании на магнитной мешалке и слабом нагреве на водяной бане (40-50°C) в деионизированной воде (~20 мл, очистка системой Millipore, сопротивление ~18 МΩ·см) с добавлением соответствующего объёма водного раствора нитрата вводимого иона ( $v = 6.735$  ммоль при введении 0.1% молярн.; были приготовлены растворы различной концентрации). Полученный раствор упаривают на водоструйном насосе при интенсивном перемешивании на магнитной мешалке и нагреве на водяной бане (~45-55°C). После упаривания до суха, смесь тщательно растирают шпателем и досушивают в вакууме водоструйного (12-15 мм рт. ст.) или масляного (< 0.1 мм рт. ст.) насоса при 80°C в течении 5-10 ч.

Отдельно была проведена серия люминесцентных измерений в водных растворах содержащих аланин и один из люминесцентных зондов, в частности —  $Gd^{3+}$ ,  $Eu^{3+}$  и  $Tb^{3+}$ . При возбуждении люминесценции растворов, содержащих  $Gd^{3+}$  (1.34 ммоль/л; Ala :  $Gd^{3+} = 1000 : 1$ ), на длине волны 270 нм сигнал удалось наблюдать на пределе обнаружительной способности. Увеличение концентрации ионов  $Gd^{3+}$  привело к полному тушению фотолюминесценции. С другой стороны, известно, что, например, присутствие растворённого кислорода также может служить одной из возможных причин приводящих к сильному тушению ФЛ. Облучение растворов аланина, содержащих  $Eu^{3+}$  (1.34 ммоль/л; Ala :  $Eu^{3+} = 1000 : 1$ ), на длине волны 400 нм привело к заметной ФЛ в режиме максимальной чувствительности; однако различия между L и DL формами аланина оказались несущественными. ФЛ ионов  $Tb^{3+}$  в аналогичных условиях оказалась не уровне шумов.

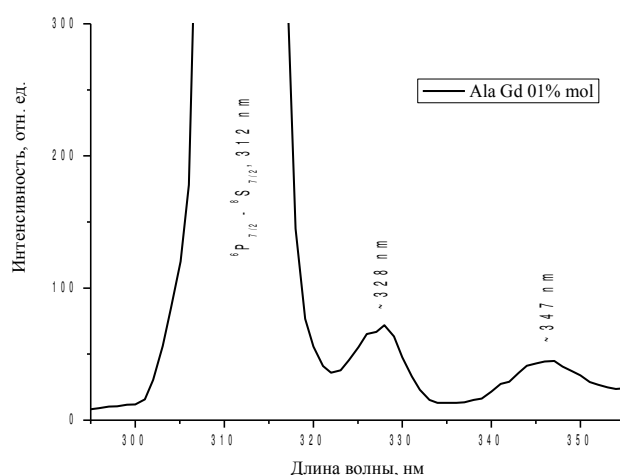
### *ЗОНДИРОВАНИЕ АЛАНИНА ИОНАМИ ГАДОЛИНИЯ (III)*

Система аланин — гадолиний (III) была нами наиболее пристально изучена. Проведены эксперименты по изучению зависимости характеристик фотолюминесценции от концентрации вводимого иона  $Gd^{3+}$ . Серия стандартных образцов (чистые L, D и DL) была приготовлена в одних и тех же условиях по 3-4 раза для выяснения воспроизводимости результатов. Были подготовлены и изучены образцы аланина содержащие 0.01, 0.1, 0.5, 1, 10 % ионов  $Gd^{3+}$  по молям, что соответствует соотношению между аланином и гадолинием: 10000 : 1, 1000 : 1, 200 : 1, 100 : 1 и 10 : 1. Концентрация 0.01%  $Gd^{3+}$  оказалась уже достаточно высокой для надёжной регистрации сигнала люминесценции, тогда как при соотношении между аланином и ионами гадолия 100 к 1 уже наблюдалось концентрационное тушение (при соотношении 10 : 1 сигнал был на уровне шумов). Таким образом, первые предварительные экспе-

рименты с концентрацией  $Gd^{3+}$  0.1% молярн. (1000 : 1) оказались удачным выбором. Эта же концентрация была использована при дальнейшем допировании другими ионами.

Нами были проведены систематические исследования нерацемических смесей аланина в полном диапазоне энантиомерного избытка L-энантиомера от 0 до 100%. В частности, помимо энантиомерночистого L и рацемического DL аланина, были подготовлены нерацемический смеси с энантиомерным избытком 1, 5, 25, 50, 75, 90% L; дополнительно была изучена энантиомерночистая D-форма. Допирование аланина ионами  $Gd^{3+}$  (Ala :  $Gd^{3+}$  1000 : 1) осуществлялось по вышеописанной методике. Нерацемические смеси готовились из энантиомерночистого L и рацемического DL Ala; смесь содержащую 1% избытка L энантиомера готовили взвешиванием на аналитических весах, имеющих точность до 6 знака. Ключевая особенность, которая была нами обнаружена — поразительное отличие интенсивности в спектрах фотолуминесценции (ФЛ) смесей L и DL-Ala допированного ионами гадолиния (III): при возбуждении на длине волны 270 нм. Эта длина волны близка, как собственному поглощению аланина, так и попадает в область поглощения  $Gd^{3+}$ .

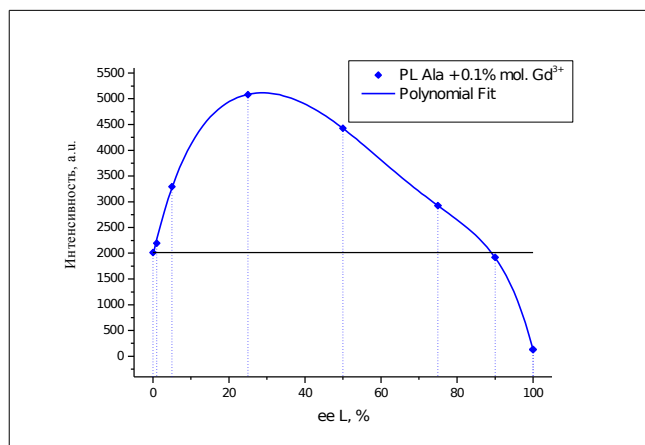
Обе формы, содержащие 0.1 % (в молярном соотношении)  $Gd^{3+}$  наблюдаются полосы ФЛ с максимумами при 306 и 312 нм ( $\sim 32051$   $cm^{-1}$ , наиболее интенсивная полоса), соответствующие переходам электронным переходам  $Gd^{3+} {}^6P_{5/2} \rightarrow {}^8S_{7/2}$  и  ${}^6P_{7/2} \rightarrow {}^8S_{7/2}$ . В длинноволновой части спектра проявляются малоинтенсивные полосы с максимумами при  $\sim 328$  нм ( $\sim 30488$   $cm^{-1}$ ) и  $\sim 347$  нм ( $\sim 28818$   $cm^{-1}$ ), очевидно соответствующие проявлению внутримолекулярных колебательных переходов, с соответствующими частотами  $\sim 1560$   $cm^{-1}$  и  $\sim 3100$   $cm^{-1}$  (Рисунок 1).



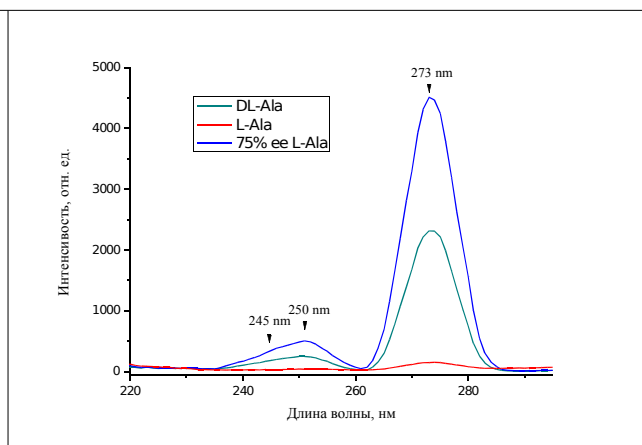
**Рисунок 1.** Спектр ФЛ образца нерацемического аланина (25% ee L), с увеличенной областью колебательных переходов.

Полоса с максимумом 312 нм является симметричной, что свидетельствует, что в аланине отсутствуют неэквивалентные центры  $Gd^{3+}$ . По известным данным (Б.Н. Тарасевич, *ИК спектры основных классов органических соединений*, МГУ, 2012; Boldyreva et al. *J. Struct. Chem.* **2010**, 51, 1052), эти значения соответствуют частотам валентных колебаний  $COO^-$  ( $\nu_{as}$ ) и  $^+NH_3$  ( $\nu_{as}$ )–групп, соответственно. Наличие этих частот в спектрах ФЛ свидетельствует об образовании комплекса с конкретными функциональными группами.

Наиболее примечательным является то, что интенсивность люминесценции DL-Ala оказалась выше в **16 раз**, чем для L-Ala. В соответствии с пунктом 3 поставленных задач данного проекта (см. стр. 3), мы провели аналогичные измерения для нерацемических смесей содержащих 1, 5, 25, 50, 75 и 90% энантиомерного избытка. На **рис. 2а** представлена зависимость интенсивности ФЛ образцов от энантиомерного избытка. Одна из наиболее интересных особенностей зависимости проявляется в наличии максимума интенсивности ФЛ при 20-30% ee. Общие черты графика напоминают перевёрнутые фазовые диаграммы плавления или растворения энантиомеров, образующих истинные рацемические соединения. Также следует обратить внимание и на существенные отличия рацемической DL смеси с нерацемической, содержащей лишь 1% ee L-Ala (2013 и 2196 а.у. для DL и 1% ee L, соответственно), что подразумевает возможность осуществления хирального анализа с низкими значениями энантиомерного избытка.



**Рисунок 2а.** Зависимость интенсивности ФЛ ионов  $Gd^{3+}$  (переход  $^6P_{7/2} \rightarrow ^8S_{7/2}$ ) в зависимости от энантиомерного избытка аланина.



**Рисунок 2б.** Спектры возбуждения ФЛ аланина с различным энантиомерным избытком, содержащих следовые количества ионов  $Gd^{3+}$ .

Существенные отличия между рацематом и энантиомерчистым Ala также были обнаружены нами в спектрах возбуждения ФЛ  $Gd^{3+}$ , где наблюдались широкие полосы с макси-

мурами при значениях 250 и 273 нм, соответствующие переходам  ${}^6D_{9/2} \rightarrow {}^8S_{7/2}$  и  ${}^6I_{7/2} \rightarrow {}^8S_{7/2}$  в  $Gd^{3+}$ . Различие в интенсивностях перехода  ${}^6I_{7/2} \rightarrow {}^8S_{7/2}$  (273 нм) между допированными L, DL и 75% ee L образцами составило: 1 : 15 : 29.5 (рис. 2b).

Действительно, следует отметить, что характер зависимости интенсивности фотолюминесценции ионов гадолиния от энантиомерной чистоты аланина не является биективным, то есть в определённом диапазоне значений ee одной и той же интенсивности ФЛ соответствуют два различных значения ee. Например, интенсивности ФЛ в 3290 а.е. соответствуют значения энантиомерного избытка 5 и 68.5%. Безусловно, на данном этапе исследований этот экспериментальный факт является препятствием для полноценного использования данной методики **в полном диапазоне** энантиомерного избытка. Однако, что касается смесей с заведомо низкими или высокими значениями энантиомерного избытка, проведенные в проекте исследования показали, что предложенный нами фотолюминесцентный метод обладает значительно большей чувствительностью и, следовательно, более высокой надёжностью определения энантиомерного избытка, чем любой из известных методов, включая, например, газовую хроматографию. Так, при газ-хроматографическом анализе смесей энантиомеров на хиральных носителях (наиболее общеупотребительные детекторы в этом случае — пламенно-ионизационный, масс-спектрометрический), в случае очень низких значений энантиомерного избытка (менее 1-2 процентов) наблюдаемые различия в площади пиков энантиомеров (математическая разница) становятся достаточно малы, что бы точность расчёта энантиомерного избытка была соизмерима с погрешностью измерения данным методом. В случае использования метода ФЛ, проведенные исследования показали, что, например, отличия интегральной интенсивности перехода  ${}^6P_{7/2} \rightarrow {}^8S_{7/2}$  рацемической DL смеси от нерацемической, содержащей лишь 1% ee L-Ala, составляют уже ~9%! Данное значение существенно выше погрешности использованного спектрофлуориметра CaryEclipse, которая определяется воспроизводимостью по длинам волн и интенсивности ФЛ сигнала от измерения к измерению. Эти значения составляют 0,1 нм и <1%, соответственно.

С другой стороны, начиная со значений интенсивности ФЛ менее 2000 а.е. (что соответствует значению ee > 89%), интенсивности ФЛ отвечает лишь одно значение энантиомерного избытка. Контроль хиральной чистоты образца D-энантиомера аланина методом газовой хроматографии на хиральном носителе показал наличие примеси L-энантиомера 0.35% (что соответствует 99.3% ee). Резкий рост интенсивности ФЛ при снижении энантиомерного избытка в диапазоне от 100 до 90%, обуславливает различия между образцами D-Ala и L-Ala (который по данным хиральной ГХ не содержит заметных примесей D-Ala, т.е. имеет энантиомерный избыток >99.9%), в несколько раз (в 2.4 раза). На фоне общеизвестного факта,

что энантиомеры обладают одинаковыми физическими свойствами (в ахиральной среде и при отсутствии воздействия поляризованным излучением), хотелось бы обратить внимание на эти наблюдаемые различия.

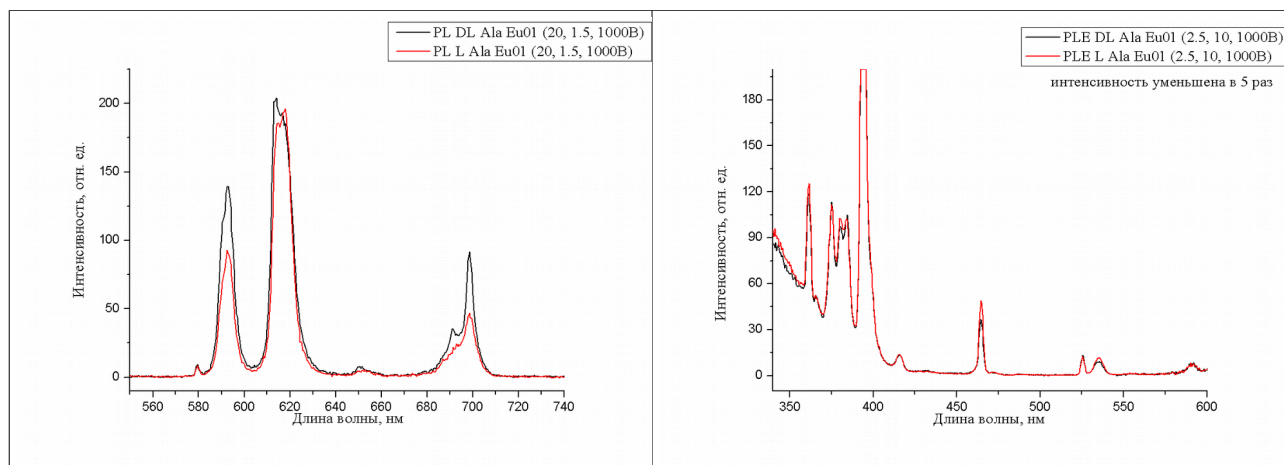
Столь сильные различия, вызванные таким незначительным изменением хиральной чистоты, детектируемые *ахиральным* физическим методом действительно являются необычным и уникальным экспериментальным фактом. Эти полученные данные и их сравнительная характеристика с классическим методом хирального анализа (ГХ на хиральном носителе) касаются пунктов 4 и 5 поставленных задач данного проекта (стр. 3).

Также стоит отметить, что в настоящей работе, с целью показать воспроизводимость полученных результатов для каждого из образцов были проведены многократные измерения спектров ФЛ. Отличие в значениях интегральной интенсивности от измерения к измерению составляло <1%. Образцы аланина, параллельно приготовленные в одних и тех условиях, содержащие одну и ту же концентрацию ионов гадолиния (III), показали очень близкие значения интенсивности фотолюминесценции, что говорит в пользу нашего подхода для применения в аналитических целях.

### ЗОНДИРОВАНИЕ АЛАНИНА ИОНАМИ ЕВРОПИЯ (III)

Допирование энантиомерно чистого L и рацемического DL Ala ионами  $\text{Eu}^{3+}$  (0.1 % мол.) осуществлялось по вышеописанной методике. В спектрах образцов L и DL Ala, допированных  $\text{Eu}^{3+}$ , наблюдается ФЛ в области 575-725 нм с близкими, *но не совпадающими максимумами* при 579.5, 592.6, 614, 650.5 и 698.4 нм для L и при 579.5, 592.3, 618.1, 650.5 и 698.4 нм для DL (**рис. 3а**). Полосы с указанными максимумами соответствуют переходам  ${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_J$  ( $J=0-4$ ) в ионах  $\text{Eu}^{3+}$ . Наиболее интенсивный переход наблюдался на длине волны 614 нм ( ${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_2$ ). Как видно из **рис. 3а**, наиболее сильные различия в спектрах проявляются в области перехода  ${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_2$  (610-625 нм). Кроме этого, наблюдаются значительные различия в интенсивности соответствующих переходов. Так для переходов  ${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_2$  и  ${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_4$  интенсивность ФЛ DL-Ala выше, чем у L в приблизительно 1,5 и 2 раза, соответственно (по высоте), **рис. 3а, табл. 1**. Полосы в спектрах возбуждения ФЛ, записанные для перехода  ${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_2$  для L и DL-Ala также различаются по интегральной площади и высоте перехода (**рис. 3б, табл. 1**).

Нами был проведён анализ интенсивности магнитно-дипольных и диполь-дипольных переходов ( ${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_1$  и  ${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_2$ ) в ионах европия. Магнитный дипольный переход  ${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_1$  не чувствителен к точечной симметрии, так как он разрешен по четности. В то же время вынужденный электрический дипольный переход  ${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_2$  является сверхчувствительным и



**Рисунки 3а (слева) и 3б (справа).** Спектры ФЛ и возбуждения ФЛ  $\text{Eu}^{3+}$  введённого в L и DL аланин.

**Таблица 1.**

Наиболее выразительные отличия между энантиомерночистым L и рацемическим DL аланином допированным  $\text{Eu}^{3+}$  в спектрах фотолюминесценции (PL) и возбуждения фотолюминесценции (PLE).

Спектр	DL/L по площади	DL/L по высоте
<b>PL</b>	1.53 (582.5 – 604 нм)	1.51 (592 нм)
<b>PL</b>	1.53 (675.5 – 710.5 нм)	1.97 (698 нм)
<b>PLE</b>	0.804 (457.5 – 469.5 нм)	1.35 (464.5 нм)

интенсивность его люминесценции может сильно варьироваться в зависимости от локальной симметрии и ближайшего окружения (п. 2 поставленных задач). По аналогии с работами (Hnatejko et al. *J. Alloys and Compounds* **2000**, 300-301, 38; Elbanowski et al. *Monatshefte fur Chemie* **1987**, 907-921, 118) мы оценили соотношение  $\eta$  между интенсивностью переходов  $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_1$  и  $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_2$  ( $I_{\text{lum}615} / I_{\text{lum}593}$ ) (Таблица 2). Известно, что значение параметра  $\eta$  зависит от окружения иона, от силы кристаллического поля, создаваемого лигандами, от локальной симметрии и от перекрывания колебательных уровней (электронно-колебательного взаимодействия между уровнями). Так, например, для высокосимметричного сольватированного иона европия  $[\text{Eu}(\text{H}_2\text{O})_9]^{3+}$  (водные растворы перхлората европия) соотношение  $\eta$  имеет одно из наиболее низких значений (0.39), что указывает на слабое влияние поля лигандов на  $4f$  орбитали европия.

В Таблице 2 представлены значения  $\eta$  для переходов  $\text{Eu}^{3+}$  в образцах L, D и DL аланина. Интегрирование пика, соответствующему магнитно-дипольному переходу  $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_1$  (593 нм), осуществлялось в диапазоне от 582 до 603 нм; пика диполь-дипольного

гиперчувствительного перехода  ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$  (615 нм) — от 603 до 636 нм. Было обнаружено, что энантиомерно чистый L-аланин проявляет наиболее высокое значение  $\eta$  (2.89), что свидетельствует о наибольшем возмущении локальной симметрии координированного иона европия (III). DL-аланин с примесью европия показал более низкое значение (2.14). Интересно, что наименьшее значение было получено для образца D-аланина, хиральная чистота которого изначально составляла 99.3% *ee*. Столь чувствительное влияние энантиомерного избытка на соотношения  $\eta$  также может быть использовано для определения соотношения между энантиомерами.

Таблица 2.

Образец	$\eta = I_{lum615} / I_{lum593}$
Eu(ClO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> , водный раствор	0.39*
L-Ala, 0.1% Eu <sup>3+</sup>	<b>2.89</b>
DL-Ala, 0.1% Eu <sup>3+</sup>	<b>2.14</b>
D-Ala, 0.1% Eu <sup>3+</sup>	<b>1.88</b>

\*Литературные данные

Отдельно можно упомянуть проявление в спектра ФЛ европия (Рис. 3а) резонансного перехода  ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_0$  (579.5 нм). Известно, что в соответствии с правилами отбора и теорией Джадда-Офельта этот переход строго запрещён. Однако он всё же может наблюдаться, когда европия имеет локальную симметрию по Шёнфлису  $C_n$ ,  $C_{nv}$  and  $C_s$  (Binnemans *Coord. Chem. Rev.* **2015**, 295, 1), из которых только аксиальная  $C_n$  группа соответствует хиральным соединениям. Аланин, содержащий асимметрический атом углерода, относится к группе  $C_1$ . Как и следовало ожидать наличие перехода  ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_0$  в спектрах ФЛ свидетельствует о низкой локальной симметрии. Как видно из спектра ФЛ полоса этого перехода является симметричной, что, как в случае  $Gd^{3+}$ , свидетельствует об отсутствии неэквивалентных центров.

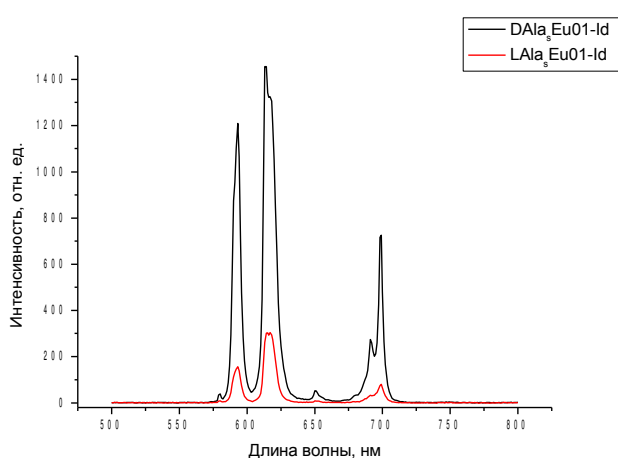
Проведенные исследования показали что европий обладает более высокой интенсивностью ФЛ, чем гадолиний, что свидетельствует о близости излучательного уровня европия  ${}^5D_0$  с триплетным состоянием аланина, причем таким, что в комплексе аланина с  $Eu^{3+}$  триплетное состояние энергетически оказывается расположено выше, чем излучательные уровни европия.

В литературе имеются данные о количественной корреляции между энергией перехода  ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_0$  и общим зарядом на лигандах, непосредственно связанных с европием в первой координационной сфере (Albin & Horrocks *Inorg. Chem.* **1985**, 24, 895):

$$\nu = -0.76p^2 + 2.29p + 17273,$$

где  $\nu$  — положение перехода выраженное в  $\text{см}^{-1}$ , а  $p$  – суммарный заряд на лигандах. Используя эту зависимость, мы оценили значение  $p$ , которое составило около -3.5, что говорит о возможной координации к иону европия сразу нескольких аминокислот посредством карбоксилатной группы.

Столкнувшись с существенными различиями для образцов L-Ala (>99.9% *ee* по ГХ) и D-Ala (99.3% *ee*) при допировании ионами гадолия (III), нами были проведены аналогичные исследования с зондированием  $\text{Eu}^{3+}$ . Аналогично, мы обнаружили резкий рост интенсивности ФЛ при снижении энантиомерного избытка аланина всего на доли процента (Рисунок 4). В данном случае различия оказались ещё более выразительными (Табл. 3).



**Рисунок 4.** Сравнение спектров ФЛ образцов L и D аланина, содержащих 0.1%  $\text{Eu}^{3+}$ .

**Таблица 3.**

Соотношение интегральных интенсивностей указанных переходов для L и D аланина различной энантиомерной чистоты (>99.9% и 99.3% *ee*, соответственно).

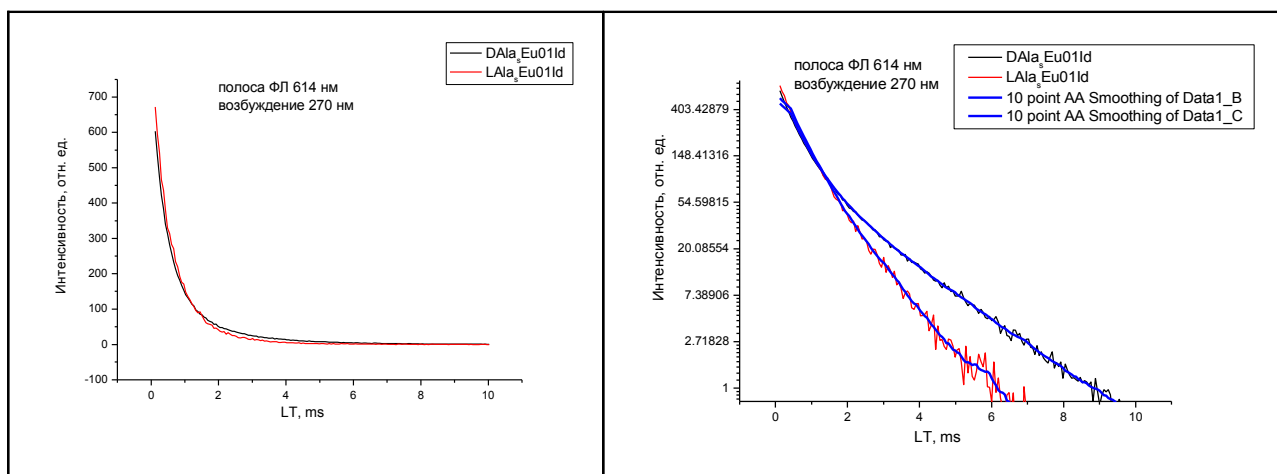
Переход	Соотношение площадей D/L
${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_1$	7.33
${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_2$	4.6

Наряду с «классической» ФЛ нами был проведён ряд временных измерений. Исследуя зависимость интенсивности люминесценции от времени, можно найти величину, характеризующую возбужденный уровень – время жизни. Время жизни определяется совокупностью излучательных и безызлучательных процессов. Было исследовано время жизни возбужденного уровня ионов европия  ${}^5\text{D}_0$  для образцов L (>99.9% *ee*) и D-Ala (99.3% *ee*), содержащих 0.1%  $\text{Eu}^{3+}$ . Для определения времени жизни измерялась зависимость



интенсивности люминесценции на длине волны  $\lambda_{em} = 614$  нм ( ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$ ) от времени при длине волны возбуждения  $\lambda_{ex} = 270$  нм. Кривые затухания ФЛ приведены на рисунке 5 в обычном (а) и полулогарифмическом масштабе (б).

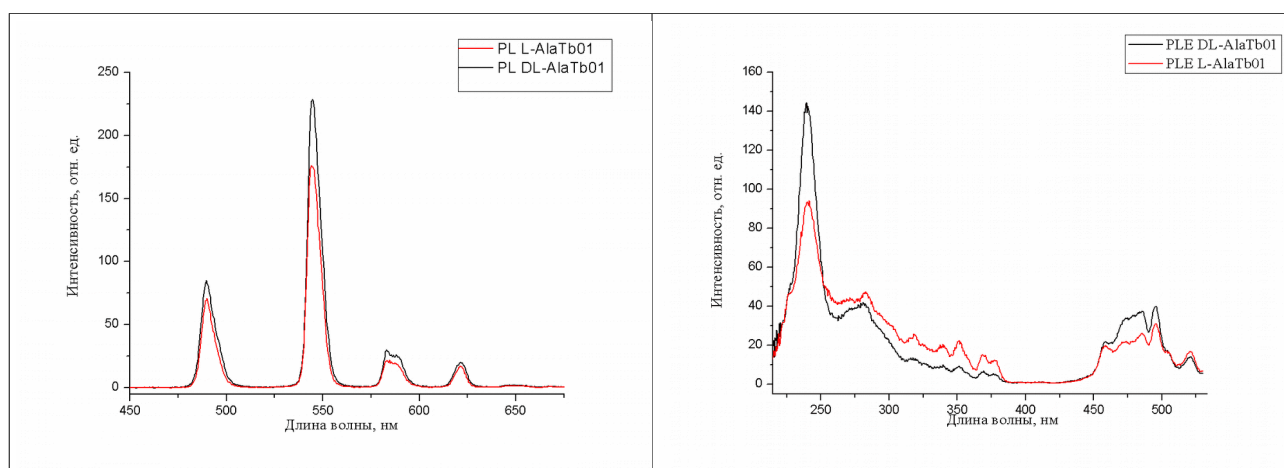
Полученные экспериментальные зависимости были аппроксимированы одной экспонентой и суммой двух экспонент. В случае использования для аппроксимации одной экспоненты наблюдаемое время жизни для образцов L и D аланина различно и составляет 0,62 и 0,69 ms. Наблюдаемые различия во временах согласуются с представленными выше различиями в ФЛ этих образцов.



**Рисунок 5.** Кривые затухания ФЛ на длине волны  $\lambda_{em} = 614$  нм ( ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$ ),  $\lambda_{ex} = 270$  нм.

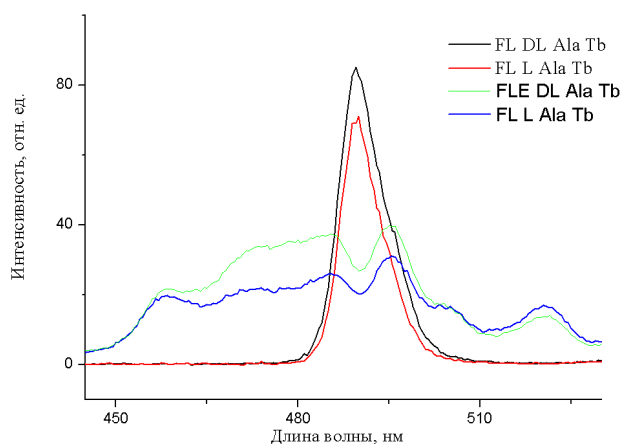
### ЗОНДИРОВАНИЕ АЛАНИНА ИОНАМИ ТЕРБИЯ (III)

На **рис. 6** представлены спектры ФЛ (а) и возбуждения ФЛ (б) L и DL Ala, допированных ионами  $Tb^{3+}$  (0.1 % мол.). Существенные отличия между рацематом и энантиомерным Ala были найдены как в спектрах ФЛ, так и в спектрах возбуждения ФЛ. Как видно из **рис. 6а**, спектры ФЛ обоих образцов лежат в области 475-700 нм. Сравнивая интенсивность ФЛ  $Eu^{3+}$ ,  $Gd^{3+}$  и  $Tb^{3+}$  в смесях с аланином, можно сказать, что люминесценция тербия обладает наибольшей интенсивностью, что согласуется с известными литературными данными. Так как *возбуждение тербия происходит посредством переноса энергии с триплета аланина*, то факт того, что тербий обладает наибольшей ФЛ, говорит о том, что *для тербия безызлучательные потери при таком переносе энергии — минимальны*. Из этого можно сделать однозначный вывод о том, что *резонансный уровень тербия (489.5 нм) наиболее близко расположен к триплетному уровню аланина*. Более того, как видно из спектров, форма полосы отвечающей переходу  ${}^5D_4 \rightarrow {}^7F_6$  имеет все характеристические черты (Рис. 6с), свидетельствующие об внутримолекулярном обменно-резонансном взаимодействии состояния  ${}^5D_4$  и триплетного уровня аланина.



**Рисунки 6а (слева) и 6б (справа).** Спектры ФЛ и возбуждения ФЛ Tb<sup>3+</sup> введённого в L и DL аланин.

Полосам ФЛ с максимумами 489.5, 544.5, 583, 621.3, 647.9, 668.7 и 680 нм для обоих образцов нами приписаны электронные переходы  $^5D_4 \rightarrow ^7F_J$  ( $J=6-0$ ) в ионах Tb<sup>3+</sup>. Наиболее интенсивной является полоса при 544.5 нм. Положение резонансной полосы при 489.5 нм совпадает для L и DL аланина. Эти данные по тербию подтверждают положение триплета аланина, что соответствует анализу спектров аланина с европием (положение триплета аланина очень близко к 493 нм) и с адолия (положения триплета аланина значительно ниже, чем 312 нм). В спектрах ФЛ L и DL (**рис. 6а**) значительные отличия в интенсивности наблюдаются для переходов  $^5D_4 \rightarrow ^7F_{6,5,4}$ . Также отличия в интенсивности полос для L и DL форм обнаружены и в спектрах возбуждения ФЛ (**рис. 6б**). В Таблице 4 приведены соотношения интегральных интенсивностей основных переходов Tb<sup>3+</sup> в образцах L и DL аланина. Анализ спектров в области резонансного перехода выявляет характеристические частоты внутримоле-



**Рисунок 6с.** Спектры ФЛ и возбуждения ФЛ Tb<sup>3+</sup> в области триплетного уровня аланина.

кулярных колебаний, позволяющий не прибегая к дополнительным методам исследования определить функциональную группу – комплексообразующую.

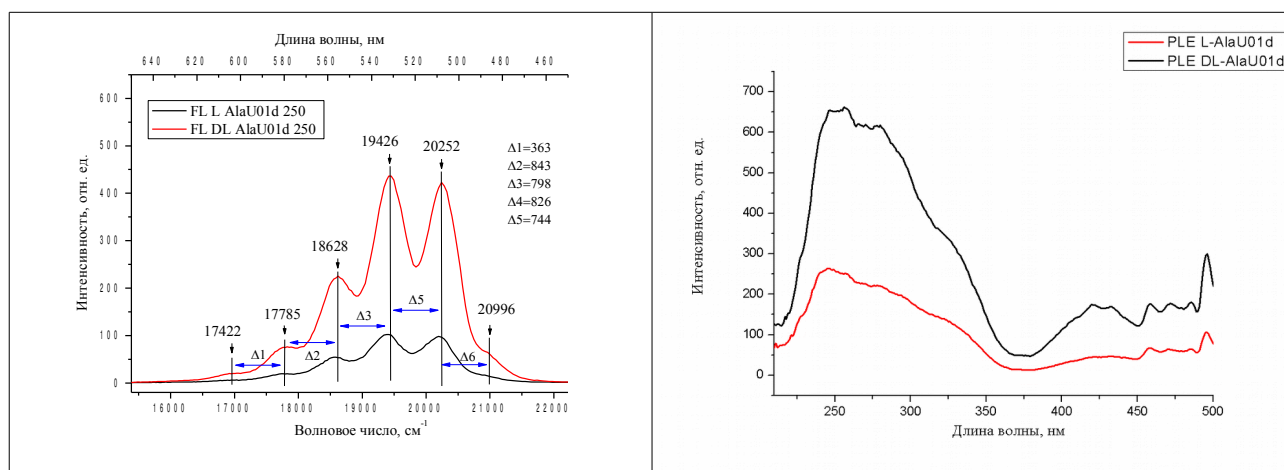
**Таблица 4.**

Наиболее выразительные отличия между энантиомерно чистым L и рацемическим DL аланином допированным  $Tb^{3+}$  в спектрах фотолюминесценции (PL) и возбуждения фотолюминесценции (PLE).

Спектр	DL/L по площади	DL/L по высоте
<b>PL</b>	1.31 (476.5 – 516 нм)	1.21 (489.5 нм)
<b>PL</b>	1.28 (527 – 570 нм)	1.30 (544.5 нм)
<b>PL</b>	1.33 (572 – 607.5 нм)	1.38 (583 нм)
<b>PL</b>	1.30 (607.5 – 636 нм)	1.18 (621.3 нм)
<b>PLE</b>	1.23 (215 – 262 нм)	1.55 (247 нм)
<b>PLE</b>	1.23 (432 – 530 нм)	1.29 (495 нм)

#### ЗОНДИРОВАНИЕ АЛАНИНА ИОНАМИ УРАНИЛА ( $UO_2^{2+}$ )

На **рис. 7** представлены спектры ФЛ (**а**) и возбуждения ФЛ (**б**) L и DL аланина, допированных ионами  $UO_2^{2+}$  (0.1 % мол.). В спектрах ФЛ наблюдаются характерные частоты колебаний U-O в  $UO_2^{2+}$ . Соответствующая разница между ними составляет порядка  $800\text{ см}^{-1}$ .



**Рисунки 7а (слева) и 7б (справа).** Спектры ФЛ и возбуждения ФЛ  $UO_2^{2+}$  в L и DL Ala.

Как и в случае, допирования другими ионами, наибольшие различия для образцов L и DL Ala наблюдаются как в интегральной интенсивности, так и в высоте линий. В случае DL Ala интенсивность ФЛ оказалась в 4 раза больше, чем для L (Таблица 5). Частотный анализ

выявляет принадлежность к определённой функциональной группе с проявляемыми несовпадениями частот колебаний. Уранил ион подтверждает расположение триплетного состояния аланана.

**Таблица 5.**

Наиболее выразительные отличия между энантиомерночистым L и рацемическим DL аланином допированным  $UO_2^{2+}$  в спектрах фотолюминесценции (PL) и возбуждения фотолюминесценции (PLE).

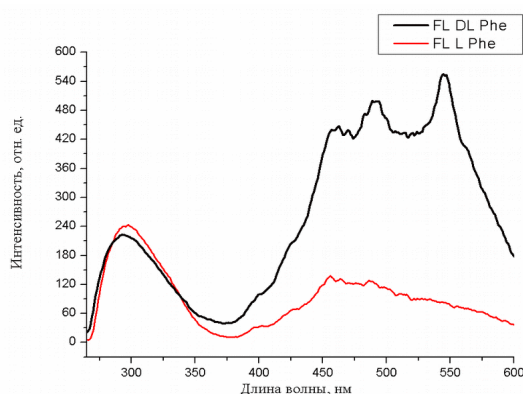
Спектр	DL/L по площади	DL/L по высоте
<b>PL</b>	4.11 (454.5 – 645 нм)	4.20 (495 нм)
		4.28 (515 нм)
		4.25 (538 нм)
<b>PLE</b>	2.67 (210 – 500 нм)	2.48 (247 нм)

#### *ЛЮМИНЕСЦЕНТНОЕ ЗОНДИРОВАНИЕ ИОНАМИ $La^{3+}$ и $Lu^{3+}$*

Нами была предпринята попытка обнаружения положения триплетного уровня аланина путём снятия запрета  $T \rightarrow S_0$  переход в присутствии ионов лантана (III) и лютеция (III), что предположительно можно привести к выявлению фосфоресценции. Образцы L-аланина, содержащие 0.1% указанных ионов не проявили сколь-нибудь заметной ФЛ.

#### *ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ХИРАЛЬНЫХ ФОРМ ФЕНИЛАЛАНИНА*

Измерение спектров фотолюминесценции энантиомерночистого L и рацемического DL фенилаланина осуществлялось без допирования, вследствие наличия собственной люминесценции (флуоресценции и фосфоресценции). При возбуждении на длине волны 250 нм в спектрах были обнаружены отличия между L и DL формами (**Рис. 8**). В области 375 - 600 нм (фосфоресценция) соотношение площадей интенсивностей L к DL форме составило 4.23 раза (**Таблица 6**).



**Рисунки 8.** Спектр ФЛ L и DL фенилаланина в твёрдой фазе.

**Таблица 6.**

Наиболее выразительные отличия между энантиомерночистым L и рацемическим DL фенилаланином в спектрах фотолюминесценции (PL) и возбуждения фотолюминесценции (PLE) без введения люминесцентных зондов.

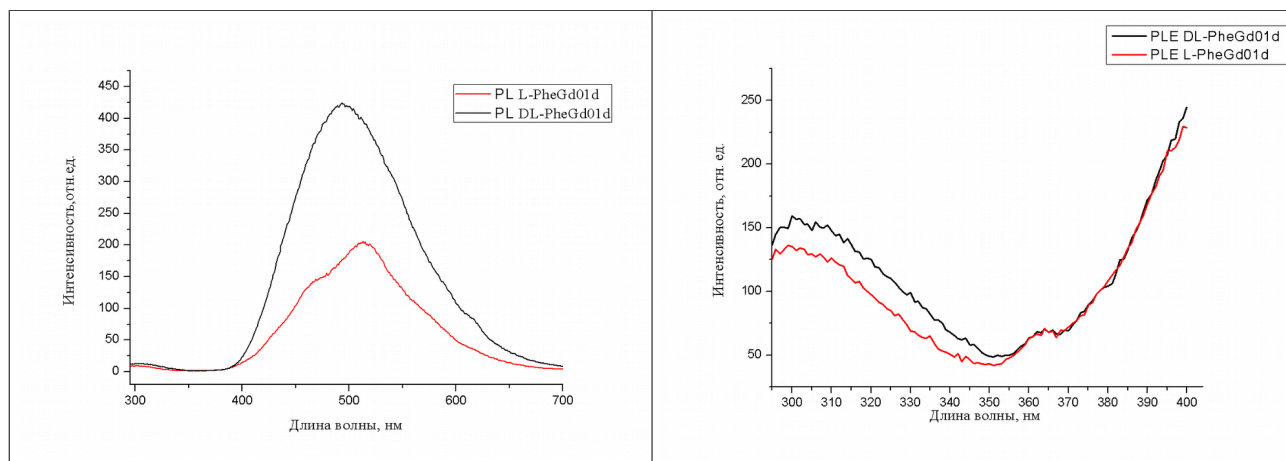
Спектр	L/DL по площади	DL/L по высоте
<b>PL</b>	0.99 (265 – 375 нм)	0.95 (295 нм)
<b>PL</b>	<b>4.23</b> (375– 600 нм)	-

### *ЗОНДИРОВАНИЕ ФЕНИЛАЛАНИНА ИОНАМИ ГАДОЛИНИЯ (III)*

Допирование энантиомерночистого L и рацемического DL фенилаланина ионами  $Gd^{3+}$  осуществлялось по вышеописанной методике. Навеску фенилаланина (576 мг, 3.49 ммоль) растворили при перемешивании на магнитной мешалке и слабом нагреве на водяной бане (40-50°C) в водном растворе нитрата гадолиния (III) (1.5 мл,  $c(Gd^{3+}) = 2.32$  мкмоль/мл, 3.39 мкмоль) с добавлением деионизированной воды (18.5 мл для L-Phe и 28.5 мл для DL-Phe). Полученный раствор упарили на водоструйном насосе при интенсивном перемешивании на магнитной мешалке и нагреве на водяной бане (~45-55°C). После упаривания до суха, смесь тщательно растирают шпателем и досушивают в вакууме при 80°C в течении 4 ч.

На **Рис. 9а** представлены спектры фотолюминесценции L и DL фенилаланина, допированных ионами гадолиния (0.1 % мол.).

На **Рис. 9б** представлены спектры возбуждения фотолюминесценции L и DL фенилаланина, допированных ионами гадолиния (0.1 % мол.) при возбуждении на длине волны 270 нм.



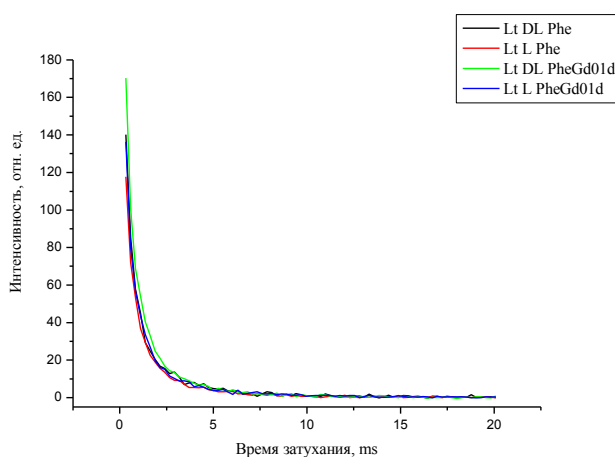
**Рисунки 9а (слева) и 9б (справа).** Спектры ФЛ и возбуждения ФЛ L и DL фенилаланина допированного ионами  $Gd^{3+}$ .

**Таблица 7.**

Наиболее выразительные отличия между энантиомерночистым L и рацемическим DL фенилаланином допированным  $Gd^{3+}$  в спектрах фотолюминесценции (PL) и возбуждения фотолюминесценции (PLE).

Спектр	DL/L по площади
<b>PL</b>	2.22 (350 – 700 нм)
<b>PLE</b>	1.22 (295 – 360 нм)

Временные измерения как свободных, так и допированных L и DL форм фенилаланина не обнаружило заметных различий (Рисунок 10).



**Рисунок 10.** Кинетика затухания различных форм фенилаланина.

## СТЕПЕНЬ ВЫПОЛНЕНИЯ ПОСТАВЛЕННЫХ ЗАДАЧ, ВЫВОДЫ

На примере модельных соединений — простейшей хиральной  $\alpha$ -аминокислоты аланина, не обладающей собственной люминесценцией, и  $\alpha$ -аминокислоты фенилаланина, обладающей собственной люминесценцией, показаны примеры возможностей визуализации сильных различий люминесцентных характеристик их хиральных форм: в том числе, при использовании люминесцентных зондов, в зависимости от (i) энантиомерного избытка нерацемических образцов аланина, от 1% и вплоть до 99.3% *ee*, (ii) хиральной формы (L или DL) аланина и фенилаланина. При использовании целой серии люминесцентных зондов обнаружены отличия между (а) чистым энантиомером и рацематом (аланина и фенилаланина), (б) хиральными формами аланина с очень близкой энантиомерной чистотой (0 и 1% L; 99.3 D и >99.9% *ee* L). Обнаруженные различия являются беспрецедентными (см. напр. Jacques et al., *Enantiomers, Racemates and Resolutions*, Krieger 1994).

Несмотря на бивариантность значений энантиомерного избытка в определённом диапазоне интенсивности фотолюминесценции, полученные результаты являются важными с точки зрения фундаментальных вопросов стереохимии и хирального анализа. Хотя в текущем виде, разрабатываемый способ не может быть использован в качестве рутинной аналитической методики определения энантиомерного в полном диапазоне значений, проделанные исследования указывают на принципиальную возможность очень точного определения низкого и высокого энантиомерного избытка нерацемических смесей хиральных соединений с большей надёжностью, чем другими классическими методами. При этом, концентрационная чувствительность разрабатываемой фотолюминесцентной методики для каждого из ионов-зондов по нашим оценкам составляет не менее чем  $10^{-9}$  % молярн. для  $Tb^{3+}$ ,  $10^{-7}$  % для  $Eu^{3+}$  и  $10^{-6}$  % для  $Gd^{3+}$ .

Поведенные исследования с использованием в качестве люминесцентных зондов ионов  $Gd^{3+}$ ,  $Eu^{3+}$ ,  $Tb^{3+}$  и  $UO_2^{2+}$  дали возможность пополнить информацию об электронной структуре простейшей хиральной протеиновой  $\alpha$ -аминокислоты — аланина, а именно выявить положение одного из его триплетных уровней. По нашим сведениям в литературе эти данные отсутствуют.

Таким образом, нами предложен новый метод анализа энантиомеров и их смесей, принципиально отличающийся от существующих тем, что он является *ахиральным*, т.е. позволяет избегать использования каких-либо внешних асимметрических вспомогательных агентов, растворителей, хиральных носителей и не прибегать к анализу изменения поляризации излучения.

**Первоначальное финансирование** данных исследований в рамках молодёжного поискового проекта ИК СО РАН позволило нам подготовить несколько заявок, в частности, для патентирования описанного открытия, на получение дальнейшего финансирования для проведения более детальных дальнейших исследований и на представление результатов на нескольких международной конференции:

1. Патент Российской Федерации под названием «Способ определения энантиомерного избытка хиральных соединений». Заявка № 2015147898 с приоритетом 06.11.2015. Объём патента: 48 страниц, 7 таблиц и 7 фигур.

2. Заявка на конкурс научных проектов Российского Фонда Фундаментальных Исследований, выполняемых молодыми учеными (Мой первый грант) под названием «Люминесцентные свойства энантиомерно чистых, рацемических и нерацемических смесей энантиомеров допированных ионами лантаноидов — новый подход к хиральному анализу». Руководитель — к.х.н. Тарасевич А.В., участники — Баронский М.Г. и Костюков А.И. **Поддержана на 2016-2017 года, номер проекта 16-33-00369.**

3. Заявка на конкурс совместных научных проектов Российского Фонда Фундаментальных Исследований и Национального Центра Научных Исследований Франции (CNRS) под названием *Энантиообогащённые альфа-аминокислоты как катализаторы для дерацемизации и энантиообогащения других аминокислот, пептидов и синтеза гомохиральных сахаров*. В качестве высокочувствительного метода исследования гомо- и гетерохиральных взаимодействий между энантиомерами аминокислот и сахаров, а также как дополнительная возможность изучения механизма реакции (in situ отслеживание изменение люминесцентных характеристик) предложено люминесцентное зондирование ионами переходных металлов, в частности, ионами РЗЭ. Руководитель — к.ф.-м.н. доц. Снытников В.Н., участники — д.х.н. проф. Таран О.П., Расторгуев А.А., к.х.н. Тарасевич А.В., Баронский М.Г., Костюков А.И. Руководитель от французской стороны — PhD Prof. Guillemin J.-C. **Поддержана на 2016-2018 года, номер проекта 16-53-150004.**

4. Заявка по программе Академическая Мобильность в фонд Михаила Прохорова на дорожный грант Костюкова А.И. для участия в 28-ом международном симпозиуме по хиральному распознаванию «Chirality 2016» (28th International Symposium on Chiral Discrimination), который состоится в период с 24 по 27 июля 2016 г. в городе Гейдельберг, Германия. **Поддержана в апреле 2016 года.** Костюковым А.И. будет представлена постерная презентация под названием «Unusual aspects of the vibronic transitions of luminescent probes in the matrices of enantiopure and racemic alpha-amino acids» (Особенности элек-



тронно-колебательных переходов люминесцентных зондов в матрице энантиомерно чистых и рацемических  $\alpha$ -аминокислот».

5. Научным организационным комитетом 28-ого международного симпозиума по хиральному распознаванию «Chirality 2016» **приняты тезисы для устного доклада** Тарасевича А.В. Доклад под названием «Luminescent probing of enantiopure and racemic alpha-amino acids» (Люминесцентное зондирование энантиомерно чистых и рацемических  $\alpha$ -аминокислот) будет сделан на секции «Chiroptical Spectroscopy» (Хирооптическая Спектроскопия).

6. По тематике проекта **в марте 2016 года** Тарасевичем А.В. **установлены научные контакты** с сотрудниками Бресчйского университета (Италия) — проф. Ettore Castiglioni (бывший директор Европейского офиса JASCO), проф. Sergio Abbate, доц. Giovanna Longhi. В рамках сотрудничества нами была подготовлена и доставлена в Италию серия образцов аминокислот содержащих люминесцентные зонды (L и D аланин с европием, L и D аланин с гадолинием) для измерения спектров циркулярно-поляризованной люминесценции и флуоресцентно-детектируемого кругового дихроизма в твёрдой фазе. Данные методики являются одними из наиболее передовых для хирооптического анализа и фактически недоступны в России.

Рецензия на итоговый отчет М.Г. Баронского, А.И. Костюкова и А.В. Тарасевича  
**«Люминесцентные свойства энантиомерно чистых, рацемических и  
нерацемических смесей природных  $\alpha$ -аминокислот, допированных ионами  
лантаноидов – новый подход к хиральному анализу»..**

Итоговый отчет авторов проекта, в отличие от их промежуточного отчета, является более основательным и полным, с необходимым количеством сопроводительной информации и сведениями, отражающими детали выполненной работы. В целом, предоставленный отчет позволяет сделать обоснованное заключение по проекту.

1) Представленное исследование является нетривиальным по изученным объектам, а примененный люминесцентный метод – достаточно новым и оригинальным по отношению к выявлению хиральности органических соединений.

2) Отраженные в итоговом отчете результаты соответствуют заявленным ранее *Целям работы* и *Основным задачам*. Объем выполненной работы – достаточный, чтобы считать инициативный проект состоявшимся. Без сомнения, данное исследование соответствует всем требованиям, предъявляемым к инициативным проектам по формальным показателям и по неформальным результатам. Это касается и оформленной авторами заявки на патент, и подготовленные заявки на участие в научных конкурсах РФФИ. С этой точки зрения, безусловно, следует признать эффективными финансовые затраты Института на поддержку данного проекта.

3) Раздел *«Степень выполнения поставленных задач»* и *«Выводы»* адекватно и объективно отражает основные результаты.

4) По моему мнению, авторам необходимо продолжить и активнее развивать данную научную тематику, чтобы сохранить приоритет в применении данного фотолюминесцентного метода для хирального анализа органических соединений.

Вместе с тем, после ознакомления с заключительным отчетом возникают вопросы по тем пунктам запланированных *Задач*, которые не нашли здесь достаточного освещения. Это пункты 5 и 6 – сравнение эффективности разрабатываемого метода хирального анализа с хиральной газовой хроматографией и его применимость для рутинного анализа и изучения механизмов каталитических асимметрических реакций. По моему мнению, в ныне существующем виде предложенный метод пока ещё неприемлем для *«рутинного анализа и изучения механизмов каталитических асимметрических реакций»*. Несмотря на тот факт, что чувствительность люминесцентного метода, показанная в данной работе, превосходит хроматографию на хиральном носителе, «за кадром» остался вопрос об оптимальном количестве анализируемого вещества, которое необходимо для проведения требуемых манипуляций при подборе подходящего люминесцентного зонда (иона) и его введении в этот анализат. В целом же предполагаю, что временные затраты на такую пробоподготовку значительно перекроют разумные пределы.

### Заключение.

Авторы своей работой продемонстрировали возможности нового метода хирального анализа, не имеющего на настоящий момент широкого практического применения в мировой практике. Полученные результаты могут стать хорошим заделом для последующего развития и совершенствования этого люминесцентного метода, сохранения приоритета Института в этой научной области.

**Рецензия на промежуточный отчет по проекту «Люминесцентные свойства энантиомерных, рацемических и нерацемических смесей природных  $\alpha$ -аминокислот допированных ионами лантаноидов — новый подход к хиральному анализу»**  
*Баронского Марка Германовича, Костюкова Антона Ивановича, Тарасевича Аркадия Викторовича*

Авторы к написанию финального отчета выполнили серьезную работу. Провели эксперименты с использованием  $Gd^{3+}$ ,  $Eu^{3+}$ ,  $Tb^{3+}$  и  $UO_2^{2+}$  зондов в полном диапазоне энантиомерных избытков аланина. Выполнили отдельные эксперименты с аланином. В принципе, уже на основе данного массива работ можно считать проект полностью выполненным и продолжить финансирование.

Однако, у рецензента остались замечания к авторам.

Хотелось бы видеть аналогичные изображенной на рис.2.а отчета зависимости для других зондов, а не только для гадолиния. Это замечание не критично, но, все-таки, рекомендую авторам предоставить данные сведения на финальном докладе о проделанной работе.

Более серьезное замечание заключается в том, что эксперименты по воспроизводимости методики означают воспроизведение всей последовательности действий, из которых, собственно, методика состоит. То, о чем говорят авторы в отчете, по сути является тестами на воспроизводимость и стабильность сигнала спектрофлюориметра Cary Eclipse, т.к. использовались одни и те же образцы. Таким образом, экспериментов по воспроизводимости методики авторами сделано не было. Эта часть является критически важной, т.к. любая новая методика **обязательно(!)**, должна быть протестирована на воспроизводимость результатов. Это серьезный недостаток работы. Однако, в рамках правил КМПП авторы проект полностью выполнили. Надеюсь, что эта ситуация временная, и авторы такие эксперименты проведут. Очень хотелось бы видеть эти результаты на итоговом докладе – это бы разрешило все поставленные вопросы.

**Резюме: Несмотря на развернутый и подробный отчет, отсутствует критически важная часть: эксперименты по воспроизводимости методики. Однако, в целом считаю проект выполненным и поддерживаю авторов.**

**Финансирование проекта продолжить.**