

Санкт-Петербургский государственный университет

КРАВЦОВ Денис Вадимович

Выпускная квалификационная работа

Изучение фотохимических и термодинамических свойств фотоактивируемых биологически активных соединений на основе азобензолов

Уровень образования: *магистратура*

Направление *28.04.04 «Наносистемы и наноматериалы»*

Основная образовательная программа *ВМ.5724.2019 «Фундаментальные и прикладные аспекты наноматериалов и нанотехнологий»*

Научный руководитель: к.х.н,
доцент, кафедра лазерной химии и
лазерного материаловедения,
Тверьянович Андрей
Станиславович

Рецензент: к.х.н, ведущий научный
сотрудник, ФГБУ ВОиН «Санкт-
Петербургский национальный
исследовательский Академический
университет имени Ж.И.Алферова
РАН»,
Бойцов Виталий Михайлович

Санкт-Петербург
2021

Содержание

Введение	3
Раздел 1 Обзор литературы	5
1.1 Применение производных азобензола в фотофармакологии	5
1.1.1 Блокаторы ионных каналов	5
1.1.2 Фотоактивируемые лекарственные препараты	10
1.1.3 Использование фотопереключателей для контроля биологических систем	12
1.2 Влияние заместителей на спектральные и временные характеристики	12
1.3 Устойчивость соединений в организме	17
Раздел 2 Экспериментальная часть	19
2.1 Методы разностной спектроскопии высокого временного разрешения	19
2.1.1 Флеш-Фотолиз	20
2.1.2 Метод возбуждение-зондирование	21
2.2 Методы и материалы	23
2.2.1.Подготовка растворов	23
2.3 Используемые методы	23
2.3.1 Установка для флеш-фотолиза	23
2.3.2 Спектрофотометр	24
2.3.3 Спектроскопия комбинационного рассеяния	24
2.3.4 Циклическая и дифференциальная вольтамперометрия	24
2.3.5 Квантово-химические расчеты	26
Раздел 3 Обсуждение результатов	27
Выводы	42
Благодарности	43
Список литературы	44

Введение

В современных исследованиях в области биологии и фармакологии актуальными являются работы, направленные на изучение процессов, происходящих внутри клетки, и их контроль.

Одним из таких направлений является фотофармакология. Исследования в данной области позволяют влиять на процессы в клетке путем воздействия электромагнитного излучения. Примером фотофармакологических препаратов являются фотоактивируемые цитостатические и антибиотические препараты, а также молекулярные фотопереключатели. При взаимодействии со светом, последние, могут переходить между своими изомерными формами, обладающими различной биологической активностью [1].

Одними из соединений, на основе которых строят молекулярные переключатели, часто выступают производные азобензола. Данные соединения при взаимодействии с электромагнитным излучением переходят за время порядка сотен фемтосекунд из своей стабильной транс-формы в цис-форму. Обратный переход может происходить как при поглощении излучения с другой длиной волны, так и термически, при этом времена термической изомеризации лежат в интервале от наносекунд до лет (Рис.1).

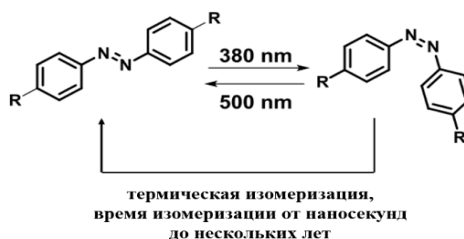


Рис.1 Фотохимические и термические изомерные переходы производного азобензола.

Производные азобензола широко используют в нейробиологических исследованиях для контроля нейронных систем. Принцип действия заключается в том, что в одной из своих форм соединение блокирует ионный канал, что приводит к поляризации или деполяризации клеточной мембраны. При поглощении кванта света происходит изменение конформации соединения, что приводит к открытию ионного канала, вызывая изменение мембранного потенциала и формирование первичного импульса[2]. Данный процесс позволяет исследователям контролировать активность

нейронов. Однако, важно отметить, что для подобных исследований критическим является время изменения мембранного потенциала, которое зависит от многих факторов, в том числе от времен цис-транс изомеризации.

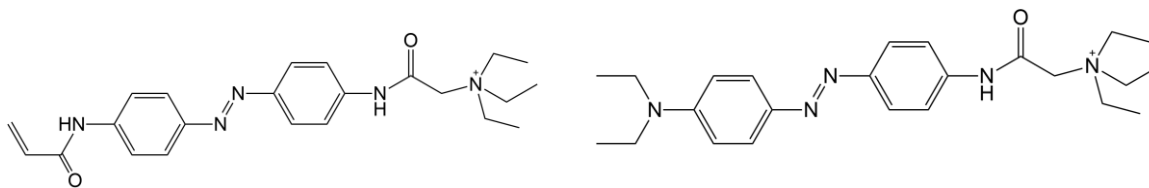


Рис.2 Соединения AAQ(слева) и DENAQ(справа).

Нами были исследованы процессы цис-транс изомеризации на примере двух производных азобензола DENAQ и AAQ (рис.2), которые относятся к двум поколениям блокаторов ионных каналов. Представители двух поколений резко отличаются по своим спектральным и временным характеристикам, а также по растворимости и временам отклика мембраны. В работе, представленной группой Траунера, времена отклика клеточной мембраны для соединений DENAQ и AAQ составляло 300мс и 7-8 минут, соответственно[3]. Возможным объяснением разницы в свойствах может являться различное значение pK_a соединений, что может вызывать протонирование DENAQ, что приводит к увеличению растворимости и изменению спектральных характеристик соединения.

Нами была поставлена задача определить является ли время цис-транс изомеризации, лимитирующей, и определить причины различия характеристик представленных соединений.

Цель работы: определить, является ли процесс цис-транс перехода лимитирующим для времен отклика клеточной мембраны и определить отличия механизмов процесса цис-транс изомеризации для соединений.

Основные этапы работы:

Измерить и сопоставить с квантовохимическими расчётами спектры в УФ и видимой области (стационарные и разностные) и спектры комбинационного рассеяния при различной кислотности среды.

Измерить времена цис-транс изомеризации и электрохимические характеристики для соединений при различных значениях pH среды.

На основании полученных данных определить различия в механизмах цис-транс изомеризации соединений DENAQ и AAQ.

Раздел 1 Обзор литературы

1.1 Применение производных азобензола в фотофармакологии

Изомеризация азобензола из транс-формы в цис-форме под действием УФ излучения была впервые показана Хартли в 1937 году. Обратная изомеризация происходит при облучении соединения синим светом, либо термически, при отсутствии излучения [4]. Данный процесс протекает с достаточной эффективностью и без значимых побочных реакций. Более того, процесс цис-транс изомеризации сохраняется у производных азобензола, что позволяет создавать фотохромные переключатели под различные задачи. Стабильность процесса фотоизомеризации вкупе с достаточной простотой синтеза различных производных позволяет применять азобензолы в широком круге направлений материаловедения и нейробиологии [5].

1.1.1 Блокаторы ионных каналов

Одним из направлений использования производных азобензола является использование их в качестве фотохромных блокаторов ионных каналов. Ионными каналами называются трансмембранные белки, которые контролируют транспорт ионов через клеточную мембрану [12]. Процесс транспорта контролируется переключением между «закрытой» и «открытой» конформациями. Ионных каналов существует огромное множество, отличающееся селективностью к ионам и кинетическими характеристиками, что дает широкую вариативность их функций. Примером работы ионных каналов может выступать работа клеток нейронов, которые функционируют за счёт открытия и закрытия ионных каналов. Достаточно распространенными ионными каналами являются калиевые каналы, в которых потенциал мембраны изменяется за счет изменения тока ионов калия через мембрану. Фотохромные блокаторы калиевых каналов на основе азобензола блокируют канал при помещении в него, но при изомеризации под действием света происходит его разблокировка (Рис.3) [6].

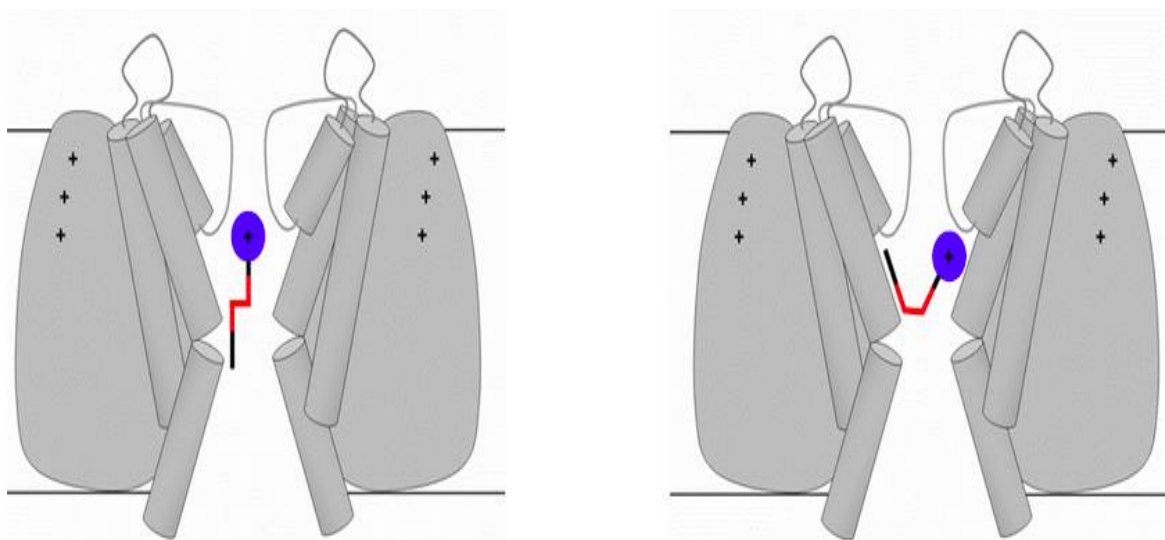


Рис.3 Блокировка и разблокировка калиевого канала производным азобензола[6].

Последующая передача сигнала между нейронами может быть описана следующими процессами. После открытия калиевых каналов в нейроне, облученном светом, происходит выход ионов калия из клетки во внешнюю среду, при этом происходит повышение концентрации ионов калия во внеклеточной среде, что приводит к снижению блокирующей способности молекулярных переключателей в других клетках. Это приводит к частичной разблокировке калиевых каналов и передаче сигнала к следующим нейронам [2].

Первыми синтезированными фотохромными блокаторами ионных каналов были соединения Bis-Q и QBr. Данные соединения связываются с никотиновым ацетилхолиновым рецептором nAChR и активировали его в своей транс-форме [15]. Фоторегуляция ацетилхолиновых рецепторов является интересным инструментом для контроля мышечной активности, однако в случае центральной нервной системы, где данные рецепторы выполняют лишь вспомогательную функцию, такой подход мало подходит для прямого изучения протекающих процессов.

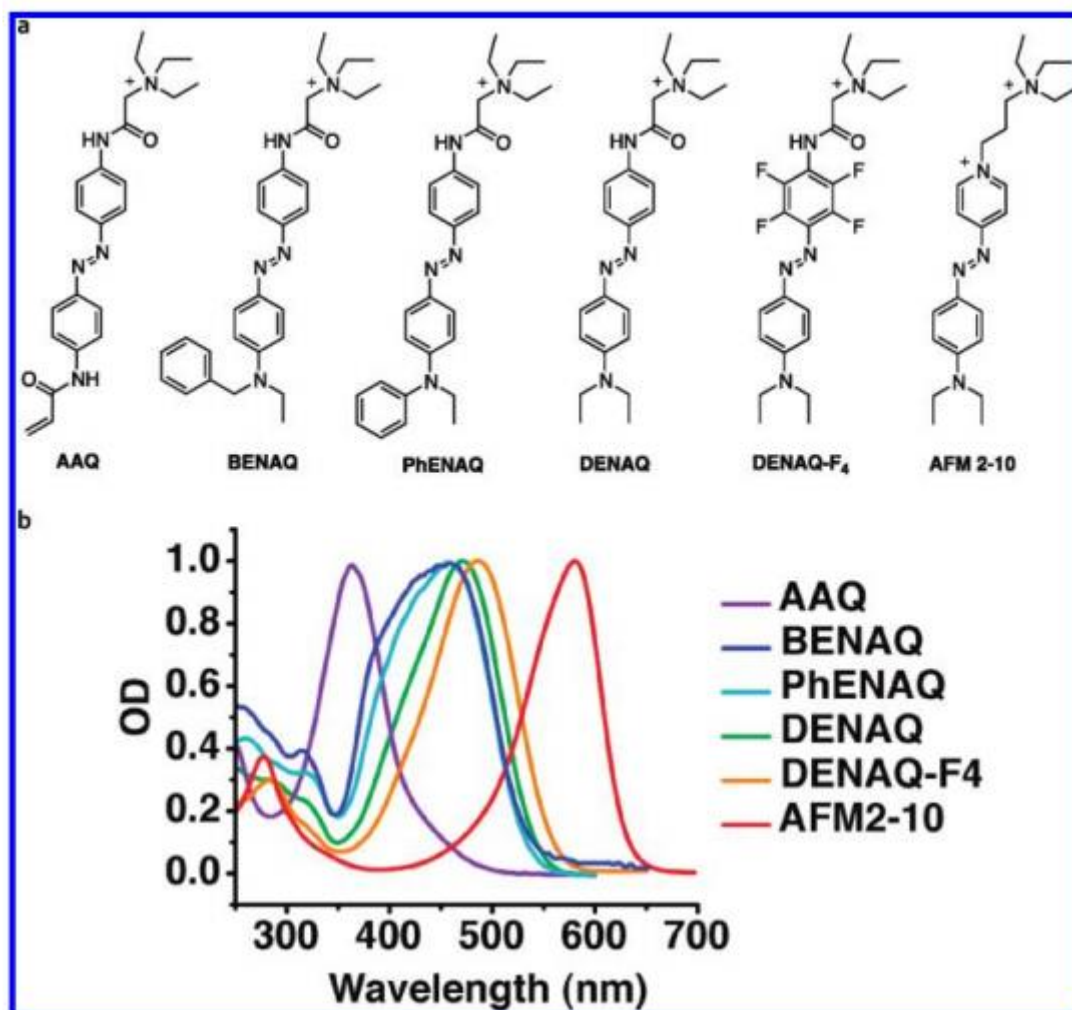


Рис.4 Различные фотохромные блокаторы калиевых каналов (a) и их спектры поглощения (b)

Для того, чтобы клетка стала фоточувствительной должно произойти два процесса: фотопереклюатель должен пройти через плазматическую мембрану внутрь клетки, после чего соединение должно присоединиться к ионному каналу. Для этого азобензолы синтезируют с использованием определенных групп.

Азобензолы применяемые в качестве блокаторов ионных каналов состоят из трех основных частей (Рис.5). Основной частью, функция которой заключается непосредственно в фотопереклюении между формами под действием света, является сам азобензол, либо его аналоги (например, гетероциклические азосоединения). Биологически активная часть отвечает за взаимодействие азобензола с клеткой и ионным каналом. В случае контроля калиевых каналов в биологически активную часть азобензола добавляют положительно заряженную группу, а именно четвертичную

аммонийную группу [2]. Заместители в азобензоле позволяют варьировать как термодинамические свойства азобензола, так и его спектральные характеристики [5].

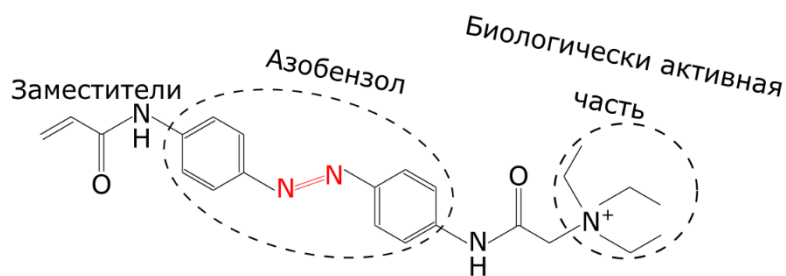


Рис.5 Основные части азобензола как блокатора ионных каналов.

Возможность управления активностью нейронов под действием света открывает широкий круг возможностей в целях фармакологии. Примером использования производных азобензола может являться применение в качестве перспективного препарата для лечения дегенеративной слепоты у людей. Данное заболевание вызывает уменьшение концентрации фоточувствительного компонента в сетчатке глаза, что приводит к потере фоточувствительности и слепоте. Исследования показали, что введение в клетки сетчатки глаза мышей соединений DENAQ и BENAQ (Рис.6) приводит к восстановлению светочувствительности ганглионарных клеток [7].

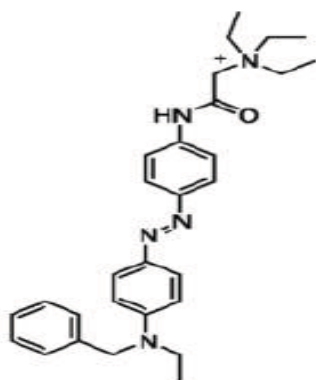


Рис.6 BENAQ.

Помимо указанных выше препаратов на основе азобензолов, существуют и другие подходы к созданию фотоконтролируемых лекарственных средств. Например, для управления нервной активностью могут применяться природные и искусственные фотоконтролируемые белки и нейромедиаторы с фотолабильной группой. Работа последних, называемых «связанными» нейромедиаторами, заключается во введении в состав дезактивирующей фотолабильной группы, которая может быть удалена при

взаимодействии со светом определенной длины волны. Примером такого препарата служит «связанный» глутамат DMNB-glu [15].

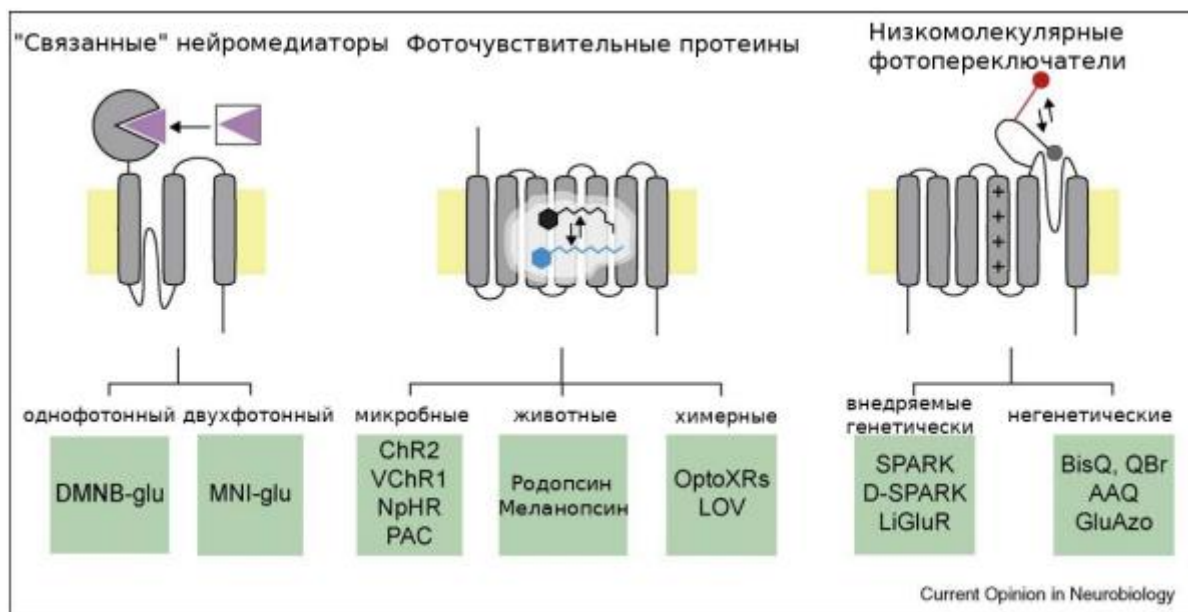


Рис.7 Подходы к фотохимическому контролю нейронной активности [15].

Другим применением фотохромных блокаторов ионных каналов является их использование для создания фотоконтролируемых анестетиков. Известно, что принцип действия анестетиков заключается в нарушении передачи импульса между нейронами нервной системы, что происходит при блокировке ионных каналов. Стоит однако учитывать, что действие данных соединений постоянно, поэтому их нельзя контролировать ни по времени, ни по месту действия. С другой стороны, анестетики легко могут проникать сквозь ткани тела, тогда как блокаторы по типу DENAQ не обладают таким свойством. Одним из способов создания фотоконтролируемых анестетиков, совмещающих в себе свойства обоих типов соединений, является процесс «азологизации». Идея данного процесса заключается в замещении определенной группы в исходном соединении на азо-группу. В качестве исходных соединений используются те, которые в своем составе содержат группы по своему строению схожие с азо-группой: стильбены, дифенилэтаны, N-бензиланилины, фенилбензиловые эфиры и другие (Рис.8). При этом у синтезируемого соединения сохраняются размеры близкие к исходным.

Примером такого соединения может быть фотокаин, который был получен из фомокаина путем замещения бензилфенильной эфирной группы на азо-группу (Рис.8) [8].

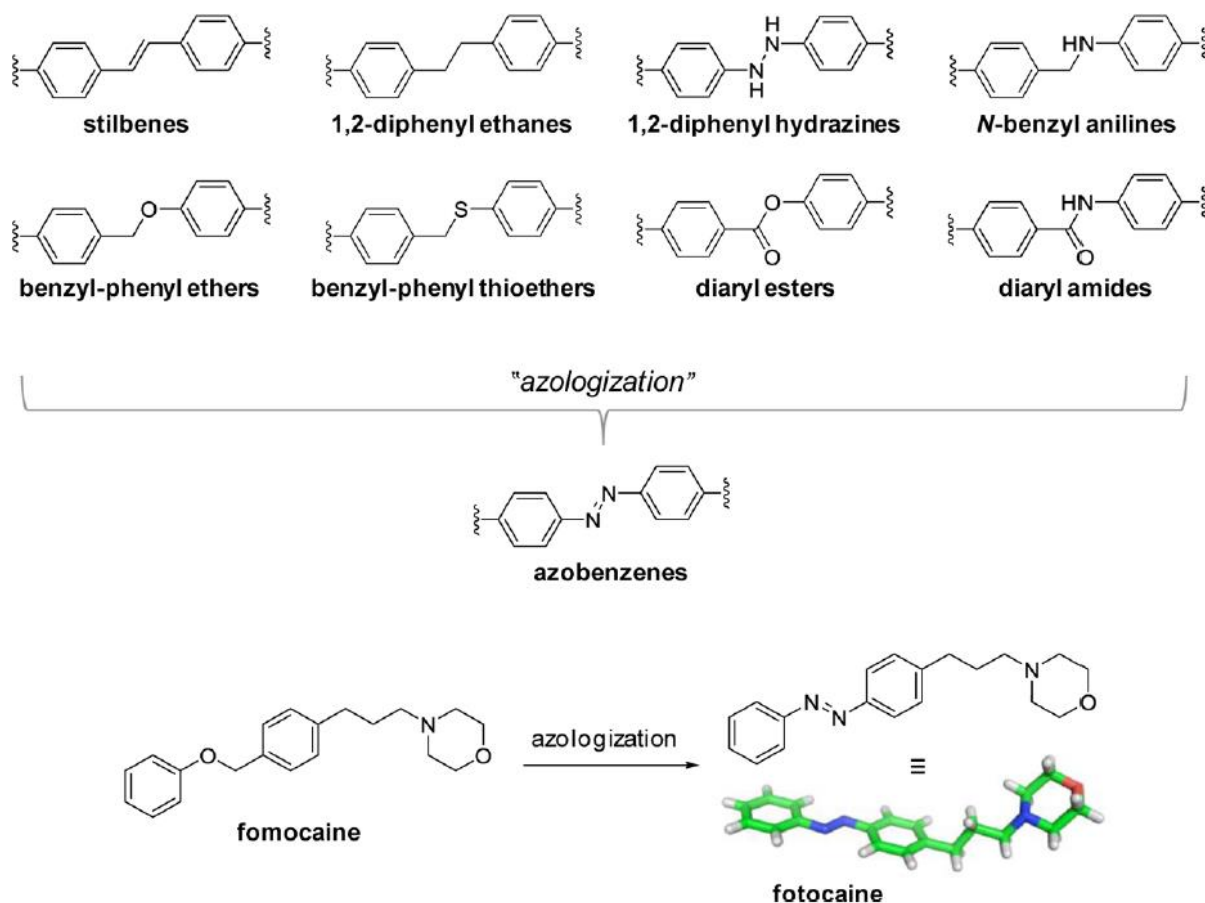


Рис.8 Иллюстрация принципа «азологизации» (вверху) и пример получения фотоконтролируемого анестетика (внизу) [8].

1.1.2 Фотоактивируемые лекарственные препараты

Одной из проблем возникающих при создании лекарственных препаратов является локализация эффекта. При попадании препарата в организм он начинает распространяться по большому объему тканей, и, в случае низкой селективности, действовать на все клетки организма, включая здоровые, что приводит к побочным эффектам. Особенно ярко данная проблема проявляется при лечении различных локализованных заболеваний, таких как очаговые инфекции и раковые заболевания.

Например, известно, что цитостатические препараты, применяемые при лечении рака, вызывают нарушение многих процессов в клетке, что приводит к ее гибели.

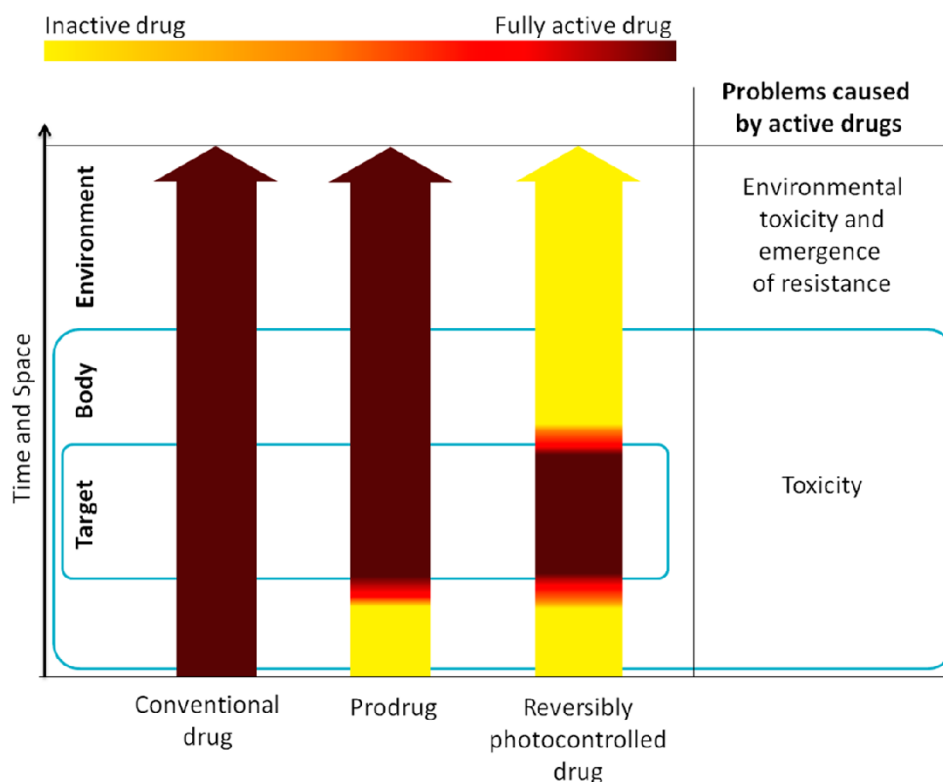


Рис.9 Биологическая активность обычных лекарств, пролекарств и фотоконтролируемых препаратов в зависимости от времени после введения и области [1].

Помимо этого, важным аспектом является селективность препарата. Чем ниже селективность препарата, тем ниже порог токсичности, что толкает к применению его в дозировках сильно ниже оптимальных.

Одним из возможных решений данной проблемы может быть использование фотоактивируемых препаратов. Как было сказано выше, данные препараты переходят в биологически активную форму под действием света с определенной длиной волны и восстанавливаются в неактивную без излучения или при облучении светом в другом диапазоне[1]. Применение фотоактивируемых препаратов позволяет улучшить селективность лекарства как в пространстве (т.е. локализовать эффект), так и по времени его действия. Создание подобных препаратов может быть построено на базе производных азобензола и его аналогов. При этом дизайн данных соединений может быть построен на различных подходах, например по принципу азологизации, который был изложен выше [8].

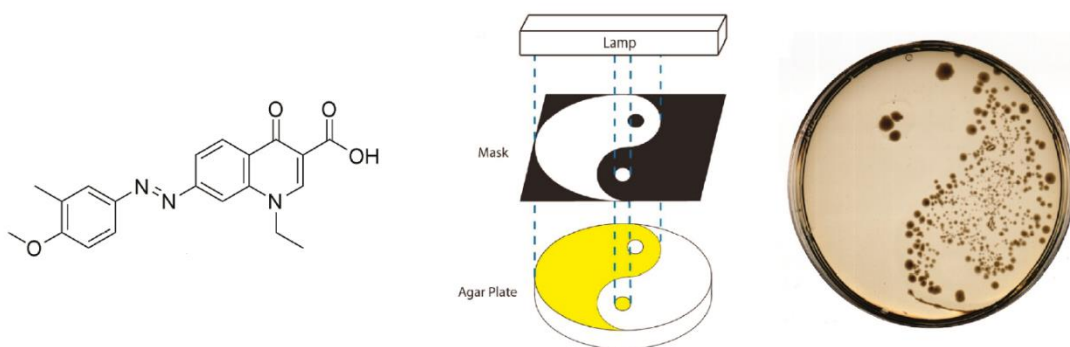


Рис.10 Пример фотоактивируемого антибиотика на основе азобензола и его действие на бактериальную культуру [1].

1.1.3 Использование фотопереклюателей для контроля биологических систем

Другим перспективным направлением использования фотохромных переключателей для контроля процессов, происходящих в живых клетках, является управление различными биомолекулами. Например, исследователям удалось управлять свойствами, в том числе транскрипцией и трансляцией, и структурой молекул ДНК. Помимо этого данные подходы могут позволить управлять активностью энзимов, изменять конформацию белка, контролировать мембранный транспорт и т.д. [9].

1.2 Влияние заместителей на спектральные и временные характеристики

При использовании фотопереклюателей необходимо знать и уметь управлять их спектральными характеристиками и временем цис-транс изомеризации. Управление спектральными характеристиками необходимо для получения соединений, которые поглощают в красной или ближней инфракрасной области спектра. Данная область характеризуется тем, что в ней ткани имеют наибольшее светопропускание, что крайне важно для целей фотофармакологии. Однако, азобензол поглощает в ультрафиолетовой области [10], где светопропускание тканей крайне низко, а само излучение фототоксично.

Возможность изменения времени цис-транс изомеризации позволяет подстраивать препарат под различные задачи, тем самым повышая его эффективность. Например, для использования соединения в качестве фотохромного блокатора ионных

каналов при контроле нейронной активности эффективнее будут действовать препараты с временами обратной изомеризации в интервале микросекунды-секунды, т.е. достаточно быстрые соединения. Напротив, при использовании соединений в качестве фотоконтролируемых препаратов следует синтезировать соединения с более долгими временами цис-транс изомеризации, а именно в интервале минуты-часы.

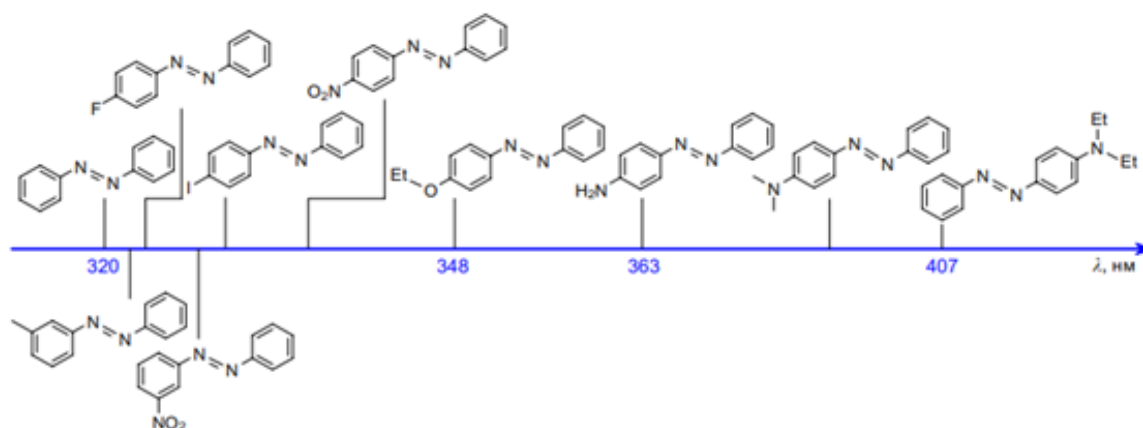


Рис.11 Зависимость положения $\pi \rightarrow \pi^*$ полосы поглощения от заместителя [23].

Так как азобензолы обладают достаточно длинной системой сопряженных кратных связей, то им характерны $\pi \rightarrow \pi^*$ переходы. Так у обеих форм азобензола имеется широкая полоса высокой интенсивности с максимумом на 281 нм для транс-формы и 320 нм для цис-формы. Помимо этого у азобензола существует слабоинтенсивная полоса в области 432 и 443 нм для транс- и цис-изомеров соответственно, которая отвечает переходам $n \rightarrow \pi^*$ [23].

Помимо положения максимума поглощения транс-формы, важно также и различие в положениях и интенсивностях полосы транс-формы и полосы цис-формы. Как было указано ранее, обратная изомеризация может проходить как термически, так и под действием света, соответствующего полосе неустойчивой формы. Если полосы перекрываются, то можно достичь лишь некоторого равновесия в системе, так как поглощение света будет двигать систему в обе стороны. Если же требуется достичь высокой концентрации неустойчивой формы, например при использовании препарата в качестве цитостатического, то необходимо добиться максимального разрешения полос цис- и транс-форм.

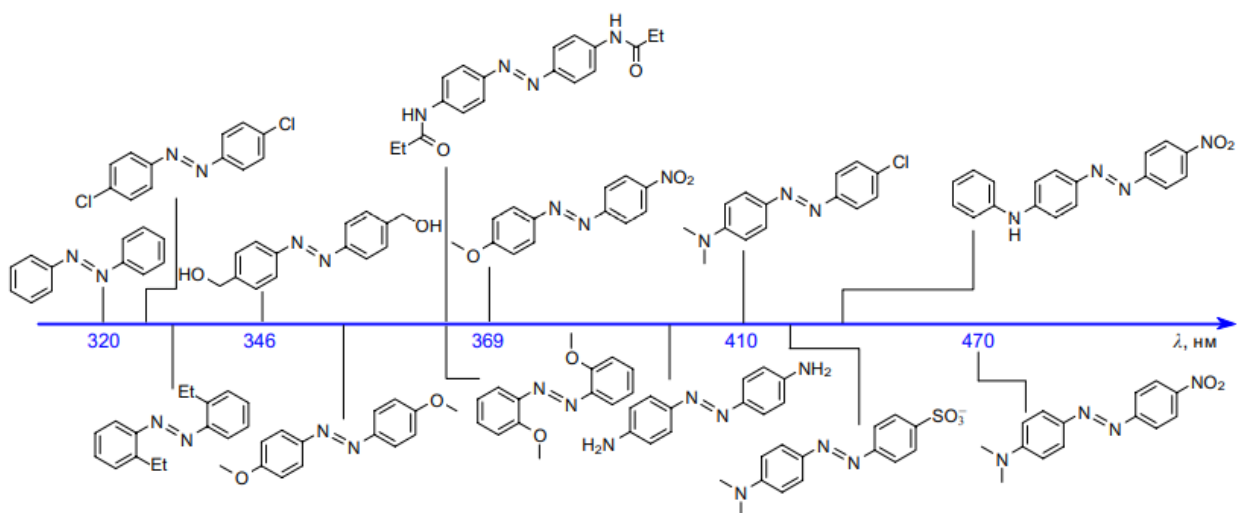


Рис.12 Влияние заместителей на положение $\pi \rightarrow \pi^*$ полосы в электронных спектрах поглощения симметричных производных азобензола [23].

Получение соединений, поглощающих в красной области спектра, может быть осуществлено с использованием различных подходов в дизайне молекул. Одним из распространенных подходов является синтез соединений, которые называются push-pull азобензола. Данные соединения отличаются тем, что в разных частях молекулы (обычно в обоих пара положениях) располагаются электрон-донорные и электрон-акцепторные группы (название «push-pull» или «тяги-толкай» основано на разном влиянии групп на электронную плотность). Примером такого соединения является DENAQ, исследуемый в данной работе (Рис.13). Соединения push-pull обычно обладают короткими временами цис-транс изомеризации и поглощением около 400 - 500 нм. Однако данные соединения обладают высокой поляризованностью, из-за чего их спектральные и термодинамические характеристики сильно зависят от полярности растворителя.

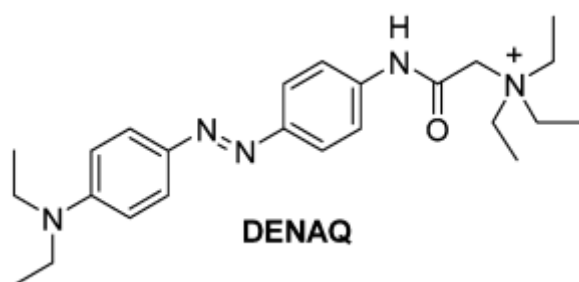


Рис.13 DENAQ, как пример push-pull соединения.

Для того, чтобы замедлить времена цис-транс изомеризации применяют подход, который заключается во введении в орто-положения обоих бензольных колец электрон-донорных групп (метокси-, хлоро-, amino- и т.д.). Данные группы создают стерическую заторможенность, что позволяет увеличить времена жизни неустойчивой формы.

Другим подходом для сдвига поглощения в длинноволновую область является создание соединений на основе C2-мостиковых азобензолов. Данные соединения интересны не только сдвигом полосы поглощения, но также и тем, что стабильной формой для них является цис-форма. Скорость изомеризации данных соединений достаточно низка. При этом C2-мостиковые азобензолы обладают очень высоким разделением полос цис- и транс-форм, что вкупе с низкими скоростями обратной изомеризации позволяет практически количественно переводить соединение в каждую из форм [5].

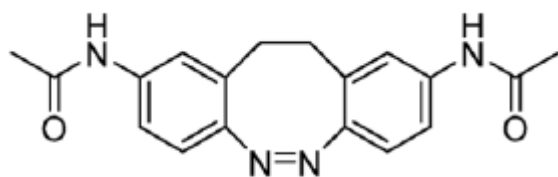


Рис.14 Пример C2-мостикового азобензола [5].

Для получения фотопереключателей на основе азобензолов, обладающих высокими скоростями цис-транс изомеризации, используют подход, заключающийся в использовании гетероциклов. Использование обедненных π -электронной плотностью гетероциклов, таких как пиримидиновые или пиридиновые, позволяет получить соединения с временами цис-транс изомеризации порядка сотен наносекунд [11].

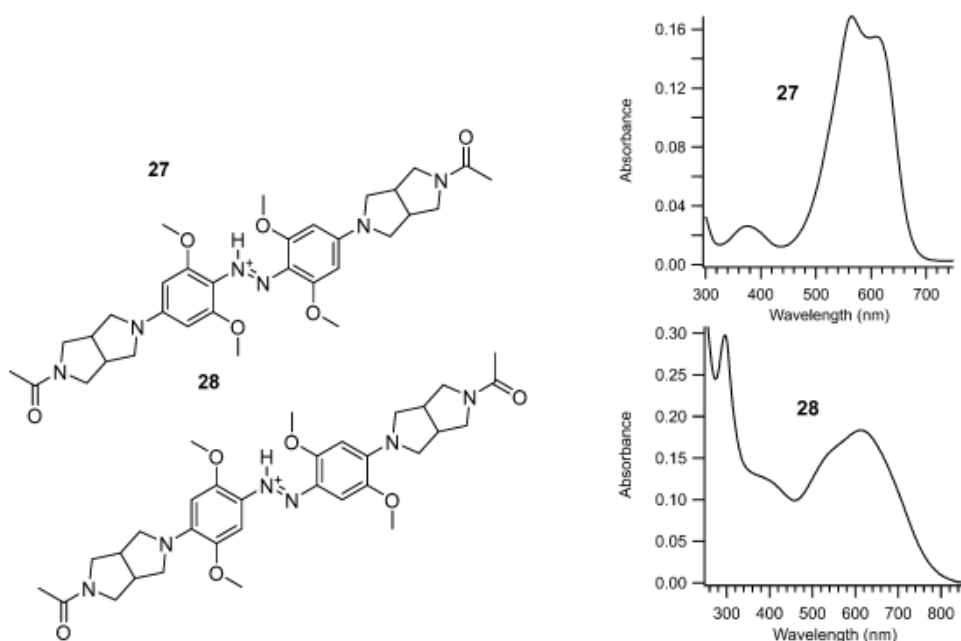


Рис.15 Поглощающие в красной и ближней-ИК области азобензолы и их спектры поглощения.

Еще одним подходом для синтеза молекул с красным сдвигом полосы поглощения является создание препаратов протонированных по азогруппе. Азобензол является достаточно слабым основанием, однако введение различных заместителей может привести к изменению кислотно-основных свойств [23]. Примеры соединений, протонированных по азо-группе были получены в соединениях орто-замещенных метокси и аминогруппами. Так, например, было показано, что введение во все четыре положения аминогрупп, позволяет получить высокую концентрацию протонированной формы E-изомера азониевого катиона уже при физиологических значениях кислотности среды [16].

Помимо протонирования атомов азота в азо-группе, протонирование других гетероатомов в молекуле также может приводить к смещению полосы поглощения в красную область, однако, это может приводить к ухудшению спектральных и термодинамических характеристик фотопереклювателя. Так например был получен переключатель на основе гетерокаркаса с имидазолом, который при pH=9 показал хорошее разделение полос поглощения E- и Z-форм и время изомеризации около 16 с, что позволило получить устойчивое фотостационарное равновесие и возможность обратного фотопереключения на другой длине волны. Однако, уже при

физиологических значениях кислотности среды данные эффекты пропадают и увеличивается перекрытие полос изомеров [17].

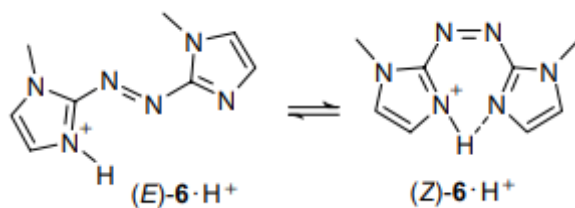


Рис.16 Фотопереключатель на основе гетерокаркаса с имидазолом.

1.3 Устойчивость соединений в организме

Важным свойством препаратов на основе азобензолов, как и любых других препаратов, является их устойчивость в клеточном окружении. Для фотохромных переключателей, данный параметр становится особенно важным ввиду того, что процессы окисления-восстановления соединения в клеточной среде могут приводить к изменению как спектральных характеристик молекулы, так и к изменению термодинамических свойств молекулы. Это вкуче с изменением структуры приводит к изменению биологической активности молекулы [23].

Примером таких процессов может быть один из первых противомикробных препаратов -Пронтозил. Который является прекурсором к образованию действующей сульфаниламидной активной формы, образующейся путем восстановления азо-группы.

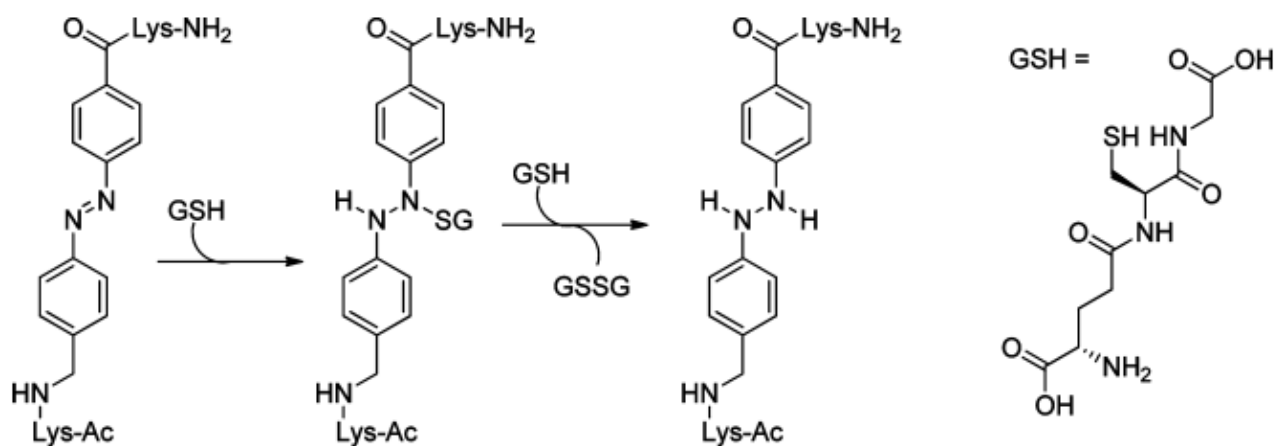


Рис.17 Процесс восстановления азобензола глутатионом [1].

Одним из известных процессов, протекающим в клеточной среде, является процесс восстановления азобензола глутатионом. Внутриклеточная среда содержит до 10 ммоль/л глутатиона. Было показано, что механизм восстановления глутатионом включает в себя две стадии. Первая заключается в атаке атомом серы азогруппы с образованием сульфенилгидразидного производного, который во второй стадии претерпевает присоединение второй молекулы глутатиона с образованием 1,2-диарилгидразина и окислением молекулы глутатиона. Полученное производное может далее окисляться обратно до азосоединения из-за гидролиза в случае недостатка глутатиона [1].

Данный процесс может быть уменьшен путем направленного синтеза молекулы, а именно путем введения электронодонорных заместителей во все орто-положения соединения. Используемыми группами могут быть тиольные, метоксигруппы [16] и атомы хлора и фтора. Другим подходом является введение объемных аминогрупп в орто-положения. Принципиально другим подходом является использование гетероциклических аналогов, что позволяет увеличить электрононасыщенность азосоединений [23].

Куда менее изученным процессом является восстановление азосоединений в ходе ферментативных реакций. В живых организмах этот процесс каталируется системой азоредуктаза-никотинамидадениндинуклеотидфосфат [20]. Либо с использованием микроорганизмов кишечника, что важно при метаболизме пероральных препаратов на основе производных азобензола [21].

Раздел 2 Экспериментальная часть

2.1 Методы разностной спектроскопии высокого временного разрешения

Методами разностной спектроскопии называют группу методов в основе которых лежит измерение величины разностного поглощения как функции от длины волны поглощаемого света λ и временной задержки t : $\Delta A(\lambda, t) = A(\lambda, t)_{\text{облуч}} - A(\lambda)_{\text{необлуч}}$, где $A(\lambda)_{\text{необлуч}}$ – спектр поглощения образца, $A(\lambda, t)_{\text{облуч}}$ – поглощение образца через время t после возбуждения светом. Физический смысл разностного спектра описывается как спектр вещества после фотовозбуждения (это может быть как спектр возбужденного состояния, так и спектр продуктов фотореакции) за вычетом спектра основного состояния вещества (реагентов) [24].

Поглощение фотона сопровождается переходом вещества в возбужденное состояние, из которого вещество может релаксировать. Процесс релаксации вещества может проходить как с испусканием фотона (например, в случае флуоресценции или фосфоресценции) так и термически (т.е. с переходом энергии в тепло, как, например, в случае внутренней конверсии). Различные процессы перехода обладают различными скоростями и, соответственно, различными временами перехода. Примеры различных процессов и их времен перехода представлены в таблице 1.

Табл.1 Некоторые процессы, происходящие после фотовозбуждения и их времена [25]

<i>Процесс</i>	<i>Время, с</i>
Внутренняя конверсия	10^{-7} - 10^{-13}
Флуоресценция	10^{-7} - 10^{-9}
Интеркомбинационная конверсия	10^{-8} - 10^{-13}
Фосфоресценция	10^1 - 10^{-1}
Фотохимические реакции	-

Методы разностной спектроскопии временного разрешения позволяют изучать широкий круг как различных физических процессов (внутренняя и интеркомбинационная конверсия), так и химические процессы, например, фотохимические реакции. При этом возможно измерение в различных диапазонах длин

волн, что позволяет изучать различные процессы. Диапазон частот лежит от инфракрасной области (колебательная спектроскопия поглощения) до рентгеновской (спектроскопия поглощения XANES). Существует два принципиально разных подхода при измерении спектров разностного поглощения: метод флеш-фотолиза и метод возбуждение-зондирование [24].

2.1.1 Флеш-Фотолиз

В 1949 году был впервые показан метод флеш-фотолиза. Метод заключается в возбуждении образца коротким высокоинтенсивным импульсом с последующим зондированием образца излучением слабой интенсивности. Зондирование образца может проходить с использованием двух подходов: фотографический, который заключается в том, что импульс зондирования следует сразу за более интенсивным импульсом возбуждения, и фотоэлектрический - при использовании которого для измерения применяется постоянное излучение на одной длине волны. В исследованиях чаще применяют последний метод [25]. Метод флеш-фотолиза обладает временным диапазоном от $5 \cdot 10^{-9}$ до 10^{-3} с, что позволяет исследовать многие процессы (см. табл. 1). Пример принципиальной схемы установки для флеш-фотолиза представлен на рисунке 18.

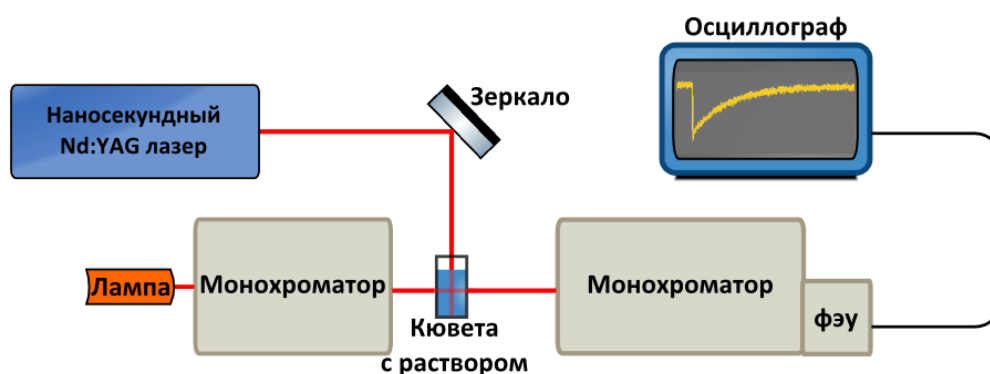


Рис.18 Пример установки для флеш-фотолиза.

Источником зондирующего излучения обычно выступают источники широкого спектра, такие как, например, ксеноновые дуговые лампы. В качестве источника возбуждающего излучения в современных исследованиях обычно применяют

наносекундные импульсные лазеры, однако, в первых исследованиях с использованием данного метода применялись высокоинтенсивные лампы-вспышки. Импульс от лазера вызывает модуляцию интенсивности зондирующего излучения, при пересчете которой в единицы разностного поглощения при сканировании различных длин волн, можно получить разностное поглощение в виде функции от длины волны зондирующего излучения и времени после возбуждения.

В качестве детектора для УФ и видимой области спектра используют фотоэлектронные умножители и фотодиоды. Использование данных детекторов позволяет проводить измерения с временным разрешением до единиц наносекунд [24].

2.1.2 Метод возбуждение-зондирование

Метод возбуждение-зондирование имеет схожий принцип с методом флеш фотолиза, но в отличие от последнего, где зондирование производится источником постоянного излучения, в данном методе и возбуждение и зондирование происходит двумя короткими импульсами (фемтосекундный-пикосекундный). Зависимость разностного поглощения от времени в данном случае получается при сканировании времен задержки между импульсами возбуждения и зондирования.

Для того, чтобы варьировать временную задержку между импульсами возбуждения и зондирования используют трансляционную линию (которая называется линией задержки), на которую установлен уголкового отражателем. Перестройка времени задержки происходит путем изменения расстояния, которое проходит импульс зондирования. На пути импульса возбуждения устанавливают блокирующую заслонку, которая не пропускает каждый второй импульс, что позволяет измерять разностное поглощение как:

$$\Delta A = -lg \frac{I}{I_0},$$

где I_0 -сигнал без импульса возбуждения, I -сигнал после импульса возбуждения.

Принципиальная схема установки метода возбуждение-зондирование показана на рисунке 19.

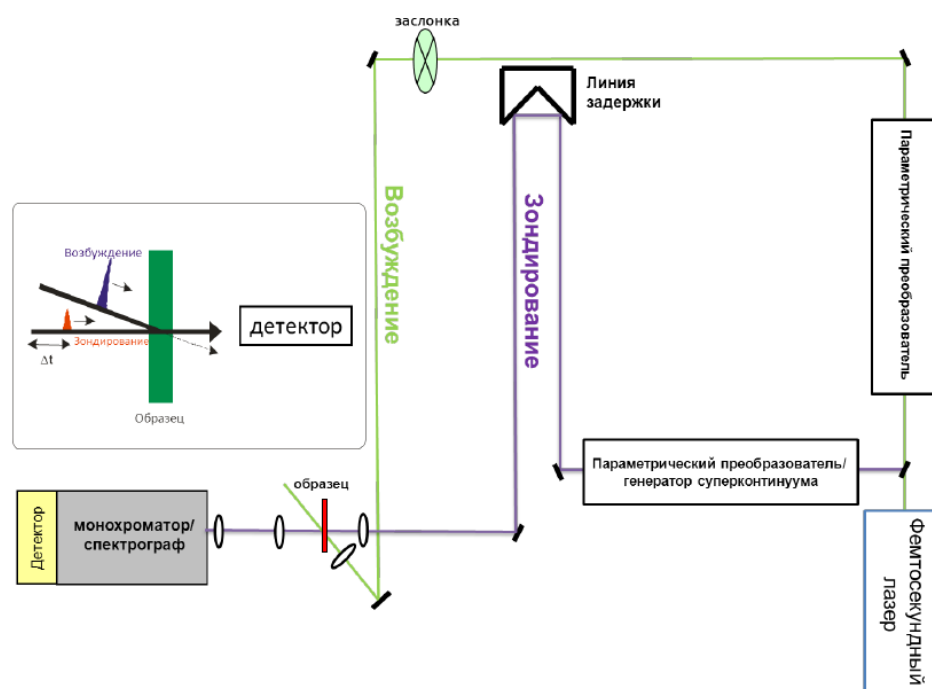


Рис.19 Принципиальная схема установки для метода возбуждение-зондирование.

В классической схеме прибора для регистрации спектра используют оптические преобразователи света, но также часто можно встретить приборы построенные на использовании суперконтинуума (спектрально уширенная полоса лазера), который получают при фокусировке импульса от фемтосекундного лазера в нелинейном кристалле (CaF_2 , LiF, сапфир). Использование комбинации монохроматор-диодная линейка позволяет в таком случае регистрировать разностное поглощение одновременно на большом значении длин волн. Использование одного фотодиода или ФЭУ требует сканирования как по длинам волн поглощения, так и по временам задержки, что значительно увеличивает время проведения эксперимента.

Метод возбуждение-зондирование позволяет изучать процессы происходящие за времена от десятков фемтосекунд до сотен пикосекунд. Такой диапазон времен позволяет изучать ход реакции и в том числе движение волнового пакета по поверхностям потенциальной энергии электронных состояний [24].

2.2 Методы и материалы

2.2.1. Подготовка растворов

Водные растворы веществ готовились в дистиллированной воде. Значение рН среды достигалось добавками соляной кислоты или гидроксида калия. Контроль рН осуществлялся с использованием рН-метра (Аквилон рН-420) со стеклянным электродом.

Ацетонитрил использовался 1 сорта (Криохром).

После приготовления раствора, он отстаивался и отфильтровывался для удаления возможной взвеси.

Для проведения фотометрического титрования готовился раствор с концентрацией порядка 30-50 мкМ (значение оптической плотности 0.6-1) объемом 50 мл. Раствор разделялся на две равные части и оттитровывался добавками по 2-20 мкл соляной кислоты и раствора гидроксида калия отдельно в кислую и щелочную область, соответственно. При построении спектров вводилась поправка на разбавление.

При измерении спектров комбинационного рассеяния растворы готовились аналогично указанному выше. Объем раствора 10-20 мл, концентрация 100-200 мкМ.

Для проведения электрохимических измерений 1 мМ раствор готовился путем растворения навески 11.2 мг DENAQ в 25 мл 0.1М раствора хлорида калия. Изменение рН проводилось аналогично указанному выше.

2.3 Используемые методы

2.3.1 Установка для флеш-фотолиза

В данной работе применялась установка для флеш-фотолиза представленная на рисунке 18. Источником возбуждающего излучения является Nd:YAG наносекундный лазер LF-117 (SOL Instruments) с длинами волны 355 и 532 нм. Частота следования импульсов – 10 Гц, длительность импульса 7-10 нс. Энергия импульса составляла 10 и 20 мДж для длин волн 355 и 532 нм, соответственно. В качестве источника зондирующего излучения применялась ксеноновая дуговая лампа (AvaLight-HAL, Avantes). Перед кюветой луч зондирования проходил через монохроматор. Диапазон

сканируемых длин волн составлял 360-650 нм. Лучи возбуждения и зондирования пересекались в кювете 10x10мм с образцом под углом 90°. Диаметр лучей составлял около 8мм. После кюветы луч зондирования проходил через монохроматор и попадал на фотоэлектронный умножитель (Hamamatsu R-2949), подключенный к осциллографу (Tektronix, 300 MHz).

Подбор длины волны возбуждающего импульса осуществлялся на основании стационарных спектров поглощения. Для проведения исследований использовались растворы со значением оптической плотности, лежащей в пределах 0.6-1. Из полученных кинетик были получены значения среднего времени жизни возбужденного состояния τ по уравнению $\frac{N}{N_0} = e^{-t/\tau}$.

Для определения энергий активации находились времена жизни возбужденного состояния на длине волны максимума поглощения в интервале температур от 20-25 до 55-60°C. В соответствии с уравнением Аррениуса, из наклона прямой графика, построенного в координатах $\lg k - 1000/T$, находили значение энергии активации.

2.3.2 Спектрофотометр

Стационарные спектры поглощения были сняты с использованием однолучевого спектрофотометра Аквилон СФ-103 в 1 см кварцевых кюветах на интервале 200-800 нм. Спектральное разрешение 1 нм.

2.3.3 Спектроскопия комбинационного рассеяния

Спектры комбинационного рассеяния были сняты в 1 см кварцевых кюветах с использованием спектрометра комбинационного рассеяния Horiba Jobin-Yvon LabRam HR800. Длина волны лазерного излучения - 488 нм, мощность – 20 мВт, диапазон частот – 2500-80 см⁻¹, количество сканирований – 40, время накопления – 40 с, дифракционная решетка – 1800 ш/см.

2.3.4 Циклическая и дифференциальная вольтамперометрия

Работа проводилась в герметичной виале объемом 20 мл. Объем раствора 10 мл. Для проведения эксперимента использовалась установка Metrohm Autolab PGSTAT12

с трёхэлектродной ячейкой. Рабочий электрод выполнен из стеклоуглерода, электрод сравнения-хлорсеребряный ($\text{Ag}|\text{AgCl}(\text{KCl} \text{ нас.})$), вспомогательный электрод-платиновый.

Виала с раствором продувалась 10 минут аргоном перед каждым измерением. После этого снимались дифференциальные вольтамперограммы и циклические вольтамперограммы со скоростями развертки 50, 75, 100, 200, 500, 750, 1000, 1500 и 2000 мВ/с. В качестве значения истинного потенциала для дифференциальной вольтамперограммы использовалось значение анодного пика (рис.2).

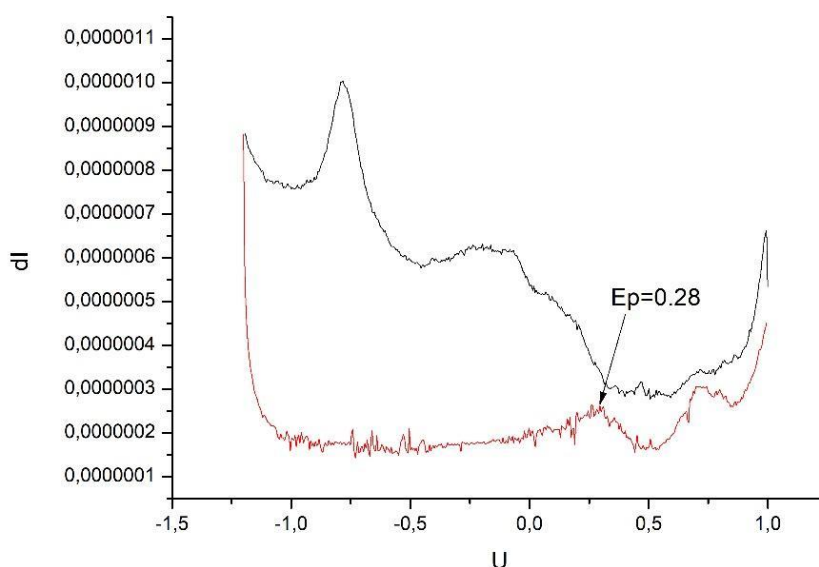


Рис.20 Дифференциальная вольтамперограмма DENAQ при $\text{pH}=7.5$. E_p – значение истинного потенциала.

Значение истинного потенциала для ЦВА находили путем построения значений анодного и катодного потенциалов в координатах $E-\lg v$, где v скорость развертки в мВ/с. Линейные участки (полученные при высоких скоростях развертки) аппроксимировались линейно. По точке пересечения прямых находили значение истинного потенциала (рис.3).

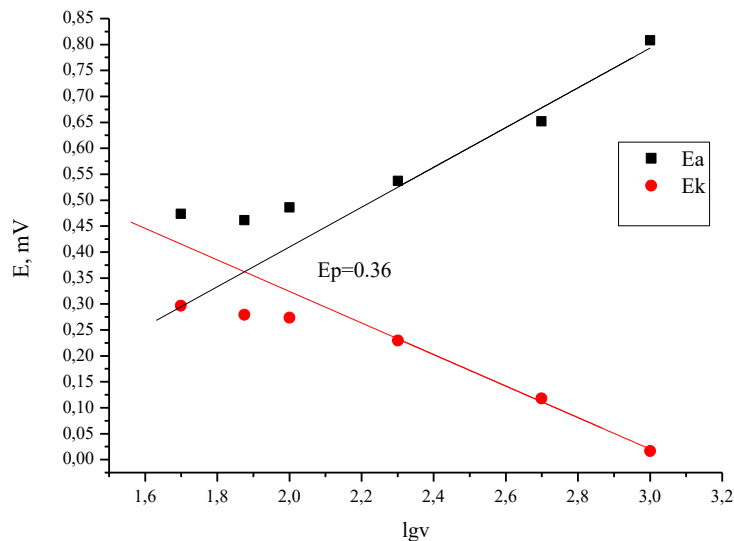


Рис.21 Нахождение истинного потенциала.

2.3.5 Квантово-химические расчеты

Квантово-химические расчеты, проведенные в нашей группе, были выполнены с использованием методов: CAM-B3LYP/6-311++g(d,p)//B3LYP/6-31g(d)

Расчет свободной энергии образования протонированных форм выполнен с использованием методов: M11/cc-pVDZ//M11/cc-pVDZ

Расчет колебательных спектров соединений проводился с использованием методов: B3lyp/6-311g(d,p)//B3lyp/6-311g(d,p)

Раздел 3 Обсуждение результатов

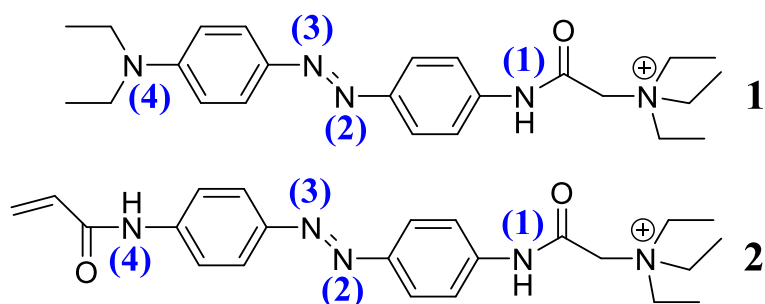


Рис.22 DENAQ (1) и AAQ (2). Цифрами указаны атомы азота, по которым может проходить протонирование.

В ходе данной работы были измерены стационарные спектры поглощения водных растворов соединений DENAQ(1) и AAQ(2) при разных значениях кислотности среды.

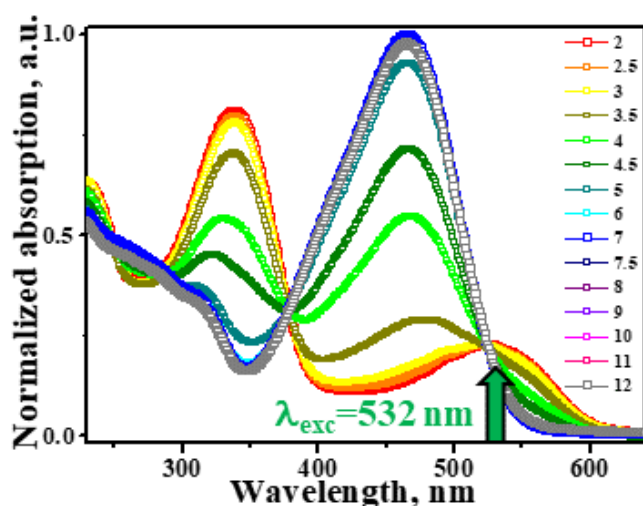


Рис.23 Стационарные спектры поглощения при разных значениях pH для DENAQ

При рассмотрении спектров видно, что у соединения DENAQ в нейтральной и щелочной среде присутствует интенсивная полоса с максимумом 470нм. Форма полосы имеет небольшое плечо, что может говорить о сосуществовании нескольких форм соединения. Спектр поглощения в целом не изменяется вплоть до pH=5, а затем, при понижении значения кислотности среды, основная полоса поглощения сдвигается к 350нм и образуется полоса меньшей интенсивности на 540 нм. При этом на спектре находятся изобестические точки на 213, 250, 285, 378 и 524 нм, разделяющие полосы

поглощения разных форм при переходе от одной кислотности среды к другой. Столь критическое изменение спектра поглощения видно невооруженным глазом, т.к. цвет раствора в кювете резко изменяется от оранжевого (в щелочной и нейтральной среде) до ярко-фиолетового (в кислой). Смещение полос поглощения говорит о протонировании соединения, а сосуществование двух полос может говорить о сосуществовании двух протонированных форм. Также о сосуществовании двух форм может говорить наличие плеча на полосе поглощения в щелочной и нейтральной среде.

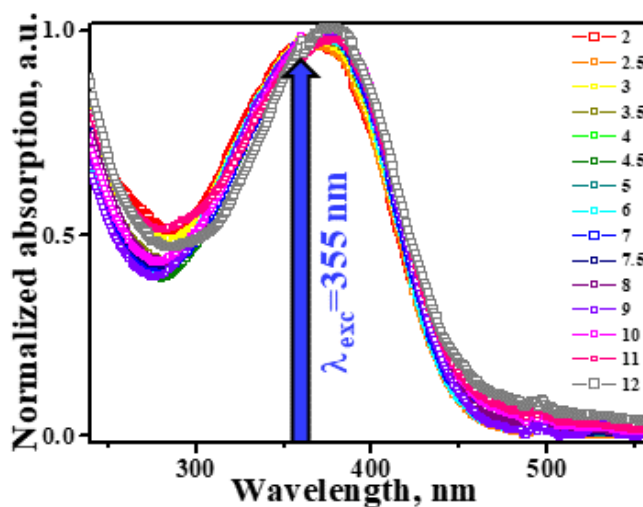


Рис.24 Стационарные спектры поглощения при разных значениях рН для AAQ

Для соединения AAQ максимум поглощения находится на 370 нм и не сдвигается на всем диапазоне кислотности среды. Форма полосы поглощения правильная. Отсутствие изменений в форме и положении спектра говорит об отсутствии процессов протонирования соединения.

Для подтверждения нашего предположения были рассчитаны значения свободной энергии образования протонированных транс-форм. При этом видно, что энергия образования протонированной формы для соединения DENAQ находится сильно ниже по энергии чем для соединения AAQ. При рассмотрении энергий образования дипротонированных форм соединения DENAQ видно, что формы протонированные по позициям (3) и (4) и по позициям (2) и (4) находятся близко по энергии, что подтверждает наше предположение о сосуществовании двух форм при кислых рН.

Табл.2 Электронные переходы, силы осциллятора, энергия связи N-H и длина связи N-N непротонированных и возможных протонированных форм DENAQ (1) и AAQ (2) рассчитанные различными.

		λ_{\max} (nm), (сила осциллятора)		Энергия связи (kcal mol ⁻¹) ^a	Длина связи N-N (Å)
		NEVPT2/6- 31g*/M11/cc-pVDZ	SAM-B3LYP/6- 31++g(d,p)//B3LYP/6-31g*		
DENAQ (1)	Unprot.	389 (0.82)	398 (1.57)	0.00	1.246
	(2)	438 (0.62)	428 (1.56)	-17.1	1.272
	(3)	457 (0.57)	498 (1.53)	-23.3	1.249
	(4)	312 (0.21)	321 (1.28)	-23.5	1.242
	(2)/(3)	564 (0.12)	488 (0.42)	-14,1	1.345
	(2)/(4)	322 (0.28)	402 (1.60)	-28.7	1.250
	(3)/(4)	326 (0.37)	398 (1.40)	-30.7	1.240
AAQ (2)	Unprot.	287 (0.30)	377 (1.70)	0.00	1.244
	(2)	453 (0.30)	474 (1.70)	-14.6	1.250
	(3)	413 (1.41)	486 (1.70)	-13.5	1.246

^aЭнергии образования протонированных форм рассчитывались как $(E_{prot} + E_{H_2O}) - (E_{trans} - E_{H_3O^+})$.

При сопоставлении данных полученных экспериментально и результатов квантовохимических расчетов можно сделать ряд выводов. Полоса поглощения DENAQ с максимумом на 470 нм может быть отнесена к полосе поглощения соединения протонированного по 3му атому азота. Полосы 328 и 528 нм, которые появляются при значениях кислотности среды ниже рН=5, могут быть отнесены к соединениям протонированным дважды (2)-(3) и (3)-(4), соответственно. Полоса 370 у AAQ может быть отнесена к непротонированной форме.

Данное предположение, о сосуществовании в кислой среде форм (2)-(3) и (3)-(4), подтверждается при анализе спектра поглощения соединения DMNAQ, которое отличается от DENAQ метильными группами при атоме азота в аминогруппе.

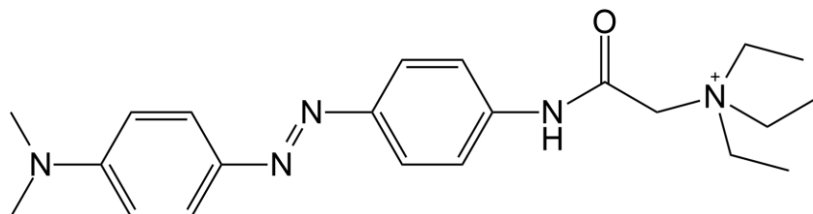


Рис.25 DMNAQ.

Протонирование соединения с образованием азониевого катиона также хорошо объясняет значительное увеличение растворимости соединения по сравнению с AAQ.

При сравнении спектров соединений DENAQ и DMNAQ в кислой среде видно, что интенсивности коротковолновой и длинноволновой полос инвертированы. Данный факт может быть объяснен более сильным индуктивным эффектом этильных групп.

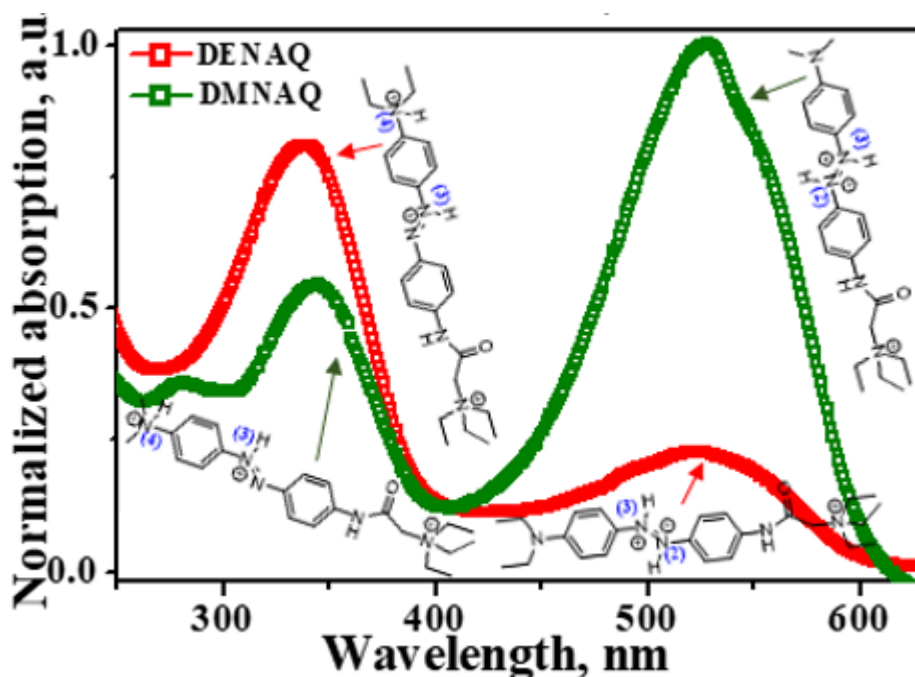


Рис.26 Сравнение спектров поглощения соединений DENAQ и DMNAQ в кислой среде.

Далее нами были изучены времена цис-транс изомеризации для данных соединений с использованием метода флеш-фотолиза. Пример кинетики, получаемой в ходе эксперимента представлен на рисунке 27. Все кинетики, не зависимо от кислотности среды и их типа (положительная или отрицательная), обладают моноэкспоненциальной зависимостью, что говорит о протекании одного процесса и об отсутствии процессов димеризации (при наличии процессов димеризации форма кинетики меняется).

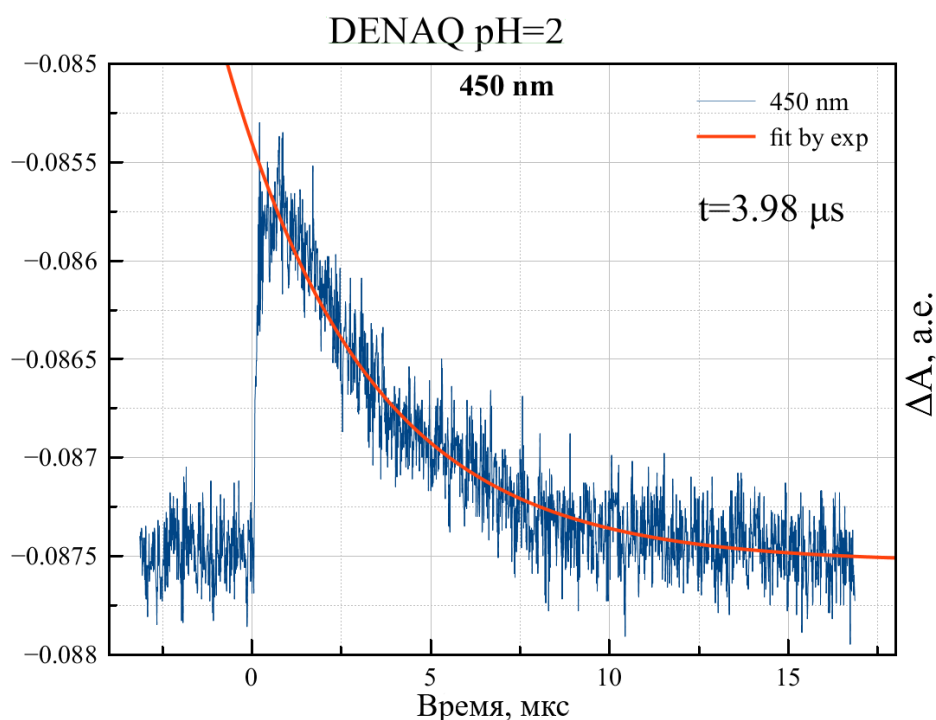


Рис.27 Пример получаемой кинетики.

Времена цис-транс изомеризации представлены в таблице 2.

Табл.2 Времена цис-транс изомеризации соединений AAQ и DENAQ, мкс.

	$\tau_{iso}, \mu s$			
	pH 2	pH 7	pH 12	Ацетонитрил
DENAQ (1)	1.5 ± 0.6	120.0 ± 3.0	$45.0 \pm 0.3 \times 10^3$	$66 \pm 5 \times 10^3$
AAQ (2)	$7.9 \pm 0.3 \times 10^3$	$8.0 \pm 0.4 \times 10^3$	$48 \pm 3 \times 10^3$	$50 \pm 7 \times 10^3$

Ускорение процесса цис-транс изомеризации DENAQ можно объяснить исходя из значений длины связи N-N в азогруппе и её изменении при протонировании. Длина связи для непротонированной формы составляет 1.246 Å. При протонировании по 3 положению происходит увеличение длины связи до 1.249 Å из-за её перехода в «полуторное» состояние, которое увеличивается еще больше при втором протонировании.

Помимо стационарных спектров поглощения, нами были измерены разностные спектры поглощения для соединений AAQ и DENAQ. Аналогично стационарным спектрам, для DENAQ спектры аналогичны при pH=12 и pH=7 и меняется при понижении кислотности среды. Для AAQ спектр сохраняется во всем диапазоне pH.

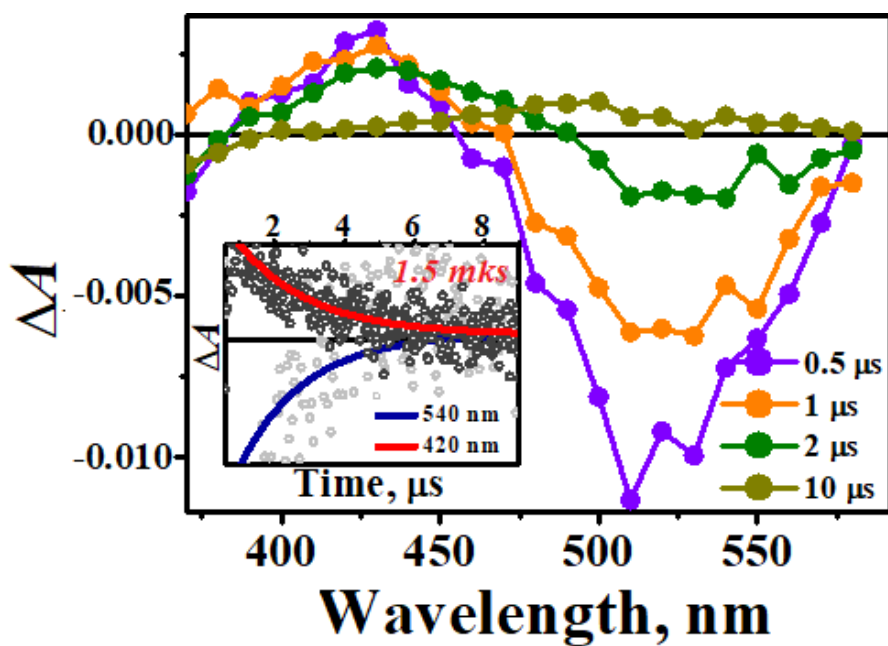


Рис.28 Разностный спектр и кинетики для DENAQ при pH=2.

При pH=2 разностный спектр DENAQ состоит из полосы с максимумом 425 нм и двух отрицательных сигналов в диапазоне 360-370нм и 520 нм.

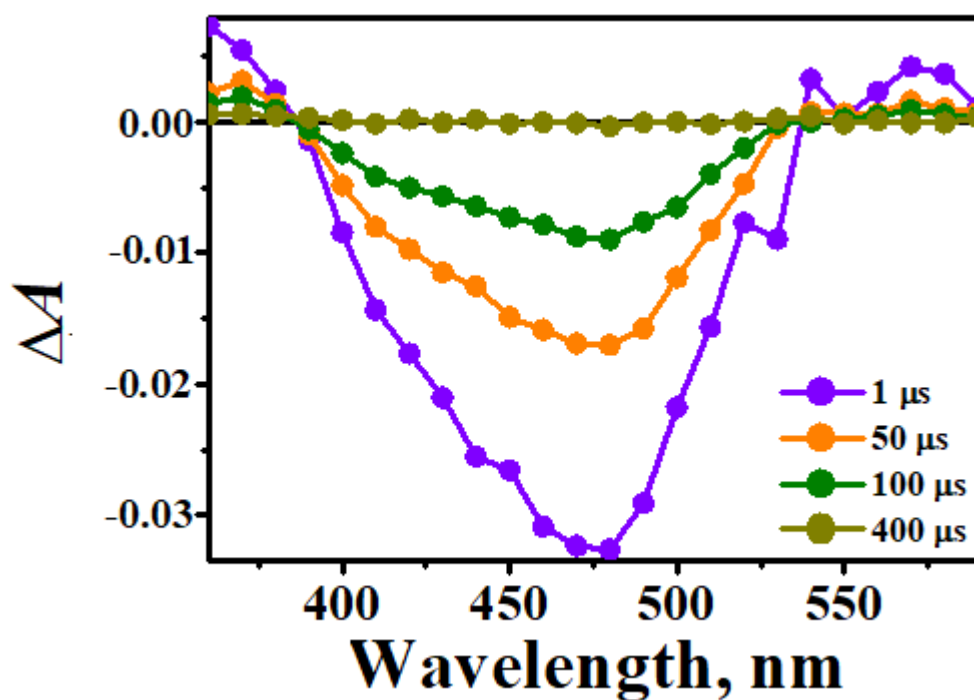


Рис.29 Разностный спектр DENAQ при pH=7.

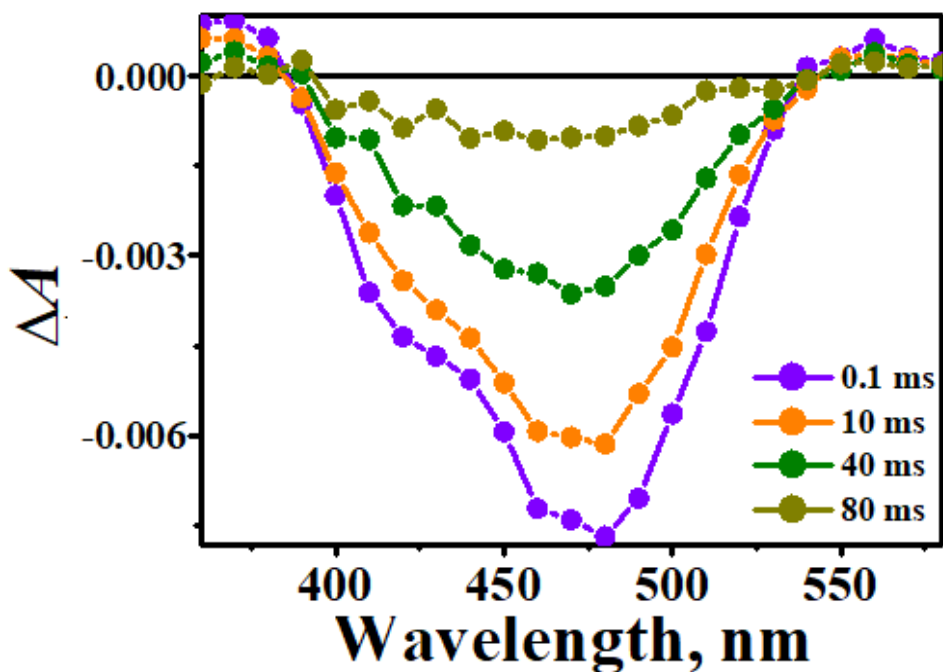


Рис.30 Разностный спектр DENAQ при pH=12.

Как было указано выше при нейтральной и щелочной реакции среды, разностные спектры DENAQ идентичны и содержат широкую полосу с отрицательным сигналом и минимумом на 470 нм и два слабых положительных сигнала на интервалах 360-380 и 545-575 нм. Положительные сигналы могут быть отнесены к поглощению неустойчивой цис-формы соединения, а отрицательный сигнал соответствует уменьшению концентрации транс-формы.

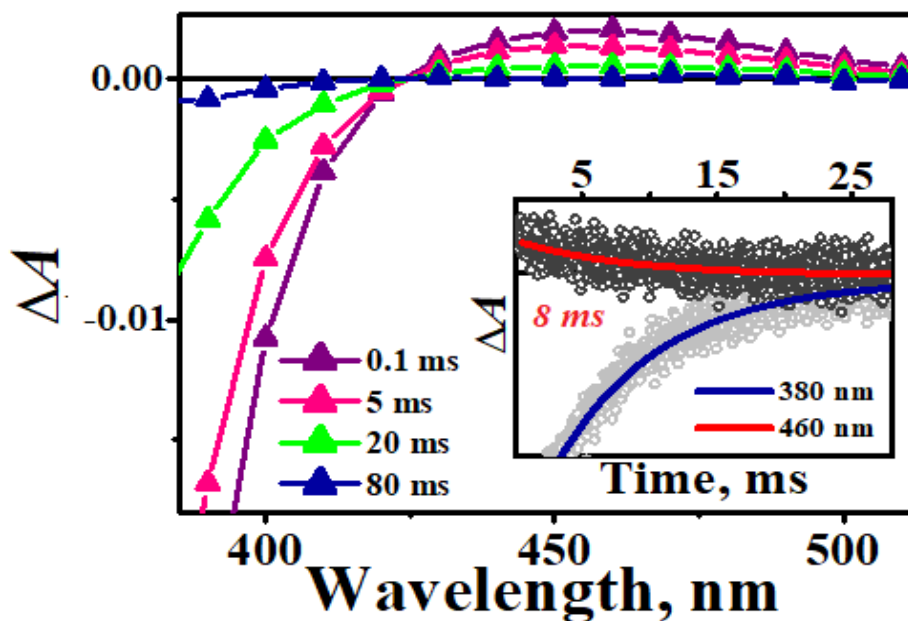


Рис.31 Разностный спектр и кинетики для AAQ при pH=2.

Для соединения ААQ спектры во всех трех средах идентичны и состоят из отрицательного сигнала на интервале 385-420 нм и слабой полосы поглощения на 460 нм. Данная полоса может быть отнесена к цис-изомеру ААQ, тогда как отрицательный сигнал относится к уменьшению концентрации транс-формы.

Для определения того, какие формы сосуществуют при различных значениях кислотности среды были измерены спектры комбинационного рассеяния в водных растворах при различных значениях кислотности среды.

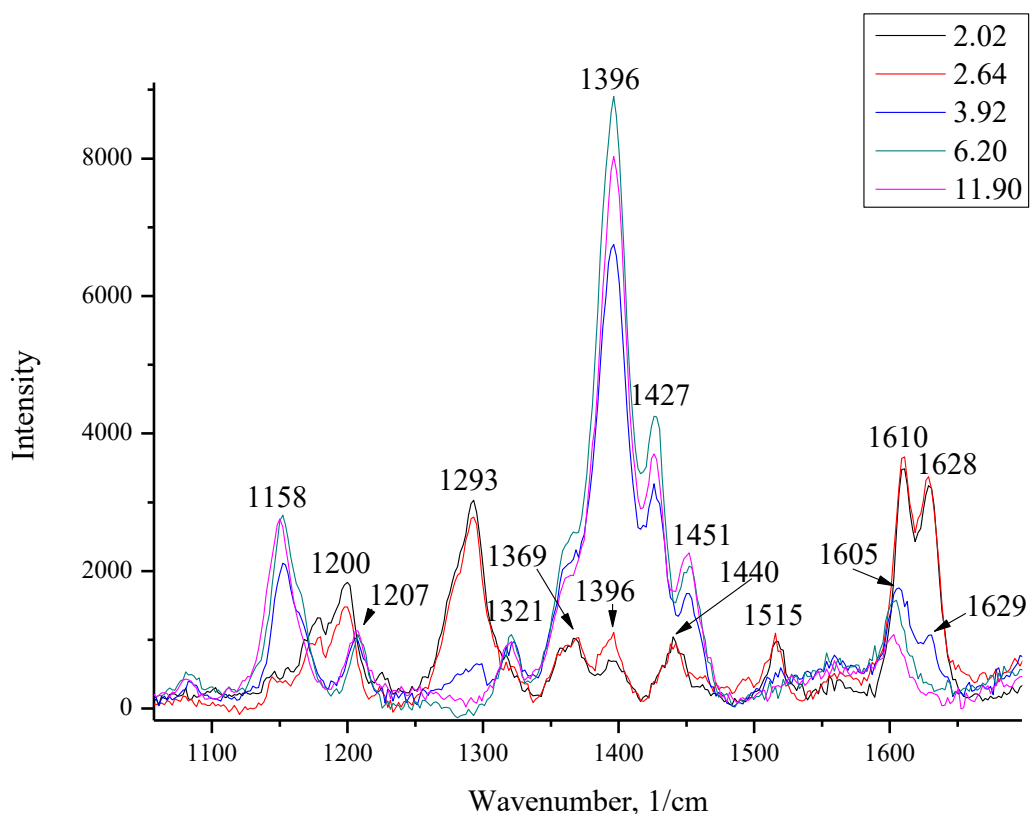


Рис.32 Спектры комбинационного рассеяния DENAQ при разных значениях pH среды.

Как и в случае со спектрами поглощения, спектры комбинационного рассеяния DENAQ слабо меняются на диапазоне от 4 до 12 pH. Спектр состоит из полосы высокой интенсивности около 1396 см^{-1} и полос меньшей интенсивности на 1427, 1605, 1158, 1207 и 1451 см^{-1} . При переходе в кислую среду происходит усиление полосы 1610 см^{-1} , снижение интенсивности полосы 1396 см^{-1} и появление двух новых

полос высокой интенсивности на 1200 и 1293 cm^{-1} и полосы средней интенсивности на 1515 cm^{-1} .

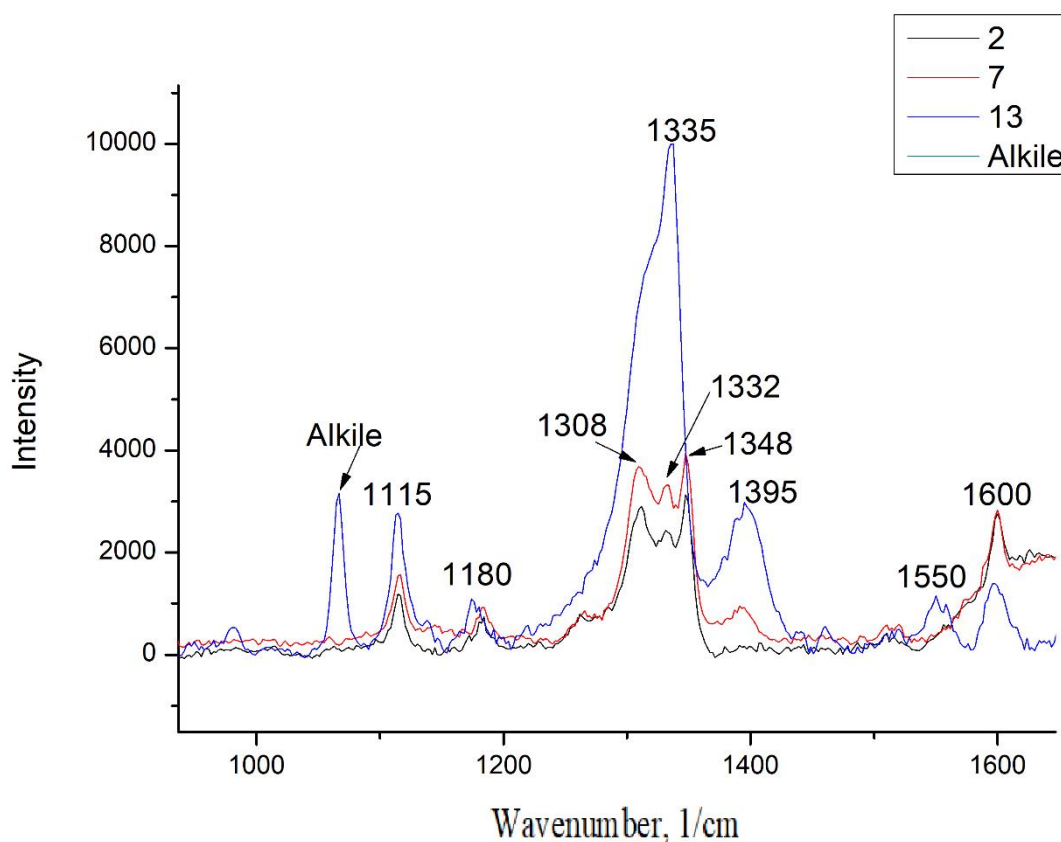


Рис.33 Спектры комбинационного рассеяния AAQ при разных значениях pH среды.

Спектр комбинационного рассеяния AAQ при pH=12 состоит из полосы высокой интенсивности на 1335 cm^{-1} и полос средней интенсивности на 1115, 1395 и 1550 cm^{-1} . При подкислении среды происходит уменьшение интенсивности основной полосы и ее разделение на несколько полос с примерно равной интенсивностью.

Для того, чтобы сделать вывод о том, какие формы существуют при различных значениях кислотности среды было проведено их соотнесение с расчетными данными.

При сопоставлении экспериментальных данных с рассчитанными значениями можно сделать вывод о том, что для соединения DENAQ в нейтральной среде и щелочной основной формой является протонированная по (3) атому азота. При переходе к кислой среде равновесие сдвигается в сторону более протонированных форм. Наиболее вероятно сосуществование форм протонированных по (2) и (3) положению и формы протонированной по (3) и (4) положению. Что находится в

хорошем соответствии с результатами, полученными при анализе электронных спектров поглощения.

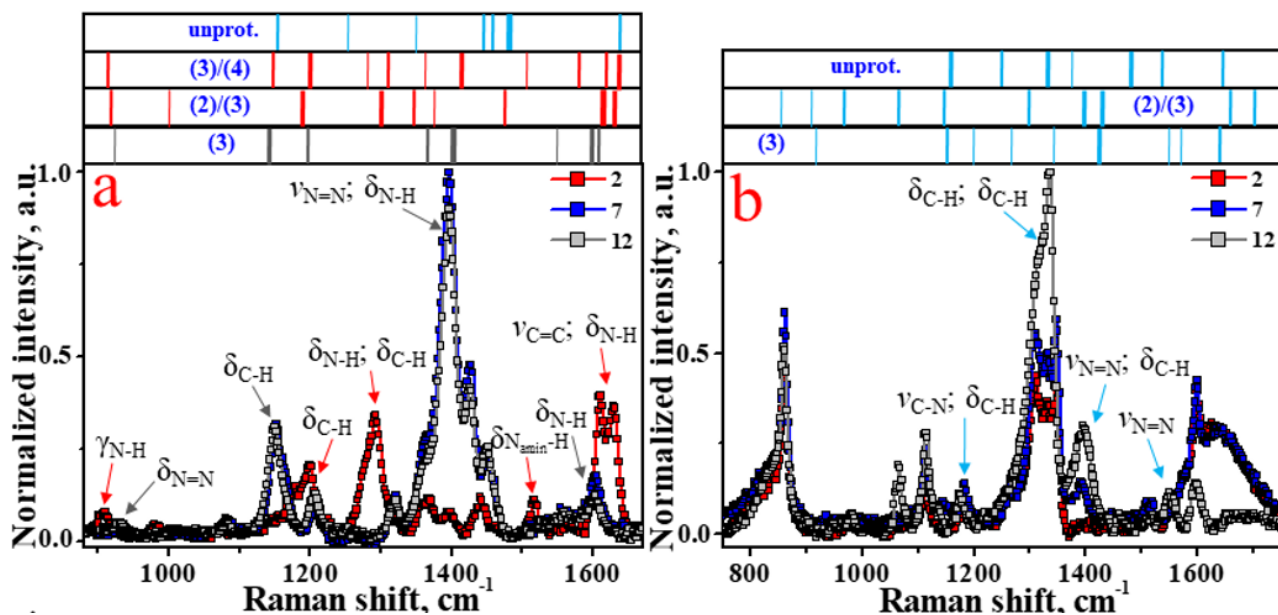


Рис.34 Спектры комбинационного рассеяния DENAQ(a) и AAQ(b) при разных значениях pH среды и их соотношение к наиболее интенсивным полосам различных форм. Чем толще полоса, тем выше ее интенсивность.

Для соединения AAQ в ходе измерения было выявлено разрушение молекулы, о чем свидетельствует совпадение наиболее интенсивных полос с полосами, относящимися к акриловой кислоте (рис.34). Более того, при измерении последовательных спектров происходит увеличение относительной интенсивности данных полос.

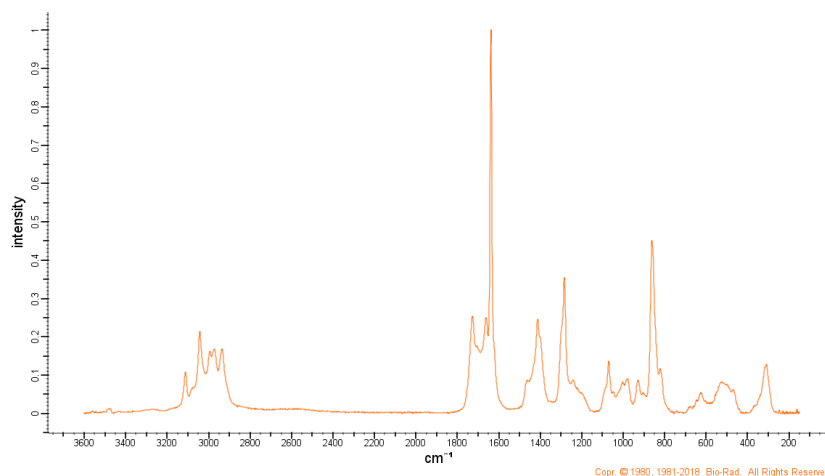


Рис.35 Спектр комбинационного рассеяния акриловой кислоты.

Возможный процесс разложения соединения AAQ можно описать гидролизом до акриловой кислоты и аминопроизводного азобензола (рис.36).

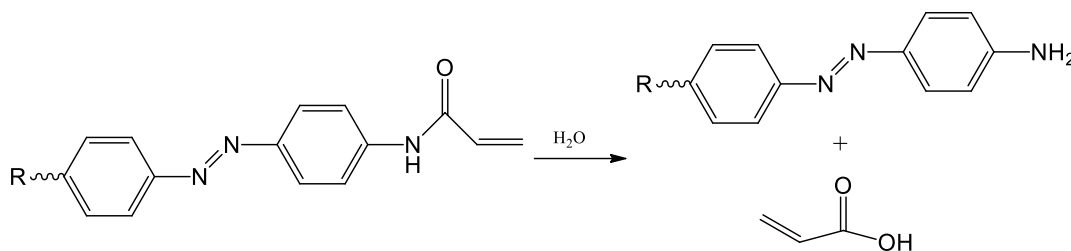
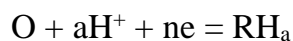


Рис.36 Возможный механизм разложения.

Разрушение молекулы AAQ наблюдалось и при измерении циклической и дифференциальной вольтамперометрии. Поэтому значения для данных измерений будут представлены только для соединения DENAQ.

Электрохимические измерения проводились для определения значений pK_a для соединений и подтверждения (или опровержения) гипотезы о протонировании DENAQ уже в щелочной среде. Известно, что вольтамперометрическое восстановление органических соединений можно описать уравнением:



При этом зависимость потенциала от pH может быть описана уравнением Нернста: $E_p = E^0 - (0.0591a/n)pH$. При построении графика в координатах E-pH, должна получаться прямая линия с наклоном равным $0.0591a/n$. Пересечение данной прямой с осью ординат будет соответствовать значению E^0 [26].

В ходе измерения нами был получен график, представленный на рисунке 37. На данном графике видно наличие двух искажений линейной зависимости, которая располагается на диапазоне 4-10 единиц pH. Первый в области 3-5 единиц pH соответствует переходу, который ранее был описан при построении стационарных спектров поглощения.

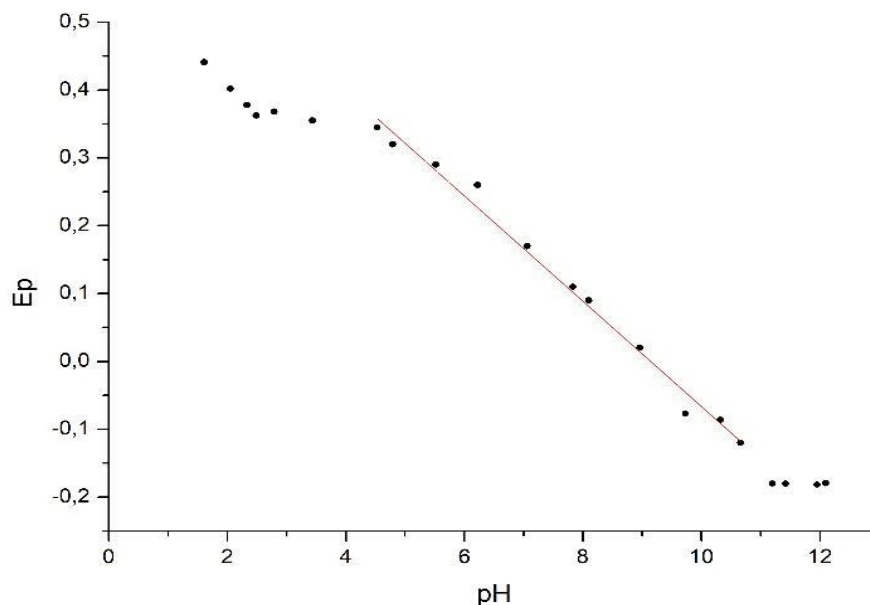


Рис.37 График E_p-рН для DENAQ.

Второй перелом линейной зависимости, наблюдаемой на диапазоне 4-10 единиц рН, располагается в области около 11.0-11.5 единиц рН. При аппроксимации двух линейных участков графика прямыми линиями была найдена точка пересечения, которая соответствует значению $pK_a=11.4\pm 0.3$. Данный факт подтверждает наличие протонирования даже в растворах с высоким значением рН среды.

Помимо соединений AAQ и DENAQ в данной работе был изучен ряд производных азобензола (табл. 3). В качестве растворителя применялись водные растворы с различным значением рН среды, глицерин и хлороформ. Использование последних двух растворителей позволяет изучить влияние вязкости и полярности среды соответственно.

Результаты измерений представлены в таблицах 4 и 5. Пропуски в таблицах связаны либо с низкой растворимостью соединений, либо с отсутствием поглощения на длине волны лазера накачки. Раствор Рингера - физиологический раствор содержащий ионы калия, натрия и кальция.

Табл.3 Производные азобензола для исследования.

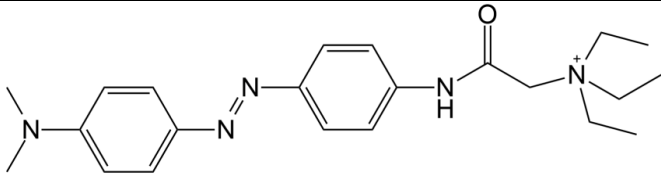
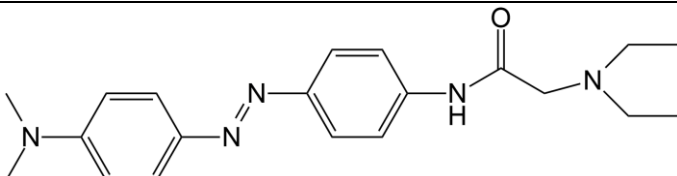
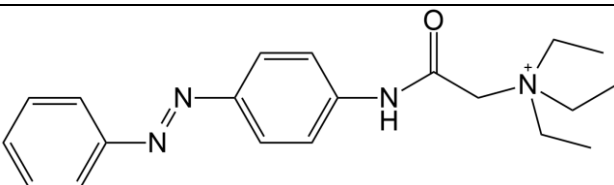
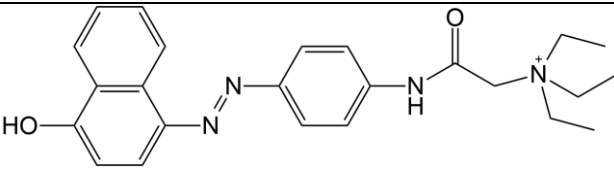
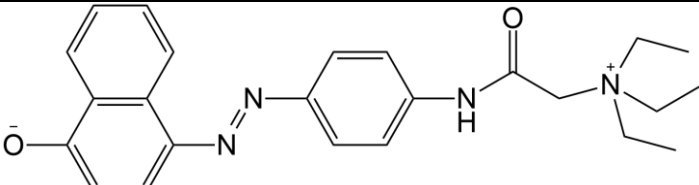
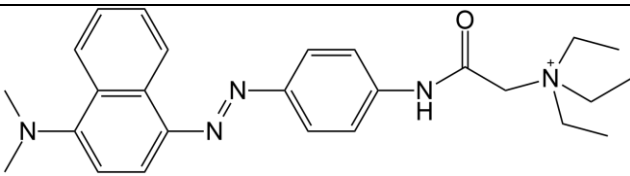
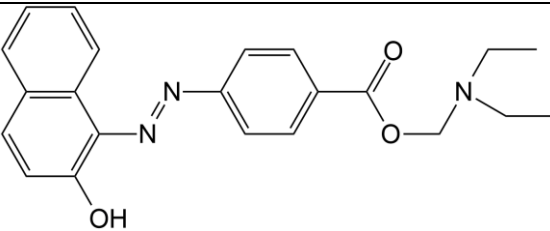
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	

Табл.4 Значения средних времен жизни различных азо-соединений в с*10⁻⁶.

№	1	2	3	4	5	6	7
Вода (рН=2,2)	5±1	4.9±0.5	-	0.7±0.1	0.6±0.1	0.40±0.05	0.5±0.1
Вода	1950±150	350±8	4500± 100	2.6± 0.2	3.7± 0.3	2700±100	240±12
Р-р Рингера*	1360±250	-	-	7.4± 0.1	7.5± 0.1	2500± 100	16.8±0.2
Вода (рН=10,0)	45000± 1000	43000± 1000	-	3300± 300	3200± 250	130000± 5000	1.7±0.1
Хлороформ	115000± 5000	84000± 6000	-	-	-	7300±150	9950± 150
Глицерин	30000± 5000	62000± 3500	225± 10	10000± 2500	3000±200	1400±120	850±70

** физиологический раствор.*

Табл.5 Значение энергий активации процесса цис-транс изомеризации для различных азо-соединений, кДж/моль.

№	1	2	3	4	5	6	7
Вода (рН=2,2)	29	30	-	37	37	18	23.5
Вода	16	20	12	31	41	12	42.5
Р-р Рингера	27	-	-	21	21	25.5	15
Вода (рН=10,0)	33	34	-	30	12	43.5	43.5
Хлороформ	47	-	-	-	-	-	44
Глицерин	41	81	-	43.5	49	44	44

При анализе результатов экспериментальных данных были выявлены следующие закономерности:

-Повышение кислотности среды сокращает времена цис-транс изомеризации. Это подтверждает выводы сделанные для DENAQ. При этом стоит отметить, что единственное соединение, которое не обладает таким эффектом это соединение 3, которое не является push-pull азобензолом. Из чего можно сделать вывод о том, что в

данных соединениях происходит изменение pK_a , что приводит к более простому их протонированию;

-Азонафталины обладают временами изомеризации значительно более быстрыми, чем азобензолы;

-Низкополярные растворители способствуют замедлению процесса обратной цис-транс изомеризации;

-Увеличение вязкости среды замедляет процесс обратной цис-транс изомеризации.

Выводы

В ходе данной работы нами были измерены спектры поглощения соединений AAQ и DENAQ в водных растворах с различным значением кислотности среды. Исходя из полученных данных было выдвинуто предположение о протонировании соединения DENAQ и об отсутствии протонирования на всем диапазоне pH для AAQ. Данное предположение было подтверждено при анализе спектров комбинационного рассеяния и результатов электрохимических измерений. Нами было показано, что DENAQ находится в протонированном состоянии уже при щелочных значениях кислотности среды и протонируется второй раз в кислой среде.

Различие в значениях pK_a соединений, а соответственно возможность их протонирования, объясняют различия в спектральных и термодинамических свойствах данных соединений. Помимо этого, при протонировании происходит увеличение растворимости соединения в водных растворах, что важно учитывать при его использовании в клетках.

Благодарности

Исследование выполнено на базе ресурсных центров СПбГУ “Оптические и лазерные методы исследования вещества”, “Ресурсный Образовательный Центр по направлению химия”, “Методы анализа состава вещества” и “Магнитно-резонансные методы исследования”

Автор выражает свою благодарность Рязанцеву Михаилу Николаевичу, Панову Максиму Сергеевичу, Мерещенко Андрею Сергеевичу и Беляеву Леониду Юрьевичу за помощь в выполнении эксперимента и интерпретации результатов, Штырову Андрею за выполненные квантово-химические расчёты, а также Борисову Евгению и Калиничеву Алексею за помощь в проведении спектральных измерений.

Список литературы

1. Willem A. Velema, Wiktor Szymanski, Ben L. Feringa, Photopharmacology: Beyond Proof of Principle // *J. Am. Chem. Soc.*, T.136 (6), pp.2178–2191, 2014;
2. M.R.Banghart, Alexandre Mourot, Doris L. Fortin, Jennifer Z. Yao, Richard H. Kramer, Dirk Trauner, Photochromic Blockers of Voltage-Gated Potassium Channels // *Angew. Chem. Int. Ed.*, T.48, pp.9097–9101, 2009;
3. Alexandre Mourot et al., Tuning Photochromic Ion Channel Blockers // *ACS Chem. Neurosci.*, T.2, pp.536–543, 2011;
4. Hartley, G. S. The cis-form of azobenzene // *Nature*, 1937, T.140, pp.281–281;
5. Mingxin Dong et al., Red-Shifting Azobenzene Photoswitches for in Vivo Use // *Acc Chem Res.*, T.4 №8(10), pp.2662-70, 2015;
6. Rotov A.Y. et al., New Experimental Models of Retinal Degeneration for Screening Molecular Photochromic Ion Channel Blockers // *Acta Naturae.*, T.10(1), pp.75-84, 2018;
7. I.Tochitsky et al., How Azobenzene Photoswitches Restore Visual Responses to the Blind Retina // *Neuron*, T.92, pp.100–113, 2016;
8. Matthias Schoenberger, Arunas Damjionaitis, Zinan Zhang, Daniel Nagel, and Dirk Trauner, Development of a New Photochromic Ion Channel Blocker via Azologization of Fomocaine // *ACS Chem Neurosci.*, T.5(7): pp. 514–518, 2014;
9. Wiktor Szymański, John M. Beierle, Hans A. V. Kistemaker, Willem A. Velema, Ben L. Feringa, Reversible Photocontrol of Biological Systems by the Incorporation of Molecular Photoswitches // *Chem. Rev.*, T.113, pp.6114–6178, 2013;
10. Lubica Vertracova, Vít Ladanyia, Jamaludin Al Anshoria, Pavel Dvorak, Jakob Wirz, Dominik Heger, The absorption spectrum of cis-azobenzene // *Photochem. Photobiol. Sci.*, T.16, pp.1749-1756, 2017;
11. Jaume Garcia-Amor, Mireia Diaz-Lobo, Santi Nonell, Dolores Velasco, Fastest Thermal Isomerization of an Azobenzene for Nanosecond Photoswitching Applications under Physiological Conditions // *Angew. Chem. Int. Ed.*, T.51, pp.12820–12823, 2012;

12. A. Arcangeli, O. Crociani, E. Lastraioli, A. Masi, S. Pillozzi, and A. Becchetti, "Targeting Ion Channels in Cancer: A Novel Frontier in Antineoplastic Therapy," *Curr. Med. Chem.*, T.16, no. 1, pp. 66–93, 2008;
13. M. Sheng and M. Wyszynski, "Ion Channel Targeting in Neurons," *BioEssQys*, T.19, no. 10, pp. 847–853, 1997.;
14. M. B. Dalva and L. C. Katz, "Rearrangements of synaptic connections in visual cortex revealed by laser photostimulation [published erratum appears in *Science* 1994 Sep 16;265(5179):1644]," *Science* (80-.), T. 265, no. 5169, pp. 255–258, 1994;
15. D. L. Fortin, and D. Trauner, "New photochemical tools for controlling neuronal activity," *Curr. Opin. Neurobiol.*, T. 19, no. 5, pp. 544–552, 2009;
16. M. Dong, A. Babalhavaeji, M. Hansen, L. Kalman, G. Woolley, Red, far-red, and near infrared photoswitches based on azonium ions, *Chem. Commun.*, T. 51, p.12981, 2015;
17. C.E. Weston, R.D. Richardson, M.J. Fuchter, Photoswitchable basicity through the use of azoheteroarenes, *Chem. Commun.*, T. 52, p.4521, 2016;
18. C. BouleÁgue, M. LoÈweneck, C. Renner, L. Moroder, Redox Potential of Azobenzene as an Amino Acid Residue in Peptides, *ChemBioChem*, T. 8, p.591, 2007;
19. E.M. Kosower, H. Kanety-Londner, Mechanism of thiol oxidation by diazenedicarboxylic acid derivatives, *J. Am. Chem. Soc.*, T. 98, p.3001, 1976;
20. W.G. Levine, Metabolism of azo dyes: implication for detoxication and activation, *Drug Metab. Rev.*, vol.23, p.253, 1991;
21. T. Eom, W. Yoo, S. Kim, A. Khan, Biologically activatable azobenzene polymers targeted at drug delivery and imaging applications, *Biomaterials*, T. 185, pp.333-347, 2018;
22. J.R. Fouts, J.J. Kamm, B.B. Brodie, ENZYMATIC REDUCTION OF PRONTOSIL AND OTHER AZO DYES, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, T. 120, pp.291-300, 1957;
23. MN Ryazantsev, DM Strashkov, DM Nikolaev, AA Shtyrov, MS Panov, Molecular design of azobenzene and heteroaryl azo photoswitches for photopharmacological applications: main principles, in silico modeling and synthesis, *RUSS CHEM REV*, T. 90, 2021;
24. А.С. Мерещенко, Методы оптической спектроскопии с временным разрешением: учебное пособие-СПб: Санкт-Петербургский гос.ун-т., с.37, 2018;

25. Бенсассон Р., Лэнд Э., Траскот Т., Флеш-фотолиз и импульсный радиолиз: Применение в биохимии и медицинской химии: Пер. с англ.-М.:Мир, с.398, 1987;
26. Necati Menek, POLAROGRAPHIC AND VOLTAMMETRIC BEHAVIOUR OF 2-HYDROXY-3-METHOXY-5-(2-PROPENYL)AZOBENZENE, Analytical Letters, vol.31(2), pp. 275-282, 1998.