

## Дизайн флуоресцентних зондів на основі 3-гідроксихромонів та їх аналогів

В. Г. Пивоваренко

Київський національний університет імені Тараса Шевченка  
вул. Володимирська, 64, Київ, 01033, Україна

**Резюме.** Розглянуто аспекти дизайну мультіканальних флуоресцентних зондів для дослідження фізичних параметрів гомогенних і гетерогенних рідинних середовищ. Зроблено огляд літератури з дизайну, синтезу, люмінесцентних і сенсорних властивостей в органічних розчинниках, міцелах і ліпосомах мультіканальних зондів на основі 3-гідроксихромону, а також катіонних індикаторів на цій основі.

**Ключові слова:** флуоресцентні зонди, флуоресцентні сенсори, внутрішньомолекулярний фотоперенос протону, 3-гідроксихромони, 3-гідроксифлаволи, флавоноли, дифлавоноли.

**Вступ.** Методи флуоресцентної спектроскопії знаходять широке застосування в дослідженнях таких складних субмолекулярних об'єктів, як міцели, ліпосоми, біологічні клітини та їхні компоненти [1]. За своїми аналітичними можливостями деякі з них є унікальними, оскільки дають змогу реєструвати випромінювання одного кванта світла в об'ємі, меншому за  $1 \text{ мкм}^3$ , або фіксувати молекулярні явища у фемтосекундній шкалі часу. У дослідженнях субмолекулярних об'єктів часто використовуються допоміжні інструменти — флуоресцентні зонди — молекули, здатні після поглинання кванта світла оптичного діапазону випромінювати новий квант світла (рис. 1).

Флуоресцентні зонди, незважаючи на свої надмініатюрні розміри (довжина, ширина, товщина їхніх молекул, як правило, не перевищують значень відповідно  $1\text{--}0,5\text{--}0,2 \text{ нм}$ ), є пристроями, в будові яких можна виділити окремі функціональні елементи, зокрема, приймально-передавальний блок, роль якого виконує хромо-

фор молекули. Залежно від призначення флуоресцентний зонд може містити фіксуючу групу (якір) та сенсор — апарат налаштування зонда на заданий режим вимірювань. Оскільки зонд завжди працює в середовищі з певними характеристиками міжмолекулярних взаємодій, до яких часто застосовують термін *ліпофільність* (гідрофобність), то для стабільної та адекватної роботи він завжди повинен відповідати середовищу за цим параметром.

Характеристики випромінювання зондів (інтенсивність, положення і напівширина смуги в спектрі тощо) завжди несуть певну інформацію про об'єкт. Завдання дослідника — адекватно інтерпретувати отриману інформацію. Проте часто цей процес є досить складним, оскільки випромінювання молекули зонда, як правило, відображає стан відразу кількох фізичних параметрів мікрооточення. У зв'язку з цим до хімічної архітектури зонда та його флуоресцентних властивостей висувають ряд вимог, однією з яких є можливість отримання адекватної інформації про досліджуваний параметр середовища. Це завдання вирішується з допомогою різних методів фільтрації інформації. Як правило, з цією метою структуру зонда налаштовують на

\*Corresponding author.

Tel.: +38044-2393312, fax: +38044-2208391

E-mail address:

pvg@univ.kiev.ua

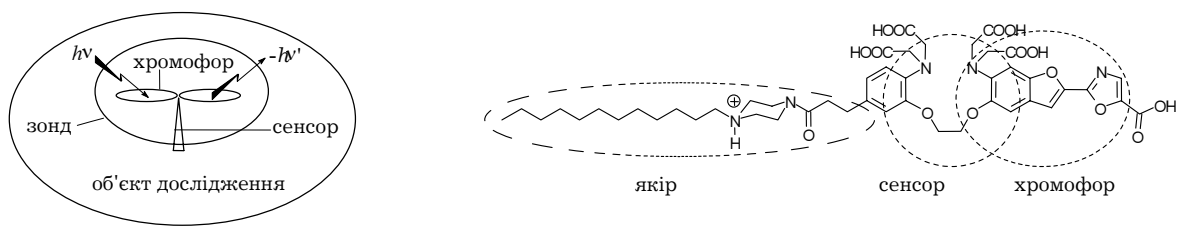


Рис. 1. Принцип роботи та схема флуоресцентного зонда на прикладі клітинного індикатора іонів  $\text{Ca}^{2+}$  (приклад вибрано з [2]).

вимірювання одного певного параметра. Додатковим шляхом підвищення достовірності інформації про об'єкт є збільшення числа каналів її отримання.

Конструкція і властивості молекулярного зонда визначаються не тільки параметром об'єкта, на вимірювання якого він настроєний, але також і типом приладу, що приймає інформацію від зонда. Найбільш розповсюдженими є флуоресцентні зонди для стаціонарної флуориметрії і флуоресцентної мікроскопії. За типом спектральної відповіді такі зонди можна поділити на три групи: флуоресцентні мітки, інтенсометричні та раціометричні зонди. Флуоресцентні мітки (рис. 2а) інформують тільки про місце перебування (локалізацію) об'єкта досліджень, про кількість його одиниць та/або про його геометричні розміри. Тому до міток висувають лише одну вимогу: контактуючи з об'єктом, вони повинні якомога яскравіше світитися (яскравість випромінювання тут визначається високими

значеннями молярного коефіцієнта екстинкції і квантового виходу флуоресценції).

Принцип передачі інформації інтенсометричними зондами (рис. 2б) полягає у зміні інтенсивності флуоресценції. Зонди зазначеного виду є одноканальними пристроями, у будові яких передбачено настроювання єдиного каналу на збір і передачу відібраної інформації про об'єкт. Під настроюванням розуміємо оптимізацію конструкції всіх елементів зонда (насамперед блоку сенсор—хромофор) відповідно до завдань дослідження. Настроювання інтенсометричних зондів на відтворення стану єдиного параметра, який вивчається, значно спрощує інтерпретацію одержаних даних, що робить ці зонди молекулярними пристроями, які широко використовуються. За таким принципом побудовано роботу більшості сучасних флуоресцентних зондів для вимірювання мікрров'язкості, рН, концентрації катіонів ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ) або ж аніонів ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{AsO}_4^{3-}$ ), окисників і

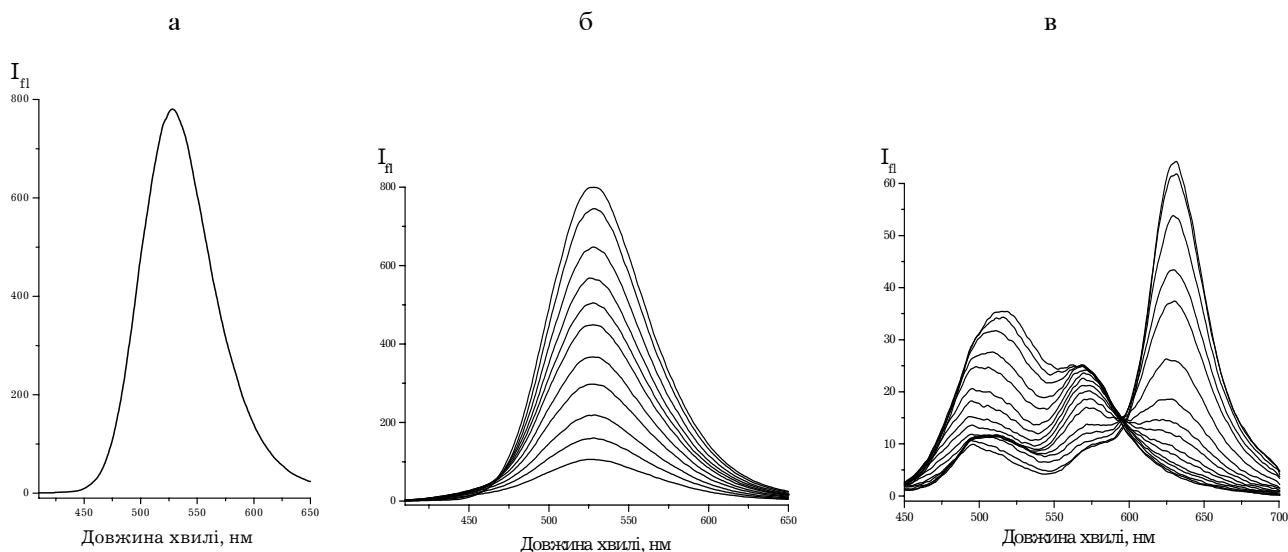


Рис. 2. Класифікація флуоресцентних зондів відповідно до типу їх спектральної відповіді: а — флуоресцентні мітки, б — інтенсометричні зонди, в — раціометричні зонди.

багатьох інших молекулярних компонентів клітини, що мають більш складну будову [1].

Основний недолік інтенсометричних зондів — неможливість застосування їх в умовах, коли об'єм, що аналізується, є невизначеним. Така ситуація часто виникає під час роботи з мікрооб'єктами, у тому числі й з біоклітинами. Крім того, існує ряд завдань, які неможливо вирішити за допомогою одноканальних зондів. У таких випадках застосовують багатоканальні пристрої, зокрема, раціометричні зонди (від англ. *ratio* — відношення, рис. 2в). У спектрі флуоресценції вони мають дві смуги (два канали збору інформації), інтенсивності яких змінюються при зміні вимірюваних параметрів. Коли положення кожної смуги в спектрі значно змінюється при зміні інших параметрів середовища, з'являються два додаткові канали надходження інформації. У більшості випадків розподіл отриманої інформації по каналах підвищує ступінь її однозначності, а це полегшує її інтерпретацію або збільшує кількість параметрів об'єкта, даючи змогу вивчати їх одночасно. Очевидно, що багатоканальні зонди є більш досконаліми пристроями, які дозволяють збільшувати кількість інформації від об'єкта й цим спрощувати її інтерпретацію. Однак на сьогодні існують лише поодинокі приклади таких молекулярних пристроїв для флуоресцентної спектроскопії. Основною причиною ситуації, що склалась, є закони флуоресценції: більшість молекулярних сполук може мати в спектрі лише одну смугу флуоресценції.

3-Гідроксифлавонони (ЗГХ) та їхні похідні — флавоноли (3-гідроксифлавонони, ЗГФ) — унікальні сполуки з двосмуговою флуоресценцією [3]. В основному ( $S_0$ ) стані вони завжди існують у формі кетонів, проте при збудженні, у стані  $S_1$ , вони здатні до таутомеризації — внутрішньомолекулярного фотопереносу протона від гідроксигрупи до карбонілу молекули (рис. 3). Оскільки обидва таутомери здатні випромінювати світло, у спектрі флуоресценції 3-гідроксифлавононів часто спостерігаються дві смуги, положення й інтенсивності яких змінюються в залежності від параметрів мікрооточення [4, 5].

Однак, будучи унікальними, флавоноли як флуоресцентні барвники мають ряд не-

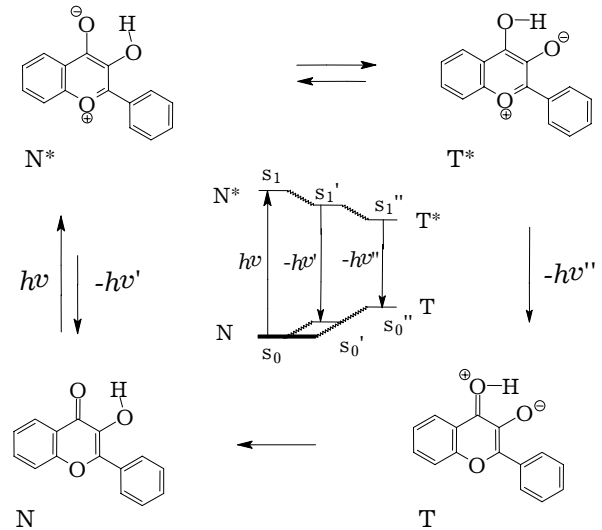


Рис. 3. Схема внутрішньомолекулярного фотопереносу протона в 3-гідроксифлавонах і діаграма енергетичних рівнів основного і збудженого станів молекули ЗГФ.

доліків: невисокий молярний коефіцієнт поглинання, максимум якого виходить за межі видимої області спектра, та незначний квантовий вихід флуоресценції. Закономірності впливу мікрооточення на параметри їхньої флуоресценції не досліджені, тому в дизайні зондів на основі флавонолів насамперед потрібно створити сполуки з покращеними спектральними властивостями, а також виявити закономірності впливу на них природи рідинних середовищ.

**Дизайн. Будова хромофорної частини молекули.** Флавоноли — сполуки несиметричної будови, спектри поглинання яких можна із задовільною точністю розрахувати з допомогою методів квантової хімії. Флуоресцентні властивості сполук спрогнозувати значно важче, особливо у випадку довгохвильового діапазону емісії. Відомо лише, що для підвищення квантового виходу слід зменшувати кількість ступенів свободи молекули [6]. Збільшення дипольного моменту молекули шляхом встановлення електродонорної групи також сприяє покращенню її флуоресцентних властивостей, що впливає з порівняння характеристик подібних сполук [4, 5] і незаміщеного ЗГФ [3]. Тому оптимальним способом удосконалення структури 3-гідроксифлавонону є введення донорної групи в пара-положення бокового замісника — 2-арилу, збільшення довжини ланцюга спряження

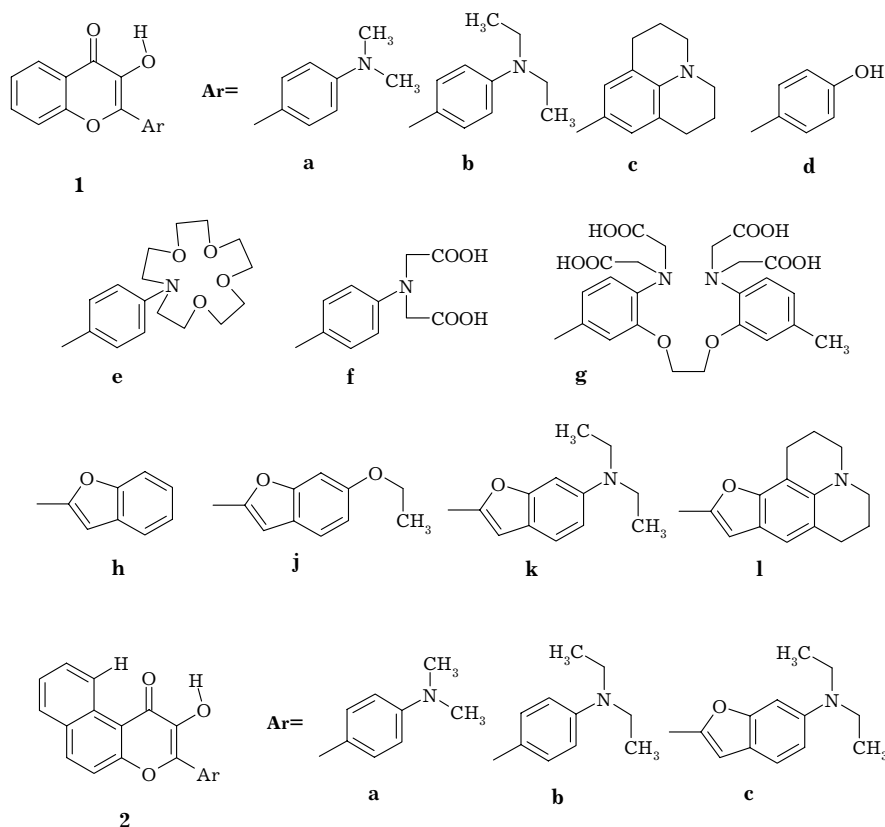


Рис. 4. Структури синтезованих 3-арил- і 3-гетарилхромонів.

карбоніл-донорної групи та підвищення ступеня конденсованості молекули.

Виходячи з вищезазначеного, здійснено синтез групи ЗГФ (рис. 4) [7—14] і вивчено їхні флуоресцентні властивості в протонних і апротонних розчинниках різної полярності, а також у мікрогетерогенних системах — мицелах та ліпосомах. За допомогою методів електрооптичної спектроскопії визначено величини і напрями дипольних моментів 3-гідроксифлавонів в основному та збудженому ( $S_1$ ) станах [15—17].

**Сенсорні групи.** Молекула ЗГФ містить два сенсори — окремі групи атомів, які відповідають за вплив мікрооточення на спектральні

параметри зонда (рис. 5). Сенсор 1 є поляризованим ланцюгом спряжених кратних зв'язків, який закінчується електронодонором (аміногрупою) з одного боку та акцепторною групою (карбонілом) з іншого. При стеричному блокуванні специфічних взаємодій донорної та акцепторної груп з оточенням подібні конструкції працюють як сенсори загальної полярності середовища за принципом зміщення смуги у спектрі [18]. Водночас карбоніл звичайної молекули ЗГФ має одну неподільну пару електронів, здатну утворювати міжмолекулярний водневий зв'язок, впливаючи таким чином на положення смуги емісії в спектрі, а також на співвідношення інтенсивності смуг емісії фототаутомерів.

Отже, 3-гідроксифлавоони, як і багато інших флуоресцентних барвників амінокарбонільної природи, без спеціальних модифікацій здатні одночасно відслідковувати молекулярні взаємодії неспецифічного та специфічного характеру — полярність рідинних середовищ і наявність водневих зв'язків у них. Оскільки обидва фактори чинять подібний вплив на флуоресценцію 3-гідроксифлавонів, перед

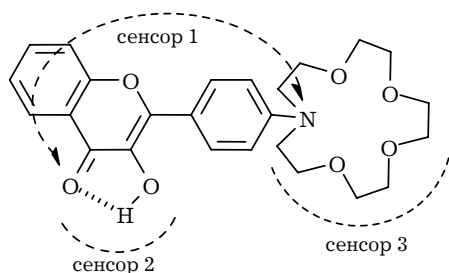


Рис. 5.

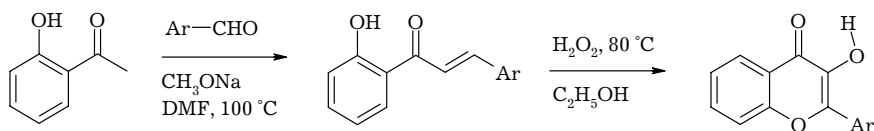


Схема 1.

дослідниками постало завдання розділення цих ефектів у спектрах.

Крім того, конструкція молекули ЗГФ і методи отримання цих сполук дають змогу вводити третій сенсор на місце електронодонора — діалкіламіногрупи. При встановленні додаткового хелатора катіонів (структури le-1g) чи основної групи ці сполуки перетворюються на індикатори іонів певної хімічної природи.

**Урахування ліпофільності молекули.** Флуоресцентні зонди призначені для роботи в середовищі з певними характеристиками ліпофільності — водному розчині органічної сполуки, цитозолі чи клітинній мембрані. Тому під час проектування зонда потрібно врахувати той чи інший параметр середовища. У протилежному разі процеси асоціації або міграції зонда в близькі за ліпофільністю фази (для мікрогетерогенних середовищ) будуть перешкоджати розв'язанню поставлених завдань. Урахування ліпофільності зручно проводити поетапно. На першому етапі за допомогою розрахункових методів [19] добираються замісники для досягнення заданої ліпофільності молекули зонда. На другому етапі, після досліджень на реальному об'єкті, будова зонда коректується.

**Урахування хімічної топології місця зв'язування.** В окремих випадках простого врахування ліпофільності молекули не достатньо. Наприклад, якщо зонд призначений для зв'язування з одним із сайтів глобулярного білка, необхідно врахувати форму, розміри і розподіл зарядів у сайті. Мембранні зонди часто мають векторну будову — явно виражені ліпофільну та гідрофільну частини. У зв'язку з цим до складу молекули зонда, яка містить основні елементи (хромофор, сенсор і т. ін.), повинні входити додаткові групи, що приведуть у відповідність топології молекули та місця зв'язування.

**Синтез.** Відомо кілька шляхів синтезу флавонолів [20—22], кожен з яких при синтезі ЗГФ з електронодонорними замісниками в молекулі дає занижені виходи продуктів.

Умови найбільш загального методу [20] удосконалили [14], що дало змогу одержати цільові сполуки 1c, 1h-1l із задовільними виходами за надзвичайно короткий час (схема 1).

**Флуоресцентні властивості.** Наявність двох сенсорних груп у молекулі ЗГХ зумовлює їхню більш виразну відповідь на зміну параметрів оточення і водночас ускладнює інтерпретацію спектрів флуоресценції. У зв'язку з цим детально вивчалися флуоресцентні властивості одержаних сполук у найбільш простих для інтерпретації умовах — у середовищі органічних розчинників (рис. 6). При цьому було виявлено певні закономірності зміни інтенсивності й позиції смуг флуоресценції таутомерних N<sup>-</sup> і T<sup>-</sup>-форм 3-гідроксихромонів у залежності від полярності або протондонорності їхнього оточення [10—14, 23—28]. Показано, що 3-гідроксихромони є мультипараметричними зондами, які дають змогу одночасно реєструвати три фізичні параметри оточення — діелектричну проникність, коефіцієнт заломлення і донорність водневого зв'язку

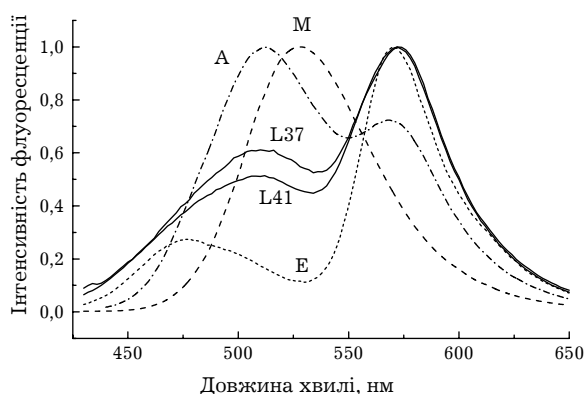


Рис. 6. Нормалізовані по ординаті спектри флуоресценції 4-діетиламіно-3-гідроксифлавонолу (1a) в рідинних середовищах: А — ацетонітрил, Е — етилацетат, М — метанол, L37 і L41 — суспензії і ліпосом (концентрація DPPC ліпосом — 1 ммоль/л, зонда — 10 мкмоль/л) відповідно при температурі 37 та 41 °С. Довжина хвилі збудження — 400 нм [23].

(протонодонорність) [29]. Проведений аналіз спектральних даних, отриманих у 21 розчиннику, показав, що для цих зондів існує можливість розділення ефектів полярності, протонодонорності й мікров'язкості середовища у спектрах флуоресценції. Розроблено алгоритм аналізу спектральних даних.

Утворені сполуки (1h-1l, 2a-2b та ін.) мають рекордні для даного класу значення молярного коефіцієнту екстинкції і квантового виходу флуоресценції [10—14], а також рекордну чутливість до параметрів оточення [27]. Наприклад, якщо зонди полярності інших типів повністю охоплюють усю шкалу полярності розчинників, істотно втрачаючи при цьому в точності вимірювання, то кожен із раціометричних зондів 1k, 1b та 1h налаштований на роботу в окремому діапазоні, відповідно в середовищах низької, середньої та високої полярностей [25].

**Зонди полярності рідинних середовищ.** Найбільш поширеною і водночас простою характеристикою локальної полярності рідин є функція Ліпперта [30]:

$$L = f(\epsilon) - f(n) = \frac{\epsilon - 1}{2\epsilon + 1} - \frac{n^2 - 1}{2n^2 + 1},$$

де  $f(\epsilon)$  та  $f(n)$  — відповідно функції діелектричної проникності середовища та показника заломлення світла в ньому.

Слід зазначити, що параметр Ліпперта можна визначити з допомогою спектрометричних методів. Флуориметричне або спектрофотометричне визначення полярності апротонних середовищ проводять з допомогою барвників, основний або збуджений стан яких характеризується високим дипольним моментом [18]. Проте для протонних середовищ кількісне визначення полярності є складною проблемою, оскільки за таких умов специфічні взаємодії з оточенням (водневі зв'язки) є причиною додаткових спектральних ефектів. Для усунення цих ефектів створено окремі барвники оксифенілпіридинового ряду, в яких просторовий доступ протонодатора до крайніх атомів хромофора молекули є максимально блокованим. Шкалу полярності  $E_T30$  побудовано саме на спектральних властивостях одного з таких барвників [18]. Проте жоден із застосованих методів не дав змоги повністю усунути специфічні взаємодії молекул

протонних розчинників із молекулами барвника [31].

У випадку 3-гідроксихромонів стеричне блокування карбонільної групи молекули (структури 2a-2c) може бути методом усунення впливу специфічних взаємодій із середовищем на спектральні властивості зонда. Однак для структур 2a-2c зберігається можливість утворення водневих зв'язків як по 3-ОН групі, так і по карбонілу (семичленний циклічний комплекс). Здатність утворювати водневі комплекси, їх можливі відмінності за флуоресцентними властивостями від незв'язаних молекул демонструють лише досліди з реальними сполуками 2a-2c, оскільки квантово-хімічні розрахунки в цьому випадку не дають точної відповіді.

Такі досліди проводилися зі сполукою 2b [32] й показали, що карбонільна група сполук 2a-2c при температурі 20 °C і вище не утворює міжмолекулярного водневого зв'язку з протонодонором, а можливі специфічні взаємодії сполук з оточенням настільки слабкі, що істотно не впливають на їх флуоресцентні властивості.

Отже, ми створили перший двосмуговий флуоресцентний зонд полярності, який працює однаково ефективно як у протонних, так і в апротонних середовищах. У парі зі звичайним зондом 1b його рекомендовано для вивчення полярності й гідратованості ліпідних мембран.

**Застосування багатоканальних зондів для вивчення фізико-хімічних явищ у міцелах і ліпосомах** продемонструвало їх високу ефективність [7, 8, 13, 23—26, 33—35]. Збільшення кількості каналів передачі інформації від об'єкта дає змогу реєструвати такі явища, як входження зонда в мікроструктуру, зміну в'язкості й гідратованості його оточення, зміну полярності оточення, а також виявляти причини цих явищ. Висока чутливість зондів дозволяє досягати високої контрастності ефектів (рис. 7).

**Дизайн зондів для дослідження глобулярних білків** — складна проблема, яка вимагає глибоких знань третинної структури білка. Тут завдання розподіляються за двома напрямками — конструювання зондів для вивчення процесів, що відбуваються на межі білкової глобули й оточення, і зондів для дослідження більш глибоких зон (сайтів) білка. У першому

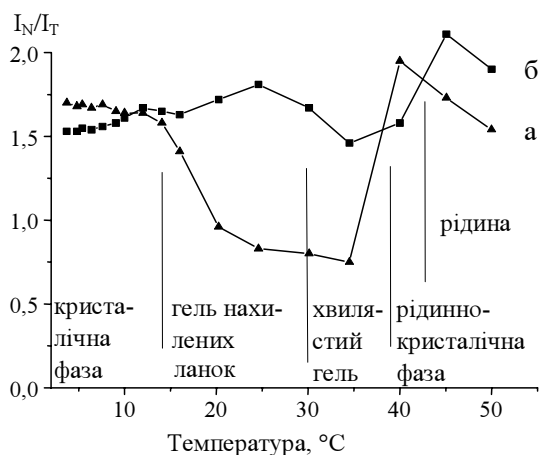


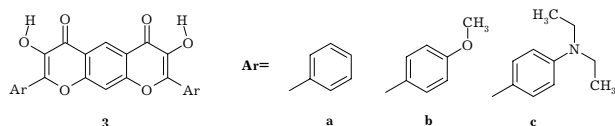
Рис. 7. Зміна відношення інтенсивностей смуг у спектрі флуоресценції сполуки 1e в мембрані ліпосом (дипальмітоїлфосфатидилхолін, 2 ммоль/л) як функція температури: а — за відсутності етанолу, б — у присутності 100 мг/мл етанолу у водному розчині [8]. Довжина хвилі збудження — 405 нм. Вертикальні лінії відповідають відомим точкам фазових переходів мембрани даного складу за відсутності етанолу.

випадку зонд ковалентно прикріплюють до глобули з допомогою відомих методів [1], його будова повинна відповідати оточенню глобули за параметром ліпофільності. У другому випадку вимоги щодо конструювання зонда більш суворі: необхідно досягнути відповідності хімічної топології його молекули й місця зв'язування, оскільки лише за таких умов просторову структуру глобули не буде порушено, а константа зв'язування зонда матиме максимально високі значення. Таку

відповідність знайдено для БСА та сполуки 1k, що дало змогу визначати концентрацію БСА в сироватці крові [25].

**Дизайн індикаторів катіонів.** Краун-флавонол 1e запропоновано як індикатор, що розрізняє йони лужно-земельних металів за їх радіусом [9, 36]. Ефекти зв'язування йону металу по краун-циклу і по гідроксикарбонільному хелатору молекули 1e добре розрізняються як в спектрі флуоресценції (рис. 8), так і в спектрі поглинання. Кальцієвий зонд 1g дає спектральну відповідь на зміну концентрації кальцію в діапазоні 50—5000 нмоль/л (рис. 9).

**Дизайн трисмугових флуоресцентних зондів.** Зазначені вище результати свідчать про перспективність застосування багатоканальних флуоресцентних зондів у різних галузях науки і техніки, що є стимулом для роботи щодо збільшення кількості каналів передачі інформації з допомогою флуоресцентних зондів на основі ЗГХ. З цією метою синтезовано сполуки 3a-3c, які мають два здатні до фототаутомеризації угруповання. Розпочато дослідження флуоресцентних властивостей цих сполук [38, 39].



Дифлафони 3a-3c у збудженому стані з вихідної NN'-форми можуть утворювати два таутомери — NT' і TT', унаслідок чого в їхніх

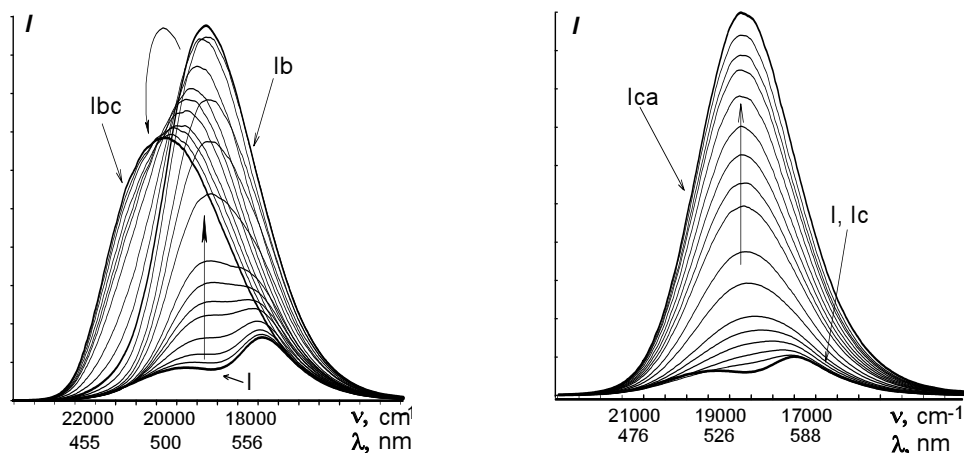


Рис. 8. Вплив зміни концентрації іонів  $Mg^{2+}$  (а) і  $Ba^{2+}$  (б) на спектри флуоресценції сполуки 1e (середовище — ацетонітрил) [9]. На графіках: 1ca, 1b — ефекти зв'язування катіону по карбонілу, 1bc — ефект зв'язування катіону по краун-циклу.

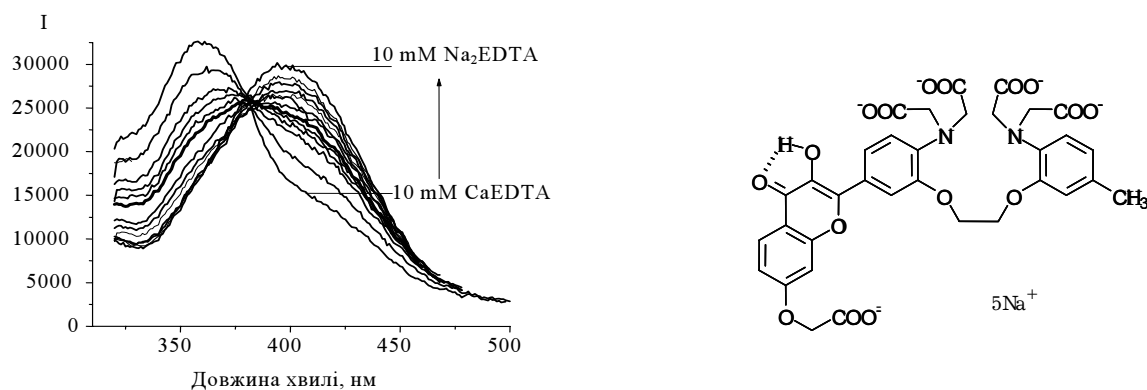


Рис. 9. Хімічна структура і спектри збудження кальцієвого зонда на основі ЗГФ при поступовому зниженні концентрації іонів  $\text{Ca}^{2+}$  в 0,1 М трис-буфері (рН 7,2) при температурі 20 °С. Довжина хвилі прийому емісії — 550 нм [37].

спектрах флуоресценції можуть спостерігатися три смуги. Для сполуки 3а виявлено три-смугову флуоресценцію в етанольному розчині (рис. 10) [40]. Дифлавонол 3с у досліджуваних умовах завжди мав дві смуги в спектрі флуоресценції, однак його короткохвильова смуга в різних розчинниках у 2 рази різнилася за напівшириною, що з урахуванням інших

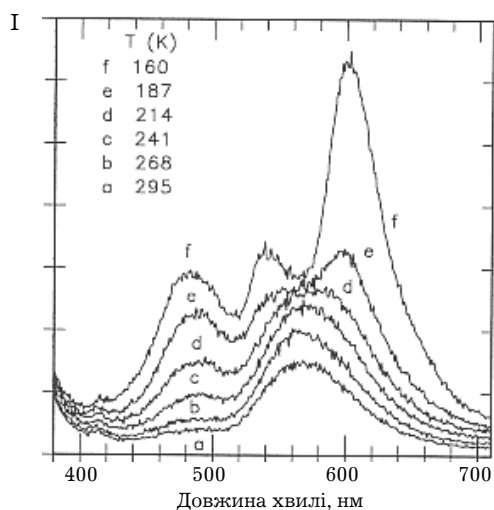


Рис. 10. Спектри дифлавонолу 3а в етанолі при температурі від 295 К (а) до 160 К (f) [38].

спектральних закономірностей свідчить про суміщену в ній емісію двох таутомерних форм [39]. Ця сполука має рекордну спектральну чутливість до полярності розчинника.

Окрім багатосмугової емісії, дифлавоноли мають цілий ряд унікальних флуоресцентних властивостей, а саме: великий стоксовий зсув однієї зі смуг емісії ( $12000 \text{ cm}^{-1}$ ), одночасну люмінесценцію у всій області видимого спектра, відносно високий молярний коефіцієнт поглинання ( $\sim 60000$ ) і високий квантовий вихід флуоресценції ( $\sim 0,6$ ).

**Висновки.** Унаслідок інтенсивного розвитку біохімії, молекулярної біології та медицини виникає потреба в нових, більш досконалих методах наукових досліджень. Флуоресцентні зонди як інструмент дослідження мають широке і щораз усе більш різноманітне застосування. Нині вони удосконалюються, створюються їх нові типи, одним з яких є похідні 3-гідроксифлавонолу. Флуоресцентні властивості цих сполук, їхня висока чутливість до природи оточення є перспективними для дизайну й практичного застосування зондів на їх основі у дослідженнях клітинних об'єктів.



## Design of multi-channel fluorescent probes on the basis of 3-hydroxychromones and their analogues

V. H. Pyvovarenko

Department of Chemistry, Taras Shevchenko National University  
64 Volodymyrska Str., Kyiv, 01033, Ukraine

**Summary.** The design of multi-channel fluorescent probes for the study of physical parameters of homogeneous and heterogeneous liquid media are discussed. The review deals with the design, synthesis luminescence and sensor properties in organic solvents, micelles and liposomes of multi-channel probes on the basis of 3-hydroxychromones as well as cation indicators on this basis.

**Key words:** fluorescent probes, fluorescent sensors, excited state intramolecular proton transfer, 3-hydroxychromones, 3-hydroxyflavones, flavonols, diflavonols.

## Перелік літератури

1. *Haugland R.P.* Handbook of Fluorescent Probes and Research Products // 6th Edition, Molecular Probes, Inc. — Eugen: OR, 1998. — 676p.
2. *Vorndran C., Minta A., Ponie M.* New fluorescent calcium indicators designed for cytosolic retention or measuring calcium near membranes // *Biophys. J.* — 1995. — Vol. 69. — P. 2112—2124.
3. *Sengupta P.K., and Kasha M.* Excited state proton-transfer spectroscopy of 3-hydroxyflavone and quercetin // *Chem. Phys. Lett.* — 1979. — Vol. 68, No 2—3. — P. 382—385.
4. *Swinney T.C., Kelley D.F.* Proton transfer dynamics in substituted 3-hydroxyflavones: Solvent polarization effects // *J. Chem. Phys.* — 1993. — Vol. 99, No 1. — P. 211—221.
5. *Chou P.-T., Martinez M.L., Clements J.-H.* Reversal of excitation behavior of proton-transfer vs. charge-transfer by dielectric perturbation of electronic manifolds // *J. Phys. Chem.* — 1993. — Vol. 97, No 11. — P. 2618—2622.
6. *Ищченко А.А.* Строение и спектрально-люминесцентные свойства полиметиновых красителей. — Киев: Наук. думка, 1994. — С. 50—66.
7. *Pivovarenko V.G., Tuganova A.V., Klymchenko A.S., Demchenko A.P.* Flavonols as models for fluorescent membrane probes. 1. The response to the charge of micelles // *Cellular & Molecular Biology Letters.* — 1997. — Vol. 2. — P. 355—364.
8. *Bondar O.P., Pivovarenko V.G., Rowe E.S.* Flavonols — new fluorescent membrane probes for studying the interdigitation of lipid bilayers // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1998. — Vol. 1369, No 1. — P. 119—130.
9. *Roshal A.D., Grigorovich A.V., Doroshenko A.O., Pivovarenko V.G., Demchenko A. P.* Flavonols and crown-flavonols as metal cation chelators. The different nature of Ba<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> complexes // *J. Phys. Chem.* — 1998. — Vol. 102, No 29. — P. 5907—5914.
10. *Klymchenko A.S., Ozturk T., Pivovarenko V.G., Demchenko A.P.* A new 3-hydroxychromone with dramatically improved fluorescence properties // *Tetrahedron Letters.* — 2001. — Vol. 42. — P. 7967—7970.
11. *Klymchenko A.S., Ozturk T., Pivovarenko V.G., Demchenko A.P.* Synthesis and fluorescent properties of benzo- and naphthofuryl-3-hydroxychromones // *Can. J. Chem.* — 2001. — Vol. 79. — P. 358—363.
12. *Klymchenko A.S., Demchenko A.P.* Electrochromic modulation of excited-state intramolecular proton transfer: the new principle in design of fluorescence sensors // *J. Am. Chem. Soc.* — 2002. — Vol. 124. — P. 12372—12379.
13. *Klymchenko A., Duportail G., Ozturk T., Pivovarenko V., Mely Y., Demchenko A.* Novel two-band ratiometric fluorescence probes with different location and orientation in phospholipid membranes // *Chem. Biol.* — 2002. — Vol. 9. — P. 1199—1208.
14. *Klymchenko A.S., Öztürk T., Demchenko A.P.* Synthesis of furanochromones: a new step in improvement of fluorescence properties // *Tetrahedron Lett.* — 2002. — Vol. 43, No 39. — P. 7079—7082.
15. *Nemkovich N.A., Kruchenok J.V., Rubinov A.N., Pivovarenko V.G., Baumann W.* Site selectivity in excited-state intramolecular proton transfer in flavonols // *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* — 2001. — Vol. 139, No 1. — P. 53—62.
16. *Крученко Ю.В., Немкович Н.А., Пивоваренко В.Г., Рубинов А.Н.* Механизм внутримолекулярного переноса протона и электрона в возбужденном состоянии 4'-аминопроизводных 3-гидроксифлавона // *Журн. прикл. спектроскопии.* — 2002. — Т. 69, № 3. — С. 324—330.
17. *Nemkovich N.A., Baumann W., Pivovarenko V.G.* Dipole moments of 4'-aminoflavonols determined using electro-optical absorption measurements or molecular Stark-effect spectroscopy // *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* — 2002. — Vol. 140. — P. 19—24.
18. *Reichardt C.* Solvatochromic dyes as solvent polarity indicators // *Chem. Rev.* — 1994. — Vol. 94, No 8. — P. 2319—2358.
19. *Rekker R.F., de Kort H.M.* The hydrophobic fragmental constant; an extension to a 1000 data point set // *Eur. J. Med. Chem., Chim. Therap.* — 1979. — Vol. 14. — P. 479—488.
20. *Smith M.A., Neumann R.M., Webb R.A.* A modification of the Algar-Flynn-Oyamada preparation of flavonols // *J. Heterocyclic Chem.* — 1968. — Vol. 5. — P. 425—426.
21. *Rao T.S., Deshpande S., Mathur H.H., Trivedi G.K.* A novel synthesis of 6-methoxy and 7-methoxy flavonols // *Heterocycles.* — 1984. — Vol. 22. — P. 1943—1946.
22. *Fougerousse A., Gonzalez E., Brouillard R.* A convenient method for synthesizing 2-aryl-3-hydroxy-4-oxo-4H-1-benzopyrans or flavonols // *J. Org. Chem.* — 2000. — Vol. 65. — P. 583—586.
23. *Klymchenko A. S., Öztürk T., Pivovarenko V.G., Demchenko A.P.* Design of Fluorescent Probes Sensitive to Membrane Potential Based on Intramolecular Excited State Proton Transfer // *Proceedings of the Third*

Conference «Fluorescence Microscopy and Fluorescent Probes» Ed. by A. Kotyk. — Espero Publishing. — Prague, 1999. — P. 153—158.

24. Demchenko A.P., Klymchenko A.S., Pivovarenko V.G. 3-Hydroxyflavones as fluorescence probes for molecular and cellular research // *J. Biol. Chem. Luminescence*. — 2000. — Vol. 15. — P. 116—118.

25. Demchenko A.P., Klymchenko A.S., Pivovarenko V.G., Ercelen S. Ratiometric probes: design and applications // *Fluorescence Spectroscopy, Imaging and Probes — New Tools in Chemical, Physical and Life Sciences*, Ed. by Kraayenhof R., Visser A. J. W. G., Gerritsen H. C. — Springer Series on Fluorescence Methods and Applications. — Vol. 2. — Springer-Verlag. — Heidelberg: Germany. — 2002. — P. 101—110.

26. Sebnem E., Roshal A.D., Demchenko A.P., Klymchenko A.S. Excited-state proton transfer reaction in a new benzofuryl 3-hydroxychromone derivative: the influence of low-polar solvents // *Polish J. Chem.* — 2002. — Vol. 76, No 9. — P. 1287—1299.

27. Sebnem E., Klymchenko A.S., Demchenko A.P. An ultrasensitive fluorescent probe for hydrophobic range of solvent polarities // *Analytica Chimica Acta*. — 2002. — Vol. 464. — P. 273—287.

28. Klymchenko A.S., Pivovarenko V.G., Ozturk T., Demchenko A.P. Principles of designing the two-band microenvironment-sensitive fluorescent dyes based on 3-hydroxychromone // *In press*.

29. Klymchenko A.S., Demchenko A.P. Multiparametric probing of intermolecular interactions with fluorescent dye exhibiting excited state intramolecular proton transfer // *Phys. Chem. Chem. Phys.* — 2003. — Vol. 5. — P. 461—468.

30. Lippert E. Dipolmoment und Elektronenstruktur von angeregten Molekulan // *Z. Naturforsch.* — 1955. — Vol. 10a, No 7. — P. 541—545.

31. Kjaer A.M., Ulstrup J. // *J. Am. Chem. Soc.* — 1987. — Vol. 109. — P. 1934—1941.

32. Klymchenko S., Pivovarenko V.G., Demchenko A.P. Elimination of hydrogen bonding effect on the sol-

vatochromism of 3-hydroxyflavones // *J. Phys. Chem. A*. — 2003. — Vol. 107. — P. 4211—4216.

33. Duportail G., Klymchenko A.S., Mely Y., Demchenko A.P. Neutral fluorescence probe with strong ratiometric response to surface charge of phospholipid membranes // *FEBS Lett.* — 2001. — Vol. 508, No 2. — P. 196—200.

34. Duportail G., Klymchenko A., Mely Y., Demchenko A.P. On the coupling between surface charge and hydration in biomembranes. experiments with 3-hydroxyflavone probes // *J. Fluorescence*. — 2002. — Vol. 12, No 2. — P. 181—185.

35. Klymchenko A.S., Demchenko A.P. Probing AOT reverse micelles with two-color fluorescence dyes based on 3-hydroxychromone // *Langmuir*. — 2002. — Vol. 18, No 15. — P. 5637—5639.

36. Roshal A.D., Grigorovich A.V., Doroshenko A.O., Pivovarenko V.G., Demchenko A.P. Flavonols as metal-ion chelators: complex formation with  $Mg^{2+}$  and  $Ba^{2+}$  cations in the excited state // *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* — 1999. — Vol. 127. — P. 89—100.

37. Пивоваренко В.Г., Демченко О.П. // Неопубліковані результати.

38. Falkovskaia E., Pivovarenko V.G., del Valle J.C. Observation of a single proton transfer fluorescence in a biaxially symmetric dihydroxy diflavonol // *Chem. Phys. Lett.* — 2002. — Vol. 352. — P. 415—420.

39. Pivovarenko V.G., Józwiak L., Błażejowski J. 2,8-Bis[4-(diethylamino)phenyl]-3,7-dihydroxy-4H,6H-pyrano[3,2-g]chromene-4,6-dione — a new liquid-phase-sensitive fluorescent probe utilising intramolecular one- or two-proton transfer phenomena // *Europ. J. Org. Chem.* — 2002. — P. 3979—3985.

40. Falkovskaia E., Pivovarenko V.G., del Valle J.C. Interplay between intra- and inter-molecular excited state single and double proton transfer processes in the biaxially symmetric molecule 3,7-dihydroxy-4H,6H-pyrano[3,2-g]-chromene-4,6-dione // *J. Phys. Chem. A*. — 2004.