

Поліметинові барвники — похідні 7-N,N-діалкіламінокумаринів

Я.О. Простота, О.Д. Качковський^{1*}, О.В. Кропачев¹,
М.Ю. Лосицький, С.С. Тарнавський, С.М. Ярмолук

*Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
вул. Акад. Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна*

*¹Інститут органічної хімії НАН України
вул. Мурманська, 5, Київ, 03660, Україна*

Резюме. Отримано ряд катіонних поліметинових барвників — похідних 7-N,N-діетиламінокумарину, а також його аналога з просторово закріпленою аміногрупою (юлолідинілкумарин, кумарин 343), — модифікованих уведенням поліметинового хромофора в положення 3 кумаринового фрагмента. Досліджено спектри поглинання всіх синтезованих речовин. Сполуки протестовано на можливість застосування як флуоресцентних зондів для детекції нуклеїнових кислот і білків. Встановлено, що барвники **5б** і **6в** є найбільш придатними об'єктами для неспецифічної детекції протеїнів у присутності додецилсульфату натрію, однак вони мають низьку хімічну стабільність у буферних розчинах та у присутності біологічних молекул.

Ключові слова: поліметинові барвники, кумарини, поглинання, флуоресцентні зонди.

Вступ. Поліметинціаніни протягом тривалого часу широко застосовуються в біологічних і медичних методологіях як флуоресцентні барвники для детекції та візуалізації біологічних полімерів [1]. Стрімкий розвиток новітніх біотехнологій вимагає розробки нових ультрачутливих методів визначення нуклеїнових кислот (НК) і білків. Більшість цих методів ґрунтуються саме на ціанінових барвниках. Так, поліметинціаніни використовують для детекції НК у розчинах, електрофоретичних гелях, на твердих носіях (блоти й мікрочіпи), у капілярно-електрофоретичних процедурах, флуоресцентній мікроскопії, полімеразно-ланцюгових реакціях із визначенням кількості отриманої НК у режимі реального часу (Real-time PCR) [1, 2]. Усі ці методи вимагають поліме-

тинціанінів із новими, не характерними для класичних ціанінів, спектральними властивостями.

Останнім часом зусилля науковців спрямовані на розробку флуоресцентних барвників, які поглинають у ближній ІЧ-області [3, 4]. Відомо, що саме 7-N,N-діалкіламінокумарини та деякі їх похідні широко використовуються як довгохвильові флуорофори [4, 5]. Уведення ж сильних електроноакцепторних груп у положення 3 і 4 кумаринів спричинює, як правило, батохромний зсув смуги поглинання. Це пояснюється подовженням ланцюга спряження в модифікованих кумаринах.

У зв'язку з цим ми вважали за доцільне отримати й більш детально дослідити спектрально-люмінесцентні властивості катіонних ціанінових барвників — похідних 7-N,N-діалкіламінокумарину — з уведеним у положення 3 поліметиновим хромофором, об'єднавши таким чином у складі однієї молекули структури поліметинового барвника й кумарину.

* Corresponding author.

Tel.: +38044-5510682; fax: +38044-5732643

E-mail address: adkachkovsky@mail.ru

Характеристики синтезованих барвників

Сполука	Вихід %	t _{пл} , °C (розч. для крист.)	Брутто-формула	Дані елементного аналізу					
				Розраховано, %			Знайдено, %		
				C	H	N (Cl)	C	H	N (Cl)
3б	61	108-112 (EtOH:CH ₃ CN - 2:1)	C ₁₆ H ₁₃ NO ₃	71,4	5,6	5,2	71,3	5,5	5,1
5а	71	187-190	C ₂₆ H ₂₃ N ₂ O ₆ Cl	62,3	5,8	5,6 (7,0)	62,2	5,9	5,5 (7,0)
5б	40	245-249	BC ₂₆ H ₂₄ N ₂ O ₃ F ₄	65,6	5,7	5,5	65,5	5,6	5,5
6а	59	258-261 (HOAc)	BC ₃₂ H ₂₈ NO ₃ F ₄	68,5	5,0	2,5	68,7	5,4	2,7
6б	52	>300 (HOAc: CH ₃ CN - 2:1)	BC ₃₄ H ₂₈ NO ₃ F ₄	69,7	4,8	2,4	69,9	4,7	2,5
6в	21	176-179 (i-PrOH)	C ₂₆ H ₂₆ NO ₇ Cl	63,0	6,8	2,6 (6,7)	62,9	6,9	2,7 (6,6)
7а	50	289-291	C ₃₀ H ₃₁ N ₂ O ₂ Cl	65,4	5,6	5,1 (6,4)	65,3	5,5	5,1 (6,5)
7б	19	>300	C ₃₂ H ₃₁ N ₂ O ₆ Cl	66,8	5,4	4,9	66,7	5,5	5,0

Варто зазначити, що поліметинові барвники — похідні кумаринів — представлені в літературі лише одиничними прикладами [4, 7], тоді як донорно-акцепторні похідні 7-N,N-діетиламінокумарину (мероціаніни) — досить широко [7]. Окрім того, у літературі майже немає згадок про флуоресцентні характеристики всіх цих сполук, а також про їх застосування як зондів.

У цій роботі описано синтез ряду нових катіонних поліметинових барвників — похідних 7-N,N-діетиламінокумарину, а також його аналога із закріпленою аміногрупою (юлолідинілкумарин, кумарин 343). Досліджено властивості спектрів поглинання та флуоресценції одержаних речовин. Синтезовані сполуки вивчено як можливі флуоресцентні зонди для детекції НК і білків.

Матеріали й методи. Експериментальна частина. Електронні спектри поглинання розчинів синтезованих сполук в ацетонітрилі записували на спектрофотометрі Shimadzu UV-3100. Для вимірювань використовувався ацетонітрил спектральної чистоти. Спектри поглинання розчинів сполук у ДМФА, буфері та за присутності біологічних молекул реєстрували з допомогою спектрофотометра Specord M-40 (Carl Zeiss, Німеччина). Для запису спектрів флуоресценції використовували флуоресцентний спектрофотометр Cary Eclipse (Varian Inc., Австралія). Спектри збудження флуоресценції коректувалися на спектральну неоднорідність джерела випромінювання, проте виправлення спектрів флуоресценції на чутливість фотодетектора не здійснювалося.

Усі виміри проводилися за кімнатної температури. Спектри ПМР записували на спектрометрі Varian VXR-300 з робочою частотою 300 МГц за 25 °С, внутрішній стандарт ТМС. Температури плавлення, дані елементного аналізу й розчинники для кристалізації наведено в табл. 1.

2,3,6,7-Тетрагідро-11-оксо-1Н,5Н,11Н-[1]бензопірано[6,7,8-іj]хінолізин-10-карбальдегід (3б). До розчину 1,1 г (4,6 ммоль) кумарину **2б** у 6 мл сухого ДМФА при перемішуванні та охолодженні льодом прикапували 0,36 мл POCl₃. Суміш витримували 3 год за температури 70-80 °С. Після охолодження до неї приливали 1 М розчин NaOH до рН 6-7 (універсальний індикаторний папір). Осад, що утворився, відфільтровували та перекристалізовували.

Спектр ПМР, CDCl₃, δ, м.ч.: 1,98 м (4Н, NCH₂CH₂CH₂), 2,76 м (2Н, NCH₂CH₂CH₂), 2,87 м (2Н, NCH₂CH₂CH₂), 3,37 м (4Н, NCH₂CH₂CH₂), 6,95 с (1Н, 5-Н), 8,1 с (1Н, 4-Н), 10,1 с (1Н, Н_{CHO}).

2-[2-(7-Діетиламіно-2-оксо-2Н-хромен-3-іл)-вініл]-1,3,3-триметил-3Н-індолій перхлорат (5а). Суміш 0,2 г (0,82 ммоль) альдегіду **3а** та 0,22 г (0,82 ммоль) перхлорату 1,2,3,3-тетраметил-3Н-індолію у 3 мл свіжоперегнаного оцтового ангідриду кип'ятили протягом 3 хв. Осад, що утворився після охолодження розчину, відфільтровували, промивали етилацетатом, ефіром і сушили.

Спектр ПМР, CD₃CN, δ, м.ч.: 1,27 т (6Н, J=7 Гц, NCH₂CH₃), 1,8 с (6Н, C(CH₃)₂), 3,6 кв (4Н, J=7 Гц, NCH₂CH₃), 3,94 с (3Н, NCH₃), 6,63 д (1Н, J=2,4 Гц, 4-Н), 6,87 дд (1Н, J=9, 2,4 Гц, 5-Н), 7,56 д (1Н, J=9 Гц, 6-Н), 7,6-7,73 м (4Н, Н_{Ar}),

7,88 д (1H, $J=16$ Гц, CH=), 8,32 д (1H, $J=16$ Гц, CH=), 8,43 с (1H, 8-H).

Барвник **5б** отримували аналогічно з альдегіду **3б** і тетрафторборату 1,2,3,3-тетраметил-3H-індолю.

Спектр ПМР, CD₃CN, δ , м.ч.: 1,8 с (6H, $J=7$ Гц, C(CH₃)₂), 2,6 м (4H, NCH₂CH₂CH₂), 2,84 м (4H, NCH₂CH₂CH₂), 3,5 м (4H, NCH₂CH₂CH₂), 3,9 с (3H, NCH₃), 7,13 с (1H, 5-H), 7,5-7,62 м (3H, H_{Ar}), 7,71 д (1H, $J=7$ Гц, 7-H індолієвого залишку), 7,8 д (1H, $J=16$ Гц, CH=), 8,2 д (1H, $J=16$ Гц, CH=), 8,26 с (1H, 4-H).

4-[2-(7-Діетиламіно-2-оксо-2H-хромен-3-іл)-вініл]-2,6-дифенілпіранілій тетрафторборат (**6а**). Суміш 0,2 г (0,82 ммоль) альдегіду **3а** та 0,27 г (0,82 ммоль) тетрафторборату 2,6-дифеніл-4-метил-пірилію в 5 мл свіжоперегнаного оцтового ангідриду кип'ятили протягом 5 хв.

Осад, що утворився після охолодження розчину, відфільтровували, промивали етилацетатом, ефіром і перекристалізували.

Спектр ПМР, ДМСО-d₆, δ , м.ч.: 1,18 т (6H, $J=6,6$ Гц, NCH₂CH₃), 3,52 кв (4H, $J=6,6$ Гц, NCH₂CH₃), 6,6 с (1H, 5-H), 6,84 д (1H, $J=9$ Гц, 5-H), 7,57 д (1H, $J=9$ Гц, 6-H), 7,72 м (7H, H_{Ph} + CH=), 8,2 с (1H, 8-H), 8,35 д (4H, $J=7$ Гц, H_{Ph}), 8,48 д (1H, $J=15$ Гц, CH=), 8,86 с (2H, $\beta\beta'$ -H пірилію).

Барвник **6б** отримували аналогічно з альдегіду **3б** і тетрафторборату 2,6-дифеніл-4-метил-пірилію.

Спектр ПМР, ДМСО-d₆, δ , м.ч.: 1,79 м (4H, NCH₂CH₂CH₂), 3,3 м (4H, NCH₂CH₂CH₂), 6,6 с (1H, 5-H), 7,4 д (1H, $J=15$ Гц, CH=), 7,6-7,7 м (7H, H_{Ph} + 4-H), 7,81 с (2H, $\beta\beta'$ -H пірилію), 7,9 д (1H, $J=15$ Гц, CH=), 8-8,3 м (4H, H_{Ph}).

2,6-Ди-(трет-бутил)-4-[2-(7-діетиламіно-2-оксо-2H-хромен-3-іл)-вініл]-піранілій перхлорат (**6в**). Суміш 0,2 г (0,82 ммоль) альдегіду **3а** та 0,27 г (0,82 ммоль) перхлорату-2,6-ди-(трет-бутил)-4-метил-пірилію у 3 мл свіжоперегнаного оцтового ангідриду кип'ятили протягом 5 хв.

Після охолодження до реакційної маси додавали 50 мл ефіру, осад відфільтровували й перекристалізували з вугіллям.

Спектр ПМР, CD₃CN, δ , м.ч.: 1,24 т (6H, $J=7$ Гц, NCH₂CH₃), 1,48 с (18H, т-C₄H₉), 3,5 кв (4H, $J=7$ Гц, NCH₂CH₃), 6,6 д (1H, $J=2,4$ Гц, 4-H), 6,83 дд (1H, $J=9, 2,4$ Гц, 5-H), 7,53 д (1H, $J=9$ Гц, 6-H), 7,72 с

(2H, $\beta\beta'$ -H пірилію), 7,8 д (1H, $J=16$ Гц, CH=), 8,16 д (1H, $J=16$ Гц, CH=), 8,2 с (1H, 8-H).

1-(н-Бутил)-2-[2-(7-діетиламіно-2-оксо-2H-хромен-3-іл)-вініл]-бенз[cd]індолий перхлорат (**7а**). Суміш 0,1 г (0,41 ммоль) альдегіду **3а** і 0,132 г (0,82 ммоль) перхлорату 1-(н-бутил)-2-метил-бенз[cd]індолю в 10 мл свіжоперегнаного оцтового ангідриду кип'ятили 5 хв. Осад, що утворився після охолодження розчину та його відстоювання протягом двох діб, відфільтровували, промивали етилацетатом, ефіром і сушили.

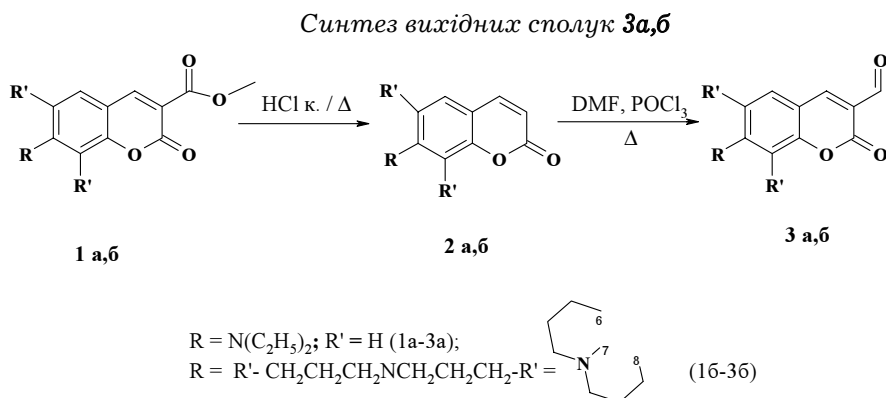
Спектр ПМР, ДМСО-d₆, δ , м.ч.: 1,0 т (3H, $J=8$ Гц, NCH₂CH₂CH₂CH₃), 1,19 т (6H, $J=6,6$ Гц, NCH₂CH₃), 1,47 кв (2H, $J=8$ Гц, NCH₂CH₂CH₂CH₃), 1,92 м (2H, NCH₂CH₂CH₂CH₃), 3,54 м (4H, NCH₂CH₃), 4,59 м (2H, NCH₂CH₂CH₂CH₃), 6,52 с (1H, 4-H), 6,8 д (1H, $J=9$ Гц, 5-H), 7,49 д (1H, $J=7$ Гц, 6-H), 7,86 тр (1H, $J=7,5$ Гц, H_{Ar}), 8,05-8,2 м (4H, H_{Ar}), 8,56-8,23 м (2H, H_{Ar}), 9,08 д (1H, $J=7$ Гц, H_{Ar}).

Барвник **7б** синтезовано аналогічно з альдегіду **3б** і перхлорату 1-(н-бутил)-2-метил-бенз[cd]індолю.

Спектр ПМР, ДМСО-d₆, δ , м.ч.: 0,98 т (3H, $J=7$ Гц, NCH₂CH₂CH₂CH₃), 1,47 кв (2H, $J=7$ Гц, NCH₂CH₂CH₂CH₃), 1,87 м (6H, NCH₂CH₂CH₂ + NCH₂CH₂CH₂CH₃), 2,49-2,67 м (2H, NCH₂CH₂CH₂), 3,43 м (2H, NCH₂CH₂CH₂), 4,46 м (4H, NCH₂CH₂CH₂CH₃), 6,91 с (1H, 5-H), 7,8 м (1H, H_{Ar}), 8,04 м (4H, H_{Ar}), 8,37-8,5 м (3H, H_{Ar}), 8,95 м (1H, H_{Ar}).

Приготування зразків. Для отримання стокових розчинів концентрації 2×10^{-3} М барвники розчиняли у ДМФА. Стокові розчини ДНК і РНК концентрації відповідно 6×10^{-3} М пар основ (п.о.) та $1,2 \times 10^{-2}$ М основ (о.) готували в 0,05 М Tris-HCl буфері, рН 8,0. У роботі використовувалася тотальна ДНК із лосося й сумарна дріжджова РНК (Sigma, США). Стокові розчини БСА (сироваткового альбуміну бика) та системи БСА-ДСН (додецилсульфат натрію) у вищезазначеному буфері містили 0,2 мг/мл БСА й суміш із 0,2 мг/мл БСА та 0,05 % ДСН відповідно.

Розчини вільних барвників та їх комплексів із нуклеїновими кислотами готували розведенням відповідних стокових розчинів у буфері. Концентрації ДНК і РНК у робочих розчинах дорівнювали відповідно 6×10^{-5} М п.о. та $1,2 \times 10^{-4}$ М о. Розчини барвників у присутності БСА й системи БСА-ДСН готували шляхом



змішування необхідної кількості стокових розчинів барвника та БСА чи БСА-ДСН. Таким чином, концентрація БСА й ДСН у розчинах складала відповідно 0,2 мг/мл і 0,05 %, концентрація барвників — 5×10^{-6} М.

Квантово-хімічні розрахунки. Квантово-хімічні розрахунки рівноважної молекулярної геометрії катіонів досліджуваних барвників **5а**, **6а**, **6в**, **7а**, а також модельного вінілога стирилу **8** виконувалися в наближенні АМ1 (пакет програм МОРАС). Для основного стану процедура оптимізації геометрії проводилася до моменту досягнення глобального мінімуму енергії і припинялася при значенні градієнта енергії $\text{grad}(S_0) = 0,5$ ккал/моль. У збудженому стані оптимізувалися тільки довжини зв'язків та валентні кути, так що молекула залишалася пласкою (т.зв. флуоресцентний збуджений стан). При цьому враховувалися збуджені конфігурації за участі двох верхніх заповнених орбіталей і двох нижніх вакантних МО; $\text{grad}(S_1) = 0,5$ ккал/моль. Енергії електронних переходів з урахуванням правила Франка-Кондона в геометрії основного стану (відповідають спектрам поглинання) та при оптимізованій геометрії першого збудженого стану (відповідають спектрам флуоресценції) обчислено в рамках «спектрального» наближення ZINDO/S (пакет HyperChem). Ураховувалися 20 однократно збуджених конфігурацій із найнижчою енергією. Змінний параметр OWF (Overlap Weight Factor) добирався так, щоб досягти найкращої кореляції з максимумом довгохвильової смуги поглинання, що дало змогу оцінити стокові зсуви.

Результати й обговорення. Синтез барвників. Отримано ряд сполук — похідних 7-*N,N*-

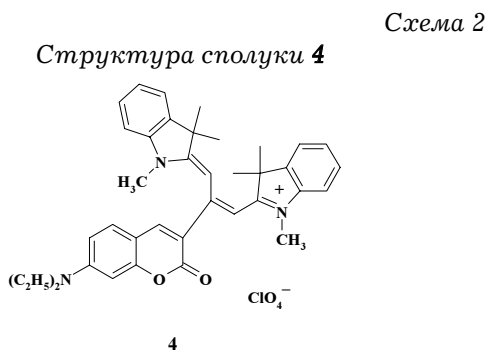
діалкіламінокумаринів із поліметиновим хромофором, уведеним у положення 3 кумаринового фрагмента. Барвники **5-7** за будовою основного хромофора можна трактувати (з деяким наближенням) як похідні вінілогів стирилів (бутадієнільних похідних), з якими їх зручно порівнювати.

Як вихідні речовини для синтезу сполук **5-7** (схема 1) було обрано препаративно доступні альдегіди ряду кумарину **3а,б** [8].

Відомо, що просторове закріплення аміногрупи через уведення метиленового містка веде (у більшості відомих поліметинових барвників) до поглиблення забарвлення [9]. Саме тому для отримання барвників цього ряду нами також було обрано ядро відомого флуорофора — кумарину 343 (**2б**). Це мало спричинити батохромний зсув максимуму поглинання барвників — похідних цього ядра — в порівнянні з барвниками — похідними 7-*N,N*-діетиламінокумарину (де має місце вільне обертання діетильних залишків аміногрупи). Відомо, що просторове закріплення аміногрупи приводить до суттєвого збільшення квантового виходу флуоресценції для широкого ряду флуорофорів різних типів [4].

У роботі [7] згадується про спробу синтезу барвника **5а** конденсацією альдегіду **3а** з основою Фішера в умовах основного каталізу, однак триядерний ціанін виявився єдиним продуктом реакції **4** (схема 2), який виділено у вигляді лейкооснови.

Провівши цю ж реакцію конденсації альдегіду **3а** з перхлоратом 1,2,3,3-тетраметил-3Н-індолію в оцтовому ангідриді, нам вдалося без особливих зусиль отримати бажаний барвник **5а** з високим виходом.



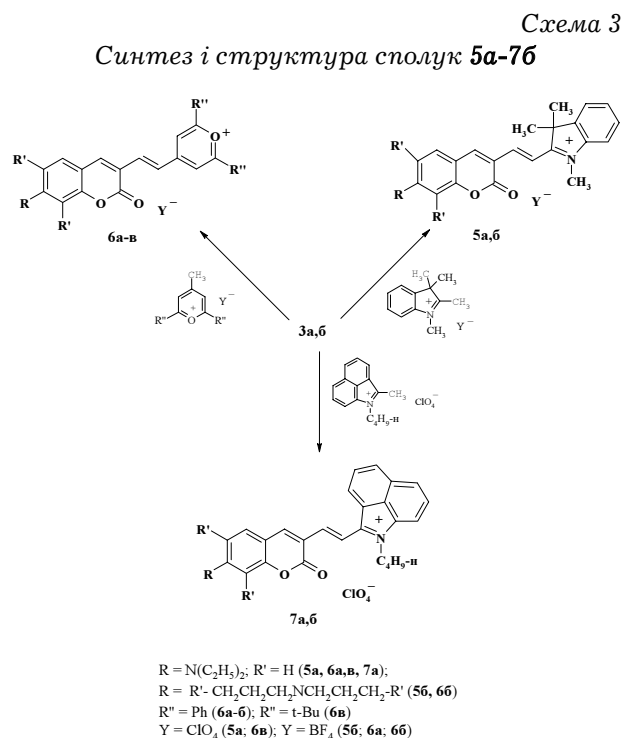
У ході дослідження виявилось, що оптимальним розчинником для синтезу всіх цільових сполук є оцтовий ангідрид, а оптимальними умовами — короточасне кип'ятіння розчинів двох вихідних компонентів. У той же час проведення реакцій ціанінової конденсації в інших розчинниках (піридин, етанол) або збільшення часу реакції суттєво погіршувало вихід цільових продуктів або спричинювало повну чи часткову деструкцію бажаних барвників. Тому сполуки **6-7** одержали шляхом конденсації альдегідів **3а,б** із відповідними гетероциклічними солями — 2,6-дифеніл-4-метилпірилію (**6а,б**), 2,6-ди(трет-бутил)-4-метилпірилію (**6в**) та 1-(*n*-бутил)-2-метилбенз[*cd*]індолю (**7а,б**) в оцтовому ангідриді.

Склад і структуру синтезованих барвників доведено за допомогою елементного аналізу, електронної та ПМР-спектроскопії.

Для всіх отриманих сполук записано спектри поглинання в ацетонітрилі. Встановлено, що барвники мають довгохвильові максимуми поглинання (573–717 нм) (табл. 2) при середніх ($60000\text{--}90000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) значеннях коефіцієнтів екстинкції (ϵ). Треба зауважити, що для вінілолів стирилів також характерні такі спектральні особливості [10]. Для сполук **5а,б**, **6в**, крім того, виміряно спектри флуоресценції в ацетонітрилі (табл. 2).

Спектральні властивості барвників у ДМФА й буфері. Спектральні властивості синтезованих кумаринових барвників у ДМФА та буфері наведено в табл. 3.

У спектрах поглинання розчинів барвників у ДМФА виявляється смуга з максимумом, розташованим в області 572–714 нм, що відповідає поглинанню поліметинового хромофора. Проте ця смуга інтенсивна лише у випадку сполук **5а** та **5б** (відповідно $\epsilon=0,38 \times 10^5$ і



$0,64 \times 10^5\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), тоді як для інших досліджуваних барвників значення молярного коефіцієнта екстинкції (ϵ) не перевищує $0,03 \times 10^5\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Отже, на відміну від розчинів барвників в ацетонітрилі, поглинання хромофорів розчинів **6а, 6б, 6в, 7а** та **7б** у ДМФА є досить слабким. Водночас для сполук **5а, 5б, 6в** і **7б** спостерігалися спектри флуоресценції, що відповідають випромінюванню поліметинових хромофорів. Максимуми спектрів збудження флуоресценції розташовані між 578 і 678 нм, а відповідні максимуми спектрів випромінювання — в інтервалі 653–725 нм. Для індоленінових барвників **5а** та **5б** спостерігалися середні значення

Таблиця 2
Спектральні характеристики
барвників 5-7 в ацетонітрилі

Сполука	$\lambda_{\text{макс}}$, нм	ϵ , $10^{-3}\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$	$\lambda_{\text{фл}}$, нм	ΔS , нм
5а	573	79,0	648	75
5б	605	84,9	679	74
6а	405, 642	23,0, 80,0	—	—
6б	404, 694	23,0, 82,3	—	—
6в	595	70,0	712	117
7а	420, 667	15,1, 68,1	—	—
7б	427, 715	13,7, 73,6	—	—

Примітка: $\lambda_{\text{макс}}$ ($\lambda_{\text{фл}}$) — довжина хвилі максимуму спектра поглинання (флуоресценції), ϵ — молярний коефіцієнт екстинкції, S — стоксів зсув.

Спектрально-люмінесцентні властивості сполук **5-7** у ДМФА й буфері

Барв- ник	У ДМФА					У буфері (0,05 М TRIS-HCl, pH 8,0)				
	$\lambda_{\text{погл.}}^{\text{нм}}$	$\epsilon, 10^5 \text{ М}^{-1}\text{см}^{-1}$	$\lambda_{\text{аб.}}^{\text{нм}}$	$\lambda_{\text{фл.}}^{\text{нм}}$	I, в.о.	$\lambda_{\text{погл.}}^{\text{нм}}$	$\epsilon, 10^5 \text{ М}^{-1}\text{см}^{-1}$	$\lambda_{\text{аб.}}^{\text{нм}}$	$\lambda_{\text{фл.}}^{\text{нм}}$	I, в.о.
5а	572	0,38	578	653	398	567	0,72	587	654	168
5б	605	0,64	614	680	152	596	0,78	635	679	47,3
6а	639	~0,02	~680	~691	1,5	593 ~550-плече	0,36 ~0,24	~680	~760	0,15
6б	~690	~0,03	~680	~694	1,5	585	0,4	—	—	~0,1
6в	611	0,03	612	725	1,0	585	0,5	600	710	5,6
7а	670	0,024	—	—	~0,2	595	0,62	—	—	~0,1
7б	~714	~0,012	678	692	1	617	0,52	—	—	~0,1

Примітка: $\lambda_{\text{погл.}}$ ($\lambda_{\text{аб.}}$, $\lambda_{\text{фл.}}$) — довжина хвилі максимуму спектра поглинання (збудження, випромінювання флуоресценції); ϵ — молярний коефіцієнт екстинкції на $\lambda_{\text{погл.}}$; I — інтенсивність флуоресценції (подано у внутрішніх одиницях (в.о.) приладу).

інтенсивності випромінювання (I), для сполук **6а**, **6б**, **6в** та **7б** — дуже низькі — на два порядки менші, ніж для індоленів. Для **7а** у ДМФА спектр флуоресценції, що відповідає випромінюванню поліметинового хромофора, не спостерігався.

Спектри поглинання розчинів барвників у водному буфері містять смугу, що відповідає поглинанню поліметинового хромофора, максимум якої знаходиться в інтервалі 567–617 нм, тобто є зсунутим у короткохвильовий бік на величину до 105 нм, на відміну від спектра відповідного барвника в ДМФА. Розчини досліджуваних сполук у буфері, на відміну від відповідних розчинів у ДМФА, мають вищі значення ϵ (від $0,36 \times 10^5$ до $0,78 \times 10^5 \text{ М}^{-1}\text{см}^{-1}$). Для розчинів барвників **6б**, **7а** і **7б** у буфері флуоресценція, що відповідає випромінюванню стирилових хромофорів, не спостерігалася. Для **5а**, **5б**, **6а** та **6в** максимума спектрів збудження і випромінювання флуоресценції знаходяться в діапазонах 587–680 і 654–760 нм відповідно. Інтенсивність флуоресценції розчинів барвників у буфері, порівняно з розчинами відповідних барвників у ДМФА, зменшується у 2–3 рази для **5а**, **5б** і **6а** та зростає у 5–6 разів для **6в**.

Спектрально-люмінесцентні властивості синтезованих барвників у буфері в присутності ДНК і РНК. Спектральні властивості розчинів досліджуваних кумаринових барвників у буфері в присутності ДНК і РНК подано в табл. 4.

У спектрах поглинання сполук **5а**, **5б**, **6б** і **6в** у присутності ДНК спостерігається лише одна смуга, що відповідає поглинанню полімети-

вого хромофора, максимум якої зсунутий на 2–9 нм у довгохвильовий бік відносно аналогічного максимуму відповідного барвника в буфері. Для барвників **6а**, **7а** та **7б** у присутності ДНК у спектрах поглинання з'являються додаткові максимуми в інтервалі 670–764 нм, які не спостерігаються у спектрах вільних барвників. Окрім того, у спектрі **7б** у присутності ДНК проявляються два максимуми (605 та 641 нм), тоді як для вільного барвника спостерігається лише один (617 нм).

Вимірювання спектрів флуоресценції барвників у присутності ДНК показало, що для сполук **5а**, **5б** і **6в** максимума спектрів збудження та випромінювання флуоресценції знаходяться в інтервалах відповідно 586–630 і 651–709 нм. У випадку **6а** та **7а** згадані максимуми знаходяться відповідно між 720–742 і 780–785 нм. Інтенсивність флуоресценції **5а**, **5б**, **6а**, **6в** та **7а** в присутності ДНК зростає в 1,4–15 разів порівняно з флуоресценцією (або рівнем фону у випадку **7а**) цих барвників у буфері. Слід зауважити, що сполука **5б** характеризується як відносно високим значенням інтенсивності флуоресценції в присутності ДНК (228 в.о.), так і підвищенням інтенсивності у 4,8 раза при додаванні ДНК. Для барвників **6б** і **7б** у присутності ДНК зареєструвати спектри флуоресценції не вдалося.

Максимума спектрів поглинання барвників у присутності РНК (табл. 4), порівняно з розчинами відповідних сполук у буфері, зсунуті в довгохвильовий бік до 17 нм. Винятком є барвник **6б**, для якого спостерігається короткохвильовий зсув на 3 нм. Окрім того, у спектрах по-

Спектрально-люмінесцентні властивості сполук **5-7** у присутності ДНК і РНК

Барвник	У присутності 6×10^{-5} М ДНК					У присутності $1,2 \times 10^{-4}$ М РНК				
	$\lambda_{\text{полл}}, \text{нм}$	$\varepsilon, 10^7 \text{ М}^{-1} \text{ см}^{-1}$	$\lambda_{\text{аб}}, \text{нм}$	$\lambda_{\text{фл}}, \text{нм}$	I, в.о.	$\lambda_{\text{полл}}, \text{нм}$	$\varepsilon, 10^5 \text{ М}^{-1} \text{ см}^{-1}$	$\lambda_{\text{аб}}, \text{нм}$	$\lambda_{\text{фл}}, \text{нм}$	I, в.о.
5а	569	0,62	586	651	240	568	0,66	590	652	225
5б	605	0,6	630	686	228	599	0,64	634	680	146
6а	549 612 ~670- плече	0,24 0,24 0,2	~720	~780	1,5	605 ~540- плече	0,34 ~0,12	~718	~770	1,1
6б	588	0,32	–	–	0,2	582 ~630- плече	0,28 ~0,24	–	–	0,1
6в	587	0,44	615	709	10	587	0,44	630	708	11
7а	576 ~698- плече	0,36 ~0,18	742	785	1,5	603 ~710- плече	0,52 ~0,14	732	783	0,8
7б	605 641 ~764- плече	0,34 0,32 ~0,1	–	–	~0,1	634 ~770- плече	0,48 0,08	–	–	~0,1

Примітка: $\lambda_{\text{полл}}$ ($\lambda_{\text{аб}}$, $\lambda_{\text{фл}}$) — довжина хвилі максимуму спектра поглинання (збудження, випромінювання флуоресценції); ε — молярний коефіцієнт екстинкції на $\lambda_{\text{полл}}$; I — інтенсивність флуоресценції (подано в внутрішніх одиницях (в.о.) приладу).

глинання барвників **6б**, **7а** та **7б** у присутності РНК наявний довгохвильовий максимум відповідно на 630, 710 і 770 нм, який відсутній у спектрах цих сполук у буфері.

Максимуми спектрів збудження та випромінювання флуоресценції барвників **5а**, **5б**, **6а**, **6в** і **7а** у присутності РНК, на відміну від відповідних спектрів у присутності ДНК, зсунуті в довго- чи короткохвильовий бік до 15 нм. Інтенсивність флуоресценції у присутності РНК є посередньою для сполук **5а** та **5б** (відповідно 225 і 146 в.о.), для **6в** — значно меншою (11 в.о.), для решти барвників — незначною (меншою 1,1 в.о.). Для **6б** і **7б** флуоресценція у присутності РНК не спостерігалась.

Спектри поглинання та флуоресценції барвників у присутності БСА й системи БСА-ДСН. Характеристики спектрів поглинання і флуоресценції кумаринових сполук у присутності БСА, а також системи БСА-ДСН наведено в табл. 5.

Максимуми спектрів поглинання барвників **5б**, **6а**, **6б** і **7а** у присутності БСА зсунуті в довгохвильовий бік на 1-16 нм відносно максимумів відповідних сполук у буфері, а у випадку **5а**, **6в** та **7б** положення максимумів спектрів поглинання у буфері та в присутності БСА збігаються. Значення коефіцієнта екстинкції

розчинів досліджуваних барвників у присутності БСА близькі до відповідних значень сполук у буфері.

Положення максимумів спектрів збудження та випромінювання флуоресценції барвників **5а**, **6а** та **6в** у присутності БСА зсунуті в короткохвильовий бік відносно максимумів цих сполук у буфері відповідно на 5-16 та 1-55 нм. Для **5б** положення спектрів не змінюється, для **7а** у присутності БСА з'являються спектри збудження і випромінювання флуоресценції (максимуми 661 та 721 нм), які не спостерігались для розчину **7а** в буфері. Найбільше зростання інтенсивності флуоресценції барвника в присутності БСА відносно інтенсивності флуоресценції (чи фону) цього ж барвника в буфері складає 26 разів для сполуки **7а**, проте значення інтенсивності є дуже низьким (2,6 в.о.). Для решти барвників, що виявляють флуоресцентні властивості у присутності БСА, інтенсивність підвищується до 3,3 раза. Для розчинів **6б** і **7б** у присутності БСА флуоресценція не спостерігається.

Максимуми смуг поглинання барвників у присутності системи БСА-ДСН розташовані в області 580-625 нм і зсунуті на 8-40 нм у довгохвильовий бік відносно спектрів поглинання сполук у буфері (за винятком **6б**, для якого має

Спектрально-люмінесцентні властивості сполук **5-7** у присутності розчинів білків (БСА та БСА+ДСН)

Барвник	У присутності 0,2 мг/мл БСА					У присутності 0,2 мг/мл БСА та 0,05 % ДСН				
	$\lambda_{\text{погл}}$, нм	ε , 10^5 М ⁻¹ см ⁻¹	$\lambda_{\text{аб}}$, нм	$\lambda_{\text{фл}}$, нм	I, в.о.	$\lambda_{\text{погл}}$, нм	ε , 10^5 М ⁻¹ см ⁻¹	$\lambda_{\text{аб}}$, нм	$\lambda_{\text{фл}}$, нм	I, в.о.
5a	567	0,74	582	653	168	584	0,7	599	663	982
5б	597	0,78	635	679	58,8	616	0,76	667 ~615-плече	700 ~675-плече	710 ~500
6a	609 554-плече	0,24 0,2	~670	~705	0,5	606	0,4	677	746	21
6б	587	0,36	—	—	0,4	580	0,36	~748	~785	1,9
6в	585	0,5	584	667	10,6	625	0,58	636	710	215
7a	596	0,54	661	721	2,6	612	0,54	684	748	26
7б	617	0,5	—	—	0,2	625	0,54	748	~785	3,5

Примітка: $\lambda_{\text{погл}}$ ($\lambda_{\text{аб}}$, $\lambda_{\text{фл}}$) — довжина хвилі максимуму спектра поглинання (збудження, випромінювання флуоресценції); ε — молярний коефіцієнт екстинкції на $\lambda_{\text{погл}}$; I — інтенсивність флуоресценції (подано у внутрішніх одиницях (в.о.) приладу).

місце короткохвильовий зсув на 5 нм). Положення спектрів збудження та випромінювання флуоресценції **5a**, **5б** і **6в** у присутності БСА-ДСН зсунуті відповідно на 12-36 та 0-21 нм відносно положень спектрів цих барвників у буфері. У той же час для сполуки **6a** проявляється короткохвильовий зсув спектрів збудження і випромінювання флуоресценції (відповідно на 3 та 14 нм) у присутності системи БСА-ДСН. Для барвників **6б**, **7a** та **7б**, флуоресценції розчинів яких у буфері зареєстровані не були, у присутності БСА-ДСН спостерігалися спектри збудження та випромінювання флуоресценції з максимумами відповідно на 684-748 і 748-785 нм. Інтенсивність флуоресценції досліджуваних сполук у присутності БСА-ДСН зростала у 5,8-260 разів, проте її значення для більшості барвників не було високим, найвище спостерігалось для барвника **5a** (982 в.о.). Щоправда, підвищення інтенсивності, порівняно з розчином у буфері, складо лише 5,8 раза.

Серед барвників, що характеризуються достатньо високими значеннями інтенсивності флуоресценції та її підвищенням у присутності БСА-ДСН водночас, можна відзначити **5б** і **6в** (інтенсивність у присутності БСА-ДСН відповідно 710 та 215 в.о., підвищення відповідно в 15 і 38 разів). Таким чином, барвники **5б** і **6в** можна розглядати як сполуки, що придатні для неспецифічної детекції білків у присутності ДСН.

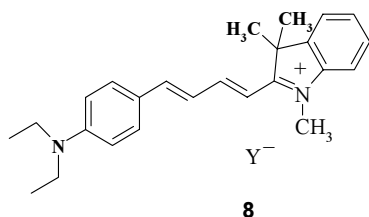
Стабільність барвників. Слід зауважити,

що спектри поглинання барвників **6a**, **6б**, **6в**, **7a** та **7б** залежать від часу, що проявляється, як правило, у зменшенні інтенсивності максимуму основної смуги спектра поглинання. Винятки, коли інтенсивність не змінюється (за час порядку 10-20 хв), становлять спектри поглинання сполук **6a**, **6б** і **7б** у ДМФА та **6a**, **7a**, **7б** у присутності РНК (щоправда, значення коефіцієнта екстинкції є надзвичайно низьким в усіх цих випадках). Окрім того, для спектрів поглинання барвників **7a** та **7б** у присутності БСА-ДСН спостерігається довгохвильовий зсув із часом, а у випадку **7a** — ще й зростання інтенсивності. Цікаво, що спектри флуоресценції зазначених сполук є стабільними в часі, такими ж є і спектри поглинання барвників **5a** і **5б**. Виняток становить розчин **5a** у ДМФА, для якого спостерігається зменшення інтенсивності.

Квантово-хімічні розрахунки. Барвники **5-7**, як уже згадувалося, можна розглядати як похідні вінілогів стирилів. Відомо, що більшість представників вінілогів стирилів поглинають у ближньому ІЧ-діапазоні, при цьому вони проявляють порівняно ефективну флуоресценцію [10].

Для встановлення можливих способів дезактивації збудженого стану, зокрема шляхом конформаційних перетворень, ми виконали квантово-хімічні розрахунки рівноважної молекулярної геометрії катіонів барвників **5a**, **6a**, **6в**, **7a**, а також модельного вінілога стирилу **8** (у наближенні AM1 із пакета MOPAC).

Схема 4
Структура модельного вінілога стирилу **8**
для квантово-хімічних розрахунків



За своєю електронною будовою стирили та їх вінілоги є типовими несиметричними ціаніновими барвниками, ступінь асиметрії яких традиційно пов'язують з альтернуванням довжин вуглець-вуглецевих зв'язків [11]. Для зручності графічного представлення альтернування як довжин зв'язків, так і зарядів на атомах будемо вважати бензольне кільце N,N-діалкілфеніленового залишку продовженням поліметинового ланцюга, хоча й розгалуженого. Розрахунки модельного барвника **8** показують, що різниця довжин зв'язків у еквівалентних положеннях бензольного кільця не перевищує 0,01 Å як в основному, так і збудженому станах, а різниця зарядів на атомах в еквівалентних положеннях менша 0,01. Кількісно альтернування довжин сусідніх CС-зв'язків було запропоновано характеризувати параметром Δl_v , а альтернування зарядів — Δq_μ . Їх значення обчислюються відповідно за допомогою формул (1) і (2) [12]:

$$\Delta l_v = |l_v - l_{v+1}| \quad (1),$$

$$\Delta q_\mu = |q_\mu - q_{\mu+1}| \quad (2),$$

де l_v — довжина v -ого зв'язку, а q_μ — заряд на μ -ому атомі.

Обчислені значення параметрів l_v та q_μ для хромофора барвників **5a** і **8** представлені на рис. 1. Як видно з рисунка, довжини зв'язків не вирівняні, на відміну від симетричних ціанінів [12]. Для вінілога стирилу **8** в основному стані найбільший ступінь альтернування розрахунки дають для відкритого поліметинового ланцюга поблизу амінофеніленового кінцевого залишку. Циклізація цих зв'язків під час переходу до барвника **5a**, похідного кумарину, значно вирівнює їх довжини, проте водночас розрахунки показують підвищення ступеня альтернування довжин зв'язків біля індолінового залишку. Δl_v збільшується з 0,024 до

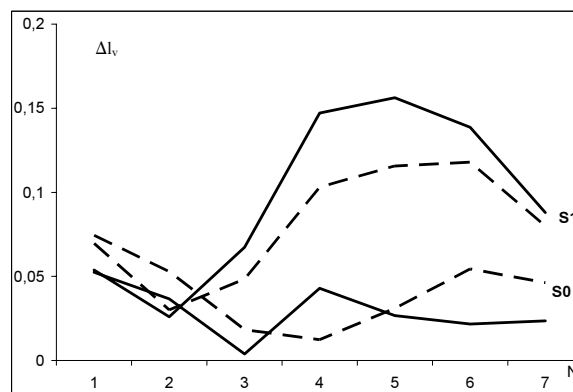


Рис. 1. Альтернування довжин зв'язків (Δl_v) у хромофорі модельного барвника **8** (—) та барвника **5a** (- - -) в основному (S_0) і збудженому (S_1) станах; N — номер зв'язку.

0,046 Å як за рахунок збільшення довжини зв'язку, що межує із індоліновою кінцевою групою (з 1,405 до 1,414 Å), так і за рахунок зменшення довжини наступного зв'язку (з 1,382 до 1,368 Å). З рис. 1 також можна бачити, що в релаксованому збудженому стані ступінь альтернування значно вищий, насамперед у відкритому ланцюзі. Циклізація частини хромофора барвника **5a** супроводжується суттєвим зменшенням альтернування довжин зв'язків у відкритій частині хромофора. Найбільшу довжину при релаксації у збудженому стані розрахунки дають для зв'язку, що межує з кумариновим залишком, — $l_v=1,467$ Å. Приблизно таку ж довжину має цей зв'язок і в інших барвниках — 1,467 Å (**7a**); 1,477 Å (**6b**); 1,469 Å (**6a**).

Значна зміна довжин зв'язків при релаксації молекулярної геометрії барвників у збудженому стані, як відомо [11], повинна приводити до значної стабілізації збудженого стану, а отже, до суттєвих стоксових зсувів смуги флуоресценції, тоді як наявність подовжених зв'язків у збудженому стані може сприяти конформаційним перетворенням.

З іншого боку, ціанінові барвники, як катіонні π -системи, характеризуються значним альтернуванням часткових позитивних і негативних зарядів у хромофорі. На рис. 2 подано обчислені значення параметра Δq_μ для модельного вінілога стирилу **8** і для барвника **5a** — похідного кумарину.

Як видно з рисунка, розрахунки дають порівняно високий ступінь альтернування за-

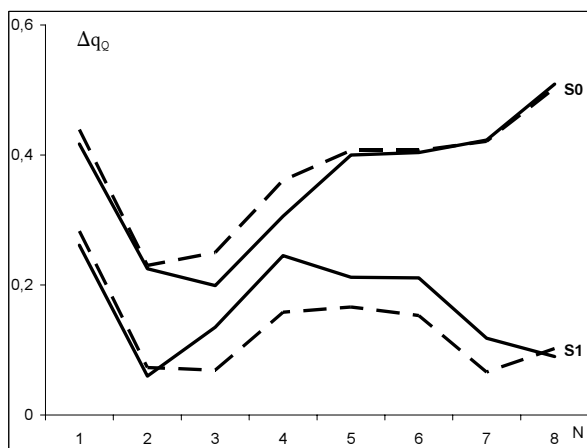


Рис. 2. Альтернування зарядів на атомах (Δq_n) у хромофорі модельного барвника **8** (—) і барвника **5a** (- - -) в основному (S_0) та збудженому (S_1) станах; N — номер атома.

рядів на атомах вуглецю у відкритому ланцюзі, причому циклізація в барвнику **5a** його практично не зменшує. На відміну від альтернування довжин зв'язків, перехід до збудженого стану суттєво зменшує величини параметра Δq_n , що відповідає теорії триад З. Дене [13], згідно з якою ступені альтернування зарядів і зв'язків обернено залежні один від одного. Подібну картину розподілу зарядів розрахунки дають і для решти барвників. Таким чином, за своєю електронною структурою і молекулярною геометрією основного хромофора барвники **5-7** є несиметричними йонними спряженими системами, чутливими до збудження світлом,

яке викликає значний перерозподіл електронної густини на атомах та суттєву зміну молекулярної геометрії. Циклізація частини хромофора з утворенням кумаринового гетероциклу блокує насамперед можливість конформаційних перетворень, не змінюючи принципово електронної будови та молекулярної геометрії хромофора.

Висновки.

1. Уперше отримано ряд катіонних поліметинових барвників — похідних 7-*N,N*-діетиламінокумарину, а також його аналога із закріпленою аміногрупою, — модифікованих введенням поліметинового хромофора в положення 3 кумаринового фрагмента.

2. Досліджено спектральні властивості синтезованих сполук, встановлено, що вони мають довгохвильові максимуми поглинання (570-700 нм) при середніх (60000-80000 $M^{-1}cm^{-1}$) значеннях коефіцієнта екстинкції.

3. Одержані барвники досліджено як можливі флуоресцентні зонди для визначення НК і деяких білків. Встановлено, що сполуки **5b** і **6b** є найбільш перспективними об'єктами для конструювання на їх основі флуоресцентних зондів для неспецифічної детекції протеїнів у присутності ДСН, проте головною вадою всієї серії барвників такого типу є їх низька хімічна стабільність у буферних розчинах, а також у присутності біологічних молекул.

Надійшла в редакцію 26.06.2007 р.

Polymethine dyes — derivatives of the 7-*N,N*-dialkylaminocoumarines

Ya.O. Prostota, Ya.O. Kachkovsky¹, A.V. Kropachev¹, M.Yu. Losytskyu, S.S. Tarnavskyu, S.M. Yarmoluk

Institute of Molecular Biology and Genetics, NAS of Ukraine
150 Zabolotny Str., Kyiv, 03143, Ukraine

¹Institute of Organic Chemistry, NAS of Ukraine
5 Murmanska Str., Kyiv, 03660, Ukraine

Summary. A series of new polymethine dyes — derivatives of the 7-*N,N*-diethylaminocoumarine substituted by polymethine chromophore at position 3 and its analogue with the fully fixed aminogroup (coumarine 343) were obtained.

Absorption and emission spectra of these dyes were investigated. All these compounds were examined as possible fluorescent probes for nucleic acids and proteins detection. Dyes **5b** and **6b** are the most appropriate for the non-specific detection of proteins in the presence of SDS (sodium dodecylsulphate). Nevertheless, the main disadvantage of this type of dyes is their low chemical stability in buffered solutions, as well as in the presence of biological molecules.

Keywords: polymethine dyes, coumarines, absorption, fluorescent probe.

Перелік літератури

1. *Haughland R.* Molecular Probes. Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, Ninth edition, Molecular Probes, Inc., Eugene, OR. — 2002.
2. *Bustin S.A.* Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays // *Journal of Molecular Endocrinology*. — 2000. — Vol. 25. — P. 169-193.
3. *Fabian J., Nakazumi H., Matsuoka M.* Near Infra-red absorbing dyes // *Chem. Rev.* — 1992. — Vol. 92, No. 6. — P. 1197.
4. *Mama J.* Developments in the chemistry of long wavelength fluorescent dyes // *Adv. Colour Sci. Techn.* — 1999. — Vol. 2, No. 3. — P. 3.
5. *Tuccio S.A., Drexhage K.H., Reynolds G.A.* CW[continious wave] laser emission from coumarin dyes in the blue and green // *Optics Comm.* — 1973. — Vol. 7. — P. 248.
6. *Грандберг И.И., Денисов Л.К., Попова О.А.* 7-аминокумарины // *Хим. Гетероцикл. Соедин.* — 1987. — № 2. — С. 147.
7. *Griffiths J., Millar V., Bahra G.S.* The influence of chain length and electron acceptor residues in 3-substituted 7-N,N-Diethylaminocoumarin dyes // *Dyes and Pigments*. — 1995. — Vol. 28. — P. 327.
8. *Комлев И.В., Тавризова М.А., Хромова О.Р., Михайлова Т.А.* Синтез и спектрально-люминесцентные свойства гидразонов 3-формил и 3-ацетил 7-диэтиламинокумаринов // *ЖОХ*. — 1985. — Т. 55, № 4. — С. 888.
9. *Ищенко А.А.* Строение и спектрально-люминесцентные свойства полиметиновых красителей. — Киев: Наукова думка, 1994. — 232 с.
10. *Sahill P.A.* Toward red-emitting radiation tolerant chromophores // *Radiat. Phys. Chem.* — 1993. — Vol. 1-2, No. 2. — P. 351.
11. *Тютюльков Н., Fabian J., Mehlhorn A., Dietz F., Tadjer A.* Polymethine Dyes. Structure and Properties. St. Kliment Ohridski University Press, Sofia, 1991. — 328 p.
12. *Качковский А.Д.* Солитонный характер электронного строения ионов линейных полиметиновых соединений // *Теорет. эксперим. химия*. — 2005. — Т. 41, № 3. — С. 139.
13. *Daehne S.* Color and Constitution. One hundred years of research // *Science*. — 1978. — Vol. 199. — P. 1163.