



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 113132

(13) C2

(51) МПК

C07D 215/14 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)

G01N 33/52 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки: а 2015 12679

(22) Дата подання заявки: 22.12.2015

(24) Дата, з якої є чинними
права на винахід: 12.12.2016(41) Публікація відомостей
про заявку: 25.04.2016, Бюл.№ 8(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: 12.12.2016, Бюл.№ 23

(72) Винахідник(и):

Пивоваренко Василь Георгійович (UA),
Бугера Олександра Ігорівна (UA)

(73) Власник(и):

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ТАРАСА
ШЕВЧЕНКА,

вул. Володимирська, 60, м. Київ, 01601 (UA)

(56) Перелік документів, взятих до уваги
експертизою:

UA 75448 C2; 17.04.2006

UA 74883 C2; 15.02.2006

US 5 552 551 B2; 03.09.1996

US 5 258 478 B2; 02.11.1993

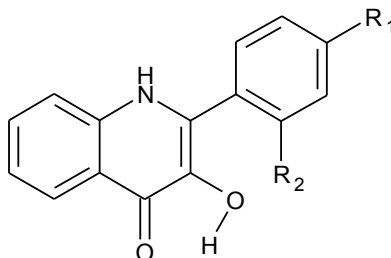
Тимошук В.В., Пивоваренко В.Г. Синтез та
властивості флуоресцентних барвників на
основі 3-гідрокси-2-хінолонів/ «Сучасні
проблеми хімії» XI Всеукраїнська
конференція студентів та аспірантів. – 2010.
– с.89(54) ЗАСТОСУВАННЯ 2-АРИЛ-3-ГІДРОКСИХІНОЛІН-4-ОНІВ ЯК ФЛУОРЕСЦЕНТНИХ ЗОНДІВ ДЛЯ
ВИЗНАЧЕННЯ АДЕНОЗИН-5'-ТРИФОСФАТУ У ВОДНИХ РОЗЧИНАХ

(57) Реферат:

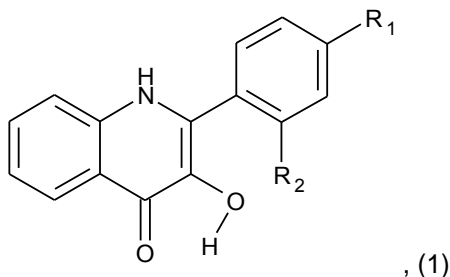
Застосування 2-арил-3-гідроксихінолін-4-онів як флуоресцентних зондів для визначення аденозин-5'-трифосфату у водних розчинах стосується області органічної хімії, біохімії, флуоресцентної спектроскопії та фотоніки органічних молекул.

Визначення концентрації АТФ у водних розчинах здійснюється у межах 9-1800 мікромолів на літр на основі змін форми та інтенсивності спектра збудження флуоресценції зонда.

Дані сполуки дозволяють реєструвати мікромолярні концентрації АТФ, отримувати краще розділення смуг збудження флуоресценції зонда та його комплексу з АТФ та збільшити яскравість флуоресценції зонда.



Винахід стосується області органічної хімії, флуоресцентної спектроскопії та фотоніки органічних молекул, а саме - синтезу та застосуванню як зонда концентрації аденозин-5'-трифосфату (АТФ) 2-арил-3-гідроксифлаволін-4-онів загальної формули (1):



5

де $R_1, R_2 = H, OH, C_1-C_6$ алкіл або C_1-C_6 алкоксигрупа, та може застосовуватись у біології та медицині.

Дані сполуки можуть бути використані як флуоресцентні зонди для визначення концентрації АТФ у водних розчинах за значень $pH > 6,5$. АТФ є універсальним джерелом енергії та медіатором у багатьох біохімічних процесах.

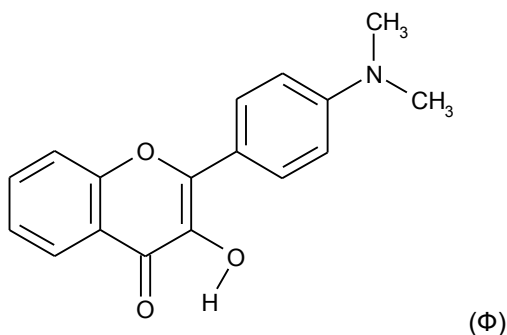
Флуоресцентні зонди широко використовуються для визначення концентрації аналітів у розчинах. Найбільш популярними є індикатори протонів (pH) та численних катіонів металів ($Ca^{2+}, Mg^{2+}, Zn^{2+}, Cd^{2+}, Hg^{2+}, Na^+, K^+$ тощо). В останній час ведуться інтенсивні розробки флуоресцентних індикаторів аніонів та складних органічних молекул, серед яких зонди АТФ займають чільне місце.

Відоме застосування фермента люциферази у присутності молекулярного кисню для визначення концентрації АТФ в розчині (Leach F.R., J. Appl Biochem., 1981, 3, - С. 473-478). Недоліком є вимога створення спеціальних умов для проведення аналізу. Зокрема, фермент не працює в анаеробних умовах та при низьких концентраціях кисню в системі.

Відомий аналог застосування - мічення люциферазою для визначення АТФ (US005837465A від 17.11.1998 р.). Недоліками способу є складність і обмеженість у застосуванні, адже вони ідентифікують АТФ у комплексі з магнієм, за присутності ферменту люциферази та кисню. У патентах US007422868B2 від 9.09.2008 р. та US007732128B2 від 8.06.2010 р. люциферазний метод було застосовано на клітинах.

За найближчий аналог прийнято застосування 4'-диметиламіно-3-гідроксифлавону (Ф) для флуориметричного визначення концентрації аденозин-5'-трифосфату у водних розчинах (UA75448 від 17.04.2006 р.). Недоліками використання 4'-диметиламіно-3-гідроксифлавону є звужені межі детекції АТФ, мале співвідношення сигнал/шум, низька яскравість флуоресценції зонду та його комплексу з АТФ.

Відомо, що флавоноли (3-гідроксифлавоноли) є сполуками, параметри флуоресценції яких залежать від фізико-хімічних параметрів середовища, таких як діелектрична проникненість середовища, pH , здатність до утворення водневих зв'язків (протонодонорність) та в'язкість. Характерною особливістю спектрів флуоресценції цих сполук є дві смуги випромінювання в розчинах, що спричиняються ефектом внутрішньомолекулярного фотоперенесення протона (ВФП або ESИPT-ефект).



В основу винаходу поставлено завдання створити такі флуоресцентні зонди для визначення аденозин-5'-трифосфату у водних розчинах, за допомогою яких досягалася б можливість розширення його меж чутливості, збільшення співвідношення сигнал/шум та яскравості флуоресценції зонду і його комплексу з АТФ. Поставлене завдання вирішено за допомогою

застосування 2-арил-3-гідроксихінолін-4-онів для визначення аденозин-5'-трифосфату у водних розчинах на основі змін форми та інтенсивності спектру збудження флуоресценції цих сполук.

Технічний результат винаходу полягає в тому, що 2-арил-3-гідроксихінолін-4-они формули (1) в порівнянні з флавонолом (Ф) мають ряд переваг у детекції АТФ. Так, при $R_1=H$, $R_2=OCH_3$ хінолон має вищу яскравість флуоресценції (у 56 разів для вільного зонду, у 17 - для його комплексу з АТФ (Фіг. 1)) та у півтора рази більший Стоксів зсув смуги флуоресценції комплексу зонду з АТФ (5050 см^{-1} , замість 3278 см^{-1} - для флавонолу (Ф)). Обидві риси покращують чутливість, збільшуючи відношення сигнал/шум. 2-Арил-3-гідроксихінолін-4-они мають значно більшу чутливість до АТФ - у 6 разів при $R_1=OH$ або OCH_3 та у 3 рази для інших випадків, і цим розширюють межі реєстрації мінімальної концентрації АТФ в 6 разів (від 56 до 9 мікромолів на літр) (Таблиця 1).

Таблиця 1

Межі чутливості 2-арил-3-гідроксихінолін-4-онів та флавонолу (Ф) до АТФ у водних розчинах за інтенсометричним та ратіометричним методами вимірювань

| Назва | DR(I), μM^* | DR(R), μM |
|---|------------------------|----------------------|
| 3-гідрокси-2-(4-метоксифеніл)хінолін-4 (1 H)-он | 30-1700 | 11-1700 |
| 3-гідрокси-2-(4-гідроксифеніл)хінолін-4(1H)-он | 15-1800 | 9-1400 |
| 3-гідрокси-2-(2-метоксифеніл)хінолін-4(1H)-он | 25-1400 | 17-1100 |
| 3-гідрокси-2-(2-гідроксифеніл)хінолін-4(1H)-он | 29-2300 | 15-1300 |
| Флавонол (Ф) | 100-3300 | 56-1800 |

*DR(I) - Межі вимірювання концентрації АТФ інтенсометричним методом.

DR(R) - Межі вимірювання концентрації АТФ ратіометричним методом.

Як і у випадку флавонолу (Ф), визначення АТФ можливе двома методами: інтенсометричним і ратіометричним - з реєстрацією інтенсивності флуоресценції при збудженні на двох довжинах хвилі опромінення.

Отже, застосування 2-арил-3-гідроксихінолін-4-онів для визначення аденозин-5'-трифосфату у водних розчинах дозволяє реєструвати його мікромольні концентрації, отримувати краще розділення смуг збудження флуоресценції зонда та його комплексу з АТФ та збільшити яскравість флуоресценції зонда. Додаткова суть винаходу пояснюється графіками, на яких:

Фіг. 1 - Спектри флуоресценції хінолону (формула 1, $R_1=H$, $R_2=OCH_3$) та флавонолу (Ф) у буфері pH=7,2 за відсутності АТФ та при концентрації АТФ, рівній 3мМ. Концентрація зонда: $2 \cdot 10^{-6}\text{ M}$ у кожному разі.

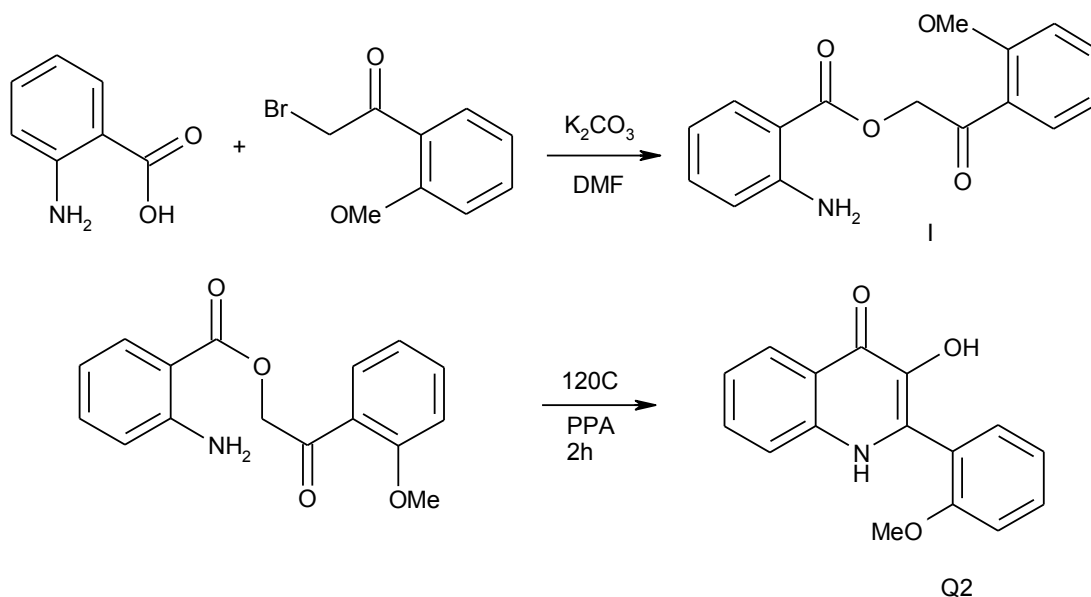
Фіг. 2 - Відношення інтенсивностей флуоресценції $I_{\text{АТФ}}/I_0$ комплексу зонда з АТФ ($I_{\text{АТФ}}$) та вільного зонда (I_0) для хінолону (формула 1, $R_1=H$, $R_2=OCH_3$) у буфері pH=7.2. Концентрація зонда: $2 \cdot 10^{-6}\text{ M}$ у кожному разі.

Фіг. 3 - Спектри флуоресценції 3-гідрокси-2-(2-метоксифеніл)хінолін-4(1H)-ону (формула 1, $R_1=H$, $R_2=OCH_3$) у буфері pH=7,2 при різних концентраціях АТФ. Концентрація хінолону: 10^{-6} M .

Приклади практичної реалізації винаходу

Приклад 1. Синтез 3-гідрокси-2-(2-метоксифеніл)хінолін-4(1H)-ону.

2'-метоксифенацилантранілат (1) було синтезовано алкілюванням антранілової кислоти в ДМФА з K_2CO_3 . Далі сполуку 1 (0.5 г, 1.75 ммоль) додавали до поліфосфорної кислоти (3.3 г) і нагрівали до 120°C протягом 2 годин. Потім реакційну суміш виливали на 20 г льоду та нейтралізували 10 % водним розчином карбонату натрію. Після фільтрування осад промивали, сушили та перекристалізовували з ДМФА. Отримали 3-гідрокси-2-(2-метоксифеніл)хінолін-4(1H)-он (2). Вихід 48 %. Спектр ЯМР ^1H (шкала δ): 11,58 (s, 1H, NH) 8.17 (d, J=8 Hz, 1H, ArH), 7,57-7,40 (m, 4H, ArH, Ar'H), 7,27-7.18 (m, 2H, ArH, Ar'H), 7,09 (t, J=7 Hz, 1H, Ar'H), 3,78 (s, 3H, OCH_3); m/z 268,2 (M^++H).



| | | | |
|--|---|---|--|
| | | | |
| Q1 | Q2 | Q3 | Q4 |
| 3-гідрокси-2-(2-гідроксифеніл)хінолін-4(1H)-он | 3-гідрокси-2-(2-метоксифеніл)хінолін-4(1H)-он | 3-гідрокси-2-(4-метоксифеніл)хінолін-4(1H)-он | 3-гідрокси-2-(4-гідроксифеніл)хінолін-4(1H)-он |

Приклад 2. Побудова калібровочної кривої залежності відношення інтенсивності флуоресценції 3-гідрокси-2-(2-метоксифеніл)хінолін-4(1H)-ону при збудженні на двох довжинах хвиль від концентрації АТФ у розчині.

Усі спектри флуоресценції були зняті на спектрофлуориметрі "FluoroMax3" (Jobin Yvon) за температури 25 °С, з наступною цифровою обробкою результатів за допомогою програми Origin v 6.1. Усі спектри збудження флуоресценції були отримані при довжині хвилі реєстрації флуоресценції $\lambda_{\text{f}}=470$ нм.

Калібрувальна крива будується шляхом реєстрації серії спектрів збудження флуоресценції 3-гідрокси-2-(2-метоксифеніл)хінолін-4(1H)-ону у водних розчинах з відомою концентрацією АТФ ($C_{\text{АТФ}}$) та наступним вимірюванням відношення інтенсивностей флуоресценції I_1/I_2 (де I_1 - інтенсивність флуоресценції при збудженні на 360-450 нм, I_2 - інтенсивність флуоресценції при збудженні на 300-350 нм), з наступним нанесенням отриманих пар даних на графік у координатах I_1/I_2 $C_{\text{АТФ}}$. Калібровочна крива, отримана за методикою, що описана в прикладі 2, зображена на Фіг. 2.

Для побудови калібрувальної кривої використовували водний розчин (1), що містить $1 \cdot 10^{-2}$ моль/л буферу Tris рН 7.2, та $5 \cdot 10^{-6}$ моль/л 3-гідрокси-2-(2-метоксифеніл)хінолін-4(1H)-ону (формула 1, $R_1=\text{H}$, $R_2=\text{OCH}_3$), а також водний розчин (2), що містить $1 \cdot 10^{-2}$ моль/л буферу Tris рН 7.2, $5 \cdot 10^{-6}$ моль/л 3-гідрокси-2-(2-метоксифеніл)хінолін-4(1H)-ону та $4 \cdot 10^{-2}$ моль/л АТФ. Задану концентрацію АТФ у аналітичному розчині (3) отримували шляхом додавання до 1.5 мл розчину (1) розрахованої кількості розчину (2). Після цього розчин (3) переносили у флуориметричну кювету з метою подальшого отримання спектру збудження флуоресценції (Фіг. 2). Реєстрацію флуоресценції здійснювали на довжині хвилі 470 нм. Отримані числові дані відношення інтенсивностей флуоресценції при збудженні на 415 та 350 нм (I_{415}/I_{350}) від концентрації АТФ ($C_{\text{АТФ}}$) у розчині наносили на графік, який зображено на Фіг. 2.

Приклад 3

Реєстрація спектра збудження флуоресценції розчину похідного 3-гідрокси-2-(2-метоксифеніл)хінолін-4(1H)-ону при невідомій концентрації АТФ. Отримання зі спектра числових значень відношення інтенсивностей флуоресценції 2-арил-3-гідроксихінолін-4-ону при збудженні на двох довжинах хвиль. Визначення за допомогою калібрувальної кривої вмісту АТФ у досліджуваних розчинах.

Використовуючи розчини (1) та (2) (див. Приклад 3), приготували розчини А1, А2, А3, А4, та А5 з концентрацією АТФ 0.0000016 (С1), 0.000025 (С2), 0.00005 (С3), 0.00015(С4) та 0.0003 моль/л (С5). Далі вимірювали спектри збудження флуоресценції при довжині хвилі емісії 470 нм. З отриманих спектрів обчислили відношення інтенсивностей емісії I_{415}/I_{350} для розчинів А1 - А5. На основі цих даних, використовуючи калібрувальну криву (Фіг. 2), визначили концентрацію АТФ ($X_1 - X_5$) у розчинах (Таблиця 2).

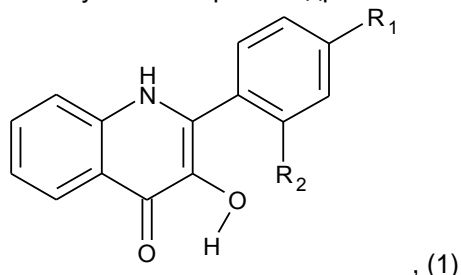
Таблиця 2

| Номер розчину | Задана концентрація АТФ, моль/л | Відношення I_{415}/I_{350} | Визначена концентрація АТФ, моль/л |
|---------------|---------------------------------|------------------------------|------------------------------------|
| A1 | $1.6 \cdot 10^{-6}$ | 0.19 | $1.62 \cdot 10^{-6} (X_1)$ |
| A2 | $2.5 \cdot 10^{-5}$ | 0.24 | $2.54 \cdot 10^{-5} (X_2)$ |
| A3 | $5.0 \cdot 10^{-5}$ | 0.33 | $5.02 \cdot 10^{-5} (X_3)$ |
| A4 | $1.5 \cdot 10^{-4}$ | 0.60 | $1.53 \cdot 10^{-4} (X_4)$ |
| A5 | $3.0 \cdot 10^{-4}$ | 0.84 | $2.90 \cdot 10^{-4} (X_5)$ |

Технічний результат винаходу полягає в тому, що 2-арил-3-гідроксихінолін-4-они формули (1) в порівнянні з флавонолом (Ф) мають ряд переваг у детекції АТФ. Так, при $R_1=H$, $R_2=OCH_3$ хінолон має вищу яскравість флуоресценції (у 56 разів для вільного зонду, у 17 - для його комплексу з АТФ (Фіг. 1)) та у півтора рази більший Стоксів зсув смуги флуоресценції комплексу зонду з АТФ. Обидві риси покращують чутливість, збільшуючи відношення сигнал/шум. 2-Арил-3-гідроксихінолін-4-они мають значно більшу чутливість до АТФ - у 6 разів при $R_1=OH$ або OCH_3 та у 3 рази для інших випадків, і цим розширюють межі реєстрації мінімальної концентрації АТФ в 6 разів.

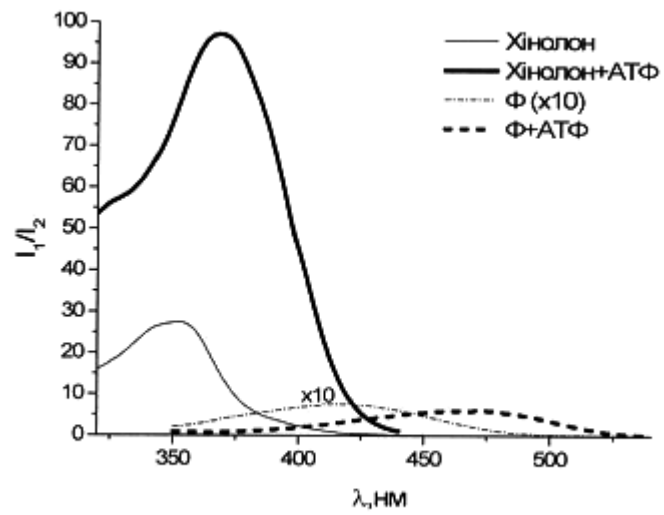
ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

Застосування 2-арил-3-гідроксихінолін-4-онів формули (1)

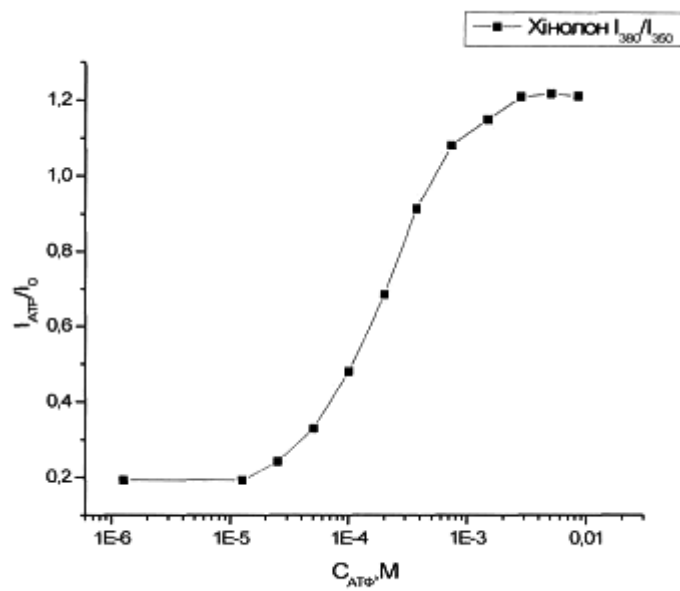


де $R_1, R_2=H, OH, C_1-C_6$ алкіл або C_1-C_6 алкоксигрупа,

як флуоресцентних зондів для визначення аденозин-5'-трифосфату у водних розчинах.



Фиг. 1



Фиг. 2

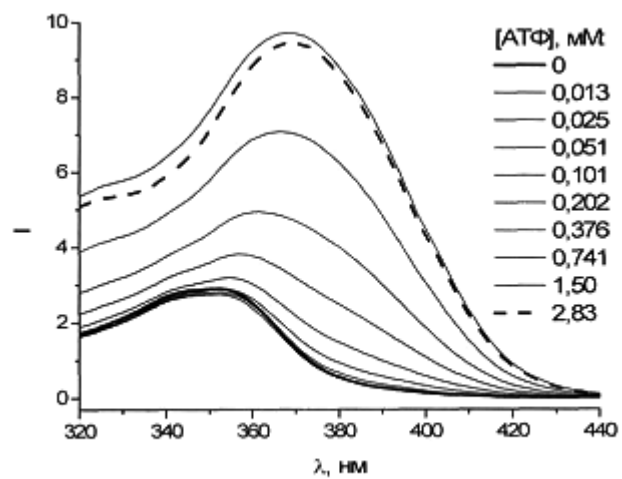


Fig. 3

Комп'ютерна верстка Л. Ціхановська

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601