



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 113471

(13) C2

(51) МПК

C07D 407/10 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки: а 2015 11362

(22) Дата подання заявки: 18.11.2015

(24) Дата, з якої є чинними  
права на винахід: 25.01.2017(41) Публікація відомостей 11.04.2016, Бюл.№ 7  
про заявку:(46) Публікація відомостей 25.01.2017, Бюл.№ 2  
про видачу патенту:(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)(74) Представник:  
Солнцев В'ячеслав Сергійович(56) Перелік документів, взятих до уваги  
експертизою:  
UA 75448 C2, 17.04.2006  
Fluorometric Detection of Adenosine  
Triphosphate with 3-Hydroxy-4-  
(dimethylamino)flavone in Aqueous Solutions/  
Vasyl G. Pivovarenko, Olga B. Vadzyuk,  
Sergiy O. Kosterin// Journal of Fluorescence,  
Vol. 16, No. 1, January 2006, page 9-15  
Synthesis and fluorescence properties of 2-  
aryl-3-hydroxyquinolones, a new class of dyes  
displaying dual fluorescence/ Dmytro A.  
Yushchenko, Mykhailo D. Bilokin, Oleksandr  
V. Pyvovarenko, Guy Duportail, Yves Mely and  
Vasyl G. Pivovarenko// Tetrahedron Letters 47  
(2006) page 905–908  
A wide-range fluorescent pH-indicator based  
on 3-hydroxyflavone structure/ Viktoria F.  
Valuk, Guy Duportail, Vasyl G. Pivovarenko//  
Journal of Photochemistry and Photobiology A:  
Chemistry 175 (2005) page 226–231  
2-[4-(Dimethylamino)phenyl]-3-hydroxy-4H-  
chromene-4-one: A H-bond-sensitive  
fluorescent probe for investigating binary  
mixtures of organic solvents/ V.G.  
Pivovarenko, A. Wroblewska, J. Blazejowski//  
Analytica Chimica Acta 545 (2005) page 74–  
78

UA 113471 C2

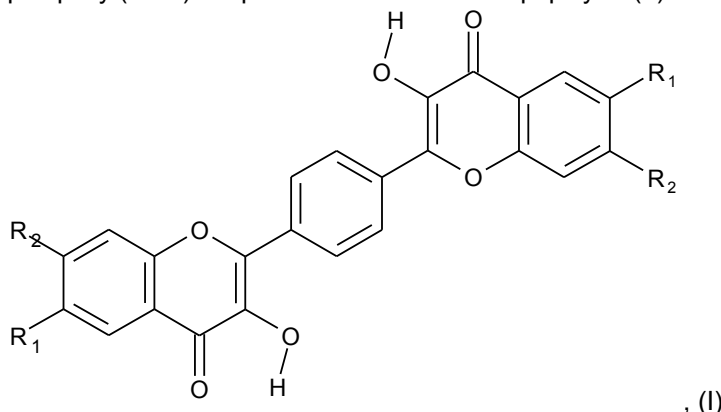
## (54) СПОСІБ ДЕТЕКЦІЇ АДЕНОЗИН-5'-ТРИФОСФАТУ У ВОДНИХ РОЗЧИНАХ

## (57) Реферат:

Винахід належить до області органічної хімії, біохімії, флуоресцентної спектроскопії та фотоніки органічних молекул, а саме - синтезу та застосування біс-(3-гідроксі-4-оксо-4H-2-хроменіл)бензенів (бісфлавонолів) як зондів концентрації аденозин-5'-трифосфату у водних розчинах. Спосіб детекції аденозин-5'-трифосфату у водних розчинах включає побудову калібрувальної кривої, вимірювання спектрів збудження зонду в розчинах з невідомою концентрацією АТФ, з нанесенням отриманих даних на калібрувальну криву. Новим є те, що зі

спектра збудження флуоресценції зонду в розчині АТФ невідомої концентрації отримують числові значення  $I_1/I_2$  (де  $I_1$  - інтенсивність флуоресценції при збудженні на 360-450 нм,  $I_2$  - те ж при збудженні на 300-350 нм), отримані дані наносять на калібрувальну криву, побудовану шляхом вимірювання серії спектрів збудження флуоресценції похідного бісфлавонолу у розчинах із заданою концентрацією АТФ ( $C_{\text{АТФ}}$ ), обчислення параметрів  $I_1/I_2$  та нанесення отриманих даних на графік у координатах  $I_1/I_2$ - $C_{\text{АТФ}}$ . Виконання способу детекції аденозин-5'-трифосфату у водних розчинах за допомогою бісфлавонолів дозволяє реєструвати його мілімолярні концентрації, отримувати краще розділення смуг збудження флуоресценції зонда та його комплексу з АТФ та збільшити яскравість флуоресценції зонда.

Винахід належить до області органічної хімії, флуоресцентної спектроскопії та фотоніки органічних молекул, а саме - до синтезу та застосування як зонда концентрації аденозин-5'-трифосфату (АТФ) бісфлавонолів загальної формули (1):



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

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.

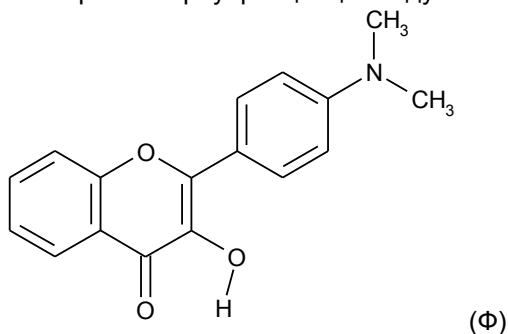
Відомий спосіб визначення концентрації АТФ у розчині за допомогою ферменту люциферази у присутності молекулярного кисню (Leach F.R., J. Appl Biochem., 1981, 3, - С. 473-478). Даний спосіб є незручним, тому що вимагає створення спеціальних умов для проведення аналізу. Зокрема, він не працює в анаеробних умовах, при низьких концентраціях кисню в системі, або ж за відсутності ферменту люциферази чи катіонів  $Mg^{2+}$ .

Відомий спосіб визначення АТФ за допомогою мічення люциферазою (US005837465A від 17.11.1998 р.). Варто зазначити, що такі способи є доволі складними і обмеженими у застосуванні, адже вони ідентифікують АТФ у комплексі з магнієм, за присутності ферменту люциферази та кисню. У US007422868B2 від 9.09.2008 р. та US007732128B2 від 8.06.2010 р. люциферазний метод було застосовано на клітинах.

За найближчий аналог прийнято спосіб флуориметричного визначення концентрації аденозин-5'-трифосфату у водних розчинах за допомогою 4'-диметиламіно-3-гідроксифлавонону (Ф) (UA75448 від 17.04.2006 р.). Відомо, що флавоноли (3-гідроксифлавоноли) є сполуками, параметри флуоресценції яких залежать від фізико-хімічних параметрів середовища, таких як діелектрична проникненість середовища,  $pH$ , донорність водневих зв'язків, в'язкість, іонна сила тощо. Характерною особливістю спектрів флуоресценції цих сполук є дві смуги випромінювання в розчинах, що спричиняються ефектом внутрішньомолекулярного фотоперенесення протона (ВФП або ESIPT-ефект).

У статтях Pivovarenko V.G., Vadzyuk O.B., Kosterin S.O., J. Fluorescence (2006) V. 16, P. 9-15 та Yushchenko D.A. і співавт, Analytical Biochemistry (2007) V. 369 P. 218-225 спосіб (UA75448 від 17.04.2006 р.) було успішно випробувано на водній суспензії мітохондрій.

Недоліками даного способу є звужені межі детекції АТФ, мале співвідношення сигнал/шум, низька яскравість флуоресценції зонду та його комплексу з АТФ.



В основу винаходу поставлена задача створити такий спосіб детекції аденозин-5'-трифосфату у водних розчинах, в якому б за рахунок використання нових зондів для АТФ досягалася можливість розширення його меж детекції.

Поставлена задача вирішена тим, що спосіб детекції аденозин-5'-трифосфату у водних розчинах включає побудову калібрувальної кривої, вимірювання спектрів збудження зонду у розчинах з невідомою концентрацією АТФ та подальшим нанесенням отриманих даних на калібрувальну криву. В представленому методі, згідно з винаходом, зі спектра збудження флуоресценції зонду в розчині АТФ невідомої концентрації отримують числові значення  $I_1/I_2$  (де  $I_1$  - інтенсивність флуоресценції при збудженні на 360-450 нм,  $I_2$  те ж при збудженні на 300-350 нм), отримані дані наносять на калібрувальну криву, побудовану шляхом вимірювання серії спектрів збудження флуоресценції похідного бісфлавонолу (1) у розчинах із заданою концентрацією АТФ ( $C_{\text{АТФ}}$ ), обчислення параметрів  $I_1/I_2$  та нанесення отриманих даних на графік у координатах  $I_1/I_2 - C_{\text{АТФ}}$ .

Бісфлавоноли формули (1) у порівнянні з флавонолом (Ф) мають цілий ряд переваг у детекції АТФ. Так, при  $R_1=H$ ,  $R_2=OCH_3$  бісфлавонол має вищу яскравість флуоресценції (у 3 рази - для вільного зонду та його комплексу з АТФ, Фіг. 1) та вдвічі краще розділення смуг збудження флуоресценції вільного зонду та його комплексу з АТФ ( $5500 \text{ см}^{-1}$ , замість  $2800 \text{ см}^{-1}$  - для флавонолу (Ф), Фіг. 1). Обидві риси покращують детекцію, збільшуючи співвідношення сигнал/шум. Бісфлавоноли мають значно вищу чутливість до АТФ і ширші межі детекції АТФ у розчинах: для флавонолу (Ф) вони складають  $100-3300 \cdot 10^{-6} \text{ М}$  концентрації АТФ, тоді як для бісфлавонолу ( $R_1=CH_3$ ,  $R_2=H$ ) межі детекції складають  $7-10000 \cdot 10^{-6} \text{ М}$  АТФ, а для бісфлавонолу ( $R_1=H$ ,  $R_2=OCH_3$ ) -  $13-3500 \cdot 10^{-6} \text{ М}$  АТФ Таблиця 1, (Фіг. 2).

Таблиця 1

Межі чутливості бісфлавонолів та флавонолу (Ф) до АТФ у водних розчинах за інтенсометричним та ратіометричним методами вимірювань

Назва	DR(I), $\mu\text{M}$ *	DR(R), $\mu\text{M}$
2,2'-(1,4-фенілен)біс(3-гідрокси-6-метил-4Н-хромен-4-он), (формула 1, $R_1=CH_3$ , $R_2=H$ )	7-10000	2-1000
2,2'-(1,4-фенілен)біс(3-гідрокси-7-метокси-4Н-хромен-4-он) (формула 1, $R_1=H$ , $R_2=OCH_3$ )	13-3500	3-800
2,2'-(1,4-фенілен)біс(3-гідрокси-4Н-хромен-4-он) (формула 1, $R_1=R_2=H$ , )	15-3400	6-1300
Флавонол (Ф)	100-3300	56-1800

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

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

Як і у випадку флавонолу (Ф), визначення АТФ тут можливе двома методами: інтенсометричним і ратіометричним, з реєстрацією інтенсивності флуоресценції при збудженні на двох довжинах хвиль опромінення. Отже, бісфлавоноли мають у 7-14 разів кращу чутливість до АТФ і цим розширюють межу реєстрації мінімальної концентрації АТФ від 100 до 7 мікромолів на літр, при кращому співвідношенні сигнал/шум.

Отже, застосування способу детекції аденозин-5'-трифосфату у водних розчинах за допомогою бісфлавонолів дозволяє реєструвати його мікромольні концентрації, отримувати краще розділення смуг збудження флуоресценції зонда та його комплексу з АТФ та збільшити яскравість флуоресценції зонда. Винахід пояснюється графіками, на яких:

Фіг. 1 - Спектри збудження флуоресценції бісфлавонолу (формула 1,  $R_1=H$ ,  $R_2=OCH_3$ ) та флавонолу (Ф) у водному буфері pH=7.2 за відсутності АТФ та при концентрації АТФ, рівній 3 мМ. Концентрація зонда:  $2 \cdot 10^{-6} \text{ М}$  у кожному разі. Довжина хвилі флуоресценції  $\lambda_{f1}=470$  та 550 нм відповідно.

Фіг. 2 - Залежність співвідношення інтенсивностей флуоресценції  $I_{\text{АТФ}}/I_0$  комплексу зонда з АТФ ( $I_{\text{АТФ}}$ ) та вільного зонда ( $I_0$ ) для бісфлавонолу (формула 1,  $R_1=H$ ,  $R_2=OCH_3$ ) та флавонолу Ф у буфері pH=7.2 від концентрації АТФ. Концентрація зонда:  $2 \cdot 10^{-6} \text{ М}$  у кожному разі.

Фіг. 3 - Спектри збудження флуоресценції бісфлавонолу (формула 1,  $R_1=H$ ,  $R_2=OCH_3$ ) у водному буфері pH=7.2 при різних концентраціях АТФ. Концентрація бісфлавонолу:  $2 \cdot 10^{-6} \text{ М}$ . Довжина хвилі флуоресценції  $\lambda_{f1}=470 \text{ нм}$ .

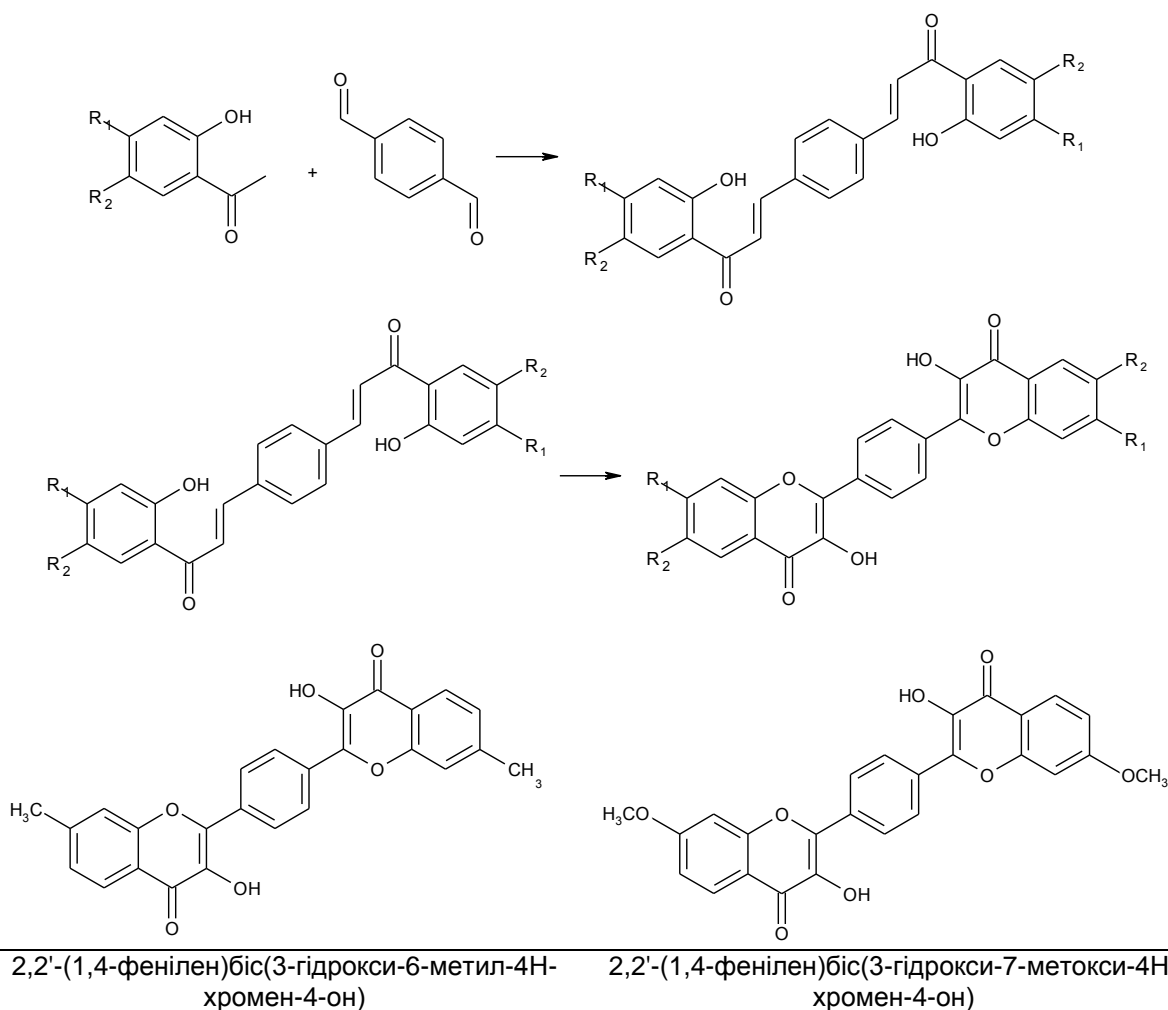
Наступні приклади демонструють способи отримання бісфлавонолів та способи їх застосування для детекції АТФ.

Приклад 1. Синтез (E)-1-(2-гідроксифеніл)-3-4-[(E)-3-(2-гідроксифеніл)-3-оксо-1-пропеніл]феніл-2-пропен-1-ону (біс-халкон до Прикладу 2).

Терефталевий альдегід і 2-гідрокси-4-метоксіацетофенон беруть у мольному співвідношенні 1:2 і розчиняють у ДМФА, виходячи із розрахунку 1 ммоль альдегіду на 2 мл ДМФА. Після максимально можливого розчинення реагентів, у суміш додають метилат натрію у кількості 5 ммоль на 1 ммоль альдегіду. Реакція проходить за 1,5-2 години при температурі, трохи нижчій температури кипіння ДМФА. Продукт після нейтралізації перекристалізують з суміші етанол-ДМФА.

Приклад 2. Синтез біс-(3-гідрокси-4-оксо-4Н-7-метокси-2-хроменіл)бензену (формула 1,  $R_1=H$ ,  $R_2=OCH_3$ ).

У суміші ДМФА-етанол у об'ємному співвідношенні 1:4 розчиняють біс-халкон у присутності 5-кратного мольного надлишку етилату натрію. Перекис водню (30 %) додається повільно протягом усього часу проходження реакції, але загальна його кількість не повинна перевищувати 2-кратний мольний надлишок відносно потрібної для реакції кількості. Проходження реакції контролюють хроматографічно, і зупиняють реакцію негайно після того, як у суміші зникає вихідний біс-халкон. Суміш виливають у воду та нейтралізують так, щоб значення рН після нейтралізації було біля 5. Перекристалізацію продукту проводять у суміші трифлуороцтової кислоти з хлороформом. Вихід 34 %. Чистота зразка: >95 %.  $T_{\text{топл}} > 350^\circ\text{C}$ . Спектр ЯМР  $^1\text{H}$  (400 МГц, ТМС - внутрішній стандарт, м.ч., розчинник: трифлуороцтова кислота): 8.33 (d,  $J=8$ , 2H); 8.25 (m, 4H); 7.33 (d,  $J=8$ , 2H); 7.29 (s, 2H); 4.10 (s, 6H).



Приклад 3. Побудова калібрувальної кривої залежності співвідношення інтенсивності флуоресценції бісфлавонолу 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 8.0. Усі спектри збудження флуоресценції були отримані при довжині хвилі флуоресценції  $\lambda_{f1}=470$  нм.

5 Калібрувальна крива будується шляхом реєстрації серії спектрів збудження флуоресценції бісфлавонолу у водних розчинах з відомою концентрацією АТФ ( $C_{\text{АТФ}}$ ) та наступним вимірюванням співвідношення 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  $I_1/I_2 - C_{\text{АТФ}}$ .

10 Калібрувальна крива, отримана за методикою, що описана в прикладі 3, 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 бісфлавонолу (формула 1,  $R_1=H$ ,  $R_2=OCH_3$ ), а також водний розчин (2), що містить  $1 \cdot 10^{-2}$  моль/л буферу Tris рН 7.2,  $5 \cdot 10^{-6}$  моль/л бісфлавонолу 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. 3). Реєстрацію флуоресценції здійснювали на довжині хвилі 470 нм. Отримані числові дані співвідношення 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.

20 Приклад 4. Реєстрація спектру збудження флуоресценції розчину похідного бісфлавонолу загальної формули (I), при невідомій концентрації АТФ. Отримання зі спектра числових значень співвідношення інтенсивностей флуоресценції бісфлавонолу при збудженні на двох довжинах хвиль. Визначення за допомогою калібрувальної кривої вмісту АТФ у досліджуваних розчинах.

25 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 співвідношення інтенсивностей емісії  $I_{415}/I_{350}$  для розчинів А1 - А5. На основі цих даних, використовуючи калібрувальну криву (Фіг. 2) визначили концентрацію АТФ ( $X_{1 \times 5}$ ) у розчинах (Таблиця 2).

Таблиця 2

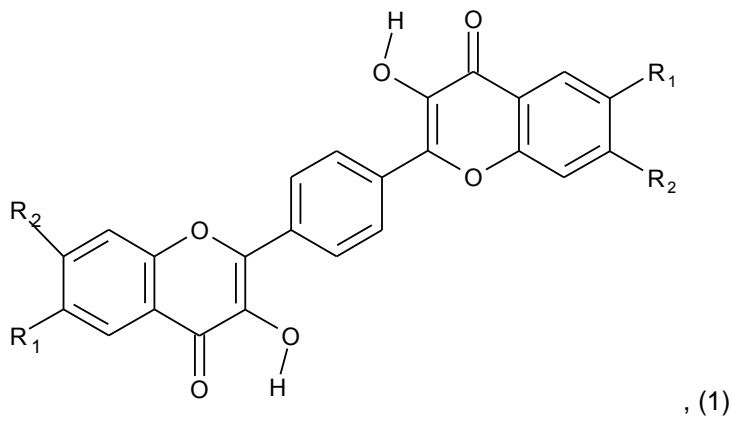
Номер розчину	Задана концентрація АТФ, моль/л	Відношення $I_{415}/I_{350}$	Визначена концентрація АТФ, моль/л
A1	$1.6 \cdot 10^{-6}$	0.51	$1.7 \cdot 10^{-6} (X_1)$
A2	$2.5 \cdot 10^{-5}$	0.89	$2.62 \cdot 10^{-5} (X_2)$
A3	$5.0 \cdot 10^{-5}$	1.17	$5.16 \cdot 10^{-5} (X_3)$
A4	$1.5 \cdot 10^{-4}$	1.77	$1.48 \cdot 10^{-4} (X_4)$
A5	$3.0 \cdot 10^{-4}$	2.18	$2.90 \cdot 10^{-4} (X_5)$

#### ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

35

Спосіб детекції аденозин-5'-трифосфату (АТФ) у водних розчинах, який включає побудову калібрувальної кривої, вимірювання спектрів збудження зонду у розчинах з невідомою концентрацією АТФ, з подальшим нанесенням отриманих даних на калібрувальну криву, який **відрізняється** тим, що зі спектра збудження флуоресценції зонда в розчині АТФ невідомої концентрації отримують числові значення  $I_1/I_2$  (де  $I_1$  - інтенсивність флуоресценції при збудженні на 360-450 нм,  $I_2$  - те ж при збудженні на 300-350 нм), отримані дані наносять на калібрувальну криву, побудовану шляхом вимірювання серії спектрів збудження флуоресценції похідного бісфлавонолу загальної формули (1):

40



де  $R_1, R_2 = H, C_1-C_6$  алкіл або  $C_1-C_6$  алкоксигрупа,  
у розчинах із заданою концентрацією АТФ ( $C_{\text{АТФ}}$ ), обчислення параметрів  $I_1/I_2$  та нанесення  
5 отриманих даних на графік у координатах  $I_1/I_2-C_{\text{АТФ}}$ .

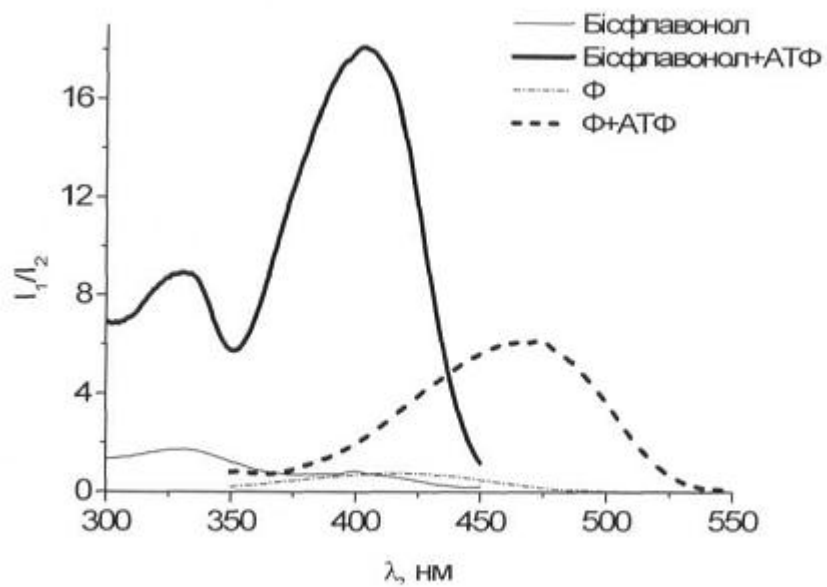


Fig. 1

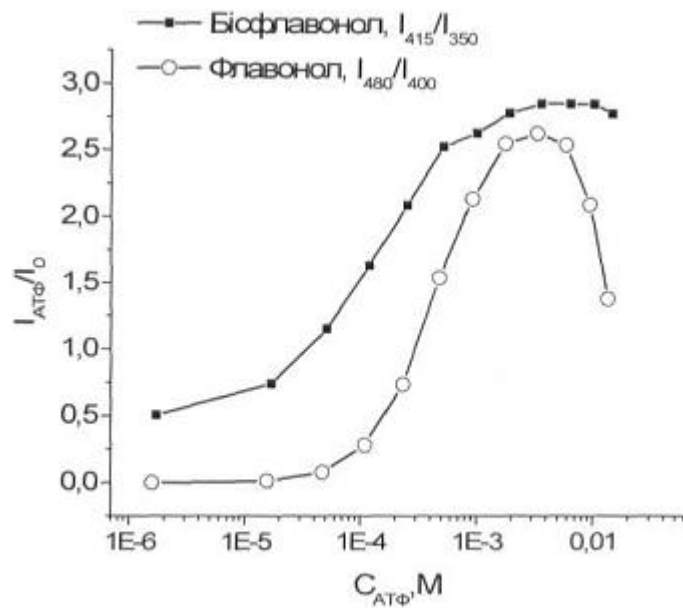


Fig. 2

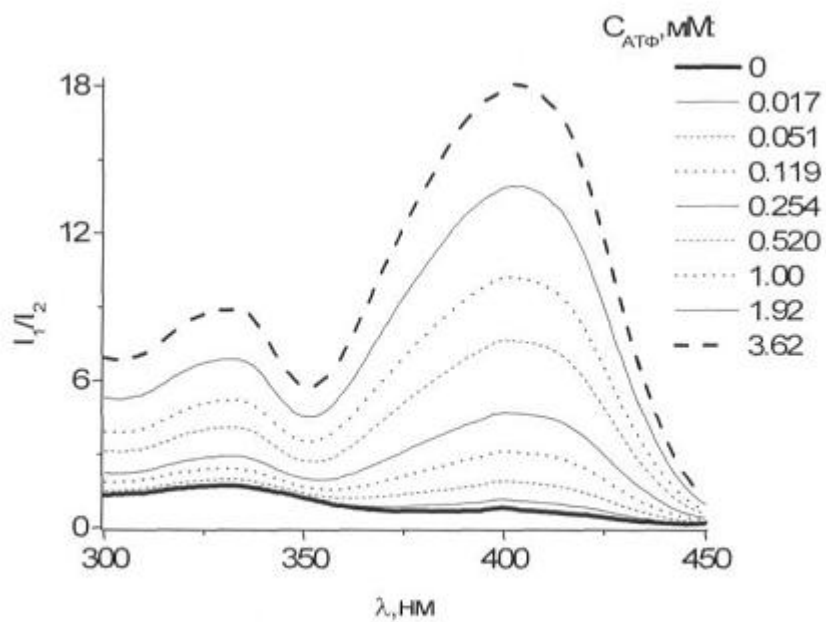


Fig. 3

Комп'ютерна верстка О. Рябко

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