

**Кострюкова Т.С.,  
Ивановская Н.П.,  
Осин Н.С.,  
Затонский Г.В.,  
Васильев Н.В.\***

## **НОВЫЕ КОМПЛЕКСЫ ЕВРОПИЯ ДЛЯ ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНТНОГО АНАЛИЗА БИОСПЕЦИФИЧЕСКИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ**

*Аннотация.* В работе рассмотрены основные методы лантанидного иммунофлуоресцентного анализа с временной задержкой, описаны преимущества и недостатки используемых в настоящее время аналитических реагентов. Предпринято экспериментальное исследование методов получения наиболее перспективных из таких реагентов – фторированных гетероциклических тетракетонов и тетракетодиэфиров. С этой целью изучена конденсация по Кляйзену между ацетогетероциклическими соединениями и эфирами перфторированных кислот, приводящая к образованию новых реагентов для иммунофлуоресцентного анализа. Проведена оценка люминесцентно-спектральных свойств комплексов этих соединений с ионом  $\text{Eu}^{3+}$ .

*Ключевые слова:* лантанидный иммунофлуоресцентный анализ с временной задержкой, фторированные гетероциклические тетракетоны и тетракетодиэфиры, комплексные соединения.

В настоящее время для большинства целей анализа химических объектов применяются сравнительно новые методы физико-химического анализа. Медико-биологические объекты много трудней анализировать с применением физико-химических методов, в связи с тем, что такие объекты, как правило, достаточно лабильны в условиях экспериментов.

Как правило, современные биохимические аналитические методы определения биообъектов основаны на так называемых реакциях биоспецифического связывания. Главным достоинством таких методов является высокая селективность (специфичность) при обнаружении патогенного возбудителя (его антигенов и/или продуктов метаболизма), при ДНК-диагностике, при проявлении лиганд – рецепторных взаимодействий и т.д.

Одним из видов биоспецифического взаимодействия, часто применяющимся на практике, является реакция иммунохимического связывания, основанная на взаимодействии антиген-антитело. Благодаря своей уникальной специфичности эта реакция находит все большее применение для создания новых методов определения различных соединений. Объектом анализа могут служить как низкомолекулярные соединения (гормоны, лекарства), так и биополимеры (белки, ДНК, полисахариды) и даже микроскопические частицы (бактерии, вирусы).

Методы, основанные на взаимодействии антиген-антитело – радиоиммунологические [1], иммуноферментные [2], иммунофлуоресцентные [3] – в принципе достаточно похожи и отличаются только типом детектирования помеченного конъюгата. Все эти методы имеют свои недостатки и преимущества.

Одним из наиболее перспективных методов является иммуноанализ с использованием в качестве люминесцентной метки хелатов редкоземельных металлов (лантанидный иммунофлуоресцентный анализ - ЛИФА). Он не уступает в чувствительности и специфичности широко распространенным методам иммуноанализа с применением

радиоактивной и ферментной метки, обладая при этом лучшей воспроизводимостью и сохранностью реагентов.[4] Это возможно благодаря уникальным свойствам комплексов лантанидов металлов - значительным разнесением полос возбуждения и регистрации люминесценции и длительным временем жизни люминесценции. Это способствует существенному повышению чувствительности анализа, особенно при использовании анализа с временным разрешением, так как это позволяет избежать проблемы, связанной с собственной люминесценцией биологического образца и вспомогательных материалов, например, полистирола.

Одним из важнейших компонентов анализа является флуоресцентная метка, к которой предъявляют следующие требования – высокая эффективность поглощения света; высокий квантовый выход; длины волн поглощения свыше 350-400 нм и эмиссии  $\approx 600$  нм, соответственно (различие между ними должно превышать 100 нм); время жизни в возбужденном состоянии должно быть достаточно большим (свыше 1 мкс); фотохимическая стабильность и содержание функциональных групп, благодаря которым можно осуществить связывание с антителами и антигенами с минимальным снижением спектральных свойств.

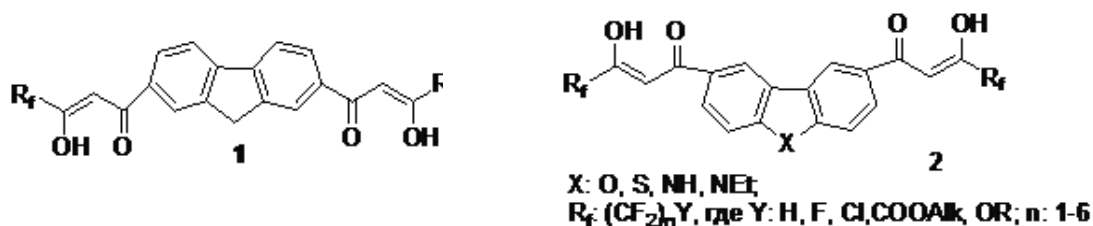
Метки, которая бы удовлетворяла всем этим требованиям, не существует, однако существуют классы меток, в той или иной степени удовлетворяющие им. В настоящий момент для флуоресцентного анализа с временным разрешением описаны 4 типа меток – это органические красители [5], органические комплексы *d*-металлов ( $Ru^{3+}$ ,  $Os^{3+}$ ) [6], металлокомплексы порфиринов ( $Pt^{2+}$ ,  $Pd^{2+}$ ) [7] и комплексы лантаноидов ( $Eu^{3+}$ ,  $Tb^{3+}$ ,  $Dy^{3+}$  и  $Sm^{3+}$ ).

Предметом изучения в настоящей работе явились полифторалкильные  $\beta$ -дикетонатные соединения гетероароматического ряда и комплексы  $Eu^{3+}$  на их основе.  $\beta$ -Дикетоны в растворах существуют в виде таутомеров, и енольная форма образует комплексы с ионами металла. Фрагмент, содержащий гетероароматическую систему, обеспечивает поглощение энергии и ее передачу на ион металла (внутримолекулярная конверсия), полифторалкильный фрагмент способствует образованию енольной формы и увеличивает устойчивость комплекса. Обладая, наряду с другими хелатами лантаноидов, уникальными люминесцентно-спектральными характеристиками (значительным Стоксовым сдвигом -  $>200$  нм, узостью полосы эмиссии люминесценции -  $\sim 14$  нм, длительными временами жизни возбужденного состояния – до 800 мкс), гетероароматические  $\beta$ -дикетоны фторированного ряда при этом имеют дополнительные преимущества: более высокие значения квантовой эффективности ( $\epsilon\phi$ ) и более длинноволновое ( $\sim 360 - 380$  нм) положение максимума возбуждения люминесценции, что важно для повышения чувствительности и специфичности анализа, а также возможности упрощения его приборной реализации.

В то же время, обычные фторированные  $\beta$ -дикетонатные комплексы РЗЭ не обладают достаточной для проведения безразделительного анализа или для анализа "in situ" стабильностью: константа связывания иона европия ( $Eu^{3+}$ ) для наиболее известного комплексона этого типа - нафтоилтрифторацетона (НТА) составляет всего  $\sim 10^7 M^{-1}$ . Поэтому он используется лишь при большом избытке относительно  $Eu^{3+}$  в различных вариантах диссоциативно усиленного лантанидного флуоресцентного иммуноанализа (DELFIА = ЛИФА). Предпринятые в последнее время попытки повышения стабильности комплексов путем введения в хелатирующую молекулу дополнительных  $\beta$ -дикетонатных (двух или даже четырех) и электроноакцепторных ( $CF_2$ ) групп носили эпизодический характер и, хотя и привели к получению новых комплексонов, рекомендованных авторами для использования в недиссоциативном анализе, все же представляются недостаточно эффективными, так как используются с большим избытком  $Eu^{3+}$  и обладают недостаточно удовлетворительными люминесцентно-спектральными характеристиками.[8]

Недавно были разработаны новые комплексоны, имеющие в своем составе две  $\beta$ -

дикетонатные группы у конденсированных дибензосодержащих ароматических и гетероароматических систем [8]:

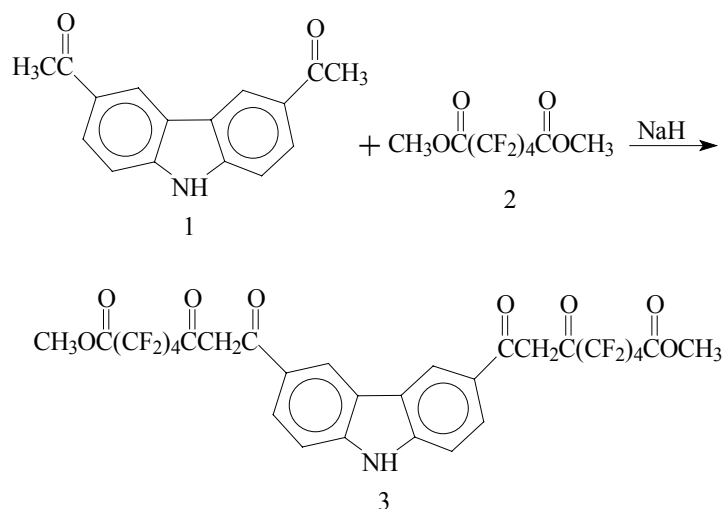


В приведенной работе достигнуты достаточно высокие люминесцентно-спектральные свойства соединений, особенно важным является наличие высоких констант устойчивости  $>10^{11}$  M<sup>-1</sup>, образуемых с лантаноидами комплексов, а также длинноволновое ( $\sim 390$  нм) поглощение, позволяющее использовать дешевые светодиодные источники возбуждения.

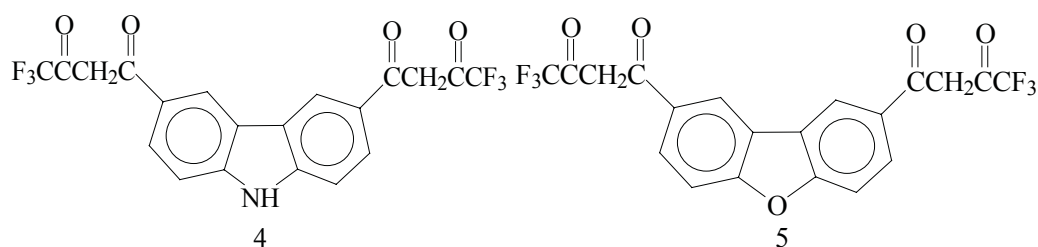
Вместе с тем, в обсуждаемой работе синтез дибензосодержащих соединений проводился конденсацией по Кляйзену в присутствии алкоголятов натрия, что в ряде случаев приводит к побочным процессам и, при этом, функционально-замещенные производные дибензосодержащих соединений не могут быть получены. В частности, затруднительным является получение меток, содержащих алкоксикарбонильные группы, отделенные от люминесцирующего центра на расстояние  $\sim 1$  нм, что необходимо для сохранения специфичности биообъекта.

Одной из целей настоящей работы являлся поиск реагентов для более удобной методики проведения конденсации Кляйзена. Так, нами проведена оптимизация условий реакции Кляйзена диацетилкарбазола с диэфирами полифторкарбоновых кислот в присутствии такого реагента, как гидрид натрия (NaH). Это соединение известно как слабый гидрирующий агент, что позволяет использовать его в качестве основания в безводных апротонных растворителях. В частности, описаны реакции конденсации по Кляйзену осуществляемые в присутствии гидрида натрия для случая ароматических и гетероароматических кетонов и негалогенированных сложных эфиров [9].

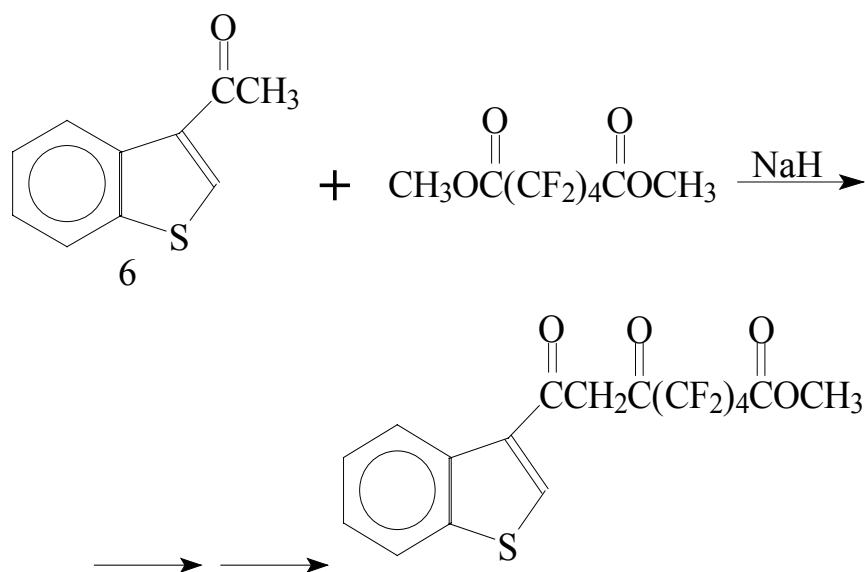
Оказалось, что реакция 3,6-диацетилкарбазола 1 с диэфирами полифторкарбоновых кислот 2 осуществляется в течение 7 суток при комнатной температуре и при этом с удовлетворительными выходами образуются соответствующие тетракетодиэфиры 3 ( $\sim 50\%$ ). Контроль полноты осуществления процесса во времени реакции осуществлялся методом тонкослойной хроматографии, строение веществ подтверждено методом ядерного магнитного резонанса на ядрах атомов <sup>1</sup>H и <sup>19</sup>F.

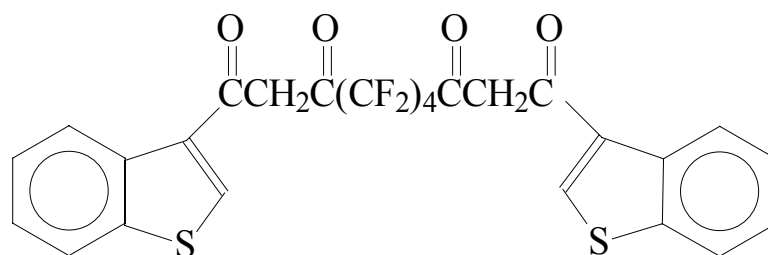


Применение гидрида натрия в качестве основания было также применено и для методик получения по Кляйзену для получения тетракетонов на основе карбазола 4 и дибензофурана 5, описанных ранее в патенте [8]. Использование гидрида натрия позволило в этих случаях увеличить выхода продуктов реакции на 15-25%, и существенно упростить методики проведения процессов.



Интересным представлялось осуществить получение комплексонов на основе бензотиофена (6). При этом оказалось, что реакция осуществляется в течение 2 суток и происходит образование тетракетосодержащего дибензотиофена 7. Образование промежуточного diketоэфира 7a на первой стадии процесса было зафиксировано при анализе реакционной смеси, однако его выделение оказалось не осуществимым.





7

Полученные тетракетоны обладают различными люминесцентно-спектральными свойствами, в частности, наличие кетоэфирной группы, разделенной дифторметиленовой цепочкой, представляло определенный интерес для формирования аналитических реагентов нанопараметрового размера.

### Экспериментальная часть

Оборудование и методы исследования

Спектры ЯМР  $^1\text{H}$  сняты на спектрометре “Bruker AC-300” с рабочей частотой 300.13 Мгц; спектры ЯМР  $^{19}\text{F}$  сняты на спектрометре “Bruker WP-200 SY” с рабочей частотой 188.31 Мгц. Химические сдвиги ( $\delta$ ) приведены в м.д. относительно внешних эталонов: ТМС ( $^1\text{H}$ );  $\text{CF}_3\text{COOH}$  ( $^{19}\text{F}$ ). В работе использовались коммерческие реагенты и растворители, которые сушились в соответствии с известными рекомендациями [10]. В качестве основного реагента использовался NaH в масле производства “Sigma-Aldrich” без дополнительной очистки (46%, контролировалось предварительно).

Данные ЯМР, выход веществ, брутто-формула веществ, определенная по данным элементного анализа, физико-химические характеристики представлены в табл.1.

Оценка люминесцентно-спектральных характеристик соединений проводилась в водной среде, содержащей 0,05М Трис-буфер pH 7,2,  $5 \cdot 10^{-5}$  М ТОФО и 0.1% Тритона X-100 в присутствии  $\text{Eu}^{3+}$  (соотношения лиганд/ион, при которых наиболее вероятно образование комплекса 1:1), то есть в избытке лиганда.

Спектры поглощения снимали на спектрофотометре Shimadzu UV-1650PC, спектры флуоресценции с временной задержкой  $t_d$  0,1 мс относительно возбуждающего импульса и временем регистрации  $t_g$  1,00 мс - на спектрофлуориметре LS-5B фирмы Perkin-Elmer. Данные электронной спектроскопии приведены в табл.2.

**Взаимодействие 3,6 - диацетилкарбазола с диметилловым эфиром перфторадипиновой кислоты.** К 0,73 г гидрида натрия (0,014 моль) в эфире (50 мл) при перемешивании и охлаждении ( $-10^\circ\text{C}$ ) в течение 15 минут прибавляли 5,09 г (0,016 моль) диэфира перфтордикарбоновой кислоты; через 30 минут добавляли 1 г (0,004 моль) диацетилкарбазола. Реакционную массу перемешивали в течение 6-7 суток при комнатной температуре, затем выливали в смесь 250 мл льда и 15 мл 10% раствора серной кислоты при перемешивании, добавляли 50 мл хлороформа. Выдерживали при перемешивании 30 минут, органический слой отделяли, промывали водой (6×50 мл), сушили сульфатом натрия. Через 12 часов на холоде ( $-5^\circ\text{C}$ ) выпадал осадок (смесь исходного и продукта). Образовавшийся осадок отфильтровывали, к фильтрату добавляли 5-и кратное количество гептана. Образующийся осадок тетракетодиэфира **3** отфильтровывали, промывали гептаном, сушили в вакууме (20 мм рт.ст.). Выделено 1,34 г метил-10-[6-(4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9-додекафтор-10-метокси-3,10-диоксодеканойл)-9Н-карбазол-3-ил]-2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,7,7-додекафтор-8,10-диоксодеканойл **3**.

**Взаимодействие 3-ацетилбензотиофена с диметилловым эфиром перфторадипи-**

**пиновой кислоты.** К 0,43 г (0,0085 моль) гидрида натрия в эфире (50 мл) при перемешивании и охлаждении (-10°C) в течение 15 минут добавляли 1,36 г (0,0043 моль) диэфира перфтордикарбоновой кислоты; через 30 минут добавляли 0,5 г (0,0028 моль) 3-ацетилбензотиофена. Реакционную массу перемешивали при кипячении в течение 10 часов, затем выливали в смесь 100 мл колотого льда и 15 мл 10% раствора серной кислоты, добавляли 50 мл хлороформа. Выдерживали смесь при перемешивании 30 минут. Выпавший в водной фазе осадок тетракетосодержащего дибензотиофена **7**, отфильтровывали, промывали эфиром (5×15 мл) и сушили в вакууме (20 мм рт.ст.). Выделено 0,58 г 1,10-бис(бензотиофен-3-ил)-2,2,9,9-тетрагидроперфтордека-1,3,8,10-тетраона **7**.

**Взаимодействие 3,6 - диацетилдибензофурана с метиловым эфиром трифторуксусной кислоты.** К 0,52 г (0,01 моль) гидрида натрия в эфире (50 мл) при перемешивании и охлаждении (-10°C) в течение 15 минут добавляли 1,28 г (0,01 моль) метилового эфира трифторуксусной кислоты; через 30 минут добавляли 0,5 г (0,002 моль) 3,6 - диацетилдибензофурана. Реакционную массу перемешивали и кипятили в течение 10 часов, затем выливали в смесь 100 мл колотого льда и 15 мл 10% раствора серной кислоты. Выдерживали при перемешивании 30 минут. Органический слой отделяли, промывали водой (5×50 мл), через 20 часов на холоде (-5°C) выпадал осадок тетракетона, который отфильтровывали и сушили в вакууме (20 мм рт.ст.). Выделено 0,68 г 4,4,4-Трифтор-1-[6-(4,4,4-трифтор-3-оксобутаноил)-дibenзо[b,d]фуран-4-ил]-1,3-бутандиона **5**.

**Взаимодействие 3,6 - диацетилкарбазола с метиловым эфиром трифторуксусной кислоты.** К 1,04 г (0,02 моль) гидрида натрия в эфире (50 мл) при перемешивании и охлаждении (-10°C) в течение 15 минут добавляли 2,56 г (0,02 моль) метилового эфира трифторуксусной кислоты; через 30 минут добавляли 1 г (0,004 моль) 3,6 - диацетилкарбазола. Реакционную массу перемешивали и кипятили в течение 40 часов, после выливали в смесь 250 мл колотого льда и 15 мл 10% раствора серной кислоты, добавляли 50 мл хлороформа. Выдерживали при перемешивании 30 минут. Органический слой отделяли, промывали водой (6×50 мл), сушили сульфатом натрия. Через 12 часов на холоде (-5°C) выпадал осадок тетракетона. Образовавшийся осадок отфильтровывали, промывали холодным эфиром, сушили в вакууме (20 мм рт.ст.). Выделено 0,9 г 4,4,4-Трифтор-1-[6-(4,4,4-трифтор-3-оксобутаноил)-9Н-карбазол-3-ил]-1,3-бутандиона **4**.

Как видно из таблицы, соединения **3** и **4** обладают лучшими люминесцентно-спектральными характеристиками по сравнению с соединением **7** (более длинноволновые области поглощения, более высокие коэффициенты экстинкции, большая величина интенсивности люминесценции). Если сравнивать между собой соединения **3** и **4**, можно заметить, что наличие реакционно-способной группы приводит к снижению коэффициента поглощения и относительной люминесценции комплекса при неизменности характера спектров. При этом люминесценция остается на достаточно высоком уровне, что позволяет продолжить работу по использованию соединения **3** в методиках формирования частиц нанопараметрового размера.

Таблица 1.\*

Данные спектров ЯМР  $^1\text{H}$ ,  $^{19}\text{F}$ , физико-химические характеристики, выход синтезированных гетероциклических соединений

№ по статье	Формула	Брутто формула	ЯМР $^1\text{H}$ (TMC, $\delta$ , м.д.; J, Гц.) $^{19}\text{F}$ ( $\text{CF}_3\text{COOH}$ ; $\delta$ , м.д.; J, Гц.)	$T_{\text{пл.}}$ , $^{\circ}\text{C}$	ВЫХОД %
1	2	3	4	5	6
5		$\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{F}_6\text{O}_3$	$^1\text{H}$ : 6.7 (с, 2H, =CH); 7.7 (д, 2H, =CH, J=10.3); 8.2 (д, 1H, =CH, J=10.3); 7.7 (с, 1H, =CH); $^{19}\text{F}$ : 3.3 (с, 3F, $\text{CF}_3$ ).	234, разл	77,3
4		$\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{F}_6\text{NO}_4$	$^1\text{H}$ : 7.1 (с, 2H, =CH); 7.6 (д, 2H, =CH, J=11.4); 8.2 (д, 1H, =CH, J=11.4); 9.2 (с, 1H, =CH); 12.4 (ушс, 1H, NH); $^{19}\text{F}$ : 3.3 (с, 3F, $\text{CF}_3$ ).	180- 183	51,1
3		$\text{C}_{30}\text{H}_{17}\text{F}_{16}\text{NO}_8$	$^1\text{H}$ : 4.0 (с, 6H, $\text{OCH}_3$ ); 7.2 (с, 2H, =CH); 7.85 (д, 2H, =CH, J=10.3); 8.4 (д, 2H, =CH, J=10.3); 9.3 (с, 2H, =CH); 11.5 (ушс, 1H, NH).	132, разл	40,3
7		$\text{C}_{26}\text{H}_{12}\text{F}_8\text{S}_2\text{O}_4$	$^1\text{H}$ : 6.6 (уш.с, 2H, =CH); 7.5 (м, 2H, =CH); 7.55 (м, 2H, =CH); 7.9 (д, 2H, =CH, J=9); 8.4 (уш.с, 2H, =CH); 8.6 (д, 2H, =CH, J=9); 15.6 (ушс, 2H, OH).	221	34,3

Физико-химические характеристики и спектральные данные соединений 4 и 5 соответствуют приведенным ранее в работе [8].

Таблица 2

Сравнение люминесцентно-спектральных характеристик новых и ранее известных модифицированных гетероциклов

Комплексон	$\lambda_{\text{полг}}$ свободного лиганда, нм $\epsilon \times 10^4, \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$	$\lambda_{\text{полг}}$ 1:1 комплекса с $\text{Eu}^{3+}$ , нм $\epsilon \times 10^4, \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$	$\lambda_{\text{возб}}$ люминесценции комплекса, нм	$\lambda_{\text{эм}}$ люминесценции (основной max) комплекса, нм	I интенсивность люминесцен- ции, отн.ед	$\tau$ время жиз- ни, мкс
7	338,0 1,6	343,6 1,6	347	616	42	692
3	331,1; 368,1, 1,92; 1,71 402 плечо	337,4; 376,9 1,76; 1,97	338; 380	616	72	621
4	326,5; 352,5; 3,48; 3,14 402 плечо	329; 377 3,33; 3,32	335; 380	616	270	775

Примечание. Интенсивность люминесценции от (1:1)\* $10^{-7}$  комплексов при  $\lambda_{\text{возб}}$  и  $\lambda_{\text{эм}}$ , оптимальных для комплекса при чувствительности 1.

ЛИТЕРАТУРА

1. Sarkkinen H.K., Tuokko H., Hallonen P.E. Comparison of enzyme immunoassay and radioimmunoassay for detection of human rotaviruses and adenoviruses from stool specimen. // J. Virol. Methods. 1980. V. 1(6). P. 331–341.
2. Engvall E. Enzyme immunoassay, ELiSa and EMIT. Enzymology 1980, 70:419-439.
3. Olsson T., Thore A. Chemiluminescence and its use in immunoassay. // Human Reproduction. 1988. Vol. 3. No. 2. 1-9.
4. Hemmila I. Applications of Fluorescence in immunoassay. Willey, 1991.
5. Красовицкий Б.М., Болотин Б.М. Органические люминофоры. 2е изд. М. изд. Химия, 1984.
6. Li L, Castellano FN, Gryczynski I, Lakowicz JR. Long-lifetime lipid rhenium metal-ligand complex for probing membrane dynamics on the microsecond timescale. // Chem. Phys. Lipids. 1999. V. 99(1). P.1-9.
7. Савицкий А.П., Папковский Д.Б., Березин И.В. Флуоресцентный иммуноанализ. Порфирины как новый тип меток для иммуноанализа. // ДАН СССР. 1987. Т. 293. №3. 744-748.
8. Романов Д.В., Лямин А.И., Ивановская Н. П., Осин Н.С., Васильев Н.В. «Комплексообразующие дибензосодержащие пятичленные циклические соединения, содержащие два симметричных бета – дикарбонильных заместителя с фторированными радикалами // Патент РФ №2296756, 2007.
9. Несмеянов А. Н., Несмеянов Н. А. Начала органической химии, кн. 1. М. 1969. с. 411.
10. А. Гордон, Р. Форд. Спутник химика. изд. М.: Мир, 1976.
11. Осин Н.С, Помелова В.Г, Быченкова В.Г, Соколов А.С. «Новая технология флуоресцентного иммуноанализа для обнаружения микроорганизмов и вирусов». Материалы 4-й межгосударственной научно-практической конференции государств-учредителей СНГ «Современные технологии в диагностике особо опасных заболеваний», Саратов, 2003.
12. Савицкий А.П. Флуоресцентный иммуноанализ // Успехи химии, 2000. Т.44. С. 64-98.

T. Kostyukova, N. Ivanovskaya, D. Romanov, G. Zatonsky, N. Vasil'ev

NEW EU COMPLEXES FOR FLUOROIMMUNOASSAY BIO-SPECIFIC INTERACTIONS.

*Abstract.* This paper is dedicated to the common methods of lanthanoid time-resolved fluorescence immunoassay and the advantages and limitations of the actually used analytical reagents. Also undertaken experimental researches of obtaining methods for the most perspective reagents – fluoridated heterocyclic tetraketones and tetraketodiethers. With this purpose Claisen condensation of acetyl-containing heterocyclic compounds and ethers of perfluorochemical acids, which leads to the formation of the new fluorescence immunoassay reagents, was investigated. Luminescent-spectral characteristics of the complexes of these compounds with  $\text{Eu}^{3+}$  were also evaluated.

*Key words:* lanthanide immunofluorescence analysis with a time delay, fluorinated heterocyclic tetraketones and tetraketodiethers, complex compounds.