4'-КАРБОКСИМЕТОКСИФЛАВОНОЛ ЯК ФЛУОРЕСЦЕНТНИЙ ЗОНД ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ АТФ: ПІДХОДИ ДО ЗАСТОСУВАННЯ

Л.І. Коршенко, О.М. Замотаєв, Р.П. Линник, В.Г. Пивоваренко
Хімічний факультет,
Київський національний університет імені Тараса Шевченка,
вул. Володимирська, 64/13, 01601, Київ, Україна
e-mail: liubov_korshenko@knu.ua

Актуальність роботи

Флуоресцентна спектроскопія – потужний сучасний аналітичний метод, який дає змогу визначати речовини різної природи. Флуоресцентні зонди використовуються для високочутливого детектування речовин, що не мають власного свічення. Це може бути ***актуальним*** для розв'язання численних аналітичних завдань, зокрема в медицині та фармації, де надважливим є виявлення біологічно активних сполук на рівні мікро- й нанокількостей.

Метою роботи було дослідження спектрально-флуоресцентних властивостей похідної флавонолу та її комплексу з Al(III) у присутності АТФ, встановлення оптимальних умов їх взаємодії та оцінювання впливу компонентів біологічного середовища й інших нуклеозидфосфатів на флуоресцентний відгук.

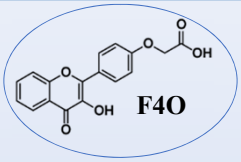
Методи і об'єкти дослідження

Флуоресцентна спектроскопія (Perkin Elmer LS-55)



Абсорбційна спектроскопія (Shimadzu 2401PC)





2-[4-(3-гідрокси-4-оксо-4Н-хромен-2-іл)фенокси]оцтова кислота

Спектральні та протолітичні характеристики F4O

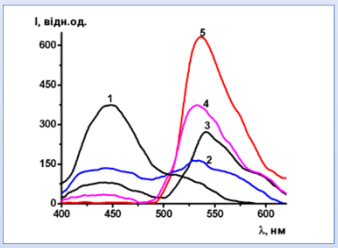
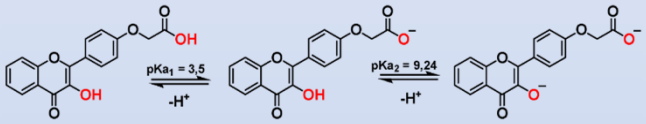


Рис. 1. Спектри флуоресценції розчину F4O у різних розчинниках. 1 – H_2O, 2 – EtOH, 3 – DMSO, 4 – CH_3CN, 5 – EtOAc, C_{F4O} = 5,0 мкМ, λ_{ex} = 360 нм.

Табл.1. Спектральні характеристики F4O у різних розчинниках.

Розчинник	λ_{abs}, нм	λ_{em}, нм	Стоксів зсув	
			Δλ, нм	Δν, см$^{-1}$
Етанол	356	530	174	57471
ДМСО	360	540	180	55556
H_2O, pH 7,8	355	450	95	105263



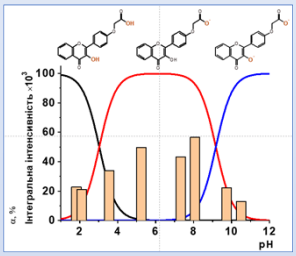


Рис. 2. Діаграма розподілу протолітичних форм F4O (криві) і інтегральна інтенсивність свічення F4O при різних pH (стовпчики).

Взаємодія F4O з іонами Al(III)

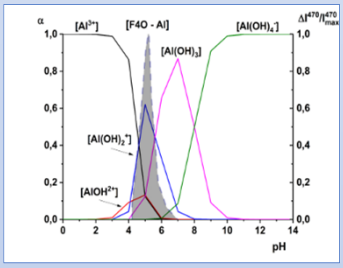


Рис. 3. Діаграма розподілу протолітичних форм гідроксокомплексів алюмінію та нормована залежність інтенсивності флуоресценції комплексу F4O -Al від pH середовища.

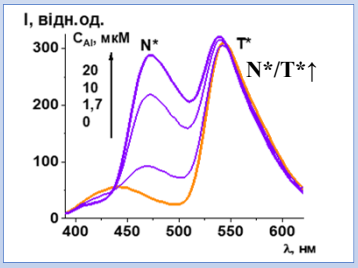


Рис. 4. Спектри флуоресценції комплексу F4O-Al у ДМСО.
C_{F4O} = 10 мкМ, λ_{ex} = 360 нм.

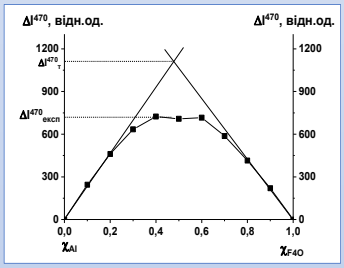


Рис. 5. Діаграма ізомолярної серії для системи F4O -Al.
$C_{i.c.}$ = 6,7 мкМ, pH 5,18, λ_{ex} = 405 нм, χ – мольна частка.

Оптимальне pH комплексоутворення: 5,15–5,20.

Форма існування Al(III): $Al(OH)_2^+$.

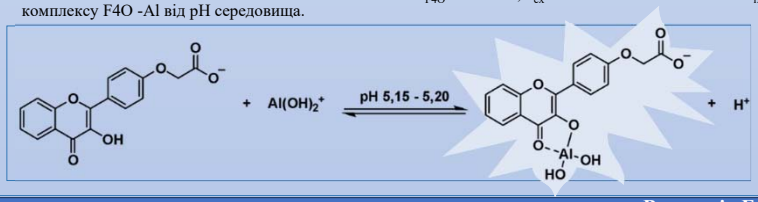
Зростання співвідношення інтенсивностей таутомерних форм N* і T* вказує на регіоселективність утворення комплексу: взаємодія іонів Al(III) відбувається за участю груп 3-OH та 4-C=O.

Стійкість та стехіометрію комплексу досліджували методами ізомолярної серії та Бенесі-Гільдебранда. Утворюється комплекс середньої стійкості та найпростішої стехіометрії.

Умовна константа стійкості комплексу (розрахована за методом Бенесі-Гільдебранда з рівняння регресії*):

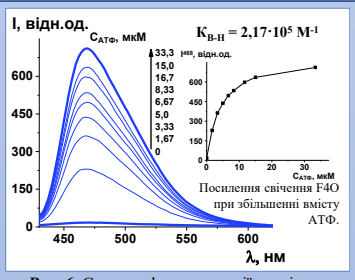
$$K_{B\text{-}H} = 6{,}44 \cdot 10^4\ M^{-1}$$

* $1/(I\text{-}I_{min}) = (1{,}29 \pm 0{,}05)\cdot 10^{-3} + (1{,}51 \pm 0{,}02))\cdot 10^{-8}\cdot 1/C_{Al(III)}$, л/моль, R^2 = 0,999





Взаємодія F4O з АТФ



Посилення свічення F4O при збільшенні вмісту АТФ.

Рис. 6. Спектри флуоресценції асоціату F4O-АТФ за різної кількості АТФ.
C_{F4O} = 2,0 мкМ, λ_{ex} = 410 нм, pH 7,39.

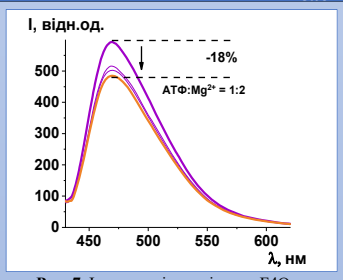


Рис. 7. Інтенсивність свічення F4O за різного співвідношення АТФ:Mg^{2+} у суміші. C_{F4O} = 2,0 мкМ, $C_{АТФ}$ = 5,0 мкМ, pH 7,42, λ_{ex} = 410 нм.

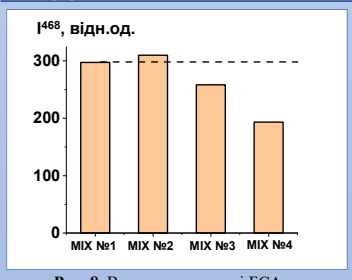


Рис. 8. Вплив присутності БСА на флуоресценцію F4O молекулами АТФ.
C_{F4O} = 2,0 мкМ, $C_{АТФ}$ = 5,0 мкМ, pH 7,42, λ_{ex} = 410 нм.

Найвища інтенсивність флуоресценції спостерігається у розчинах із pH 7,2–7,4.

Стійкість та стехіометрію досліджували методами ізомолярної серії та Бенесі-Гільдебранда. Утворюється асоціат середньої стійкості та найпростішої стехіометрії.

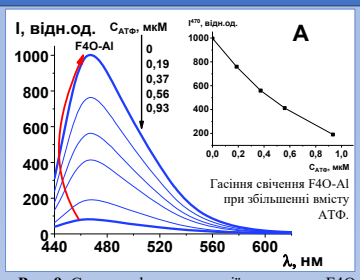
Дослідили вплив іонів Mg(II) та БСА на свічення асоціату F4O-АТФ.

При співвідношенні АТФ:Mg(II) = 1:2 інтенсивність емісії асоціату на 18% нижча, ніж за відсутності Mg(II).

За одночасної присутності АТФ і БСА, при збільшенні вмісту БСА чутливість F4O до АТФ знижується

MIX №	$C_{БСА}$, мкг/мл
1	0
2	5
3	10
4	50

Взаємодія комплексу F4O-Al з АТФ



Гасіння свічення F4O-Al при збільшенні вмісту АТФ.

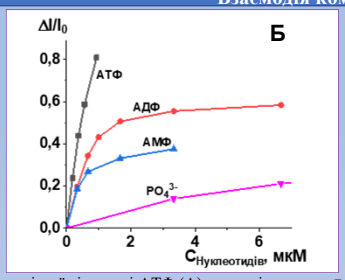


Рис. 9. Спектри флуоресценції комплексу F4O-Al за різної кількості АТФ (А) та ступінь гасіння свічення F4O-Al зі зростанням вмісту нуклеотидів та фосфат-аніонів (Б).
C_{F4O} = 10 мкМ, $C_{Al^{3+}}$ = 1,0 мкМ, λ_{ex} = 405 нм, , λ_{max} = 470 нм, pH 5,15 – 5,20.

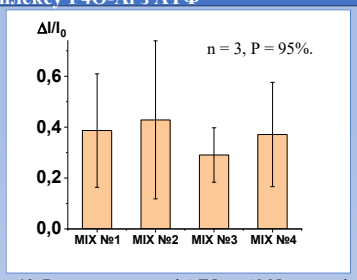


Рис. 10. Вплив присутності АДФ та АМФ на ступінь гасіння свічення F4O-Al молекулами АТФ. C_{F4O} = 10 мкМ, $C_{Al^{3+}}$ = 1,0 мкМ, λ_{ex} = 405 нм, λ_{max} = 470 нм, pH 5,18.

Подібно до АТФ, АДФ та АМФ взаємодіють із F4O-Al. Найвищу спорідненість до флуорофору виявляє АТФ.

Вибірковість взаємодії між F4O-Al та АТФ досліджували з використанням модельних розчинів, що містили АТФ, АДФ та АМФ у співвідношеннях, що відповідають рівням вмісту цих нуклеозидфосфатів у клітинах живих організмів:

MIX №	$C_{АТФ}$, мкМ	$C_{АДФ}$, мкМ	$C_{АМФ}$, мкМ
1	105	-	-
2	105	28.3	-
3	105	28.3	7
4	105	-	7

Висновки

- Найвища інтенсивність флуоресценції асоціату 4'-карбоксиметоксифлавонолу з АТФ спостерігається у діапазоні pH 7,2-7,4.
- Методами ізомолярної серії і Бенесі-Гільдебранда встановлено, що F4O утворює з АТФ комплекс найпростішої стехіометрії, середньої стійкості ($K_{B\text{-}H}$ = 2,17·10^5 M^{-1}).
- Поступове збільшення співвідношення Mg(II):АТФ у розчині незначною мірою впливає на інтенсивність емісії асоціату F4O-АТФ.
- Збільшення кількості БСА в модельних розчинах АТФ послаблює інтенсивність свічення асоціату F4O-АТФ.
- Досліджено вплив аденозин фосфатів на флуоресценцію комплексу F4O-Al. За одночасної присутності АТФ та АДФ інтенсивність емісії практично не змінюється, проте додавання АМФ збільшує інтенсивність свічення системи.
- Отримані результати свідчать про перспективність використання F4O для флуоресцентного детектування АТФ у різноманітних об'єктах.