

На правах рукописи



Пугачёв Дмитрий Евгеньевич

**СИНТЕЗ И СВОЙСТВА ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИХ КОМПЛЕКСОНОВ
ЛАНТАНОИДОВ ДЛЯ ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНТНОГО АНАЛИЗА**

Специальность 02.00.03 – «Органическая химия»

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Черноголовка – 2019

Работа выполнена на кафедре теоретической и прикладной химии Биолого-химического факультета Государственного образовательного учреждения высшего образования Московской области Московского государственного областного университета и в Государственном научно-исследовательском институте биологического приборостроения.

Научный руководитель

Васильев Николай Валентинович,
доктор химических наук, профессор,
ГОУ ВО МО «Московский государственный
областной университет», заведующий кафедрой
теоретической и прикладной химии

Официальные оппоненты:

Чкаников Николай Дмитриевич,
доктор химических наук,
ФГБУН «Институт элементоорганических
соединений им. А. Н. Несмеянова Российской
академии наук», заведующий лабораторией
физиологически активных фторорганических
соединений

Румянцева Валентина Дмитриевна,
кандидат химических наук,
ФГБОУ ВО «МИРЭА - Российский
технологический университет»,
старший научный сотрудник кафедры химии и
технологии биологически активных соединений
имени Н.А. Преображенского

Ведущая организация

Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
«Московский государственный университет имени
М. В. Ломоносова»

Защита состоится 26 ноября 2019 г. в 14 ч. 00 м. на заседании Диссертационного совета Д 002.102.02 на базе Федерального государственного учреждения науки Института физиологически активных веществ Российской академии наук (ИФАВ РАН) по адресу 142432, Московская область, г. Черноголовка, Северный проезд, д. 1, Зал ученого совета. С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ИФАВ РАН по адресу: http://www.ipac.ac.ru/diss_sovet/

Автореферат разослан «___» _____ 2019 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета Д 002.102.02

кандидат химических наук



Афанасьева С. В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Интерес к методам получения и свойствам органических реагентов для иммунофлуоресцентного анализа (ИФА) чрезвычайно возрос в начале 80-х годов XX века с введением в медицинскую практику иммунофлуоресцентного анализа с временным разрешением на основе хелатов лантаноидов, в частности, технологии диссоциативного усиленного лантаноидного иммунофлуоресцентного анализа (DELFIА). Использование люминесцирующих реагентов на основе комплексов редкоземельных элементов (РЗЭ) повысило чувствительность анализа и его достоверность, благодаря уникальным люминесцентно-спектральным свойствам комплексов лантаноидов по сравнению с реагентами других типов (органические люминофоры, ферментные системы и прочее). Среди лантанидов в технологиях ИФА с временным разрешением наиболее часто используются Eu^{3+} и Tb^{3+} .

Чувствительность и быстродействие анализа являются основными требованиями в условиях клинического исследования. Для повышения этих параметров в настоящее время получено и исследовано большое количество комплексонов европия и других лантанидов, в том числе, веществ бензогетероциклического строения, однако существующие решения не всегда соответствуют поставленным требованиям. В связи с этим является актуальной разработка новых органических бензогетероциклических комплексонов лантанидов для ИФА, обеспечивающих возможность высокочувствительной диагностики заболеваний и повышающих экспрессность скрининга. Кроме того, важной задачей является разработка люминесцирующих нанодисперсий на основе комплексов европия, обеспечивающих повышение чувствительности анализа.

Целью настоящего исследования являлась разработка новых бензогетероциклических комплексонов редкоземельных элементов и оценка возможности их использования в иммунофлуоресцентном анализе с временным разрешением.

В соответствии со сформулированной целью в работе были поставлены следующие задачи:

1. Разработка методов получения новых гетероциклических лигандов ряда бензофурана и карбазола, обеспечивающих улучшенные люминесцентно-спектральные характеристики комплексов с ионами европия (III) и тербия (III), а также их кинетическую стабильность по сравнению с уже имеющимися решениями.

2. Синтез лигандов ряда карбазола, содержащих соединенные спейсерами функциональные группы для дальнейшей конъюгации с биомолекулами.

3. Определение люминесцентно-спектральных характеристик водных растворов комплексов полученных соединений с ионами европия (III) и тербия (III).

4. Оценка возможности использования комплексов лантанидов полученных соединений в качестве реагентов для иммунофлуоресцентного анализа, в том числе для маркирования белковых молекул и создания люминесцирующих нанодисперсий.

Научная новизна результатов исследований.

Получен ряд новых фторсодержащих енаминонов на основе бензофурана, отработаны методы их получения. При этом выявлена региоселективность образования промежуточных галогененонов: реакции бензофуранилтрифторметил- β -дикетона с хлористым тиоилом и с трибромидом фосфора приводят к различным результатам, а именно к образованию преимущественно α - или γ - галогензамещенного региоизомера соответственно. Различия в региоселективности этих процессов позволяет с удовлетворительными выходами осуществлять целевой синтез как α - так и γ - енаминонов.

Оценена хелатирующая активность фторсодержащих енаминонов на основе бензофурана по отношению к иону европия. При этом определено, что люминесцентно-спектральные характеристики комплексов фторсодержащих бензофураниленаминонов с Eu^{3+} в водных растворах затухает по сравнению с комплексами исходного бензофуранилтрифторметил- β -дикетона. Спектральными методами показано гидролитическое превращение комплексов енаминонов в комплексы β -дикетонов.

С помощью различных методов органического синтеза получены новые и известные прекурсоры ряда N-замещенных карбазолов и на их основе **разработаны** соответствующие фторсодержащие бис- β -дикетоны, в том числе N-спейсеросодержащие соединения с карбоксильными функциональными группами.

Показаны повышенная хелатирующая способность фторсодержащих тетракетонов на основе N-замещенных карбазолов и улучшенные люминесцентно-спектральные характеристики (значение коэффициента экстинкции (ϵ), квантовый выход (Φ), показатель светимости ($\epsilon \times \Phi$), интенсивности люминесценции (I)), а также устойчивость образующихся комплексов с ионом Eu^{3+} во времени по сравнению с известными реагентами ряда гетероциклических и ароматических фторсодержащих β -дикетонов.

Разработан ряд методик получения симметричных и несимметричных 2,7- и 3,6-дизамещенных карбазолов, содержащих хелатирующий пиридин-4-ил-2,6-дикарбоксильный фрагмент. Спектры полученных соединений симметричного и несимметричного строения изучены при комплексообразовании с европием и тербием в водных растворах. Выявлено, что соединения этого ряда образуют гидрофобные комплексы, которые проявляют удовлетворительные квантовые выходы люминесценции (до 25%) при длинах волн возбуждения ≥ 340 нм, что приводит к лучшему соотношению сигнал/фон по сравнению с известными производными пиридиндикарбоновых кислот, и могут быть применены для мультиплексного иммунофлуоресцентного анализа.

Практическое значение результатов исследований.

Разработаны методы получения ряда N-замещенных карбазолов с препаративными выходами.

Определены высокие значения интенсивности люминесценции и её устойчивость во времени для комплексов европия (III) с тетракетонами ряда карбазола в условиях проведения микробиологического анализа, что обуславливает конкурентные преимущества разработанных фторсодержащих тетракетонов на основе N-замещенных карбазолов при использовании в иммунофлуоресцентных методиках с временным разрешением.

Создан универсальный аналитический реагент – стрептавидин, маркированный N-спейсерсодержащим бис- β -дикетоном на основе карбазола, подходящий для биологического микроанализа, в том числе для иммунофлуоресцентного анализа с временным разрешением, что отражено в материалах заявки на патент РФ

№ 2019127178 «N-Спейсерсодержащие 3,6-бис-β-дикарбонилзамещенные карбазолы с фторированными заместителями, для использования в качестве маркеров и комплексонов».

Достоверность и апробация результатов

При выполнении исследования синтезировано 72 соединения, из них 45 ранее не описаны. Строение и чистота обсуждаемых в работе соединений подтверждены данными элементного анализа, данными спектроскопии ЯМР ^1H , ^{13}C , ^{19}F , высокоэффективной жидкостной хроматографии. Данные спектральных исследований получены с применением современных физико-химических методов и методик, реализованных с использованием стандартного оборудования. Корректность результатов подтверждается их сходимостью при повторных экспериментах, обработанных методами математической статистики. Полученные автором результаты не противоречат известным научным данным и закономерностям.

Результаты работы апробированы на следующих международных и всероссийских конференциях: Международный конгресс по химии гетероциклических соединений "Кост-2015" (МГУ, 2015), Всероссийская молодежная школа-конференция "Успехи синтеза и комплексообразования" (РУДН, 2016), Международная научно-практическая конференция "Актуальные проблемы биоэкологической и химической экологии" (МГОУ, 2016), Международная молодежная конференция "Ломоносов 2018" (МГУ, 2018), Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием "Экология родного края: проблемы и пути их решения" (Киров, ВятГУ, 2019).

Публикации. По материалам диссертации выпущено 10 статей и тезисов докладов в сборниках конференций, 4 статьи в рецензируемых журналах, в том числе входящих в перечень журналов, рекомендованных ВАК РФ.

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 165 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, обсуждения результатов, экспериментальной части, выводов, списка цитируемой литературы и приложения. Диссертационная работа содержит 63 схемы, 17 рисунков, 13 таблиц и 198 ссылок.

Автор выражает благодарность и признательность своему научному руководителю доктору хим. наук, проф. Васильеву Н.В. за терпение и помощь в организации исследования, научному сотруднику «ГосНИИ БП» к.х.н. Кострюковой Т.С. за помощь и поддержку в работе, старшему научному сотруднику «ГосНИИ БП» к.х.н. Парамонову Д.В. за бесценный обмен междисциплинарным опытом и критическому взгляду на научные проблемы, за методологическую помощь к.х.н. Петренко Д.Б. и Затонскому Г.В. за регистрацию и помощь в интерпретации ЯМР спектров.

Личный вклад соискателя. Автором проведены все экспериментальные исследования по получению соединений и изучению их свойств, проведена интерпретация и обобщение экспериментальных данных. Соискатель провел анализ и обобщение материалов (статей, патентов, обзоров, монографий) по теме исследования, подготовил публикации и представлял доклады по теме диссертационной работы.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Обзор литературы посвящен описанию реагентов для ИФА. Больше внимание уделено существующим в научной литературе сведениям о гетероциклических лигандах европия дикетонатного типа, а также производным пиридиндикарбоновых кислот, которые позволяют эффективно сенсibilизировать тербий. В отдельном подразделе описаны механизмы переноса энергии поглощенного электромагнитного излучения с лиганда на ион металла и сформулированы требования, предъявляемые к реагентам для иммунофлуоресцентного анализа. На основе анализа литературных сведений определено, что наиболее подходящими гетероциклическими хромофорами, эффективно сенсibilизирующими энергию в комплексах РЗЭ, являются бензофурановый и карбазольный фрагменты, которые и рассматривались в настоящей работе.

Диссертационная работа выполнена в трех основных направлениях:

получение новых бензофурансодержащих комплексонов ряда енаминонов и оценка возможности их комплексообразования с европием;

синтез N-замещенных тетракетонов на основе карбазола, в том числе N-спейсерзамещенных тетракетонов, и выявление среди них наиболее эффективных сенсibilизаторов люминесценции европия;

разработка методов получения карбазолзамещенных производных дипиколиновой кислоты (ДПК) и выявление среди них наиболее эффективных лигандов для реализации люминесценции тербия.

1. Фторсодержащие лиганды на основе бензофурана

Фторсодержащие енаминоны являются таутомерами соответствующих иминов и электронными аналогами енольных форм β -дикетонов. В обзоре литературы (глава 1) показано, что одним из наиболее отвечающих требованиям по спектральным характеристикам хромофоров, эффективно сенсibilизирующих энергию в комплексах РЗЭ, является бензофурановый фрагмент, изученный ранее на примере соединения **1**.

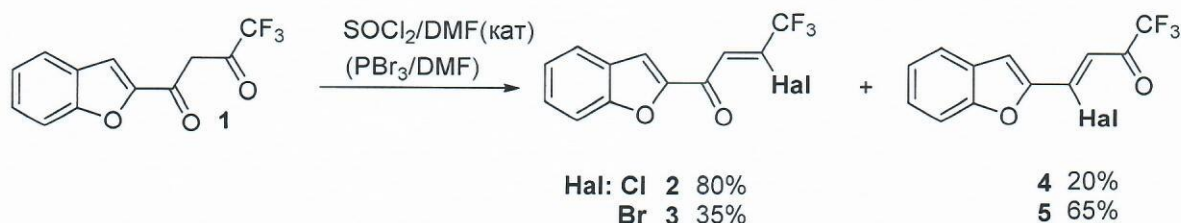
Представлялось целесообразным получить ранее неизвестные бензофуранилтрифторметилсодержащие енаминоны, изучить их комплексообразование с Eu^{3+} в водных растворах и оценить люминесцентно-спектральные свойства водных растворов комплексов с целью возможного использования для разработки реагентов иммунофлуоресцентного анализа.

Получение бензофуранилтрифторметиленаминонов **6** и **7** не удалось осуществить прямым взаимодействием бензофуранилтрифторметил- β -дикетона **1** с аминами в среде спирта, карбоновой кислоты, ароматических углеводородах в условиях кислого катализа – HCl , $\text{BF}_3 \times \text{Et}_2\text{O}$, толуолсульфо кислоты и др. В связи с этим, для получения енаминонов была выбрана двухстадийная схема, включающая промежуточное образование хлор- и броменонов. В качестве исходного реагента использовался бензофуранилтрифторметил- β -дикетон **1**, получение которого проводили по модифицированной реакции Кляйзена из коммерчески доступного 2-ацетилбензофурана с использованием в качестве основания гидроксида лития. Выход продукта в этом процессе составил 96 %.

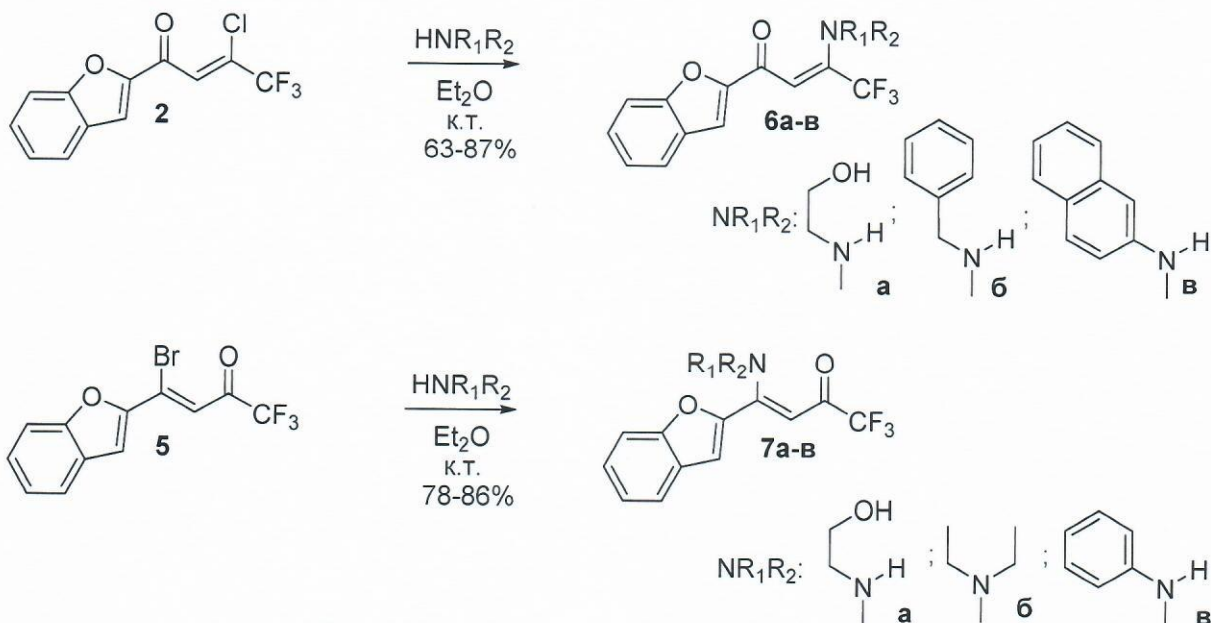
Хлореноны получали нагреванием исходного β -дикетона **1** в избытке хлористого тионила в присутствии диметилформамида, использованного в качестве катализатора. После удаления тионилхлорида в вакууме получали смесь региоизомеров: хлоренон **2**

и хлоренон **4**. Основным изомером являлся хлоренон **2**, который легко отделяется перегонкой в вакууме. Выход составил (~80%). Изомеры бензофуранилброменона **3** и **5**, полученные взаимодействием дикетона **1** с PBr_3 в ДМФА, имеют обратное соотношение региоизомеров. Превалирующим изомером (~65%) являлся изомер **5** противоположной ориентации в сравнении с хлореноном **2**. Региоизомеры **3** и **5** разделяли колоночной хроматографией на силикагеле.

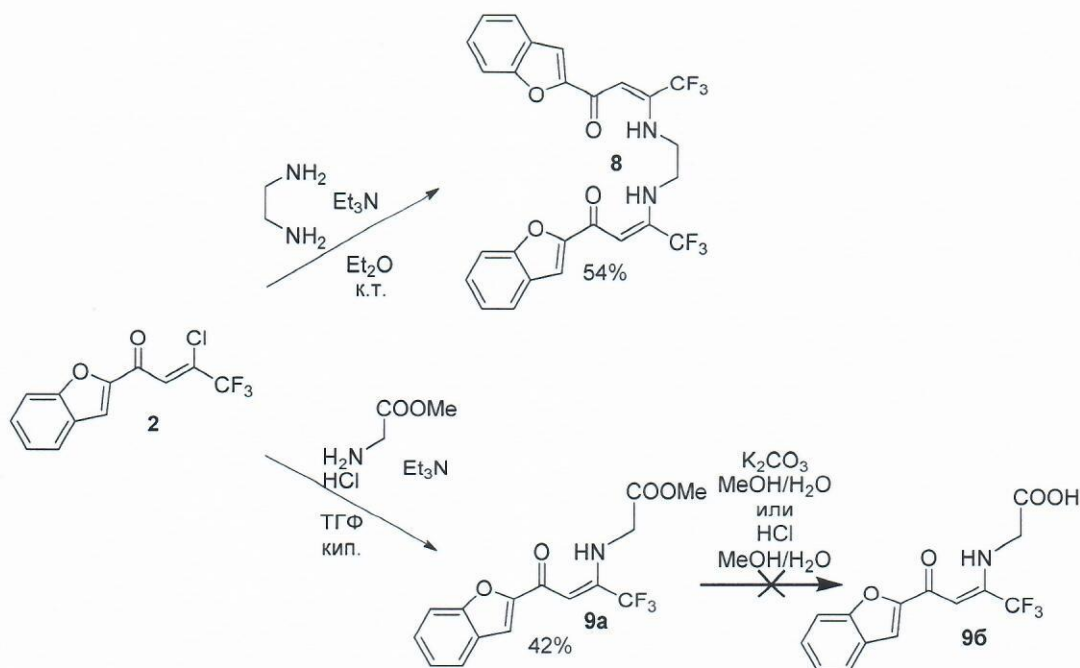
Подтверждение структуры полученных соединений основывали на анализе спектров ЯМР ^{13}C . Для изомера **2** отсутствует расщепление карбонильного атома углерода на атомах фтора (квартет) в области 170-190 м.д., а имеется лишь синглет карбонильной группы при 176 м.д. Квартет, который, судя по всему, относится к углероду C-Cl, находится при 132 м.д. В свою очередь, в спектре ^{13}C региоизомера **4** имеется квартет карбонильной группы при 178 м.д.



Введение аминной функции осуществлялось действием соответствующего амина на полученный хлоренон **2** в среде сухого диэтилового эфира. В случае водорастворимых аминов (этаноламин, диэтиламин, бензиламин) замещение производили действием 2,2 эквивалентов амина. Реакционная смесь промывалась водой и, при необходимости, енамины **6** перекристаллизовывались из водного этанола (80-85%). Ароматические амины использовались в эквивалентных количествах, а в качестве акцептора хлороводорода использовался небольшой избыток сухого триэтиламина. Полученные соединения также перекристаллизовывались из спирта. Ряд енаминов противоположной ориентации был получен исходя из броменона **5**.



Для увеличения координационной способности синтезируемых енаминов была предпринята попытка получения бисзамещенного β -енамина **8** и имеющего дополнительную аминокарбоксильную функцию енамина **9б**. Для получения **8** использовали 0,5 эквивалента этилендиамина в эфире в присутствии триэтиламина. В случае соединения **9б** синтез велся через промежуточный эфир **9а**. Дальнейший гидролиз сложноэфирной группы в соединении **9а** приводил к полному разложению реакционной смеси как в основной, так и в кислой среде.

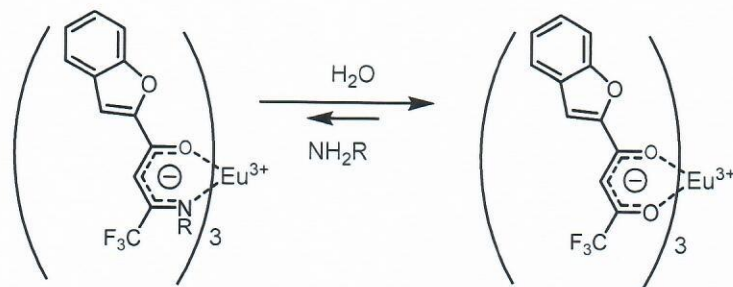


Полученные бензофураниленамины **6-9а** охарактеризовывались методом ЯМР ^1H и ^{19}F .

Для енаминонов **7а-в**, у которых енаминная функция находится ближе к бензофурановому фрагменту, на спектре ^{19}F синглет трифторметильной группы находится в области $-76(-77)$ м.д., для енаминонов **6а-в**, **8**, **9а** в районе $-66(-67)$ м.д. На спектрах (ЯМР ^1H и ^{19}F) наблюдается характерное удвоение интегральных интенсивностей сигналов для енаминонов **6а** и **7а**, что объясняется наличием *Z* и *E* изомеров. Протон при атоме азота проявляется в областях $10,5-12,5$ м.д. В случае енаминона **7б** на спектре однозначно определяется один *E*-изомер.

Образование комплексов с европием и люминесцентно-спектральные свойства соединений **6**, **7**, **8** изучались спектрофотометрически в водных растворах. Представлялось логичным сравнивать спектральные свойства и комплексообразование изучаемых соединений со свойствами β -дикетона **1**. По сравнению с исходным β -дикетоном **1**, максимум поглощения которого находится на 350 ± 2 нм, для полученных енаминонов, имеющих подвижный атом водорода, основной максимум поглощения наблюдается в областях $360-390$ нм. Диэтиламиносодержащий енаминон **7б**, не имеющий подвижного протона, имеет небольшой гипсохромный сдвиг – его максимум поглощения находится на 337 ± 2 нм. Экстинкция енаминонов **6а**, **7в**, **8** сравнима или превышает экстинкцию β -дикетона **1**. Изомеры **6** проявляют большее батохромное смещение ($10-15$ нм) длинноволнового максимума поглощения по сравнению с региоизомерами **7**.

Для изучения комплексообразования к исследуемым лигандам **1**, **6**, **7** добавляли водный раствор гексагидрата нитрата европия (III) в соотношении 3:1 (лиганд/ион металла) при рН 7,8 в присутствии со-лиганда триоктилфосфиноксида (ТОФО). Для соединения **8**, исходя из дентатности лиганда, использовали соотношение 2:1. В целом люминесценция комплексов бензофуранильных енаминонов **6-8** в водных средах оказалась затушенной в сравнении с комплексами β -дикетона **1**. При этом люминесценция растворов комплексов во времени не уменьшается, а возрастает. Одновременно происходит гипсохромное смещение максимума возбуждения люминесценции. Такие изменения во времени не характерны для люминесцирующих комплексов европия, и полученные данные свидетельствуют в пользу того, что комплексы европия с енаминонами **6-8** в водных растворах претерпевают гидролитические превращения в комплексы исходного β -дикетона **1**.



При дальнейшем изучении было выявлено, что в присутствии иона европия гидролизуются не только соединения типа **6**, но и **7**. Скорость гидролиза енаминов **6** несколько выше, чем для ряда региоизомерных соединений **7**. Гидролитические превращения, видимо, облегчаются в присутствии Eu^{3+} , который выступает в качестве кислоты Льюиса, катализирующей гидролиз до комплексов β -дикетона **1**.

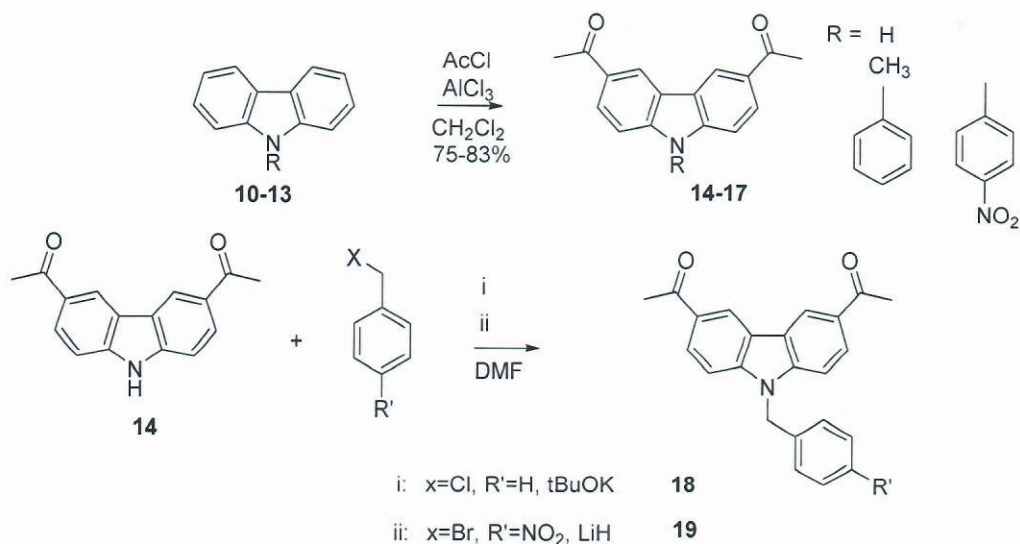
2. Фторированные тетракетоны на основе карбазола

Фторированные тетракетоны (бис- β -дикетоны) имеют повышенные константы устойчивости комплекса с ионом европия, что является существенным преимуществом при проведении иммунофлуоресцентного анализа. Среди описанных в литературе соединений особый интерес представляет тетракетон на основе карбазола **23** ввиду оптимальных спектральных свойств (максимумы поглощения >370 нм с коэффициентами экстинкции $\geq 3 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Наличие NH-функции карбазольного фрагмента позволяет вводить спейсерные функциональные группы для дальнейшей конъюгации N-спейсерсодержащих фторсодержащих тетракетонов на основе карбазола с молекулами белка. При этом для выполнения различных задач иммуноанализа представлялось интересным получить реагенты, имеющие короткий и длинный спейсеры, которые отделяют карбоксильную группу от хромофорной части.

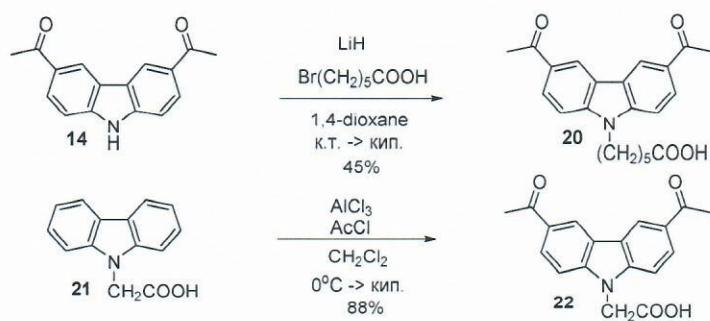
Для синтеза целевых соединений **23-29** были опробованы различные синтетические схемы, позволяющие препаративно получать конечные продукты с высокими выходами. Промежуточные производные карбазола (N-метилзамещенный **11**, N-фенилзамещенный **12** и N-нитрофенилзамещенный **13**) получали из карбазола **10**.

Ацетильные группы для последующего проведения реакции Кляйзена вводились в условиях реакции Фриделя-Крафтса по стандартной методике действием на карбазолы **10-13** ацетил хлорида в присутствии хлористого алюминия в дихлорметане. Выходы соответствующих диацетилпроизводных **14-17** составили от 78 до 83%.

Бензил замещенные кетоны **18**, **19** оказалось удобнее получать алкилированием NH-диацетилкарбазола **14**, известного ранее. В случае соединения **18** для введения бензильной группы использовался хлористый бензил в присутствии ^tBuOK в ДМФА, нитробензильная группа вводилась действием пара-нитробензилбромида в ДМФА при действии LiH в качестве основания. Обе реакции осуществляются селективно по азоту карбазольного фрагмента.

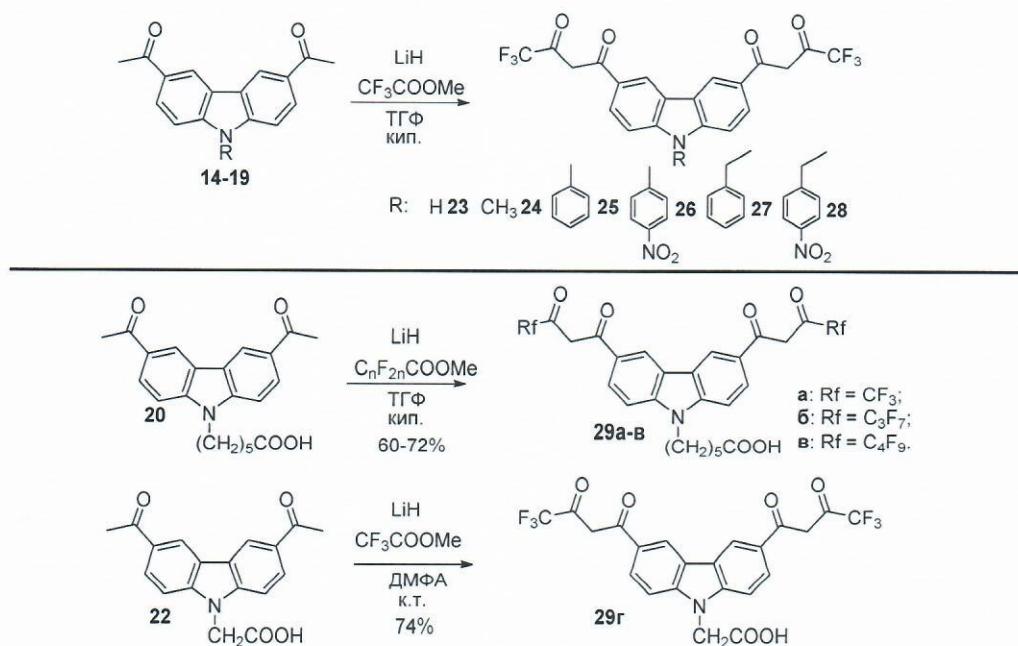


Введение карбокси-группы с длинным спейсером достаточно успешно осуществляется взаимодействием диацетильного производного **14** с 6-бромгексановой кислотой в среде сухого 1,4-диоксана в присутствии гидроксида лития. Соединение **20** выделено после перекристаллизации из этилацетата с выходом 45%. Введение фрагмента с коротким спейсером C2 - уксусной кислоты не удалось осуществить аналогично, поэтому был предварительно получен карбазол **21** на который действовали ацетилхлоридом в присутствии хлорида алюминия с получением карбазола **22**.



Диацетилкарбазолы **14-20**, **22** подвергались ацилированию по Кляйзену в присутствии избытка LiH в качестве основания в сухом ТГФ или ДМФА.


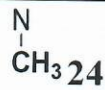
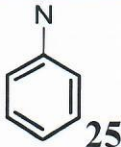
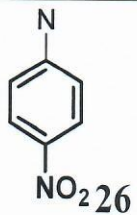
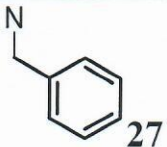
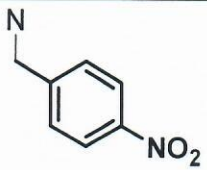
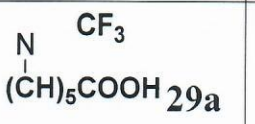
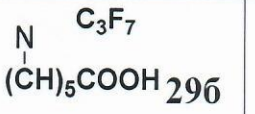
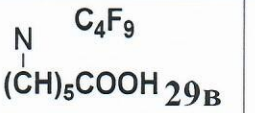
Использование гидрида лития в ТГФ, как и в предыдущих случаях, оказалось оптимальным. Для реакций в ТГФ характерен “запуск” при достижении смесью температуры $\sim 60^\circ$. Время реакций составляет $\sim 1-1,5$ часа, выходы тетракетонов достаточно высоки (69-88 %), в том числе и для ранее известного NH тетракетона **23**. Получение спейсерсодержащих соединений **29а-в** проводили с использованием эфиров различных перфторкарбоновых кислот (CF_3 , C_3F_7 , C_4F_9), поскольку представлялось интересным оценить влияние фторированных заместителей на люминесцентные свойства комплексов получаемых соединений.



Идентификация структур соединений проводилась по ИК, ЯМР ^1H , ^{13}C и ^{19}F спектрам и выполнялся элементный анализ. В ИК спектрах найдены характерные для енолов полосы поглощения в области $1583-1675\text{ см}^{-1}$. В спектрах ЯМР ^1H однозначно идентифицируется енольная форма тетракетонов с наличием сигнала в области 7,15-7,17 ppm в ДМСО-d₆.

Люминесцентно-спектральные свойства. Введение заместителей донорного типа к атому азота карбазольного фрагмента (метил **23**, фенил **25**, бензил **27**) увеличивает время жизни люминесцентного состояния и интенсивность по сравнению с известным ранее незамещенным тетракетоном **22** в буферном и буферно-мицеллярном растворах. Комплексы нитрофенил **26** и нитробензилзамещенного **28** карбазолов демонстрируют несколько сниженные люминесцентные характеристики.

Люминесценция комплексов карбазолов с Eu^{3+} в водном растворе Трис-буфера (0,05М) и Тритоне X100 (0,1%); $C=(\text{лиганд}:\text{Eu}^{3+}:\text{ТОФО})=(3:2:6)\times 10^{-5}\text{M}$. $\lambda_{\text{эм}} = 615 \pm 2 \text{ нм}$. ($n = 3$; $P = 0,95$).

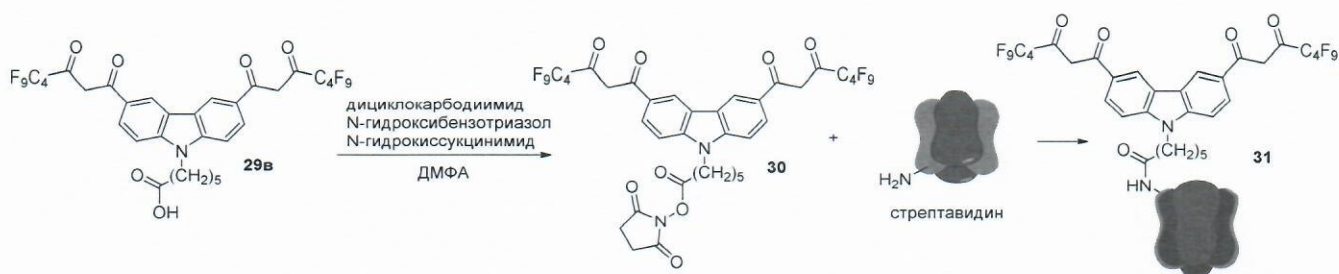
Лиганд	Трис-буфер, рН 7.8			Трис-буфер, рН 7.8 + Тритон X-100		
	$\lambda_{\text{возб}}$, $\pm 2 \text{ нм}$	I отн ед, $\times 10^4$	τ , мкс	$\lambda_{\text{возб}}$, $\pm 2 \text{ нм}$	I отн ед, $\times 10^4$	τ , мкс
 23	378	$35,6 \pm 2,4$ 2	560 ± 1 5	372	$125,4 \pm 4$ 68	686 ± 9
 24	378	$48,3 \pm 1,4$ 8	575 ± 1 1	374	$142,5 \pm 4$ 12	701 ± 8
 25	374	$55,4 \pm 2,3$ 2	565 ± 1 7	368	$161,8 \pm 3$ 98	711 ± 1
 26	368	$19,1 \pm 1,0$ 9	520 ± 1 3	362	$68,9 \pm 5,7$ 1	692 ± 7
 27	376	$56,2 \pm 3,0$ 1	575 ± 1 4	370	$150,0 \pm 3$ 57	710 ± 9
 28	374	$11,8 \pm 1,1$ 0	434 ± 1 1	334	$37,2 \pm 1,2$ 0	568 ± 1 1
 29a	378	$60 \pm 1,4$	544 ± 10	376	$37 \pm$	654 ± 12
 29б	376	$113 \pm 2,3$	566 ± 9	376	$71 \pm$	665 ± 13
 29B	378	$121 \pm 2,4$	570 ± 11	378	$79 \pm 1,9$	689 ± 11

$\begin{array}{c} \text{CF}_3 \\ \\ \text{N} \\ \\ \text{CH}_2\text{COOH} \end{array} \text{29Г}$	378	70±2,1	550±9	375	52±1,9	621±11
---	-----	--------	-------	-----	--------	--------

Изучение люминесцентных характеристик N-замещенных тетракетонов на основе карбазола в водных растворах с ТОФО в качестве со-лиганда выявило, что комплексы с Eu^{3+} интенсивно и длительно люминесцируют в сравнении с незамещенным соединением **23**. Для соединений с более длинным перфторалкильным радикалом - **29б,в** интенсивность люминесценции в среднем на 15% выше, чем для **29а,г**.

В мицеллярно-буферном растворе (0,1% Тритон X-100 и 0,05 М Трис-буфер pH 7,8) увеличивается время жизни люминесцентного состояния для всех комплексов N-спейсерсодержащих тетракетонов **29а-г**, но одновременно наблюдается снижение интенсивности люминесценции, что связано с наличием гидрофильных карбоксилсодержащих групп, которые сдвигают равновесие распределения комплексов тетракетонов **29** с Eu^{3+} между водной и мицеллярной фазой в сторону первой.

Конъюгирование и нанодисперсии. Применение синтезированных реагентов предполагает возможности создания на их основе иммунореагентов. Комплекс спейсерсодержащего карбазола **29в** как наиболее перспективный по своим люминесцентным характеристикам был исследован в модельном эксперименте конъюгации с стрептавидином. Конъюгацию производили при предварительной активации карбоксильной группы в среде ДМФА с помощью дициклогексилкарбодиимида и гидроксibenотриазолом. Полученный активированный комплекс **30** без выделения добавляли к буферному раствору стрептавидина.



После осуществления конъюгации реакционную массу фракционировали на колонке, используя Сефадекс G200. В результате был получен меченый конъюгат **31** на основе спейсерсодержащего тетракетона **29в**. В соответствии с расчётами по

спектрофотометрическим данным на одну молекулу белка в конъюгате **31** приходится в среднем 4-5 комплекса европия.

Получение флуоресцирующих наночастиц проводили на основе силикатной матрицы (аэросил 380). Для введения в матрицу использовался комплекс спейсерсодержащего тетракетона **29г** с Eu^{3+} и ТОФО. Полученные частицы стабильны во времени и активно люминесцируют в течение нескольких месяцев.

3. Дипиколиновые производные карбазола

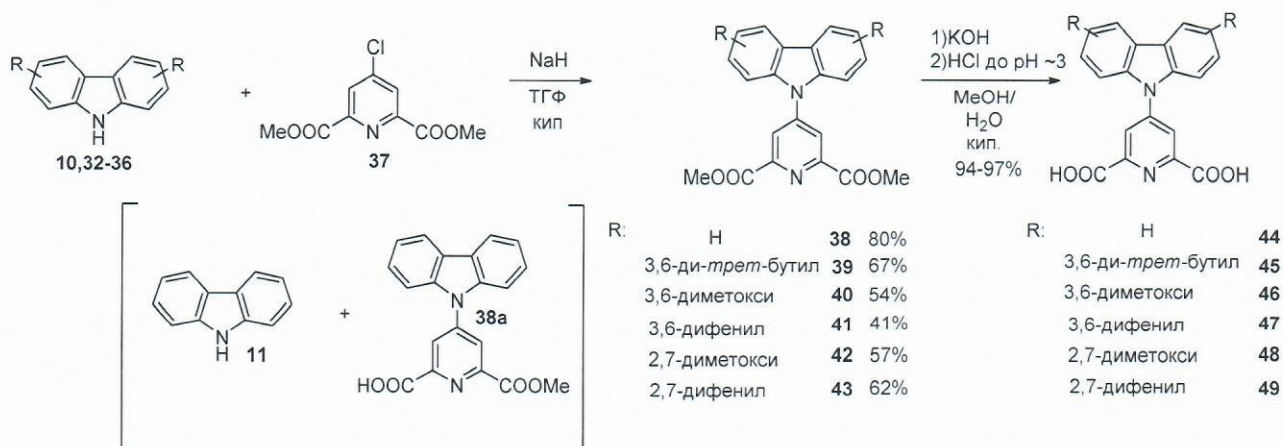
Молекулярное конструирование люминесцентных зондов с разными полосами испускания света является основой реализации мультиплексного анализа для одновременного определения нескольких аналитов в пробе. Наилучшими фосфоресцентными характеристиками и временем жизни люминесцентного состояния, обладают комплексы Eu^{3+} и Tb^{3+} . Наиболее эффективными сенсibilизаторами Tb^{3+} являются производные пиридин-2,6-дикарбоновой кислоты. К недостаткам большинства сенсibilизаторов ряда пиридинкарбоновых кислот относятся коротковолновые максимумы возбуждения и невысокая экстинкция. Поэтому представлялось интересным создать комбинированные лиганды, которые имели бы возможность поглощать электромагнитное излучение в одной спектральной области с дикетонатными лигандами, и при этом чтобы их комплексы люминесцировали в различных областях с различной интенсивностью, для количественной кодировки аналитов по соотношению ионов Eu^{3+} и Tb^{3+} . В связи с этим были исследованы методы получения хелатов, которые являются производными пиридиндикарбоновых кислот и одновременно содержат сенсibilизирующие фрагменты карбазола, как незамещенного, так и с различными заместителями в 3,6 и 2,7-положениях

Для введения карбазольного фрагмента в пиридин-2,6-дикарбоновую кислоту использовалась реакция нуклеофильного замещения. Для этого получали диметиловый эфир 4-хлорпиридин-2,6-дикарбоновой кислоты **37**. В качестве заместителей в карбазольных фрагментах рассматривались бис 3,6- и 2,7-замещенные: фенил-, трет-бутил, метокси-производные. Для получения 3,6- и 2,7-замещенных производных использовались описанные в литературе методики, реализованные с

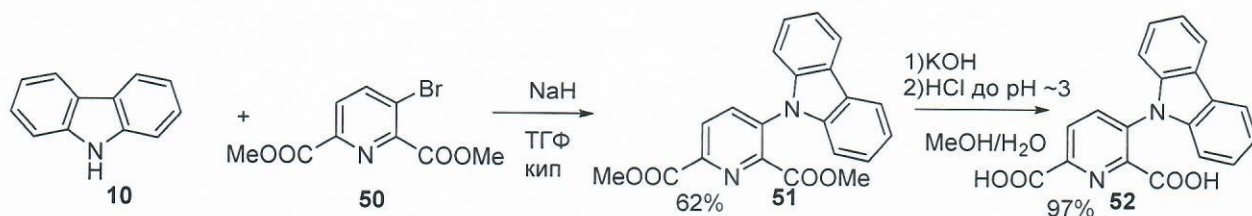
незначительными изменениями. Карбазолы **35** и **36**, замещенные по положению 2 и 7 получали из замещенного бифенила.

Для получения целевых карбазолзамещенных пиридин-2,6-дикарбоновых кислот проводили замещение хлора в пиридине **37** действием карбазолов **10**, **32-36** в присутствии гидрида натрия в сухом ТГФ. После нагревания суспензии до изменения окраски раствора на светло-бежевый, методом хроматографии фиксировалась неполная конверсия исходных карбазолов **10**, **32-36** и полное отсутствие дипиколината **37**. Побочными продуктами, зафиксированными хроматографией и по ЯМР спектрам, являются метилированный по азоту карбазол **11**, а также частично деметилированный продукт **38a**. Очистка целевых соединений производилась колоночной хроматографией с использованием хлороформа в качестве элюента. Выходы продуктов **38-41** после разделения составили от 40 до 80%. Соединения 2,7-замещенного ряда **42** и **23** очищались перекристаллизацией из смеси MeOH/CHCl₃ (1:3).

Полученные эфиры карбазолзамещенной дипиколиновой кислоты **38-43** подвергали гидролизу нагреванием в смеси метанол/вода с гидроксидом калия с последующим подкислением. Карбазолилзамещенные пиридин-2,6-дикарбоновые кислоты **44-49** образуются с высокими выходами (94-97%).



Для оценки влияния положения заместителей на свойства веществ осуществлено получение несимметричного региоизомера соединения **44** 3-карбазолилдипиколиновой кислоты **52**. Исходное бромпроизводное **50** получали из 2,6-лутидина. Нуклеофильное замещение и последующий гидролиз эфира **51** выполняли аналогично описанному выше для симметричных систем.



Люминесцентно-спектральные свойства. Для 3,6-замещенных карбазольных производных ДПК **45-47** характерно наличие более длинноволновых максимумов (350-360 нм) по сравнению с незамещенным производным **44** (335 нм) и 2,7-замещенными производными **48-49** (300-320 нм). Образование комплекса с Tb³⁺ характеризуется батохромным сдвигом максимумов поглощения и одновременным возрастанием оптической плотности обоих соединений.

Изучение люминесценции показало, что наибольшую интенсивность демонстрирует комплекс производного **44** с Tb³⁺, имеющий максимум возбуждения около 340 нм. Введение групп по 3 и 6 положениям – трет-бутильной **45** и фенильной **47** - сдвигает максимум возбуждения в область 350-360 нм, одновременно наблюдается снижение интенсивности люминесценции в несколько раз. Для комплексов с Tb³⁺ метоксильных производных **46**, **48** и 2,7-дифенильного производного **49** характерно полное отсутствие люминесценции в водных растворах. Несимметричное карбазольное производное дипиколиновой кислоты **52** демонстрирует снижение люминесцентных характеристик комплекса с Tb³⁺ в ~100 раз.

Рассчитанный относительный квантовый выход для комплекса **44** с ионом тербия составляет около 25%, для сравнения незамещенная ДПК демонстрирует квантовый выход на уровне 21% ($\lambda_{\text{возб}} = 275$ нм).

ВЫВОДЫ

1. Разработаны препаративные методы получения новых представителей N-замещенных фторсодержащих тетракетонов на основе карбазола, содержащих заместители донорного и акцепторного характера. Усовершенствована методика синтеза этих соединений по Кляйзену, заключающаяся в применении гидрода лития в тетрагидрофуране и приводящая к препаративным выходам соединений.
2. Показано, что N-замещенные фторсодержащие тетракетоны на основе карбазола эффективно сенсбилизируют ион европия в сравнении с известными

примерами ди- и тетракетонов ароматического и гетероароматического рядов. При этом введение электронодонорных заместителей к азоту карбазольного фрагмента увеличивает интенсивность люминесценции и время жизни люминесцентного состояния образующихся комплексов с Eu^{3+} в сравнении с известными примерами. Возбуждение комплексов осуществляется в области 380-390 нм, и по своим люминесцентно-спектральным свойствам они могут быть использованы в качестве реагентов для серийного клинического иммуноанализа.

3. По двухстадийной методике синтезирован ряд новых фторсодержащих енаминонов на основе бензофурана. Выявлены различия в региоселективности при получении промежуточных бензофуранилтрифторметилгалогененонов реакциями бензофуранилтрифторметил- β -дикетона с хлористым тиоилом и с трибромидом фосфора: образование преимущественно α - или γ -галогензамещенных региоизомеров, соответственно. Региоселективность этих процессов позволяет с удовлетворительными выходами осуществлять целевой синтез как α -, так и γ -енаминонов.
4. Изучение люминесценции фторсодержащих енаминонов на основе бензофурана показало, что все они образуют комплексы с Eu^{3+} , однако люминесценция этих комплексов существенно затухает. Возможной причиной снижения уровня люминесценции может являться увеличение сродства комплексов к воде в сравнении с комплексами β -дикетонов. Судя по спектральным данным, комплексы енаминонов подвергаются гидролитическим превращениям и реорганизируются в комплексы фторированного β -дикетона.
5. Оценена возможность использования N-спейсерсодержащих тетракетонов карбазольного типа в качестве реагентов для иммуноанализа с временным разрешением. Эти соединения образуют длительно и интенсивно люминесцирующие комплексы с Eu^{3+} , обладают повышенной устойчивостью во времени (в сравнении с незамещенным карбазолсодержащим тетракетоном). Показано, что на их основе возможно создание иммунореагентов с биомолекулярным мечением, а также флуоресцирующих нанодисперсий, которые по своим характеристикам имеют перспективы использования в

биологическом микроанализе иммунофлуоресцентного типа с временным разрешением.

6. Получены новые представители комплексонов - карбазолзамещенные пиридин-2,6-дикарбоновые кислоты симметричного и несимметричного строения. Комплексы этих соединений с Tb^{3+} демонстрируют удовлетворительные квантовые выходы и люминесцентные характеристики, определяющие возможность одновременного применения с комплексами других лантанидов (например, Eu^{3+}) в мультиплексном иммунофлуоресцентном анализе с временным разрешением заболеваний и патогенов.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Пугачев Д.Е., Осин Н.С., Васильев Н.В. Синтез маркера для иммунофлуоресцентного анализа: N_1 -(*n*-изотиоцианатобензил)-диэтилентриамин- N_1, N_2, N_3, N_3 -тетрауксусной кислоты // Вестник Московского государственного областного университета. Сер. Естественные науки. – 2017. – №3. – С. 51.
2. Pugachov D.E., Kostryukova T.S., Zatonsky G.V., Vatsadze S.Z., Vasil'ev N.V. Fluorinated tetraketone derivatives of N-substituted carbazoles and their Eu(III) complexes for fluorescence immunoassay // Chem. Heterocycl. Compd. – 2018. – № 5 (54). – P. 528.
3. Pugachyov D.E., Kostryukova T.S., Ivanovskaya N.P., Lyamin A.I., Romanov D.V., Moiseyev S.V., Zatonsky G.V., Osin N.S., Vasilyev N.V. Fused fluorinated bis- β -diketones and luminescent-spectral properties of their complexes with europium // Russ. J. Gen. Chem. – 2019. – № 5 (89). – P. 965.
4. Pugachov D.E., Zatonsky G.V., Vasil'ev N.V. Synthesis of fluorine-containing ligands of benzofuran type and properties of their complexes with europium (III) in aqueous solutions // Fluorine notes: – 2019. – № 4 (125). – P. 9.
5. Пугачёв Д.Е., Бакиев А.Н., Кострюкова Т.С., Шкляева Е.В., Васильев Н.В. Синтез *N*-арилзамещенных фторированных тетракетонов на основе карбазола для иммунофлуоресцентного анализа // International Congress on Heterocyclic Chemistry “KOST-2015” – М.: МГУ, 2015 – С. 250.

6. Пугачёв Д.Е., Кострюкова Т.С., Васильев Н.В., Затонский Г.В. Синтез фторированных енаминонов и их спектральные свойства в присутствии ионов европия // Успехи синтеза и комплексообразования тезисы докладов I Всероссийской молодёжной школы-конференции. – М.: РУДН, 2016. – С. 66.
7. Пугачёв Д.Е., Кострюкова Т.С., Васильев Н.В. Синтез N-арилзамещенных фторированных бис-β-дикетонов на основе карбазола для иммунофлуоресцентного анализа биозагрязнений // Актуальные проблемы биологической и химической экологии. – М.: ИИУ МГОУ, 2016. – С. 279.
8. Пугачёв Д.Е., Логинова О.Д., Грищенко А.С. Фторированные N-замещенные карбазольные бис-β-дикетоны // Материалы IX научной конференции молодых ученых “Инновации в химии: достижения и перспективы. Ломоносов – 2018”. – М.: издательство «Перо», 2018. – С. 668.
9. Логинова О.Д., Грищенко А.С., Пугачёв Д.Е. Люминесцирующие нанодисперсии органического и силикатного типов для иммунофлуоресцентного медико-биологического анализа // Материалы IX научной конференции молодых ученых “Инновации в химии: достижения и перспективы. Ломоносов – 2018”. – М.: издательство «Перо», 2018.
10. Пугачев Д.Е., Кострюкова Т.С., Затонский Г.В., Осин Н.С., Васильев Н.В. Новые гетероциклические реагенты для иммунофлуоресцентного медико-биологического анализа // Материалы IX всероссийской научно-практической конференции с международным участием "Экология родного края: проблемы и пути их решения - 2019". – Киров: ВятГУ, 2019, с. 98.