

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ  
ИНСТИТУТ ЭЛЕМЕНТООРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ им. А.Н. НЕСМЕЯНОВА  
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

---

На правах рукописи

ПОЛЯКОВА АННА СЕРГЕЕВНА

**РАЗРАБОТКА ОПТИЧЕСКИХ ХЕМОСЕНСОРОВ НА ОСНОВЕ МОНО-  
И БИСХРОМОФОРНЫХ СИСТЕМ НА КАТИОНЫ РТУТИ И СЕРЕБРА В  
ВОДНЫХ РАСТВОРАХ И КЛЕТОЧНЫХ СРЕДАХ**

1.4.3. – Органическая химия

1.4.4. – Физическая химия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Москва – 2026

Работа выполнена в лаборатории Фотоактивных супрамолекулярных систем Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова Российской академии наук (ИНЭОС РАН).

Научные руководители:

Панченко Павел Александрович, доктор химических наук, доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории фотоактивных супрамолекулярных систем ИНЭОС РАН.

Федорова Ольга Анатольевна, доктор химических наук, профессор, заведующая лабораторией Фотоактивных супрамолекулярных систем ИНЭОС РАН.

## Оглавление

Список основных сокращений и обозначений .....	4
1. Введение .....	6
2. Литературный обзор.....	12
2.1 Монохромовые ратиометрические катионные сенсоры .....	17
2.1.1 Ратиометрические хемосенсоры, функционирующие на основе механизма внутримолекулярного переноса заряда (ICT) .....	17
2.1.2 Ратиометрические PET-сенсоры.....	29
2.1.3 Ратиометрические ESIPT-сенсоры .....	37
2.2 Бисхромовые ратиометрические катионные сенсоры .....	42
2.2.1. Бисхромовые сенсоры, в которых модуляция эффективности RET достигается за счет изменения степени перекрытия спектральных полос.....	46
2.2.2. Бисхромовые сенсоры, в которых модуляция эффективности RET достигается за счет изменения квантового выхода PET-флуорофора.....	63
2.2.3 Ратиометрические ТВЕТ-сенсоры .....	67
2.3. Выводы из анализа литературных данных.....	73
3. Обсуждение результатов.....	76
3.1. Синтез соединений .....	82
3.2. Изучение спектрально-люминесцентных свойств и комплексообразования монохромовых сенсоров в растворах и живых средах.....	90
3.3. Изучение спектрально-люминесцентных свойств и комплексообразования RET-систем <i>типа 1</i> в растворах и живых средах .....	107
3.3. Изучение спектрально-люминесцентных свойств и комплексообразования RET-систем <i>типа 2</i> в растворах и живых средах .....	129
4. Экспериментальная часть.....	144
4.1 Синтез соединений .....	147
5. ВЫВОДЫ.....	172
6. Список использованной литературы .....	174
7. Список публикаций автора по теме диссертации.....	195

## Список основных сокращений и обозначений

ВЗМО – Высшая занятая молекулярная орбиталь

д – Дублет

ДИПЭА – Диизопропилэтиламин

ДМСО – Диметилсульфоксид

ДМФА – *N,N*-Диметилформаид

ИК – Инфракрасный

ИЭР – Ионизация при электрораспылении

КЛСМ – Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия

м – Мультиплет

м.д. – Миллионная доля, единица химического сдвига в спектрах ядерного магнитного резонанса

НСМО – Низшая свободная молекулярная орбиталь

ПЗ – Перенос Заряда

РСА – Рентгеноструктурный анализ

с – Синглет

т – Триплет

ТГФ – Тетрагидрофуран

ТСХ – Тонкослойная хроматография

УФ – Ультрафиолетовый

ХД – Хромофор Донор

ХА – Хромофор Акцептор

ЭА – Электроноакцепторный

ЭД – Электронодонорный

ЭДТА – Этилендиаминтетрауксусная кислота

ЯМР – Ядерный магнитный резонанс

*A* – Оптическая плотность

BODIPY – *англ.*, «Boron-Dipyrromethene», хромофор, представляющий собой борфторидный комплекс дипиррометена

COSY – *англ.*, Correlation Spectroscopy, двумерная гомоядерная корреляционная спектроскопия

*C* – Молярная концентрация

ESIPT – *англ.*, Excited state intramolecular proton transfer, внутримолекулярный перенос протона в возбужденном состоянии

FRET – *англ.*, Förster Resonance Energy Transfer, резонансный перенос энергии по механизму Ферстера

HMBC – *англ.*, Heteronuclear Multiple-Bond Correlation spectroscopy, двумерная гетероядерная корреляционная спектроскопия через несколько связей

HSQC – *англ.*, Heteronuclear Single-Quantum Correlation spectroscopy, гетероядерная корреляционная спектроскопия через одну химическую связь

*I* – Интенсивность флуоресценции

*in vitro* – лат. «в стекле», в искусственных условиях вне организма

*in vivo* – лат. «в (на) живом», в условиях эксперимента на живом организме

*J* – Константа спин-спинового взаимодействия; Интеграл перекрывания спектра поглощения хромофора-акцептора и спектра флуоресценции хромофора-донора

*K* – Константа устойчивости комплекса

*L* – Лиганд

*M* – Катион металла; Единица измерения концентрации (моль/л)

*m/z* – Отношение массы к заряду (в масс-спектрах)

ICT – *англ.*, Intramolecular Charge Transfer, внутримолекулярный перенос заряда

PET – *англ.*, Photoinduced Electron Transfer, фотоиндуцированный перенос электрона

RET – *англ.*, Resonance Energy Transfer, Резонансный перенос энергии

ТВЕТ – *англ.*, Through-Bond Energy Transfer, передача энергии через связь

ТИСТ – *англ.*, Twisted Intramolecular Charge Transfer, «скрученное» состояние с переносом заряда

*T* – Температура в шкале Цельсия

$\delta$  – Химический сдвиг

$\epsilon$  – Диэлектрическая проницаемость; Коэффициент экстинкции

$\lambda$  – Длина волны

$\phi$  – Квантовый выход флуоресценции

## 1. Введение

### Актуальность темы и степень ее разработанности

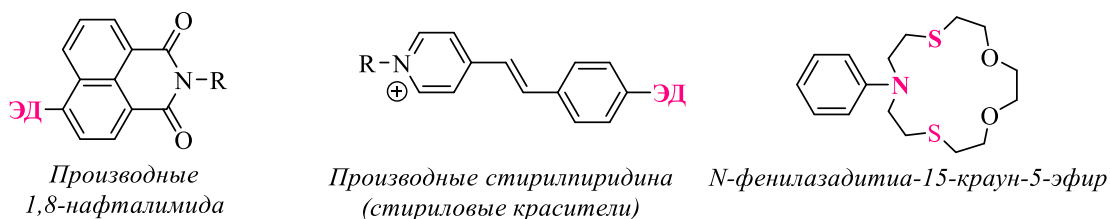
Детектирование катионов тяжелых и переходных металлов в объектах окружающей среды и биологических системах представляет собой важную техническую задачу. Несмотря на то, что ионы некоторых *d*-элементов участвуют в физиологических процессах в организме и входят в состав ферментов различного действия, в подавляющем большинстве случаев даже при относительно низких концентрациях для них характерен токсический эффект [1; 2]. Одними из наиболее распространенных неорганических токсикантов являются соединения ртути. Обладая способностью блокировать сульфгидрильные группы (SH) тиоловых ферментов, катион  $\text{Hg}^{2+}$  нарушает нормальное функционирование клеток [3]. При попадании в морскую среду  $\text{Hg}^{2+}$  трансформируется микроорганизмами в катион метилртути (II)  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ , форму, которая отличается высокой нейротоксичностью и способностью к биоаккумуляции [4]. Накапливаясь, в организмах промысловых рыб, «метилртуть» достигает вершины пищевой цепи, что в итоге может представлять угрозу для здоровья человека [5].

Соединения серебра используются в медицине в качестве антисептиков, в различных областях промышленности (электроника, производство зеркал и оптики, фотография) и повседневной жизни (столовые приборы, фильтры для воды) [6; 7]. Попадание избыточных количеств  $\text{Ag}^+$  в организм вызывает отравления. В условиях *in vivo* ионы серебра вытесняют  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Zn}^{2+}$  в гидроксиапатите костей, а также проявляют токсичность за счет связывания с различными метаболитами через amino- и карбоксильные группы и, подобно соединениям ртути, за счет инактивации тиоловых ферментов. В результате могут иметь место повреждения головного мозга, нервов и нарушениям иммунной системы [8]. Для определения низких концентраций катионов металлов большую популярность получили методы оптической электронной спектроскопии, в частности спектро-флуориметрический метод [9; 10]. Для проведения такого анализа необходимым является наличие органических реагентов, молекулы которых содержат рецептор, селективно взаимодействующий с субстратом, и сигнальный хромофорный фрагмент, способный изменять свои спектральные характеристики в результате связывания рецептором иона металла [11–14]. Новым направлением в области создания ион-активных молекулярных устройств подобного типа (флуоресцентных хемосенсоров) является разработка бисхромофорных комплексов [15]. Последние обладают рядом преимуществ для использования в качестве флуоресцентных индикаторов в биологических исследованиях [16]. Сочетание двух фотоактивных молекулярных фрагментов в структуре сенсора позволяет добиться большого различия в длинах волн возбуждения и испускания

за счет резонансного переноса энергии (RET, *англ.* Resonance Energy Transfer) [17] между хромофорами, что является важным для регистрации отклика на комплексообразование методом конфокальной флуоресцентной микроскопии, а также внутренней калибровки генерируемого оптического сигнала [18; 19]. Последнее обстоятельство открывает возможность для определения концентрации катиона ратиометрическим методом, который может быть реализован в условиях, когда содержание самого реагента-индикатора в среде неизвестно (например, при проведении анализа в живых клетках) [20–22]. Следует отметить, что, несмотря на достаточно большой объем публикаций по флуоресцентным хемосенсорам на катионы металлов [23; 24] число описанных в литературе систем, сочетающих высокую чувствительность и селективность по отношению к определяемому субстрату с возможностью проведения ратиометрических измерений в сильно «конкурентной» водной среде относительно невелико.

### **Цели и задачи исследования**

Целью данного диссертационного исследования является разработка моно- и бисхромофорных ратиометрических RET-хемосенсоров для определения катионов ртути и серебра в водных растворах, а также оценка возможности использования полученных соединений для проведения количественного анализа катионов ртути в условиях *in vitro* (в живых клетках). В качестве базового хромофора были выбраны флуоресцентные производные имида нафталевой кислоты (1,8-нафталимида). Данный тип соединений хорошо зарекомендовал себя в последние годы в качестве оптической платформы для создания молекулярных и супрамолекулярных устройств различного типа, в том числе оптических хемосенсоров. Вторым компонентом RET-систем были донорно-акцепторные красители ряда стирилпиридина, которые часто применяются в качестве флуорофоров в биологических исследованиях, хорошо проникают в клетки и характеризуются относительно длинноволновым поглощением и флуоресценцией. Последнее обстоятельство позволяет рассматривать их как хромофоры-акцепторы (ХА) энергии электронного возбуждения в RET-парах. Производные 1,8-нафталимида в работе выступали в основном в роли хромофоров-доноров (ХД). В качестве рецептора для создания ратиометрических хемосенсоров был выбран азадита-15-краун-5-эфир, который, по литературным данным обладает достаточно узкой селективностью (связывает  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ , в то время как координация с катионами щелочных и щелочно-земельных металлов не наблюдается).



**Рис. 1.** Структура фотоактивных фрагментов и рецептора, которые планируется использовать в качестве донорных и акцепторных хромофоров в составе RET-хемосенсоров.

Кроме того, целью работы также было получение и исследование монохромофорных хемосенсоров, являющихся составными компонентами RET-пар. Данные соединения использовались для сравнительного анализа спектральных характеристик более сложных RET-систем и были двух видов в зависимости от механизма возникновения оптического сигнала при комплексообразовании: RET-сенсоры (механизм RET – *англ.* Photoinduced Electron Transfer – фотоиндуцированный перенос электрона), в которых рецептор присутствовал в составе N-арильного фрагмента нафталимидного ядра и ICT-сенсоры (механизм ICT – *англ.* Intramolecular Charge Transfer – внутримолекулярный перенос заряда), в которых рецептор был сопряжен с  $\pi$ -системой хромофора (нафталимида или стирилпиридина).

В соответствии со сказанным в работе были поставлены следующие конкретные задачи.

1. Синтез монохромофорных производных стирилпиридина и 1,8-нафталимида, содержащих рецепторную азадитиа-15-краун-5-эфирную группу.
2. Разработка метода синтеза бисхромофорных ратиометрических RET-хемосенсоров на основе 1,8-нафталимида, стирилпиридина и азадитиа-15-краун-5-эфира, различающихся по способу соединения рецептора с фотоактивными остатками.
3. Изучение спектрально-люминесцентных характеристик и комплексообразования монохромофорных RET- и ICT-хемосенсоров в водном растворе.
4. Изучение катинозависимых спектральных свойств бисхромофорных RET-хемосенсоров.
5. Анализ способности полученных бисхромофорных соединений проникать в клетки, накапливаться в определенных типах клеточных органелл и связывать катионы  $Hg^{2+}$  во внутриклеточной среде, продуцируя ратиометрический флуоресцентный отклик.

### Научная новизна

В настоящей диссертационной работе впервые было продемонстрировано использование медь(I)-катализируемой клик-реакции 1,3-диполярного азид-алкинового циклоприсоединения для синтеза конъюгатов производных 1,8-нафталимида и стироловых красителей.

Впервые было показано, что монохроматорные хемосенсоры на основе 1,8-нафталимида и стирилпиридина, содержащие азитиа-15-краун-5-эфирный рецептор, способны селективно связывать катионы ртути (II) и серебра в водных буферных растворах при pH 4.5–7.5 с образованием комплексов состава металл – лиганд 1:1, демонстрируя оптический отклик по РЕТ- или ИСТ-механизму. В последнем случае изменения в эмиссионном спектре зависят от типа используемого хромофора: краунсодержащий стирилпиридин демонстрирует разгорание флуоресценции при связывании с  $Hg^{2+}$ , а производное нафталимида с рецептором в составе заместителя при атоме углерода С-4 нафталинового ядра – тушение флуоресценции.

Обнаружено, что в полученных бисхромофорных хемосенсорах на основе РЕТ-пары «нафталимид – стирилпиридин» с высокой эффективностью реализуется процесс резонансного переноса энергии между фотоактивными фрагментами. При этом в бисхромофоре, в котором рецептор присутствует в составе *N*-арильного заместителя при имидном атоме азота нафталимидного ядра, остаточная эмиссия ХД может быть использована для регистрации ратиометрического отклика как в водных растворах, так и в живых клетках. Кроме того, обнаружено, что подсоединение нафталимидного фрагмента к стирилпиридину существенно изменяет характер внутриклеточного распределения последнего, что положительно сказывается на сенсорных свойствах.

Предложены протоколы определения концентрации содержащегося в клетке катиона  $Hg^{2+}$  на основе изменений флуоресцентных характеристик сенсора, регистрируемых с использованием конфокального флуоресцентного микроскопа.

### **Практическая и теоретическая значимость**

Полученные дитиакраун-эфирные производные 1,8-нафталимида являются селективными флуоресцентными хемосенсорами по отношению к катионам ртути (II) и серебра (I) в водном растворе на уровне их ПДК. С точки зрения синтеза предложенный модульный принцип построения бисхромофорных систем позволяет легко варьировать как фотоактивные компоненты хемосенсора, так и рецепторную составляющую. В перспективе это может быть использовано для расширения круга детектируемых субстратов, а также для тонкой подстройки фотофизических свойств бисхромофорного комплексона под конкретную аналитическую задачу. Кроме того, практическая значимость работы заключается в том, что были предложены методики детектирования катионов ртути (II) в живых клетках не только на качественном уровне, но отработаны протоколы количественного определения.

## **Методология и методы диссертационного исследования**

Методология и методы диссертационного исследования основаны на анализе литературных данных, разработке методов синтеза из коммерчески доступных реагентов. Полученные соединения были подробно охарактеризованы данными физико-химических методов установления строения и состава веществ, таких как ЯМР-спектроскопия на ядрах  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  (в том числе двумерная), масс-спектрометрия, элементный анализ. Для изучения комплексообразующих, фотофизических и фотобиологических свойств моно- и бисхромофорных систем широко использовалась оптическая электронная спектроскопия поглощения и испускания, а также конфокальная флуоресцентная микроскопия. Анализ результатов проводился с привлечением данных квантово-химических расчетов.

## **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Разработка метода синтеза ранее неизвестных моно- и бисхромофорных систем на основе 1,8-нафталимида и стирилпиридина, содержащих в качестве рецептора фрагмент *N*-фенилазидитиа-15-краун-5-эфира.
2. Использование концепции флуоресцентного RET-хемосенсора с «OFF→ON»-типом отклика для детектирования катионов ртути (II) и серебра в водном растворе на уровне их ПДК.
3. Использование концепции ратиометрических флуоресцентных бисхромофорных RET-сенсоров для детектирования катионов ртути (II) в водных растворах и живых клетках.
4. Анализ возможности увеличения контраста в переключении флуоресцентного сигнала RET-хемосенсоров при комплексообразовании с катионом за счет подбора донорных и акцепторных хромофорных фрагментов.

## **Личный вклад автора**

Автор диссертации проводил анализ литературных данных, участвовал в обсуждении задач, решаемых в диссертационной работе, подготовке и проведении спектроскопических экспериментов, разработке методик синтеза новых соединений, интерпретации полученных результатов и их обобщении, формулировке основных научных выводов, а также в написании научных публикаций и представлении докладов по теме диссертации на конференциях различного уровня.

## **Благодарности**

Данная работа выполнена при финансовой поддержке РФФ № 20-73-10186, № 20-73-10186-П, № 18-73-00118. Автор выражает особую благодарность д.х.н. Панченко П. А., д.х.н. Федорову Ю. В., д.х.н. Федоровой О.А. за участие в постановке экспериментов и

обсуждении полученных результатов на разных этапах работы; к.х.н. Устимовой М. А. за предоставленные стиральные красители в синтетической части работы; к.х.н. Павловой М. А. и к.х.н. Шукиной А. А. за регистрацию спектров ЯМР и масс-спектров; н.с. Ефременко А. В. и д.б.н. Феофанову А. В. за проведение экспериментов на клетках.

### **Достоверность полученных результатов**

Достоверность полученных в работе результатов следует из надежного установления структур полученных в работе соединений совокупностью физико-химических методов анализа; отсутствия противоречий между выводами, сделанными в результате выполнения работы, и известными литературными данными; экспертной оценки рецензентов высокоцитируемых журналов, в которых были опубликованы результаты данной работы.

### **Апробация работы**

По материалам диссертации опубликовано 9 статей (в научных изданиях, рекомендованных ВАК) и 8 тезисов докладов. Основные результаты работы были представлены на следующих конференциях: The 8th International conference on chemistry, structure and function of biomolecules (Minsk, Belarus, 2024); Всероссийская конференция по люминесценции LUMOS-2024 (Москва, Россия, 2024); Международная конференция по химии «Байкальские чтения-2023» (Иркутск, Россия, 2023); XXVI Всероссийская конференция молодых учёных-химиков (Нижний Новгород, Россия, 2023); XIX Международная конференция «Спектроскопия координационных соединений» (Туапсе, Россия, 2022); The XII International Conference on Chemistry for Young Scientists «MENDELEEV 2021» (Санкт-Петербург, Россия, 2021); VII Международная конференция «Супрамолекулярные системы на поверхности раздела» (Туапсе, Россия, 2021); International Conference «Chemistry of Organoelement Compounds and Polymers 2019» (Москва, Россия, 2019).

### **Объем и структура работы**

Диссертация общим объемом 197 страниц состоит из вводной части, содержащей общую характеристику работы, литературного обзора, обсуждения полученных результатов, экспериментальной части, выводов, списка литературы, списка основных сокращений и обозначений, списка публикаций автора по теме диссертации и содержит 44 схемы, 5 таблиц, 115 рисунков. Список литературы включает 250 наименований (с учетом собственных публикаций автора). Нумерация схем, рисунков, уравнений и таблиц в разделах 2 (Литературный обзор), 3 (Обсуждение результатов) и 4 (Экспериментальная часть), а также нумерация соединений в разделах 2 и 3 принята отдельной.

## 2. Литературный обзор

Существует несколько традиционных спектроскопических методов для обнаружения катионов металлов. К ним относят атомно-абсорбционную спектроскопию, масс-спектроскопию с индуктивно-связанной плазмой, а также электрохимические методы [25; 26]. Атомно-абсорбционная спектроскопия представляет собой чувствительный метод элементного анализа, позволяющий определять содержание металлов в различных образцах на уровне нанограмм [27]. Однако есть ряд ограничений, снижающих его производительность. Так отклик часто нарушается множественными физическими или химическими реакциями в распылителе, что может привести к большей потере атомов аналита по сравнению с эталонным раствором. Кроме того, матрица образца может производить летучие или стабильные молекулярные формы аналита, что влияет на сигнал поглощения [28]. Также может требоваться предварительная обработка образцов путем минерализации или применения метода селективной экстракции, в процессе которых могут возникнуть ошибки из-за неполной минерализации или экстракции [29].

Масс-спектроскопия с индуктивно связанной плазмой (Inductively coupled plasma mass spectrometry, ICP-MS) – популярный метод элементного и изотопного анализа, заключающийся в расщеплении молекулы на атомы, которые ионизируются в плазме с масс-спектрометрическим обнаружением [30]. С помощью ICP-MS можно определять почти все элементы кроме водорода, гелия, азота, кислорода, фтора, неона и аргона, которые являются важными в биохимических исследованиях. Стоит отметить, что в данном методе используется сложная и дорогостоящая аппаратура, а в процессе работы расходуется большое количество аргона (более 15 л/мин), что представляет собой значительные эксплуатационные затраты [30]. Помимо всего прочего, многие биологические исследования являются затруднительными из-за низкой эффективности транспортировки клеточных образцов в прибор. Неполная транспортировка происходит даже в современной аппаратуре при наличии в ней высокоэффективной системы ввода образцов [31]. Эффективность транспортировки сильно зависит от типа и размера клеток. Большинство клеток млекопитающих являются достаточно крупными и имеют диаметр около 8–30 мкм, удаляясь в обычных распылительных камерах приборов MS. Фундаментальное исследование анализа отдельных клеток в 1994 году показало, что эффективность транспортировки клеток млекопитающих составила всего 0.1% [32]. В свою очередь, электрохимические методы детектирования привлекают большое внимание современных исследователей из-за простоты эксплуатации, низкой стоимости, высокой скорости реакции и легкости онлайн-мониторинга [33; 34].

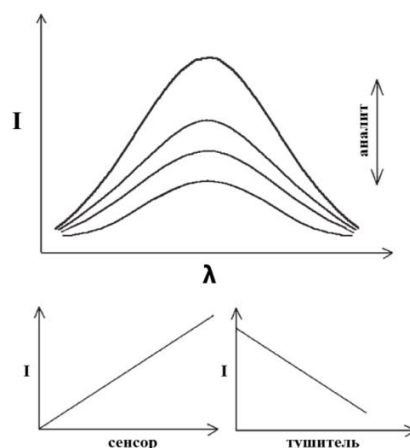
Электрохимический анализ – это аналитический метод, использующий основные принципы и экспериментальные методы электрохимии для определения состава и содержания целевых веществ на основе их электрохимических свойств [35; 36]. Однако, поскольку электрохимическое и фотоэлектрохимическое детектирование все еще находится в зачаточном состоянии, эти аналитические методы могут сталкиваться с некоторыми проблемами. В настоящее время для большинства электрохимических и фотоэлектрохимических методов селективность обнаружения низкая. В частности, некоторые методы не могут выполнять качественный анализ нескольких веществ, а также из-за своей низкой чувствительности редко используются для количественного анализа следовых концентраций искомых агентов [37]. В дополнение ко всему сейчас остро стоит задача создания нового типа электрохимического датчика, недорогого и пригодного для вторичной переработки, что сделало бы метод более экологичным и менее затратным для практического использования [37]. Подводя итог, перечисленные методы детектирования не всегда могут быть широко использованы из-за ограничений реализации, высокой стоимости, длительного времени обработки, сложной аппаратуры и низкой селективности.

По сравнению с традиционными аналитическими методами, методы оптической электронной спектроскопии представляют собой перспективный подход к обнаружению ионов металлов за счет относительной простоты проведения эксперимента, высокой чувствительности по отношению к детектируемым субстратам и низкой стоимости флуоресцентных реагентов [38; 39]. Одним из важнейших параметров детектирования является высокая чувствительность, особенно необходимая, если аналит присутствует в образце в следовых количествах [40; 41]. В настоящее время уже существуют такие флуоресцентные агенты, способные достигать пикомолярного диапазона обнаружения [42–46]. Также данный метод позволяет получать самый быстрый отклик, который развивается в масштабе времени жизни флуоресценции ( $10^{-8}$ – $10^{-12}$  с). Неразрушающий и неинвазивный характер флуоресцентных методов позволяет использовать их для решения биологических и медицинских задач [47–49]. Большой прогресс в данном направлении был достигнут благодаря созданию флуоресцентных сенсоров, представляющих собой небольшие молекулы, которые можно использовать для качественного и количественного определения аналитов высокоселективным и чувствительным образом [50; 51].

Большинство флуоресцентных сенсоров имеют схожее строение и, как правило, сконструированы из следующих принципиально важных частей: рецептора, способного селективно связываться с субстратом и сигнального фрагмента, меняющего свои спектральные характеристики при комплексообразовании [52]. Роль рецептора заключается в быстром связывании анализируемого катиона. В качестве рецепторов

обычно используются краун-эфиры, цикламы и другие системы, содержащие атомы с неподелёнными электронными парами [53]. Функция сигнального фрагмента состоит в проявлении некоего регистрируемого отклика при связывании рецептором катиона металла. Хорошо зарекомендовали себя в этой стезе органические люминофоры на основе родамина, кумарина, порфирина, BODIPY и 1,8-нафталимида [54; 55].

В настоящее время среди флуоресцентных сенсоров превалирует механизм переключения спектрального отклика типа OFF-ON (выключение-включение) или ON-OFF (включение-выключение). Под таким переключением подразумевается изменение интенсивности сигнала в пределах одного информационного канала, то есть одной длины волны [56]. Интенсивность сигнала может увеличиваться (OFF-ON) или уменьшаться (ON-OFF) в зависимости от концентрации аналита (рис. 1). Аналитический сигнал, основанный на разгорании/тушении флуоресценции, может быть легко получен различными способами, что делает данные сенсоры очень популярными [57].



**Рис. 1.** Зависимости интенсивности сенсора типа OFF-ON/ ON-OFF от концентрации аналита.

Между тем, при одноканальных измерениях интенсивности флуоресценции, наблюдаемые изменения не могут быть количественно оценены в абсолютной шкале. Интенсивности регистрируемых спектров могут существенно отличаться в зависимости от типа прибора, источника света или чувствительности детектора. Только при измерении в точно таких же экспериментальных условиях (что является трудновыполнимой задачей) интенсивность  $I$  может быть использована для определения концентрации аналита  $[A]$  в соответствии с формулой (1), которая основана на законе действующих масс и применима для простейшего случая стехиометрии комплекса 1:1 [58]:

$$[A] = K_d \frac{I - I_{min}}{I_{max} - I} \quad (1)$$

Где  $I_{max}$  – интенсивность сенсора при полном связывании с аналитом,  $I_{min}$  измеряется как интенсивность флуоресценции без связывания аналита, а  $K_d$  – константа диссоциации. Вследствие того, что простые системы типа OFF-ON/ ON-OFF не позволяют определять

содержание аналита в условиях, когда концентрация самого сенсора неизвестна, в настоящее время остро стоит задача разработки флуоресцентных методов, способных осуществлять данное измерение. Для получения количественного результата интенсивность флуоресценции должна быть откалибрована как функция концентрации аналита [56]. Данная внутренняя самокалибровка достигается ратиометрическим методом, а сенсоры, работающие по такому принципу, называются ратиометрическими [22; 59].

В общем случае, ратиометрический отклик может быть реализован в сенсорных системах двух типов: хемосенсорах и хемодозиметрах. Хемосенсоры представляют собой детектирующие агенты, работающие посредством специфического распознавания аналита. Такое молекулярное распознавание является обратимым комплексообразованием аналит – сенсор [60]. Определение «хемодозиметр» подразумевает краситель, который распознает специфический ион посредством высокоселективной химической реакции, обычно необратимой [61; 62]. Однако такой тип сенсоров не позволяет проводить мониторинг концентрации аналита в режиме реального времени в биологических образцах. Помимо всего прочего, время химической реакции хемодозиметров с аналитом может составлять получаса до одного часа и больше [63], что является неудобным для проведения экспериментов.

Ратиометрический метод подразумевает регистрацию интенсивностей на двух длинах волн, в ходе которого хотя бы одна из них изменяется пропорционально концентрации аналита. Ратиометрия целесообразна, когда регистрируются сильные спектральные сдвиги и/или появляются новые полосы с изменением их относительной интенсивности в результате связывания сенсора с детектируемым субстратом. Таким образом, возможна внутренняя калибровка аналитического сигнала, что обеспечивает высокую чувствительность и коррекцию мешающих факторов даже при низком уровне абсолютных интенсивностей [64; 65]. Калиброванный ратиометрический сигнал позволяет получать информативную визуализацию распределения аналита, когда концентрацию зонда и его распределение в образце сложно контролировать. Благодаря данной визуализации можно анализировать концентрацию сенсора и аналита, наблюдая за изменением соотношения интенсивностей спектральных сигналов [56]. Такая ратиометрическая визуализация различных искомым реагентов в сложных биологических средах, становится очень популярной [66].

Самый простой способ получения ратиометрического сигнала – использовать второй флуоресцентный излучатель, не взаимодействующий или взаимодействующий с основным сигнальным фрагментом. В первом случае интенсивность флуоресценции реагирующего красителя  $I$  может изменяться от нуля до предельно высоких значений, в то

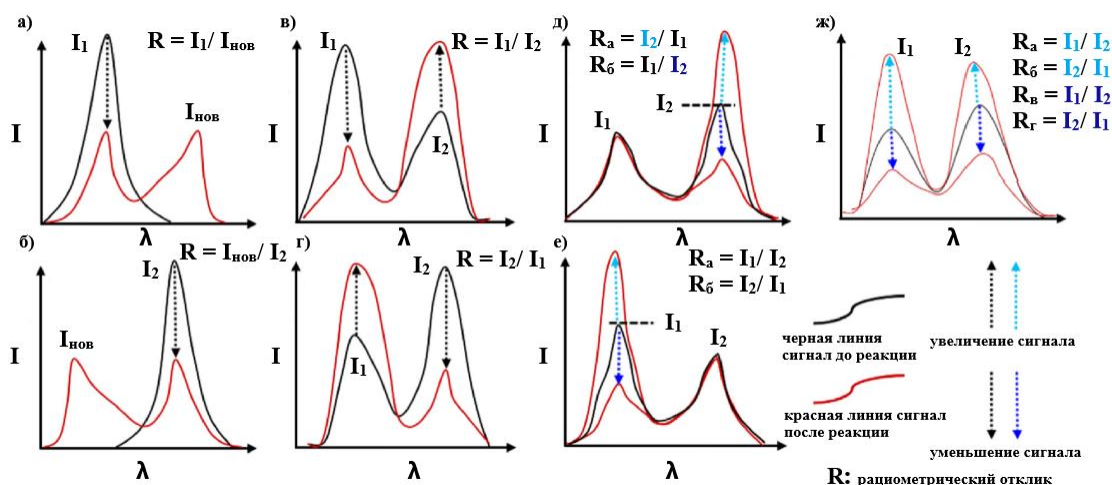
время как интенсивность референсного красителя  $I_{ref}$  остается постоянной (рис. 2). Делением числителя и знаменателя уравнения (1) на интенсивность референсного хромофора  $I_{ref}(\lambda_2)$ , измеренную в тех же условиях, но на другой длине волны ( $\lambda_2$ ) от красителя-репортера ( $\lambda_1$ ), можно получить концентрацию аналита  $[A]$  по уравнению (2), которое содержит только отношения интенсивностей  $R = I(\lambda_1) / I_{ref}(\lambda_2)$ ,  $R_{min} = I_{min}(\lambda_1) / I_{ref}(\lambda_2)$  и  $R_{max} = I_{max}(\lambda_1) / I_{ref}(\lambda_2)$  [67].

$$[A] = K_d \frac{R - R_{min}}{R_{max} - R} \quad (2)$$

Существует другой вариант, в котором вторая полоса излучения может появиться в результате внутримолекулярной или межмолекулярной реакции, происходящей с основным сигнальным хромофором. В этом случае оба излучения могут взаимно преобразовываться, одна полоса уменьшаться, а другая – увеличиваться. Далее наблюдается взаимодействие интенсивностей на двух выбранных длинах волн ( $\lambda_1$ ) и ( $\lambda_2$ ) с образованием изобестических точек (рис. 2). Если такая точка выбрана в качестве отсчетной, то можно использовать уравнение (2). В более общем случае, когда  $\lambda_2$  – это другая длина волны (например, максимум второй полосы), ратиометрический сигнал должен быть скорректирован так, чтобы он включал в себя фактор, учитывающий отношение интенсивностей свободной ( $I_f$  - free) и связанной ( $I_b$  - bond) форм на длине волны  $\lambda_2$  [67]:

$$[A] = K_d \frac{R - R_{min}}{R_{max} - R} \left[ \frac{I_f(\lambda_2)}{I_b(\lambda_2)} \right] \quad (3)$$

В настоящее время можно выделить четыре типа ратиометрического отклика (рис. 2) [68].



**Рис. 2.** Типы флуоресцентного отклика ратиометрических сенсоров. Рисунок взят и адаптирован из [68].

Интересно отметить, что вид отклика на рис. 2ж относится к редкому типу. Спектр сенсора имеет два исходных эмиссионных пика  $I_1$  и  $I_2$ . Примечательно, что после

связывания с искомым реагентом, интенсивность обоих полос демонстрирует одновременное увеличение или одновременное уменьшение. Тогда изменение отношения  $I_1/I_2$  или  $I_2/I_1$  можно рассматривать как ратиометрический отклик на аналит [68]. В общем случае вид флуоресцентного отклика определяется тем, какой фотофизический процесс реализуется в сенсоре. Можно выделить наиболее популярные механизмы, такие как резонансный перенос энергии по Фёрстеру (Forster Resonance Energy Transfer, FRET) [69], передача энергии через связь (Through-bond energy transfer, TBET) [70], фотоиндуцированный перенос электрона (Photoinduced electron transfer, PET) [71], внутримолекулярный перенос заряда (Intramolecular charge transfer, ICT) [72] и внутримолекулярный перенос протона в возбужденном состоянии (Excited state intramolecular proton transfer, ESIPT) [73].

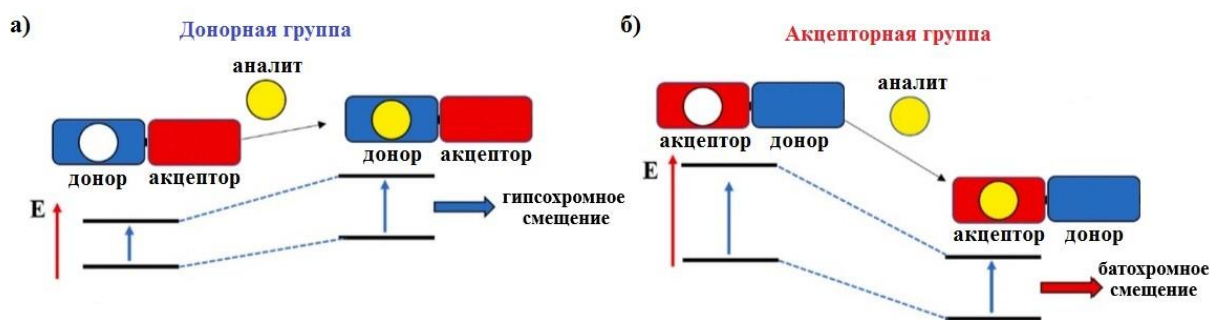
Настоящий литературный обзор посвящен рассмотрению различных механизмов возникновения спектрального отклика в ратиометрических флуоресцентных катионных хемосенсорах. На сегодняшний день большинство опубликованных обзоров построены по принципу разделения сенсоров по типу металлов [74–76] или по типу хромофоров [77–79], многие из которых не включают в себя примеры ратиометрических зондов. Вдобавок ко всему, рассмотрению конкретных механизмов образования спектрального отклика посвящено сравнительно небольшое количество работ. Структура данного литературного обзора включает отдельный раздел по каждому механизму (ICT, PET, ESIPT, RET, TBET), внутри каждого раздела рассмотрены ратиометрические сенсорные устройства на различные катионы металлов за последние десять лет.

## **2.1 Монохромофорные ратиометрические катионные сенсоры**

### **2.1.1 Ратиометрические хемосенсоры, функционирующие на основе механизма внутримолекулярного переноса заряда (ICT)**

На сегодняшний день с использованием процесса внутримолекулярного переноса заряда (Intramolecular charge transfer, ICT) было создано множество флуоресцентных соединений. Такие флуорофоры работают путем изменения в их сопряженной  $\pi$ -электронной системе электронодонорных или электроноакцепторных свойств при взаимодействии с целевым аналитом [80]. Впервые механизм внутримолекулярного переноса заряда ICT для создания катионных сенсоров предложил Валер [81]. Флуоресцентные ICT-зонды сконструированы из фотоактивного фрагмента и, сопряженной с его  $\pi$ -электронной системой, рецепторной группы. В таких системах предполагается отсутствие спейсера. В зависимости от способа соединения рецептора с хромофором будет наблюдаться батохромное или гипсохромное смещение максимумов в

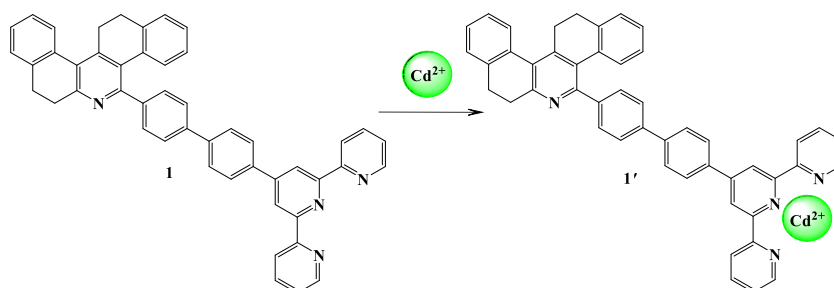
спектрах поглощения и флуоресценции (рис. 3). В случае связывания катиона с электронодонорной частью сенсора, перенос заряда затрудняется, и в спектре наблюдается гипсохромный сдвиг полосы поглощения и флуоресценции (рис. 3а) [52]. При взаимодействии аналита с электроноакцепторной частью зонда, в результате переноса заряда происходит увеличение частичного отрицательного заряда на ЭА-заместителе, что в большей степени понижает уровень энергии возбужденного состояния образующегося комплекса по сравнению с основным состоянием. В результате энергия перехода с переносом заряда уменьшается. Это сопровождается длинноволновым сдвигом максимумов спектральных полос (рис. 3б) [52]. Благодаря тому, что оптический отклик ICT-флуороионофоров характеризуется изменением положения максимума эмиссионной полосы, данный тип соединений представляет интерес для создания ратиометрических сенсоров.



**Рис. 3.** Энергетическая диаграмма, объясняющая принцип работы ICT-сенсора а) ЭД-заместитель в структуре флуорофора входит в состав рецептора б) ЭА-заместитель в структуре флуорофора входит в состав рецептора.

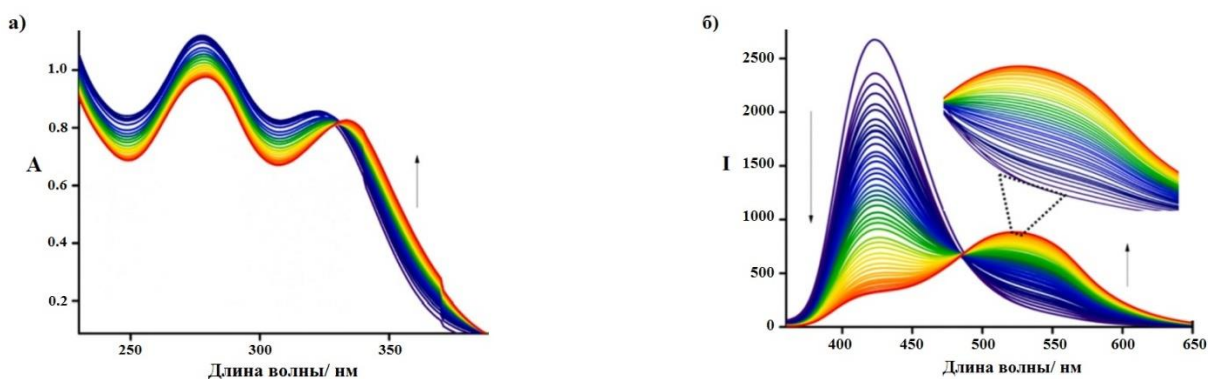
В недавнем зарубежном исследовании [82] был создан флуоресцентный сенсор **1** на основе пары фенантридин-терпиридин с расширенной сопряженной  $\pi$ -системой (схема 1), который может координироваться с ионами  $\text{Cd}^{2+}$ .

**Схема 1**



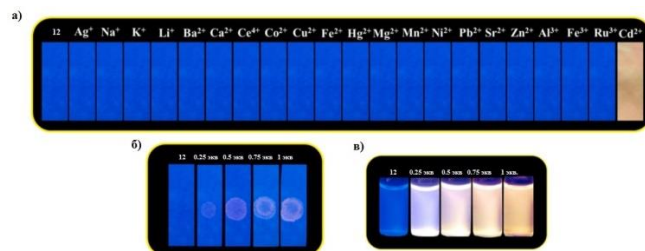
Спектр поглощения **1** имеет два максимума при 277 и 321 нм, которые авторы работы отнесли к электронным переходам в возбужденные состояния  $\pi$ - $\pi^*$  и  $n$ - $\pi^*$  соответственно. Добавление  $\text{Cd}^{2+}$  приводит к появлению нового пика при 334 нм меньшей интенсивности, смещенного в красную область (рис. 1а). При возбуждении длиной волны 334 нм в спектре флуоресценции **1** обнаруживается полоса испускания при 423 нм.

Присутствие иона  $\text{Cd}^{2+}$  индуцирует проявление нового менее интенсивного широкого пика эмиссии при 523 нм (рис. 1б) и меняет цвет испускания раствора **1** с синего на светло-оранжевый. Данное явление является результатом внутримолекулярного переноса заряда-ИСТ от фенантридина к терпиридину связанному с  $\text{Cd}^{2+}$ . Был рассчитан предел обнаружения **1**, значение которого составило  $1.181 \cdot 10^{-8}$  М. Метод Джоба подтвердил стехиометрию связывания 1:1 сенсора **1** с ионом  $\text{Cd}^{2+}$ . Также была рассчитана константа связывания  $K$  **1** с  $\text{Cd}^{2+}$  которая оказалась равной  $5.9649 \cdot 10^{-7}$   $\text{M}^{-1}$ .



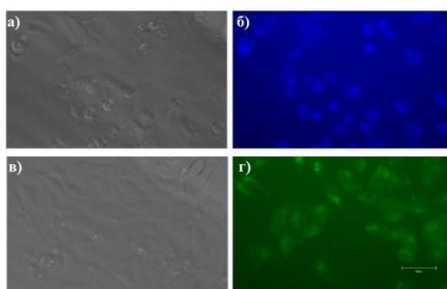
**Рис. 4.** Спектры поглощения (а) и флуоресценции (б) сенсора **1** ( $2 \cdot 10^{-5}$  М) в растворе  $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$  при различной концентрации  $\text{Cd}^{2+}$  (0-1 экв.). Рисунок взят и адаптирован из [82].

Обратимость комплексообразования **1** была исследована с помощью эмиссионной спектроскопии с добавлением  $\text{Cd}^{2+}$ , а затем пирофосфата натрия (тетраосновного). В течение четырех циклов последовательного добавления  $\text{Cd}^{2+}$  и пирофосфата натрия наблюдались красные и синие сдвиги эмиссии **1** соответственно. Результаты экспериментов показали, что **1** является пригодным сенсором для вторичного связывания с ионом  $\text{Cd}^{2+}$ . Исследования, проведенные на тест-полосках, продемонстрировали, что при добавлении катионов различных металлов, изменения цвета эмиссии не наблюдалось, тогда как тестовая бумага при контакте с  $\text{Cd}^{2+}$  показала изменение цвета флуоресценции с синего на светло-оранжевый (рис. 5). Кроме того, зонд **1** использовался для обнаружения  $\text{Cd}^{2+}$  в различных пробах воды, таких как водопроводная, дважды дистиллированная и озерная вода. Сенсор **1** показал соответствие между рассчитанным и реально добавленным количеством ионов  $\text{Cd}^{2+}$  в различных пробах воды.



**Рис. 5.** (а) Фотография, показывающая сдвиг флуоресцентного цвета **1**, вызванный добавлением ионов различных металлов к полоскам тестовой бумаги при длине волны 365 нм. (б) Фотографии флуоресценции  $\text{Cd}^{2+}$  на тест-полосках бумаги в различных концентрациях ( $2 \cdot 10^{-5}$  М) и (в) в растворе. Рисунок взят и адаптирован из [82].

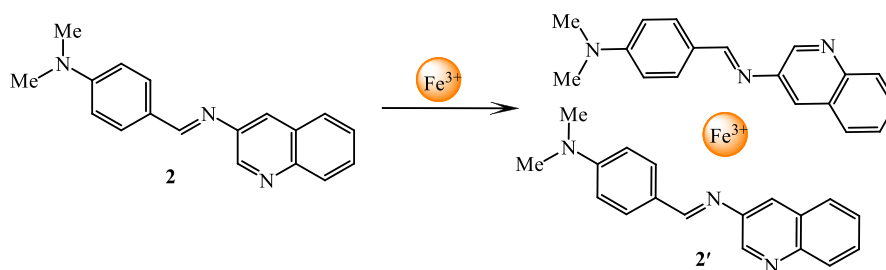
Для оценки сенсорных свойств **1** в живых клетках использовалась клеточная линия HeLa. При обработке клеток красителем **1** с помощью КЛСМ (Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия) было обнаружено, что клетки проявляют интенсивную флуоресценцию в синем канале (рис. 6б). При последовательной инкубации клеток соединением **1**, а затем  $\text{Cd}^{2+}$ , флуоресценция отображалась в зеленом канале (рис. 6г). Результаты данного исследования демонстрируют, что соединение **1** является перспективным агентом для обнаружения  $\text{Cd}^{2+}$  в живых клетках и водных объектах.



**Рис. 6.** Флуоресцентные изображения и изображения в проходящем свете клеток HeLa с сенсором **1**. В (а и в) клетки HeLa обрабатывали отдельно **1** и  $1 \cdot \text{Cd}^{2+}$ . (б, г): Флуоресцентные фотографии клеток HeLa, обработанных **1** и  $1 \cdot \text{Cd}^{2+}$ . Рисунок взят и адаптирован из [82].

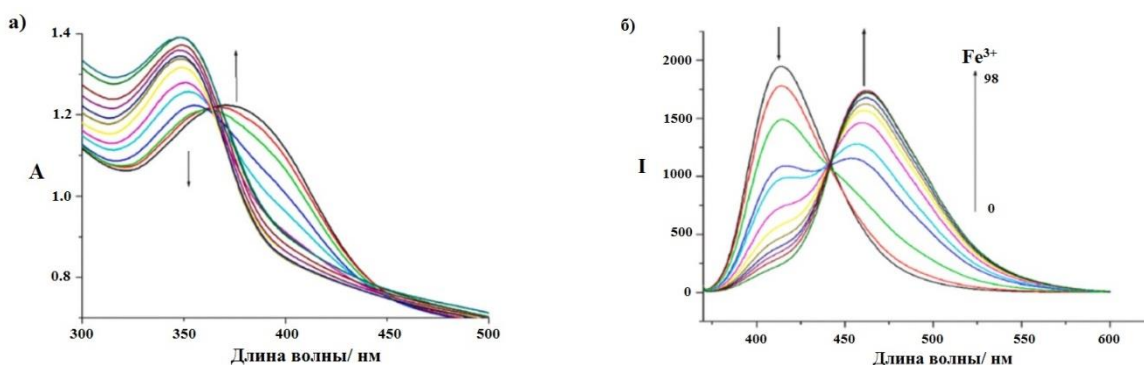
Следующий пример ратиометрического флуоресцентного ИСТ-зонда для обнаружения  $\text{Fe}^{3+}$  был показан в работе [83]. Молекула **2** представляет собой основание Шиффа, которое было синтезировано из аминоксинолина и диметиламинобензальдегида.

#### Схема 2



В УФ области спектра наблюдалась полоса поглощения при 350 нм (рис. 7а). При постепенном добавлении  $\text{Fe}^{3+}$  пик при 350 нм уменьшался, и образовывалась новая полоса при 375 нм, с четкой изобестической точкой при 368 нм, что свидетельствовало об образовании комплекса между **2** и  $\text{Fe}^{3+}$  (рис. 7а). Спектр флуоресценции свободного лиганда **2** демонстрировал широкую полосу испускания при 413 нм. С увеличением концентрации  $\text{Fe}^{3+}$  в растворе **2**, интенсивность эмиссии при 413 нм уменьшалась с одновременным возрастанием пика при 463 нм (изобестическая точка при 446 нм, рис. 7б.). На основании флуоресцентного титрования был рассчитан предел обнаружения **2** для  $\text{Fe}^{3+}$ , который оказался равным 0.4 мкМ. Константа ассоциации  $K_a$  хемосенсора **2** с  $\text{Fe}^{3+}$  составила  $1.455 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1/2}$ . Стехиометрия взаимодействия **2** с  $\text{Fe}^{3+}$  была определена как 2:1 и дополнительно подтверждена DFT-расчётами, которые показали, что подходящим

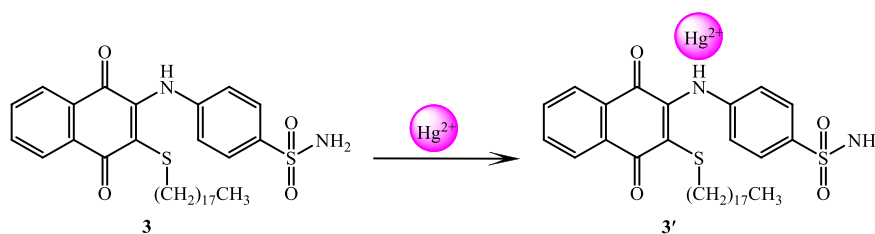
сайтом связывания для  $\text{Fe}^{3+}$ , скорее всего, является атом азота в азометиновом фрагменте. На основе расчета методом DFT/ V3LYP авторами был предложен следующий механизм сенсорного отклика **2** по отношению к ионам  $\text{Fe}^{3+}$ . Показано, что свободный лиганд **2** является неплоским, и хинолиновый фрагмент в нем находится под углом  $85.28^\circ$ . Из-за этого поворота внутримолекулярный перенос заряда (ICT) между бензальдегидным и хинолиновым фрагментами в свободном лиганде подавляется. Однако при связывании **2** с  $\text{Fe}^{3+}$ , ICT-взаимодействие между ЭД диметиламиногруппой и хинолиновым фрагментом облегчается за счет увеличения копланарности сопряженной системы. Спектральные изменения были обратимыми. При добавлении добавления  $\text{NH}_3$  к комплексу,  $\text{Fe}^{3+}$  был удален из лиганда **2** в виде аммиачного комплекса железа. Приведенные исследования показали, что новый флуоресцентный зонд **2** на основании Шиффа, может найти широкое практическое применение для обнаружения ионов железа.



**Рис. 7.** (а) Спектры поглощения и (б) флуоресценции хемосенсора **2** (30 мкМ) в ДМСО:  $\text{H}_2\text{O}$  (рН 7.1) при последовательном добавлении 0–98 мкМ  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\lambda_{ex} = 290$  нм. Рисунок взят и адаптирован из [83].

Новый колориметрический и ратиометрический флуоресцентный хемосенсор **3** для селективного обнаружения  $\text{Hg}^{2+}$  представлен в недавней публикации [84]. Зонд **3** синтезирован на основе нафтохинона и *p*-аминобензолсульфонамида. Роль центра связывания с катионом ртути играет NH-группа (схема 3).

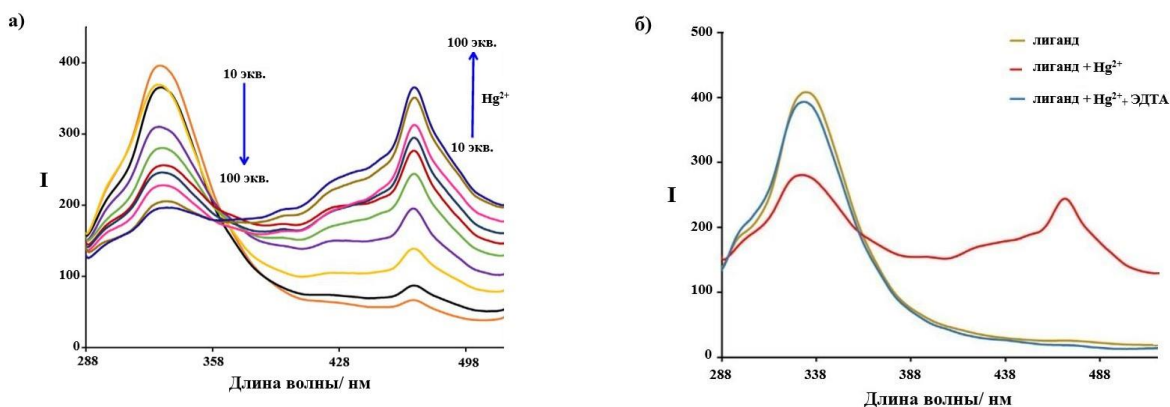
### Схема 3



Спектр поглощения соединения **3** демонстрировал максимумы при 252 нм, 297 нм и 514 нм соответствующие  $\pi - \pi^*$  и  $n - \pi$  переходам. При добавлении  $\text{Hg}^{2+}$ , наблюдалось смещение пиков от 252 до 257 нм, от 297 до 290 нм и от 514 до 487 нм. Сопутствующие изменения сопровождались повышением цвета раствора со светло-бордового до бледно-желтого. При возбуждении свободного лиганда светом с длиной волны 270 нм, спектр

флуоресценции **3** показывал интенсивный пик эмиссии при 330 нм. С увеличением концентрации  $\text{Hg}^{2+}$ , интенсивность флуоресценции при 330 нм постепенно уменьшалась, и образовывался новый пик при 470 нм (рис. 8а). В спектре наблюдалась отчетливая изоэмиссионная точка при 366 нм, что указывает на образование комплекса **3** с  $\text{Hg}^{2+}$  и ратиометрический характер сенсорного отклика. Авторы работы отметили, что местом связывания катиона в основном была вторичная аминогруппа, хотя в молекуле сенсора присутствует атом серы, который также является мягким нуклеофилом и имеет сродство к катиону ртути [85]. Это предположение было доказано ИК и ЯМР  $^1\text{H}$  спектроскопией. В спектрах комплекса ни один из сигналов от других функциональных групп кроме  $-\text{NH}$  не претерпевал изменения. Также были проведены квантово-химические расчеты DFT с использованием метода B3LYP, которые подтвердили, что  $\text{Hg}^{2+}$  образовывал координационную связь с группой  $-\text{NH}$ . Результаты свидетельствуют о том, что связывание  $\text{Hg}^{2+}$  способствует усилению ICT-эффекта посредством увеличения акцепторных свойств группы  $-\text{NH}$  при комплексообразовании. Стоит обратить внимание, что сенсорное поведение **3** является не типичным для ICT-зондов, так как спектр поглощения демонстрировал гипсохромный сдвиг при связывании катиона ртути, а спектр флуоресценции батохромный. Однако авторы работы не объяснили данное явление.

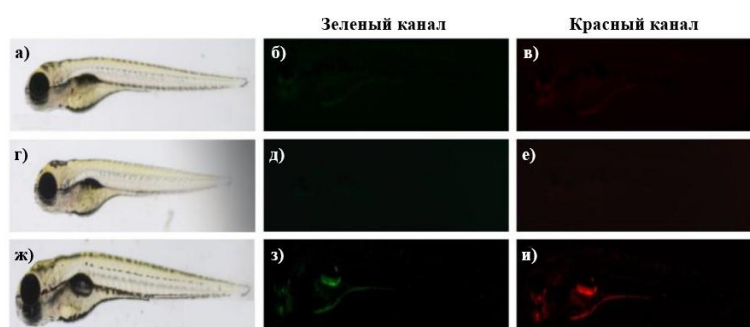
По данным спектрофлуориметрического анализа, была рассчитана константа ассоциации ( $K_a$ ), значение которой составило  $5.55 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1}$ . Предел обнаружения катиона ртути с использованием сенсора **3** был рассчитан как 0.451 мкМ. Далее было изучено обратимое связывание **3** с помощью хелатирующего агента ЭДТА. Добавление ЭДТА к смеси **3** и  $\text{Hg}^{2+}$  приводило к уменьшению интенсивности флуоресценции при 470 нм и одновременному возрастанию эмиссии при 330 нм. Интенсивность флуоресценции при 470 нм могла регенерироваться при дальнейшем добавлении  $\text{Hg}^{2+}$  (рис. 8б.), что является важной особенностью для анализа, проводимом в режиме реального времени.



**Рис. 8.** (а) Спектрофлуориметрический анализ **3** ( $1.25 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ ) с  $\text{Hg}^{2+}$  (от  $1.25 \cdot 10^{-4} \text{ M}$  до  $1.25 \cdot 10^{-3} \text{ mM}$ ) в растворе ДМСО:  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\lambda_{ex} = 270 \text{ nm}$ . (б) Анализ обратимости хемосенсора **3** ( $1.25 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ ) с  $\text{Hg}^{2+}$  ( $6.25 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ ) и ЭДТА ( $2.5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ ) в растворе ДМСО:  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\lambda_{ex} = 270 \text{ nm}$ . Рисунок взят и адаптирован из [84].

Избирательность сенсора **3** изучалась в присутствии различных катионов металлов, анионов, аминокислот и пептидов, включая следующий ряд металлов:  $\text{Cs}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{La}^{3+}$ . При добавлении различных аналитов в раствор **3** не было характерного изменения флуоресценции или сдвига пиков, исключение составлял катион ртути. Небольшое тушение эмиссии наблюдалось для  $\text{Cu}^{2+}$ , что связано с его парамагнитным характером [86]. Конкурентное добавление металлов показало, что их присутствие практически не влияет на обнаружение  $\text{Hg}^{2+}$ , и ратиометрический сигнал не был нарушен.

Зонд **3** эффективно использовался в качестве агента для биовизуализации  $\text{Hg}^{2+}$  в живых клетках и личинках рыбок *danio rerio*. Для внутриклеточной детекции  $\text{Hg}^{2+}$  были выбраны клетки фибробластомы мыши L929 и клетки рака молочной железы человека MCF-7. Хемосенсор **3** продемонстрировал более контрастную флуоресценцию в раковых клетках, что помогло отличить раковые клетки человека MCF-7 от нормальных живых клеток L929. Этот результат предполагает, что **3** является потенциальной молекулой для дальнейшей разработки агентов биовизуализации при идентификации раковых клеток. Далее сенсорная способность **3** изучалась на пятидневных личинках рыбок данио. Было показано, что только при совместной инкубации **3** и  $\text{Hg}^{2+}$  наблюдалась увеличение интенсивности флуоресценции как в зеленом, так и в красном каналах (рис. 9ж-и). Представленные исследования показывают **3** высокочувствительным и селективным сенсором для обнаружения  $\text{Hg}^{2+}$  в микромолярных концентрациях на двух различных линиях живых клеток и личинках рыбок данио.

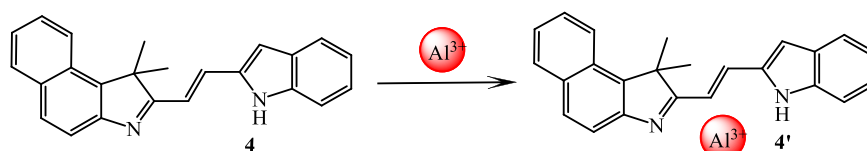


**Рис. 9.** Флуоресцентная биовизуализация  $\text{Hg}^{2+}$  в личинках рыбок *danio rerio* с использованием **3**; где а–в личинки рыбок данио, инкубированные с 6.25 мМ  $\text{Hg}^{2+}$ ; г–е личинки рыбок данио, инкубированные с 6.25 мМ **3**; ж–и личинки рыбок данио, инкубированные с 6.25 мМ  $\text{Hg}^{2+}$  и **3** соответственно. Рисунок взят и адаптирован из [84].

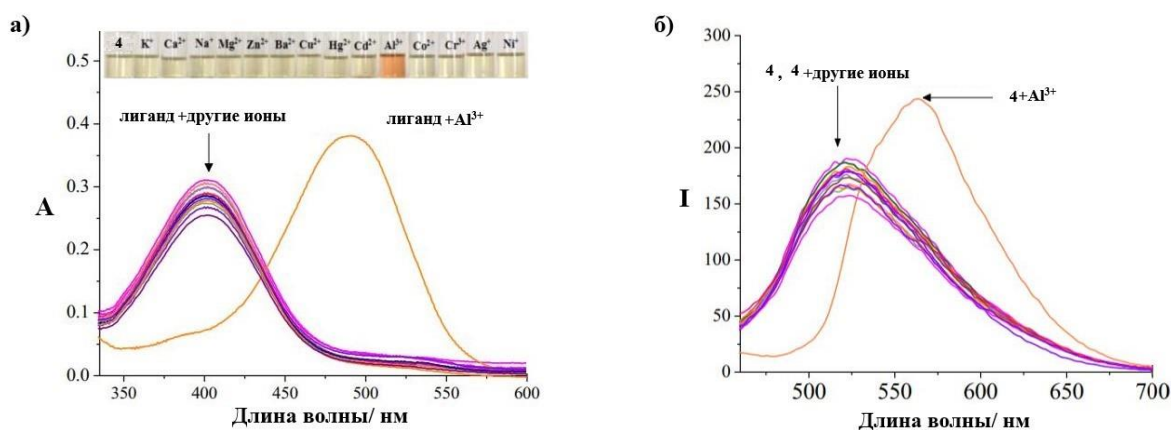
Ратиометрический ICT-сенсор на основе бензоиндола (схема 4) для определения  $\text{Al}^{3+}$  представлен в сообщении [87]. Сенсор **4** демонстрировал полосу поглощения при 402 нм. При добавлении  $\text{Al}^{3+}$  в раствор **4**, пик поглощения при 402 нм уменьшался, и одновременно появлялась новая полоса с максимумом при 490 нм. В ходе

абсорбационного титрования наблюдалась четкая изобестическая точка при 435 нм. Комплексообразование сопровождалось изменением цвета раствора от бледно-желтого до оранжевого. Как показано на рис. 10, свободный краситель **4** имеет полосу испускания при 524 нм. Присутствие  $Al^{3+}$  способствовало уменьшению интенсивности при 524 нм и индуцировало возрастание нового пика эмиссии при 566 нм. С увеличением добавки  $Al^{3+}$ , соотношение интенсивностей флуоресценции ( $I_{566}/I_{524}$ ) увеличивалось, далее выходя на плато. Смещённые батохромно спектры поглощения и испускания **4** при связывании с катионом  $Al^{3+}$  являются результатом координации алюминия с акцепторной частью хромофора, что приводит к облегчению переноса заряда в комплексе. По данным спектрофлуориметрического титрования рассчитан предел обнаружения  $Al^{3+}$  равным 1.58 мкМ. Значение  $K$  для **4** с  $Al^{3+}$  составило  $1.80 \cdot 10^4 M^{-1}$ , а соотношение связывания **4** с  $Al^{3+}$  оказалось равным 1:1.

#### Схема 4



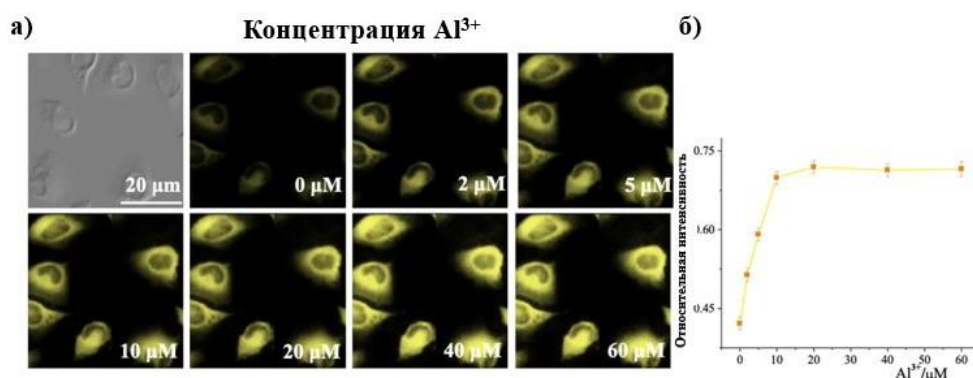
Оптическая плотность и флуоресцентный отклик **4** изучались с катионами различных металлов ( $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Na^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Ba^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Al^{3+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Cr^{3+}$ ,  $Ag^+$ ,  $Ni^{2+}$ ). Присутствие других ионов кроме  $Al^{3+}$  в растворе соединения **4** вызвало незначительное изменение оптической плотности при 402 нм и мало влияло на соотношение интенсивностей флуоресценции ( $I_{566}/I_{524}$ ) (рис. 10а, б).



**Рис. 10.** Изменение спектров поглощения (а) и флуоресценции (б) **4** (10 лМ) при добавлении ионов различных металлов в смеси  $H_2O$ :  $EtOH$ . Вставка а) изменение цвета раствора **4** при воздействии различных ионов металлов,  $\lambda_{ex} = 435$  нм. Рисунок взят и адаптирован из [87].

Далее была исследована способность **4** для обнаружения экзогенного  $Al^{3+}$  ратиометрическим методом на клеточной линии HeLa. Свободный лиганд **4** демонстрировал два типа флуоресценции: интенсивную в зеленом канале и слабую в желтом. После обработки клеток  $Al^{3+}$  зеленая флуоресценция гасла, тогда как эмиссия в

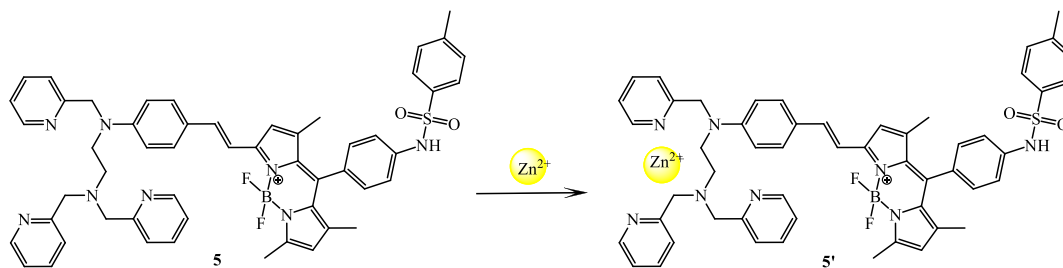
желтом канале значительно разгоралась. При увеличении концентрации  $\text{Al}^{3+}$  внутриклеточное отношение интенсивностей флуоресценции возрастало, что свидетельствует об образовании комплекса **4** с  $\text{Al}^{3+}$  (рис. 11а, б). Более того, сенсор **4** имеет высокую чувствительность и селективность в отношении ионов  $\text{H}^+$ . При протонировании бензоиндольного ядра увеличиваются акцепторные свойства данного фрагмента, усиливая внутримелокулярный ICT-процесс, что ведет к образованию нового флуоресцентного сигнала. Исследование клеточной линии HeLa показало, **4** может быть использован для ратиометрического обнаружения колебаний рН в живых клетках. Таким образом, благодаря высокой чувствительности **4** по отношению к ионам  $\text{Al}^{3+}$  и  $\text{H}^+$ , данный сенсор может быть успешно использован для их детектирования в водных растворах и живых клетках. Стоит отметить, что авторы данной работы немногие из тех, кто привел внутриклеточную зависимость значения ратиометрического сигнала от концентрации металла (рис. 11а, б), однако внутриклеточная концентрация и ПО  $\text{Al}^{3+}$  посчитаны не были.



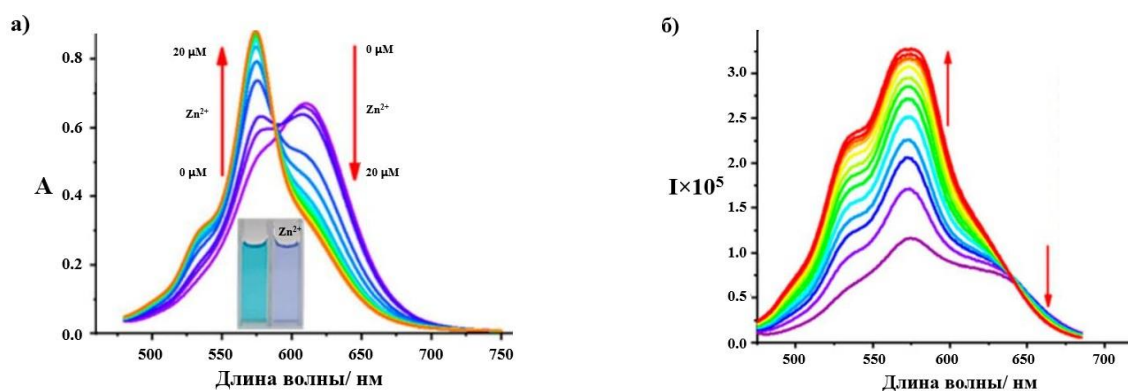
**Рис. 11.** (а) Флуоресцентные микроскопические изображения **4** (10  $\mu\text{M}$ ) в клетках HeLa с различными концентрациями  $\text{Al}^{3+}$  (0, 2, 5, 10, 20, 40 и 60  $\mu\text{M}$ ) (рН 7.0),  $\lambda_{\text{ex}} = 435$  нм. Масштабная метка: 20  $\mu\text{m}$ . (б) Ратиометрическое отношение интенсивностей **4** при добавлении  $\text{Al}^{3+}$ . Рисунок взят и адаптирован из [87].

Фанг с коллегами разработали сенсор **5** на основе механизма ICT для обнаружения  $\text{Zn}^{2+}$  [88]. Хемосенсор **5** сконструирован путем введения стирилового фрагмента в  $\alpha$ -положение хромфорной системы BODIPY. По сравнению с индивидуальным красителем BODIPY, соединение **5** обладает более протяженной сопряженной системой, что обеспечивает длинноволновое положение максимума эмиссии в спектре (схема 5). В качестве группы хелатирующей  $\text{Zn}^{2+}$  выступает фрагмент *N,N,N'*-три(пиридин-2-илметил)этан-1,2-диамин, а *p*-толуолсульфонамид был введен в мезо-положение флуорофора в качестве векторной группы обеспечивающей накопление в эндоплазматическом ретикулуме (основное место локализации  $\text{Zn}^{2+}$  в клетке [89]).

## Схема 5



Свободное соединение **5** демонстрирует пик поглощения с максимумом при 640 нм. Как видно из рис. 12а, с увеличением концентрации  $Zn^{2+}$ , оптическая плотность при 610 нм уменьшается, в то время как при 575 нм появляется новый пик. Смещение максимума поглощения гипсохромно сопровождалось образованием изобестической точки при 588 нм и изменением цвета раствора с голубого на синий. Авторы работы предполагают следующий механизм взаимодействия. Атом азота в хелатирующей группе свободного лиганда **5** обладает сильными электронодонорными свойствами, которые ослабляются при связывании с  $Zn^{2+}$ , уменьшая энергию ICT-перехода в хромофоре, что вызывает гипсохромный сдвиг пика поглощения.

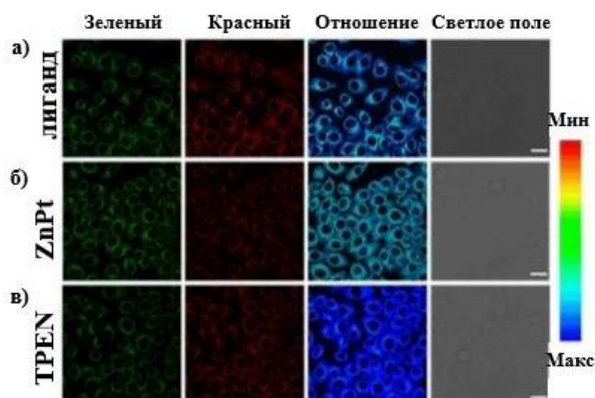


**Рис. 12.** (а) Спектры поглощения и (б) возбуждения флуоресценции (475–685 нм) **5** (10 мкМ) при добавлении  $Zn^{2+}$ . Вставка (а): фотографии 10 мкМ **5** с 0 и 1.0 экв.  $Zn^{2+}$  при естественном освещении. Рисунок взят и адаптирован из [88].

Результаты спектрофлуориметрического титрования показали, что при увеличении концентрации  $Zn^{2+}$ , интенсивность излучения при 660 нм увеличивалась. На основании этого авторы дополнительно протестировали спектры возбуждения диапазоном 475–685 нм при флуоресценции на 700 нм. При добавлении  $Zn^{2+}$ , интенсивность флуоресценции на 700 нм, возбуждаемая длиной волны 573 нм, увеличивается, в то время как эмиссия при 700 нм, возбуждаемая длиной волны 671 нм, слегка снижается (рис. 12б). Таким образом, ратиометрический отклик **5** основан на режиме двойного возбуждения с одноканальной флуоресценцией. Отношение интенсивностей  $I_{573}/I_{671}$  заканчивает увеличиваться при добавлении одного эквивалента  $Zn^{2+}$ , что указывает на стехиометрию связывания 1:1. Кроме того, предел обнаружения зонда оказался равным 31.8 нМ. Обратимость комплексообразования **5** с  $Zn^{2+}$  изучалась в присутствии  $N,N,N',N'$ -

тетраakis(2-пиридилметил)этилендиамина (TPEN), известного агента, хелатирующего  $Zn^{2+}$  [90]. Показано, что зонд **5** может эффективно возобновлять комплексообразование после добавления TPEN как минимум четыре раза.

Биологические исследования соединения **5** проводились на клеточной линии HeLa. Для изучения способности **5** детектировать  $Zn^{2+}$  был выбран мембранопроницаемый носитель цинка (пиритион цинка, ZnPT), а в качестве внутриклеточного хелатора  $Zn^{2+}$  выступал TPEN. При инкубации клеток зондом **5**, была продемонстрирована двухканальная визуализация в клетках (рис. 13а). При последовательной инкубации клеток красителем **5** и пиритионом цинка, наблюдалось разгорание флуоресценции в зеленом канале, в то время как испускание в красном канале ослабло (рис. 13б), а отношение изображений было увеличено, показывая повышенный уровень  $Zn^{2+}$  в клетках. При дальнейшей инкубации клеток TPEN, отношение изображений было значительно уменьшено. Результаты работы показали, что **15** можно использовать для количественной визуализации  $Zn^{2+}$  в клетках, что обеспечивает основу для количественной и динамической визуализации эндогенного  $Zn^{2+}$  в эдоплазматическом ретикулууме.

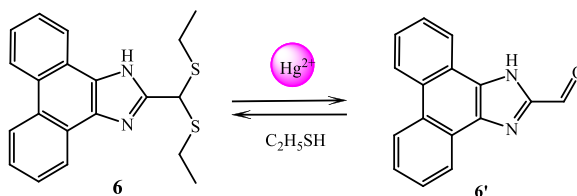


**Рис. 13.** (а) Флуоресцентное изображение клеток HeLa окрашенных **5** (5 мкМ); (б) после инкубации с 5 мкМ пиритионом цинка в течение 20 минут и (в) последующей обработки TPEN, 50 мкМ. Зеленый канал:  $\lambda_{ex} = 570$  нм,  $\lambda_{em} = 660\text{--}720$  нм, красный канал:  $\lambda_{ex} = 650$  нм,  $\lambda_{em} = 660\text{--}720$  нм, Отношение =  $I_{зел}/I_{кр}$ , масштабная метка: 25 мкм. Рисунок взят и адаптирован из [88].

Приведенные примеры сенсорных систем демонстрируют перспективность ратиометрических ICT-зондов. Несложные структуры, простота синтеза, и как следствие, обширный выбор хромофорных систем делает ICT-сенсоры привлекательной областью исследования. Однако существенным недостатком данных хемосенсоров является флуоресцентное тушение. В полярных средах и, особенно в воде может происходить тушение ICT-эмиссии [91], что является критическим недостатком для биологических исследований, где среда водная. Также при связывании такого сенсора с тяжелыми переходными металлами наблюдается тушение флуоресценции за счет парамагнетизма и внутреннего эффекта тяжелого атома [92; 93]. Во флуоресцентном анализе при

комплексообразовании тушение эмиссии является менее предпочтительным явлением, чем ее разгорание, так как последнее обеспечивает более низкую чувствительность к постороннему шуму в спектре [94]. Данную проблему можно решить использованием хемодозиметров, молекулы которых, вступая в химическую реакцию с аналитом, индуцируют увеличение интенсивности флуоресценции сигнального фрагмента. Такой ИСТ-хемодозиметр **6** на основе фенантроимидазольного хромофора (схема 6) для селективного детектирования  $\text{Hg}^{2+}$  описан Ху с коллегами в работе [95]. В качестве механизма, индуцирующего ратиометрический отклик, использовалась химическая реакция деацетализации, приводящая к образованию альдегидной группы. При добавлении  $\text{Hg}^{2+}$  в спектрах флуоресценции наблюдался сильный батохромный сдвиг от 393 до 515 нм (до 122 нм), за который отвечал ИСТ-процесс в полученном альдегиде **6'**. Дальнейшее изучение молекулы **6** показало высокую селективность зонда к  $\text{Hg}^{2+}$  по сравнению с другими сосуществующими катионами/анионами. Хемодозиметр **6** имел линейную зависимость ратиометрического сигнала ( $I_{515}/I_{393}$ ) от концентрации  $\text{Hg}^{2+}$ , с помощью которой был рассчитан предел обнаружения  $\text{Hg}^{2+}$  ( $5.22 \cdot 10^{-7}$  М). В дальнейшем исследователи планируют применить сенсор **6** для определения катионов ртути в объектах окружающей среды.

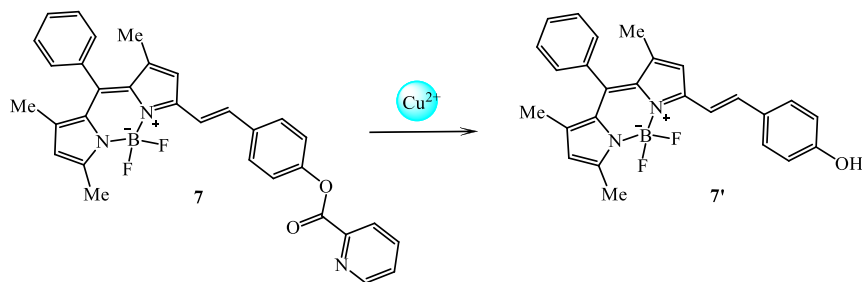
**Схема 6**



Группа Шу разработала и синтезировала ратиометрический хемодозиметр **7** на основе производного BODIPY, содержащего фрагмент 2-пиколинового эфира (схема 7), для обнаружения парамагнитного иона  $\text{Cu}^{2+}$  в водном буферном растворе [96]. Флуорофор BODIPY был выбран в качестве сигнальной единицы, а 2-пиколиновая кислота исполняла роль фрагмента, хелатирующего  $\text{Cu}^{2+}$ . Механизм детектирования зонда **7** основан на том, что атом азота 2-пиколиновой кислоты переносит  $\text{Cu}^{2+}$  в непосредственную близость от эфирной связи, способствуя гидролизу пиколинового эфира, в результате чего образуется донорная гидроксигруппа. В новом фрагменте **7'** донор усиливает перенос заряда на BODIPY-хромофор, что сопровождается батохромным сдвигом полос поглощения и флуоресценции по сравнению с исходным соединением **7**, в котором пиридинкарбонильная группа уменьшает электронную плотность на атоме кислорода. Когда зонд **7** гидролизовался  $\text{Cu}^{2+}$  до соединения **7'**, в спектрах флуоресценции наблюдался ратиометрический сигнал. Отношение интенсивности флуоресценции  $I_{593}/I_{574}$

возрастало с увеличением концентрации  $\text{Cu}^{2+}$ , а реакция завершалась в течение 3 минут, что является достаточно быстрым откликом для хемодозиметров. Далее был рассчитан ПО, значение которого составило 0.08 мкМ. С удовлетворительной точностью хемодозиметр **7** был применен для определения  $\text{Cu}^{2+}$  в реальных образцах воды (озерной, минеральной и питьевой воде) и на фильтровальной бумаге, что делает его потенциально пригодным для измерения катионов меди в объектах окружающей среды.

**Схема 7**



Такой способ детекции катионов переходных металлов является пригодным для использования в водных растворах и однократного применения в биологических образцах. Необратимость химической реакции хемодозиметров не позволяет проводить исследования в режиме реального времени внутри биологических объектов. В этом случае сенсор является невозобновляемой единицей и не может подстраиваться под изменяющуюся концентрацию металла в системе. Иными словами, по завершении химической реакции хемодозиметр не будет реагировать на дальнейшее увеличение/ уменьшение концентрации аналита в биологической среде.

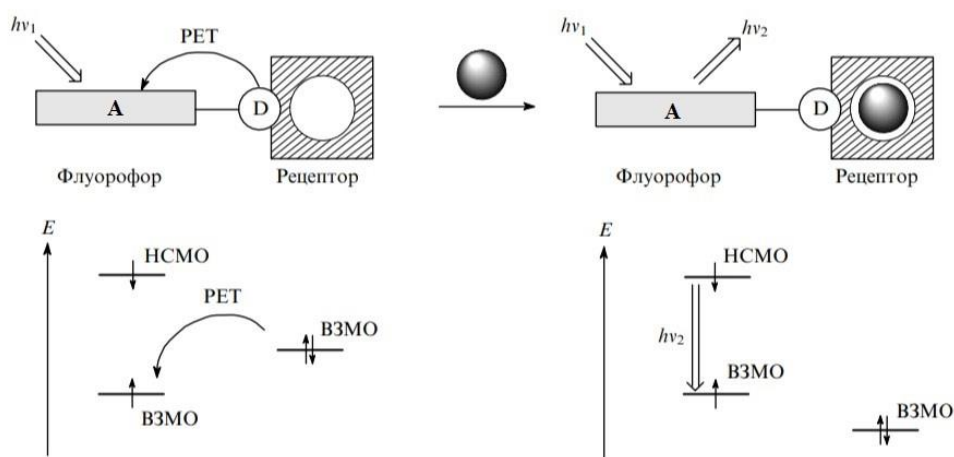
Вторая проблема состоит в том, что для монохромовых ИСТ-хемосенсоров величина сдвига максимума полосы флуоресценции часто оказывается в интервале 20–50 нм [97; 98], что приводит к незначительному изменению отношения интенсивностей флуоресценции на двух различных длинах волн, то есть к слабо выраженному ратиометрическому отклику. Одной из возможных причин такого типа поведения может быть рекоординация катиона металла в рецепторной полости, при которой разрывается связь между катионом и флуорофором [99], в результате чего оптические характеристики последнего в комплексе оказываются в значительной мере близки к характеристикам свободного лиганда. Перечисленные недостатки можно решить путем синтеза бисхромовых систем. В таких системах реализуется резонансный перенос энергии в сочетании с механизмом ИСТ, что создает молекулы, обладающие большим Стоксовым сдвигом [100], примеры которых будут рассмотрены в данном литературном обзоре далее.

### 2.1.2 Ратиометрические PET-сенсоры

Фотоиндуцированный перенос электрона (Photoinduced electron transfer, PET) играет важную роль в процессах естественного и искусственного фотосинтеза,

функционирования фотовольтаических устройств, различных фотосенсибилизаторов и фотокатализаторов [71]. Одной из важнейших областей практического использования PET-процесса является разработка флуоресцентных хемосенсоров. Фотоиндуцированный перенос электрона происходит от донора (Д) электронов-рецептора к акцептору-флуорофору (А). При возбуждении такого сенсора происходит перенос электрона (PET) с ВЗМО донора-рецептора на однократно занятую ВЗМО акцептора-флуорофора, что вызывает тушение флуоресценции последнего (рис. 14) [71].

При связывании катиона металла с рецептором уровень энергии его ВЗМО становится ниже уровня ВЗМО флуорофора (рис. 14), в результате чего PET-эффект не реализуется, и сенсор начинает флуоресцировать [101]. Классические PET-сенсоры демонстрируют переключение сигнала типа ON-OFF или OFF-ON. Механизм возникновения их отклика основан на изменении интенсивности флуоресценции красителя-флуорофора на заданной длине волны. При связывании с аналитом сигнальный фрагмент либо уменьшает интенсивность флуоресценции путем тушения (ON-OFF), либо увеличивают интенсивность, устраняя эффект тушения (OFF-ON) [102].

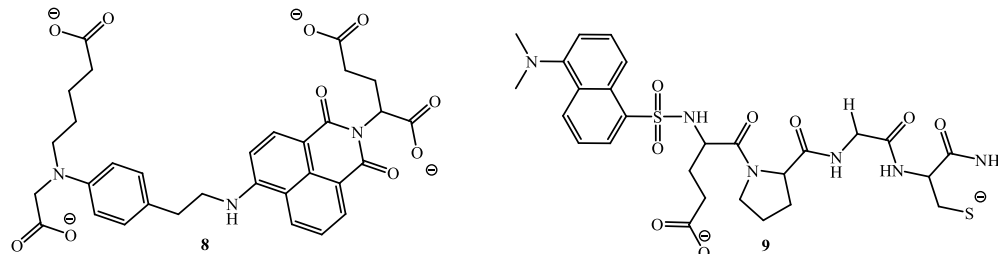


**Рис. 14.** Принципиальная схема работы PET-сенсора для распознавания катионов. Катион представлен в виде шарика.

Соединения **8** и **9** (схема 8) прекрасно иллюстрируют работу флуоресцентных PET-сенсоров. Молекула **8** представляет собой водорастворимый флуоресцентный агент на основе 4-амино-1,8-нафталимида, содержащий фрагмент аминокислоты в составе *N*-алкильного заместителя и аминоксислоту в качестве рецептора в 4 положении нафталинового ядра [103]. При физиологических pH зонд **8** демонстрирует хорошую растворимость в воде, а также высокую селективность и чувствительность по отношению  $Zn^{2+}$ . Характерная полоса испускания 4-амино-1,8-нафталимида с центром на 550 нм разгорается примерно в 20 раз при связывании с катионом  $Zn^{2+}$ . Данное увеличение интенсивности флуоресценции является результатом блокировки PET-

процесса с рецепторного фрагмента на нафталиimidную часть молекулы. Сенсор **8** демонстрировал успешное обнаружение  $Zn^{2+}$  в живых клетках HeLa. Результаты исследования показали, что **8** обладает хорошей проницаемостью для клеточных мембран и может применяться для обнаружения  $Zn^{2+}$  в живых клетках. В сообщении [104] Вонгом с коллегами был разработан и синтезирован PET-сенсор **9** на основе тетрапептида с дансиламидным фрагментом. Зонд **9** продемонстрировал высокочувствительное флуоресцентное распознавание ионов  $Cd^{2+}$  в водном растворе. Флуоресцентное испускание свободного красителя **9** было почти погашено, что связано с явлением фотоиндуцированного переноса электрона (PET) от сульфгидрильных групп к дансиламиду. При связывании с ионами  $Cd^{2+}$  PET-процесс блокировался, и флуоресценция зонда **9** разгоралась. Было обнаружено, что  $Cd^{2+}$  координируется атомом кислорода гидроксигруппы и атомами серы сульфидных групп. Стехиометрия комплекса оказалась равной 2: 1, а предел обнаружения сенсора **9** для ионов  $Cd^{2+}$  составил 45 нМ. Дальнейшие исследования были посвящены флуоресцентной визуализации эндогенных ионов  $Cd^{2+}$  на клеточной линии HeLa. Эксперименты показали, что зонд **9** может успешно использоваться для флуоресцентной визуализации катиона  $Cd^{2+}$  в клетках HeLa, что указывает на его потенциальное применение в анализе биологических образцов.

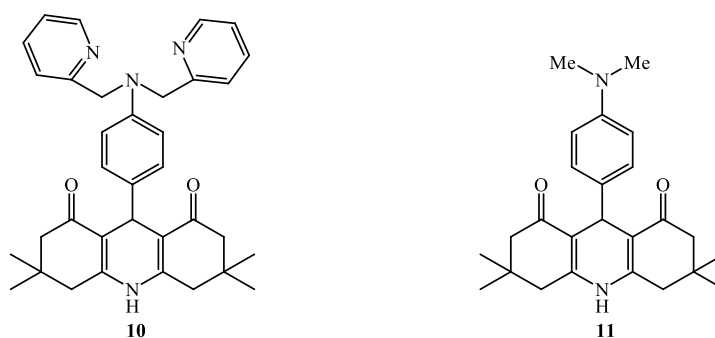
**Схема 8**



На сегодняшний день большинство доступных флуоресцентных сенсоров на основе механизма PET демонстрируют увеличение интенсивности излучения, но показывают небольшой спектральный сдвиг или вообще не имеют его как в спектрах поглощения, так в спектрах испускания. Анализ литературных данных показал, что известно всего несколько примеров ратиометрических PET-сенсоров. В работе [105] сообщается о ратиометрическом флуоресцентном PET-сенсоре **10** на основе флуорофора акридиндиона и фрагмента *N,N*-бис(2-пиридилметил)амин в роли хелатора  $Zn^{2+}$  (схема 9). Исследования спектров поглощения и испускания **10** были проведены в серии протонных и апротонных растворителей. В апротонных растворителях **10** демонстрирует интенсивное двухполосное поглощение. Максимум при 360 нм отвечает внутримолекулярному переносу заряда (ICT) [106] от атома азота шестичленного цикла на карбонильные группы во флуорофоре, а плечо на 315 нм приписывается электронному переходу в рецепторном фрагменте. В

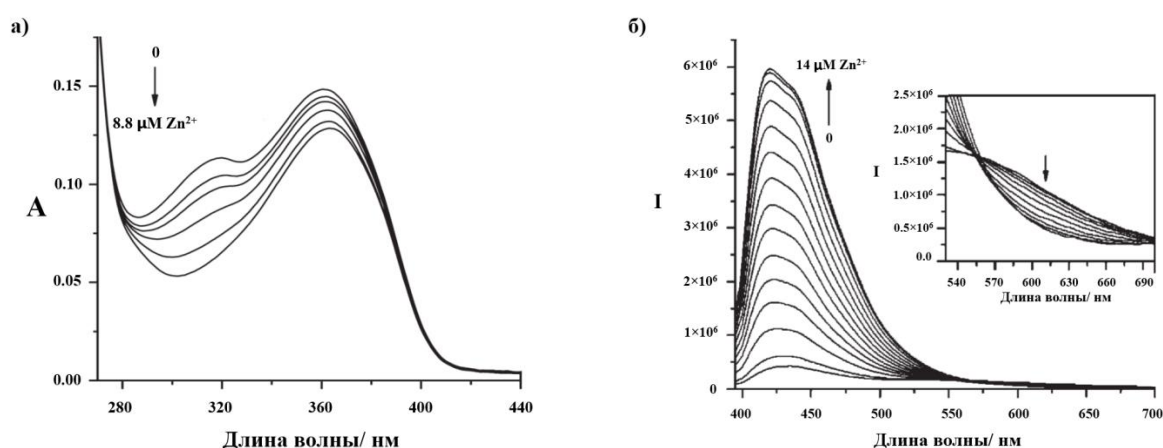
протонных растворителях появляется полоса, смещенная в синюю область, из-за протонирования атома азота во фрагменте дипиколиламина. Соединение **10** имеет одну полосу испускания в протонных растворителях, в то время как в апротонных флуоресценция оказывается двухполосной. Данное явление объясняется с помощью изучения спектров возбуждения **10**. Спектр возбуждения, зарегистрированный на максимуме флуоресценции при 560 нм, имеет плечо около 315 нм, однако такое же плечо не наблюдается в спектре возбуждения, зарегистрированном при максимуме испускания на 425 нм. Из этого следует, что молекула **10** имеет две различных конформации в основном состоянии, которые приводят к двум близко расположенным возбужденным состояниям (локально возбужденному и переносу заряда), таким образом, индуцируя двойную флуоресценцию красителя. Авторами работы показано, что в одной из конформаций происходит эффективный РЕТ из донорного амино-фрагмента в относительно электронно-дефицитное возбужденное состояние флуорофора акридиндиона, что приводит к более длинноволновой эмиссии из состояния с переносом заряда.

#### Схема 9



Аналогичное явление наблюдалось в соединении **11** (схема 9), описанном в сообщении [107], в котором вместо дипикалиламино-группы была диметаламино-группа. Молекула **11** также имеет два максимума в спектре испускания, за которые отвечает локально-возбужденное состояние и состояние с переносом заряда. Было проанализировано, является ли длинноволновая эмиссия красителя **11** результатом скрученного внутримолекулярного переноса заряда ТИСТ (Twisted Intramolecular Charge Transfer) [108]. Скрученный внутримолекулярный перенос заряда ТИСТ предполагает образование состояния переноса заряда у соединений с перпендикулярной конформацией посредством внутримолекулярного вращения вокруг химической связи [109]. Влияние полярности растворителя и вязкости среды показало, что перенос заряда не обусловлен механизмом ТИСТ, так как при изменении данных параметров, интенсивность длинноволновой эмиссии не изменялась.

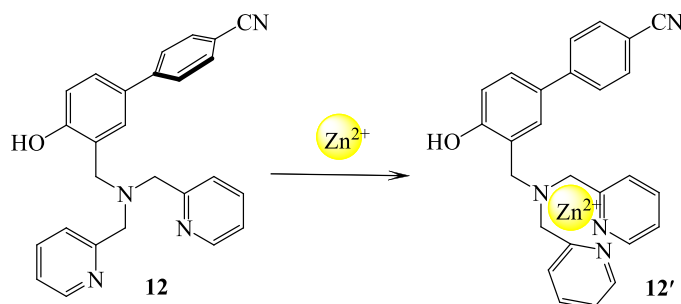
Интересно отметить, что по сравнению с соединением **10**, длинноволновая флуоресценция красителя **11** при 550 нм, которая отвечает состоянию с переносом заряда, является намного более интенсивной, чем эмиссия из локально-возбужденного состояния при 424 нм. Получается, что значение отношения интенсивностей длинноволновой эмиссии к коротковолновой больше у соединения **11**, чем у молекулы **10**. Предполагается, что данное различие обусловлено тем, что в **11** присутствует сильная ЭД диметиламино-группа, приводящая к более эффективному процессу РЕТ по сравнению с **10**. Однако если анализировать сенсорные свойства обоих зондов, то отсутствие селективной рецепторной группы ограничивает использование **11** в качестве сенсора. Действительно, сенсор **10** оказался чувствительным по отношению к катиону  $Zn^{2+}$ . Добавление  $Zn^{2+}$  к ацетонитрильному раствору **10** приводит к уменьшению интенсивности поглощения рецепторного фрагмента около 315 нм (рис. 15а), что указывает на наличие взаимодействия между  $Zn^{2+}$  и рецепторным блоком в основном состоянии. С другой стороны, никаких изменений в максимуме поглощения акридиндиона не наблюдалось, что подтверждает отсутствие какого-либо взаимодействия между рецепторным блоком и флуорофором в основном состоянии. В присутствии  $Zn^{2+}$  соединение **10** демонстрирует увеличение интенсивности коротковолновой флуоресценции при 425 нм с одновременным тушением излучения при 560 нм (рис. 15б). Соотношение интенсивности флуоресценции  $I_{425}/I_{560}$  увеличивается от 3.3 до 103. Связывание  $Zn^{2+}$  с фрагментом рецептора изменяет конформацию молекулы так, что процесс РЕТ не реализуется. Это приводит к исчезновению испускания, отвечающее состоянию переноса заряда при 560 нм и усилению интенсивности испускания локально-возбужденного состояния на 435 нм. Предел обнаружения зонда **10** в ацетонитриле оказался равным 98 нМ.



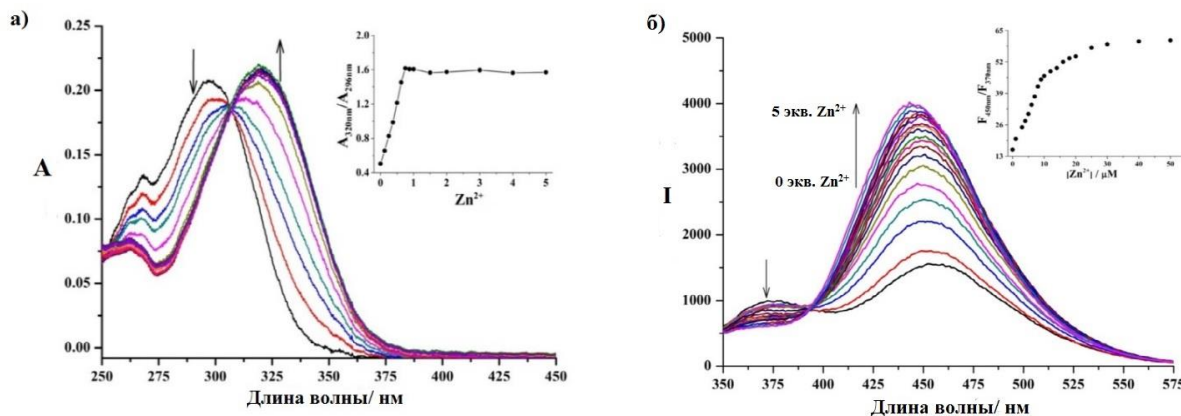
**Рис. 15.** (а) Спектры поглощения **10** (12 мкМ) при добавлении  $Zn^{2+}$  в ацетонитриле. (б) Спектры испускания **10** (12 мкМ) при добавлении  $Zn^{2+}$  в ацетонитриле;  $\lambda_{ex} = 388$  нм. На вставке показаны спектры испускания в области 530–700 нм. Рисунок взят и адаптирован из [105].

Следующий РЕТ-сенсор **12** на основе цианобифенила и ди-2-пиколиламина (схема 10) показывал ратиометрический отклик не только в спектрах флуоресценции, но и в спектрах поглощения [110]. Соединение **12** имеет максимум поглощения при 296 нм. В ходе титрования  $Zn^{2+}$  пик поглощения постепенно уменьшался, и образовалась новая полоса при 320 нм (рис. 16а). Спектр флуоресценции **12** демонстрирует две полосы с максимумами на 370 нм и 450 нм. Низкий квантовый выход ( $\phi^f=0.01$ ) свободного лиганда **12** связан с тушением флуоресценции из-за фотоиндуцированного переноса электрона (РЕТ) от ди-2-пиколиламиногруппы к флуорофору цианобифенилу. Однако при добавлении  $Zn^{2+}$  наблюдалось разгорание флуоресценции при 450 нм и тушение эмиссии на 370 нм (рис. 16б). Данные спектральные изменения можно объяснить с помощью изучения кристаллических структур соединения **12** и его комплекса с  $Zn^{2+}$ . Было показано, что в свободном лиганде **12** бифенильные кольца находятся в ортогональном положении из-за существования водородной связи между гидроксигруппой и алифатическим атомом азота дипиколинового фрагмента. После координации с  $Zn^{2+}$  межмолекулярная водородная связь исчезла. Отсутствие водородной связи, по-видимому, способствовало не только ингибированию процесса РЕТ, но и усилению ИСТ-эффекта внутри бифенила за счет компланарности бензольных колец, что привело к батохромному смещению полосы поглощения. Авторы работы не приводят объяснения природы образования двухполосной полосы испускания. Однако можно предположить, что данное явление связано с тем, что свободный лиганд существует в виде двух форм: гидрокси-формы с полосой испускания на 370 нм и депротонированной формы с максимумом на 450 нм. Добавление катионов  $Zn^{2+}$  приводило к ингибированию РЕТ-процесса, а также увеличивало концентрацию депротонированной формы **12**, и, следовательно, индуцировало тушение флуоресценции на 370 нм (рис. 16б). Таким образом, отношение интенсивностей флуоресценции  $I_{450}/I_{370}$  можно рассматривать как ратиометрический отклик. Отношение  $I_{450}/I_{370}$  изменяется от 16 до 61 и выходит на плато после добавления трех эквивалентов  $Zn^{2+}$ . Константа связывания  $K_a$  комплекса **12** с цинком на основе стехиометрии 1:1 посчитана равной  $3.67 \cdot 10^4 M^{-1}$ , а предел обнаружения **12** для  $Zn^{2+}$  составил 0.77 мкМ.

**Схема 10**



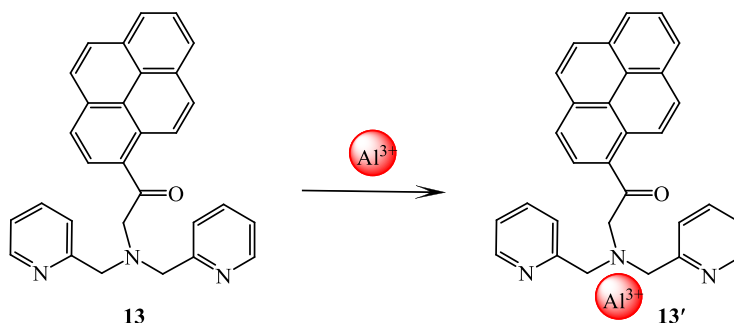
Соединение **12** является селективным по отношению к катионам цинка в присутствии таких ионов как  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$  и  $\text{Na}^+$ . Исключение составляют ионы  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  и  $\text{Pb}^{2+}$  в присутствии которых, наблюдается тушение флуоресценции. Отношение  $I_{450}/I_{370}$  значительно увеличивалось только при добавлении  $\text{Zn}^{2+}$  к смешанным растворам **12** и другого иона металла, кроме  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ , которые, по-видимому, связывали рецепторную группу и вызывали тушение эмиссии комплекса. Таким образом, зонд **12** показал флуоресцентный отклик, но низкий ратиометрический сигнал на ион  $\text{Zn}^{2+}$  в растворе.



**Рис. 16.** Спектры поглощения (а) и флуоресценции (б) при титровании **12** (10 мкМ)  $\text{Zn}^{2+}$  (0–5.0 экв.), НЕРЕС: ДМСО (рН 7.4); Вставка а): изменение соотношения поглощения  $A_{320}/A_{296}$  **12** при добавлении различных экв.  $\text{Zn}^{2+}$ . Вставка б): изменение соотношения флуоресценции ( $I_{450}/I_{370}$ ) **12** при добавлении различных экв.  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\lambda_{ex} = 306$  нм. Рисунок взят и адаптирован из [110].

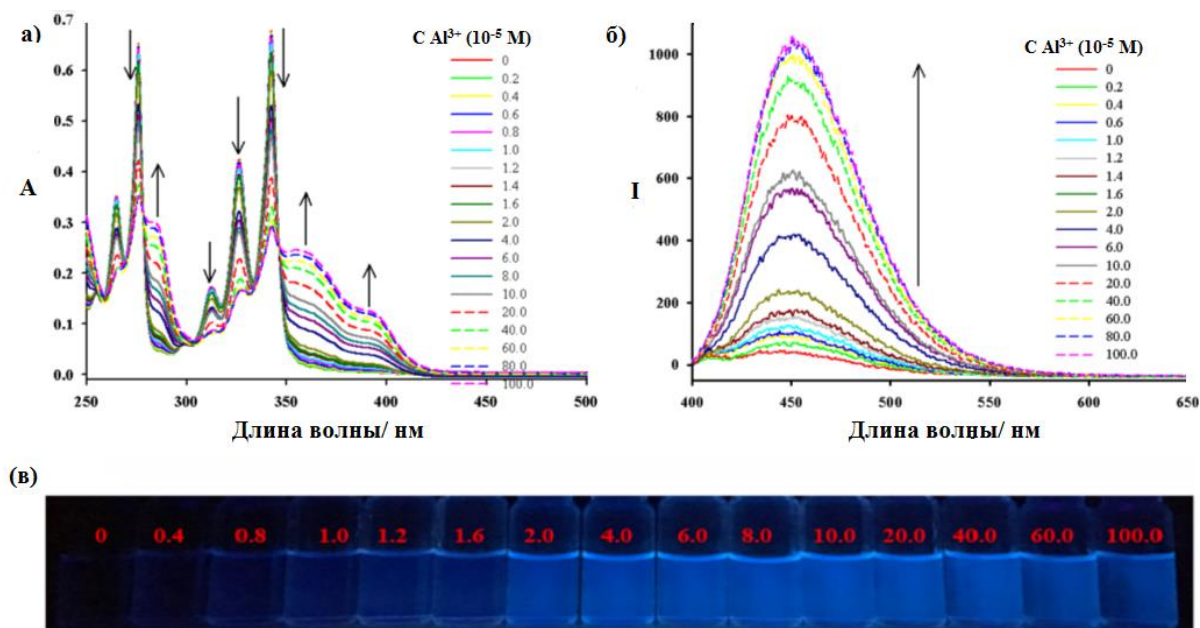
Еще один ратиометрический флуоресцентный сенсор **13** на основе дипиколиламина (схема 11) представлен в сообщении [111]. Дипиколиламин является широко используемым рецептором для таких ионов металлов, как  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  и  $\text{Cu}^{2+}$  [112], но может демонстрировать низкую селективность связывания. Примечательно, что в этом исследовании желаемая селективность рецептора к  $\text{Al}^{3+}$  была реализована путем введения дополнительного карбонильного звена, действующего совместно с дипиколиламином.

#### Схема 11



В спектрах поглощения соединения **13** наблюдалось пять полос при 265, 276, 313, 326 и 342 нм (рис. 17а). При постепенном добавлении  $\text{Al}^{3+}$ , оптическая плотность при 265, 276, 313, 326 и 342 нм уменьшалась с одновременным появлением двух длинноволновых полос около 360 нм. Зонд **3** проявлял очень слабую флуоресценцию при 451 нм из-за

фотоиндуцированного переноса электрона PET (рис. 17б). В присутствии  $Al^{3+}$  эмиссия при 451 нм (рис. 17б) возрастала за счет взаимодействия между НЭП атомов азота рецептора **13** и  $Al^{3+}$ , которое препятствовало PET-процессу.



**Рис. 17.** Спектры поглощения а) и флуоресценции б) **13** ( $1.0 \cdot 10^{-5}$  M) при титровании  $Al^{3+}$  ( $0-100 \cdot 10^{-5}$  M) в системе EtOH: HEPES (pH 7.5); в) изображения флуоресценции **13** с пошаговым добавлением  $Al^{3+}$  ( $0-100 \cdot 10^{-5}$  M) под УФ-облучением с длиной волны 365 нм. Рисунок взят и адаптирован из [111].

Для оценки чувствительности **13** к  $Al^{3+}$  были проведены эксперименты по абсорбционному и флуориметрическому титрованию, при этом сенсор демонстрировал ратиометрический отклик поглощения  $A_{360}/A_{342}$ . Константы ассоциации  $K_a$  **13** с  $Al^{3+}$  были оценены как  $3.35 \cdot 10^7 M^{-1}$  и  $4.55 \cdot 10^6 M^{-1}$  по результатам абсорбционного и флуоресцентного титрования соответственно. Кроме того, флуоресценция **13** изменяла свой цвет от голубого до ярко-синего (рис. 17в). Детектирование  $Al^{3+}$  с **13** реализовано в широком диапазоне pH 5–12. Пределы обнаружения  $Al^{3+}$  составили 0.19 и 0.10 мкМ абсорбционным ( $A_{360}/A_{342}$ ) и флуоресцентным ( $I_{451}$ ) методами соответственно. Стехиометрия связывания между **13** и  $Al^{3+}$  была определена как 1:1. Зонд **13** также успешно применялся для обнаружения  $Al^{3+}$  в пробах искусственно загрязненной воды, в воде реки Юнцзян и на пластинках ТСХ. Показано, что сенсор **13** является перспективным кандидатом для определения  $Al^{3+}$  в экологических системах.

Представленные соединения **10–13** демонстрируют небольшие изменения в отношении интенсивностей флуоресценции, что является непригодным для образования ратиометрического внутриклеточного отклика на катион металла. Однако данные молекулы являются редким примером ратиометрических сенсоров с PET-механизмом отклика, поскольку в большинстве случаев образующиеся при PET-процессе ион-

радикальные пары релаксируют безызлучательно путем обратного переноса электрона. Анализ литературных данных показал, что ратиометрических сенсоров на основе механизма PET в настоящее время описано весьма мало. Важно отметить, что ратиометрические сенсорные устройства, работающие исключительно на механизме PET отсутствуют. Для достижения ратиометрического отклика, в случае монохромоморфных сенсоров, PET механизм нужно комбинировать с ICT-механизмом. Но удачных монохромоморфных сенсоров такого типа мало. В большинстве случаев отношение интенсивностей  $R$  меняется не очень сильно, либо вообще не меняется как в последнем примере **13**. Флуоресценцию скрученных состояний с разделенными зарядами ПИСТ также очень сложно использовать (она обычно слабая или вовсе отсутствует). Более перспективной является комбинация PET и RET механизма [113]. Этот подход реализован в конструкциях бисхромоморфных сенсоров, принцип работы которых будет рассмотрен в разделе 2.2.

### 2.1.3 Ратиометрические ES IPT-сенсоры

Впервые процесс внутримолекулярного переноса протона в возбужденном состоянии (Excited state intramolecular proton transfer, ES IPT) был описан Уэллером в 1950-х годах для салициловой кислоты [114]. Этот механизм обычно наблюдается в тех молекулах, где донор и акцептор протонов находятся в непосредственной близости. Таким образом, протоны могут мигрировать из одной группы в другую, что приводит к образованию таутомерной формы, которая испускает свет со значительным сдвигом в сторону больших или меньших длин волн [69]. Фотофизический и фотохимический процесс переноса протона вызывает заметный Стоксов сдвиг вплоть до 200 нм [115]. Молекулы, демонстрирующие ES IPT, представляют интерес для создания ратиометрических сенсоров, поскольку они могут демонстрировать два изменяющихся канала испускания. Один из них отвечает флуоресценции возбужденной нормальной формы ( $E^*$ ), а другой возбужденной таутомерной форме ( $K^*$ ) (рис. 18) [101]. При фотовозбуждении электронный заряд таких молекул может перераспределяться, что приводит к большей кислотности группы-донора водородной связи и повышенной основности акцептора водородной связи. В результате происходит чрезвычайно быстрая фототаутомеризация енола в кето-форму ( $K_{ES IPT} > 10^{12} \text{ c}^{-1}$ ) [115], при этом возбужденная енольная форма ( $E^*$ ) быстро преобразуется в возбужденную кетоформу ( $K^*$ ) (рис. 18). После излучательной релаксации обратно в основное электронное состояние, происходит обратный перенос протона с образованием исходной формы  $E$  (рис. 18).

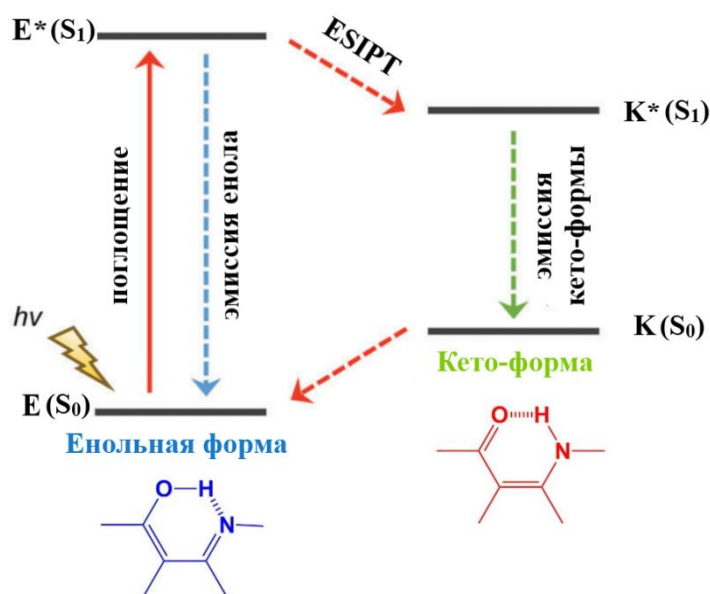
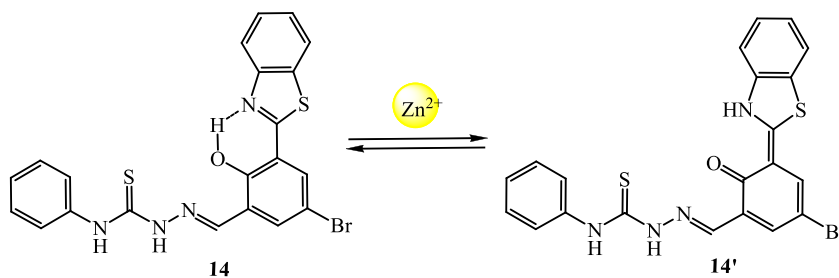


Рис. 18. Энергетическая диаграмма процесса ESIPT

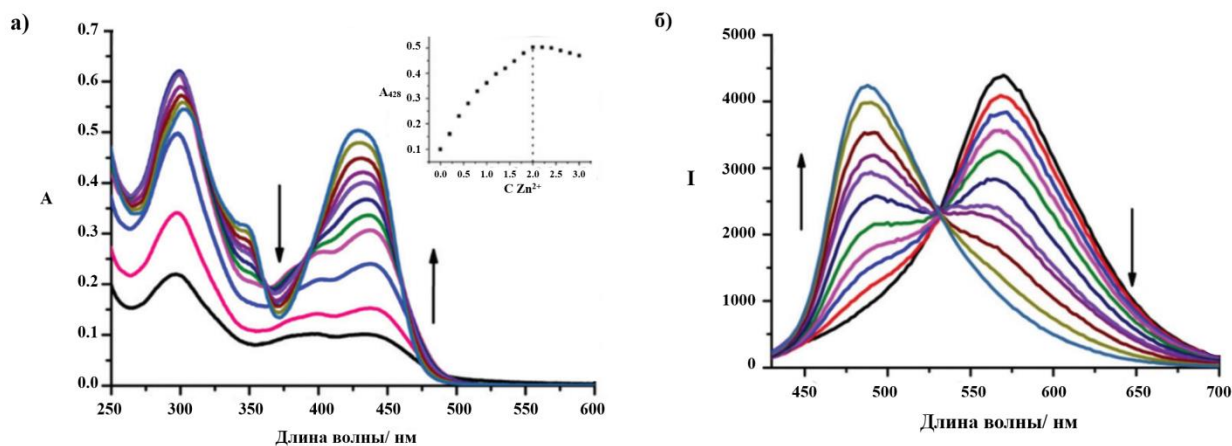
Одна из стратегий разработки флуоресцентных зондов с механизмом ESIPT основана на блокировании донора водородной связи во флуорофоре с помощью агента, специфичного для предотвращения процесса ESIPT. В результате наблюдается только более коротковолновая эмиссия енола (*E*), поскольку доступные протоны для обмена отсутствуют [115]. В работе [116] представлен сенсор **14** на катион  $Zn^{2+}$ , работающий по данному механизму, в котором сигнальным фрагментом выступает флуорофор 2-(2'-гидроксифенил)бензотиазол (схема 12).

Схема 12



Спектроскопические исследования проводились в системе метанол – вода, в которой соединение **14** демонстрировало два отдельных пика поглощения, расположенных при 396 нм и 432 нм соответственно (рис. 19а). Добавление ионов  $Zn^{2+}$  приводило к образованию новой интенсивной полосы при 428 нм. Абсорбционное титрование показало, что максимальная интенсивность поглощения достигается при одном эквиваленте  $Zn^{2+}$ , что свидетельствует о стехиометрии связывания 1:1 (рис. 19б). Спектр испускания **14** состоит из двух полос – слабой полосы при 488 нм, соответствующей енолу **14** и интенсивной полосы при 570 нм, которая предположительно относится к кето-таутомеру **14'**. Примечательно, что разница в максимумах между двумя наблюдаемыми пиками эмиссии достаточно велика (82 нм, рис 19б). При добавлении

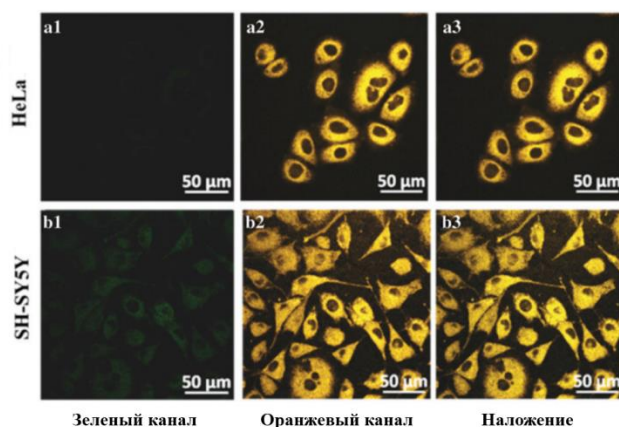
ионов различных металлов, только  $Zn^{2+}$  вызывал заметное увеличение интенсивности испускания при 488 нм с одновременным уменьшением интенсивности флуоресценции при 570 нм. Связывание **14** с  $Zn^{2+}$  блокирует процесс ESIPT, в результате чего наблюдается только эмиссия енола на 488 нм. Полученные в ходе спектрофлуориметрического титрования данные отношения интенсивностей флуоресценции  $I_{488}/I_{570}$  в зависимости от концентрации  $Zn^{2+}$  показали хорошую линейную зависимость в диапазоне концентраций 0.04–4.0 мкМ, что позволило количественно определять концентрацию  $Zn^{2+}$  ратиометрическим методом. Также был рассчитан предел обнаружения  $Zn^{2+}$  равным  $3.87 \cdot 10^{-7}$  М, что намного ниже ПДК  $Zn^{2+}$  для питьевой воды (76 мкМ). Константа связывания составила  $4.155 \cdot 10^4$  л моль<sup>-1</sup>. Более того, спектральные изменения сенсора **14** оказались обратимы после поочередного добавления  $Zn^{2+}$  и EDTA, что указывает на его потенциал для мониторинга концентрации  $Zn^{2+}$  в режиме реального времени. Показано, что присутствие посторонних катионов не влияло на сенсорные свойства **14**, за исключением ионов  $Hg^{2+}$  и  $Cu^{2+}$ , присутствие которых вызывало гашение флуоресценции. Авторами работы было предложено добавлять ионы  $S^{2-}$  в качестве маскирующего агента для устранения влияния катионов меди и ртути.



**Рис. 19.** Спектры поглощения (а) и флуоресценции (б) **14** (4 мкМ) при возрастающей концентрации  $Zn^{2+}$  (0–1 экв),  $\lambda_{ex} = 362$  нм. Вставка (а): график поглощения при 428 нм в зависимости от  $Zn^{2+}$ . Рисунок взят и адаптирован из [116].

Практическое применение красителя **14** изучалось на клеточной линии HeLa. Как показано на рис. 20, клетки, инкубированные **14**, демонстрировали интенсивную флуоресценцию в оранжевом канале и незначительную флуоресценцию в зеленом канале. При дополнительной инкубации клеток ионами  $Zn^{2+}$ , появлялось зеленое испускание, интенсивность которого постепенно увеличивалась, в то время как оранжевая флуоресценция затухала. Более того, клетки, предварительно инкубированные **14** и  $Zn^{2+}$ , после дополнительной обработки EDTA демонстрировали сильное гашение эмиссии в зеленом канале. Таким образом, наблюдаемое изменение цвета флуоресценции с

оранжевого на зеленый было обусловлено образованием комплекса между **14** и  $Zn^{2+}$ . Следовательно, краситель **14** позволяет определять экзогенные ионы  $Zn^{2+}$  в живых клетках с помощью ратиометрического метода. Также изучено применение сенсора **14** для эндогенного распознавания цинка в живых клетках. Для этого в качестве модельных были выбраны клетки нейробластомы SH-SY5Y с относительно высоким уровнем содержания эндогенного  $Zn^{2+}$ , а клетки HeLa с низким уровнем эндогенного  $Zn^{2+}$  выступали в качестве контраста для флуоресцентной визуализации. На рис. 20 показано, что клетки HeLa, обработанные **14**, обладают очень слабой флуоресценцией в зеленом канале. И напротив, клетки нейробластомы SH-SY5Y, обработанные **14**, продемонстрировали заметное увеличение зеленой эмиссии. Таким образом, относительное соотношение интенсивности зеленого и оранжевого каналов флуоресценции выше для клеток SH-SY5Y по сравнению с клетками HeLa, что означает, что зонд **14** имеет высокий потенциал для мониторинга эндогенного уровня  $Zn^{2+}$  в живых клетках.



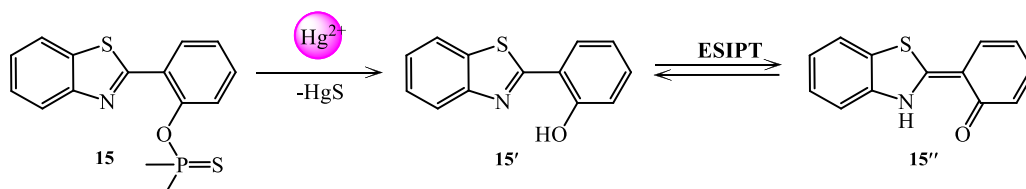
**Рис. 20.** Флуоресцентные изображения (а) клеток HeLa и (б) клеток нейробластомы SH-SY5Y, окрашенных 10 мкМ **14** в течение 12 ч ( $\lambda_{ex} = 405$  нм, зеленый канал: 468–508 нм и оранжевый канал: 550–590 нм). Рисунок взят и адаптирован из [116].

Несмотря на все достоинства сенсоров данного типа, они не всегда являются подходящими для ратиометрической визуализации в биологических объектах из-за гипсохромного сдвига полос в спектре флуоресценции. По сравнению с флуоресцентной визуализацией в видимом спектре (400–700 нм), флуоресцентная визуализация в ближнем инфракрасном окне (700–1700 нм) предлагает такие значительные преимущества как уменьшение рассеивания фотонов, меньшее поглощение и минимальное влияние автофлуоресценции [117]. Визуализация в ближнем инфракрасном диапазоне обеспечивает высокое разрешение и соотношение сигнал/ шум, а также обладает большим потенциалом в молекулярной диагностике и терапии.

Во избежание нежелательного смещения в синюю часть спектра, могут быть использованы флуоресцентные хемодозиметры, работающие по механизму ESIPT. В

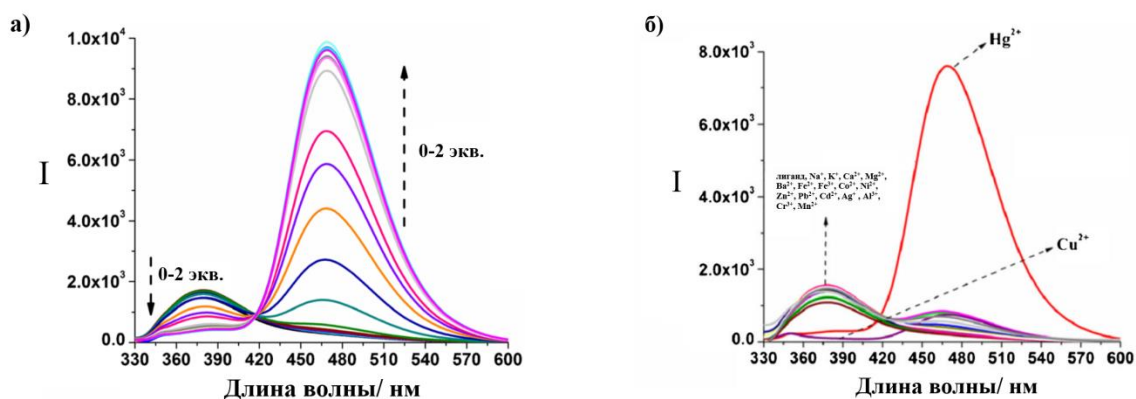
таком сенсоре изначально отсутствует процесс ESIPT, и он демонстрирует коротковолновую эмиссию. Однако в его структуре содержится функциональная группа, которая может вступать в химическую реакцию под действием катиона металла, образуя далее новый краситель, способный к ESIPT и, соответственно, имеющий более длинноволновое излучение [73]. Жанг с коллегами разработали хемодозиметр данного типа на основе бензотиазола для ратиометрического обнаружения  $\text{Hg}^{2+}$  (схема 13) [118]. Спектральные свойства зонда **15** изучались в растворе ацетонитрил – HEPES при pH 7.4. Соединение **15** обладает флуоресценцией с максимумом в области 377 нм при возбуждении светом с длиной волны 310 нм. После добавления десяти эквивалентов  $\text{Hg}^{2+}$ , излучение при 377 нм уменьшилось, и одновременно появлялся значительный пик эмиссии на 470 нм (рис. 21а), соответствующий кето-форме. Это указывает на то, что химическая реакция между  $\text{Hg}^{2+}$  и рецептором (тиофосфинированным фенолом) начинается при этой минимальной концентрации. В то же время хемодозиметр **15** продемонстрировал высокую избирательность по отношению к  $\text{Hg}^{2+}$ , так как химический процесс завершился за одну минуту. При постепенном увеличении концентрации  $\text{Hg}^{2+}$ , отношение интенсивности флуоресценции ( $I_{470}/I_{377}$ ) увеличивалось и достигало плато примерно при добавлении двух эквивалентов  $\text{Hg}^{2+}$  (рис. 21а). Также был рассчитан предел обнаружения зонда **15** для определения  $\text{Hg}^{2+}$ , который составил 12 нМ.

### Схема 13



Селективность **15** оценивалась в присутствии ряда катионов металлов (рис. 21б). Показано, что только добавление десяти эквивалентов  $\text{Hg}^{2+}$  вызывало заметное увеличение отношения флуоресценции ( $I_{470}/I_{377}$ ), в то время как добавка того же количества ионов других металлов не давала никакого ответа. Эксперименты по конкурентному добавлению катионов металлов к **15** с  $\text{Hg}^{2+}$  подтвердили, что присутствие других ионов металлов оказывает очень низкое влияние на обнаружение  $\text{Hg}^{2+}$ , только наличие  $\text{Cu}^{2+}$  вызывает незначительные изменения во флуоресцентном отклике **15** на  $\text{Hg}^{2+}$ . Авторы работы предположили, что это может быть связано с эффектом тушения флуоресценции парамагнитным катионом  $\text{Cu}^{2+}$ . Кроме того, были проведены эксперименты по изучению обратимости химической реакции с  $\text{Hg}^{2+}$  путем добавления KI. При добавлении двух эквивалентов KI к раствору **15** с  $\text{Hg}^{2+}$ , интенсивность флуоресценции при 470 нм практически не изменилась, что указывает на необратимость

химической реакции **15** с  $\text{Hg}^{2+}$ . Практическая применимость зонда **15** изучалась на клеточной линии TE1. Внутри живых клеток TE1 наблюдалась только очень слабая флуоресценция **15**. После инкубации  $\text{Hg}^{2+}$  внутриклеточная эмиссия разгоралась.



**Рис. 21.** (а) Спектры флуоресценции **15** (10 мкМ) при постепенном повышении концентрации  $\text{Hg}^{2+}$  (0–2 экв.). (б) Спектры флуоресценции **15** (10 мкМ) в присутствии 10 экв. различных катионов металлов. Система  $\text{CH}_3\text{CN}$ : HEPES (10 мМ, pH=7.4),  $\lambda_{ex} = 310$  нм. Рисунок взят и адаптирован из [118].

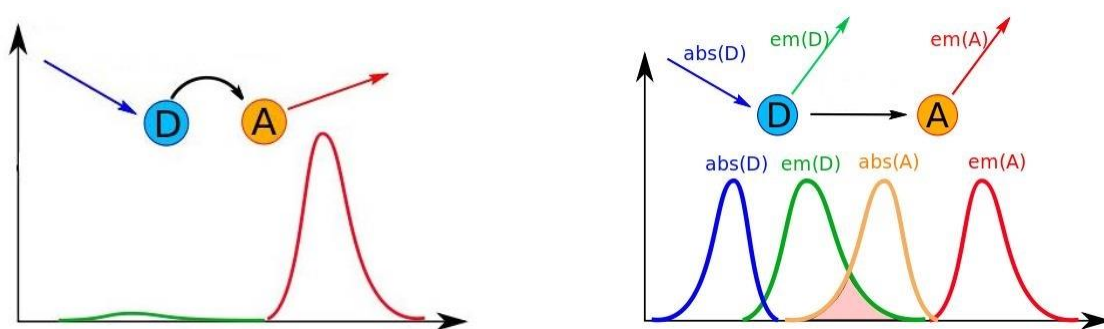
Результаты данного исследования продемонстрировали, что зонд **15** является селективным и потенциально перспективным для флуоресцентной визуализации  $\text{Hg}^{2+}$  в биологических образцах. Однако внутриклеточная концентрация  $\text{Hg}^{2+}$  посчитана не была, а обнаружение катионов ртути имело только качественную характеристику. Аналогичные хемодозиметры на катионы ртути и меди [119] являются хорошим альтернативным решением хемосенсорам из-за возможного тушения эмиссии последних при комплексообразовании. Использование хемодозиметров оправдано в том случае, когда отсутствует другой инструмент обнаружения и от анализа не требуется постоянный мониторинг концентрации аналита в режиме реального времени.

## 2.2 Бисхромофорные ратиометрические катионные сенсоры

Новым направлением в области создания ион-активных молекулярных устройств с переключаемыми спектральными характеристиками является разработка бисхромофорных хемосенсоров [120]. Бисхромофорные сенсоры состоят из двух фотоактивных фрагментов, соединенных спейсером. Один из хромофорных фрагментов соединен с рецепторной группой, ответственной за связывание с ионом. Соединения такого типа обладают рядом преимуществ для использования в качестве флуоресцентных индикаторов в биологических исследованиях. Сочетание двух фотоактивных молекулярных фрагментов в структуре сенсора позволяет добиться большого различия в длинах волн возбуждения и испускания за счет резонансного переноса энергии RET (Resonance Energy Transfer) между хромофорами, что является важным для регистрации отклика на комплексообразование методом конфокальной флуоресцентной микроскопии,

а также – внутренней калибровки генерируемого оптического сигнала, что открывает возможность для ратиометрического определения концентрации аналита [102]. Использование резонансного переноса энергии электронного возбуждения RET между хромофором-донором (ХД) и хромофором-акцептором (ХА) представляет собой весьма удачную стратегию для достижения ратиометрического флуоресцентного отклика [50; 54; 121].

В случае бисхромофорных RET-хемосенсоров взаимодействие с субстратом вызывает изменение эффективности резонансного переноса энергии ( $\Phi_{RET}$ ) в системе, что в свою очередь приводит к изменению отношения интенсивностей эмиссионных пиков ХД и ХА в спектре. RET-процесс реализуется в молекуле, содержащей два флуорофорных фрагмента, то есть в такой системе поглощает один флуорофор, а флуоресцирует другой. Применению резонансного переноса энергии в биохимии и молекулярной биологии посвящено огромное число работ. С его помощью можно определять расстояние на макромолекулярном уровне и анализировать конформационные изменения биомолекул в режиме реального времени, изучать ферментативные процессы гидролиза, слияния липидных везикул [122]. Обязательным элементом структуры флуоресцентного RET-хемосенсора является наличие двух пространственно сближенных хромофоров на расстоянии до 10 нм (рис. 22а), один из которых является донором энергии, а второй акцептором энергии поглощенного света [123]. Также для осуществления эффективного безызлучательного переноса энергии необходима резонансная подстройка фрагментов ХД и ХА, а именно, спектр флуоресценции хромофора-донора должен в той или иной степени перекрываться со спектром поглощения акцептора (рис. 22) [56].



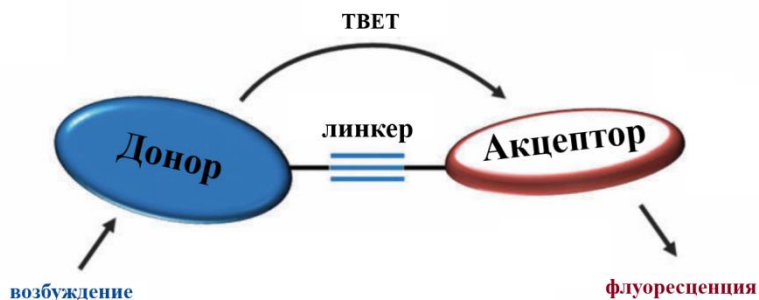
**Рис. 22.** (а) Схема резонансной передачи энергии; (б) Схема перекрывания спектров поглощения и флуоресценции донора и акцептора.

RET-процесс бывает двух видов: резонансный перенос энергии по Фёрстеру (Forster Resonance Energy Transfer, FRET) и обменно-резонансный перенос энергии по Декстеру. Перечисленные условия реализации процесса (перекрывание спектров и расстояние менее 10 нм) относятся как к механизму Декстера так к механизму Ферстера, они оба резонансные. Основное различие в реализации данных механизмов – расстояние

между хромофорами. Процесс FRET реализуется на расстояниях 1–10 нм. На таком расстоянии перекрывания электронных оболочек хромофоров не наблюдается, происходит взаимодействие через пространство. Менее 1 нм происходит резонансный перенос по механизму Декстера, который требует перекрывания электронных оболочек донора и акцептора [123]. В случае, когда расстояние между фотоактивными фрагментами сопоставимо с их размерами (что часто имеет место в молекулах с небольшим спейсером), могут реализовываться оба механизма одновременно, различить которые крайне сложно. Поэтому далее в работе будет использована аббревиатура RET для обозначения процесса резонансного переноса энергии. В общем случае механизм функционирования сенсорной RET-системы заключается в том, что связывание рецептора с анализируемым субстратом обеспечивает модуляцию эффективности переноса энергии вследствие изменения степени перекрывания спектров испускания ХД и поглощения ХА, расстояния между ними, а также за счет усиления или ингибирования других процессов, составляющих в фотовозбужденном состоянии конкуренцию RET-взаимодействию. Исходя из анализа литературных данных, изменение расстояния между двумя хромофорами как параметр, влияющий на эффективность переноса энергии, практически не используется при создании ратиометрических сенсоров. Так как размер молекулы сенсора небольшой, при изменении расстояния между ХД и ХА, эффективность переноса энергии сильно не изменяется, что вызывает слабый спектральный отклик или его отсутствие при связывании с аналитом. Поэтому у большинства хемосенсоров механизм возникновения ратиометрического отклика основан на изменении спектрального перекрывания ХД и ХА. Происходящее при комплексообразовании возмущение фотофизических параметров системы оказывает влияние на вид стационарных спектров флуоресценции, что используется в качестве аналитического сигнала.

Еще одним механизмом переноса энергии является перенос энергии через связь ТВЕТ (Through-bond energy transfer). Процесс представляет собой безызлучательную передачу энергии от возбужденного ХД к ХА через  $\pi$ -систему электронно-сопряженного жесткого линкера, который выводит донорный и акцепторный фрагменты из копланарности [124]. Типичный хемосенсор на основе ТВЕТ обычно состоит из донора энергии, акцептора энергии и сопряженного жесткого линкера  $\pi$ -системы. Хотя ТВЕТ аналогичен RET, он не ограничен требованием RET о том, что спектр излучения донора должен перекрываться со спектром поглощения акцептора [125]. RET-процесс подразумевает внутримолекулярный перенос энергии через пространство за счет отсутствия сопряжения между донорным и акцепторным флуорофорами. В то время как в ТВЕТ-процессе перенос энергии в основном происходит через связи, при которых энергия

передается от донорной группы к акцепторной через электронно-сопряженный жесткий линкер  $\pi$ -системы (рис. 23). Как правило, линкер представляет собой электронно-сопряженный спейсер, что гарантирует эффективную передачу энергии через связь от донора к акцептору вместо образования одного сопряженного хромофора. Чаще всего спейсер состоит из фенильной группы или тройной связи, которые могут успешно выводить донорную и акцепторную группы из компланарности [121].



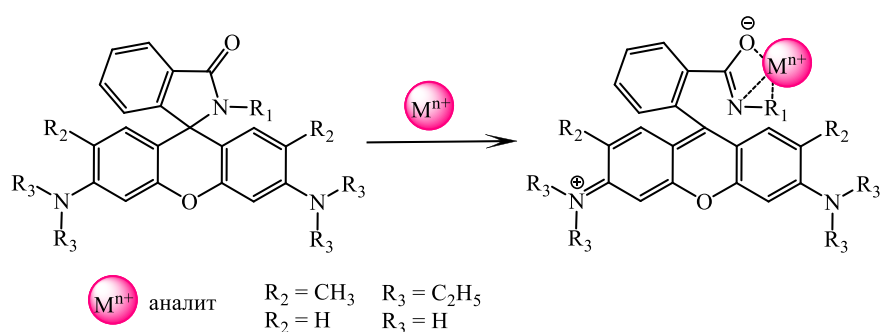
**Рис. 23.** Схема передачи энергии через сквозную связь

Известно, что для эффективности RET-процесса необходимо существенное спектральное перекрытие полос донорного излучения и акцепторного поглощения, что иногда ограничивает выбор и конструкцию молекул-зондов на основе RET [126]. В то время как в случае сенсоров на основе переноса энергии через связь (ТВЕТ) спектральное перекрытие между полосой излучения донора и полосой поглощения акцептора не требуется, хотя красители также демонстрирует большие псевдостоксовы сдвиги [121]. Однако, стоит отметить, что в большинстве системах на основе переноса энергии, в которых донор и акцептор объединены в одну молекулу, может сосуществовать как RET так и ТВЕТ, внося свой вклад в скорость передачи, особенно при наличии короткого линкера между ними. Определение механизма переноса энергии – это непростая задача: в каждом конкретном случае требуется детальный анализ фотофизических свойств соединения, проведение время-разрешенных оптических экспериментов достаточно высокого уровня. Как правило, авторы работ по ТВЕТ не проводят определение механизма переноса энергии, считая, что при наличии сопряженного линкера реализуется ТВЕТ по умолчанию. Также механизм ТВЕТ до сих пор не изучен до конца и не выделен так же тщательно, как механизм RET. Несмотря на свою неоднозначность, системы на основе ТВЕТ привлекают внимание исследователей и находят применение в сфере оптических материалов, фотосинтетических моделей [127], биотехнологии [128] и хемосенсорах [121]. Далее будут рассмотрены примеры ратиометрических ион-активных систем, в которых механизм возникновения оптического отклика включает процесс переноса энергии.

### 2.2.1. Бисхромофорные сенсоры, в которых модуляция эффективности RET достигается за счет изменения степени перекрытия спектральных полос

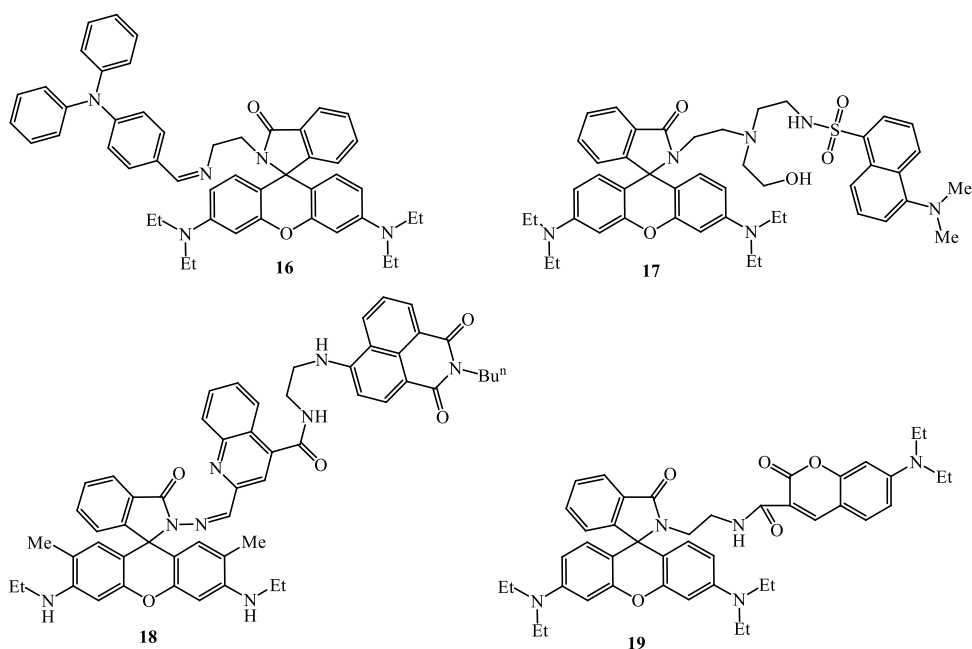
В современной литературе большинство описанных ратиометрических сенсоров основаны на паре родаминовый краситель плюс второй хромофор. Родамины остаются одними из самых востребованных флуорофоров, а их модифицированные производные могут иметь длины волн испускания в красной/ближней ИК-области спектра [78]. Данный тип красителей используются повсеместно в сфере химических, биохимических, биологических и медицинских исследований. Кроме того, такие свойства производных родамина как высокая биосовместимость и интенсивная флуоресценция делают их отличным выбором для создания биосенсоров. Как показано на схеме 14, связывание сенсора и целевого иона вызывает раскрытие кольца спиролактама, что индуцирует колориметрический и/или флуоресцентный отклик, которые обычно не наблюдаются до координации с аналитом (схема 14).

Схема 14



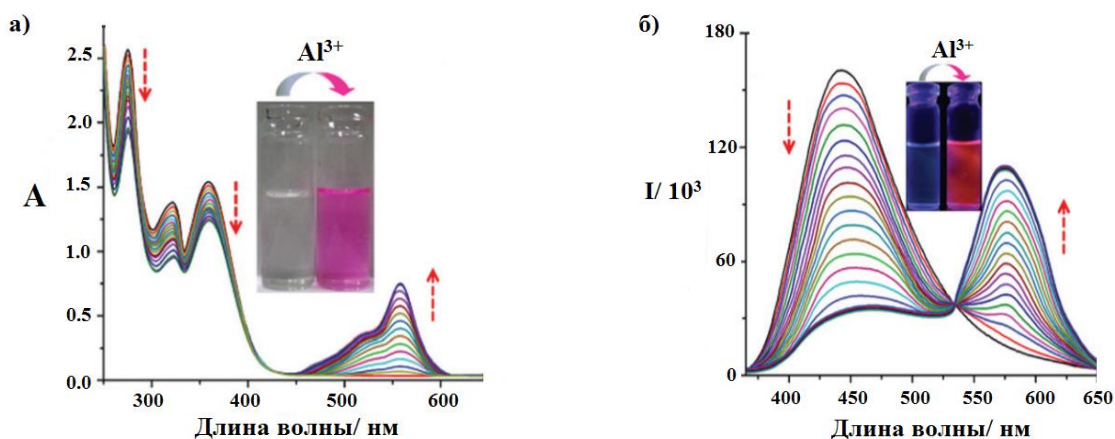
Как правило, бесцветный и нефлуоресцентный родамин становится красным и демонстрирует сильную флуоресценцию, когда его замкнутое спирокольцо открывается за счет комплексообразования с металлом или воздействия кислых сред [78]. Наиболее распространенными механизмами образования спектрального отклика у сенсоров на основе родамина являются фотоиндуцированный перенос электрона PET [129], внутримолекулярный перенос заряда ICT [130] и резонансный перенос энергии RET [131]. Общий принцип работы таких RET-сенсоров хорошо иллюстрируют примеры **16** и **17** (схема 15). Описанный в работе [132] ратиометрический хемосенсор **16** синтезирован для специфического обнаружения  $Al^{3+}$  на основе RET-пары «трифениламин (донор) – родамин В (акцептор)». Свободный лиганд **16** имеет характерные полосы поглощения при 275 нм и 352 нм (рис. 24а). Отсутствие поглощения при 550 нм указывает на то, что родаминовый фрагмент существует в закрытой спиролактаманной форме. При постепенном добавлении  $Al^{3+}$ , пики при 275 и 352 нм уменьшаются с появлением нового пика при 550 нм, характерный для раскрытого спирокольца, что сопровождалось изменением цвета раствора **16** с бесцветного на пурпурный (рис. 24а, вставка).

## Схема 15



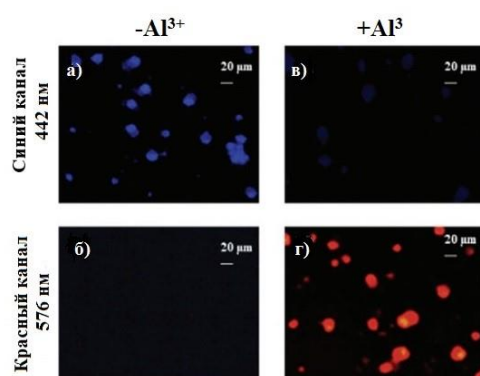
При сближении в пространстве фрагментов трифениламина и родамина-В, в сенсоре **16** потенциально должен реализовываться резонансный перенос энергии RET. В несвязанном состоянии **16** родамин находится в форме спиролактама. При возбуждении на 350 нм свет поглощается и испускается исключительно трифениламинным фрагментом, при этом RET-процесс не наблюдается. Авторы исследования предполагают, что при связывании  $Al^{3+}$  с атомами азота иминов и атомом кислорода амидной группы, спиролактамовое кольцо открывается, индуцируя эмиссию при 576 нм из-за RET-процесса между трифениламином и родамином. Поскольку при комплексообразовании происходит RET, сделаны выводы, что  $Al^{3+}$  координируется как по родаминовому фрагменту, так и с атомом азота трифениламино-группы, сближая тем самым флуорофоры в пространстве и индуцируя RET. Эффективность RET-процесса составила 44% для комплекса с алюминием. В результате переноса энергии наблюдается эмиссия родаминового хромофора при 576 нм, а отношение интенсивностей  $I_{576}/I_{442}$  позволяет количественно определять  $Al^{3+}$ . Был рассчитан ПО  $Al^{3+}$ , который составил  $6.7 \cdot 10^{-8}$  М, и значение константы ассоциации  $K_a = 5.9 \cdot 10^5$  М<sup>-1</sup>. Кроме того комплекс **16** с катионом алюминия показывает обратимое связывание с деметаллированием в присутствии ЭДТА с практически полностью возобновляемым ратиометрическим откликом на  $Al^{3+}$ . Избирательность **16** исследовали в присутствии ряда катионов металлов ( $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Cr^{3+}$  и  $Mn^{2+}$ ). Показано, что **16** обладает высокой селективностью по отношению к  $Al^{3+}$  по сравнению с другими катионами металлов, включая  $Fe^{3+}$  и  $Cr^{3+}$ . Происхождение селективности к  $Al^{3+}$  по

сравнению с другими катионами металлов авторы работы отнесли с размером связывающей полости, предоставляемой родамином и трифениламиновыми фрагментами.



**Рис. 24.** Спектральные изменения **16** при постепенном добавлении  $\text{Al}^{3+}$  (от 0 до 1.5 экв.), **16** (20 мМ) в  $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ , буфер HEPES (10 мМ), pH 7.2. (а) Электронные спектры поглощения **16**, (б) спектры испускания **16**,  $\lambda_{\text{ex}} = 350$  нм. Рисунок взят и адаптирован из [132].

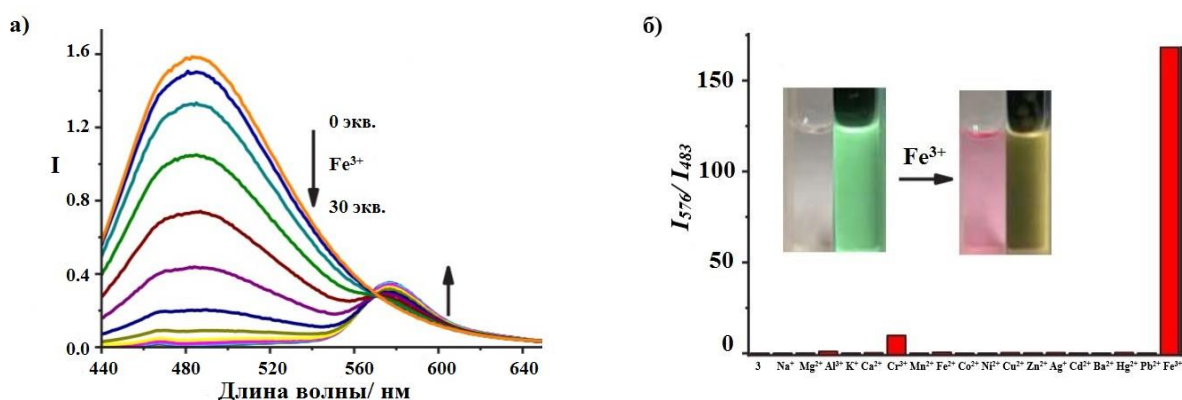
Биологические исследования соединения **16** проводили на клеточной линии мононуклеарных клеток крови человека РВМС. При обработке только красителем **16**, клетки проявляли интенсивную синюю флуоресценцию и очень слабую флуоресценцию в красном канале (рис. 25а, б). Однако после добавления  $\text{Al}^{3+}$  наблюдалась отчетливая флуоресценция в красном канале и затухание эмиссии синего канала (рис. 25в, г соответственно), что указывает на взаимодействие **16** и  $\text{Al}^{3+}$ . Авторами работы были также измерены средние интенсивности флуоресценции внутри клеток с помощью программы ImageJ, которые демонстрировали аналогичное поведение. Результаты данной работы показали, что сенсор **16** можно использовать в качестве эффективного флуоресцентного зонда для ратиометрического обнаружения *in vitro* иона  $\text{Al}^{3+}$ .



**Рис. 25.** Флуоресцентные изображения клеток РВМС с 10 мМ **16**, (а, б) без  $\text{Al}^{3+}$  и (в, г) с  $\text{Al}^{3+}$  (10 мМ). Изображения были получены в синем (излучение на длине волны 442 нм) и красном (излучение на длине волны 576 нм) каналах.  $\lambda_{\text{ex}} = 350$  нм. Рисунок взят и адаптирован из [132].

Ратиометрический флуоресцентный зонд **17** представлен в сообщении [133]. Сенсор разработан на основе родамина и производного дансиламида (схема 15). Свободное соединение **17** имеет широкую полосу поглощения от 200 до 420 нм с

несколькими пиками при 250, 270 и 320 нм и полосу испускания дансиламида с максимумом на 483 нм при возбуждении на 405 нм. Отсутствие флуоресценции родамина указывает на то, что между ним и фрагментом дансиламида не возникает RET-процесс. После воздействия  $\text{Fe}^{3+}$  появилась новая полоса поглощения при 561 нм, соответствующая открытой форме родаминового красителя. Флуоресцентное титрование сенсора **17** с  $\text{Fe}^{3+}$  показало заметное снижение эмиссии дансиламида при 483 нм и сопутствующее незначительное разгорание флуоресценции родамина при 576 нм (рис. 26а). Предполагается, что  $\text{Fe}^{3+}$  координируется с тремя атомами азота и атомом кислорода фрагмента гидроксиэтилдиэтилентриамина, что индуцирует раскрытие кольца спиролактама и RET-процесс от дансиламида к родамину. Эффективность переноса энергии в комплексе **17** с  $\text{Fe}^{3+}$  составила  $\sim 99\%$ . Примечательно, что, несмотря на парамагнитную природу  $\text{Fe}^{3+}$ , снижающую квантовый выход флуоресценции, наблюдалось хоть и незначительное, но отчетливое разгорание эмиссии родамина. Действительно, было показано, что квантовый выход комплекса **17** с  $\text{Fe}^{3+}$  в этаноле ( $\sim 23.62\%$ ) намного ниже, чем у родамина ( $\sim 66\%$ ) в этаноле, что согласовывается с эффектом тушения  $\text{Fe}^{3+}$ . Эффект флуоресцентного тушения у дансиламида и родамина, скорее всего, обусловлен влиянием  $\text{Fe}^{3+}$  на эмиссионное поведение обоих флуорофоров.

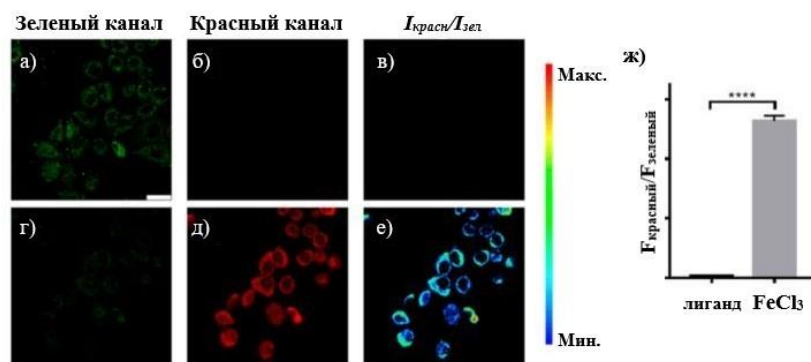


**Рис. 26.** (а) Спектрофлуориметрическое титрование  $\text{Fe}^{3+}$  раствора **17** (10 мкМ,  $\lambda_{ex} = 405$  нм). (б) Отношение интенсивностей эмиссии  $I_{576}/I_{483}$  раствора **17**, в присутствии различных ионов металлов (10 мкМ,  $\lambda_{ex} = 405$  нм). Вставка (б): фотографии растворов **17** в отсутствие или в присутствии  $\text{Fe}^{3+}$  при дневном свете и свете УФ (365 нм). Рисунок взят и адаптирован из [133].

Отношение интенсивностей испускания  $I_{576}/I_{483}$  **17** в присутствии десяти эквивалентов  $\text{Fe}^{3+}$  имело значение примерно равное 170, в то время как у свободного лиганда **17** составляло всего лишь  $\sim 0.02$  (рис. 26б). Добавление  $\text{Fe}^{3+}$  вызвало изменение цвета раствора с бесцветного на розовый и изменение цвета флуоресценции с зеленой на оранжевую при облучении УФ-лампой (365 нм) (рис. 26б). Константа ассоциации  $K_a$  **17** с  $\text{Fe}^{3+}$  была найдена равной  $3.91 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ , значение предела обнаружения составило 0.13 мкМ. Добавление ионов различных металлов,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,

$Zn^{2+}$ ,  $Ag^+$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$ ,  $Cr^{3+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Pb^{2+}$ , а также  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ , не вызывало заметных изменений в значении  $I_{576}/I_{483}$ , за исключением небольшого увеличения, вызванного  $Cr^{3+}$  (рис. 26б). Ратиометрический отклик на присутствие  $Fe^{3+}$  был также исследован в присутствии данного ряда катионов металлов. Показано, что почти все протестированные катионы не влияли на ратиометрический отклик **17**, за исключением  $Hg^{2+}$ . Добавление  $Hg^{2+}$  явно уменьшало индуцированное  $Fe^{3+}$  увеличение отношения  $I_{576}/I_{483}$ . Кроме того, эмиссия **17**, индуцируемая  $Fe^{3+}$ , может быть восстановлена до уровня свободного лиганда путем смешивания с *N,N,N',N'*-тетраakis(2-пиридилметил)этилендиамином (TPEN), с последующей способностью связывать  $Fe^{3+}$  как минимум еще три цикла.

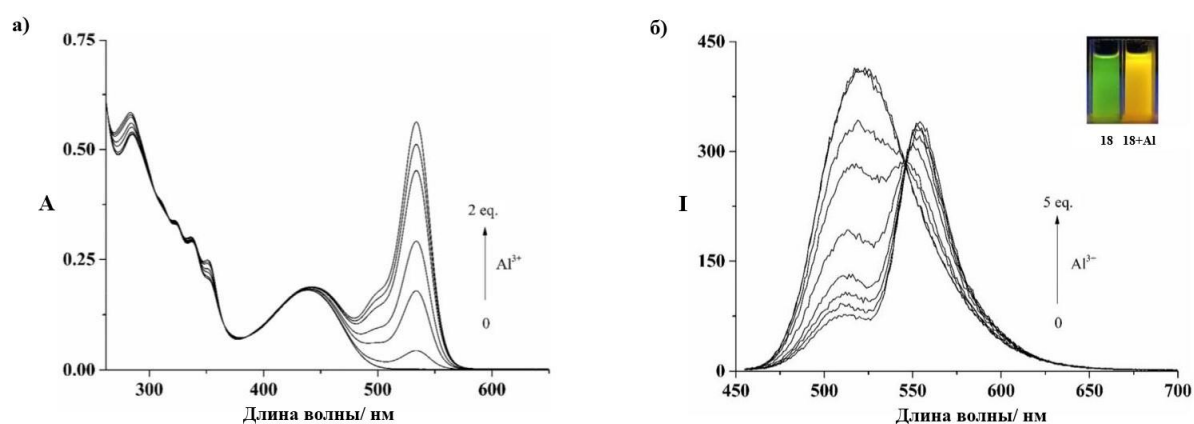
Была проанализирована возможность применения сенсора **17** для биовизуализации  $Fe^{3+}$  на клетках HeLa. Как показано на рисунках 27а, б, окрашенные красителем **17** клетки HeLa демонстрировали интенсивную флуоресценцию дансиламида в зеленом канале и незначительную флуоресценцию родамина В в красном канале. После того, как клетки дополнительно инкубировали  $Fe^{3+}$ , наблюдалась яркая флуоресценция в красном канале и слабая эмиссия в зеленом канале (рис. 27д, г). Отношение интенсивностей внутриклеточного сигнала  $I_{крас}/I_{зел}$  в присутствии  $Fe^{3+}$  было рассчитано равным  $\sim 5$  (рис. 27в, е), что значительно выше, чем у контрольных клеток без  $Fe^{3+}$  ( $>50$  раз). Приведенные данные позволяют предположить, что **17** может быть многообещающим ратиометрическим агентом для обнаружения  $Fe^{3+}$  в живых клетках.



**Рис. 27.** Флуоресцентная визуализация клеток HeLa, окрашенных **17** (10 мкМ): (а-в) клетки, окрашенные только **17**; (г-е) клетки, окрашенные **17**, дополнительно инкубированные с 300 мкМ  $FeCl_3$  в течение 6 мин. (а и г) Изображения зеленого канала, полученные в диапазоне 440–500 нм при  $\lambda_{ex} = 405$  нм. (б и д) Изображения красного канала, полученные в диапазоне 570–630 нм при  $\lambda_{ex} = 561$  нм. (в, е) Соответствующие изображения, показывающие отношение интенсивностей  $I_{крас}/I_{зел}$ . (ж) Среднее отношение  $I_{крас}/I_{зел}$  на изображениях в частях (в) и (е). Масштабная метка 25 мкм. Рисунок взят и адаптирован из [133].

В исследовании [134] разработан ратиометрический флуоресцентный хемосенсор **18** для селективного обнаружения  $Al^{3+}$ . Молекула **18** состоит из донора энергии – нафталимида, акцептора – родамина и фрагмента 2-метилхиолин-4-карбоновой кислоты, выполняющего роль спейсера и рецепторной группы (схема 15). Как показано на рис. 28а,

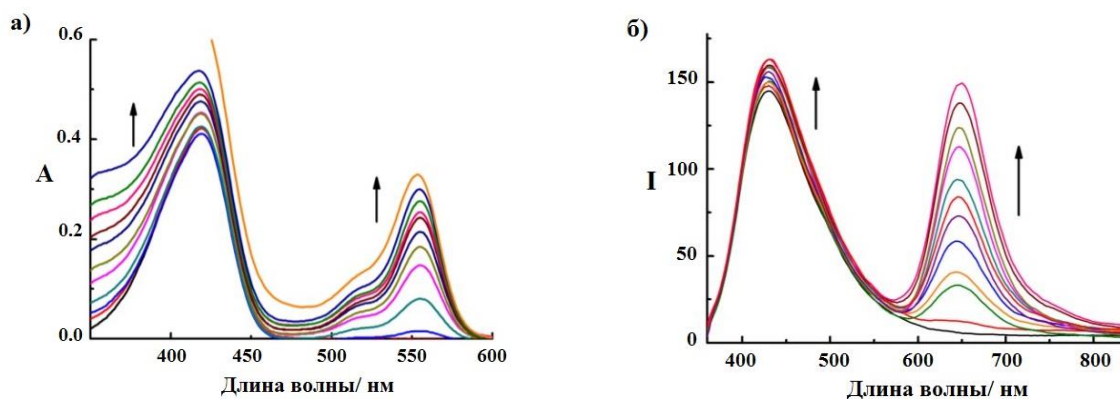
лиганд **18** демонстрирует интенсивное поглощение при 440 нм в этаноле, отвечающий нафталимидному хромофору. С увеличением концентрации  $Al^{3+}$  появляется новый пик поглощения при 530 нм, соответствующий фрагменту родамина с открытым спирокольцом. На основании измерения поглощения в этаноле был определен состав связывания **18** с  $Al^{3+}$  равным 1:2. В спектрах флуоресценции при возбуждении **18** на 454 нм, родаминовое ядро находится в замкнутой форме, в результате чего его характерное испускание при 550 нм не наблюдается (рис. 28б). Присутствует лишь эмиссия на 524 нм, соответствующая нафталимидному фрагменту, что говорит об отсутствии переноса энергии между двумя хромофорами. В присутствии  $Al^{3+}$ , появляется новая полоса флуоресценции при 550 нм, принадлежащая открытому родаминовому фрагменту, а эмиссия при 524 нм постепенно уменьшается, изменяя цвет с зеленого на оранжевый (рис. 28б вставка). Это связано с тем, что  $Al^{3+}$  не только запускает раскрытие спирокольца, но и координируется с -NH-фрагментом, индуцируя RET-процесс с нафталимидного хромофора на родамин. По данным флуоресцентного титрования, был рассчитан предел обнаружения **18** для  $Al^{3+}$  равным  $4.47 \cdot 10^{-7}$  моль/л. Представленные результаты делают сенсор **18** перспективным для обнаружения микромолярных концентраций  $Al^{3+}$  в химических и биологических средах.



**Рис. 28.** (а) Изменение поглощения **18** (10 мкМ) в этаноле при добавлении  $Al^{3+}$  (0–2.0 экв.). (б) Изменения флуоресценции **18** (10 мкМ) в этаноле при добавлении  $Al^{3+}$  (0–5 экв.),  $\lambda_{ex} = 454$  нм. Верхняя вставка показывает фотографии растворов **18** (справа) и **18**+ $Al^{3+}$  (слева) в свете УФ лампы. Рисунок взят и адаптирован из [134].

В качестве донора энергии в бисхромофорном RET-сенсоре на основе родамина может выступать кумариновый краситель. Примером такого ратиметрического зонда для обнаружения  $Fe^{3+}$  может служить соединение **19** (схема 15), сконструированное из кумарина и родамина, соединенных этилендиаминовым спейсером [135]. Спектр поглощения сенсора **19** демонстрирует полосу с центром при 420 нм (рис. 33а), соответствующую кумариновому хромофору. При облучении длиной волны 420 нм наблюдается сильная эмиссия при 465 нм (рис. 29б), соответствующая донорному

кумарину, что свидетельствует об отсутствии внутримолекулярного RET-процесса в свободном сенсоре **19**. Однако интенсивность флуоресценции кумарина в лиганде **19** сильно подавлена (рис. 29б) из-за фотоиндуцированного переноса электрона PET от амидного фрагмента к кумарину.



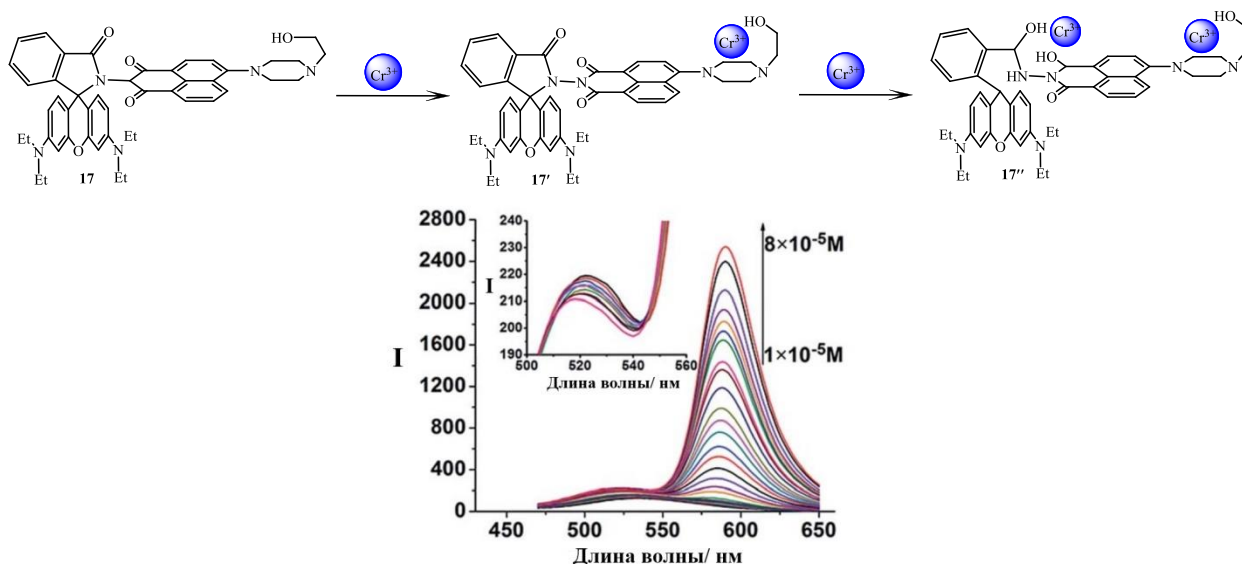
**Рис. 29.** Спектры поглощения (а) и эмиссии (б) соединения **19** (10 мкМ) в метаноле с добавкой  $\text{Fe}^{3+}$  (0–10 экв.).  $\lambda_{\text{ex}} = 420$  нм. Рисунок взят и адаптирован из [135].

Присутствие  $\text{Fe}^{3+}$  индуцирует новую полосу поглощения при 555 нм (рис. 36а), связанную с открытой формой родаминового фрагмента. При добавлении  $\text{Fe}^{3+}$  наблюдается небольшое усиление флуоресценции в районе 465 нм из-за ингибирования PET-процесса (рис. 29б). Кроме того, при возбуждении на 420 нм появляется новая полоса испускания с максимумом при 573 нм с возрастающей интенсивностью из-за реализации RET от кумарина к роданину. Спектрофлуориметрическое титрование **19** показало заметное увеличение отношения интенсивностей флуоресценции ( $I_{573}/I_{460}$ ) в 75 раз при обработке  $\text{Fe}^{3+}$ . Константа ассоциации сенсора **19** с ионом  $\text{Fe}^{3+}$  в метаноле составила  $0.99 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ . Исходя из всего вышесказанного, зонд **19** представляет собой потенциальный агент для дальнейшего детектирования  $\text{Fe}^{3+}$  в растворах и биологических объектах.

Следующий сенсор **20** с двумя центрами связывания синтезирован для селективного обнаружения катионов хрома III [136]. Зонд **20** разработан на основе 1,8-нафталимида и родамина, оба фрагмента которых чувствительны к присутствию  $\text{Cr}^{3+}$  (схема 16). Был представлен следующий механизм комплексообразования с  $\text{Cr}^{3+}$ . При координации  $\text{Cr}^{3+}$  с **20**, происходит два поэтапных процесса «включения» флуоресценции. Сначала ион хрома взаимодействует с нафталимидной частью молекулы, ингибируя PET-процесс с пиперазинового фрагмента на нафталимидный остаток, что ведет к разгоранию эмиссии нафталимида. При дальнейшем добавлении  $\text{Cr}^{3+}$ , происходит преобразование родамина в открытую форму, в результате чего реализуется внутримолекулярный резонансный перенос энергии RET от донорного хромофора-нафталимида к акцептору-роданину, вызывая увеличение интенсивности флуоресценции последнего. Действительно, свободный лиганд **20** при возбуждении на 410 нм проявляет

слабую эмиссию нафталимида при 537 нм (рис. 30). Отсутствие какой-либо полосы флуоресценции выше 550 нм указывает на существование родамина с замкнутым спирокольцом. При добавлении  $\text{Cr}^{3+}$  происходит увеличение интенсивности флуоресценции при 537 нм с одновременным значительным ростом новой полосы испускания при 588 нм, что указывает на раскрытие кольца спиролактама за счет координации ионов  $\text{Cr}^{3+}$  (рис. 30). Отношение интенсивностей флуоресценции  $I_{588}/I_{537}$  возросло в 22.1 раза, что свидетельствует о высокой эффективности переноса энергии в системе. Константа ассоциации соединения **20** с  $\text{Cr}^{3+}$  была определена с использованием данных спектрофлуориметрического титрования и составила  $4.51 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ . Соотношение связывания лиганд – металл оказалось равным 1:2, а рассчитанный ПО  $\text{Cr}^{3+}$  составил 0.14 нМ. Результаты исследования показали, что предлагаемая сенсорная система **20** обеспечивает селективную стратегию обнаружения катиона  $\text{Cr}^{3+}$ .

#### Схема 16

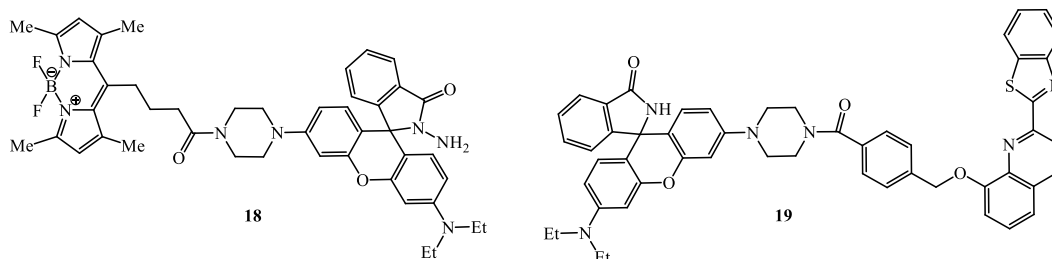


**Рис. 30.** Изменение спектров флуоресценции зонда **20** (13 мМ) при увеличении концентраций  $\text{Cr}^{3+}$  в буферном растворе  $\text{CH}_3\text{CN}$ : HEPES (2:1, 0.5 мМ, рН 7.4). Рисунок взят и адаптирован из [136].

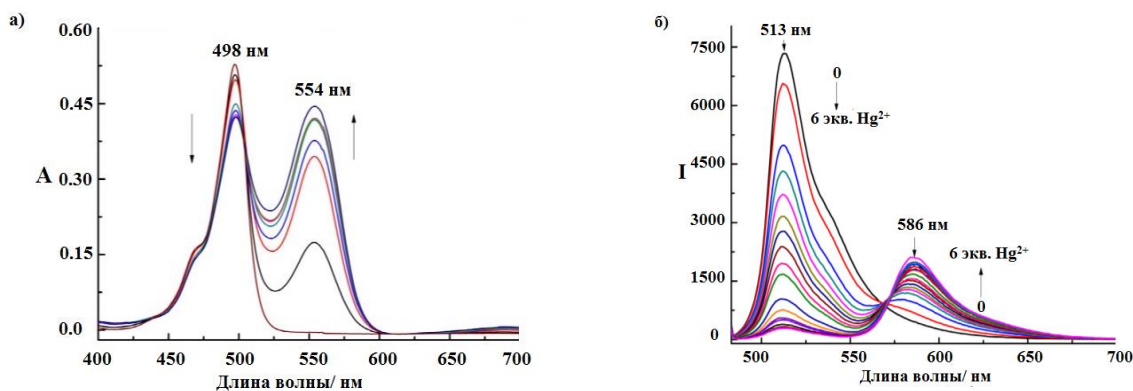
Родаминовые красители также находят свое применение при создании флуоресцентных хемодозиметров. Производные родамина являются эффективными кандидатами для разработки высокоэффективных хемодозиметров из-за особых структурных свойств, благодаря которым посредством химической реакции индуцируется раскрытие кольца спиролактама [137]. Ратиометрический хемодозиметр **18** (схема 17) для обнаружения ионов  $\text{Hg}^{2+}$  был разработан на основе пары BODIPY – родамин, в которой фотоактивные фрагменты соединялись посредством пиперазинового линкера [138]. Как показано на рис. 31а, в спектре поглощения **18** наблюдалась типичная полоса поглощения донора-BODIPY с центром при 498 нм. Добавление  $\text{Hg}^{2+}$  вызвало увеличение интенсивности полосы поглощения около 554 нм, которая соответствует поглощению

родамина. Отношение оптических плотностей  $A_{554}/A_{498}$  достигало плато после добавления шести эквивалентов  $Hg^{2+}$ , что сопровождалось постепенным изменением цвета от светло-желтого до розового (рис. 31а).

#### Схема 17



Авторы работы объясняют механизм связывания протеканием гидролиза родамингидразида до родаминовой кислоты, стимулированного присутствием  $Hg^{2+}$ . Данный процесс индуцировал раскрытие кольца спиролактама, что привело к переносу энергии от BODIPY к роданину. При возбуждении **18** на длине волны 480 нм наблюдалась полоса испускания с центром 513 нм, принадлежащая BODIPY. Как показано на рис. 31б, с увеличением концентрации ионов  $Hg^{2+}$  флуоресценция при 513 нм уменьшалась, и появлялась новая полоса свечения при 586 нм, отвечающая роданиновому фрагменту. Кроме того, цвет эмиссии изменился с зеленого на оранжево-красный. Все эти результаты ясно указывают на то, что реализуется RET-процесс при присоединении  $Hg^{2+}$ , эффективность которого была посчитана и составила 96.4%. Кроме того, ратиометрическое отношение интенсивностей флуоресценции  $I_{586}/I_{513}$  **18** значительно возрастало с увеличением концентрации  $Hg^{2+}$ , по данным которого был рассчитан предел обнаружения **18** равным 0.3 мкМ.

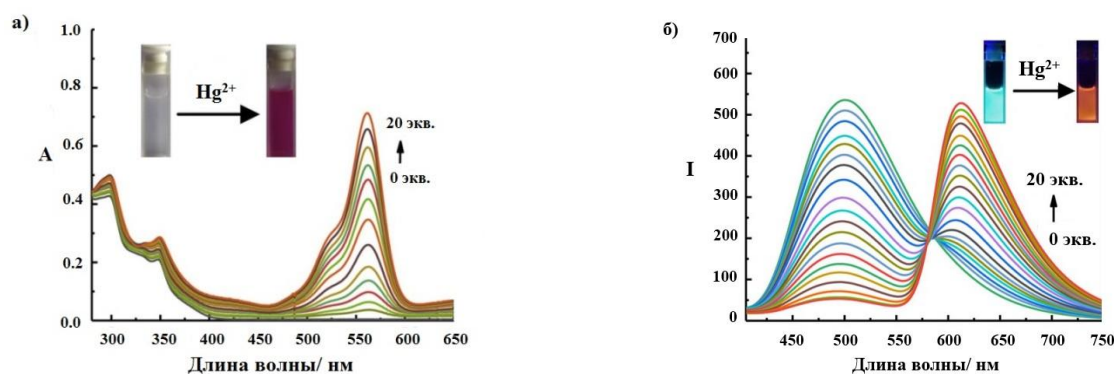


**Рис. 31.** (а) Спектры поглощения хемодозиметра **18** (10 мкМ) с увеличением концентрации  $Hg^{2+}$  (0–28 мкМ). (б) Спектры флуоресценции хемодозиметра **18** (10 мкМ) с увеличением концентрации  $Hg^{2+}$  (0–60 мкМ). Все спектры сняты в системе MeOH: NEPES (7:3, pH 6.0). Рисунок взят и адаптирован из [138].

Эксперименты с тестовой фильтровальной бумагой, показали, что только бумага с **18**, погруженная в раствор  $Hg^{2+}$ , имела оранжевую флуоресценцию, в то время как образцы, погруженные в раствор катионов других металлов, сохраняли зеленую

флуоресценцию при облучении УФ-лампой. Кроме того, были проведены биологические исследования хемодозиметра **18** на клеточной линии HeLa. Результаты показали, что краситель **18** пригоден для обнаружения  $\text{Hg}^{2+}$  в живых клетках на качественном уровне.

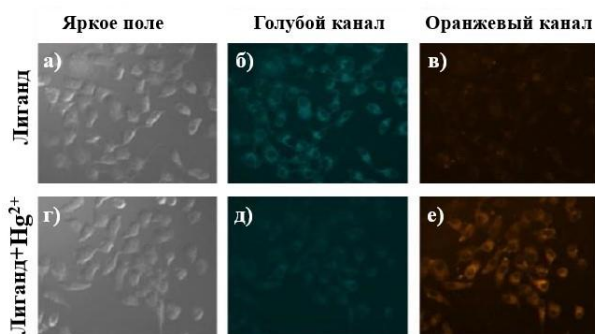
Схожий пример ратиометрического хемодозиметра показан в работе [139]. В данном исследовании для обнаружения  $\text{Hg}^{2+}$  было сконструировано соединение **19** с хинолин-бензотиазольной группой в качестве донора и родамином в качестве акцептора (схема 17). В отсутствие катионов раствор соединения **19** не имел характерного пика поглощения открытой формы родамина и был бесцветным. При добавлении  $\text{Hg}^{2+}$ , наблюдалось образование нового пика с максимальной длиной волны поглощения 559 нм (рис. 32а), и цвет зонда **19** изменился на розовый. Это позволяет предположить, что  $\text{Hg}^{2+}$  индуцирует раскрытие спиролактаманного кольца. Интенсивность новой полосы поглощения при 559 нм линейно увеличивалась с увеличением концентрации  $\text{Hg}^{2+}$  в диапазоне 0–36 мкМ и достигала максимума при добавлении 20 экв.  $\text{Hg}^{2+}$  (рис 32б). По полученным данным был найден предел обнаружения  $\text{Hg}^{2+}$  равным 0.37 мкМ. При возбуждении на длине волны 390 нм интенсивность испускания при 504 нм, относящаяся к излучению хинолинилбензотиазольного фрагмента, уменьшалась с увеличением добавки  $\text{Hg}^{2+}$ , а интенсивность испускания родамина при 613 нм постепенно увеличивалась (рис. 32б). При увеличении концентрации  $\text{Hg}^{2+}$  до 20 экв. отношение интенсивностей эмиссий  $I_{613}/I_{504}$  не изменилось. Однако цвет флуоресценции **19** сменился с голубого на оранжевый (вставка на рис. 30а), что свидетельствовало о переносе энергии от хинолин-бензотиазольной группы к родмину. На основании спектрофотометрического и спектрофлуориметрического титрования был рассчитан ПО **19** для  $\text{Hg}^{2+}$  равным 0.2 мкМ и 0.37 мкМ соответственно.



**Рис. 32.** (а) Спектры поглощения **19** (10 мкМ) с различной концентрацией  $\text{Hg}^{2+}$ . (б) Эмиссионные спектры ( $\lambda_{ex} = 390$  нм) **19** (10 мкМ) с различной концентрацией  $\text{Hg}^{2+}$  (0–20 экв.). Рисунок взят и адаптирован из [139].

Биохимические исследования проводились на клеточной линии HeLa. Как показано на рис. 33 (а–в), при инкубации с красителем **19** были обнаружены сильный сигнал флуоресценции хинолин-бензотазолового фрагмента и слабый сигнал оранжевой эмиссии

родамина. После добавления  $\text{Hg}^{2+}$  наблюдалась сильная флуоресценция в оранжевом канале, а сигнал в голубом канале резко уменьшился (рис. 33д, е). Результаты представленного исследования позволяют предположить, что зонд **19** является перспективным для количественного обнаружения  $\text{Hg}^{2+}$  и его можно использовать для распознавания данного катиона в живых клетках.



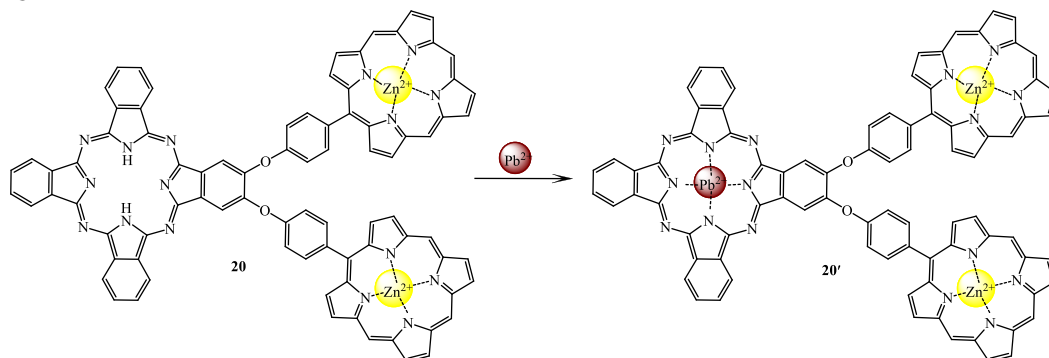
**Рис. 33.** Конфокальные изображения зонда **19** (10 мкМ), с  $\text{Hg}^{2+}$  в клетках HeLa. (а и г): Изображения в проходящем свете; (б и д): голубой канал; (в и е): оранжевый канал. Рисунок взят и адаптирован из [139].

Таким образом, сенсоры на основе родамина имеют большой круг применения, благодаря наличию специфического раскрытия кольца спиролактама. Этот тип флуорофора может успешно выступать в качестве акцептора энергии в RET-паре для широкого ряда хромофоров из-за его длинноволнового поглощения и эмиссии. Однако использование данных красителей все же имеет следующий ряд ограничений. Синтез соединений часто протекает с низкими выходами, а очистка веществ весьма трудоемка. Также ограничением флуоресцеинов и родаминов является их относительно низкая фотостабильность. Всего час облучения может привести к значительному фотообесцвечиванию посредством окислительной деградации флуорофора в возбужденном состоянии [140]. Следует отметить, что на взаимопревращение между флуоресцентной «открытой формой» и нефлуоресцентной спироциклической «закрытой формой» влияет рН среды, что является важным для биологических исследований. Однако такая зависимость не всегда может быть выгодна, так как внутри клеточных органелл рН разный, а в некоторых случаях от экспериментов требуется рН-нечувствительный сенсор [141]. Конечно, в настоящее время ратиометрических сенсоров на основе отличных хромофорных систем от родамина мало, однако они могут быть не менее эффективными агентами для детекции катионов металлов.

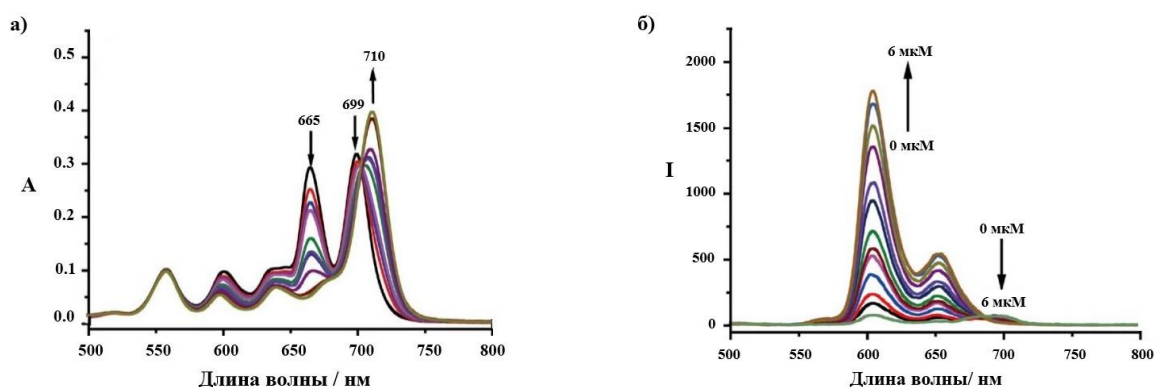
Интересно рассмотреть зонд **20** для катионов свинца (II), представляющий собой фталоцианин-порфириновую гетеротриаду [142]. Порфирины и родственные макроциклы интенсивно используются в качестве чувствительных агентов при создании хемосенсоров. Данный интерес связан со способностью порфиринов и фталоцианинов образовывать

комплексы с большинством ионов металлов, тем самым, обеспечивая богатый и разнообразный координационный химизм [143]. Соединение **20** характеризуется высокоэффективным процессом внутримолекулярного резонансного переноса энергии RET от двух цинк-порфириновых звеньев к безметаллическому фталоцианиновому фрагменту (схема 18).

**Схема 18**



Спектр поглощения триады **20** характеризуется неинтенсивной полосой с центром 348 нм фталоцианинового звена, сильным поглощением при 426 нм и слабым при 558 нм, которые соответствуют фрагментам металлизированных порфиринов (рис. 34а). Следующие два слабых пика поглощения при 601 и 640 нм отнесены к вибронным полосам фталоцианина (рис. 34а). Спектр поглощения **20** имеет схожее строение со спектром смеси двух эквивалентов металлизированных порфиринов и одного эквивалента фталоцианина, что указывает на отсутствие электронного взаимодействия между данными хромофорами в основном состоянии молекулы. При возбуждении на длине волны 420 нм в спектре флуоресценции **20** присутствуют пики эмиссии порфирина и фталоцианина с максимумами при 605 и 700 нм соответственно (рис. 34б).



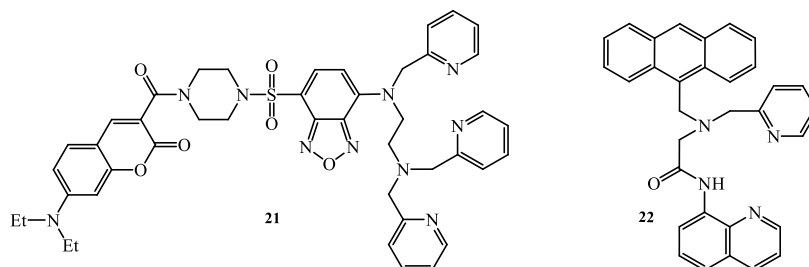
**Рис. 34.** (а) Электронные спектры поглощения и (б) спектры эмиссии триады **20** (2.0 мкМ в системе ТГФ:  $\text{CH}_3\text{OH}$ , 4: 1,  $\lambda_{ex} = 420$  нм) при добавлении  $\text{Pb}^{2+}$  (0–6.0 мкМ). Рисунок взят и адаптирован из [142].

При добавлении  $\text{Pb}^{2+}$  к **20**, полоса поглощения, отвечающая металлизированным порфиринам, практически не изменились, в то время как характерные полосы фталоцианина постепенно сменились на поглощение комплекса с изобестической точкой

при 703 нм (рис. 34а). Также цвет тестируемого раствора изменился с синего на темно-зеленый. Координация  $Pb^{2+}$  звеном фталоцианина вызывает батохромное смещение полос поглощения и уменьшение спектрального перекрытия между испусканием порфирина и поглощением фталоцианинового звена, тем самым подавляя RET-процесс и усиливая эмиссию донора-порфирина на 605 нм. В то же время флуоресценция фталоцианинового фрагмента при 700 нм гасится под действием катиона тяжелого металла  $Pb^{2+}$  (рис. 34б). Примечательно, что наряду с добавлением  $Pb^{2+}$  отношение интенсивностей флуоресценции  $I_{605}/I_{700}$  увеличилось в 82 раза. По данным флуоресцентного титрования был рассчитан предел обнаружения  $Pb^{2+}$ , который составил  $4.1 \cdot 10^{-9}$  М. Результаты исследования продемонстрировали высокую селективность триады **20** по отношению к иону свинца, однако все экспериментальные данные были получены в системе метанол – ТГФ, что не раскрывает потенциал применения сенсора **20** для водных систем и биологических объектов.

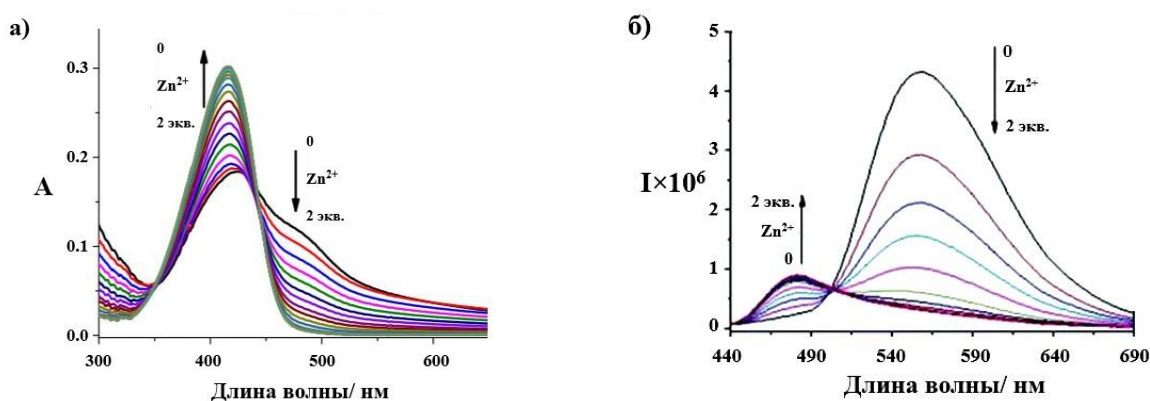
Часто в качестве механизма, индуцирующего спектральный отклик, используется сочетание нескольких фотофизических процессов, происходящих в одной молекуле. В настоящий момент популярно модульное взаимодействие ICT и RET механизмов. Сочетание процессов ICT и RET может приводить к большим значениям псевдостоксова сдвига, а также к контрастному переключению флуоресценции в отсутствии/ присутствии аналита, что ведет к образованию различных эмиссионных каналов и, следовательно, возникновению ратиометрического отклика [144; 145]. Это важное свойство для одновременного мониторинга нескольких аналитов или улучшения селективности и чувствительности флуоресцентных сенсоров [72]. В соединениях **21** и **22** фотоактивными составляющими выступают пары флуорофоров кумарин – бензооксадиазол и антрацен – хинолин соответственно (схема 19).

#### Схема 19



Ратиометрический сенсор **21** [146] для мониторинга  $Zn^{2+}$  содержит фрагмент 4-амин-7-сульфамойлбензооксадиазола, который обладает внутримолекулярным переносом заряда ICT (схема 19). При постепенном добавлении  $Zn^{2+}$ , спектры поглощения **21** показали гипсохромное смещение из-за уменьшения ICT-эффекта (рис. 35а), в результате ослабления электронодонорных свойств 4-аминогруппы при комплексообразовании.

Гипсохромное смещение полосы поглощения привело к снижению спектрального перекрытия между донором – кумарином и акцептором – бензооксадиазолом и, как следствие, уменьшению эффективности RET-процесса. Свободный лиганд **21** демонстрировал сильную эмиссию при 560 нм, соответствующую бензооксадиазолу, и слабое испускание при 480 нм, отвечающую фрагменту кумарина (рис. 35б). После связывания с  $Zn^{2+}$ , интенсивность флуоресценции при 560 нм существенно снижалась, а при 480 нм возрастала (рис. 35б). Отношение интенсивностей эмиссии  $I_{480}/I_{560}$  увеличивалось с уменьшением эффективности RET-процесса. Было определено значение константы диссоциации  $K_d$  комплекса **21** с  $Zn^{2+}$  равным 14 пМ, что указывает на высокую чувствительность **21** к ионам цинка.



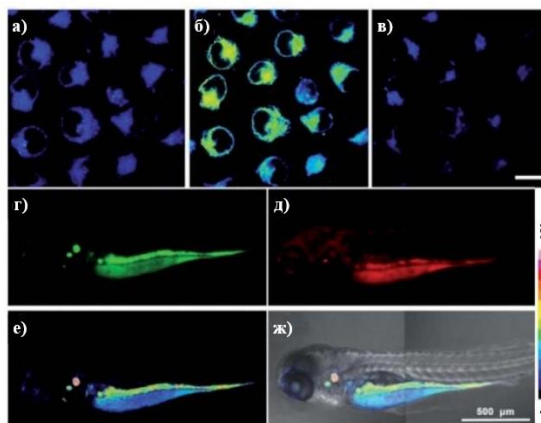
**Рис. 35.** Спектральные исследования **21**, HEPES буфер (50 мМ HEPES, 100 мМ  $KNO_3$ , pH 7.40, ДМСО:  $H_2O$ , 1:99). (а) Спектры поглощения **21** (10 мкМ) при титровании  $Zn^{2+}$  (0–2.0 экв.). (б) Спектры флуоресценции **21** (5 мкМ) при титровании  $Zn^{2+}$  (0–2.0 экв.),  $\lambda_{ex} = 415$  нм. Рисунок взят и адаптирован из [146].

Авторами работы была изучена способность сенсора **21** визуализировать ионы  $Zn^{2+}$  в биологических образцах. Ратиометрическую визуализацию  $Zn^{2+}$  в живых клетках MCF-7 проводили с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии, результаты которой показали, что **21** преимущественно локализуется в эндоплазматическом ретикулуме. Как показано на рис. 34а–в, клетки MCF-7, окрашенные **21**, демонстрировали темно-синее испускание, которое изменяло цвет на зелено-желтый после обработки  $Zn^{2+}$  и снова приобретало темно-синий цвет после инкубации с хелатирующим  $Zn^{2+}$   $N,N,N',N'$ -тетраakis(2-пиридилметил)этилендиамином (TPEN). Важно отметить, что концентрация  $Zn^{2+}$  в цитоплазме клеток MCF-7 была рассчитана по формуле (4) с помощью сенсора **21** ратиометрическим методом и оказалось равной 4.2 пМ.

$$R = (R_{min} K_d + R_{max} [Zn^{2+}]) / (K_d + [Zn^{2+}]) \quad (4)$$

Где  $R$  – внутриклеточное отношение интенсивной флуоресценции **21**, полученное на ратиометрических изображениях;  $R_{max}$  и  $R_{min}$  – внутриклеточные отношения интенсивностей флуоресценции **21** после обработки  $ZnCl_2$ / пириционом (1:1) и раствором

TPEN соответственно;  $K_d$  – константа диссоциации комплекса **21** с  $Zn^{2+}$ . Сенсор **21** демонстрировал аналогичное внутриклеточное поведение и эффективность ратиометрической визуализации  $Zn^{2+}$  в других клеточных линиях, таких как A549, SGC-7901 и SKOV3. Далее с помощью КЛСМ было проведена флуоресцентная визуализация *in vivo* эндогенно лабильного  $Zn^{2+}$  в трехдневных личинках рыбок данио (рис. 36г–ж).

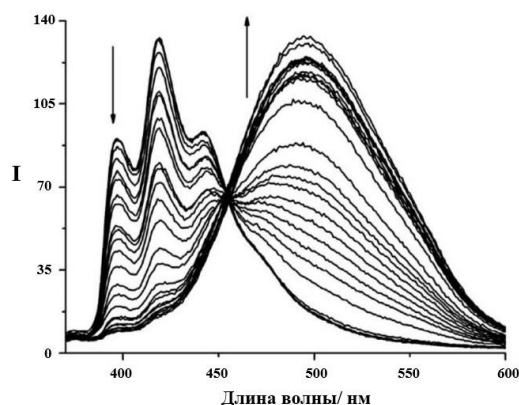


**Рис. 36.** (а–в) Флуоресцентные изображения клеток MCF-7, окрашенных **21** (10 мМ) в отсутствие (а) и присутствии (б)  $Zn^{2+}$  (20 мМ  $ZnCl_2$ /пирицион, 1: 1); в) инкубирование с 20 мМ TPEN. Масштабная метка (в), 20 мм. (г–ж) Флуоресцентная визуализация  $Zn^{2+}$  *in vivo* у 3-дневной личинки рыбки данио, инкубированной с 0.1 мМ **21**. Изображения зеленого канала (г), красного канала (д) и ратиометрическое отношение зеленого канала к красному (е). (ж) Наложение ратиометрического изображения к светопольному. Из-за ограниченного поля зрения инструмента изображение всего тела личинки было получено путем объединения двух изображений, полученных в одинаковых условиях съемки. Все ратиометрические изображения были получены из отношения зеленого канала (440–500 нм) к красному каналу (540–600 нм),  $\lambda_{ex} = 405$  нм. Вставка цветной шкалы представляет собой отношение двух каналов для (а–в), (е) и (ж). Рисунок взят и адаптирован из [146].

Флуоресцентные изображения красного канала показали, что **21** сосредоточен в основном в брюшной полости, некоторых частях головы и туловища (рис. 36д), а изображения зеленого канала показали свечение лишь в ограниченной брюшной области (рис. 36г). На изображениях, характеризующих ратиометрическое отношение зеленого канала к красному каналу (рис. 36е, ж) цвет от синего до светло-красного соответствует различной концентрации  $Zn^{2+}$ . Самый высокий уровень  $Zn^{2+}$  наблюдается вокруг ушей, что соответствует литературным данным, показывающим, что высокие концентрации синаптического  $Zn^{2+}$  были обнаружены в дорсальном кохлеарном ядре крыс [147]. Данная работа представляет собой редкий пример исследования, в котором была определена ратиометрическим методом внутриклеточная концентрация анализируемого катиона металла, что указывает на потенциальное применение **21** на живых организмах.

Еще один ратиометрический сенсор **22** (схема 19), сочетающий механизм внутреннего переноса заряда и резонансного переноса энергии для обнаружения  $Zn^{2+}$  с высокой чувствительностью и селективностью, представлен в работе [148]. Как показано

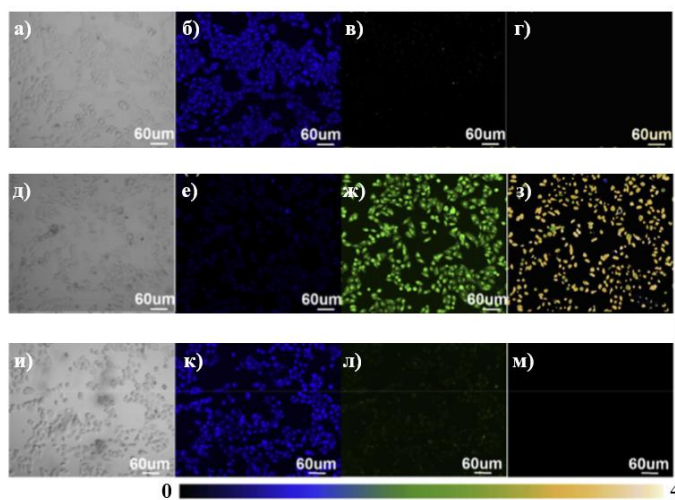
на рис. 37, в отсутствие  $Zn^{2+}$  спектр флуоресценции **22** демонстрирует полосу излучения с максимумами при 400, 420 и 445 нм, типичную для антраценового фрагмента. При добавлении  $Zn^{2+}$  полоса эмиссии антраценового звена постепенно уменьшается с одновременным образованием новой полосы испускания, смещенной батохромно, при 497 нм, отвечающей эмиссии хинолина. В ходе эксперимента наблюдалось явное увеличение отношения интенсивностей флуоресценции  $I_{497}/I_{420}$  от 0.6 до 7.5 при добавлении восьми эквивалентов  $Zn^{2+}$ . По данным флуоресцентного титрования  $Zn^{2+}$  был рассчитан предел обнаружения **22** равным 33.6 нМ. Также была рассчитана константа диссоциации  $K_d$  для связывания  $Zn^{2+}$  с **22**, значение которой составило 52.8 мМ. Авторы работы предполагают, что комплексообразование между  $Zn^{2+}$  и атомами азота в **22** приводит к появлению эмиссии хинолинового флуорофора за счет усиления его внутреннего эффекта переноса заряда ICT и реализации RET-процесса. Поскольку полоса излучения антраценового фрагмента перекрывается с полосой поглощения хинолинового флуорофора, то возникает RET-эффект от донора (антрацена) к акцептору (хинолину), приводящий к уменьшению интенсивности излучения при 420 нм и увеличению интенсивности излучения при 497 нм (рис. 37).



**Рис. 37.** Спектры флуоресценции **22** в буфере ДМСО: НЕРЕС (рН 7.4, 10 мМ, 1:1): а) Флуоресцентное титрование **22** (10 мМ); ( $\lambda_{ex} = 330$  нм). Рисунок взят и адаптирован из [148].

Биологические исследования по флуоресцентной визуализации проводились на клеточной линии MCF-7. После инкубации клеток MCF-7 с **22** наблюдалась интенсивная синяя флуоресценция (рис. 38б), в то время как зеленый канал демонстрировал незначительную эмиссию (рис. 38в). Однако при добавлении  $Zn^{2+}$  в зеленом канале появилось интенсивное зеленое испускание (рис. 38ж), а наложение синего и зеленого каналов показало, что флуоресценция клеток сменилась с синей на голубовато-зеленую. Добавление проницаемого для клеток хелатора  $Zn^{2+}$  ТРЕН восстановило синюю флуоресценцию и ослабило зеленую, подтверждая факт того, что изменение эмиссии являются результатом координации с  $Zn(II)$  (рис. 38к). Конкурентная визуализация

клеток с обработкой  $\text{Cd}^{2+}$  показала, что **22** можно использовать для селективного детектирования  $\text{Zn}^{2+}$  без вмешательства со стороны  $\text{Cd}^{2+}$ . Стоит отметить, что из перечисленного ряда сообщений, только в данной работе проверяли внутриклеточную селективность по отношению к конкурентному катиону металла.



**Рис. 38.** Конфокальные флуоресцентные изображения **22** в клетках MCF-7. (а), (д), (и) Изображения в светлом поле. (б), (е), (к) Флуоресцентные изображения с испускание в диапазоне 425–475 нм. (в), (ж), (л) Флуоресцентные изображения в диапазоне 500–600 нм. (г), (з), (м) Отношение интенсивности флуоресценции каналов  $I_{500-600}/I_{425-475}$ . Изображения синего канала были собраны при возбуждении на длине волны 405 нм, изображения зеленого канала были собраны при возбуждении на длине волны 488 нм. Масштабная метка: 60 мкм. Рисунок взят и адаптирован из [148].

Исходя из анализа литературных данных, сочетание процессов ICT и RET представляет удачную стратегию для детекции катионов металлов, но все же менее популярную, чем сенсоры только на основе RET-механизма. Наличие двух фотофизических процессов в одной молекуле индуцирует более сложный механизм образования спектрального отклика и является привлекательным решением при создании ратиометрических сенсоров. Стоит также отметить, что сочетание таких процессов как PET и RET является интересной комбинацией для использования в ратиометрических системах, которая в настоящее время в литературных данных почти не представлена. В описанных зондах **19** и **20** PET-процесс особо не влиял на образование ратиометрического сигнала, а играл второстепенную роль, индуцируя незначительные изменения в спектральных откликах. Несмотря на небольшую популярность, сочетание процессов PET и RET имеет большой потенциал для создания ратиометрических сенсоров, о котором будет сказано в следующем разделе.

## 2.2.2. Бисхромофорные сенсоры, в которых модуляция эффективности RET достигается за счет изменения квантового выхода PET-флуорофора

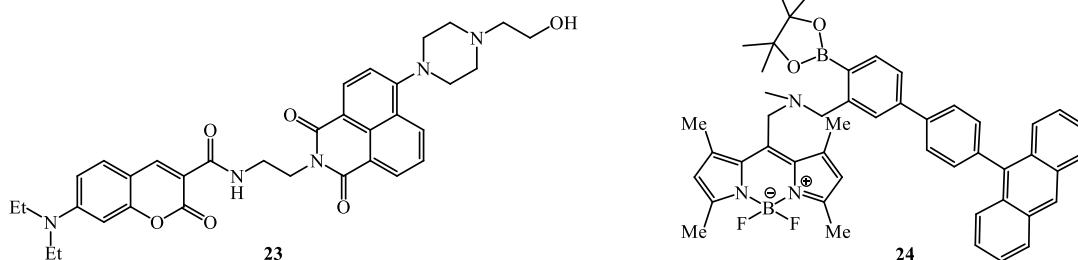
Молекулы, сочетающие PET - FRET являются привлекательными платформами для создания ратиометрических сенсоров. Главным их отличием от RET и ICT-зондов является то, что модуляция эффективности переноса энергии при комплексообразовании достигается за счет изменения интенсивности флуоресценции одного из хромофоров – донора или акцептора энергии, в то время как, спектры поглощения могут оставаться практически неизменными. Флуоресцентные сенсоры на основе комбинации PET и FRET могут индуцировать ратиометрический отклик двумя способами. В первом случае в свободном лиганде резонансный перенос энергии (RET) будет подавляться за счет реализации фотоиндуцированного переноса электрона (PET). Следовательно, при возбуждении донорного хромофора будет наблюдаться низкий уровень флуоресценции хромофора-акцептора. В первом случае связывание сенсора с катионом металла, блокирующее RET-процесс, приведет к разгоранию флуоресценции донорного фрагмента. Во втором случае комплексообразование ингибирует RET-процесс, в результате чего происходит перенос энергии с донора на акцепторный фрагмент, и наблюдается эмиссия последнего. Благодаря таким спектральным изменениям, детекция катионов металлов достигается ратиометрическим методом путем измерения отношения интенсивностей флуоресценции донора и акцептора до и после комплексообразования.

В настоящее время сенсоров на катионы металлов, работающих таким способом известно мало. В литературе описано несколько примеров сочетания RET и PET. Флуоресцентный ратиометрический pH-сенсор **23** на основе пары нафталимид – кумарин (схема 20) представлен в работе [113]. Хемосенсор **23** был синтезирован путем введения pH-нечувствительного флуорофора кумарина в качестве донора RET в pH-чувствительное производное amino-нафталимида, которое исполняло роль RET-акцептора. В основном растворе при pH 10 флуоресценция аминонафталимидного флуорофора тушилась посредством фотоиндуцированного переноса электронов (PET) от аминогруппы пиперазина на нафталимид. В данных условиях amino-нафталимид не был эффективным акцептором для получения энергии от донора кумарина. Поэтому **23** преимущественно показывал синюю эмиссию от кумаринового звена. В кислых условиях при pH 3 протонирование аминогруппы пиперазинового звена посредством блокировки PET-процесса индуцирует флуоресценцию amino-нафталимида, который действует как эффективный акцептор энергии. В результате чего зонд **23** преимущественно демонстрировал зеленое испускание от нафталимидного фрагмента из-за реализации переноса энергии RET в кислых условиях. Раствор **23** показал два отчетливых максимума

поглощения при 395 нм в основных условиях и при 425 нм в кислых условиях, что соответствует максимумам поглощения флуорофоров кумарина и амино-нафталимида соответственно. При возбуждении на 405 нм наблюдались отчетливые максимумы испускания при 467 нм, соответствующие кумариновому звену, и при 525 нм от амино-нафталимида. Измерение отношения интенсивностей флуоресценции при 525 нм к 467 нм ( $I_{525}/I_{467}$ ) выявило рабочий pH зонда **23** от 4.0 до 8.0. При использовании обратного отношения интенсивности при 467 нм к 525 нм ( $I_{467}/I_{525}$ ) рабочий pH **23** составил от 6 до 10. Также сенсор **23** успешно применялся для визуализации и мониторинга внутриклеточных значений pH трех клеточных линий, CP-A, J774A.1 и HeLa.

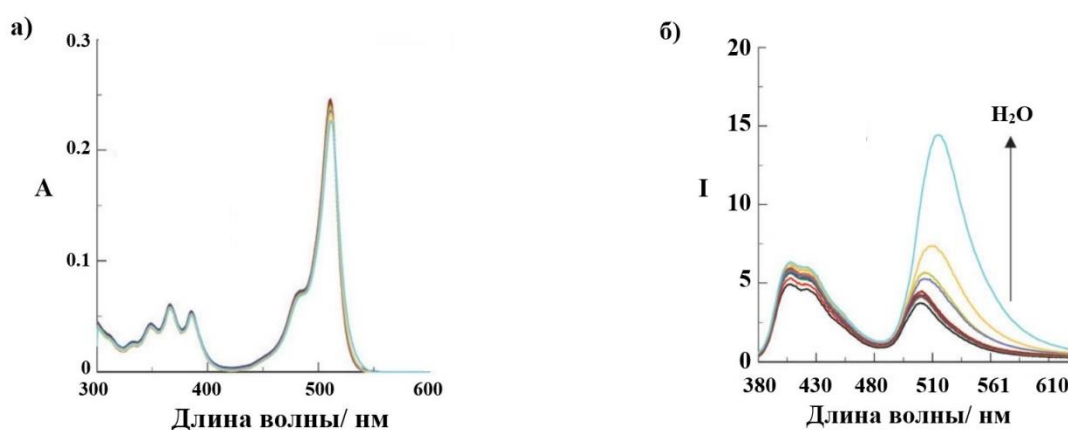
Для обнаружения воды в органических растворителях был разработан флуоресцентный ратиометрический зонд **24** [149]. Соединение **24** состоит из антраценового хромофора – донора и красителя BODIPY – акцептора (схема 20). Авторы выдвигают следующий механизм детектирования. В абсолютизированных органических растворителях происходит RET от донорного антрацена к акцептору – BODIPY, однако флуоресценция последнего не наблюдается из-за PET-процесса с атома азота аминогруппы на BODIPY. Добавление воды в органические растворители, содержащие **24**, должно вызывать одновременное подавление PET-процесса вследствие протонирования атома азота и передачу энергии RET от донора - антрацена к акцептору - BODIPY, что приведет к разгоранию флуоресценции последнего.

Схема 20



Спектр поглощения **24** в ацетонитриле имеет широкую полосу поглощения от антрацена в диапазоне от 300 до 400 нм и узкую полосу от фрагмента BODIPY с максимумом при 500 нм (рис. 39а). При возбуждении на 367 нм сенсор **24** демонстрирует флуоресценцию с двумя максимумами при 407 нм и 520 нм, отвечающие антрацену и BODIPY соответственно (рис. 39б). При добавлении воды в раствор **24** в ацетонитриле спектр поглощения практически не изменился. В то время как, в спектре испускания **24** наблюдалось разгорание эмиссии хромофора - BODIPY при 520 нм, а полоса при 410 нм, отвечающая антраценовому фрагменту, практически не поменялась. Данные результаты указывают на то, что разгорание флуоресценции фрагмента BODIPY связано с ингибированием PET-процесса, так и с реализацией RET от антрацена в возбужденном

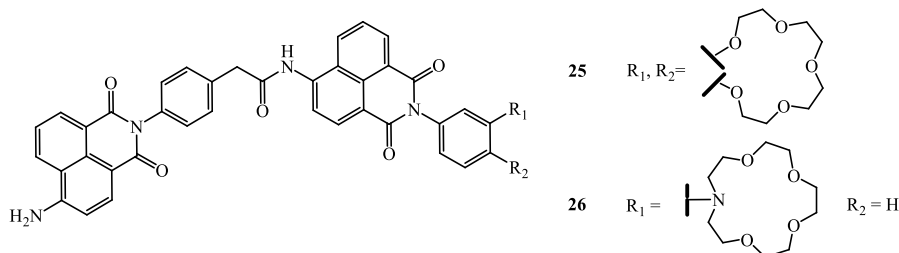
состоянии к флуорофору BODIPY в основном состоянии при добавлении воды в раствор ацетонитрила. Аналогичные результаты были получены в случае ТГФ. Эффективность RET для **24** оценивается в 53%. Невысокая эффективность переноса энергии авторы исследования связывают с несильным перекрытием спектра флуоресценции донора со спектром поглощения акцептора. Был рассчитан предел обнаружения воды по графикам интенсивности флуоресценции **24** при 520–535 нм в зависимости от фракции воды до 40 мас.%, который составил более 10 мас.%, что является достаточно низким показателем. Сенсор **24** представляет собой редкий пример, в котором реализуется интересная стратегия создания ратиометрического сигнала, где фотоиндуцированный перенос электрона происходит на акцеторный фрагмент. Так как чаще всего зонды на основе PET и RET модулируют таким образом, что PET-процесс осуществляется на донорный хромофор.



**Рис. 39.** Спектры поглощения (а) и флуоресценции (б) **24** ( $4.0 \cdot 10^{-6}$  М) в ацетонитриле, содержащем воду (0.0033–40 мас.%),  $\lambda_{ex} = 367$  нм. Рисунок взят и адаптирован из [149].

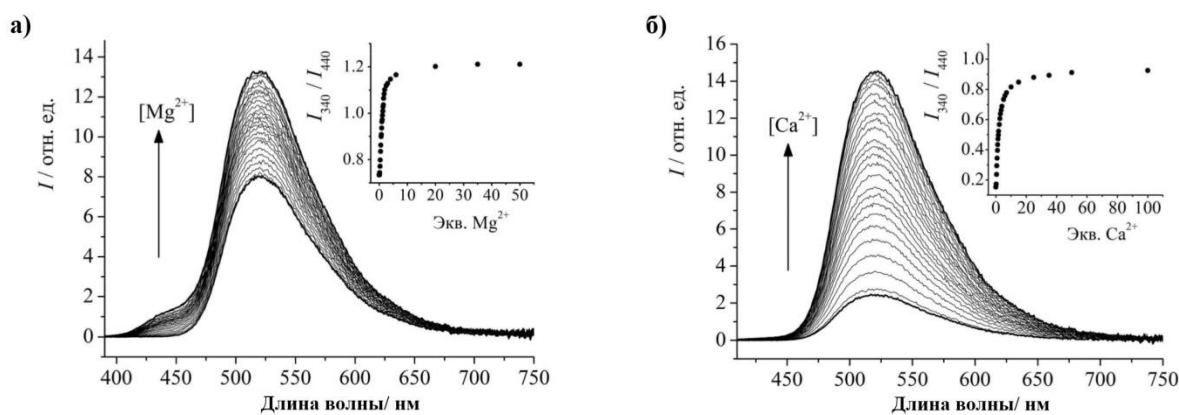
Нашей исследовательской группой под руководством Панченко П. А. в 2015 г. была синтезирована пара флуоресцентных ратиометрических сенсоров **25** и **26** на основе нафталимидных флуорофоров [150]. Молекулы имеют идентичное строение и содержат амино- и амидные-группы в составе заместителей в 4-положении нафталинового ядра, однако отличаются рецепторными фрагментами. В случае зонда **25** рецептором выступает бензо-15-краун-5-эфир, а у сенсора **26** рецептором служит *N*-фенилазакраунэфирный остаток (схема 21). Так как соединения имеют схожее строение, далее спектрально-люминесцентные свойства будут рассматриваться на примере соединения **26**.

#### Схема 21



Спектральные свойства биснафталимидных производных **25** и **26** и их комплексов с катионами  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  изучались в ацетонитрильных растворах. Спектр поглощения **26** имеет два максимума при 340 нм, соответствующий донору нафталимиду с амидной группой, и при 420 нм, отвечающий акцептору с аминогруппой. При возбуждении на 430 нм спектр флуоресценции биснафталимидов **26** демонстрирует полосу с максимумом в области 520 нм, соответствующую свечению 4-аминонафталимидного остатка, в то время как, эмиссия при 450 нм от 4-(ацетил)аминонафталимидов не проявляется, что указывает на перенос энергии возбуждения в соединении **26** между двумя хромофорными фрагментами. Следует отметить, что в сенсорах **25** и **26** флуоресценция донорного 4-(ацил)аминонафталимидного хромофора подавляется не только за счет переноса энергии РЕТ, но и за счет РЕТ-процесса с рецепторных фрагментов на нафталимидную часть молекул.

В случае бисхромофорных соединений **25** и **26** комплексообразование приводит к увеличению эффективности переноса энергии РЕТ и разгоранию флуоресценции акцепторного 4-аминонафталимидного флуорофора, поскольку связывание катионов металлов краунсодержащими производными нафталимидов сопровождается частичным или полным блокированием РЕТ-процесса, что было продемонстрировано нашей исследовательской группой ранее [151]. Изменения в спектрах флуоресценции **25** и **26**, вызванные добавлением в их раствор в ацетонитриле перхлората магния и кальция соответственно, представлены на рис. 40а, б. По данным спектрофлуориметрического титрования **25** и **26** были определены константы устойчивости образующихся комплексов состава 1: 1 равными  $5.69 \pm 0.03$  для **25** с  $\text{Mg}^{2+}$  и  $5.04 \pm 0.01$  для **26** с  $\text{Ca}^{2+}$ . Координация  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$  по краун-эфирным фрагментам лигандов **25** и **26** не вызывала изменений в положении и интенсивности длинноволновых полос в спектрах поглощения.



**Рис. 40.** Изменения в спектрах флуоресценции **25** (а) и **26** (б), вызванные добавлением перхлората магния (в случае **25**) и перхлората кальция (в случае **26**) в ацетонитриле,  $\lambda_{ex} = 340$  нм. Концентрации соединений в растворе равны 6.5 мкмоль/л. Верхние вставки на рисунках а) и б) показывают зависимость отношения интенсивностей флуоресценции на длине волны 520 нм, измеренных при использовании света возбуждения с  $\lambda_{ex} = 340$  нм ( $I_{340}$ ) и с  $\lambda_{ex} = 440$  нм ( $I_{440}$ ).

Бисхромофорные производные **25** и **26** могут быть использованы для ратиометрического определения концентрации ионов металлов. В случае соединений **25** и **26** возбуждение хромофора-акцептора видимым светом ( $\lambda_{ex} = 440$  нм) приводит к появлению в эмиссионном спектре полосы с максимумом 520 нм. Данный сигнал (интенсивность флуоресценции на длине волны 520 нм при  $\lambda_{ex} = 440$  нм,  $I_{440}$ ) не зависит от того, присутствует ли катион в краун-эфирной полости или нет, следовательно, его можно использовать для калибровки флуоресцентного отклика. Интенсивность флуоресценции лигандов **25** и **26**, регистрируемая при возбуждении хромофора-донора УФ светом с  $\lambda_{ex} = 340$  нм ( $I_{340}$ ), напротив, получается катинозависимой. В результате отношение интенсивностей флуоресценции  $R$  равно  $I_{340}/I_{440}$  увеличивается с ростом концентрации катионов  $Mg^{2+}$  и  $Ca^{2+}$  в растворе (см. верхние вставки на рис. 45а, б), что позволяет в соответствии с уравнением (2) рассчитать концентрацию катиона металла в условиях, когда концентрация сенсора неизвестна.

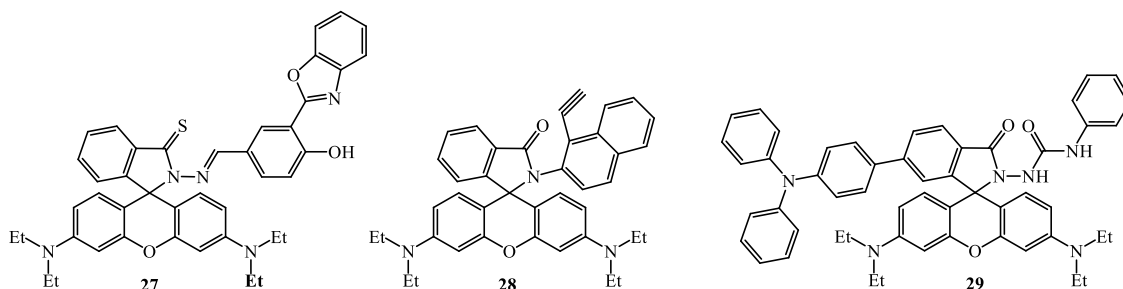
В результате анализа литературных данных можно сделать вывод, что сочетание RET и PET-процессов создает условия для реализации ратиометрического отклика в бис(хромофорной) молекуле, однако создание и применение таких систем является малоизученной областью. Главным преимуществом данных сенсоров является большой псевдостоксов сдвиг и отсутствие гипсохромных сдвигов в спектрах поглощения и, следовательно, флуоресценции, которые являются менее предпочтительными для биологических исследований. Хемосенсоры **25** и **26** являются примерами чуть ли не единственных ратиометрических сенсоров на катионы металлов, работающих на основе сочетания RET и PET-механизмов. Молекулы **25** и **26** успешно справляются с задачами по детекции катионов металлов, однако в системе органического растворителя ацетонитрила, требуя, таким образом, дополнительной доработки для использования в чисто водных растворах и биологических средах.

### 2.2.3 Ратиометрические ТВЕТ-сенсоры

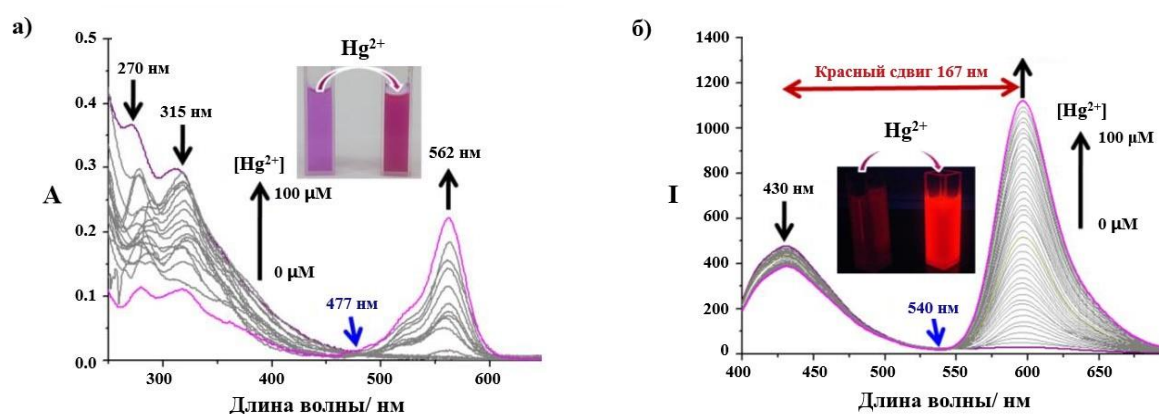
В целом, можно сказать, что в современной литературе зонды на основе механизма ТВЕТ рассматриваются, как отдельный класс сенсорных устройств. В настоящее время большая часть представленных ратиометрических ТВЕТ-сенсоров синтезирована на основе родаминового фрагмента, спектры поглощения которого в той или иной степени перекрывается со спектрами испускания практически любого флуорофора. Это означает, что данный процесс в большинстве случаев будет сопровождаться переносом энергии через пространство RET, приводя к тому, что в молекуле сенсора будет реализовываться одновременно два механизма передачи энергии. В этом случае сложно отнести

возникновение ратиометрического отклика к механизму RET или ТВЕТ. Поэтому далее для удобства описанные зонды **27–29** (схема 22) будут рассматриваться как ТВЕТ-сенсоры по умолчанию из-за наличия сопряженного линкера между двумя хромофорами. В исследовании [152] предложен ратиометрический флуоресцентный ТВЕТ-зонд **27**. В конъюгате **27** донором энергии выступает 2-(2-гидроксифенил)бензоксазол, а акцептором является производное родамина (схема 22).

#### Схема 22



Соединение **27** демонстрирует две полосы поглощения с максимумами при 275 нм и 315 нм, которые можно отнести к  $\pi$ - $\pi^*$ -переходу в донорном фрагменте (рис. 41а). При этом полоса поглощения выше 500 нм не наблюдается, что подтверждает факт существования **27** в закрытой спироформе. При добавлении  $\text{Hg}^{2+}$ , две полосы поглощения уменьшаются и одновременно появляется новый пик при 562 нм, который можно отнести к открытой форме акцепторного фрагмента (рис. 41а). Флуоресцентное поведение соединения **27** по отношению к добавлению  $\text{Hg}^{2+}$  исследовалось при возбуждении длиной волны 370 нм. Как показано на рис. 41б, сенсор **27** имеет только одну полосу испускания с центром при 430 нм, которая отвечает эмиссии бензоксазолового фрагмента.

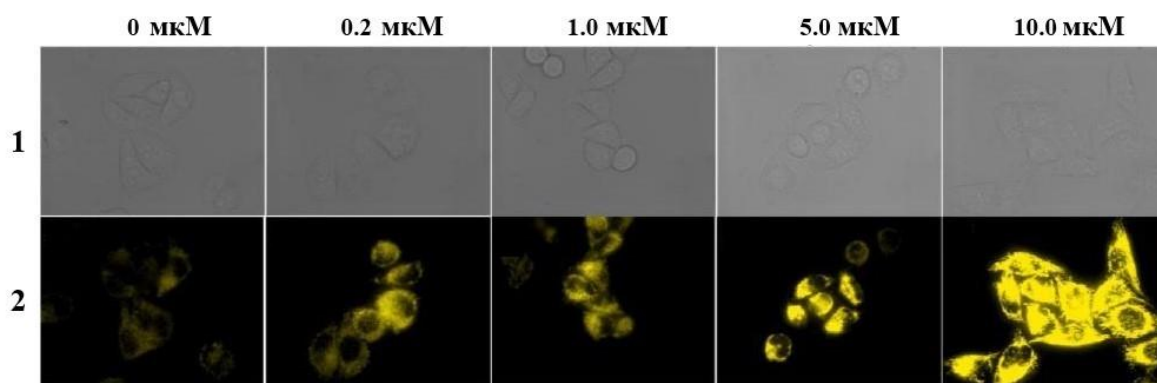


**Рис. 41.** (а) Изменение спектров поглощения **27** (10 мкМ) при добавлении 0–100 мкМ  $\text{Hg}^{2+}$  в растворе  $\text{CH}_3\text{CN}$ : трис-буфер (1:1, pH 7.4). Вставка: фотография показывает изменение цвета раствора при добавлении  $\text{Hg}^{2+}$ . (б) Изменение спектров флуоресценции соединения **27** (10 мкМ) при добавлении 0–100 мкМ  $\text{Hg}^{2+}$  в раствор  $\text{CH}_3\text{CN}$ : трис-буфера (1:1, pH 7.4) ( $\lambda_{\text{ex}} = 370$  нм). Вставка: фотография показывает изменение цвета флуоресценции при добавлении  $\text{Hg}^{2+}$ . Рисунок взят и адаптирован из [152].

Добавление  $\text{Hg}^{2+}$  к системе **27** вызывает постепенное уменьшение эмиссионного сигнала при 422 нм и разгорание новой полосы флуоресценции при 597 нм (рис. 41б).

Спектры испускания **27** демонстрируют сильный батохромный сдвиг от 430 до 597 нм, возникающий из-за ТВЕТ-процесса между бензоксазоловым фрагментом и открытой формой родамина. В присутствии  $\text{Hg}^{2+}$  соотношение интенсивностей эмиссии акцептора и донора при 597 и 430 нм ( $I_{597}/I_{430}$ ) возрастает в 58.6 раза. Было найдено значение константы ассоциации  $K_a$  для  $\text{Hg}^{2+}$  и **27** равное  $(3.3 \pm 0.5) \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ , а рассчитанный предел обнаружения **27** составил  $1.31 \cdot 10^{-9} \text{ моль} \cdot \text{л}^{-1}$ .

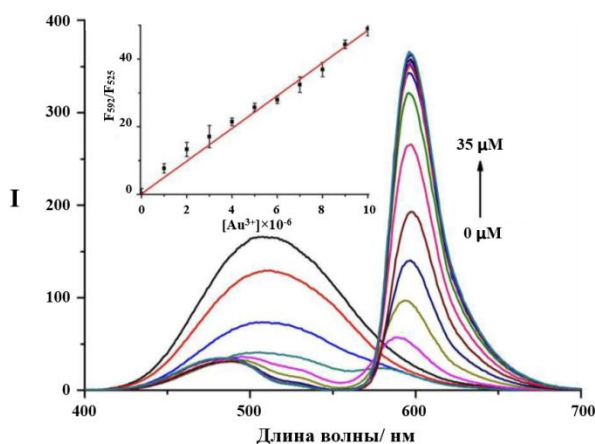
Чтобы проверить эффективность сенсора **27** на  $\text{Hg}^{2+}$  в реальных образцах воды, были взяты пробы водопроводной воды и воды из озера Даминг. Учитывая сложность состава воды из озера, степень детектирования  $\text{Hg}^{2+}$ , полученная с помощью **27**, была немного ниже, чем в водопроводной воде (более 98%), но все же сохранялась на уровне выше 93%, что указывает на потенциал применения **27** для обнаружения  $\text{Hg}^{2+}$  в реальных пробах воды. Биологическое применение зонда **27** изучалось по отношению к клеточной линии HeLa. Клетки HeLa, инкубированные зондом **27** демонстрировали очень слабую желтую флуоресценцию (рис. 42). При добавлении  $\text{Hg}^{2+}$  к окрашенным **27** клеткам, появилась интенсивная желтая флуоресценция (рис. 42). Кроме того, изображения, полученные в проходящем свете, подтвердили, что клетки были жизнеспособными на протяжении всего исследования (рис. 42). Отмечено, что цвет флуоресцентного излучения клеток HeLa постепенно усиливался с увеличением концентрации  $\text{Hg}^{2+}$ . Данные наблюдения показали, что флуоресцентная сенсорная система **27** пригодна для колориметрической визуализации внутриклеточного  $\text{Hg}^{2+}$ .



**Рис. 42.** Изображения клеток HeLa, инкубированных зондом **27** (0.5 мкМ) в течение 10 мин и дополнительно обработанных при различных уровнях  $\text{HgCl}_2$  (0, 0.2, 1.0, 5.0, 10.0 мкМ) в течение 1 ч. (ряд 1: изображения в проходящем свете; ряд 2: флуоресцентные изображения). Рисунок взят и адаптирован из [152].

В статье [153] представлен необычный пример ратиометрического флуоресцентного ТВЕТ-хемодозиметра **28** для катионов  $\text{Au}^{3+}$ . В данном зонде производное 1-алкинил-2-нафтиламина сопряжено с родаминовым красителем (схема 22). В спектре поглощения свободного лиганда **28** наблюдается одна полоса с максимумом

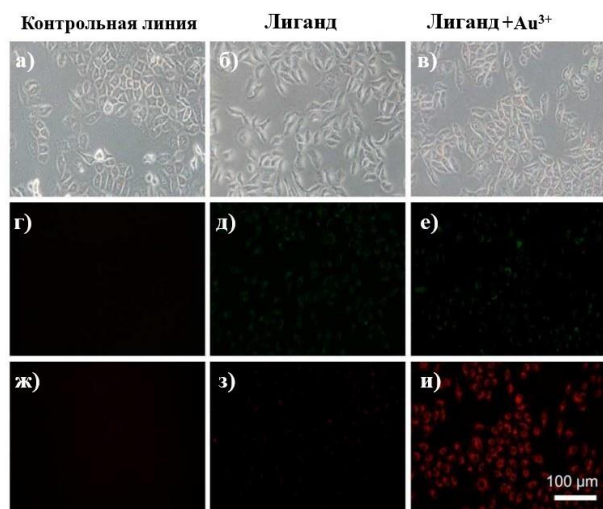
при 325 нм, которая относится к 1-алкинил-2-нафтиламиновому фрагменту. При добавлении пяти эквивалентов  $\text{Au}^{3+}$  полоса поглощения сместилась батохромно от 325 нм до 561 нм, что сопровождалось изменением цвет раствора с бесцветного на розовый, указывая на образование открытой формы родамина в сенсоре **28**. При возбуждении **28** длиной волны 320 нм, спектр флуоресценции демонстрирует единственную полосу испускания с центром при 525 нм, которая относится к эмиссии 1-алкинил-2-нафтиламинового хромофора (рис. 43). Добавление  $\text{Au}^{3+}$  значительно снизило интенсивность флуоресценции при 525 нм, одновременно индуцируя новую, смещенную батохромно, полосу излучения при 592 нм (рис. 43). При добавлении  $\text{Au}^{3+}$  зонд **28** посредством процесса внутримолекулярной циклизации преобразуется в производное оксазина, в котором фрагмент родамина подвергается раскрытию спирокольца, катализируемое ионами золота. В такой форме происходит перенос энергии от возбужденного донора 1-алкинил-2-нафтиламина к акцептору родамину, что приводит к интенсивной красной флуоресценции последнего. В ходе спектрофлуориметрического титрования по возрастающему значению отношения интенсивностей  $I_{592}/I_{525}$  был рассчитан предел обнаружения **28** для  $\text{Au}^{3+}$ , значение которого составило 2.91 нМ.



**Рис. 43.** Спектры флуоресценции **28** (20 мкМ) при добавлении  $\text{Au}^{3+}$  (0–35 мкМ). Вставка: линейная зависимость **28** интенсивности флуоресценции от концентрации  $\text{Au}^{3+}$ . Рисунок взят и адаптирован из [153].

Чтобы оценить эффективность визуализации **28** для  $\text{Au}^{3+}$  в живых клетках, авторами работы была выбрана клеточная линия A549. Клетки демонстрировали интенсивную флуоресценцию в канале I (510–550 нм) и слабую флуоресценцию в канале II (570–620 нм). После обработки клеток красителем **28** и  $\text{Au}^{3+}$  эмиссионный сигнал в канале I снизился, а интенсивность флуоресценции в канале II резко возросла, что указывает на реакцию **28** с  $\text{Au}^{3+}$  (рис. 44). Результаты работы позволяют предположить, что сенсор **28** можно использовать в качестве ратиометрического флуоресцентного агента для визуализации  $\text{Au}^{3+}$  в живых клетках. Хемодозиметр **28** является редким примером

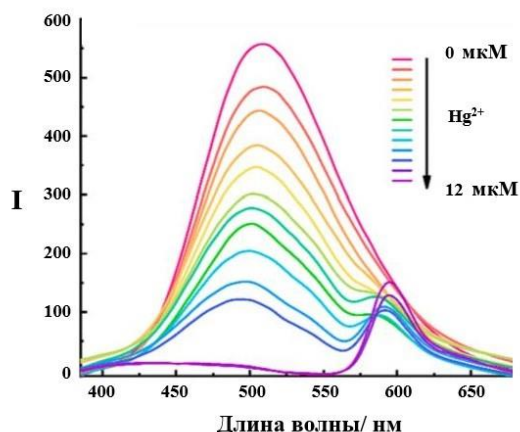
детектирования катионов золота ратиометрическим методом. Данная задача очень важна для биохимических исследований, так как ионы золота являются очень токсичными для биологических систем, поскольку они могут прочно связываться с ДНК и белками и даже вызывать расщепление ДНК [154].



**Рис. 44.** Флуоресцентные изображения клеток A549 инкубированные **28** (10 мкМ). (а) Изображения клеток A549 в проходящем свете без **28**; (б) изображения клеток A549 в проходящем свете инкубированные с **28** (10 мкМ); (в) изображения клеток A549 в проходящем свете инкубированные с **28** (10 мкМ), а затем с  $\text{HAuCl}_4$  (40 мкМ). Изображения наблюдались через (г-е) канал I (510–550 нм) и (ж-и) канал II (570–620 нм). Рисунок взят и адаптирован из [153].

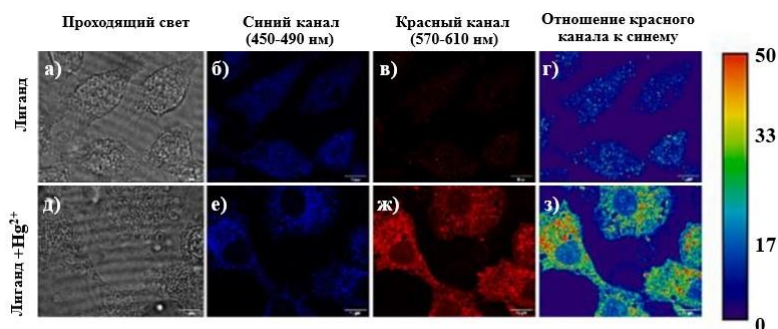
В недавнем исследовании [155] представлен ратиометрический флуоресцентный ТВЕТ-зонд **29**, разработанный на основе трифениламина и производного родамина (схема 22). Трифениламин был выбран в качестве донора энергии благодаря наличию неподеленной пары электронов, что наделяет его сильными донорными свойствами. Стоит отметить, что структура трифениламина имеет форму пропеллера, состоящую из трех бензольных колец, которые способствуют скручиванию донора и акцептора в пространстве, что является предпочтительным для конструкции ТВЕТ-зондов [156]. В качестве акцепторного фрагмента выступает производное родамина. Физико-химические свойства **29** изучались в системе ТГФ – вода. Спектр поглощения соединения **29** имеет максимум при 365 нм, что относится к фрагменту трифениламина. Однако спектр смещен на 66 нм батохромно по сравнению со свободным лигандом трифениламином из-за наличия расширенной  $\pi$ -сопряженной системы в сенсоре **29**. После добавления  $\text{Hg}^{2+}$  появляется новый пик поглощения при 570 нм, который соответствует сигналу открытой формы родамина. При возбуждении на 355 нм, зонд **29** демонстрировал одиночный сигнал эмиссии при 490 нм, отвечающий фрагменту трифениламина. При добавлении  $\text{Hg}^{2+}$  начальный пик флуоресценции уменьшался с одновременным появлением нового сигнала излучения при 595 нм (рис. 45), который соответствует характерной эмиссии родамина. При этом цвет испускания раствора **29** поменялся с голубого на оранжево-красный.

Ратиометрический отклик измеряли путем изменения отношения интенсивностей флуоресценции  $I_{595}/I_{490}$ , значение которого сильно возрастало в присутствии  $\text{Hg}^{2+}$ .



**Рис. 45.** Спектры флуоресценции **29** (10 мкМ) с добавкой  $\text{Hg}^{2+}$  (1–12 мкМ,  $\lambda_{ex} = 355$  нм). Рисунок взят и адаптирован из [155].

Для оценки способности зонда **29** обнаруживать  $\text{Hg}^{2+}$  в биологических системах была проведена ратиометрическая флуоресцентная визуализация на клеточной линии HeLa. Окрашенные **29** клетки HeLa возбуждались на длине волны 405 нм, демонстрируя сильную флуоресценцию в синем канале (450–490 нм) и слабое испускание в красном канале (570–610 нм) (рис. 46в). После обработки клеток  $\text{Hg}^{2+}$ , сигнал флуоресценции в красном канале значительно усилился (рис. 46ж). После инкубации клеток катионом ртути флуоресцентное изображение отношения красного канала к синему демонстрировало отчетливое повышение уровня  $\text{Hg}^{2+}$  (рис. 46г, з).



**Рис. 46.** Флуоресцентные изображения клеток HeLa инкубированных **29** (10 мкМ). Клетки HeLa инкубированные в отсутствие (а-г) и в присутствии 50 мкМ  $\text{Hg}^{2+}$  (д-з). Изображения в проходящем свете (а, д); изображения синего канала (б, е): 450–490 нм; изображения в красном канале (в, ж): 570–610 нм; отношение изображений (д, з) красного/ синего,  $\lambda_{ex} = 405$  нм. Вставка цветной шкалы представляет собой отношение интенсивности флуоресценции красного канала к синему для г) и е). Рисунок взят и адаптирован из [155].

Затем авторами работы была исследована способность сенсора **29** детектировать ртуть в образцах воды водопроводной и озерной (озеро Яньху, Китай). Эксперименты проводились пять раз для каждого образца воды, определяя среднее значение обнаруженной  $\text{Hg}^{2+}$ . Результаты показали, что зонд **29** можно применять для определения

количества  $\text{Hg}^{2+}$  в сложных реальных пробах воды. Чтобы расширить область практического, сенсор **29** использовался в качестве сенсорного агента при изготовлении флуоресцентного гидрогелевого материала. Соединение **29** интегрировали в гидрогели ПВА и наносили непосредственно на лабораторные латексные перчатки. Перчатка с гидрогелем испускала синюю флуоресценцию в ультрафиолетовом свете. Однако после контакта перчатки с ионами  $\text{Hg}^{2+}$ , цвет эмиссии меняется с голубого на розовый. Способность сенсорных перчаток с **29** обнаруживать  $\text{Hg}^{2+}$  была исследована на образцах морепродуктов, а именно креветок, погруженных в растворы солей ртути. Как показано на рис. 47, быстрое изменение цвета флуоресценции с синего на розовый наблюдалось после того, как сенсорные перчатки вошли в контакт с загрязненным образцом креветки. Таким образом, данное исследование является перспективным для разработки более многообещающих новых материалов для применения в повседневной жизни в устройствах для обнаружения катиона ртути.



**Рис. 47.** Видимое изменение цвета излучения сенсорной перчатки до и после прикосновения к креветке, загрязненной  $\text{Hg}^{2+}$ . Рисунок взят и адаптирован из [155].

Представленные соединения неоспоримо являются перспективными сенсорными устройствами для детекции катионов металлов. Однако, несмотря на свои плюсы, ТВЕТ-сенсоры также имеют определенные недоработки. Как правило, авторы работ не приводят глубоких спектроскопических исследований для точного определения механизма переноса энергии, считая формально наличие сопряженного спейсера доказательством переноса энергии через связь. Плюс ко всему, с точки зрения создания флуоресцентных зондов на основе ТВЕТ, донорный или акцепторный фрагменты должны иметь более одного активного реакционного центра для облегчения синтеза. Следовательно, при создании этих сенсоров, необходимо применять сложные многостадийные реакции. Помимо всего прочего, механизм ТВЕТ до сих пор не изучен и не выделен так же тщательно, как механизм RET.

### 2.3. Выводы из анализа литературных данных

Подводя итоги анализа литературных данных, можно сделать следующие выводы о современных флуоресцентных ратиометрических сенсорных устройствах:

1. Использование RET-систем представляет собой наиболее оптимальный способ достижения ратиометрического флуоресцентного отклика, поскольку позволяет регистрировать отношение интенсивностей флуоресценции, испускаемой двумя различными фотоактивными фрагментами в составе одной бис(хромофорной) системы. Примечательно, что в случае RET систем рецептор не обязательно должен быть сопряжен с хромофором, а может соединяться с ним посредством спейсера, обеспечивающего разобщение между указанными фрагментами в основном электронном состоянии. Это выгодно отличает RET-сенсоры от сенсоров ICT-типа.
2. Среди рассмотренных выше механизмов возникновения оптического отклика только механизмы ICT и RET или сочетание двойного переключения между RET/ ICT или RET/ PET представляют интерес для создания ратиометрических сенсоров, способных к определению концентрации аналита в условиях *in vitro/ in vivo*. Сенсоров, работающих на основе модуляции механизмов RET и PET, в литературе представлено мало, однако создание таких зондов представляет собой перспективную область исследования.
3. Основным недостатком ратиометрических ICT сенсоров является то, что в их структуре один из донорных атомов рецептора должен входить в состав хромофорной системы фотоактивного фрагмента. Такая особенность в структуре может создавать некоторые сложности в случае комплексообразования с тяжелыми и переходными элементами, связанные с тушением флуоресценции хромофора за счет *d*- $\pi$ -взаимодействия с ионом переходного металла, находящегося в непосредственной близости (имеет место в случае катионов ртути (II) и серебра), либо за счет спин-орбитальных эффектов (имеет место в случае парамагнитных ионов, например  $\text{Cu}^{2+}$  и  $\text{Cr}^{3+}$ ).
4. Стоит отметить, что большинство ратиометрических сенсоров содержат фрагмент родаминового красителя. Это существенно сужает диапазон длин волн практического применения данных зондов. Важно расширять химическую библиотеку флуорофоров, пригодных для создания ратиометрических систем.
5. Одним из самых больших недостатков современных ратиометрических хемосенсоров является их ограниченная способность детектировать катионы металлов в чисто водных средах. Практически во всех представленных работах физико-химические исследования проводились в органических растворителях либо их смеси с водой, что ограничивает применение таких зондов на биологических объектах, где среда водная. Сенсоров на тяжелые катионы металлов, которые работают в чисто водной среде без добавления органических растворителей, в настоящее время описано немного.

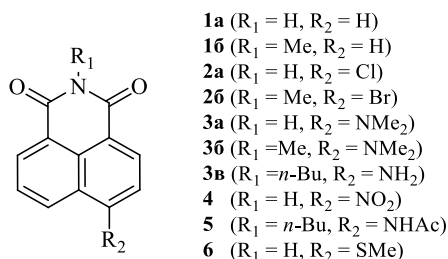
6. Работ, в которых бы проводились доскональные физико-химические исследования в биологических объектах представлено мало. В большинстве сообщений зонды показывали лишь качественное определение искомого аналита в биологической системе. Не определялась внутриклеточная концентрация детектируемого металла, а также его внутриклеточный предел обнаружения с помощью сенсора и не изучалась внутриклеточная селективность сенсора в присутствии конкурентных катионов металлов.

### 3. Обсуждение результатов

При подготовке данного раздела диссертации были использованы собственные публикации автора [157–165]. Как показал проведенный анализ литературных данных, использование RET-систем (RET – *англ.* Resonance Energy Transfer,) представляет собой наиболее оптимальный способ достижения ратиометрического отклика, поскольку позволяет регистрировать отношение интенсивностей флуоресценции, испускаемой двумя различными фотоактивными фрагментами в составе одной бисхромофорной молекулы. Часто в качестве одного из флуорофоров, входящих в состав бисхромофорных флуоресцентных хемосенсоров, выступают производные 1,8-нафталимида. Данная тенденция обусловлена такими свойствами этих соединений как интенсивное поглощение и испускание в видимой области спектра, высокие квантовые выходы флуоресценции, термо- и светостойкость, способность проникать и накапливаться в биологических системах, а также возможностью тонкой подстройки фотофизических свойств путем вариации заместителей в составе нафталимидного ядра [166–169].

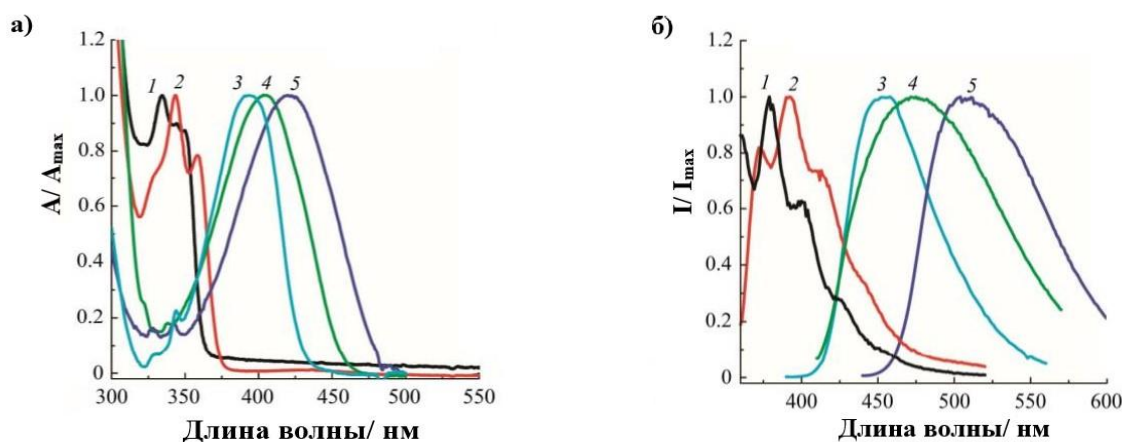
Длинноволновые полосы в электронных спектрах поглощения незамещенных по нафталимиднему ядру производных 1,8-нафталимида **1a** и **1b** (схема 1) располагаются в области 330–360 нм и обусловлены переходами  $\pi \rightarrow \pi^*$  типа [170]. Подобные соединения обладают слабой флуоресценцией с максимумами при 340–460 нм. Квантовый выход флуоресценции *N*-метил-1,8-нафталимида **1b** в гексане составляет 0.005, а в этаноле – 0.22. Как было показано авторами работ [171; 172], низшее излучательное состояние соединений данного типа имеет преимущественно  $\pi, \pi^*$ -природу, а низкий квантовый выход флуоресценции может быть объяснен относительно небольшой разницей в энергии между  $S_1^{\pi, \pi^*}$  и  $T_1^{n, \pi^*}$  возбужденными уровнями, вследствие чего может происходить интеркомбинационный переход (ИКП)  $S_1^{\pi, \pi^*} \rightarrow T_1^{n, \pi^*}$  с последующей безызлучательной дезактивацией триплетного состояния.

Схема 1



Введение заместителей с +M-эффектом в 4-ое положение нафталимидного хромофора приводит к появлению интенсивных длинноволновых полос, связанных с внутримолекулярным переносом заряда (ПЗ) с ЭД-заместителя на карбоксимидную группировку нафталимида, и одновременно к повышению квантового выхода

флуоресценции. В случае если в качестве донорного мезомерного заместителя выступает атом галогена, обладающий слабым +M-эффектом, величина батохромного сдвига при переходе от незамещенного нафталимида **1a** к 4-хлорнафталимиду **2a** (схема 1) невелика [173] (рис. 1).



**Рис. 1.** Спектры поглощения а) и флуоресценции б) соединений **1a** (1), **2a** (2), **6** (3), **4** (4) и **3a** (5) в дихлорметане. Концентрация растворов ~ 0.3 ммоль/ л. Рисунок взят и адаптирован из [173].

Введение диметиламиногруппы в 4-ое положение нафталинового ядра приводит к существенному изменению спектрально-люминесцентных характеристик. В спектре поглощения соединения **3a** (рис. 1) появляется дополнительная широкая полоса, батохромно смещенная на 80–90 нм по сравнению с длинноволновой полосой поглощения соединения **2a**. Одновременно наблюдается увеличение интенсивности флуоресценции. При введении нитрогруппы в 4-ое положение нафталимидного ядра (**4**, схема 1) максимумы в спектрах поглощения и флуоресценции претерпевают заметное батохромное смещение (рис. 1). Длинноволновое поглощение 4-нитропроизводных также обусловлено переносом заряда, но в данном случае электронная плотность смещается в сторону нитрогруппы, обладающей сильным отрицательным M-эффектом [173]. Квантовый выход флуоресценции при введении нитрогруппы значительно уменьшается, что связано с низким по энергии расположением триплетного уровня  $T_1^{n,\pi^*}$ . Замена аминогруппы на ацетиламиногруппу в положении 4 нафталимидного ядра сопровождается гипсохромным сдвигом максимумов поглощения и флуоресценции и уменьшением величины Стокса сдвига, что обусловлено менее выраженным ЭД характером NHCOR-заместителя [174; 175]. Ацилирование аминопроизводного **3b** с образованием 4-ацетамидонафталимида **5** (схема 1) приводит к смещению полосы ПЗ в УФ область при 363 нм в этаноле и появлению голубой эмиссии с максимумом в этаноле при 465 нм [174]. Интенсивной синей флуоресценцией обладают имиды 4-алкокси- и 4-ароксинафталевых кислот [176]. Спектральные свойства таких производных оказываются в значительной степени близки к свойствам 4-(ацил)аминонафталимидов [177].

Соединения типа краун-эфиров представляют собой макроциклические полиэфиры, проявляющие высокую связывающую способность к ионам металлов, включая *s*-металлы и катионы переходных металлов [178; 179]. Ранее было показано, что введение фрагмента бензо-15-краун-5- и *N*-фенилаза-15-краун-5-эфира в состав *N*-арильного заместителя при имидном атоме азота нафталимидного ядра приводит к появлению эффективного РЕТ-процесса в молекуле, в результате чего в присутствии катионов щелочноземельных металлов в растворе ацетонитрила наблюдается разгорание флуоресценции [180–182]. Тем не менее, полученные соединения не подходят для проведения анализа в водных растворах, поскольку в этом случае молекулы воды, находящиеся в огромном избытке, эффективно конкурируют за связывание катиона.

В настоящей работе была осуществлена модификация *N*-фенилаза-15-краун-5-эфирной группы путем введения двух атомов серы в состав макроцикла вместо двух атомов кислорода. Как известно, наличие атомов S, обладающих мягкой электронной оболочкой, способно обеспечить сродство ионофорной группы к мягким катионам металлов *d*-ряда, в частности к катионам  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  [183], детектирование которых привлекает значительное внимание современных исследователей, поскольку они участвуют в различных экологических, промышленных и биохимических процессах. Медь играет важную роль в биологических системах, так как выступает метаболическим кофактором в ферментах, таких как цитохромоксидаза, тирозиназа и супероксиддисмутаза [184; 185]. Аномальные уровни меди приводят к таким заболеваниям, как синдром Менкеса, болезнь Альцгеймера, болезнь Вильсона, болезнь Паркинсона [186; 187]. Катион ртути (II) обладает выраженным токсическим действием на клетки человека за счет блокировки сульфгидрильных ( $-\text{SH}$ ) групп тиоловых ферментов [188]. Главными загрязнителями окружающей среды соединениями ртути (II) являются различные промышленные производства и сжигание каменного угля. При попадании в морскую среду  $\text{Hg}^{2+}$  трансформируется микроорганизмами в катион метилртути (II)  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ , форму, которая отличается высокой нейротоксичностью и способностью к биоаккумуляции [189]. Накапливаясь, в организмах промысловых рыб, «метилртуть» достигает вершины пищевой цепи, что в итоге может представлять угрозу для здоровья человека. В свою очередь, серебро является одним из металлов, часто используемых в различных областях, таких как электроника, фармацевтика, фотография, а также ювелирные изделия, столовые приборы и фильтры для очистки воды [190]. Однако избыточное количество серебра может вызвать сильное отравление [191]. После попадания в организм человека ионы серебра могут вытеснять основные катионы металлов, такие как  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Zn}^{2+}$  в гидроксилпатите в костях. Более того, сообщалось о биоаккумуляции и токсичности

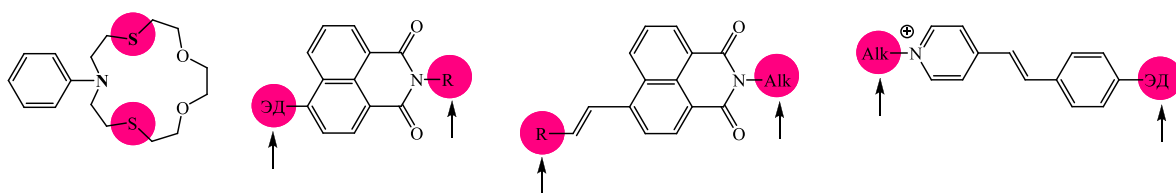
ионов серебра посредством связывания с сульфгидрильными ферментами, а также о взаимодействии с различными метаболитами через аминные и карбоксильные группы [192]. Высокая концентрация ионов  $Ag^+$  может привести к различным неблагоприятным последствиям для здоровья: повреждению мозга и нервов, нарушениям в иммунной системе. В этом отношении разработка флуоресцентных реагентов для определения низких концентраций данного ряда катионов металлов в воде и биологических объектах представляется актуальным направлением исследований.

За последние тридцать лет на основе производных 1,8-нафталимида было получено и исследовано сравнительно небольшое число краунсодержащих флуоресцентных сенсоров, в которых краун-эфирный фрагмент находится в составе заместителя в 4-м положении нафталинового ядра [193] или при имидном атоме азота со стороны карбонильных групп [194]. В архитектуре представленных зондов флуорофорами часто выступают соединения, содержащие остаток 4-алкокси-1,8-нафталимида [176; 195; 196]. В настоящей работе 4-алкокси-производные 1,8-нафталимида будут выступать в качестве доноров энергии возбужденного состояния. Выбор данных красителей обусловлен их интенсивной флуоресценцией в видимой области спектра около 450 нм [197], в которой, согласно анализу литературных данных, поглощают акцепторные фрагменты бисхромофорных RET-пар. Такое перекрытие спектров ХД и ХА обеспечивает реализацию эффективного резонансного переноса энергии RET между ними. Однако прежде чем приступить к синтезу бисхромофорных соединений, необходимо было изучить спектрально-люминесцентные характеристики и комплексообразование краунсодержащих хромофоров-доноров энергии, составляющих RET-пары. В данной работе будут рассмотрены монохромофорные ион-активные 4-алкокси и 4-(ацил)амино-1,8-нафталимиды, в которых макроциклический краун-эфирный рецептор соединен с нафталимидным остатком посредством спейсера со стороны карбоксиимидной группировки, а также соединения, содержащие рецепторный фрагмент в составе заместителя в 4-м положении нафталимидного кольца.

В качестве флуоресцирующих акцепторных фрагментов будут использоваться длинноволновые красители на основе 1,8-нафталимида и стирилпиридины, которые эффективно поглощают в районе 450 нм, где испускают хромофоры-доноры алкокси-нафталимиды. Представленные 4-амино- и 4-стирил-1,8-нафталимиды обладают достаточно интенсивной и длинноволновой эмиссией около 500 нм [198; 199]. Следует отметить, что стирилпиридиниевые красители демонстрирует флуоресценцию в видимой области спектра (600–800 нм), а также показывает высокую аффинность к биомолекулами и низкую цитотоксичность [200; 201]. Также предполагается, что наличие положительного

заряда в ядре пиридиния, улучшает совместимость с водной средой. Выбранные красители флуоресцирует в длинноволновой области, чаще всего, затрагивая, так называемое, терапевтическое окно 600–1200 нм, в котором глубина проникновения в клетки ткани наибольшая, а поглощение системы минимально [202].

Таким образом, в настоящей работе в качестве составляющих частей RET-пар будут использоваться следующие компоненты. Роль рецептора будет выполнять *N*-фенилазидитиа-15-краун-5-эфир, который является известным хелатором для детектирования катионов серебра, меди (II) и ртути (II). В качестве хромофоров будут выступать производные 1,8-нафталимида, содержащие ЭД-группы в 4 положении нафталинового кольца, стирилнафталимиды и стирилловые красители (рис. 2).



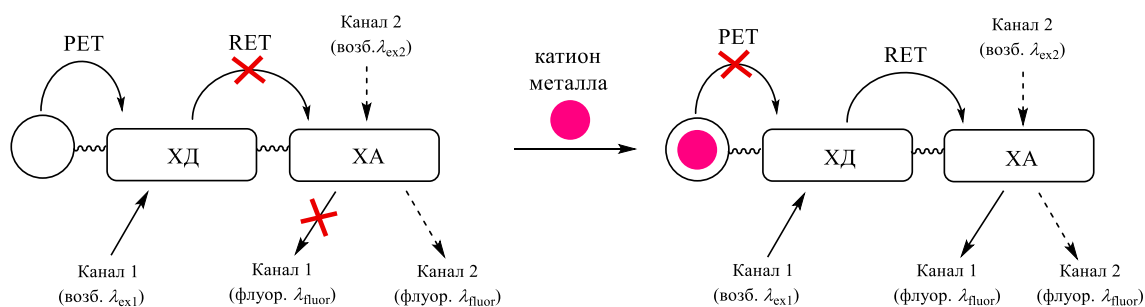
**Рис. 2.** Структура рецептора и фотоактивных фрагментов, которые планируется использовать в качестве донорных и акцепторных хромофоров в составе RET-хемосенсоров. Стрелками показаны положения, в которые могут быть введены рецепторные группы или спейсеры, соединяющие два хромофора.

На следующем этапе планировалась разработка сложных бисхромофорных систем на основе резонансного переноса энергии (RET), переноса электрона (PET – *англ.*, Photoinduced Electron Transfer) и внутримолекулярного переноса заряда (ICT – *англ.*, Intramolecular Charge Transfer), которые, как было нами изучено ранее (см. литературный обзор раздел 2.2), являются наиболее подходящими процессами для создания ратиометрических сенсоров. Нами были разработаны два типа RET-систем, способных при связывании с катионом металла продуцировать ратиометрический флуоресцентный отклик (рис. 3). В структурах *типа 1* рецепторный фрагмент присоединен к бисхромофорной системе посредством спейсера со стороны хромофора-донора (ХД). В свободном лиганде резонансный перенос энергии (RET) будет подавляться за счет фотоиндуцированного переноса электрона (PET). При возбуждении ХД (канал 1) будет наблюдаться низкий уровень флуоресценции хромофора-акцептора (ХА). Связывание сенсора с катионом металла, блокирующее PET-процесс, таким образом, приведет к разгоранию флуоресценции в канале 1. Напротив, флуоресценция, полученная при прямом возбуждении ХА (канал 2), не будет являться катионозависимой. Получается, что отношение двух интенсивностей флуоресценции, измеряемое на различных длинах волн возбуждения будет увеличиваться с ростом концентрации аналита (*вариант 1* проведения измерений). Также по альтернативной схеме в случае проявления в спектре остаточной

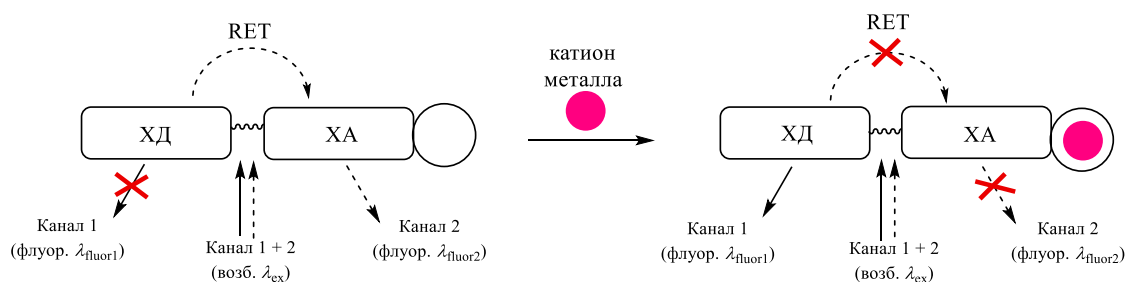
полосы флуоресценции ХД можно использовать одну длину волны возбуждения и регистрировать отношение интенсивностей  $R$  на различных длинах волн испускания (*вариант 2* проведения измерений).

Отличительной чертой сенсоров *типа 2* (рис. 3) является использование одной длины волны возбуждения. Ратиометрические измерения в данном случае заключаются в регистрации интенсивности флуоресценции на двух различных длинах волн. Это означает, что при образовании комплекса лиганда с катионом должна изменяться сама форма спектра флуоресценции. Данный эффект в сенсорах *типа 2* достигается комбинацией ХД с ХА при условии, что последний способен демонстрировать гипсохромный сдвиг длинноволновой полосы поглощения в присутствии катиона металла. Наблюдаемый спектральный сдвиг приводит к уменьшению перекрытия между полосами испускания и поглощения хромофором - донором и хромофором - акцептором, что в итоге подавляет резонансный перенос энергии и изменяет соотношение интенсивностей испускания в двух каналах регистрации. Простейшим способом добиться спектральных сдвигов при комплексообразовании является построение акцепторного хромофора по принципу ИСТ-сенсора. Поэтому нами планируется введение рецептора в состав молекулы таким образом, чтобы его атомы, ответственные за образование координационной связи с ионом металла, входили в состав сопряженной системы фотоактивной группы ХА.

### RET-системы *типа 1*



### RET-системы *типа 2*



**Рис 3.** Механизм возникновения ратиометрического флуоресцентного отклика в RET-сенсорах *типа 1* и *типа 2*, где ХД – Хромофор-донор, ХА – Хромофор-акцептор.

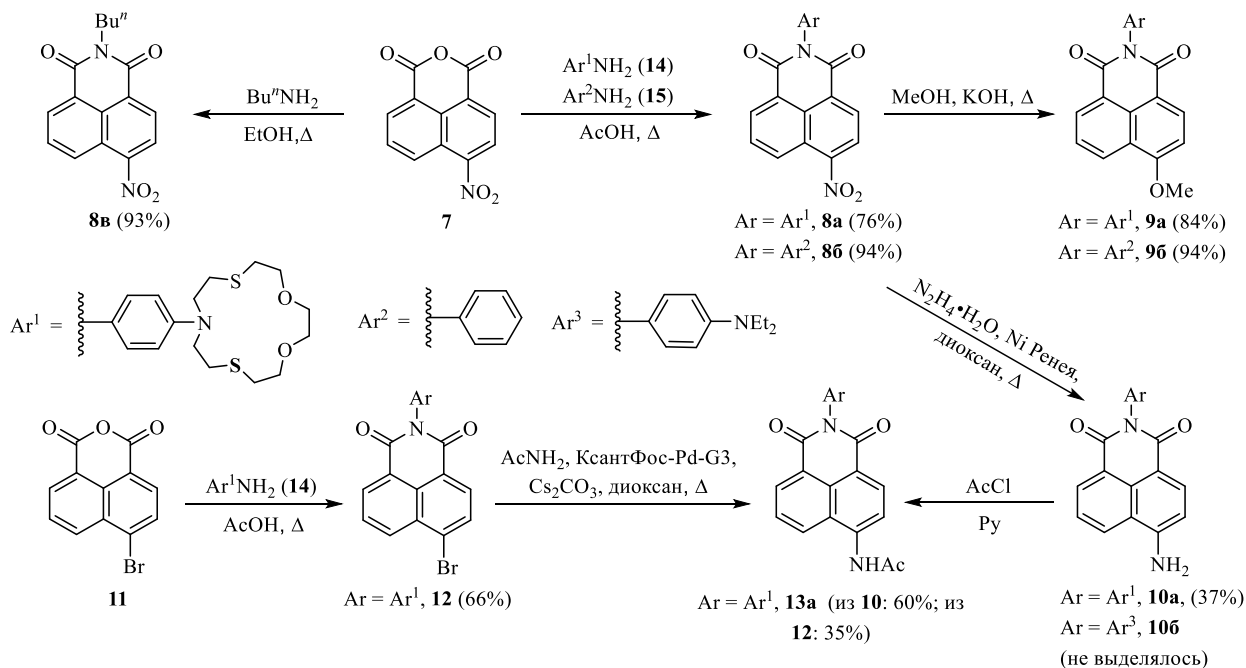
Далее будет рассмотрен синтез монохромофорных хемосенсоров, бисхромофорных комплексонов *типа* 1 и *типа* 2, после чего будут представлены результаты исследования их спектрально-люминесцентных свойств в присутствии и отсутствии катионов металлов, а также их практическое применение на биологических образцах.

### 3.1. Синтез соединений

Анализ литературных данных показал, что дизайн сенсоров на основе производных нафталимида можно варьировать путем различного введения рецепторной части в состав молекулы. Один из подходов осуществляется введением рецепторного фрагмента посредством спейсера со стороны карбоксиимидной группировки. В этом случае рецептор и хромофор являются несопряженными частями, давая, таким образом, РЕТ-сенсор (см. литературный обзор) [203; 204]. Второй способ предполагает, что рецепторный фрагмент будет являться заместителем или его частью в 4-м положении нафталимидного ядра [205–207]. В данной модели присутствует сопряжение между рецептором и хромофорной системой, что предполагает возникновение спектрального отклика по ICT-механизму (см. литературный обзор).

На первом этапе работы нами были синтезированы ион-активные соединения обоих типов, содержащие в своей структуре один хромофорный фрагмент и одну рецепторную группу. Были получены и изучены новые сенсорные реагенты на основе хромофоров 4-метокси- и 4-(ацетил)амино-1,8-нафталимида, имеющие в своем составе макроциклический рецептор *N*-фенилазидитиа-15-краун-5-эфир, который должен обладать высокой селективностью по отношению к катионам ртути/серебра/меди за счет атома азота и мягких атомов серы. Синтез РЕТ-сенсоров на основе производных 4-метокси- и 4-(ацетил)амино-1,8-нафталимидов с краун-эфирным рецептором представлен на схеме 1. В качестве стартового соединения использовался коммерчески доступный 4-нитронафталевый ангидрид **7**. Для получения хемосенсора **9a**, содержащего *N*-фенилазидитиа-15-краун-5-эфир, ангидрид **7** имидировали краунсодержащим ариламином **14** (схема 2). Образовавшийся 4-нитронафталимид **8a** далее подвергался нуклеофильному замещению нитрогруппы на метоксигруппу под действием едкого кали при кипячении в метаноле, давая, таким образом, целевое соединение **9a**. В качестве модельного вещества для сравнения спектрально-люминесцентных свойств в присутствии и отсутствии рецептора, было рассмотрено также соединение **9b**, молекула которого аналогична молекуле **9a**, но не содержит краун-эфирный фрагмент (схема 2). Синтез вещества **9b** проводился в идентичных условиях **9a**, а в качестве исходного амина использовался анилин.

## Схема 2

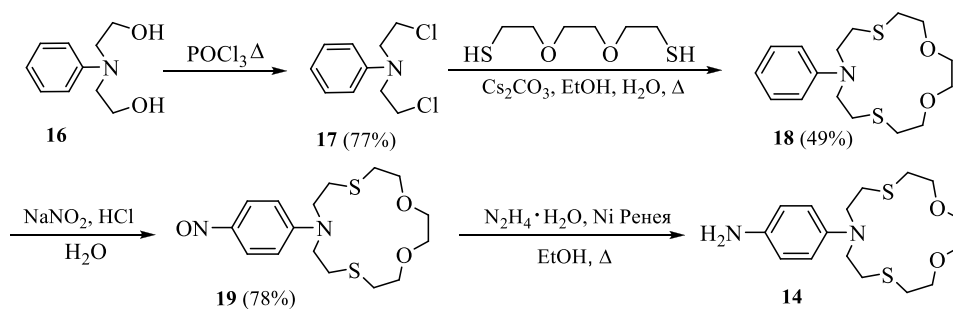


Некоторые сложности возникли на стадии восстановления соединения **8a**. Часто используемым восстановителем для синтеза 4-аминопроизводных нафталимида является дихлорид олова в присутствии соляной кислоты. Его применение позволяет получать целевые соединения с почти количественными выходами, однако, как показали проведенные ранее исследования, в случае азкараунсодержащих производных наблюдается побочное замещение атомом хлора в третьем положении нафталинового ядра. Кроме того, катион олова обладает существенным сродством к атомам серы макроцикла, что может приводить к образованию прочных комплексов. Поэтому в качестве восстановителя нами была выбрана система «гидразин-гидрат – никель Ренея», с использованием которой был получен амин **10a** с выходом 37%. Невысокий выход **10a**, по всей видимости, обусловлен с одной стороны низкой растворимостью 4-аминонафталимидов в большинстве растворителей, используемых для проведения хроматографии, что значительно осложняло их очистку, а с другой стороны – протеканием побочного гидронолиза связей C–S в краун-эфирном фрагменте с образованием 4-амино-*N*-(4-*N,N*-диэтиламинофенил)-1,8-нафталимида, выход которого возрастал с ростом количества никелевого катализатора. В частности, при синтезе **10a** в процессе хроматографирования реакционной массы была выделена фракция, представляющая собой смесь продукта **10a** и побочного вещества **10b**. Продукт гидронолиза **10b** не был выделен в индивидуальном виде, однако его образование было зафиксировано по <sup>1</sup>H ЯМР спектру (наличие сигналов диэтиламиногруппы при 1.10 – 1.16 м.д. (2×CH<sub>2</sub>) и 3.45 – 3.50 м.д. (2×CH<sub>3</sub>) в ДМСО-*d*<sub>6</sub>) и масс-спектру электронного удара (наличие пика с *m/z* 359) полученной фракции. С целью оптимизации условий

получения амида **13a** нами был отработан метод прямого введения (ацетил)аминогруппы в нафталимидное ядро с использованием реакции палладий-катализируемого амидирования. В соответствии с этим метод продукт **13a** может быть получен в две стадии исходя из 4-бромнафталевого ангидрида **11** и ариламина **14** (схема 2). Помимо меньшего числа стадий достоинство данного метода заключается в использовании более дешевого 4-бромнафталевого ангидрида по сравнению с 4-нитро-нафталевым.

Краунсодержащий ариламин **14**, использованный в синтезе соединения **9a**, был получен в результате проведения превращений, представленных на схеме 3. Стадия макроциклизации дихлорида **10** проводилась в этиловом спирте в присутствии карбоната цезия. Дальнейшее введение аминогруппы в фенильное ядро осуществлялось путем нитрозирования соединения **18** с последующим восстановлением гидразином. После проведения стадии восстановления, амин **14** вводился в реакцию с нитронафталевым ангидридом **7** без предварительной очистки.

Схема 3



Методика макроциклизации производного **17** была использована при попытке синтеза ИСТ-сенсора **24** (схема 4). Первоначально из 4-бромнафталевого ангидрида **11** было получено дихлорпроизводное **23**. Интересно отметить, что проведение реакции между 4-бром-*N*-бутилнафталимидом **20** и диэтаноламином в среде ДМФА сопровождалось образованием 4-(*N,N*-диметиламино)-*N*-бутилнафталимиды **25** (схема 4). В литературе представлен синтез аминирования арилгалогенидов под действием палладиевых и никелевых катализаторов в присутствии основания неактивными амидами, в том числе и ДМФА, в качестве источников аминогрупп в мягких условиях реакции [207; 208]. Примечательно, что в данном случае реакция аминирования прошла без использования никелевого или палладиевого катализаторов с удовлетворительным выходом. Структуры **22**, **23** и **25** были подтверждены данными РСА (рис. 4). Макроциклизация **23** в условиях аналогичных синтезу **17** не привела к целевому соединению **24**. По всей вероятности, нафталиновый фрагмент в структуре исходного соединения **23** создает большие стерические трудности по сравнению с фенильной группой в **17** для замыкания макроцикла.

#### Схема 4

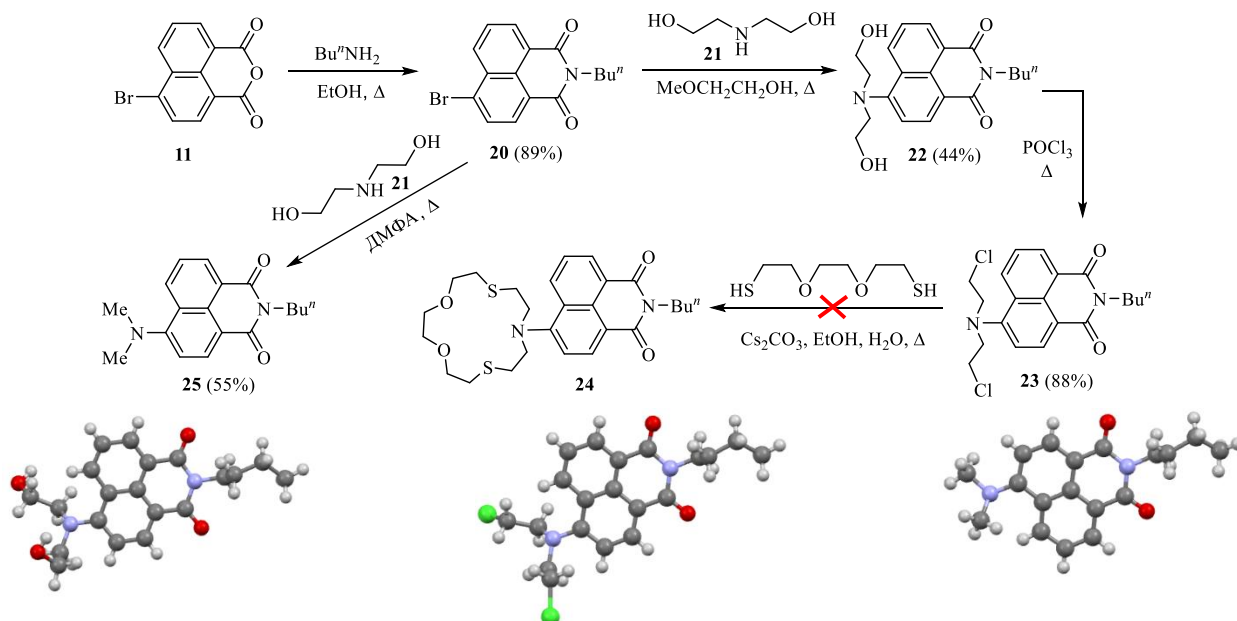
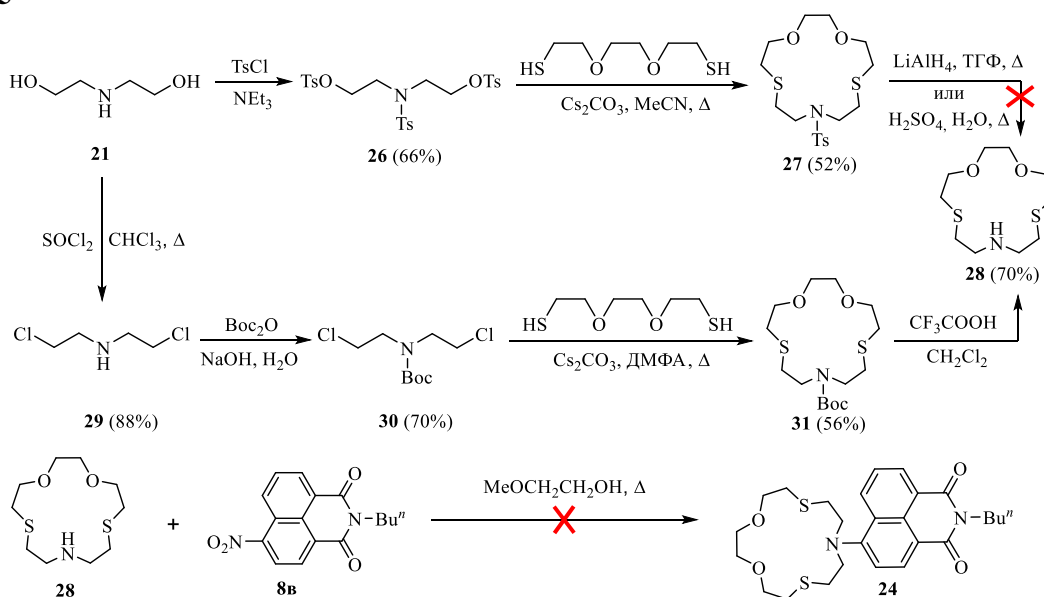


Рис. 4. Структуры соединений **22** (слева), **23** (в центре) и **25** (справа), полученные методом РСА.

Поэтому была предпринята попытка синтезировать **24** путем взаимодействия азадитиа-15-краун-5-эфира **28** с веществом **8в**, полученным при кипячении нитронафталевого ангидрида **7** с бутиламином в этаноле (схема 2). В ходе работы была реализована методика синтеза **28** из диэтаноламина **21**, включающая стадию образования промежуточного Вос-производного **31** (схема 5). Альтернативный способ сборки краун-эфира, предполагающий синтез **27**, оказался неэффективным из-за трудностей, возникших на стадии удаления защитной тозилатной группы. Попытки получить **24** по реакции **8в** с **28** были безуспешными.

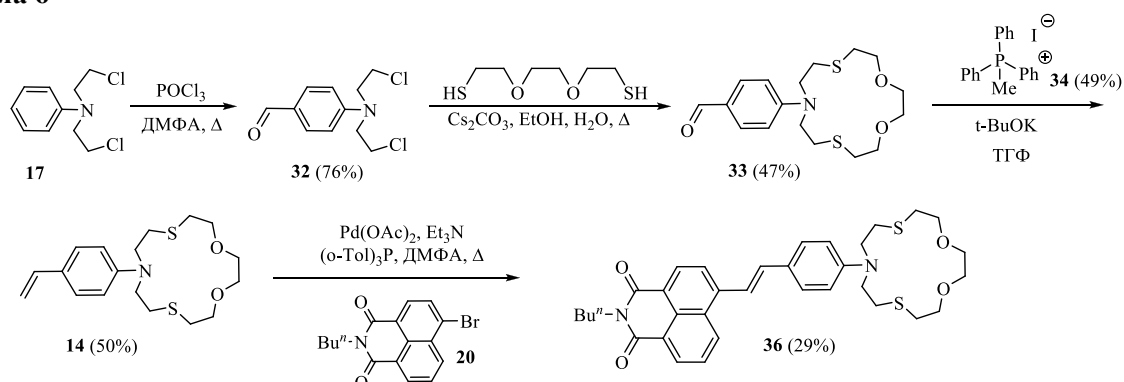
#### Схема 5



Далее было принято решение модифицировать структуру сенсора **24**, дабы избежать возникших синтетических затруднений. Было предложено ввести рецепторную

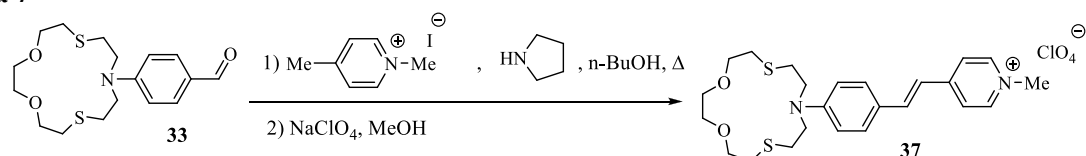
группу в состав заместителя через стирильный фрагмент. Таким образом, фотоактивной составляющей в новой структуре **36** (схема 6) будет выступать 4-стирил-1,8-нафталимидный хромофор, обладающий более длинноволновой флуоресценцией [209; 210], что является плюсом для биологических исследований. В качестве исходного соединения использовался дихлорид **17**, который подвергался формилированию с последующей макроциклизацией с образованием формильного производного **32**. Хемосенсор **36** был получен по реакции Хека между 4-бром-*N*-бутил-1,8-нафталимидом **20** и краунсодержащим стиролом **35** (схема 6). Последний получали из альдегида **33** по Виттигу, предварительно синтезировав соль йодид трифенилметилфосфония **34**.

Схема 6



Как было указано выше, в RET-системах *tuna 2* рецепторный фрагмент будет связан с акцепторным хромофором. Поэтому перед созданием бисхромофорной молекулы, необходимо было синтезировать и изучить монохромофор **37**, в котором фрагмент стирилпиридиния связан с краун-эфирным остатком. На основе азадитиакраун-эфирного рецептора к.х.н. Туляковой Е.В. был синтезирован такой стирильный краситель **37** (схема 7), проявляющий свойства ICT-сенсора [211]. Для синтеза **37** в качестве исходного соединения использовалось формильное производное **33**. Конденсация **33** с перхлоратом *N*-метил- $\gamma$ -пиколиния в основных условиях с высоким выходом приводила к продукту **37**.

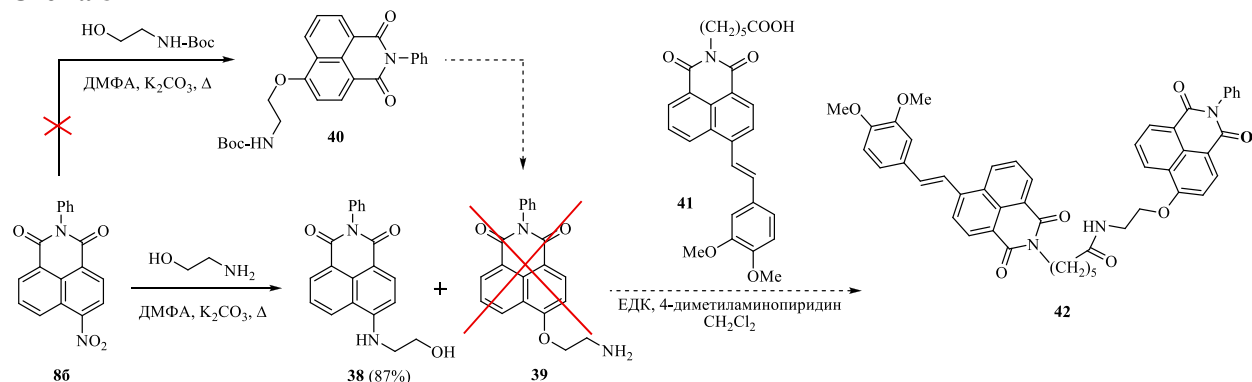
Схема 7



На следующем этапе работы мы приступили к созданию бисхромофорных систем. В роли хромофорных компонент RET-систем *tuna 1* были выбраны производные 4-алкокси-1,8-нафталимида, 4-диметоксистирил-1,8-нафталимида, 4-аминонафталимида и стирилпиридиниевых красителей. Стратегия ковалентной сшивки двух молекулярных фрагментов заключалась в создании амидной связи между ними. Было принято решение о введении *O*-алкиламиногруппы в состав заместителя в 4-м положении нафталинового

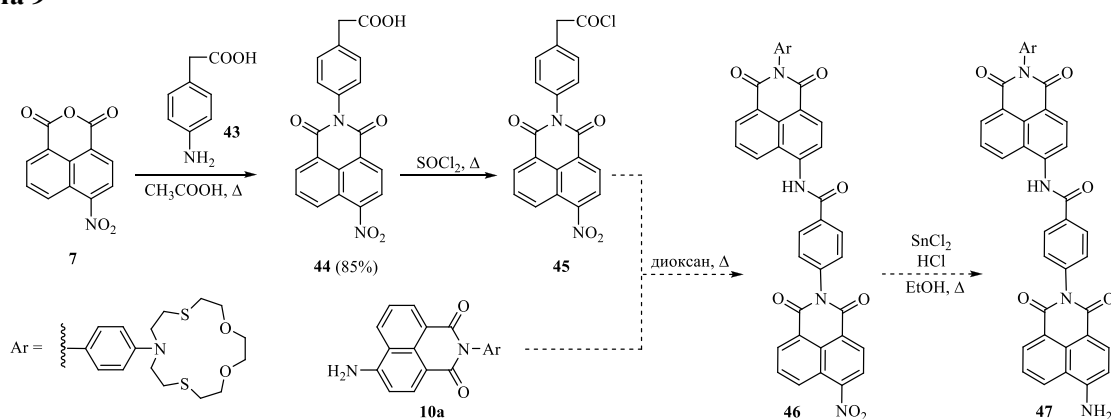
ядра. Бисхромофорный продукт **42** планировалось получать путем реакции аминокпроизводного **39** (схема 8) с карбоновой кислотой **41**, которая имела в достаточном количестве в лаборатории и была получена по описанной методике [212]. Трудности возникли на стадии нуклеофильного замещения нитрогруппы в соединении **86**. Известно, что этаноламин реагирует с 4- нитропроизводными нафталимида с образованием 4-(*N*-2-гидроксиэтил)аминозамещенных. В тоже время, нагревание нитропроизводных с 2-метоксиэтанолом в присутствии основания ( $K_2CO_3$ ) дает соответствующие алкоксинафталимиды. Взаимодействие **86** с этаноламином в ДМФА в присутствии  $K_2CO_3$  привело с высоким выходом к **38**, в то время как образования продукта **39** не наблюдалось вообще. *N*-Бокированное производное этаноламина в указанных условиях в реакцию с **86** не вступало.

Схема 8



Для следующей попытки шивки двух хромофоров через реакцию ацилирования нами были выбраны производные 1,8-нафталимида, содержащие в 4-м положении нафталинового ядра amino/аминозамещенную группу. Синтез бисхромофорного производного **47** заключался в ацилировании аминонафталимида **10a** хлорангидридом **45** (схема 9) и последующим восстановлением нитрогруппы в **46** до конечного продукта. Кислота **44** была получена при имидировании нитронафталевого ангидрида **7** (4-аминофенил)уксусной кислотой **43**. Однако на следующем этапе синтеза не удалось получить в достаточном количестве хлорангидрид **45**.

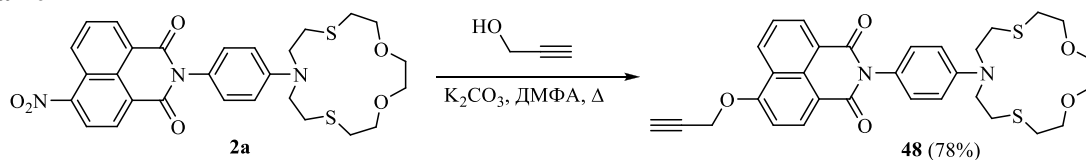
Схема 9



Хорошие результаты в отношении синтеза бисхромофорных систем были получены при использовании медь(I)-катализируемой клик-реакции азид-алкинового 1,3-диполярного циклоприсоединения. Данный тип реакций относится к так называемым «клик-процессам» и часто используется в современном органическом синтезе, так как протекает с высокой скоростью и селективностью в мягких условиях. Ковалентная сшивка молекул, несущих азидидную и алкиновую функциональные группы, проходит по механизму 1,3-диполярного циклоприсоединения, в результате образуется конъюгат, представляющий собой 1,4-замещенное производное 1,2,3-триазола.

В качестве ХД был выбран 4-метокси-1,8-нафталимид. Было решено не использовать производные 4-(ацил)амино-1,8-нафталимида в качестве ХД, поскольку, как было показано выше, введение (ацил)аминогруппы в 4-е положение нафталинового ядра осуществить сложнее по сравнению с введением метоксигруппы (при том, что спектральные характеристики 4-метокси- и 4-(ацил)аминонафталимидов отличаются незначительно). В системах *типа 1* рецепторный фрагмент присоединен со стороны хромофора-донора энергии алкокси-нафталимида, поэтому для проведения клик-реакции нами было получено пропаргильное производное **48** путем нуклеофильного замещения нитрогруппы **2a** под действием пропаргильного спирта и карбоната калия в ДМФА (схема 10).

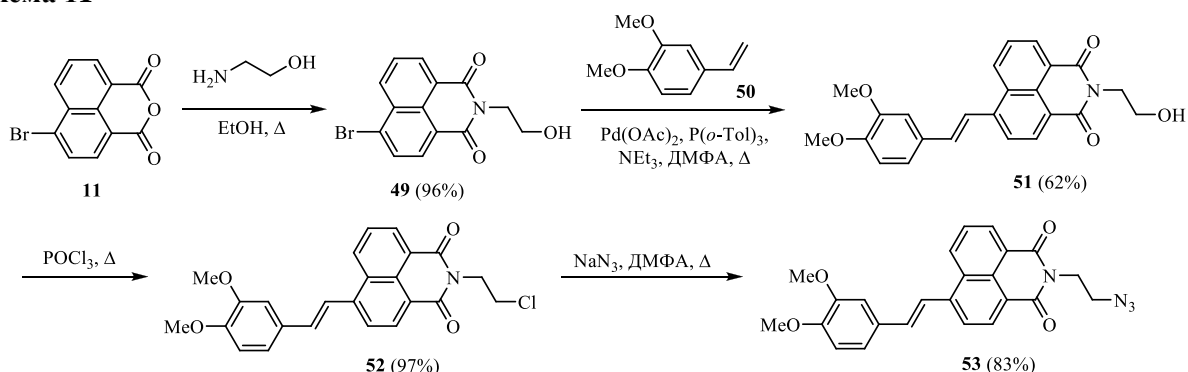
**Схема 10**



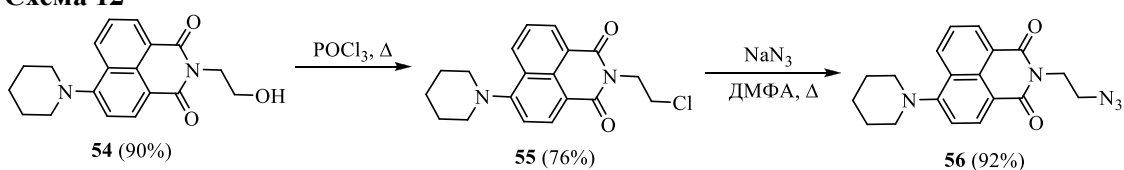
Также для получения RET-систем *типа 1* был получен ряд красителей **53**, **56**, **61**, содержащих азидную группу (схемы 11–13). Стирилнафталимид **53** синтезировали имидированием бром-нафталевого ангидрида **11** с последующим превращением по Хеку с 3,4-диметоксистиролом **50** (схема 11). Синтез проводили в типичных для данного типа реакции условиях: с использованием в качестве предшественника палладиевого катализатора соли Pd(OAc)<sub>2</sub>, трифенилфосфина в качестве лиганда и триэтиламина как основания [213]. Замена гидроксильной группы соединения **51** на азидную (схема 11) проводилась через стадию получения хлор-производного **52** действием оксихлорида фосфора по адаптированным из литературы методикам [214; 215]. Заключительной стадией синтеза стало проведение реакции **52** с азидом натрия в среде ДМФА. По аналогичной схеме был получен аминафталимид **56** путем введения пиперазинового фрагмента в 4 положение нафталимидного ядра **54** и последующими превращениями в азид **56** с высокими выходами (схема 12). В качестве третьего компонента для создания

бисхромофорных систем *типа 1* использовался стирил **61** (схема 13). Краситель **61** был ранее получен сотрудником нашей лаборатории к.х.н. Устимовой М. А. по описанной методике [216] из коммерчески доступного 4-пиколина **57**.

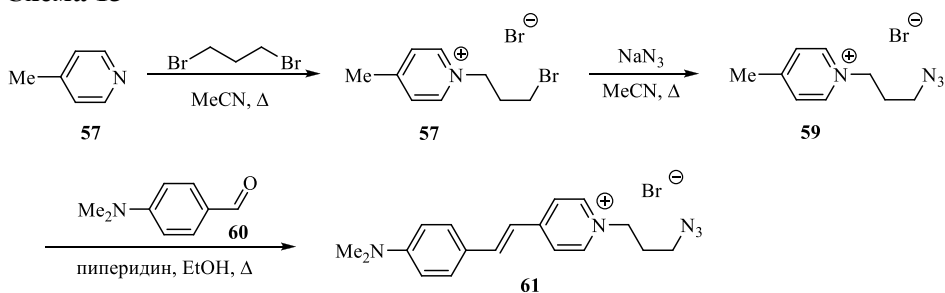
#### Схема 11



#### Схема 12

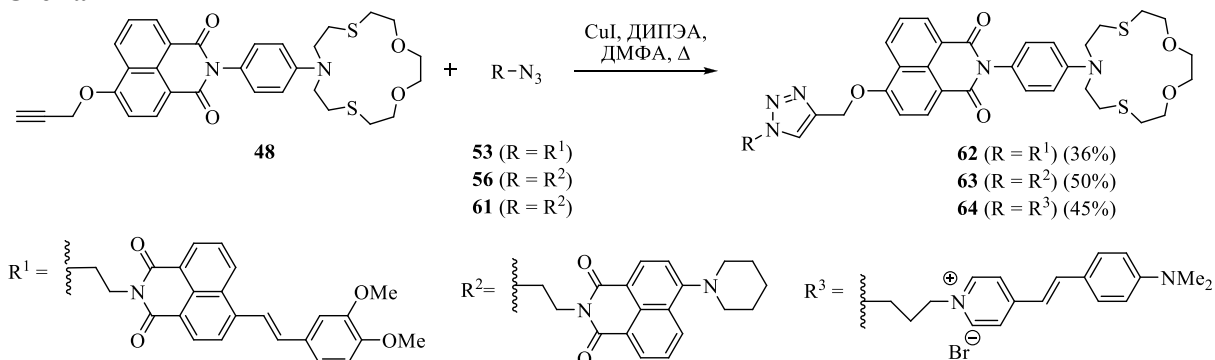


#### Схема 13



В результате проведенных реакций циклоприсоединения «азид – алкин» из пропаргильного производного **48** и соединений **53**, **56** и **61** были получены конъюгаты *типа 1* **62**, **63** и **64** (схема 14).

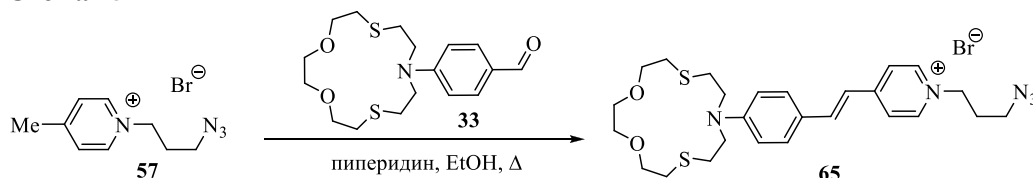
#### Схема 14



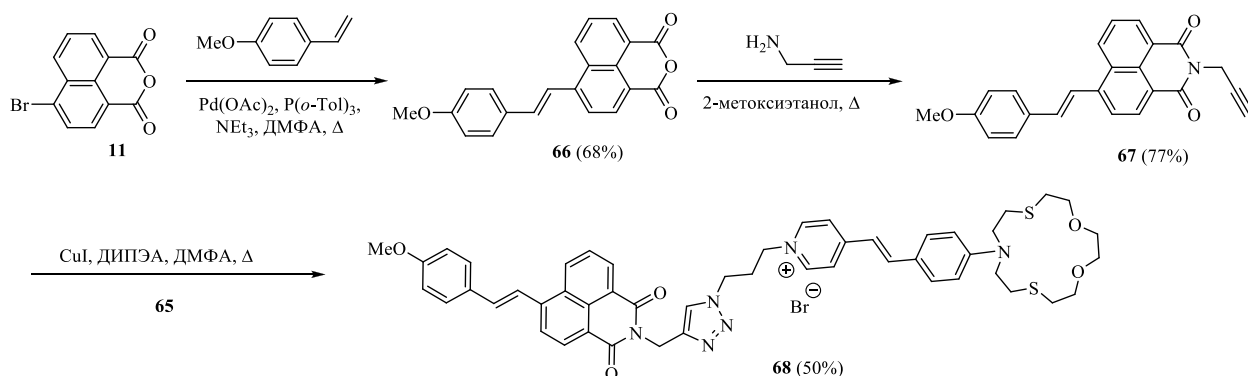
Для получения RET-систем *типа 2*, в которых рецептор присутствовал в составе хромофора-акцептра, нами использовалась отработанная стратегия сшивки двух хромофоров – медь(I)-катализируемая клик-реакция 1,3-диполярного азид-алкинового циклоприсоединения. В качестве «азида» и хромофора, содержащего рецепторный

фрагмент, использовалось производное **65** (схема 15), полученное по методике [217] путем конденсации в основных условиях альдегида **33** с солью  $\gamma$ -пиколиния **60**. Вторым компонентом клик-реакции («алкином») были производные нафталимида **67** и **69**, содержащие пропаргильную группу (схема 15, 16). Пропаргильное производное 4-стирил-1,8-нафталимида **67** был получен по реакции Хека между 4-бромнафталевым ангидридом **11** и стиролом **65** с последующим имидированием ангидрида **66** пропаргиламином (схема 16).

**Схема 15**

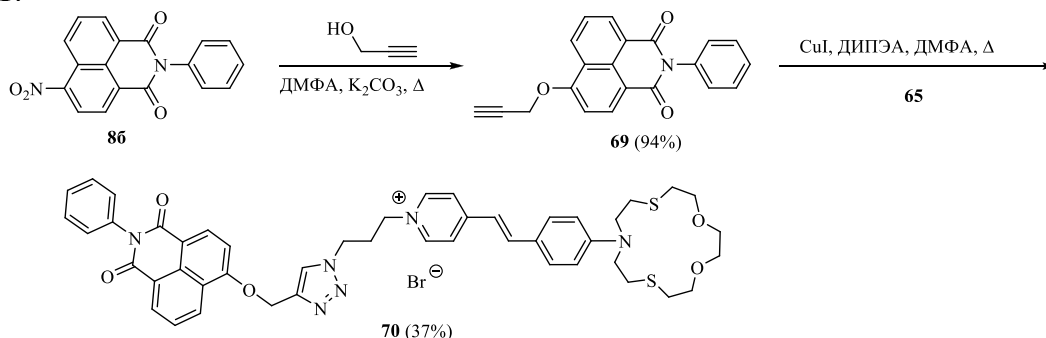


**Схема 16**



Производное **69** с тройной связью синтезировали из 4-нитро-*N*-фенил-1,8-нафталимида **86** нуклеофильным замещением нитрогруппы под действием пропаргильного спирта (схема 17). Взаимодействие **65** с **67** и **65** с **69** позволило получить целевые конъюгаты *типа 2* **68** и **70** с умеренным выходом (схема 17).

**Схема 17**

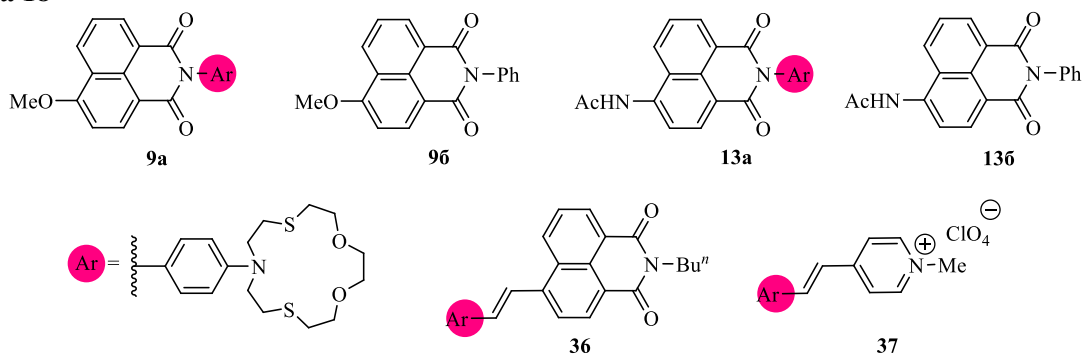


### 3.2. Изучение спектрально-люминесцентных свойств и комплексообразования монохромоформных сенсоров в растворах и живых средах

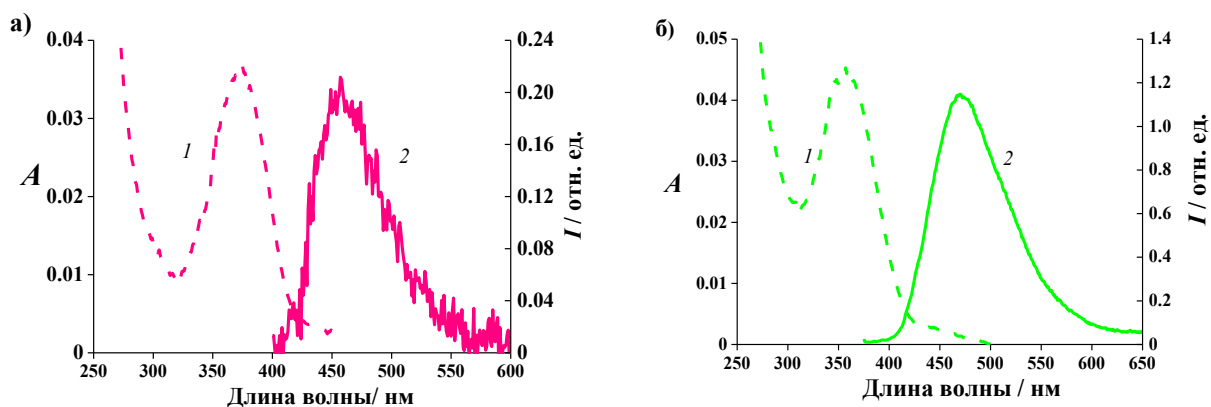
Перед созданием бисхромоформных молекул нами были изучены спектрально-люминесцентные свойства компонентов предполагаемых RET-пар **9a**, **13**, **36** и **37**,

содержащие рецепторный фрагмент и представляющие собой монокромофорные катионные сенсоры (схема 18).

### Схема 18



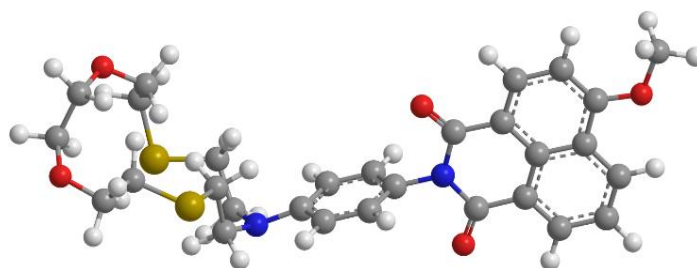
Для исследования оптических свойств были записаны спектры поглощения и флуоресценции соединения **9a**, **13a** и модельного вещества **9b** (схема 18), в котором отсутствует краун-эфирный фрагмент. На рис. 5 приведены спектры краунсодержащих производных **9a** и **13a** в смеси вода – метанол. Соединение **9a** имеет максимум поглощения при 374 нм и полосу испускания при 458 нм (рис. 5а). В спектрах поглощения присутствует длинноволновая полоса переноса заряда с электронодонорной метокси-группы на карбонильные группы карбоксимидного остатка. Введение краун-эфирного заместителя не влияет на максимум положения полос поглощения и флуоресценции. Это связано с отсутствием сопряжения между *N*-арильным фрагментом и нафталимидной частью молекулы. Похожие спектральные характеристики показывало и соединение **13a**, отличающиеся от **9a** лишь заместителем в 4-м положении нафталинового кольца (рис. 5б).



**Рис. 5.** Стационарные спектры (а) **9a** и (б) **13a** поглощения и испускания ( $1.33 \cdot 10^{-6}$  М) в водном растворе, содержащем 40 об.% MeOH,  $\lambda_{\text{ex}} = 375$  нм. Пунктиром обозначены спектры поглощения, линией спектры флуоресценции.

Классическая архитектура флуорофор–линкер–рецептор молекулы **9a** была подтверждена оптимизированной геометрией основного состояния (рис. 6), показывающей почти ортогональную ориентацию плоскостей нафталимидного и фенильного колец и, таким образом, отсутствие сопряжения между рецептором и

хромофором. Квантовые выходы флуоресценции ( $\phi^fl$ , табл. 1) измерялись по методике, взятой из [218]. Показано, что введение краун-эфирного заместителя сопровождается уменьшением квантового выхода как в паре соединений **9a** по сравнению с **9b**, так и в паре **13a** с **13b**. По-видимому, это связано с безызлучательным процессом фотоиндуцированного переноса электрона РЕТ. В представленных соединениях **9a** и **13a** данный процесс происходит с атома азота краун-эфирного фрагмента на нафталиimidную часть молекулы.



**Рис. 6.** Оптимизированная геометрия основного состояния соединения **9a** (метод РМ6). Двугранный угол между нафталиimidным и бензольным кольцом составляет 89°.

Соединение	$\lambda_{max}^{abs}$ ; нм	$\epsilon_\lambda$ ; л/моль•см	$\lambda_{max}^{fl}$ ; нм	$\lambda_{ex}$	$\phi^fl$
<b>9a</b>	375	27 067	466	375	0.0005
<b>9b</b>	373	22 000	458	375	0.42
<b>13a</b>	375	13 513	476	375	0.018
<b>13b</b> (H <sub>2</sub> O)	356	22 387	482	320	0.73
<b>13b</b> (MeOH)	364	21 380	473	320	0.77

**Табл. 1.** Спектральные характеристики соединения **9a**, **9b**, в смеси вода – метанол (40% об. MeOH) и **13b** в воде и метаноле, данные по соединению **13b** взяты из [219].

Для объяснения различия квантовых выходов **9a** и **9b** были проведены квантово-химические расчёты методом РМ6 в программном комплексе МОРАС. Энергетическая диаграмма, составленная по результатам расчётов, приведена на рис. 7. На представленной диаграмме показано, что НСМО соединения **9a** локализована в нафталиimidной части молекулы, а ВЗМО на рецепторном фрагменте. Переход, соответствующий длинноволновой полосе поглощения, соответствует переходу электрона с ВЗМО(-3) на орбиталь НСМО. По данным диаграммы видно, что возможен термодинамически выгодный РЕТ-процесс с орбитали ВЗМО на однократнозанятой орбиталь ВЗМО(-3). По-видимому, этот процесс является конкурирующим по отношению к излучательному каналу релаксации возбужденного состояния, что объясняет низкий квантовый флуоресценции соединения **9a**. Для сравнения, в соединении **9b**, не содержащем краун-эфирного фрагмента, локальная ВЗМО *N*-арильного заместителя обладает более низкой энергией, чем орбиталь 4-метоксизамещенного нафталиimidного остатка. Поэтому переноса электрона не наблюдается, и соединение проявляет

интенсивную эмиссию. Из сказанного выше можно сделать вывод, что соединение **9a** должно проявлять свойства переключаемого PET-сенсора при образовании комплексов с катионами металлов.

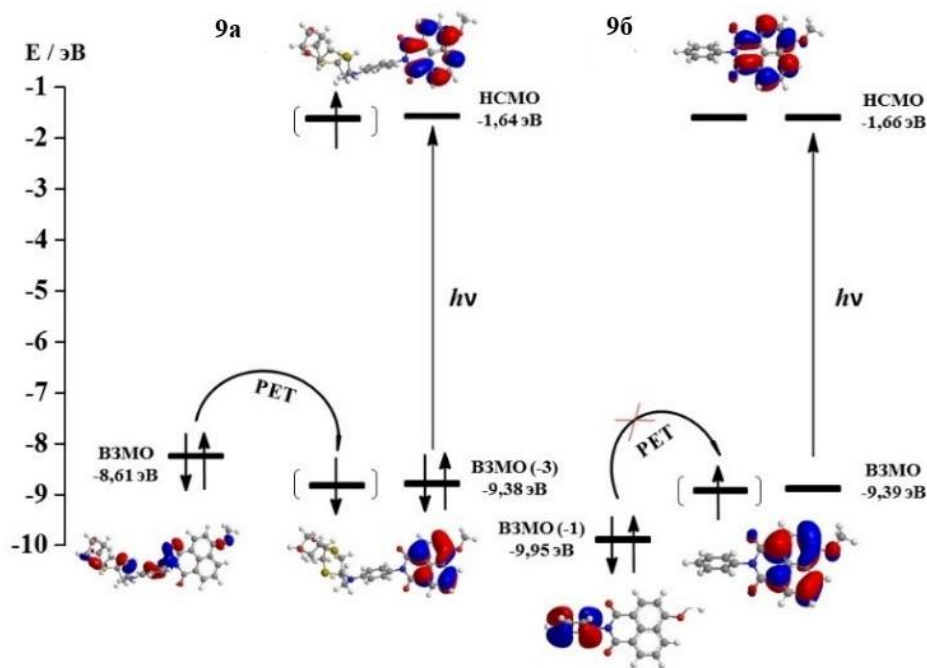


Рис. 7. Энергетическая диаграмма уровней МО соединения **9a** и **9b** соответственно.

Квантовый выход флуоресценции ( $\phi^{\text{fl}}$ ) **13a** составил 0.018. Такое низкое значение  $\phi^{\text{fl}}$ , также подтверждается возможностью протекания PET-процесса данными квантово-химических расчетов методом PM6 (рис. 8), согласно которым уровень энергии локальной высшей заполненной молекулярной орбитали *N*-арильной группы (ВЗМО,  $-8.84$  эВ) располагается выше самой высокой по энергии заполненной МО нафталимидного остатка (ВЗМО(-1),  $-8.91$  эВ). Поглощение света в длинноволновой области вызывает переход электрона между ВЗМО(-1) и НСМО, в результате чего ВЗМО(-1) становится однократно занятой в возбужденном состоянии. Релаксация возбужденного состояния, таким образом, может протекать путем энергетически выгодного безызлучательного переноса одного электрона с ВЗМО на ВЗМО(-1).

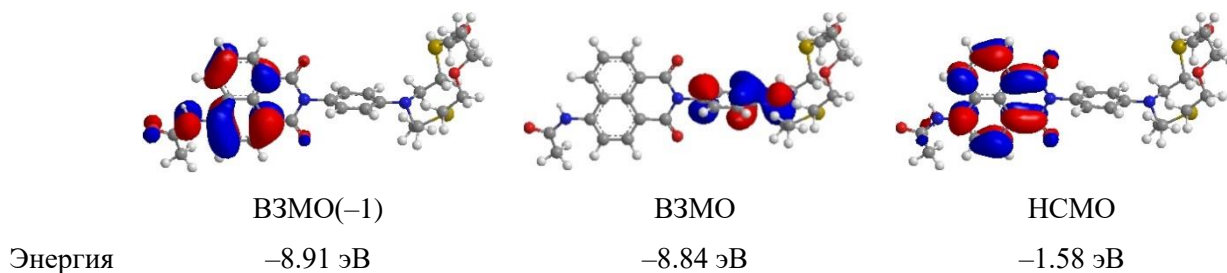
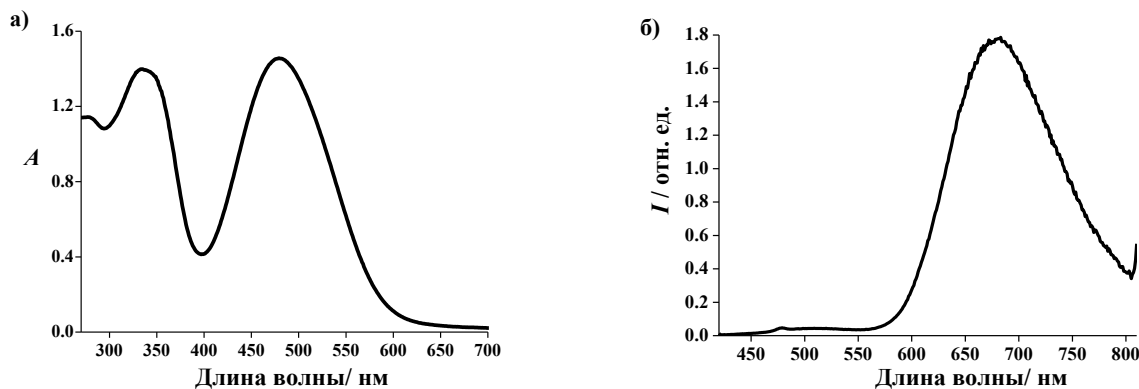


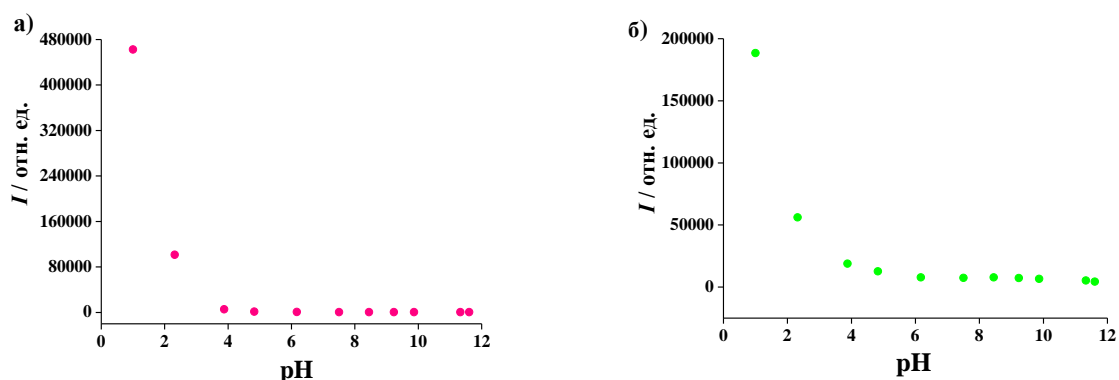
Рис. 8. Граничные молекулярные орбитали соединения **13a**, рассчитанные с использованием метода PM6.

Далее были изучены спектральные характеристики нафталимидного производного **36**. Длинноволновая полоса в спектре поглощения соединения **36** (рис. 9а) в воде с максимумом при 490 нм соответствует внутримолекулярному переносу заряда от донорного атома азота арильного фрагмента к электроноакцепторным карбонильным группам дикарбоксиимидного остатка. Флуоресценция **36** характеризуется наличием длинноволновой полосы, характерной для стирилнафталимидов, в области 680 нм ( $\phi^f = 0.028$ ) (рис. 9б).



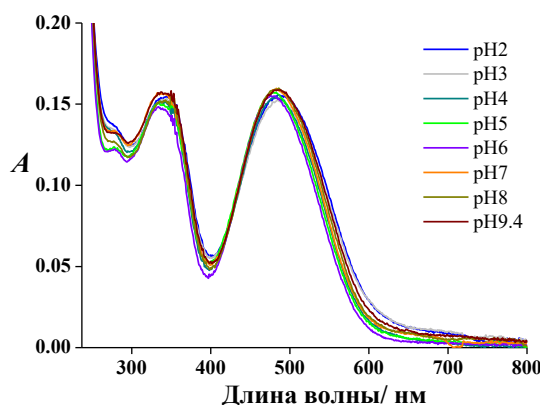
**Рис. 9.** Стационарные спектры поглощения (а) и испускания (б) **36** (10 мкмоль/л) в воде (рН 4.5, ацетатный буфер, 0.01 М),  $\lambda_{ex} = 410$  нм.

Прежде чем приступить к изучению сенсорных свойств **9a**, **13a** и **36** по отношению к катионам металлов различной природы, необходимо было изучить влияние рН на люминесцентные свойства полученных соединений. Известно, многие соли переходных металлов в водной среде подвергаются гидролизу по катиону, что приводит к уменьшению рН раствора [220]. Атом азота краун-эфирного фрагмента способен протонироваться в кислой среде. Получается, что невозможно точно сказать, является ли разгорание флуоресценции результатом координации с металлом или протонирования лиганда. Сначала было изучено влияние рН на флуоресценцию производных **9a** и **13a** (рис. 10а, б). В обоих случаях наблюдалось увеличение интенсивности эмиссии при снижении рН ниже 4.0, что можно объяснить ингибированием процесса РЕТ при протонировании атома азота азкараун-эфирного рецептора. При рН выше 6.0 не происходило никаких изменений в интенсивности флуоресценции. На основании этих результатов для измерения сенсорных свойств **9a** была выбрана среда с рН 7.3 (HEPES буфер). Так как сенсор **13a** имеет аналогичное строение с **9a** нами было принято решение провести его физико-химические исследования при слегка закисленном рН 6 (ацетатный буфер). Данный выбор рН обусловлен тем, что он близок к физиологическому, а также исключает возможность протонирования сенсоров в данной среде.



**Рис. 10.** Зависимость интенсивности флуоресценции от рН среды соединений **9a** (а) и **13a** (б) ( $5.0 \cdot 10^{-6}$  М, фосфатно-цитратный буфер, 6.7 мМ) в смеси вода–метанол (40% об. MeOH),  $\lambda_{\text{ex}} = 375$  нм.

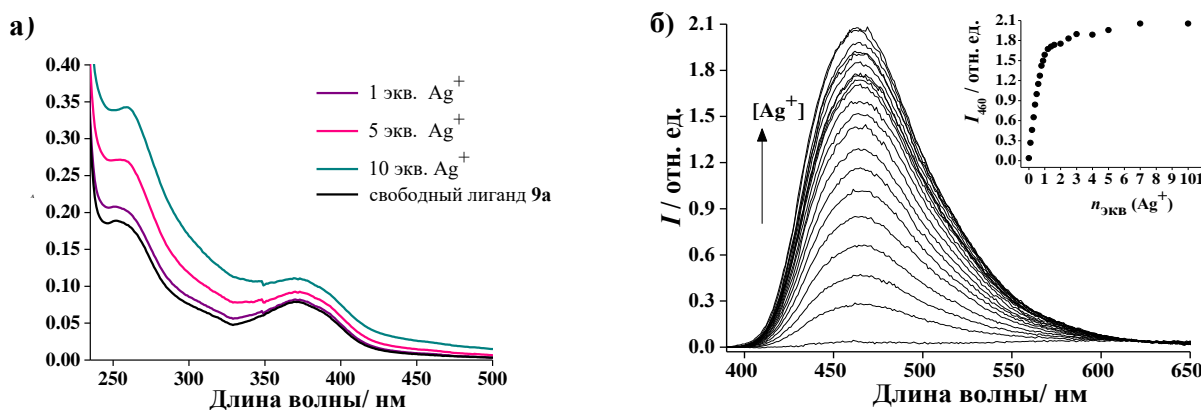
Для оценки влияния кислотности среды на поведение сенсора **36** нами были записаны его спектры поглощения при различных рН. Как видно из рис. 11, рН среды практически не влияет на сенсорные свойства соединения **36**, так как не наблюдается сдвига максимума поглощения. Такое незначительное влияние рН, скорее всего, обусловлено низкой донорностью атома азота из-за сопряжения его НЭП с нафталимидной частью молекулы. Поэтому для изучения соединения **36** нами был выбран закисленный рН 4.5, являющийся подходящим для интервала физиологического рН лизосом (рН 4–6) [221], и при котором большинство катионов металлов находится в виде свободных ионов [220]. Так как в сенсоре **36** краун-эфирный фрагмент аналогично соединению **36** входит в состав хромофорной системы красителя, для анализа его спектрально-люминесцентных свойств также использовался рН 4.5.



**Рис. 11.** Зависимость интенсивности флуоресценции от рН среды соединения **36** ( $1.0 \cdot 10^{-5}$  М), в воде (HEPES буфер, 0.01 мМ),  $\lambda_{\text{ex}} = 410$  нм.

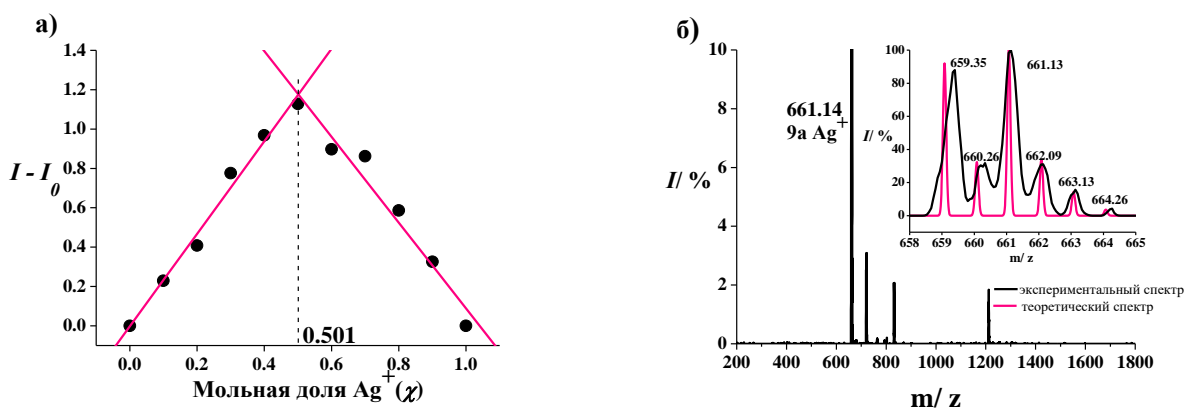
На следующем этапе работы изучалась комплексообразование полученного ряда сенсоров. Присутствие катионов  $\text{Ag}^+$  в водном растворе лиганда **9a** приводило к резкому увеличению испускания при 460 нм, в то время как изменения в спектре поглощения были

незначительными (рис. 12а). По-видимому, разгорание флуоресценции связано с подавлением РЕТ-процесса при координации катиона по краун-эфирному фрагменту.



**Рис. 12.** Спектральные характеристики **9a** (5 мкМ) при добавлении  $\text{Ag}^+$  (0–50 мкМ), рН7.3 (HEPES буфер, 10 мМ). (а) Спектры поглощения; (б) Спектры флуоресценции,  $\lambda_{\text{ex}}=375$  нм. Вставка на панели (б): зависимость интенсивности флуоресценции при 460 нм от количества эквивалентов  $\text{Ag}^+$ .

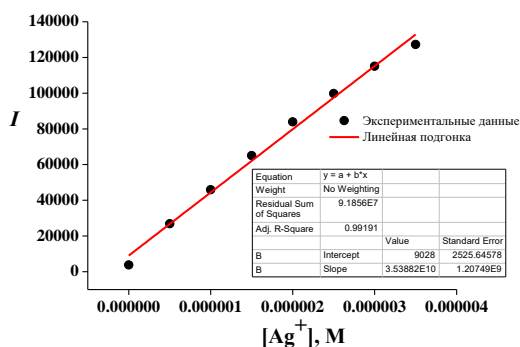
Доказательство образования комплекса **9a** с  $\text{Ag}^+$  было подтверждено графиком Джоба, который показал максимальную интенсивность флуоресценции смешанного раствора, содержащего лиганд **9a** и перхлорат серебра (I), приблизительно при 0.5 мол. % Ag, что соответствует комплексу состава 1:1 (рис. 13а). Кроме того, анализ ESI MS раствора **9a** в ацетонитриле в присутствии 1 экв.  $\text{AgClO}_4$  (рис. 13б) показал основной сигнал при  $m/z$  661.14 (расчет: 661.09), соответствующий катиону  $[\mathbf{9a} + \text{Ag}]^+$ .



**Рис. 13.** (а) График Джоба, показывающий разницу между интенсивностью флуоресценции до ( $I_0$ ) и после ( $I$ ) добавления  $\text{Ag}^+$  в зависимости от мольной доли  $\text{Ag}^+$  ( $\chi = C[\text{Ag}^+]/(C[\text{Ag}^+] + C[\mathbf{9a}])$ ) при постоянном значении  $C[\text{Ag}^+] + C[\mathbf{9a}]$  (5 мкМ) в воде, рН 7.3 (HEPES буфер, 10 мМ),  $\lambda_{\text{ex}} = 375$  нм. Прямые линии на панели а были получены как линейные подгонки экспериментальных точек: левая линия ( $\chi = 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5$ , коэффициент корреляции 0.985), правая линия ( $\chi = 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0$ ; коэффициент корреляции 0.953). (б) Спектр ESI MS раствора **9a** (25 мкМ) в MeCN, содержащем 1 экв.  $\text{AgClO}_4$ . На вставке показан теоретический и экспериментальный спектр в увеличенной области, соответствующей катиону  $[\mathbf{9a} + \text{Ag}]^+$ .

По данным спектрофлуориметрического титрования (рис. 12а) был рассчитан логарифм константы комплексообразования ( $\lg K$ ), который составил  $6.39 \pm 0.07$ . Более того, сенсор **9a** продемонстрировал линейную зависимость между интенсивностью

флуоресценции и количеством эквивалентов серебра в растворе в интервале концентраций 0.5–3.5 мкМ (рис. 14).



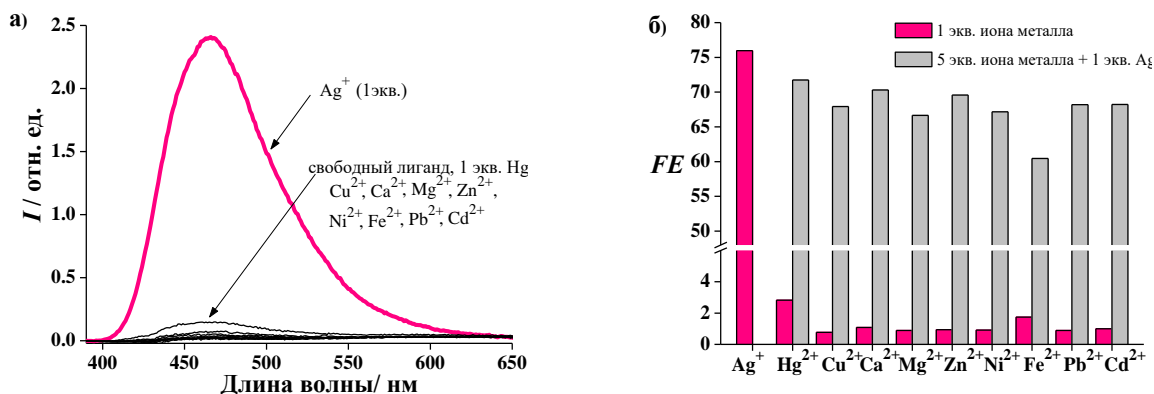
**Рис. 14.** График интенсивности флуоресценции **9a** (5 мкМ) при 460 нм в зависимости от возрастающих концентраций  $\text{Ag}^+$  (0–3.5 мкМ), используемых для расчета предела обнаружения,  $\lambda_{\text{ex}} = 375$  нм. На вставке показаны параметры подгонки.

С использованием метода стандартного отклонения при низких концентрациях [222; 223], из наклона данного калибровочного графика ( $r$ ) и стандартного отклонения раствора свободного лиганда **9a** ( $S_Y$ ), был найден предел обнаружения  $\text{Ag}^+$  ( $C_{\text{ПО}}$ ) равным 0.38 мМ в соответствии с уравнением (1):

$$C_{\text{ПО}} = \frac{3S_Y}{r} \quad (1)$$

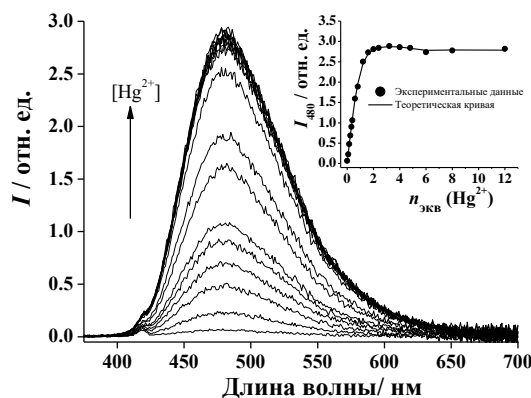
Стоит обратить внимание, что полученное значение  $C_{\text{ПО}}$  довольно близко к максимальному уровню загрязнения серебра ( $I$ ) в питьевой воде (0.1 мг дм<sup>-3</sup> или 0.93 мМ), установленному Агентством по охране окружающей среды США [224]. Комплексообразование **9a** изучалось с рядом 2-х зарядных катионов металлов ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ) и серебра. При добавлении в раствор сенсора **9a** указанных катионов, значительное разгорание флуоресценции наблюдалось только в присутствии  $\text{Ag}^+$  (рис. 15а). Также были проведены эксперименты по конкурентному добавлению катионов металлов. Спектр испускания измерялся до и после добавления других ионов (5 экв.) к раствору **9a** (5 мМ), содержащему  $\text{Ag}^+$  (1 экв.). Как можно видеть, присутствие  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  или  $\text{Cd}^{2+}$  не вызывало выраженных изменений сигнала, тогда как в случаях  $\text{Hg}^{2+}$  и  $\text{Fe}^{2+}$  наблюдался небольшой эффект (рис. 15б). Примечательно, что такой низкий отклик сенсора **9a** на катионы ртути (II) поначалу казался довольно неожиданным, поскольку азадитиа-15-краун-5-эфир является известным ионофором для  $\text{Hg}^{2+}$  [225–228]. Анализ условий, при которых этот рецептор был способен эффективно связывать  $\text{Hg}^{2+}$ , показал, что в качестве среды использовались в основном чистые органические растворители (ацетонитрил [225; 226], хлороформ [226] или ТГФ [227]). Однако в водном этаноле (50 об. % EtOH) при pH 7.2 наблюдалось похожее поведение, показывающее высокую селективность к  $\text{Ag}^+$  по сравнению с  $\text{Hg}^{2+}$ .

Это согласуется с тем фактом, что при нейтральном рН ион ртути (II) полностью гидролизуется и существует в форме  $\text{Hg}(\text{OH})_2$  [229], тогда как  $\text{Ag}^+$  подвергается гидролизу в гораздо меньшей степени.



**Рис. 15.** (а) Спектры флуоресценции **9a** (5 мкМ) при добавлении  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$  (1 экв.), рН 7.3 (HEPES буфер, 10 мМ); (б) селективность **9a** к  $\text{Ag}^+$ .  $\lambda_{\text{ex}} = 375$  нм. Значение *FE* (англ. Fluorescence Enhancement) рассчитывалось как отношение интенсивности испускания при 460 нм, измеренной после добавления иона металла, к интенсивности, измеренной до добавления.

Отдельно было исследовано комплексообразование **13a** с  $\text{Hg}^{2+}$  в водно-ацетатном буферном растворе при рН 6. Как и ожидалось, добавление перхлората ртути в водный раствор **13a** не приводило к изменению положения и интенсивности длинноволновой полосы в спектре поглощения, однако сопровождалось разгоранием флуоресценции (рис. 16). Увеличение интенсивности флуоресценции можно объяснить аналогичным с соединением **9a** снижением эффективности РЕТ-процесса при координации катиона металла с атомом азота рецептора, которая приводит к снижению электронодонорных свойств *N*-арильного заместителя. Интересно отметить, что рН 6, схожий с нейтральной средой, вызвал смену селективности сенсора с катиона серебра на катион ртути.

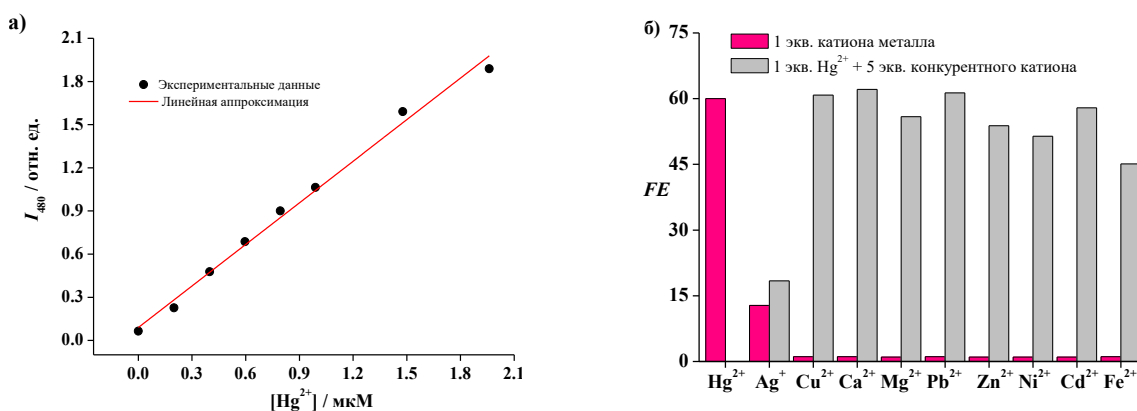


**Рис. 16.** Спектрофлуориметрическое титрование соединения **13a** (2.5 мколь/л) перхлоратом ртути (II) в воде при рН 6.0 (ацетатный буфер, 0.05 М),  $\lambda_{\text{ex}} = 365$  нм. Верхняя вставка показывает зависимость интенсивности флуоресценции на длине волны 480 нм ( $I_{480}$ ) от количества эквивалентов катиона ртути (II) ( $n_{\text{экв}}(\text{Hg}^{2+})$ ) в растворе.

Наблюдаемые изменения в спектре испускания флуоресценции (рис. 16) соответствовали образованию комплекса состава 1:1. По полученным в ходе

спектрофлуориметрического титрования данным было определено значение логарифма константы устойчивости  $(13a) \cdot Hg^{2+}$  ( $\lg K$ ), которое составило  $6.51 \pm 0.03$ . Кроме того, интенсивность флуоресценции на длине волны 480 нм обнаруживала хорошую линейную корреляцию (корреляционный коэффициент 0.991) с концентрацией  $Hg^{2+}$  в интервале 0–2.0 мкмоль/л (рис. 16). По тангенсу угла наклона  $r$  представленной калибровочной прямой (рис. 16а) и стандартному отклонению аналитического сигнала  $s$  (интенсивности флуоресценции) в соответствии с уравнением (1) было найдено, что значение предела обнаружения ртути  $[Hg^{2+}]_{по}$  с использованием сенсора **13а** в заданных условиях составляет 28 нмоль/л. Полученное значение близко к значению ПДК ртути в питьевой воде (30 нмоль/л) [230].

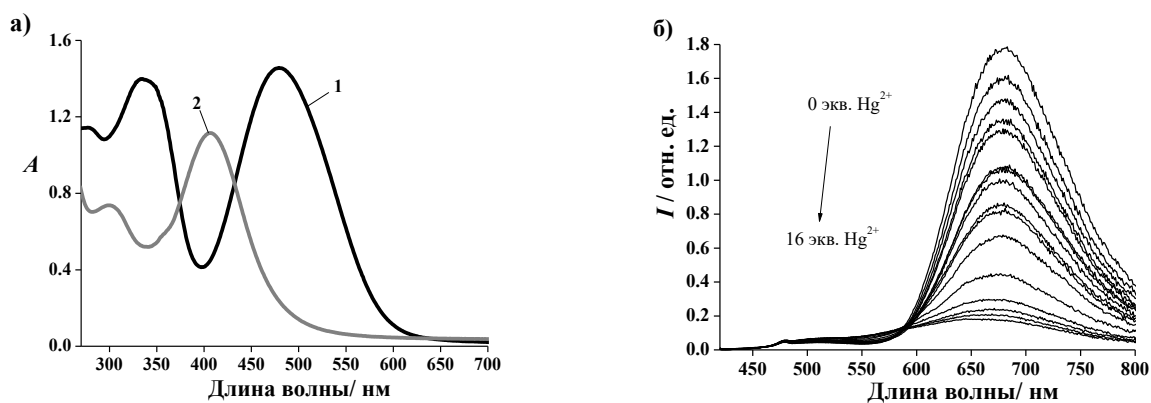
Анализ селективности сенсора **13а** показал, что добавление одного эквивалента  $Hg^{2+}$  приводит к значительному увеличению интенсивности флуоресценции, в то время как в случае катионов  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  изменения были незначительными (рис. 17б). Заметный эффект имело присутствие катионов  $Ag^+$ . Также было исследовано влияние добавления конкурентного иона на интенсивность флуоресценции комплекса  $(13a) \cdot Hg^{2+}$ . В типичном эксперименте спектр испускания записывали до и после добавления 5 эквивалентов  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  и  $Ag^+$  в раствор, содержащий **13а** и 1 экв.  $Hg^{2+}$ . Как видно из рис. 17б, все катионы, за исключением  $Ag^+$  не вызывают существенного снижения аналитического сигнала. Как было показано нами ранее, в случае соединения **9а** при pH 7.3 был образован достаточно устойчивый комплекс с  $Ag^+$ , однако в данных условиях при pH 6 интенсивность его флуоресценции ниже по сравнению с  $(13a) \cdot Hg^{2+}$ . Смена селективности рецептора в зависимости от pH среды, по всей видимости, связана с увеличением концентрации свободного катиона ртути (II) при понижении pH раствора.



**Рис. 17.** (а) Зависимость интенсивности флуоресценции **13а** (2.5 мкмоль/л) на длине волны 480 нм ( $I_{480}$ ) от концентрации  $Hg^{2+}$  в воде при pH 6.0 (ацетатный буфер, 0.05 М),  $\lambda_{ex} = 365$  нм. (б) Степень разгорания флуоресценции (FE) **13а** (5 мкмоль/л) в присутствии перхлоратов различных металлов в воде при pH 6.0 (ацетатный буфер, 0.05 М),  $\lambda_{ex} = 365$  нм.

Далее изучался стирилнафталимид **36**, содержащий краун-эфирный фрагмент в составе заместителя в 4-м положении нафталинового ядра (схема 17). В предложенном хемосенсоре **36** наличие сопряжения между атомом азота макроцикла и карбонильными группами имидного остатка предполагает возникновение спектрального отклика по ИСТ-механизму, в соответствии с которым комплексообразование вызывает изменение энергии электронного перехода с внутримолекулярным переносом заряда (ИСТ) в хромофоре при фотовозбуждении. В частности, координация катиона по краун-эфирному фрагменту, предположительно, должна затруднять смещение электронной плотности от рецептора на дикарбоксиимидный фрагмент и сопровождаться смещением максимумов поглощения и флуоресценции в коротковолновую область.

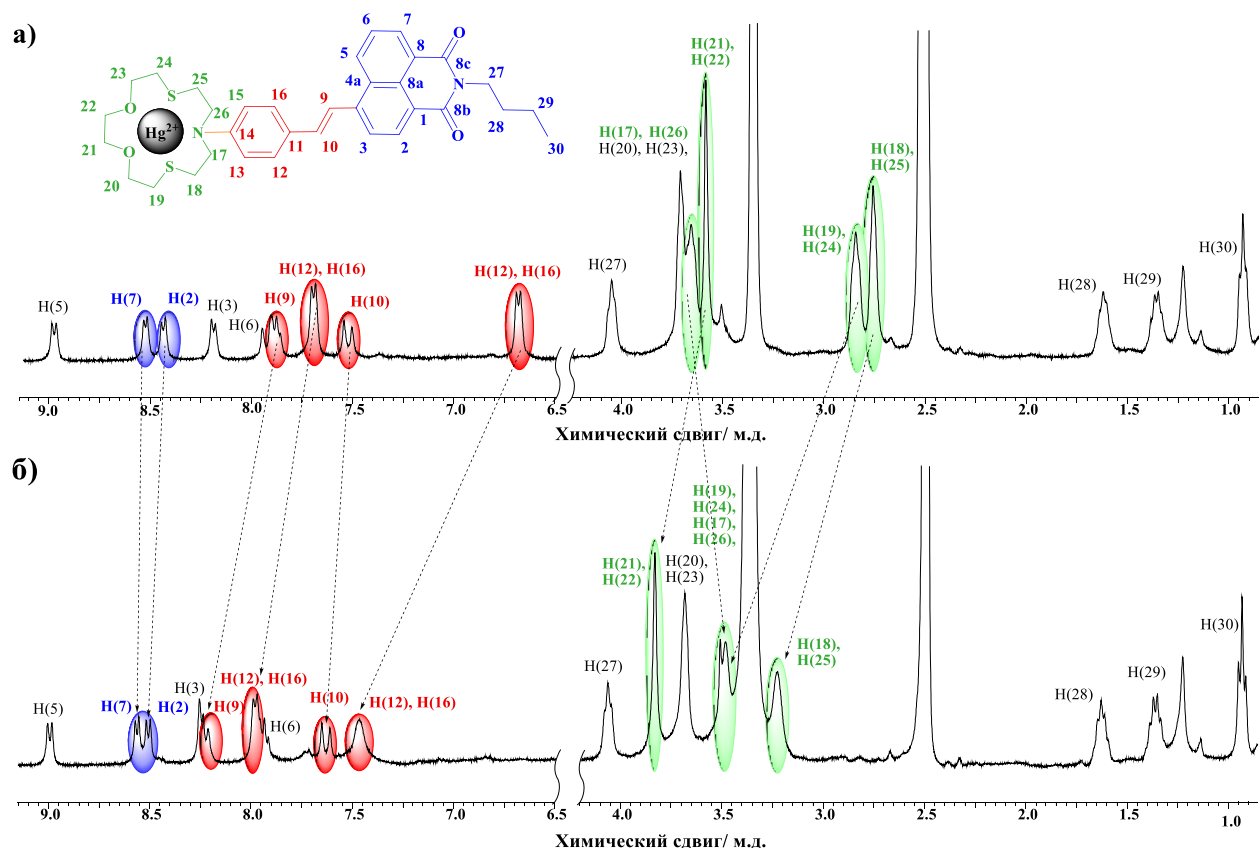
Добавление  $\text{Hg}^{2+}$  в водный раствор **36** приводило к появлению новой полосы в спектре поглощения, смещенной гипсохромно на 100 нм, которая связана с координацией катиона ртути по краун-эфирному остатку (рис. 18а). По-видимому, данные изменения вызваны тем, что при комплексообразовании атом азота макроциклического фрагмента частично выключается из сопряженной системы. Также связывание катиона ртути краун-эфирным рецептором было подтверждено с использованием спектроскопии  $^1\text{H}$  ЯМР. В присутствии перхлоратов ртути наблюдался сильный сдвиг сигналов протонов бензольного ядра и краун-эфирного цикла в область слабого поля, протоны нафталимидной части также сдвигались, но менее выражено (рис. 19).



**Рис. 18.** Спектральные свойства соединения **36** (10 мкмоль/л) в воде (рН 4.5, ацетатный буфер, 10 мМ). (а) Спектр поглощения **36** в отсутствие (1) и присутствии (2) перхлората ртути (II). (б) Спектры флуоресценции **36** при постепенном добавлении  $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$ ,  $\lambda_{\text{ex}} = 410$  нм.

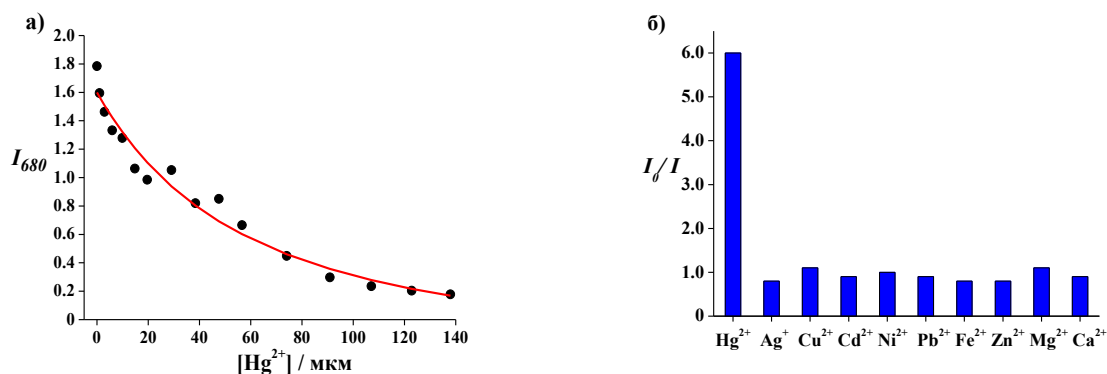
В спектре флуоресценции постепенное добавление катионов ртути приводило к тушению флуоресценции **36**. Уменьшение интенсивности эмиссионной полосы может быть обусловлено внутренним эффектом тяжелого атома в образующемся комплексе [92; 93; 231]. Наблюдаемые изменения в спектре испускания флуоресценции (рис. 17б) соответствовали образованию комплекса состава 1:1. При этом было установлено, что экспериментальные данные по зависимости интенсивности сигнала на длине волны

680 нм от концентрации  $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$  соответствуют теоретическому расчету, проведенному с использованием программы SpecFit32, если учитывать только образование комплекса данного состава (рис. 20а). По полученным в ходе спектрофлуориметрического титрования данным было определено значение логарифма константы устойчивости ( $36$ )  $\text{Hg}^{2+}$  ( $\lg K$ ), которое составило  $4.25 \pm 0.09$ . Такое низкое значение константы обусловлено уменьшением способности атома азота макроциклического рецептора координировать металлы из-за возникновения сопряжения с карбонильными группами нафталимидного остатка в структуре **36**.



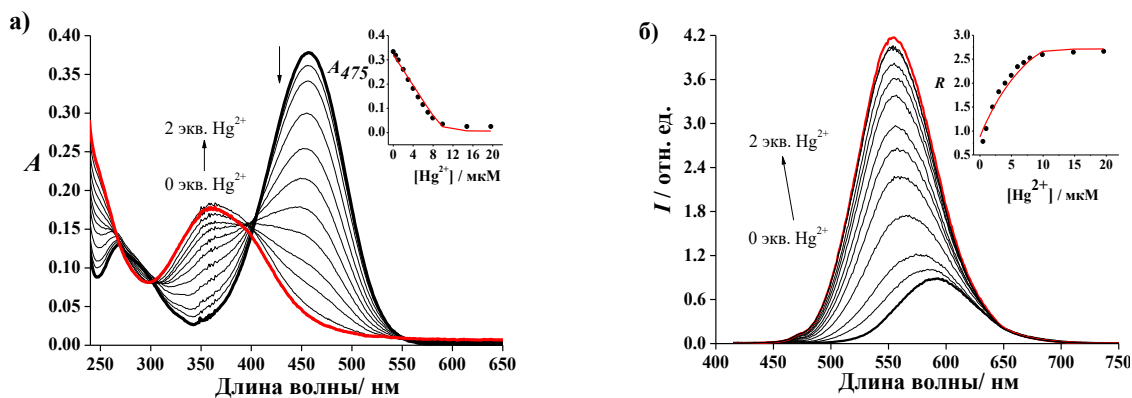
**Рис. 19.** Спектры ЯМР  $^1\text{H}$  соединения **36** (10 ммоль/л) в  $\text{DMSO-}d_6$  до (а) и после (б) добавления 5 экв.  $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$ . Частота спектрометра 400.02 МГц. Сигналы протонов, претерпевающие сильный сдвиг сигнала, отмечены цветом.

Для анализа селективности сенсора **36** были измерены флуоресцентные отклики на присутствие различных ионов металлов. В качестве меры величины отклика использовалось отношение интенсивности флуоресценции лиганда к интенсивности после добавления катиона металла на длине волны 680 нм. Данные, представленные на рис. 20б, показывают, что добавление десяти эквивалентов  $\text{Hg}^{2+}$  приводит к значительному тушению флуоресценции, в то время как в случае катионов  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  изменения были незначительными.



**Рис. 20.** (а) Зависимость интенсивности флуоресценции **36** на длине волны 680 нм ( $I_{680}$ ) от концентрации катионов  $\text{Hg}(\text{II})$  в растворе (точки соответствуют экспериментальным данным, кривые – расчету). (б) Отношение интенсивности флуоресценции **36** ( $I_0$ ) к интенсивности после добавления 10 экв. катиона металла ( $I$ ) на длине волны 680 нм,  $\lambda_{\text{ex}} = 410$  нм.

Стирилпиридиниевый ИСТ-флуороионофор **37** (схема 18), в структуре которого НЭП атома азота краун-эфирного рецептора сопряжена с ЭА пиридиниевым фрагментом, был ранее изучен в нашей лаборатории [211]. Исследования показали, что хемосенсор **37** с катионами ртути (II) в водном растворе при pH 6.0 образует устойчивый комплекс (**37**)  $\text{Hg}^{2+}$ , характеризующийся логарифмом константы устойчивости ( $\lg K$ ) равным  $6.03 \pm 0.06$ . При этом связывание катионов сопровождается гипсофлорным и гиперфлорным эффектом. Однако величина гипсофлорного сдвига при переходе от лиганда **37** к (**37**)  $\text{Hg}^{2+}$  оказалось небольшой (36 нм). В настоящей работе было изучено комплексообразование **37** в водно-ацетатном буферном растворе при закисленном pH 4.5 (рис. 21).

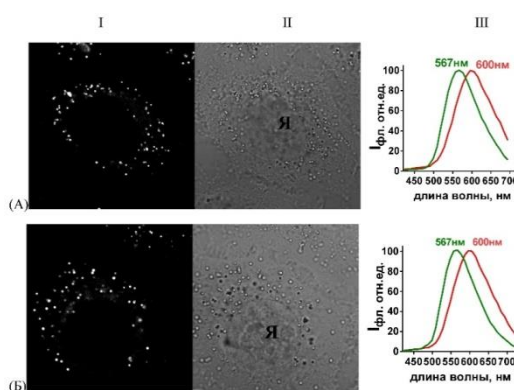


**Рис. 21.** Изменения в спектрах поглощения (а) и флуоресценции (б) соединения **37** (10.0  $\mu\text{M}$ ) при постепенном добавлении перхлората ртути (II) в воде при pH 4.5 (ацетатный буфер, 0.01 M),  $\lambda_{\text{ex}} = 405$  нм. Верхние вставки на рисунках а) и б) показывают зависимость оптической плотности на длине волны 475 нм ( $A_{475}$ ) и отношения  $R$  интенсивности  $I_{550}/I_{580}$  от концентрации  $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$  в растворе (точки соответствуют экспериментальным данным, кривые – расчету).

Связывание катионов ртути (II) соединением **37** сопровождалось появлением в спектре поглощения полосы в области 350 нм, отвечающей комплексу состава металл – лиганд 1:1 (рис. 21а). При этом интенсивность длинноволновой полосы с максимумом при 457 нм, которая связана с внутримолекулярным переносом заряда в свободном лиганде,

уменьшалась. В спектре флуоресценции **37** комплексообразование вызывало смещение максимума полосы в коротковолновую область и увеличение ее интенсивности (рис. 21б). Отмеченные спектральные изменения являются результатом увеличения энергии ICT-перехода в комплексе вследствие уменьшения ЭД свойств атома азота макроциклического рецептора. По данным спектрофотометрического и спектрофлуориметрического титрования **37** перхлоратом ртути (II) были определены константы устойчивости комплекса  $(37) \cdot \text{Hg}^{2+}$  равными  $7.4 \pm 0.4$  и  $7.6 \pm 0.6$  соответственно. Большее значение константы устойчивости при рН 4.5 по сравнению с рН 6, по-видимому, связано с тем, что при увеличении рН раствора концентрация  $\text{Hg}(\text{OH})_2$  возрастает, снижая эффективность комплексообразования.

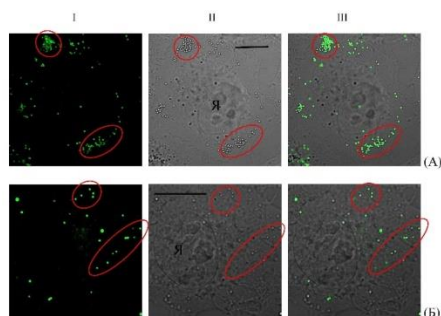
В следующей части работы была исследована возможность использования соединения **36** (схема 18) для флуоресцентной визуализации  $\text{Hg}^{2+}$  в живых клетках<sup>1</sup>. Методом конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (КЛСМ) было выявлено, что **36** проникает в клетки НЕК293, диффузно распределяется в цитоплазме и накапливается в везикулярных структурах субмикронного размера (рис. 22А, Б). Следует отметить, что внутриклеточный спектр флуоресценции **36** характеризуется более коротковолновым положением максимума (600 нм в цитоплазме и 567 нм в везикулах (рис. 22)) по сравнению с его спектром в воде (рис. 18б). По всей вероятности, гипсофлорный сдвиг при переходе от водного раствора к внутриклеточной среде обусловлен уменьшением полярности микроокружения стирилнафталиimidного флуорофора [232; 233].



**Рис. 22.** Конфокальные флуоресцентные изображения и спектры флуоресценции **36** в клетках НЕК293. Колонка I (А, Б) типичные внутриклеточные распределения соединения **36** из стока в ДМСО (А) и 10%-ной эмульсии CgEL (Б) в диапазоне 510–730 нм и соответствующие изображения клеток в проходящем свете (колонка II). Масштабная метка соответствует 10 мкм. Клетки инкубировали с **36** (5 мкМ) в течение 30 мин. Колонка III типичные внутриклеточные нормализованный спектры флуоресценции **36** в везикулярных (зеленая линия) структурах и цитоплазме (красная линия) в клетках НЕК293 ( $\lambda_{\text{ex}} = 405$  нм).

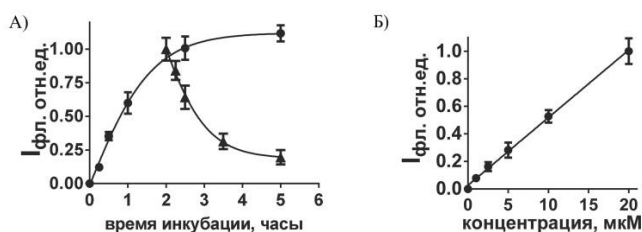
<sup>1</sup> Здесь и далее клеточные экспериментальные данные получены в Институте биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН н.с. Ефременко А. В. и д.б.н. Феофановым А. В.

Сравнивая изображения внутриклеточного распределения **36** в везикулярных структурах, полученные КЛСМ, с распределением липидных капель, наблюдаемых на изображениях в проходящем свете, был сделан вывод, что **36** накапливается в липидных каплях, клеточных органеллах, запасующих нейтральные липиды (рис. 23).



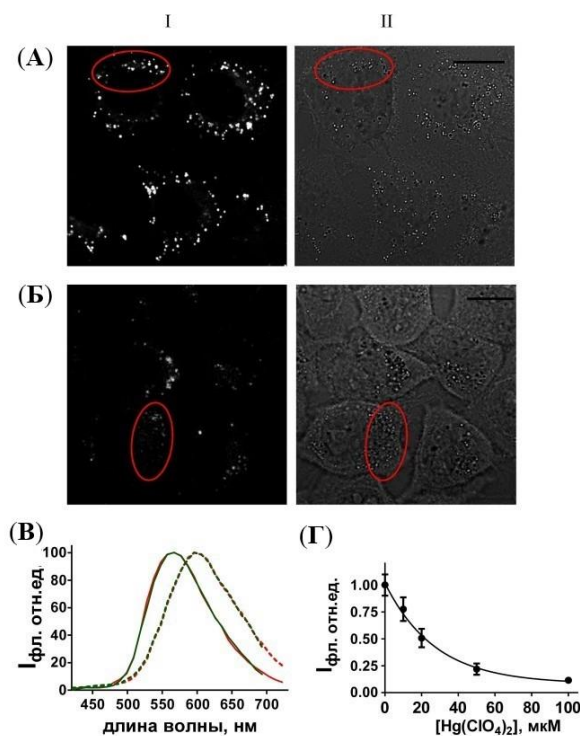
**Рис. 23.** Клеточные органеллы, в которых локализуется **36**, в клетках HEK293. Колонка I конфокальное флуоресцентное изображение, показывающее внутриклеточное распределение соединения **36** ( $\lambda_{ex} = 405$  нм). Масштабная метка представляет 10 мкм. Колонка II изображение клеток в проходящем свете. Овалом выделена группа липидных капель, расположенных на периферии клетки и видимых как ярко-белые или черные гранулы. Колонка III наложение изображений колонок I и II, демонстрирующее накопление **36** в липидных каплях. Клетки инкубировали с 5 мкМ **36** из стока в 10%-ном CgEL A) или из стока в ДМСО Б) в течение 30 мин.

В работе было показано, что внутриклеточное накопление **36** достигало насыщения к 2 ч инкубации клеток HEK 293 с **36** (5 мкМ), а время полунакопления составляло  $48 \pm 1$  мин (рис. 24А). При инкубации клеток с соединением **36** в течение 30 мин внутриклеточная концентрация соединения возрастает линейно при инкубационных концентрациях сенсора в диапазоне 1 – 20 мкМ (рис. 24Б). Характер внутриклеточного распределения соединения при этом не меняется. Дальнейшее увеличение инкубационной концентрации **36** ограничено токсичностью солубилизатора. Кинетика выведения **36** из клеток HEK 293 показала, что внутриклеточная концентрация красителя снижается в 2 раза через  $49 \pm 1$  мин после удаления соединения из внешней среды. В последующие часы наблюдается снижение скорости выведения **36** из клеток (рис. 24А). Таким образом, для соединения **36** характерны равные скорости клеточного накопления и выведения.



**Рис. 24.** Кинетика накопления (А (●)), выведения (А (▲)) и концентрационная зависимость (Б) **36** в клетках HEK293. (А, ●) клетки инкубировали с **36** (5 мкМ, сток из ДМСО) в течение различных временных интервалов и регистрировали с помощью КЛСМ при одинаковых условиях измерений. (А, ▲) Клетки инкубировали с **36** (5 мкМ) в течение 2 ч, дважды промывали раствором Хэнкса и помещали в свежую среду (без **36**) на разные (0–3 ч) периоды времени и регистрировали с помощью КЛСМ при одинаковых условиях измерений. (Б) клетки инкубировали с 1–20 мкМ соединения **36** в течение 30 мин. Данные усреднены по 30–40 клеткам в каждом измерении и представлены в виде среднего значения интенсивности флуоресценции ( $I_{фл}$ ) на клетку  $\pm$  SD.

Преинкубация клеток с  $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$  (5–100 мкМ, 30 мин) и дальнейшая инкубация клеток НЕК 293 с красителем **36** (5 мкМ, 30 мин) не изменила качественной картины внутриклеточного распределения **36** и формы внутриклеточных спектров флуоресценции. Однако привела к снижению интенсивности внутриклеточной флуоресценции **36**, что, принимая во внимания результаты исследований сенсорных свойств **36** в водном растворе, свидетельствует о формировании комплексов с катионом  $\text{Hg}^{2+}$  (рис. 25).

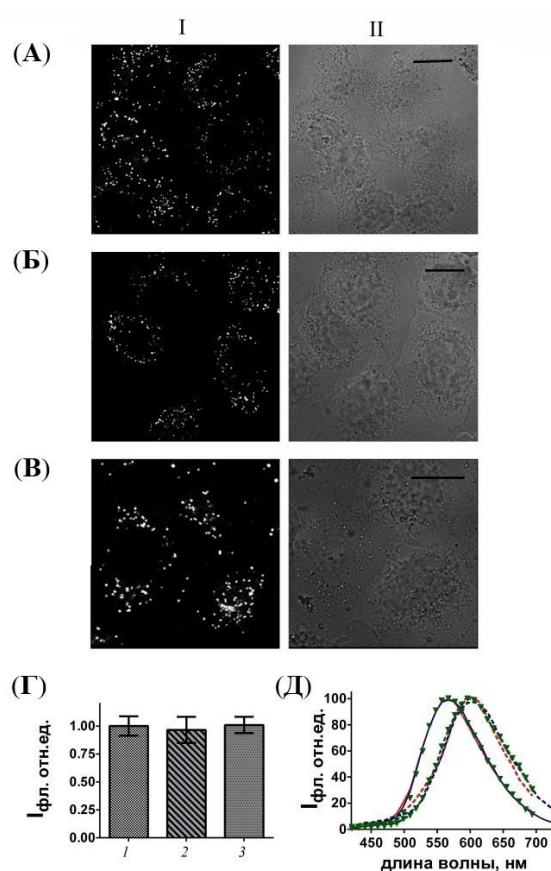


**Рис. 25.** Конфокальные флуоресцентные изображения (А, Б) и спектры флуоресценции (В) соединения **36** и его комплекса(ов) с катионом  $\text{Hg}^{2+}$  в клетках НЕК 293 при  $\lambda_{\text{ex}} = 405$  нм. (В) Клетки инкубировали с **36** (5 мкМ, сток из ДМСО) в течение 30 мин. (Б) Клетки предварительно инкубировали с 50 мкМ  $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$  в течение 30 мин, дважды промывали раствором Хэнкса и инкубировали с 5 мкМ **36** в течение 30 мин. Колонка I изображения внутриклеточной флуоресценции, полученные методом КЛСМ, в спектральном диапазоне 510–730 нм. Колонка II изображения клеток в проходящем свете. Метка масштаба равна 10 мкм. Овалом выделена группа липидных капель, расположенных на периферии клетки и видимых как ярко-белые или черные гранулы. (В) Типичные нормализованные спектры внутриклеточной флуоресценции **36** (зеленые линии) и комплекса(ов) **36** с  $\text{Hg}^{2+}$  (красные линии) в липидных каплях (сплошная линия) и в цитоплазме (пунктирная линия). (Г) Зависимость среднего значения интенсивности флуоресценции **36** в клетках НЕК 293 от концентрации  $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$ . Клетки НЕК 293 предварительно инкубировали с 5–100 мкМ  $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$  в течение 30 мин, дважды промывали раствором Хэнкса и инкубировали с 5 мкМ **36** из стока в ДМСО в течение 30 мин. Данные усреднены по 30–40 клеткам в каждом измерении и представлены в виде среднего значения  $I_{\text{фл.}}$  на клетку  $\pm$  SD.

В диапазоне используемых концентраций  $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$  (5–30 мкМ) снижение внутриклеточной интенсивности флуоресценции **36** происходит пропорционально количеству  $\text{Hg}^{2+}$  (рис. 25Г). Увеличение концентрации  $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$  во внеклеточной среде

выше 80 мкМ не приводит к значительному снижению внутриклеточной интенсивности флуоресценции **36** (рис. 25Г).

Для проверки селективности внутриклеточного ответа **36** на ионы  $\text{Hg}^{2+}$  клетки НЕК 293 преинкубировали с ионами  $\text{Ni}(\text{ClO}_4)_2$  или  $\text{Pb}(\text{ClO}_4)_2$  в диапазоне концентраций 0.02–1 мМ, после чего инкубировали с соединением **36** (5 мкМ). В исследуемом диапазоне концентраций  $\text{Ni}^{2+}$  и  $\text{Pb}^{2+}$  не наблюдалось изменений ни в спектрах внутриклеточной флуоресценции, ни в характерной картине внутриклеточного распределения **36**, ни в изменении интенсивности флуоресценции (рис. 26). Этот результат позволяет сделать вывод о том, что соединение **36** перспективно для селективного обнаружения ионов  $\text{Hg}^{2+}$  в живых клетках.



**Рис. 26.** Конфокальные флуоресцентные изображения (А, Б, В), гистограмма внутриклеточной интенсивности флуоресценции (Г) и нормализованные спектры флуоресценции (Д) **36**, **36** в присутствии  $\text{Ni}^{2+}$  и **36** в присутствии  $\text{Pb}^{2+}$  в клетках НЕК 293 при  $\lambda_{\text{ex}} = 405$  нм. (А) Клетки инкубировали с **36** (5 мкМ) в течение 30 мин. (Б, В) Клетки предварительно инкубировали с 1 мМ  $\text{Ni}(\text{ClO}_4)_2$  (Б) или  $\text{Pb}(\text{ClO}_4)_2$  (В) в течение 60 мин, дважды промывали раствором Хэнкса и инкубировали с 5 мкМ **36** в течение 30 мин. Колонка I изображения внутриклеточной флуоресценции, полученные методом КЛСМ, в спектральном диапазоне 510–730 нм. Колонка II изображения клеток в проходящем свете. Метка масштаба равна 10 мкм. (Г) Гистограмма среднего значения интенсивности флуоресценции **36** (1), **36** в присутствии  $\text{Ni}^{2+}$  (2) и **36** в присутствии  $\text{Pb}^{2+}$  (3) в клетках НЕК 293. Данные усреднены по 30–40 клеткам в каждом измерении и представлены в виде среднего значения  $I_{\text{фл.}}$  на клетку  $\pm$ SD. (Д) Типичные нормализованные спектры внутриклеточной флуоресценции **36** (зеленые линии, треугольник), **36** в присутствии  $\text{Ni}^{2+}$  (красные линии) и **36** в присутствии  $\text{Pb}^{2+}$  (синие линии) в липидных каплях (сплошная линия) и в цитоплазме клетки (пунктирная линия).

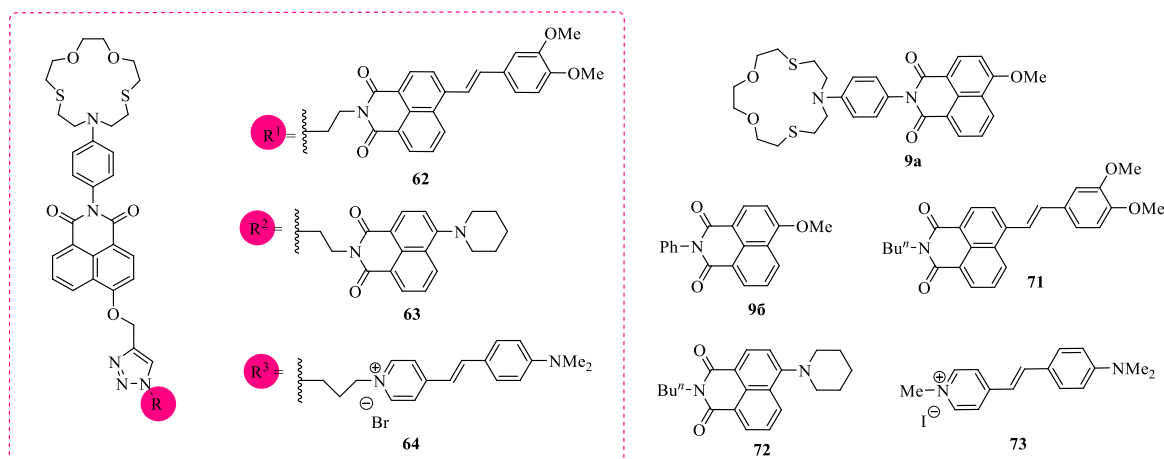
Таким образом, было показано, что оптический отклик стирилнафталимида **36** на присутствие катионов ртути (II) заключается в гипсохромном сдвиге длинноволновой полосы поглощения и уменьшении интенсивности сигнала в эмиссионном спектре, связанным с образованием нефлуоресцирующего комплекса. Ввиду отсутствия у **36** ратиометрического флуоресцентного отклика, соединение **36** может быть использовано в качестве селективного колориметрического и флуоресцентного хемосенсора на  $\text{Hg}^{2+}$  в водном растворе, а также для качественного флуориметрического определения указанного иона в живых клетках.

В результате проделанной работы был получен ряд катионных флуоресцентных хемосенсоров, содержащих в качестве рецептора фрагмент *N*-фенилазидитиа-15-краун-5-эфира. Оптические свойства представленного ряда сенсоров изучались в растворах в чисто водных средах. Нами были предложены соединения **9a** и **13a**, демонстрирующие переключение эмиссионного сигнала с состояния «OFF» на состояние «ON» при связывании с катионом металла в результате подавления RET-процесса в образующемся комплексе. Показано, что селективность рецепторной краун-эфирной группы изменяется при различных pH раствора: при нейтральном pH 7.3 связывание происходит с катионом серебра (I), при слегка закисленном pH 6 с катион ртути (II). Однако при дальнейшей работе монохромофор **13a** не включался в состав бисхромофорной системы, так как алкокси-производные нафталимида получались всего в одну стадию и с большими выходами. Представленная пара ICT-сенсоров **36** и **37** избирательно связывается с  $\text{Hg}^{2+}$  при pH 4.5. Но для синтеза RET-систем была исключена компонента стирилнафталимида **36**, который на присутствие катионов ртути (II) продемонстрировал более низкую константу устойчивости и уменьшение интенсивности сигнала в эмиссионном спектре, связанное с образованием нефлуоресцирующего комплекса. Полученные данные позволяют сделать вывод, что наиболее подходящими компонентами для создания более сложных бис(хромофорных) систем являются монопроизводные красители **9a** и **37**, обладающие избирательностью к отмеченным металлам, а также высокой константой устойчивости образующихся комплексов.

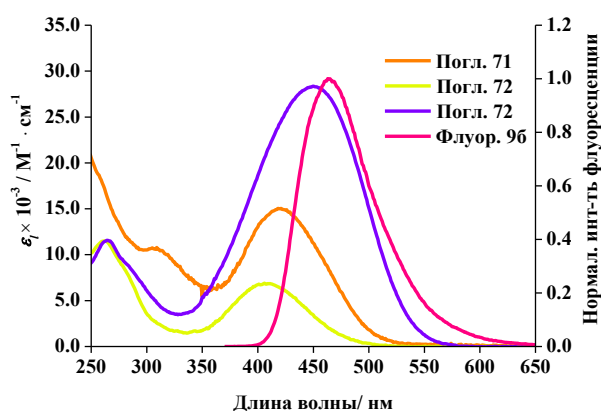
### **3.3. Изучение спектрально-люминесцентных свойств и комплексообразования RET-систем типа I в растворах и живых средах**

На следующем этапе работы было проведено изучение фотофизических свойств ранее синтезированных RET-систем типа I, которые представляют соединения **62**, **63** и **64** (схема 19). Монохромофорные производные **9a**, **9b**, **71**, **72** и **73** (схема 19) использовались в качестве модельных для сравнительного анализа спектроскопических характеристик.

## Схема 19



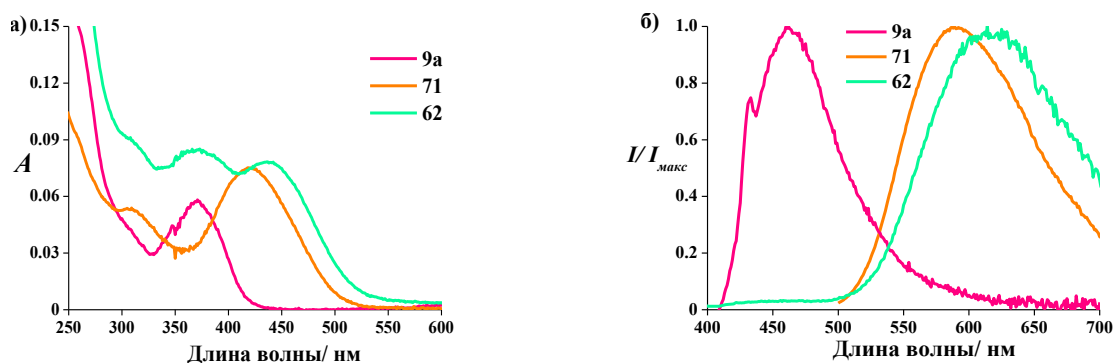
Выбор указанных хромофоров обусловлен тем, что полосы в их спектрах поглощения перекрываются с полосой флуоресценции донора **96** (рис. 27). Спектральные свойства стирилнафталимида **71** ранее были подробно изучены в нашей лаборатории [234]. Соединение **71** демонстрирует длинноволновую флуоресценцию в полярных растворителях в области 600 нм, а также характеризуется наличием широкой полосы поглощения при 420 нм, которая в значительной степени перекрывается с полосой испускания флуоресценции соединения **96** (рис. 27). В свою очередь, аминопроизводные нафталимида хорошо зарекомендовали себя в качестве акцепторной единицы при создании катионных сенсоров [150]. Такие хромофоры обладают высокими квантовыми выходами флуоресценции и поглощают в районе 400 – 450 нм, также попадая в область эмиссии **9a** (рис. 27). Эти данные позволяют предположить наличие эффективного резонансного переноса энергии в системах, где нафталимидные фрагменты производных **96** и **71/72** будут связаны ковалентно при помощи спейсерной группы.



**Рис. 27.** Перекрывание в воде спектров поглощения **71,72** и **73** со спектром испускания **96**. Длина волны возбуждения  $\lambda_{ex} = 360$  нм. Концентрация соединений 5 мкмоль/л.

Спектр поглощения соединения **62** (рис. 28а, табл. 2) в длинноволновой области состоит из двух перекрывающихся полос, отвечающих 4-диметоксистирил- (370 нм) и 4-метокси-1,8-нафталимиду (438 нм). Возбуждение **62** светом с длиной волны 360 нм

приводит к появлению в спектре флуоресценции широкой полосы с максимумом 617 нм, отвечающей испусканию 4-стирилнафталиimidного фрагмента (рис. 28б). При этом относительная интенсивность в области 460 нм, в которой флуоресцирует донорный хромофор, близка к нулю. Данные наблюдения позволяют предположить существование в возбужденном состоянии свободного лиганда **62** безызлучательного канала релаксации, связанного с резонансным переносом энергии между двумя фотоактивными фрагментами.



**Рис. 28.** Спектры поглощения (а) и флуоресценции (б) соединений **9а**, **71** и **62** в воде,  $\lambda_{\text{ex}} = 360$  нм. (**9а**, **62**) и  $\lambda_{\text{ex}} = 450$  нм (**71**). Концентрация всех соединений 5.0 мкмоль/л.

Возможность протекания RET-процесса в соединении **62** была подтверждена расчетом квантовой эффективности переноса энергии ( $\Phi_{\text{RET}}$ ) в рамках индуктивно-резонансной модели Ферстера по уравнению (2),

$$\Phi_{\text{RET}} = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} \quad (2)$$

Соединение	$\lambda_{\text{max}}^{\text{abs}} / \text{нм}$	$\epsilon_{\lambda} / \text{M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$	$\lambda_{\text{max}}^{\text{fl}} (\lambda_{\text{ex}}) / \text{нм}$	$\varphi^{\text{fl}}$
<b>9а</b>	370	9 700	465 (360)	0.0073
<b>9б</b>	374	13 600	467 (360)	0.71
<b>71</b>	420	15 000	590 (450)	0.09
<b>72</b>	408	6 900	533 (415)	0.184
<b>73</b>	450	28 300	619 (455)	0.00039
<b>62</b>	370; 438	16 800; 15 600	617 (360)	0.0046
<b>64</b>	382; 482	14 800; 18 000	461; 605 (375)	0.00094
<b>63</b>	375	7 800	475; 541 (375)	0.014

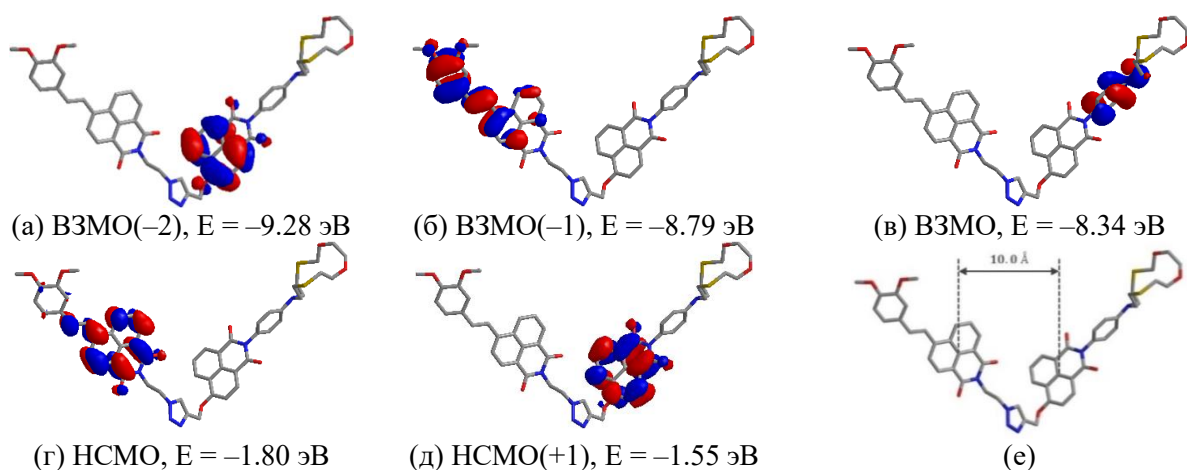
**Табл. 2.** Спектрально-люминесцентные характеристики (бис)хромофоров и их индивидуальных компонентов в воде.

где  $r$  – расстояние между хромофорами, а  $R_0$  – критический радиус Ферстера, представляющий собой расстояние, на котором 50% возбужденных доноров дезактивируются путем резонансного переноса энергии (то есть  $\Phi_{\text{RET}} = 0.5$ ). Значение  $r$  было найдено из данных по оптимизированной геометрии соединения **62** (рис. 29е,  $r = 10 \text{ \AA}$ ), а  $R_0$  был рассчитан по формуле (3), где  $\kappa^2$  – ориентационный фактор, который определяет взаимное расположение дипольных моментов переходов донора и акцептора

энергии;  $\varphi_{\text{ХД}}^{\text{фл}}$  – квантовый выход флуоресценции хромофора-донора в отсутствие акцептора;  $n$  – показатель преломления растворителя;  $N_{\text{А}}$  – число Авогадро. Интеграл в выражении (3) определяет степень перекрытия нормализованного спектра испускания хромофора-донора ( $I_{\text{ХД}}(\lambda)$ ) со спектром поглощения хромофора-акцептора ( $\varepsilon_{\text{ХА}}(\lambda)$ ).

$$R_0^6 = \frac{9000 \ln 10 \kappa^2 \varphi_{\text{ХД}}^{\text{фл}}}{128 \pi^2 N_{\text{А}} n^4} \int_0^{\infty} I_{\text{ХД}}(\lambda) \varepsilon_{\text{ХА}}(\lambda) \lambda^4 d\lambda \quad (3)$$

В качестве индивидуальных хромофоров при расчете интеграла перекрытия были выбраны производные **96** и **71**. С учетом  $\kappa^2=2/3$  (для случая беспорядочной ориентации дипольных переходных моментов донора и акцептора за счет вращательной диффузии до переноса энергии) и  $\varphi_{\text{ХД}}^{\text{фл}} = 0.76$  (квантовый выход флуоресценции соединения **96**, табл. 1) расчетное значение  $\Phi_{\text{РЕТ}}$  составило 0.9998. Полученный результат указывает на возможность протекания переноса энергии почти со 100%-ной эффективностью между фрагментами 4-метокси- и 4-стирилнафталимида, сближенными до расстояния 10 Å. Следует, однако, сказать, что тушение флуоресценции при 460 нм в спектре бисхромофора **62** отчасти обусловлено и протеканием фотоиндуцированного переноса электрона (РЕТ) с рецепторного *N*-фенилазидитиакраун-эфирного фрагмента на остаток 4-метокси-1,8-нафталимида подобно тому, как это происходит при переходе от *N*-фенильного производного **96** (квантовый выход флуоресценции 0.71, табл. 2) к краунсодержащему аналогу **9а** (квантовый выход 0.0073). С учетом протекания переноса электрона в системе значение  $\Phi_{\text{РЕТ}}$  для соединения **62** должно быть меньше, чем 0.9998 (см. расчет ниже).

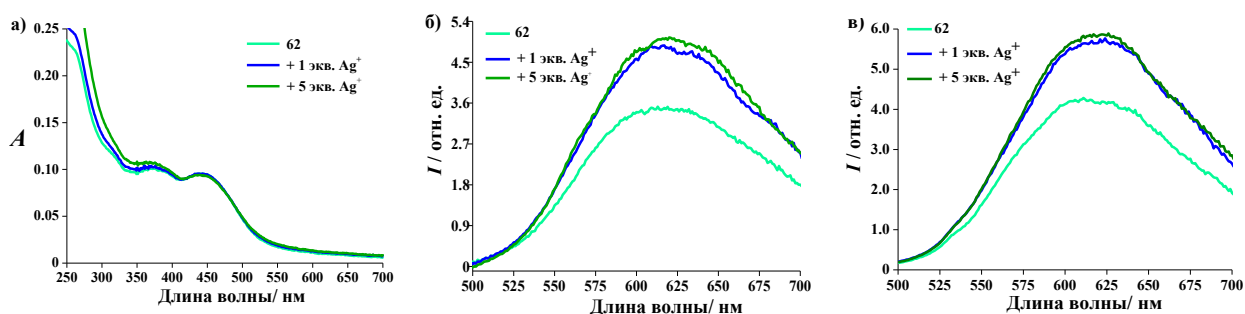


**Рис. 29.** Граничные МО (а–д) и оптимизированная геометрия (е) соединения **62** (метод РМ6).

Комплексообразование сенсора **62** было изучено с катионами серебра в водном растворе при pH 7.4 (HEPES-буфер). Модельное соединение **9а** в аналогичных условиях связывает катион  $\text{Ag}^+$  с образованием комплекса  $(\mathbf{9a}) \cdot \text{Ag}^+$ , для которого логарифм

константы устойчивости ( $\lg K$ ) составляет  $6.39 \pm 0.07$ . Такое значение  $\lg K$  соответствует практически полному связыванию свободного лиганда в присутствии 1–2 экв.  $\text{Ag}^+$  в растворе (при концентрации лиганда 5 мкмоль/л). При добавлении нитрата серебра в водный раствор **62** при pH 7.4 в спектре поглощения не происходит изменения интенсивности и положения длинноволновых полос (рис. 30а), однако в спектре флуоресценции, записанном при использовании длины волны возбуждения 360 нм, происходит увеличение интенсивности (рис. 30б). Указанный рост интенсивности можно объяснить координацией катиона серебра по краун-эфирному фрагменту, в результате чего происходит подавление процесса переноса электрона в системе с одновременным увеличением эффективности конкурентного переноса энергии на акцепторный хромофор.

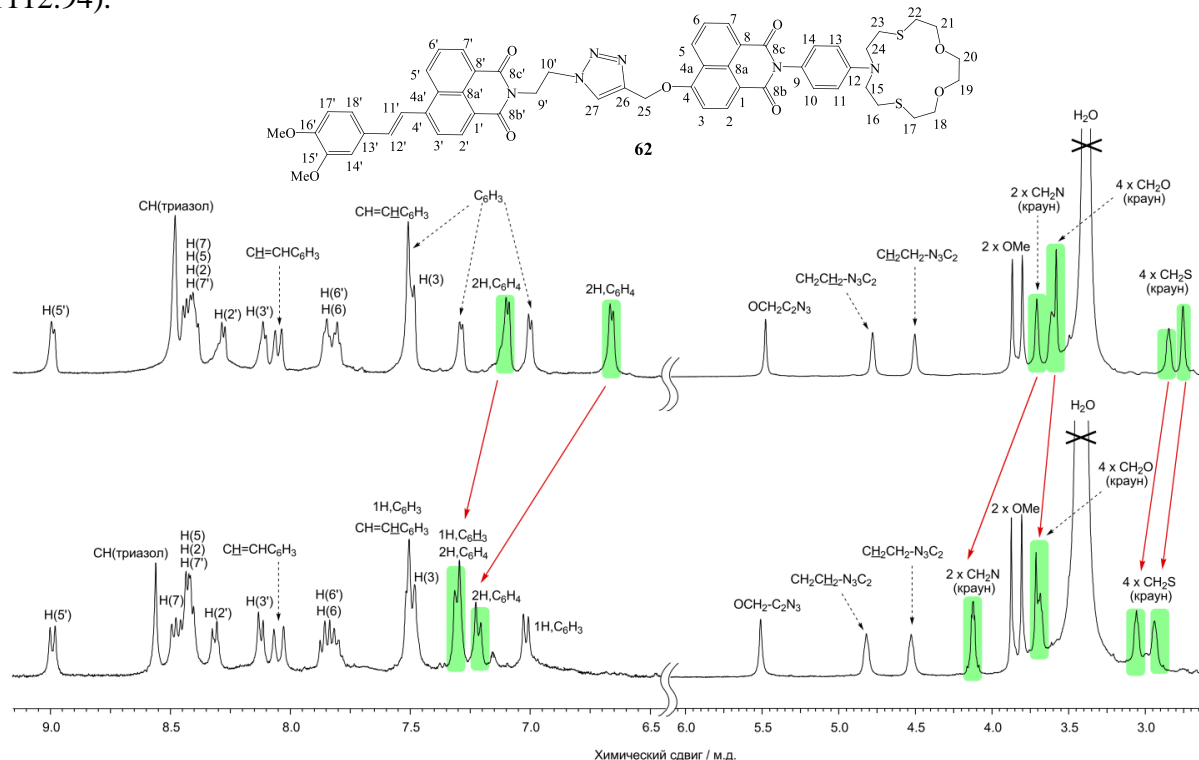
Интересно отметить, что возбуждение **62** светом с длиной волны 450 нм, который поглощается только 4-стирилнафталимидным фрагментом, также приводило к разгоранию флуоресценции на 620 нм (рис. 30в). Причиной данного эффекта, по-видимому, является перенос электрона с рецепторного *N*-арильного заместителя в свободном лиганде на фотовозбужденный хромофор-акцептор, который блокируется при комплексообразовании. Возможность такого РЕТ-взаимодействия подтверждается данными квантово-химических расчетов граничных МО соединения **62** (рис. 29), согласно которым уровень высшей заполненной МО *N*-арильной группы (ВЗМО,  $-8.34$  эВ) лежит выше не только по отношению к верхней заполненной МО 4-метоксиафталимидного фрагмента (ВЗМО(–),  $-9.28$  эВ), но и по отношению к верхней заполненной МО остатка 4-стирилнафталимидина (ВЗМО(–1),  $-8.79$  эВ).



**Рис. 30.** Спектры поглощения (а) и флуоресценции (б), (в) соединения **62** (5.0 мкмоль/л) в присутствии и в отсутствие нитрата серебра в воде при pH 7.4 (HEPES буфер, 80 ммоль/л),  $\lambda_{\text{ex}} = 360$  нм (б) и  $\lambda_{\text{ex}} = 450$  нм (в).

Связывание сенсора **62** с ионами  $\text{Ag}^+$  было подтверждено с использованием спектроскопии  $^1\text{H}$  ЯМР. При добавлении нитрата серебра в раствор соединения **62** в ДМСО- $d_6$  наблюдался значительный слабopольный сдвиг протонов бензольного ядра и краун-эфирного цикла (рис. 31), что указывает на участие рецепторной *N*-арильной группы в координации  $\text{Ag}^+$ . Образование комплекса состава  $(\mathbf{62}) \cdot \text{Ag}^+$  ( $[\text{C}_{55}\text{H}_{52}\text{N}_6\text{O}_9\text{S}_2\text{Ag}]^+$ )

было зафиксировано в ИЭР-масс-спектре (вычислено:  $m/z = 1113.22$ ; найдено:  $m/z = 1112.94$ ).



**Рис. 31.** Спектры  $^1\text{H}$  ЯМР соединения **62** (10 ммоль/л) в ДМСО- $d_6$  до (сверху) и после (снизу) добавления 1 экв.  $\text{AgNO}_3$ . Частота спектрометра 600.22 МГц.

Представленные на рис. 30 спектральные изменения, обусловленные присутствием  $\text{Ag}^+$ , позволили количественно оценить, как изменяется эффективность переноса энергии ( $\Phi_{\text{RET}}$ ) в бис(хромофорном) производном **62** при комплексообразовании. Как следует из вида спектров поглощения соединений **9a** и **71** (рис. 28a), свет возбуждения с длиной волны 360 нм поглощается на 63% фрагментом 4-метоксиафталимида (доля света, поглощаемого донором  $\chi_{\text{ХД}}^{360} = 0.63$ ) и на 37% 4-стирилнафталимидным остатком (доля света, поглощаемого акцептором  $\chi_{\text{ХА}}^{360} = 0.37$ ). Это означает, что значительный вклад в интенсивность флуоресценции лиганда **54** при  $\lambda_{\text{ex}} = 360$  нм обусловлен прямым возбуждением хромофора-акцептора. Величина  $\Phi_{\text{RET}}$  в соединении **62** может быть оценена по интенсивности флуоресценции хромофора-акцептора по уравнению (4),

$$\Phi_{\text{RET}} = \frac{I_{\text{набл.}} - I_{\text{пр.возб.}}}{I_{100\%} - I_{\text{пр.возб.}}} \quad (4)$$

где  $I_{\text{набл.}}$  — наблюдаемая интенсивность флуоресценции **62** на длине волны 620 нм при возбуждении светом с длиной волны 360 нм ( $I_{\text{набл.}} = 3.5$  отн. ед., рис. 30б);  $I_{\text{пр.возб.}}$  — интенсивность флуоресценции на 620 нм ( $\lambda_{\text{ex}} = 360$  нм), обусловленная прямым возбуждением хромофора-акцептора;  $I_{100\%}$  — интенсивность флуоресценции **62** на длине волны 620 нм ( $\lambda_{\text{ex}} = 360$  нм) при условии переноса энергии в системе со 100%-й эффективностью (т.е. при отсутствии переноса электрона). Для расчета величины  $I_{\text{пр.возб.}}$

мы исходили из предположения, что свет с длиной волны 450 нм поглощается только акцепторным хромофором (см. рис. 28а), а следовательно  $I_{\text{пр.возб.}}$  можно рассчитать, умножив интенсивность флуоресценции **62** на длине волны 620 нм при возбуждении 450 нм  $I'$  ( $I' = 4.2$  отн. ед., рис. 30в) на отношение оптической плотности в спектре поглощения лиганда **62** на длине волны 360 нм, создаваемой 4-стирилнафталимидным фрагментом ( $A_{360}^{\text{XA}}$ ), к оптической плотности на длине волны 450 нм, создаваемой тем же фрагментом ( $A_{450}^{\text{XA}}$ ) в соответствии с соотношением (5).

$$I_{\text{пр.возб.}} = I' \cdot \frac{A_{360}^{\text{XA}}}{A_{450}^{\text{XA}}} \quad (5)$$

В свою очередь значения  $A_{360}^{\text{XA}}$  и  $A_{450}^{\text{XA}}$  могут быть найдены по известным наблюдаемым значениям оптической плотности при 360 нм ( $A_{360}^{\text{набл.}}$ ) и 450 нм ( $A_{450}^{\text{набл.}}$ ) в спектре поглощения лиганда **62** (0.099 и 0.093 соответственно, см. рис. 28а) и доли света, поглощаемого акцептором на рассматриваемых длинах волн ( $\chi_{\text{XA}}^{360}$  и  $\chi_{\text{XA}}^{450}$ ,  $\chi_{\text{XA}}^{360} = 0.37$  и  $\chi_{\text{XA}}^{450} = 1$ ) по уравнениям (6) и (7).

$$A_{360}^{\text{XA}} = A_{360}^{\text{набл.}} \cdot \chi_{\text{XA}}^{360} \quad (6)$$

$$A_{450}^{\text{XA}} = A_{450}^{\text{набл.}} \cdot \chi_{\text{XA}}^{450} \quad (7)$$

Для расчета  $I_{100\%}$  использовалось выражение (8).

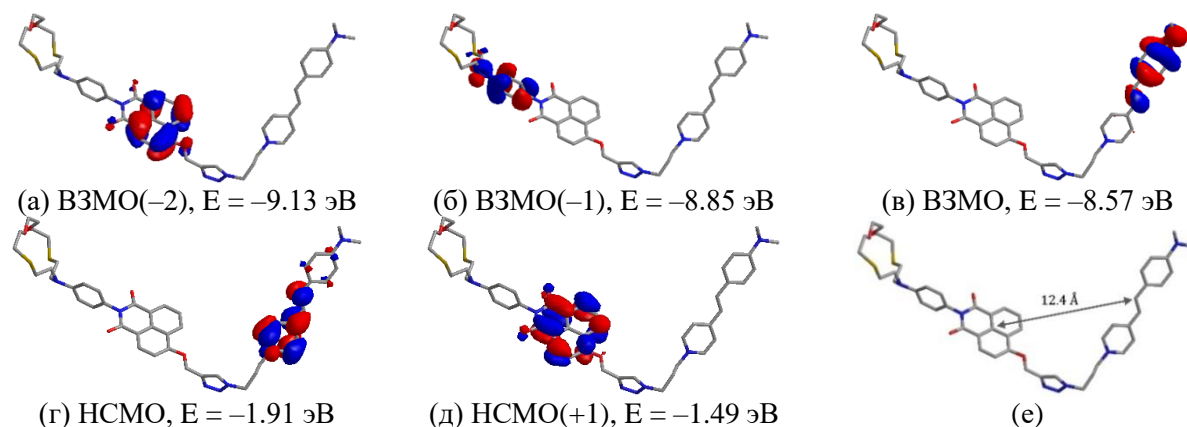
$$I_{100\%} = I' \cdot \frac{A_{360}^{\text{набл.}}}{A_{450}^{\text{набл.}}} \quad (8)$$

С учетом выражений (4)–(8) величина  $\Phi_{\text{RET}}$  в свободном лиганде **62** составила 0.65 (65%). При комплексообразовании сенсора **62** с катионами  $\text{Ag}^+$  происходит подавление переноса электрона в системе с одновременным увеличением эффективности переноса энергии. Если учесть, что РЕТ-процесс в комплексе (**62**)· $\text{Ag}^+$  с рецепторной группы на остаток метоксинафталимида подавляется полностью и  $\Phi_{\text{RET}} \approx 1$ , то расчет по уравнению (4) без учета эффекта добавочного разгорания флуоресценции, связанного с ингибированием переноса электрона на акцепторный хромофор (см. выше), дает ожидаемое значение интенсивности на длине волны 620 нм равное 4.5 отн. ед., что достаточно близко к экспериментально наблюдаемому значению (5.0 отн. ед, рис. 30б). По-видимому, небольшое различие в полученных данных связано с некоторым возрастанием эффективности излучательной дезактивации фрагмента 4-стирилнафталимида в комплексе.

Проведенные исследования катионозависимых оптических свойств соединения **62** показали, что связывание катионов серебра в водном растворе сопровождается увеличением эффективности переноса энергии в системе, которое выражается в

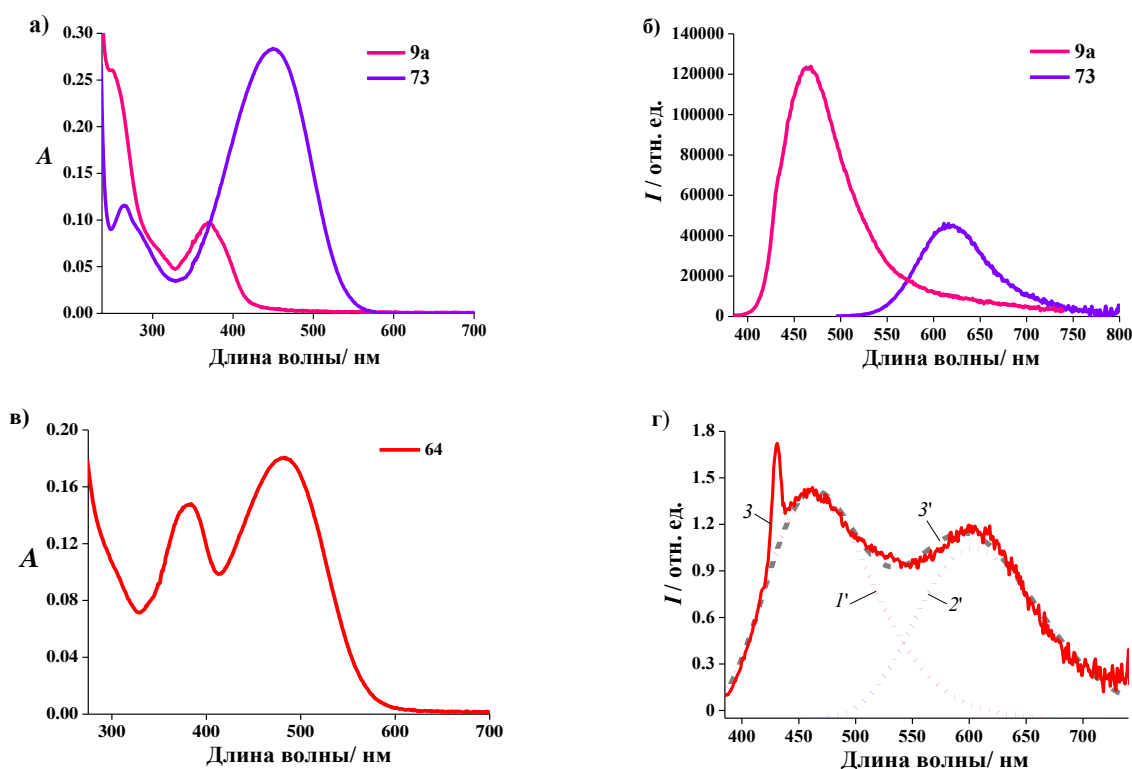
разгорании флуоресценции хромофора-акцептора на длине волны 620 нм в 1.4 раза при возбуждении светом 360 нм. Наблюдаемый оптический эффект оказался ниже, чем в случае монохромного производного **9a** (76-кратное разгорание флуоресценции в присутствии  $\text{Ag}^+$  в аналогичных условиях за счет ингибирования РЕТ-взаимодействия), что можно объяснить с одной стороны неполным подавлением переноса энергии в свободном лиганде, а с другой стороны значительным поглощением хромофора-акцептора на длине волны 360 нм. Наиболее существенным недостатком сенсора **62** является чувствительность флуоресценции 4-стирилнафталимидного фрагмента к присутствию катионов  $\text{Ag}^+$ , обусловленная подавлением переноса электрона с рецептора на акцепторный хромофор при комплексообразовании. Наблюдаемое при этом увеличение интенсивности эмиссии сопоставимо с тем, которое имеет место за счет роста эффективности РЕТ-процесса. Так как флуоресценция красителя **62** является однополосной, то регистрация спектрального отклика проводилась в режиме двух длин волн возбуждения. Таким образом показано, отношение интенсивностей флуоресценции в двух каналах (канал 1: регистрация 620 нм, возбуждение 360 нм; канал 2: регистрация 620 нм, возбуждение 450 нм) будет оставаться практически неизменным при связывании  $\text{Ag}^+$  в комплекс. Это делает невозможным проведение ратиометрических измерений концентрации анализируемого катиона металла по *варианту 1* (см. рис. 3). Использование одной длины волны возбуждения для регистрации ратиометрического отклика (*вариант 2* измерений) также не было возможно, поскольку спектр испускания **62** однополосный.

Далее мы приступили к исследованию бисхромофора **64**. Нами были проведены расчеты граничных МО в бисхромоформном производном **64** (схема 19), содержащем фрагмент стирилового красителя в качестве ХА. Как видно из расчетов (рис. 32), последний имеет энергию ВЗМО равную  $-8.57$  эВ, при этом локальная ВЗМО *N*-арильного рецептора располагается ниже на энергетической шкале ( $E = -8.85$  эВ).



**Рис. 32.** Граничные МО (а–д) и оптимизированная геометрия (е) соединения **64** (метод РМ6).

Принимая во внимание данное обстоятельство, мы приступили к изучению сенсорных свойств **64** в водном растворе. Для сравнительного анализа спектральных характеристик в круг исследуемых соединений были использованы монохромофорные 4-метоксипроизводные нафталимида **9a** и **9б**, а также стироловый краситель **73** (схема 18). Поглощение света нафталиimidным фрагментом в соединении **64** приводит к появлению в его ЭСП пика с максимумом 382 нм (рис. 33в). В пользу такого отнесения говорит тот факт, что 4-метоксинафталимиды **9a** и **9б** характеризуются близкими значениями  $\lambda_{max}^{abs}$  (рис. 33а, табл. 2). Полосы в спектрах флуоресценции **9a** и **9б** располагаются при 465 и 467 нм (рис. 33б, табл. 2). Похожая полоса наблюдается и в спектре испускания **64**, записанном при использовании света возбуждения с длиной волны 375 нм (рис. 33г).



**Рис. 33.** Спектры поглощения (а, в) и флуоресценции (б, г) соединений **9a**, **73** и **64** в воде,  $\lambda_{ex}=375$  нм (для **9a** и **64**) и  $\lambda_{ex}=455$  нм (для **73**). Концентрации всех соединений 10.0 мкмоль/л. Пунктирная линия (**3'**) на рисунке г) представляет собой расчетную кривую, которая является суперпозицией пиков нафталиimidного (**1'**) и стирилпиридиниевого (**2'**) фрагментов.

Соединение **73** демонстрирует максимум поглощения при 450 нм, обусловленный электронным переходом с переносом заряда и флуоресценцию при 619 нм. Спектры **64** также имеют пики, характерные для стирилпиридиниевого хромофора, однако длина волны максимума  $\lambda_{max}^{abs}$  в случае **64** оказалась bathochromно смещенной на 30 нм относительно полосы в ЭСП соединения **73**. Причиной различия в положении полос, по-видимому, служит высокая чувствительность оптических свойств стироловых красителей к микроокружению [234]. Как показывают квантово-химические расчеты, проведенные

для соединения **64** (рис. 32е), расстояние между фотоактивными фрагментами составляет 12 Å, что сопоставимо с размерами самих хромофоров. Следовательно, для соединения **64** в некоторой степени возможно перекрывание электронных оболочек нафталимидного и стирилового остатков, которое способно изменить энергию перехода с переносом заряда.

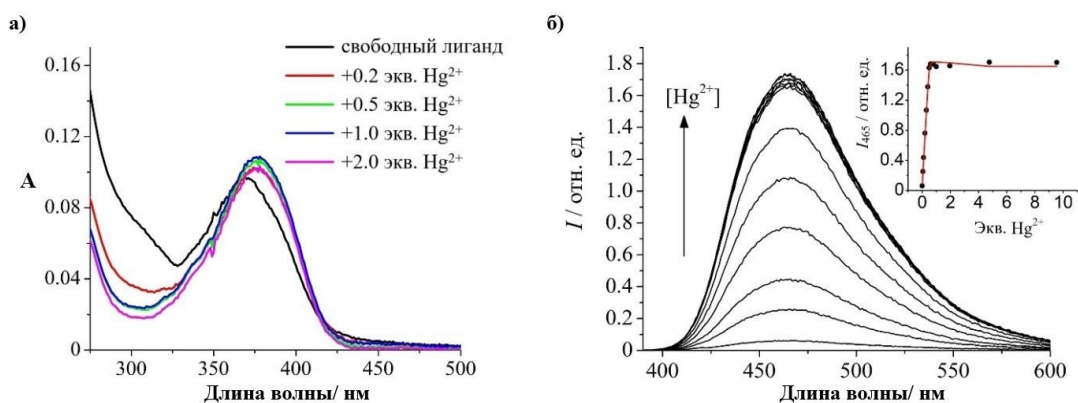
При возбуждении на 375 нм, в спектре испускания хемосенсора **64** наблюдалось наличие двух полос (рис. 33г). Принимая во внимание величины  $\lambda_{max}^{abs}$  соединений **9a** и **73**, двухполосная флуоресценция **64** может быть объяснена прямым фотовозбуждением хромофора-донора и хромофора-акцептора. С другой стороны, полосы эмиссии красителей **9a** и **9b** перекрываются со спектром поглощения **73**. По этой причине флуоресценция **64** при 605 нм может отчасти быть обусловлена переносом энергии с нафталимидного остатка на стирилпиридиниевый хромофор. Для подтверждения данного предположения мы сравнили квантовый выход флуоресценции ХД в составе **64** ( $\varphi_{ХД}^{фл}$ ) с квантовым выходом ХД в отсутствие ХА ( $\varphi_{ХД,0}^{фл}$ ). В качестве последнего было взято значение для соединения **9a** (0.0073, табл. 2). Величину  $\varphi_{ХД}^{фл}$  оценивали исходя из спектров поглощения и флуоресценции **64** (рис. 33в и 33г), при этом исходили из того что *i*) 50% интегральной интенсивности двухполосной флуоресценции **64** приходится на испускание нафталимидного остатка (рассчитано через отношение площадей под кривыми *I'* и *3'* на рис. 33г) и *ii*) нафталимидный хромофор в **64** поглощает около 2/3 света возбуждения (приблизительно найдено путем сравнения спектров поглощения, представленных на рис. 33а, в). Расчет  $\varphi_{ХД}^{фл}$  для свободного лиганда **64** таким образом привел к значению, равному 0.00068. С использованием квантовых выходов  $\varphi_{ХД}^{фл}$  и  $\varphi_{ХД,0}^{фл}$  по уравнению (9) было найдено, что эффективность RET-процесса в **64** составляет 0.91 (91%).

$$\Phi_{RET} = 1 - \frac{\varphi_{ХД}^{фл}}{\varphi_{ХД,0}^{фл}} \quad (9)$$

Проведенный анализ показывает, что основным каналом дезактивации возбужденного состояния нафталимидного хромофора в **64** является перенос энергии. По альтернативной схеме ХД может релаксировать путем переноса электрона с *N*-арильного фрагмента, содержащего краун-эфирную группу, на что указывают результаты расчетов граничных МО лиганда **64** методом РМ6 (рис. 32а–32д): ВЗМО рецептора имеет более высокую энергию (–8.85 эВ), чем высшая заполненная МО нафталимидного остатка (–9.13 эВ). Следует отметить, что RET-процесс между рецептором и акцептором в **64** не реализуется, так как квантовый выход стирилпиридиниевого хромофора (0.00049,

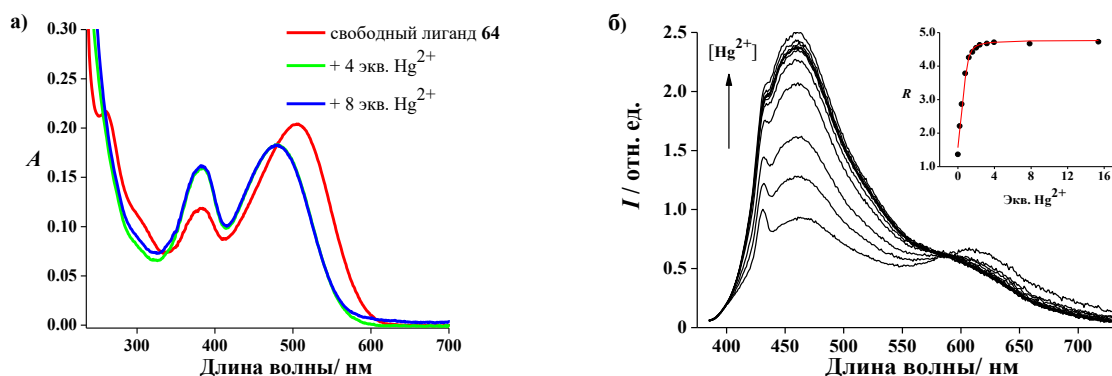
рассчитан, как описано выше, для квантового выхода ХД), оказался достаточно близок к  $\varphi^{ФЛ}$  соединения **73** (0.00039, табл. 2).

На следующем этапе работы мы приступили к изучению комплексообразования сенсора **64** с катионами ртути. В качестве среды использовался ацетатный буферный раствор с рН 4.5. Выбор данного значения рН был связан с нашим стремлением изучить спектральные эффекты, вызванные комплексообразованием в условиях наиболее близких к тем, в которых проводились эксперименты на клетках. Отметим также, что сенсор **64** при рН 4.5 находится в непротонированной форме (см. данные по зависимости интенсивности флуоресценции соединения **9a**, рис. 10a). Это обеспечивает переключение РЕТ-процесса при связывании катиона ртути (II) с краун-эфирным рецептором. В действительности, такое переключение имело место для краунсодержащего метоксипроизводного нафталимида **9a** (рис. 34).



**Рис. 34.** Изменения в спектре поглощения (а) и флуоресценции (б) соединения **9a** (10.0 мкмоль/л) при добавлении  $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$  при рН 4.5 (ацетатный буфер, 0.1 моль/л),  $\lambda_{\text{ex}} = 375$  нм. Верхняя вставка на рисунке (б) показывает зависимость интенсивности флуоресценции на длине волны 465 нм ( $I_{465}$ ) от количества эквивалентов  $\text{Hg}^{2+}$  в растворе (точки – экспериментальные данные, кривая – расчет).

Добавление перхлората ртути (II) к водному раствору сенсора **64** не вызывало значительных изменений в спектре поглощения (рис. 35а), однако приводило к увеличению интенсивности нафталиimidного хромофора на длине волны 465 нм в 2.7 раза (рис. 35б), связанному с подавлением РЕТ в образующемся комплексе. В тоже время, полоса испускания стирилпиридиниевого фрагмента практически не изменялась. Наблюдаемые спектральные эффекты позволяют заключить, что соединение **64** проявляет свойства ратиометрического флуоресцентного хемосенсора на катион ртути (II), поскольку отношение интенсивностей эмиссии при 465 и 610 нм ( $I_{465}/I_{610}$ ) в присутствии ( $R$ ) и в отсутствии  $\text{Hg}^{2+}$  ( $R_F$ ) оказывается различным. По данным спектрофлуориметрического титрования была рассчитана константа устойчивости  $K$  комплекса (**64**)· $\text{Hg}^{2+}$  ( $\lg K = 6.89 \pm 0.13$ ). В случае модельного соединения **9a** с  $\text{Hg}^{2+}$  также образовывался комплекс состава металл – лиганд 1:1 с близким значением  $\lg K$  ( $7.62 \pm 0.17$ ).

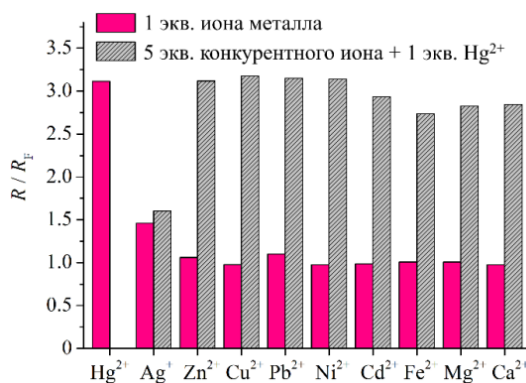


**Рис. 35.** Изменения в спектре поглощения (а) и флуоресценции (б) соединения **64** (10.0 мкмоль/л) при добавлении  $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$  при pH 4.5 (ацетатный буфер, 0.1 моль/л),  $\lambda_{\text{ex}} = 375$  нм. Верхняя вставка на рис. б) показывает зависимость отношения интенсивности флуоресценции при 465 нм к интенсивности при 610 нм ( $R$ ) от количества эквивалентов  $\text{Hg}^{2+}$  в растворе (точки – экспериментальные данные, кривая – расчет).

Анализ оптического отклика хемосенсоров **64** и **9a** показал, что разгорание флуоресценции на длине волны 465 нм ( $FE_{465}$ ), которое равно отношению интенсивности эмиссионного сигнала после добавления 5 экв.  $\text{Hg}^{2+}$  к интенсивности свободного лиганда, для соединения **64** ( $FE_{465} = 2.7$ , рис. 35б) оказалось меньше, чем в случае **9a** ( $FE_{465} = 28.5$ , рис. 34б). Такое различие может быть объяснено тем, что излучательная дезактивация ХД в комплексе  $(\mathbf{64})\cdot\text{Hg}^{2+}$  подавляется за счет переноса энергии. Эффективность RET в  $(\mathbf{64})\cdot\text{Hg}^{2+}$  была рассчитана по уравнению (9). При расчетах мы предположили, что значение  $\phi_{\text{ХД}}^{\text{фл}}$  для нафталимидного фрагмента в лиганде **64** увеличивается в 2.7 раза ( $FE_{465}$ ) в результате комплексообразования. Данное предположение основано на том, что величину  $FE_{465}$  можно считать равной отношению квантовых выходов флуоресценции до и после добавления  $\text{Hg}^{2+}$ , поскольку длинноволновая полоса поглощения ХД не изменяется при комплексообразовании (см. рис. 34а, некоторый гиперхромный эффект при 380 нм в ЭСП соединения **64** (рис. 35а), по всей вероятности, связан с гипсохромным сдвигом полосы стирилпиридиниевого фрагмента). С учетом сказанного, а также считая, что  $\phi_{\text{ХД},0}^{\text{фл}}$  приблизительно соответствует квантовому выходу 4-метокси-*N*-фенил-1,8-нафталимида **9b** (0.71, табл. 2), в котором RET-процесс не реализуется, эффективность переноса энергии  $\Phi_{\text{RET}}$  в комплексе  $(\mathbf{64})\cdot\text{Hg}^{2+}$  составила 0.997 (99.7%). Теоретический расчет  $\Phi_{\text{RET}}$  в рамках индукционно-резонансной модели Ферстера по уравнениям (2) и (3) также подтвердил высокую эффективность переноса (99.97%). Таким образом, механизм функционирования сенсора **64** основан на подавлении RET-процесса с *N*-арильного рецепторного фрагмента на нафталимидный хромофор, которое сопровождается увеличением эффективности RET с 91 до 99.7%. Небольшое различие в  $\Phi_{\text{RET}}$  для лиганда **64** и комплекса  $(\mathbf{64})\cdot\text{Hg}^{2+}$  объясняет отсутствие разгорания флуоресценции

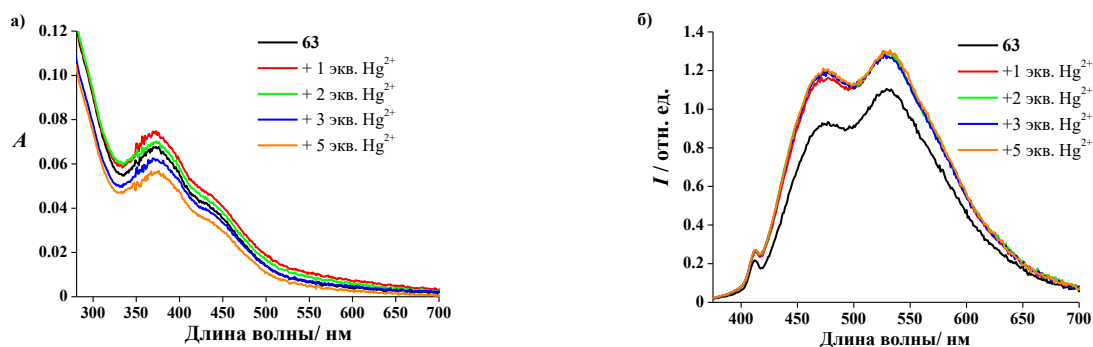
стирилпиридиниевого фрагмента (для сравнения это различие в случае рассмотренного выше производного **62** более значительное, что, как было показано, приводит к некоторому увеличению интенсивности флуоресценции ХА при возбуждении ХД). В результате полоса ХА при 610 нм в спектре **64** может быть использована для внутренней калибровки сенсорной системы. Это позволяет регистрировать ратиометрический флуоресцентный отклик. Следует отметить, что подобный режим измерений (возбуждение в полосу поглощения ХД и регистрация отношения интенсивностей флуоресценции на двух различных длинах волн) оказался непригоден для сенсора **54**, поскольку в его спектре испускания полоса эмиссии ХД не проявлялась. Отсутствие флуоресценции ХД в случае соединения **62**, скорее всего, связано с тем, что она практически не проявляется на фоне интенсивной флуоресценции фрагмента 4-(3,4-диметоксистирил)стирил-1,8-нафталимида (квантовый выход **71** выше, чем у соединения **73** более, чем на два порядка, табл. 2). Двухполосный спектр испускания **64** является более предпочтительным для биологических исследований, потому что позволяет использовать одну длину волны возбуждения. Так как использование одной длины волны возбуждения привело к образованию ратиометрического отклика, то дополнительный анализ режима регистрации с двумя длинами волн возбуждения нами не проводился.

Изучение селективности комплексообразования **64** показало, что присутствие 1–5 экв.  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  не вызывает значительных изменений ни в его спектре флуоресценции, ни в спектре флуоресценции комплекса  $(64) \cdot Hg^{2+}$ , однако добавление  $Ag^+$  к **64** сопровождается некоторым увеличением отношения  $I_{465}/I_{610}$  (рис. 36). При этом было обнаружено, что  $Ag^+$  мешает детектированию  $Hg^{2+}$ , так как добавка 5 экв. перхлората серебра к раствору, содержащему **64** и 1 экв.  $Hg^{2+}$  приводит к уменьшению оптического отклика. По-видимому, в рассматриваемых условиях **64** образует с  $Ag^+$  достаточно прочный комплекс, характеризующийся меньшей величиной  $R$ .



**Рис. 36.** Селективность флуоресцентного отклика **64** (10.0 мкмоль/л) на ионы  $Hg^{2+}$  в воде при рН 4.5 (ацетатный буфер, 0.1 моль/л). Величина  $R_F$  представляет собой отношение интенсивности флуоресценции при 465 нм к интенсивности при 610 нм для свободного лиганда **64**,  $R$  – то же отношение, но рассчитанное после добавления иона металла в раствор **64**,  $\lambda_{ex} = 375$  нм.

Далее мы приступили к изучению свойств соединения **63**. В случае лиганда **63** катионо-индуцированные изменения в спектре флуоресценции были небольшими, причем интенсивность испускания ХД и ХА возрастала приблизительно в одинаковой степени (рис. 37). Таким образом, среди представленного ряда RET-систем *muna 1* только производное **64** демонстрировало ратиометрический флуоресцентный отклик, обусловленный образованием одного комплекса состава металл – лиганд 1:1. Поэтому дальнейшие биологические исследования проводились с красителем **64**.

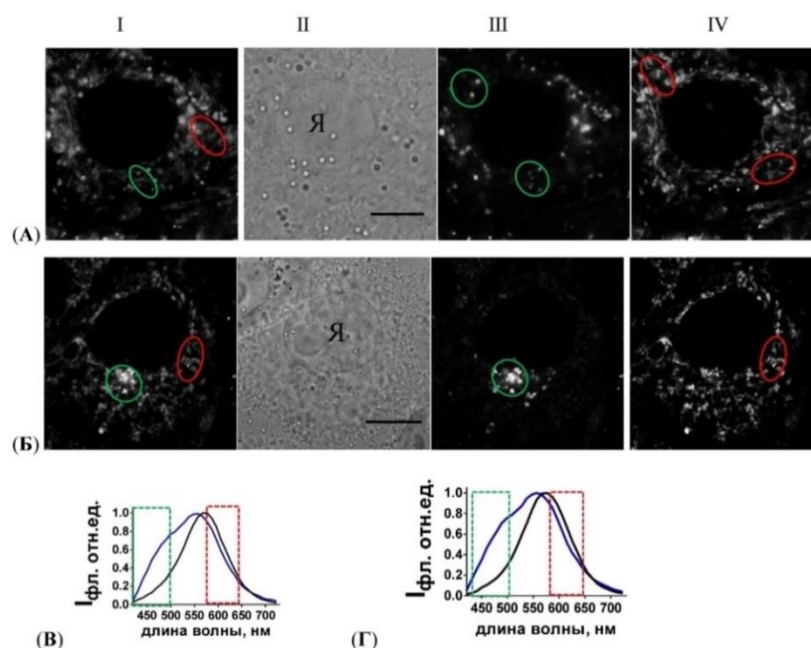


**Рис. 37.** Изменения в спектре поглощения (а) и флуоресценции (б) соединения **63** (10.0 мкмоль/л) при добавлении  $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$  при pH 4.5 (ацетатный буфер, 0.1 моль/л),  $\lambda_{\text{ex}} = 360$  нм.

Взаимодействие **64** с клетками различного гистогенеза было изучено для оценки применимости зонда для флуоресцентной визуализации ртути в живых клетках. Клетки аденокарциномы легкого человека A549 и эмбриональные клетки почек человека НЕК293 выращивали в среде DMEM/F12 (ПанЭко, Россия) с добавлением 10%-ной эмбриональной телячьей сыворотки NuClone defined (GE Healthcare Life Sciences, США) и 2 мМ глутамина (ПанЭко, Россия). Пересевы проводились 2 раза в неделю. Для эксперимента клетки на логарифмической фазе роста сажали на покровные стекла в 24-луночные планшеты ( $2 \cdot 10^5$  клеток в лунке) и выращивали сутки при 37°C при 5%  $\text{CO}_2$ . Методом конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (КЛСМ) с использованием микроскопа LSM-710 (Carl Zeiss AG, Germany, 100×/1.4 масляно-иммерсионный объектив, разрешение 0.3 и 1.5 мкм в латеральной и аксиальной плоскостях) было выявлено, что соединение **64** проникает в клетки различного гистогенеза (A549 и НЕК293) и накапливается в цитоплазме (рис. 38). При этом в обеих клеточных линиях наблюдается сходное внутриклеточное распределение: соединение **64** накапливается в везикулярных структурах субмикронного размера с диффузным окрашиванием цитоплазмы, а также в вытянутых структурах, образующих сложную сеть (рис. 38а и 38б), морфология которой типична для митохондрий.

Спектры внутриклеточной флуоресценции соединения **64** ( $\lambda_{\text{возб}}=405$  нм) анализировали с использованием спектрального режима получения конфокальных

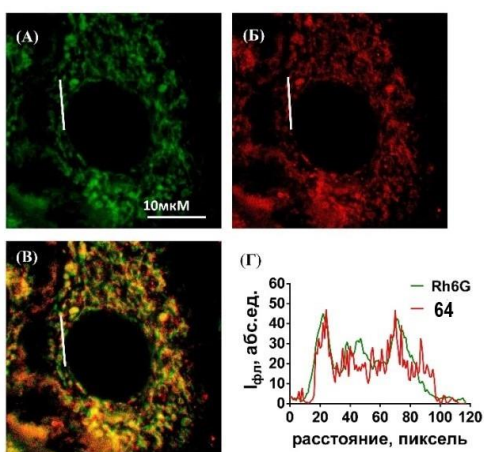
изображений. Флуоресценцию возбуждали лазером с длиной волны 405 нм и регистрировали в спектральном режиме с шагом 5 нм в диапазоне 420–730 нм. Спектры внутриклеточной флуоресценции **64** различны по форме и положению максимума в везикулярных или удлинённых структурах в цитоплазме одного типа клеток, но совпадают по форме и положению максимума в соответствующих органеллах в клетках различного гистогенеза (рис. 38В, Г). Спектр флуоресценции, наблюдаемый в везикулярных структурах, имеет более широкую форму, чем спектр в вытянутых структурах, и характеризуется наличием «плеча» в спектральном диапазоне 440–510 нм (флуоресценция донора). Различия в спектрах флуоресценции **64** в зависимости от внутриклеточной локализации соединения позволяет получить типичные изображения распределения **64** преимущественно в зернистых структурах (рис. 38И). Поскольку основные характеристики взаимодействия зонда **64** с клетками А549 и НЕК 293 оказались схожими, дальнейшие исследования были продолжены только с клетками А549.



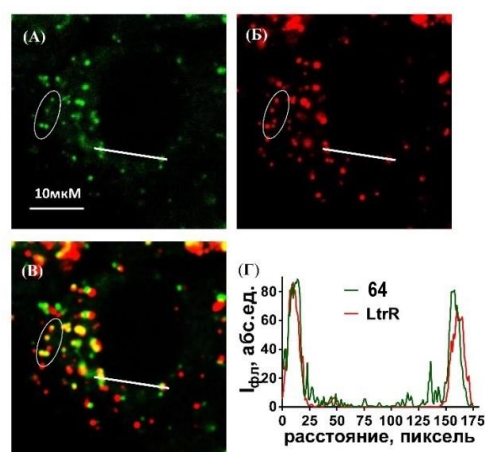
**Рис. 38.** Конфокальные флуоресцентные изображения (А, Б) и спектры флуоресценции (В, Г) **64** в клетках А549 (А, В) и НЕК293 (Б, Г). (А, Б) Типичные внутриклеточные распределения (столбцы I, III и IV) **64** в диапазонах 440–710 нм (столбец I), 440–510 нм (столбец III) и 590–650 нм (столбец IV). Изображения клеток в проходящем свете показаны в столбце II. Масштабная метка представляет собой 10 мкм. «Я» обозначает ядро. Клетки инкубировали с **64** (5 мкМ) в течение 30 мин. (В, Г) Типичные спектры внутриклеточной флуоресценции **64** в удлинённых и везикулярных структурах клеток А549 (В) и клеток НЕК293 (Г). Представленные спектры были измерены в клеточных структурах, отмеченных зеленым и красным овалами (ряды А, Б). Спектры возбуждались при  $\lambda_{ex} = 405$  нм. Зеленые и красные прямоугольники на панелях В, Г обозначают области спектра, которые использовались для измерения изображений, показанных в столбцах III и IV соответственно.

Для выяснения происхождения органелл, аккумулирующих соединение **64** был проведен солокализационный анализ исследуемого соединения с флуоресцентными маркерами клеточных органелл. Исследование солокализации **64** и родамина 6G (Rh6G),

селективного флуоресцентного зонда митохондрий, подтвердило митохондриальное накопление **64** в клетках A549 (рис. 39). Результаты были получены с помощью КЛСМ. Клетки A549 пост-инкубировали с 2 мкМ родамина 6G (20 мин, 37°C) после инкубации их с соединением **64** (5 мкМ в течение 10 мин, 37°C). Флуоресценцию Rh6G возбуждали лазером с длиной волны 543 нм, а излучение регистрировали в диапазоне 550–600 нм. Флуоресценцию соединения **64** возбуждали лазером с длиной волны 405 нм, а излучение регистрировали в диапазоне 600–700 нм. Контрольные клетки инкубировали с **64** или Rh6G по отдельности и измеряли в тех же условиях. Коэффициент «затекания флуоресценции» (перекрестный сигнал) составил 0.07 для **64** в диапазоне получения сигнала 550–600 нм. Для Rh6G в спектральном диапазоне 600–700 нм коэффициент «затекания флуоресценции» составил менее 0.01. Флуоресцентные изображения, показывающие внутриклеточное распределение **64** и Rh6G, полученные с помощью КЛСМ, демонстрируют высокий уровень солокализации соединения с жизненно важным зондом (рис. 39).



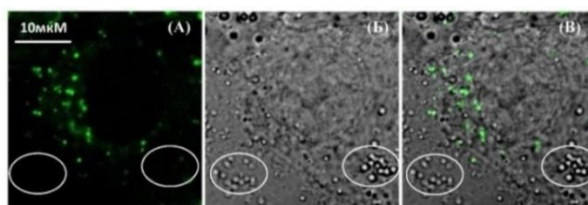
**Рис. 39.** Определение клеточных органелл, в которых происходит накопление **64** в клетках A549. (А, Б) Внутриклеточное распределение Rh6G (А) и **64** (Б). Метка масштаба равна 10 мкм. (В) Наложение изображений А и Б. Желтый цвет указывает на солокализацию **64** и Rh6G. (Г) Распределение интенсивностей флуоресценции **64** и Rh6G вдоль белой линии, проходящей через две митохондриальные нити (см. (А) – (В)). Близкое сходство обоих профилей интенсивности подтверждает солокализацию **64** и Rh6G в этих органеллах.



**Рис. 40.** Типичные распределения **64** (А) и LtrR (Б) в клетках A549. (В) Наложение изображений (А) и (Б), демонстрирует солокализацию везикул **64** и LtrR (желтый цвет). Овалы- области, где солокализация наиболее очевидна. (Г) Распределение интенсивностей флуоресценции **64** и LtrR вдоль белой линии, проходящей через две везикулы (см. (А)-(Б)). Близкое сходство обоих профилей интенсивности подтверждает солокализацию **64** и LtrR в этих везикулах. Метка масштаба составляет 10 мкм.

Для того чтобы подтвердить накопление **64** в лизосомах, краситель LysoTracker Red (LtrR) был выбран в качестве жизненно важного флуоресцентного зонда, который накапливается в лизосомах и флуоресцирует в диапазоне 560–750 нм. Клетки A549 предварительно инкубировали с LtrR (50 нМ в течение 40 мин), после чего инкубировали с соединением **64** (5 мкМ в течение 20 мин). Для измерения внутриклеточного распреде

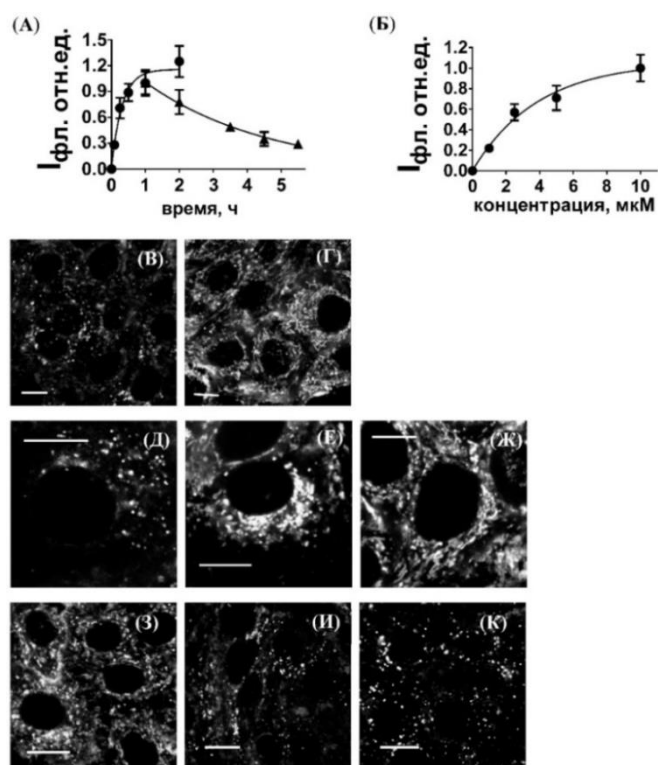
ления **64** и LtrR был применен последовательный режим сканирования. При первом сканировании флуоресценцию **64** возбуждали лазером с длиной волны 405 нм и регистрировали в диапазоне 440–510 нм. При последующем сканировании флуоресценцию LtrR возбуждали длиной волны 543 нм и регистрировали в диапазоне 650 – 750 нм («затекания флуоресценции» для **64** при данных условиях эксперимента не наблюдали). С помощью КЛСМ показано, что большинство внутриклеточных везикул, содержащих **64**, представляют собой лизосомы (рис. 40). Коэффициент сококализации соединения **64** с лизосомами (рассчитанный с использованием специальной функции программы ImageJ – Colocalization Threshold (National Institute of Health, USA)) составляет  $0.74 \pm 0.05$ , а с митохондриями –  $0.92 \pm 0.03$ . Сравнивая изображения внутриклеточного распределения **64** в везикулярных структурах, полученные КЛСМ, с распределением липидных капель, наблюдаемых на изображениях в проходящем свете, был сделан вывод, что **64** не накапливается в липидных каплях, клеточных органеллах, запасующих нейтральные жиры (рис. 41).



**Рис. 41.** Клеточные органеллы клеток линии A549, в которых локализуется **64**, отличаются от липидных капель. (А) Конфокальное флуоресцентное изображение, показывающее внутриклеточное распределение соединения **64**. Масштабная метка представляет 10 мкм. (Б) Изображение клеток в проходящем свете. Овалом выделенна группа липидных капель, расположенных на периферии клетки и видимых как ярко-белые гранулы. (В) Наложение изображений (А) и (Б) демонстрирует отсутствие накопления **64** в липидных каплях.

В работе было показано, что внутриклеточное накопление **64** достигало насыщения к 50 мин инкубации клеток A549 с **64**, а время полунакопления составляло  $10.0 \pm 0.5$  мин (рис. 42). При этом через 5 минут инкубации клеток A549 с 10 мкМ соединения (рис. 42В) наблюдали преимущественное накопление **64** в лизосомах с диффузным окрашиванием цитоплазмы. Можно предположить, что механизм внутриклеточного проникновения **64** связан (по крайней мере частично) с пассивной диффузией через плазматическую мембрану с последующим накоплением и захватом в лизосомах. Дальнейшая инкубация клеток с соединением сопровождается накоплением **64** в митохондриях (рис. 42Г). Аналогичная картина внутриклеточного распределения наблюдалась при изучении концентрационной зависимости. При низких инкубационных концентрациях соединения в первую очередь визуализировалось накопление **64** в лизосомах. С увеличением концентрации соединения во внешней среде внутриклеточное распределение становилось лизосомально-митохондриальным (рис. 42Д-Ж). Кинетика выведения **64** из клеток A549

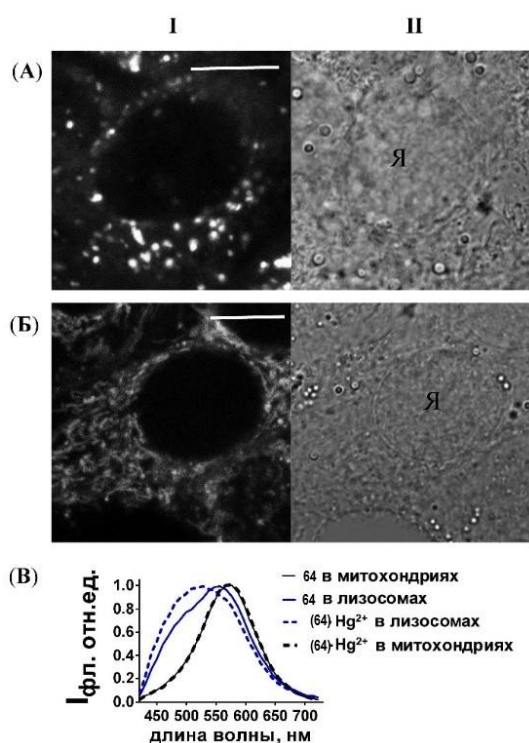
показала, что внутриклеточная концентрация красителя снизилась в 2 раза через 2.5 ч после удаления соединения из внешней среды. В последующие часы наблюдали снижение скорости элиминации **64** из клеток (рис. 42А). Около 30% от начальной внутриклеточной концентрации соединения было обнаружено в клетках через 4.5 ч после удаления **64** из инкубационной среды. Стоит отметить, что наблюдаемое снижение внутриклеточной концентрации **64** происходит в основном за счет выведения соединения из митохондрий, в то время как лизосомальное распределение сохраняется (рис. 42(З-К)). Таким образом, для соединения **64** характерно быстрое (5–10 мин) накопление и длительное удержание (более 4–5 ч) в лизосомальных структурах в клетках А549 и более медленная кинетика накопления (45–60 мин) с более высокой скоростью элиминации из митохондрий. Все последующие исследования взаимодействий между сенсором **64** и  $\text{Hg}^{2+}$  в клетках проводили после 20 или 45-минутной инкубации клеток с **64**.



**Рис. 42.** Кинетика накопления (А(●), В, Г), выведения (А(▲), З-К) и концентрационная зависимость (Б, Д-Ж) соединения **64** в клетках А549. (А, ●) Клетки инкубировали с **64** (10 мкМ) в течение различных временных интервалов и регистрировали с помощью КЛСМ при одинаковых условиях измерений. (А, ▲) Клетки инкубировали с **64** (10 мкМ) в течение 1 ч, дважды промывали раствором Хэнкса и помещали в свежую среду (без **64**) на разные (0 – 4.5 ч) периоды времени и регистрировали с помощью КЛСМ при одинаковых условиях измерений. (В, Г) Типичные КЛСМ-изображения **647** в клетках А549 при 5 (В) и 60 (Г) мин инкубации клеток с соединением. (Д-Ж) Типичные КЛСМ изображения **64** в клетках А549 при инкубационной концентрации 1 (Д), 2.5 (Е), 10 (Ж) мкМ (30 мин). (З-К) Типичные КЛСМ изображения **64** в клетках А549 после 1 (З), 2.5 (И) или 3.5 (К) ч элиминации соединения из клеток. Предварительно клетки инкубировали с 10 мкМ **64** в течение 60 мин. Метка масштаба представляет 10 мкм.

Преинкубация клеток А549 с перхлоратом ртути (II) (2–50 мкМ, 20 мин) и дальнейшая инкубация с **64** (10 мкМ, 20 мин) приводит к значительным изменениям во

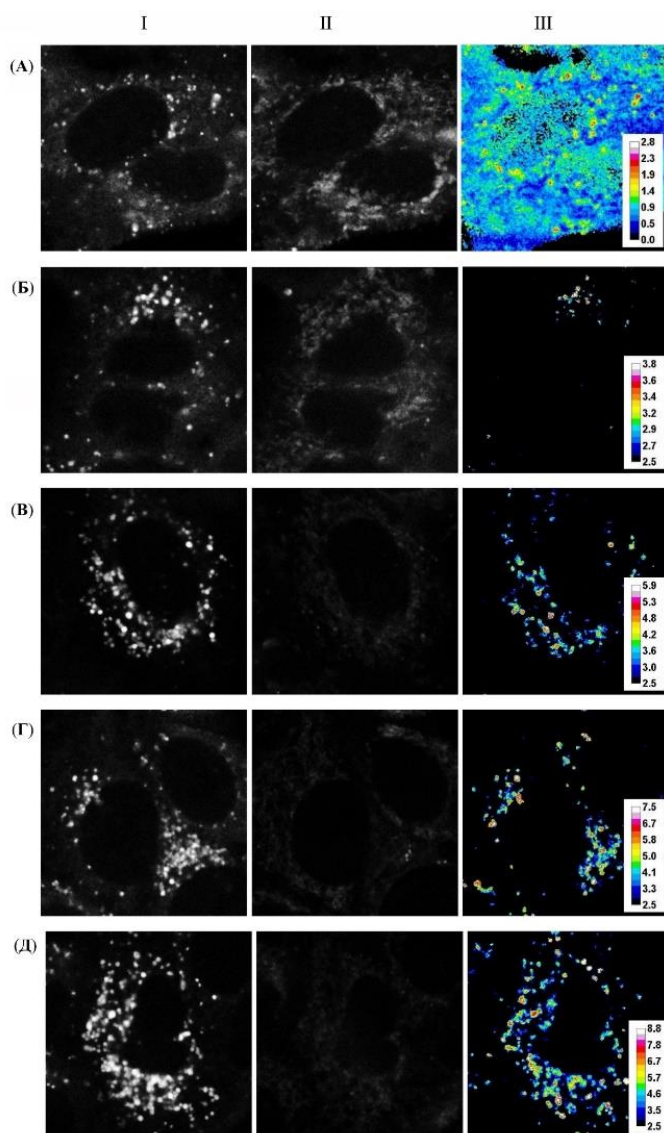
внутриклеточных спектрах флуоресценции **64** в лизосомах ( $\lambda_{\text{возб}} 405 \text{ нм}$ ), что указывает на образование комплексов  $(\mathbf{64})\cdot\text{Hg}^{2+}$  (рис. 43). В присутствии  $\text{Hg}^{2+}$  спектры флуоресценции **64** в лизосомах уширяются (рис. 43В). Причиной такого уширения является разгорание флуоресценции ХД в области 420–520 нм, что согласуется с растворными данными, так как уровень рН лизосом варьируется в пределах 4.5–4.8 [235]. Также было показано, что внутриклеточные спектры и распределение **64** в митохондриях не изменяются в результате преинкубации с  $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$ . Одной из вероятных причин отсутствия изменений в данном случае может быть слабощелочная среда (рН 8.0) в митохондриях, в которой эффективность комплексообразования с катионом ртути (II) существенно снижается. В свою очередь, при использовании света возбуждения с длиной волны 488 нм, который поглощается ХА, изменения во внутриклеточных спектрах флуоресценции сенсора **57** при добавлении  $\text{Hg}^{2+}$  отсутствовали.



**Рис. 43.** Конфокальные флуоресцентные изображения (А, Б) и спектры флуоресценции (В) **64** и  $(\mathbf{64})\cdot\text{Hg}^{2+}$  в клетках А549 ( $\lambda_{\text{возб}}=405 \text{ нм}$ ). (А, Б) Клетки предварительно инкубировали с 20 мкМ  $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$  в течение 20 мин, дважды промывали раствором Хэнкса и инкубировали с **64** (10 мкМ) в течение 20 мин. (I) – Изображения внутриклеточной флуоресценции, полученные методом КЛСМ, в спектральных диапазонах 440–510 (А) и 590–650 нм (Б). (II) Изображения клеток, полученные в проходящем свете. Метка масштаба равна 10 мкм. (В) Типичные нормализованные внутриклеточные спектры флуоресценции **64** и  $(\mathbf{64})\cdot\text{Hg}^{2+}$  в лизосомах и митохондриях.

Наблюдаемые различия во внутриклеточных спектрах флуоресценции **64** и  $(\mathbf{64})\cdot\text{Hg}^{2+}$  могут быть использованы для ратиометрического детектирования  $\text{Hg}^{2+}$  в клетках. Регистрируя флуоресцентные изображения клеток, инкубированных с **64**, в спектральных диапазонах 440–510 нм и 590–650 нм при  $\lambda_{\text{возб}}=405 \text{ нм}$ , были получены карты отношения  $R'$  интегральных интенсивностей флуоресценции в указанных

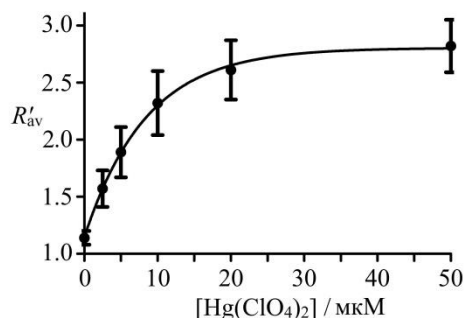
диапазонах ( $R' = I_{450-510}/I_{590-650}$ ). Для построения карт  $R'$  рассчитывали в каждой точке клетки при различных концентрациях  $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$  (рис. 44). В отсутствие ионов  $\text{Hg}^{2+}$  значение  $R'$  по цитоплазме клетки вне гранулярных структур варьировалось в пределах  $0.5 \div 1$ ; максимальный уровень ( $2.5 \div 2.8$ ) достигался в единичных лизосомах (рис. 44А).



**Рис. 44.** Флуоресцентная визуализация внутриклеточного комплексообразования **64** с  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\lambda_{\text{ex}} = 405$  нм и измеряли в спектральных диапазонах 440–510 нм (столбец I) и 590–650 нм (столбец II). В столбце III показано отношение  $R'$  интенсивностей флуоресценции  $I_{450-510}/I_{590-650}$ , рассчитанных в каждой точке клетки в отсутствие ионов  $\text{Hg}^{2+}$  (ряд А) и при 2.5 (ряд Б), 5 (ряд В), 10 (ряд Г) и 50 мкМ (ряд Д)  $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$ . Полоса интенсивности представляет собой отношение  $R'$  в каждой точке ячейки. Клетки А549 предварительно инкубировали с  $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$  в течение 20 мин, дважды промывали раствором Хэнкса и инкубировали с 10 мкМ **64** в течение 20 мин.

При обработке КЛСМ изображений клеток, преинкубированных с  $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$ , значение  $R' = 2.8$  принималось за нижнюю границу флуоресцентного сигнала сенсора **64** (области, где  $R' \leq 2.8$  представлены черным цветом). Было установлено, что отношение  $R'$  увеличивается с ростом концентрации  $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$ , добавленной к клеткам (рис. 44Б-Д). Это указывает на чувствительность  $R'$  к внутриклеточной концентрации  $\text{Hg}^{2+}$ . Также на

представленных флуоресцентных изображениях видно, что комплексообразование происходит исключительно в лизосомальных структурах клеток A549. Далее была получена зависимость среднего значения  $R'$  от внешней концентрации  $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$  (рис. 45), которая показала, что при 20 мкМ  $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$  наблюдается внутриклеточное насыщение. Установлено, что отношение  $R'$  чувствительно к присутствию ионов  $\text{Hg}^{2+}$  в клетках и возрастает с увеличением концентрации  $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$  (рис. 44, 45). Локально внутри клеточных лизосом  $R'$  колеблется от 1.4 до 2.5 в отсутствие ионов  $\text{Hg}^{2+}$  и достигает 7.8–8.0 в некоторых лизосомах при концентрации 50 мкМ  $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$ .



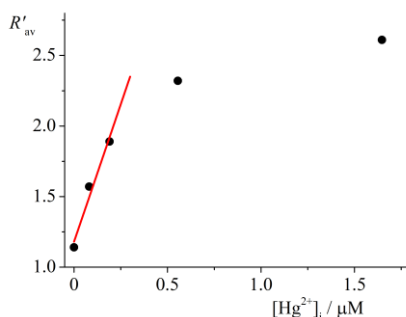
**Рис. 45.** Зависимость отношения  $R'_{av}$  от концентрации перхлората ртути (II), добавляемого в ячейки. Клетки A549 предварительно инкубировали с различными концентрациями  $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$  в течение 20 мин, дважды промывали раствором Хэнкса и инкубировали с 10 мкМ **64** в течение 20 мин. Данные усреднялись по 20 клеткам в каждом измерении и представлялись как среднее  $\pm$  стандартное отклонение.

Зависимость отношения  $R'$ , усредненная по конфокальным изображениям клеток ( $R'_{av}$ ) от концентрации добавленной к клеткам  $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$  нелинейно увеличивается от 1.9 до 2.6–2.8 и достигает насыщения при концентрации  $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$  выше 20 мкМ (рис. 45). Изменения  $R'_{av}$  при 20–50 мкМ  $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$  находятся в пределах точности измерений, и, следовательно, верхний предел обнаружения  $\text{Hg}^{2+}$  внутри клеток с зондом **64** равен примерно 20 мкМ ионов  $\text{Hg}^{2+}$  во внеклеточной среде. Далее была оценена средняя внутриклеточная концентрация ионов ртути  $[\text{Hg}^{2+}]_{i,av}$  по уравнению (9) [67],

$$[\text{Hg}^{2+}]_{i,av} = K_d \cdot Q \cdot \frac{R'_{av} - R'_{av,min}}{R'_{av,max} - R'_{av}} \quad (9)$$

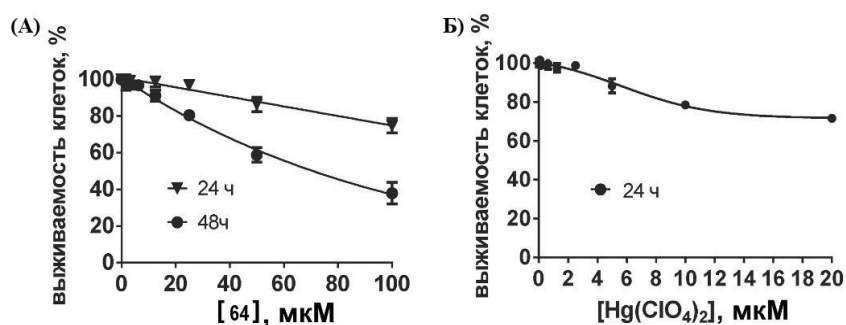
где  $K_d$  – константа диссоциации комплекса  $(\text{64}) \cdot \text{Hg}^{2+}$ , (равная  $6.89 \pm 0.13$ );  $R'_{av,min}$  и  $R'_{av,max}$  – средние значения  $R'_{av}$  для свободного **64** и комплекса  $(\text{64}) \cdot \text{Hg}^{2+}$  в клетках A549. Согласно рис. 45  $R'_{av,min} = 1.14 \pm 0.06$  и  $R'_{av,max} = 2.82 \pm 0.23$ .  $Q$  – отношение внутриклеточной интенсивности флуоресценции свободного лиганда **64** к интенсивности  $(\text{64}) \cdot \text{Hg}^{2+}$  в диапазоне 590–650 нм ( $Q = 1.81 \pm 0.03$ ). Таким образом, для внеклеточной концентрации  $\text{Hg}^{2+}$  2.5, 5.0, 10.0 и 20.0 мкМ значения  $[\text{Hg}^{2+}]_{i,av}$  составили 0.08, 0.19, 0.56, 1.65 мкМ соответственно. Зависимость  $R'_{av}$  от  $[\text{Hg}^{2+}]_{i,av}$  в диапазоне 0–0.19 мкМ продемонстрировала хорошую линейность с коэффициентом корреляции 0.99 (рис. 46).

На основании наклона этой линейной зависимости ( $r$ ) и стандартного отклонения отношения  $R'_{av}$  ( $S_Y$ ) предел обнаружения  $Hg^{2+}$  в клетках ( $C_{ПО}$ ) составил 46 нМ, согласно уравнению (1), что сопоставимо с другими флуоресцентными хемосенсорами на ион  $Hg(II)$  [183; 236].



**Рис. 46.** График отношения  $R'_{av}$  для сенсора **64** в зависимости от увеличения внутриклеточной концентрации  $Hg(ClO_4)_2$ ,  $\lambda_{ex} = 405$  нм (точки соответствуют экспериментальным данным, кривые – линейной аппроксимации методом наименьших квадратов).

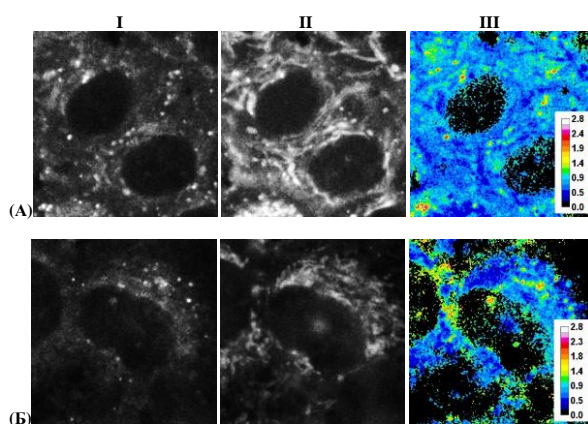
Сенсор **64** оказался не токсичен для клеток при концентрации 20 мкМ или менее в течение 24 ч инкубации (рис. 47А). Концентрации **64**, использованные в представленных исследованиях (5–10 мкМ), не влияли на рост клеток. В отношении перхлората ртути (II), выживаемость клеток снижалась при концентрациях  $Hg(ClO_4)_2$  выше 2.5 мкМ, например, наблюдалось уменьшение данного показателя на 30% при 20 мкМ  $Hg(ClO_4)_2$  по истечении 24 ч инкубации клеток А549 с  $Hg^{2+}$  (рис. 47Б).



**Рис. 47.** Зависимость выживаемости клеток А549 от различных концентраций хемосенсора **64** (А) и перхлората ртути (II) (Б). Клетки инкубировали с **64** или  $Hg(ClO_4)_2$  в течение 24 ч и 48 ч, с  $Hg(ClO_4)_2$  – в течение 24 ч.

Для проверки селективности внутриклеточного ответа **64** на ионы  $Hg^{2+}$  клетки А549 преинкубировали и с ионами  $Cu^{2+}$  или  $Pb^{2+}$  в диапазоне концентраций 2–1000 мкМ, после чего инкубировали с соединением **64** (10 мкМ). В исследуемом диапазоне концентраций  $Cu^{2+}$  и  $Pb^{2+}$  не наблюдалось изменений ни в спектрах внутриклеточной флуоресценции (включая ненормализованную интенсивность и значения  $R$ ), ни в характерной картине внутриклеточного распределения **64**. Этот результат согласуется с неспособностью **64** образовывать комплексы с  $Cu^{2+}$  и  $Pb^{2+}$  в водном растворе, что

позволяет сделать вывод о том, что соединение **64** перспективно для селективного обнаружения ионов  $\text{Hg}^{2+}$  в живых клетках с использованием ратиометрического подхода.

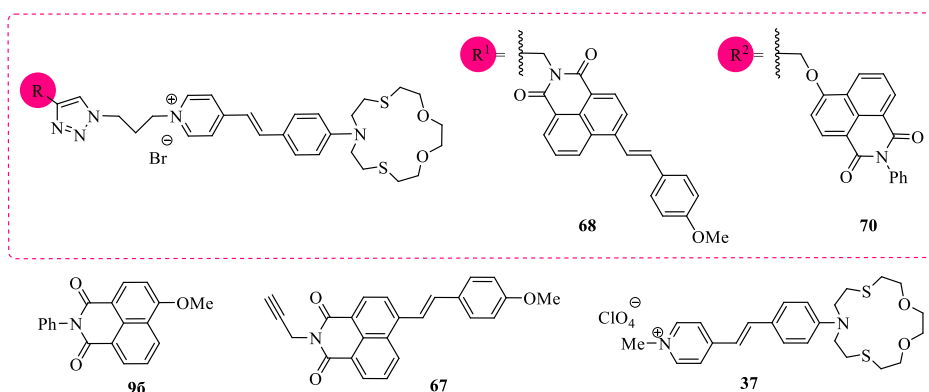


**Рис. 48.** Флуоресцентная визуализация внутриклеточного комплексообразования **64** с  $\text{Cu}^{2+}$  (А) и  $\text{Pb}^{2+}$  (Б). (I) Изображения внутриклеточной флуоресценции, измеренные в спектральном диапазоне 440–510 нм. (II) Изображения внутриклеточной флуоресценции, измеренные в спектральном диапазоне 590–650 нм. (III) Изображения в псевдоцветах, показывающие отношение  $R'$  интенсивностей флуоресценции  $I_{440-510}/I_{590-650}$  при 1 мМ  $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2$  (А) и 10 мМ  $\text{Pb}(\text{ClO}_4)_2$  (Б). Шкала интенсивности соответствует значениям  $R'$ . Клетки A549 предварительно инкубировали с  $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2$  (1 мМ) или  $\text{Pb}(\text{ClO}_4)_2$  (10 мМ) в течение 30 мин, дважды промывали раствором Хэнкса и инкубировали с **64** (10 мкМ) в течение 20 мин.

### 3.3. Изучение спектрально-люминесцентных свойств и комплексообразования RET-систем *типа 2* в растворах и живых средах

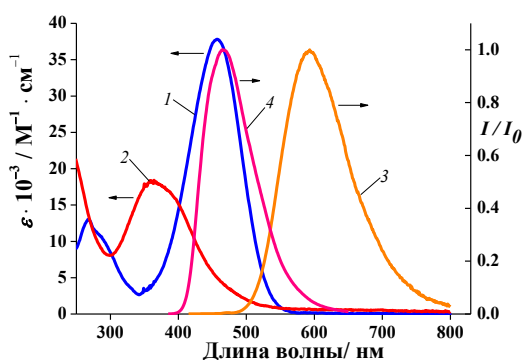
Следующая часть работы заключалась в изучении оптических свойств RET-систем *типа 2*. При создании RET-систем *типа 2* в качестве ICT-флуороионофора был выбран стирилпиридиниевый краситель **37** (схема 20), в структуре которого неподеленная электронная пара атома азота краун-эфирного рецептора сопряжена с электроноакцепторных пиридиниевым фрагментом.

Схема 20



Сенсорные свойства соединения **37** были ранее представлены в данной работе. При исследовании оптических свойств **37** было выявлено, что комплексообразование сопровождается гипсофлорным и гиперфлорным эффектом. Тем не менее, величина гипсофлорного сдвига при переходе от лиганда **37** к  $(\mathbf{37}) \cdot \text{Hg}^{2+}$  оказалось небольшой (36 нм). Поэтому с целью улучшения сенсорных свойств ICT-хемосенсора **37** в настоящей

работе была осуществлена модификация его структуры путем введения 4-стирил- и 4-метоксихромофорного фрагмента с образованием RET-пар **68** и **70** (схема 20). Выбор 4-алкокси- и 4-метоксистирил-1,8-нафталимидного остатка в качестве ХД в структурах RET-пар **68** и **70** основан на анализе спектральных характеристик индивидуальных красителей-компонент **37**, **67** и **96** (схема 20). Так, спектр поглощения **37** (ХА) перекрывается со спектрами испускания производных **67** и **96**, (рис. 49). Такое перекрывание обеспечивает возможность реализации RET-процесса в свободных лигандах **68** и **70**. В то же время, гипсохромный сдвиг максимума поглощения ХА при комплексообразовании с  $\text{Hg}^{2+}$  (рис. 49) вызывает уменьшение перекрывания спектральных полос и снижение эффективности RET, которое должно выражаться в росте интенсивности полосы испускания ХД в спектре на фоне сигнала ХА.



**Рис. 49.** Перекрывание спектров поглощения **37** (1) и комплекса  $(37) \cdot \text{Hg}^{2+}$  (2) с нормализованными спектрами флуоресценции соединений **67** (3) и **96** (4) в воде при pH 4.5 (ацетатный буфер, 0.01 М),  $\lambda_{\text{ex}} = 405 \text{ нм}$  (3) и  $\lambda_{\text{ex}} = 375 \text{ нм}$  (4). Концентрации всех соединений в растворе – 10.0 мкМ.

Для наглядности в табл. 3 приведены значения интегралов перекрывания  $J(\lambda)$ , критических радиусов Ферстера  $R_0$  и эффективностей резонансного переноса энергии  $\Phi_{\text{RET}}$  для пар хромфоров **37–67**, **37–96**,  $(37) \cdot \text{Hg}^{2+} - 67$  и  $(37) \cdot \text{Hg}^{2+} - 96$ . Для расчета указанных параметров использовались уравнения (2)–(3) и данные по оптимизированной геометрии соединений **68** и **70** (рис. 50). Изучение спектрально-люминесцентных и комплексообразующих свойств бисхромофорных производных **68** и **70**, а также модельных соединений **37**, **67** и **96**, представляющих собой индивидуальные монохромофорные компоненты RET-пар, проводилось в водном ацетатном буферном растворе при pH 4.5.

RET-пара	$J(\lambda) / \text{М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1} \cdot \text{нм}^4$	$R_0 / \text{Å}$	$\Phi_{\text{RET}}$
<b>96</b> (ХД) – <b>37</b> (ХА)	$1.17 \cdot 10^{15}$	17.7	0.93
<b>96</b> (ХД) – $(37) \cdot \text{Hg}^{2+}$ (ХА)	$6.24 \cdot 10^{13}$	12.3	0.60
<b>67</b> (ХД) – <b>37</b> (ХА)	$1.65 \cdot 10^{14}$	20.7	0.89
<b>67</b> (ХД) – $(37) \cdot \text{Hg}^{2+}$ (ХА)	$8.87 \cdot 10^{13}$	12.7	0.30

**Табл. 3.** Спектроскопические характеристики RET-пар «нафталимид – стироловый краситель» в воде.

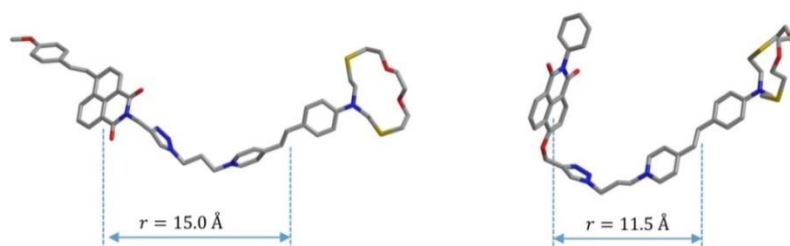


Рис. 50. Оптимизированная методом РМ6 геометрия соединения **68** (слева) и **70** (справа).

Соединение (L)	$\lambda_{\text{погл макс}} / \text{нм}$	$\lambda_{\text{фл макс}} / \text{нм}$	$\varphi_{\text{фл}}$	$\lg K$ для (L)·Hg <sup>2+</sup>	
				Данные спектрофотометрии	Данные спектрофлуориметрии
<b>96</b>	375	465	0.66	–	–
<b>67</b>	425	595	0.039	–	–
<b>37</b>	460	610	0.0066	$7.4 \pm 0.4$	$7.6 \pm 0.6$
<b>68</b>	469	637	0.00085	$5.37 \pm 0.05$	$5.81 \pm 0.06$
<b>70</b>	377; 487	458; 612	$< 10^{-4}$	$6.0 \pm 0.2$	$5.6 \pm 0.1$

Табл. 4. Спектрально-люминесцентные характеристики соединений **96**, **67**, **37**, **68**, **70** и константы устойчивости комплексов **37**, **68** и **70** с катионами ртути (II) в воде при pH 4.5 (ацетатный буфер, 0.01 М).

Спектр поглощения **68** содержит широкую длинноволновую полосу, батохромно смещенную относительно полосы стирилового красителя **37** (рис. 51а). Сдвиг на 27 нм в красную область при переходе от **37** к **68** наблюдался также и в спектре флуоресценции (рис. 51б, табл. 4). Отмеченный батохромный сдвиг не связан со вкладом полосы поглощения ХД, поскольку последняя расположена в более коротковолновой области (нафталимид **67** имеет максимум в спектре поглощения при 420 нм, рис. 51а). По-видимому, из-за высокой чувствительности стирилпиридиниевого хромофора к микроокружению имеет место некоторое изменение степени поляризации его  $\pi$ -электронной системы в результате присоединения второго фотоактивного фрагмента.

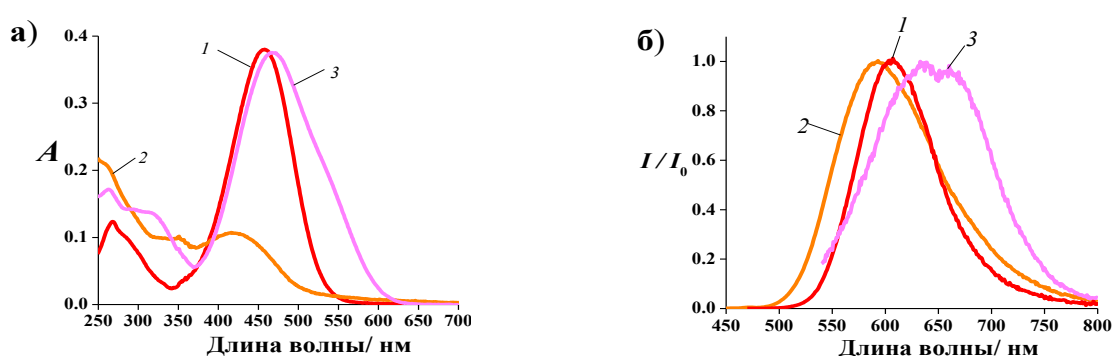


Рис. 51. Спектры поглощения (а) и нормализованные спектры флуоресценции (б) соединений **37** (1), **67** (2) и **68** (3) в воде при pH 4.5 (ацетатный буфер, 0.01 М). Концентрации всех соединений 10.0 мкМ.,  $\lambda_{\text{exc}} = 405$  нм (**67**, **68**) и 460 нм (**37**).

Данное предположение подтверждается тем, что в спектрах <sup>1</sup>H ЯМР химические сдвиги протонов нафталимидного ядра в соединениях **67** и **68** практически не отличаются,

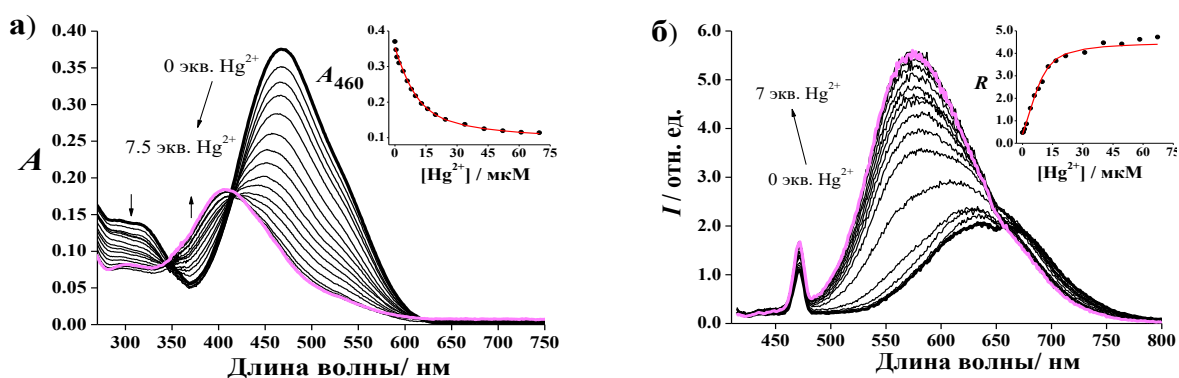
в то время как сигналы стирилпидиниевого фрагмента при переходе от **37** к **68** претерпевают значительный сдвиг (табл. 5), и что разница устойчивости комплексов **37** и **68** с катионом ртути (II) (табл. 5) различается приблизительно на два порядка.

	Обозначение атома водорода <sup>a</sup>	Химический сдвиг, $\delta$ / м.д.		$ \delta_1 - \delta_2 $ / м.д. <sup>b</sup>
		Монохромофор, соединение <b>67</b> и <b>37</b> ( $\delta_1$ )	Бисхромофор, соединение <b>68</b> ( $\delta_2$ )	
Нафталиimidный фрагмент	OCH <sub>3</sub>	3.82	3.82	0
	H(17)	4.79	5.30	<b>0.51</b>
	H(13), H(15)	7.02	7.03	0.01
	H(10)	7.59	7.60	0.01
	H(12), H(16)	7.83	7.83	0
	H(6)	7.88 – 7.95	7.88 – 7.95	<b>0.06</b>
	H(9)	8.08	8.09	0.01
	H(3)	8.23	8.24	0.01
	H(2)	8.49	8.50	0.01
	H(7)	8.57	8.56	0.01
H(5)	9.03	9.04	0.01	
Стирилпидиниевый фрагмент	H(26')	2.10 – 2.22	1.13 – 1.25	<b>0.97</b>
	H(16'), H(23')	2.71 – 2.79	2.72 – 2.78	0.01
	H(17'), H(22')	2.80 – 2.89	2.79 – 2.87	0.01
	H(27')	3.43 – 3.51	3.44 – 3.50	0.01
	H(15'), H(24')	3.53 – 3.62	3.55 – 3.60	0.02
	H(18'), H(19'), H(20'), H(21')	3.62 – 3.75	3.63 – 3.73	0.01
	H(25')	4.43 – 4.54	4.37 – 4.47	<b>0.06</b>
	H(11'), H(13')	6.72	6.71	0.01
	H(8')	7.17	7.11	<b>0.06</b>
	H(10'), H(14')	7.59	7.53 – 7.64	<b>0.06</b>
	H(7')	7.94	7.86 – 7.96	<b>0.08</b>
	H(3'), H(5')	8.08	8.01	<b>0.07</b>
	H(2'), H(6')	8.78	8.69	<b>0.09</b>

**Табл. 5.** Значения химических сдвигов протонов в спектрах <sup>1</sup>H ЯМР соединений **37**, **67** и **68** в ДМСО-*d*<sub>6</sub>. <sup>a</sup>Нумерация атомов в нафталиimidном и стирилпидиниевом фрагменте соединений **37**, **67** и **68** представлена в экспериментальной части. <sup>b</sup>Красным цветом выделены значения разностей химических сдвигов, соответствующие протонам, сигналы которых изменяют свое положение в спектре при переходе от монохромофорного производного (**37** или **67**) к бисхромофору **68** наиболее сильно.

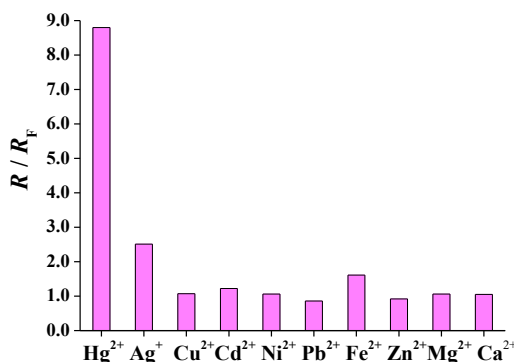
При добавлении Hg<sup>2+</sup> водный раствор **68** наблюдался гипсохромный сдвиг длинноволновой полосы поглощения, обусловленный координацией катиона с краун-эфирным фрагментом стирипидиниевого остатка (рис. 52а). В спектре флуоресценции **68** присутствие Hg<sup>2+</sup> вызывало смещение максимума в коротковолновую область и рост интенсивности эмиссии (рис. 52б). По представленным данным было определено значение логарифма константы устойчивости комплекса **68** с катионом Hg<sup>2+</sup> состава 1:1 (табл. 4). Наблюдаемое разгорание флуоресценции **68** является отчасти результатом увеличения эффективности излучательной дезактивации самого стирилпидиниевого хромофора при комплексообразовании (рис. 49б), а отчасти ростом интенсивности испускания ХД за счет подавления RET (полосы испускания **67** и (**37**)·Hg<sup>2+</sup> сильно перекрываются, см. рис. 49б и

рис. 51б). Изменение формы спектра флуоресценции **68** при связывании  $\text{Hg}^{2+}$  позволяет рассматривать данный сенсор как ратиометрический. Действительно, отношение  $R$  интенсивности флуоресценции при 565 нм к интенсивности при 687 нм ( $R = I_{565}/I_{687}$ ) возрастало приблизительно в 9 раз в процессе спектрофлуориметрического титрования (верхняя вставка рис. 52б). Следует отметить, что монохроматический ратиометрический хемосенсор **37** в аналогичных условиях демонстрировал меньший контраст в переключении аналитического сигнала (отношение  $R$ , равное  $I_{550}/I_{605}$ , при добавлении перхлората ртути (II) возрастало в 3.5 раза, см. рис. 21б).



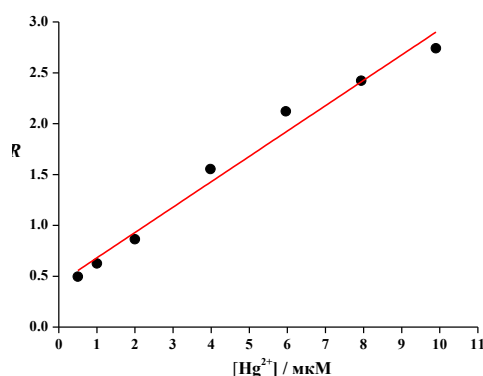
**Рис. 52.** Изменения в спектрах поглощения (а) и флуоресценции (б) соединения **68** (10.0 мкМ) при постепенном добавлении перхлората ртути (II) в воде при рН 4.5 (ацетатный буфер, 0.01 М),  $\lambda_{\text{ex}} = 405$  нм. Верхние вставки на рисунках а) и б) показывают зависимость оптической плотности на длине волны 460 нм ( $A_{460}$ ) и отношения  $R$  интенсивности флуоресценции на длине волны 565 нм к интенсивности на длине волны 687 нм ( $I_{565}/I_{687}$ ) от концентрации  $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$  в растворе (точки соответствуют экспериментальным данным, кривые – расчету).

Спектральный отклик сенсора **68** на ион  $\text{Hg}^{2+}$  был селективным: изменения в спектрах поглощения и флуоресценции не наблюдались в присутствии катионов  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  и  $\text{Fe}^{2+}$ . На рис. 53 представлена гистограмма, кооторая показывает во сколько раз возрастает величина  $I_{565}/I_{687}$  при добавлении 5 экв. перхлоратов указанных металлов в водный раствор **68**.



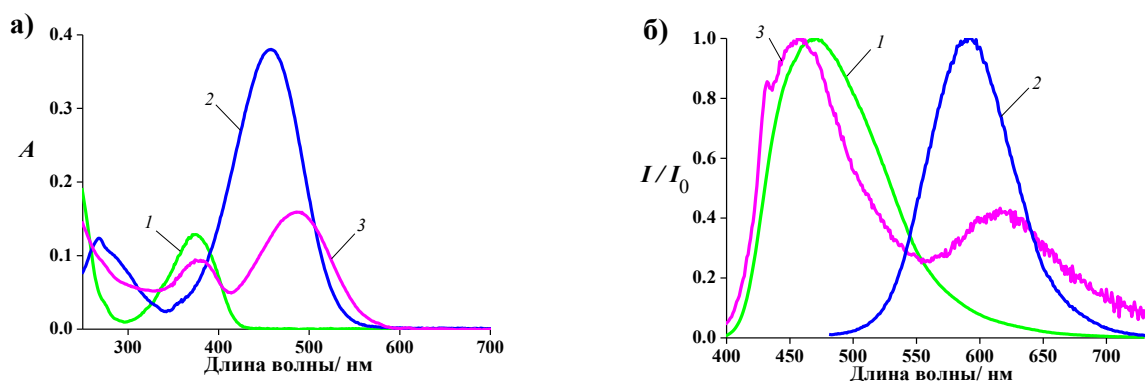
**Рис. 53.** Гистограмма, показывающая селективность флуоресцентного отклика сенсора **68** (10.0 мкМ) на присутствие  $\text{Hg}^{2+}$  в водном растворе при рН 4.5 (ацетатный буфер, 0.01 М). Величина  $R_F$  рассчитана как отношение интенсивности флуоресценции при 565 нм к интенсивности при 687 нм для свободного лиганда **68**;  $R$  – аналогичное отношение, но рассчитанное после добавления 5 экв. перхлората металла в раствор сенсора **68**,  $\lambda_{\text{ex}} = 405$  нм.

Зависимость отношения  $R$  интенсивности флуоресценции на длине волны 565 нм к интенсивности на длине волны 687 нм сенсора **68** обнаруживала хорошую линейную корреляцию (корреляционный коэффициент 0.97) с концентрацией  $\text{Hg}^{2+}$  в интервале 1 – 10 мкМ (рис. 54). По тангенсу угла наклона  $r$  представленной калибровочной прямой (рис. 54) и стандартному отклонению аналитического сигнала  $s$  (отношения  $R$ ) в соответствии с уравнением (1) было найдено, что значение предела обнаружения ( $C_{\text{ПО}}$ ) катионов  $\text{Hg}^{2+}$  с использованием сенсора **68** в заданных условиях составляет 40 нмоль/л. Найденное значение  $C_{\text{ПО}}$  оказалось достаточно близко к ПДК ртути в питьевой воде (30 нМ) [230].



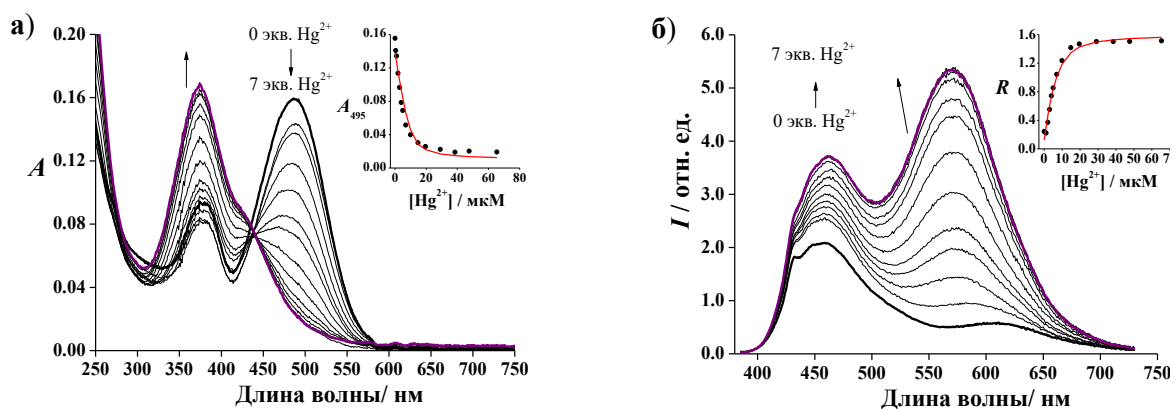
**Рис. 54.** Зависимость отношения  $R$  интенсивности флуоресценции на длине волны 565 нм к интенсивности на длине волны 687 нм ( $I_{565}/I_{687}$ ) раствора **68** (10.0 мкМ) в воде при pH 4.5 (ацетатный буфер, 0.01 М) от концентрации  $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$  в растворе (точки соответствуют экспериментальным данным, кривые – линейной аппроксимации методом наименьших квадратов),  $\lambda_{\text{ex}} = 405$  нм.

Далее нами был изучен хемосенсор **70**, содержащий фрагмент 4-алкокси-1,8-нафталимида в качестве хромофора-донора. Спектр поглощения **70** состоит из двух пиков, соответствующих фрагментам нафталимида при 377 нм и стирилпиридина при 487 нм (рис. 55а). В спектре флуоресценции (рис. 55б), при возбуждении длиной волны 375 нм, где преимущественно поглощает донорный фрагмент, присутствуют характерные пики обоих хромофоров, однако эмиссия нафталимида в бисхромофоре значительно погашена (квантовые выходы флуоресценции соединений **70** и **96** представлены в табл. 4). Это объясняется довольно высокой эффективностью протекания RET-процесса в системе. Флуоресценция **70** и **37** в воде оказалась очень слабой, что соответствует общему недостатку флуорофоров ICT, который заключается в том, что такие соединения обычно демонстрируют низкий квантовый выход флуоресценции в полярных протонных растворителях [234]. Тем не менее, стирилпиридиновые красители часто используются во флуоресцентной визуализации из-за их способности увеличивать интенсивность излучения в биологической среде [201; 233].



**Рис. 55.** Спектры поглощения (а) и нормализованной флуоресценции (б) соединений **96** (1), **37** (2) и **70** (3) в воде при рН 4.5 (0.01 М ацетатный буфер). Концентрация всех соединений 10.0 мкМ,  $\lambda_{\text{ex}} = 405$  нм (**37**) и 375 нм (**96**, **70**).

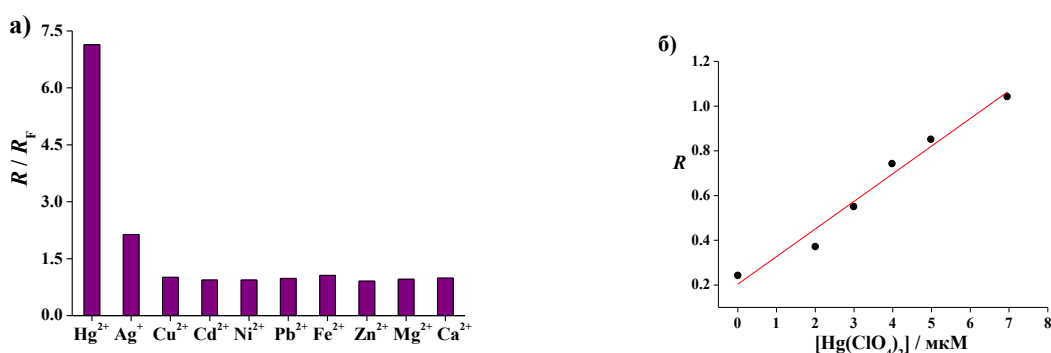
Добавление  $\text{Hg}^{2+}$  к водному раствору **70** приводило к синему сдвигу длинноволновой полосы поглощения (рис. 56а), связанному с координацией катиона с рецепторной полостью фрагмента стирилпиридиния. При возбуждении на длине волны 375 нм, присутствие  $\text{Hg}^{2+}$  вызвало усиление флуоресценции донора около 450 нм из-за ингибирования RET – процесса (см. данные по  $\Phi_{\text{RET}}$  в табл. 3), а также разгорание флуоресценции акцептора на 570 нм, объяснимое более интенсивным излучением комплекса по сравнению с одиночным лигандом **37**.



**Рис. 56.** Изменения в спектрах поглощения (а) и флуоресценции (б) соединения **70** (10.0 мкМ) при постепенном добавлении перхлората ртути (II) в воде при рН 4.5 (ацетатный буфер, 0.01 М),  $\lambda_{\text{ex}} = 375$  нм. Верхние вставки на рисунках а) и б) показывают зависимость оптической плотности на длине волны 495 нм ( $A_{495}$ ) и отношения  $R$  интенсивности флуоресценции на длине волны 570 нм к интенсивности на длине волны 450 нм ( $I_{570} / I_{450}$ ) от концентрации  $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$  в растворе (точки соответствуют экспериментальным данным, кривые – расчету).

Наблюдаемое разгорание эмиссии было сильнее в длинноволновом канале, так что отношение интенсивности флуоресценции при 570 нм к интенсивности при 450 нм ( $I_{570} / I_{450}$ )  $R$  возрастало в 6.6 раза при постепенном добавлении перхлората ртути (см. верхнюю вставку на рис. 56б). Таким образом, ратиометрический отклик зонда **70** был выше в отличие от монохромофорного производного **37**, демонстрирующее увеличение  $R$  ( $I_{550} / I_{580}$ ) всего в 3.3 раза (рис. 21б). Используя данные спектрофотометрического и

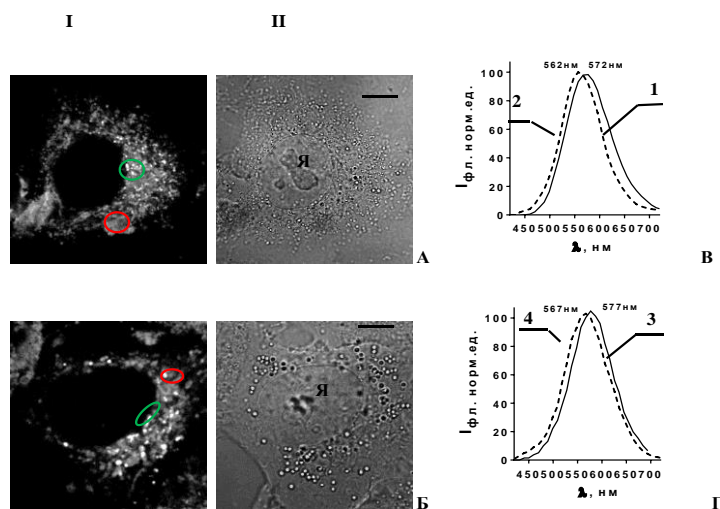
спектрофлуориметрического титрования, были найдены логарифмы констант устойчивости ( $\lg K$ ) для комплекса  $(70) \cdot \text{Hg}^{2+}$  равными  $6.0 \pm 0.2$  и  $5.6 \pm 0.1$  соответственно (табл. 4). Флуоресцентный ответ **70** по отношению к  $\text{Hg}^{2+}$  был достаточно селективным. Добавление 1–10 экв.  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  не изменило отношение  $R$  (рис. 57а), однако в присутствии  $\text{Ag}^+$  произошло небольшое увеличение значения  $R$ . График зависимости  $R$  от концентрации перхлората  $\text{Hg(II)}$  для сенсора **70** показал хорошую линейность в диапазоне концентраций  $\text{Hg}^{2+}$  0–7.0 мкМ (коэффициент корреляции 0.987, рис. 57б). Используя наклон графика из рис. 57б ( $r$ ) и стандартное отклонение сигнала ( $s$ ) для раствора свободного лиганда **70**, был рассчитан предел обнаружения  $\text{Hg}^{2+}$  ( $C_{\text{ПО}}$ ) согласно уравнению (1), который составил 170 нМ, Полученное значение  $C_{\text{ПО}}$  сопоставимо со значениями других флуоресцентных зондов для  $\text{Hg}^{2+}$  [237].



**Рис. 57.** (а) Селективность флуоресцентного отклика **70** (10 мкМ) по отношению к ионам ртути (II) в воде при pH 4.5. Значение  $R_F$  рассчитано как отношение интенсивности флуоресценции при 570 нм к интенсивности флуоресценции при 450 нм для свободного лиганда **70**,  $R$  – то же отношение, но найденное после добавления 5 экв. ионов металла к раствору **70**  $\lambda_{\text{ex}} = 375$  нм. (б) Зависимость отношения  $R$  интенсивности флуоресценции на длине волны 565 нм к интенсивности на длине волны 687 нм ( $I_{570} / I_{450}$ ) раствора соединения **70** (10.0 мкМ) в воде при pH 4.5 (ацетатный буфер, 0.01 М) от концентрации  $\text{Hg(ClO}_4)_2$  в растворе (точки соответствуют экспериментальным данным, кривые – линейной аппроксимации методом наименьших квадратов),  $\lambda_{\text{ex}} = 375$  нм.

На следующем этапе работы была изучена биоприменимость сенсоров **68** и **70** для флуоресцентной визуализации катионов ртути (II) на клеточных культурах. Для исследования **68** использовались эмбриональные клетки почки человека НЕК293. При добавлении соединения **68** к клеткам из стокового раствора в ДМСО, значительная его часть в клеточной среде выпадает в осадок, что, по всей вероятности, обусловлено высокой гидрофобностью соединения. Методом КЛСМ установлено, что **68** проникает в клетки НЕК293 и накапливается в цитоплазме. При этом наблюдается концентрирование соединения в везикулах, локализация в клеточных органоидах вытянутой структуры, а также диффузное окрашивание цитоплазмы (рис. 58А, Б). Характер внутриклеточного распределения соединения существенно не меняется при варьировании инкубационных концентраций и времени инкубации клеток с ним. Полученные внутриклеточные спектры флуоресценции соединения, локализованного в везикулярных структурах субмикронного

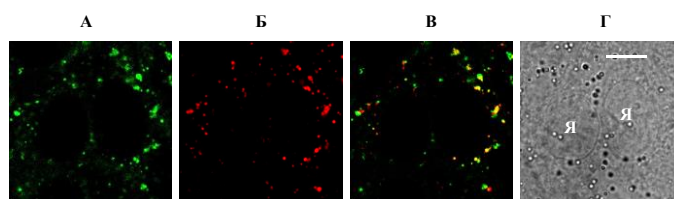
размера, отличны по форме и положению максимума ( $\lambda_{\text{max}}^{\text{fl}}$  572 нм) от спектров в других частях цитоплазмы ( $\lambda_{\text{max}}^{\text{fl}}$  577 нм) (рис. 58В, Г). Интенсивность внутриклеточных спектров флуоресценции варьируется в разных частях клетки.



**Рис. 58.** Конфокальные флуоресцентные изображения (А, Б) и внутриклеточные спектры флуоресценции соединения **68** (рисунки (В) и (Г), сплошные линии) и комплексов  $(\mathbf{68}) \cdot \text{Hg}^{2+}$  (рисунки (В) и (Г), пунктирные линии) в везикулярных структурах (В) и цитоплазме (Г) в клетках НЕК293. (I) флуоресцентные изображения. (II) изображения клеток в проходящем свете. Клетки инкубировали с 5 мкМ соединения **68** в течение 1 ч (А) или преинкубировали с 50 мкМ  $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$  (30 мин) и далее инкубировали с 5 мкМ соединения **68** в течение 1 ч (Б). Метка масштаба составляет 5 мкм,  $\lambda_{\text{ex}} = 405$  нм, регистрировали в диапазоне 420–730 нм. Спектры флуоресценции представлены в нормализованных единицах. Зелеными овалами выделены некоторые лизосомы, красными овалами – область диффузного распределения соединения в цитоплазме или органоиде, отличным от везикулы. Буква «Я» обозначает ядра.

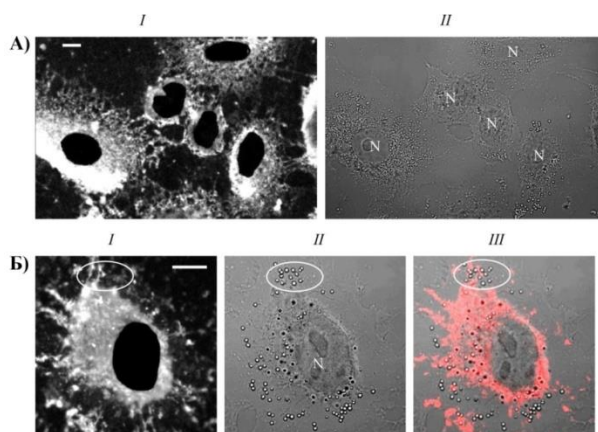
Для выяснения происхождения везикул, аккумулирующих соединение **68**, был проведен солокализационный анализ исследуемого соединения с флуоресцентным маркером лизосом LysoTracker Red (LtrR). Исследования выявили, что наблюдаемое в клетках гранулярное распределение соединения отражает его преимущественное накопление в лизосомах (рис. 59). Коэффициент солокализации соединения с лизосомами составляет  $0.7 \pm 0.1$ . Отметим, что монохромофорный стироловый краситель **37** проникал в живые клетки и накапливался преимущественно в митохондриях [183]. Как показали полученные ранее результаты, детектирование  $\text{Hg}^{2+}$  в клетках с использованием **37** было невозможно вследствие основного уровня рН ( $\sim 8.0$ ) в указанных органеллах. При изучении внутриклеточного комплексообразования сенсора **63** мы исходили из предположения, что связывание катионов  $\text{Hg}^{2+}$  азадитиакраун-эфирным рецептором не подавляется за счет гидролиза соли ртути, так как значение рН в лизосомах составляет приблизительно 4.5 [235]. Преинкубация клеток НЕК293 с  $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$  (20–50 мкМ, 60 мин), и дальнейшая инкубация с **68** (5 мкМ, 60 мин) приводила к смещению внутриклеточных спектров флуоресценции в область коротких длин волн на 10 нм (рис. 58). Аналогичный результат наблюдался при инкубации клеток с соединением **68** и последующей

инкубацией с  $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$ . Максимум внутриклеточного спектра флуоресценции **68** в присутствии  $\text{Hg}^{2+}$  наблюдался при 562 и 567 нм в лизосомах и цитоплазме соответственно (рис. 58В, Г). Наблюдаемое незначительное изменение формы эмиссионной полосы и небольшой сдвиг максимума в присутствии ионов  $\text{Hg}^{2+}$  в клетках, вероятно, связаны с тем, что спектр флуоресценции стирилового красителя, выполняющего роль акцептора в хемосенсоре **68**, смещается в коротковолновую область при переходе от водного раствора к внутриклеточной среде. В результате различие в положении максимумов испускания ХА, ХД, и ХА, связанного с ионом  $\text{Hg}^{2+}$ , оказывается недостаточным для регистрации ратиометрического флуоресцентного отклика.



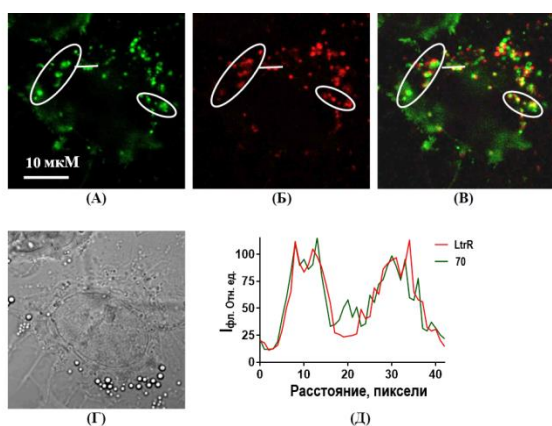
**Рис. 59.** Типичные распределения соединения **68** (А) и флуоресцентного маркера лизосом LtrR (Б) в клетках НЕК 293, полученные методом КЛСМ. (В) – наложение изображений (А) и (Б). Желтый цвет указывает на солокализацию соединения **68** и маркера LtrR. Флуоресцентные изображения были скорректированы на перекрытие спектров флуорофоров. (Г) – изображение клеток в проходящем свете. Метка масштаба соответствует 10 мкм. Буква «Я» обозначает ядра.

Далее была исследована применимость **70** для флуоресцентной визуализации  $\text{Hg}^{2+}$  в живых клетках аденокарциномы легких человека А549 с использованием КЛСМ. Было выявлено, что **70** проникает в клетки А549 и накапливается в цитоплазме (рис. 60). Диффузное окрашивание цитоплазмы **70** сопровождалось концентрацией соединения в субмикронных везикулах и накоплением в вытянутых структурах, образующих сложную сеть на периферии (рис. 60). Было показано, что везикулы, окрашенные **70**, отличаются от липидных капель, т. е. от клеточных органелл, хранящих нейтральные липиды (рис. 60).

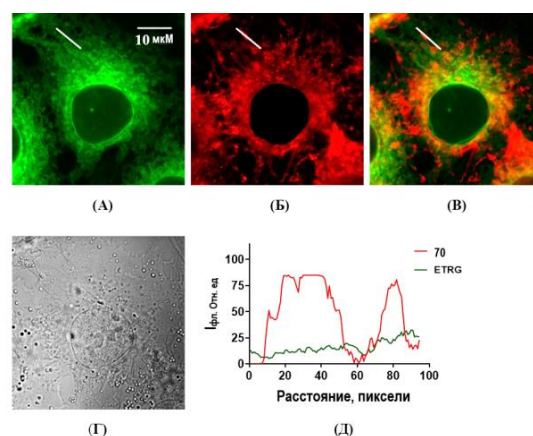


**Рис. 60.** Типичные внутриклеточные распределения (столбцы I) соединения **70** в диапазонах 450–730 нм. Изображения клеток в проходящем свете показаны в столбце II. Объединенные изображения IБ (красный цвет) и IIБ на панели IIIБ демонстрируют отсутствие накопления **70** в липидных каплях. Овалами отмечена группа липидных капель, расположенных на периферии клетки и наблюдаемых как светло-контрастные гранулы. Черта представляет 10 мкм. «N» обозначает ядро. Клетки инкубировали с соединением **70** (5 мкМ) в течение 30 мин.

В экспериментах по солокализации с флуоресцентным маркером лизосом LysoTracker Red (LtrR) везикулы, накапливающие **70**, были идентифицированы как лизосомы (рис. 61). Коэффициент солокализации, рассчитанный с использованием функции Colocalization Threshold программы ImageJ (Национальный институт здравоохранения, США), составляет  $0.5 \pm 0.1$ . Далее с помощью КЛСМ было выявлено, что витальный флуоресцентный зонд Endoplasmic Reticulum Tracker Green (ETRG) и вытянутые структуры, накапливающие **70**, не солокализуются, исключая, таким образом, локализацию **70** в эндоплазматическом ретикулуме (рис. 62). Аналогичным образом, не наблюдалось колокализации родамина 123 (Rh123), флуоресцентного зонда митохондрий, и **70** в продолговатых структурах на периферии клеток A549.



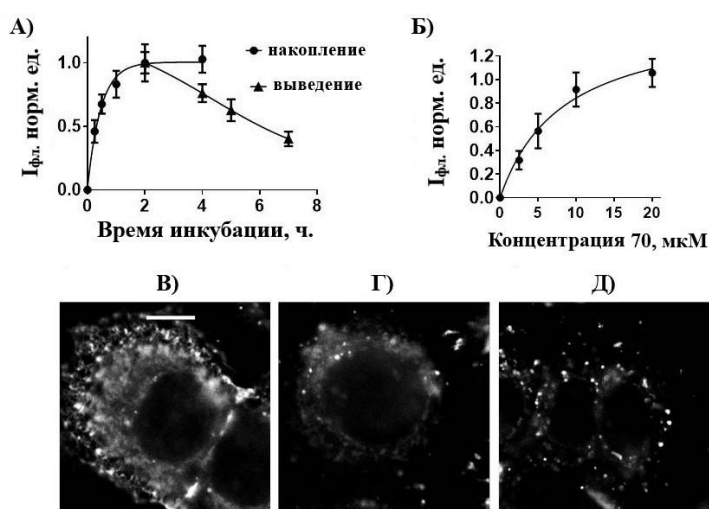
**Рис. 61.** Типичные распределения **70** (А) и LtrR (Б), флуоресцентного маркера лизосом, в клетках A549, полученные методом КЛСМ. (В) наложение изображений А и Б. Желтый цвет указывает на солокализацию **70** и LtrR. Овалами выделены характерные группы лизосом. (Г) изображение клеток в проходящем свете. Зеленым овалом выделена группа липидных капель, расположенных на периферии клетки и видимых как ярко-белые гранулы. (Д) Распределение интенсивности флуоресценции **70** и LtrR вдоль белой линии, проходящей через две везикулы (см. панели (А)–(В)). Близкое сходство обоих профилей интенсивности подтверждает солокализацию **70** и LtrR в этих везикулах. Метка масштаба соответствует 10 мкм. Клетки A549 инкубировали с **70** (5 мкм) и 50 нМ LtrR в полной среде в течение 1 ч.



**Рис. 62.** Типичные распределения ETRG (А) и **70** (Б), флуоресцентного маркера ETRG, в клетках A549, полученные методом КЛСМ. (В) наложение изображений А и Б, характеризующее отсутствие солокализации **70** и ETRG. (Г) Изображение клеток в проходящем свете. (Д) Распределение интенсивности флуоресценции **70** и ETRG вдоль белой линии, проходящей через две вытянутые структуры на периферии клетки (см. панели (А) – (В)). Отсутствие сходства в этих профилях интенсивности предполагает, что в этих структурах нет солокализации **70** и ETRG. Метка масштаба соответствует 10 мкм. Клетки A549 инкубировали с **70** (5 мкм) и 1 мкм ETRG в растворе Хенкс в течение 45 мин.

Для характеристики взаимодействия **70** с клетками была изучена кинетика клеточного поглощения и удержания **70**. Анализ кинетики клеточного поглощения **70** показал, что насыщение внутриклеточного накопления **70** наступало после 1 ч инкубации клеток A549 с красителем (рис. 63А). Время полунакопления составило  $19 \pm 3$  мин. Описанная выше картина внутриклеточного распределения формировалась в течение

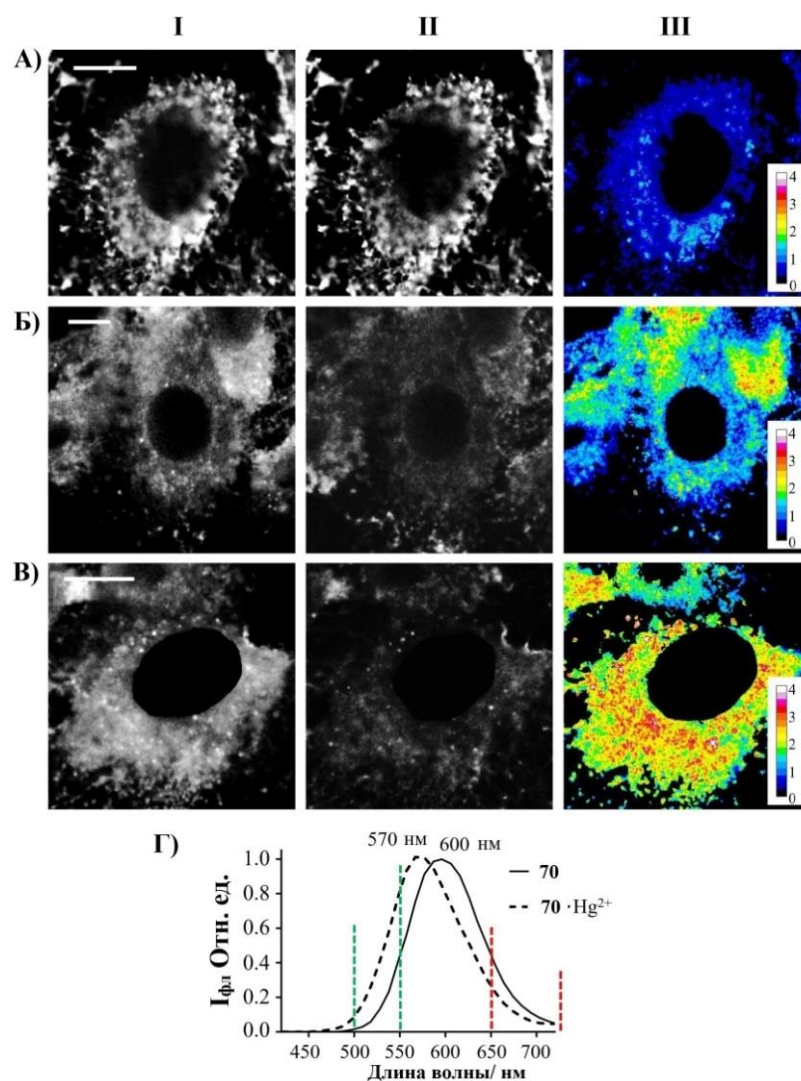
первых 10–15 мин воздействия **70** на клетки и количественно изменялась только при дальнейшем увеличении времени инкубации (рис. 63А, В). Концентрационная зависимость внутриклеточного накопления **70** имеет тенденцию к насыщению при концентрации **70** в среде выше 10 мкМ (рис. 63Б). 50%-ный уровень внутриклеточного накопления достигается при внеклеточной концентрации **70**  $5.0 \pm 1.5$  мкМ. Соединение **70** характеризуется длительным удерживанием в клетках А549 (рис. 63А), 50% отток **70** из клеток А549 происходит в течение  $4.0 \pm 0.2$  ч. Отток **70** характеризуется ускоренным снижением диффузного распределения **70** и длительным удерживанием **70** в лизосомах (рис. 63Г, Д).



**Рис. 63.** Кинетика накопления (А (●), В, Г), выведения (А (▲), 3-К) и концентрационная зависимость (Б, Д-Ж) **70** в клетках А549. (А, ●) Клетки инкубировали с **70** (5 мкМ) в течение различных временных интервалов и регистрировали с помощью ЛСКМ при одинаковых условиях измерений. (А, ▲) Клетки инкубировали с **70** (5 мкМ) в течение 2 ч, дважды промывали Хэнксом, помещали в свежую полную среду (без **70**) на разные периоды времени (0-5 ч) и регистрировали с помощью КЛСМ при одинаковых условиях измерений. (Б) концентрационная зависимость накопления **70** в клетках А549, которая была измерена с помощью КЛСМ после 0.5-часовой инкубации клеток с различными концентрациями **70**. (В) типичное КЛСМ изображение **70** в клетках А549 при 15 мин инкубации клеток с 5 мкМ **70**. (Г, Д) типичные КЛСМ изображения **70** в клетках А549 после 3 ч (Г) и 5 ч (Д) элиминации соединения из клеток. Предварительно клетки инкубировали с 5 мкМ **70** в течение 2 ч. Метка масштаба представляет 10 мкм.

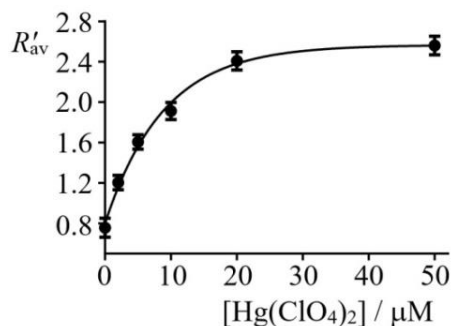
Внутриклеточные нормализованные спектры флуоресценции **70**, возбуждаемые при 405 нм, оказались схожими по форме и положению максимума ( $\lambda_{\text{max}}^{\text{fl}} = 600$  нм) в каждой точке цитоплазмы, включая лизосомы, вытянутые клеточные структуры и области диффузного распределения (рис. 64Г). Интересно отметить, что пик испускания нафталимидного хромофора при 450 нм в полученных спектрах отсутствовал. Это наблюдение можно объяснить предположением, что интенсивность флуоресценции фрагмента акцептора усиливается во внутриклеточной среде до такого уровня, при котором остаточное испускание ХД вряд ли может быть обнаружено. В клетках А549, предварительно инкубированных с  $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$ , положение спектров флуоресценции,

возбуждаемых при 405 нм, изменяется, что указывает на образование комплекса  $(70) \cdot \text{Hg}^{2+}$  (рис. 64Г). В присутствии ионов  $\text{Hg}^{2+}$  максимум флуоресценции смещается в синюю область на 30 нм ( $\lambda_{\text{max}}^{\text{fl}} = 570$  нм). Наблюдаемые различия в спектрах флуоресценции **70** и  $(70) \cdot \text{Hg}^{2+}$ , очевидно, связаны с гипсфлорирующим эффектом ХА при координации с катионом и могут быть использованы для ратиометрического флуоресцентного обнаружения  $\text{Hg}^{2+}$  в клетках. На основе интегральных интенсивностей флуоресценции **70** внутри клеток, измеренных одновременно в спектральных диапазонах 500–550 и 650–730 нм ( $I_{500-550}$  и  $I_{650-730}$  соответственно), получены изображения, описывающие внутриклеточное распределение отношения  $I_{500-550}/I_{650-730}$  ( $R'$ ) (рис. 64А–В).



**Рис. 64.** КЛМСМ -изображения образования комплексов  $(70) \cdot \text{Hg}^{2+}$ . Флуоресценцию возбуждали при длине волны 405 нм и измеряли в спектральных диапазонах 500–550 нм (столбец I) и 650–730 нм (столбец II). В столбце III показано отношение  $R'$  интенсивностей флуоресценции  $I_{500-550}/I_{650-730}$ , рассчитанное в каждой точке клетки в отсутствие ионов  $\text{Hg}^{2+}$  (А), при 10 (Б) или 50 мкМ (В)  $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$ . На шкале интенсивности показан цветовой код для значений соотношения  $R'$ . Клетки A549 предварительно инкубировали с  $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$  в течение 1 ч., дважды промывали раствором Хэнкса и инкубировали с 5 мкМ **70** в течение 1 ч. (Г) типичные нормализованные внутриклеточные спектры флуоресценции **70** (сплошная линия) и  $(70) \cdot \text{Hg}^{2+}$  (пунктирная линия). Прямоугольниками зеленого и красного цвета выделены выбранные диапазоны флуоресценции, в которых собирали сигнал.

Учитывая кинетические особенности взаимодействия **70** с клетками A549, клетки предварительно инкубировали с  $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$  (2 – 50 мкМ в течение 1 ч), дважды промывали раствором Хэнкса и инкубировали с 5 мкМ **70** в течение 1 ч. Рассчитанное и усредненное по выборке ( $n = 30$ ) клеток соотношение интенсивностей флуоресценции  $I_{500-550} / I_{650-730}$  ( $R'_{av}$ ) составило  $0.8 \pm 0.1$  в отсутствие ионов  $\text{Hg}^{2+}$  и  $2.6 \pm 0.1$  при насыщении связывания  $\text{Hg}^{2+}$  с **70**. В работе также получена и представлена зависимость среднего значения отношения  $R'_{av}$  в клетках A549 от концентрации  $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$  (рис. 65), которая показала, что при 20 мкМ  $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$  наблюдается внутриклеточное насыщение.

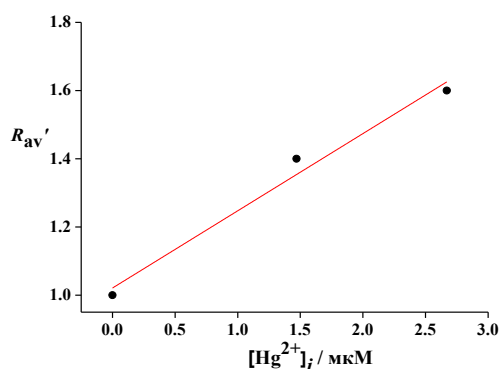


**Рис. 65.** Зависимость среднего значения отношения  $R'_{av}$  в клетках от концентрации  $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$ . Данные были усреднены по 20 клеткам в каждом измерении и представлены в виде среднего  $\pm$  стандартное отклонение.

Увеличение концентрации  $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$  во внеклеточной среде выше 20 мкМ не приводит к значительным изменениям отношения  $R'_{av}$ . Это означает, что верхний предел обнаружения  $\text{Hg}^{2+}$  внутри клеток с **70** соответствует присутствию приблизительно 20 мкМ ионов ртути (II) во внеклеточной среде. Средняя внутриклеточная концентрация  $\text{Hg}^{2+}$  может быть определена по формуле:

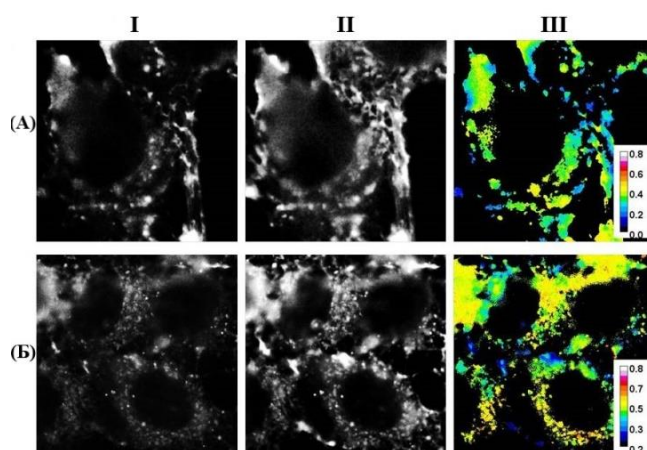
$$[\text{Hg}^{2+}]_{i,av} = K_d \cdot Q \cdot \frac{R'_{av} - R'_{av,min}}{R'_{av,max} - R'_{av}} \quad (10)$$

где  $K_d$  – константа диссоциации комплекса  $(\mathbf{70}) \cdot \text{Hg}^{2+}$ , (равная  $5.6 \pm 0.1$ , табл. 4);  $R'_{av,min}$  и  $R'_{av,max}$  средние значения  $R'_{av}$  для свободного **70** и комплекса  $(\mathbf{70}) \cdot \text{Hg}^{2+}$  в клетках A549, соответственно. Согласно рис. 66,  $R'_{av,min} = 1.00 \pm 0.05$  и  $R'_{av,max} = 2.56 \pm 0.09$ .  $Q$  – отношение интенсивности внутриклеточной флуоресценции свободного лиганда **70** к интенсивности комплекса  $(\mathbf{70}) \cdot \text{Hg}^{2+}$  в диапазоне 650 – 730 нм ( $Q = 1.66 \pm 0.05$ ). Таким образом, при внеклеточных концентрациях  $\text{Hg}^{2+}$  2, 5 и 10 мкМ значения  $[\text{Hg}^{2+}]_{i,av}$  составили 1.5, 2.7 и 6.0 мкМ соответственно. Зависимость  $R'_{av}$  от  $[\text{Hg}^{2+}]_{i,av}$  в диапазоне 0 – 2.7 мкМ продемонстрировала хорошую линейность с коэффициентом корреляции 0.99 (рис. 66). Из наклона этой линейной зависимости ( $r$ ) и стандартного отклонения отношения ( $s$ ) было установлено, что нижний предел обнаружения  $\text{Hg}^{2+}$  внутри клеток составляет 0.7 мкМ в соответствии с уравнением (10).



**Рис. 66.** График отношения  $R'_{av}$  для сенсора **70** в зависимости от увеличения внутриклеточной концентрации  $Hg(ClO_4)_2$ ,  $\lambda_{ex} = 405$  нм (точки соответствуют экспериментальным данным, кривые – линейной аппроксимации методом наименьших квадратов).

Для проверки селективности внутриклеточного ответа **70** на ионы  $Hg^{2+}$  клетки A549 преинкубировали с ионами  $Ni^{2+}$  или  $Pb^{2+}$  в диапазоне концентраций 2 – 1000 мкМ, после чего инкубировали с **70** (5 мкМ) (рис. 67).



**Рис. 67.** КЛСМ-изображения внутриклеточного взаимодействия **70** с  $Ni^{2+}$  (A) и  $Pb^{2+}$  (B). Изображения внутриклеточной флуоресценции **70** были измерены в диапазоне 500–550 нм (I) и в диапазоне 650–730 нм (II). (III) цветные изображения, показывающие отношение  $R'$  интенсивностей флуоресценции  $I_{500-550} / I_{650-730}$  при 1 мМ  $Ni(ClO_4)_2$  (A) или  $Pb(ClO_4)_2$  (B). Шкала интенсивности показывает цветовой код для значений  $R'$ . Клетки A549 были предварительно инкубированы с  $Cu(ClO_4)_2$  или  $Pb(ClO_4)_2$  (1 мМ) в течение 1 ч, дважды промыты раствором Хэнкса и инкубированы с **70** (5 мкМ) в течение 1 ч.

В исследуемом диапазоне концентраций  $Ni(ClO_4)_2$  и  $Pb(ClO_4)_2$  не наблюдалось изменений ни в спектрах внутриклеточной флуоресценции, ни в характерной картине внутриклеточного распределения **70**, ни в изменении интенсивности флуоресценции. Этот результат согласуется с неспособностью **70** образовывать комплексы с  $Ni^{2+}$  и  $Pb^{2+}$  в водном растворе, что позволяет сделать вывод о том, что хемосенсор **70** перспективен для селективного обнаружения ионов  $Hg^{2+}$  в живых клетках.

#### 4. Экспериментальная часть

Спектры ЯМР на ядрах  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  были зарегистрированы на спектрометрах Avance-300, Avance-400, Avance-500, Avance-600 фирмы Bruker. Использовали растворы образцов в дейтерированных хлороформе, дихлорметане, диметилсульфоксиде, ацетоне. Химические сдвиги ядер  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  определялись с точностью 0.01 м.д. относительно остаточных сигналов растворителей и пересчитывались к внутреннему стандарту (TMS). КССВ измерялись с точностью 0.1 Гц. Для отнесения сигналов в спектрах  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  ЯМР использовались двумерные методики HSQC, HMBC и  $^1\text{H}$  COSY с импульсными полевыми градиентами.

Масс-спектры электронного удара были записаны на приборе Finnigan Polaris Q (ионная ловушка). Энергия ионизирующих электронов 70 эВ. Образцы соединений в виде 1 масс. % раствора в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  или  $\text{CHCl}_3$  загружались в кварцевые микроампулы, которые вставлялись в обогреваемый наконечник штанги прямого ввода. Съемка термомассспектрограмм осуществлялась в процессе ступенчатого (через  $50^\circ\text{C}$ ) нагрева ампул от  $50$  до  $150^\circ\text{C}$ . Перед проведением нагрева образцов обычно снималась термомасс-спектрограмма пустой ампулы, подтверждающая отсутствие каких-либо загрязнений ампулы и штанги. Масс-спектры в условиях электрораспыления при атмосферном давлении (метод ИЭР) регистрировали в режиме полного сканирования масс положительных ионов на тандемном динамическом масс-спектрометре Finnigan LCQ Advantage (США), оборудованном масс-анализатором с октапольной ионной ловушкой, насосом MS Surveyor, автосамплером Surveyor, генератором азота Schmidlin-Lab (Германия) и системой сбора и обработки данных с использованием программы Xcalibur Version 1.3 фирмы Finnigan. Температура трансферного капилляра  $200^\circ\text{C}$ , напряжение поля между иглой и противоэлектродом 3 кВ. Образцы с концентрацией  $10^{-4}$ – $10^{-5}$  М в растворе ацетонитрила (Paneras, HPLC-gradient grade), дихлорметана или метанола вводили в ионный источник (прямой ввод) со скоростью потока 50 мкл/мин через инжектор Reodyne с петлей на 20 мкл. Когда анализируемое соединение содержало основные группы, в некоторых случаях в раствор добавляли эквивалентное количество хлорной кислоты. Масс-спектры с ионизацией электрораспылением (ИЭР) были также получены с использованием масс-спектрометра Shimadzu LCMS-2020 High Performance Liquid Chromatograph Mass Spectrometer с квадрупольным детектором, температурой линии десольватации/ термического блока  $250/400^\circ\text{C}$  и напряжением ионизации 4.5 кВ. Оптимальная скорость потока составляла 0.4 мл/мин. Для снятия спектров использовались растворы исследуемых соединений в метаноле, ацетонитриле и воде с концентрацией порядка  $10^{-5}$  М.

Электронные спектры поглощения измеряли на двухканальном спектрофотометре Cary-300 (фирма Agilent) и оптоволоконном спектрофотометре AvaSpec-2048 (Avantes), спектры флуоресценции – на спектрофлуориметрах FluoroLog-3 (Horiba Jobin Yvon) и Avantes AvaSpec-ULS2048L (Avantes). Наблюдаемая флуоресценция детектировалась под прямым углом относительно пучка возбуждения. Спектры флуоресценции, записанные на FluoroLog-3, были скорректированы по отношению к чувствительности измеряющего фотоэлектронного умножителя. Для снятия спектров поглощения и флуоресценции использовались спектроскопически чистые растворители фирм Aldrich и Acros. Элементный анализ был проведен на оборудовании лаборатории микроанализа ИХЭОС РАН. Температуры плавления определялись в капиллярах на приборе Mel-temp и не корректировались. Контроль над ходом реакции и индивидуальностью полученных соединений осуществлялся методом ТСХ на пластинках DC-Alufohlen Kieselgel 60 F254 (фирма Merck) и Sorbfil UV-254 (тип сорбента – силикагель СТХ-1ВЭ). Колоночная хроматография проводилась с использованием силикагеля Kieselgel 60 (размер частиц 40 – 60 мкм, Acros Organics) и нейтрального оксида алюминия (50 – 200 мкм, Acros Organics) в системах растворителей бензол – этанол, дихлорметан – метанол, петролейный эфир – этилацетат и др. Очистку соединений также производили на препаративном жидкостном флэшхроматографе низкого давления Isolera Prime (Biotage).

Квантово-химические расчеты были проведены в программном комплексе MOPAC 2012 и MOPAC 2016 с использованием полуэмпирического метода PM6 [238]. Конфигурационное взаимодействие включало 8 высших занятых и 8 низших вакантных молекулярных орбиталей. Итерационная процедура продолжалась до тех пор, пока разница в энергии молекулы для двух соседних итераций не стала превышать 0.01 ккал/ моль. Влияние природы растворителя учитывалось в соответствии с моделью COSMO (COnductorlike Screening Model), встроенной в MOPAC 2016. При расчетах принималось, что растворитель имеет диэлектрическую проницаемость  $\epsilon$  равную 40 и показатель преломления  $n$ , такой, что  $n^2 = 2$ . Применяемые в синтетической части работы растворители при необходимости очищались и абсолютизировались в соответствии со стандартными методиками. Дополнительная очистка исходных веществ для синтеза целевых соединений (коммерчески доступные реагенты фирм Aldrich, Acros и др.) не проводилась. Используемую в работе соль  $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$  высушивали в вакууме при 240°C до постоянной массы.  $\text{AgClO}_4$ ,  $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$ ,  $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$  использовались в виде кристаллогидратов.

Пригодные для РСА кристаллы были получены путем выпаривания при комнатной

температуре растворов соединений **22**, **23**, **25** в этаноле, смеси дихлорэтан – этанол (v/v = 1:5). Рентгенодифракционные исследования проводили на дифрактометрах SMART 1000 CCD и SMART APEX II CCD (MoK $\alpha$ -излучение, графитовый монохроматор,  $\omega$ -сканирование). Структуры расшифрованы прямым методом и уточнены методом наименьших квадратов в анизотропном полноматричном приближении по Fhk12

Для приготовления скелетного никелевого катализатора в стакане на 250 мл суспендировали 11.0 г сплава Ni–Al (массовая доля Ni – 50%) в 110 мл воды. В суспензию без внешнего охлаждения вносили твердый КОН с такой скоростью, чтобы не возникало чрезмерного вспенивания. Реакция протекала бурно и начиналась после короткого индукционного периода. Добавление КОН продолжали до тех пор, пока очередная его порция не переставала вызывать видимую реакцию (всего около 22 – 25 г). По окончании реакции реакционной массе давали постоять 10–15 мин, далее стакан помещали на 30 минут в водяную баню, нагретую до 70°C, после чего декантировали воду, промывали осадок три раза дистиллированной водой, затем три раза этиловым спиртом. Катализатор оставляли под слоем спирта.

Квантовые выходы флуоресценции определялись в насыщенных воздухом растворах при температуре  $20 \pm 1^\circ\text{C}$  по отношению к стандарту – кумарину 481 в ацетонитриле ( $\varphi^{\text{fluor}} = 0.08$ ) [239]. Для расчета квантовых выходов использовалась следующая формула (1) [218]:

$$\varphi^{\text{fluor}} = \varphi_{\text{R}}^{\text{fluor}} \cdot \frac{S \cdot (1 - 10^{-A_{\text{R}}}) \cdot n^2}{S_{\text{R}} \cdot (1 - 10^{-A}) \cdot n_{\text{R}}^2} \quad (1)$$

где  $\varphi^{\text{fluor}}$  и  $\varphi_{\text{R}}^{\text{fluor}}$  – квантовые выходы анализируемого раствора и стандарта соответственно,  $A$  и  $A_{\text{R}}$  – оптическая плотность анализируемого раствора и раствора стандарта соответственно,  $S$  и  $S_{\text{R}}$  – площадь под кривой спектра флуоресценции анализируемого раствора и раствора стандарта соответственно,  $n$  и  $n_{\text{R}}$  – показатели преломления растворителей исследуемого вещества и стандартного соединения.

Константы устойчивости образующихся комплексов определялись с помощью метода спектрофотометрического и спектрофлуориметрического титрования [240]. В кварцевой кювете ( $l = 1$  см) готовили раствор лиганда в выбранном растворителе с точно известной концентрацией ( $10^{-5}$ – $10^{-6}$  М) путем разбавления более концентрированного раствора и записывали спектр поглощения/ флуоресценции. В полученный раствор далее небольшими порциями (5–20 мкл) прибавлялся раствор соли металла в том же растворителе (также с известной концентрацией). После каждой добавки записывался спектр поглощения/ флуоресценции. Титрование считалось окончанным тогда, когда

спектр флуоресценции переставал меняться при добавлении очередной порции титранта. Полученный набор данных использовался для расчета констант устойчивости комплексов при помощи программы SPECFIT 32 Version 3.0.37. При расчете принимали во внимание возможность образования комплексов согласно уравнениям (2) и (3):



где символ  $L$  обозначает лиганд,  $M^{n+}$  – катион металла.

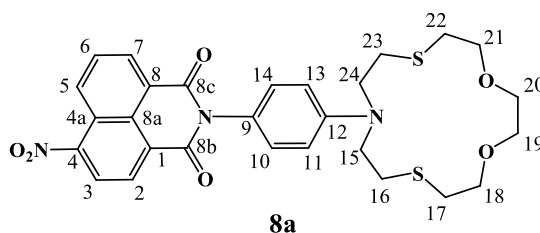
Биологические исследования получены в лаборатории оптической микроскопии и спектроскопии биомолекул ФГБУН ИБХ им. ак ММ. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН Ефременко А.В. и д.х.н. Феофановым А.В. Подробное описание экспериментов с клетками представлено в опубликованных работах [157 – 159; 161].

#### 4.1 Синтез соединений

##### Общая методика имидирования 4-замещенных 1,8-нафталевого ангидрида аминами

К суспензии 10.0 моль нафталевого ангидрида в 30 мл ледяной уксусной кислоты или этилового спирта прибавляют 1 – 2 экв (10.0 – 20.0 ммоль) соответствующего амина. Реакционную массу нагревают до кипения, выдерживают при кипении 6 ч, охлаждают до комнатной температуры. Выпавший осадок  $N$ -замещенного нафталимида отфильтровывают, промывают на фильтре 5%-й соляной кислотой, затем 10%-м раствором  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , водой и/или этиловым спиртом. Продукт высушивают при 80°C.

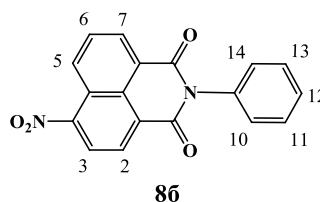
##### 2-(4-(1,4-Диокса-7,13-дитиа-10-азациклопентадекан-10-ил)фенил)-6-нитро-1Нбензо[d,e]изохинолин-1,3(2H)-дион (8a)



По общей методике имидирования 4-замещенных 1,8-нафталевого ангидрида аминами из 298 мг (1.226 ммоль) 4-нитронафталевого ангидрида **7**, 600 мг ариламина **14** (получен непосредственно перед синтезом, введен в реакцию без предварительной очистки) и 4 мл 80%-ной водной уксусной кислоты получено 528 мг (76%) 4-нитропроизводного **8a**. Промывка осадка, отфильтрованного из реакционной массы, осуществлялась этиловым спиртом. Т.пл. 259 – 262°C. Спектр  $^1\text{H}$  ЯМР (300.13 МГц, ДМСО- $d_6$ , 24°C,  $\delta$  / м.д.,  $J$  / Гц): 2.72 – 2.93 (м, 8H,  $\text{CH}_2(16)$ ,  $\text{CH}_2(17)$ ,  $\text{CH}_2(22)$ ,  $\text{CH}_2(23)$ ), 3.56 – 3.77 (м, 12H,  $\text{CH}_2(15)$ ,  $\text{CH}_2(18)$ ,  $\text{CH}_2(19)$ ,  $\text{CH}_2(20)$ ,  $\text{CH}_2(21)$ ,  $\text{CH}_2(24)$ ), 6.71 (д, 1H,

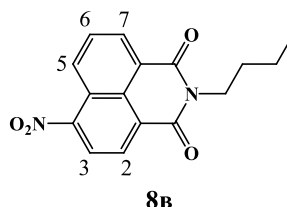
H(11), H(13),  $J = 8.9$ ), 7.15 (д, 1H, H(10), H(14),  $J = 8.9$ ), 8.12 (дд, 1H, H(6),  $J = 7.3$ ,  $J = 6.8$ ), 8.58 (д, 1H, H(3),  $J = 8.1$ ), 8.60 (д, 1H, H(2),  $J = 8.1$ ), 8.63 (д, 1H, H(7),  $J = 7.3$ ), 8.75 (д, 1H, H(5),  $J = 8.6$ ). Спектр  $^{13}\text{C}$  ЯМР (100.62 МГц, ДМСО- $d_6$ , 27°C,  $\delta$  / м.д.): 29.01 (2×CH<sub>2</sub>S), 30.58 (2×CH<sub>2</sub>S), 51.36 (2×CH<sub>2</sub>N), 70.04 (2×CH<sub>2</sub>O), 73.01 (2×CH<sub>2</sub>O), 111.30 (C(11), C(13)), 122.84 (C(4a)), 123.42 (C(9) или C(8)), 123.47 (C(8) или C(9)), 124.29 (C(3)), 127.40 (C(1)), 128.71 (C(5), C(8a)), 129.57 (C(2), C(10), C(14)), 130.14 (C(6)), 131.69 (C(7)), 146.53 (C(12)), 149.15 (C(4)), 162.73 (C(8b)), 163.53 (C(8c)). Масс-спектр (ИЭР), вычислено,  $m/z$ : 568.16; найдено: 568.04 ([M+H]<sup>+</sup>), 590.06 ([M+Na]<sup>+</sup>). Найдено (%): С, 59.32; Н, 5.19; N, 7.39. C<sub>28</sub>H<sub>29</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>S<sub>2</sub>. Вычислено (%): С, 59.24; Н, 5.15; N, 7.40.

**6-Нитро-2-фенил-1Н-бензо[d,e]изохинолин-1,3(2Н)-дион (4-нитро-N-фенил-1,8-нафталимид) (8б)**



По общей методике имидирования 4-замещенных 1,8-нафталевого ангидрида аминами из 6 г (0.025 моль) 4-нитронафталевого ангидрида **7**, 4.6 мл (0.05 моль) анилина и 75 мл ледяной уксусной кислоты было получено 7.5 мг (94%) 4-нитро-N-фенилнафталимида **8б**. Промывка осадка, отфильтрованного из реакционной массы, осуществлялась горячим 10%-ным раствором Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> и 5%-ным раствором HCl. Т.пл. 281 – 283°C (лит. [241]: Т.пл. 280 – 282°C). Спектр  $^1\text{H}$  ЯМР (300.13 МГц, ДМСО- $d_6$ , 21°C,  $\delta$  / м.д.,  $J$  / Гц): 7.38 – 7.45 (м, 2H, H(10), H(14)), 7.45 – 7.59 (м, 3H, H(11), H(12), H(13)), 8.13 (дд, 1H, H(6),  $J = 7.2$ ,  $J = 8.6$ ), 8.59 (д, 1H, H(3),  $J = 8.0$ ), 8.62 (д, 1H, H(2),  $J = 8.0$ ), 8.65 (д, 1H, H(7),  $J = 7.2$ ), 8.77 (д, 1H, H(5),  $J = 8.6$ ). Масс-спектр,  $m/z$  ( $I$ , %): 318 ([M]<sup>+</sup>) (76), 317 (100), 287 (25), 271 (42), 227 (21), 214 (8), 195 (9), 179 (11), 151 (9), 125 (9).

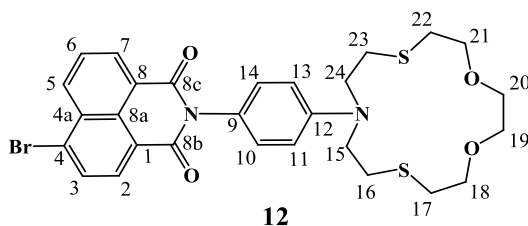
**2-Бутил-6-нитро-1Н-бензо[де]изохинолин-1,3(2Н)-дион (8в)**



По общей методике имидирования 4-замещенных 1,8-нафталевого ангидрида аминами из 300 мг (1.23 ммоль) 4-нитронафталевого ангидрида **7**, 122 мкл (1.23 ммоль) бутиламина и 10 мл этилового спирта было получено 340 мг (93%) 4-нитро-N-бутилнафталимида **8в**. Промывка осадка, отфильтрованного из реакционной массы,

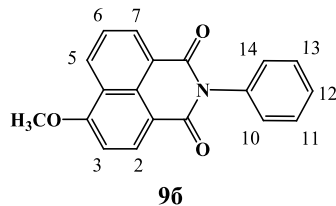
осуществлялась водой и этиловым спиртом. Т. пл. 104 – 102°C. Лит. [242]: т. пл. 104 – 106°C. Спектр  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц, ацетон- $d_6$ , 19.4°C,  $\delta$  / м. д.,  $J$  / Гц): 0.90 (т, 3H,  $\text{CH}_3$ ,  $J = 7.3$ ), 1.33 (д, 2H,  $\text{CH}_2$ ,  $J = 7.5$ ), 1.66–1.54 (м, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 4.05 – 3.97 (м, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 8.06 (дд, 1H, H(6),  $J = 8.75, 7.15$ ), 8.52 (д, 1H, H(3),  $J = 8.1$ ), 8.63 – 8.54 (м, 2H, H(2), H(7)), 8.7 (д, 1H, H(5),  $J = 8.6$ ).

***N*-2-(4-(1,4-Диокса-7,13-дитиа-10-азабициклопентадекан-10-ил)фенил)-6-бром-1*H*-бензо[*d,e*]изохинолин-1,3(2*H*)-дион (**12**)**



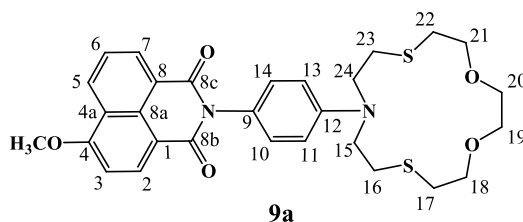
По общей методике имидирования 4-замещенных 1,8-нафталевого ангидрида аминами из 150 мг (0.542 ммоль) 4-бромнафталевого ангидрида **11**, 65 мг (приблизительно 0.19 ммоль) ариламина **14** (получен непосредственно перед синтезом, введен в реакцию без предварительной очистки) и 3 мл 80%-ной водной уксусной кислоты получено 75 мг (66%) 4-бромпроизводного **12**. Промывка осадка, отфильтрованного из реакционной массы, осуществлялась водой и этиловым спиртом. Осадок очищали колоночной хроматографией на  $\text{SiO}_2$ , используя в качестве элюента градиентную смесь PhH – MeOH. Т.пл. 237 – 238°C. Спектр  $^1\text{H}$  ЯМР (400.13 МГц, ДМСО- $d_6$ , 26°C,  $\delta$  / м.д.,  $J$  / Гц): 2.71 – 2.80 (м, 4H,  $\text{CH}_2(17)$ ,  $\text{CH}_2(22)$ ), 2.82 – 2.91 (м, 4H,  $\text{CH}_2(16)$ ,  $\text{CH}_2(23)$ ), 3.55 – 3.67 (м, 8H,  $\text{CH}_2(18)$ ,  $\text{CH}_2(19)$ ,  $\text{CH}_2(20)$ ,  $\text{CH}_2(21)$ ), 3.69 – 3.75 (м, 4H,  $\text{CH}_2(15)$ ,  $\text{CH}_2(24)$ ), 6.7 (д, 2H, H(11), H(13),  $J = 8.8$ ), 7.13 (д, 2H, H(10), H(14),  $J = 8.8$ ), 7.99 – 8.07 (м, 1H, H(6)), 8.25 (д, 1H, H(3),  $J = 7.8$ ), 8.34 (д, 1H, H(2),  $J = 7.8$ ), 8.55 – 8.63 (м, 2H, H(5), H(7)). Спектр  $^{13}\text{C}$  ЯМР (150.93 МГц, ДМСО- $d_6$ , 22°C,  $\delta$  / м.д.): 24.11 ( $\text{CH}_3\text{CO}$ ), 29.03 ( $2 \times \text{CH}_2\text{S}$ ), 30.58 ( $2 \times \text{CH}_2\text{S}$ ), 51.38 ( $2 \times \text{CH}_2\text{N}$ ), 70.05 ( $2 \times \text{CH}_2\text{O}$ ), 73.01 ( $2 \times \text{CH}_2\text{O}$ ), 111.83 (C(11), C(13)), 123.06 (C(1)), 123.8 (C(8)), 129.23 (C(6)), 129.33 (C(4)), 129.66 (C(8a)), 130.4 (C(4a)), 130.18 (C(10), C(14)), 131.47 (C(2)), 131.86 (C(3)), 132.08 (C(7)), 133.24 (C(5)), 136.25 (C(9)), 163.73 (C(8b)), 163.79 (C(8c)). Масс-спектр,  $m/z$  ( $I$ , %): 602 (13) ( $[\text{M}+2]^+$ ), 600 (17) ( $[\text{M}]^+$ ), 439 (60), 426 (19), 407(26), 395 (31), 393 (44), 380 (49), 379 (84), 204 (100). Найдено (%): C, 55.97; H, 5.07; N, 4.79.  $\text{C}_{28}\text{H}_{29}\text{BrN}_2\text{O}_4\text{S}_2 \cdot 0.5\text{H}_2\text{O}$ . Вычислено (%): C, 55.81; H, 5.02; N, 4.66.

### 6-Метокси-2-фенил-1Н-бензо[de]изохинолин-1,3(2Н)-дион (9б)



Смесь метанола (3 мл), 4-нитро-*N*-фенилнафталимида **8б** (100 мг, 0.314 ммоль) и гидроксида калия (80 мг, 1.429 ммоль) выдерживают при кипячении в течение 6 ч. Реакционную массу разбавляют 6 мл воды, избыток щелочи нейтрализуют уксусной кислотой. Образовавшийся осадок отфильтровывают, промывают водой, высушивают на воздухе. Выход 89 мг (94%). Т.пл. 234 – 238°C (лит. [243]: Т.пл. 235 – 239°C). Спектр <sup>1</sup>Н ЯМР (400 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>, 19.4 °С, δ / м. д., J / Гц): δ: 4.15 (с, 3Н, OCH<sub>3</sub>), 7.32 – 7.40 (м, 3Н, Н(10), Н(14), Н(3)), 7.41 – 7.56 (м, 3Н, Н(12), Н(11), Н(13)), 7.85 (дд, 1Н, Н(6), J = 7.3, J = 8.6), 8.44 – 8.54 (м, 2Н, Н(2), Н(7)), 8.60 (д, 1Н, Н(5), J = 8.4).

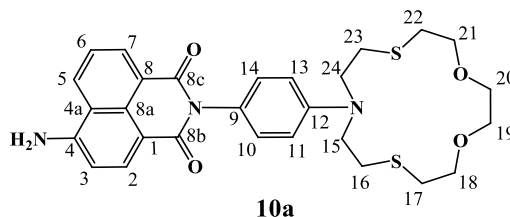
### 6-Метокси-2-(2,3,5,6,8,9,11,12-октагидробензо[*b*][1,4,10,7,13]триоксадитиациклопентадецин-15-ил)-1Н-бензо[*d,e*]изохинолин-1,3(2Н)-дион (9а)



Смесь гидроксида калия (85 мг, 1.518 ммоль), 4-нитропроизводного **8а** (100 мг, 0.176 ммоль) и метанола (3 мл) выдерживают при кипячении в течение 20 ч. в токе аргона. В охлажденную до комнатной температуры реакционную массу добавляют 86 мкл ледяной уксусной кислоты (для нейтрализации избытка КОН), растворитель упаривают в вакууме. К полученному остатку добавляют 2 мл воды. Образовавшийся осадок отфильтровывают, промывают на фильтре дистиллированной водой, после чего высушивают на воздухе. Осадок очищают флэш-хроматографией на SiO<sub>2</sub>, используя в качестве элюента градиентную смесь петролейный эфир – этилацетат. Выход 81 мг (84%). Т.пл. 233 – 235°C. Спектр <sup>1</sup>Н ЯМР (400.13 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>, 20°C, δ / м. д., J / Гц): 2.70 – 2.93 (м, 8Н, CH<sub>2</sub>(16), CH<sub>2</sub>(17), CH<sub>2</sub>(22), CH<sub>2</sub>(23)), 3.53 – 3.78 (м, 12Н, CH<sub>2</sub>(15), CH<sub>2</sub>(18), CH<sub>2</sub>(19), CH<sub>2</sub>(20), CH<sub>2</sub>(21), CH<sub>2</sub>(24)), 4.15 (с, 3Н, OMe), 6.68 (д, 2Н, Н(11), Н(13), J = 8.9), 7.10 (д, 2Н, Н(10), Н(14), J = 8.9), 7.36 (д, 1Н, Н(3), J = 8.3), 7.79 – 7.90 (м, 1Н, Н(6)), 8.47 (д, 1Н, Н(2), J = 8.3), 8.50 (д, 1Н, Н(7), 3J = 7.0), 8.59 (д, 1Н, Н(5), J = 8.5). Спектр <sup>13</sup>С ЯМР (125.76 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>, 25°C, δ / м. д.): 29.07 (2×CH<sub>2</sub>S), 30.62 (2×CH<sub>2</sub>S), 51.42 (2×CH<sub>2</sub>N), 56.72 (OCH<sub>3</sub>), 70.08 (2×CH<sub>2</sub>O), 73.04 (2×CH<sub>2</sub>O), 106.35 (C(3)), 111.32 (C(11), C(13)), 114.91

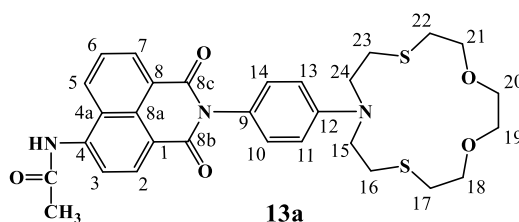
(C(1)), 122.63 (C(4a)), 122.96 (C(8)), 124.13 (C(9)), 126.52 (C(6)), 129.04 (C(5)), 129.78 (C(10), C(14)), 131.19 (C(8a)), 133.39 (C(7)), 136.70 (C(2)), 146.34 (C(12)), 160.39 (C(4)), 163.60 (C(8b)), 164.23 (C(8c)). Масс-спектр (ИЭР), вычислено, 292  $m/z$ : 661.09; найдено: 661.13 ( $[M+Ag]^+$ ). Найдено (%): C, 62.94; H, 5.79; N, 5.09.  $C_{29}H_{32}N_2O_5S_2$ . Вычислено (%): C, 63.02; H, 5.84; N, 5.07.

**2-(4-(1,4-Диокса-7,13-дитиа-10-азациклопентадекан-10-ил)фенил)-6-амино-1Нбензо[d,e]изохинолин-1,3(2H)-дион (10a)**



К раствору 200 мг (0.353 ммоль) 4- нитропроизводного нафталимида **8a** в 13 мл 1,4-диоксана, нагретому до 90°C, прибавляют 1.5 мл 100%-ного гидразин-гидрата. В полученный раствор при интенсивном перемешивании порциями в течение 30 мин вносят скелетный никелевый катализатор, приготовленный из 150 мг сплава никеля с алюминием (50 масс. % Ni). Реакционную массу выдерживают при 90°C в течение 1.5 ч, после чего катализатор отфильтровывают, фильтрат упаривают в вакууме. Осадок очищают флэш-хроматографией на  $SiO_2$ , используя в качестве элюента градиентную смесь PhH – EtOH. Полученный продукт перекристаллизовывают из 2 мл этанола. Выход 69 мг (37%). Т.пл. 279°C с разл. Спектр  $^1H$  ЯМР (300.13 МГц, ДМСО- $d_6$ , 24°C,  $\delta$  / м.д.,  $J$  / Гц): 2.68 – 2.94 (м, 8H,  $CH_2(16)$ ,  $CH_2(17)$ ,  $CH_2(22)$ ,  $CH_2(23)$ ), 3.52 – 3.79 (м, 12H,  $CH_2(15)$ ,  $CH_2(18)$ ,  $CH_2(19)$ ,  $CH_2(20)$ ,  $CH_2(21)$ ,  $CH_2(24)$ ), 6.67 (д, 1H, H(11), H(13),  $J = 8.7$ ), 6.86 (д, 1H, H(3),  $J = 8.3$ ), 7.04 (д, 1H, H(10), H(14),  $J = 8.7$ ), 7.44 (уш. с, 2H,  $NH_2$ ), 7.61 – 7.72 (м, 1H, H(6)), 8.18 (д, 1H, H(2),  $J = 8.3$ ), 8.41 (д, 1H, H(7),  $J = 7.3$ ), 8.64 (д, 1H, H(5),  $J = 8.5$ ). Спектр  $^{13}C$  ЯМР (100.61 МГц, ДМСО- $d_6$ , 27°C,  $\delta$  / м.д.): 29.03 ( $2 \times CH_2S$ ), 30.56 ( $2 \times CH_2S$ ), 51.38 ( $2 \times CH_2N$ ), 70.05 ( $2 \times CH_2O$ ), 73.04 ( $2 \times CH_2O$ ), 108.02 (C(1)), 108.18 (C(3)), 111.24 (C(11), C(13)), 119.49 (C(4a)), 122.39 (C(8)), 124.02 (C(6)), 124.62 (C(9)), 129.36 (C(5)), 129.81 (C(10), C(14)), 130.09 (C(8a)), 131.10 (C(7)), 133.99 (C(2)), 146.09 (C(12)), 152.69 (C(4)), 163.51 (C(8b)), 164.36 (C(8c)). Масс-спектр (ИЭР), вычислено,  $m/z$ : 538.18; найдено: 538.08 ( $[M+H]^+$ ), 560.09 ( $[M+Na]^+$ ). Найдено (%): C, 62.61; H, 5.83; N, 7.76.  $C_{28}H_{31}N_3O_4S_2$ . Вычислено (%): C, 62.54; H, 5.81; N, 7.81.

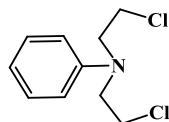
***N*-(2-(4-(1,4-Диокса-7,13-дитиа-10-азациклопентадекан-10-ил)фенил)-1,3-диоксо-2,3-дигидро-1*H*-бензо[*d,e*]изохинолин-6-ил)ацетамид (13a)**



*Метод 1.* К перемешиваемой при комнатной температуре суспензии 30 мг (0.056 ммоль) 4-аминопроизводного **10a** в 0.4 мл безводного пиридина прибавляют 0.1 мл раствора ацетилхлорида в ДМФА, полученного смешением 1 мл ДМФА и 0.1 мл AcCl. Через некоторое время после прибавления ацетилхлорида осадок аминопроизводного растворяется с образованием прозрачного раствора. Перемешивание при комнатной температуре продолжают в течение 2 ч. По окончании выдержки реакционную массу разбавляют 1 мл этанола и оставляют на несколько часов в холодильнике. Выпавший осадок отфильтровывают и очищают колоночной хроматографией на SiO<sub>2</sub>, используя в качестве элюента градиентную смесь PhH – EtOH. Выход 19 мг (60%).

*Метод 2.* Смесь бромпроизводного **12** (35 мг, 0.058 ммоль), ацетамида (4 мг, 0.068 ммоль), Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 27 мг (0.083 ммоль), палладиевого катализатора КсантФос-Pd-G3 (1 мг) и 1,4-диоксана (2 мл) нагревали при 90°C в течение 10 ч. в атмосфере аргона. По завершении выдержки в реакционную массу было добавляють 5 мл воды, образовавшийся осадок отфильтровывают, промывают водой и перекристаллизовывают из этанола. Выход 12 мг (35%). Т.пл. 244 – 246°C (*Метод 1*); 252 – 253°C (*Метод 2*). Спектр <sup>1</sup>H ЯМР (300.13 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>, 21°C, δ / м.д., *J* / Гц): 2.30 (с, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.68 – 2.94 (м, 8H, CH<sub>2</sub>(16), CH<sub>2</sub>(17), CH<sub>2</sub>(22), CH<sub>2</sub>(23)), 3.54 – 3.78 (м, 12H, CH<sub>2</sub>(15), CH<sub>2</sub>(18), CH<sub>2</sub>(19), CH<sub>2</sub>(20), CH<sub>2</sub>(21), CH<sub>2</sub>(24)), 6.69 (д, 1H, H(11), H(13), *J* = 8.7), 7.11 (д, 2H, H(10), H(14), *J* = 8.7), 7.85 – 7.96 (м, 1H, H(6)), 8.32 (д, 1H, H(3), *J* = 8.3), 8.47 (д, 1H, H(2), *J* = 8.3), 8.52 (д, 1H, H(7), *J* = 7.3), 8.74 (д, 1H, H(5), *J* = 8.5), 10.43 (уш. с, 1H, NHCO). Спектр <sup>13</sup>C ЯМР (150.93 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>, 22°C, δ / м.д.): 24.11 (CH<sub>3</sub>CO), 29.03 (2×CH<sub>2</sub>S), 30.58 (2×CH<sub>2</sub>S), 51.38 (2×CH<sub>2</sub>N), 70.05 (2×CH<sub>2</sub>O), 73.01 (2×CH<sub>2</sub>O), 111.28 (C(11), C(13)), 118.12 (C(1)), 119.45 (C(3)), 122.96 (C(8)), 123.98 (C(9)), 124.17 (C(4a)), 126.42 (C(6)), 128.73 (C(8a)), 129.26 (C(5)), 129.72 (C(10), C(14)), 130.90 (C(7)), 131.63 (C(2)), 140.29 (C(4)), 146.34 (C(12)), 163.52 (C(8b)), 164.08 (C(8c)), 169.64 (CH<sub>3</sub>CO). Масс-спектр (ИЭР), вычислено, *m/z*: 580.19; найдено: 580.13 ([M+H]<sup>+</sup>) (*Метод 1*). Найдено (%): C, 62.21; H, 5.78; N, 7.16. C<sub>30</sub>H<sub>33</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>S<sub>2</sub>. Вычислено (%): C, 62.15; H, 5.74; N, 7.25 (*Метод 1*).

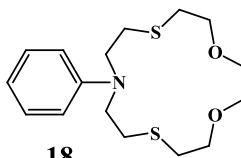
### ***N,N*-Бис(2-хлорэтил)анилин (17)**



**17**

К  $\text{POCl}_3$  (3.23 г, 0.021 моль) прибавляют порциями *N*-фенилдиэтаноламин (**16**) (4.2 г, 0.023 моль) при 5°C. Смесь нагревают 1 ч при 100°C, охлаждают до комнатной температуры и выливают в 14 мл бензола. Полученный раствор выливают в 21 г льда. Органическую фазу отделяют, продукты реакции экстрагируют бензолом из водной фазы. Экстракты объединяют, сушат над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , растворитель упаривают, остаток перекристаллизовывают из MeOH. Выход соединения **17** составил 3.83 г (77%). Т.пл. 44 – 45°C (лит. [244]: Т.пл. 41 – 45°C). Спектр  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{DMSO-}d_6$ , 19.4°C,  $\delta$  / м. д.,  $J$  / Гц):  $\delta$  = 3.71 (с, 8H, 4 $\times$ CH<sub>2</sub>), 6.63 – 7.15 (м, 3H, ArH), 7.15 – 7.26 (м, 2H, ArH).

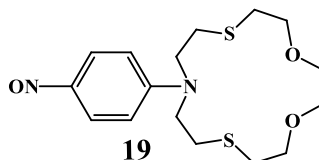
### **10-Фенил-1,4-диокса-7,13-дитиа-10-азациклопентадекан (18)**



**18**

К кипящему раствору, содержащему  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  (8.7 г, 0.027 моль), EtOH (280 мл) и  $\text{H}_2\text{O}$  (280 мл) в течение 1 ч одновременно прибавляют растворы дитиола (1.1 г, 0.006 моль) и соединения **16** (1.31 г, 0.006 моль) в EtOH (50 мл). Реакционную смесь перемешивают при 60°C в течение 20 ч, растворитель упаривают, к остатку прибавляют 30 мл воды. Продукт реакции экстрагируют бензолом. После удаления растворителя сырой продукт очищают колоночной хроматографией на  $\text{SiO}_2$ , используя в качестве элюента градиентную смесь петролейного эфира – этилацетата. Выход соединения **18** 1.4 г (49%), Т.пл. 85 – 86°C. Спектр  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{DMSO-}d_6$ , 19.4°C,  $\delta$  / м. д.,  $J$  / Гц):  $\delta$  = 2.69 – 2.83 (м, 8H, 4 $\times$ CH<sub>2</sub>), 3.50 – 3.61 (м, 4H, 2 $\times$ CH<sub>2</sub>), 3.50 – 3.61 (м, 8H, 4 $\times$ CH<sub>2</sub>), 6.53 – 6.64 (м, 3H, ArH), 7.10 – 7.21 (м, 2H, ArH).

### **10-(4-Нитрозофенил)-1,4-диокса-7,13-дитиа-10-азациклопентадекан (19)**

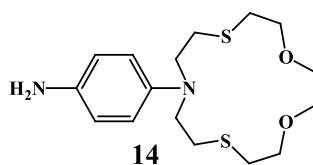


**19**

К охлажденному в бане со льдом раствору (1.22 г, 3.7 ммоль) *N*-фенилзамещенного азакраун-эфира (**18**) в смеси 1.1 мл концентрированной соляной кислоты ( $\rho = 1.18 \text{ г/см}^3$ ) и 2.8 мл воды при перемешивании в течение 1 ч. Прикапывают раствор (0.28 г, 3.7 ммоль) нитрита натрия, следя за тем, чтобы температура не поднималась выше 0–5°C. После того

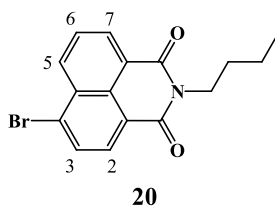
как был прибавлен весь раствор  $\text{NaNO}_2$ , перемешивание продолжают при заданной температуре еще 1 ч. Далее для выделения свободного основания нитрозосоединения в реакционную массу добавляют раствор 0.52 г  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  в 6.2 мл воды при энергичном перемешивании. Выпавший темно-зеленый осадок экстрагируют хлористым метиленом, экстракт промывали водой. После удаления дихлорметана, сырой продукт очищали колоночной хроматографией на  $\text{SiO}_2$ , используя в качестве элюента градиентную смесь  $\text{CH}_2\text{Cl}_2 - \text{MeOH}$ . Выход соединения **19** 1.04 г (78%), Т.пл 117 – 118 °С. Спектр  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{DMCO-}d_6$ , 19.4°C,  $\delta / \text{м. д.}, J / \text{Гц}$ ):  $\delta = 2.69 - 2.80$  (м, 4Н,  $2 \times \text{CH}_2$ ), 2.82 – 2.93 (м, 4Н,  $2 \times \text{CH}_2$ ), 3.58 (с, 4Н,  $2 \times \text{CH}_2$ ), 3.63 – 3.73 (м, 4Н,  $2 \times \text{CH}_2$ ), 3.74 – 3.86 (м, 4Н,  $2 \times \text{CH}_2$ ), 6.82 (д, 2Н, ArH,  $^3J = 7.4$ ), 8.05 (уш. с, 2Н, ArH). Спектр  $^{13}\text{C}$  ЯМР (150.93 МГц,  $\text{DMCO-}d_6$ , 21°C,  $\delta / \text{м. д.}$ ): 29.15, 31.07, 51.80, 69.94, 72.79, 110.88, 153.36, 162.81. Масс-спектр (ИЭР), вычислено,  $m/z$ : 357.13; найдено: 357.14 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ).

#### 4-(1,4-Диокса-7,13-дитиа-10-азациклопентадекан-10-ил)анилин (**14**)



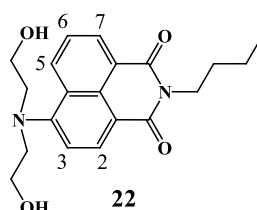
К нагретому до кипения раствору (1.1 г, 3.1 ммоль) нитрозосоединения **19** в 14 мл этанола добавляют 1.63 мл 100%-го гидразин-гидрата, после чего порциями при перемешивании вносят скелетный никелевый катализатор, приготовленный из 1.16 г сплава никеля с алюминием (массовая доля Ni 50%). После добавления всего катализатора реакционную массу выдерживают при кипении 1 ч, катализатор отфильтровывают, фильтрат упаривают в вакууме. Образующийся после отгонки растворителя маслообразный остаток представляет собой загрязненный примесями целевой продукт реакции, который без предварительной очистки используется на последующей стадии взаимодействия с ангидридами **7** и **11**. Спектр  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{DMCO-}d_6$ , 19.4°C,  $\delta / \text{м. д.}, J / \text{Гц}$ ):  $\delta = 2.70 - 2.79$  (м, 4Н,  $2 \times \text{CH}_2$ ), 2.81 – 2.91 (м, 4Н,  $2 \times \text{CH}_2$ ), 3.45 – 3.56 (м, 4Н,  $2 \times \text{CH}_2$ ), 3.63 (с, 4Н,  $2 \times \text{CH}_2$ ), 3.75 – 3.83 (м, 4Н,  $2 \times \text{CH}_2$ ), 6.55 (д, 2Н, ArH,  $J = 8.9$ ), 6.64 (д, 2Н, ArH,  $J = 8.9$ ).

#### 6-Бром-2-бутил-1Н-бензо[de]изохинолин-1,3(2Н)-дион (**20**)



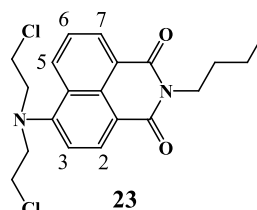
По общей методике имидирования 4-замещенных 1,8-нафталевого ангидрида аминами из 500 мг (1.8 ммоль) 4-бромнафталевого ангидрида **11**, 228 мкл (2.3 ммоль) бутиламина и 35 мл этилового спирта было получено 534 мг (89%) 4-бром-*N*-бутилнафталимида **20**. Промывка осадка, отфильтрованного из реакционной массы, осуществлялась этиловым спиртом. Т. пл. 100 – 102°C. Лит. [245]: т. пл. 101 – 102°C. Спектр <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>, 19.4°C, δ / м. д., *J* / Гц): 0.94 (т, 3H, CH<sub>3</sub>, *J* = 8.4), 1.29 – 1.40 (м, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.56 – 1.65 (м, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.03 (т, 2H, CH<sub>2</sub>, *J* = 8.4), 8.00 (дд, 1H, H(6), *J* = 7.3, *J* = 8.5), 8.21 (д, 1H, H(3), *J* = 8.1), 8.32 (д, 1H, H(2), *J* = 8.1), 8.52 – 8.59 (м, 2H, H(7), H(5)). Масс-спектр (ИЭР), вычислено, *m/z*: 331.02; найдено: 331.07 ([M]<sup>+</sup>).

#### 6-(Бис(2-гидроксиэтил)амино)-2-бутил-1H-бензо[де]изохинолин-1,3(2H)-дион (**22**)



В атмосфере аргона к раствору бромпроизводного **20** (412 мг, 1.24 ммоль) в 7 мл 2-метоксиэтанола добавляют диэтиламин (2607 мг, 24.82 ммоль) и кипятят в течение 12 ч. Реакционную массу разбавляют водой, экстрагируют этилацетатом. Растворитель упаривают, остаток очищают флэш-хроматографией на SiO<sub>2</sub>, используя в качестве элюента этилацетат. Выход 208 мг (44%). Спектр <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 19.4°C, δ / м. д., *J* / Гц): 0.96 (т, 3H, CH<sub>3</sub>, *J* = 8.0), 1.35 – 1.47 (м, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.62 – 1.73 (м, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.52 (уш. с, 2H, 2×OH), 3.55 – 3.64 (м, 4H, 2×CH<sub>2</sub>), 3.75 – 3.86 (м, 4H, 2×CH<sub>2</sub>), 4.03 (т, 2H, CH<sub>2</sub>, *J* = 5.0), 7.38 (д, 1H, H(3), *J* = 8.1), 7.63 – 7.72 (м, 1H, H(6)), 8.43 (д, 1H, H(2), *J* = 8.1), 8.50 (д, 1H, H(7), *J* = 7.3), 8.87 (д, 1H, H(5), *J* = 8.9)).

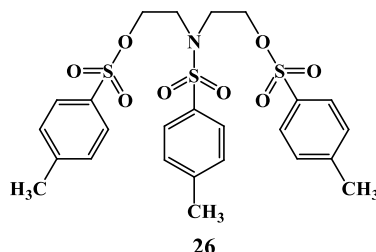
#### 6-(Бис(2-хлорэтил)амино)-2-бутил-1H-бензо[де]изохинолин-1,3(2H)-дион (**23**)



К POCl<sub>3</sub> (2.5 мл) прибавляют порциями производное **22** (100 мг, 0.28 ммоль) при 5°C. Далее смесь кипятят в течение 6 ч, охлаждают до комнатной температуры и выливают на лед. Органическую фазу отделяют, продукты реакции экстрагируют этилацетатом из водной фазы. Экстракты объединяют, сушат над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, растворитель упаривают, остаток очищают флэш-хроматографией на SiO<sub>2</sub>, используя в качестве элюента градиентную смесь петролейный эфир – этилацетат. Выход 97 мг (88%). Спектр

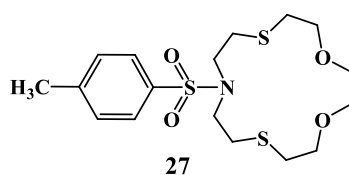
$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ , 19.4°C,  $\delta$  / м. д.,  $J$  / Гц): 0.96 (т, 3H,  $\text{CH}_3$ ,  $J = 7.5$ ), 1.35 – 1.49 (м, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 1.60 – 1.74 (м, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3.62 (т, 4H,  $2 \times \text{CH}_2$ ,  $J = 3.6$ ), 3.80 (т, 4H,  $2 \times \text{CH}_2$ ,  $J = 3.8$ ), 4.13 (т, 2H,  $\text{CH}_2$ ,  $J = 4.1$ ), 7.46 (д, 1H, H(3),  $J = 7.5$ ), 7.70 – 7.79 (м, 1H, H(6)), 8.49 (д, 1H, H(2),  $J = 7.5$ ), 8.53 – 8.62 (м, 1H, H(7), H(5)).

**2,2'-(Тозилазандиил)бис(этан-2,1-диил)бис(4-метилбензолсульфонат) (26)**



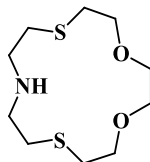
Диэтиламин (3.3 мл, 0.343 моль) растворяют в сухом триэтилаmine (96 мл) при 0°C, добавляя небольшими порциями *n*-толуолсульфохлорид (19.65 г, 0.103 моль) так, чтобы температура не поднималась выше 5°C. Смесь осторожно нагревают до комнатной температуры и перемешивают еще 1 ч. Реакционную массу растворяют в хлороформе, промывают водой. Органический слой упаривают на 2/3, разбавляют этанолом. Выпавший осадок отфильтровывают. Выход 11.54 г (66%). Т. пл. 85 – 86°C. Лит. [246]: т. пл. 84 – 85°C. Спектр  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{DMCO}-d_6$ , 19.4°C,  $\delta$  / м. д.,  $J$  / Гц): 2.38 (с, 1H,  $\text{CH}_3$ ), 2.43 (с, 6H,  $\text{CH}_3$ ), 3.28 (т, 4H,  $\text{CH}_2\text{N}$ ,  $J = 3.3$ ), 3.99 (т, 4H,  $\text{CH}_2\text{O}$ ,  $J = 3.9$ ), 7.36 (д, 2H, ArH,  $J = 7.8$ ), 7.48 (д, 4H, ArH,  $J = 8.1$ ), 7.52 (д, 2H, ArH,  $J = 7.8$ ), 7.73 (д, 4H, ArH,  $J = 8.1$ , ArH).

**10-Тозил-1,4-диокса-7,13-дитиа-10-азациклопентадекан (27)**



Тритозилат (2.5 г, 4.39 ммоль) и 1,8-димеркапто-3,6-диоксаоктан (0.78 мл, 4.39 ммоль) растворяют в 110 мл ацетонитрила. Полученную смесь по каплям добавляют к кипящему раствору  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  (6.65 г, 20.4 ммоль) в 660 мл смеси этанола и воды (1:1), после чего кипятят в течение 40 ч. Основную часть растворителей упаривают, оставшуюся реакционную смесь с белым осадком экстрагируют бензолом, промывают водой и сушат над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . После упаривания растворителя осадок перекристаллизовывают из смеси гексана – этилацетат. Выход 930 мг (52%). Т. пл. 97 – 98°C. Лит. [246]: т. пл. 96 – 98°C. Спектр  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{DMCO}-d_6$ , 19.4°C,  $\delta$  / м. д.,  $J$  / Гц): 2.40 (с, 1H,  $\text{CH}_3$ ), 2.62 – 2.71 (м, 4H,  $2 \times \text{CH}_2$ ), 2.79 – 2.88 (м, 4H,  $2 \times \text{CH}_2$ ), 3.15 – 3.30 (м, 4H,  $2 \times \text{CH}_2$ ), 3.51 (с, 4H,  $2 \times \text{CH}_2\text{O}$ ), 3.59 – 3.68 (м, 4H,  $2 \times \text{CH}_2\text{O}$ ), 7.42 (д, 2H, ArH,  $J = 7.8$ ), 7.9 (д, 2H, ArH,  $J = 7.9$ ).

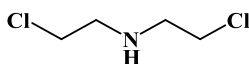
### 1,4-Диокса-7,13-дитиа-10-азациклопентадекан (28)



28

Защитную группу Вос-замещенного краун-эфира **31** (157 мг, 0.45 ммоль) снимают трифторуксусной кислотой (1 мл) в хлористом метиле (1 мл) в течение 15 мин при комнатной температуре. Растворители упаривают, сырой продукт разбавляют водой и защелачивают до pH 12 раствором Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Продукт реакции экстрагируют хлористым метилом из водной фазы. Растворитель упаривают, получая продукт **28**. Выход 79 мг (70%). Спектр <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>, 19.4°C, δ / м. д., J / Гц): 2.29 (уш. с, 1H, NH), 2.58 – 2.86 (м, 12H, 6×CH<sub>2</sub>), 3.47 – 3.71 (м, 8H, 4×CH<sub>2</sub>).

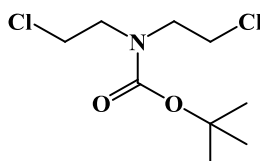
### Бис(2-хлорэтил)амин (29)



29

К смеси SOCl<sub>2</sub> (876 мкл, 12.058 ммоль) в 1 мл хлороформе по каплям добавляют раствор диэтиламина **21** в 1 мл хлороформа. После этого смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 3-х ч. Далее кипятят 30 мин и охлаждают до комнатной температуры. Реакционную смесь разбавляют 3 мл гексана, выпавший осадок отфильтровывают. Продукт высушивают на воздухе. Выход 355 мг (88%). Т. пл. 207 – 208°C. Лит. [247]: т. пл. 207 – 209°C. Спектр <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>, 19.4°C, δ / м. д., J / Гц): 3.19 – 3.34 (м, 4H), 3.72 – 3.93 (м, 4H), 9.84 (с, 1H).

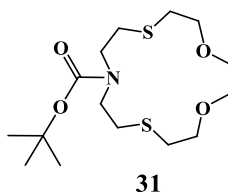
### Трет-бутил бис(2-хлорэтил)карбамат (30)



30

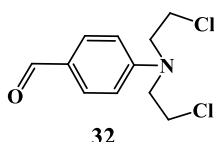
Дихлорид **29** (347 мг, 2.44 ммоль) добавляют к раствору NaOH (391 мг, 9.77 ммоль) в 6 мл воды при 5°C, далее осторожно порциями прибавляют Вос<sub>2</sub>O. Смесь перемешивают в течение ночи при комнатной температуре. Продукт реакции экстрагируют этилацетатом из водной фазы, сушат над MgSO<sub>4</sub>, растворитель упаривают с получением замещенного амина в виде желтого масла. Выход 410 мг (70%). Спектр <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>, 19.4°C, δ / м. д., J / Гц): 1.46 (с, 9H, 3×CH<sub>3</sub>), 3.44 – 3.72 (м, 8H).

### Трет-бутил 1,4-диокса-7,13-дитиа-10-азациклопентадекан-10-карбоксилат (31)



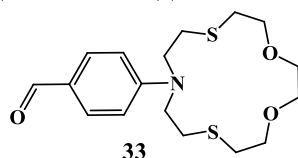
Вос-замещенный дихлорид **30** (410 мг, 1.69 ммоль) и 1,8-димеркапто-3,6-диоксаоктан (271 мкл, 1.69 ммоль) в 16 мл ДМФА медленно прикапывают к суспензии Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (853 мг, 2.62 ммоль) в 24 мл ДМФА при 65°C. Полученный раствор выдерживают при заданной температуре 50 ч. Затем растворитель удаляют в вакууме, сырой продукт растворяют в хлористом метиле, промывая водой для удаления солей цезия. Органический слой упаривают, получая **31** в виде прозрачного масла. Выход 331 мг (56%). Спектр <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>, 19.4°C, δ / м. д., J / Гц): 1.37 (с, 9H, 3×CH<sub>3</sub>), 2.50 – 2.87 (м, 8H, 4×CH<sub>2</sub>), 3.20 – 3.44 (м, 4H, 2×CH<sub>2</sub>), 3.47 – 3.77 (м, 8H, 4×CH<sub>2</sub>).

### 4-(Бис(2-хлорэтил)амино)бензальдегид (32)



К охлажденному до 0°C раствору POCl<sub>3</sub> (753 мкл, 8 ммоль) в ДМФА (6.5 мл) по каплям прибавляют смесь дихлорида **17** (1.76 г, 8 ммоль) в ДМФА (6.5 мл). Реакционную массу выдерживают при 15°C в течение 15 мин, далее выдерживают при 40°C в течение 2-х ч. Смесь выливают на лед, и быстро отфильтровывают не прореагировавшее исходное вещество. Фильтрат оставляют на 30 мин при 0°C, образовавшийся осадок отфильтровывают, промывают водой, сушат. Выход 1.64 г (76%). Спектр <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>, 19.4°C, δ / м. д., J / Гц): 3.79 (д, 4H, 2×CH<sub>2</sub>, J = 3.8), 3.84 (д, 4H, 2×CH<sub>2</sub>, J = 3.8), 6.92 (д, 2H, ArH, J = 6.9), 7.72 (д, 2H, ArH, J = 7.7), 9.71 (с, 1H, CH=O).

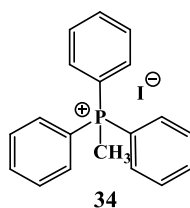
### 4-(1,4-Диокса-7,13-дитиа-10-азациклопентадекан-10-ил)бензальдегид (33)



К раствору этанола (300 мл) и воды (300 мл) добавляют Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (9.3 г, 0.028 моль). Раствор доводят до кипения и далее в течение часа медленно прикапывают смесь 1,8-димеркапто-3,6-диоксаоктан (1.14 г, 6.25 ммоль) и дихлорид **32** (1.4 г, 5.7 ммоль) в 75 мл этанола. Реакционную смесь выдерживают при перемешивании при 60°C в течение 24 ч. Основную часть растворителей упаривают, к остатку добавляют 40 мл воды. Продукты

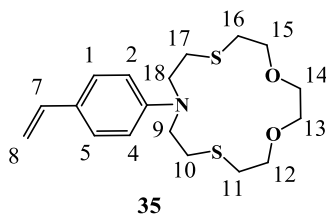
реакции экстрагируют этилацетатом, органическую фракцию упаривают, остаток очищают колоночной хроматографией на SiO<sub>2</sub>, используя в качестве элюента градиентную смесь гексан – этилацетат. Выход 1 г (47%). Т.пл. 85-87 °С. Лит. [248]: т.пл. 86 °С. Спектр <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>, 19.4°C, δ / м. д., J / Гц): 2.78 (т, 4Н, 2×CH<sub>2</sub>S, J = 4.6), 2.92 (т, 4Н, 2×CH<sub>2</sub>S, J = 7.5), 3.66 (с, 4Н, 2×CH<sub>2</sub>O), 3.74 (т, 4Н, 2×CH<sub>2</sub>O, J = 7.5), 3.82 (т, 4Н, 2×CH<sub>2</sub>N, J = 4.6), 6.68 (д, 2Н, ArH, J = 8.3), 7.73 (д, 2Н, ArH, J = 8.3), 9.74 (с, 1Н, CH=O).

### Трифенил-метил-фосфиний йодид (34)



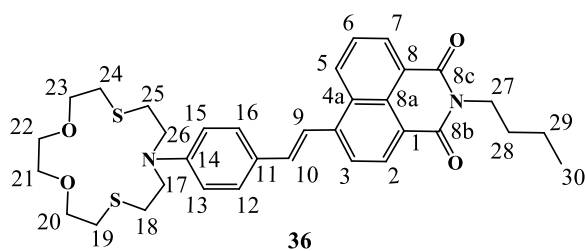
Трифенилфосфин (500 мг, 1.91 ммоль) растворяют в 3.5 мл сухого толуола. Затем к полученному раствору при 0°C по каплям добавляют CH<sub>3</sub>I (130 мкл, 2.1 ммоль). Смесь оставляют на ночь при комнатной температуре. Полученную белую суспензию отфильтровывают, промывают диэтиловым эфиром и сушат. Выход 680 г (88%). Спектр <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>, 19.4°C, δ / м. д., J / Гц): 3.16 (д, 3Н, CH<sub>3</sub>, J = 14.0), 7.66 – 7.83 (м, 12Н, ArH), 7.84 – 7.99 (м, 3Н, ArH).

### 10-(4-Винилфенил)-1,4-диокса-7,13-дитиа-10-азациклопентадекан (35)



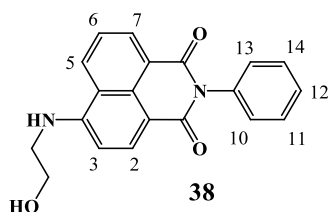
В атмосфере аргона к раствору Ph<sub>3</sub>P<sup>+</sup>MeI (34) (606 мг, 1.5 ммоль) в сухом ТГФ (10 мл) добавляют *t*-BuOK (168 мг, 1.5 ммоль), затем быстро прикапывают альдегид **33** (264 мг, 0.75 ммоль) в 5 мл сухого ТГФ. Реакционную массу перемешивают в течение 15 ч при комнатной температуре. По окончании реакции к смеси добавляют 5 мл гексана. Осадок отфильтровывают, фильтрат упаривают. Получают 133 мг (50%) сырого продукта **35** в виде желтого масла, которое сразу же используют на следующей стадии без предварительной очистки. <sup>1</sup>H ЯМР (300.13 МГц, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 21°C, δ / м.д., J / Гц): 2.70 – 2.80 (м, 4Н, Н(10), Н(17)), 2.83 – 2.94 (м, 4Н, Н(11), Н(16)); 3.58 – 3.65 (м, 8Н, Н(12), Н(13), Н(14), Н(15)); 3.75 – 3.81 (м, 4Н, Н(9), Н(18)); 5.52 (д, 1Н, Н(7), J = 17.3), 6.55 – 6.62 (м, 2Н, Н(8)), 6.69 (д, 2Н, Н(2), Н(4)) ((Н(1), Н(5)), J = 8.4), 7.26 (д, 2Н, (д, 2Н, Н(1), Н(5)) ((Н(2), Н(4))), J = 8.4).

**(E)-6-(4-(1,4-Диокса-7,13-дитиа-10-азациклопентадекан-10-ил)стирил)-2-бутил-1H-бензо[de]изохинолин-1,3(2H)-дион (36)**



Раствор 4-бром-*N*-бутил-1,8-нафталимида **20** (55 мг, 0.17 ммоль), Pd(OAc)<sub>2</sub> (19 мг, 0.08 ммоль), трис-(орто-толил)фосфина (25 мг, 0.08 ммоль), триэтиламина (300 мкл) и стирола **35** (118 мг, 0.33 ммоль) растворяют в сухом ДМФА (5 мл) и греют при 105°C в течение 16 ч в атмосфере аргона. Реакционную массу упаривают, остаток очищают флэш-хроматографией на SiO<sub>2</sub>, используя в качестве элюента градиентную смесь хлористый метилен – метанол. Выход 30 мг (29%). Т.пл. 244 – 246 °С. ЯМР <sup>1</sup>H (400.02 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>, 21°C, δ / м.д., *J* / Гц): 0.88 – 0.97 (м, 3H, H (30)), 1.27 – 1.47 (м, 2H, H (29)), 1.55 – 1.69 (м, 2H, H (28)), 2.70 – 2.80 (м, 4H, H(18), H(25)), 2.81 – 2.90 (м, 4H, H(19), H(24)), 3.54 – 3.61 (м, 4H, H(21), H(22)), 3.62 – 3.77 (м, 8H, H(17), H(26), H(20), H(23)), 6.68 (д, 2H, H(13), H(15), *J* = 7.5), 7.52 (д, 1H, H(10), *J* = 16.5), 7.69 (д, 2H, H(12), H(16), *J* = 7.5), 7.83 – 7.98 (м, 2H, H(9), H(6)), 8.18 (д, 1H, H(3), *J* = 7.9), 8.43 (д, 1H, H(2), *J* = 7.9), 8.52 (д, 1H, H(7), *J* = 6.6), 8.97 (д, 1H, H(5), *J* = 8,3). ЯМР <sup>13</sup>C (150.93 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>, 22°C, δ / мд): 15.79 (C(30)), 20.59 (C(29)), 30.46 (C(19), C(24)), 30.79 (C(28)), 31.21 (C(18), C(25)), 40.77 (C(27)), 51.64 (C(17), C(26)), 69.72 (C(21), C(22)), 73.82 (C(23), C(20)), 111.85 (C(13), C(15)), 118.13 (C(9)), 121.81 (C(1)), 122.66 (C(3)), 122.73 (C(8)), 126.24 (C(6)), 128.64 (C(8a)), 128.75 (C(12), C(16)), 129.44 (C(4a)), 129.55 (C(11)), 129.91 (C(5)), 130.66 (C(7)), 130.82 (C(2)), 135.29 (C(10)), 142.20 (C(4)), 147.72 (C(14)), 163.91 (C(8b)), 164.23 (C(8c)). Масс-спектр (ИЭР), вычислено, *m/z*: 605.25; найдено: 605.45 ([M+H]<sup>+</sup>). Спектр ЯМР <sup>1</sup>H соединения **36** в ДМСО-*d*<sub>6</sub> показан на рис. 19.

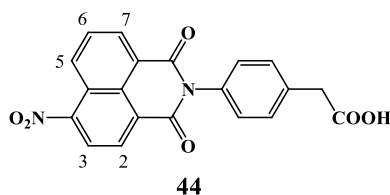
**6-(2-Гидроксиэтиламино)-2-фенил-1H-бензо[de]изохинолин-1,3(2H)-дион (38)**



4-Нитро-*N*-фенил-1,8-нафталиמיד **86** (100 мг, 0.31 ммоль) и K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (116 мг, 0.84 ммоль) растворяют в ДМФА (1 мл). Далее добавляют раствор этаноламина (84 мкл, 1.4 ммоль) в ДМФА (500 мкл). Греют при 50°C в течение 2-х ч, предварительно разбив раствор на УЗ-бане. Реакционную смесь разбавляют водой, выпавший осадок

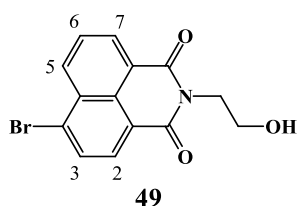
отфильтровывают, промывают водой, сушат. Выход 90.8 мг (87%). ЯМР  $^1\text{H}$  (400.02 МГц, ДМСО- $d_6$ , 21°C,  $\delta$  / м.д.,  $J$  / Гц): 3.44 – 3.56 (м, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.66 – 3.79 (м, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.86 – 4.97 (м, 1H, OH), 6.85 (д, 1H, H(3),  $J = 8.7$ ), 7.31 (д, 2H, ArH,  $J = 7.6$ ), 7.39 – 7.56 (м, 3H, ArH), 7.66 – 7.75 (м, 1H, H(6)), 7.76 – 7.85 (м, 1H, NH), 8.26 (д, 1H, H(2),  $J = 8.7$ ), 8.44 (д, 1H, H(7),  $J = 7.4$ ), 8.76 (д, 1H, H(5),  $J = 8.5$ )).

**2-(4-(6-Нитро-1,3-диоксо-1H-бензо[d,e]изохинолин-2(3H)-ил)фенил)уксусная кислота (44)**



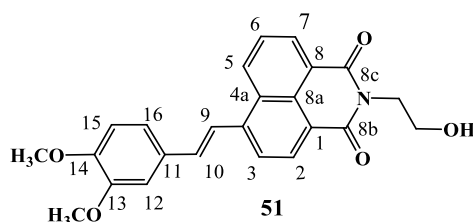
По общей методике имидирования 4-замещенных 1,8-нафталевого ангидрида аминами из 372 мг (1.53 ммоль) 4-нитронафталевого ангидрида **7**, 346 мг (2.29 ммоль) (4-аминофенил)уксусной кислоты **43** и 3 мл ледяной уксусной кислоты было получено 487 мг (85%) продукта **44**. Промывка осадка, отфильтрованного из реакционной массы, осуществлялась горячим 10%-ным раствором Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> и 5%-ным раствором HCl. Т.пл. 293 – 294°C. Лит. [249]: т.пл. 293 – 295 °C. Спектр  $^1\text{H}$  ЯМР (300.13 МГц, ДМСО- $d_6$ , 21°C,  $\delta$  / м. д.,  $J$  / Гц): 3.68 (с, 2H, CH<sub>2</sub>), 7.25 – 7.53 (м, 4H, ArH), 8.02 – 8.19 (м, 1H, H(6)), 8.49 – 8.70 (м, 3H, H(3), H(2), H(7)), 8.75 (д, 1H, H(5),  $J = 8.3$ ), 12.45 (уш. с, 1H, COOH).

**6-Бром-2-(2-гидроксиэтил)-1H-бензо[d,e]изохинолин-1,3(2H)-дион (49)**



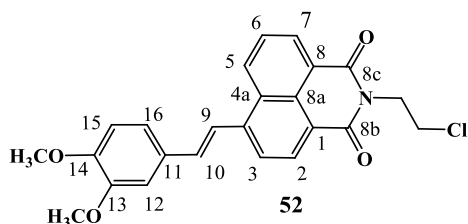
По общей методике имидирования 4-замещенных 1,8-нафталевого ангидрида аминами из 300 мг (1.08 ммоль) 4-бромнафталевого ангидрида **11**, 99 мкл (1.63 ммоль) этаноламина и 10 мл этанола было получено 289 мг (96%) продукта **49**. Промывка осадка, отфильтрованного из реакционной массы, осуществлялась этанолом. Т.пл. 202 – 204°C. Лит. [250]: т.пл. 203 – 204°C.  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц, ДМСО- $d_6$ , 19.4°C,  $\delta$  / м. д.,  $J$  / Гц): 4.01 – 4.07 (м, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.51 – 4.57 (м, 2H, CH<sub>2</sub>), 5.24 (с, 1H, OH), 8.37 – 8.43 (м, 1H, H(6)), 8.62 (д, 1H, H(3),  $J = 7.7$ ), 8.73 (д, 1H, H(2),  $J = 7.7$ ), 8.92 – 8.99 (м, 2H, H(7), H(5)).

**2-(2-Гидроксиэтил)-6-(3,4-диметоксистирил)-1Н-бензо[d,e]изохинолин-1,3(2Н)-дион (51)**



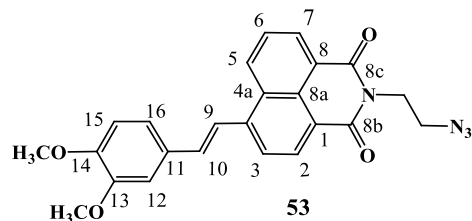
Смесь 500 мг (1.56 ммоль) 4-бромпроизводного **49**, 4 мг (0.018 ммоль) ацетата палладия (II), 25 мг (0.083 ммоль) трис(орто-толил)фосфина, 3 мл триэтиламина, 267 мкл (1.8 ммоль) 4-метоксистирила **50** и 20 мл ДМФА выдерживают при перемешивании в атмосфере аргона при температуре 105°C в течение 15 ч. Реакционную массу охлаждают до комнатной температуры, разбавляют водой и экстрагируют хлористым метиленом. Экстракт высушивают над MgSO<sub>4</sub>, упаривают, остаток очищают флэш-хроматографией на SiO<sub>2</sub>, используя в качестве элюента градиентную смесь хлористый метилен – метанол. Выход 400 мг (62%). Т.пл. 198 – 199°C. Лит. [249]: т.пл. 199 – 200°C. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>, 19.4°C, δ / м. д., J / Гц): 3.62 – 3.68 (м, 2H, CH<sub>2</sub>OH), 3.82 (с, 3H, C(14)-OCH<sub>3</sub>), 3.89 (с, 3H, C(13)-OCH<sub>3</sub>), 4.16 (т, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH, J = 6.4), 4.80 (т, 1H, OH, J = 6.0), 7.02 (д, 1H, H(15), J = 8.3), 7.32 (дд, 1H, H(16), J<sub>1</sub> = 8.3, J<sub>2</sub> = 1.9), 7.51 – 7.57 (м, 2H, H(10), H(12)), 7.91 (дд, 1H, H(6), J<sub>1</sub> = 8.7, J<sub>2</sub> = 7.2), 8.08 (д, 1H, H(9), J = 16.1), 8.21 (д, 1H, H(3), J = 7.9), 8.48 (д, 1H, H(2), J = 7.9), 8.54 (д, 1H, H(7), J = 7.2), 9.01 (д, 1H, H(5), J = 8.7).

**2-(2-Хлорэтил)-6-(3,4-диметоксистирил)-1Н-бензо[d,e]изохинолин-1,3(2Н)-дион (52)**



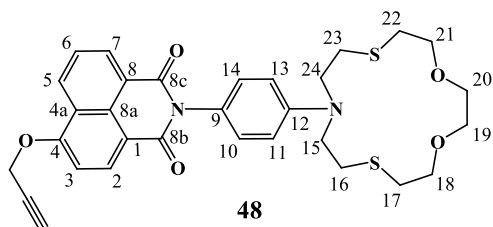
Смесь 446 мг (1.11 ммоль) соединения **51** и 5.5 мл оксихлорида фосфора выдерживают при перемешивании при 90°C 2 ч. Избыток POCl<sub>3</sub> отгоняют в вакууме. Остаток очищают флэш-хроматографией на SiO<sub>2</sub>, используя в качестве элюента градиентную смесь метилен – метанол. Выход 300 мг (65%). Т.пл. 195 – 196°C. Лит. [249]: т.пл. 195 – 197°C. Спектр <sup>1</sup>H ЯМР (400.13 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>, 27°C, δ / м.д., J / Гц): 3.82 (с, 3H, C(14)-OCH<sub>3</sub>), 3.84 – 3.96 (м, 5H, CH<sub>2</sub>Cl, C(13)-OCH<sub>3</sub>), 4.41 (т, 2H, J = 6.8, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Cl), 7.03 (д, 1H, H(15), J = 8.3), 7.33 (д, 1H, H(16), J<sub>1</sub> = 8.3, J<sub>2</sub> = 1.7), 7.52 – 7.62 (м, 2H, H(10), H(12)), 7.90 – 7.96 (м, 1H, H(6)), 8.10 (д, 1H, H(9), J = 16.2), 8.23 (д, 1H, H(3), J = 8.0), 8.50 (д, 1H, H(2), J = 8.0), 8.57 (д, 1H, H(7), J = 7.3), 9.04 (д, 1H, H(5), J = 8.0).

## 2-(2-Азидоэтил)-6-(3,4-диметоксистирил)-1Н-бензо[d,e]изохинолин-1,3(2Н)-дион (53)



Раствор 300 мг (0.71 ммоль) хлорпроизводного **52** и 232 мг (3.56 ммоль) азид натрия в 20 мл ДМФА выдерживают при перемешивании при 100°C в течение 7.5 ч. По окончании выдержки реакционную массу разбавляют водой, продукт экстрагируют хлористым метиленом, промывают объединенные органические экстракты водой и оставляют на ночь над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, после чего отгоняют растворитель в вакууме. Выход 253 мг (83%). Т.пл. 173°C с разл. Лит. [249]: т.пл. 173°C с разл. Спектр <sup>1</sup>H ЯМР (600.22 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>, 30°C, δ / м.д., J / Гц): 3.63 (т, 2Н, CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>, J = 6.2), 3.81 (с, 3Н, C(14)-OCH<sub>3</sub>), 3.89 (с, 3Н, C(13)-OCH<sub>3</sub>), 4.29 (т, 2Н, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>, J = 6.2), 7.02 (д, 1Н, H(15), J = 8.4), 7.33 (дд, 1Н, H(16), J<sub>1</sub> = 2.0, J<sub>2</sub> = 8.4), 7.52 – 7.58 (м, 2Н, H(9), H(12)), 7.93 (дд, 1Н, H(6)), J<sub>1</sub> = 7.3, J<sub>2</sub> = 8.8), 8.08 (д, 1Н, H(9), J = 16.0), 8.22 (д, 1Н, H(3), J = 7.9), 8.50 (д, 1Н, H(2), J = 7.9), 8.58 (д, 1Н, H(7), J = 7.3), 9.03 (д, 1Н, H(5), J = 8.8).

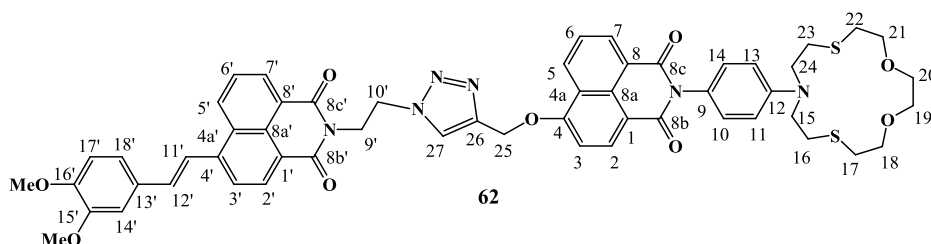
## 2-(4-(1,4-Диокса-7,13-дитиа-10-азапентадекан-10-ил)фенил)-6-(проп-2-ин-1-илокси)-1Н-бензо[де]изохинолин-1,3(2Н)-дион (48)



В атмосфере аргона к раствору нитропроизводного **8a** (87 мг, 0.151 ммоль) в 2 мл ДМФА добавляют пропаргиловый спирт (42 мкл, 0.728 ммоль) и K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (57 мг, 0.413 ммоль). Реакционную массу нагревают до 80°C и выдерживают при указанной температуре 10 ч, после чего разбавляют насыщенным раствором соли. Образовавшийся осадок отфильтровывают, промывают на фильтре дистиллированной водой и этиловым спиртом. Продукт высушивают на воздухе. Выход 68 мг (78%). Т.пл. 233 – 234°C. <sup>1</sup>H ЯМР (400.13 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>, 20°C, δ / м.д., J / Гц): 2.72 – 2.80 (м, 4Н, H(16), H(23)), 2.84 – 2.90 (м, 4Н, H(17), H(22)), 3.58 – 3.67 (м, 8Н, H(18), H(19), H(20), H(21)), 3.70 – 3.75 (м, 4Н, H(15), H(24)), 3.76 (т, 1Н, C≡CH, J = 2.2), 5.24 (д, 2Н, CH<sub>2</sub>C≡CH, J = 2.1), 6.69 (д, 2Н, H(11), H(13), J = 8.9), 7.1 (д, 2Н, H(10), H(14), J = 8.9), 7.42 (д, 1Н, H(3), J = 8.3), 7.85 – 7.90 (м, 1Н, H(6)), 8.48 (д, 1Н, H(2), J = 8.3), 8.52 (д, 1Н, H(7), J = 7.4), 8.58 (д, 1Н, H(5), J = 8.5). <sup>13</sup>C ЯМР (150.93 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>, 25°C, δ / м.д.): 29.01 (C(16), C(23)), 30.56 (C(17),

C(22)), 51.36 (C(15), C(24)), 56.86 ( $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{C}\equiv\text{CH}$ ), 70.03 (C(19), C(20)), 72.99 (C(18), C(21)), 78.16 ( $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{C}\underline{\text{H}}$ ), 79.47 ( $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$ ), 107.65 (C(3)), 111.26 (C(11), C(13)), 115.61 (C(1)), 122.86 (C(4a)), 123.01 (C(8)), 124.05 (C(9)), 126.70 (C(6)), 128.16 (C(5)), 129.03 (C(8a)), 129.72 (C(10), C(14)), 131.18 (C(7)), 132.79 (C(2)), 146.31 C(12)), 157.98 (C(4)), 163.45 (C(8b)), 164.10 (C(8c)). Масс-спектр,  $m/z$  ( $I$ , %): 578 (2), 577 (2), 576 ( $[\text{M}]^+$ ) (3), 494 (1), 446 (2), 428 (32), 383 (100), 344 (85), 287 (37). Найдено (%): C, 64.49; H, 5.63; N, 4.83; O, 13.91; S, 11.09.  $\text{C}_{31}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}_2$ . Вычислено (%): C, 64.56; H, 5.59; N, 4.86; O, 13.87; S, 11.12.

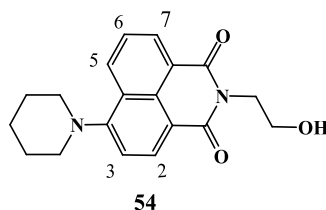
**(E)-2-(4-(1,4-Диокса-7,13-дитиа-10-азациклопентадекан-10-ил)фенил)-6-((1-(2-(6-(3,4-диметоксистирил)-1,3-диоксо-1H-бензо[de]изохинолин-2(3H)-ил)этил)-1H-1,2,3-триазол-4-ил)метокси)-1H-бензо[de]изохинолин-1,3(2H)-дион (62)**



Смесь соединения **48** (50 мг, 0.087 ммоль), соединения **62** (42 мг, 0.098 ммоль), диизопропилэтиламина (31 мкл, 0.178 ммоль), йодида меди (I) (5 мг, 0.026 ммоль) в 3 мл ДМФА в атмосфере аргона выдерживают при 80°C в течение 30 ч. Растворитель отгоняют в вакууме, остаток очищают флэш-хроматографией на  $\text{SiO}_2$ , используя в качестве элюента градиентную смесь хлористый метилен – метанол. Выход 32 мг (36%). Т.пл. 246 – 247°C.  $^1\text{H}$  ЯМР (400.13 МГц, ДМСО- $d_6$ , 20°C,  $\delta$  / м.д.,  $J$  / Гц): 2.74 – 2.78 (м, 4H, H(16), H(23)), 2.82 – 2.88 (м, 4H, H(17), H(22)), 3.57 – 3.65 (м, 8H, H(18), H(19), H(20), H(21)), 3.69 – 3.74 (м, 4H, H(15), H(24)), 3.81 (с, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.88 (с, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 4.46 – 4.56 (м, 2H, H(9')), 4.75 – 4.84 (м, 2H, H(10')), 5.49 (с, 2H, H(25)), 6.67 (д, 2H, H(11), H(13),  $J = 8.2$ ), 7.01 (д, 1H, H(17'),  $J = 7.2$ ), 7.1 (д, 2H, H(10), H(14),  $J = 8.2$ ), 7.29 (д, 1H, H(18'),  $J = 7.2$ ), 7.47 – 7.55 (м, 2H, H(3), H(12'), H(14')), 7.78 – 7.89 (м, 2H, H(6), H(6')), 8.06 (д, 1H, H(11'),  $J = 15.9$ ), 8.11 – 8.15 (м, 1H, H(3')), 8.28 (д, 1H, H(2'),  $J = 7.8$ ), 8.37 – 8.47 (м, 4H, H(7), H(5), H(2), H(7')), 8.5 (с, H(27)), 8.99 (д, 1H, H(5'),  $J = 7.5$ ).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (150.93 МГц, ДМСО- $d_6$ , 25°C,  $\delta$  / м.д.): 28.42 (C(16), C(23)), 29.84 (C(17), C(22)), 40.12 (C(9')), 45.50 (C(10')), 51.77 (C(15), C(24)), 55.58 ( $\text{OCH}_3$ ), 55.74 ( $\text{OCH}_3$ ), 62.67 (C(25)), 70.08 (C(19), C(20)), 73.07 (C(18), C(21)), 107.86 (C(3)), 110.22 (C(14')), 111.31 (C(11), C(13)), 112.05 (C(17')), 115.45 (C(1)), 121.04 (C(11')), 121.93 (C(18')), 122.11 (C(4a)), 122.15 (C(8')), 122.68 (C(4a')), 123.00 (C(8)), 123.40 (C(3')), 124.50 (C(9)), 126.07 (C(27)), 126.70 (C(6)), 126.88 (C(6')), 127.93 (C(7')), 128.22 (C(8a')), 128.73 (C(5)), 129.49 (C(8a)), 129.52 (C(13')), 129.72 (C(10), C(14)), 129.78 (C(1')), 130.02 (C(2)), 130.81 (C(2')), 131.31 (C(5')), 131.68 (C(7)), 135.63 (C(12')), 141.80 (C(4'), C(26)),

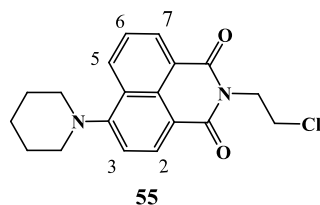
146.31 (C(12)), 149.05 (C(15')), 149.83 (C(16')), 158.90 (C(4)), 163.28 (C(8b')), 163.45 (C(8c')), 164.10 (C(8b)), 164.21 (C(8c)). Масс-спектр (ИЭР), вычислено,  $m/z$ : 1113.22; найдено: 1112.94 ( $[C_{55}H_{52}N_6O_9S_2Ag]^+$ ). Найдено (%): C, 65.72; H, 5.21; N, 8.36; O, 14.33; S, 6.38.  $C_{55}H_{52}N_6O_9S_2$ . Вычислено (%): C, 67.68; H, 5.23; N, 8.40; O, 14.28; S, 6.41.

#### 2-(2-Гидроксиэтил)-6-(пиперидин-1-ил)-1Н-бензоди[изохинолин-1,3-(2Н)-дион (54)



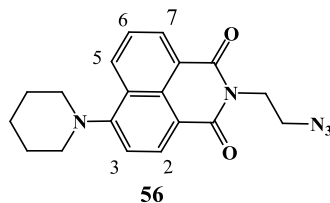
Смесь 200 мг (0.63 ммоль) соединения **49**, 266 мкл (2.7 ммоль) пиперидина и 2.5 мл 2-метоксиэтанола кипятят в атмосфере аргона в течение 5 ч. По окончании реакции растворитель отгоняют в вакууме, сухой остаток очищают флэш-хроматографией на  $SiO_2$ , используя в качестве элюента хлористый метилен. Выход 182 мг (90%). Спектр  $^1H$  ЯМР (400.13 МГц, ДМСО- $d_6$ , 27 °С,  $\delta$  / м. д.,  $J$  / Гц): 1.63 – 1.70 (м, 2H,  $CH_2$ ), 1.77 – 1.87 (м, 4H,  $2 \times CH_2$ ), 3.16 – 3.23 (м, 4H,  $2 \times CH_2$ ), 3.55 – 3.64 (м, 2H,  $2 \times CH_2OH$ ), 4.13 (т, 2H,  $2 \times CH_2N$ ,  $J = 6.4$ ), 4.8 (т, 1H, OH,  $J = 5.8$ ), 7.29 (д, 1H, H(3),  $J = 7.9$ ), 7.77 – 7.83 (м, 1H, H(6)), 8.35 – 8.43 (м, 2H, H(2), H(7)), 8.46 (д, 1H, H(5),  $J = 7.2$ ).

#### 2-(2-Хлорэтил)-6-(пиперидин-1-ил)-1Н-бензоди[изохинолин-1,3-(2Н)-дион(55)



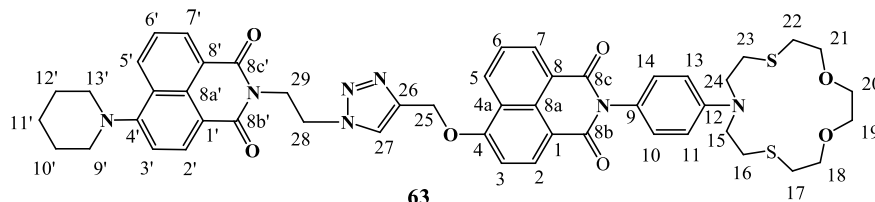
В соответствии с методикой, предложенной для синтеза соединения **52**, из 134 мг (0.41 ммоль) соединения **54** (*N*-(2-гидроксиэтил)-4-(пиперидин-1-ил)-1,8-нафталимид) и 2.5 мл  $POCl_3$  получено 108 мг (76%) продукта **55**. По окончании реакции продукт выливают на лед, далее экстрагируют хлористым метиленом. Органический слой промывают водой и 10%-м раствором хлорида натрия, растворитель отгоняют в вакууме. Спектр  $^1H$  ЯМР (400.13 МГц, ДМСО- $d_6$ , 27°C,  $\delta$  / м. д.,  $J$  / Гц): 1.60 – 1.72 (м, 2H,  $CH_2$ ), 1.75 – 1.87 (м, 4H,  $2 \times CH_2$ ), 3.17– 3.25 (м, 4H,  $2 \times CH_2$ ), 3.85 (т, 2H,  $2 \times CH_2Cl$ ,  $J = 6.7$ ), 4.38 (т, 2H,  $2 \times CH_2N$ ,  $J = 6.4$ ), 7.33 (д, 1H, H(3),  $J = 8.2$ ), 7.78 – 7.86 (м, 1H, H(6)), 8.37 – 8.45 (м, 2H, H(2), H(7)), 8.49 (д, 1H, H(5),  $J = 7.7$ ). Масс-спектр (ИЭР) найдено,  $m/z$ : 342.15; вычислено: 342.12 ( $[M+H]^+$ ).

## 2-(2-Азидоэтил)-6-(пиперидин-1-ил)-1Н-бензоди[изохинолин-1,3-(2Н)-дион(56)



В соответствии с методикой, предложенной для синтеза соединения **52**, из 30 мг (0.087 ммоль) соединения **55** (*N*-(2-хлорэтил)-4-(пиперидин-1-ил)-1,8-нафталимид), 40 мг (0.612 ммоль) азидата натрия и 3 мл ДМФА получено 28 мг (92%) продукта **56**. По окончании реакции смесь разбавляют водой, далее экстрагируют хлористым метиленом. Растворитель отгоняют в вакууме, сухой остаток очищают флэш-хроматографией на SiO<sub>2</sub>, используя в качестве элюента смесь хлористый метилен–метанол. Спектр <sup>1</sup>H ЯМР (400.13 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>, 27°C, δ / м. д., *J* / Гц): 1.61 – 1.71 (м, 2Н, CH<sub>2</sub>), 1.77 – 1.87 (м, 4Н, 2×CH<sub>2</sub>), 3.15 – 3.25 (м, 4Н, 2×CH<sub>2</sub>), 3.60 (т, 2Н, 2×CH<sub>2</sub>N, *J* = 5.9), 4.27 (т, 2Н, 2×CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>, *J* = 6.1), 7.31 (д, 1Н, Н(3), *J* = 8.2), 7.78 – 7.86 (м, 1Н, Н(6)), 8.37 – 8.44 (м, 2Н, Н(2), Н(7)), 8.49 (д, 1Н, Н(5), *J* = 7.2). Масс-спектр (ИЭР) найдено, *m/z*: 350.18; вычислено: 350.16 ([*M*+*H*]<sup>+</sup>).

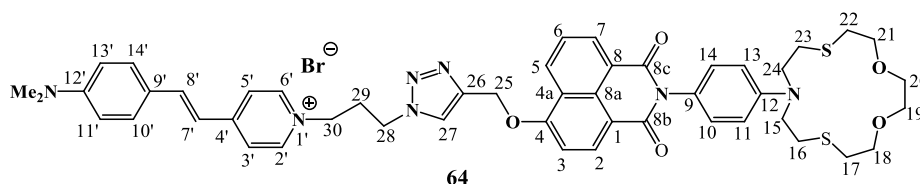
## 2-(4-(1,4-Диокса-7,13-дитиа-10-азациклопентадекан-10-ил)фенил)-6-((1-(2-(1,3-диоксо-6-(пиперидин-1-ил)-1Н-бензо[de]изохинолин-2(3Н)-ил)этил)-1Н-1,2,3-триазол-4-ил)метокси)-1Н-бензо[de]изохинолин-1,3(2Н)-дион (63)



В соответствии с методикой, предложенной для синтеза соединения **62**, из 21 мг (0.037 ммоль) пропаргилпроиозводного **48**, 13 мг (0.037 ммоль) азидата **56**, 31 мкл (0.178 ммоль) диизопропилэтиламина, 5 мг (0.026 ммоль) йодида меди (I) и 2.5 мл ДМФА получено 20 мг (59%) продукта **63**. Реакционную смесь выдерживают при 80°C в течение 30 ч. По окончании реакции растворитель отгоняют в вакууме, сухой остаток очищают флэш-хроматографией на SiO<sub>2</sub>, используя в качестве элюента хлористый – метанол. Т.пл. 144 – 145°C. <sup>1</sup>H ЯМР (400.13 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>, 20°C, δ / м.д., *J* / Гц): 1.68 – 1.76 (м, 2Н, Н(11')), 1.82 – 1.92 (м, 4Н, Н(10'), Н(12')), 2.71 – 2.82 (м, 4Н, Н(16), Н(23)), 2.89 – 3.00 (м, 4Н, Н(17), Н(22)), 3.17 – 3.19 (м, 4Н, Н(9'), Н(13')) 3.60 – 3.74 (м, 8Н, Н(18), Н(19), Н(20), Н(21)), 3.76 – 3.84 (м, 4Н, Н(15), Н(24)), 4.60 – 4.69 (м, 2Н, Н(29)), 4.76 – 4.83 (м, 2Н, Н(28)), 5.48 (с, 2Н, Н(25)), 6.74 (д, 2Н, Н(11), Н(13), *J* = 8.2), 7.08 (д, 2Н, Н(10), Н(14), *J* = 8.2), 7.14 (д, 1Н, Н(3'), *J* = 8.3), 7.25 (д, 1Н, Н(3), *J* = 8.3), 7.60 – 7.75 (м, 2Н, Н(6'), Н(6)), 7.89 (с, 1Н, Н(27)), 8.33 – 8.46 (м, 3Н, Н(2'), Н(7'), Н(5')), 8.43 – 8.55 (м, 2Н, Н(2), Н(7)),

8.58 (д, 1H, H(5),  $J = 7.4$ ).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (150.93 МГц, ДМСО- $d_6$ , 25°C,  $\delta$  / м.д.): 24.29 (C(11')), 26.34 (C(10'), C(12')), 29.35 (C(16), C(23)), 31.29 (C(17), C(22)), 39.44 (C(29)), 48.12 (C(28)), 52.06 (C(15), C(24)), 62.82 (C(25)), 70.79 (C(19), C(20)), 74.14 (C(18), C(21)), 106.61 (C(3)), 111.63 (C(11), C(13)), 114.63 (C(3')), 114.84 (C(1')), 115.59 (C(1)), 123.42 (C(8)), 123.95 (C(27)), 123.98 (C(9)), 123.99 (C(4a)), 125.19 (C(8')), 125.23 (C(6')), 125.99 (C(6)), 126.06 (C(4a')), 128.70 (C(7)), 129.30 (C(8a)), 129.46 (C(10), C(14)), 130.73 (C(8a')), 131.18 (C(7')), 131.45 (C(5)), 132.73 (C(2')), 133.34 (C(2)), 142.70 (C(26)), 146.82 (C(12)), 157.72 (C(4')), 159.57 (C(4)), 163.71 (C(8b')), 163.93 (C(8b)), 164.27 (C(8c')), 164.38 (C(8c)). Масс-спектр (ИЭР), найдено,  $m/z$ : 463.35; вычислено: 463.67 ( $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ ).

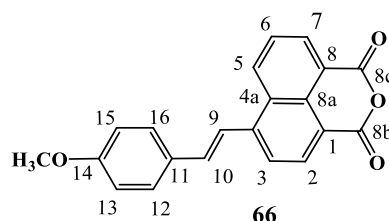
**(E)-1-(3-(4-((2-(4-(1,4-Диокса-7,13-дитиа-10-азациклопентадекан-10-ил)фенил)-1,3-диоксо-2,3-дигидро-1H-бензо[де]изохинолин-6-илокси)метил)-1H-1,2,3-триазол-1-ил)пропил)-4-(4-(диметиламино)стирил)пиридиния бромид (64)**



В соответствии с методикой, предложенной для синтеза соединения **62**, из 40 мг (0.069 ммоль) пропаргилпроиозводного **48**, 27 мг (0.070 ммоль) азида **61**, 25 мкл (0.144 ммоль) диизопропилэтиламина, 5 мг (0.026 ммоль) йодида меди (I) и 3 мл ДМФА получено 30 мг (45%) продукта **64**. Реакционную смесь выдерживают при 80°C в течение 12 ч. По окончании реакции растворитель отгоняют в вакууме, сухой остаток сухой остаток очищают флэш-хроматографией на  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , используя в качестве элюента градиентную смесь хлористый метилен – метанол. Т.пл. 238 – 239°C.  $^1\text{H}$  ЯМР (400.13 МГц, ДМСО- $d_6$ , 20 °C,  $\delta$  / м.д.,  $J$  / Гц): 1.13 – 1.25 (м, 2H,  $\text{CH}_2(29)$ ), 2.73 – 2.80 (м, 4H,  $\text{CH}_2(16)$ ,  $\text{CH}_2(23)$ ), 2.82 – 2.92 (м, 4H,  $\text{CH}_2(17)$ ,  $\text{CH}_2(22)$ ), 3.02 (с, 6H,  $\text{NMe}_2$ ), 3.48 – 3.53 (м, 2H,  $\text{CH}_2(30)$ ), 3.55 – 3.68 (м, 8H,  $\text{CH}_2(18)$ ,  $\text{CH}_2(19)$ ,  $\text{CH}_2(20)$ ,  $\text{CH}_2(21)$ ), 3.68 – 3.76 (м, 4H,  $\text{CH}_2(15)$ ,  $\text{CH}_2(24)$ ), 4.49 – 4.58 (м, 2H,  $\text{CH}_2(28)$ ), 5.54 (в, 2H,  $\text{CH}_2(25)$ ), 6.68 (д, 2H, H(11), H(13),  $J = 8.4$ ), 6.67 (д, 2H, H(11'), H(13'),  $J = 8.3$ ), 7.05 – 7.17 (м, 3H, H(10), H(14) H(7')), 7.49 – 7.59 (м, 3H, H(10'), H(14'), H(3)), 7.80 – 7.93 (м, 2H, H(6), H(8')), 8.03 (д, 2H, H(3'), H(5'),  $J = 6.1$ ), 8.39 – 8.46 (м, 2H, H(2), H(27)), 8.47 – 8.58 (м, 2H, H(7), H(5)), 8.74 (д, 2H, H(2'), H(6'),  $J = 6.1$ ).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (150.93 МГц, ДМСО- $d_6$ , 25°C,  $\delta$  / м.д.): 29.49 (C(16), (C(23))), 29.87 (C(29)), 31.08 (C(17), C(22)), 39.20 ( $\text{NMe}_2$ ), 47.28 (C(30)), 51.80 (C(15), C(24)), 57.32 (C(28)), 62.95 (C(25)), 70.18 (C(19), C(20)), 70.60 (C(18), C(21)), 107.90 (C(3)), 111.74 (C(11), C(13)), 112.49 (C(11'), C(13')), 115.71 (C(1)), 117.45 (C(7')), 122.61 (C(9')), 122.83 (C(3'), C(5')), 123.12 (C(4a)), 123.51 (C(8)), 124.57 (C(9)), 125.38 (C(27)), 126.94 (C(6)),

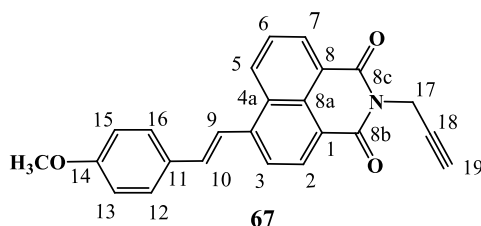
128.81 (C(5)), 129.50 (C(8a)), 130.20 (C(10), C(14)), 130.67 (C(10'), C(14')), 131.66 (C(7)), 133.52 (C(2)), 141.71 (C(26)), 142.75 (C(8')), 144.01 (C(2'), C(6')), 146.74 (C(12)), 152.43 (C(12')), 154.31 (C(4')), 159.40 (C(4)), 163.92 (C(8b)), 164.48 (C(8c)). Масс-спектр (ИЭР), вычислено,  $m/z$ : 884.36; найдено 884.12 ( $[C_{49}H_{54}N_7O_5S_2]^+$ ). Найдено (%): С, 60.98; Н, 5.69; N, 10.18.  $C_{49}H_{54}BrN_7O_5S_2$ . Вычислено (%): С, 60.92; Н, 5.74; N, 10.15.

**(E)-6-(4-Метоксистирил)бензо[d,e]изохромен-1,3-дион (66)**



В соответствии с методикой, предложенной для синтеза соединения **51**, из 300 мг (1.28 ммоль) 4-бромнафта-левого ангидрида **11**, 5 мг (0.022 ммоль) ацетата палладия (II), 5 мг (0.016 ммоль) трис(орто-толил)фосфина, 1805 мкл триэтиламина и 208 мкл (1.56 ммоль) 1-метокси-4-винилбензол в 12 мл ДМФА получено 243 мг (68%) продукта **66**. Реакционную смесь выдерживают при 105°C в течение 8 ч. По окончании реакции смесь разбавляют водой, отфильтровывают осадок, промывают водой, этанолом, сушат, получая чистый продукт **66**. Т. пл. 184 – 185°C. Спектр  $^1H$  ЯМР (400.13 МГц, ДМСО- $d_6$ , 18°C,  $\delta$  / м. д.,  $J$  / Гц): 3.82 (с, 3H, OCH<sub>3</sub>), 7.03 (д, 2H, H(13), H(15),  $J$  = 8.6), 7.63 (д, 1H, H(10),  $J$  = 16.1), 7.84 (д, 2H, H(12), H(16),  $J$  = 8.6), 7.90 – 7.97 (м, 1H, H(6)), 8.09 (д, 1H, H(9),  $J$  = 16.1), 8.27 (д, 1H, H(3),  $J$  = 7.8), 8.48 (д, 1H, H(2),  $J$  = 7.8), 8.55 (д, 1H, H(7),  $J$  = 7.4), 9.09 (д, 1H, H(5),  $J$  = 8.4). Спектр  $^{13}C$  ЯМР (100.60 МГц, ДМСО- $d_6$ , 18°C,  $\delta$  / м. д.,  $J$  / Гц): 55.39 (OCH<sub>3</sub>), 114.27 (C(13), C(15)), 116.19 (C(1)), 119.23 (C(8)), 120.22 (C(9)), 123.16 (C(3)), 127.15 (C(6)), 129.01 (C(4a)), 129.30 (C(12), C(16)), 129.78 (C(11)), 130.65 (C(4a)), 132.06 (C(5)), 132.33 (C(2)), 132.54 (C(7)), 135.83 (C(10)), 142.73 (C(4)), 160.07 (C(14)), 160.64 (C(8b)), 161.04 C(8c)). Масс-спектр (ИЭР) найдено,  $m/z$ : 331.18; вычислено: 331.10 ( $[M+H]^+$ ). Найдено (%): С, 72.41; Н, 4.59.  $C_{21}H_{14}O_4 \times H_2O$ . Вычислено (%): С, 72.41; Н, 4.63.

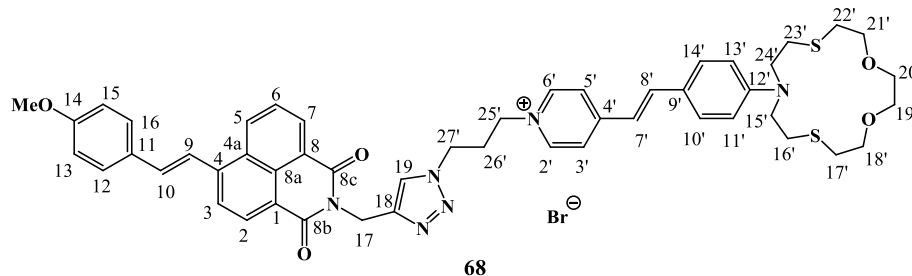
**(E)-6-(4-Метоксистирил)-2-(проп-2-инил)-1H-бензо[d,e]изохинолин-1,3(2H)-ди-он (67)**



Смесь ангидрида **66** (215 мг, 0.652 ммоль) и пропаргиламина (170 мкл, 2.658 ммоль) кипятят в 2-метоксиэтанол (10 мл) в атмосфере аргона в течение 10 ч.

Реакционную массу разбавляют водой. Выпавший осадок отфильтровывают, промывают на фильтре водой, высушивают на воздухе, после чего перекристаллизовывают из метанола. Получено 184 мг (77%) продукта **67** в виде оранжевого порошка. Т. пл. 225 – 226°C. Спектр  $^1\text{H}$  ЯМР (400.13 МГц, ДМСО- $d_6$ , 18°C,  $\delta$  / м. д.,  $J$  / Гц): 3.64 (с, 1H, C $\equiv$ CH), 3.82 (с, 3H, OCH $_3$ ), 4.78 (с, 2H, CH $_2$ ), 7.02 (д, 2H, H(13), H(15),  $J$  = 8.5), 7.58 (д, 1H, H(10),  $J$  = 16.2), 7.82 (д, 2H, H(12), H(16),  $J$  = 8.5), 7.86 – 7.94 (м, 1H, H(6)), 8.05 (д, 1H, H(9),  $J$  = 16.2), 8.21 (д, 1H, H(3),  $J$  = 8.1), 8.48 (д, 1H, H(2),  $J$  = 8.1), 8.55 (д, 1H, H(7),  $J$  = 7.1), 9.00 (д, 1H, H(5),  $J$  = 8.9). Спектр  $^{13}\text{C}$  ЯМР (100.60 МГц, ДМСО- $d_6$ , 18°C,  $\delta$  / м. д.,  $J$  / Гц): 29.55 (CH $_2$ ), 55.48 (C $\equiv$ CH), 55.78 (OCH $_3$ ), 73.51 (C $\equiv$ CH), 114.77 (C(13), C(15)), 120.30 (C(1)), 121.07 (C(9)), 122.44 (C(8)), 123.58 (C(3)), 127.44 (C(6)), 128.37 (C(8a)), 129.47 (C(4a)), 129.67 (C(12), C(16)); 130.77 (C(11)), 131.54 (C(7)), 131.91 (C(5)), 133.34 (C(2)), 135.77 (C(10)), 142.43 (C(4)), 160.43 (C(14)), 162.93 (C(8b)), 163.28 (C(8c)). Масс-спектр (ИЭР), найдено,  $m/z$ : 368.18; вычислено: 368.13 ([M+H] $^+$ ). Найдено (%): C, 77.08; H, 4.90; N, 3.45. C $_{24}$ H $_{17}$ NO $_3$ ×0.4CH $_3$ OH. Вычислено (%): C, 77.08; H, 4.93; N, 3.68.

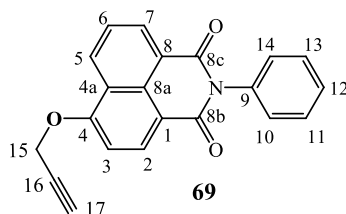
**4-(4-(1,4-Диокса-7,13-дитиа-10-азациклопентадекан-10-ил)стирил)-1-(3-(4-((6-(4-метоксистирил)-1,3-диоксо-1H-бензо[де]изохинолин-2(3H)-ил)метил)-1H-1,2,3-триазол-1-ил)пропил)пиридиния бромид (**68**)**



В соответствии с методикой, предложенной для синтеза соединения **62**, из 48 мг (0.131 ммоль) пропаргилпроиозводного **67**, 77 мг (0.130 ммоль) азида **65**, 45 мкл (0.259 ммоль) диизопропилэтиламина, 10 мг (0.052 ммоль) йодида меди (I) и 3 мл ДМФА получено 20 мг (59%). Реакционную смесь выдерживают при 80°C в течение 25 ч. По окончании реакции растворитель отгоняют в вакууме, сухой остаток очищают флэш-хроматографией на Al $_2$ O $_3$ , используя в качестве элюента градиентную смесь хлористый метилен – метанол. Т. пл. 243 – 244°C. Спектр  $^1\text{H}$  ЯМР (400.13 МГц, ДМСО- $d_6$ , 19°C,  $\delta$  / м. д.,  $J$  / Гц): 2.69 – 2.78 (м, 4H, H(16'), H(23')), 2.78 – 2.90 (м, 4H, H(17'), H(22')), 3.54 – 3.60 (м, 4H, H(19'), H(20')), 3.62 – 3.78 (м, 8H, H(18'), H(21'), H(15'), H(24')), 3.82 (с, 3H, OCH $_3$ ), 4.37 – 4.47 (м, 4H, H(27'), H(25')), 5.30 (с, 2H, H(17)), 6.71 (д, 2H, H(11'), H(13')),  $J$  = 8.6), 7.03 (д, 2H, H(13), H(15),  $J$  = 8.2), 7.11 (д, 1H, H(7'),  $J$  = 16.1), 7.52 – 7.64 (м, 3H, H(10'), H(14'), H(10)), 7.83 (д, 2H, H(12), H(16),  $J$  = 8.2), 7.86 – 7.96 (м, 2H, H(8'), H(6)),

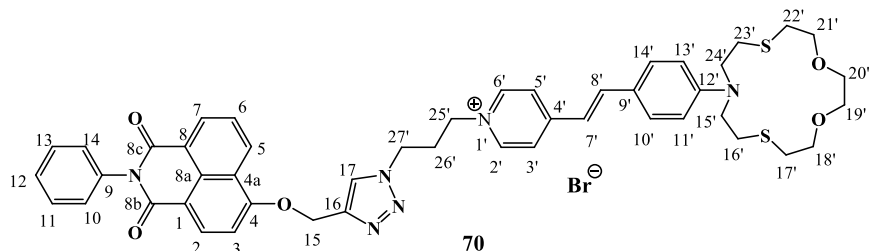
8.01 (д, 2H, H(3'), H(5'),  $J = 6.1$ ), 8.04 – 8.14 (м, 2H, H(19), H(9)), 8.23 (д, 1H, H(3),  $J = 7.9$ ), 8.49 (д, 1H, H(2),  $J = 7.9$ ), 8.56 (д, 1H, H(7),  $J = 7.4$ ), 8.69 (д, 2H, H(2'), H(6'),  $J = 6.1$ ), 9.03 (д, 1H, H(5),  $J = 8.3$ ). Спектр  $^{13}\text{C}$  ЯМР (100.60 МГц, ДМСО- $d_6$ , 18°C,  $\delta$  / м. д.,  $J$  / Гц): 29.47 (C(17'), C(22')), 30.90 (C(26')), 31.34 (C(16'), C(23')), 46.55 (C(27')), 51.82 (C(15'), C(24')), 53.17 (C(25')), 55.70 (OCH<sub>3</sub>), 60.53 (C(17)), 70.47 (C(19'), C(20')), 72.33 (C(18'), C(21')), 112.29 (C(11'), C(13')), 114.78 (C(13), C(15)), 117.69 (C(7')), 120.59 (C(1)), 121.20 (C(9)), 122.31 (C(8)), 122.89 (C(3'), C(5')), 122.93 (C(9')), 123.46 (C(3)), 123.49 (C(19)), 127.79 (C(6)), 128.72 (C(8a)), 129.32 (C(4a)), 129.71 (C(12), C(16)), 130.53 (C(11)), 130.57 (C(10'), C(14')), 131.07 (C(7)), 131.33 (C(2)), 131.90 (C(5)), 135.66 (C(10)), 142.26 (C(8')), 142.35 (C(4)), 143.60 (C(18)), 144.07 (C(2'), C(6')), 149.34 (C(12')), 154.54 (C(4')), 160.48 (C(14)), 163.38 (C(8b)), 163.81 (C(8c)). Масс-спектр высокого разрешения (ИЭР), найдено,  $m/z$ : 881.3522; вычислено: 881.3519 ([C<sub>50</sub>H<sub>53</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub>S<sub>2</sub>]<sup>+</sup>).

## 2-Фенил-6-(проп-2-инилокси)-1Н-бензо[де]изохинолин-1,3(2Н)-дион (69)



В соответствии с методикой, предложенной для синтеза соединения **48**, из 500 мг (1.57 ммоль) нитропроизводного **86**, 413 мкл (7.17 ммоль) пропаргилового спирта и 570 мг (4.13 ммоль) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> получено 479 мг (93%) продукта **69**. Реакционную смесь выдерживают при 80°C в течение 10 ч. Промывка осадка, отфильтрованного из реакционной массы, осуществлялась водой и этиловым спиртом. Т.пл. 190 – 191°C.  $^1\text{H}$  ЯМР (400.02 МГц, ДМСО- $d_6$ , 20°C,  $\delta$  / м.д.,  $J$  / Гц): 3,78 (т, 1H, C≡CH,  $J = 2.2$ ), 5.25 (с, 2H, CH<sub>2</sub>), 7.34 – 7.39 (м, 2H, H(11), H(13)), 7.40 – 7.49 (м, 2H, H(3), H(12)), 7.51 (д, 2H, H(10), H(11),  $J = 7.8$ ), 7.83 – 7.90 (м, 1H, H(6)), 8.45 – 8.54 (м, 2H, H(2), H(7)), 8.58 (д, 1H, H(5),  $J = 8.4$ ). ЯМР  $^{13}\text{C}$  (100.603 МГц, ДМСО- $d_6$ , 25°C,  $\delta$  / м.д.): 57.36 (CH<sub>2</sub>), 78.64 (C≡CH); 79.98 (C≡CH), 107.65 (C(3)), 115.56 (C(1)); 122.58 (C(8)), 123.12 (C(4a)), 126.72 (C(6)), 128.10 (C(12)), 128.34 (C(5)), 128.60 (C(8a)), 128.84 (C(11), C(13)), 129.22 (C(10), C(14)), 131.17 (C(7)), 132.83 (C(2)), 136,18 (C(9)), 158.12 (C(4)), 163.20 (C(8b)), 163.90 (C(8c)). Масс-спектр высокого разрешения (ИЭР), найдено,  $m/z$ : 327.0968, 350.0793; рассчитано: 327.0974 ([M+H]<sup>+</sup>), 350.0793 ([M+Na]<sup>+</sup>).

**(E)-4-(4-(1,4-Диокса-7,13-дитиа-10-азациклопентадекан-10-ил)стирил)-1-(3-(4-((1,3-диоксо-2-фенил-2,3-дигидро-1H-бензо[де]изохинолин-6-илокси)метил)-1H-1,2,3-триазол-1-ил)пропил)пиридиния бромид (70)**



В соответствии с методикой, предложенной для синтеза соединения **62**, из 17 мг (0.05 ммоль) пропаргилпроиозводного **69**, 30 мг (0.05 ммоль) азида **65**, 35 мкл (0.2 ммоль) диизопропилэтиламина, 7 мг (0.04 ммоль) йодида меди (I) и 3 мл ДМФА получено 18 мг (39%). Реакционную смесь выдерживают при 80°C в течение 12 ч. По окончании реакции растворитель отгоняют в вакууме, сухой остаток очищают флэш-хроматографией на Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, используя в качестве элюента градиентную смесь хлористый метилен – метанол. Т.пл. 228 – 229°C. <sup>1</sup>H ЯМР (400.02 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>, 20°C, δ / м.д., J / Гц): 2.55 – 2.63 (м, 2H, H(26')), 2.70 – 2.78 (м, 4H, H(16'), H(23')), 2.79 – 2.89 (м, 4H, H(17'), H(22')), 3.49 – 3.53 (м, 2H, H(27')), 3.54 – 3.61 (м, 4H, H(19'), H(20')), 3.63 – 3.74 (м, 8H, H(18'), H(21'), H(15'), H(24')), 4.48 – 4.59 (м, 2H, H(25')), 5.55 (с, 2H, CH<sub>2</sub>(15)), 6.70 (д, 2H, H(11'), H(13')), J = 7,4), 7.12 (д, 1H, H(7')), J = 16.1), 7.32 – 7.40 (м, 2H, H(11), H(13)), 7.42 – 7.61 (м, 6H, H(10'), H(14'), H(10), H(12), H(14), H(3)), 7.82 – 7.94 (м, 2H, H(6), H(8')), 8.05 (д, 2H, H(3'), H(5')), J = 5.6), 8.39 – 8.49 (м, 2H, H(2), H(17)), 8.50 – 8.60 (м, 2H, H(7), H(5)), 8.74 (д, 2H, H(2'), H(6')), J = 5.6). <sup>13</sup>C ЯМР (100.60 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>, 25°C; δ / м.д.): 29.59 (C(17')), (C(22')), 30.94 (C(26')), 31.15 (C(16'), C(23')), 51.80 (C(18'), C(21')), 56.56 (C(25')), 57.89 (C(27')), 62.97 (C(15)), 70.43 (C(19'), C(20')), 73.64 (C(15'), C(24')), 107.55 (C(3)), 112.24 (C(11'), C(13')), 115.46 (C(1)), 117.82 (C(7')), 122.14 (C(3'), C(5')), 122.87 (C(9')), 122.97 (C(8)), 123.46 (C(4a)), 125.02 (C(17)), 126.37 (C(6)), 128.02 (C(12)), 128.25 (C(5)), 128.50 (C(9)), 126.16 (C(8a)), 129.25 (C(11), C(13)), 129.59 (C(10), C(14)), 130.47 (C(10'), C(14')), 133.13 (C(2)), 133.47 (C(7)), 141.91 (C(8')), 142.06 (C(16)), 144.03 (C(2'), C(6')), 149.31 (C(12')), 153.95 (C(4')), 159.14 (C(4)), 163.32 (C(8b)), 164.37 (C(8c)). Масс-спектр высокого разрешения (ИЭР), найдено, *m/z*: 841.3202; вычислено: 841.3206 ([C<sub>47</sub>H<sub>49</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub>S<sub>2</sub>]<sup>+</sup>).

## 5. ВЫВОДЫ

1. Разработан метод синтеза бисхромофорных систем на основе 1,8-нафталимида и стирилпиридина, в структуре которых присутствует рецепторный *N*-фенилазидитиа-15-краун-5-эфирный фрагмент. Предложен способ введения указанного рецептора в состав заместителя, находящегося в положении 4 нафталимидного ядра.
2. Показано, что 4-метокси- и 4-(ацетил)аминопроизводные 1,8-нафталимида, содержащие остаток *N*-фенилазидитиа-15-краун-5-эфира в качестве заместителя при имидном атоме азота, проявляют свойства флуоресцентных РЕТ-хемосенсоров с «OFF → ON»-типом отклика по отношению к катионам  $\text{Ag}^+$  и  $\text{Hg}^{2+}$  в нейтральном и слабокислом водном растворе на уровне их ПДК, причем селективность комплексообразования может быть изменена путем варьирования рН среды.
3. В случае монохромофоров, в которых атом азота краун-эфирного заместителя входит в сопряженную систему фотоактивного фрагмента (1,8-нафталимида или стирилпиридина), было обнаружено, что связывание катиона  $\text{Hg}^{2+}$  сопровождается гипсохромным сдвигом длинноволновых полос в спектрах поглощения и эмиссии за счет увеличения энергии электронного перехода с внутриморлекулярным переносом заряда (ICT). При этом для нафталимидного производного в комплексе с  $\text{Hg}^{2+}$  наблюдалось тушение флуоресценции, в то время как для краунсодержащего стирилового красителя – разгорание.
4. Сочетание в одной бисхромофорной системе фрагментов 1,8-нафталимида и стирилового красителя обеспечивает эффективный резонансный перенос энергии (RET) на стирилпиридин (акцептор) при возбуждении нафталимидного остатка (донора), благодаря чему спектр испускания содержит полосы обоих флуорофоров. Показано, что модуляция эффективности RET в полученных соединениях при комплексообразовании может достигаться как за счет изменения конкуренции между RET и РЕТ процессами (в RET-парах *типа 1*), так и посредством сдвига ICT-полосы поглощения хромофора-акцептора (в RET-парах *типа 2*). В обоих случаях связывание катиона  $\text{Hg}^{2+}$  приводит к изменению отношения интенсивностей флуоресценции на двух различных длинах волн испускания.
5. Биологические исследования моно- и бисхромофорных хемосенсоров показали, что присутствие нафталимидного фрагмента в структуре соединения существенно влияет на характер внутриклеточного распределения по сравнению с индивидуальным стироловым красителем: последний аккумулируется в митохондриях, в то время как

для конъюгатов «1,8-нафталимид – стирилпиридин» реализуется накопление в лизосомах, либо – в лизосомах и митохондриях. Способность бисхромофорных хемосенсоров продуцировать ратиометрический флуоресцентный отклик сохраняется при переходе от растворов к живым клеткам. Предложен протокол использования данных соединений для количественного определения ионов  $\text{Hg}^{2+}$  в условиях *in vitro* и мониторинга их концентрации в режиме реального времени.

**Перспективы дальнейшей разработки темы диссертации** заключаются в последующем исследовании и применении бисхромофорных RET-систем для флуоресцентной визуализации катионов металлов в водных растворах и биологических средах. С одной стороны, варьирование рецепторного фрагмента в синтезированных бисхромофорных производных может привести к селективным сенсорам на другие катионы металлов, а с другой – введение определенных векторных групп для конкретного типа клеточных органелл в структуру сенсора будет способствовать расширению его биоприменимости.

## 6. Список использованной литературы

1. Ezeajughu, V. I. Heavy metals intoxication: The facts / V. I. Ezeajughu, D. O. Ezeajughu // *World Journal of Advanced Research and Reviews*. – 2024. – Vol. 24. – № 3. – P. 2916-2923.
2. Kiran. Effect of heavy metals: An overview / Kiran, R. Bharti, R. Sharma // *Materials Today: Proceedings*. – 2021. – Vol. 51. – P. 880-885.
3. Toxic Mechanisms of Five Heavy Metals: Mercury, Lead, Chromium, Cadmium, and Arsenic / M. Balali-Mood, K. Naseri, Z. Tahergorabi [et al.] // *Frontiers in Pharmacology*. – 2021. – Vol. 12. – № 643972. – P. 1-19.
4. Environmental mercury and its toxic effects / K. M. Rice, E. M. Walker, M. Wu [et al.] // *Journal of Preventive Medicine and Public Health*. – 2014. – Vol. 47. – № 2. – P. 74-83.
5. Heavy metals: toxicity and human health effects. Vol. 99 / K. Jomova, S. Y. Alomar, E. Nepovimova [et al.]. – Springer Berlin Heidelberg. – 2025. – P. 153-209.
6. Lansdown, A. B. G. A pharmacological and toxicological profile of silver as an antimicrobial agent in medical devices / A. B. G. Lansdown // *Advances in Pharmacological Sciences*. – 2010. – Vol. 2010. – P. 1-17.
7. Walker, M. The biological fate of silver ions following the use of silver-containing wound care products - A review / M. Walker, D. Parsons // *International Wound Journal*. – 2014. – Vol. 11. – № 5. – P. 496-504.
8. Hadrup, N. Oral toxicity of silver ions, silver nanoparticles and colloidal silver - A review / N. Hadrup, H. R. Lam // *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. – 2014. – Vol. 68. – № 1. – P. 1-7.
9. Kakalejčíková, S. Extraction-less green spectrofluorimetric method for determination of mercury using an Astra Phloxine fluorophore: Comprehensive experimental and theoretical studies / S. Kakalejčíková, Y. Bazel, M. Fizer // *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. – 2024. – Vol. 310. – P. 1386-1425.
10. Alizadeh, N. Spectrofluorimetric study of the complexation of ochratoxin A and Cu<sup>2+</sup>: Towards the hybrid fluorimetric sensor and visual detection of ochratoxin A in wheat flour samples from farm to fork / N. Alizadeh, J. Hashemi, F. Shahdost-Fard // *Food Chemistry*. – 2021. – Vol. 350. – P. 1-8.
11. Zinc(II), copper(II) and cadmium(II) complexes as fluorescent chemosensors for cations / R. Pandey, A. Kumar, Q. Xu, D. S. Pandey // *Dalton Transactions*. – 2020. – Vol. 49. – № 3. – P. 542-568.
12. Traven, V. F. Sensory effects of fluorescent organic dyes / V. F. Traven, D. A. Cheptsov // *Russian Chemical Reviews*. – 2020. – Vol. 89. – № 7. – P. 713-749.
13. Recent studies focusing on the development of fluorescence probes for zinc ion / F.

- Wang, K. Wang, Q. Kong [et al.] // *Coordination Chemistry Reviews*. – 2021. – Vol. 429. – P. 213636.
14. New fluorescent chemosensors for metal ions in solution / M. Formica, V. Fusi, L. Giorgi, M. Micheloni // *Coordination Chemistry Reviews*. – 2012. – Vol. 256. – № 1-2. – P. 170-192.
15. Schwarze, T. 1,2,3-Triazol-1,4-diyl-fluoroionophores for  $Zn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  and  $Ca^{2+}$  based on fluorescence intensity enhancements in water / T. Schwarze, T. Sprenger, J. Riemer // *ChemistrySelect*. – 2020. – Vol. 5. – № 41. – P. 12727-12735.
16. A Novel Ratiometric Fluorescent Probe for Mercury (II) ions and Application in Bio-imaging / Q. Gao, Y. Jiao, C. He, C. Duan // *Molecules*. – 2019. – Vol. 24. – № 12. – P. 1-10.
17. FRET Materials for Biosensing and Bioimaging / R. Su, L. Francés-Soriano, P. I. Diriwari [et al.] // *Chemical reviews*. – 2025. – Vol. 125. – № 19. – P. 9429-9551.
18. Förster resonance energy transfer (FRET)-based small-molecule sensors and imaging agents / L. Wu, C. Huang, B. P. Emery [et al.] // *Chemical Society Reviews*. – 2020. – Vol. 49. – № 15. – P. 5110-5139.
19. Dey, N. FRET-based ‘ratiometric’ molecular switch for multiple ions with efficacy towards real-time sampling and logic gate applications / N. Dey, N. Kumari, S. Bhattacharya // *Tetrahedron*. – 2021. – Vol. 85. – P. 132007.
20. Recent advances in ratiometric luminescence sensors / X. Pei, Y. Pan, L. Zhang, Y. Lv // *Applied Spectroscopy Reviews*. – 2021. – Vol. 56. – № 4. – P. 324-345.
21. Liu, L. Ratiometric fluorescence sensing with logical operation: Theory, design and applications / L. Liu, L. Ga, J. Ai // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2022. – Vol. 213. – P. 114456.
22. Recent advances in dual-emission ratiometric fluorescence probes for chemo/biosensing and bioimaging of biomarkers / R. Gui, H. Jin, X. Bu [et al.] // *Coordination Chemistry Reviews*. – 2019. – Vol. 383. – P. 82-103.
23. Recent Progress in Fluorescent Probes For Metal Ion Detection / L. Li, J. Wang, S. Xu [et al.] // *Frontiers in Chemistry*. – 2022. – Vol. 10. – P. 1-15.
24. Recent developments on the colorimetric and fluorometric detection of 3d block metal ions using Schiff base probes / R. Kumar, B. Singh, P. Gahlyan [et al.] // *Journal of Molecular Structure*. – 2023. – Vol. 1289. – P. 135859.
25. Detection and removal of heavy metal ions: a review / L. A. Malik, A. Bashir, A. Qureashi, A. H. Pandith // *Environmental Chemistry Letters*. – 2019. – Vol. 17. – № 4. – P. 1495-1521.
26. Electrochemical detection of heavy metal ions in water / Q. Ding, C. Li, H. Wang [et al.]

// Chemical Communications. – 2021. – Vol. 57. – № 59. – P. 7215-7231.

27. Exploiting the bead-injection approach in the integrated sequential injection lab-on-valve format using hydrophobic packing materials for on-line matrix removal and preconcentration of trace levels of cadmium in environmental and biological samples via fo / M. Miró, S. Jończyk, J. Wang, E. H. Hansen // *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. – 2003. – Vol. 18. – № 2. – P. 89-98.
28. Sardans, J. Determination of As, Cd, Cu, Hg and Pb in biological samples by modern electrothermal atomic absorption spectrometry / J. Sardans, F. Montes, J. Peñuelas // *Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy*. – 2010. – Vol. 65. – № 2. – P. 97-112.
29. Multi-element determination of Cu, Fe, Ni and Zn content in vegetable oils samples by high-resolution continuum source atomic absorption spectrometry and microemulsion sample preparation / L. S. Nunes, J. T. P. Barbosa, A. P. Fernandes [et al.] // *Food Chemistry*. – 2011. – Vol. 127. – № 2. – P. 780-783.
30. Inductively coupled plasma mass spectrometry / T. Van Acker, S. Theiner, E. Bolea-Fernandez [et al.] // *Nature Reviews Methods Primers*. – 2023. – Vol. 3. – № 1. – P. 1-18.
31. Single-cell analysis by use of ICP-MS / S. Theiner, K. Loehr, G. Koellensperger [et al.] // *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. – 2020. – Vol. 35. – № 9. – P. 1784-1813.
32. Determination of Calcium Content in Individual Biological Cells by Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry / T. Nomizu, S. Kaneco, T. Tanaka [et al.] // *Analytical Chemistry*. – 1994. – Vol. 66. – № 19. – P. 3000-3004.
33. Zhao, W. W. Photoelectrochemical detection of metal ions / W. W. Zhao, J. J. Xu, H. Y. Chen // *Analyst*. – 2016. – Vol. 141. – № 14. – P. 4262-4271.
34. Recent progress on carbon nanomaterials for the electrochemical detection and removal of environmental pollutants / Y. N. Zhang, Q. Niu, X. Gu [et al.] // *Nanoscale*. – 2019. – Vol. 11. – № 25. – P. 11992-12014.
35. Electrochemical detection of Bisphenol A with high sensitivity and selectivity using recombinant protein-immobilized graphene electrodes / K. S. Kim, J. ryang Jang, W. S. Choe, P. J. Yoo // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2015. – Vol. 71. – P. 214-221.
36. Facile and green fabrication of size-controlled AuNPs/CNFs hybrids for the highly sensitive simultaneous detection of heavy metal ions / B. Zhang, J. Chen, H. Zhu [et al.] // *Electrochimica Acta*. – 2016. – Vol. 196. – P. 422-430.
37. Li, Z. Detection of pollutants in water bodies: electrochemical detection or photoelectrochemical detection? / Z. Li, M. Zhu // *Chemical Communications*. – 2020. – Vol. 56. – № 93. – P. 14541-14552.
38. A simple but efficient fluorescent sensor for ratiometric sensing of Cd<sup>2+</sup> and bio-imaging

- studies / J. H. Wang, Y. M. Liu, J. Bin Chao [et al.] // *Sensors and Actuators, B: Chemical*. – 2020. – Vol. 303. – P. 127216.
39. A single molecular sensor for selective and differential colorimetric/ratiometric detection of  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Pd}^{2+}$  in 100% aqueous solution / W. Zhou, Q. Gao, D. Liu [et al.] // *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. – 2020. – Vol. 237. – P. 118365.
40. Ratiometric fluorescent nanoprobe for visual detection: Design principles and recent advances - A review / A. Bigdeli, F. Ghasemi, S. Abbasi-Moayed [et al.] // *Analytica Chimica Acta*. – 2019. – Vol. 1079. – P. 30-58.
41. DNA Origami-Based Förster Resonance Energy-Transfer Nanoarrays and Their Application as Ratiometric Sensors / Y. Choi, L. Kotthoff, L. Olejko [et al.] // *ACS Applied Materials and Interfaces*. – 2018. – Vol. 10. – № 27. – P. 23295-23302.
42. Ratiometric fluorescent probe based on symmetric peptidyl receptor with picomolar affinity for  $\text{Zn}^{2+}$  in aqueous solution / P. K. Mehta, E. T. Oh, H. J. Park, K. H. Lee // *Sensors and Actuators, B: Chemical*. – 2017. – Vol. 245. – P. 996-1003.
43. Ratiometric fluorescent sensor based on inhibition of resonance for detection of cadmium in aqueous solution and living cells / L. Xue, G. Li, Q. Liu [et al.] // *Inorganic Chemistry*. – 2011. – Vol. 50. – № 8. – P. 3680-3690.
44. Selective picomolar detection of mercury(II) using optical sensors / C. Díez-Gil, R. Martínez, I. Ratera [et al.] // *Chemical Communications*. – 2011. – Vol. 47. – № 6. – P. 1842-1844.
45. Anthracene based surface acoustic wave sensors for picomolar detection of lead ions. Correlation between experimental results and DFT calculations / G. Attia, S. Rahali, S. Teka [et al.] // *Sensors and Actuators B: Chemical*. – 2018. – Vol. 276. – P. 349-355.
46. Hydrogen Bond-Assisted Colorimetric Picomolar Level Detection of  $\text{Hg}^{2+}$  Ions in 100% Aqueous Solution / P. Yuvaraj, J. Ajantha, M. Karuppusamy [et al.] // *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*. – 2021. – Vol. 9. – № 30. – P. 10309-10317.
47. Fluorescent probes for the detection of disease-associated biomarkers / W. T. Dou, H. H. Han, A. C. Sedgwick [et al.] // *Science Bulletin*. – 2022. – Vol. 67. – № 8. – P. 853-878.
48. Rational design of dual-ligand Eu-MOF for ratiometric fluorescence sensing  $\text{Cu}^{2+}$  ions in human serum to diagnose Wilson's disease / Y. D. Xia, Y. Q. Sun, Y. Cheng [et al.] // *Analytica Chimica Acta*. – 2022. – Vol. 1204. – P. 339731.
49. Quantitative assessment of copper(II) in wilson's disease based on photoacoustic imaging and ratiometric surface-enhanced raman scattering / J. Song, H. Feng, Q. Fu [et al.] // *ACS Nano*. – 2021. – Vol. 15. – № 2. – P. 3402-3414.
50. Synthetic ratiometric fluorescent probes for detection of ions / S. H. Park, N. Kwon, J. H.

- Lee [et al.] // *Chemical Society Reviews*. – 2020. – Vol. 49. – № 1. – P. 143-179.
51. A brief review on novel pyrene based fluorometric and colorimetric chemosensors for the detection of  $\text{Cu}^{2+}$  / Z. Kowser, U. Rayhan, T. Akther [et al.] // *Materials Chemistry Frontiers*. – 2021. – Vol. 5. – № 5. – P. 2173-2200.
52. Панченко, П.А. Флуоресцентные и колориметрические хемосенсоры на катионы на основе производных 1,8-нафталимида: принципы дизайна и механизмы возникновения оптического сигнала / П.А. Панченко, О.А. Федорова, Ю.В. Федоров // *Успехи Химии*. – 2014. – Т. 83. – № 2. – P. 155-182.
53. Nagarajan, R. Recent advancements in the role of N-Heterocyclic receptors on heavy metal ion sensing / R. Nagarajan, C. Varadaraju, K. H. Lee // *Dyes and Pigments*. – 2021. – Vol. 191. – P. 109331.
54. Energy transfer cassettes based on organic fluorophores: Construction and applications in ratiometric sensing / J. Fan, M. Hu, P. Zhan, X. Peng // *Chemical Society Reviews*. – 2013. – Vol. 42. – № 1. – P. 29-43.
55. Roy, A. Dual chemosensors for metal ions: A comprehensive review / A. Roy, M. Nandi, P. Roy // *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. – 2021. – Vol. 138. – P. 116204.
56. Demchenko, A. P. Dual emission and its  $\lambda$ -ratiometric detection in analytical fluorimetry. Pt. I. Basic mechanisms of generating the reporter signal / A. P. Demchenko // *Methods and Applications in Fluorescence*. – 2023. – Vol. 11. – № 3. – P. 033002.
57. Recent advances in turn off-on fluorescence sensing strategies for sensitive biochemical analysis - A mechanistic approach / B. The Huy, D. T. Thangadurai, M. Sharipov [et al.] // *Microchemical Journal*. – 2022. – Vol. 179. – P. 107511.
58. Demchenko, A. P. The concept of  $\lambda$ -ratiometry in fluorescence sensing and imaging / A. P. Demchenko // *Journal of Fluorescence*. – 2010. – Vol. 20. – № 5. – P. 1099-1128.
59. Nanomaterial-Based Dual-Emission Ratiometric Fluorescent / Y. Zhang, D. Hou, Z. Wang [et al.]. – 2021. – Vol. 13. – № 15. – P. 2540.
60. Fluorescent chemosensors: The past, present and future / D. Wu, A. C. Sedgwick, T. Gunnlaugsson [et al.] // *Chemical Society Reviews*. – 2017. – Vol. 46. – № 23. – P. 7105-7123.
61. Chemoselective Alteration of Fluorophore Scaffolds as a Strategy for the Development of Ratiometric Chemodosimeters / X. Zhou, L. Lesiak, R. Lai [et al.] // *Angewandte Chemie - International Edition*. – 2017. – Vol. 56. – № 15. – P. 4197-4200.
62. Chemodosimeters and chemoreactands for sensing ferric ions\* / K. J. Wallace, A. D. G. Johnson, W. S. Jones, E. Manandhar // *Supramolecular Chemistry*. – 2018. – Vol. 30. – № 5-6. – P. 353-383.
63. A reusable ratiometric two-photon chemodosimeter for  $\text{Hg}^{2+}$  detection based on ESIPT

and its application in bioimaging / W. Luo, H. Jiang, K. Zhang [et al.] // *Journal of Materials Chemistry B*. – 2015. – Vol. 3. – № 17. – P. 3459-3464.

64. Estimating weak ratiometric signals in imaging data. I. Dual-channel data / J. Broder, A. Majumder, E. Porter [et al.] // *Journal of the Optical Society of America A*. – 2007. – Vol. 24. – № 9. – P. 2921.

65. Estimating weak ratiometric signals in imaging data II Meta-analysis with multiple, dual-channel datasets / A. Sornborger, J. Broder, A. Majumder [et al.] // *Journal of the Optical Society of America A*. – 2008. – Vol. 25. – № 9. – P. 2185.

66. Recent progress in the development of fluorescent probes for detection of biothiols / J. Dai, C. Ma, P. Zhang [et al.] // *Dyes and Pigments*. – 2020. – Vol. 177. – P. 108321.

67. Grynkiewicz, G. A new generation of  $\text{Ca}^{2+}$  indicators with greatly improved fluorescence properties / G. Grynkiewicz, M. Poenie, R. Y. Tsien // *Journal of Biological Chemistry*. – 1985. – Vol. 260. – № 6. – P. 3440-3450.

68. Ratiometric two-photon fluorescence probes for sensing, imaging and biomedicine applications at living cell and small animal levels / H. Jin, M. Yang, Z. Sun, R. Gui // *Coordination Chemistry Reviews*. – 2021. – Vol. 446. – P. 214114.

69. Sharma, S. Recent advances (2017–20) in the detection of copper ion by using fluorescence sensors working through transfer of photo-induced electron (PET), excited-state intramolecular proton (ESIPT) and Förster resonance energy (FRET) / S. Sharma, K. S. Ghosh // *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. – 2021. – Vol. 254. – P. 119610.

70. Lee, M. H. Small molecule-based ratiometric fluorescence probes for cations, anions, and biomolecules / M. H. Lee, J. S. Kim, J. L. Sessler // *Chemical Society Reviews*. – 2015. – Vol. 44. – № 13. – P. 4185-4191.

71. Escudero, D. Revising Intramolecular Photoinduced Electron Transfer (PET) from First-Principles / D. Escudero // *Accounts of Chemical Research*. – 2016. – Vol. 49. – № 9. – P. 1816-1824.

72. Fluorescent chemosensors manipulated by dual/triple interplaying sensing mechanisms / L. He, B. Dong, Y. Liu, W. Lin // *Chemical Society Reviews*. – 2016. – Vol. 45. – № 23. – P. 6449-6461.

73. A water soluble ESIPT-based fluorescent chemodosimeter for the ratiometric detection of palladium ions in aqueous solution and its application in live-cell imaging / J. Huang, Y. Ding, H. Fu [et al.] // *New Journal of Chemistry*. – 2018. – Vol. 42. – № 19. – P. 15587-15592.

74. Coumarin-Based Small-Molecule Fluorescent Chemosensors / D. Cao, Z. Liu, P. Verwilt [et al.] // *Chemical Reviews*. – 2019. – Vol. 119. – № 18. – P. 10403-10519.

75. Colorimetric chemosensors for d-metal ions: A review in the past, present and future prospect / S. Upadhyay, A. Singh, R. Sinha [et al.] // *Journal of Molecular Structure*. – 2019. – Vol. 1193. – P. 89-102.
76. Colorimetric and fluorescent Schiff base sensors for trace detection of pollutants and biologically significant cations: A review (2010–2021) / A. Kumar, Virender, M. Saini [et al.] // *Microchemical Journal*. – 2022. – Vol. 181. – P. 107798.
77. Jain, N. A comprehensive compendium of literature of 1,8-Naphthalimide based chemosensors from 2017 to 2021 / N. Jain, N. Kaur // *Coordination Chemistry Reviews*. – 2022. – Vol. 459. – P. 214454.
78. Recent Developments in Rhodamine-Based Chemosensors: A Review of the Years 2018–2022 / Y. Wang, X. Wang, W. Ma [et al.] // *Chemosensors*. – 2022. – Vol. 10. – № 10. – P. 399.
79. Khan, D. Coumarin-based fluorescent sensors / D. Khan, Shaily // *Applied Organometallic Chemistry*. – 2023. – Vol. 37. – № 7. – P. 1-20.
80. Fluorescent probes for the detection of magnesium ions ( $Mg^{2+}$ ): From design to application / M. Liu, X. Yu, M. Li [et al.] // *RSC Advances*. – 2018. – Vol. 8. – № 23. – P. 12573-12587.
81. Valeur, B. Design principles of fluorescent molecular sensors for cation recognition / B. Valeur, I. Leray // *Coordination Chemistry Reviews*. – 2000. – Vol. 205. – № 1. – P. 3-40.
82. Enbanathan, S. A novel phenanthridine and terpyridine based D- $\pi$ -A fluorescent probe for the ratiometric detection of  $Cd^{2+}$  in environmental water samples and living cells / S. Enbanathan, S. K. Iyer // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. – 2022. – Vol. 247. – P. 114272.
83. A combined theoretical and experimental study of ratiometric fluorescent Schiff base chemosensor for detection of  $Fe^{3+}$  ion and its anticancer activity / M. Mustufa, A. Abbasi, S. Hanif [et al.] // *Chemistry of Inorganic Materials*. – 2023. – Vol. 1. – P. 100011.
84. A dual-channel colorimetric and ratiometric fluorescence chemosensor for detection of  $Hg^{2+}$  ion and its bioimaging applications / P. Ravichandiran, V. K. Kaliannagounder, N. Maroli [et al.] // *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. – 2021. – Vol. 257. – P. 119776.
85. Pearson, R. G. Hard and Soft Acids and Bases / R. G. Pearson // *Journal of the American Chemical Society*. – 1963. – Vol. 85. – № 22. – P. 3533-3539.
86. Highly sensitive fluorescent sensor for copper (II) based on amplified fluorescence quenching of a water-soluble NIR emitting conjugated polymer / L. Sun, D. Hao, W. Shen [et al.] // *Microchimica Acta*. – 2012. – Vol. 177. – № 3-4. – P. 357-364.
87. Benzimidazole-based bifunctional ratiometric turn-on sensor with an ICT effect for trapping

- of  $H^+$  and  $Al^{3+}$  in dual-channel cell imaging and samples / Y. Zhang, Y. Zhao, Y. Wu [et al.] // *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. – 2021. – Vol. 247. – P. 119123.
88. An Endoplasmic Reticulum-Targeted Ratiometric Fluorescent Molecule Reveals  $Zn^{2+}$  Micro-Dynamics During Drug-Induced Organelle Ionic Disorder / H. Fang, Y. Li, S. Yao [et al.] // *Frontiers in Pharmacology*. – 2022. – Vol. 13. – P. 927609.
89. Zinc transporter-3 knockout mice demonstrate age-dependent alterations in the metalloproteome / S. M. Hancock, S. D. Portbury, A. P. Gunn [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2020. – Vol. 21. – № 3. – P. 1-11.
90. TPEN, a  $Zn^{2+}/Fe^{2+}$  chelator with low affinity for  $Ca^{2+}$ , inhibits lamin assembly, destabilizes nuclear architecture and may independently protect nuclei from apoptosis *in vitro* / D. K. Shumaker, L. R. Vann, M. W. Goldberg [et al.] // *Cell Calcium*. – 1998. – Vol. 23. – № 2-3. – P. 151-164.
91. Demchenko, A. P. Introduction to Fluorescence Sensing. *Introd. to Fluoresc. Sens.* / A. P. Demchenko. – Springer. – 2015. – P. 295 – 309.
92. Direct evidence of a blocking heavy atom effect on the water-assisted fluorescence enhancement detection of  $Hg^{2+}$  based on a ratiometric chemosensor / X. L. Ni, Y. Wu, C. Redshaw, T. Yamato // *Journal of the Chemical Society. Dalton Transactions*. – 2014. – Vol. 43. – № 33. – P. 12633-12638.
93. A novel colorimetric and fluorescent chemosensor: synthesis and selective detection for  $Cu^{2+}$  and  $Hg^{2+}$  / H. Mu, R. Gong, Q. Ma [et al.] // *Tetrahedron Letters*. – 2007. – Vol. 48. – № 31. – P. 5525-5529.
94. Rurack, K. Flipping the light switch “ON” - The design of sensor molecules that show cation-induced fluorescence enhancement with heavy and transition metal ions / K. Rurack // *Spectrochimica Acta - Part A Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. – 2001. – Vol. 57. – № 11. – P. 2161-2195.
95. A new ratiometric fluorescent chemodosimeter based on an ICT modulation for the detection of  $Hg^{2+}$  / J. Hu, Z. Hu, S. Liu [et al.] // *Sensors and Actuators, B: Chemical*. – 2016. – Vol. 230. – P. 639-644.
96. A novel ratiometric fluorescent probe based on a BODIPY derivative for  $Cu^{2+}$  detection in aqueous solution / T. Shu, Z. Yang, Z. Cen [et al.] // *Analytical Methods*. – 2018. – Vol. 10. – № 48. – P. 5755-5762.
97. Design of ICT-PET fluorescent probes for zinc(II) based on 5-aryl-2,20-bipyridines / D. S. Kopchuk, A. M. Prokhorov, P. A. Slepukhin, D. N. Kozhevnikov // *Tetrahedron Letters*. – 2012. – Vol. 53. – № 46. – P. 6265-6268.

98. Erdemir, S. A NIR fluorescent sensor based on thiazoline-isophorone with low cytotoxicity in living cells for  $\text{Hg}^{2+}$  detection through ICT associated hydrogen bonding effect / S. Erdemir, M. Oguz, S. Malkondu // *Analytica Chimica Acta*. – 2022. – Vol. 1192. – P. 339353.
99. Comparative analysis of the PET and ICT sensor properties of 1,8-naphthalimides containing aza-15-crown-5 ether moiety / P. A. Panchenko, Y. V. Fedorov, O. A. Fedorova, G. Jonusauskas // *Dyes and Pigments*. – 2013. – Vol. 98. – № 3. – P. 347-357.
100. Advances in FRET-based biosensors from donor-acceptor design to applications / W. C. Yang, S. Y. Li, S. Ni, G. Liu // *Aggregate*. – 2024. – Vol. 5. – № 2. – P. 1-22.
101. Signaling recognition events with fluorescent sensors and switches / A. P. De Silva, H. Q. N. Gunaratne, T. Gunnlaugsson [et al.] // *Chemical Reviews*. – 1997. – Vol. 97. – № 5. – P. 1515-1566.
102. Demchenko, A. P. The problem of self-calibration of fluorescence signal in microscale sensor systems / A. P. Demchenko // *Lab on a Chip*. – 2005. – Vol. 5. – № 11. – P. 1210-1223.
103. Water-soluble fluorescent sensor for  $\text{Zn}^{2+}$  with high selectivity and sensitivity imaging in living cells / D. Liu, T. Zhang, M. Zhang [et al.] // *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. – 2020. – Vol. 30. – № 8. – P. 127073.
104. Wang, P. A fluorescent dansyl-based peptide probe for highly selective and sensitive detect  $\text{Cd}^{2+}$  ions and its application in living cell imaging / P. Wang, D. Zhou, B. Chen // *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. – 2019. – Vol. 207. – P. 276-283.
105. Ashokkumar, P. Photoinduced electron transfer (PET) based  $\text{Zn}^{2+}$  fluorescent probe: Transformation of turn-on sensors into ratiometric ones with dual emission in acetonitrile / P. Ashokkumar, V. T. Ramakrishnan, P. Ramamurthy // *Journal of Physical Chemistry A*. – 2011. – Vol. 115. – № 50. – P. 14292-14299.
106. Li, Y. Ratiometric and selective fluorescent sensor for  $\text{F}^-$  based on intramolecular charge transfer (ICT) / Y. Li, H. Lin, H. Lin // *Journal of Fluorescence*. – 2010. – Vol. 20. – № 6. – P. 1299-1305.
107. A novel fluorophore with dual fluorescence: Local excited state and photoinduced electron-transfer-promoted charge-transfer state / V. Thiagarajan, C. Selvaraju, E. J. P. Malar, P. Ramamurthy // *ChemPhysChem*. – 2004. – Vol. 5. – № 8. – P. 1200-1209.
108. Sasaki, S. Recent advances in twisted intramolecular charge transfer (TICT) fluorescence and related phenomena in materials chemistry / S. Sasaki, G. P. C. Drummen, G. I. Konishi // *Journal of Materials Chemistry C*. – 2016. – Vol. 4. – № 14. – P. 2731-2743.
109. Chen, C. Fluorescence Modulation by Amines: Mechanistic Insights into Twisted Intramolecular Charge Transfer (TICT) and Beyond / C. Chen, C. Fang // *Chemosensors*. – 2023.

– Vol. 11. – № 2. – P. 1-32.

110. A cyanobiphenyl-based ratiometric fluorescent sensor for highly selective and sensitive detection of  $Zn^{2+}$  / F. Bie, H. Cao, P. Yan [et al.] // *Inorganica Chimica Acta*. – 2020. – Vol. 508. – P. 119652.

111. Liang, J. Pyrene-based ratiometric and fluorescent sensor for selective  $Al^{3+}$  detection / J. Liang, H. B. Liu, J. Wang // *Inorganica Chimica Acta*. – 2019. – Vol. 489. – P. 61-66.

112. Phapale, D. Selective recognition of Cu (II) and Fe (III) using a pyrene based chemosensor / D. Phapale, A. Gaikwad, D. Das // *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. – 2017. – Vol. 178. – P. 160-165.

113. An FRET-based ratiometric chemosensor for in vitro cellular fluorescence analyses of pH / X. Zhou, F. Su, H. Lu [et al.] // *Biomaterials*. – 2012. – Vol. 33. – № 1. – P. 171-180.

114. Weller, A. Fluorescence of salicylic acid and related compounds / A. Weller // *Naturwissenschaften*. – 1955. – Vol. 42. – P. 175-176.

115. Excited-state intramolecular proton-transfer (ESIPT) based fluorescence sensors and imaging agents / A. C. Sedgwick, L. Wu, H. H. Han [et al.] // *Chemical Society Reviews*. – 2018. – Vol. 47. – № 23. – P. 8842-8880.

116. Ratiometric sensing of  $Zn^{2+}$  with a new benzothiazole-based fluorescent sensor and living cell imaging / Q. Wu, L. Feng, J. Bin Chao [et al.] // *Analyst*. – 2021. – Vol. 146. – № 13. – P. 4348-4356.

117. Exploiting the biological windows: Current perspectives on fluorescent bioprobes emitting above 1000 nm / E. Hemmer, A. Benayas, F. Légaré, F. Vetrone // *Nanoscale Horizons*. – 2016. – Vol. 1. – № 3. – P. 168-184.

118. A Turn on ESIPT Probe for Rapid and Ratiometric Fluorogenic Detection of  $Hg^{2+}$  and its Application in Live-Cell Imaging / D. Zhang, J. Liu, H. Yin [et al.] // *Journal of Fluorescence*. – 2016. – Vol. 26. – № 4. – P. 1367-1372.

119. Water-Mediated Structural Tunability of Alkyl / siloxane Hybrid: from Amorphous to Lamellar Structure or Bilamellar Superstructure / S. C. Nunes, N. J. O. Silva, J. Hümmer [et al.]. // *Journal of Materials* – 2012. – Vol. 2. – P. 2087-2099.

120. Rhodamine-based ratiometric fluorescent probes based on excitation energy transfer mechanisms: Construction and applications in ratiometric sensing / R. Zhang, F. Yan, Y. Huang [et al.] // *RSC Advances*. – 2016. – Vol. 6. – № 56. – P. 50732-50760.

121. Through bond energy transfer (TBET)-based fluorescent chemosensors / D. Cao, L. Zhu, Z. Liu, W. Lin // *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*. – 2020. – Vol. 44. – P. 100371.

122. Single-vesicle intensity and colocalization fluorescence microscopy to study lipid vesicle

- fusion, fission, and lipid exchange / A/ Andersson, M/ Fornasier, K. Makasewicz // *Frontiers in Molecular Neuroscience*. – 2022. – Vol. 15. – P. 1-13.
123. Resonance Energy Transfer / D. L. Andrews, D. S. Bradshaw, R. Dinshaw, G. D. Scholes // *Photonics: Scientific Foundations, Technology and Applications*. – 2015. – Vol. 4. – P. 101-127.
124. Speiser, S. Photophysics and mechanisms of intramolecular electronic energy transfer in bichromophoric molecular systems: Solution and supersonic jet studies / S. Speiser // *Chemical Reviews*. – 1996. – Vol. 96. – № 6. – P. 1953-1976.
125. Through-bond energy transfer cassettes with minimal spectral overlap between the donor emission and acceptor absorption: Coumarin-rhodamine dyads with large pseudo-stokes shifts and emission shifts / W. Lin, L. Yuan, Z. Cao [et al.] // *Angewandte Chemie - International Edition*. – 2010. – Vol. 49. – № 2. – P. 375-379.
126. Turn-On fluorescence resonance energy transfer (FRET)-based electrospun fibrous membranes: Rapid and ultrasensitive test strips for on-site detection of Mercury (II) ion / K. Tonsomboon, P. Noppakudrittidej, S. Sutikulsombat [et al.] // *Sensors and Actuators B: Chemical*. – 2021. – Vol. 344. – P. 130212.
127. Holten, D. Probing electronic communication in covalently linked multiporphyrin arrays. A guide to the rational design of molecular photonic devices / D. Holten, D. F. Bocian, J. S. Lindsey // *Accounts of Chemical Research*. – 2002. – Vol. 35. – № 1. – P. 57-69.
128. Chemiluminescent energy-transfer cassettes based on fluorescein and Nile red / J. Han, J. Jose, E. Mei, K. Burgess // *Angewandte Chemie - International Edition*. – 2007. – Vol. 46. – № 10. – P. 1684-1687.
129. An indole-rhodamine-based ratiometric fluorescent probe for Pd<sup>2+</sup> determination and cell imaging / W. Luo, M. Lei, Y. Wang [et al.] // *Analytical Methods*. – 2019. – Vol. 11. – № 8. – P. 1080-1086.
130. Facile Synthesis of Water-Soluble Rhodamine-Based Polymeric Chemosensors via Schiff Base Reaction for Fe<sup>3+</sup> Detection and Living Cell Imaging / X. Qiu, J. Huang, N. Wang [et al.] // *Frontiers in Chemistry*. – 2022. – Vol. 10. – P. 1-11.
131. Controllable FRET processes towards ratiometric Fe<sup>3+</sup> ion sensor of pseudo [3]rotaxane containing naphthalimide-based macrocyclic host donor and multi-stimuli responsive rhodamine-modified guest acceptor / T. T. K. Cuc, P. Q. Nhien, T. M. Khang [et al.] // *Dyes and Pigments*. – 2022. – Vol. 197. – P. 109907.
132. FRET based ratiometric switch for selective sensing of Al<sup>3+</sup> with bio-imaging in human peripheral blood mononuclear cells / S. Das, P. Pratim Das, J. W. Walton [et al.] // *New Journal of Chemistry*. – 2021. – Vol. 45. – № 4. – P. 1853-1862.

133. Reversible FRET Fluorescent Probe for Ratiometric Tracking of Endogenous Fe<sup>3+</sup> in Ferroptosis / J. Gao, Y. He, Y. Chen [et al.] // *Inorganic Chemistry*. – 2020. – Vol. 59. – № 15. – P. 10920-10927.
134. Study on synthesis and fluorescence property of rhodamine–naphthalene conjugate / J. can Qin, Z. hai Fu, L. mei Tian, Z. yin Yang // *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. – 2020. – Vol. 229. – P. 117868.
135. A ratiometric fluorescence sensor for Fe<sup>3+</sup> based on FRET and PET processes / Y. Hu, J. Wang, L. Long, X. Xiao // *Luminescence*. – 2016. – Vol. 31. – № 1. – P. 16-21.
136. A novel dual-switch fluorescent probe for Cr(III) ion based on PET–FRET processes / F. Hu, B. Zheng, D. Wang [et al.] // *Analyst*. – 2013. – Vol. 139. – № 14. – P. 3607-3613.
137. Ghosh, S. A rhodamine based chemodosimeter for the detection of Group 13 metal ions / S. Ghosh, P. Roy // *Analytical Methods*. – 2022. – Vol. 15. – № 1. – P. 17-26.
138. A novel FRET fluorescent probe based on BODIPY- rhodamine system for Hg<sup>2+</sup> imaging in living cells / D. Wen, X. Deng, G. Xu [et al.] // *Journal of Molecular Structure*. – 2021. – Vol. 1236. – P. 130323.
139. A ratiometric and colorimetric fluorescent probe for the detection of mercury ion based on rhodamine and quinoline–benzothiazole conjugated dyad / Z. Zhu, H. Ding, Y. Wang [et al.] // *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. – 2020. – Vol. 400. – P. 112657.
140. Zheng, Q. Development of photostable fluorophores for molecular imaging / Q. Zheng, L. D. Lavis // *Current Opinion in Chemical Biology*. – 2017. – Vol. 39. – № 1. – P. 32-38.
141. Fu Y. Small-molecule fluorescent probes and their design / Y. Fu, N. S. Finney // *RSC Advances*. – 2018. – Vol. 8. – № 51. – P. 29051-29061.
142. A phthalocyanine-porphyrin triad for ratiometric fluorescent detection of Lead(II) ions / D. Qi, J. Zhang, D. Zhang [et al.] // *Dyes and Pigments*. – 2020. – Vol. 173. – P. 107941.
143. Porphyrinoids for Chemical Sensor Applications / R. Paollesse, S. Nardis, D. Monti [et al.] // *Chemical Reviews*. – 2017. – Vol. 117. – № 4. – P. 2517-2583.
144. A synergetic FRET/ICT platform-based fluorescence probe for ratiometric imaging of bisulfite in lipid droplets / Y. H. Yan, X. L. Cui, Z. Y. Li [et al.] // *Analytica Chimica Acta*. – 2020. – Vol. 1137. – P. 47-55.
145. A more flexible long-chain bis(salamo)-like fluorescent probe based on FRET and ICT effects for the identification of aluminum ion in the environment and plants / X. X. Li, M. X. Du, C. Y. Ma [et al.] // *Journal of Molecular Structure*. – 2024. – Vol. 1295. – № P1. – P. 136792.
146. A FRET-based fluorescent Zn<sup>2+</sup> sensor: 3D ratiometric imaging, flow cytometric tracking and cisplatin-induced Zn<sup>2+</sup> fluctuation monitoring / H. Xu, C. Zhu, Y. Chen [et al.] // *Chemical Science*. – 2020. – Vol. 11. – № 40. – P. 11037-11041.

147. Endogenous concentrations of biologically relevant metals in rat brain and cochlea determined by inductively coupled plasma mass spectrometry / S. R. Wegst-Uhrich, E. J. Mullin, D. Ding [et al.] // *BioMetals*. – 2015. – Vol. 28. – № 1. – P. 187-196.
148. A highly sensitive and selective ratiometric fluorescent sensor for Zn<sup>2+</sup> ion based on ICT and FRET / X. Chen, Y. Ma, H. Chen [et al.] // *Dyes and Pigments*. – 2014. – Vol. 102. – P. 301-307.
149. Development of fluorescent sensors based on a combination of PET (photo-induced electron transfer) and FRET (Förster resonance energy transfer) for detection of water / D. Jinbo, K. Ohira, K. Imato, Y. Ooyama // *Materials Advances*. – 2020. – Vol. 1. – № 3. – P. 354-362.
150. FRET versus PET: Ratiometric chemosensors assembled from naphthalimide dyes and crown ethers / P. A. Panchenko, Y. V. Fedorov, O. A. Fedorova, G. Jonusauskas // *Physical Chemistry Chemical Physics*. – 2015. – Vol. 17. – № 35. – P. 22749-22757.
151. Cation-dependent spectral properties of fluorescent complexon based on 1,8-naphthalimide with PET mechanism of optical response / P. A. Panchenko, V. V. Park, O. A. Fedorova [et al.] // *Russian Chemical Bulletin*. – 2015. – Vol. 64. – № 8. – P. 1871-1876.
152. TBET-based ratiometric fluorescent probe for Hg<sup>2+</sup> with large pseudo-Stokes shift and emission shift in aqueous media and intracellular colorimetric imaging in live Hela cells / X. Yang, X. Qin, Y. Li [et al.] // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2018. – Vol. 121. – № 336. – P. 62-71.
153. A TBET-based ratiometric probe for Au<sup>3+</sup> and its application in living cells / X. Han, L. Zhao, D. E. Wang [et al.] // *Analyst*. – 2016. – Vol. 141. – № 3. – P. 1098-1104.
154. Habib, A. Oxidative DNA damage induced by HEPES (2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl] ethanesulfonic acid) buffer in the presence of Au(III) / A. Habib, M. Tabata // *Journal of Inorganic Biochemistry*. – 2004. – Vol. 98. – № 11. – P. 1696-1702.
155. A sensitive ratiometric fluorescent chemosensor for visual and wearable mercury (II) recognition in river prawn and water samples / M. Qi, Z. Zhang, L. Li [et al.] // *Food Chemistry*. – 2023. – Vol. 408. – P. 135211.
156. Syntheses, photophysical properties, and application of through-bond energy-transfer cassettes for biotechnology / G. S. Jiao, L. H. Thoresen, T. G. Kim [et al.] // *Chemistry - A European Journal*. – 2006. – Vol. 12. – № 30. – P. 7816-7826.
157. Application of RET Approach for Ratiometric Response Enhancement of ICT Fluorescent Hg<sup>2+</sup> Probe based on Crown-containing Styrylpyridinium Dye / P. A. Panchenko, A. V. Efremenko, A. S. Polyakova [et al.] // *Chemistry - An Asian Journal*. – 2024. – Vol. 19. – № 24. – Art. № e202400777.
158. A naphthalimide-based fluorescent and colorimetric probe for the detection of

mercury(II) ions in aqueous solutions and in living cells / A. S. Polyakova, P. A. Panchenko, A. V. Efremenko [et al.] // *Mendeleev Communications*. – 2024. – Vol. 34. – № 3. – P. 418-420.

159. Ратиометрический флуоресцентный хемосенсор на катионы Hg(II) в водном растворе на основе краунсодержащей бисхромофорной системы «1,8-нафталимид – стирилпиридин» / П.А. Панченко, А.С. Полякова, М.А. Устимова [и др.] // *Известия Академии наук. Серия химическая*. – 2024. – Т.73. – №10. – P. 2921-2935.

160. Панченко П.А., Сайфутярова А.Э., Иванова М.И., Полякова А.С., Федоров Ю.В., Федорова О.А. Синтез и изучение сенсорных свойств бисхромофорных систем на основе 1,8-нафталимида и стирилпиридина, содержащих олигогликолиевый рецепторный фрагмент // *Известия Академии наук. Серия химическая*. – 2024. – Т. 73. – № 4. – С. 849–862.

161. Fluorescent RET-Based Chemosensor Bearing Ratiometric Detection of Hg<sup>2+</sup> and Its Bio-Application / P. A. Panchenko, A. V. Efremenko, A. S. Polyakova [et al.] // *Biosensors*. – 2022. – Vol. 12. – № 39. – P. 770.

162. Панченко П.А., Полякова А.С., Федоров Ю.В., Федорова О.А. Изучение катионозависимого резонансного переноса энергии в краунсодержащей бисхромофорной системе на основе 4-метокси- и 4-стирил-1,8-нафталимида // *Макрогетероциклы*. – 2022. – Т. 15. – №1. – С 44–52.

163. Панченко П.А., Полякова А.С., Федоров Ю.В., Федорова О.А. Флуоресцентный хемосенсор на катионы ртути (II) в водном растворе на основе производного 4-(ацетил)амино-1,8-нафталимида, содержащего *N*-фенилазидитиа-15-краун-5-эфирный рецептор // *Известия Академии наук. Серия химическая*. – 2021. – Т. 70. – № 10. – С. 1939–1945.

164. Fluorimetric detection of Ag<sup>+</sup> cations in aqueous solutions using a polyvinyl chloride sensor film doped with crown-containing 1,8-naphthalimide / P. A. Panchenko, Y. V. Fedorov, A. S. Polyakova, O. A. Fedorova // *Mendeleev Communications*. – 2021. – Vol. 31. – № 4. – P. 517-519.

165. Chemoselective detection of Ag<sup>+</sup> in purely aqueous solution using fluorescence ‘turn-on’ probe based on crown-containing 4-methoxy-1,8-naphthalimide / P. A. Panchenko, A. S. Polyakova, Y. V. Fedorov, O. A. Fedorova // *Mendeleev Communications*. – 2019. – Vol. 29. – № 2. – P. 155-157.

166. Investigation of synthesis, characterization, photophysical and biological properties of novel antimicrobial fluorescent naphthalimide derivatives / H. Shaki, A. Khosravi, K. Gharanjig, A. Mahboubi // *Materials Technology*. – 2016. – Vol. 31. – № 6. – P. 322-331.

167. 1,8-Naphthalimide-based fluorescent chemosensors: recent advances and perspectives /

H. Q. Dong, T. B. Wei, X. Q. Ma [et al.] // *Journal of Materials Chemistry C*. – 2020. – Vol. 8. – № 39. – P. 13501-13529.

168. Expanding the Breadth of 4-Amino-1,8-naphthalimide Photophysical Properties through Substitution of the Naphthalimide Core / K. G. Leslie, D. Jacquemin, E. J. New, K. A. Jolliffe // *Chemistry - A European Journal*. – 2018. – Vol. 24. – № 21. – P. 5569-5573.

169. Thiourea based molecular dyad (ANTU): Fluorogenic Hg<sup>2+</sup> selective chemodosimeter exhibiting blue-green fluorescence in aqueous-ethanol environment / P. Srivastava, R. Ali, S. S. Razi [et al.] // *Sensors and Actuators, B: Chemical*. – 2013. – Vol. 181. – P. 584-595.

170. Spectroscopic properties of aromatic dicarboximides / V. Wingtens, P. Valat, J. Kossanyi, L. Biczók // *Journal of chemical society faraday transaction*. – 1994. – Vol. 90. – № 3. – P. 411-421.

171. Comprehensive model of the photophysics of W-phenylnaphthalimides: The role of solvent and rotational relaxation / A. Demeter, T. Berces, L. Biczok [et al.] // *Journal of Physical Chemistry*. – 1996. – Vol. 100. – № 6. – P. 2001-2011.

172. Perkin, J. C. S. I. 1302 J.C.S. Perkin II / J. C. S. I. Perkin. – 1977. – Vol. 2. – № 1302. – P. 1302-1308.

173. Electronic properties of 4-substituted naphthalimides / P. Kucheryavy, G. Li, S. Vyas [et al.] // *Journal of Physical Chemistry A*. – 2009. – Vol. 113. – № 23. – P. 6453-6461.

174. Brown, R. G. The UV-Visible Absorption and Fluorescence of some Substituted 1,8-Naphthalimides and Naphthalic Anhydrides / R. G. Brown, D. Wa, P. Brittain // *Journal of the Chemical Society*. – 1990. – Vol. 2. – P. 837-842.

175. Synthesis and photophysical properties of some novel fluorescent dyes based on naphthalimide derivatives / H. Shaki, K. Gharanjig, S. Rouhani, A. Khosravi // *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. – 2010. – Vol. 216. – № 1. – P. 44-50.

176. Solvent influence on the photophysical properties of 4-methoxy-N-methyl-1,8-naphthalimide / G. J. F. Demets, E. R. Triboni, E. B. Alvarez [et al.] // *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. – 2006. – Vol. 63. – № 1. – P. 220-226.

177. Experimental and theoretical study of the intramolecular charge transfer on the derivatives 4-methoxy and 4-acetamide 1,8-naphthalimide N-substituted / E. Martín, J. L. G. Coronado, J. J. Camacho, A. Pardo // *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. – 2005. – Vol. 175. – № 1. – P. 1-7.

178. Ushakov, E. N. Crown ether-based optical molecular sensors and photocontrolled ionophores / E. N. Ushakov, M. V. Alfimov, S. P. Gromov // *Macrocyclic Chemistry*. – 2010. – Vol. 3. – № 4. – P. 189-200.

179. Heterocyclic Crown Ethers with Potential Biological and Pharmacological Properties:

From Synthesis to Applications / F. Ullah, T. A. Khan, J. Iltaf [et al.] // Applied Sciences. – 2022. – Vol. 12. – № 3. – P. 1102.

180. Cation-dependent fluorescent properties of naphthalimide derivatives with *N*-benzocrown ether fragment / P. A. Panchenko, Y. V. Fedorov, V. P. Perevalov [et al.] // Journal of Physical Chemistry A. – 2010. – Vol. 114. – № 12. – P. 4118-4122.

181. Hybrid sensor materials based on tin(IV) oxide and crown-containing 4-amino-1,8-naphthalimides / P. A. Panchenko, Y. V. Fedorov, O. A. Fedorova [et al.] // Mendeleev Communications. – 2011. – Vol. 21. – № 1. – P. 12-14.

182. Synthesis and sensor properties of crown-containing derivatives of 4-(1,5-diphenyl- $\Delta^2$ -pyrazolin-3-yl)-1,8-naphthalimide / A. N. Sergeeva, P. A. Panchenko, Y. V. Fedorov, O. A. Fedorova // Protection of Metals and Physical Chemistry of Surfaces. – 2012. – Vol. 48. – № 5. – P. 524-533.

183. Ratiometric detection of mercury (II) ions in living cells using fluorescent probe based on bis(styryl) dye and azadithia-15-crown-5 ether receptor / P. A. Panchenko, A. V. Efremenko, A. V. Feofanov [et al.] // Sensors. – 2021. – Vol. 21. – № 2. – P. 1-15.

184. Yang, Z. Cuproptosis and Cu: a new paradigm in cellular death and their role in non-cancerous diseases / Z. Yang, R. Feng, H. Zhao // Apoptosis. – 2024. – Vol. 29. – № 9-10. – P. 1330-1360.

185. Binesh A. Copper in Human Health and Disease: A Comprehensive Review / A. Binesh, K. Venkatachalam // Journal of Biochemical and Molecular Toxicology. – 2024. – Vol. 38. – № 11. – P. 1-14.

186. Copper Dyshomeostasis In Neurodegenerative Diseases / M. Maffia, M. Greco, F. Rizzo [et al.] // Acta Physiologica. – 2019. – Vol. 227. – P. 58.

187. Osredkar, J. Copper and Zinc, Biological Role and Significance of Copper/Zinc Imbalance / J. Osredkar, N. Sustar // Journal of Clinical Toxicology. – 2011. – Vol. 3. – P. 2-18.

188. Von Burg, R. Inorganic mercury / R. Von Burg // Journal of applied toxicology. – 1995. – Vol. 15. – № 6. – P. 483-493.

189. Harris, H. H. The chemical form of mercury in fish / H. H. Harris, I. J. Pickering, G. N. George // Science. – 2003. – Vol. 301. – № 5637. – P. 1203.

190. Lee S. Y. A fluorescence “turn-on” chemosensor for  $Hg^{2+}$  and  $Ag^+$  based on NBD (7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazolyl) / S. Y. Lee, K. H. Bok, C. Kim // RSC Advances. – 2017. – Vol. 7. – № 1. – P. 290-299.

191. Imidazoloquinoline bearing thiol probe as fluorescent electrochemical sensing of Ag and relay recognition of Proline / K. Velmurugan, A. Thamilselvan, R. Antony [et al.] // Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry. – 2017. – Vol. 333. – P. 130-141.

192. Antibacterial effect of silver nanoparticles on *Staphylococcus aureus* / F. Mirzajani, A. Ghassempour, A. Aliahmadi, M. A. Esmaeili // *Research in Microbiology*. – 2011. – Vol. 162. – № 5. – P. 542-549.
193. A Selective and Sensitive  $Hg^{2+}$  Aminonaphthalimide-aza-crown-ether Cellular Chemosensor / R. L. Miller, A. Denisenko, P. Thapa [et al.]. – 2024. – P. 1-27.
194. A Versatile Molecular Probe of Naphthalimide-Derivative for Zn(II) Sensor: A Mini-Review / P. P. Das, P. Mohanty, A. K. Barick [et al.] // *Trends in Sciences*. – 2023. – Vol. 20. – № 7. – P. 1-14.
195. Fluorescent sensor of copper(II) ions based on PMBA microtubes with 4-methoxy-1,8-naphthalimide groups / G. Wenxun, Z. Yaqing, L. Botian, T. Liming // *Reactive and Functional Polymers*. – 2020. – Vol. 146. – P. 104400.
196. Tian, Y. Detection Sensitivity Enhancement of Naphthalimide / Y. Tian, M. Li, Y. Liu // *Molecules*. – 2020. – Vol. 25. – № 19. – P. 4465.
197. Research Progress on Naphthalimide Fluorescent Probes / H. Xu, Y. Xiao, Y. G. Liu, W. Sun // *Advanced Sensor Research*. – 2024. – Vol. 3. – № 2. – P. 1-15.
198. Synthesis and Photophysical Studies on Naphthalimide Derived Fluorophores as Markers in Drug Delivery / N. Singh, R. Srivastava, A. Singh, R. K. Singh // *Journal of Fluorescence*. – 2016. – Vol. 26. – № 4. – P. 1431-1438.
199. Fluorescence behaviour of 2-, 3- and 4-amino-1,8-naphthalimides: Effects of the substitution positions of the amino functionality on the photophysical properties / L. Wang, M. Fujii, M. Yamaji, H. Okamoto // *Photochemical and Photobiological Sciences*. – 2018. – Vol. 17. – № 10. – P. 1319-1328.
200. Styryl dyes - synthesis and applications during the last 15 years / T. Deligeorgiev, A. Vasilev, S. Kaloyanova, J. J. Vaquero // *Coloration Technology*. – 2010. – Vol. 126. – № 2. – P. 55-80.
201. Specific Fluorescent Probes for Imaging DNA in Cell-Free Solution and in Mitochondria in Living Cells / A. S. Efimova, M. A. Ustimova, N. S. Chmelyuk [et al.] // *Biosensors*. – 2023. – Vol. 13. – № 7. – P. 734.
202. Gollavelli G. Magnetic and fluorescent graphene for dual modal imaging and single light induced photothermal and photodynamic therapy of cancer cells / G. Gollavelli, Y. C. Ling // *Biomaterials*. – 2014. – Vol. 35. – № 15. – P. 4499-4507.
203. Demonstration of Selective Single-Barium Ion Detection with Dry Diazacrown Ether Naphthalimide Turn-on Chemosensors / P. Thapa, N. K. Byrnes, A. A. Denisenko [et al.] // *ACS Sensors*. – 2021. – Vol. 6. – № 1. – P. 192-202.
204. Gauci G. Solvent-polarity reconfigurable fluorescent 4-piperazino-N-aryl-1,8-

- naphthalimide crown ether logic gates / G. Gauci, D. C. Magri // RSC Advances. – 2022. – Vol. 12. – № 54. – P. 35270-35278.
205. Colorimetric and fluorescent anion sensors: An overview of recent developments in the use of 1,8-naphthalimide-based chemosensors / R. M. Duke, E. B. Veale, F. M. Pfeffer [et al.] // Chemical Society Reviews. – 2010. – Vol. 39. – № 10. – P. 3936-3953.
206. When crown ethers finally click: Novel, click-assembled, fluorescent enantiopure pyridino-crown ether-based chemosensors - And an: N -2-aryl-1,2,3-triazole containing one / B. Szemenyei, M. Malmosi, D. Pál [et al.] // New Journal of Chemistry. – 2021. – Vol. 45. – № 48. – P. 22639-22649.
207. Kim, H. Lithium sensors based on photophysical changes of 1-aza-12-crown-4 naphthalene derivatives synthesized via Buchwald-Hartwig amination / H. Kim, B. Koo // RSC Advances. – 2022. – Vol. 12. – № 49. – P. 31976-31984.
208. Nickel-Catalyzed Amination of Aryl Chlorides with Amides / J. Li, C. Huang, D. Wen [et al.] // Organic Letters. – 2021. – Vol. 23. – № 3. – P. 687-691.
209. A ratiometric fluorescent probe for the quantitative detection of styrene in air / K. Chen, Z. Gao, J. Sun [et al.] // Chemical Communications. – 2020. – Vol. 56. – № 85. – P. 13037-13039.
210. Novel 1,8-naphthalimide derivatives for standard-red organic light-emitting device applications / S. Luo, J. Lin, J. Zhou [et al.] // Journal of Materials Chemistry C. – 2015. – Vol. 3. – № 20. – P. 5259-5267.
211. Тулякова, Е. В. Дизайн, синтез и исследования супрамолекулярных фоточувствительных систем, содержащих краун-соединения с различным сочетанием N, O, S – гетероатомов / Е. В. Тулякова // – 2007. – С. 45.
212. Conjugates of 3,4-dimethoxy-4-styrylnaphthalimide and bacteriochlorin for theranostics in photodynamic therapy / M. A. Zakharko, P. A. Panchenko, D. P. Zarezin [et al.] // Russian Chemical Bulletin. – 2020. – Vol. 69. – № 6. – P. 1169-1178.
213. Heck, K. F. Palladium-Catalyzed Vinylic Hydrogen Substitution Reactions with Aryl, Benzyl, and Styryl Halides / K. F. Heck, J. P. Nolley // Journal of Organic Chemistry. – 1972. – Vol. 37. – № 14. – P. 2320-2322.
214. Antitumor efficacy and apoptotic activity of substituted chloroalkyl 1H-benz[de]isoquinoline-1,3-diones: A new class of potential antineoplastic agents / A. Mukherjee, S. Hazra, S. Dutta [et al.] // Investigational New Drugs. – 2011. – Vol. 29. – № 3. – P. 434-442.
215. Photovoltaic properties of new cyanine-naphthalimide dyads synthesized by “Click” chemistry / W. hai Zhan, W. jun Wu, J. li Hua [et al.] // Tetrahedron Letters. – 2007. – Vol. 48. – № 14. – P. 2461-2465.

216. Helical aggregates of bis(styryl) dyes formed by DNA templating / M. A. Ustimova, Y. V. Fedorov, V. B. Tsvetkov [et al.] // *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. – 2021. – Vol. 418. – P. 113378.
217. Устимова, М. А. Разработка флуоресцентных реагентов на основе стириловых производных для внутриклеточной визуализации / М. А. Устимова // – 2023. – С. 80.
218. Федоров, Ю.В. Современные фотометрические методы анализа органических веществ / Ю.В. Федоров, О.А. Федорова, П. А. Панченко // – 2015. – С. 31.
219. Synthesis and spectral properties of 4-amino-and 4-acetyl-amino-N- aryl-naphthalimides containing electron-donating groups in the N-aryl substituent / P. A. Panchenko, O. A. Fedorova, V. P. Perevalov [et al.] // *Russian Chemical Bulletin*. – 2009. – Vol. 58. – № 6. – P. 1233-1240.
220. Жилин, Д. М. Исследование реакционной способности детоксицирующих свойств гумусовых кислот по отношению к соединениям ртути / Д. М. Жилин. – 1998. – С. 202.
221. Dual site-controlled two-photon fluorescent probe for the imaging of lysosomal pH in living cells / C. Wang, B. Dong, X. Kong [et al.] // *Luminescence*. – 2018. – Vol. 33. – № 7. – P. 1275-1280.
222. Loock, H. P. Detection limits of chemical sensors: Applications and misapplications / H. P. Loock, P. D. Wentzell // *Sensors and Actuators, B: Chemical*. – 2012. – Vol. 173. – P. 157-163.
223. A ratiometric fluorescent sensor for zinc ions based on covalently immobilized derivative of benzoxazole / Q. J. Ma, X. B. Zhang, X. H. Zhao [et al.] // *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. – 2009. – Vol. 73. – № 4. – P. 687-693.
224. Park K. S. Mismatched pyrrolo-dC-modified duplex DNA as a novel probe for sensitive detection of silver ions / K. S. Park, J. Y. Lee, H. G. Park // *Chemical Communications*. – 2012. – Vol. 48. – № 38. – P. 4549-4551.
225. Hg<sup>2+</sup> and Cu<sup>2+</sup> selective detection using a dual channel receptor based on thiopyrylium scaffoldings / T. Ábalos, D. Jiménez, R. Martínez-Mañez [et al.] // *Tetrahedron Letters*. – 2009. – Vol. 50. – № 27. – P. 3885-3888.
226. Self-assembly of a ternary architecture driven by cooperative Hg<sup>2+</sup> ion binding between cucurbit[7]uril and crown ether macrocyclic hosts / E. Chernikova, D. Berdnikova, Y. Fedorov [et al.] // *Chemical Communications*. – 2012. – Vol. 48. – № 58. – P. 7256-7258.
227. Solvent effect and amine interference on colorimetric changes of azobenzene-conjugated dithiaazadioxo crown ether mercury sensor / C. H. Jeon, J. Lee, S. J. Ahn, T. H. Ha // *Tetrahedron Letters*. – 2013. – Vol. 54. – № 50. – P. 6841-6847.
228. Atilgan, S. A near IR di-styryl BODIPY-based ratiometric fluorescent chemosensor for Hg(II) / S. Atilgan, I. Kutuk, T. Ozdemir // *Tetrahedron Letters*. – 2010. – Vol. 51. – № 6. –

P. 892-894.

229. Walcarius, A. Uptake of inorganic HgII by organically modified silicates: Influence of pH and chloride concentration on the binding pathways and electrochemical monitoring of the processes / A. Walcarius, M. Etienne, C. Delacote // *Analytica Chimica Acta*. – 2004. – Vol. 508. – № 1. – P. 87-98.
230. Detection of mercury(II) ions using colorimetric gold nanoparticles on paper-based analytical devices / G. H. Chen, W. Y. Chen, Y. C. Yen [et al.] // *Analytical Chemistry*. – 2014. – Vol. 86. – № 14. – P. 6843-6849.
231. A novel fluorescence “on-off-on” chemosensor for Hg<sup>2+</sup>: Via a water-assistant blocking heavy atom effect / C. Wu, J. L. Zhao, X. K. Jiang [et al.] // *Dalton Transactions*. – 2016. – Vol. 45. – № 38. – P. 14948-14953.
232. Optical and electrochemical properties of novel fused tricyclic thiophene–15-crown-5 systems and their complexes with Mg and Ba ions / S. D. Tokarev, A. Botezatu, A. V. Khoroshutin [et al.] // *Mendeleev Communications*. – 2022. – Vol. 32. – № 3. – P. 367-370.
233. Synthesis and optical characteristics of 4-styrylpyridinium dyes and their conjugates with antibody / A. S. Efimova, M. A. Ustimova, M. A. Maksimova [et al.] // *Mendeleev Communications*. – 2023. – Vol. 33. – № 3. – P. 384-386.
234. Controlling photophysics of styrylnaphthalimides through TICT, fluorescence and: E, Z - photoisomerization interplay / P. A. Panchenko, A. N. Arkhipova, O. A. Fedorova [et al.] // *Physical Chemistry Chemical Physics*. – 2017. – Vol. 19. – № 2. – P. 1244-1256.
235. Ohkuma S. Fluorescence probe measurement of the intralysosomal pH in living cells and the perturbation of pH by various agents / S. Ohkuma, B. Poole // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1978. – Vol. 75. – № 7. – P. 3327-3331.
236. A reaction-type receptor for the multi-feature detection of Hg<sup>2+</sup> in water and living cells / M. Zhao, G. K. Shao, Y. S. Guo [et al.] // *New Journal of Chemistry*. – 2020. – Vol. 44. – № 29. – P. 12538-12545.
237. Fluorescent sensors for detection of mercury: From small molecules to nanoprobe / H. Shuai, C. Xiang, L. Qian [et al.] // *Dyes and Pigments*. – 2021. – Vol. 187. – P. 109125.
238. Stewart, J. J. P. Optimization of parameters for semiempirical methods V: Modification of NDDO approximations and application to 70 elements / J. J. P. Stewart // *Journal of Molecular Modeling*. – 2007. – Vol. 13. – № 12. – P. 1173-1213.
239. Nad, S. Photophysical properties of coumarin-152 and coumarin-481 dyes: Unusual behavior in nonpolar and in higher polarity solvents / S. Nad, M. Kumbhakar, H. Pal // *Journal of Physical Chemistry A*. – 2003. – Vol. 107. – № 24. – P. 4808-4816.
240. Demeter, A. Spectroscopic Properties of Aromatic Dicarboximides. Part 2. Substituent

- Effect on the Photophysical Properties of *N*-Phenyl-1,2-naphthalimide / A. Demeter, T. Berces, L. Biczok // *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions*. – 1994. – Vol. 90. – № 18. – P. 2635-2641.
241. Okazaki M., Suhara Y., Uemura S., Fujiyama M., Oda K., Tanaka T., Taniguchi S. W. Y. Synthesis of alkyl- and arylimides of 4-nitronaphthalic acid / W. Y. Okazaki M., Suhara Y., Uemura S., Fujiyama M., Oda K., Tanaka T., Taniguchi S. – 1957. – Vol. 51. – P. 8051.
242. Rouhani, S. Facile synthesis of 4-nitro-*N*-substituted-1,8-naphthalimide derivatives using ultrasound in aqueous media / S. Rouhani, K. Gharanjig, M. H. Nezhad // *Green Chemistry Letters and Reviews*. – 2014. – Vol. 7. – № 2. – P. 174-178.
243. Matrix screening of substituted *N*-aryl-1,8-naphthalimides reveals new dual fluorescent dyes and unusually bright pyridine derivatives / H. Cao, V. Chang, R. Hernandez, M. D. Heagy // *Journal of Organic Chemistry*. – 2005. – Vol. 70. – № 13. – P. 4929-4934.
244. Synthesis of Potential Anticancer Agents. I. Nitrogen Mustards Derived from *p*-[*N,N*-Bis(2-chloroethyl)amino]benzaldehyde / R. C. Elderfield, I. S. Covey, J. B. Geiduschek [et al.] // *Journal of Organic Chemistry*. – 1958. – Vol. 23. – № 11. – P. 1749-1753.
245. Stange, P. Ion speciation of protic ionic liquids in water: Transition from contact to solvent-separated ion pairs / P. Stange, K. Fumino, R. Ludwig // *Angewandte Chemie - International Edition*. – 2013. – Vol. 52. – № 10. – P. 2990-2994.
246. Control of photochemical properties of monolayers and langmuir-blodgett films of amphiphilic chromoionophores / S. L. Selektor, O. A. Raitman, D. A. Silant'Eva [et al.] // *Protection of Metals and Physical Chemistry of Surfaces*. – 2011. – Vol. 47. – № 4. – P. 484-493.
247. Design, synthesis, and biological evaluation of structurally constrained hybrid analogues containing ropinirole moiety as a novel class of potent and selective dopamine D3 receptor ligands / B. Zhou, K. H. Hong, M. Ji, J. Cai // *Chemical Biology and Drug Design*. – 2018. – Vol. 92. – № 3. – P. 1597-1609.
248. Synthesis, complexation, and *E*–*Z* photoisomerization of azadithiacrown-containing styryl dyes as new optical sensors for mercury cations / E. V. Tulyakova, O. A. Fedorova, Yu. V. Fedorov [et al.] // *Russian Chemical Bulletin*. – 2007. – Vol. 56. – № 3. – P. 513-526.
249. Панченко, П. А. Разработка флуоресцентных фотохромных, сенсорных систем и тераностиков на основе производных 1,8-нафталимида / П. А. Панченко // . – 2023. – С. 271.
250. A ratiometric fluorescence halide sensor based on covalently immobilization of quinine and benzothioxanthene / C. G. Niu, A. L. Guan, G. M. Zeng [et al.] // *Analytica Chimica Acta*. – 2005. – Vol. 547. – № 2. – P. 221-228.

## 7. Список публикаций автора по теме диссертации

### Статьи в рецензируемых журналах

1. Panchenko P.A., Efremenko A.V., Polyakova A.S., Feofanov A.V., Ustimova M.A., Fedorov Y.V., Fedorova O.A. Application of RET Approach for Ratiometric Response Enhancement of ICT Fluorescent Hg<sup>2+</sup> Probe based on Crown-containing Styrylpyridinium Dye // Chem. Asian J. – 2024. – Vol.19. – № 24. – . Art. № e202400777.
2. Polyakova A.S., Panchenko P.A., Efremenko A.V., Feofanov A.V., Fedorov Y.V., Fedorova O.A. Naphthalimide-based fluorescent and colorimetric probe for detection of mercury (II) ions in aqueous solutions and living cells // Mendeleev Commun. – 2024. – Vol. 34. – № 3. – P. 418–420.
3. Панченко П.А., Полякова А.С., Устимова М.А., Ефременко А.В., Феофанов А.В., Федоров Ю.В., Федорова О.А. Ратиометрический флуоресцентный хемосенсор на катионы Hg(II) в водном растворе на основе краунсодержащей бисхромофорной системы 1,8-нафталимид – стирилпиридин // Известия Академии наук. Серия химическая. – 2024. – Т. 73. – № 10. – С. 2921–2935.
4. Панченко П.А., Сайфутярова А.Э., Иванова М.И., Полякова А.С., Федоров Ю.В., Федорова О.А. Синтез и изучение сенсорных свойств бисхромофорных систем на основе 1,8-нафталимида и стирилпиридина, содержащих олигогликолиевый рецепторный фрагмент // Известия Академии наук. Серия химическая. – 2024. – Т. 73. – № 4. – С. 849–862.
5. Panchenko P.A., Efremenko A.V., Polyakova A.S., Feofanov A.V., Ustimova M.A., Fedorov Y.V., Fedorova O.A. Fluorescent RET-based chemosensor bearing 1,8-naphthalimide and styrylpyridine chromophores for ratiometric detection of Hg<sup>2+</sup> and its bio-application // Biosensors. – 2022. – Vol. 12. – № 9. – . Art. № 770.
6. Панченко П.А., Полякова А.С., Федоров Ю.В., Федорова О.А. Изучение катионозависимого резонансного переноса энергии в краунсодержащей бисхромофорной системе на основе 4-метокси- и 4-стирил-1,8-нафталимида // Макрогетероциклы. – 2022. – Т. 15. – №1. – С 44–52.
7. Панченко П.А., Полякова А.С., Федоров Ю.В., Федорова О.А. Флуоресцентный хемосенсор на катионы ртути (II) в водном растворе на основе производного 4-(ацетил)амино-1,8-нафталимида, содержащего *N*-фенилазидитиа-15-краун-5-эфирный рецептор // Известия Академии наук. Серия химическая. – 2021. – Т. 70. – № 10. – С. 1939–1945.
8. Panchenko P.A., Polyakova A.S., Fedorov Y.V., Fedorova O.A. Fluorimetric detection of Ag<sup>+</sup> cations in an aqueous solution using polyvinyl chloride sensor film doped with crown-

containing 1,8-naphthalimide // Mendeleev Commun. – 2021. – Vol. 31. – № 4. – P. 517–519.

9. Panchenko P.A., Polyakova A.S., Fedorov Y.V., Fedorova O.A. Chemoselective detection of  $\text{Ag}^+$  in purely aqueous solution using fluorescence turn-on probe based on crown-containing 4-methoxy-1,8-naphthalimide // Mendeleev Commun – 2019. – Vol. 29. – № 2. – P. 155–157.

**Тезисы докладов на конференциях:**

1. Polyakova A.S., Panchenko P.A. Study of the cation-dependent resonance energy transfer in the crown-containing bischromophoric system based on 4-alkoxy- and 3,4-dimethoxystyryl-1,8-naphthalimide // International Conference «Chemistry of Organoelement Compounds and Polymers 2019». – Moscow, Russia, 18 – 22 November, 2019. – P. 223.
2. Полякова А.С., Панченко П.А., Федоров Ю.В., Федорова О.А. Флуоресцентный хемосенсор на катионы ртути (II) в водном растворе на основе производного 4-(ацетил)амино-1,8-нафталимида, содержащего N-фенилазидитиа-15-краун-5-эфирный рецептор // VII Международная конференция «Супрамолекулярные системы на поверхности раздела». – Туапсе, Россия. 20 – 24 сентября, 2021. – С. 39.
3. Polyakova A.S., Panchenko P.A., Fedorov U.V., Fedorova O.A. Fluorescent chemosensor for mercury (II) cations in aqueous solution based on 4- (acetyl) amino-1,8-naphthalimide derivative containing N-phenylazadithia-15-crown-5-ether receptor // XII International Conference of Young Scientists «Mendeleev 2021». – St. Petersburg, Russia, 6 – 10 September, 2021. – P. 611.
4. Полякова А.С., Панченко П.А., Федоров Ю.В., Федорова О.А. Флуоресцентный RET-хемосенсор на основе 1,8-нафталимида и стирилпиридина для логометрического обнаружения  $\text{Hg}^{2+}$  и его биоприменение // XIX Международная конференция «Спектроскопия координационных соединений». – Туапсе, Россия, 18 – 23 сентября, 2022. – С. 70.
5. Полякова А.С., Панченко П.А., Федоров Ю.В., Федорова О.А. Флуоресцентный RET-хемосенсор на основе 1,8-нафталимида и стирилпиридина для логометрического обнаружения  $\text{Hg}^{2+}$  // XXVI Всероссийская конференция молодых учёных-химиков. – Нижний Новгород, Россия, 18 – 20 апреля, 2023. – С. 107.
6. Полякова А.С., Панченко П.А., Федоров Ю.В., Федорова О.А. Синтез и сенсорные свойства RET-датчика на основе 1,8-нафталимида и стирилпиридина для определения катионов ртути // Международная конференция по химии «Байкальские чтения-2023». – Иркутск, Россия, 4 – 8 сентября, 2023. – С. 190.

7. Полякова А.С., Панченко П.А., Ефременко А.В., Феофанов А.В., Федоров Ю.В., Федорова О.А. Флуоресцентный и колориметрический зонд на основе нафталимида для обнаружения ионов ртути (II) в водных растворах и живых клетках // Всероссийская конференция по люминесценции LUMOS-2024. – Москва, Россия, 23 – 26 апреля, 2024. – С. 27.
8. Panchenko P.A., Efremenko A.V., Polyakova A.S., Feofanov A.V., Ustimova M.A., Fedorov Y.V., Fedorova O.A. A novel naphthalimide and styrylpyridinium based ICT - RET fluorescent probe for the ratiometric detection of Hg(II) // The 8th International conference on chemistry, structure and function of biomolecules. – Minsk, Belarus, 1 – 5 October, 2024. – P. 33.