

NIR tartományba emittáló fluoreszcens vegyületek előállítása és szerkezetvizsgálata

Synthesis and structural investigation of NIR emitting compounds

SISA Richárd

richardsisa@gmail.com

Babes-Bolyai Tudományegyetem, Kémia és Vegyészmérnöki kar

Vezető tanára: Dr. BRÉM Balázs

Kivonat

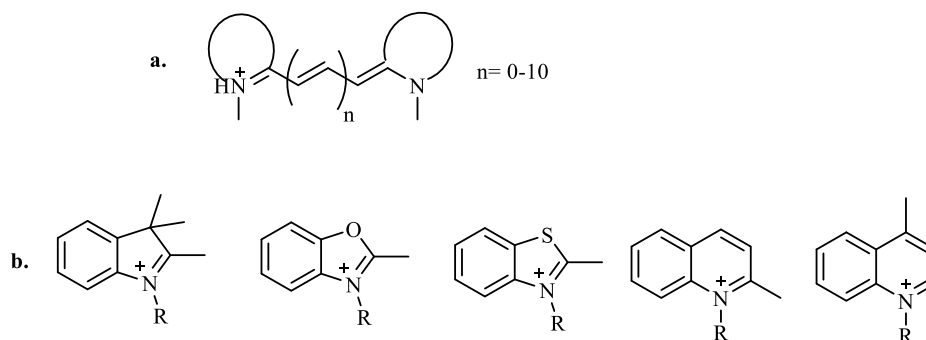
Di-, penta- és heptametin cianin származékok szintézisét különböző eljárásokkal valósítottuk meg, minden vegyület esetében fenil hidrazinból kiindulva. Első lépésként gyűrűzárási reakcióval trimetil indolént állítottunk elő, melyet kvaterner ammónium származékká alakítottunk metil jodid használatával. A tetrametil indolén sokat kondenzációs reakcióba vittük kiterjedt konjugációjú "linker" molekulákat alkalmazva. A dimetin vegyületek esetében a kvaterner ammónium sót aromás aldehidekkel kondenzáltattuk. Az előállított cianin festékek fotofizikai tulajdonságait vizsgáltuk, az oldószer hatást mind az elnyelési mind az emissziós spektrumban tanulmányoztuk.

Kulcsszavak: fluoreszcens vegyületek, NIR tartomány, polimetilén cianin festékek, szolvatokrómia

1. BEVEZETŐ

1.1. Cianin festékek

Azon szerves vegyületek, amelyek szerkezetében egy polimetilén lánc köt össze egy donor és akceptor csoportot polimetilén festékeknek nevezzük. Az elektron donor csoport rendszerint olyan heteroatomot tartalmaz, melynek kötésben részt nem vevő/szabad elektronpárja(i) van(nak) például N, S, O; míg az akceptor csoportban egy erős elektronegativitású, sp^2 -es hibridizációjú heteroatom található. Ezen osztályon belül beszélhetünk cianin festékekről, melyekben a donor és akceptor atom egyaránt nitrogén. A két nitrogén tartalmú heterociklusos molekulát összekötő telítetlen lánc hossza 0-tól 10 metilén csoportig változhat^[1] (1. ábra). Ezeket a festékeket a metilén láncon lévő szénatomok száma szerint nevezzük el, például, ha hét C atom köti össze a molekula két végét akkor heptametin cianin festékről beszélünk, ha kettő akkor dimetin cianin festékekkel van dolgunk.



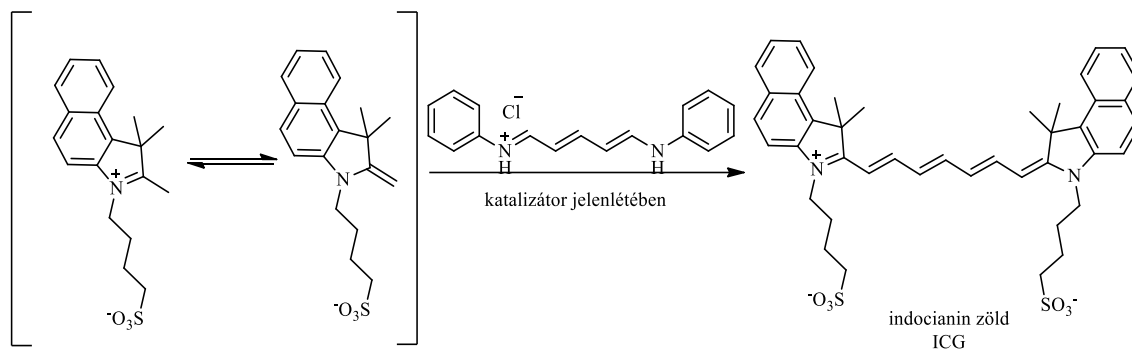
1. ábra

Polimetilén cianin festékek általános szerkezete (a),
A legtöbbet kutatott cianin festékek kiindulási anyagai (b)

2. POLIMETIN CIANIN FESTÉKEK ELŐÁLLÍTÁSA ÉS FUNKCIONALIZÁLÁSA

2.1. Előállítás

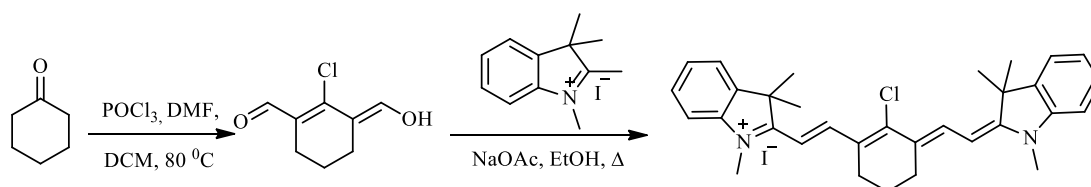
Az utóbbi két évtizedben egy újra felkarolt és sokat kutatott témává vált a 600 és 1200 nm között, azaz a NIR tartományban elnyelő festékek szintézise, a sokoldalú biológiai alkalmazhatóságuknak köszönhetően. A mono- és trimetin festékek előállítására számos módszert dolgoztak ki, a különböző nitrogén tartalmú heterociklusos vegyületek nukleofil jellegének kihasználásával egy telítetlen α, ω -dialdehid^[2], vagy az abból származtatott vegyülettel szemben, katalitikus kondenzációs reakció keretén belül.



2. ábra

Az ICG – indocyanine green/indocianin zöldként – előállítási reakciója

Az ICG egyik hátránya az alacsony emissziós intenzitás, amelyet egy belső konverzió okoz (magasabb energiaállapotból alacsonyabb energiaállapotba való átmenet fotonok kibocsátása nélkül), úgyszintén elmondható, hogy a vegyület alacsony fotofizikai és fotokémiai stabilitással bír. Mindezek ellenére rákos sejtek kimutatására is sikeresen alkalmazták az indocianin zöldet. Több próbálkozás volt az ICG fotokémiai stabilitásának növelésére is. Az egyik ilyen volt Patonay és Sterowski próbálkozása, amely során úgy sikerült stabilabbá tenni egy NIR festéket, hogy egy ciklohexil gyűrűt építettek be a molekula polimetilén „hidjába” (3. ábra) ^{[3] [4]}.

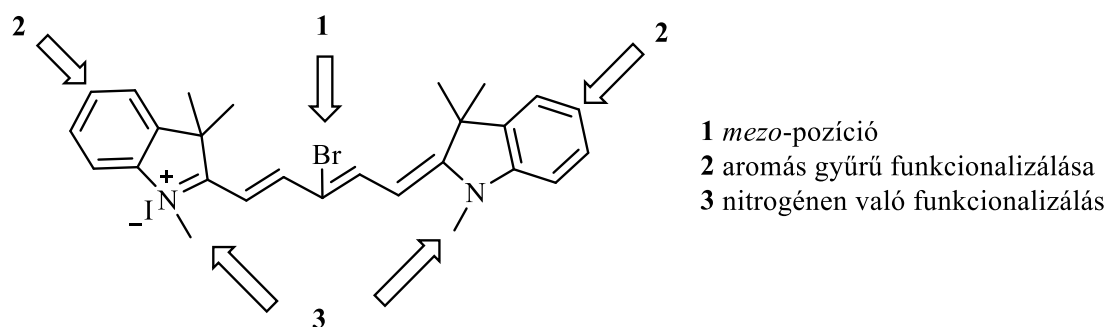


3. ábra

A Patonay és Sterowski által előállított heptametín cianin festék szerkezete

2.2. Polimetín cianin festékek funkcionálizálása

A NIR festékek strukturális sokszínűségét a heterociklus változtatásával érik el a legkönnyebben és a legtöbbször a gyakorlatban. Ebből kifolyólag az ilyen molekulákat három pozícióban lehet a leghatékonyabban funkcionálizálni: az aromás rendszeren, az úgynevezett *mezo*-pozícióban, valamint a heterociklusban részt vevő nitrogén atomon (4. ábra).



4. ábra

A polimetin cianin festékek funkcionálálható pozíciói.

3. POLIMETILÉN CIANIN FESTÉKEK OPTIKAI TULAJDONSÁGAI

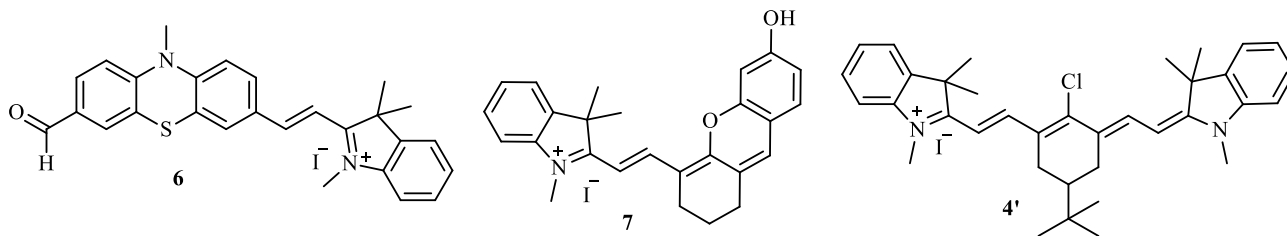
A polimetin festékek abszorpciós és emissziós maximumainak megváltoztatására két főbb módszert alkalmaznak, nevezetesen: a polimetilén „híd” hosszának változtatását, rendszerint minden egyes plusz metilén csoport 100 nm-es hullámhossz eltolódást eredményez és ezek számának a növelése a vegyület stabilitásának a csökkenését is előidézi; valamint saját konjugációval rendelkező funkciós csoportokkal való funkcionálálást^[5]. Úgyszintén oldószer, valamint pH változtatással is könnyen befolyásolható a színezékek abszorpciós, illetve emissziós maximuma. A *meso*-pozícióban szekunder vagy terciér aminokat tartalmazó festékek sokkal alacsonyabb hullámhosszon nyelnek el, mint a nem szubsztituált vegyületek, de sokkal intenzívebb fluoreszcenciát, és nagyobb Stokes eltolódással rendelkeznek. Főleg a biológiai alkalmazhatóság szempontjából fontos, hogy az előbb említett eltolódás minél nagyobb legyen, mivel így csökkenthető a háttérzaj, és a biomolekulák sokkal könnyebben jelölhetőek^[6].

4. KUTATÓMUNKA KIVITELEZÉSE, ELÉRT EREDMÉNYEK KIÉRTÉKELÉSE

4.1. A vegyületek szintézise

A kutató munka során cél volt heteroaromás csoportokat tartalmazó polimetin cianin festék előállítás, a vegyületek vízoldékonyságának a növelése, valamint ezen vegyületek fotofizikai tulajdonságainak a tanulmányozása- szolvatokrómia.

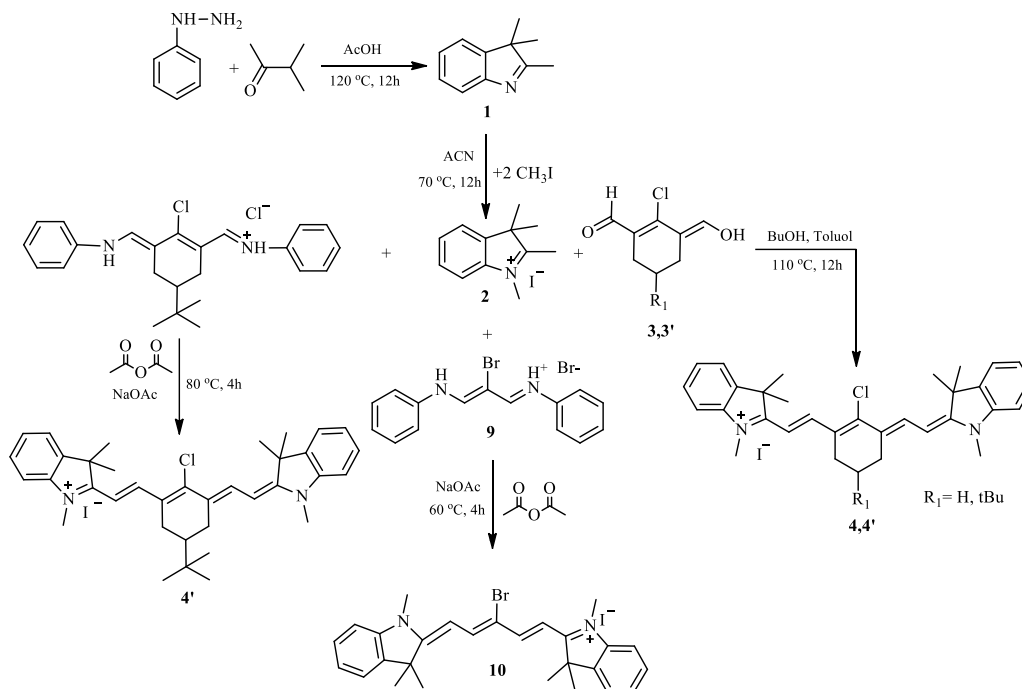
Mindezek alapján az 5. ábrán feltüntetett vegyületeket választottuk célvegyületeknek.



5. ábra

A kitűzött célvegyületek szerkezete és számozása

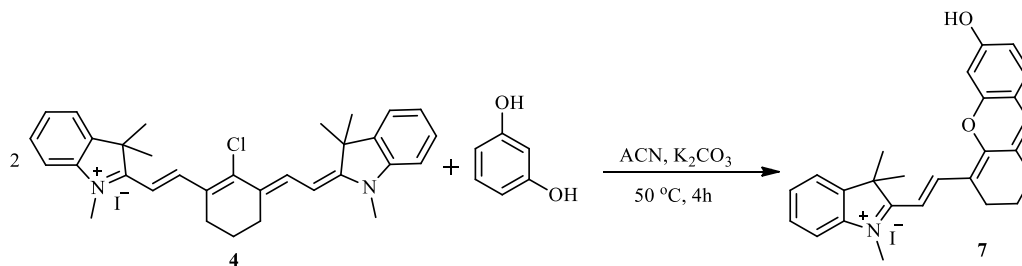
A 4'-es vegyület szintézisét két különböző szintetikus úton is megvalósítottuk. Első lépésben a 2,3,3-trimetil-indolént (1) állítottuk elő fenil-hidrazin és izopropil-metil-ke-ton kondenzációs reakciójával. Ezt követően egy kvaterner ammónium só (2) képeztünk metil-jodiddal való N-alkilezési reakció során, így próbálva megnövelni a kiinduló- és a célvegyület vízoldékonyságát. A szimmetrikus heptametin cianin festék (4') előállítás érdekében 2-klór-1-formil-3-hidroxitmetilén-5-tercbutil-ciklohexénnel (5') reagáltattunk két ekvivalens 1,2,3,3-tertametil-indolium-jodiddal, butanol és toluol elegyét használva reakcióközegként (6. ábra).



6. ábra

Heptametin származékok és pentametin cianin előállítása

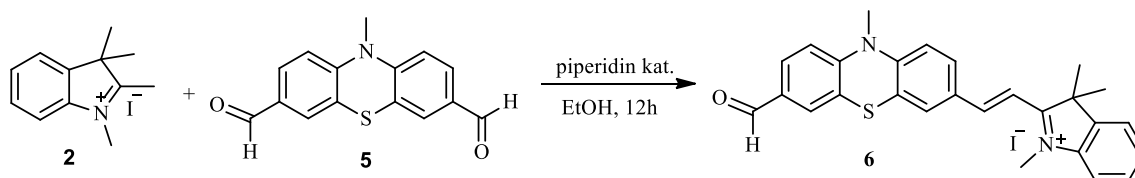
A 7-es célvegyületet a 2-klór-3-(2-(1,3,3-trimetilindolin-2-ilidén)etilidén)ciklohex-1-én-1-il)vinil)-1,3,3-trimetil-3H-indol-1-ium jodid (4) rezorcinnal történő gyűrűzárásával kaptuk acetonitrilben melegítve, bázis jelenlétében (7. ábra).



7. ábra

Dimetilén cianin előállítása heptametilén cianinból

A fenotiazin alapú polimetilén cianin, NIR tartományban emittáló vegyület szintéziséhez több szintetikus lépésben előállított 3,7-diformil-10-metil-fenotiazint használtuk kiinduló anyagként, amelyet 1,2,3,3-tetrametil-indolium-jodiddal (2) reagáltatva, piperidint használva katalizátorként, megkaptuk a fenotiazin alapú dimetilén cianin célvegyületünket (8. ábra).

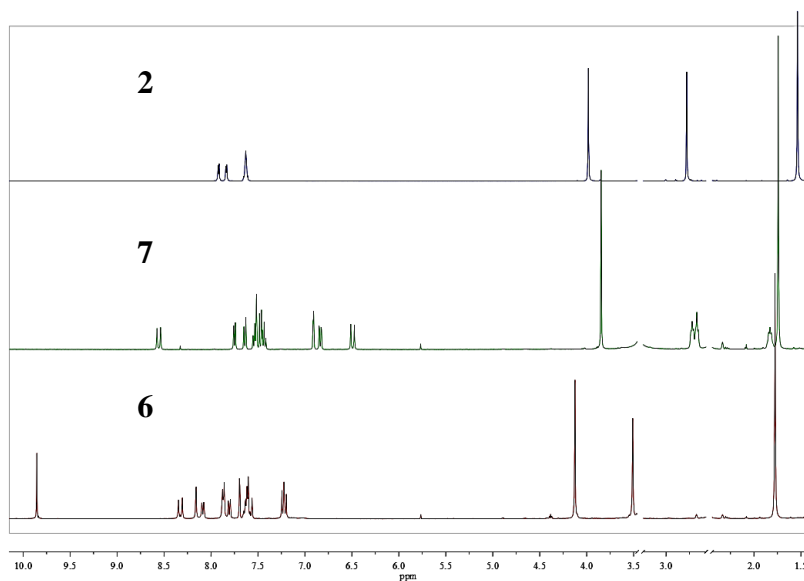


8. ábra

Fenotiazinil dimetilén cianin szintézise

4.2. A vegyületek szerkezetének és fotofizikai tulajdonságainak a vizsgálata

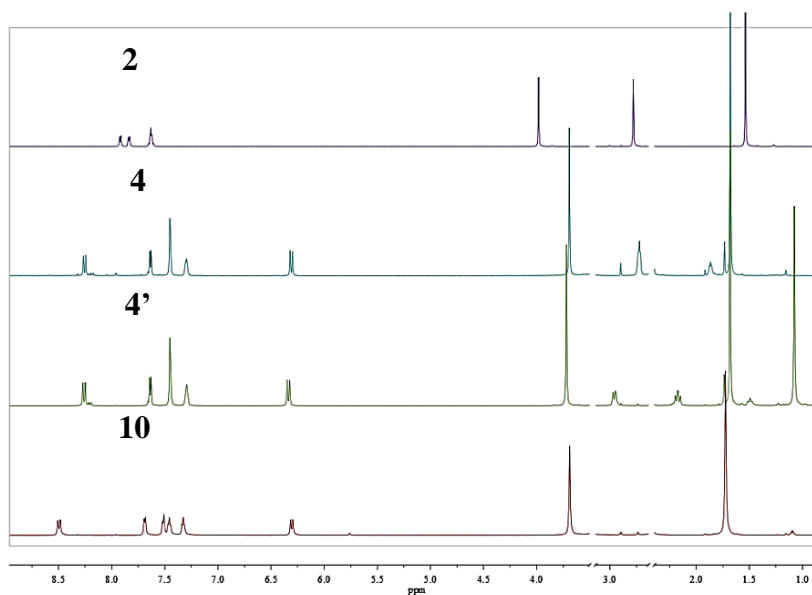
Az előállított vegyületek szerkezetvizsgálata NMR, mono-, és kétdimenziós (^1H , ^{13}C , COSY, HMQC), FT-IR, UV-Vis, fluoreszcencia- illetve tömegspektroszkópiás (HRMS) módszerekkel történt. A **6**-os vegyület proton NMR spektrumában 8,33 ppm-nél az etilén csoport indolén vázhoz közelebbi protonjának a jele, dublettként jelentkezik, csatolási állandója 14 Hz, ami azt bizonyítja, hogy deuterált DMSO oldatban az *E* izomer van jelen (9. ábra).



9. ábra

2, 6, 7 vegyületek ^1H -NMR spektrumai (DMSO- d_6 , 600MHz)

A heptametilén és pentametilén származékok ^1H -NMR spektrumait a 10. ábrán van bemutatva, a kiindulási vegyület (**2**) NMR spektrumával együtt (10. ábra).



10. ábra

2, 4, 4', 10 vegyületek ^1H -NMR spektrumai (DMSO- d_6 , 600MHz)

A **4**, **4'**, **10**-es vegyületekre nagyfokú szimmetria jellemző, ezért az ¹H-NMR-ben alacsony a jelek felhasadásának mértéke. A **4'**-es heptametilén szerkezetében a legárnyékoltabb jelet a tercbutil csoport protonjai adják, 1,07 ppm-nél, a legkevésbé árnyékol jelet pedig az etilén csoport klórciklohexilhez közelebbi protonja adja 7,25 ppm-nél. Az etilén csoport másik protonjának a jele 6,34 ppm-nél szintén dublettként jelentkezik. Mindkét jel esetében a csatolási állandó 14 Hz.

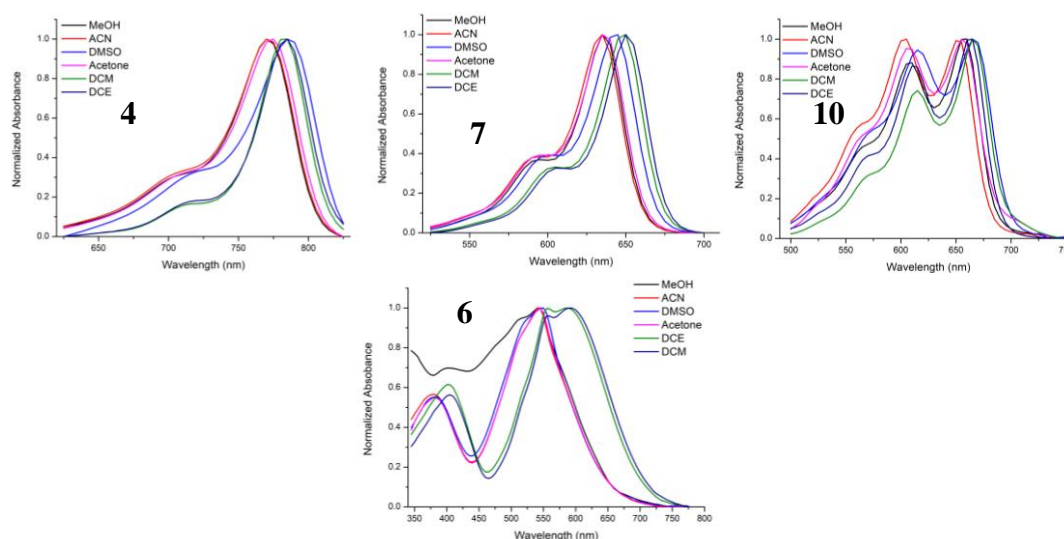
4.3. Fotofizikai tulajdonságok vizsgálata

Az előállított színezékmolekuláknak az abszorpciós és emissziós spektrumát azonos koncentrációban tanulmányoztuk, diklóretán oldószert alkalmazva (1. táblázat).

1. táblázat: Az előállított vegyületek fotofizikai jellemzői (DCM, $1 \cdot 10^{-5}$ M)

Vegyület	$\lambda_{\text{absz}}(\text{nm})$	$\lambda_{\text{em}}(\text{nm})$	$\epsilon (\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1})$	Stokes eltolódás (cm^{-1})
6	403/585	-	24125	-
4	717/780	802	194150	352
4'	717/781	803	196740	351
7	565/610/660	676/737	72033	359
10	600/650	677/725	212060	614

Szolvatokrómias vizsgálatokat metanolban (MeOH), acetonitrilben (ACN), dimetil-szulfidban (DMSO), acetonban és diklóretánban (DCE) végeztük. A heptametilén ciáninok (**4**, **4'**) esetében az abszorpciós maximum 765 nm-nél jelentkezik, ha oldószerként poláris oldószereket használtunk (MeOH, ACN), a DMSO esetében minimális batokrom eltolódás észlelhető, míg halogénezett oldószerek használata esetén az abszorpciós sáv 15 nm-rel toódik el a NIR tartomány felé. A pentametilén származékunk (**10**) esetében is ez a tendencia érvényesült. A legnagyobb batokrom eltolódást a fenotiazinil dimetilén származék (**6**) esetében tapasztaltuk (50 nm) (11. ábra).



11. ábra

A **4**, **6**, **7**, **10** polimetilén származékok UV-Vis spektrumai különböző oldószerekben (0,2 mM)

5. KÖVETKEZTETÉSEK

A cél vegyületek szintézisét sikeresen megvalósítottuk, a szerkezetüket különböző szerkezetvizsgálati módszerekkel igazoltuk. Fotofizikai tulajdonságaikat UV-Vis, valamint fluoreszcencia spektroszkópiás mérésekkel vizsgáltunk. Mindezek alapján elmondható, hogy bár az általunk előállított polimetilén cianin festékek kis Stokes eltolódással rendelkeznek, ezek a kiterjedt konjugációval rendelkező festékek kitűnően alkalmazhatóak jelzővegyületként, mivel a moláris abszorptivitásuk kellően nagy. Továbbá sikeresen szintetizáltunk fenotiazin alapú dimetin cianin festéket is (6). A szolvatokrómiás effektusok vizsgálata során kiderült, hogy ezen molekulák mindegyikének eltolható az abszorpciós maximuma a vörös tartomány felé, halogénezett oldószer használatával.

6. IRODALMI HIVATKOZÁSOK

- [1] Patonay G., Salon J., Sowell J., Strekowski L., *Noncovalent Labeling of Biomolecules with Red and Near-Infrared Dyes Molecules*, **2004**, 9, 40–49.
- [2] Strekowski L., Lipowska M., Patonay G., *Facile derivatizations of heptamethine cyanine dyes*, *Synthetic Commun.*, **1992**, 22, 2593–2598.
- [3] Strekowski L., Mason J. C., Lee H., Say M., Patonay G., *Water-soluble pH-sensitive 2, 6-bis (substituted ethylidene)-cyclohexanone/hydroxy cyanine dyes that absorb in the visible/near-infrared regions*, *J. Heterocyclic Chem.*, **2004**, 41, 227–232.
- [4] Mojzych M., Henary M., *Synthesis of cyanine dyes*, *Top. Heterocycl. Chem.*, **2008**, 14, 1–9.
- [5] Fabian J., Nakazumi H., Matsuoka M., *Near-infrared absorbing dyes*, *Chem. Rev.*, **1992**, 92, 1197–1226.
- [6] Lakowicz J. R., *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd ed.; Springer, **2009**.