

## Новые азопроизводные тиакаликс[4]арена: синтез, структура и комплексообразование с красителями

Е. С. Чурбанова,<sup>a,b</sup> Ф. Б. Габдрахманова,<sup>a@</sup> С. Р. Клешина,<sup>a</sup>  
В. А. Бурилов,<sup>b</sup> С. Е. Соловьева,<sup>a,b</sup> И. С. Антипин<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова – обособленное структурное подразделение  
ФИЦ КазНЦ РАН, 420088 Казань, Россия

<sup>b</sup>Казанский федеральный университет, 420008 Казань, Россия

@E-mail: kleo-w@mail.ru

Посвящается памяти Академика РАН Оскара Иосифовича Койфмана

Синтезированы тетразамещённые производные тиакаликс[4]арена **2** и **3** в конформации 1,3-альтернат, содержащие азо- и сульфогруппы на нижнем ободе. На основе синтезированных макроциклических лигандов **2b** и **3b** получены комплексы типа «хозяин-гость» с катионными красителями – родаминами В (**RhB**), 6G (**Rh6G**) и 123 (**Rh123**). Структура супрамолекулярных комплексов была установлена методами <sup>1</sup>H ЯМР, УФ и флуоресцентной спектроскопии. На основе данных флуоресцентного титрования выявлено, что **Rh6G** наиболее эффективно связывается с макроциклами по сравнению с остальными красителями. Константы связывания с другими родаминами в случае соединения **3b**, содержащего фрагмент нафталина, оказались на два порядка выше, чем для производного **2b**. Стехиометрия полученных комплексов была определена методом изомолярных серий. Показано, что соединение **2b** образует комплексы смешанного состава, а соединение **3b** образует комплексы состава 1:1 со всеми используемыми красителями. Методом <sup>1</sup>H ЯМР спектроскопии установлено, что в присутствии макроциклов **2b** и **3b** наблюдается сильнополюсный сдвиг сигналов протонов **Rh6G**, вызванный влиянием кольцевых токов ароматических ядер каликсарена. При этом для системы **3b-Rh6G** наблюдались меньшие значения сдвигов сигналов красителя по сравнению с комплексом **2b-Rh6G**, что, по всей видимости, связано с меньшей степенью погружения красителя в полость макроцикла. Выявлено, что для систем с высоким значением  $K_a$  конкурентное комплексообразование с присутствующими в биологических средах объектами отсутствует.

**Ключевые слова:** Тиакаликс[4]арен, гипоксия, красители, комплексы «гость-хозяин».

## New Azo Derivatives of Thiacalix[4]arene: Synthesis, Structure and Complexation with Dyes

E. S. Churbanova,<sup>a,b</sup> F. B. Gabdrakhmanova,<sup>a@</sup> S. R. Kleshnina,<sup>a</sup>  
V. A. Burilov,<sup>b</sup> S. E. Solovieva,<sup>a,b</sup> and I. S. Antipin<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>Arbuzov Institute of Organic and Physical Chemistry, FRC Kazan Scientific Center, Russian Academy of Sciences, 420088 Kazan, Russia

<sup>b</sup>Kazan Federal University, 420008 Kazan, Russia

@Corresponding author E-mail: kleo-w@mail.ru

Dedicated to the memory of Academician Oskar Iosifovich Koifman

The synthesis of tetrasubstituted thiacalix[4]arene derivatives **2** and **3** in the 1,3-alternate conformation functionalized with azo and sulfo fragments on the lower rim with different distances between the macrocyclic platform and functional groups, is presented. Host-guest complexes were obtained by synthesized ligands **2b** and **3b** with cationic dyes: rhodamine B (**RhB**), rhodamine 6G (**Rh6G**), and rhodamine 123 (**Rh123**). The structure of the supramolecular complexes was determined by <sup>1</sup>H NMR, UV and fluorescence spectroscopy. Based on fluorescent titration data, it was revealed that **Rh6G** binds most efficiently to macrocycles compared to other dyes. The binding

constants for compound **3b** containing a naphthalene fragment with other dyes were two orders of magnitude higher than for derivative **2b**. In the dye-macrocyclic system the different degrees of binding constants correlate with UV spectroscopy data: for the complex with **2b-Rh6G** a hypochromic effect and a bathochromic shift are observed, while the addition of macrocycle **2b** to other dyes causes virtually no changes in the absorption spectra. The stoichiometry of the synthesized complexes was determined by the Job's plots. In the complexes of compound **2b** with all dyes was indeterminate composition but in the case of compound **3b** complexes were 1:1. The mechanism of dye luminescence quenching was studied using the **3b-Rh6G** system as an example. In the presence of macrocycles **2b** and **3b**, a high-field shift of the **Rh6G** proton signals is observed, caused by the influence of ring currents of the aromatic nuclei of calixarene, which was shown using NMR spectroscopy. At the same time, for the **3b-Rh6G** system, smaller values of dye signal shifts were observed compared to the **2b-Rh6G** complex, which is apparently due to the lower degree of immersion of the dye into the macrocycle cavity. The possibility of dissociation of binary macrocycle-dye systems in the presence of components contained in biological environment (lysine, arginine, proline, glucose, adenosine-5'-triphosphate, urea, creatinine, bovine serum albumin and metal ions:  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ) was studied. It has been shown that for systems with a high  $K_a$  value there is no competitive complexation with objects present in biological environment.

**Keywords:** Thiacalix[4]arene, hypoxia, dyes, host-guest complexes.

## Введение

С момента открытия в опухолевых клетках областей с пониженным содержанием кислорода гипоксия стала известна как основной признак раковых клеток и их микроокружения.<sup>[1]</sup> Гипоксия представляет собой состояние низкой концентрации кислорода в тканях (<5–10 мм рт. ст.) и является важной характеристикой большинства крупных опухолей и гематологических злокачественных новообразований, при этом тесно связано с прогрессированием опухоли, метастазированием, терапевтической резистентностью и сложностью диагностики.<sup>[2–6]</sup> В условиях гипоксии восстановительные ферменты в опухолях сверхэкспрессируются (например, азоредуктаза, нитроредуктаза, хиноновые ферменты),<sup>[7–10]</sup> что может быть использовано для обнаружения злокачественных новообразований и диагностирования рака на ранних этапах.<sup>[11–14]</sup> Несмотря на широкий круг методов измерения оксигенации опухолей (позитронно-эмиссионная томография,<sup>[15]</sup> однофотонная эмиссионная компьютерная томография,<sup>[16]</sup> магнитно-резонансная томография,<sup>[17–18]</sup> фотоакустическая визуализация<sup>[19]</sup> и др.), особый интерес представляет флуоресцентная визуализация, благодаря низкой стоимости, высокому пространственно-временному разрешению, чувствительности и возможности использования *in vivo*.<sup>[20]</sup> В частности, были предложены сенсоры на основе каликс- и тиакаликс[4]аренов в конформации конус, содержащие азогруппы и способные образовывать комплексы «хозяин-гость» с родаминовыми красителями.<sup>[21–22]</sup> При комплексообразовании происходит тушение люминесценции красителями, но в условиях гипоксии азо-связи макроцикла восстанавливаются под действием имитирующего азоредуктазу дитионита натрия, краситель высвобождается и наблюдается усиление люминесценции, что и позволяет визуализировать гипоксию. Настоящая работа является продолжением исследований, посвященных созданию супрамолекулярных систем для визуализации гипоксии на основе азопроизводных метациклофанов в конфигурации конус.<sup>[21–23]</sup> Целью данного исследования

стал синтез новых лигандов – замещенных по нижнему ободу азопроизводных тиакаликс[4]арена в конфигурации *1,3-альтернат*, изучение их комплексообразования с родаминовыми красителями, определение механизма тушения флуоресценции красителей и возможного конкурентного комплексообразования с компонентами, содержащимися в биологических жидкостях для целей визуализации гипоксии.

## Экспериментальная часть

Коммерческие реагенты (Acros Organics (Бельгия), Alfa Aesar (США)) и флуоресцентные красители (Biotium (США)) использовались без предварительной очистки. Очистка растворителей проводилась в соответствии с известными литературными методиками.<sup>[24]</sup> Для синтезов использовались магнитные мешалки Heildolph MR HeiStandard (Германия). Чистоту соединений контролировали методом тонкослойной хроматографии на пластинках «Silufol UV 254» с использованием ультрафиолетовой лампы VL-6.LC (6W –254 nm tube).

ИК-спектры были записаны на спектрометре Bruker Vector-22 (Германия) в диапазоне волновых чисел 400–4000  $\text{cm}^{-1}$ , в качестве матрицы применялась таблетка из KBr. Эксперименты ИЭР МС проводились с помощью масс-спектрометра Agilent iFunnel 6550 LC/Q-TOF (Agilent Technologies, Санта-Клара, Калифорния, США). Осушающий газ – азот, температура осушающего газа 300 °С, скорость осушающего газа 12 л/мин., давление распылителя 275 кПа, напряжение воронки – 3500 В, напряжение капилляра 500 В, режим регистрации общего ионного тока MS, диапазон сканируемых масс 100–3000  $m/z$ , скорость сканирования 8 спектров/сек. Температуру плавления определяли на плавильном столе ВОЕТИУС с прибором визуализации РНМК 05. Элементный анализ был осуществлен на CHNS-О высокотемпературном анализаторе EuroEA3028-НТ-ОМ (Eurovector SpA, Италия). ЯМР эксперименты проводились на приборах Bruker Avance (Германия) с рабочей частотой 400 и 600 МГц для съемки спектров  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  ЯМР. Химические сдвиги определяли относительно сигналов остаточных протонов дейтерированного растворителя  $\text{DMSO}-d_6$ : для  $^1\text{H}$  ЯМР – 2.50 м.д.; для  $^{13}\text{C}$  ЯМР – 39.52 м.д.

Спектры поглощения в УФ-видимой области измеряли на спектрофотометре Perkin Elmer «Lambda 35» UV-VIS Spectrometer. Были использованы 10 мм кварцевые кюветы. Максимумы спектров поглощения красителей и комплексов:

$\lambda_{\max}(\text{Rh123})=499$  нм,  $\lambda_{\max}(\text{Rh123+2b})=499$  нм,  $\lambda_{\max}(\text{Rh123+3b})=499$  нм,  $\lambda_{\max}(\text{Rh6G})=527$  нм,  $\lambda_{\max}(\text{Rh6G+2b})=541$  нм,  $\lambda_{\max}(\text{Rh6G+3b})=533$  нм,  $\lambda_{\max}(\text{RhB})=554$  нм,  $\lambda_{\max}(\text{RhB+2b})=555$  нм,  $\lambda_{\max}(\text{RhB+3b})=555$  нм. *Спектры испускания* измеряли на флуоресцентном спектрофотометре Fluorolog-3 (Horiba Jobin Yvon). Были использованы кварцевые кюветы (3.5 мл, длины пути 10 мм). Ширина щелей возбуждения и испускания составляла 2 нм. В качестве растворителей использовались водный раствор фосфатного буфера, pH 7.4 и ДМСО.

## Синтез

Исходный *n*-трет-бутилкаликс[4]арен,<sup>[25]</sup> 5,11,17,23-тетра-трет-бутил-25,26,27,28-тетраакис(2-бромэтокси)-2,8,14,20-тетратиакаликс[4]арен **1a**,<sup>[26]</sup> 5,11,17,23-тетра-трет-бутил-25,26,27,28-тетраакис(3-бромпропокси)-2,8,14,20-тетратиакаликс[4]арен **1b** и 5,11,17,23-тетра-трет-бутил-25,26,27,28-тетраакис(4-бромбутокси)-2,8,14,20-тетратиакаликс[4]арен **1c**,<sup>[27]</sup> соединения **2b-c**,<sup>[28]</sup> 4-(4-гидроксифенилазо)бензолсульфоновая<sup>[29]</sup> и 4-(4'-гидроксифенилазо)нафтионовую кислоты<sup>[30]</sup> синтезировали по известным методикам.

*Общая методика синтеза соединений 2a, 3a-b.* К суспензии 25,26,27,28-тетраакис(*n*-бромалкокси)-5,11,17,23-тетра(трет-бутил)тиакаликс[4]арена **1** (0.1 г, 0.1 ммоль) в ДМФА (10 мл) добавили 4-(4'-гидроксифенилазо)бензолсульфоновою кислоту / 4-(4'-гидроксифенилазо)нафтионовую кислоту (0.6 ммоль) и  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  (1 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в атмосфере аргона при нагревании до ~85 °C в течение 5 суток. Затем удаляли растворитель под вакуумом, к остатку добавляли 15 мл 5% раствора соляной кислоты. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали водой, сушили на воздухе.

25,26,27,28-Тетраакис-2-[4-(4'-сульфонилфенилдиазинил)фенокси]этокси-5,11,17,23-тетра(трет-бутил)тиакаликс[4]арен (**2a**). Выход 0.14 г (83%). Масс-спектр, *m/z* (ИЭР МС): вычислено для  $[\text{M}-\text{C}_{38}\text{H}_{31}\text{N}_6\text{O}_{11}\text{S}_3]^-$  ( $\text{C}_{58}\text{H}_{65}\text{N}_2\text{O}_9\text{S}_5$ ): 1093.3299, найдено: 1093.3290.  $T_{\text{пл}}$ . 280 °C (разл.).  $R_f$  (этилацетат : петролейный эфир=10:1) 0.45. Найдено, %: C 59.05; N 5.04; S 13.31.  $\text{C}_{96}\text{H}_{96}\text{N}_8\text{O}_{20}\text{S}_8 \cdot (\text{CH}_3)_2\text{NC}(\text{O})\text{H}$ . Вычислено, %: C 59.12; N 4.99; S 13.23. ИК (KBr)  $\nu_{\max}$  см<sup>-1</sup>: 2961 (C<sub>Ar</sub>-H), 1453, 1434 (N=N), 1259, 1224, 1033, 1008 (SO<sub>2</sub>). <sup>1</sup>H ЯМР ([D<sub>6</sub>]DMSO, 400 МГц, 25 °C)  $\delta_{\text{H}}$  м.д.: 7.89 (8H, м, ArH<sub>azo</sub>), 7.78 (8H, м, ArH<sub>azo</sub>), 7.58 (8H, м, ArH<sub>azo</sub>), 7.29 (8H, с, ArH), 7.10 (8H, м, ArH<sub>azo</sub>), 4.36–3.73 (16H, м, OCH<sub>2</sub>), 1.15 (36H, с, *t*-Bu). <sup>13</sup>C ЯМР ([D<sub>6</sub>]DMSO, 101 МГц, 25 °C)  $\delta_{\text{C}}$  м.д.: 161.12, 157.65, 151.69, 150.22, 146.26, 146.15, 133.40, 132.64, 129.61, 129.16, 129.03, 126.64, 124.61, 124.43, 121.74, 115.12, 71.02, 67.57, 60.06, 34.51, 33.98, 33.84, 31.04, 30.99, 30.90, 30.84, 30.72, 30.63.

25,26,27,28-Тетраакис-3-[4-(4'-сульфонилфенилдиазинил)фенокси]этокси-5,11,17,23-тетра(трет-бутил)тиакаликс[4]арен (**3a**). Выход 0.12 г (63%). Масс-спектр, *m/z* (ИЭР МС): вычислено для  $[\text{M}-\text{C}_{50}\text{H}_{37}\text{N}_6\text{O}_{11}\text{S}_3]^-$  ( $\text{C}_{62}\text{H}_{67}\text{N}_2\text{O}_9\text{S}_5$ ): 1143.3456, найдено: 1143.3436.  $T_{\text{пл}}$ . 268 °C (разл.).  $R_f$  (этилацетат : петролейный эфир=10:1) 0.33. Найдено, %: C 61.59; N 5.23; S 11.07.  $\text{C}_{112}\text{H}_{104}\text{N}_8\text{O}_{20}\text{S}_8 \cdot 2(\text{CH}_3)_2\text{NC}(\text{O})\text{H} \cdot \text{H}_2\text{O}$ . Вычислено, %: C 61.55; N 5.25; S 11.07. ИК (KBr)  $\nu_{\max}$  см<sup>-1</sup>: 2961 (C<sub>Ar</sub>-H), 1439 (N=N), 1258, 1223, 1190, 1047, 1023 (SO<sub>2</sub>). <sup>1</sup>H ЯМР ([D<sub>6</sub>]DMSO, 400 МГц, 25 °C)  $\delta_{\text{H}}$  м.д.: 8.99–8.98 (4H, м, ArH<sub>azo</sub>), 8.88–8.86 (4H, м, ArH<sub>azo</sub>), 8.11–8.05 (12H, м, ArH<sub>azo</sub>), 7.62–7.69 (20H, м, ArH<sub>azo</sub>, ArH), 7.14–7.16 (8H, м, ArH<sub>azo</sub>), 4.40–4.47 (м, 16H, OCH<sub>2</sub>), 1.21 (с, 36H, *t*-Bu). <sup>13</sup>C ЯМР ([D<sub>6</sub>]DMSO, 101 МГц, 25 °C)  $\delta_{\text{C}}$  м.д.: 161.27, 147.35, 147.06, 146.36, 130.90, 129.90, 127.90, 126.47, 126.14, 125.02, 124.44, 122.78, 115.23, 109.96, 67.66, 33.98, 30.90.

25,26,27,28-Тетраакис-3-[4-(4'-сульфонилфенилдиазинил)фенокси]пропокси-5,11,17,23-тетра(трет-бутил)тиакаликс[4]арен (**3b**). Выход 0.12 г (67%). Масс-спектр, *m/z* (ИЭР МС): вычислено для  $[\text{M}-\text{C}_{48}\text{H}_{31}\text{N}_6\text{O}_9\text{S}_3]^-$  ( $\text{C}_{68}\text{H}_{81}\text{N}_2\text{O}_{11}\text{S}_5$ ):

1261.4449, найдено: 1261.4457.  $T_{\text{пл}}$ . 244 °C (разл.).  $R_f$  (этилацетат : петролейный эфир=10:1) 0.44. Найдено, %: C 62.51; N 5.28; S 11.54.  $\text{C}_{116}\text{H}_{112}\text{N}_8\text{O}_{20}\text{S}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . Вычислено, %: C 62.46; N 5.24; S 11.50. ИК (KBr)  $\nu_{\max}$  см<sup>-1</sup>: 2959 (C<sub>Ar</sub>-H), 1476, 1440 (N=N), 1262, 1232, 1202, 1047 (SO<sub>2</sub>). <sup>1</sup>H ЯМР ([D<sub>6</sub>]DMSO, 400 МГц, 25 °C)  $\delta_{\text{H}}$  м.д.: 8.99–8.97 (4H, м, ArH<sub>azo</sub>), 8.88–8.86 (4H, м, ArH<sub>azo</sub>), 8.09–8.05 (8H, м, ArH<sub>azo</sub>), 7.68–7.64 (8H, м, ArH<sub>azo</sub>), 7.49–7.32 (12H, м, ArH<sub>azo</sub>, ArH), 7.15–7.09 (8H, м, ArH<sub>azo</sub>), 4.02–3.94 (16H, м, OCH<sub>2</sub>), 1.39–1.51 (8H, м, CH<sub>2</sub>), 1.24 (36H, с, *t*-Bu). <sup>13</sup>C ЯМР ([D<sub>6</sub>]DMSO, 101 МГц, 25 °C)  $\delta_{\text{C}}$  м.д.: 162.26, 161.43, 147.34, 146.97, 146.39, 130.87, 129.90, 127.91, 127.36, 127.15, 126.43, 126.07, 125.44, 124.41, 122.74, 115.06, 114.99, 109.92, 65.10, 57.67, 33.95, 30.86.

25,26,27,28-Тетраакис-3-[4-(4'-сульфонилфенилдиазинил)фенокси]бутокси-5,11,17,23-тетра(трет-бутил)тиакаликс[4]арен (**3c**). Выход 0.13 г (71%). Масс-спектр, *m/z* (ИЭР МС): вычислено для  $[\text{M}-\text{C}_{48}\text{H}_{31}\text{N}_6\text{O}_9\text{S}_3]^-$  ( $\text{C}_{72}\text{H}_{89}\text{N}_2\text{O}_{11}\text{S}_5$ ): 1317.5075, найдено: 1317.5073.  $T_{\text{пл}}$ . 219 °C (разл.).  $R_f$  (этилацетат : петролейный эфир=10:1) 0.53. Найдено, %: C 64.11; N 5.31; S 11.44.  $\text{C}_{120}\text{H}_{120}\text{N}_8\text{O}_{20}\text{S}_8$ . Вычислено, %: C 64.04; N 5.37; S 11.40. ИК (KBr)  $\nu_{\max}$  см<sup>-1</sup>: 2953 (C<sub>Ar</sub>-H), 1474, 1440 (N=N), 1240, 1199, 1047 (SO<sub>2</sub>). <sup>1</sup>H ЯМР ([D<sub>6</sub>]DMSO, 400 МГц, 25 °C)  $\delta_{\text{H}}$  м.д.: 8.98–8.97 (4H, м, ArH<sub>azo</sub>), 8.87–8.86 (4H, м, ArH<sub>azo</sub>), 8.07–8.06 (8H, м, ArH<sub>azo</sub>), 7.69–7.62 (12H, м, ArH<sub>azo</sub>, ArH), 7.36–7.31 (12H, м, ArH<sub>azo</sub>), 7.13–7.11 (8H, м, ArH<sub>azo</sub>), 3.98–3.77 (16H, м, OCH<sub>2</sub>), 1.62 (16H, м, CH<sub>2</sub>), 1.24 (36H, с, *t*-Bu). <sup>13</sup>C ЯМР ([D<sub>6</sub>]DMSO, 101 МГц, 25 °C)  $\delta_{\text{C}}$  м.д.: 161.53, 156.74, 156.64, 147.29, 146.94, 146.42, 145.33, 130.89, 129.90, 127.92, 127.43, 126.43, 126.07, 125.03, 124.40, 122.73, 114.98, 109.91, 68.42, 67.96, 60.67, 47.92, 33.85, 30.91, 28.83, 26.49, 25.42, 25.03.

## Результаты и их обсуждение

Синтез целевых азопроизводных тиакаликс[4]-арена **2** и **3** проводился в две стадии (Схема 1). На первой стадии были получены тетразамещенные бромалкокси-производные тиакаликс[4]арена **1** по реакции Мицунобу<sup>[26]</sup> и Вильямсона.<sup>[27]</sup> Соединения **1b-c** были выделены в результате взаимодействия незамещенного тиакаликсарена с 1,3-дибромпропаном и 1,4-дибромбутаном, где в качестве основания для депротонирования гидроксильных групп был использован карбонат калия. Синтез бромпроизводного **1a** был осуществлен в системе трифенилфосфин (TRP)/диэтилазодикарбоксилат (DEAD), так как в случае нуклеофильного замещения использование 1,2-дибромэтана приводит к образованию продуктов внутримолекулярной и межмолекулярной сшивки,<sup>[31]</sup> что снижает выход продукта **1a**. На второй стадии были получены целевые соединения **2** и **3** в конформации *1,3-альтернат* в ходе взаимодействия бромалкокси-производных **1** с 4-[(4-гидроксифенил)диазинил]бензолсульфоновою и 4-(4'-гидроксифенилазо)нафтионовой кислот в условиях реакции Вильямсона.

Структуры полученных соединений **2** и **3** были охарактеризованы комплексом физико-химических методов анализа (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C ЯМР и ИК-спектроскопия, масс-спектрометрия высокого разрешения с ионизацией электрораспылением (ИЭР МС)). В <sup>1</sup>H ЯМР спектрах полученных соединений наблюдается классических набор сигналов, характерный для симметричных тетразамещенных тиакаликс[4]аренов: присутствуют сигналы трет-бутильных групп и ароматических протонов тиакаликсареновой платформы в виде сингле-

тов, сигналы метиленовых протонов в виде мультиплетов, а также характерный набор сигналов для *para*-замещенных ароматических заместителей в области слабых полей. В  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектрах наблюдаются сигналы  $sp^3$ -углеродов *tert*-бутильных групп и алкилденового спейсера в области сильных полей, а также  $sp^2$ -ароматических углеродов в области слабых полей. В масс-спектрах высокого разрешения ИЭР МС (Рисунок 1), зарегистрированных в отрицательном режиме, основные пики соответствуют квазимолекулярным ионам продуктов фрагментации в виде моноанионов, несущих один сульфатный фрагмент. При этом, для соединений **2a** и **3a** со спейсером с двумя метиленовыми группами наблюдаются пики продуктов более полного распада, включая продукты полного деалкилирования, чем для **3b-c** с более длинными спейсерами с тремя и четырьмя метиленовыми группами, структура которых менее стерически загружена. Для производных **3a** и **3b** наблюдаются пики фрагментных ионов с отщеплением воды (для **3a**  $m/z=1125.3331$ , для **3b**  $m/z=1243.4330$ ).

Следующий этап работы заключался в изучении комплексообразования полученных азопроизводных **2b**

и **3b** с одинаковой длиной алкилденового спейсера ( $n=3$ ), но с различными заместителями при азо-группах (Рисунок 2).

Для комплексообразования с макроциклами **2b** и **3b**, содержащими отрицательно заряженные сульфогруппы, использовались наиболее распространенные красители катионного типа – родамин В (**RhB**), родамин 6G (**Rh6G**) и родамин 123 (**Rh123**) (Рисунок 3). Молекулы всех используемых красителей обладают высокой интенсивностью люминесценции и фотостабильностью.<sup>[32-33]</sup>

Комплексообразование соединений **2b** и **3b** с родаминами было изучено с помощью флуоресцентной спектроскопии. Для всех изученных систем наблюдалось тушение люминесценции красителей при добавлении макроциклов, что свидетельствует о комплексообразовании (Рисунок 4). В случае систем **Rh6G** (Рисунок 4a) с соединениями **2b** и **3b** увеличение концентрации макроцикла приводит к гипсохромному (синему) сдвигу максимума полосы эмиссии красителя (5 и 8 нм, соответственно). Для **RhB** (Рисунок 4б) и **Rh123** такого эффекта не наблюдается.

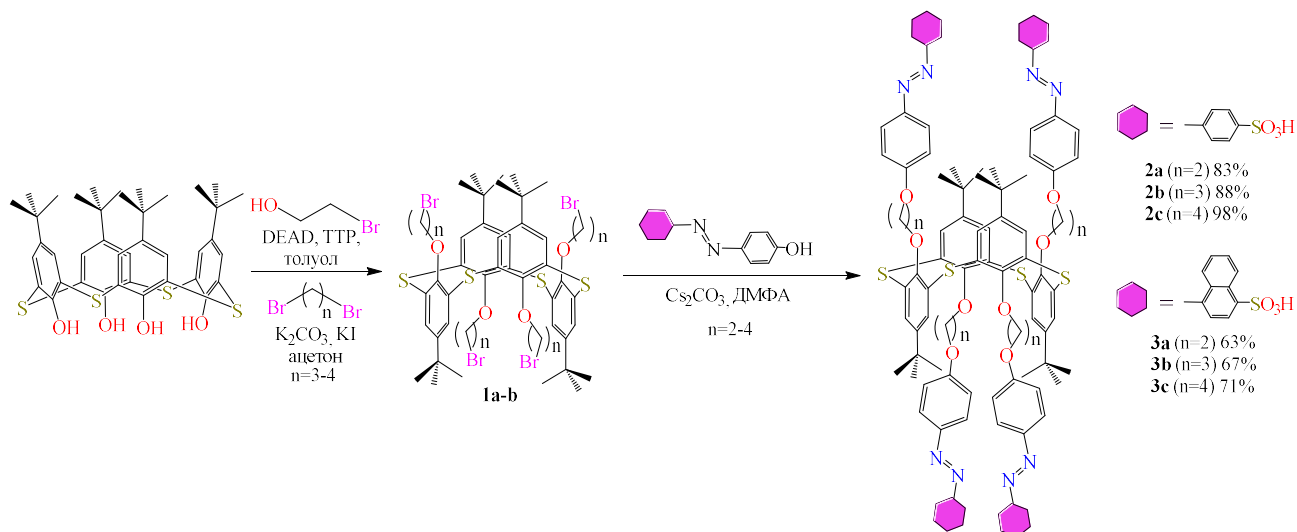


Схема 1.

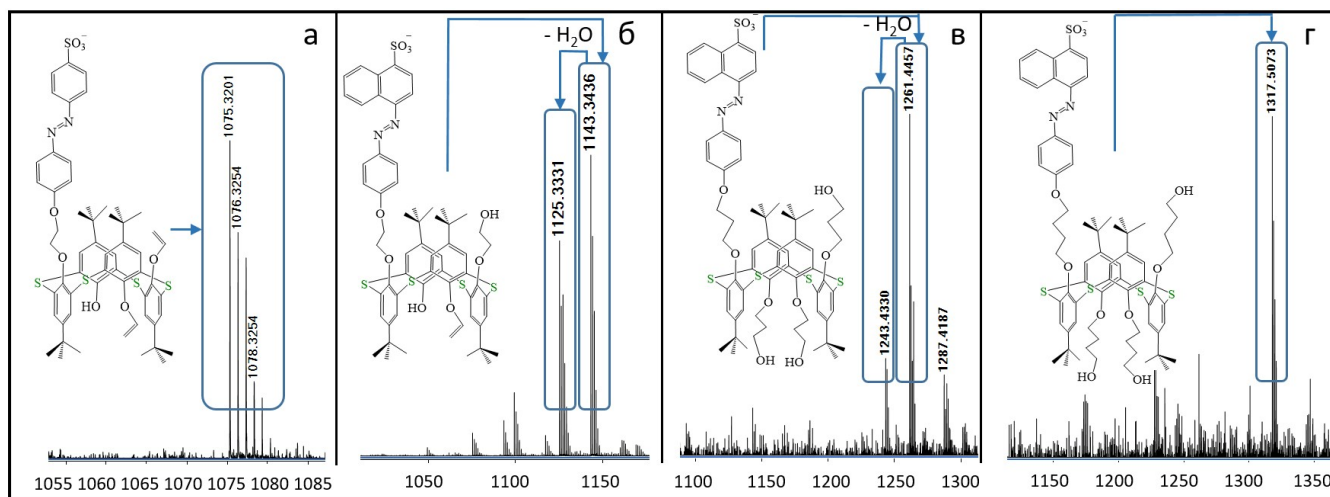


Рисунок 1. Фрагменты масс-спектров МС ИЭР соединений **2a** (а), **3a** (б), **3b** (в), **3c** (г).

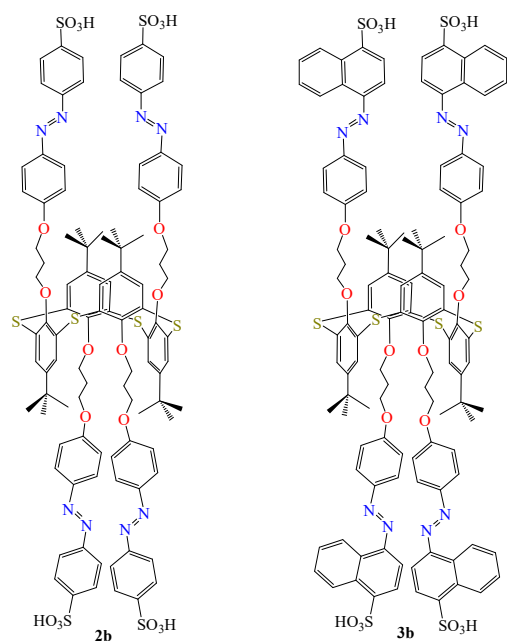
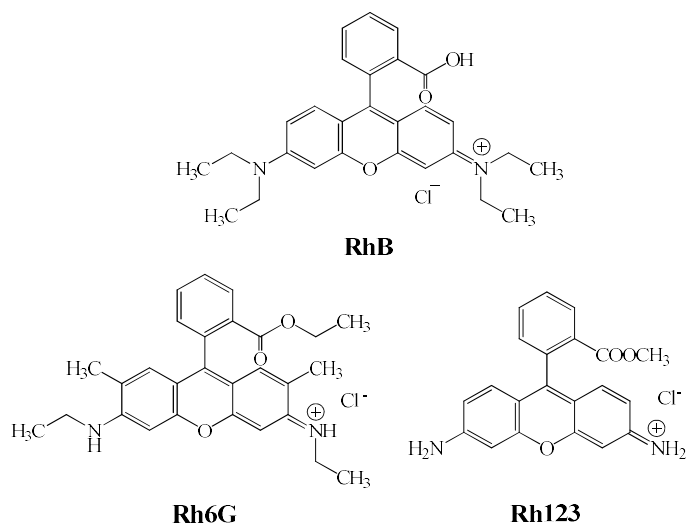
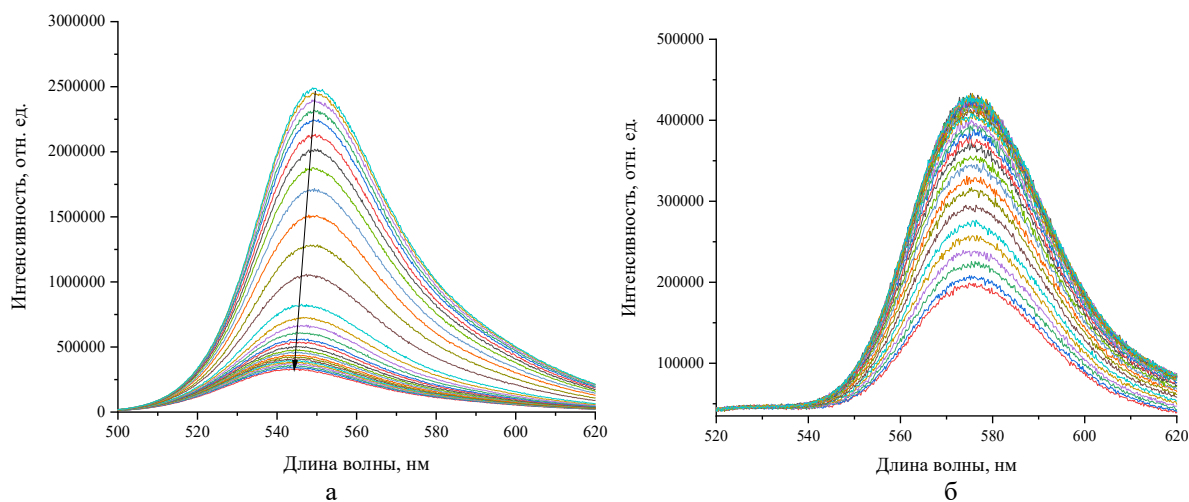
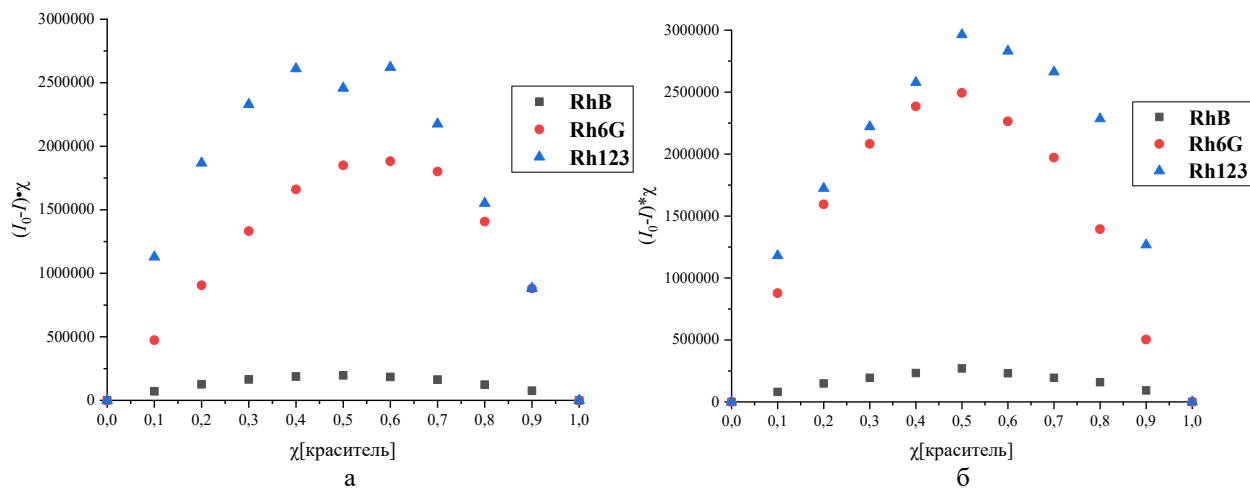
Рисунок 2. Структура соединений **2b** и **3b**.

Рисунок 3. Структуры родаминовых красителей, используемых в бинарных системах макроцикл-краситель.

Рисунок 4. Изменения люминесценции красителей **Rh6G** (а) и **RhB** (б) в процессе титрования макроциклом **2b**.  $C[\text{краситель}] = 1 \mu\text{M}$ ,  $C[\text{макроцикл}] = 0\text{--}10 \mu\text{M}$ , фосфатный буфер,  $\text{pH } 7.4$ ,  $37^\circ\text{C}$ .Рисунок 5. Диаграммы Жоба макроциклов **2b** (а) и **3b** (б) с родаминовыми красителями.  $C[\text{общая}] = 2 \mu\text{M}$ , фосфатный буфер,  $\text{pH } 7.4$ ,  $37^\circ\text{C}$ .

Состав образующихся комплексов был изучен методом изомольных серий, в котором стехиометрическое соотношение реагирующих веществ соответствует максимуму испускания. Ранее было показано, что для азопроизводных каликс[4]арена в конформации конус, которые также содержат сульфогруппы, образуются комплексы макроцикл:краситель состава 1:1.<sup>[22]</sup> Учитывая, что для лигандов **2b** и **3b** в конформации *1,3-альтернат* сульфогруппы расположены по обе стороны макроциклического остова, вероятнее было ожидать формирование комплексов со стехиометрией макроцикл:краситель 1:2. Однако такое соотношение наблюдалось только в случае **2b** с **Rh6G**. При этом с **RhB** образуются комплексы состава 1:1, а с **Rh123** – смешанные комплексы различного состава (Рисунок 5а). В случае соединения **3b** комплексы со всеми используемыми родаминами имеют стехиометрию 1:1 (Рисунок 5б), что может быть связано с более выраженным аллостерическим эффектом макроцикла в конфигурации *1,3-альтернат*,<sup>[34]</sup> когда в процессе комплексообразования с одной стороны от плоскости макроцикла происходит сближение заместителей, в то время как на противоположной стороне заместители отдаляются друг от друга, что препятствует комплексообразованию.

Для сравнения степени связывания красителей макроциклами методом флуоресцентного титрования были оценены константы связывания (Таблица 1), рассчитанные по двойному логарифму от концентрации макроцикла.<sup>[35]</sup> Для обоих макроциклов наибольшие значения констант связывания наблюдались в случае систем с **Rh6G**. При этом для систем с другими красителями – родаминами **B** и **123** константы связывания с макроциклом **3b** были выше, чем для **2b**. В связи с тем, что исследуемые соединения **2b** и **3b** при pH 7.4 находятся в анионной форме, а красители – в катионной, то электростатические взаимодействия являются движущей силой образования таких комплексов. Более предпочтительное взаимодействие макроциклов **2b** и **3b** с **Rh6G** по сравнению с **RhB** и **Rh123** повторяет общую тенденцию ранее изученных систем на основе азопроизводных (тиа)каликс[4]аренов и, по всей видимости, связано со сравнительно высокой гидрофобностью **Rh6G**, что благоприятствует взаимодействию с гидрофобной полостью тиакаликсарена.<sup>[22,23]</sup>

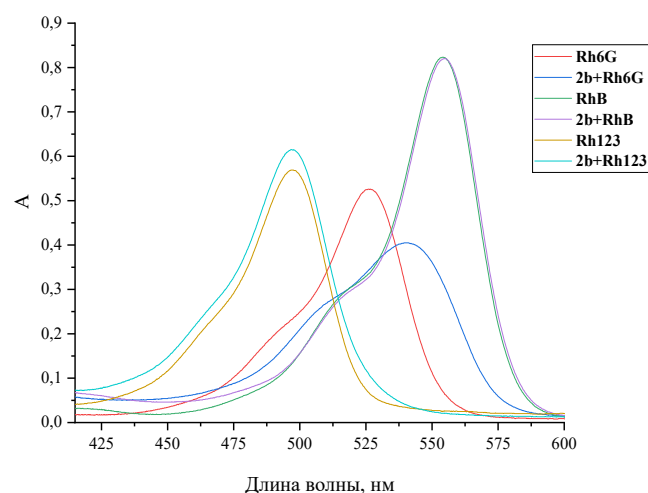
Разные значения констант связывания в системе краситель-макроцикл проявляется также в спектрах поглощения. С помощью УФ-спектроскопии было показано, что при добавлении азотиакаликсарена **2b** к **Rh6G** происходит понижение интенсивности поглощения света (гипохромный эффект) и батохромный сдвиг, в то время как для **RhB** изменения в спектре поглощения в присутствии макроцикла **2b** не наблюдается. В случае **Rh123** при добавлении лиганда отмечается только гипохромный эффект (Рисунок 6).

Для определения механизма тушения люминесценции красителей было проведено флуоресцентное титрование красителя **Rh6G** макроциклом **3b** при разных температурах. Из литературных источников известно, что при статическом тушении повышение температуры способствует разложению темного комплекса, а при динамическом тушении повышение температуры увеличивает частоту столкновений частиц.<sup>[36]</sup>

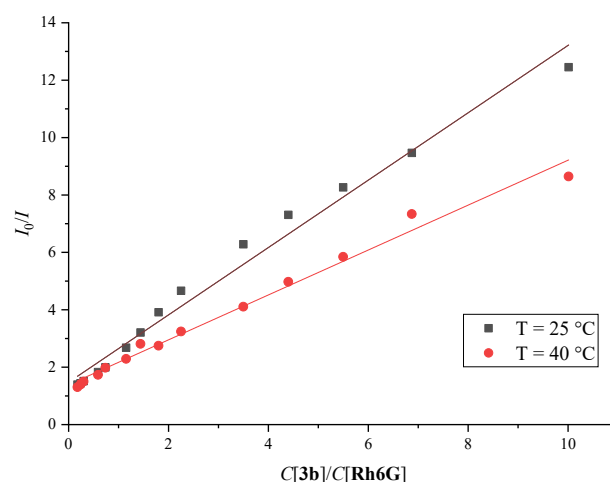
Согласно полученным данным (Рисунок 7), повышение температуры с 25° С до 40° С снижает тушение флуоресценции красителя в бинарной системе **Rh6G** - **3b**, что указывает на статическое тушение в качестве основного механизма тушения, а также доказывает образование комплекса тиакаликсарен-краситель.

**Таблица 1.** Константы связывания каликсаренов **2b** и **3b** с родаминами красителями.

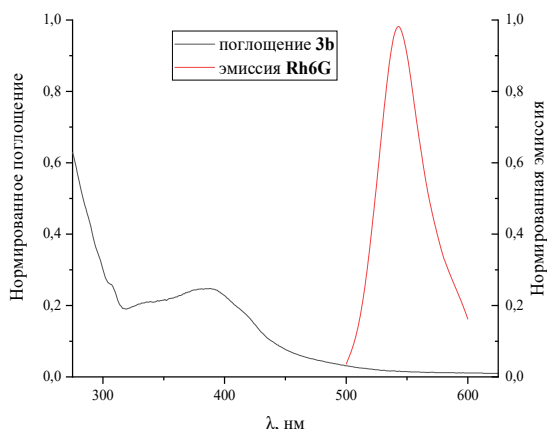
Система	$K_a, M^{-1}$	Стехиометрия макроцикл : краситель
<b>RhB-2b</b>	$2.0 \pm 0.4 \cdot 10^3$	1:1
<b>RhB-3b</b>	$4.0 \pm 0.1 \cdot 10^5$	1:1
<b>Rh6G-2b</b>	$1.6 \pm 0.1 \cdot 10^6$	1:2
<b>Rh6G-3b</b>	$2.0 \pm 0.1 \cdot 10^6$	1:1
<b>Rh123-2b</b>	$1.0 \pm 0.6 \cdot 10^3$	-
<b>Rh123-3b</b>	$6.0 \pm 0.3 \cdot 10^5$	1:1



**Рисунок 6.** Спектры поглощения красителей и двойных систем макроцикл **2b** – краситель.  $C[2b] = 10 \mu M$ ,  $C[\text{краситель}] = 10 \mu M$ , фосфатный буфер, pH 7.4, 37 °С.



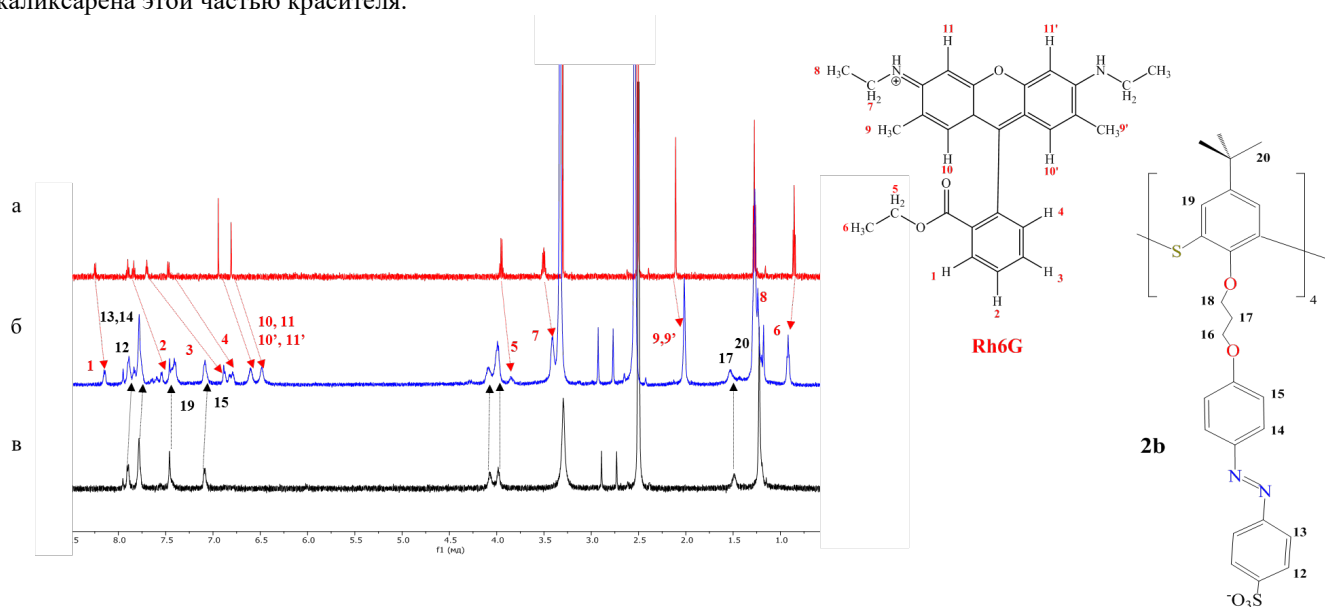
**Рисунок 7.** Кривые в координатах Штерна-Фольмера для системы **Rh6G-3b** при разных температурах.  $C[\text{Rh6G}] = 1 \mu M$ ,  $C[3b] = 0-10 \mu M$ , фосфатный буфер, pH 7.4.



**Рисунок 8.** Нормированные спектр поглощения макроцикла **2b** и спектр эмиссии **Rh6G**.  $C[\text{Rh6G}] = C[\text{2b}] = 10 \mu\text{M}$ , фосфатный буфер, pH 7.4, 37 °C.

Существует два основных типа механизмов тушения флуоресценции в комплексе макроцикл-краситель: резонансный перенос энергии Ферстера (FRET) или фотоиндуцированный перенос электронов (PET). Линейность зависимости  $I_0/I$  ( $I_0$  – интенсивность излучения свободного красителя,  $I$  – интенсивность излучения связанного красителя) от концентрации тушителя для макроцикла **3b** (Рисунок 7) указывает на преобладание только одного типа механизма тушения. Учитывая тот факт, что перекрытие полосы поглощения макроциклов с полосой излучения красителя отсутствует (Рисунок 8), механизм FRET можно исключить. Таким образом, PET является наиболее вероятным механизмом тушения.

Комплексообразование **2b** и **3b** с **Rh6G** было изучено также методом  $^1\text{H}$  ЯМР спектроскопии. В ЯМР спектре комплекса краситель-**2b** наблюдаются сильно-полюсные сдвиги сигналов для **Rh6G** (Рисунок 9). Наибольшие сдвиги обнаружены для ароматических протонов фрагмента, содержащего сложнэфирную группу (для  $\text{H}_2$  наблюдается  $\Delta\delta=0.37$  м.д., а для  $\text{H}_{3,4}$   $\Delta\delta = 0.96$  и 0.68 м.д.), что объясняется погружением в полость калликсарена этой частью красителя.



**Рисунок 9.**  $^1\text{H}$  ЯМР спектры 1.25 mM **Rh6G** (а), 2.5 mM соединения **2b** (в) и их (0.5:1) комплекса (б) ( $\text{DMSO}-d_6$ , 25°C, 600 МГц).

В ЯМР спектре комплекса краситель-**3b** (Рисунок 10) наблюдаются меньшие значения сдвигов сигналов для **Rh6G** по сравнению с комплексом краситель-**2b** (для  $\text{H}_2$  наблюдается  $\Delta\delta=0.07$  м.д., а для  $\text{H}_{3,4}$   $\Delta\delta = 0.17$  и 0.11 м.д., соответственно), что возможно связано с меньшей степенью погружения красителя в полость макроцикла.

Важным моментом для использования систем макроцикл-краситель в биологических средах является отсутствие взаимодействий, приводящих к разрушению комплексов азо-каликсаренов с красителями и возобновлением флуоресценции последних в условиях, не связанных с явлением гипоксии. По этой причине все комплексы были протестированы на наличие флуоресцентного отклика с различными объектами, присутствующими в биологических средах (Рисунок 11). Интенсивность эмиссии красителей при добавлении третьего компонента в двойные системы с высокими значениями  $K_a$  (**2b-Rh6G**, **3b-Rh6G**, **3b-RhB**, **3b-Rh123**) не изменяется, что свидетельствует об отсутствии конкурирующего взаимодействия вводимого анализа с красителем или комплексом. Для комплексов с низкими значениями  $K_a$  (**2b-RhB**) наблюдается усиление эмиссии красителя (до 12% в случае иона  $\text{Na}^+$ ) за счет вытеснения из полости макроцикла некоторыми конкурирующими биоаналитами и ионами металлов. В случае системы **2b-Rh123** наоборот, наблюдается небольшое тушение люминесценции, что также характеризует слабое комплексообразование.

Сравнение комплексообразующих свойств азо-производных **2b** и **3b**, показало, что наилучшее связывание для обоих триакаликсаренов наблюдалось с **Rh6G**, и если в случае соединения **2b** состав комплекса 1:2, то для **3b** образуются комплексы состава 1:1, что может быть связано с аллостерическим эффектом. При этом константы связывания с другими красителями для соединения **3b**, содержащего фрагмент нафталина, оказались выше на порядок, чем для производного **2b**. На примере системы **Rh6G-3b**, показано, что для данных комплексов характерен статический механизм тушения.

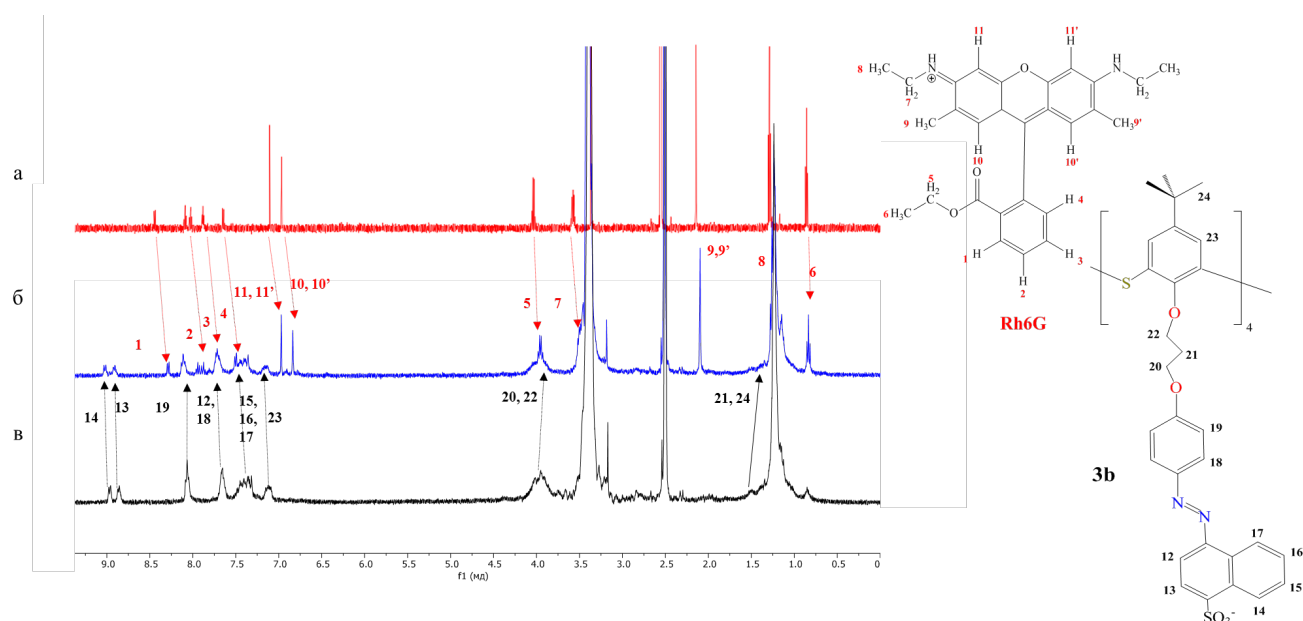


Рисунок 10.  $^1\text{H}$  ЯМР спектры 1.25 мМ Rh6G (а), 2.5 мМ соединения **2b** (в) и их (0.5:1) комплекса (б) ( $\text{DMSO-}d_6$ , 25°C, 600 МГц).

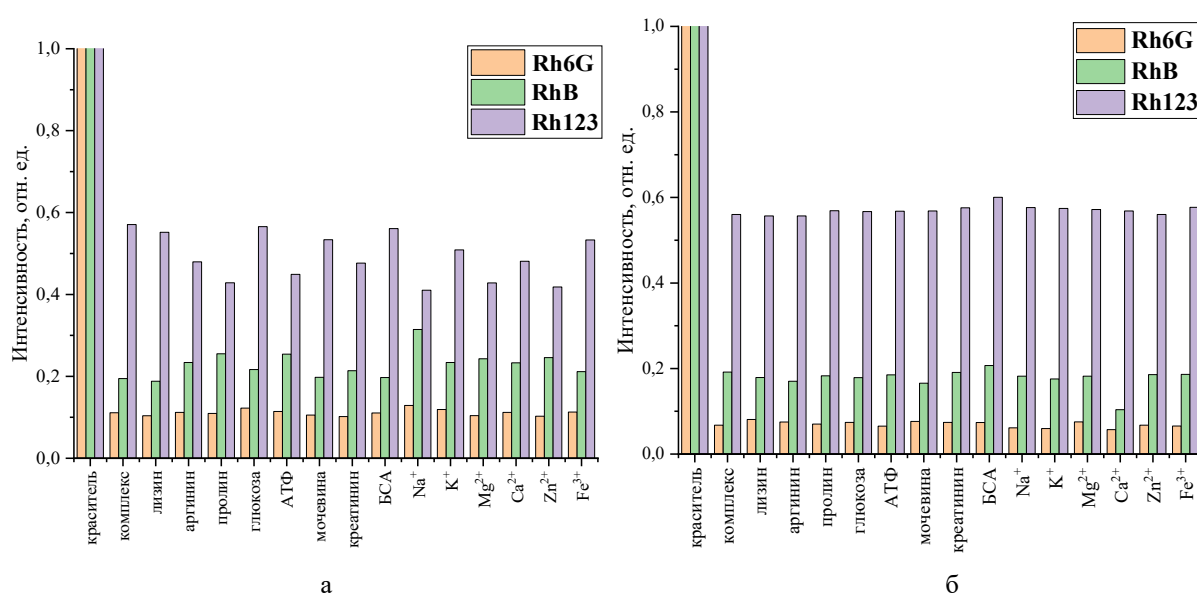


Рисунок 11. Флуоресцентный отклик двойных систем краситель–макроцикл **2b** (а), **3b** (б) на введение третьего компонента;  $C[\text{краситель}] = 1 \mu\text{M}$ ,  $C[\text{макроцикл}] = 3 \mu\text{M}$ ,  $C[\text{биоаналит}] = 10 \mu\text{M}$ , фосфатный буфер,  $\text{pH } 7.4$ , 37 °C

## Заключение

Синтезированы тетразамещённые азопроизводные тиаксаликс[4]арена **2** и **3** в конформации *1,3-альтернат*, содержащие сульфогруппы на нижнем ободе. Получены супрамолекулярные комплексы с родаминовыми красителями на основе макроциклических лигандов **2b** и **3b**, что было подтверждено методами  $^1\text{H}$  ЯМР, УФ и флуоресцентной спектроскопии. Сравнение комплексообразующих свойств азопроизводных **2b** и **3b** в отношении родаминовых красителей показало, что наилучшее связывание для обоих тиаксаликсаренов наблюдалось с Rh6G, и если в случае соединения **2b** образуются комплексы с различной стехиометрией, то для **3b** образу-

ются исключительно комплексы состава 1:1, что может быть связано с более выраженным аллостерическим эффектом. Константы связывания с другими красителями для соединения **3b**, содержащего фрагмент нафталинсульфокислоты, оказались на два порядка выше, чем для производного **2b**. Было показано, что для систем с высоким значением  $K_a$  конкурентное комплексообразование с присутствующими в биологических средах объектами отсутствует.

**Благодарности.** Работа выполнена при поддержке Российского Научного Фонда (проект № 22-73-10138) с привлечением оборудования ЦКП-САЦ ФИЦ КазНЦ РАН.



## Список литературы

## References

- Thomlinson R.H., Gray L.H. *Br. J. Cancer* **1955**, *9*, 539–549. DOI: 10.1038/bjc.1955.55.
- Li Y., Zhao L., Li X.F. *Front. Oncol.* **2021**, *11*, 700407. DOI: 10.3389/fonc.2021.700407.
- Chen Z., Han F., Du Y., Shi H., Zhou W. *Sig. Transduct. Target Ther.* **2023**, *8*, 70. DOI: 10.1038/s41392-023-01332-8.
- Brown J.M., Wilson W.R. *Nat. Rev. Cancer* **2004**, *4*, 437–447. DOI: 10.1038/nrc1367.
- Lee J.W., Ko J., Ju C., Eltzhig H.K. *Exp. Mol. Med.*, **2019**, *51*, 1–13. DOI: 10.1038/s12276-019-0235-1.
- Span P.N., Bussink J.B. *Semin. Nucl. Med.* **2015**, *45*, 101–109. DOI: 10.1053/j.semnuclmed.2014.10.002.
- Wilson W.R., Hay M.P. *Nat. Rev. Cancer* **2011**, *11*, 393–410. DOI: 10.1038/nrc3064.
- Fitzsimmons S.A., Workman P., Grever M., Paull K., Camalier R., Lewis A.D. *J. Natl. Cancer Inst.* **1996**, *88*, 259–269. DOI: 10.1093/jnci/88.5.259.
- Kelley E.E., Hock T., Khoo N.K.H., Richardson G.R., Johnson K.K., Powell P.C., Giles G.I., Agarwal A., Lancaster J.R., Tarpey M.M. *Free. Radic. Biol. Med.* **2006**, *40*, 952–959. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2005.11.008.
- Janczy-Cempa E., Mazuryk O., Sirbu D., Chopin N., Zarnik M., Zastawna M., Colas C., Hiebel M.-A., Suzenet, F., Brindell M. *Sens. Actuators, B* **2021**, *346*, 925–4005. DOI: 10.1016/j.snb.2021.130504.
- Klockow J.L., Hettie K.S., LaGory E.L., Moon E.J., Giaccia A.J., Graves E.E., Chin F.T. *Sens. Actuators, B* **2020**, *306*, 127446. DOI: 10.1016/j.snb.2019.127446.
- Wang Y., Han X., Zhang X., Zhang L., Chen L. *Analyst* **2020**, *145*, 1389–1395. DOI: 10.1039/c9an02436k.
- Zheng J., Shen Y., Xu Z., Yuan Z., He Y., Wei C., Er M., Yin J., Chen H. *Biosens. Bioelectron.* **2018**, *119*, 141–148. DOI: 10.1016/j.bios.2018.08.014.
- Wang C., Zhang S., Huang J., Cui L., Hu J., Tan S. *RSC Adv.* **2019**, *9*, 21572–21577. DOI: 10.1039/c9ra02741f.
- Griffeth L.K. *Baylor University Medical Center Proceedings* **2005**, *18*, 321–330. DOI: 10.1080/08998280.2005.11928089.
- Chapman J.D., Engelhardt E.L., Stobbe C.C., Schneider R.F., Hanks G.E. *Radiother. Oncol.* **1998**, *46*, 229–237. DOI: 10.1016/s0167-8140(97)00186-2.
- Zhao D., Constantinescu A., Hahn E.W., Mason R.P. *Radiat. Res.* **2001**, *156*, 510–520. DOI: 10.1667/0033-7587(2001)156[0510: todwrt]2.0.co;2.
- Zhao D., Jiang L., Mason R.P. *Methods Enzymol.* **2004**, *386*, 378–418. DOI: 10.1016/S0076-6879(04)86018-X.
- Kim G., Huang S.W., Day K.C., O'Donnell M., Agayan R.R., Day M.A., Kopelman R., Ashkenazi S. *J Biomed Opt.* **2007**, *12*, 044020. DOI: 10.1117/1.2771530.
- Sandhu S., Kydd L., Jaworski J. *J. Nanomed. Res.* **2017**, *6*, 00160. DOI: 10.15406/jnmr.2017.06.00160.
- Geng W.-C., Jia S., Zheng Z., Li Z., Ding D., Guo D.-S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58*, 2377–2381. DOI: 10.1002/anie.201813397.
- Mironova D., Burilov B., Galieva F., Khalifa M.A.M., Kleshchina S., Gazalieva A., Nugmanov R., Solovieva S., Antipin I. *Molecules* **2021**, *26*, 5451. DOI: 10.3390/molecules26185451.
- Galieva F., Khalifa M., Akhmetzyanova Z., Mironova D., Burilov V., Solovieva S., Antipin I. *Molecules* **2023**, *28*, 466. DOI: 10.3390/molecules28020466.
- Armarego W.L.F., Chai C.L.L. *Purification of Laboratory Chemicals*. New York: Elsevier **2009**, 743 p.
- Gutsche C.D., Iqbal M., Stewart D. *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 742. DOI: 10.1021/jo00355a033.
- Bitter I., Csokai V. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 2261–2265. DOI: 10.1016/S0040-4039(03)00285-5.
- Tyuftin A.A., Solovieva S.E., Muravrev A.A., Polyantsev F.M., Latypov Sh.K., Antipin I.S. *Chem. Bull., Int. Ed.* **2009**, *58*, 145–151. DOI: 10.1007/s11172-009-0022-6.
- Gabdrakhmanova F.B., Churbanova E.S., Khalifa M.A., Kleshchina S.R., Solovieva S.E., Antipin I.S. *Molbank* **2023**, *2023*, M1570. DOI:10.3390/M1570.
- Wei Y., Zeng Q., Bai S., Wang M., Wang L.J. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, *9*, 44114–44123. DOI: 10.1021/acsami.7b14772.
- Kantar C., Ataci E., Amaz S. *Turkish Journal of Chemistry* **2014**, *38*, 1185–1200. DOI:10.3906/kim-1404-35.
- Akdas H., Bringel L., Bulach V., Graf E., Hosseini M.W., De Cian A. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 8975–8979. DOI: 10.1016/S0040-4039(02)02152-4.
- Rajasekar M. *J. Mol. Struct.* **2021**, *1235*, 130232. DOI: 10.1016/j.molstruc.2021.130232.
- Gill H., Gokel M.R., McKeever M., Negin S., Patel M.B., Yin S., Gokel G.W. *Coord. Chem. Rev.* **2020**, *412*, 213264. DOI: 10.1016/j.ccr.2020.213264.
- Pérez-Casas C., Rahman S., Begum N., Xi Z., Yamato T. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2008**, *60*, 173–185. DOI:10.1007/s10847-007-9367-3.
- van de Weert M., Stella L. *J. Mol. Struct.* **2011**, *998*, 144–150. DOI: 10.1016/j.molstruc.2011.05.023.
- Lakowicz J.R. *Springer US* **2006**, 27–61. DOI: 10.1007/978-1-4757-3061-6.

Received 06.04.2024

Accepted 02.05.2024