

Katarzyna JUREK
Janina KABATC

BARWNIKI SKWARYLIOWE JAKO SONDY FLUORESCENCYJE DO OZNACZANIA BIOCZAŚTECZEK

STRESZCZENIE *Chemiczna modyfikacja struktury barwników skwaryliowych daje nowe układy chromoforowe o szerokim zakresie właściwości optycznych, takich jak absorpcja światła i emisja fluorescencji, z zakresu światła od widzialnego do bliskiej podczerwieni. Otrzymano nowe funkcjonalne barwniki, w których pod wpływem bodźca zewnętrznego lub oddziaływań chemicznych, zachodzą zmiany w rozmieszczeniu ładunku elektronowego w chromoforze skwaryliowym. Z uwagi na wyraźne zmiany ich właściwości spektroskopowych pod wpływem połączenia z substancją analizowaną, mogą znaleźć praktyczne zastosowanie, jako markery fluorescencyjne do oznaczania biocząsteczek.*

Słowa kluczowe: sondy fluorescencyjne, barwniki skwaryliowe, serum albuminy wołowej

1. WSTĘP

Barwniki skwaryliowe, zsyntezowane po raz pierwszy przez Jacoba w 1965 r. to obszerna grupa związków o szczególnych właściwościach fotofizycznych i fotochemicznych [1]. Zaliczane są do barwników polimetinowych, które mają w strukturze czterocząsteczkowy pierścień kwasu kwadratowego. Związki te absorbują promieniowanie elektromagnetyczne z zakresu światła widzialnego i bliskiej podczerwieni. Charakteryzują się również wysoką wydajnością kwantową fluorescencji. Z tego względu znalazły szerokie zastosowanie do oznaczania biocząsteczek w chemii, naukach przyrodniczych i medycynie klinicznej.

dr inż. Katarzyna JUREK, dr hab. inż., Janina KABATC
e-mail: [katjurek; nina]@utp.edu.pl

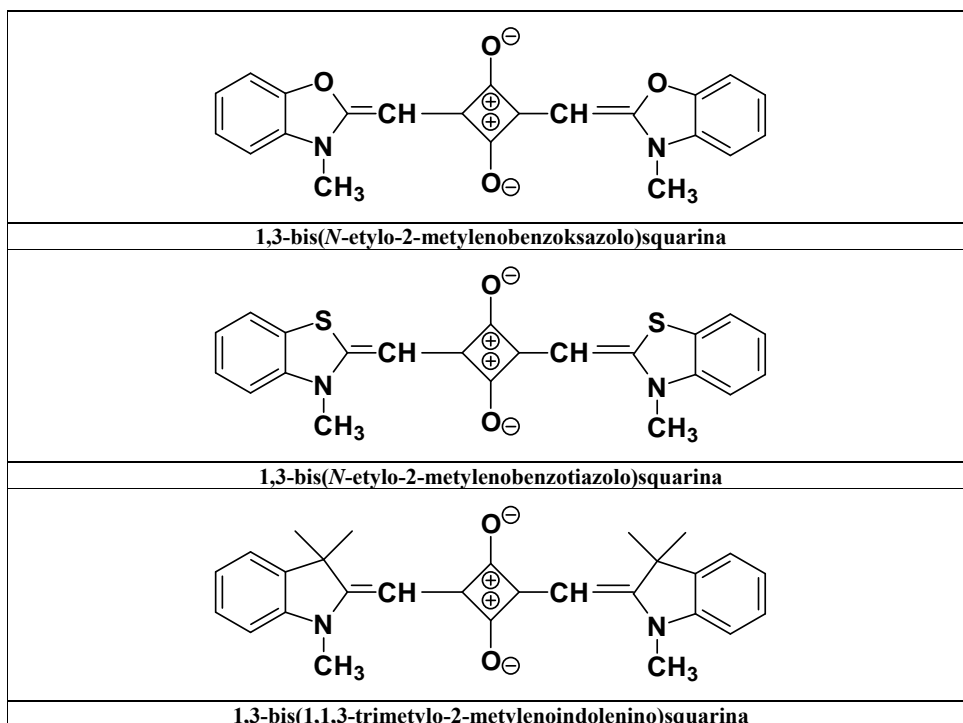
Wydział Technologii i Inżynierii Chemicznej,
Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy
im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich w Bydgoszczy,
ul. Seminaryjna 3, 85-326 Bydgoszcz

PRACE INSTYTUTU ELEKTROTECHNIKI, zeszyt 268, 2015

Albuminy to główne białka krążące w osoczu krwiobiegu. Produkowane w wątrobie, odgrywają znaczącą rolę w utrzymaniu ciśnienia koloidalnego i osmotycznego. Odpowiadają za wiązanie długocząsteczkowych kwasów tłuszczowych, bilirubiny, kwasów żółciowych, wapnia i magnezu. Działają one również, jako nośnik dla odżywczych czynników i leków. Ponieważ albumina surowicy jest wiarygodnym wskaźnikiem zachorowalności i śmiertelności, chorób wątroby, nerek i niedożywienia, zatem konieczne jest opracowanie metod analitycznych ich badania. Z uwagi na wykorzystywanie barwników skwaryliowych w różnych technologiach z zakresu NIR oraz dużą czułość, selektywność i prostotę metody spektrofotometrycznej, wydają się one obiecujące, jako potencjalne sondy fluorescencyjne do wykrywania i oznaczania albumin z zakresu NIR [2-4].

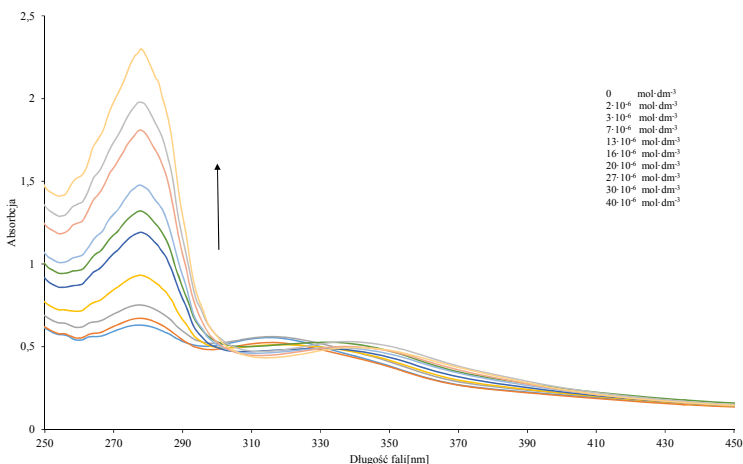
2. WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA

W badaniach jako potencjalne sondy do wykrywania i oznaczania serum albuminy wołowej (BSA), zastosowano zsyntezowane barwniki skwaryliowe o następującej budowie:

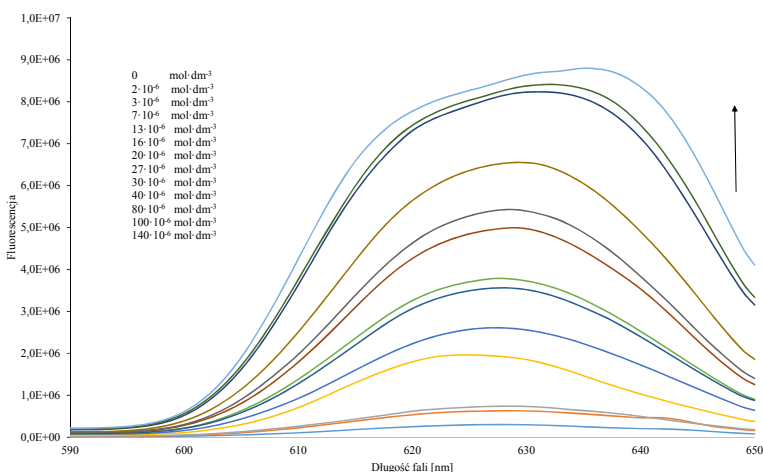


W celu określenia właściwości spektroskopowych nowych barwników zarejestrowano elektronowe widma absorpcyjne w 6 rozpuszczalnikach o różnej polarności takich jak: tetrahydrofuran (THF), metanol, nitrometan, acetonitryl, sulfotlenek dimetylowy (DMSO), woda.

Określono również wpływ stężenia serum albuminy wołowej na absorpcję barwników skwaryliowych. W tym celu przygotowano roztwory Stocka barwnika i albuminy o stężeniu $4 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ oraz bufor TRIS-HCl. Następnie do roztworu barwnika dodawano roztwór albuminy o stężeniach: $2 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $3 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $7 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $13 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $16 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $20 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $27 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $30 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $40 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Poniżej przedstawiono elektronowe widma absorpcji barwnika 1,3-bis(*N*-etylo-2-metylobenzoksazolo)skwaryliowego. Wzrost stężenia albuminy w roztworze barwników powoduje zmianę intensywności absorpcji barwnika oraz batochromowe przesunięcie pasma absorpcji, spowodowane tworzeniem asocjatu barwnik – białko.



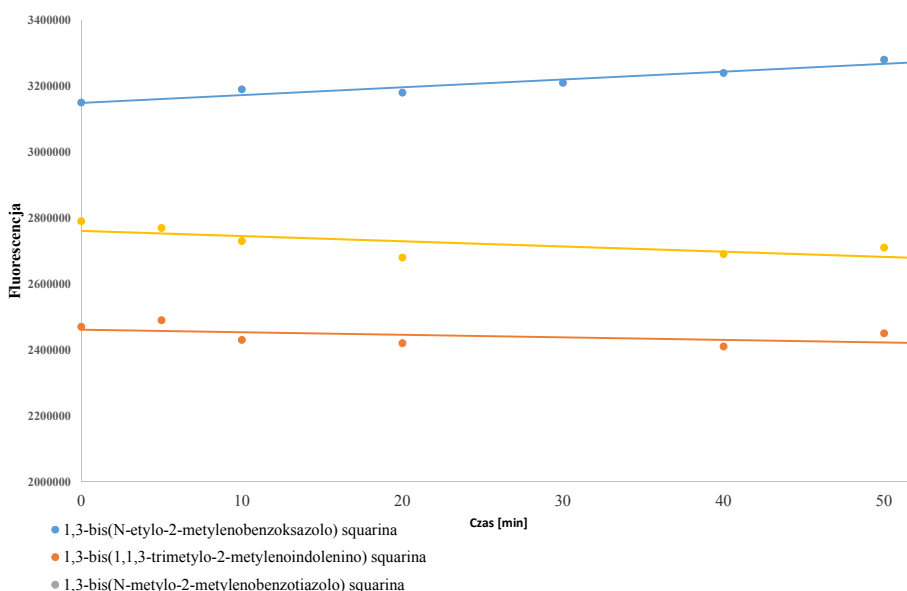
Rys. 1. Elektronowe widma absorpcji barwnika 1,3-bis (*N*-etylo-2-metylobenzoksazolo) skwaryliowego w obecności serum albuminy wołowej o różnych stężeniach



Rys. 2. Widma fluorescencji barwnika 1,3-bis (*N*-etylo-2-metylobenzoksazolo) skwaryliowego w obecności serum albuminy wołowej o różnych stężeniach

Dla takich samych stężeń barwnika i serum albuminy wołowej zarejestrowano widma fluorescencji (rys. 2). Wraz ze wzrostem stężenia serum albuminy wołowej w roztworze obserwujemy intensywny wzrost fluorescencji barwnika. Wzrost stężenia tworzącego się kompleksu białko – barwnik powoduje zmianę położenia pasma emisji w kierunku bardziej długofalowego zakresu widma co w pełni odpowiada zastosowaniu barwników jako sond spektroskopowych do oznaczania biocząsteczek, gdyż redukuje wpływ autofluorescencji samej albuminy.

Badano również proces asocjacji barwnika skwaryliowego z serum albuminy wołowej dla roztworów barwnika o stężeniu $2 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ oraz $1,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ w roztworze buforowym TRIS-HCl o pH = 8 i badano zmiany fluorescencji w czasie.



Rys. 3. Zależność zmian fluorescencji barwnika w obecności serum albuminy wołowej w funkcji czasu

Na podstawie otrzymanych wyników, wyznaczono czasy asocjacji barwnik/biocząsteczka. Wynosiły one odpowiednio: 30 minut dla 1,3-bis(*N*-etylo-2-metylenobenzoksazolo)skwaryny, 10 minut dla 1,3-bis(1,1,3-trimetylo-2-metylenoindolenino)skwaryny i 1,3-bis(*N*-metylo-2-metylenobenzotiazolo)skwaryny. Dla powyższych układów barwnik – BSA wyznaczono zależności Benesi'ego-Hildebranda zgodnie z równaniem:

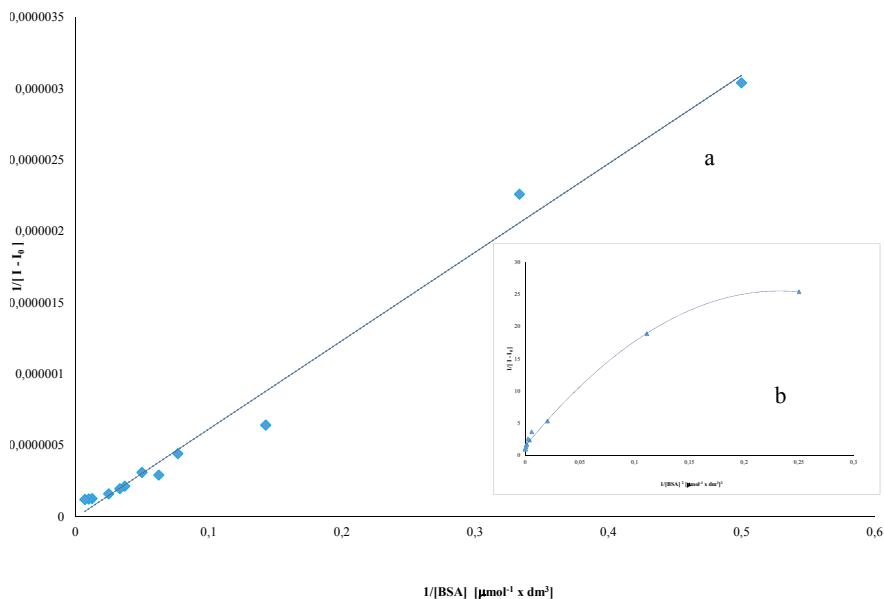
$$\text{SQ} + \text{BSA} \leftrightarrow \text{SQ} : \text{BSA}$$

$$K = \frac{[\text{SQ}:\text{BSA}]}{[\text{SQ}][\text{BSA}]}$$

Gdzie K jest to stała tworzenia w M^{-1} , natomiast stężenia każdego składnika będzie odpowiadało w tym przypadku fluorescencji danego składnika. W związku z tym zależność tą można przedstawić następująco:

$$\frac{1}{(I - I_0)} = \frac{1}{(I_1 - I_0)} + \frac{1}{(I_1 - I_0)K[BSA]}$$

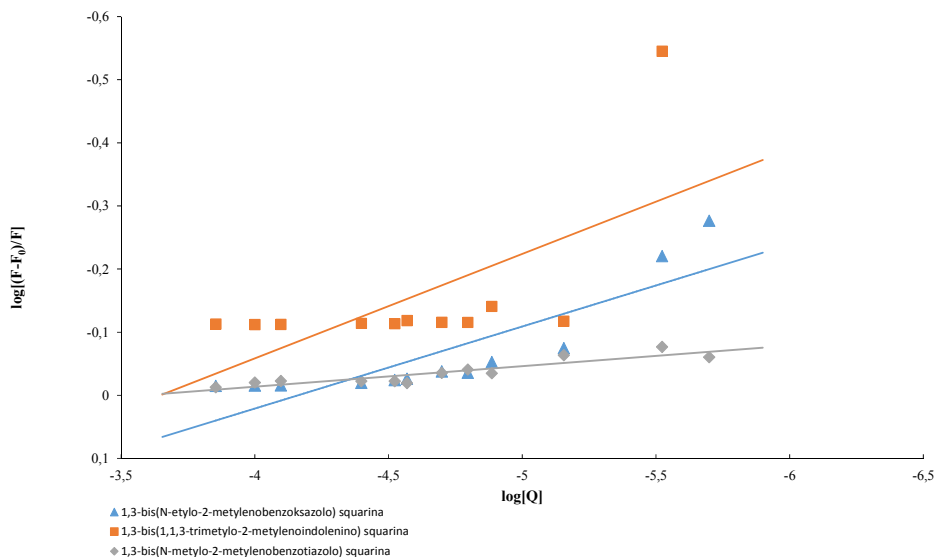
Na rysunku 4 przedstawiono zależności $1/(I - I_0)$ od odwrotności stężenia BSA oraz zależność od odwrotności kwadratu stężenia BSA. We wszystkich przypadkach obserwujemy lepsze dopasowanie kwadratowej zależności co może świadczyć o kompleksowaniu w stosunku 1:2 pomiędzy fluoroforem barwnika a proteiną (BSA).



Rys. 4. Zależność Benesi–Hildebrand dla barwnika 1,3-bis (*N*-etylo-2-metylobenzosazolu) skwaryliowego związanego z BSA ($1/(I - I_0)$ vs. $1/[BSA]$ wykres a, $1/(I - I_0)$ vs. $1/[BSA]^2$ wykres b)

Na podstawie zmodyfikowanego równania Sterna-Volmera [4] wyznaczono stałą tworzenia i liczbę miejsc wiązania zgodnie z następującą zależnością:

$$\log \frac{(F-F_0)}{F} = \log K_{SV} + n \log [Q]$$



Rys. 5. Zależność zmodyfikowanego równania Sterna-Volmera dla badanych barwników skwaryliowych związanych z serum albuminy wołowej

Na podstawie powyższych zależności dla barwników: 1,3-bis(*N*-etylo-2-metylenobenzoksazolo) skwaryny, 1,3-bis(1,1,3-trimetylo-2-metylenoindolenino) skwaryny i 1,3-bis(*N*-metylo-2-metylenobenzotiazolo) skwaryny wyznaczono stałe tworzenia K_{SV} oraz liczbę miejsc wiązania n . Otrzymane wyniki przedstawiono w tabeli 1.

TABELA 1

Zestawienie otrzymanych wartości K_b i n dla układów barwnik skwaryliowy – BSA

Barwnik	K_{SV}	n
1,3-bis(<i>N</i> -etylo-2-metylenobenzoksazolo) squarina	1,35	0,54
1,3-bis(1,1,3-trimetylo-2-metylenoindolenino) squarina	1,46	0,60
1,3-bis(<i>N</i> -metylo-2-metylenobenzotiazolo) squarina	1,08	0,12

Dla wszystkich kompleksów barwnik: albumina otrzymaliśmy zbliżone i niezbyt wysokie wartości stałych tworzenia K_{SV} oraz małą liczbę miejsc wiążących.

3. WNIOSKI

Z prezentowanych badań wynika, że 1,3-bis (*N*-etylo-2-metylenobenzoksazolo) skwaryna, 1,3-bis(1,1,3-trimetylo-2-metylenoindolenino)skwaryna i 1,3-bis (*N*-metylo-2-metylenobenzotiazolo) skwaryna mogą być stosowane jako potencjalne sondy fluorescencyjne do oznaczania protein. Na podstawie badań spektroskopowych można stwierdzić, że pomiędzy zastosowanymi barwnikami skwaryliowymi a BSA tworzą się asocjaty, czemu towarzyszy intensywny wzrost zarówno absorpcji jak i emisji sondy fluorescencyjnej.

LITERATURA

1. Treibis A., Jacob K.: *Angew. Chem.*, nr 77, s. 680, 1965.
2. Volkova K.D., Kovalska V.B., Losytskyy M.Yu., Reis L.V., Santos P.F., Almeida P., Lynch D.E., Yarmoluk S.M.: *Dyes and Pigments*, nr 90, s. 41-47, 2011.
3. Tatikolov A.S., Costa S.M.B.: *Biophys. Chem.*, nr 107, s. 33-49, 2004.
4. Anuva S., Bijan K.P., Nikhil G.: *Biophys. Chem.*, nr 156, s. 128-139, 2011.

Rękopis dostarczono dnia 16.04.2014 r.

SKWARYLIUM DYES AS FLUORESCENCE PROBES FOR BIOMOLECULES DETERMINATION

Katarzyna JUREK, Janina KABATC

ABSTRACT *Chemical modification of the structure of squarylium dyes gives a new chromophoric systems that have a wide range of optical properties, such as the light absorption and fluorescence emission in the range from the visible light to the near infrared one. The new functional dyes in which the changes of the electron charge distribution in chromophore under the influence of an external stimulus or chemical undergo have been obtained. The interaction between dye and analyte leads to the significant changes of their spectroscopic properties. It can give the possibility of practical application of these new dyes as the fluorescent markers for biomolecules labeling.*

Keywords: *squarylium dyes, fluorescent probes, bovine serum albumin*



Dr inż. Katarzyna JUREK – adiunkt w Katedrze Chemii Nieorganicznej na Wydziale Technologii i Inżynierii Chemicznej Uniwersytetu Technologiczno-Przyrodniczego im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich w Bydgoszczy. Wykształcenie: 1993 – Magister inżynier (Technologia Chemiczna), Akademia Technologiczno – Rolnicza w Bydgoszczy, 2003 – Doktorat z nauk chemicznych, Politechnika Poznańska w Poznaniu. Zainteresowania zawodowe: binarne układy tlenkowe, kataliza heterogeniczna, adsorpcja, spektroskopia FTIR, UV-VIS, sondy spektroskopowe.

Dr hab. inż. Janina KABATC, prof. nadzw. UTP w Zakładzie Chemii Organicznej na Wydziale Technologii i Inżynierii Chemicznej Uniwersytetu Technologiczno-Przyrodniczego im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich w Bydgoszczy.

Wykształcenie: 1993 – Magister inżynier (Technologia Chemiczna), Akademia Technologiczno – Rolnicza w Bydgoszczy, 2001 – Doktorat z nauk chemicznych, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu. 2013 – Doktor habilitowany nauk chemicznych, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu.

Zainteresowania zawodowe: synteza barwników, dwu- i wieloskładnikowe barwnikowe układy fotoinicjujące polimeryzację wolnorodnikową, sondy spektroskopowe.

