

## Fluorescence Properties of Fluorine-containing Hydantoin Derivatives as Potential Fluorescent Probes

I.A. Lytvyn, O.V. Kulynych, V.S. Starova\*, P.K. Mykhailiuk, O.A. Zaporozhets

Taras Shevchenko National University of Kyiv, Volodymyrska str., 64, Kyiv, Ukraine, 01601;

\*e-mail: starova-v@ukr.net

Received: April 06, 2016; Accepted: May 26, 2016

DOI: 10.17721/moca.2016.11-15

*The cyclohexanespiro-5-hydantoine and 8,8-difluorocyclohexanespiro-5-hydantoine were chosen as a model substances for properties comparison of hydantoin and its fluorine-containing analogues. Hydrolysis of such hydantoin derivatives allows to obtain an 1-aminocyclohexane and 1-amino 4,4-difluorocyclohexanecarboxylic acids, which are the constituents of many medicines.*

*It was established that incorporation of fluorine atoms into the cyclohexane ring of chosen hydantoin causes the improving of their acidic and fluorescence properties. The sensitive fluorescence technique of determination of fluorinated hydantoin content in blood serum and urine were elaborated ( $DL \approx 20 \text{ mg/ml}$ ,  $Sr \leq 5\%$ ). The fluorescence quantum yield of 1-amino 4,4-difluorocyclohexanecarboxylic acid is  $0.15 \pm 0.01$  and significantly increases at the presence of the protein molecules. At that the protein fluorescence intensity decreases. These phenomena confirm the interaction between ovalbumin and the fluorine-substituted amino acid. Obtained results indicated the prospective of application the fluorine derivatives of hydantoin as fluorescent probes for biochemical and clinical studies. The offered technique of fluorescence determination of such hydantoin is characterized by satisfactory analytical parameters and can be proposed for using at pharmacokinetic investigations of these type substances.*

**Keywords:** hydantoin derivatives, cyclohexanespiro-5-hydantoine, 1-aminocyclohexanecarboxylic acid, fluorescence, quantum yield, interaction with protein

## Флуоресцентні властивості флуоропохідних гідантоїну як потенційних флюоресцентних зондів

I.A. Литвин, О.В. Кулинич, В.С Старова\*, П.К.Михайлюк, О.А. Запорожець

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, вул. Володимирська 64, Київ, Україна, 01601;

\*e-mail: starova-v@ukr.net

Надійшла: 06 квітня 2016 р; Прийнята: 26 травня 2016 р

DOI: 10.17721/moca.2016.11-15

*Встановлено, що введення атому флуору у насичений цикл циклогексанспіро-5-гідантоїну та 1-аміноциклогексанкарбонової кислоти викликає зростання їх кислотних та флюоресцентних властивостей. Високі флюоресцентні властивості таких флуоропохідних гідантоїну були використані для розробки методики їх флюоресцентного визначення у плазмі крові та сечі без додаткової пробопідготовки. Показано, що квантовий вихід флюоресценції 1-аміно 4,4-дифлуороциклогексан карбонової кислоти, який становить  $0.15 \pm 0.01$ , зростає у присутності білків, що може бути покладено в основу використання цієї сполуки як флюоресцентного зонду.*

**Ключові слова:** флуоропохідні гідантоїну, циклогексанспіро-5-гідантоїн, 1-аміноциклогексанкарбонова кислота, флюоресценція, квантовий вихід, взаємодія з білком

Похідні гідантоїну у медичній практиці набули широкого використання як м'язові релаксанти, протисудомні та антиаритмічні засоби [1, 2]. Вони також проявляють високу антипроліферативну активність та розглядаються як ефективні протипухлинні засоби [3-5]. Однак більшість відомих гідантоїнів характеризуються високою токсичністю [6]. З огляду на це, синтез нових

похідних гідантоїну, а також розробка чутливих методів дослідження фармакокінетики та контролю якості фармацевтичних препаратів на їх основі залишаються актуальними задачами.

Введення атому флуору, трифлуорометильної групи або інших флуоровмісних фрагментів у молекулу вбачається раціональним шляхом для зменшення токсичності гідантоїнів за рахунок

здатності флуорозамісників зменшувати основність органічних речовин [7, 8]. Водночас флуорозамісники суттєво впливають на ліпофільність, розчинність, конформаційні параметри органічних сполук, а також поліпшують їхні спектроскопічні характеристики та метаболітичну стабільність. Це дає можливість цілеспрямовано змінювати фізико-хімічні та біологічні властивості лікарських речовин [8-11].

Циклогексанспіро-5-гідантоїн (ЦГСГ) та його флуоропохідне – 8,8-дифлуороциклогексанспіро-5-гідантоїн (ФЦГСГ) є перспективними будівельними блоками в синтезі не тільки нових агрохімічних продуктів, а й фармацевтичних препаратів широкого спектру біологічної дії, зокрема хіміотерапевтичних засобів та діагностичних систем [12, 13]. Ці гідантоїни також використовують як вихідні речовини для синтезу 1-аміноциклогексан (АЦГКК) та 1-аміно 4,4-дифлуороциклогексан (ФАЦГКК) карбонових кислот, які, в свою чергу, є складовими багатьох лікарських засобів [12] та легко можуть бути включенні у будову ряду біомолекул як специфічні мітки для біохімічних та медичних досліджень. Здатність флуорозамісників підсилювати квантовий вихід люмінесценції органічних сполук та спорідненість до ліпідної мембрани клітини [8, 14] обумовлює можливість використання флуоропохідних гідантоїну при розробці ефективних люмінесцентних зондів для вивчення фармакокінетики та метаболізму лікарських засобів на їх основі. Однак, даних щодо впливу флуорозамісників на фізико-хімічні характеристики таких похідних гідантоїну в літературі не знайдено.

Тому, метою роботи було встановити вплив флуорозамісника на протолітичні та флюоресцентні властивості циклогексанспіро-5-гідантоїну й 1-аміноциклогексанкарбонової кислоти та з'ясувати можливість використання цих сполук як флюоресцентних зондів.

### Матеріали та методика досліджень

Досліджувані в роботі похідні гідантоїну було синтезовано за методикою [12], вміст основної речовини становив  $\geq 99.9\%$ . Робочі розчини ЦГСГ та ФЦГСГ готували розчиненням їх точних наважок в органічних розчинниках ацетонітрилі та ДМСО, а робочі розчини 1-аміноциклогексан та 1-аміно 4,4-дифлуороциклогексан карбонових кислот готували розчиненням їх наважок у бідистильованій воді. Використаний у роботі диметилсульфоксид (ДМСО) був спектроскопічної чистоти, «Merck». Чистота ацетонітрилу, гідрохлоридної кислоти та натрій гідроксиду становила  $\geq 95\%$ , «Merck».

Спектри флюоресценції та збудження реєстрували за допомогою спектрофлюориметра LS55 (Perkin-Elmer, UK) у діапазоні 200-600 нм з урахуванням фону розчинника за оптимальних

довжин хвиль збудження та емісії для кожної сполуки.

Дослідження протолітичних властивостей ЦГСГ та ФЦГСГ проводили методом потенціометричного титрування їх розчинів лугом з використанням рН-метру (рН-340) зі скляним електродом ESL-43-07 (Білорусь). Через нерозчинність даних сполук у воді, їх умовні константи дисоціації ( $pK_f$ ) визначали у водно-ацетонітрильних розчинах ( $\omega_{\text{H}_2\text{O}}:\omega_{\text{CH}_3\text{CN}} = 20:80 \div 80:20$ ). Розрахунок значень констант дисоціації досліджуваних сполук у воді ( $pK_a$ ) проводили екстраполяцією лінійної залежності  $pK_f = f(C_{\text{CH}_3\text{CN}}, \%)$  [15]. Для визначення констант дисоціації функціональних груп АЦГКК та ФАЦГКК, до розчину додавали еквімолярну кількість хлоридної кислоти та відтитровували їх протоновані форми стандартизованим розчином лугу.

### Результати досліджень та їх обговорення

Встановлено, що на кривих рН-метричного титрування ЦГСГ та ФЦГСГ спостерігається лише один стрибок титрування, що узгоджується з розрахунками в програмі ACDLabs. Відщеплення протону від імідного атому нітрогену повинно відбуватись при  $\text{pH} > 9.2$  ( $pK_{a1}$ ), а від амідного нітрогену при  $\text{pH} > 13.7$  ( $pK_{a2}$ ). Отже методом рН-метричного титрування можна встановити значення лише першої константи дисоціації даних гідантоїнів.

З даних табл.1 видно, що введення атому флуору в молекулу циклогексанспіро-5-гідантоїну викликає зменшення  $pK_{a1}$  приблизно на 0.4 одиниці [12].

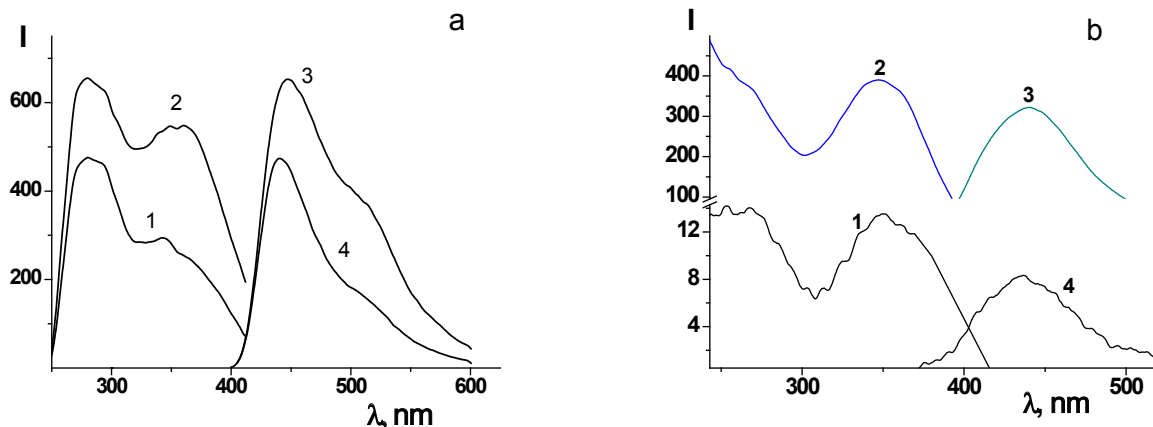
**Табл. 1.** Структурні формули та значення констант дисоціації у воді похідних гідантоїну та циклічних аміно-карбонових кислот.

Скорочення	Структурна формула	$pK_{a1}^*$	$pK_{a2}^{**}$
ЦГСГ		8.43 $\pm 0.07$	-
ФЦГСГ		8.01 $\pm 0.06$	-
АЦГКК		2.92 $\pm 0.02$	10.48 $\pm 0.03$
ФАЦГКК		2.56 $\pm 0.01$	9.31 $\pm 0.02$

Аналогічні зміни  $pK_{a1}$  спостерігаються у випадку введення флуору у цикл АЦГКК. При цьому, значення  $K_{a2}$ , що характеризує дисоціацію аміногрупи, зростає приблизно на порядок. Відповідно зменшується значення ізоелектричної точки (pI) даних амінокислот з  $6.70 \pm 0.03$  для АЦГКК до  $5.93 \pm 0.02$  ФАЦГКК.

З рис. 1 видно, що флуоропохідні

циклогексанспіро-5-гідантоїну та 1-аміноциклогексан карбонової кислоти характеризуються кращими флюоресцентними властивостями порівняно із вихідними сполуками [12]. Примітно, що введення флуорозамісників в молекулу амінокислоти супроводжується зростанням інтенсивності її флюоресценції більш ніж в 30 разів, рис. 1б.



**Рис. 1.** Спектри збудження (1, 2) і флюоресценції (3, 4) розчинів гідантоїнів ЦГСГ (1а, 4а) та ФЦГСГ (2а, 3а), а також циклічних аміно-карбонових кислот АЦГКК (1б, 2б) та ФАЦГКК (3б, 4б).  $C = 0.001$  М.  $\lambda_{ex} = 281$  нм (1а, 2а),  $\lambda_{em} = 447$  нм (3а, 4а);  $\lambda_{ex} = 347$  нм (1б, 2б),  $\lambda_{em} = 441$  нм (3б, 4б).

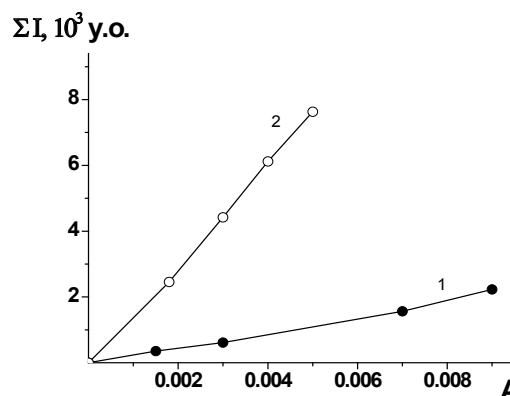
Для визначення відносного квантового виходу флюоресценції 1-аміно 4,4-дифлуороциклогексан карбонової кислоти ( $\Phi_x$ ) було отримано залежності інтегральної інтенсивності флюоресценції ( $\Sigma I$ ) від оптичної густини ( $A$ ) розчинів ФАЦГКК. Для усунення проявів внутрішнього фільтру залежність  $\Sigma I = f(A)$  будували при  $A < 0.01$ . Як стандартну речовину використали фенілаланін з огляду на чітку визначеність її квантового виходу ( $\Phi_{ST} = 0.024$  [16, 17]) у водному розчині та близькість значення ізоелектричної точки до pI ФАЦГКК ( $pI_{ST} = 5.6$ ). Спектри поглинання та флюоресценції даних амінокислот реєстрували у водному розчині за умов домінування їхніх цвіттер-іонних форм при  $pH \approx pI \approx 5.5$  та при їх однакових концентраціях у розчині ( $C_{амінокислот}$  (М) = 0;  $8.3 \cdot 10^{-5}$ ;  $1.7 \cdot 10^{-4}$ ;  $3.3 \cdot 10^{-4}$ ;  $5.0 \cdot 10^{-4}$ ;  $\lambda_{abs} = 258$  нм,  $\lambda_{em} = 447$  нм,  $l = 10$  мм). Результати наведено на рис.2. Слід зазначити, що найбільш висока інтенсивність флюоресценції спостерігається при  $pH \approx pI$ . Додавання до розчину невеликих кількостей сильної кислоти чи основи призводить до різкого зменшення інтенсивності випромінювання та зсуву смуг поглинання і флюоресценції у довгохвильову ділянку спектру.

Значення квантового виходу ФАЦГКК розраховували відповідно до [18] за формулою

$$\Phi_x = \Phi_{ST} \cdot (\text{Grad}_x / \text{Grad}_{ST}) \cdot (\eta_x^2 / \eta_{ST}^2),$$

де  $\text{Grad}_{ST}$  та  $\text{Grad}_x$  тангенси кута нахилу кривої 1 та кривої 2, відповідно (рис.2). Припускали, що коефіцієнти заломлення водних розчинів амінокислот  $\eta_x^2$  та  $\eta_{ST}^2$  практично співпадають.

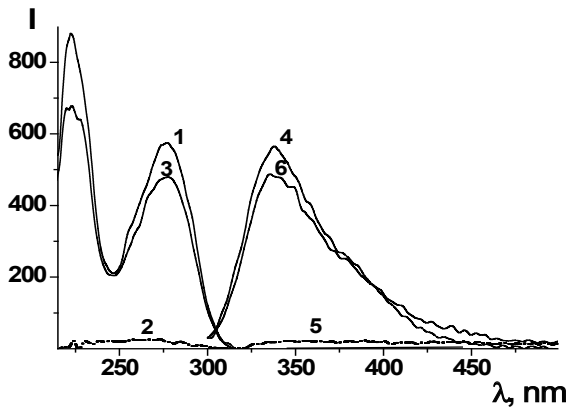
З рис.1 та рис.2 видно, що люмінесцентні властивості 1-аміно-циклогексанкарбонової кислоти при введенні у цикл атомів флуору суттєво покращуються: квантовий вихід флюоресценції для ФАЦГКК становить  $0.15 \pm 0.01$  ( $n=3$ ,  $P=0.95$ ), що перевищує значення квантових виходів більшості відомих природних амінокислот [17].



**Рис. 2.** Залежність інтегральної інтенсивності флюоресценції від світлопоглинання розчинів фенілаланіну (1) та ФАЦГКК (2).  $\text{Grad}_{ST} = 242.6$  (1),  $\text{Grad}_x = 1543.7$  (2).  $r^2 = 0.990$  (1),  $r^2 = 0.997$  (2).

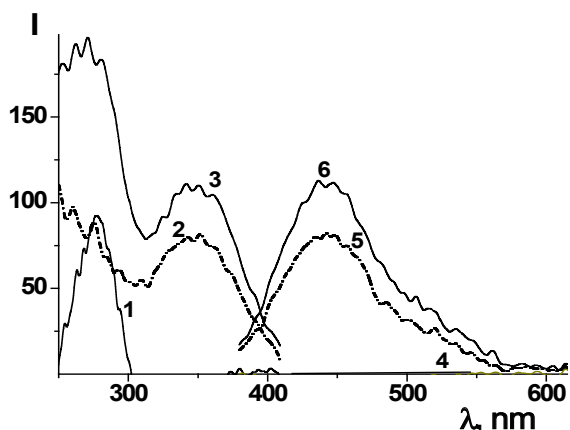
Високий квантовий вихід ФАЦГКК обумовлює перспективність її використання як флюоресцентного зонду, наприклад, для встановлення механізму метаболічного руйнування відповідних біоактивних сполук, а також для діагностики онкозахворювань.

Для перевірки можливості включення FAЦГКК до біомолекули як специфічної мітки було використано модельний білковий субстрат овальбумін. Встановлено, що довжини хвиль максимумів смуг збудження та флюоресценції овальбуміну становлять 223 нм, 280 нм та 336 нм, відповідно. За цих умов інтенсивність флюоресценції FAЦГКК незначна. При додаванні FAЦГКК до розчину овальбуміну спостерігається гасіння флюоресценції білку ( $\Delta I > 80$  у.е.), рис. 3.



**Рис. 3.** Спектри збудження (1-3) та флюоресценції (4-6) водного розчину овальбуміну (1,4), FAЦГКК (2,5) та їх суміші (3,6).  $C_{FAЦГКК} = 1.0 \cdot 10^{-5}$  М,  $C_{альбуміну} = 10$  мкг/мл. При  $\lambda_{ex}^{max}$  збудження овальбуміну 280 нм.

З іншого боку за оптимальних умов збудження для FAЦГКК ( $\lambda_{ex} = 347$  нм) сам овальбумін практично не флюоресцює. Однак, у присутності овальбуміну за цих умов при  $\lambda_{ex} = 347$  нм спостерігається зростання інтенсивності флюоресценції FAЦГКК. Такий ефект, а також відхилення від закону адитивності у відповідних спектрах поглинання вказують на наявність хімічної взаємодії між компонентами суміші, рис. 4.



**Рис. 4.** Спектри збудження (1-3) та флюоресценції (4-6) водного розчину овальбуміну (1,4), FAЦГКК (2,5) та їх суміші (3,6).  $C_{FAЦГКК} = 1.0 \cdot 10^{-5}$  М,  $C_{альбуміну} = 10$  мкг/мл. При  $\lambda_{ex}^{max}$  збудження FAЦГКК 347 нм.

Значне зростання інтенсивності флюоресценції FAЦГКК внаслідок утворення асоціатів білок-FAЦГКК ( $\Delta I_{em} > 30$ ) свідчить про перспективність використання такої флуорозаміщеної амінокислоти як флюоресцентного зонду.

Можливість флюоресцентного визначення лікарських препаратів на основі флуоропохідних гідантоїну у водних розчинах і таких фізіологічних рідинах, як сеча і плазма крові, було перевірено на прикладі FЦГСГ з огляду на його протиракову активність і високий терапевтичний потенціал [12, 13].

Дослідження залежності  $I_{em} = f(C_{FЦГСГ})$  показало, що зі збільшенням концентрації FЦГСГ у розчині інтенсивність флюоресценції при довжині хвилі 447 нм зростає. Рівняння градуального графіку з урахуванням фону розчинника ( $\omega_{вода} : \omega_{DMCO} = 90:10$ ) має вигляд  $\Delta I_{em}^{447} = (0.08 \pm 8.03) + (1.81 \pm 0.06) \cdot C_{FЦГСГ}$  мкг/мл,  $r^2 > 0.995$ . Межа виявлення FЦГСГ (за  $3\sigma$  - критерієм) у водних розчинах становить 13.3 мкг/мл.

Визначення FЦГСГ у сечі та плазмі крові здійснювали методом добавок з урахуванням «фону» матриці фізіологічних рідин. При приготуванні модельних розчинів виходили з таких міркувань. Враховуючи, рекомендовані дози застосування ряду протипухлинних препаратів на основі гідантоїну і найбільш застосовуваного у протираковій терапії лікарського засобу флуорурацилу, а також фармакокінетичні властивості структурних аналогів FЦГСГ (2-7% виводиться з організму нирками у незміненому вигляді) можна зробити висновок, що середній їх вміст у сечі і плазмі крові має становити 120-480 мкг/мл [19, 20].

Визначення FЦГСГ у фізіологічних рідинах проводили наступним чином: до 3.0 мл центрифугованої проби сечі або плазми крові додавали відповідно 0.25 мл та 0.3 мл  $4.9 \cdot 10^{-3}$  моль/л розчину FЦГСГ у ДМСО, ретельно перемішували і реєстрували спектри збудження і флюоресценції. За розробленою методикою діапазон визначуваних концентрацій FЦГСГ у сечі та плазмі крові знаходиться в межах 20-1000 мкг/мл.

Результати визначення FЦГСГ у робочому розчині, сечі та плазмі крові наведено у табл.2. Видно, що методика характеризується задовільними правильністю і прецизійністю.

**Табл. 2.** Результати визначення FЦГСГ у робочому розчині (I), сечі (II) та плазмі крові (III) ( $\lambda_{ex} = 281$  нм,  $\lambda_{em} = 447$ ,  $l = 10$  мм, щілини збудження та емісії дорівнюють 10 і 20 нм, відповідно).  $P = 0.95$ ,  $n = 3$ .

Об'єкт	Введено, мкг/мл	Знайдено, мкг/мл	$S_r$
I	133	132 ± 3	0.01
II	82	77 ± 5	0.04
III	102	102 ± 10	0.05



Отримані дані свідчать про доцільність застосування розробленої методики для флюоресцентного визначення флуоропохідних гідантоїну у фізіологічних рідинах при вивченні їх фармакокінетики та метаболізму.

## Висновки

На основі проведених досліджень встановлено, що введення флуору у цикл молекул циклогексанспіро-5-гідантоїну та 1-аміноциклогексанкарбонової кислоти супровод-

жується зниженням їхньої основності та поліпшенням люмінесцентних властивостей. Завдяки високому квантовому виходу ФАЦГКК вбачається перспективним флюоресцентним зондом для біохімічних і клінічних досліджень. Методика флюоресцентного визначення ФЦГСГ характеризується задовільними хіміко-аналітичними характеристиками і може бути запропонована для застосування при проведенні фармакокінетичних досліджень сполук такого типу.

## Література:

1. Trišović Nemanja P., Ušćumlić Gordana S., Petrović Slobodan D. Hydantoins: Synthesis, properties and anticonvulsant activity. *Hemijaska industrija*. 2009, 63(1), 17-31.
2. Aboul-Enein M.N., El-Azzouny A.A., Attia M.I., Maklad Y.A., et al. Anticonvulsant Profiles of Certain New 6-Aryl-9-substituted-6,9-diazaspiro-[4.5]decane-8,10-diones and 1-Aryl-4-substituted-1,4-diazaspiro[5.5]undecane-3,5-diones. *Int J Mol Sci*. 2014, 15(9), 16911–16935.
3. Rodgers T.R., LaMontagne M.P., Markovac A., Ash A.B. Hydantoins as antitumor agents. *Journal of medicinal chemistry*. 1977, 20(4), 591-594.
4. Shankaraiah N., Nekkanti S., Chudasama K.J., Senwar K.R., et al. Design, synthesis and anticancer evaluation of tetrahydro- $\beta$ -carboline-hydantoin hybrids. *Bioorganic and Medical Chemistry Letters*. 2014, 24(23), 5413-5417.
5. Mudit M., Behery F.A., Wali V.B., Sylvester P.W., El Sayed K.A. Synthesis of fluorescent analogues of the anticancer natural products 4-hydroxyphenylmethylene hydantoin and delta-tocotrienol. *Nat Prod Commun*. 2010, 5(10), 1623-1626.
6. Beebe R., Myers J. Professional Paramedic: Foundations of Paramedic Care. Delmar, Cengage Learning, USA. 2010. P. 695.
7. Morgenthaler M., Schweizer E., Hoffmann-Roeder A., et al. Predicting and tuning physicochemical properties in lead optimization: amine basicities. *Chem. Med. Chem*. 2007, 2 (8), 1100-1115.
8. Shcherbatiuk A.V., Shyshlyk O.S., Yarmoliuk D.V., et al. Synthesis of 2- and 3-trifluoromethylmorpholines: useful building blocks for drug discovery. *Tetrahedron*. 2013, 69 (19), 3796-3804.
9. Purser S., Moore P.R., Swallow S., Gouverneur V. Fluorine in medicinal chemistry. *Chem. Soc. Rev*. 2008, 37, 320.
10. Begue J.P., Bonnet-Delpon D., Wiley J., et al. Bioorganic and Medicinal Chemistry of Fluorine. New Jersey. 2008.
11. Chaume G., Barbeau O., Lesot P., Brigaud T. Synthesis of 2-Trifluoromethyl-1,3-oxazolidines as Hydrolytically Stable Pseudoprolines. *J. Org. Chem*. 2010, 75, 4135-4145.
12. Mykhailiuk P.K., Iurchenko V., Shishkina S.V., et al. 1-Amino-4,4-difluorocyclohexanecarboxylic acid as a promising building block for drug discovery: design, synthesis and characterization. *Tetrahedron*. 2013, 69 (20), 4066-4075.
13. Bretschneider, et al. Substituted 3-(biphenyl-3-yl)-8,8-difluoro-4-hydroxy-1-azaspiro[4.5]dec-3-en-2-ones for therapy and halogen-substituted spirocyclic ketonols. United States Patent. 8,946,124. 2015.
14. Gerus I.I., Mironetz R.X., Kondratov I.S., Bezdudny A.V., et al. "Reported, but still unknown." A closer look into 3,4-bis- and 3,4,5-tris(trifluoromethyl) pyrazoles. *The Journal of Organic Chemistry*. 2012, 77 (1), 47-56.
15. Бицурин В.М., Дорощук В.А., Старова В.С., Рябицький О.Б. Протолитические свойства 2-ацилтиоацетамидов. *Журнал общей химии*. 2012, 82 (10), 1695-1699.
16. Brouwer A.M., Lakowicz J.R. Standards for photoluminescence quantum yield measurements in solution (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem*. 2011, 83 (12), 2213-2228.
17. Chen R.F. Fluorescence Quantum Yields of Tryptophan and Tyrosine. *Analytical Letters*: 1967, 1(1), 35-42.
18. A guide to recording fluorescence quantum yields. Technical report, Horiba, Jobin Yvon Ltd, 2 Dalston Gardens, Stanmore, Middlesex, UK. 2011.
19. Prevost G., Auvin S., Lanco C., Liberatore A.-M., Lavergne O.. Imidazolidine-2,4-dione derivatives, and use thereof as a cancer drug. Patent. US8710091 B2. 2014.
20. Проценко Л.Д., Булкина З.П. Химия и фармакология синтетических противоопухолевых препаратов. Справочник. К.: «Наукова думка». 1985. 260 с.