

УДК 541.49+577.113

**С.Ф. Барановский, Е.В. Глобина, П.А. Болотин**

*Севастопольский национальный технический университет*

*Студгородок, г. Севастополь, Украина, 99053*

*E-mail: veselkov@sevgtu.sebastopol.ua*

## **ИССЛЕДОВАНИЕ САМОАССОЦИИ ФЕНАНТРИДИНОВОГО КРАСИТЕЛЯ В ВОДНОМ РАСТВОРЕ МЕТОДОМ СПЕКТРОФОТОМЕТРИИ**

*Изучена самоассоциация ароматических молекул фенантридинового красителя – бромистого этидия в водном растворе спектрофотометрическим методом. Исследованы концентрационные зависимости молярного коэффициента экстинкции взаимодействующих молекул красителя. Экспериментальные результаты проанализированы с помощью димерной и бесконечномерной некооперативной моделей ассоциации молекул. Определены численные значения равновесных констант димеризации и п-меризации, а также проведено теоретическое разделение экспериментальных спектров поглощения красителя на мономерные и димерные составляющие. Установлено, что увеличение концентрации красителя вызывает смещение равновесия в сторону образования димеров.*

### **ВВЕДЕНИЕ**

Самоассоциация молекул является важным звеном в цепи организации биологических структур и представляет существенный интерес для исследователей.

Такие физические взаимодействия, как Ван дер-Ваальсовы силы, водородные связи, электростатические силы и выполнение стерических условий, имеющие место в процессах ассоциации, требуют детального исследования свойств растворителя, ионных равновесий и конформационных перестроек молекул различными экспериментальными методами.

Основными методами исследования равновесного поведения ароматических молекул биологически активных веществ (красителей, антибиотиков) в растворе являются методы спектроскопии в широком диапазоне длин волн. Здесь особо следует отметить метод ЯМР-спектроскопии, который имеет определенные преимущества в сравнении с оптической спектроскопией, поскольку он позволяет определить как равновесные параметры ассоциации молекул, так и структурные особенности образующихся молекулярных комплексов в условиях многокомпонентного равновесия в растворе [1]. Однако в плане получения оптимальных результатов по ассоциации ароматических молекул в растворе оптическая спектроскопия является наиболее эффективной.

Многие молекулы красителей и антибиотиков, имеющие плоские гетероциклические хромофоры, проявляют биологическую активность, связываясь с нуклеиновыми кислотами. В водных растворах ароматические молекулы присутствуют как в мономерной форме, так и в виде ассоциатов. Процесс агрегации ароматических лигандов в водном растворе представляет собой образование стопочных агрегатов, которые стабилизированы вертикальными стэкинг-взаимодействиями хромофоров молекул. Исследования самоассоциации ароматических лигандов, проведенные различными экспериментальными методами, показали, что параметры агрегации ароматических молекул в значительной степени определяются строением их хромофоров, в частности, равновесная константа ассоциации однозначно связана с числом ароматических колец в хромофоре лиганда.

Спектры поглощения растворов красителей характеризуются максимумами, относительная интенсивность которых в значительной степени зависит от концентрации красителя, температуры и свойств растворителя. Наблюдаемые максимумы связаны с различными видами молекулярной агрегации красителя в растворе. Обычно в таких случаях имеет место нарушение закона Бера, в котором постулируется независимость коэффициента поглощения от концентрации.

В некоторых растворителях особенно в водном, ионы красителей при концентрациях больших  $10^{-4}$  М присутствуют в виде димеров. Однако значения концентраций, при которых наблюдается заметная димеризация молекул, изменяются в широких пределах в зависимости от природы красителя и растворителя. Опыт показывает, что введение в разбавленный раствор красителя сравнительно больших количеств электролита (например, 0,5 М NaCl) производит такое же действие, как и повышение концентрации красителя. Следует отметить, что при изменении концентрации водородных ионов среды краситель может изменить число атомов водорода, заряд и спектр поглощения. На этом, как известно, основано применение некоторых красителей в качестве индикаторов pH среды [2].

При достаточно высоких концентрациях красителя образуются агрегаты более высокого порядка ( $n$ -мерные формы), которые также могут быть обнаружены в спектрах поглощения. Ассоциация молекул растворенного вещества сопровождается различными деформациями их полос поглощения: уменьшением интенсивности поглощательной способности молекул, что в некоторых случаях, сопровождается небольшим смещением максимума полосы и появление новой полосы, сдвинутой либо в длинноволновую, либо в коротковолновую область относительно максимума интенсивности поглощения мономера [2].

Во многих работах по спектрофотометрическому исследованию процессов самоассоциации ароматических молекул красителей не учитывается образование *n*-мерных агрегатов. Введение ограничений на размеры агрегатов (формирование лишь димерных комплексов) справедливо только в области малых концентраций и относительно небольших констант ассоциации молекул, поэтому такой подход можно рассматривать как приближенный. К этому же выводу можно прийти путем анализа определения параметров самоассоциации графическим методом, основанного на учете реакций димеризации молекул, взаимодействующих в растворе [3].

В настоящей работе методом спектрофотометрии в видимом диапазоне спектра исследовались различные модели самоассоциации молекул биологически активного фенантридинового красителя бромистого этидия (ЕВ). Бромистый этидий представляет собой заряженную молекулу, имеющую три плоских ароматических кольца, содержащие две аминогруппы в положениях 3 и 8, гетероатом азота в положении 5, а также фенольное кольцо и этильную группу в хромофоре красителя (рисунок 1).

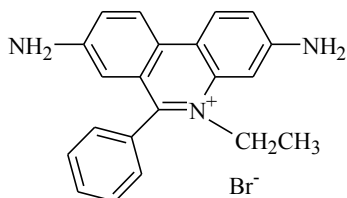


Рисунок 1 – Структурная формула фенантридинового красителя – бромистого этидия

Анализ экспериментальных данных проводился с использованием димерной и бесконечномерной некооперативной модели самоассоциации молекул в водных растворах на основе экспериментальных концентрационных зависимостей молярных коэффициентов поглощения молекул. Это позволило определить равновесные константы образования димеров и агрегатов более высокого порядка и сделать качественные выводы о структуре образующихся комплексов в водном растворе. В работе проведено теоретическое разделение экспериментальных спектров поглощения бромистого этидия на мономерные и димерные составляющие.

### МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Электронные спектры поглощения исследуемых растворов красителя – бромистого этидия регистрировали на спектрофотометре СФ-46 в видимой области спектра при  $T=298\text{ К}$ . При титровании раствора ЕВ использовали диапазон концентраций  $1,125 \cdot 10^{-5} + 8 \cdot 10^{-3}$  моль/л. Измерения проводились в стандартных стеклянных кюветах с длиной оптического пути 2,0; 1,0; 0,5; 0,1 и 0,05 см, которые термостатировались в кюветном отделении спектрофотометра жидкостным термостатом с точностью  $\pm 0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Растворы красителя готовились в 0,1-молярном фосфатном буфере ( $\text{pH}=6,7$ ) с использованием бидистиллированной воды. Исследуемый

образец красителя бромистого этидия («Sigma», США) перед приготовлением растворов прогревали при 90°C в течение 30 минут.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На рисунке 2 представлены спектры поглощения бромистого этидия в водном растворе, содержащем различные концентрации красителя при постоянной температуре 298 К. Как видно из рисунка, спектры *EB* имеют форму близкую к лоренцевой.

Положение мономерной полосы остается практически неизменным при изменении концентрации красителя. Вместе с тем спектры поглощения заметно меняются с ростом концентрации: наблюдается уменьшение интенсивности полосы поглощения молекул, что указывает на процессы агрегации в растворе [2].

На рисунке 3 показана экспериментальная концентрационная зависимость молярного коэффициента экстинкции водных растворов красителя на длине волны  $\lambda = 480$  нм. Как видно из рисунка, поглощение бромистым этидием в видимой области спектра носит нелинейный характер и не подчиняется закону Бера. Это, очевидно, связано с образованием димеров и агрегатов красителя более высокого порядка в водном растворе.

Равновесие в растворе моделировалось схемой:



где  $K$  – равновесная константа димеризации молекул, а  $D_1$  и  $D_2$  – мономерная и димерная формы исследуемых молекул. С учетом закона действующих масс для реакции (1) и закона сохранения массы получаем уравнение:

$$[D_0] = [D_1] + 2K[D_1]^2. \quad (2)$$

Здесь  $[D_1]$ ,  $[D_0]$  – соответственно, равновесная молярная концентрация лиганда в мономерной форме и исходная концентрация красителя в растворе. В такой модели молярный показатель поглощения имеет вид:

$$\varepsilon = \varepsilon_m f_m + \varepsilon_d f_d, \quad (3)$$

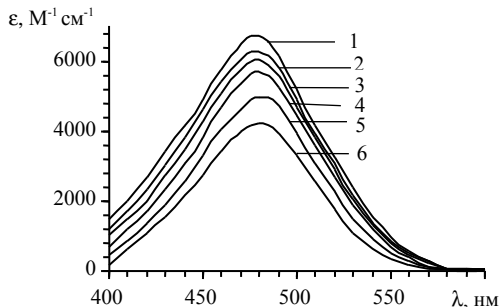


Рисунок 2 – Спектры бромистого этидия в водном растворе (pH=6,7; T=298 К) при различных концентрациях красителя: 1 –  $1,125 \cdot 10^{-5}$ ; 2 –  $9 \cdot 10^{-5}$ ; 3 –  $1,8 \cdot 10^{-4}$ ; 4 –  $9 \cdot 10^{-4}$ ; 5 –  $3 \cdot 10^{-3}$ ; 6 –  $8 \cdot 10^{-3}$  М

где  $\varepsilon_m$ ,  $\varepsilon_d$  – коэффициенты экстинкции мономерной и димерной форм красителя;  $f_m$  и  $f_d$  – равновесные мольные доли молекул в мономерной и димерной формах ( $f_m = \frac{[D_1]}{[D_0]}$ ,  $f_d = \frac{2K[D_1]^2}{[D_0]}$ ,  $f_m + f_d = 1$ ). Зависимость поглощения раствора  $\varepsilon$  от концентрации красителя  $[D_0]$  определяется следующим образом:

$$\varepsilon = \varepsilon_d + (\varepsilon_d - \varepsilon_m) \frac{1 - \sqrt{1 + 8[D_0]K}}{4K[D_0]}. \quad (4)$$

Параметры модели  $\varepsilon_m$ ,  $\varepsilon_d$  и  $K$  рассчитывались путем минимизации суммы квадратов отклонений  $S = \sum_{k=1}^n (\varepsilon_k^{эксн} - \varepsilon_k)^2$  экспериментальных значений

молярных показателей поглощения ( $\varepsilon_k^{эксн}$ ) от значений  $\varepsilon_k$ , рассчитанных в тех же точках по моделям (4). Численная процедура решения "обратной" задачи осуществлялась методом Марквардта [4]. Расчет проведен по концентрационной зависимости молярного показателя поглощения  $EB$  на длине волны, соответствующей максимуму поглощения мономера лиганда (рисунок 3).

В результате расчетов получены следующие значения параметров:  $K = (240 \pm 70)$  л/моль при  $T = 298$  К,  $\varepsilon_m = (6550 \pm 72)$  М<sup>-1</sup> см<sup>-1</sup> и  $\varepsilon_d = (2820 \pm 378)$  М<sup>-1</sup> см<sup>-1</sup>. Численное значение равновесной константы  $K$  находятся в согласии с результатами, полученным методом ЯМР – спектроскопии [5] в близких условиях растворителя. Теоретическое разделение экспериментального спектра на моно-

мерную и димерную составляющие (рисунок 4) и оценка относительного содержания различного типа ассоциатов в растворе (рисунок 5) показывают, что равновесие в растворе существенно зависит от исходной концентрации лиганда  $[D_0]$  и константы димеризации молекул в водном растворе.

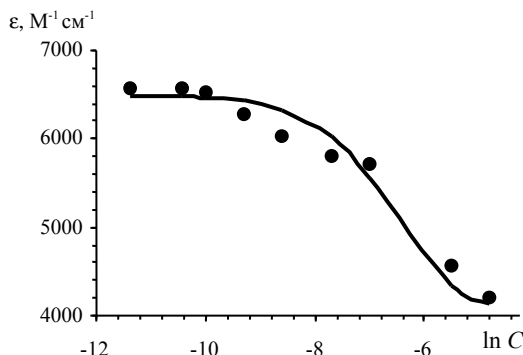


Рисунок 3 – Зависимость молярного коэффициента экстинкции бромистого этидия от логарифма концентрации для  $\lambda_{max} = 480$  нм

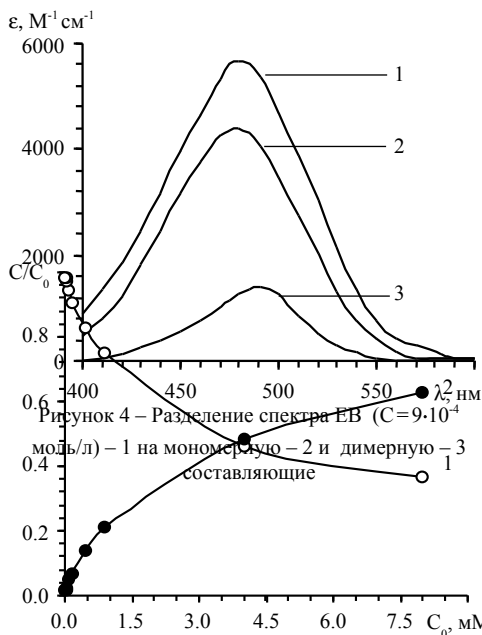


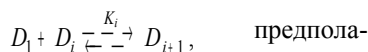
Рисунок 5 – Относительное содержание мономеров и димеров EB в водном растворе (pH=6,68; T=298K) 1 – мономер; 2 – димер

ка параметров самоассоциации проведена с использованием модели:  $\varepsilon = \varepsilon_m f_m + \varepsilon_d f_d + \varepsilon_n f_n$ , где  $\varepsilon_m, \varepsilon_d, \varepsilon_n$  – коэффициенты экстинкции мономерной, димерной и  $n$ -мерной форм красителя;  $f_m, f_d, f_n$  – равновесные мольные доли молекул красителя в мономерной форме и в ассоциатах – димерных и  $n$ -мерных соответственно ( $f_m + f_d + f_n = 1$ ). В результате проведенных расчетов получено значение  $K = (360 \pm 110)$  л/моль, что хорошо согласуется с результатами работы [5].

### Библиографический список

1. Veselkov A.N. Anti-Cancer drug design: Biological and Biophysical aspects of synthetic phenoxazone derivatives / A.N. Veselkov, D.B. Davies. — Sevastopol: SevNTU Press, 2002. — 260 p.
2. Zdunek M. Thermodynamical model of mixed aggregation of ligands with caffeine in aqueous solution. Part II / M. Zdunek, J. Piosik, J. Kapuscinski // Biophysical Chemistry. — 2000. — V. 84. — P. 77–85.
3. ЯМР  $^1\text{H}$  анализ гетероассоциации молекул дауномицина и иодистого пропидия в водном растворе / А.Н. Веселков, М.П. Евстигнеев, Д.А. Веселков, Д.Б. Дэвис // ЖОХ. — 2002. — Т. 38. — Вып. 38. — С. 1078–1084.

Для оценки вероятности образования агрегатов красителей более высокого порядка, чем димеры, экспериментальная концентрационная зависимость (рисунок 3) была проанализирована с помощью бесконечно-мерной некооперативной модели самоассоциации молекул, в которой все константы равновесия  $K_i$  для реакций



гаются одинаковыми  $K_1 = K_2 = \dots = K_i = K$  [5]. В схеме реакции  $D_1$  и  $D_i$  соответствуют мономеру и агрегату, содержащему  $i$  мономеров красителя соответственно. Уравнение материального баланса в этом случае имеет вид:  $[D_0] = [D_1] / (1 - K[D_1])^2$ . Оцен-

4. Минимизация в инженерных расчетах на ЭВМ / С.Ю. Гуснин, Г.А. Омелянов, Г.В. Резников, В.С. Сироткин. — М.: Машиностроение, 1981. — 341 с.

5. Исследование самоассоциации бромистого этидия в водном растворе методом  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектроскопии / А.Н. Веселков, Л.Н. Дымант, С.Ф. Барановский., П.А. Болотин, Х.Е. Паркес, Д. Дэвис // Хим. физика. — 1994. — Т. 13. — № 11. — С. 70–78.

*Поступила в редакцию 12.03.2004 г.*