

УДК 541.49+577.113

С.Ф. Барановский, П.А. Болотин, Е.В. Глобина, А.Н. Веселков

Севастопольский национальный технический университет

Студгородок, г. Севастополь, Украина, 99053

E-mail: max_evstigneev@mail.ru

ИССЛЕДОВАНИЕ РАВНОВЕСНОГО ПОВЕДЕНИЯ АРОМАТИЧЕСКИХ МОЛЕКУЛ КРАСИТЕЛЯ ТИАЗИНОВОГО РЯДА В ВОДНОМ РАСТВОРЕ МЕТОДОМ СПЕКТРОФОТОМЕТРИИ

Исследована самоассоциация молекул ароматического красителя тиазинового ряда – метиленового голубого в водном растворе спектрофотометрическим методом. Изучены концентрационные зависимости молярного коэффициента экстинкции тиазинового красителя в водно-солевом растворе. Экспериментальные результаты проанализированы с помощью бесконечномерной некооперативной и димерной моделей ассоциации молекул. Определены численные значения равновесных констант димеризации и п-меризации, структурных параметров димерных комплексов в водном растворе, а также проведено теоретическое разделение экспериментальных спектров поглощения красителя на мономерные, димерные и п-мерные составляющие.

ВВЕДЕНИЕ

Молекулы красителей и антибиотиков, имеющие плоские гетероциклические хромофоры, как правило, проявляют свою биологическую активность путём взаимодействия с молекулами нуклеиновых кислот (НК). В водных растворах ароматические лиганды присутствуют как в мономерной форме, так и в виде ассоциатов, образованных за счёт стэкинг- взаимодействия хромофоров молекул [1]. Исследование агрегации лигандов важно для понимания физических механизмов комплексообразования этих молекул с НК.

Самоагрегирующие комплексы красителей могут служить и в качестве модельных систем для оценки роли стэкинг и электростатических взаимодействий при ассоциации нуклеотидов и нуклеозидов, связывании кофактора с ферментом в растворе [1].

В качестве объекта исследований в данной работе выбран краситель тиазинового ряда метиленовый голубой (МВ). Краситель относится к классу биологически активных веществ, способных связываться с молекулами биополимеров, в частности, с вирусными НК [2]. МВ способен избирательно окрашивать внутри клетки определенные виды микробов и вирусов, т.е. образовывать комплексы с их белками [2]. Следует также отметить, что МВ используется как лекарственное средство при заболеваниях тропической малярией [3]. Тиазиновые красители обладают высокой чувствительностью к структурным изменениям и различным конформационным перестройкам молекул ДНК в ядрах клеток. Это свойство позволяет использовать их в качестве меток при изучении деструктивных и конформационных изменений в молекулах биополимеров.

Установлено [4,5], что в спектрах растворов ароматических красителей при увеличении их концентрации наблюдается изменение формы полос, возникновение новых полос поглощения и их смещение в частотном диапазоне. Во многих работах в спектрофотометрических исследованиях процессов самоассоциации не учитывается образование п-мерных агрегатов молекул красителей. Введение ограничений на размеры агрегатов (формирование лишь димерных комплексов) молекул справедливо только в области малых концентраций и относительно небольших констант ассоциации, поэтому такой подход можно рассматривать как приближенный.

Классическими интеркаляторами ДНК являются молекулы хромофоров, которых содержат три ароматических кольца [1]. К ним относятся, в частности, акридиновые красители – профлавин, акридиновый оранжевый и фенантридиновый краситель – бромистый этидий. В работе [1] показано, что характеристики реакций самоассоциации ароматических лигандов, полученные на основе кооперативной и некооперативной моделей взаимодействия молекул, существенно зависят от химической структуры хромофоров и характера боковых цепей и групп молекул. Анализ самоассоциации пиримидиновых соединений свидетельствует о том, что метилирование значительно увеличивает их ассоциативную способность в водном растворе [6]. Равновесная константа самоассоциации для акридинового оранжевого ($K \approx 6100$ л/моль) приблизительно на порядок выше, чем для профлавина ($K \approx 700$ л/моль) [1], что объясняется дополнительным вкладом гидрофобных взаимодействий метильных групп акридинового оранжевого при агрегации молекул. Для фенантридинового красителя бромистого этидия наличие бокового фенольного кольца и этильной группы в хромофоре красителя фактически приводит к отсутствию кооперативности при агрегации молекул [1]. Наличие заряженных атомов и групп в боковых цепях ароматических соединений также оказывает существенное влияние на параметры агрегации молекул и характер их стэкинг-взаимодействия. Например, константа самоассоциации фенантридинового красителя йодистого пропидия $K \approx (63 \pm 6)$ л/моль, в боковой цепи которого в отличие от бромистого этидия, содержится заряженный атом азота, существенно ниже, чем для бромистого этидия $K \approx (305 \pm 14)$ л/моль при одинаковых экспериментальных условиях [1].

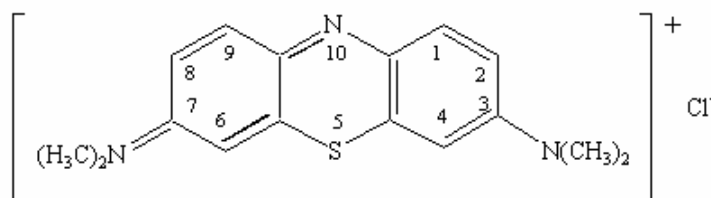


Рисунок 1 – Структурная формула тиазинового красителя метиленового голубого

В настоящей работе методом спектрофотометрии в видимом диапазоне спектра исследована самоассоциация молекул *МВ* с использованием различных теоретических моделей. Метиленовый голубой относящийся к фенгтазиновым производным, представляет собой заряженную ароматическую молекулу, хромофор которой состоит из трёх плоских ароматических колец, при этом в положениях 3 и 7 хромофора *МВ* находятся две гидрофобные диметиламиновые группы, а также гетероатомы серы и азота в положениях 5 и 10, соответственно (рисунок 1).

Анализ самоассоциации красителя в водном растворе проведен на основе экспериментальных концентрационных зависимостей молярного коэффициента поглощения молекул с использованием бесконечномерной и димерной моделей, что позволило определить равновесные константы димеризации и оценить константы образования агрегатов красителя более высокого порядка в водно-солевом растворе. Проведено теоретическое разделение экспериментальных спектров поглощения *МВ* на составляющие и рассчитаны структурные параметры димерных комплексов

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Электронные спектры поглощения водных растворов красителя гидрохлорида метиленового голубого $C_{16}H_{17}N_3S \cdot HCl \cdot 3H_2O$ ("Sigma", США) регистрировали на спектрофотометре СФ-46 в видимой области спектра. Исследуемый образец красителя высушивали при 90 °С в течение 30 минут и использовали без дополнительной очистки. Водные растворы красителя готовились методом последовательного разбавления в диапазоне концентраций $10^{-6} \div 10^{-3}$ моль/л. Использовались стандартные стеклянные кюветы с длиной оптического пути 2,0; 1,0; 0,2; 0,1 и 0,01 см. Температура внутри кюветного отделения спектрофотометра ($T = 293K$) поддерживалась постоянной термостатическим устройством с точностью $\pm 0,25^\circ C$. Растворы красителя готовились в фосфатном буфере с использованием бидистиллированной воды ($pH = 6.86$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

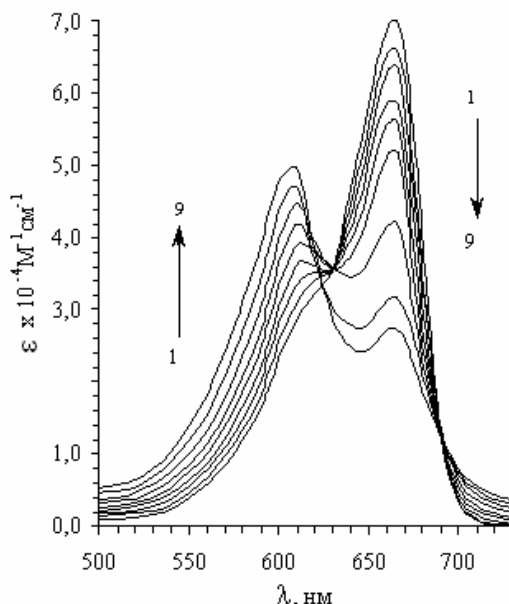


Рисунок 2 - Спектры поглощения водных растворов ($pH=6.86$; $T=293K$) красителя – метиленового голубого при различных концентрациях: 1 - $1 \cdot 10^{-6}$; 2 - $5.16 \cdot 10^{-6}$; 3 - $9.52 \cdot 10^{-6}$; 4 - $2.57 \cdot 10^{-5}$; 5 - $4.94 \cdot 10^{-5}$; 6 - $1.01 \cdot 10^{-4}$; 7 - $2.28 \cdot 10^{-4}$; 8 - $4.16 \cdot 10^{-4}$; 9 - $8.25 \cdot 10^{-4}$ М

На рисунке 2 представлены электронные спектры поглощения метиленового голубого в водном растворе с различной концентрацией красителя при постоянной температуре 293K. Как видно из рисунка спектры метиленового голубого в видимой области, при использованных концентрациях красителя, не подчиняются закону Бугера-Ламберта-Бера.

Следует отметить, что положение максимума полосы поглощения мономера ($\lambda_{max} = 664$ нм) при

концентрационных измерениях остается практически неизменным. С увеличением концентрации наблюдается уменьшение интенсивности полосы поглощения мономера с одновременным появлением нового пика поглощения в коротковолновой области спектра при $\lambda_{\max} = 630 \text{ нм}$.

Наличие изобестической точки ($\lambda = 630 \text{ нм}$) указывает на то, что исследуемый раствор при концентрациях $MB \ 1 \cdot 10^{-6} \div 1,01 \cdot 10^{-4} \text{ М}$ представляет собой бинарную смесь мономеров красителя и его ассоциатов (димеров), которые имеют различные полосы поглощения.

Молярный коэффициент экстинкции MB в изобестической точке $\epsilon_{630} = (3,574 \pm 0,015) \cdot 10^4 \text{ М}^{-1} \text{ см}^{-1}$ согласуется в пределах ошибки измерений с данными работы [7]. При дальнейшем увеличении концентрации красителя мономерный пик поглощения переходит в новый пик поглощения ($\lambda = 610 \text{ нм}$), что предполагает образование агрегатов красителя более высокого порядка, чем димеры.

Количественный анализ процесса самоассоциации молекул проведен по концентрационной зависимости молярного коэффициента экстинкции красителя на длине волны 664 нм (рисунок 3). Характер полученной зависимости подтверждает процессы агрегации лигандов в растворе.

При интерпретации экспериментальных данных использовалась модель бесконечномерной

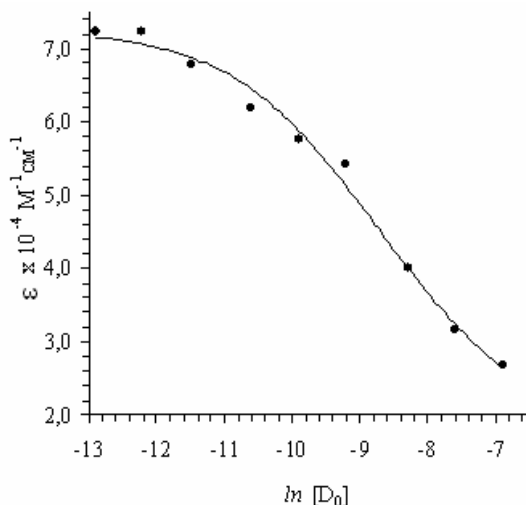


Рисунок 3 – Зависимость молярного коэффициента экстинкции водного раствора метиленового голубого ($\lambda_{\max} = 664 \text{ нм}$) от логарифма концентрации красителя

некооперативной самоассоциации молекул, в которой все константы равновесия K_j для реакций



где $j = 1, 2, \dots, \infty$, предполагаются одинаковыми [1]:

$$K_1 = K_2 = \dots = K_j = K.$$

В схеме (1) D_1 и D_j соответствуют мономеру и агрегату, содержащему j мономеров красителя, соответственно. Закон сохранения массы имеет вид:

$$[D_0] = \sum_{j=1}^{\infty} j [D_j], \quad (2)$$

где $[D_0]$ – исходная молярная концентрация красителя. Концентрация ассоциата $[D_j]$ для $j > 1$ рассчитывалась по формуле

$$[D_j] = K^{j-1} [D_1]^j, \quad (3)$$

где $[D_1]$ – молярная концентрация красителя в мономерной форме. После определения суммы ряда (2), уравнение материального баланса принимает следующий вид:

$$[D_0] = \frac{[D_1]}{(1 - K[D_1])^2}. \quad (4)$$

Расчет параметров самоассоциации проведен по экспериментальной зависимости коэффициента экстинкции ϵ исследуемых молекул с использованием модели:

$$\epsilon = \epsilon_m f_m + \epsilon_d f_d + \epsilon_n f_n, \quad (5)$$

где $\epsilon_m, \epsilon_d, \epsilon_n$ – коэффициенты экстинкции мономерной, димерной и n -мерных форм красителя; f_m, f_d, f_n – равновесные мольные доли красителя в мономерной форме и в ассоциатах – димерном и n -мерных, соответственно ($f_m + f_d + f_n = 1$). Здесь необходимо отметить, что ϵ_n в общем случае зависит от числа молекул в агрегате, т.е. этот параметр не является постоянной величиной. Однако для стопочных ассоциатов

можно ввести среднее значение параметра $\epsilon_n = \langle \epsilon_n \rangle$, которое учитывает вклад агрегатов более высокого порядка, чем димеры, в суммарное поглощение раствора красителя.

Молярные доли красителя рассчитывались по формулам

$$f_m = \frac{[D_1]}{[D_0]}, f_d = \frac{2K[D_1]^2}{[D_0]}, f_n = \frac{[D_0] - [D_1] - 2K[D_1]^2}{[D_0]} \quad (6)$$

Параметры модели $\epsilon_m, \epsilon_d, \epsilon_n$ и K определялись путем минимизации суммы квадратов отклонений экспериментальных значений молярных показателей поглощения $\epsilon_k^{эксн}$ от значений ϵ_k , рассчитанных по модели (5): $S = \sum_{k=1}^n w_k (\epsilon_k^{эксн} - \epsilon_k)^2$, где w_k – весовой множитель, n – число экспериментальных точек.

Численная процедура решения "обратной" задачи выполнялась методом Марквардта. В результате проведенных расчетов получено следующее значение равновесной константы: $K = (4,8 \pm 0,7) \cdot 10^3$ л/моль. Разделение экспериментального спектра на мономерную, димерную и n -мерную составляющие (рисунок 4) и оценка относительного содержания различного типа ассоциатов в растворе показывают, что равновесие в растворе существенно зависит от исходной концентрации лиганда $[D_0]$ и константы ассоциации молекул K .

При концентрациях $[D_0] < 2 \cdot 10^{-4}$ моль/л основной вклад в суммарный коэффициент экстинкции дают

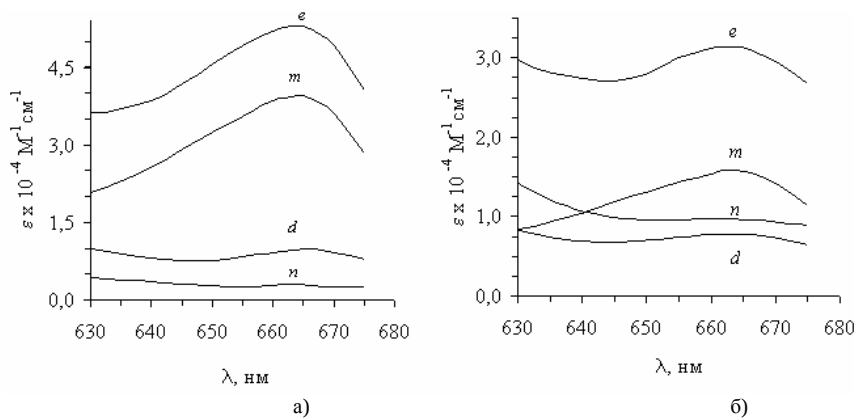


Рисунок 4 – Разделение экспериментальных спектров- ϵ метиленового голубого с концентрацией красителя: а) $1,01 \cdot 10^{-4}$ М и б) $4,16 \cdot 10^{-4}$ М на составляющие компоненты: m – спектр мономера; d – спектр димера; n – спектр молекулярных агрегатов

мономерная и димерная составляющие.

В этом случае концентрационная зависимость (рисунок 3) может быть проанализирована с достаточной точностью с помощью димерной модели, в которой уравнение баланса имеет вид:

$$[D_0] = [D_1] + 2K_d [D_1]^2, \quad (7)$$

где K_d – равновесная константа димеризации молекул. Для такой модели экспериментальная концентрационная зависимость молярного коэффициента экстинкции красителя описывается выражением [1]:

$$\epsilon = \epsilon_d + (\epsilon_d - \epsilon_m) \frac{1 - \sqrt{1 + 8[D_0]K_d}}{4K_d [D_0]}, \quad (8)$$

где ϵ_m, ϵ_d – коэффициенты экстинкции мономерной и димерной форм красителя. Численное значение равновесной константы димеризации $K_d = (3,9 \pm 0,8) \cdot 10^3$ л/моль.

Для установления взаимосвязи между экспериментальными спектрами и свойствами исследуемых молекул необходима информация о молекулярном параметре – силе осциллятора электронного перехода f_{ij} .

Сила осциллятора служит мерой интенсивности поглощения и определяется вероятностью перехода молекулы из основного (i) в возбужденное (j) состояние. Сила осциллятора пропорциональна квадрату момента перехода μ_{ij} (в работах по спектроскопии широко используется понятие дипольного момента перехода), называемого силой диполя: $D_{ij} = |\mu_{ij}|^2$. Дипольный момент электронного перехода ориентированный определенным образом относительно осей молекулы, представляют обычно в виде вектора в координатах, задаваемых положением ядер.

Силу осциллятора можно связать с экспериментально определяемыми коэффициентами экстинкции [8]:

$$f_{ij} = 4,31 \cdot 10^{-9} \int_{l_1}^{l_2} e \left(\frac{1}{l} \right) d \left(\frac{1}{l} \right).$$

Здесь $\int_{l_1}^{l_2} e^{\left(\frac{1}{l}\right)} d\left(\frac{1}{l}\right)$ – интегральный молярный коэффициент экстинкции, равный площади под кривой

поглощения (интегрирование производится по всем длинам волн в исследуемом диапазоне $\Delta\lambda = \lambda_2 - \lambda_1$). Сила осциллятора является величиной безразмерной и представляет собой отношение наблюдаемой интенсивности поглощения к интенсивности осциллирующего заряда электрона в классической модели (модель трехмерного гармонического осциллятора). Каждому типу осцилляторов можно сопоставить полосу поглощения, интенсивность и положение которой очень чувствительны к агрегации молекул. Если осцилляторы до их сближения имели одинаковые частоты, то при возникновении взаимодействия между ними полоса поглощения λ_0 , соответствующая изолированным осцилляторам (невзаимодействующим мономерам), расщепляется. Для системы, состоящей из двух связанных осцилляторов (в частности, для димера), появляются две полосы с длинами волн, λ_N и λ_P . Величина расщепления $\Delta\lambda = \lambda_N - \lambda_P$ является функцией расстояния между мономерами и угла α между моментами электронных переходов, которые соответствуют поглощению мономеров (т.е. α зависит от ориентации дипольных моментов).

Разделение экспериментальных спектров водных растворов *MB* на мономерную и димерную составляющие в широком диапазоне частот показывает, что димерный спектр содержит два пика на длинах волн $\lambda_P = 600$ нм и $\lambda_N = 675$ нм (рисунок 5).

В работах [7,9] сделано предположение, что наблюдаемые полосы *N* и *P*, соответствуют поглощению двух типов димеров, а именно: коротковолновой полосе сильной интенсивности ϵ_P (600 нм) соответствуют стопочные димеры, а длинноволновой полосе – линейные димеры (молекулы расположены в одной плоскости и примыкают “в стык” одна к другой). Существует и иная точка зрения: полосам *N* и *P* соответствует один тип димеров – стопочный, у которого не наблюдается строгая параллельность плоскостей молекул, образующих димер [9,10]. Предположив, что расстояние между хромофорами мономеров в димерных комплексах согласно принципу Франка-Кондона неизменно, можно оценить угол, соответствующий взаимной ориентации дипольных моментов молекул, используя отношение молярных

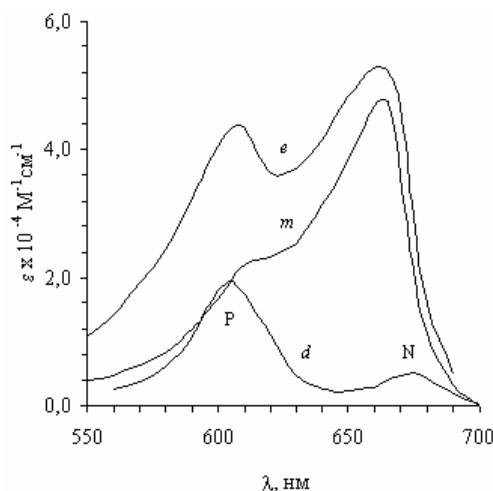


Рисунок 5 – Разделение экспериментального спектра - *e* водного раствора метиленового голубого ($[D_0] = 1.01 \cdot 10^{-4}$ моль/л) на составляющие: *m*-спектр мономера; *d*-спектр димера

коэффициентов экстинкции: $\alpha = 2 \arctg \sqrt{\epsilon_N / \epsilon_P}$ [10].

Расчетные значения силы осциллятора и угла между моментами электронных переходов для димеров *MB* составляют соответственно 0,52 и 48°.

В заключение следует подчеркнуть, что анализ равновесия “мономер-димер” путем разделения экспериментальных спектров на составляющие может быть использован для изучения природы полос поглощения и структурных особенностей димерных комплексов плоских гетероциклических молекул в водном растворе.

Библиографический список

1. Veselkov A.N. Anti-Cancer drug design: Biological and Biophysical aspects of synthetic phe-noxazone derivatives / A.N. Veselkov, D.B. Davies. — Sevastopol: SevNTU Press, 2002. — 260 p.
2. Photo-induced inactivation of viruses: Adsorption of methylene blue, thionine, and thiopyronine on Q β bacteriophage / S. Jockusch, D. Lee, N.J. Turro, E.F. Leonard // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1996. — V. 93. — P. 7446–7451.
3. Recombinant plasmodium falciparum glutathione reductase is inhibited by the antimalarial dye methylene blue / P.M. Ferber, L.D. Arscott, C.H. Williams, Jr.K. Becker, R.H. Schirmer // Eur. J. Biochem. — 1996. — V. 239. — P. 655–661.

4. Kasha M. Energy Transfer Mechanisms and the Molecular Exiton Model for Molecular Aggregates / M. Kasha // Rad. Res. — 1963. — V. 20. — P. 55–70.
5. Norden B. Structure of methylene blue – DNA complexes studied by linear and circular dichroism spectroscopy/ B. Norden, F. Tjernelid // Biopolymers. — 1982. — V. 21. — N 9. — P. 1717–1734.
6. Aradi F. Effect of methylation on the pyrimidine-pyrimidine stacking interaction studied by ^1H NMR chemical shift / F. Aradi // Biophys. Chem. — 1995. — V. 54. — P. 67–73.
7. UV – VIS spectroscopic and chemometric study on the aggregation of ionic dyes in water / L. Antonov, G. Gergov, V. Petrov, M. Kubista, J. Nygren // Elsevier Science. Talanta. — 1999. — V. 49. — P. 99–106.
8. Левшин Л.В., Салецкий А.М. Оптические методы исследования молекулярных систем / Л.В. Левшин, А.М. Салецкий. — Ч. 1. Молекулярная спектроскопия — М.: Изд-во МГУ, 1994. — 320 с.
9. Теренин Н.Т. Фотоника молекул красителей и родственных органических соединений / Н.Т. Теренин. — Л.: Наука — 1967. — 616 с.
10. Patil K.J. Self-aggregation of Methylene Blue in aqueous medium and aqueous solutions of Bu_4NBr and urea / K.J. Patil, R.B. Pawar, P.D. Talap // Phys. Chem. Chem. Phys. — 2000. — V. 2. — P. 4313–4317.

Поступила в редакцию 06.07.2005 г.