

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего образования
«СЕВАСТОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

С.Ф. Барановский, Д.Н. Чернышев

**СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ
ИССЛЕДОВАНИЕ
ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИХ
МОЛЕКУЛ
В АССОЦИИРОВАННОМ
СОСТОЯНИИ**

Монография

Севастополь
СевГУ
2018

УДК 535.243
ББК 22.344
Б242

Р е ц е н з е н т ы:

А.А. Ярошенко - доктор физико-математических наук, профессор,
заведующий кафедрой фундаментальных дисциплин филиала
ФГБОУ ВО «ГМУ им. адмирала Ф.Ф. Ушакова» в г. Севастополе

В.В. Костюков - доктор физико-математических наук,
профессор кафедры «Физика»
ФГАОУ ВО «Севастопольский государственный университет»

Барановский С.Ф.

Б242 Спектрофотометрическое исследование гетероциклических молекул в ассоциированном состоянии / С.Ф. Барановский, Д.Н. Чернышев; под ред. М.П. Евстигнеева. – Севастополь: СевГУ, 2018. – 108 с.

В монографии кратко изложены основные положения теории электронной спектроскопии поглощения гетероциклических соединений и их ассоциатов. Приведены результаты исследований однородной и разнородной ассоциации гетероциклических молекул, а также их взаимодействия с ДНК в водном растворе методами спектрофотометрии и моделирования. Предложены алгоритмы обработки экспериментальных данных и реализующие их компьютерные программы. Представлены количественные оценки параметров ассоциатов, полученных в дипольном приближении.

Предназначена для исследователей, работающих в области молекулярной биофизики, молекулярной биологии, а также для аспирантов и студентов.

Табл. 2. Ил. 48. Библиогр. 87.

УДК: 577.113:541.49
ББК 22.344

Утверждено к печати решением методической комиссии Института радиоэлектроники и информационной безопасности Севастопольского государственного университета, протокол № 1 от 4 сентября 2017 г.

Изд. № 80/17. Объем 6,75 п.л. Усл. печ. л. 6,28. Уч.-изд. л. 6,615.
РИИЦМ ФГАОУ ВО «Севастопольский государственный университет»

© Барановский С.Ф., Чернышев Д.Н., 2018
© ФГАОУ ВО «Севастопольский
государственный университет», 2018

СОДЕРЖАНИЕ

Предисловие	4
Часть 1. Взаимодействие электромагнитного излучения с молекулами	6
1.1. Некоторые понятия квантовой механики	6
1.2. Квантово-механические особенности строения биологических молекул	9
1.3. Поглощение света. Дипольный момент перехода	12
1.4. Особенности спектров поглощения гетероциклических молекул	16
1.5. Взаимодействие гетероциклических молекул	22
1.6. Анализ спектров димеров	27
Литература к части 1	28
Часть 2. Спектрофотометрический анализ ассоциации молекул по их электронным спектрам поглощения	29
2.1. Оптимальные значения измеряемой оптической плотности раствора	29
2.2. Ассоциация молекул красителей в растворе	30
2.3. Ассоциация разнородных гетероциклических молекул	41
2.4. Комплексообразование гетероциклических лигандов с ДНК	54
2.5. Спектрофотометрический анализ связывания гетероциклических биологически активных соединений с ДНК	57
2.6. Взаимодействие бромистого этидия и кофеина с ДНК в водном растворе	67
2.7. Термодинамический анализ комплексообразования гетероциклического лиганда с ДНК в водном растворе	74
Литература к части 2	81
Приложение А. Оценивание параметров моделей	86
Литература	108

ПРЕДИСЛОВИЕ

Многочисленные исследования ассоциатов гетероциклических молекул свидетельствуют об отличии физико-химических свойств, в частности, красителей в свободном и связанном состояниях. Одним из наиболее «чувствительных» методов исследования ассоциации молекул является электронная спектроскопия. Изменения электронных спектров поглощения, обусловленные взаимодействием молекул, позволяют получить информацию о различных параметрах образующихся ассоциатов. При этом важной частью спектроскопического исследования является решение обратных задач, т.е. задач определения характеристик молекулярных комплексов по спектрам поглощения ассоциирующих молекул. Для этого используются, с одной стороны, законы Бугера – Ламберта – Бера и аддитивности поглощения света, а с другой – уравнения теории химических равновесий, позволяющие связать общие концентрации в растворе веществ с их равновесными концентрациями в различных молекулярных формах (ассоциатах, мономерах) и равновесными константами связывания.

Предлагаемая монография состоит из 2-х частей и приложения. В 1-й части кратко излагаются основные положения молекулярной спектроскопии, во 2-й – результаты исследований ассоциации однородных и разнородных гетероциклических молекул, а также их взаимодействия с ДНК в водном растворе методами спектрофотометрии и моделирования.

Спектры поглощения гетероциклических молекул в ассоциированном состоянии отличаются от суммы спектров составляющих их мономеров. Под влиянием окружения изменяется относительная энергия основного и возбуждённого состояний молекул. Электронные взаимодействия между мономерами в ассоциатах приводят к расщеплению полос поглощения и гипохромизму. В димерных комплексах расщепление приводит к удвоению числа полос, интенсивности и положения которых зависят от угла между дипольными моментами переходов взаимодействующих мономеров и расстояния между ними. Лиганды, содержащие в своей основе плоские гетероциклические хромофоры, способны проявлять медико-биологическое действие, образуя комплексы с биополимерами. Биологическая активность лигандов часто коррелирует с величиной их константы образования комплексов "лиганд – биополимер".

Спектры поглощения гетероциклических соединений, измеренные в смеси с биополимером при постоянной концентрации красителей, показывают, что увеличение концентрации биополимера в исследуемых растворах приводит к смещению максимумов поглощения красителей относительно полосы свободных лигандов в длинноволновую область спектра, пересечению спектров с одновременным уменьшением интенсивности поглощения. По изменениям в спектрах сделан вывод об образовании ком-

плексов лиганд – ДНК. С использованием моделей Скэтчарда и МакГи – фон Хиппеля проанализировано комплексообразование в системах ДНК – лиганд на длинах волн максимумов поглощения молекул красителя в мономерной форме. Молекулы используемых красителей образуют комплексы с биополимером как путём интеркаляции, так и ”внешнего” связывания. Наблюдаемая связь между параметрами кооперативности и константами димеризации лигандов позволила предположить, что между адсорбированными молекулами красителей на ДНК проявляются те же взаимодействия, что и при их самоассоциации. В работе продемонстрирована возможность получения термодинамических параметров образования комплексов лиганд – ДНК на основании данных спектрофотометрии и численного анализа. Рассмотрены вопросы теории обработки результатов экспериментов – оценивания параметров математических моделей. Приведены алгоритмы, используемые при решении задач, когда целевая функция записывается в виде суммы квадратов, а также тексты компьютерных программ, реализующие эти алгоритмы: Марквардта и Бокса. Обсуждаются их достоинства, недостатки и особенности использования.

В заключение в конце каждой части помещен список литературы.

1. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ С МОЛЕКУЛАМИ

В данном разделе рассмотрены общие вопросы поглощения света молекулами. Более подробно ознакомиться с теорией поглощения многоатомных молекул можно в литературе [1-16].

1.1. Некоторые понятия квантовой механики

Электромагнитное излучение обладает как волновыми, так и корпускулярными свойствами. Волновая природа света была экспериментально доказана при изучении интерференции. Одним из экспериментальных подтверждений квантовой природы излучения является эффект Комптона.

Связь между корпускулярными и волновыми свойствами частиц устанавливается формулой де Бройля:

$$\lambda = \frac{h}{mv}, \quad (1.1)$$

где m – масса частицы и v – скорость частицы – корпускулярные характеристики, а λ – длина волны де Бройля – описывает волновые свойства частицы.

Для описания дебройлевских волн вводится волновая функция Ψ , зависящая от координат частицы и времени. В случае, если силовое поле, действующее на частицу, не зависит от времени, можно произвести разделение переменных и функцию Ψ представить в виде: $\Psi(x,y,z,t) = f(t) \cdot \psi(x,y,z)$. Волновая функция является основной характеристикой состояния частицы, но непосредственно измерена быть не может. Для её определения должен существовать специальный математический аппарат.

Экспериментально наблюдаемой физической величине $\langle L \rangle$ в квантовой механике соответствует свой оператор $\hat{L}$. Квантово-механический оператор обычно получают из классического выражения. Проверкой правильности выбора оператора служит соответствие с экспериментом.

Составив и решив уравнение типа:

$$\hat{L}\psi = L\psi, \quad (1.2)$$

можно определить собственные значения оператора L и собственные функции ψ . Уравнению (1.2) удовлетворяет ряд функций ψ с различными значениями L . Чтобы искомое решение имело физический смысл, собственные функции ψ должны быть конечными, непрерывными, однозначными, дифференцируемыми, существовать во всём интервале изменения переменных и, кроме того, они должны быть решениями уравнения Шредингера.

гера. Среднее значение величины, представленной оператором $\hat{L}$, определяется интегралом $\langle L \rangle = \int_0^\infty \psi^* \hat{L} \psi dV = \langle \psi | \hat{L} | \psi \rangle$, где интеграл вычисляется по бесконечному пространству. Здесь введены обозначения Дирака – угловые скобки, символизирующие интегрирование, первая из функций берётся в ком-плексно-сопряжённой форме.

Важной величиной при изучении атомов и молекул является их внутренняя энергия. Частным случаем уравнения (1.2) для энергии является стационарное уравнение Шредингера:

$$\hat{H} \psi = E \psi, \quad (1.3)$$

где $\hat{H}$ – оператор Гамильтона, E – собственное значение полной энергии. Гамильтониан состоит из суммы операторов: $-\frac{\hbar^2}{2m} \Delta$ и $\hat{U}$: $\hat{H} = -\frac{\hbar^2}{2m} \Delta + \hat{U}$, где m – масса частицы; Δ – оператор Лапласа; $\hat{U}$ – оператор взаимодействия (например, между электроном и ядром).

Составим выражение $\psi^* \hat{H} \psi = E |\psi|^2$ и проинтегрируем его по всей области задания функции ψ , т. е. вычислим интеграл $\int \psi^* \hat{H} \psi dV = \langle \psi | \hat{H} | \psi \rangle$.

Представим, что предварительно было решено уравнение Шрёдингера и найдена совокупность его собственных значений E_n и собственных функций ψ_n . Подставим эти функции в выражение для записанного интеграла, тогда: $\langle \psi_n | \hat{H} | \psi_n \rangle = E_n \int |\psi_n|^2 dV = E_n \langle \psi_n | \psi_n \rangle$. Функции ψ_n должны быть нормированы, т. е. интеграл следует положить $\langle \psi_n | \psi_n \rangle$ равным единице. Окончательно получим $E_n = \langle \psi_n | \hat{H} | \psi_n \rangle$, где E_n – энергия, которую может иметь частица в одном из стационарных состояний.

Точное решение уравнения Шредингера в аналитическом виде можно получить только для наиболее простого случая (атома водорода и одно-электронных ионов). Уравнение Шредингера в этом случае имеет вид

$$\Delta \psi + \frac{2m_e}{\hbar^2} (E - U) \psi = 0, \quad (1.4)$$

где m_e – масса электрона; U – энергия взаимодействия между электроном и ядром. Решив уравнение (1.4), можно установить распределение электронной плотности относительно ядра и энергию электрона в атоме водорода.

Для многоатомных молекул невозможно получить точное аналитическое решение уравнения Шредингера. В физике молекул используется приближение Борна – Оппенгеймера. Молекулярную волновую функцию и гамильтониан записывают в виде: $\psi = \psi_e \psi_n$ и $\hat{H} = \hat{H}_e + \hat{H}_n$, где

ψ_e и $\hat{H}_e$ относятся только к электронному движению, а ψ_n и $\hat{H}_n$ – только к движению ядер. В достаточно хорошем приближении можно разделить также колебательное и вращательное движения ядерного скелета, т.е. представить $\psi = \psi_e \psi_v \psi_r$ и $\hat{H} = \hat{H}_e + \hat{H}_v + \hat{H}_r$, что дает возможность решать три уравнения вида (1.3) отдельно и находить соответственно энергии электронных, колебательных и вращательных состояний молекулы. Полная энергия E складывается из энергии электронной оболочки атомов E_e , энергии колебаний ядер молекулы E_v и энергии вращения молекулы E_r :

$$E = E_e + E_v + E_r. \quad (1.5)$$

Вклад каждого движения в полную энергию молекулы является существенно различным: $E_e \gg E_v \gg E_r$. При поглощении молекулой энергии могут изменяться все виды энергии: $\Delta E = \Delta E_e + \Delta E_v + \Delta E_r$, причем $\Delta E_e \gg \Delta E_v \gg \Delta E_r$.

В первом приближении энергии E_e , E_v , E_r можно считать независимыми друг от друга, но при более строгом рассмотрении энергетических состояний молекул необходимо учитывать возможность развития у них

электронно-колебательного, электронно-вращательного и колебательно-вращательного взаимодействий.

На рис. 1.1 представлена упрощенная схема энергетических уровней двухатомной молекулы, где каждому электронному состоянию S_0 и S_1 соответствует система колебательных уровней V'' и V' , а каждому колебательному подуровню – совокупность близко расположенных вращательных состояний J'' и J' . Квантовая теория позволяет получить следующие выражения для уровней колебательной E_v и вращательной E_r энергий молекулы:

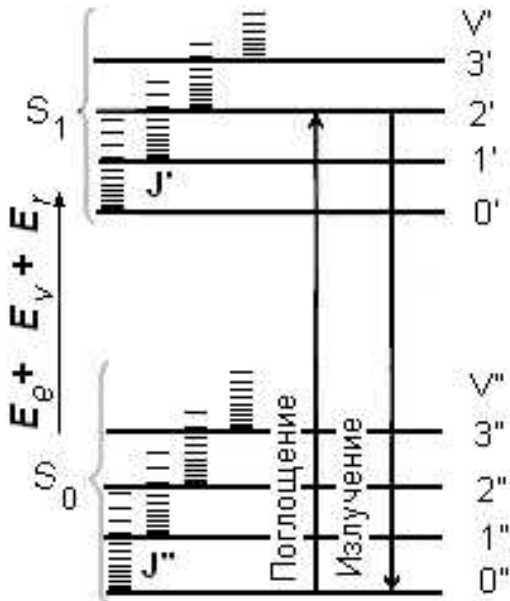


Рис. 1.1. Схема электронных (S_0 , S_1), колебательных (V'' , V') и вращательных (J , J') уровней двухатомной молекулы

$$E_v = hc \left[\omega_e \left(v + \frac{1}{2} \right) - \omega_e x_e \left(v + \frac{1}{2} \right)^2 + \omega_e y_e \left(v + \frac{1}{2} \right)^3 - \dots \right]; \quad (1.6)$$

$$E_r = hc [B_e J(J+1)], \quad (1.7)$$

где ω_e – частота колебаний; B_e – вращательная постоянная, см^{-1} ; $\omega_e x_e, \omega_e y_e$ – коэффициенты ангармоничности колебаний, см^{-1} ; v и J – колебательные и вращательные квантовые числа, принимающие значения 0, 1, 2, 3....

Для системы уровней электронной энергии двухатомных молекул нет выражений с использованием квантовых чисел, так как она имеет довольно сложный вид. Поэтому положение электронных уровней не носит такого регулярного характера, как расположение колебательных и вращательных уровней. В распределении электронных уровней есть своя сложная закономерность.

В случае молекул, как и в случае атомов, различные переходы имеют разную вероятность, и для них существуют определенные правила отбора. Электронные состояния молекулы, как и атома, могут быть классифицированы в зависимости от суммарного спина молекулы.

1.2. Квантово-механические особенности строения биологических молекул

Живые системы состоят в основном из атомов водорода, углерода, азота и кислорода. Важную роль в биохимических процессах играют также атомы фосфора и серы. Для этих атомов, кроме водорода, характерно наличие «неподеленной пары электронов» и способность легко образовывать кратные связи.

Электроны в атоме, валентные орбитали которых имеют форму сферы, называются s -электронами (рис. 1.2, а). У p -электронов (рис. 1.2, б - д) орбитали имеют форму объемных восьмерок, расположенных в трех взаимно перпендикулярных направлениях. Такие электроны отсутствуют у водорода, но зато все другие элементы (C, N, O, P, S), составляющие вместе с атомом H значительную долю биологических молекул, содержат p -электроны. Углерод имеет 2 неспаренных p -электрона на втором энергетическом уровне ($2p_x$ и $2p_y$ -орбитали), у азота 3 неспаренных p -электрона на втором энергетическом уровне ($2p_x, 2p_y, 2p_z$). У кислорода 2 спаренных и два неспаренных p -электрона на втором энергетическом уровне. Фосфор

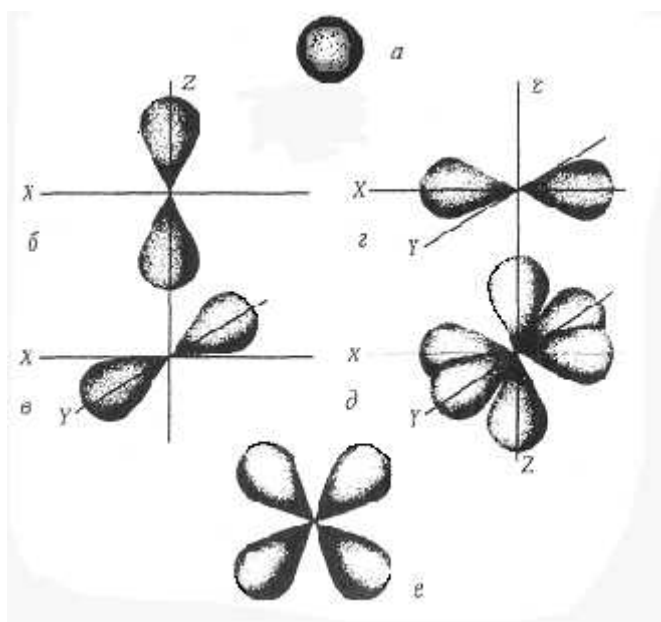


Рис. 1.2. Типы атомных орбиталей: s - (а), p - (б, в, г, д), d - (е) - электронов

и сера содержат p -электроны не только на втором, но и на третьем энергетических уровнях. Более сложные орбитали у d - (рис. 1.2, e) и f -электронов в атоме. Но таких электронов ни один из невозбужденных атомов, из перечисленных выше элементов (H, C, N, O, P, S) не имеет.

Рассмотрим образование молекулярных орбиталей (МО) молекул, содержащих атомы C, N, O. МО будут получаться путем комбинации атомных орбиталей $2s$ и $2p$, способных перекрываться между собой. В зависимости от того, какие атомные орбитали образуют данную МО, различают молекулярные σ -орбитали и π -орбитали.

Молекулярные σ -орбитали создаются при перекрытии двух s -орбиталей (рис. 1.3, a), s - и p -орбиталей, двух p -орбиталей на оси z , вдоль которой два атома взаимодействуют друг с другом (рис. 1.3, b).

Молекулярные π -орбитали возникают при взаимодействии p -орбиталей двух атомов вдоль осей x или y , перпендикулярных оси z (рис. 1.3, b).

Молекулярная π -орбиталь (рис. 1.3, b) представляет собой двойное двухдольное облако. Заряд каждого π -электрона распределен симметрично вокруг оси, перпендикулярной оси z . Поэтому π -электроны находятся вне плоскости молекулы, образуя двойные связи между атомами.

Молекуле, обладающей π -электронами, присущи нелокализованные многоцентровые орбитали, принадлежащие не отдельным атомам, а всей молекуле в целом. Единое облако π -электронов позволяет им мигрировать не только в пределах своей молекулы, но и переходить с молекулы на молекулу, если они структурно объединены в ансамбли.

Вначале отмечалось, что для атомов C, N, O, P, S характерно наличие

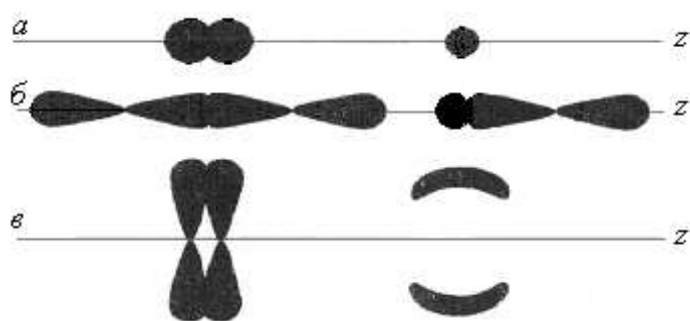


Рис. 1.3. Схемы образования молекулярных орбиталей: σ -орбиталей (a , b) и π -орбиталей ($в$)

неподеленных пар электронов. Электроны, спаренные на одной орбитали, не имеют возможности образовывать связи с электронами других атомов, и валентность атома определяется числом его неспаренных электронов. Однако электронные пары, которые в изолированном атоме занимают орбитали в той же

оболочке или подоболочке, что и валентные электроны, сильно влияют на образование связей и свойства молекул. Такие электронные пары называются неподеленными. Азот и фосфор имеют по одной неподеленной паре, кислород и сера – по две.

Многоатомные молекулы могут быть разделены на две группы: несопряженные и сопряженные системы.

Несопряженные молекулярные системы содержат только одинарные связи. Такие молекулы можно рассматривать как составленные из примыкающих друг к другу связей, каждая из которых описывается локализованной двухцентровой МО, аналогичной МО в двухатомной молекуле. Сопряженные молекулярные системы представляют собой молекулы, содержащие несколько кратных связей между соседними атомами, или же молекулы, содержащие атомы с неподеленными электронными парами, расположенными рядом с кратной связью. Для таких систем характерны нелокализованные многоцентровые МО, относящиеся к молекуле в целом или, по крайней мере, к большей ее части. Рассмотрим сопряженную систему на примере бутадиена: $\text{CH}_2 = \text{CH} - \text{CH} = \text{CH}_2$. В этой молекуле одинарные связи C-C и C-H расположены компланарно (рис. 1.4, а), тогда как $2p_x$ -орбитали атомов C ориентированы параллельно друг другу и перпендикулярно к плоскости молекулы (рис. 1.4, б).

Такая ориентация способствует максимальному перекрыванию орбиталей и обеспечивает наибольшую устойчивость всей системы. $2p_x$ -орбиталь атома C_2 может одинаково хорошо перекрываться с $2p_x$ -орбиталью как атома C_1 , так и атома C_3 . Вследствие этого нельзя считать, что p -электрон атома C_2 образует связь лишь с p -электронами атома C_1 или атома C_3 , т. е. нельзя говорить о строгой локализации p -электронов между двумя соседними атомами.

Это означает, что не существует изолированных двойных связей; двойные связи в данном случае делокализованы. Четыре $2p_x$ -орбитали образуют единое облако π -электронов, определенным образом распределенное по всей молекулярной структуре. Следовательно, все электроны бутадиена можно разделить на 2 группы: σ -электроны, которые образуют скелет локализованных связей, и π -электроны, образующие единую подвижную систему, простирающуюся вдоль скелета σ -связей.

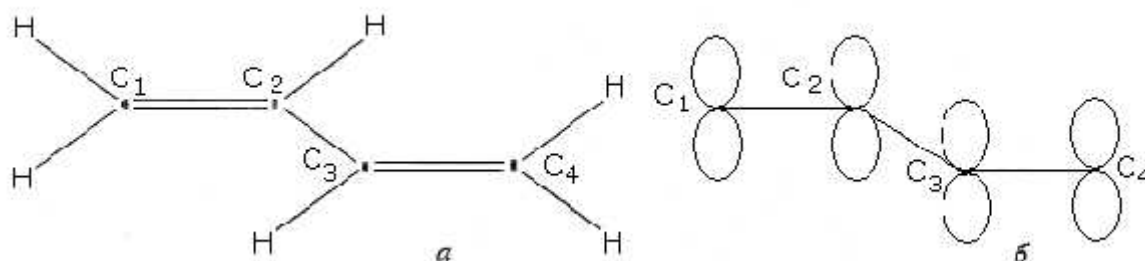


Рис. 1.4. Структурная формула молекулы бутадиена (а) и расположение $2p_x$ -орбиталей атомов углерода в молекуле бутадиена (б)

Если молекула с сопряженными связями содержит атомы, обладающие неподеленными электронными парами, то электроны этих пар могут включаться в общую систему π -электронов.

Существование делокализованных π -электронов является важнейшим свойством молекул с сопряженными связями. Основные химические, физико-химические и биохимические свойства таких систем определяются π -электронами, так как они гораздо подвижнее σ -электронов и с большей легкостью вступают в химические реакции.

Все наиболее важные биомолекулы представляют собой полностью или частично сопряженные системы. Так, основными составляющими частями нуклеиновых кислот являются сопряженные гетероциклы – пуриновые и пиримидиновые основания. Белки содержат изолированные сопряженные участки (пептидные связи), но, возможно, что их вторичная и третичная структуры предрасположены к общей делокализации электронов. Большинство ферментов проявляет каталитическую активность только в сочетании с коферментами, являющимися сопряженными системами.

1.3. Поглощение света. Дипольный момент перехода

Переходы молекул или вероятности их переходов из одного состояния в другое выражают через моменты переходов (электрический и магнитный). При поглощении света вероятность изменений у электрических дипольных моментов молекул на несколько порядков выше, чем у магнитных, или электрических квадрупольных моментов. Следовательно, спектральные полосы оптических спектров практически обусловлены электрическими дипольными переходами.

Согласно положениям квантовой теории, молекула, находящаяся в стационарном состоянии, будет находиться в нем до тех пор, пока какие-либо внешние воздействия не выведут ее из этого состояния. Например, пусть на молекулу с дипольным электрическим моментом $\vec{\mu}$ воздействует электрическое поле $\vec{E}(t)$ световой волны. Энергия взаимодействия при этом

$$V(t) = -\vec{\mu} \cdot \vec{E}(t). \quad (1.8)$$

Подвергаясь воздействию, молекула может перейти из одного состояния в другое. Чтобы найти вероятность перехода между состояниями, нужно решить временное уравнение Шредингера с учетом воздействия поля волны:

$$i\hbar \frac{\partial \Psi}{\partial t} = (\hat{H}_0 + \hat{V}(t))\Psi, \quad (1.9)$$

где $\hat{H}_0$ – оператор Гамильтона, описывающий энергию молекулярной системы до взаимодействия со светом; $\hat{V}(t) = -\hat{\vec{\mu}} \cdot \hat{\vec{E}}(t)$ – оператор взаимодействия. Решение уравнения (1.9) имеет вид линейной комбинации двух состояний:

$$\Psi = \sum_n b_n(t) \cdot \psi_n \cdot \exp(-\frac{i}{\hbar} E_n t). \quad (1.10)$$

Здесь n – номер уровня, E_n – его энергия; ψ_n – волновая функция невозмущенной системы в состоянии n в момент $t = 0$.

Физический смысл величины $b_n(t)$ состоит в том, что её квадрат $(|b_k(\Delta t)|^2)$ является вероятностью перехода молекулы из одного состояния в другое ($j \rightarrow k$) за время Δt . При этом

$$|b_k(\Delta t)|^2 = \frac{\pi^2}{\hbar^2} E_0^2 |\vec{M}_{jk}|^2 \cos^2 \theta \cdot \Delta t, \quad (1.11)$$

где E_0 – амплитуда электрического вектора падающей волны для частоты $\nu_{jk} = (E_k - E_j)/h$; θ – угол между направлением электрического вектора волны и вектором момента перехода $\vec{M}_{jk}$, а

$$\vec{M}_{jk} = \int \psi_k \hat{\vec{M}} \psi_j d\tau = \langle \psi_k | \hat{\vec{M}} | \psi_j \rangle. \quad (1.12)$$

В спектроскопии используются матричные элементы дипольного электрического момента перехода (например, $1 \rightarrow 2$):

$$\vec{\mu}_{12} = \langle \psi_2 | \hat{\vec{\mu}} | \psi_1 \rangle, \quad (1.13)$$

где $\hat{\vec{\mu}} = \sum_i e_i \hat{\vec{r}}_i$ – оператор дипольного момента системы; e_i и $\hat{\vec{r}}_i$ – соответственно заряд и оператор радиус-вектора i -частицы; $\vec{\mu}_{12}$ – векторная величина, отражающая смещение заряда (изменение дипольного момента молекулы) во время перехода. Величина $|\vec{\mu}_{12}|^2$ называется силой диполя или дипольной силой.

Для оценки интенсивности перехода часто используют понятие силы осциллятора f_{12} , пропорциональной, согласно квантовой теории, квадрату модуля $|\vec{\mu}_{12}|^2$:

$$f_{12} = \frac{8\pi m_e \nu}{3\hbar e^2} |\vec{\mu}_{12}|^2, \quad (1.14)$$

где ν – частота, при которой происходит поглощение света.

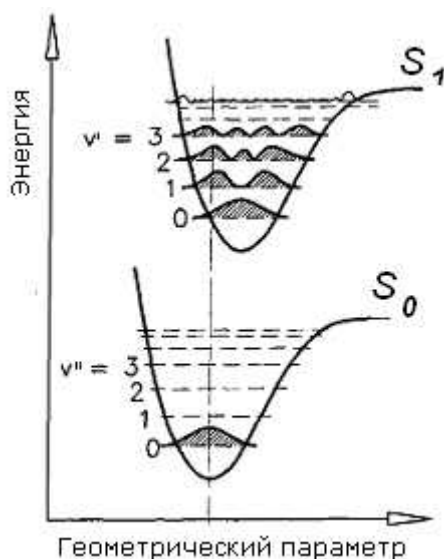


Рис. 1.5. Иллюстрация принципа Франка - Кондона. В данном примере максимальное поглощение происходит при переходе $v'' = 0 \rightarrow v' = 2$

Для прогнозирования переходов нужны точные волновые функции тех состояний, между которыми они происходят. Поскольку в большинстве случаев такие функции неизвестны, то используются приближения. В жидкостях электронный спектр поглощения имеет вид полосы с колебательной структурой, при этом вращательные уровни, как правило, не проявляются. Электронно-колебательные переходы и соответствующие им линии спектра принято называть вибронными. Для оценки вероятности переходов между вибронными уровнями в молекулах применяется эмпирический принцип Франка - Кондона. Он констатирует, что межъядерные расстояния при чрезвычайно быстром электронном переходе (10^{-15} с) не изменяются, в новые положения ядра переходят

гораздо позже (длительность ядерного колебания 10^{-13} с). В соответствии с теорией, переходы происходят преимущественно между состояниями с большим перекрытием соответствующих колебательных волновых функций (рис. 1.5). На рис. 1.5 представлено типичное сечение поверхности потенциальной энергии для основного и первого возбужденного электронных состояний простой молекулы. В каждом из этих состояний имеется множество колебательных уровней. Разность энергий нижних колебательных подуровней двух разных электронных состояний S_0 и S_1 значительно превышает (~ 80 ккал·моль $^{-1}$) энергию теплового движения молекул при комнатной температуре. Поэтому в отсутствие излучения, способного перевести молекулу в состояние S_1 , практически все молекулы в растворе будут пребывать в основном электронном состоянии S_0 . Характерные числовые значения разности энергий двух ближайших колебательных уровней (~ 10 ккал·моль $^{-1}$) также превышают тепловую энергию. Поэтому с достаточной точностью можно считать, что заселен лишь нижний из колебательных уровней (и соответствующие ему близко расположенные вращательные подуровни) состояния S_0 . При поглощении света соответствующей частоты молекула возбуждается и переходит на один из вращательно-колебательных подуровней электронного состояния S_1 . Таким образом, при отсутствии прочих эффектов мы должны получить спектр, состоящий из огромного числа близко расположенных узких линий. Интенсивность каждой из этих линий будет определяться величиной момента перехода между электронными состояниями S_0 и S_1 . На самом деле эти линии ока-

зываются довольно широкими, в результате чего спектр имеет вид размытых полос, представляющих собой огибающую отдельных линий. Уширение линий происходит из-за неоднородности окружения и по ряду других причин. Спектр оказывается малоинформативным. Несмотря на потерю значительной доли информации, он обладает неким преимуществом, состоящим в том, что при интерпретации спектров мы можем не рассматривать отдельно каждое вращательно-колебательное состояние, а моделировать спектр при помощи небольшого числа широких электронов полос, подбирая их форму эмпирически.

Остановимся на связи между теоретически вычисляемыми величинами и экспериментально измеряемыми характеристиками спектров. Поглощение света однородной средой обычно характеризуют интенсивностями прошедшего I и падающего светового пучка I_0 , исключая потери на рассеяние и отражение. При прохождении света через слой вещества интенсивность луча уменьшается согласно закону Бугера – Ламберта – Бера:

$$I = I_0 e^{-\alpha c l} . \quad (1.15)$$

Здесь l – толщина слоя, c – концентрация поглощающих центров, α – коэффициент поглощения, характеризующий поглощательную способность вещества.

Отношение $I / I_0 = e^{-\alpha c l} = T$ называется коэффициентом пропускания, а $1 - T = (I_0 - I) / I_0$ – коэффициентом поглощения.

В лабораторной практике закон Бугера – Ламберта – Бера обычно выражают через показательную функцию с основанием 10:

$$I = I_0 10^{-\varepsilon c l} , \quad (1.16)$$

где $\varepsilon = 0,434\alpha$; ε – показатель поглощения. Размерность показателя поглощения, например, растворенного вещества определяется размерностью концентрации раствора. Если длина кюветы выражена в сантиметрах, а концентрация раствора в моль/л, то ε называют молярным показателем поглощения (коэффициентом молярной экстинкции). Размерность ε – л/(моль·см).

Часто используется логарифмическая форма выражения закона Бугера – Ламберта – Бера:

$$\lg \frac{I_0}{I} = A = \varepsilon c l . \quad (1.17)$$

Величина A называется оптической плотностью. Обозначение A (от слова absorbance – поглощаемость) используется в английской литературе, D (оптическая плотность, optical density) – в русской. Спектр поглощения

графически изображается в виде зависимости ε или A от длины волны λ или волнового числа $\bar{\nu}$. Для характеристики интенсивности полос электронного спектра поглощения пользуются силой осциллятора. Эта величина связана следующим соотношением с молярным коэффициентом экстинкции:

$$f_{mn} = 4.31 \cdot 10^{-9} \cdot \int_{\bar{\nu}_m}^{\bar{\nu}_n} \varepsilon(\bar{\nu}) d\bar{\nu}, \quad (1.18)$$

где $\bar{\nu}$ – волновое число, $\int_{\bar{\nu}_m}^{\bar{\nu}_n} \varepsilon(\bar{\nu}) d\bar{\nu}$ – интеграл полосы поглощения, обусловленной переходом между m - и n -состояниями.

1.4. Особенности спектров поглощения гетероциклических молекул

Видимое излучение относится к первому спектроскопическому диапазону исследований, как наиболее удобное для использования. Именно в видимой и ультрафиолетовой областях поглощают характерные хромофорные группы молекул ($-\text{NO}_2$, $-\text{NO}$, $=\text{C}=\text{O}$, $-\text{CH}=\text{CH}-$, $-\text{N}=\text{N}-$ и др.), используемые для качественного и количественного спектрального анализа, они же являются компонентами биологически важных молекул.

Несмотря на квантованные энергетические состояния хромофоров, спектры поглощения растворов биомолекул представляют собой сравнительно плавные кривые с одним или несколькими максимумами (рис. 1.6). Существенный вклад в ширину полос поглощения вносят полярные молекулы растворителя, окружающие хромофоры и создающие своими дипольными моментами локальные электрические поля. Энергия электронных переходов при наличии внешнего электрического поля несколько изменяется, и, следовательно, изменяется длина волны света, поглощаемого исследуемыми молекулами при данном электронном переходе.

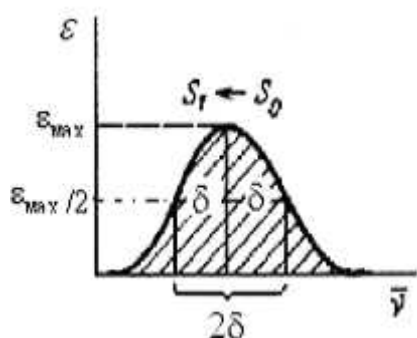


Рис. 1.6. Полоса поглощения

Изменение энергии электронного перехода для исследуемой молекулы зависит от положения молекул среды в момент поглощения света. Смещения энергии электронных переходов не квантуются, они могут принимать (в определенных пределах) любые значения. Огромное число смещенных линий поглощения, каждая из которых соответствует индивидуальным молекулам, приводит к появлению плавной кривой поглощения раствора в целом. Максимум на этой

кривой (λ_{max} или ν_{max}) соответствует наиболее вероятной, усредненной величине энергии электронного перехода. Каждая полоса поглощения спек-

тра, помимо положения максимума, может быть охарактеризована еще тремя величинами: площадью под кривой поглощения, оптической плотностью или коэффициентом молярной экстинкции в максимуме поглощения и полушириной полосы поглощения (расстояние между точками на кривой поглощения, соответствующее половине коэффициента молярной экстинкции в максимуме поглощения, т. е. $\varepsilon_{\max}/2$) (рис. 1.6).

Площадь под кривой поглощения на графике зависимости ε от волнового числа $\bar{\nu}$ (рис. 1.6) прямо пропорциональна величине силы осциллятора (1.18). Если выразить зависимость молярного коэффициента поглощения от волнового числа распределением Гаусса:

$$\varepsilon = \varepsilon_{\max} \exp\left(-\frac{\ln 2(\bar{\nu} - \bar{\nu}_{\max})^2}{\delta^2}\right) \quad (1.19)$$

и подставить (1.19) под знак интеграла (1.18), то получим

$$f_{mn} \approx 1.84 \cdot 10^{-8} \cdot \varepsilon_{\max} \cdot \delta. \quad (1.20)$$

Из анализа спектров поглощения органических молекул следует, что чем больше в молекуле сопряжённых двойных связей, тем больше длина волны максимума поглощения данного вещества. Для иллюстрации этого явления на рис. 1.7 представлены формулы молекулы этилена с одной двойной связью ($\lambda_{\max} = 180$ нм) и бутадиена-1,3, имеющего две сопряжённые связи ($\lambda_{\max} = 217$ нм).

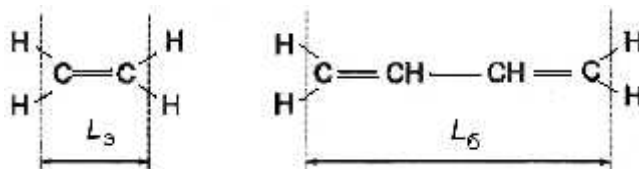


Рис. 1.7. Размер электронных ящиков (L_3 и L_6) и структурные формулы этилена (слева) и бутадиена-1,3 (справа)

Поглощение света молекулами может быть упрощенно описано на основе модели свободных электронов в одномерном потенциальном ящике. Применимость этой модели основана на допущении, что степень деклокализации π -электронов такой системы настолько высока, что они могут практически совершенно свободно перемещаться по всей сопряженной системе. В рамках модели с помощью квантово-механических методов можно рассчитать расположение электронных уровней сложных органических молекул, а, следовательно, установить длину волны максимума поглощения света. Так, если сопряженная цепь молекулы имеет длину $L = Nl$ (N – число звеньев молекулы, l – длина одного звена), то длина волны поглощаемого света может быть определена из соотношения

$$\lambda = \frac{c}{\nu} \approx \frac{4ml^2c}{h} N. \quad (1.21)$$

Формула (1.21) иллюстрирует известный экспериментальный факт – с увеличением числа сопряженных связей в молекуле максимум в спектре поглощения сдвигается в сторону больших длин волн.

Изучение спектров поглощения позволяет получить сведения о системе электронных энергетических уровней молекулы, а также о вероятности переходов между ними. В основном состоянии молекулы все ее электроны распределены по низшим молекулярным орбиталям, выше которых располагается ряд свободных МО с более высокой энергией. Поглощение света происходит в результате переходов с занятых орбиталей на высшие свободные. Классификация электронных переходов в сложных молекулах связана с типами МО, между которыми происходит переход. Система МО сложных органических молекул состоит из σ -орбиталей, π -орбиталей, а также n -орбиталей. Электронные переходы обычно обозначают, указывая орбитали, между которыми переходят электроны (рис. 1.8). В большинстве случаев уровни по значениям энергии располагаются следующим образом: $\sigma < \pi < n < \pi^* < \sigma^*$ (рис. 1.8).

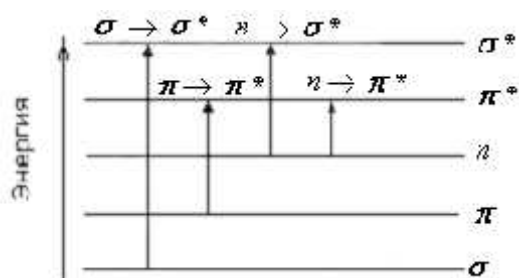


Рис. 1.8. Типы электронных переходов в сложной органической молекуле

В биологически важных молекулах возможен ряд переходов, обозначаемых символами $\sigma \rightarrow \sigma^*$, $\pi \rightarrow \pi^*$, $n \rightarrow \pi^*$, $n \rightarrow \sigma^*$. Среди этих переходов наибольший интерес представляют $\pi \rightarrow \pi^*$ переходы, соответствующие им полосы в спектрах поглощения обычно имеют довольно большую интенсивность и лежат в ближней ультрафиолетовой или видимой

областях спектра. Полосы, соответствующие $\sigma \rightarrow \sigma^*$ переходам, обычно лежат в далекой ультрафиолетовой части спектра. При $\pi \rightarrow \pi^*$ переходах или $n \rightarrow \sigma^*$ переходах один из электронов неподеленной пары переходит соответственно на π^* -орбиталь или σ^* -орбиталь.

Для $\pi \rightarrow \pi^*$ переходов характерно то, что при наличии системы сопряженных связей поглощенная энергия кванта света передается не отдельному электрону, а всей коллективизированной π -электронной системе. Поэтому наличие у молекул делокализованных π -электронов может быть обнаружено по присутствию характерных полос в спектрах поглощения этих молекул. Рассмотрим два примера.

В состав белков входят остатки таких аминокислот, как триптофан, тирозин, фенилаланин, поглощающие энергию в ультрафиолетовой части спектра. Несмотря на довольно значительные различия в структуре, спектры этих молекул сходны между собой. Наличие у всех этих молекул развитой системы делокализованных π -электронов приводит к появлению в

их спектрах широкой полосы поглощения в области 260...280 нм, обусловленной $\pi \rightarrow \pi^*$ переходами (рис. 1.9).

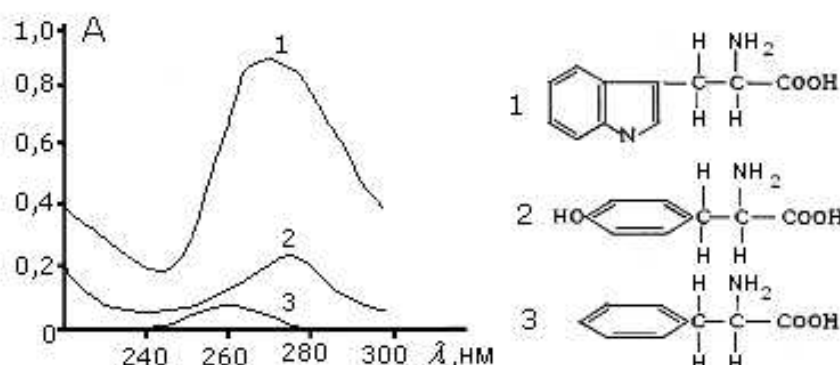


Рис.1.9. Структурные формулы и спектры поглощения ароматических аминокислот: 1 - триптофана; 2 - тирозина; 3 - фенилаланина

Важной особенностью УФ-спектров биополимеров является их высокая чувствительность к изменению конформации макромолекулы. Такие изменения могут быть вызваны разными факторами: повышением температуры раствора, добавлением химически активных веществ, величиной pH и др.

Из рассмотренных данных видно, что спектры аминокислот и, соответственно, белков таковы, что значения A при длине волны приблизительно 310...350 нм практически равны нулю. Однако при измерении спектров поглощения некоторых белков, например, миозина наблюдаются значения A , отличные от нуля при длинах волн 305...310 нм; виден так называемый длинноволновой «хвост». Он обусловлен рассеиванием ультрафиолетового излучения на больших молекулах миозина, т.е. необходимо учитывать вклад рассеяния и вычислять истинные спектры белка. При измерениях ультрафиолетовых спектров аминокислот нужно учитывать, что для них наблюдаются фотодеструктивные процессы, идущие под действием ультрафиолетового излучения. Спектр исследуемого соединения при значительных дозах облучения может изменяться (при длительном измерении и широко открытых щелях спектрофотометра).

Молекула ДНК содержит 4 нуклеотидных основания – аденин, тимин, гуанин и цитозин, которые различаются по структуре, однако в спектрах поглощения при этом много общего (рис. 1.10). Все они имеют максимум в области 260 нм, поскольку за поглощение ультрафиолетового излучения у них ответственна, в основном, система π -электронов. Максимум поглощения ДНК при 260 нм совпадает с максимумом, который является усредненным спектром поглощения отдельных оснований. Хотя максимум совпадает с максимумом средней кривой поглощения отдельных оснований, интенсивность поглощения этой полосы полимерной ДНК может изменяться на 10...50 %. Это явление называется гипохромизмом длинноволновой полосы. Гипохромизм в области 260 нм обусловлен конформационными переходами «неупорядоченная цепь – двойная спираль» (рис. 1.11).

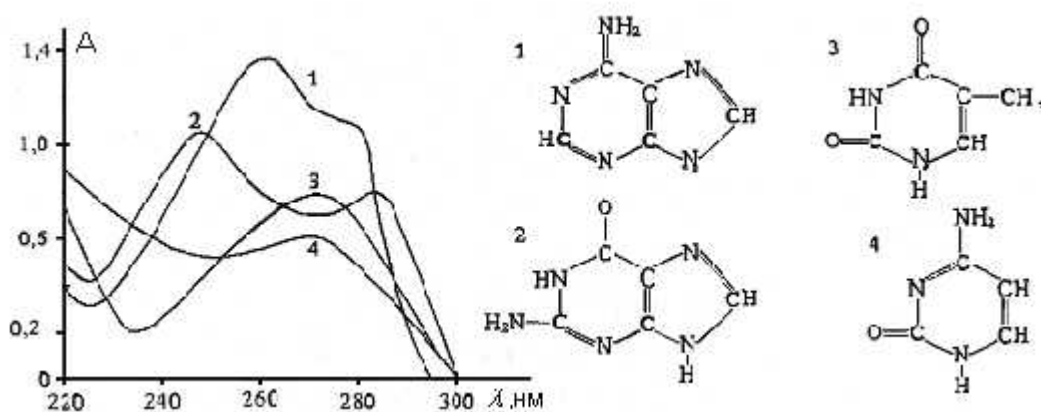


Рис. 1.10. Структурные формулы и спектры поглощения пуриновых и пиримидиновых оснований: 1 - аденина; 2 - гуанина; 3 - тимина; 4 - цитозина

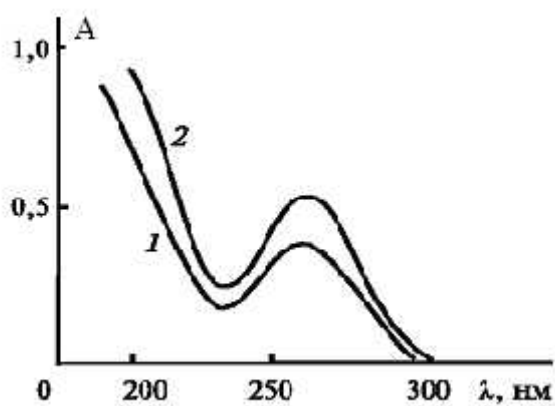


Рис. 1.11. Зависимость оптической плотности от длины волны для спиральной (1) и клубкообразной (2) конформации ДНК тимуса телёнка в тяжёлой воде

Молекулы большинства веществ, поглощающих свет в видимой и ближней ультрафиолетовой областях спектра, имеют наряду с сопряженными двойными связями гетероатомы, например, атомы кислорода в молекуле псоралена или азота в центральном кольце красителя (рис. 1.12). Таким молекулам (содержащим гетероатомы N, O, S и т.п.) наряду с $\pi \rightarrow \pi^*$ присущи $n \rightarrow \sigma^*$ и $n \rightarrow \pi^*$ переходы.

Существенным в структурных формулах, например, красителей, является присутствие концевых групп $-NR_2$, $-OR$ (R обозначает

атом Н или группу CH_3 , C_2H_5 и др.), которые получили название ауксохромов (по – греч. “ауксосис” – увеличение). Такое название указывает на то, что эти группы усиливают цвет исходного слабо окрашенного соединения.

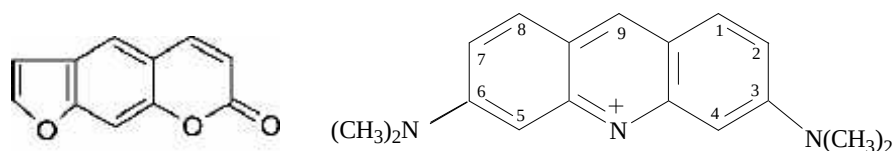


Рис. 1.12. Структурные формулы псоралена и акридинового оранжевого красителя

Ауксохромы являются частью более протяженных хромофоров, содержащих π -электроны или свободные электроны гетероатомов, которые дают свои характеристические линии поглощения. В некоторых случаях на интенсивность и положение полосы поглощения влияет природа растворителя или окружение хромофора. Сдвиг полосы поглощения в сторону длинных волн – батохромный сдвиг, а в сторону коротких волн – гипсохромный сдвиг. Кроме смещения, полоса поглощения красителя может испытывать усиление (повышение интенсивности поглощения – гиперхромный эффект), или ослабление (понижение интенсивности поглощения – гипохромный эффект).

Типичный для красителя сдвиг полосы поглощения в видимую область с одновременным сильным возрастанием поглощения не обусловлен, например, одним только присутствием указанных ауксохромов. Более существенно то обстоятельство, что ауксохромы способствуют приобретению молекулой заряда, положительного или отрицательного, либо создают условия для появления противоположных зарядов внутри нейтральной молекулы. Другими словами, особое значение для увеличения взаимодействия красителя с другими молекулами имеет ионообразующее действие ауксохромов.

Возникновение заряда в молекуле красителя объясняется тем, что ауксохромы или иные группы обладают отчётливо выраженной основной или кислотной функцией. При изменении концентрации водородных атомов среды краситель может изменить число атомов водорода, заряд и спектр поглощения, присоединяя новые протоны, или отдавая их среде.

К значительному изменению электронно-колебательных переходов приводит ассоциация молекул красителей. При ассоциации молекул происходит расщепление спектральных полос, смещение электронных спектров, изменение интенсивности поглощения, появляются новые колебательные переходы. В теоретическом аспекте многие из этих вопросов не решены. Расчёты оптических характеристик ассоциатов проводятся только для упорядоченных структур, например, типа сендвичей. Наиболее существенные результаты получены с использованием теории экситонов: предсказана форма полос поглощения молекулярных димеров.

Согласно теории межмолекулярных взаимодействий, энергия притяжения двух одинаковых молекул, обладающих длинноволновой полосой поглощения с максимумом при $\lambda_{\max}$, пропорциональна $f \cdot \lambda_{\max}^3$, где f – сила осциллятора. Так как значения f и $\lambda_{\max}$ большие у красителей, то и сила притяжения между молекулами красителей при достаточном их сближении должна быть больше, чем у соответствующих бесцветных форм. Эти силы объединяют молекулы красителей в физические димеры или более сложные ассоциаты.

1.5. Взаимодействие гетероциклических молекул

Предположим, что одинаковые гетероциклические молекулы красителя находятся на расстоянии, при котором возможно их электронное взаимодействие. В свободном состоянии гетероциклические молекулы (мономер) обладают электронными состояниями – 0 и a – и полосой поглощения $\nu_{0a} = (E_a - E_0)/h$, связанной с переходом $0 \rightarrow a$ (рис. 1.13). Основному состоянию соответствует волновая функция α_0 , возбужденному – α_a . Эти функции нормированы и ортогональны: $\langle \alpha_0 | \alpha_0 \rangle = \langle \alpha_a | \alpha_a \rangle = 1$; $\langle \alpha_a | \alpha_0 \rangle = 0$. Интенсивность поглощения мономера пропорциональна квадрату дипольного момента перехода $|\langle \alpha_a | \hat{\mu} | \alpha_0 \rangle|^2$.

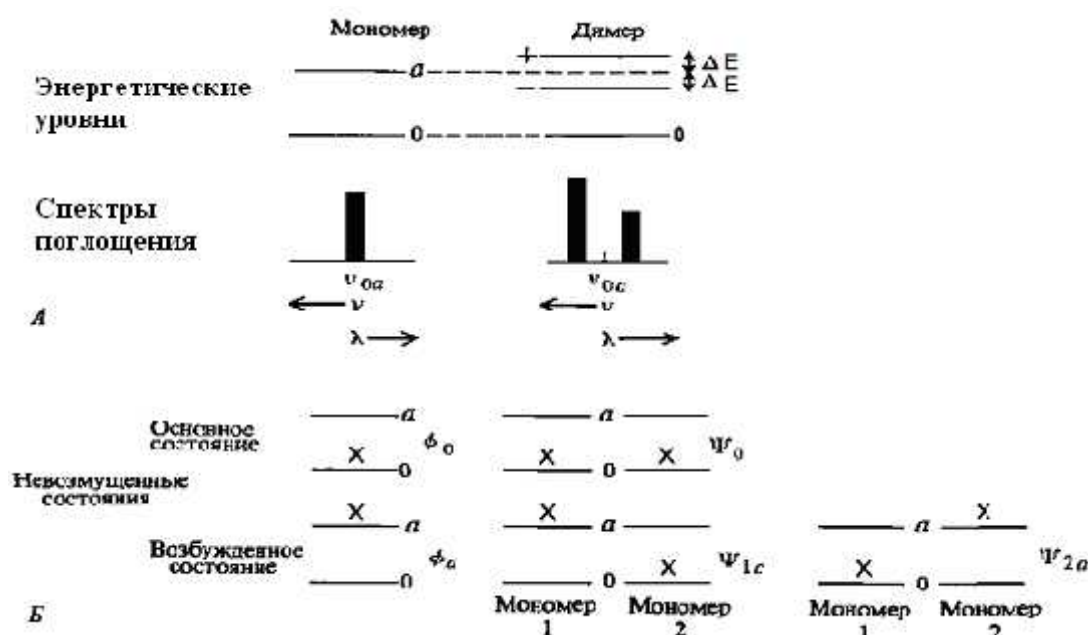


Рис. 1.13. Энергетические уровни, состояния и спектры поглощения (обычно используемые при теоретических расчетах) мономера и димера из двух одинаковых молекул красителя. А) В результате электронных взаимодействий возбужденный уровень мономера расщепляется на два уровня.

Интенсивности поглощения при переходах на эти два уровня обычно различаются. Б) Состояния и волновые функции для мономера и для димера, в котором мономеры не взаимодействуют

Вначале рассмотрим димер, в котором отсутствует взаимодействие между составляющими его мономерами. Волновая функция димера в основном состоянии записывается в виде произведения волновых функций отдельных мономеров: $\Psi_0 = \alpha_{10} \alpha_{20}$. Димер, находящийся в первом возбужденном состоянии, будет состоять из мономера в состоянии a и мономера в состоянии 0 (см. рис. 1.13). Имеются два способа описать это состояние: $\Psi_{1a} = \alpha_{1a} \alpha_{20}$ (первый мономер находится в возбужденном состоянии) и $\Psi_{2a} = \alpha_{10} \alpha_{2a}$ (второй мономер находится в возбужденном состоянии). Эти два

состояния обладают взаимно ортогональными волновыми функциями: $\langle \Psi_{1a} | \Psi_{2a} \rangle = \langle \alpha_{1a} \alpha_{20} | \alpha_{10} \alpha_{2a} \rangle = 0$. Второе возбужденное состояние димера описывается волновой функцией $\alpha_{1a} \alpha_{2a}$. Оно отстоит от основного состояния вдвое дальше по значению энергии, чем состояние с одним возбужденным мономером. Максимум полосы поглощения, обусловленный переходом из основного во второе возбужденное состояние, будет находиться при достаточно коротких длинах волн, и в дальнейшем не рассматривается.

Энергия различных состояний димера вычисляется, как собственные значения его гамильтониана

$$\hat{H} = \hat{H}_1 + \hat{H}_2, \quad (1.22)$$

где $\hat{H}_1$ и $\hat{H}_2$ – гамильтонианы 1 и 2 мономеров соответственно.

Энергия димера в основном состоянии равна

$$\begin{aligned} E &= \langle \alpha_{10} \alpha_{20} | \hat{H}_1 + \hat{H}_2 | \alpha_{10} \alpha_{20} \rangle = \langle \alpha_{10} \alpha_{20} | \hat{H}_1 | \alpha_{10} \alpha_{20} \rangle + \langle \alpha_{10} \alpha_{20} | \hat{H}_2 | \alpha_{10} \alpha_{20} \rangle = \\ &= \langle \alpha_{20} | \alpha_{20} \rangle \langle \alpha_{10} | \hat{H}_1 | \alpha_{10} \rangle + \langle \alpha_{10} | \alpha_{10} \rangle \langle \alpha_{20} | \hat{H}_2 | \alpha_{20} \rangle = E_0 + E_0 = 2E_0. \end{aligned} \quad (1.23)$$

Энергия димера в возбужденных состояниях $1a$ и $2a$:

$$\langle \alpha_{1a} \alpha_{20} | \hat{H}_1 + \hat{H}_2 | \alpha_{1a} \alpha_{20} \rangle = E_a + E_0, \quad \langle \alpha_{10} \alpha_{2a} | \hat{H}_1 + \hat{H}_2 | \alpha_{10} \alpha_{2a} \rangle = E_0 + E_a. \quad (1.24)$$

Два возбужденных состояния с функциями Ψ_{1a} и Ψ_{2a} имеют одинаковую энергию. Разность энергий основного состояния и любого из них равна $E_a - E_0$. Следовательно, частота поглощения димера будет такой же, как у мономера. Определим интенсивность поглощения, воспользовавшись выражением для оператора дипольного момента димера: $\hat{\mu} = \hat{\mu}_1 + \hat{\mu}_2$:

$$|\langle \Psi_{1a} | \hat{\mu} | \Psi_0 \rangle|^2 = |\langle \alpha_{1a} \alpha_{20} | \hat{\mu}_1 | \alpha_{10} \alpha_{20} \rangle + \langle \alpha_{1a} \alpha_{20} | \hat{\mu}_2 | \alpha_{10} \alpha_{20} \rangle|^2 = |\langle \alpha_{1a} | \hat{\mu}_1 | \alpha_{1a} \rangle|^2 = D_{0a}, \quad (1.25)$$

где D_{0a} – сила диполя, характеризующая интенсивность перехода.

Возбужденное состояние димера можно описать с помощью волновой функции $C_1 \Psi_{1a} + C_2 \Psi_{2a}$, допуская тем самым, что нам неизвестна действительная структура возбуждения (в каком из 2-х возбужденных состояний находится система). Такая функция также будет решением уравнения Шредингера для димера:

$$(\hat{H}_1 + \hat{H}_2)(C_1 \Psi_{1a} + C_2 \Psi_{2a}) = (E_a + E_0)(C_1 \Psi_{1a} + C_2 \Psi_{2a}). \quad (1.26)$$

Таким образом, измеряя поглощение на частоте $\nu_{0a} = (E_a + E_0 - 2E_0)/h$, нельзя определить, какой из мономеров переходит в возбужденное состояние.

Димер, образованный взаимодействующими мономерами. Пусть между мономерами возникает электронное взаимодействие (при условии их близкого расположения друг к другу). Будем рассматривать случай достаточно слабых взаимодействий, когда мономеры сохраняют свою индивидуальность, но каждый из них подвергается возмущению со стороны электрического поля другого. Мономеры предполагаются нейтральными, и в первом приближении основной вклад в их электронное взаимодействие вносит диполь-дипольное взаимодействие. Гамильтониан имеет следующий вид:

$$\hat{H} = \hat{H}_1 + \hat{H}_2 + \hat{V}. \quad (1.27)$$

Здесь $\hat{H}_1$ и $\hat{H}_2$ – гамильтонианы такие же, как и в случае невзаимодействующих мономеров, а $\hat{V}$ – оператор межмолекулярного взаимодействия:

$$\hat{V} = (\hat{\mu}_1 \hat{\mu}_2) R_{12}^{-3} - 3(\hat{\mu}_1 \hat{R}_{12})(\hat{\mu}_2 \hat{R}_{12}) R_{12}^{-5}, \quad (1.28)$$

где $\hat{\mu}_1$ и $\hat{\mu}_2$ – операторы дипольных моментов мономеров 1 и 2 соответственно, $\hat{R}_{12}$ – оператор радиус-вектора, а R_{12} – расстояние между мономерами.

Для нахождения электронных состояний димера необходимо решить уравнение Шредингера с гамильтонианом (1.27). Обычно для решения таких задач применяют приближенные методы. При наложении возмущения решение находят с помощью собственных волновых функций невозмущенной квантовой системы, т.е. энергию и функции возмущенной системы выражают через известные значения энергии и волновые функции невзаимодействующих мономеров. Решение ищут в виде функций $C_1 \Psi_{1a} + C_2 \Psi_{2a}$ и $C_1' \Psi_{1a} + C_2' \Psi_{2a}$, удовлетворяющих условиям нормировки, ортогональности и стационарности. Этим условиям возбужденной системы удовлетворяют две волновые функции:

$$\Psi_{A+} = (1/\sqrt{2})(\Psi_{1a} + \Psi_{2a}), \quad \Psi_{A-} = (1/\sqrt{2})(\Psi_{1a} - \Psi_{2a}). \quad (1.29)$$

Энергия основного и двух возбужденных состояний составляет:
- основное состояние

$$\langle \Psi_0 | \hat{H} | \Psi_0 \rangle = E_0 + E_0;$$

- возбужденное состояние A_+

$$\langle \Psi_{A+} | \hat{H} | \Psi_{A+} \rangle = (1/2) \langle \alpha_{1a} \alpha_{20} + \alpha_{10} \alpha_{2a} | \hat{H}_1 + \hat{H}_2 + \hat{V} | \alpha_{1a} \alpha_{20} + \alpha_{10} \alpha_{2a} \rangle = 2E_0 + V_{12}; \quad (1.30)$$

- возбужденное состояние A_-

$$\langle \Psi_{A-} | \hat{H} | \Psi_{A-} \rangle = (1/2) \langle \alpha_{1a} \alpha_{20} - \alpha_{10} \alpha_{2a} | \hat{H}_1 + \hat{H}_2 + \hat{V} | \alpha_{1a} \alpha_{20} - \alpha_{10} \alpha_{2a} \rangle = 2E_0 - V_{12}, \quad (1.31)$$

где $V_{12} = (\vec{\mu}_1 \vec{\mu}_2) R_{12}^{-3} - 3(\vec{\mu}_1 \vec{R}_{12})(\vec{\mu}_2 \vec{R}_{12}) R_{12}^{-5}$.

Таким образом, два возбужденных состояния димера не обладают одинаковой энергией. Возмущение расщепляет возбужденное состояние димеров на два состояния.

Частоты полос поглощения двух возбужденных состояний определяются уравнением:

$$\gamma_{\pm} = (1/h)(E_a + E_0 \pm V_{12} - 2E_0) = \gamma_{0a} \pm V_{12}/h. \quad (1.32)$$

Рассмотрим интенсивности переходов $\Psi_0 \rightarrow \Psi_{A+}$ и $\Psi_0 \rightarrow \Psi_{A-}$. Найдем D_{0A+} и D_{0A-} , выбрав знак плюс в приведенном ниже выражении для первого случая, и минус – для второго:

$$\begin{aligned} D_{0A\pm} &= \left| \langle \Psi_{A\pm} | \hat{\kappa}_1 + \hat{\kappa}_2 | \Psi_0 \rangle \right|^2 = (1/2) \left| \langle \alpha_{1a} \alpha_{20} \pm \alpha_{10} \alpha_{2a} | \hat{\kappa}_1 + \hat{\kappa}_2 | \alpha_{10} \alpha_{20} \rangle \right|^2 = \\ &= (1/2) \left[\left| \langle \alpha_{1a} | \hat{\kappa}_1 | \alpha_{10} \rangle \right|^2 + \left| \langle \alpha_{2a} | \hat{\kappa}_2 | \alpha_{20} \rangle \right|^2 \pm 2 \langle \alpha_{1a} | \hat{\kappa}_1 | \alpha_{10} \rangle \cdot \langle \alpha_{2a} | \hat{\kappa}_2 | \alpha_{20} \rangle \right]. \end{aligned} \quad (1.33)$$

Первые два слагаемых представляют силы диполей для мономеров D_{0a} . Поскольку $\left| \langle \alpha_{1a} | \hat{\mu}_1 | \alpha_{10} \rangle \right| = \left| \langle \alpha_{2a} | \hat{\mu}_2 | \alpha_{20} \rangle \right| = \sqrt{D_{0a}}$, то дипольные силы димера можно выразить формулой

$$D_{0A\pm} = D_{0a} \pm D_{0a} \cos \bar{\gamma}, \quad (1.34)$$

где $\bar{\gamma}$ – угол между моментами переходов мономеров 1 и 2. Из выражения (1.34) следует, что относительные интенсивности двух полос поглощения зависят от геометрии димера.

Учитывая, что сила осциллятора связана с дипольной силой соотношением:

$$f_{ij} = \frac{8\pi^2 m \gamma}{3 h e^2} D_{ij}, \quad (1.35)$$

выражение (1.34) представим в виде: $\frac{\gamma_+ f_{0A-}}{\gamma_- f_{0A+}} = \frac{1 - \cos \bar{\gamma}}{1 + \cos \bar{\gamma}}$, где f_{0A+} , γ_+ и f_{0A-} , γ_- – силы осцилляторов и частоты, соответствующие коротковолновой и длинноволновой полосам в спектре поглощения димера.

Используя выражение (1.20), угол $\bar{\gamma}$ между моментами электронных переходов мономеров можно выразить в виде

$$\bar{\gamma} \approx 2 \arctg \sqrt{\frac{\mathcal{E}_{0A-} \gamma_+ \Phi_-}{\mathcal{E}_{0A+} \gamma_- \Phi_+}}, \quad (1.36)$$

где $\mathcal{E}_{0A+}$, $\mathcal{E}_{0A-}$, Φ_+ , Φ_- – коэффициенты экстинкции и полуширина полос поглощения, соответствующие максимумам поглощения $0A_+$ и $0A_-$.

1.6. Анализ спектров димеров

Основные выводы, следующие из п. 1.5:

- 1) каждая из полос поглощения мономера при образовании димера расщепляется на две полосы;
- 2) разность частот этих полос зависит как от расстояния между мономерами, так и от их взаимной ориентации.

Интенсивности полос D_{0A+} и D_{0A-} являются функциями угла между моментами переходов мономеров и дипольной силой свободных мономеров D_{0a} . Состояниям A_+ и A_- можно дать следующее физическое толкование: при переходе $\Psi_0 \rightarrow \Psi_{A+}$ мономеры возбуждаются в фазе, а при переходе $\Psi_0 \rightarrow \Psi_{A-}$ – в противофазе. Суммарный спектр зависит от угла θ и от взаимной фазы возбуждения моментов переходов мономеров.

Рассмотрим спектры поглощения димеров, находящихся в различных конфигурациях (рис. 1.14). В первых двух случаях (А и Б) угол $\theta = 0^\circ$, следовательно, $D_{0a+} = 2D_{0a}$, а $D_{0a-} = 0$. Интенсивность поглощения определяется только переходом $\Psi_0 \rightarrow \Psi_{A+}$ [см. (1.34)], а частота перехода величиной V_{12} [см. (1.32)]. Для расположения мономеров «голова к хвосту» (случай А), – величина V_{12} отрицательна. Мономеры притягиваются, как и классические диполи при такой ориентации. Из уравнения (1.32) следует, что частота ν_+ меньше частоты ν_{0a} для мономера, то есть будет наблюдаться красное смещение поглощения. Для параллельной стопки (случай Б) величина V_{12} положительна, и поглощение проявится при частоте ν_+ , большей, чем для свободного мономера. В случаях В и Г $\theta = 180^\circ$, следовательно, $D_{0a-} = 2D_{0a}$, а $D_{0a+} = 0$. Интенсивность поглощения определяется переходом $\Psi_0 \rightarrow \Psi_{A-}$, то есть мономеры возбуждаются в противофазе. Когда мономеры располагаются «голова к голове» (случай В), величина V_{12} положительна (отталкивание), в то время как для антипараллельной стопки (случай Г) $V_{12} < 0$, и мономеры притягиваются. В случае В частота полосы поглощения ν_+ будет больше, чем для мономера, в случае Г – меньше.

Таким образом, в случае В спектр поглощения будет таким же, как и в случае А, а в случае Г – как в случае Б, хотя порождающие их состояния различаются. Заметим, что во всех этих случаях не наблюдается никакого спектрального расщепления, а происходит только сдвиг максимума поглощения. Однако для любого угла, отличного от 0 или 180° , наблюдаются две спектральные полосы.

В случае Д димер представляет собой стопку мономеров, $\theta = 90^\circ$, переходы из состояния 0 в состояния A_+ и A_- совершаются с одинаковой вероятностью. При такой геометрии $V_{12} = 0$. В случае Е мономеры лежат в одной плоскости, $\theta = 90^\circ$ ($V_{12} < 0$). Следовательно, будут наблюдаться две полосы – одна с меньшей частотой, ν_+ , другая с большей, ν_- .

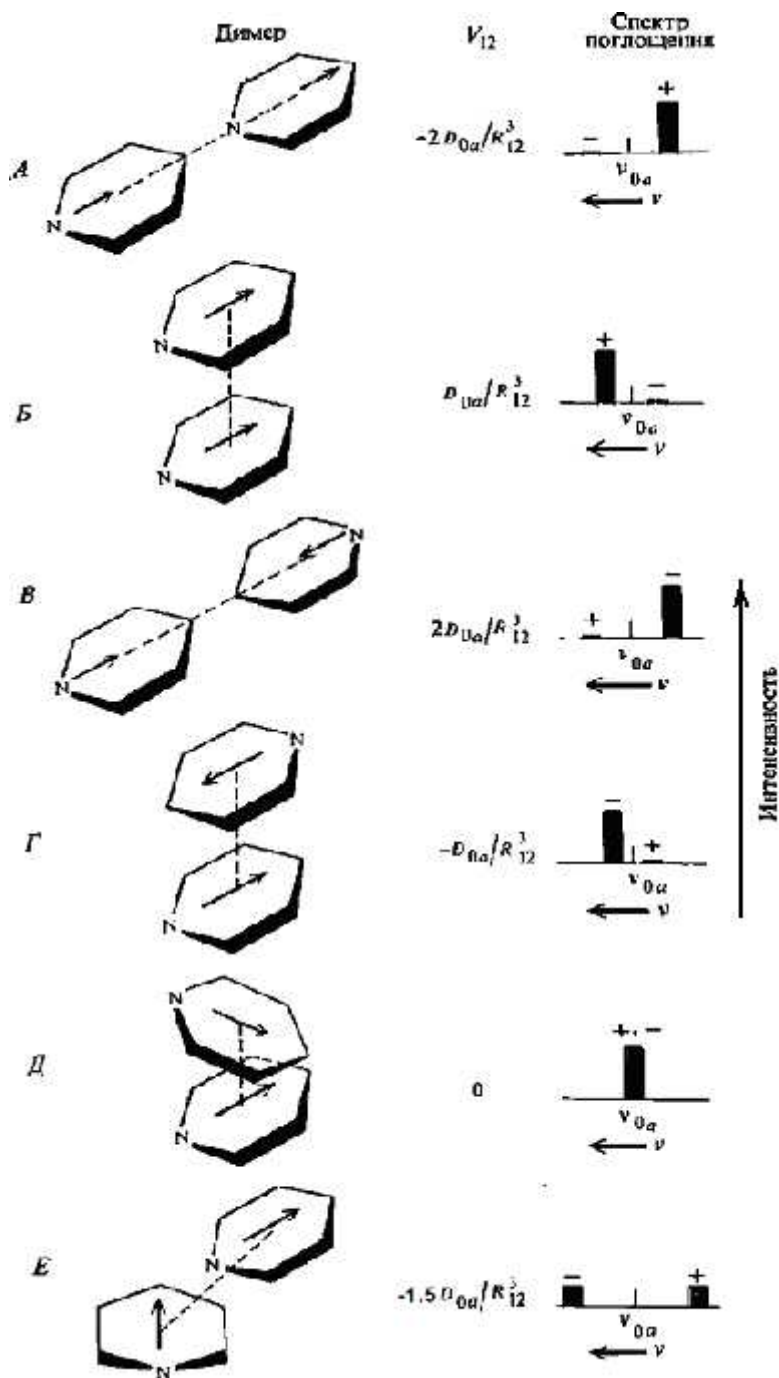


Рис. 1.14. Величина V_{12} и схематические спектры поглощения, используемые при теоретических расчетах, для шести возможных типов димеров пиридина. Энергия взаимодействия V_{12} выражена через силу диполя перехода мономера ($D_{0a} = |\langle \mu_a | \hat{\mu} | \mu_0 \rangle|^2$). Расстояние между хромофорами R_{12} изображено пунктиром; моменты переходов $\Psi_0 \rightarrow \Psi_{A+}$ указаны стрелками (для переходов $\Psi_0 \rightarrow \Psi_{A-}$ одна из стрелок должна быть обращена в сторону атома азота)

В таких случаях, как этот, удастся измерить относительные интенсивности и величину расщепления. Это, в свою очередь, позволяет найти как расстояние между хромофорами R_{12} , так и угол θ .

Литература к части 1

1. Левшин Л.В. Оптические методы исследования молекулярных систем. Молекулярная спектроскопия / Л.В. Левшин., А.М. Салецкий. - М.: Изд-во МГУ, 1994. - 320 с.
2. Фотоника молекул красителей и родственных органических соединений / Н.Т. Теренин. - Л.: Наука, 1967. - 616 с.
3. Ельяшевич М.А. Атомная и молекулярная спектроскопия. Молекулярная спектроскопия / М.А. Ельяшевич. - М.: Либроком, 2012. - 528 с.
4. Бахшиев Н.Г. Введение в молекулярную спектроскопию / Н.Г. Бахшиев. - Л.: Изд-во ЛГУ, 1987. - 216 с.
5. Южаков В.И. Ассоциация молекул красителей и её спектроскопическое проявление. Успехи химии. - 1979. - № 11. - С. 207 - 233.
6. Кантор Ч. Биофизическая химия: в 3-х т./ Ч. Кантор, П. Шимел. - М.: Мир, 1984. - Т. 2 - - 493 с.
7. Малликен Р.С. Нобелевская лекция по химии. Спектроскопия, молекулярные орбитали и химическая связь / Р.С. Малликен // УФН. - 1968. - № 4. - С. 585 - 606.
8. Волькенштейн М.В. Биофизика. - М.: Наука, 1988. - 592 с.
9. Самойлов В.О. Медицинская биофизика / В.О. Самойлов. - СПб.: СпецЛит, 2007. - 558 с.
10. Егоров В.В. Теория J-полосы от экситона Френкеля к переносу заряда / В.В. Егоров, М.В. Алфимов // УФН. - 2007. - № 10. - С. 1033 - 1081.
11. Бернштейн И.Я. Спектрофотометрический анализ в органической химии / И.Я. Бернштейн, Ю.Я. Каминский. - Л.: Химия, 1986. - 200 с.
12. Шмидт В. Оптическая спектроскопия для химиков и биологов / В. Шмидт. - М.: Техносфера, 2007. - 368 с.
13. Молекулярная спектроскопия: основы теории и практика / Ф.Ф. Литвин и др. - М.: НИЦ ИНФРА-М, 2014. - 262 с.
14. Владимиров Ю.А. Физико-химические основы фотобиологических процессов / Ю.А. Владимиров, А.Я. Потапенко. - М.: Высш. шк., 1989. - 199 с.
15. Рубин А.Б. Биофизика: в 2-х т. / А.Б. Рубин. - М.: Изд-во МГУ, 1999. - Т.1 - 448 с.
16. Малеев В.Я. Методы биофизических исследований: монография/ В.Я. Малеев. - Харьков: Изд-во ХНУ им. В.Н. Каразина, 2014. - 457 с.

2. СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ АССОЦИИИ МОЛЕКУЛ ПО ИХ ЭЛЕКТРОННЫМ СПЕКТРАМ ПОГЛОЩЕНИЯ

2.1. Оптимальные значения измеряемой оптической плотности раствора

Электронные спектры поглощения находят широкое применение для решения разнообразных задач по таким направлениям:

- качественный анализ, идентификация веществ;
- количественный анализ (количественное определение соединений, например, в растворе);
- использование электронных спектров для изучения строения молекул;
- другие применения, например, изучение скоростей реакций комплексообразования, диссоциации соединений и т.д.

Количественный спектрофотометрический анализ основан на применении закона Бугера – Ламберта – Бера и принципа аддитивности оптических плотностей. При этом измерения концентрации и оптической плотности растворов должны выполняться с наибольшей возможной точностью.

Рассмотрим ошибки, вытекающие из самой сущности закона поглощения излучений и основные закономерности, установленные Туаменом Лотианом [1]. Найденная ими зависимость ошибки измерения A от ее абсолютного значения является определяющей в оценке ошибок спектрофотометрических измерений. При рассмотрении относительной ошибки измерений ($\Delta A/A$) следует сделать некоторые допущения [1]:

- 1) ошибка при отсчете значений T или A (ΔT и ΔA) на всем протяжении шкалы прибора одинакова;
- 2) закон поглощения строго соблюдается во всем интервале исследуемых значений A , т.е. $\Delta A/A$.

Как первое, так и второе условия практически невыполнимы. Но в первом приближении, чтобы получить представление об основных закономерностях в изменении ошибок измерения, они допускаются. Запишем закон (1.16) в виде

$$A = \lg \frac{I_0}{I} = -\lg T = -\lg \frac{I}{I_0} = \lg I_0 - \lg I. \quad (2.1)$$

Для нахождения $\Delta A/A$ нужно продифференцировать уравнение (2.1):

$$dA = A'_I dI = 0 - (\lg e) \frac{dI}{I} = -0,43 \frac{dI}{I_0} \frac{1}{\frac{I}{I_0}} = -0,43 \frac{dI}{I_0} \frac{1}{T} = -0,43 \frac{dT}{10^{-A}}.$$

Заменяя дифференциалы конечными разностями, получим

$$\frac{\Delta A}{A} = -0,43 \frac{\Delta T}{A \cdot 10^{-A}}. \quad (2.2)$$

Производная $(\Delta A/A)'$ при условии, что ΔI и I_0 постоянны ($I_0 = \text{const}$, так как интенсивность первоначального потока излучения во всех измерениях постоянна, $\Delta I = \text{const}$, так как $\Delta T = \text{const}$) будет равна

$$\left(\frac{\Delta A}{A} \right)'_A = -0,43 \cdot \Delta T \left(\frac{\ln 10 \cdot 10^A}{A} - \frac{10^A}{A^2} \right). \quad (2.3)$$

Приравняв выражение (2.3) нулю, получим

$$A_{\min} = \frac{1}{\ln 10} = 0,4343. \quad (2.4)$$

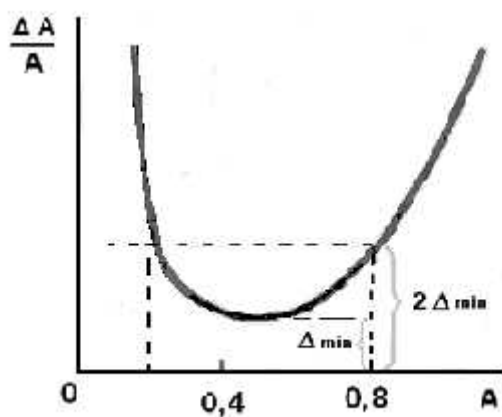


Рис. 2.1. Зависимость относительной ошибки от измеряемой оптической плотности

Таким образом, построенный график зависимости ошибки измерения от A (рис. 2.1) дает кривую с минимумом при $A = 0,4343$. Если ошибка не должна превышать $2\Delta_{\min}$, то измеряемая величина должна укладываться в интервал $0,2 \dots 0,8$. Если же измеренные значения оптической плотности оказываются за пределами рекомендуемого диапазона, то можно либо дополнительно разбавить исследуемый раствор, либо использовать для измерений кювету с иной длиной оптического пути.

Современные спектрофотометры позволяют производить высокоточные измерения и в значительно более широком интервале оптической плотности, чем выделенный интервал: $0,2 \leq A \leq 0,8$.

2.2. Ассоциация молекул красителей в растворе

Спектр поглощения красителей редко имеет простой контур, близкий к гауссовой кривой. Обычно наряду с главным максимумом присутствуют побочные – коротковолновые, относительная высота которых зависит от концентрации красителя, температуры и природы растворителя (рис. 2.2). Детальный анализ спектров поглощения позволяет изучать кинетику явлений, определять важнейшие характеристики молекулярных комплексов в

растворе: константу равновесия, энтальпию, энтропию образования комплексов и др.

Важным экспериментальным преимуществом спектрофотометрического метода является возможность изменения концентрации исследуемого вещества в широком интервале, что позволяет надежно регистрировать состав и концентрацию ассоциатов в растворе, и, следовательно, определять константу равновесия.

При увеличении концентрации красителя в растворе происходит сближение его молекул, приводящее к развитию межмолекулярного взаимодействия. Этот процесс часто сопровождается объединением соседних молекул с образованием димеров и агрегатов различной сложности. В результате в растворе, наряду с мономерными молекулами, появляются новые поглощающие, а иногда и излучающие центры. Их возникновение оказывает существенное воздействие на оптические свойства раствора. В таких случаях происходит нарушение закона Бугера – Ламберта – Бера, постулирующего независимость молярного коэффициента экстинкции красителя от концентрации. Положение, форма и ширина полосы поглощения в димере сильно зависят от взаимного расположения в нем молекул.

Процессы молекулярной ассоциации особенно сильно и своеобразно проявляются в растворах различных веществ, имеющих интенсивную полосу поглощения в видимой части спектра. Наиболее благоприятной средой для образования ассоциатов красителей является вода. В чистых же органических растворителях (спиртах, ацетоне, пиридине и др.) ассоциация молекул красителей либо вовсе не развивается, либо слабо проявляется лишь в самых концентрированных растворах. У ряда красителей процесс молекулярной ассоциации резко усиливается при помещении их в бинарные смеси полярных и неполярных растворителей (хлороформ с CCl_4 , различных спиртов с CCl_4 и др.). Дополнительное введение в разбавленный раствор красителя сравнительно больших количеств электролита (0,5М NaCl) производит такое же действие, как и повышение концентрации красителя. Охлаждение исследуемого раствора также способствует усилению ассоциации. Вместе с тем процесс ассоциации является обратимым. Все концентрационные эффекты полностью исчезают, а первоначальные оптические свойства растворов, содержащих лишь мономерные молекулы исследуемого вещества, полностью восстанавливаются при обратном разведении концентрационных растворов. Нагревание концентрированных растворов также способствует уменьшению ассоциации. Это указывает на малую прочность ассоциатов [2].

Термин «ассоциат» обозначает совокупность частиц, состоящих как из одинаковых, так и различных молекул, т. е. это – группа молекул жидкой фазы, имеющая внутреннюю структуру, обусловленную образованием

межмолекулярных связей, время жизни которой, по крайней мере, на порядок превышает период межмолекулярных колебаний.

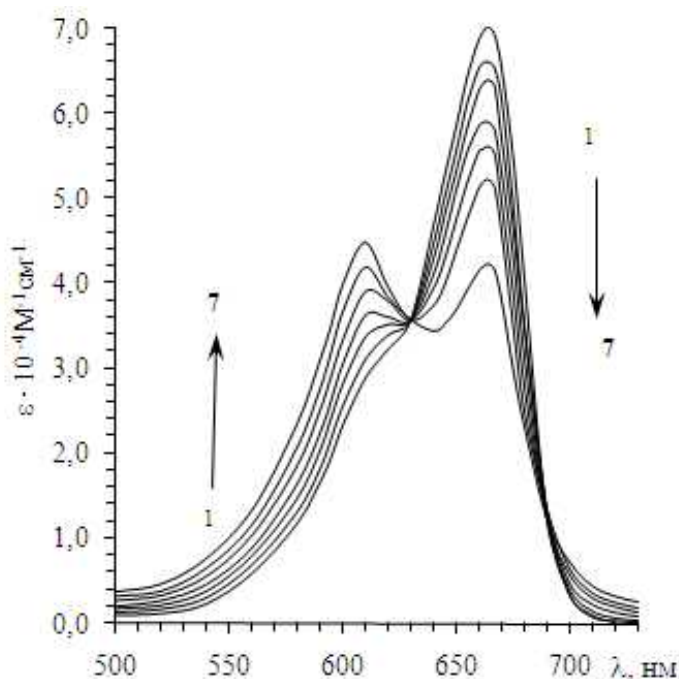


Рис. 2.2. Спектры поглощения метиленового голубого красителя в водном растворе (рН 6,7; $T = 293\text{ K}$) при различных концентрациях красителя: 1 - 10^{-6} ; 2 - $5.2 \cdot 10^{-6}$; 3 - $9.5 \cdot 10^{-6}$; 4 - $2.6 \cdot 10^{-5}$; 5 - $5 \cdot 10^{-5}$; 6 - 10^{-4} ; 7 - $2.3 \cdot 10^{-4}$ моль/л

Об образовании ассоциированных молекул можно, прежде всего, судить по деформациям видимой электронной полосы поглощения исследуемого красителя. Характер происходящих при этом изменений виден на рис. 2.2, где показаны концентрационные деформации электронного спектра поглощения красителя метиленового голубого (МГ) в воде. Спектр поглощения МГ практически не изменяется в области малых концентраций раствора ($\sim 10^{-6}$ моль/л). Следовательно, в этом диапазоне концентраций образование ассоциированных молекул

не происходит, и наблюдаемый спектр поглощения принадлежит мономерным молекулам красителя. При дальнейшем возрастании концентрации наблюдается интенсивное уменьшение длинноволновой мономерной полосы поглощения ($\lambda_{\text{max}} = 664\text{ nm}$), ее смещение с одновременным появлением и быстрым нарастанием новой коротковолновой полосы ($\lambda_{\text{max}} = 610\text{ nm}$), принадлежащей возникающим в растворе ассоциированным молекулам метиленового голубого. Из рис. 2.2 видно, что все семейство спектров поглощения пересекается в одной точке $\lambda = 630\text{ nm}$, которая называется изобестической точкой.

Дополнение 1

Молекулы МГ имеют три плоских ароматических кольца и две гидрофобные диметиламиновые группы в положениях 3 и 7, гетероатомы серы и азота в положениях 5 и 10 (рис. 2.3).

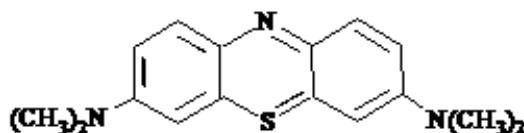


Рис. 2.3. Структурная формула МГ

Наличие изобестической точки указывает на существование равновесного состояния мономерной и димерной форм молекул красителя при концентрациях $10^{-6} \dots 10^{-4}$ моль/л в растворе. Коэффициент экстинкции на длине волны изобестической точки можно использовать для определения концентрации красителя, если закон (1.16) не нарушается.

При дальнейшем увеличении концентрации красителя мономерный пик поглощения полностью переходит в новый пик поглощения ($\lambda = 610$ нм), что предполагает образование агрегатов красителя более высокого порядка, чем димеры, т.е. раствор перестает быть бинарным, в нем появляется несколько поглощающих центров.

В спектрах поглощения при увеличении концентрации красителей наиболее типичны следующие изменения: смещение максимума поглощения красителя относительно полосы свободных лигандов и ее уширение, пересечение спектров с одновременным изменением интенсивности поглощения, появление новых полос в спектре, смещенных либо в коротковолновую, либо в длинноволновую сторону относительно максимума мономерного поглощения.

Эти изменения могут быть объяснены либо расщеплением электронных уровней вследствие взаимодействия объединяющихся молекул, либо смещением потенциальных кривых их возбужденных состояний под влиянием поля близко расположенных молекул, вызывающих изменение вероятностей переходов между колебательными уровнями основного и возбужденного электронных состояний молекул.

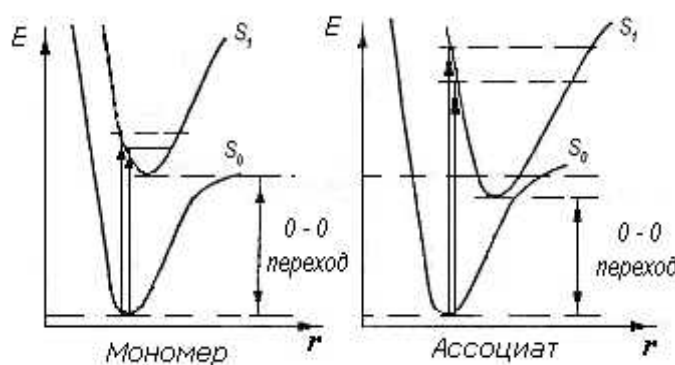


Рис. 2.4. Потенциальные кривые, характеризующие основные и возбуждённые состояния

Рассмотрим схему потенциальных кривых основного (S_0) и возбуждённого (S_1) состояний мономера и ассоциата с использованием принципа Франка – Кондона (рис. 2.4). Эта схема построена с учётом того, что при самоассоциации происходит смещение спектров поглощения в сторону больших частот. Из рис. 2.4 видно, что при поглощении с большей вероятностью, происходят переходы на более высокие колебательные уровни

возбужденного электронного состояния у ассоциированных молекул, чем у мономеров.

Количественный анализ самоассоциации молекул МГ можно провести по экспериментальной концентрационной зависимости молярного коэффициента экстинкции красителя на длине волны, соответствующей максимуму поглощения молекул в мономерной форме (рис. 2.5) [3, 4]. Уменьшение коэффициента экстинкции при увеличении концентрации МГ объясняется снижением количества свободных светопоглощающих лигандов, то есть формированием ассоциатов. Характер концентрационной зависимости свидетельствует о нарушении закона Бугера – Ламберта – Бера.

Если раствор содержит смесь мономеров и димеров, то при интерпретации экспериментальных данных используют следующую схему:



где L_1 и L_2 – мономерная и димерная формы молекул красителя.

Равновесная константа димеризации молекул K_d определяется из закона действующих масс:

$$K_d = \frac{[L_2]}{[L_1] \cdot [L_1]}, \quad (2.6)$$

где $[L_1]$ и $[L_2]$ – концентрации мономеров и димеров соответственно.

Общая концентрация молекул в растворе:

$$[L_0] = [L_1] + 2 \cdot [L_2], \quad (2.7)$$

где $[L_0]$ – исходная концентрация красителя.

Согласно модели, суммарный молярный коэффициент экстинкции ε описывается выражением:

$$\varepsilon = \varepsilon_m f_m + \varepsilon_d f_d, \quad (2.8)$$

где ε_m , ε_d – коэффициенты экстинкции мономеров и молекул красителя в составе димерных комплексов соответственно;

$f_m = \frac{[L_1]}{[L_0]}$ – равновесная

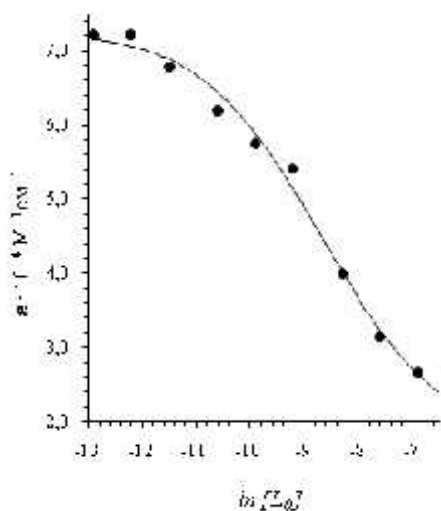


Рис. 2.5. Зависимость молярного коэффициента экстинкции МГ в водном растворе ($\lambda_{\max} = 664$ нм) от логарифма концентрации красителя

молярная доля молекул в мономерной форме; $f_d = \frac{2 \cdot K_d \cdot [L_1]^2}{[L_0]}$ – равновесная молярная доля молекул в составе димеров.

Концентрацию $[L_1]$ определяли из закона сохранения массы:

$$[L_0] = [L_1] + 2 \cdot K_d \cdot [L_1]^2.$$

Для такой модели экспериментальную концентрационную зависимость молярного коэффициента экстинкции красителя описывали выражением

$$\varepsilon = \varepsilon_d + (\varepsilon_d - \varepsilon_m) \cdot \frac{1 - \sqrt{1 + 8 \cdot K_d \cdot [L_0]}}{4 \cdot K_d [L_0]}. \quad (2.9)$$

Параметры модели ε_m , ε_d и K_d рассчитывали путем минимизации суммы квадратов отклонений $S = \sum_{k=1}^n (\varepsilon_k^{\text{эксп}} - \varepsilon_k)^2$ экспериментальных значений молярных показателей поглощения ($\varepsilon_k^{\text{эксп}}$) от значений ε_k , рассчитанных в тех же точках по модели (2.9). Численные значения параметров составляют: $\varepsilon_m = (73460 \pm 820)$ л/моль см, $\varepsilon_d = (8320 \pm 2080)$ л/моль см, $K_d = (3900 \pm 800)$ л/моль. Процедура решения обратной задачи осуществлялась методом Марквардта (прил.).

Оценка погрешностей параметров проведена в предположении нормального распределения ошибок параметров аналогично тому, как принято в линейном регрессионном анализе. Приблизительный 95%-ный доверительный интервал каждого параметра ($\Delta\Theta_j$) рассчитывался по формуле: $\Delta\Theta_j = t(\alpha, n-k-1) \cdot \sqrt{ED'_{jj}}$ где $t(\alpha, n-k-1)$ – коэффициент, зависящий от полного количества измерений n , количества неизвестных параметров k (в данном случае их три: ε_m , ε_d , K_d) и заданного значения доверительной вероятности (уровня значимости) α ; E – несмещенная оценка дисперсии отклонений регрессии; D'_{jj} – диагональные элементы дисперсионной матрицы.

Поглощение фотонов молекулами ассоциатов и передача энергии соседним невозбужденным молекулам красителя часто приводит к возникновению в них двух возбужденных уровней, энергетический зазор между которыми тем больше, чем больше молекул в ассоциате [5, 6]. У димеров это может проявляться в виде расщепления синглетно-возбужденного уровня на уровни с более высокой и более низкой энергиями. Разность энергий между расщепленными уровнями зависит от взаимного расположения мономеров, т.е. от структуры димеров.

Для оценивания структурных параметров димера его спектр выделяли из экспериментальных спектров в составе двух компонентов (мономерной и димерной). Индивидуальные составляющие (ε_{mi} и ε_{di}) получали при совместной обработке экспериментальных спектров с использованием числового значения равновесной константы K_d путем минимизации функционала (из условия наилучшего совпадения расчетных и экспериментальных значений показателей поглощения):

$$S = \sum_j \sum_i \left(\varepsilon_{ji}^e - \varepsilon_{di} - (\varepsilon_{di} - \varepsilon_{mi}) \cdot \frac{1 - \sqrt{1 + 8 \cdot K_d \cdot [L_j]}}{4 \cdot K_d \cdot [L_j]} \right)^2, \quad (2.10)$$

где $[L_j]$ – концентрация красителя; ε_{ji}^e – экспериментальные значения молярных показателей поглощения; j – номера спектров (концентраций); i – номера молярных показателей поглощения, соответствующие λ_i .

Вычислительной процедурой минимизации функционала предусматривалось объединение спектральных характеристик в два блока: одним блоком параметров описывали поглощение молекул в мономерной форме ε_{mi} , другим – в димерной ε_{di} . Минимизацию функционала выполняли варьированием параметров каждой группы в отдельности до стабилизации их значений и достижения наилучшего значения суммы (2.10) при фиксированных параметрах другой группы.

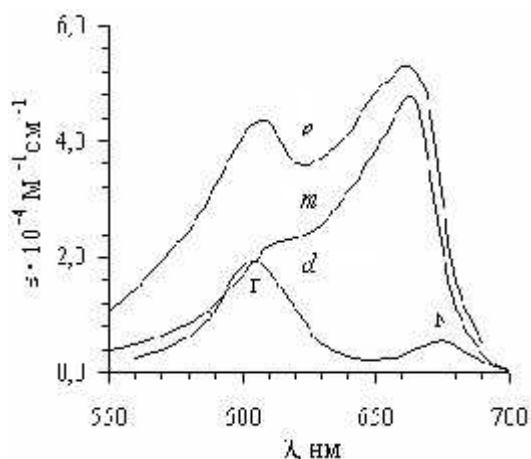


Рис. 2.6. Разделение экспериментального спектра водного раствора МГ (e , $[L_0] = 1 \cdot 10^{-4} \text{ M}$) на составляющие компоненты: m – спектр мономера; d – спектр димера

Поиск спектральных параметров «крупным шагом, состоящим из решения двух подзадач минимизации функционала» много раз повторялся, пока не была достигнута заданная точность решения задачи. Полученному значению минимума функционала соответствуют две спектральные (индивидуальные) составляющие экспериментального спектра (рис. 2.6). Подобная методика минимизации «крупным двойным повторяющимся шагом» позволяет миновать множество локальных минимумов и избежать закливания поисковой программы.

На рис. 2.6 представлен экспериментальный спектр поглощения МГ и его компоненты: спектры поглощения молекул в мономерной и димерной формах. Присутствие в спектре димеров двух полос поглощения

P ($\lambda_P = 600$ нм) и N ($\lambda_N = 675$ нм), расположенных по обе стороны от максимума мономеров, свидетельствует о расщеплении возбужденного уровня связанных молекул на две составляющие, переходы между которыми и основным уровнем определяются электронной структурой отдельных молекул красителя, а также положением молекул в димере друг относительно друга.

Молекулы в составе димеров, представляющие единую квантовую систему, описывают в основном состоянии (G) волновой функцией $\Psi_G = \alpha_{10} \cdot \alpha_{20}$. Энергия димера E_G складывается из энергий основного состояния изолированных молекул и энергии взаимодействия молекул в основных состояниях [6].

Волновые функции и энергии двух возбужденных состояний димера описываются выражениями [5, 6]:

$$\begin{aligned}\Psi_P &= (1/\sqrt{2})(\Psi_{1a} + \Psi_{2a}), \quad E_P = E_a + E_0 + V + \Delta D, \\ \Psi_N &= (1/\sqrt{2})(\Psi_{1a} - \Psi_{2a}), \quad E_N = E_a + E_0 - V + \Delta D.\end{aligned}\tag{2.11}$$

Здесь Ψ_{1a} и Ψ_{2a} – волновые функции, отвечающие возбужденным состояниям димера и не учитывающие межмолекулярные взаимодействия; E_0 и E_a – энергии основного и возбужденного состояний изолированных мономеров; V – энергия межмолекулярного взаимодействия (см. часть 1); $\Delta D = \iint \alpha_{1a} \alpha_{20} \hat{V} \alpha_{1a} \alpha_{20} dr_1 dr_2 + \iint \Psi_G \hat{V} \Psi_G dr_1 dr_2$ – сдвиг уровня энергии возбуждения молекулы за счет образования димера [6].

В результате взаимодействия V возбужденное состояние димера расщепляется на два состояния P и N (рис. 2.7). Величина расщепления подуровней, как и энергия взаимодействия V , являются функцией расстояния между мономерами и зависят от их взаимной ориентации: $V = (\vec{\kappa}_1 \vec{\kappa}_2) R_{12}^{-3} - 3(\vec{\kappa}_1 \vec{R}_{12})(\vec{\kappa}_2 \vec{R}_{12}) R_{12}^{-5}$, где κ_1 и κ_2 – дипольные моменты переходов молекул 1 и 2 соответственно; $\vec{R}_{12}$ – вектор, направленный от диполя мономера 1 к диполю мономера 2; $R_{12} = |\vec{R}_{12}|$. Двум подуровням или полосам поглощения (P и N), наблюдаемым в димерных спектрах, соответствуют два дипольных момента перехода димеров $\vec{\kappa}_P$ и $\vec{\kappa}_N$, которые могут образовываться путём сложения дипольных моментов мономеров, возбуждаемых светом в фазе и противофазе.

Усредненное значение угла между ориентациями диполей $\vec{\kappa}_1$ и $\vec{\kappa}_2$ можно рассчитать исходя из квантово-механического рассмотрения интенсивностей и положения полос димерных спектров (1.42):

$$\sim \approx 2 \arctg \sqrt{\frac{\varepsilon_N \gamma_P \Phi_N}{\varepsilon_P \gamma_N \Phi_P}},$$

где ε_P , ε_N , δ_P , δ_N – коэффициенты экстинкции максимумов полос P и N , и их полуширина (рис. 2.6).

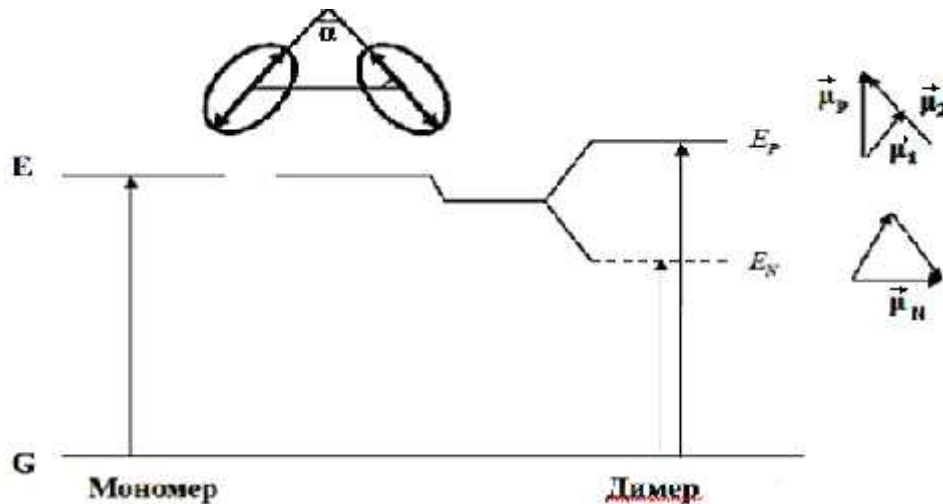


Рис. 2.7. Энергетическая диаграмма

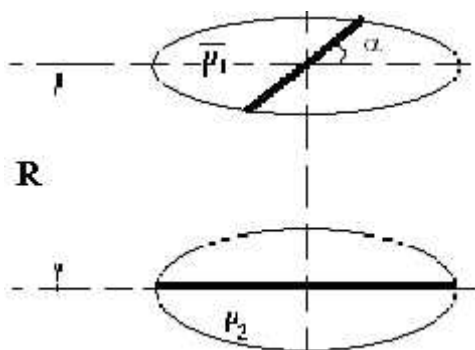


Рис. 2.8. Схематическое представление стопочного димера

Интенсивность полосы, определяемой переходом $\Psi_G \rightarrow \Psi_P$, позволяет предположить, что молекулы красителя образуют, в основном, стопочные ассоциаты (рис. 2.8), и оценить их размер, используя спектральный интервал: $\Delta^a = a_N - a_P = a_N a_P E / 2hc$, а также расстояние между взаимодействующими дипольными моментами переходов (расстояние между центрами масс молекул в димере) по формуле

$R_{12}^3 \approx |\vec{\kappa}|^2 \cos^2 \alpha / 4 \varepsilon_0 \varepsilon E$, где $|\vec{\kappa}| = |\vec{\kappa}_1| = |\vec{\kappa}_2|$; ε_0 , ε – электрическая постоянная и диэлектрическая проницаемость среды соответственно.

Дополнение 2

Величина индуцированного светом дипольного момента перехода $\langle \phi_{1a} | \hat{\mu}_1 | \phi_{10} \rangle$ осциллирует вместе с приложенным электрическим полем и в отличие от постоянного вектора ($\vec{\mu}_0$ или $\vec{\mu}_a$) обладает лишь определенной ориентацией, но не направлением (поэтому иногда его не обозначают на рисунках стрелкой). При одновременном возбуждении двух диполей важным является их относительная фаза. В зависимости от свойств системы (например, димера) диполи могут возбуждаться в фазе, в противофазе или с некоторой произвольной разностью фаз.

Квадрат дипольного момента перехода можно выразить через длину волны света и силу осциллятора $f = 8\pi^2 mc |\vec{r}| / 3he^2 a$. Окончательно получим

$$R \approx \sqrt[3]{\frac{3e^2 f \cos^2 \alpha_N \alpha_P}{16\pi^2 \epsilon_0 \epsilon mc^2 \Delta a}}. \quad (2.11)$$

Здесь f – сила осциллятора электронного перехода на длине волны a поглощения мономеров.

Расчетные значения параметров α и R_{12} для димеров МГ при данных условиях эксперимента составляют 50° , 0,57 нм.

Дополнительную информацию к той, что даёт константа самоассоциации о стабильности димерного комплекса, можно получить из анализа термодинамики перехода молекул из более ассоциированного состояния в менее упорядоченное состояние. В качестве примера проанализируем температурные изменения спектра поглощения водного раствора акридинового оранжевого (АО) красителя. При повышении температуры наблюдается рост поглощения (рис. 2.9), сопровождающийся небольшим смещением максимума полосы в коротковолновую область, свидетельствующий о разрушении ассоциированных молекул. Полного восстановления спектра, соответствующего разбавленному раствору, при нагревании не наблюдается, что, возможно, связано не только с разрушением ассоциатов, но и переходом части молекул в бесцветную форму.

На основе предположения, что деформация спектров в интервале температур $20 \dots 80^\circ \text{C}$ вызваны в основном изменением количества мономеров и димеров в растворе, сделана оценка констант равновесия по экспериментальным концентрационным зависимостям (рис. 2.10).

Оценка термодинамических параметров реакции димеризации молекул проведена по зависимости Вант-Гоффа (рис. 2.12).

Энтальпия оценивалась по величине тангенса угла наклона аппроксимирующей прямой в соответствии с соотношением Вант-Гоффа:

$$\Delta(\ln K_d) / \Delta(1/T) = -\Delta H / R. \quad (2.12)$$

Энтропия рассчитывалась из свободной энергии Гиббса $\Delta G = -RT \cdot \ln K_d$ и энтальпии:

$$\Delta S = -(\Delta G - \Delta H) / T. \quad (2.13)$$

Полученные значения ΔG , ΔH и ΔS реакции димеризации молекул акридинового оранжевого составляют: $\Delta G_{293} = - (19 \pm 3)$ кДж/моль, $\Delta H = - (38 \pm 10)$ кДж/моль, $\Delta S_{293} = - (65 \pm 24)$ Дж/моль·К.

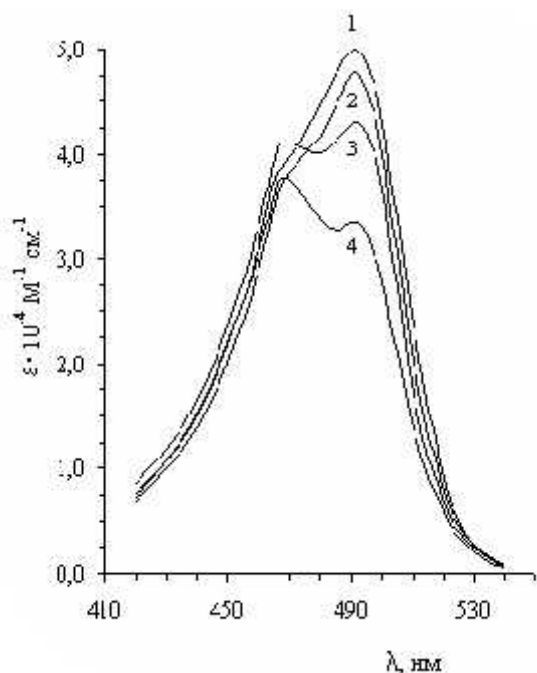


Рис. 2.9. Зависимость спектра поглощения водного раствора АО ($[L_0] = 1 \cdot 10^{-4}$ моль/л) от температуры: 1 – 25 °C; 2 – 40 °C; 3 – 60 °C; 4 – 80 °C

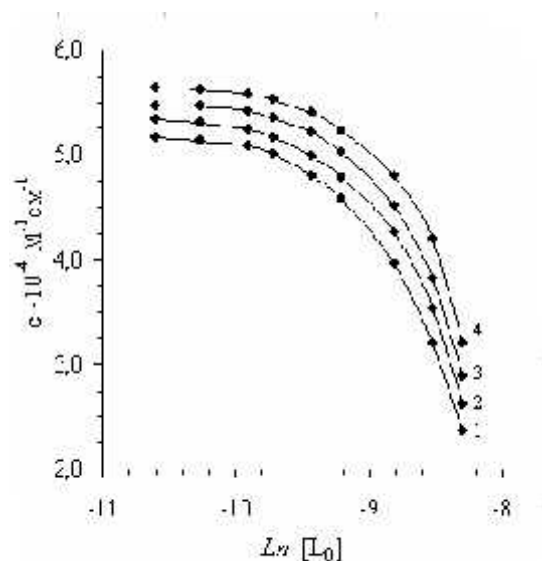


Рис. 2.10. Зависимость молярного коэффициента поглощения на длине волны 492 нм раствора АО от логарифма концентрации красителя при температурах: 1 – 293 К; 2 – 313 К; 3 – 333 К; 4 – 353 К

Известно, что экзотермические реакции характерны для процессов самоассоциации, включающих в себя стэкинг – взаимодействие ароматических систем с делокализованными π -электронами, таких как пуриновые основания, акридиновые красители и т.д.

Считается, что самоассоциация красителей происходит, в основном, в результате дисперсионных взаимодействий хромофоров этих молекул. Такие взаимодействия характеризуются как отрицательной энтальпией, так и отрицательной энтропией [7].

Дополнение 3

Молекулы АО состоят из трёх плоских ароматических колец. В положениях 3 и 6 хромофора находятся две концевые гидрофобные диметиламиновые группы и гетероатом азота в пиридиновом кольце (рис. 2.11).

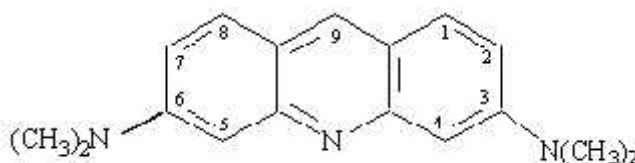


Рис. 2.11. Структурная формула красителя акридинового оранжевого

Полученные отрицательные значения энтальпии и энтропии реакции димеризации АО свидетельствуют о преимущественном вкладе дисперсионных взаимодействий в энергетику ассоциации. Большое отрицательное значение энтропии указывает, по-видимому, на определенное упорядочение молекул растворителя в окрестности димеров красителя.

Данная методика изучения динамического равновесия молекул в растворе «мономер – димер» позволяет оценить термодинамические и структурные параметры образования димерных комплексов однородных молекул красителей.

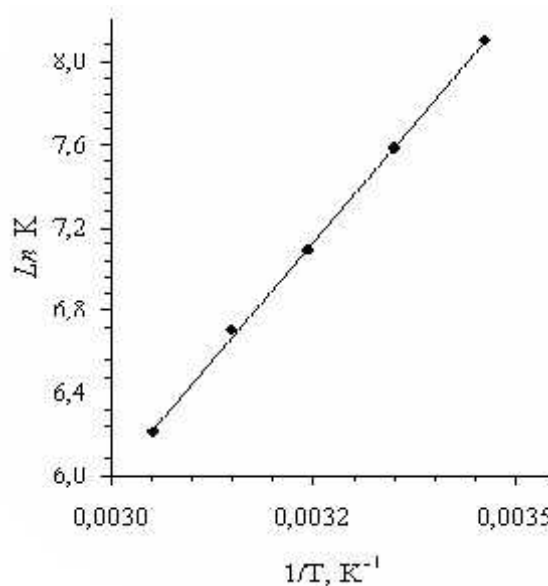


Рис. 2.12. Зависимость логарифма константы димеризации АО в растворе от температуры

2.3. Ассоциация разнородных гетероциклических молекул

Для изучения ассоциации разнородных молекул используются разнообразные методы. Такими методами являются измерения электропроводности (ассоциация при концентрациях 10^{-4} моль/л преимущественно в неводных средах), осмотического давления (ассоциация в основном нейтральных частиц при концентрациях более 10^{-5} моль/л), изучением седиментационного равновесия (при концентрациях порядка 10^{-5} - 10^{-3} моль/л), а также с использованием ^1H ЯМР-спектроскопии. Одним из наиболее “чувствительных” методов исследования ассоциации красителей является электронная спектроскопия (поглощательная и люминесцентная), позволяющая изучать их комплексообразование как в водных, так и в неводных средах в широком концентрационном диапазоне (10^{-7} - 10^{-3} моль/л) [8].

Гетероассоциация красителей проявляется в растворах уже при довольно низких концентрациях лигандов (10^{-7} - 10^{-5}) моль/л и способна вызывать резкие спектральные изменения.

Разнородная ассоциация происходит на фоне однородной, протекающей более эффективно, что создаёт сложности в изучении гетероассоциации. Можно считать, что общим признаком возникновения в растворе гетерокомплексов является отклонение светопоглощения от закона Бугера – Ламберта – Бера, выражающееся в нелинейности зависимости оптической плотности от концентрации красителя и наличии изобестических точек в спектральных (концентрационных) сериях при постоянном содержании

одного из красителей. Это нарушение закона Бугера – Ламберта – Бера установлено для разнородных ассоциатов разных классов красителей [8]. Например, в работах Л.В. Левшина [2] исследовалось образование гетероассоциатов молекул МГ и радомина 6Ж (Р6Ж) в водных растворах, а также Р6Ж с другими красителями. В ходе экспериментов концентрация одного красителя выбиралась такой, что при ней еще не наступает самоассоциация его молекул, а концентрация другого постепенно увеличивалась. На комплексообразование разнородных лигандов указывало падение поглощательной способности молекул Р6Ж с одновременным смещением максимума его полосы в длинноволновую область, а при нагревании растворов – рост полосы поглощения Р6Ж, сопровождающийся небольшим обратным смещением её максимума в коротковолновую область. Сделан вывод, что при относительно больших расстояниях между молекулами наблюдается гипохромный эффект, возникающий за счёт взаимодействий дисперсионного типа.

При увеличении концентрации второго красителя спектры поглощения Р6Ж смещаются под влиянием поля близкорасположенных молекул в длинноволновую область, а при самоассоциации Р6Ж – в коротковолновую область относительно его мономерной полосы. Различное направление этого сдвига объясняется тем, что при самоассоциации молекул переходы происходят на более высокие колебательные уровни возбуждённого состояния, чем в случае гетероассоциации. Частоты максимумов полос поглощения в первом случае больше, чем во втором.

В стабилизации гетерокомплексов в водных растворах, образованных с участием органических красителей, содержащих легко поляризуемые фрагменты, значительную роль играют π -электронные, ван-дер-ваальсовские (преимущественно дисперсионные) и гидрофобные взаимодействия [8].

Равновесный характер процесса образования разнородных ассоциатов, также как и однородных, подтверждается зависимостью спектров поглощения от температуры. Нагревание ведет к разрушению ассоциатов органических красителей и сопровождается восстановлением контуров полос индивидуальных форм красителей, при этом полное восстановление наблюдается не всегда, что объясняется наличием температурной зависимости поглощательной способности у некоторых красителей.

К основным характеристикам гетерокомплексов можно отнести константу их образования K , представленную в терминах закона действующих масс, и число частиц в комплексах.

Ассоциация разнородных лигандов гетероциклических молекул оказывает существенное влияние на их фотофизические и фотохимические свойства, определяющие применение гетероциклических молекул в технике, в биологии и медицине [8].

Рассмотрим связывание рибофлавина (РФН) с салицилатом натрия (НАС) и кофеином (КОФ) в отсутствии и в присутствии мочевины. В основе флавиновых молекул лежит изоаллоксазиновый цикл (рис. 2.13, а). Флавиновая структура имеет четыре гетероатома азота, метильные группы в положениях 7 и 8 бензольного кольца, а также заместитель, присоединенный к гетероциклическому атому азота в положении 10. У широко распространенного в природе флавина – рибофлавина или рибитилфлавина (7,8-диметил-10-N-(1'-D-рибитил) изоаллоксазин), – последний заместитель представляет собой сахароспирт рибит. Химическая структура рибофлавина высокоспецифична, так как даже незначительные модификации изоаллоксазинового цикла и остатка рибитила молекулы оказывают сильное влияние на его свойства.

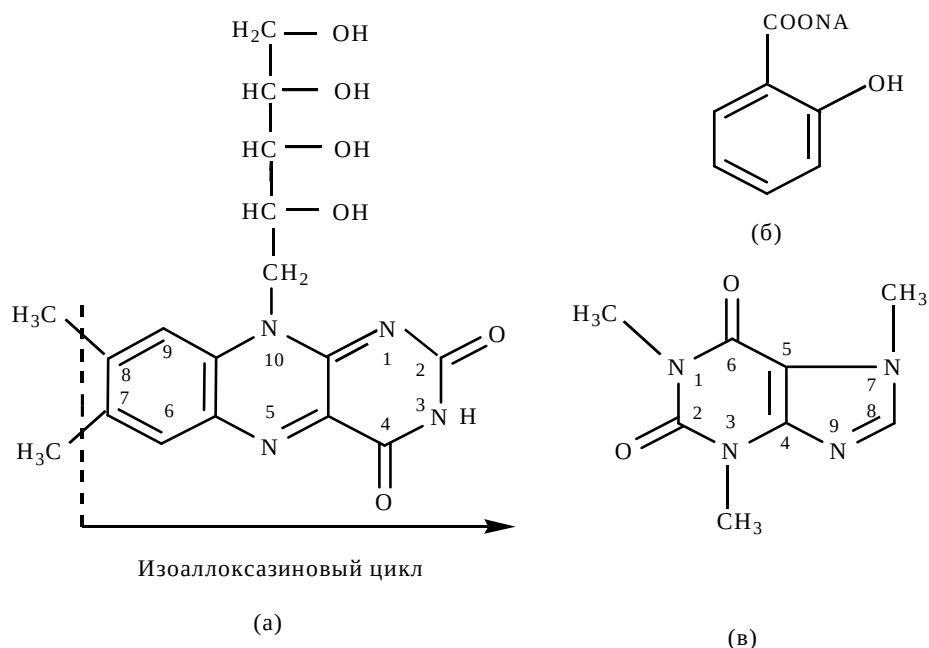


Рис. 2.13. Структурные формулы молекул:
а) рибофлавина; б) салицилата натрия; в) кофеина

Натрия салицилат (НАС) – натриевый эфир салициловой кислоты (рис. 2.13, б) – относится к группе нестероидных противовоспалительных средств, содержит в бензольном ядре карбоксиланион в положении 1 и гидроксильную группу в положении 2, что делает его хорошо растворимым в воде. НАС по фармакологическому действию близок к ацетилсалициловой кислоте (аспирин).

Кофеин (1,3,7-триметилксантин) по структуре (рис. 2.13, в) можно отнести к пуриновым основаниям. Молекулы КОФ (рис. 2.13, в) представляют собой плоские электронейтральные гетероциклические соединения, содержащие метильные группы в положениях 1, 3, 7; кислород в положениях 2, 6 и четыре гетероатома азота. КОФ – один из наиболее употребляемых психомоторных препаратов, преимущественно используется как стимуля-

тор центральной нервной системы. КОФ является гидротропным агентом, увеличивающим растворимость биологически активных веществ в водном растворе.

На рис. 2.14 приведены спектры поглощения водного раствора рибофлавина ($[L_0] = 5 \cdot 10^{-5} \text{ M} = \text{const}$) при добавлении к нему различных концентраций НАС ($2 \cdot 10^{-4} - 4 \cdot 10^{-1} \text{ M}$).

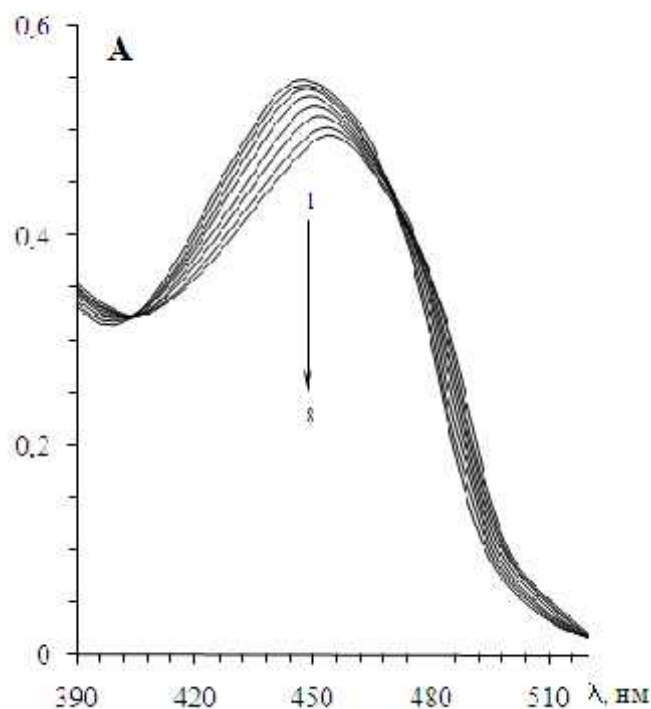


Рис. 2.14. Спектры поглощения водных растворов (0.1-М Na-фосфатный буфер, pH 6.86, $T = 298 \text{ K}$) системы рибофлавин – салицилат натрия ($[RFN] = 5 \cdot 10^{-5} \text{ M} = \text{const}$) при различных концентрациях салицилата натрия:

1 - 0; 2 - $2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$; 3 - $1.5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$; 4 - $1.25 \cdot 10^{-2} \text{ M}$; 5 - $3 \cdot 10^{-2} \text{ M}$; 6 - $5 \cdot 10^{-2} \text{ M}$; 7 - $1 \cdot 10^{-1} \text{ M}$; 8 - $2 \cdot 10^{-1} \text{ M}$

При титровании рибофлавина салицилатом натрия наблюдаются изменения в электронном спектре РФН, выражающиеся в гипохромном эффекте и батохромном сдвиге полос поглощения относительно максимума мономерной полосы флавина (446 нм), а также в появлении изобестических точек на длине волны 405 нм и 470 нм. Эти изменения в спектрах поглощения флавина, а также наличие изобестических точек свидетельствуют о присутствии специфических взаимодействий между молекулами РФН и НАС и формировании в водном растворе гетерокомплексов взаимодействующих молекул.

При условии, что $[D_0] \gg [L_0]$, где $[D_0]$ – исходная концентрация НАС

(КОФ), анализ равновесной гетероассоциации молекул НАС (КОФ) и РФН можно провести с использованием следующей схемы [9]:



где K – равновесная константа гетероассоциации молекул НАС (КОФ) и РФН; D_1 – мономеры молекул НАС (КОФ); $L_1 D_1$ – гетерокомплекс.

Положив, что $[D_1] \approx [D_0]$, константу гетероассоциации представим в виде

$$K = \frac{[L_1 D_1]}{D_0([L_0] - [L_1 D_1])}, \quad (2.15)$$

где $[L_1 D_1]$ – концентрация гетерокомплекса; $[D_1] \approx [D_0]$ – концентрация мономеров НАС (КОФ).

Исключив из формулы (2.15) концентрацию комплекса $[L_1 D_1]$, выраженную через его оптическую плотность с помощью закона Бугера – Ламберта – Бера, получим

$$A_k = \frac{\varepsilon_k \ell [L_0] K [D_0]}{K [D_0] + 1}, \quad (2.16)$$

где A_k и ε_k – оптическая плотность и молярный коэффициент поглощения молекул рибофлавина в составе гетерокомплекса; ℓ – длина оптического пути исследуемого раствора.

Преобразовав оптическую плотность раствора

$$A = \varepsilon_m \ell [L_1] + \varepsilon_k \ell [L_1 D_1] = \varepsilon_m \ell ([L_0] - [L_1 D_1]) + \varepsilon_k \ell [L_1 D_1]$$

для молекул РФН с учётом уравнения (2.15), получим концентрационную зависимость суммарного поглощения исследуемых молекул в виде

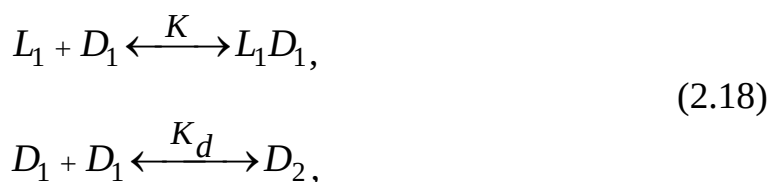
$$A = A_0 - \frac{\Delta \varepsilon \ell [L_0] K [D_0]}{K [D_0] + 1}, \quad (2.17)$$

где A_0 – оптическая плотность разбавленного раствора, содержащего только РФН; ($[L_0] = 5 \cdot 10^{-5}$ М); $\Delta \varepsilon = \varepsilon_m - \varepsilon_k$.

Выражение (2.17), описывающее оптическую плотность раствора (рис. 2.15), содержит два неизвестных параметра K и $\Delta \varepsilon$, определяемых по концентрационным зависимостям поглощения РФН на длине волны 446 нм [9].

Равновесные константа образования гетерокомплекса РФН – НАС составляет: $K = (23 \pm 4) \text{ М}^{-1}$, а для РФН с КОФ – $K = (72 \pm 11) \text{ М}^{-1}$ в отсутствии мочевины в растворах.

С учётом димеризации молекул НАС (КОФ), т. е. при более точном описании равновесия в растворе схема комплексообразования может быть представлена в виде



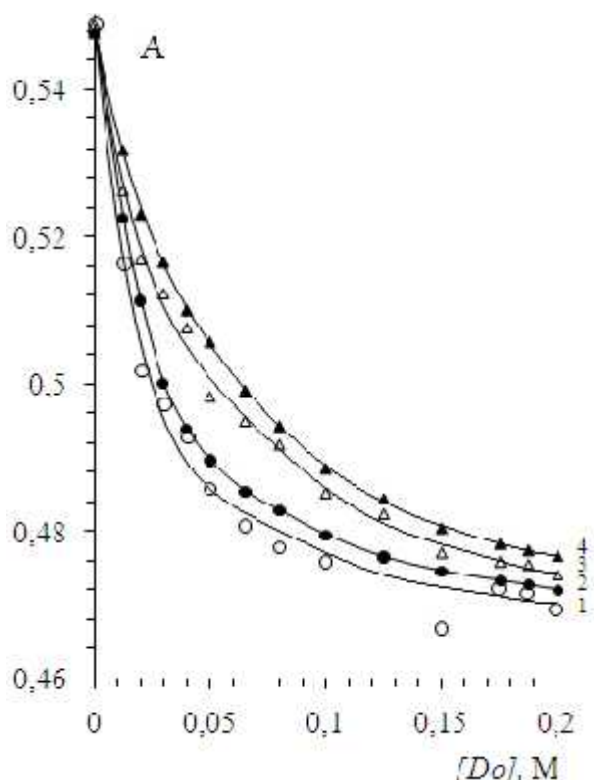


Рис. 2.15. Концентрационные зависимости оптической плотности водных растворов (0.1-М Na - фосфатный буфер, pH 6.86; $T = 298$ К) молекулярных комплексов: 1) РФН - кофеин; 2) РФН - кофеин - Urea; 3) РФН - НАС; 4) РФН - НАС - Urea ($[RФН] = 5 \cdot 10^{-5}$ М = const; $[Urea] = 1.0$ М = const) на длине волны 446 нм

где D_1 – мономеры молекул КОФ (НАС); K_d – равновесная константа димеризации молекул КОФ (НАС); D_d – димерный комплекс КОФ (НАС).

Константа гетероассоциации определяется уравнением

$$K = \frac{[L_1 D_1]}{D_1([L_0] - [L_1 D_1])}. \quad (2.19)$$

Согласно схеме (2.18) поглощение исследуемых молекул описывается выражением [9]:

$$A = A_0 - \frac{\Delta \epsilon_1 \ell [L_0] K [D_1]}{K [D_1] + 1}. \quad (2.20)$$

Концентрация мономеров КОФ (НАС) $[D_1]$ рассчитывается из уравнений материального баланса для РФН и КОФ (НАС):

$$[D_0] - K[L_1][D_1] - 2K_d[D_1]^2 - [D_1] = 0, \quad (2.21)$$

$$[L_0] - K[L_1][D_1] - [L_1] = 0.$$

Выражение (2.20), описывающее оптическую плотность раствора, содержит три неизвестных параметра K , K_d и $\Delta \epsilon_1$, определяемых по концентрационной зависимости оптической плотности РФН на длине волны (446 нм), соответствующей максимуму поглощения флавина в мономерной форме (рис. 2.15).

Вычисленные параметры (равновесные константы образования гетерокомплексов РФН – НАС (КОФ) и димерных комплексов НАС (КОФ)) имеют следующие значения для РФН и НАС: $K = (25 \pm 4) \text{ М}^{-1}$ и $K_d = (2,7 \pm 0,5) \text{ М}^{-1}$, а для РФН и КОФ, $K = (74 \pm 11) \text{ М}^{-1}$ и $K_d = (17 \pm 1,5) \text{ М}^{-1}$.

Как видим, величины констант гетероассоциации исследованных молекулярных систем принимают промежуточное значение между равновесными константами самоассоциации кофеина, салицилата натрия и рибофлавина, что наблюдалось и для других молекулярных систем [10]. Промежуточное значение константы гетероассоциации как в первом, так и во втором случаях обуславливается электронной конфигурацией образующихся комплексов.

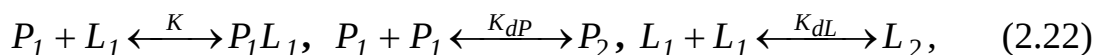
Наименьшее значение константы K_d получено для молекул НАС. Возможно, это связано со структурой салицилата натрия, содержащей одно ароматическое кольцо, и слабыми дисперсионными силами, стабилизирующими димерные π -комплексы. Величина константы K_d (РФН) в основном определяется наличием в молекуле РФН гидрофобной системы циклов с большим дипольным моментом, способствующей димеризации молекул и массивной рибитильной цепью, создающей стерические препятствия при формировании димеров.

Близость химических структур рибофлавина и флавиномононуклеотида позволяет сделать предположение, что характер их взаимодействия при самоассоциации и гетероассоциации будет похожим. Подобно многим ароматическим красителям и антибиотикам, молекулы флавиномононуклеотида образуют стопочные ассоциаты в результате вертикального взаимодействия хромофоров (стэкинг) [9]. На основе спектрофотометрических исследований и экситонной теории в работе [9] установлены структурные параметры димера флавиномононуклеотида в водном растворе и предложена сэндвичевая (плоскопараллельная) димерная модель.

Стабильность комплексов в присутствии мочевины в растворе уменьшается, что подтверждается равновесными константами образования гетерокомплексов РФН - НАС и РФН - КОФ, соответственно: $K = (17 \pm 3) \text{ M}^{-1}$ и $K = (53 \pm 7) \text{ M}^{-1}$.

Гетероассоциация молекул акридиновых красителей - профлавина (ПФ) и акридинового оранжевого. С целью определения структурных параметров гетерокомплексов изучена ассоциация молекул красителей ПФ и АО, отличающихся боковыми атомными группами в положениях 3, 6 (рис. 2.12, 2.16). Электронные спектры поглощения исследуемых растворов регистрировали на спектрофотометре UNICO UV - Vis 4802 в видимой области спектра. Содержание АО в растворе поддерживали постоянным ($2.01 \cdot 10^{-6}$ моль/л), концентрацию ПФ изменяли в интервале $10^{-6} \dots 4 \cdot 10^{-5}$ моль/л. Измерения проводились в одноразовых пластиковых кюветах с длиной оптического пути 1 см при комнатной температуре

Динамическое равновесие в растворе моделировали схемой [11,12]:



где K , K_{dP} и K_{dL} – равновесные константы гетероассоциации и димеризации молекул ПФ и АО; P_1 и P_2 – мономеры и димеры молекул ПФ; L_1 и L_2 – мономеры и димеры молекул АО; $P_1 L_1$ – гетерокомплекс.

Количественную информацию о структуре комплексов ПФ - АО можно получить, изучая их спектры поглощения, так как интенсивность и положение полос поглощения красителей очень чувствительны к гетероас-

социации молекул и существенно зависят от взаимного расположения мономеров в гетерокомплексах.

Экспериментально наблюдаемое поглощение исследуемых растворов описывали выражением:

$$A = A_1 + A_2. \quad (2.23)$$

Оптические плотности свободных и связанных молекул красителей – ПФ A_1 и акридинового оранжевого A_2 имеют вид [4]:

$$\begin{aligned} A_1 &= (\varepsilon_m^P [P_1] + 2\varepsilon_d^P K_{dP} [P_1]^2 + \varepsilon_k^P K [P_1] [L_1]) \ell, \\ A_2 &= (\varepsilon_m^A [L_1] + 2\varepsilon_d^A K_{dA} [L_1]^2 + \varepsilon_k^A K [P_1] [L_1]) \ell, \end{aligned} \quad (2.24)$$

где $\varepsilon_m^P, \varepsilon_d^P$ – коэффициенты молярного поглощения ПФ в свободном и димерном состояниях; $\varepsilon_m^A, \varepsilon_d^A$ – коэффициенты молярного поглощения АО в свободном и димерном состояниях; $\varepsilon_k^P, \varepsilon_k^A$ – коэффициенты молярного поглощения ПФ и АО в составе гетерокомплекса; $[P_1]$ и $[L_1]$ – равновесные молярные концентрации мономеров ПФ и АО.

Для оценки структурных параметров димеров разнородных молекул красителей их спектры в составе пяти компонентов (двух мономерных и трех димерных) выделяли из экспериментальных спектров (рис. 2.17). Индивидуальные составляющие ($\varepsilon_{mi}^P, \varepsilon_{mi}^E, \varepsilon_{di}^P, \varepsilon_{di}^E, \varepsilon_{ki}$) получали при совместной обработке экспериментальных спектров с использованием числовых значений равновесных констант K, K_{dP} и K_{dL} [11, 12]. Поиск спектральных составляющих, принадлежащий к классу обратных задач, осуществляли путем минимизации функционала:

$$S = \sum_j \sum_i (A_{ji}^e - A_{ji})^2, \quad (2.25)$$

где A_{ji}^e и A_{ji} – экспериментальные и расчетные оптические плотности растворов; j – номера спектров (концентраций); i – номера оптической плотности, соответствующие a_i .

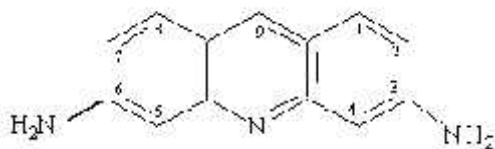


Рис. 2.16. Структурная формула ПФ

Дополнение 4

Молекулы ПФ состоят из трёх плоских ароматических колец. В положениях 3 и 6 хромофора находятся две концевые аминогруппы и гетероатом азота в пиридиновом кольце (рис. 2.16).

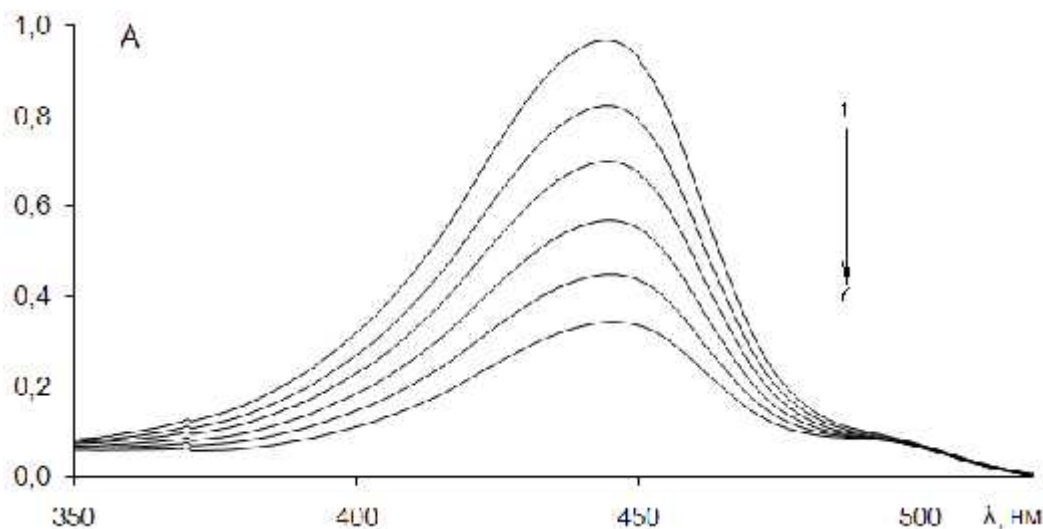


Рис. 2.17. Спектры поглощения водных растворов смесей красителей акридинового оранжевого ($[L_0] = 2,01 \cdot 10^{-6} \text{ M} = \text{const}$) и профлавина, при различных концентрациях ПФ: 1 - $9,19 \cdot 10^{-6}$, 2 - $1,22 \cdot 10^{-5}$, 3 - $1,53 \cdot 10^{-5}$, 4 - $1,91 \cdot 10^{-5}$, 5 - $2,25 \cdot 10^{-5}$, 6 - $2,65 \cdot 10^{-5} \text{ M}$

Концентрации $[P_1]$ и $[L_1]$ определяли из уравнений материального баланса [11]:

$$\begin{aligned} 2K_{dP}[P_1]^2 + K[P_1][L_1] + [P_1] - [P_0] &= 0, \\ 2K_{dL}[L_1]^2 + K[P_1][L_1] + [L_1] - [L_0] &= 0, \end{aligned} \quad (2.26)$$

где $[P_0]$, $[L_0]$ – исходные молярные концентрации ПФ и АО.

При выполнении вычислительной процедуры обработки экспериментальных спектров исходную многомерную задачу минимизации функционала (4) заменяли несколькими задачами меньшей размерности. Спектральные характеристики раствора, согласно их физическому смыслу, объединяли в три группы параметров. Одной группой параметров ε_{ai} описывали поглощение молекул в ассоциированной форме, а остальными (ε_{mi}^P и ε_{mi}^A) – поглощение молекул ПФ и ОА в свободной форме. Первой и второй группой описывали поглощение молекул в свободной форме ε_{mi}^P , ε_{mi}^A , третьей – в ассоциированной ε_{ai} . Минимизацию функционала выполняли варьированием спектральных параметров каждой группы в отдельности при фиксированных параметрах остальных групп.

Известно, что поиск минимума функционала начинают из состояния, соответствующего области "притяжения" глобального минимума. Поэтому на начальном этапе минимизации параметрам ε_{mi}^P и ε_{mi}^A присваивали чи-

словые значения, полученные ранее [7, 13] при изучении самоассоциации молекул АО и ПФ. Параметры ε_{ai} вычисляли итерационным методом, т.е. путем их варьирования до тех пор, пока числовые значения не стабилизировались при некотором минимальном значении суммы (3). На следующих этапах минимизации варьировали другие параметры, а две оставшиеся группы параметров фиксировали.

Затем, уточняя положение оптимума суммы (3) в многомерном пространстве, спектральные характеристики ε_{ai} , обобщенно отражающие ассоциацию молекул, представили тремя группами параметров: ε_{ki} , ε_{di}^P и ε_{di}^A , описывающими поглощение молекул в составе димеров: P_1L_1 , P_2 и L_2 . Исходную задачу заменили пятью подзадачами, для димерных составляющих ε_{di}^P и ε_{di}^A начальные значения определяли из специально поставленных экспериментов [7, 13]. Заданная точность решения задачи достигалась в ходе последовательного уточняющего поиска спектральных характеристик «крупным шагом, состоящим из решения пяти подзадач минимизации нелинейного функционала», при этом важным является выбор начальных значений параметров и ограничений, накладываемых на них.

Полученному значению минимума функционала соответствует набор спектральных (индивидуальных) составляющих экспериментального спектра (рис. 2. 18).

Из сопоставления экспериментальных и расчетных данных следует, что при разнородной ассоциации происходит сдвиг полос поглощения красителей, образующих гетерокомплекс. Максимум спектра поглощения ПФ, входящего в состав гетерокомплекса, смещен относительно полосы свободных молекул ПФ (445 нм) в коротковолновую сторону на 2,5 нм, а максимум поглощения АО - относительно полосы мономеров АО (490,5 нм) в длинноволновую сторону на 4,5 нм (рис. 2.18, 1б). Полосы поглощения ПФ и АО в составе гетерокомплекса более раздвинуты по сравнению с максимумами поглощения свободных молекул красителей. Поглощение однородных ассоциатов – димеров (ε_{di}^P , ε_{di}^A) – менее интенсивно по сравнению с мономерами красителей (ε_{mi}^P , ε_{mi}^A) (рис. 2.18), при этом спектр димеров, например, ПФ, имеет две полосы, как результат расщепления первого синглетного возбужденного уровня молекулы ПФ (рис. 2.18, 2б).

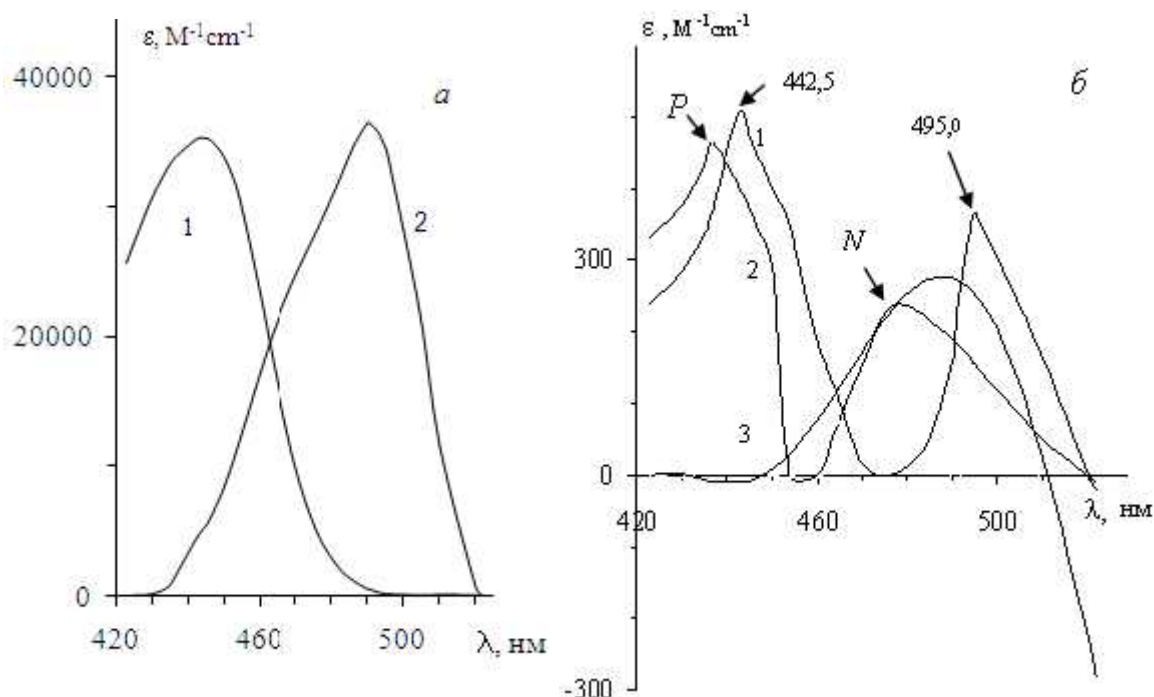


Рис. 2.18. Отдельные компоненты спектра поглощения смеси профлавина и акридинового оранжевого в водном растворе ($[L_0] = 2.01 \cdot 10^{-6}$ моль/л; $[P_0] = 1.53 \cdot 10^{-5}$ моль/л): 1а - спектр мономеров ПФ; 2а - спектр мономеров АО; 1б - спектр разнородных димеров АО + ПФ; 2б - спектр однородных димеров ПФ; 3а - спектр однородных димеров АО

Согласно квантово-механическому рассмотрению диполь-дипольного взаимодействия разнородных молекул (мономеры предполагаются нейтральными), длины волн полос поглощения ПФ ($\lambda_1 = 442,5\text{ нм}$) и АО ($\lambda_2 = 495,0\text{ нм}$) в составе гетерокомплекса можно представить в виде [14-16]:

$$\lambda_1 = \frac{hc}{\frac{hc}{\lambda_{\text{ПФ}}} + \frac{2\lambda_{\text{ПФ}}^2 \lambda_{\text{АО}} \mu_{\text{ПФ}}^2 \mu_{\text{АО}}^2 G^2}{hc(\lambda_{\text{АО}}^2 - \lambda_{\text{ПФ}}^2)}}, \quad \lambda_2 = \frac{hc}{\frac{hc}{\lambda_{\text{АО}}} + \frac{2\lambda_{\text{АО}}^2 \lambda_{\text{ПФ}} \mu_{\text{АО}}^2 \mu_{\text{ПФ}}^2 G^2}{hc(\lambda_{\text{ПФ}}^2 - \lambda_{\text{АО}}^2)}}, \quad (2.27)$$

где « $\mu_{\text{ПФ}}$ » и « $\mu_{\text{АО}}$ » дипольные моменты переходов мономеров красителей на длинах волн $\lambda_{\text{ПФ}}$ и $\lambda_{\text{АО}}$, соответствующих максимумам поглощения молекул ПФ и АО в свободном состоянии. Величина G выражает взаимодействие молекул в диполь-дипольном приближении:

$$G = \frac{1}{4\pi\epsilon_0 R^3} (\cos\varphi - 3\cos\theta_{\text{АО}} \cos\theta_{\text{ПФ}}), \quad (2.28)$$

где φ – угол между дипольными моментами переходов молекул ПФ и АО в составе гетерокомплекса, R – расстояние между точечными дипольными моментами переходов молекул ПФ и АО, $\theta_{\text{ПФ}}$, $\theta_{\text{АО}}$ – углы между вектором

$\vec{R}$, соединяющим $\vec{\kappa}_{ПФ}$ и $\vec{\kappa}_{АО}$, и векторами этих дипольных моментов, ϵ_0 , ϵ – электрическая постоянная и диэлектрическая проницаемость среды.

При разнородной ассоциации коротковолновая полоса (a_1) испытывает гиперхромный эффект, а длинноволновая (a_2) – гипохромный (рис. 2.18, 1б). Интенсивности полос у ПФ - f_1 и АО - f_2 в составе гетерокомплекса могут быть получены из выражений [14-16]:

$$\frac{f_1}{f_{ПФ}} = 1 + \frac{4}{hc} \cdot \frac{\lambda_{ПФ}^2 \lambda_{АО} \kappa_{АО}^2 G}{\lambda_{АО}^2 - \lambda_{ПФ}^2} \cdot \cos \alpha, \quad \frac{f_2}{f_{АО}} = 1 + \frac{4}{hc} \cdot \frac{\lambda_{АО}^2 \lambda_{ПФ} \kappa_{ПФ}^2 G}{\lambda_{ПФ}^2 - \lambda_{АО}^2} \cdot \cos \alpha, \quad (2.29)$$

где f_1 , f_2 – силы осцилляторов электронного перехода молекул ПФ и АО на длинах волн максимумов поглощения ПФ и АО в составе гетерокомплекса; $f_{ПФ}$, $f_{АО}$ – силы осцилляторов электронного перехода молекул ПФ и АО на длинах волны $a_{ПФ}$ и $a_{АО}$.

Квантово-механическое рассмотрение положения и интенсивности полос поглощения гетерокомплекса позволяет определить угол между моментами электронных переходов ПФ и АО:

$$\alpha = \arccos \left[\left(\frac{f_1}{f_{ПФ}} - 1 \right) \cdot \frac{\kappa_{ПФ}}{\kappa_{АО}} \sqrt{\frac{1}{8} \left(\frac{\lambda_{АО}}{\lambda_{ПФ}} - \frac{\lambda_{ПФ}}{\lambda_{АО}} \right) \frac{\lambda_1}{\lambda_{ПФ} - \lambda_1}} \right]. \quad (2.30)$$

Молекулы в димерах стремятся занять положения, соответствующие минимуму их потенциальной энергии, определяемому дипольными моментами $\vec{\kappa}_{ПФ}$ и $\vec{\kappa}_{АО}$, расстоянием R между ними, ориентацией $\vec{\kappa}_{ПФ}$ и $\vec{\kappa}_{АО}$ по отношению к вектору $\vec{R}$ (углы $\bar{\kappa}_{ПФ}$ и $\bar{\kappa}_{АО}$) и взаимной ориентацией диполей (угол φ). Выражение (2.28) при фиксированном расстоянии между диполями является функцией угловых переменных $G(\bar{\kappa}_{ПФ}, \bar{\kappa}_{АО}, \varphi)$. Зная угол между дипольными моментами переходов $\vec{\kappa}_{ПФ}$ и $\vec{\kappa}_{АО}$ и приравняв нулю частные производные по переменным $\bar{\kappa}_{ПФ}$ и $\bar{\kappa}_{АО}$: $\frac{\partial G}{\partial \bar{\kappa}_{ПФ}} = 0$,

$\frac{\partial G}{\partial \bar{\kappa}_{АО}} = 0$, можно найти числовые значения $\bar{\kappa}_{ПФ}$ и $\bar{\kappa}_{АО}$.

Соотношение интенсивностей длинноволновой (f_2) и коротковолновой (f_1) полос поглощения (рис. 2.18, 1б), определяющееся структурой димера, позволяет предположить, что молекулы красителей образуют, в основном, стопочные ассоциаты [12] и оценить, используя формулы (2.27 – 2.29), расстояние между взаимодействующими дипольными моментами переходов мономеров в гетерокомплексе:

$$R = \sqrt[3]{\frac{\langle \mu_{\text{ПФ}}^2 \rangle a_1 a_{\text{ПФ}} (f_1 - f_{\text{ПФ}})}{8\pi \epsilon_0 \epsilon h c (a_{\text{ПФ}} - a_1) f_{\text{ПФ}}}}. \quad (2.31)$$

Оценочные значения параметров гетерокомплекса, полученные с использованием составляющих экспериментального спектра и формул (2.27 – 2.31), соответственно равны: $\mu_{\text{ПФ}} = \mu_{\text{АО}} = \pi/2$, $\varphi = 31^\circ$, $R = 5.01 \text{ \AA}$.

На рис. 2.18, б представлены индивидуальные составляющие экспериментального спектра, откуда видно, что спектр димеров ПФ содержит две полосы поглощения разной интенсивности на длинах волн $\lambda_N = 476$ и $\lambda_P = 437$ нм, смещенные bathochromно и гипсохромно относительно максимума поглощения мономеров ПФ.

В точечно-дипольном приближении положение полос зависит от расстояния между мономерами и ориентации их дипольных моментов переходов [17]:

$$\lambda_{PN} = \frac{hc}{\frac{hc}{\lambda_{\text{ПФ}}} \pm \frac{(\vec{\mu}_{\text{ПФ}_1} \vec{\mu}_{\text{ПФ}_2}) R_{12}^{-3} - 3(\vec{\mu}_{\text{ПФ}_1} \vec{R}_{12})(\vec{\mu}_{\text{ПФ}_2} \vec{R}_{12}) R_{12}^{-5}}{4\pi \epsilon_0 \epsilon}}}. \quad (2.32)$$

Первым членом в знаменателе является энергия возбужденного состояния свободного мономера ПФ, вторым – энергия взаимодействия между молекулами димера, расположенными на расстоянии R_{12} и имеющими дипольные моменты переходов $\vec{\mu}_{\text{ПФ}_1}$ и $\vec{\mu}_{\text{ПФ}_2}$; $\vec{R}_{12}$ – вектор, направленный от диполя мономера ПФ₁ к диполю мономера ПФ₂.

Используя результаты разложения экспериментального спектра на составляющие (положение и интенсивность полос Р и N в димерном спектре ПФ), можно оценить значение угла между векторами $\vec{\mu}_{\text{ПФ}_1}$ и $\vec{\mu}_{\text{ПФ}_2}$. Слабая интенсивность длинноволновой полосы N (рис. 2.18, б), определяемая переходом димера на низший энергетический подуровень, возникающий при расщеплении синглетно-возбужденного уровня молекул ПФ в составе димера, позволяет предположить, что ПФ образует, в основном, стопочные ассоциаты [5, 18, 19] и оценить расстояние между однородными мономерами в димерных комплексах.

Расчетные значения параметров μ и R_{12} , определяемые структурой молекул профлавина и условиями эксперимента, для димеров ПФ составляют соответственно $\mu = 59^\circ$, $R = 3.6 \text{ \AA}$.

Предложенная методика изучения динамического равновесия однородных и разнородных молекул в растворе позволяет при совместной обработке экспериментальных спектров с использованием равновесных

констант ассоциации молекул получить количественную информацию о структуре молекулярных комплексов.

2.4. Комплексообразование гетероциклических лигандов с ДНК

Гетероциклические соединения в настоящее время находят широкое применение в различных медицинских приложениях в качестве препаратов, обладающих положительными терапевтическими свойствами. Принято считать, что соединения этого класса проявляют медико-биологическое действие путем непосредственного связывания с клеточной ДНК. В связи с этим детальная информация о характере связывания гетероциклических соединений с нуклеиновыми кислотами играет большую роль при интерпретации механизма биологического действия гетероциклических лекарственных препаратов, а также в реализации стратегии направленного синтеза более эффективных по своим терапевтическим свойствам соединений.

Исследования показали, что большинство лигандов, содержащих в своей основе гетероциклический хромофор, связываются с ДНК посредством интеркаляции, т.е. путем встраивания между парами азотистых оснований макромолекулы [20-22 и ссылки там]. При этом происходит изменение геометрии сахарофосфатного остова и нарушение регулярности спиральной структуры ДНК (рис. 2.19).

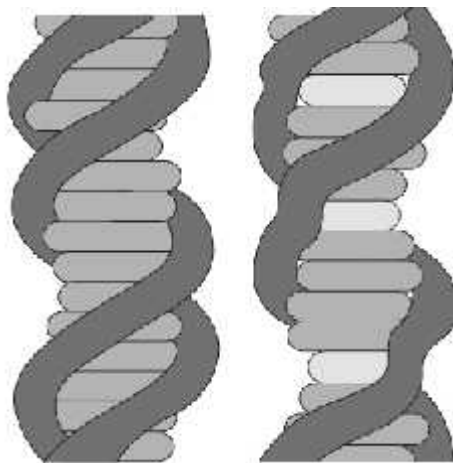


Рис. 2.19. Интеркаляция этидия в двойную спираль ДНК.

Регулярный ход двойной спирали (слева)
в результате интеркаляции нарушается (справа) [20,21]

Интеркалирующие соединения, как правило, имеют плоский гетероциклический хромофор, состоящий из трех сопряженных шестичленных колец. К этим соединениям относятся молекулы акридиновых, фенантридиновых красителей и др.

При интеркаляционном комплексообразовании, помимо изменений в структуре макромолекулы, возникают изменения спектральных свойств интеркалирующих соединений. Наличие гетероциклического хромофора определяет существование у этих соединений длинноволновой полосы поглощения в видимой области спектра, соответствующей π - π -электронным переходам. При интеркаляции наблюдаются гипохромный эффект и батохромный сдвиг этой полосы [21, 22].

Помимо интеркаляции, некоторые гетероциклические лиганды при специально подобранных условиях эксперимента (растворителя) демонстрируют неинтеркаляционный тип комплексообразования, чаще всего интерпретируемый как результат связывания лиганда с малой или большой бороздками полимерной цепи. Несмотря на то, что большая бороздка содержит больше возможностей для таких взаимодействий, почти все низкомолекулярные соединения, образующие с ДНК комплексы неинтеркаляционного типа, размещаются в малой бороздке. Это в большой степени связано с соответствием ширины малой бороздки и размеров этих лигандов, и, тем самым, со стабилизацией этих комплексов нековалентными связями. Лиганды, связывающиеся в малой бороздке, не вызывают существенных структурных изменений в молекуле ДНК [21]. Классическими представителями такого типа связывания являются нетропсин и дистамицин (рис. 2.20).



Рис. 2.20. Размещение в малой бороздке ДНК молекулы дистамицина

Экспериментальное разделение рассмотренных двух типов связывания, как правило, затруднительно, поскольку спектроскопические данные интеркаляционного и неинтеркаляционного связывания не всегда могут быть однозначно идентифицированы, так как приводят к одинаковым изменениям спектра: длинноволновому смещению и падению интенсивности полос поглощения. Величина смещения зависит от типа лиганда, вида полимера и условий эксперимента.

Третьим возможным способом связывания молекул с ДНК является образование внешнего комплекса, при котором с фосфатными группами ДНК способны связываться некоторые лиганды. Такое связывание имеет электростатическую природу, и константы связывания принимают более низкие значения по сравнению с интеркаляционным и бороздочным связыванием. Такой тип взаимодействия обычно возникает у положительно заряженных лигандов. В отличие от первых двух типов связывания, внешнее связывание носит преимущественно энтропийный характер. Это объясняется тем, что при образовании комплекса с положительно заряженным лигандом происходит высвобождение с поверхности ДНК ранее связанных с ней молекул противоионов. В спектрах поглощения лигандов, связывающихся с поверхностью ДНК, наблюдается гипохромный эффект.

Результаты исследований взаимодействия ДНК с большим количеством соединений, обладающих разнообразной структурой, привели к появлению различных модификаций используемых моделей связывания [20 – 22, ссылки там же].

Например, некоторые антрациклиновые антибиотики связываются с ДНК таким образом, что аминосахарный заместитель агликона оказывается в малой бороздке, а кольцо с метоксигруппой – в большой (рис. 2.21).

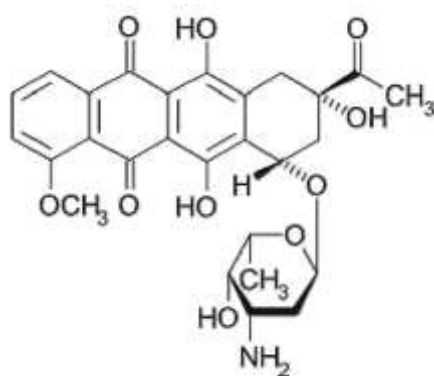


Рис. 2.21. Структура дауномицина

В некоторых случаях наличие у соединения громоздкого заместителя, препятствующего встраиванию между парами оснований ДНК, может приводить к возникновению частичной интеркаляции. Такое связывание наблюдается при взаимодействии ДНК с антибиотиком актиномицином D. Из сказанного следует, что соединения, имеющие плоский гетероциклический хромофор, могут взаимодействовать с ДНК, образуя комплексы различной структуры, которые можно исследовать методом спектрофотометрии [20 - 22].

2.5. Спектрофотометрический анализ связывания гетероциклических биологически активных соединений с ДНК

В работе метод спектрофотометрии используется для получения равновесных параметров связывания различных гетероциклических соединений с ДНК. Рассматриваются красители фенотиазинового ряда – МГ и тионин (ТИ) – фотосенсибилизаторы.

Выбор указанных соединений обусловлен тем, что не существует единого мнения по поводу доминирующего типа их связывания с ДНК, однако все авторы сходятся во мнении, что и интеркаляция, и внешнее связывание могут иметь место одновременно ([22], ссылки там же).

В качестве эталонного лиганда был выбран акридиновый краситель ПФ (рис. 2.16), характеризующийся доминирующим интеркаляционным типом связывания с ДНК, однако способный также образовывать комплексы с внешней поверхностью биополимера. Все три красителя являются заряженными молекулами при физиологических условиях.

Методика эксперимента. Электронные спектры поглощения красителей регистрировались на спектрофотометре СФ-46 в диапазоне длин волн 360...750 нм. Красители фирмы Sigma (USA) исследовались в водном буферном растворе следующего состава: 0.01-М NaCl; 0.01-М Na₂EDTA; 0.01-М Tris (pH 7.4). Этилендиаминотетраацетат натрия (Na₂EDTA) и 2-амино-2-(гидроксиметил)-1,3-пропандиол (Tris) фирмы Sigma (USA); NaCl соответствовали квалификации “о.ч.”. Используемые препараты и красители исследовались без дополнительной очистки. Для предотвращения фотоокисления взвешивание препаратов и приготовление их растворов проводились в затемненном помещении. Исходные растворы красителей готовили растворением точных навесок в буферном растворе на основе бидистиллированной воды, непосредственно перед измерениями.

При исследовании комплексообразования красителей с биополимером использовалась натриевая соль ДНК молок лосося (Sigma, D-1626, USA), содержащая 41,2 % G-C пар оснований с молекулярным весом $\sim 1.3 \cdot 10^6$ Da (приблизительно 2000 пар оснований). Исходный раствор ДНК готовили путем растворения точной навески препарата в течение 24 часов в водном буферном растворе. Концентрацию ДНК (в моль пар оснований на литр) определяли спектрофотометрически по интенсивности поглощения на длине волны 260 нм с использованием молярного коэффициента поглощения $\epsilon_{260} = 6600 \text{ М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$.

Спектрофотометрическое титрование проводилось при постоянных концентрациях красителей ($[\text{ПФ}] = 5 \cdot 10^{-5} \text{ М}$, $[\text{МГ}] = 5 \cdot 10^{-6} \text{ М}$, $[\text{ТИ}] = 6,3 \cdot 10^{-6} \text{ М}$) и различных концентрациях ДНК ($3 \cdot 10^{-3}$ - $4.6 \cdot 10^{-6} \text{ М}$) в водном буферном растворе того же состава, который использовался при изучении самоассоциации красителей. Перед проведением измерений смешанные

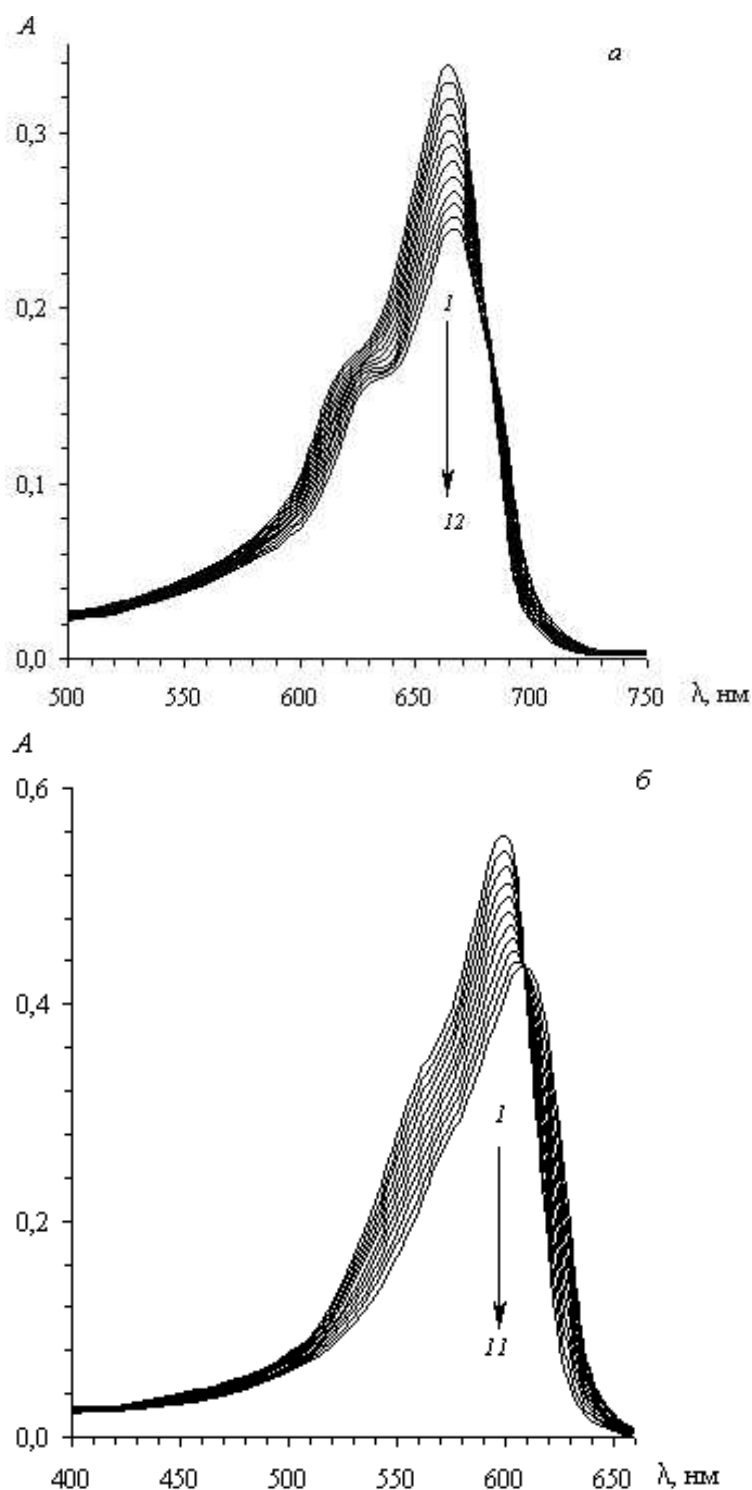


Рис. 2.22. Спектры поглощения водных растворов (0.01M NaCl, 0.01M Na₂EDTA, 0.01- M Tris, pH 7.4, $T = 298$ K) лигандов [МГ] = $5 \cdot 10^{-6}$ M = const (а) и [ТИ] = $6.3 \cdot 10^{-6}$ M = const (б) при различных концентрациях ДНК: 0 (1), $4.6 \cdot 10^{-6}$ (2), $6 \cdot 10^{-6}$ (3), $8 \cdot 10^{-6}$ (4), $2.3 \cdot 10^{-5}$ (5), $4 \cdot 10^{-5}$ (6), $6 \cdot 10^{-5}$ (7), $7.7 \cdot 10^{-5}$ (8), $2.3 \cdot 10^{-4}$ (9), $5 \cdot 10^{-4}$ (10), $8 \cdot 10^{-4}$ (11), $2 \cdot 10^{-3}$ (12)

растворы системы лиганд – ДНК выдерживались в течение 5 минут для установления равновесия.

В качестве предварительного этапа анализа взаимодействия лиганд – ДНК проводилось исследование самоассоциации красителей (п. 2.1), так как при выбранных концентрациях красителей проявляются эффекты агрегации молекул. Полученные оценки параметров самоассоциации использовались в экспериментах по комплексообразованию лигандов с полимером для перерасчета оптических плотностей A_0 .

Комплексообразование лигандов с ДНК. Факт образования комплексов лиганд – ДНК регистрируется по изменениям спектров поглощения лиганда, вызванными добавлением к раствору лиганда биополимера [22]. Характер происходящих при этом изменений виден на рис. 2.22: увеличение концентрации биополимера приводит к смещению максимумов полосы поглощения красителей относительно полосы поглощения мономерных молекул в длинноволновую область спектра (с одно-

временным изменением интенсивности поглощения) и появлению изобеситических точек. Такие изменения спектров поглощения лигандов свидетельствуют об образовании ими комплексов с ДНК.

Количественный анализ комплексообразования проведён по экспериментальным концентрационным зависимостям оптической плотности красителей на длинах волн, соответствующих их максимумам поглощения в мономерной форме (рис. 2.23). В схеме комплексообразования предполагается, что молекулы красителя, связанные с ДНК, находятся в равновесии со свободными лигандами и свободными участками (местами связывания) биополимера. Предполагается также, что все места связывания на полимере идентичны и независимы. При связывании лиганд занимает n пар оснований, которые становятся недоступными для связывания с другими молекулами красителя. Равновесие в растворе моделировалось схемой:



где K – равновесная константа связывания лиганда с парами оснований; P – свободные участки биополимера, содержащие n пар оснований, PL_1 – комплекс лиганда с участком биополимера.

Выражение равновесной константы комплексообразования

$$K = \frac{[PL_1]}{[P] \cdot [L_1]} \quad (2.34)$$

представим в виде

$$K = \frac{[L_2]}{\left(\frac{[P_0]}{n} - [L_2]\right) \cdot [L_1]}. \quad (2.35)$$

Здесь $[L_2]$ – концентрация участков полимера, занятых лигандами ($[L_2] = [PL_1]$), $[P_0]$ – исходная концентрация пар оснований ДНК, $[P_0]/n - [L_2]$ – концентрация свободных участков ($[P_0]/n - [L_2] = [P]$).

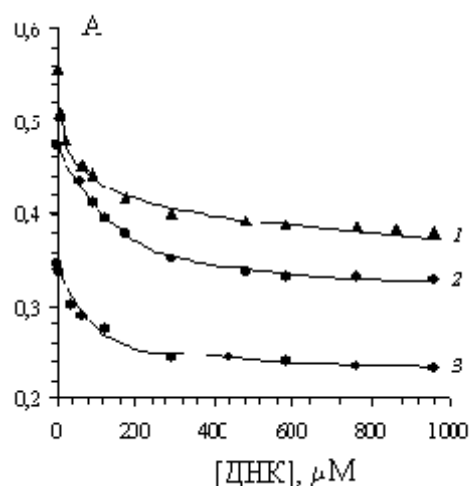


Рис. 2.23. Зависимость оптической плотности растворов (0.01 М NaCl, pH 7.4, $T = 298$ К) красителей на длине волны максимального поглощения: [ТИ] = $6.3 \cdot 10^{-6}$ М, $\lambda = 598$ нм (1); [ПФ] = $5 \cdot 10^{-5}$ М, $\lambda = 444$ нм (2); [МГ] = $5 \cdot 10^{-6}$ М, $\lambda = 664$ нм (3) от концентрации ДНК

Согласно схеме (2.33), наблюдаемую оптическую плотность лиганда в растворе можно описать выражением:

$$A = \varepsilon_1 l [L_1] + \varepsilon_2 l [L_2], \quad (2.36)$$

где l – длина оптического пути; $\varepsilon_1, \varepsilon_2$ – коэффициенты молярного поглощения лиганда в свободном и связанном состояниях соответственно.

Исключив из формулы (2.36) концентрацию $[L_1]$ с помощью закона сохранения массы

$$[L_0] = [L_1] + [L_2], \quad (2.37)$$

получим

$$A = A_0 - \Delta\varepsilon l [L_2], \quad (2.38)$$

где $\Delta\varepsilon = \varepsilon_1 - \varepsilon_2$; $A_0 = \varepsilon_1 l [L_0]$ – оптическая плотность разбавленного раствора красителя в мономерной форме.

Концентрацию $[L_2]$ рассчитывали по формуле

$$[L_2] = \frac{1}{2} \left(\frac{1}{K} + [L_0] + \frac{[P_0]}{n} \right) - \sqrt{\frac{1}{4} \left(\frac{1}{K} + [L_0] + \frac{[P_0]}{n} \right)^2 - \frac{[P_0] \cdot [L_0]}{n}}, \quad (2.39)$$

полученной из законов сохранения массы (2.37) и действующих масс (2.35).

Выражение (2.38), описывающее наблюдаемую оптическую плотность раствора, содержит три неизвестных параметра K , n и $\Delta\varepsilon$, для расчета которых использовались экспериментальные зависимости поглощения красителей в системах лиганд – ДНК (рис. 2. 23).

Параметры модели определялись путем минимизации функционала:

$$S = \sum_{i=1}^n (A_i^e - A_i)^2, \quad (2.40)$$

где A_i^e – экспериментальные значения оптической плотности; A_i – значения оптической плотности, рассчитанные с помощью выражения (2.38).

Результаты расчетов по данной методике (модель Скэтчарда) приведены в табл. 1.

Модель Скэтчарда широко применима, но при обработке экспериментальных данных могут быть значительные неточности, т.к. влияют статистические эффекты, возникающие в том случае, когда лиганд занимает несколько мест связывания («исключение соседних мест связывания»), или когда связанные лиганды взаимодействуют (антикооперативное и кооперативное взаимодействие). В этом случае более объективный анализ экс-

периментальных данных можно провести с использованием модели МакГи и фон Хиппеля [23].

Т а б л и ц а 1

Параметры комплексообразования в системах лиганд – ДНК, рассчитанные с использованием модели Скэтчарда (I) и кооперативной модели МакГи – фон Хиппеля (II)

Модель	Ком- плекс	K, M^{-1}	N	W	$\Delta\epsilon, M^{-1}\cdot cm^{-1}$
I	ПФ – ДНК	41000 ± 3000	2.4 ± 0.2	-	10400 ± 3700
II		20900 ± 2700	2.1 ± 0.1	2.6 ± 0.4	10400 ± 2500
I	ТИ – ДНК	80400 ± 19000	1.9 ± 0.2	-	25000 ± 700
II		33800 ± 4100	2.7 ± 0.2	4.7 ± 0.5	24800 ± 800
I	МГ – ДНК	194800 ± 21000	5.0 ± 0.9	-	17400 ± 1600
II		53400 ± 11000	5.9 ± 1.1	6.5 ± 1.2	17500 ± 900

Согласно модели МакГи и фон Хиппеля, молекула ДНК представляет собой жесткий полимер (решетку), состоящий из N повторяющихся звеньев (пар оснований). Лиганд может занять любые n последовательных звеньев решетки, поэтому у первого связывающегося лиганда на полностью свободной решетке имеется $N - n + 1$ потенциальных мест посадки. Число потенциальных мест связывания много больше, чем число участков N/n , которые могут быть заняты при насыщении полимера.

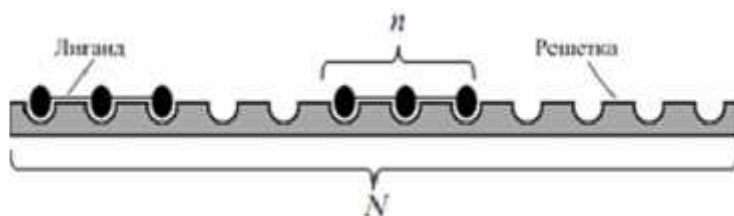


Рис. 2.24. Схематическое изображение связывания лиганда с ДНК

В одних случаях лиганды располагаются таким образом, что решетка не может связать ни одного дополнительного лиганда при наличии свободных центров, а в других – остаются места для присоединения лигандов. Все эти формы находятся в равновесии со свободными лигандами.

Обозначив среднее число свободных участков связывания, расположенных на одной линейной макромолекуле, символом N_f , равновесную константу комплексообразования запишем в виде

$$K = \frac{[PL_1]}{N_f [P_{mm}] [L_1]}, \quad (2.41)$$

где $[P_{MM}]$ – концентрация макромолекул.

При описании адсорбции лигандов на решетке главная задача состоит в определении величины $N_f = (N - n + 1)P_n$, где P_n – вероятность того, что n последовательно расположенных элементов (пар оснований) решетки, начиная с любого положения на ней, не заняты лигандом (вероятность обнаружения на решетке незанятого участка), $(N - n + 1)$ – максимальное количество потенциальных участков связывания на свободном полимере.

При $N \gg n$, выражение для N_f можно записать в виде

$$N_f = NP_n. \quad (2.42)$$

Вероятность P_n , умноженная на общее число пар оснований полимера N , дает среднее число свободных лиганд – связывающих участков N_f длиной n на одной решетке. В терминах условных вероятностей P_n можно представить в виде [17]:

$$P_n = P_f P_{ff}^{n-1}, \quad (2.43)$$

где P_f – вероятность того, что произвольно выбранный элемент (пара оснований) решетки не занят лигандом, P_{ff} – условная вероятность того, что за данным свободным элементом решетки следует другой незанятый элемент (P_{ff}^{n-1} – условная вероятность события наступающего или повторяющегося $n - 1$ раз).

Используя долю занятых элементов решетки P_b , или вероятность того, что данный центр решетки занят, выразим P_f :

$$P_f = 1 - P_b = 1 - \frac{n[L_2]}{N[P_{MM}]} = 1 - \frac{n}{N} \frac{[L_2]}{[P_{MM}]} = 1 - \frac{nv}{N}. \quad (2.44)$$

Условная вероятность P_{ff} представляет собой также долю свободных элементов решетки, находящихся перед незанятыми элементами. Эта величина равна разности между общим числом свободных элементов решетки и числом свободных элементов, стоящих перед занятым, деленной на общее число свободных элементов решетки [17]:

$$P_n = (P_f - P_{bn}P_{bf}) / P_f, \quad (2.45)$$

где P_{bf} – условная вероятность того, что перед крайней (n -й) частью связанного лиганда расположен свободный элемент решетки;

$P_{bn} = \frac{[L_2]}{[P_{mm}]N} = \frac{P_b}{n}$ – условная вероятность того, что элемент за свободной парой оснований полимера занят крайней (n-й) частью связанного лиганда.

Если предположить, что адсорбция лигандов не деформирует структуру полимера, а связанные лиганды не взаимодействуют между собой, то $P_{ff} = P_{bf}$. Используя это соотношение, уравнение (2.45) можно преобразовать к следующему виду:

$$P_{ff} = \frac{P_f}{P_f - P_{bn}} = \frac{N - n\tau}{N - (n-1)\tau} = \frac{N - n\tau}{N - (n-1)\tau}. \quad (2.46)$$

С учетом уравнений (2.43) и (2.46), среднее число свободных участков, содержащих n пар оснований, представим следующим образом:

$$N_f = NP_n = N(1 - n\tau / N) \left(\frac{1 - n\tau / N}{1 - (n-1)\tau / N} \right)^{n-1}. \quad (2.47)$$

Используя ранее введенные обозначения, получим

$$N_f = N(1 - n[L_2]/[P_{mm}]N) \left(\frac{1 - n[L_2]/[P_{mm}]N}{1 - (n-1)[L_2]/[P_{mm}]N} \right)^{n-1}. \quad (2.48)$$

Подставляя (2.48) в уравнение (2.41), положив $[P_{mm}]N = [P_0]$, получим

$$\frac{[L_2]}{[P_0]([L_0] - [L_2])} = K \left(1 - \frac{n \cdot [L_2]}{[P_0]} \right) \left[\frac{[P_0] - n \cdot [L_2]}{[P_0] - (n-1) \cdot [L_2]} \right]^{n-1}. \quad (2.49)$$

При выводе этого уравнения (МакГи – фон Хиппеля) не учитывались концевые эффекты, поэтому, строго говоря, оно справедливо только для решетки (полимера), состоящей из бесконечно большого числа элементов. Несмотря на это, уравнение (2.49) позволяет достаточно точно описать многие экспериментальные системы, включая решетки, состоящие из ограниченного числа элементов.

Выражение (2.49) можно сравнить с уравнением (2.39, модель Скетчарда), полученным для систем, в которых отсутствует эффект “перекрывания” участков связывания. Эффект “перекрывания” обусловлен тем, что при насыщении решетки лигандами их распределение по решетке делает часть центров недоступными для связывания каждой следующей молекулы красителя. Вследствие этого полное насыщение решетки большими лигандами ($n > 1$) практически недостижимо. Модель Скетчарда этот эффект не учитывает.

Выражение, описывающее оптическую плотность раствора с использованием модели МакГи – фон Хиппеля, содержит три неизвестных параметра, определяемых по экспериментальным концентрационным зависимостям. Оценку параметров (K , n , $\Delta\epsilon$) выполняют путем минимизации суммы квадратов отклонений экспериментальных значений A от значений поглощения, рассчитываемых по модели. При этом на каждом цикле минимизации функционала (при вариации каждого из искомым параметров) определяют концентрацию $[L_2]$ из решения уравнения (2.49).

Между ближайшими (соседними) лигандами, связанными с биополимером, возможны кооперативные взаимодействия. Они могут быть вызваны как различными нековалентными взаимодействиями между адсорбированными молекулами, так и за счет опосредованного взаимодействия, т.е. деформации структуры полимера в месте присоединения адсорбированного лиганда [22].

В случае кооперативной модели, примененной для анализа экспериментальных концентрационных зависимостей оптической плотности исследуемых растворов, предполагается, что адсорбция лигандов не искажает структуру полимера. ДНК с адсорбированными лигандами рассматривается как последовательность из элементов двух классов: свободных звеньев полимера и групп лигандов, связанных с полимером. В группу может входить один, два или три лиганда. Взаимодействие одного лиганда со связующим местом на полимере, удаленном от других лигандов, образующих комплекс с ДНК, характеризуется константой K . Связывание последующих лигандов, вступающих во взаимодействие со своим соседом, происходит с изменённой константой Kw , а связывание лиганда, образующего группу из трёх лигандов, может происходить с константой Kw^2 . Таким образом, параметр w отражает кооперативные взаимодействия между связанными молекулами красителя. Модель МакГи и фон Хиппеля (кооперативная модель) принимает следующий вид [23]:

$$\frac{[L_2]}{[P_0]([L_0] - [L_2])} = K(1 - nr) \left[\frac{(2w - 1)(1 - nr) + r - R}{2(w - 1)(1 - nr)} \right]^{n-1} \left[\frac{1 - (n + 1)r + R}{2(1 - nr)} \right]^2, \quad (2.50)$$

$$\text{где } r = \frac{[L_2]}{[P_0]}, \quad R = \sqrt{4wr(1 - nr) + [1 - (n + 1)r]^2}.$$

Здесь w – параметр кооперативности, характеризующий взаимодействия между близлежащими лигандами, связанными с ДНК. Значение $w > (n + 1)/2$ соответствует кооперативному связыванию, $w < (n + 1)/2$ – антикооперативному. При $w = 1$ лиганды не взаимодействуют друг с другом.

Параметры кооперативной модели K , n , w и $\Delta\epsilon$ определены из условия наилучшего совпадения экспериментальных и расчётных данных пу-

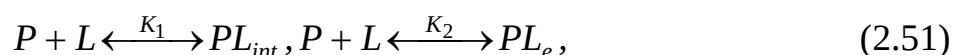
тем минимизации функционала (2.40) и представлены в табл. 1. В сравнении с другими рассмотренными моделями кооперативная модель более адекватно описывает экспериментальные данные (рис. 2.23), т.е. обеспечивает наименьшее значение функционала (2.40).

Анализ полученных данных (табл. 1) показывает, что с увеличением константы димеризации лигандов [22] параметр кооперативности также возрастает. По-видимому, между адсорбированными молекулами красителей на ДНК проявляются те же взаимодействия, что и при самоассоциации лигандов.

Число пар оснований на полинуклеотиде, приходящихся в среднем на одно место связывания для молекул ПФ и ТИ имеет значение, близкое к двум (табл. 1), что соответствует преимущественному связыванию по типу интеркаляции ([22] и ссылки там), и согласуется с данными ЯМР спектроскопии и кругового дихроизма для этих соединений. Для МГ параметр $n > 5$, что может быть объяснено преобладанием “внешнего” типа связывания ([22], ссылки там же). Последнее, при этом, не означает отсутствие интеркаляционного типа связывания МГ с биополимером, тем более что некоторые авторы указывают на доминирование интеркаляции [22].

В предположении, что молекулы МГ при связывании с полимером образуют два различных типа комплексов, проведен дополнительный анализ системы МГ—ДНК.

Равновесное комплексообразование лиганда с полимером моделировалось схемой:



где K_1 и PL_{int} – константа равновесия и комплекс МГ—ДНК, соответствующие интеркаляционному связыванию; K_2 и PL_e – равновесная константа и комплекс МГ с участком полимера, соответствующие связыванию лиганда с внешней частью макромолекулы.

Экспериментальные данные (рис. 2.23) описывали выражением:

$$A = A_0 - \Delta\epsilon_1 l [L_{2,int}] - \Delta\epsilon_2 l [L_{2,e}], \quad (2.52)$$

где $\Delta\epsilon_1$ – разность коэффициентов молярного поглощения МГ в свободном и интеркалированном состояниях; $\Delta\epsilon_2$ – разность коэффициентов молярного поглощения лиганда в свободном состоянии и в состоянии “внешнего” связывания с биополимером.

Расчёт концентраций МГ $[L_{2,int}]$ и $[L_{2,e}]$ в составе комплексов PL_{int} и PL_e проводился с использованием уравнения Скэтчарда, учитывающим два типа связывания ([22] и ссылки там):

$$\frac{[L_0] - [L_1]}{[P_0]} = \frac{K_1[L_1]}{n_1(1 + K_1[L_1])} + \frac{K_2[L_1]}{n_2(1 + K_2[L_1])}, \quad (2.53)$$

где n_1 и n_2 – числа пар оснований, приходящиеся на одно место связывания лиганда при образовании комплексов PL_{int} и PL_e .

Оценка параметров комплексообразования K_1 , K_2 , n_2 , $\Delta\varepsilon_1$ и $\Delta\varepsilon_2$ (при фиксированном значении $n_1 = 2$) показала, что $K_2 = (96 \pm 17) \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ превосходит константу интеркаляционного связывания $K_1 = (26,4 \pm 4,6) \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$, при этом число пар оснований $n_2 = 5,9 \pm 0,3$. Интенсивность поглощения лиганда в составе интеркаляционного комплекса несколько выше, чем при внешнем связывании с биополимером: $\Delta\varepsilon_1 = (16300 \pm 800) \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$, $\Delta\varepsilon_2 = (17800 \pm 1100) \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$. С использованием полученных значений K_1 , n_1 , K_2 и n_2 рассчитано относительное содержание молекулярных комплексов в растворе (рис. 2.25). Отметим, что вклад в общее равновесие различных молекулярных форм определяется не только значениями K_1 , n_1 , K_2 и n_2 , но и концентрациями $[P_0]$. Так, относительное содержание МГ в составе комплексов растет, а в мономерной форме – падает с повышением концентрации ДНК в растворе. Наблюдаемые изменения значений $[L_{2,e}]/[L_0]$, и $[L_{2,int}]/[L_0]$ при очень низких концентрациях ДНК (см. вставку на рис. 2.25) указывают на вытеснение комплексов, образованных лигандом с внешней частью биополимера интеркалирующими лигандами. Это согласуется с выводами работы [24] и обусловлено тем, что для интеркаляционного связывания требуется меньший участок посадки лиганда на ДНК ($n \approx 2$).

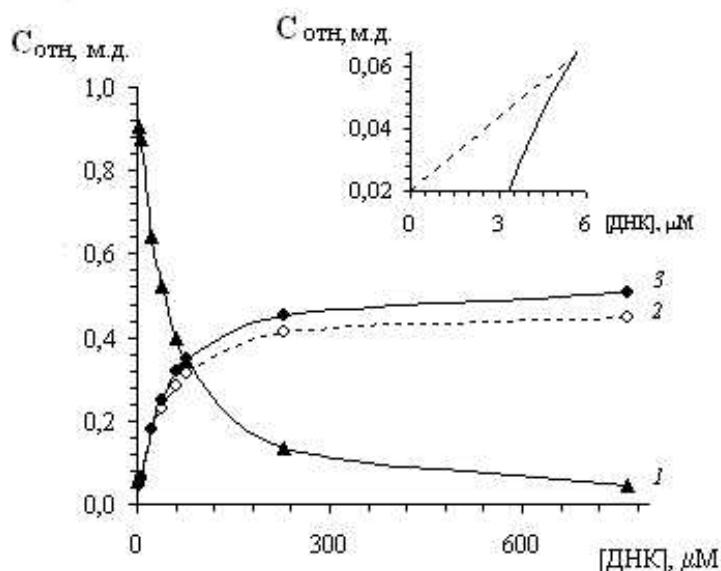


Рис. 2.25. Рассчитанные зависимости относительного содержания (мольных долей (м. д.)) МГ и его комплексов с нуклеиновой кислотой от концентрации ДНК: мономер МГ (1), интеркаляционный комплекс МГ— ДНК (2), комплекс лиганда с “внешней” частью биополимера МГ— ДНК (3); на вставке - относительное содержание комплексов МГ при малых концентрациях ДНК

Анализ экспериментальных данных с использованием модели МакГи – фон Хиппеля свидетельствует о преобладающем интеркаляционном связывании профлавина и тионина с ДНК. Молекулы метиленового голубого образуют комплексы с биополимером как путем интеркаляции, так и внешнего” связывания. Наблюдаемая связь между параметрами кооперативности и константами димеризации лигандов позволяет предположить, что между адсорбированными молекулами красителей на ДНК проявляются те же взаимодействия, что и при их самоассоциации. Из анализа равновесия в растворе молекул метиленового голубого и ДНК, проведенного в рамках модели Скэтчарда, учитывающей два типа связывания, следует, что равновесная константа образования комплекса лиганда с “внешней” частью биополимера выше, чем для интеркаляционного комплекса.

2.6. Взаимодействие бромистого этидия и кофеина с ДНК в водном растворе

В данном параграфе представлены результаты исследования связывания фенантридинового красителя бромистого этидия (ЭБ) с ДНК в присутствии и в отсутствие метилксантина кофеина (далее кофеин или КОФ) в водном растворе. ЭБ является типичным мутагенным интеркалирующим красителем для ДНК и РНК [25, 26]. Он широко используется в различных биофизических приложениях в качестве модели ДНК - интеркалирующих лигандов [27, 28]. Конформационные изменения в макромолекуле ДНК, вызванные интеркаляцией ЭБ, приводят к ингибированию процессов репликации и транскрипции ДНК в клетке [29 - 32]. Для кофеина известны различные проявления биологической активности, в том числе связывание с биополимерами – белками и ДНК [33 - 36]. Кофеин ингибирует связывание интеркалирующих мутагенных органических соединений (например, акридиновых и фенантридиновых красителей и их производных), а также антиопухолевых лекарственных средств с ДНК в живых клетках [37, 38]. Для интерпретации указанного эффекта существует два подхода. В одном из них кофеин рассматривается как интерцептор ароматических молекул [39 - 41], в другом – как протектор по отношению к клеточной ДНК [10, 42]. Интерцепторному механизму соответствует образование гетерокомплексов, что приводит к уменьшению концентрации мономеров лигандов, связывающихся с ДНК, и, соответственно, к уменьшению их токсичности [39]. Протекторный механизм проявляется в конкуренции разнородных лигандов за места связывания с ДНК [10].

Изучение совместного связывания разнородных лигандов с ДНК спектроскопическими методами в трехкомпонентной системе представляется достаточно сложной задачей, поскольку в растворе одновременно присутствуют три поглощающих ингредиента, что существенно затруд-

няет разделение их спектров. Показано [43], что экспериментальное разделение компонент и количественный анализ их совместного связывания могут быть проведены методами спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР). ЯМР, как правило, позволяет проводить исследование комплексообразования органических лигандов с нуклеиновыми кислотами в диапазоне нефизиологических (миллимолярных) концентраций, что затрудняет интерпретацию результатов по отношению к реальным биологическим системам. В свою очередь спектрофотометрический анализ – наиболее приближен к физиологическим условиям.

Динамическое равновесие в растворе трехкомпонентной системы определяется различными видами двухкомпонентных взаимодействий молекул: самоассоциацией, гетероассоциацией лигандов и их комплексообразованием с ДНК. Соответственно, количественный анализ системы ЭБ – кофеин – ДНК возможен в случае, когда известны параметры двухкомпонентных взаимодействий. Кофеин и основания ДНК поглощают в УФ области спектра, ЭБ – в видимой области. Таким образом, исследование гетероассоциации ЭБ – кофеин и комплексообразования ЭБ – ДНК может быть проведено спектрофотометрическим методом в видимой области спектра.

Гетероассоциация бромистого этидия с кофеином. На рис. 2.26 представлены экспериментальные спектры водных растворов ЭБ с различным содержанием кофеина.

Как видно, титрование ЭБ кофеином приводит к гипохромному эффекту и батохромному сдвигу полосы поглощения на 23 нм относительно максимума мономерной полосы красителя (480 нм). Одновременно на длине волны 497 нм появляется изобестическая точка. Эти спектральные изменения свидетельствуют о наличии взаимодействия между молекулами ЭБ и кофеина [3, 9] и формировании в водном растворе одного типа комплекса ЭБ - КОФ. Равновесие в растворе исследуемых молекул моделировалось схемой (2.18). Экспериментальные данные (рис. 2.26) описывали выражением (2.20), содержащим три неизвестных параметра: K , K_d (равновесная константа димеризации молекул КОФ) и $\Delta\epsilon_1$, определяемых по концентрационной зависимости оптической плотности ЭБ на длине волны (480 нм), соответствующей максимуму поглощения красителя в мономерной форме (см. рис. 2.26, вставка). Вычисленные параметры составляют: $K = (71 \pm 8) \text{ M}^{-1}$, $K_d = (12.2 \pm 2) \text{ M}^{-1}$, $\Delta\epsilon_1 = (2.4 \pm 0.3) \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Промежуточное значение константы гетероассоциации между равновесными константами димеризации молекул КОФ и ЭБ (константа димеризации молекул ЭБ – $(240 \pm 70) \text{ л/моль}$ [38]) позволяет предположить, что гетерокомплекс стабилизируется за счёт дисперсионных и гидрофобных взаимодействий циклических хромофоров исследуемых молекул.

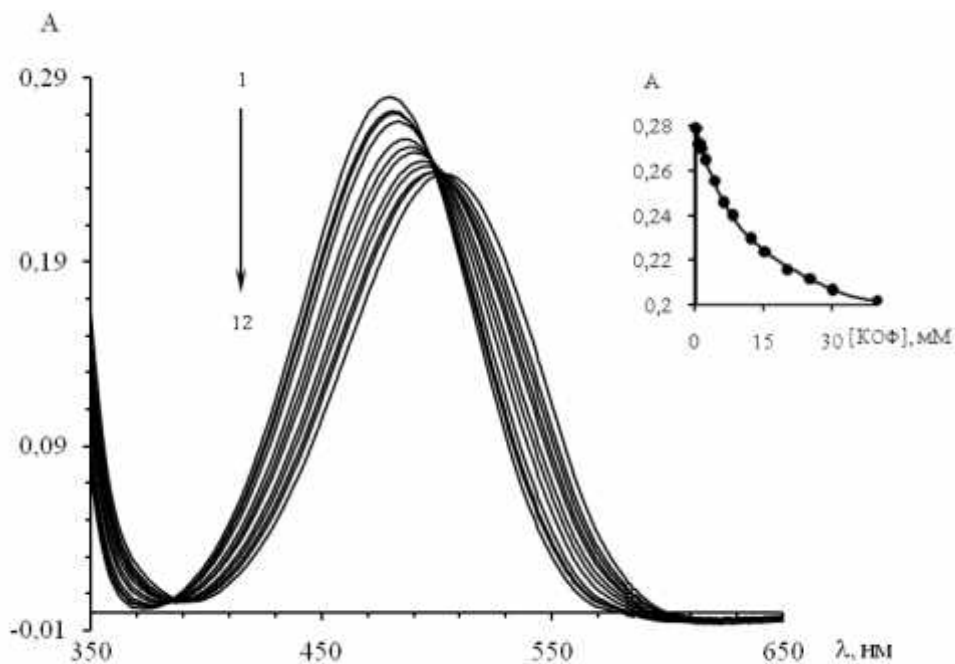


Рис. 2.26. Спектры поглощения водного раствора бромистого этидия ($[\text{ЭБ}] = 5 \cdot 10^{-5} \text{ М} = \text{const}$) при различных концентрациях кофеина: в отсутствие кофеина (1) и в присутствии его различных концентраций: $6.67 \cdot 10^{-4}$ (2), $1 \cdot 10^{-3}$ (3), $2 \cdot 10^{-3}$ (4), $4 \cdot 10^{-3}$ (5), $6 \cdot 10^{-3}$ (6), $8 \cdot 10^{-3}$ (7), $1.2 \cdot 10^{-2}$ (8), $1.5 \cdot 10^{-2}$ (9), $2 \cdot 10^{-2}$ (10), $2.5 \cdot 10^{-2}$ (11), $4 \cdot 10^{-2} \text{ М}$ (12); на вставке – зависимость оптической плотности бромистого этидия на длине волны 480 нм от концентрации кофеина

Комплексообразование бромистого этидия с ДНК. Характер изменения спектров поглощения молекул ЭБ (рис. 2.27) при титровании нуклеиновой кислотой отличается от спектров системы ЭБ — кофеин. Максимум полосы поглощения красителя больше (на 41 нм) смещается в длинноволновую область спектра относительно полос свободных лигандов; гипохромный эффект проявляется более интенсивно, изобестическая точка появляется на $\lambda = 509 \text{ нм}$. Начиная с концентрации нуклеиновой кислоты $2.43 \cdot 10^{-4} \text{ М}$ наблюдается исчезновение изобестической точки и небольшое увеличение интенсивности поглощения ЭБ в длинноволновой области спектра. Эти изменения указывают на комплексообразование красителя с ДНК.

Взаимодействие молекул ЭБ с ДНК описывалось схемой:



где K_1 – равновесная константа связывания лиганда с n_1 парами оснований ДНК, P – свободные участки биополимера, PL_1 – комплекс ЭБ с участком биополимера, содержащим n_1 пар оснований.

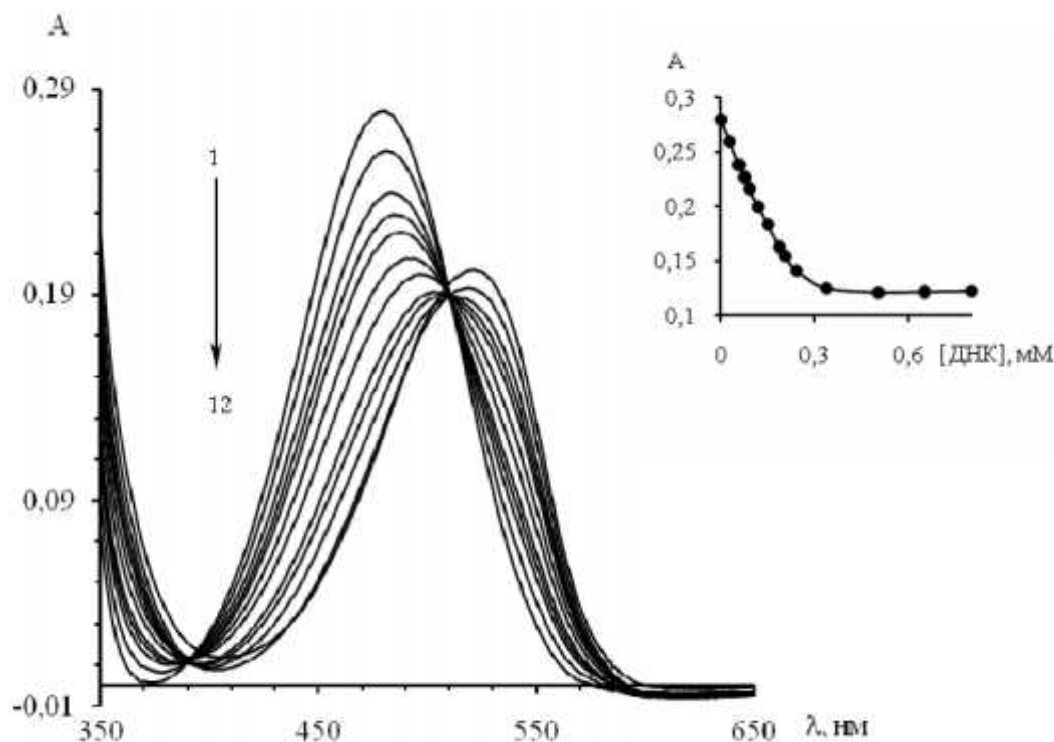


Рис. 2.27. Спектры поглощения водных растворов бромистого этидия ($[ЭБ] = 5 \cdot 10^{-5} \text{ M} = \text{const}$) при различных концентрациях ДНК: в отсутствие ДНК (1) и в присутствии её различных концентраций: $2.8 \cdot 10^{-5}$ (2), $5.6 \cdot 10^{-5}$ (3), $7.47 \cdot 10^{-5}$ (4), $8.96 \cdot 10^{-5}$ (5), $1.19 \cdot 10^{-4}$ (6), $1.49 \cdot 10^{-4}$ (7), $1.87 \cdot 10^{-4}$ (8), $2.05 \cdot 10^{-4}$ (9), $2.43 \cdot 10^{-4}$ (10), $3.36 \cdot 10^{-4}$ (11), $8.03 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ (12); на вставке – зависимость оптической плотности бромистого этидия на длине волны 480 нм от концентрации ДНК

Экспериментально наблюдаемая оптическая плотность исследуемого раствора, согласно схеме (2.33), описывалась выражением [22]: $A = A_0 - \Delta\epsilon_2 l [L_2]$, где $\Delta\epsilon_2$ – разность молярных коэффициентов поглощения лиганда в свободном и связанном с ДНК состояниях; $[L_2]$ – концентрация лиганда в связанном состоянии.

Для расчёта $[L_2]$ использовалось модель МакГи – фон Хиппеля, в которой не учитывается взаимное влияние связанных с полимером лигандов на параметры образования комплексов ЭБ – ДНК [23]:

$$\frac{[L_2]}{[P_0]([L_0] - [L_2])} = K \left(1 - \frac{n \cdot [L_2]}{[P_0]} \right) \left[\frac{[P_0] - n \cdot [L_2]}{[P_0] - (n-1) \cdot [L_2]} \right]^{n-1},$$

где $[P_0]$ – исходная концентрация пар оснований ДНК. Наилучшее совпадение экспериментальных и расчетных данных наблюдалось при следующих значениях параметров: $K_1 = (232 \pm 16) \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$, $n_1 = 3.6 \pm 0.2$, $\Delta\epsilon_2 = (3.2 \pm 0.1) \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Значение параметра n_1 отличается от типичного значения $n = 2$, характерного для чисто интеркаляционного связывания ЭБ с ДНК при высоких ионных силах ($\sim 0.1 \text{ M}$) [44]. Это позволяет

предположить, что ЭБ, при данных условиях эксперимента, не является классическим интеркалятором, как, например, профлавин [10, 42]. При значительно более низкой ионной силе раствора, используемой в настоящей работе, существует возможность связывания ЭБ с внешней поверхностью ДНК за счет электростатических взаимодействий отрицательно заряженных фосфатных групп ДНК и положительно заряженных молекул красителя [45].

Комплексообразование бромистого этидия с кофеином и ДНК. На рис. 2.28 представлены спектры поглощения красителя при разных концентрациях ДНК и постоянной концентрации кофеина и ЭБ. Добавление кофеина в двухкомпонентную систему ЭБ – ДНК незначительно влияет на гипохромизм и смещение максимума поглощения ЭБ, при этом в спектрах появляются две изобестические точки на $\lambda = 512$ и 578 нм. Эти изменения в спектрах указывают на формирование в исследуемой трехкомпонентной системе различных молекулярных комплексов.

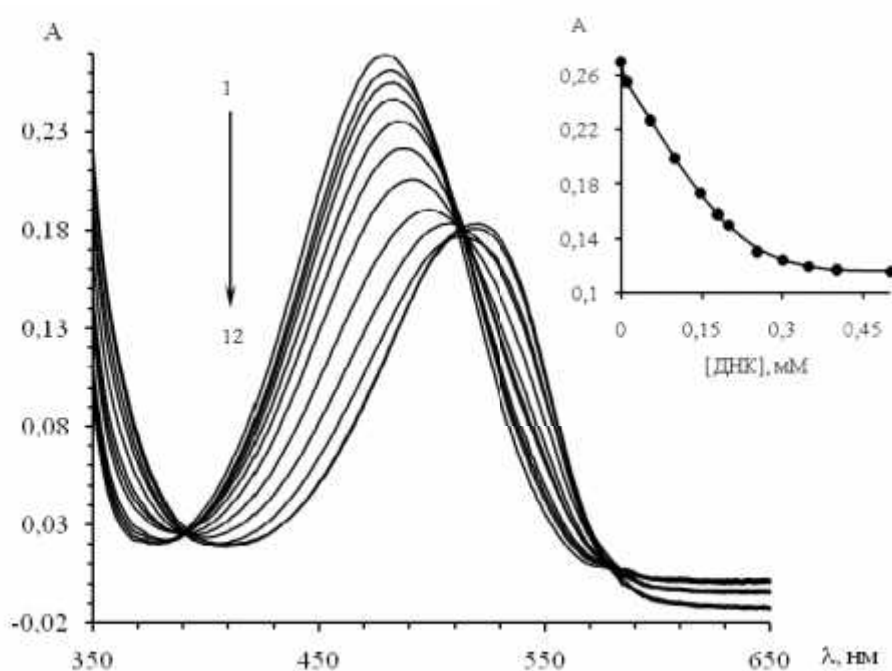
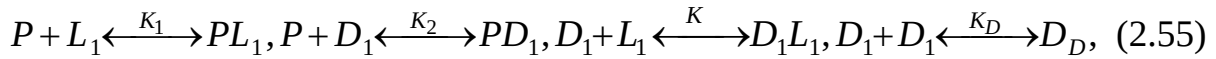


Рис. 2.28. Спектры поглощения бромистого этидия в составе трёхкомпонентной системы ЭБ – Коф - ДНК ($[\text{ЭБ}] = 5 \cdot 10^{-5} \text{ М} = \text{const}$, $[\text{Коф}] = 10^{-3} \text{ М} = \text{const}$) в отсутствие ДНК и кофеина. (1), в отсутствие ДНК (спектр ЭБ - Коф) (2) и в присутствии различных концентраций ДНК: $1 \cdot 10^{-5}$ (3), $2 \cdot 10^{-5}$ (4), $5 \cdot 10^{-5}$ (5), $7 \cdot 10^{-5}$ (6), $1 \cdot 10^{-4}$ (7), $1.47 \cdot 10^{-4}$ (8), $2 \cdot 10^{-4}$ (9), $2.53 \cdot 10^{-4}$ (10), $4 \cdot 10^{-4}$ (11), $5 \cdot 10^{-4}$ М (12); на вставке – зависимость оптической плотности ЭБ от концентрации биополимера на длине волны 480 нм

Равновесное связывание двух различных лигандов с биополимером моделировалось схемой:



где P – свободные участки биополимера; L_1 – мономеры молекул ЭБ; K_1 – равновесная константа связывания ЭБ с n_1 парами оснований ДНК; PL_1 комплекса ЭБ – ДНК; D_1 – мономеры молекул кофеина, K_2 – равновесная константа связывания кофеина с n_2 парами оснований ДНК; и PD_1 комплекс кофеин – ДНК; K – равновесная константа гетероассоциации молекул ЭБ с кофеином; D_1L_1 – гетерокомплекс кофеин – ЭБ; K_D – равновесная константа димеризации молекул кофеина; D_D – димеры молекул кофеина.

Наблюдаемую концентрационную зависимость оптической плотности ЭБ (см. рис. 2.28, вставка) описывали выражением [46]:

$$A = A_0 - \Delta \epsilon_1 l K [L_1][D_1] - \Delta \epsilon_2 l [L_2]. \quad (2.56)$$

Расчёт концентраций $[L_1]$, $[D_1]$ и $[L_2]$ проведён с использованием модели МакГи и фон Хиппеля, описывающей связывание двух различных лигандов с ДНК [46]:

$$[L_2] = [L_1] K_1 ([P_0] - n_1 [L_2] - n_2 [D_2]) \left[\frac{[P_0] - n_1 [L_2] - n_2 [D_2]}{[P_0] - n_1 [L_2] - n_2 [D_2] + [L_2] + [D_2]} \right]^{n_1 - 1}, \quad (2.57)$$

$$[D_2] = [D_1] K_2 ([P_0] - n_1 [L_2] - n_2 [D_2]) \left[\frac{[P_0] - n_1 [L_2] - n_2 [D_2]}{[P_0] - n_1 [L_2] - n_2 [D_2] + [L_2] + [D_2]} \right]^{n_2 - 1}, \quad (2.58)$$

и уравнений, отражающих закон сохранения общих концентраций лигандов ЭБ и КОФ:

$$[L_0] - K [L_1][D_1] - [L_2] - [L_1] = 0, \quad (2.59)$$

$$[D_0] - K [L_1][D_1] - 2K_D [D_1]^2 - [D_2] - [D_1] = 0, \quad (2.60)$$

где $[D_2]$ – концентрация молекул КОФ в связанном с биополимером состоянии.

Параметры модели K_2 , n_2 , $\Delta \epsilon_2$ определялись из условия наилучшего совпадения расчетных и экспериментальных значений оптической плотности (см. рис. 2.28, вставка) при заданных значениях K , K_D , K_1 , n_1 , $\Delta \epsilon_1$, полученных выше из экспериментов с двухкомпонентными системами. Равновесные концентрации $[L_1]$, $[D_1]$ и $[L_2]$ рассчитывались на каждом цикле минимизации функции - невязки. Проведённые расчеты дают следующие значения параметров связывания КОФ с ДНК: $K_2 = (127 \pm 30) \text{ M}^{-1}$, $n_2 = 1.68 \pm 0.24$, $\Delta \epsilon_2 = 3.2 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Знание равновесных констант само- и гетероассоциации КОФ и ЭБ, а также их комплексообразования с

ДНК позволило рассчитать концентрацию ЭБ и кофеина в составе двух- и трехкомпонентных комплексов в зависимости от содержания нуклеиновой кислоты в растворе (рис 2.29). Как видно, концентрация связанного с ДНК ЭБ уменьшается при добавлении в раствор кофеина (кривая 2). При $[P_0] > 0,12$ мМ преобладает процесс образования комплексов кофеин - ДНК (кривая 3) над процессом гетероассоциации ЭБ с кофеином (кривая 4), а при $[P_0] < 0,12$ мМ содержание связанного с ДНК кофеина уменьшается - превалирует процесс гетероассоциации: равновесие смещается в сторону образования гетерокомплексов. Уменьшение концентрации комплексов ЭБ - ДНК в трехкомпонентном растворе при малых концентрациях биополимера ($[P_0] < 0,12$ мМ) вызвано процессами гетероассоциации и связывания кофеина с полимером, а при больших значениях $[P_0]$ – в основном блокировкой кофеином мест связывания ЭБ на полимере.

В целом полученные результаты позволяют дать интерпретацию эффекта вытеснения ЭБ из ДНК при добавлении кофеина и, следовательно, объяснить наблюдаемое *in vitro* изменение биологической активности ЭБ в присутствии кофеина [27]. Более того, предлагаемая методика расчета относительного содержания различных типов комплексов в трехкомпонентной системе может быть использована для оценки необходимого количества интерцептора в методе практического “очищения” клеточной ДНК от связанного лиганда для повторного использования клеточной культуры [47].

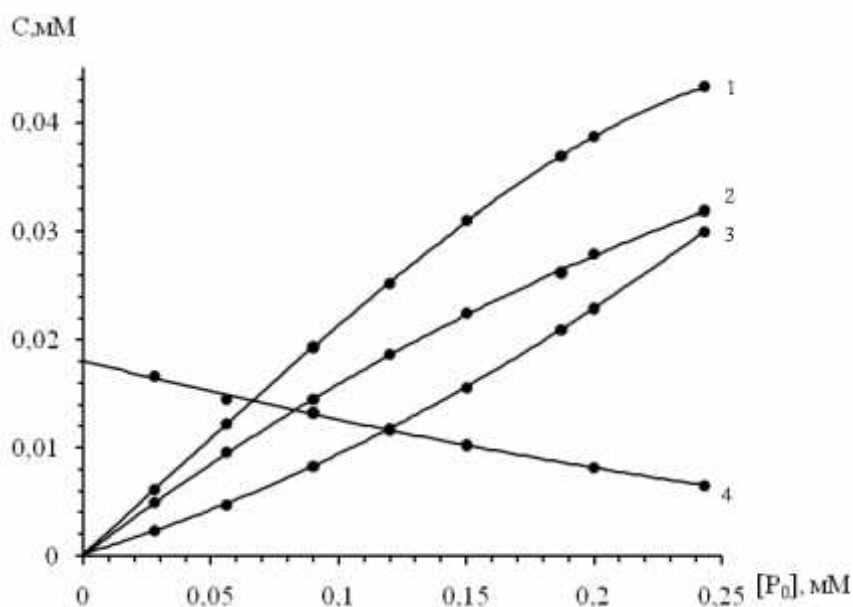


Рис. 2.29. Расчетные зависимости концентраций лигандов в составе различных комплексов от содержания нуклеиновой кислоты в растворе: ЭБ в составе комплекса ЭБ – ДНК (двухкомпонентная система) (1), в составе комплекса ЭБ – ДНК (трехкомпонентная система) (2), в составе комплекса ЭБ – кофеин (трехкомпонентная система) (4), кофеин в составе комплекса кофеин – ДНК (трехкомпонентная система) (3)

Исходя из результатов исследования комплексообразование бромистого этидия с нуклеиновой кислотой в присутствии и в отсутствие кофеина в водно-солевом растворе высказано предположение, что в данных условиях эксперимента [46] имеет место два типа связывания лиганда с ДНК – интеркаляционное и “внешнее” связывание. С использованием модели МакГи – фон Хиппеля для трехкомпонентной системы и численных значений параметров комплексообразования молекул в двухкомпонентных системах рассчитана константа связывания кофеина с ДНК. Рассчитаны концентрации бромистого этидия и кофеина в составе двух- и трехкомпонентных комплексов в зависимости от содержания нуклеиновой кислоты в растворе. Из сравнения расчетных концентрационных зависимостей лигандов следует, что концентрация связанного с ДНК бромистого этидия в трехкомпонентной системе меньше, чем в двухкомпонентной. На снижение концентрации комплексов бромистый этидий – ДНК в трехкомпонентной системе при малых концентрациях ДНК существенно влияет гетероассоциация лигандов, а при больших концентрациях ДНК – связывание кофеина с биополимером.

2.7. Термодинамический анализ комплексообразования гетероциклического лиганда с ДНК в водном растворе

В работе [48] на примере бромистого этидия с помощью метода спектрофотометрии и численного анализа продемонстрирована принципиальная возможность получения термодинамических параметров неинтеркаляционного связывания гетероциклических лигандов с ДНК. Анализ термодинамических параметров позволяет сделать вывод о вовлечении различных физических факторов в стабилизацию комплекса лиганда с “внешней поверхностью” биополимера.

Информацию о термодинамических параметрах комплексов лиганд – ДНК можно получить из анализа термодинамики перехода молекул из связанного состояния в менее упорядоченное состояние (или наоборот) с помощью известных термодинамических соотношений:

$$\Delta G = -RT \ln K, \quad d(\ln K_d)/d(1/T) = -\Delta H/R, \quad \Delta S = -(\Delta G - \Delta H)/T.$$

Можно оценить изменения энтальпии ΔH , энтропии ΔS и свободной энергии Гиббса ΔG раствора при связывании молекул, если их теплота комплексообразования не зависит от температуры, т.е. зависимость $\ln K$ от $1/T$ является линейной в исследуемом температурном диапазоне. Численные значения ΔH , ΔS и ΔG позволяют сделать вывод о вовлечении различных физических факторов в стабилизацию комплексов лиганд – ДНК.

Материалы и методы. В экспериментах использовали коммерческие препараты натриевой соли ДНК молок лосося (Sigma, D-1626, USA) и бро-

мистого этидия (Sigma, USA) без дополнительной очистки. Исследования проводились в водносолевом (0,01 M NaCl) фосфатном буферном растворе на основе бидистиллированной воды (рН 6,86). Фотометрирование образцов осуществляли в герметически закрытых одноразовых пластиковых кюветах с длиной оптического пути 1 см на двухлучевом спектрофотометре UNICO UV-Vis 4802 (USA).

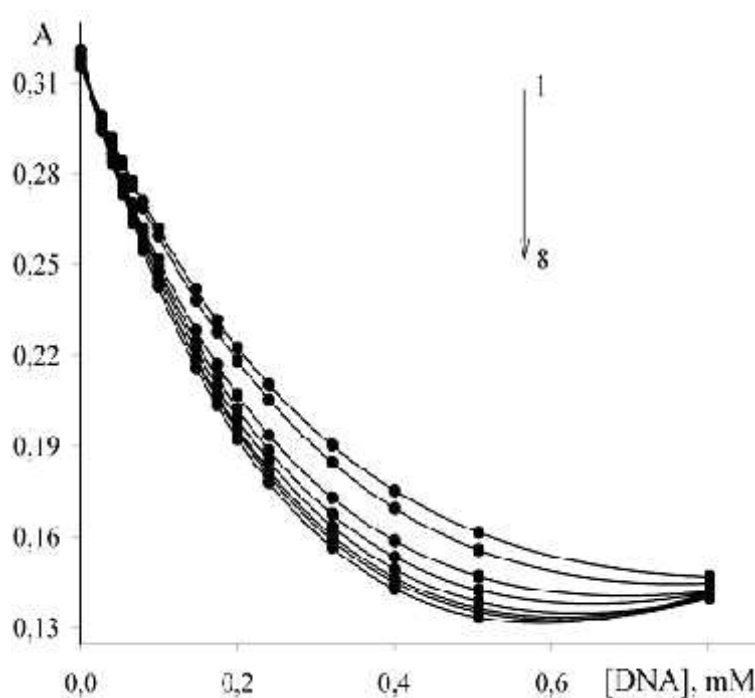


Рис. 2.30. Зависимость оптической плотности красителя от концентрации ДНК при различных температурах: 1 – 328 К; 2 – 323 К; 3 – 313 К; 4 – 308 К; 5 – 303 К; 6 – 298 К; 7 – 295 К; 8 – 292 К

Температура внутри термостатированного кюветного отделения поддерживалась с точностью $\pm 0,1$ °С. Температуру в кюветах измеряли при помощи термопары медь – константан. Для предотвращения фотоокисления взвешивание препаратов и приготовление растворов проводились в затемненном помещении.

В связи с относительно малой стабильностью водных растворов красителя исходные растворы готовили растворением точных навесок в буфере перед измерениями. Анализируемые концентрации бромистого этидия и нуклеиновой кислоты получали методом последовательного разбавления исходных растворов. Исходный раствор натриевой соли ДНК молот лосося готовили путем растворения точной навески лиофилизированного препарата в течение 24 ч в буферном растворе. Перед нагреванием из образцов удаляли растворенный в воде воздух, пузырьки которого, образующиеся при нагревании, могли исказить величину поглощения.

Анализ термодинамики комплексообразования молекул ДНК и лиганда проводился по измеренным концентрационным зависимостям оптической плотности красителя в смеси с ДНК на длине волны, соответствующей максимуму поглощения ЭБ в мономерной форме [46] в диапазоне температур 19...55 °С (рис. 2.30). Для получения равновесных концентрационных зависимостей при каждой исследуемой температуре (см. рис. 2.30) измерение поглощения проводилось спустя 10 минут после установления теплового равновесия в кюветах.

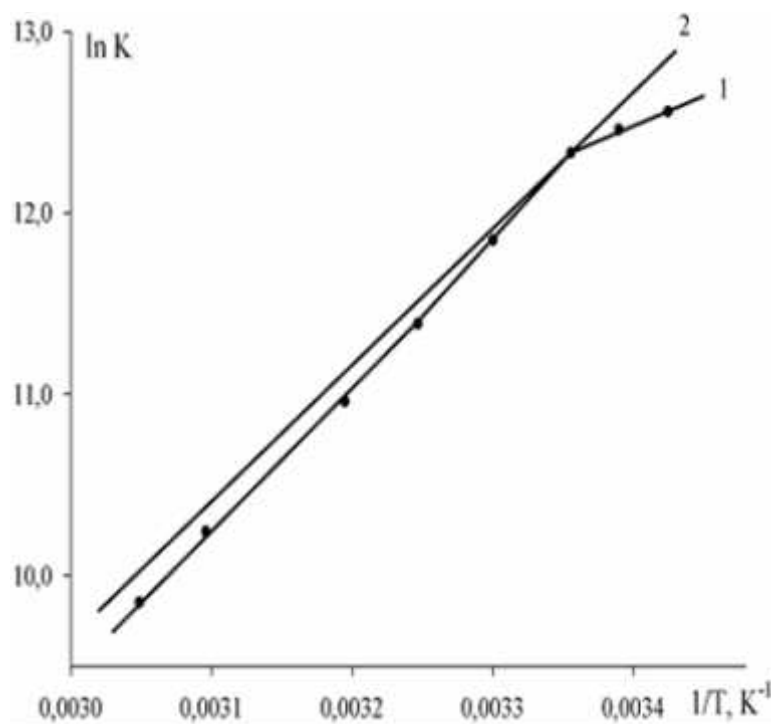


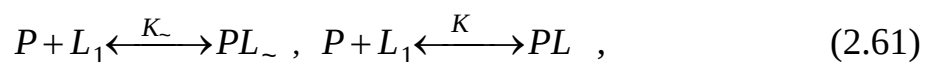
Рис. 2.31. Зависимость $\ln K$ от $1/T$ комплексообразования ЭБ с ДНК: 1 – экспериментальные данные; 2 – аппроксимирующая прямая, параллельно перенесенная в точку касания с графиком (1) при $T = 298$ К

Температурная зависимость константы комплексообразования. Равновесие в растворе моделировалось схемой: $P + L_1 \xrightleftharpoons{K} PL_1$. Экспериментально наблюдаемые оптические плотности исследуемых растворов описывалась выражениями (2.38) и (2.49), содержащими три неизвестных параметра: K , n и $\Delta\epsilon$, определяемые при различных температурах по концентрационным зависимостям оптической плотности ЭБ (см. рис. 2.30) на длине волны 480 нм.

Численный анализ показал, что в исследуемом температурном диапазоне место посадки лиганда содержит от 3,5 до 4 пар оснований, $\Delta\epsilon$ изменяется в интервале 3200...3500 $M^{-1}\cdot cm^{-1}$. На рис. 2.31 представлены числен-

ные значения константы комплексообразования K в координатах Вант-Гоффа. Характерной особенностью этой зависимости является выраженная нелинейная форма, проявляющаяся в «загибе» кривой при понижении температуры. Одним из вариантов интерпретации нелинейности кривых Вант-Гоффа является ненулевое значение изменения теплоемкости в реакции комплексообразования, и, как следствие, температурная зависимость энтальпии и энтропии данного процесса [49, 50]. Однако нелинейность кривой на рис. 2.31 не является монотонной, и условно может быть аппроксимирована двумя прямыми линиями. Аналогичная двухфазность также может наблюдаться в координатах Скэтчарда при спектрофотометрическом титровании и интерпретируется как результат одновременного сосуществования в растворе двух различных типов комплексов [51]. Учитывая последнее, а также то, что множество различных методов свидетельствуют именно о двух типах связывания бромидэтидия с ДНК – интеркаляции и внешнего связывания (мульти-modalность связывания) [52 - 58], будем далее считать, что выясненная в данной работе особенность кривых Вант-Гоффа отражает именно этот факт.

Модель для анализа двух типов связывания. Предполагая, что молекулы красителя связываются с полимером двумя различными способами, их равновесное комплексообразование может быть описано схемой



где K_{α} , K_{β} – равновесные константы образования комплексов PL_{α} и PL_{β} бромистого этидия с ДНК, соответствующие первому (α -комплекс) и второму (β -комплекс) типам связывания. На данном этапе физическое соответствие α - и β -комплексов интеркаляционному или внешнему типам связывания не рассматривается.

С учетом мульти-modalности, экспериментальные данные (см. рис. 2.30) описываются выражением:

$$A = A_0 - \Delta\epsilon_{\alpha} [L_{\alpha}] - \Delta\epsilon_{\beta} [L_{\beta}] , \quad (2.62)$$

где $\Delta\epsilon_{\alpha}$ и $\Delta\epsilon_{\beta}$ – разность коэффициентов молярного поглощения ЭБ в свободном и связанном состоянии для α - и β -комплексов.

Расчет концентраций ЭБ $[L_{\alpha}]$ и $[L_{\beta}]$ в составе комплексов проводился с использованием модели МакГи – фон Хиппеля, учитывающей образование двух различных типов комплексов:

$$[L] = [L_1] K \left([P_0] - n [L_2] - n [L] \right) \left[\frac{[P_0] - n [L_2] - n [L]}{[P_0] - n [L_2] - n [L] + [L_2] + [L]} \right]^{n-1}, \quad (2.63)$$

$$[L_2] = [L_1] K_2 \left([P_0] - n [L_2] - n [L] \right) \left[\frac{[P_0] - n [L_2] - n [L]}{[P_0] - n [L_2] - n [L] + [L_2] + [L]} \right]^{n-1},$$

и уравнения, отражающего закон сохранения общей концентрации красителя:

$$[L_0] - [L_2] - [L] - [L_1] = 0. \quad (2.64)$$

Концентрации $[L_\alpha]$ и $[L_\beta]$ определялись из решения уравнений МакГи – фон Хиппеля и закона сохранения общей концентрации красителя на каждом этапе минимизации квадратичного функционала при варьировании параметров (K_α , K_β , n_α , n_β , $\Delta\varepsilon_\alpha$, $\Delta\varepsilon_\beta$). В качестве начальных приближений $[L_\alpha]$ и $[L_\beta]$ использовались концентрации лиганда в связанном состоянии $[L_2]$, полученные на предыдущем этапе. Учитывалось, что при $[P_0] \rightarrow 0$ комплекс, имеющий больший участок посадки (большее значение n), вытесняется лигандами, связывающимися с меньшим числом пар оснований полимера [59]. Параметры модели определялись из условия наилучшего совпадения расчетных и экспериментальных значений оптической плотности (см. рис. 3.30). Числовые значения K_α и K_β представлены в виде зависимостей $\ln K = f(1/T)$ на рис. 3.32. Число пар оснований, приходящихся на одно место связывания в исследуемом температурном диапазоне, составляет: $n_\alpha = 3.6 \pm 0.2$, $n_\beta = 1.0 \pm 0.1$, а интенсивности поглощения лиганда в составе α - и β -комплексов – $\Delta\varepsilon_\alpha = (3800 \pm 400) \text{ М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ и $\Delta\varepsilon_\beta = (60 \pm 30) \text{ М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ соответственно.

Как следует из рис. 3.32, зависимости Вант-Гоффа демонстрируют монотонную нелинейность, что предполагает ненулевое значение изменения теплоемкости ΔC_p и температурную зависимость энтальпии, а также энтропии в реакции комплексообразования в виде [49, 50]:

$$\frac{d(\Delta H)}{dT} = \Delta C_p, \quad \frac{d(\Delta S)}{dT} = \frac{\Delta C_p}{T}. \quad (2.65)$$

Значения равновесных констант при различных температурах (см. рис. 2.32) позволяют вычислить значения всех термодинамических параметров, входящих в (2.65), используя стандартное термодинамическое соотношение [49, 50]:

$$\ln \frac{K(T)}{K_0} = \frac{-\Delta H + \Delta C_p T_0}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0} \right) + \frac{\Delta C_p}{R} \ln \frac{T}{T_0}, \quad (2.66)$$

где K_0 – равновесная константа связывания лиганда с ДНК ($T_0 = 298$ К).

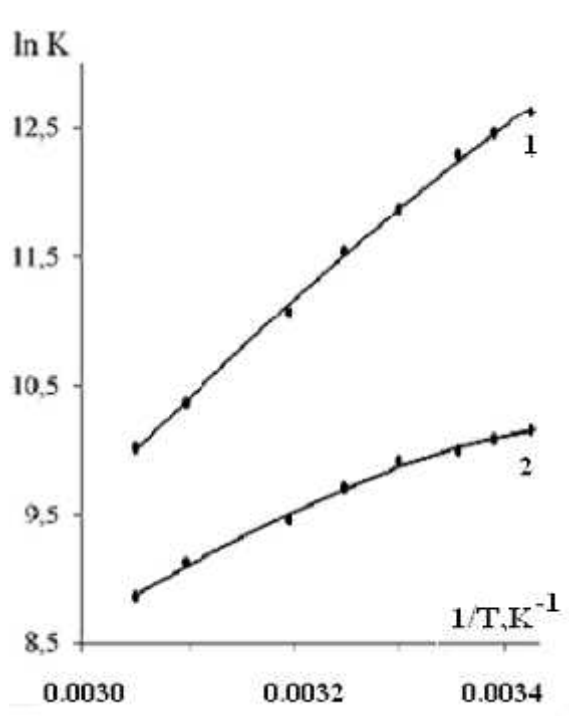


Рис. 2.32. Зависимости $\ln K$ от $1/T$ для реакций образования комплексов ЭБ с ДНК: 1 – комплекс α ; 2 – комплекс β

Т а б л и ц а 2

Комплекс	ΔH , кДж/моль				ΔC_p , Дж/К·моль
	25 °С	30 °С	40 °С	50 °С	
А	-52,9	-55,6	-61,0	-66,5	-(540 ± 15)
В	-18,0	-22,5	- 31,6	- 40,7	-(900 ± 20)

Результаты расчетов представлены в табл. 2. Здесь же приведены результаты измерения энтальпии и теплоемкости реакции образования интеркаляционного комплекса ЭБ – ДНК методом микрокалориметрии [61]. Расчетное значение теплоемкости α -комплекса совпадает с экспериментальным, однако расчетные значения энтальпии оказываются выше экспериментальных по абсолютной величине. Подобное отличие является вполне ожидаемым и неоднократно отмечалось в литературе для тех ситуаций, когда требуется прямое сравнение данных анализа Вант-Гоффа и калориметрии [60]. К этому следует также добавить, что в работе [61] не производилось разделения типов комплексов, следовательно, калориметрически измеряемые значения ΔH фактически являются взвешенной суммой энер-

гетики α - и β -комплексов, представленной в табл. 2. Это означает “заниженность” калориметрической энтальпии интеркаляционного комплекса. Хорошее совпадение результатов микрокалориметрии с расчетной энергетикой образования α -комплекса свидетельствует о том, что этот тип комплекса является интеркаляционным. Кроме этого, результаты единственного известного нам термодинамического анализа образования неинтеркаляционного комплекса ароматического красителя профлавина с тимусной ДНК приводят к значению энтальпии $\Delta H = -14,2$ кДж/моль [62], что хорошо согласуется с энтальпией образования β -комплекса в табл. 2 и независимо свидетельствует о связывании ЭБ с “внешней поверхностью” биополимера.

Из табл. 2 следует, что термодинамический профиль образования α - и β -комплексов имеет ряд существенных различий. Во-первых, энтальпия и энтропия α -комплекса характеризуется более глубокими отрицательными значениями по сравнению с β -комплексом. Этот факт находится в согласии с известным представлением о том, что образование интеркаляционного комплекса сопровождается значительным выделением энергии вследствие стэкинга ароматического хромофора лиганда и смежных пар оснований сайта интеркаляции, по сравнению с энергетически менее выгодными электростатическими взаимодействиями, стабилизирующими комплексы лигандов с “внешней поверхностью” ДНК [50, 61, 62]. Во-вторых, изменение теплоемкости β -комплекса более отрицательно, чем α -комплекса. Последнее, согласно выражениям (2.67), должно сопровождаться уменьшением величин как энтальпии, так и энтропии реакций комплексообразования. Этот вывод находится в согласии с рядом ΔH , ΔS в табл. 2, рассчитанных независимо в каждой температурной точке по данным рис. 2.32.

В работе продемонстрирована возможность получения термодинамических параметров образования двух различных комплексов для гетероциклических ДНК-связывающихся лигандов на основании данных спектрофотометрии и численного анализа. На примере фенантридинового красителя – ЭБ – впервые получены данные по термодинамике двух типов связывания бромистого этидия с ДНК: интеркаляционного и с “внешней поверхностью” биополимера. Установлено, что комплексообразование лиганда с “внешней поверхностью” биополимера характеризуется меньшими отрицательными изменениями энтальпии и энтропии и большими отрицательными изменениями теплоемкости по сравнению с интеркаляционным типом связывания. Анализ полученных данных указывает на значительный вклад гидрофобных сил в стабилизацию комплексов бромида этидия, связывающегося с “внешней поверхностью” ДНК.

Литература к части 2

1. Пешкова В.М. Методы абсорбционной спектроскопии в аналитической химии / В.М. Пешкова, М.Н. Громова. - М.: Высшая школа, 1976. - 460 с.
2. Левшин Л.В. Оптические методы исследования молекулярных систем. Молекулярная спектроскопия / Л.В. Левшин., А.М. Салецкий. - М.: Изд-во МГУ, 1994. - 320 с.
3. Барановский С.Ф. Агрегация 1,3,7-триметилксантина с метиленовым голубым в водном растворе / С.Ф. Барановский, П.А. Болотин, М.П. Евстигнеев // Журнал прикладной спектроскопии. - 2006. - Т. 73, № 2. - С. 158 - 163.
4. Bolotin P.A. Spectrophotometric investigation of the hetero-association of caffeine and thiazine dye in aqueous solution/ P.A. Bolotin, S.F. Baranovsky, M.P. Evstigneev. - Spectrochimica Acta Part A. - 2006. V.64. - P. 693 - 697.
5. Kasha M. The exciton model in molecular spectroscopy / M. Kasha, H. R. Rawls, M. Ashraf El-Bayoumi. - Pure Appl. Chem. - 1965. - № 11. - P.371 - 392.
6. Егоров В.В. Теория J-полосы от экситона Френкеля к переносу заряда / В.В. Егоров, М.В. Алфимов // УФН. - 2007. - № 10. - С. 1033 - 1081.
7. Барановский С.Ф. Спектральное исследование самоассоциации гидрохлорида акридина оранжевого в водном растворе / С.Ф. Барановский, П.А. Болотин, Д.Н. Чернышев, М.Г. Поплавская // Вестник СевГТУ (физика и математика). - 2007. - Вып. 85. - С. 64 - 69.
8. Ищенко А.А. Разнородная ассоциация ионов красителей в растворах / А.А. Ищенко, С.А. Шаповалов // Журнал прикладной спектроскопии. - 2004. - Т. 71, № 5. - С. 557 - 578.
9. Барановский С.Ф. Ассоциация рибофлавина, кофеина и натриевого эфира салициловой кислоты в водном растворе / С.Ф. Барановский, П.А. Болотин // Журнал прикладной спектроскопии. - 2007. - Т.74, № 2. - С. 188 - 194.
10. Davies D.B. Heteroassociation of caffeine and aromatic drugs and their competitive binding with a DNA oligomer/ D.B. Davies, D.A Veselkov, L.N. Djimant, A.N. Veselkov// Eur. Biophys. J. - 2001. - V. 30. - P. 354 - 366.
11. Веселков А.Н. Исследование ассоциации красителей акридинового ряда методом протонного магнитного резонанса / А.Н. Веселков, С.Ф. Барановский, Л.Н. Дымант // Хим. физика. - 1986. - Т. 5. - С. 318 - 323.
12. Барановский С.Ф. Исследование ассоциации биологически активных молекул красителей/ С.Ф. Барановский, Д.Н. Чернышев, А.С. Бучельников // Матер. XI междунар. науч.-техн. конф. «Актуальные вопросы биологической физики и химии. БФФХ-2016». - Севастополь, 2016. - С. 164 - 169.

13. Бучельников А.С. Спектрофотометрическое изучение ассоциирующих молекул красителей в водном растворе / А.С. Бучельников, Д.Н. Чернышев, П.Г. Милосердов, С.Ф. Барановский // Матер. VII междунар. науч.-техн. конф. "Актуальные вопросы биологической физики и химии. БФФХ-2011". - Севастополь, 2011. - С. 139-141.

14. Tinoco J. Hypochromism in polynucleotides / J. Tinoco // J. Amer. Chem. Soc. - 1960. - Vol. 82. - P. 4785 - 4790.

15. Rhodes W. Hypochromism and other spectral properties of helical polynucleotides / W. Rhodes // J. Am. Chem. Soc. - 1961. - V. 83. - P. 3609 - 3617.

16. Физические методы исследования белков и нуклеиновых кислот / Ред. Ю.С. Лазуркин. - М.: Наука, 1967. - 323 с.

17. Кантор Ч. Биофизическая химия в 3-х т. / Ч. Кантор, П. Шимел. - М.: Мир, 1984. - Т. 2 - 493 с.

18. Antonov L., Gergov G., Petrov V., Kubista M., Nygren J. UV-Vis spectroscopic and chemometric study on the aggregation of ionic dyes in water/ L. Antonov, G. Gergov, V. Petrov, M. Kubista // Talanta. - 1999. - V. 49. - P. 99 - 106.

19. Южаков В.И. Ассоциация молекул красителей и её спектроскопическое проявление / В.И. Южаков // Успехи химии. - 1979. - № 11. - С. 207 - 233

20. Зенгер В. Принципы структурной организации нуклеиновых кислот / В. Зенгер. - М.: Мир. - 1987. - 584 с.

21. Осинникова Д.Н. Взаимодействие молекулы ДНК с синтетическими аналогами антибиотиков и алкалоидов различной структуры: дис. канд. физ.-мат. наук: 02.00.06: защищена 17.11.16. - СПб., 2016. - 118 с.

22. Барановский С.Ф., Болотин П.А., Евстигнеев М.П., Чернышев Д.Н. Комплексообразование гетероциклических лигандов с ДНК в водном растворе / С.Ф. Барановский, П.А. Болотин, М.П. Евстигнеев, Д.Н. Чернышев // Журнал прикладной спектроскопии. - 2008. - Т. 75. - № 2. - С. 242 - 249.

23. McGhee J.D. Theoretical aspects of DNA - protein interactions: cooperative and non - cooperative binding of large ligands to a one-dimensional homogeneous lattice / J.D. McGhee, P.H. von Hippel // J. Mol. Biol. - 1974. - Vol. 86. - P. 463 - 489.

24. Нечипуренко Ю.Д. Кооперативные взаимодействия при связывании протяженных лигандов с ДНК. II. Контактные кооперативные взаимодействия между адсорбированными лигандами / Ю.Д. Нечипуренко // Молекулярная биология. - 1984. - С. 1066 - 1079.

25. Tetley J.N. The effect of inducing agents on the metabolism of ethidium bromide by isolated rat hepatocytes/ J.N. Tetley, G.G. Skellern, M.H. Midgley M.H. Grant, A.R. Pitt // Chem. Biol. Interact. - 1999. - V. 123. - № 2. - P. 105 - 115.

26. Severini A. An Assay for Proteinases and Their Inhibitors Based on DNA/ ethidium Bromide Fluorescence An Assay for Proteinases and Their Inhibitors Based on DNA/ ethidium Bromide Fluorescence/ A. Severini, A.R. Morgan // Anal. Biochem. - 1991. - V. 193. - P. 83 - 89.

27. Traganos F. Caffeine modulates the effects of DNA inter-calating drugs in vitro: A flow cytometric and spectrophotometric analysis of caffeine interaction with Novantrone, doxorubicin, ellipticine and the doxorubicin analog/ F.Traganos, J. Kapuscinski, Z. Darzynkiewicz// AD198. - Cancer Res. - 1991. - V. 51. - P. 3682 - 3689.

28. Zdunek M. The modulation by xanthines of the DNA-damaging effect of polycyclic aromatic agents /M. Zdunek , J. Piosik, J. Kapuscinski // Biophys. Chem. - 2000. - V. 84. - P. 77 - 85.

29. Gale E. F. The Molecular Basis of Antibiotic Action/ E.F.Gale, E.Cundliffe, P.E. Reynolds, M.H. Richmond, M. J.Waring// London: Wiley & Sons, 1981. - 464 p.

30. Graves D.E. Intercalative binding of small molecules to nucleic acids / D.E. Graves, L.M. Velea // Curr. Org. Chem. - 2000. - V. 4. - № 4. - P. 915 - 929.

31. Elliot W.H. The Effect of Antimicrobial Agents on Deoxyribonucleic Acid Polymerase / W.H. Elliot // Biochem. J. - 1963. - V. 86. - P. 562 - 569.

32. Waring M.J. Complex formation with DNA and inhibition of *Escherichia coli* RNA polymerase by ethidium bromide/ M.J.Waring //Biochem. Biophys. Acta. - 1964. - V.87. - P. 358 - 361.

33. Spiller G. A., in: The Methylxanthines. Beverages and Foods: Chemistry, Consumption, and Health Effects / G. A. Spiller // New York , A. R. Liss Inc. - 1984. - P. 195 - 201.

34. O'Neil F.J.J. Differential effects of cytochalasin B and caffeine on control of DNA synthesis in normal and transformed cell / F.J.J. O'Neil // J.Cell. Physiol. - 1979. - V.101. - P. 201 - 218.

35. Selby C.P. Molecular mechanisms of DNA repair inhibition by caffeine / C. P. Selby, A.Sancar // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1990. - V. 87. - P. 3522 - 3525.

36. Fritzsche H. On the interaction of caffeine with nucleic acids: III.¹NMR studies of caffeine-5'-adenosine monophosphate and caffeine-poly(riboadenylate) interactions / H. Fritzsche, I. Petri, H. Schutz, K.Weller, R. Sedmere, H. Lang // Biophys. Chem. - 1980. - V.11. - P. 109 - 119.

37. Ohsaki Y. Pentoxifylline potentiates the antitumor effect of cisplatin and etoposide on human lung cancer cell lines / Y. Ohsaki, S. Ishida, T. Fujikane, K. Kikuchi // Oncology. - 1996. - V.53. - P. 327 - 333.

38 Piosik J. The modulation by xanthines of the DNA-damaging effect of polycyclic aromatic agents. Part II. The stacking complexes of caffeine with doxorubicin and mitoxantrone/ J.Piosik, M.Zdunek, J. Kapuscinski // Biochem. Pharm. - 2002. - V.63 - P. 635 - 646.

39. Hartman P.E. Antimutagens and Anticarcinogens: A Survey of Putative Interceptor Molecules/ P.E. Hartman, P.E. Shankel// *Environ Mol. Mutagen.* – 1990. - V.15. - P.145 - 182.

40 Ramel C. Inhibitors of mutagenesis and their relevance to carcinogenesis: Report by ICPEMC Expert Group on Antimutagens and Desmutagens/C. Ramel, U.K. Alekperov, B.N. Ames, T. Kada, L.W. Wattenberg // *Mutat. Res.* - 1986. - V. 168. - P. 47 - 65.

41. Tachino N. Mechanisms of the in vitro antimutagenic action of chlorophyllin against benzo[a]pyrene: studies of enzyme inhibition, molecular complex formation and degradation of the ultimate carcinogen / N.Tachino, D. Guo, W.M. Dashwood, S.Yamane, R. Larsen, R. Dashwood // *Mutat. Res.* - 1994. -V. 308. - P. 191 - 203.

42 Lyles M.B., Cameron I.L. Interactions of the DNA intercalator acridine orange with itself with caffeine and with double stranded DNA/ M.B.Lyles, I.L. Cameron// *Biophys. Chem.* - 2002. - V. 96. - P. 53 - 76.

43. Evstigneev M.P. Complexation of daunomycin with a DNA oligomer in the presence of an aromatic vitamin (B2) determined by NMR spectroscopy/M.P.Evstigneev, Yu.V.Mykhina Yu.V., D.B. Davies // *Biophys. Chem.* - 2005. - V.118. - P. 18 - .

44. Feigns J. Interactions of antitumor drugs with natural DNA: NMR study of binding mode and kinetics / J.Feigns, W.A. Denny, W. Leupin, D.R.Kearns // *J. Med. Chem.* - 1984. - V.27. - P. 450 - 465.

45. Bantams J. Comparative binding study of the interaction of quinacrine and ethidium bromide with DNA and nucleohistone/ J. Bantams, E. Frederick// *Biophys. Chem.* - 1974. - V.2. - P. 1 - 22.

46. Барановский С.Ф. Взаимодействие бромистого этидия и кофеина с ДНК в водном растворе / С.Ф. Барановский, П.А. Болотин, М.П. Евстигнеев, Д.Н. Чернышев // *Журнал прикладной спектроскопии.* - 2009. - Т. 76, № 1. - С. 143 - 151.

47 Bedner E. Caffeine dissociates complexes between DNA and intercalating dyes: Application for bleaching fluorochrome-stained cells for their subsequent restaining and analysis by laser scanning cytometry/ E.Bedner, L.Du, F.Traganos, Z. Darzynkiewicz // *Cytometry.* - 2001. - V.43. - P. 38 - 45.

48. Барановский С.Ф. Термодинамический анализ комплексообразования ароматического лиганда с ДНК в водном растворе/ С.Ф. Барановский, Д.Н. Чернышев А.С. Бучельников, М.П. Евстигнеев, Д.Н. Чернышев// *Био-физика.* - 2011. - Т.56, № 2. - С. 235 - 241.

49. Hopkins H.P. Jr. Temperature dependence of enthalpy changes for ethidium and propidium binding to DNA: Effect of alkylamine chains/H.P.Jr.Hopkins, J. Fumero, W.D.Wilson// *Biopolymers.* - 1990. - V.29, № 2. - P. 449-459.

50. Lane A.N. Thermodynamics of nucleic acids and their interactions with ligands/ A.N. Lane T.C. Jenkins// *Quart. Rev. Biophys.* - 2000. - V. 33, № 3. - P. 255 - 306.

51. Porumb H. The solution spectroscopy of drugs and the drug-nucleic acid interactions / H. Porumb // *Prog. Biophys. Mol. Biol.* - 1978. - V.34. - P. 175 - 195.

52. Waring M.J. Structural requirements for the binding of ethidium to nucleic acids/ M.J.Waring // *Biochim. Biophys. Acta.* - 1966. - V. 114. - P. 234 - 244.

53. LePecq J.B. A fluorescent complex between ethidiumbromide and nucleic acids/ J.B LePecq, C. Paoletti // *J. Mol. Biol.* - 1967. - V. 27. - P. 87 - 106.

54. Nafisi Sh. Stability and structural features of DNA intercalation with ethidium bromide, acridine orange and methylene blue / Sh. Nafisi, A.A. Saboury, N. Keramat, J.F. Neault, H.A.Tajmir-Riahi // *Journal of Molecular Structure.* - 2007. - V.827. - P. 35 - 43.

55. Близнюк Ю.Н. Исследование комплексообразования бромистого этидия с ДНК методом спектроскопии комбинационного рассеяния / Ю.Н. Близнюк, Т.В.Больбух, Е.Б.Круглова, М.А. Семенов, В.Я. Малеев // *Биополимеры и клетка.* - 2009. - Т. 25. - № 2. - С. 126 - 132.

56. Minasyan S.H. Differential pulse voltammetric studies of ethidium bromide binding to DNA / S.H. Minasyan, L.A. Tavadyan, A.P. Antonyan, H.G. Davtyan, M.A. Parsadanyan, P.O. Vardevanyan // *Bioelectrochemistry.* - 2006. - V. 68. - P. 48 - 55.

57. Garland F. Comparative studies of the binding of ethidium bromide and its photoreactive analogs to nucleic acids by fluorescence and rapid kinetics/ F. Garland, D.E. Graves, L.W.Yielding, H.C.Cheung // *Biochemistry.* - 1980. - V.19. - № 14. - P. 3221 - 3226.

58. Monaco R.R. A novel major groove binding site in B-form DNA for ethidium cation / R.R. Monaco // *J. Biomol. Str. Dyn.* - 2007. -V. 25. - № 2. - P.119 - 125.

59. Нечипуренко Ю.Д. Взаимодействия между аналогами антибиотика дис-тамицина А, адсорбированными на ДНК / Ю.Д. Нечипуренко, А.С. Крылов, А.С. Заседателев, Г.В. Гурский // *Молекулярная биология.* - 1984. - Т. 18. - С. 332 - 342.

60. Chaires J.B. Possible origin of differences between van't Hoff and calorimetric enthalpy estimates / J.B. Chaires // *Biophys. Chem.* - 1997. - V. 64. - P. 15-23.

61. Ren J. Energetics of DNA intercalation reactions/ J. Ren, T.C. Jenkins, J.B. Chaires // *Biochemistry.* - 2000. - V. 39. - P. 8439 - 8447.

62. Berman H.M. The interaction of intercalating drugs with nucleic acids/ H.M. Berman, P.R.Young // *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, 1981. - V. 10. - P. 87 -114.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Оценивание параметров моделей

При исследовании молекулярных систем обычно возникает необходимость определения некоторых величин, неизмеряемых непосредственно. Примером могут служить эксперименты по изучению равновесных молекулярных систем, когда одновременно в растворе протекает несколько реакций, и при этом нельзя выделить одну какую-либо молекулярную форму для определения параметров её образования. Исследуется одновременно проявление всех реакций, обычно в виде нелинейной зависимости наблюдаемой переменной Y от контролируемых переменных ξ и ненаблюдаемых параметров θ [1,2]:

$$Y \approx f(\xi, \theta). \quad (\text{A1})$$

Оценивание параметров θ по значениям переменных Y_u и ξ_u ($\xi_{u1}, \xi_{u2}, \dots, \xi_{un}$), измеренным в n экспериментальных точках выполняется в предположении, что функция $f(\xi, \theta)$ известна.

Связь между измеряемыми величинами можно записать так

$$Y_u \approx f(\xi_{1u}, \xi_{2u}, \dots, \xi_{nu}; \theta_1, \theta_2, \dots, \theta_p) + \varepsilon_u,$$

или в более краткой форме

$$Y_u \approx f(\xi_u, \theta) + \varepsilon_u, \quad (\text{A2})$$

где ε_u – ошибка измерения с номером u .

Считаем, что разброс ε_u относительно значений Y , рассчитанных по модели (при тех же ξ_u), описывается нормальным распределением и при этом ε_u не коррелируют.

Сумму квадратов отклонений экспериментальных Y_u и расчетных величин $f(\xi_u, \theta)$ запишем в виде:

$$S(\theta) = \sum_{u=1}^n (Y_u - f(\xi_u, \theta))^2. \quad (\text{A3})$$

Поскольку Y_u и ξ_u фиксированы (переменные ξ_u измеряются с пренебрежимо малой ошибкой по сравнению с ошибкой в определении Y_u), сумма квадратов есть функция от θ . МНК – оценку вектора θ , которая минимизирует $S(\theta)$, обозначают символом $\hat{\theta}$.

Применим метод линеаризации, суть которого заключается в замене нелинейной зависимости $f(\xi_u, \theta)$ приближённой линейной путем разло-

жения её в ряд. В результате удаётся свести сложную задачу нелинейного оценивания к последовательности задач линейного оценивания и получить матрицу оценок параметров, с помощью которых построить доверительные интервалы для параметров модели.

Введем обозначения исходных значений оценок параметров θ : $\theta_{10}, \theta_{20}, \dots, \theta_{p0}$. Начальные значения θ могут быть предварительно оценены на основе любой имеющейся информации. Если разложить функцию $f(\xi_u, \theta)$ в ряд в окрестности точки $\theta_0 = (\theta_{10}, \theta_{20}, \dots, \theta_{p0})$, то можно утверждать, что для близких друг к другу векторов θ и θ_0 приблизительно верно соотношение

$$f(\xi_u, \theta) = f(\xi_u, \theta_0) + \sum_{i=1}^p \left[\frac{\partial f(\xi_u, \theta)}{\partial \theta_i} \right]_{\theta=\theta_0} (\theta_i - \theta_{i0}). \quad (A4)$$

Введя обозначения

$$f_u^0 = f(\xi_u, \theta_0), \quad \beta_i^0 = \theta_i - \theta_{i0}, \quad Z_{iu}^0 = \left[\frac{\partial f(\xi_u, \theta)}{\partial \theta_i} \right]_{\theta=\theta_0},$$

выражение (A2) представим в виде

$$Y_u - f_u^0 = \sum_{i=1}^p \beta_i^0 Z_{iu}^0 + \varepsilon_u.$$

Параметры β_i^0 , можно оценить, применяя теорию линейного МНК.

$$\mathbf{Z}_0 = \begin{pmatrix} Z_{11}^0 & Z_{21}^0 & \dots & Z_{p1}^0 \\ Z_{12}^0 & Z_{22}^0 & \dots & Z_{p2}^0 \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ Z_{1u}^0 & Z_{2u}^0 & \dots & Z_{pu}^0 \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ Z_{1n}^0 & Z_{2n}^0 & \dots & Z_{pn}^0 \end{pmatrix} = \{Z_{iu}^0\} - \text{матрица частных производных (матрица Якоби)}.$$

Пусть $\mathbf{b}_0 = (b_1^0, b_2^0, \dots, b_p^0)^T$ – вектор лучших оценок элементов вектора $\boldsymbol{\beta}$, $\mathbf{Y} - \mathbf{f}^0 = (Y_1 - f_1^0, Y_2 - f_2^0, \dots, Y_n - f_n^0)^T$ – вектор остатков. Тогда оценка вектора $\mathbf{b}_0$ выражается формулой [3,4]:

$$\mathbf{b}_0 = (\mathbf{Z}_0^T \mathbf{Z}_0)^{-1} \mathbf{Z}_0^T (\mathbf{Y} - \mathbf{f}^0). \quad (\text{A5})$$

Следовательно, вектор $\mathbf{b}_0$ будет минимизировать сумму квадратов

$$S(\boldsymbol{\theta}) = \sum_{u=1}^n \left[Y_u - f(\boldsymbol{\xi}_u, \boldsymbol{\theta}_0) - \sum_{i=1}^p \beta_i^0 Z_{iu}^0 \right]^2. \quad (\text{A6})$$

Отметим, что между суммой квадратов (A3), в которой используется нелинейная модель, и суммой (A6), содержащей линейное разложение этой модели, существует несовпадение (доли процентов).

При последующем уточнении параметров $\boldsymbol{\theta}$ величины θ_{il} могут выполнять ту же роль, что и прежде величины θ_{i0} . Можно продолжить уточнение параметров тем же способом (описанным выше), используя уравнения (A4) и (A6), в которых все нулевые индексы (θ_{i0}) должны быть заменены на единичные (θ_{i1}). Это приведет к другому набору уточнённых оценок θ_{i2} и т.д. Обобщая прежние обозначения, можно записать их в векторной форме:

$$\begin{aligned} \boldsymbol{\theta}_{j+1} &= \boldsymbol{\theta}_j + \mathbf{b}_j, \\ \boldsymbol{\theta}_{j+1} &= \boldsymbol{\theta}_j + (\mathbf{Z}_j^T \mathbf{Z}_j)^{-1} \mathbf{Z}_j^T (\mathbf{Y} - \mathbf{f}^j), \end{aligned} \quad (\text{A7})$$

где $\mathbf{Z}_j = \{Z_{iu}^j\}$, $\mathbf{f}^j = (f_1^j, f_2^j, \dots, f_n^j)^T$, $\boldsymbol{\theta}_j = (\theta_{1j}, \theta_{2j}, \dots, \theta_{pj})$.

Индекс (j) означает, что расчёт производится на j -м шаге поиска минимума. Итеративный процесс продолжается до тех пор, пока последовательные итерации $j, j+1$ не будут удовлетворять условию

$$\left| \left\{ \theta_{i(j+1)} - \theta_{ij} \right\} / \theta_{ij} \right| \leq \varepsilon,$$

где $i = 1, 2, \dots, p$, ε есть некоторая наперед заданная малая величина (например, 10^{-6}). Вычисляя для каждой итерации сумму $S(\boldsymbol{\theta}_j)$, проверяем, происходит ли её уменьшение.

Показателем устойчивости параметров нелинейной модели $\hat{\boldsymbol{\theta}}$ к малым вариациям вектора исходных данных $\mathbf{Y}$ может служить выражение [4, 5]:

$$\left\| \frac{d\mathbf{b}_i}{d\mathbf{Y}} \right\| \approx \sqrt{(\mathbf{Z}_0^T \mathbf{Z}_0)^{-1}_{ii}}, \quad i=1, \dots, p. \quad (\text{A8})$$

На практике замечено, что для точек, далеких от глобального минимума, правая часть (A8) является достаточно большой. Таким образом, величины $\sqrt{(Z_0^T Z_0)_{ii}^{-1}}$ могут служить своеобразным индикатором качества решаемой задачи. Это является вполне обоснованным, так как в статистике $\sqrt{S_{ocm}^2 (Z_0^T Z_0)_{ii}^{-1}}$ используется как стандартная ошибка i -го параметра модели для приближённой интервальной оценки $\bar{\theta}_i$. Обычно её выражают аналогично тому, как принято в линейном регрессионном анализе [1, 3, 4]: $\hat{\theta}_i \pm t(\sim, n - p) \cdot \sqrt{S_{ocm}^2 (Z_0^T Z_0)_{ii}^{-1}}$, где $t(\sim, n - p)$ - коэффициент, зависящий от полного количества измерений n , количества неизвестных параметров p и заданного значения доверительной вероятности (уровня значимости) α ; S_{ocm}^2 - остаточная дисперсия.

Процедура линеаризации имеет недостатки, наблюдающиеся при решении некоторых конкретных задач. Она может приводить к сильным колебаниям, т.е. периодическому увеличению и уменьшению суммы квадратов. Тем не менее, на конечном этапе решение может стабилизироваться. Процедура может вообще не сходиться и даже расходиться, так что сумма квадратов от итерации к итерации будет увеличиваться. Для преодоления этих недостатков в программах предусматривают возможность изменения длины вектора $\mathbf{b}_j$ в уравнении (A7).

Хотя теоретически этот метод сходится всегда, на практике могут возникать трудности, связанные с моделями. Нелинейность моделей может приводить к “выбросам”, несмотря на то, что длина вектора $\mathbf{b}_j$ корректируется.

Несмотря на недостатки, метод линеаризации позволяет решать многие нелинейные задачи. В тех случаях, когда это не удастся, надо рассматривать альтернативы, например, метод Марквардта.

Метод Марквардта. Альтернативой методу линеаризации может быть широко используемый для решения задач типа (A3) метод Марквардта, являющийся комбинацией метода с разложением модели в ряд Тейлора и метода наискорейшего спуска (Дополнение 1) [4]. Отметим, что уравнение (A5) верно только для малых невязок. Но, если степень нелинейности модели велика, и стартовые значения искомых параметров далеко отстоят от минимизирующих значений (направление градиентного спуска может оказаться далеко от оптимального), велика вероятность “раскачки”, расходимости итерационного процесса, плохой определенности матрицы $\mathbf{Z}_j^T \mathbf{Z}_j$.

В работе [4] была предложена процедура, “слегка подправляющая” матрицу $\mathbf{Z}_j^T \mathbf{Z}_j$, делая её положительно определённой, путём добавления к

$\mathbf{Z}_j^T \mathbf{Z}_j$ единичной матрицы. В вычислительной математике идея подобной поправки составляет суть решения некорректных задач [5, 6].

Марквардт несколько модифицировал этот подход. Он предложил вместо единичной матрицы в качестве “довеска” брать диагональную матрицу с количеством элементов, совпадающим с диагональными элементами матрицы $\mathbf{Z}_j^T \mathbf{Z}_j$.

Было предложено искать вектор $\mathbf{b}_0$ из уравнения:

$$\mathbf{b}_0 = (\mathbf{Z}_0^T \mathbf{Z}_0 + v^2 \mathbf{I})^{-1} \mathbf{Z}_0^T (\mathbf{Y} - \mathbf{f}^0). \quad (\text{A9})$$

Здесь $\mathbf{I}$ – единичная матрица размера $(p \times p)$, а v – некоторая величина (может быть, равная нулю), называемая числом Марквардта или параметром регуляризации. Этот параметр назначается на каждой итерации алгоритма.

Дополнение 1.

О методе наискорейшего спуска (метод поиска минимума невязки), в котором наряду со значениями суммы квадратов $S(\boldsymbol{\theta})$ используется и её градиент $\nabla S(\boldsymbol{\theta})$. В произвольной точке пространства параметров $\boldsymbol{\theta}$ градиент $\nabla S(\boldsymbol{\theta})$ направлен в сторону наиболее быстрого возрастания невязки. Противоположное ему направление, которое часто называют антиградиентом, представляет собой направление наиболее быстрого убывания невязки. Модуль градиента $|\nabla S(\boldsymbol{\theta})|$ определяет скорость возрастания и убывания суммы $S(\boldsymbol{\theta})$ в направлении градиента и антиградиента. Для всех остальных направлений скорость изменения невязки в точке пространства параметров $\boldsymbol{\theta}$ меньше модуля градиента. Основная идея метода градиентного спуска состоит в том, чтобы двигаться к минимуму в направлении наиболее быстрого убывания невязки, которое определяется антиградиентом. Эта идея реализуется следующим образом.

Выберем начальную точку, вычислим в ней $\nabla S(\boldsymbol{\theta})$ и сделаем небольшой шаг в обратном направлении $-\nabla S(\boldsymbol{\theta})$. В результате мы придем в точку, в которой значение невязки будет меньше первоначального. В новой точке повторим процедуру: снова вычислим градиент $\nabla S(\boldsymbol{\theta})$ и сделаем шаг в обратном направлении. Продолжая этот процесс, мы будем двигаться в сторону убывания невязки.

Вычисление градиента на каждом шаге, позволяющее всё время двигаться в сторону убывания суммы $S(\boldsymbol{\theta})$, может в то же время замедлить вычислительный процесс. Дело в том, что подсчёт $\nabla S(\boldsymbol{\theta})$ – обычно гораздо более сложная операция, чем подсчет суммы $S(\boldsymbol{\theta})$. Поэтому часто пользуются модификацией градиентного метода, получившей название метода наискорейшего спуска.

Согласно этому методу, после вычисления в начальной точке $\nabla S(\boldsymbol{\theta})$ делают в направлении антиградиента не маленький шаг, а движутся до тех пор, пока невязка убывает. Достигнув точки минимума на выбранном направлении, снова вычисляют градиент суммы квадратов и повторяют описанную процедуру. При этом градиент вычисляется гораздо реже, только при смене направлений движения.

Метод наискорейшего спуска работает хорошо в той области параметрического пространства, которая находится вдали от искомой точки $\hat{\boldsymbol{\theta}}$, что обычно имеет место на ранних итерациях. По мере приближения к точке $\hat{\boldsymbol{\theta}}$ с помощью этой процедуры происходит зигзагообразное движение, тогда как метод линеаризации работает лучше. Процедура Марквардта учитывает эти обстоятельства.

Основная идея метода Марквардта заключается в том, чтобы при высокой степени нелинейности, пока «расстояние» между итеративным и искомым решением значительно, использовать большие значения ν (метод наискорейшего спуска), а при приближении к искомому решению постоянно уменьшать значение ν (метод линеаризации), что позволяет достаточно быстро достичь желаемого минимума.

Для «настройки» программы (числа ν) Марквардтом был предложен следующий алгоритм:

1. Принять $\tau = \sqrt{0,001}$ ($\tau^2 = 0,001$) за исходное значение;
2. На каждом шаге увеличивать ν в $\sqrt{10}$ раз (ν^2 в 10 раз) до тех пор, пока $S(\theta)$ не начнет уменьшаться;
3. Увеличив значение ν в $\sqrt{10}$ раз (ν^2 в 10 раз), принять полученную величину за новое исходное значение (уменьшится при этом значение $S(\theta)$ или нет, зависит от степени нелинейности).

Если в результате вычислений невязка уменьшилась, принять текущий шаг и уменьшить ν^2 в 10 раз, чтобы понизить влияние градиентного спуска. При $\nu \rightarrow 0$ приходим к методу линеаризации, а при достаточно больших ν получаем метод градиентного спуска.

Ответ на вопрос о том, является ли найденное значение минимума глобальным, может быть получен лишь путем перебора ряда других начальных значений искомых параметров.

В предлагаемой программе 1 используется вместо градиента якобиан, т. е. матрица частных производных $\mathbf{Z}_0$, позволяющая получить больше информации о рельефе минимизируемой функции, чем её градиент. Якобиан позволяет оптимально выбирать шаг минимизации на основе имеющейся информации о рельефе функции, дает возможность решать задачу при меньшем числе итераций, чем какой-либо другой метод. Расчет матрицы Якоби ведётся методом численного дифференцирования. Хотя, при сильно нелинейной модели желательно использовать аналитические формулы для вычисления производных, не прибегая к аппроксимационным вычислениям в конечных разностях.

С целью уменьшения погрешности вычислений в программе используется не исходная система уравнений Марквардта (A9), а эквивалентная ей:

$$\mathbf{b}_0 = (\tilde{\mathbf{Z}}_0^T \tilde{\mathbf{Z}}_0 + \tau^2 \mathbf{I})^{-1} \tilde{\mathbf{Z}}_0^T (\tilde{\mathbf{F}}), \quad (\text{A10})$$

где $-\mathbf{F} = \mathbf{Y} - \mathbf{f}^0$ – вектор остатков; $\tilde{\mathbf{Z}}_0 = \begin{bmatrix} \mathbf{Z}_0 \\ \nu \mathbf{I} \end{bmatrix}$, $\tilde{\mathbf{F}} = \begin{bmatrix} \mathbf{F} \\ \mathbf{0} \end{bmatrix}$ – расширенные матрицы.

Различия между системами уравнений (A9) и (A10) сводятся к созданию во втором случае:

а) расширенной матрицы Якоби $\tilde{\mathbf{Z}}_0$ путем присоединения к $\mathbf{Z}_0$ матрицы $\mathbf{v}_f$ размера $(p \times p)$;

б) расширенного вектора остатков $\tilde{\mathbf{F}}$, получаемого путем присоединения к исходному вектору $\mathbf{F}$ нулевой компоненты $\mathbf{0}$ длины p .

Дополнительно введенные соотношения не изменяют конечного результата, но позволяют избежать решения плохо обусловленных задач (вычисления матриц), возникающих в ходе итерационных процедур, т.е. эти матрицы более численно устойчивы.

Одной из проблем, возникающих при решении нелинейных уравнений методом последовательных приближений, является выбор правила останова итеративного процесса, т.е. выбор критерия сходимости. В предложенной программе 1 порядок критерия сходимости находится в пределах $10^{-6} \dots 10^{-8}$.

Список переменных в программе 1:

$M = m$ – число элементов в выборке или число точек измерения.

$N = n = p$ – число параметров.

$EPS = \epsilon$ – значение критерия сходимости.

$H = h$ – шаг дифференцирования.

$fe(i)$ – экспериментальные значения оптической плотности.

$V_0(i)$ – концентрация исследуемых молекул.

ri – коэффициент возрастания числа Марквардта.

rd – коэффициент уменьшения числа Марквардта.

$V = \tau$ – число Марквардта.

$f(i)$ – остатки.

RS – сумма квадратов остатков, полученная на предыдущей итерации.

$A(I, J) \dots$ – элементы расширенной матрицы Якоби.....

$D(I, J)$ – элементы матрицы $\mathbf{Z}_0^T \mathbf{Z}_0$ или $\tilde{\mathbf{Z}}_0^T \tilde{\mathbf{Z}}_0$, или $\tilde{\mathbf{Z}}_0^T \tilde{\mathbf{Z}}_0 + \tau^2 \mathbf{I}$,

затем элементы обратной матрицы. .

SN – сумма квадратов остатков текущей итерации.

IT – счётчик основной итерации.

$C(j)$ – оценки параметров.

$A(j)$ – стандартные ошибки параметров.

E – несмещенная оценка дисперсии.

AR – коэффициент детерминации.

RSS – "остаточная" сумма квадратов остатков (оценка разницы между экспериментальными данными и оценочной моделью) – значение целевой функции.

ПРОГРАММА 1

```

key(1) on: on key(1) gosub 1498: DEFDBL A-Z
rem МЕТОД МАРКВАРДТА
rem СПЕКТРОФОТОМЕТРИЯ
rem АССОЦИАЦИЯ ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ
m=14:n=3
n1=n+1: n2=n+2: m1=m+n: m2=m1+1: m3=m2+1
dim c(n+1),f(m+1),a(m3+1,n2+1),d1(m+1),fe(m+1),d3(m+1),v1(m),fc(m)
dim z(m+1),d(n+1,n1+1),u(n+1),v(n+1),ff(m+1),yy(m+1),V0(m),v7(m) eps=1E-8: h=1E-5
t0=2.16
ri=sqr(10): rd=sqr(.01)
read c(1),c(2),c(3): rem Начальные значения параметров
data 10,100,10
for i=1 to m
read V0(i),fe(i): rem
data 39.0e-3, 16600
data 3.38e-3, 26300
data 2.82e-3, 26600
data 2.04e-3, 27500
data 1.29e-3, 30400
data 7.08e-4, 31800
data 3.467e-4, 35600
data 3.55e-5, 39900
data 3.24e-5, 40000
data 7.94e-5, 40500
data 4.17e-6, 41900
data 3.39e-6, 41800
data 1.9e-6, 41800
data .55e-6, 41000
next i
it=1
gosub 2000
v=sqr(.001)
sn=0: for i=1 to m: sn=sn + f(i)^2: next i
1 rs=sn
print : print "rss="; rs
for i=1 to m: a(i,n1)=f(i): next i
gosub 1000
for i=1 to n
for j=1 to n1: a(m + i,j)=0: next j
a(m+i,i)=v
next i
ic=0
2 gosub 1500
gosub 3000
for i=1 to n: s=0
for j=1 to n: s=s+d(i,j)*d(j,n1): next j
a(i,n2) = -s
next i

```

```

for i=1 to n
a(m3,i)=c(i)+a(i,n2): a(m2,i)=c(i): c(i)=a(m3,i)
next i
gosub 2000
for i=1 to n: c(i)=a(m2,i): next i
sn=0
for i=1 to m
sn=sn+f(i)^2
next i
p=abs(c(1)) : pp=abs(a(1,n2))
if n=1 then 3
for i=2 to n
if abs(c(i)) > p then p = abs(c(i))
if abs(a(i,n2)) > pp then pp = abs(a(i,n2))
next i
3 if p < 1 then p=1
if rs < sn then sw = 1 else sw = 0
if pp<=eps*p then 6
if sw=0 then 4
v=v*ri : print "v=";v,
print rs
ic=ic+1
goto 2
4 for i=1 to n
c(i)=a(m3,i)
next i
rem print "-----"
print "it=";it : print
for i=1 to n
print "c(";i;")="; c(i)
next i
if ic>0 then 5
v=v*rd
print
print "v="; v
5 it=it+1
goto 1
6 rem оптимальное решение
print "it=";it; "; " "число МАРКВАРДТА v = " v
if sw=1 then sn=rs
goto 7
for i=1 to n
c(i)=a(m3,i)
next i
gosub 1000
7 rem
e=sn/(m - n)
for i=1 to n
for j=1 to n

```

```

s=0
for k=1 to m
s=s+a(k,j)*a(k,i)
next k
d(i,j)=s
next j
next i
gosub 3000
for i=1 to n
sd=t0*sqr(ABS((e*d(i,i))))
rem Оптимальное решение
print "оценка параметра c(";i;")= "; using "#####.###"; C(I)
print "погрешность c(";i;"); t0*SD a(";i;")= "; using "#####.###"; sd    next i
ym=0
for i=1 to m
? using "#####.#####";V0(i);fe(i);fc(i);fe(i)-fc(i)
ym=ym+fe(i)
next i
ym=ym/m
yd=0
for i=1 to m
yy(i)=(fe(i)-ym)^2
yd=yd+yy(i)
next i
ar=1-(m-n-1)*sn/yd
s=0
s1=0
for i=2 to m
s=s+(f(i)-f(i-1))^2
s1=s1+(f(i))^2
next i
print "rss ="; sn
print "Коэф.детерминации.="; ar
print "критерий Дарбина -Уотсона =" S/S1
goto 4000
1000 rem *****подпрограммы дифференцирования *****
    for I =1 to m
    a(i,n1) = f(i)
    next i
    for j=1 to n
    c(j)=c(j) - h
    gosub 2000
    for i=1 to m
    a(i,n2) = f(i)
    next i
    c(j)=c(j)+2*h
    gosub 2000
    for i=1 to m
    a(i,j)=(f(i) - a(i,n2))/(2*h)

```

```

        next i
        c(j)=c(j)-h
    next j
return
1498 ? " *** "
1499 t$=inkey$:if t$="" then 1499
? " ** ":stop
1500 rem _____
for i=1 to n
for j=1 to n
s=0
for k=1 to m1
s=s+a(k,i)*a(k,j)
next k
d(i,j)=s
d(j,i)=s
    next j
    next i
    for i=1 to n
    s=0
    for k=1 to m1
    s=s+a(k,i)*a(k,n+1)
    next k
    d(i,n1)=s
    next i
    for i=1 to n
    d(i,i)=d(i,i)+v*v
    next i
return
2000 rem _____Вычисление целевой функции_____
c(1)=abs(c(1))
c(2)=abs(c(2))
c(3)=abs(c(3))
for i1=1 to m
t7= 1/(4*C(1))
t8=-1+sqr(1+8*V0(i1)*C(1))
v7(i1)=t7*t8
fc(i1)=v7(i1)*C(2)/V0(i1)+C(3)*(2*C(1)*v7(i1)^2)/V0(i1)
f(i1)=fe(i1)-fc(i1)
next i1
return
3000 rem ----- Обращение матрицы -----
for i=1 to n
u(i)=0 : v(i)=0
next i
for k=1 to n
xm=0
for j=1 to n
if u(j)<>0 then 3002

```

```

for i=1 to n
  if v(i)<>0 or abs(d(i,j))<xm then 3001
    xm=abs(d(i,j)) : q=j : r=i
3001 next i
3002 next j
    u(q)=r : v(r)=q
    for j=1 to n
      if j=q then 3004
        d(r,j)=d(r,j)/(d(r,q))
        for i=1 to n
          if i=r then 3003
            d(i,j)=d(i,j)-d(r,j)*d(i,q)
3003 next i
3004 next j
        d(r,q)=1/(d(r,q))
        for i=1 to n
          if i=r then 3005
            d(i,q)=-d(r,q)*d(i,q)
3005 next i
        next k
        for k=1 to n
          if k=u(k) then 3006
            for j=1 to n
swap d(k,j),d(u(k),j)
            next j
            for i=1 to n
              swap d(i,k),d(i,v(k))
            next i
            u(v(k))=u(k) : v(u(k))=v(k) : u(k)=k : v(k)=k
3006 next k
    return
4000 end
it= 11 ; число МАРКВАРДТА v = 3.162277660168381E-007
оценка параметра c( 1 )= 415.994
погрешность c( 1 ); t0*SD a( 1 )= ± 116.746
оценка параметра c( 2 )= 41426.050
погрешность c( 2 ); t0*SD a( 2 )= ± 620.468
оценка параметра c( 3 )= 12449.326
погрешность c( 3 ); t0*SD a( 3 )= ± 2200.330
0.03900000 16600.00000000 17109.32798815 -509.32798815
0.00338000 26300.00000000 25328.48771559 971.51228441
0.00282000 26600.00000000 26174.07428498 425.92571502
0.00204000 27500.00000000 27736.91074316 -236.91074316
0.00129000 30400.00000000 30007.43525208 392.56474792
0.00070800 31800.00000000 32913.17653948 -1113.17653948
0.00034670 35600.00000000 35935.23523263 -335.23523263
0.00003550 39900.00000000 40617.31191502 -717.31191502
0.00003240 40000.00000000 40684.41331000 -684.41331000
0.00007940 40500.00000000 39729.44367160 770.55632840

```

0.00000417	41900.00000000	41326.21044113	573.78955887
0.00000339	41800.00000000	41344.78113802	455.21886198
0.00000190	41800.00000000	41380.38898391	419.61101609
0.00000055	41000.00000000	41412.80307975	-412.80307975

rss = 5406095.75899248

коэф. детерминации = .93433221

критерий Дарбина – Уотсона = 1.7894159

Прямой метод поиска минимума невязки

К прямым методам поиска относят методы, в которых для отыскания минимума невязки не используются производные первого и высших порядков. В этих методах направления поиска определяются на основе последовательных вычислений значений целевой функции. В большинстве случаев при решении задач нелинейного программирования градиентные методы сходятся быстрее, чем прямые методы. Вместе с тем, применение на практике градиентных методов приводит к некоторым трудностям. В задачах с достаточно большим числом переменных довольно трудно получить производные невязки в виде аналитической функции. Вычисление аналитических производных можно заменить вычислением производных с помощью разностных схем, но возникающая при этом ошибка, особенно в области экстремума, может ограничить применение подобной аппроксимации. Методы прямого поиска не требуют непрерывности целевой функции, а также необходимости существования производной.

При использовании методов, основанных на вычислении первых и вторых производных, по сравнению с прямыми методами поиска требуется достаточно большое время на подготовку задачи к решению.

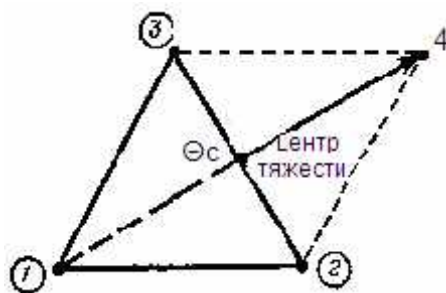


Рис. А1. Симплекс для двух независимых переменных.

- ① обозначает вершину с наихудшим значением целевой функции;
4 – вершина нового симплекса

Рассмотрим алгоритм прямого поиска с использованием регулярного симплекса. Регулярный симплекс в p -мерном пространстве искомых параметров – это многогранник, содержащий $p + 1$ равноотстоящие друг от друга вершины. В случае двухпараметрической задачи – это треугольник (рис. А1), в трёхмерном пространстве – тетраэдр. Схемы поиска с использованием симплексов основаны на слежении за изменением значений целевой функции в их вершинах (в нашем случае

целевая функция – функция – невязки $S(\theta)$). Главным в этих схемах является процесс отражения – нахождение вершины нового симплекса, расположенной симметрично относительно плоскости, проходящей через одну

из сторон исходного симплекса. Выбор направления поиска вершины нового симплекса определяется положением той вершины исходного симплекса, в которой целевая функция имеет наихудшее значение (наибольшее значение $S(\theta)$) и центром тяжести остальных вершин (рисунок А1). Новая точка называется "дополнением" наихудшей точки. Если в только что полученной вершине нового симплекса значение целевой функции оказывается худшим, то алгоритм предусматривает возврат в исходную точку – вершину прежнего симплекса. Затем осуществляется переход к той вершине прежнего симплекса, в которой целевая функция имеет следующее по величине значение, и отыскивается точка, являющаяся ее дополнением. Такой алгоритм обеспечивает систематическое смещение центра симплекса в направлении экстремума целевой функции. Поиск завершается, когда размеры симплекса становятся достаточно малыми, или разности между значениями целевой функции в вершинах симплекса меньше заданной величины.

Недостатки:

- необходимо введение масштабирования, чтобы значения переменных были сравнимы по величине;
- алгоритм достаточно медленно сходится, т. к. в нём не используется информация с предыдущей итерации;
- отсутствие ускорения поиска при проведении поиска на искривлённых участках с узким "оврагом" или "хребтом". Если симплекс по какой-либо причине уменьшается, поиск продолжается, только уже с уменьшенной величиной шага.

Для повышения эффективности симплексного метода используют информацию о построенной модели. Используя эту информацию, можно уменьшить или увеличить размерность решаемой задачи (изменить размерность симплекса), отбрасывая или добавляя соответствующие существенные или несущественные параметры. Такой подход можно применять и при решении задач минимизации функционалов при наличии ограничений.

Рассмотрим известные варианты метода симплексной оптимизации, например, метод Нелдера и Мида [7, 8]. Основная идея метода Нелдера и Мида заключается в расширении симплекса при удачных шагах итерационного процесса и сжатии при неудачных. Алгоритм работы следующий. Сначала строится исходный симплекс путем введения в программу начальных значений искомых параметров модели.

Затем вычисляются значения целевой функции в вершинах симплекса. Из полученных значений выбираются вершины с минимальным (лучшим) $S_\ell(\theta)$ и максимальным (худшим) $S_m(\theta)$ значениями целевой функции в вершинах V_ℓ и V_m соответственно. Определяют положение центра тяжести симплекса, исключая наихудшую точку. Вершина V_m заменяется новой

одним из четырёх способов: отражением, расширением, редукцией или сжатием (рис. А2).

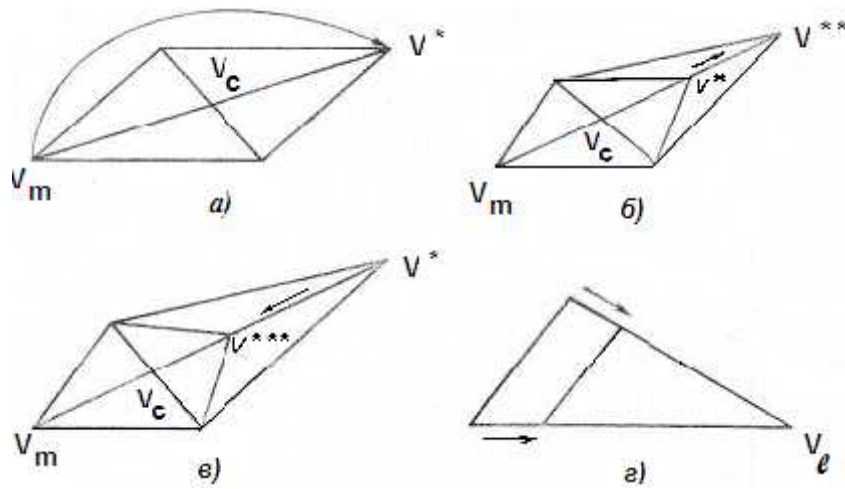


Рис. А2. Симплексный метод: а - отражение; б - расширение; в - сжатие; г - редукция

Отражение (рис. А2, а) осуществляется согласно соотношению

$$\theta_{i,*} = \theta_{c,i} + \alpha (\theta_{c,i} - \theta_{m,i}), \quad i = 1, 2, \dots, p,$$

где $\theta_{i,*}$ – координаты новой вершины V^* ; $\theta_{m,i}$ – координаты старой вершины V_m ; $\theta_{c,i}$ – i -координата центра тяжести без вершины V_m ; α – коэффициент отражения.

Если отражение оказалось успешным, т.е. значение целевой функции в вершине V^* оказалось меньше $S_\ell(\theta)$, то симплекс расширяется (рис. А2, б) в этом направлении:

$$\theta_{i,*,*} = \theta_{c,i} + \gamma (\theta_{i,*} - \theta_{c,i}),$$

где $\gamma > 1$ – коэффициент расширения; $i = 1, 2, \dots, p$. При удачном расширении вершина V_m окончательно заменяется на V^{**} , а при неудачном – на V^* .

Если отражение неудачно, т.е. значение целевой функции в новой точке больше, чем $S_m(\theta)$, то симплекс сжимается (рис. А2, в) по направлению к V_c :

$$\theta_{i,*,*,*} = \theta_{c,i} + \beta (\theta_{i,*} - \theta_{c,i}),$$

где $\beta < 1$ – коэффициент сжатия; $i = 1, 2, \dots, p$.

Если сжатие также неудачно, то симплекс сжимается к вершине V_ℓ с минимальным значением целевой функции – производится операция ре-

дукции (рис. 2А, г, редукция симплекса к вершине V_ℓ) – уменьшение длин всех ребер:

$$\bar{c}_i^j = (\bar{c}_i^j - \bar{c}_i^\ell) \cdot 0,5 + \bar{c}_i^\ell,$$

где $j = 1, 2 \dots p+1$; $i = 1, 2 \dots p$.

В этом случае, прежде чем продолжить итерации, координаты вершин, за исключением V_ℓ , заменяются на новые: $\theta_i^j = (\theta_i^j - \theta_i^\ell) \cdot 0,5$.

Стратегия поиска определяется значениями коэффициентов α , β и γ ($\alpha = 1$; $\beta = 0,5$; $\gamma = 2$ – рекомендация авторов [7]).

Критерий окончания поиска состоит в проверке условия:

$$\sqrt{\left\{ \frac{1}{p+1} \sum_{i=1}^{p+1} [S(\theta_i^k) - S(\theta_c^k)]^2 \right\}} \leq \varepsilon,$$

где k – номер итерации; $s(\theta_c^k)$ – значение целевой функции в центре тяжести; $\varepsilon > 0$ – заданное малое число. Можно использовать и другие критерии окончания поиска. Выбор критерия прекращения поиска диктуется конкретной спецификой решаемой задачи.

Метод Бокса. Идейно близким к симплексным методам с отображением одной вершины является метод Бокса [7], предложенный для задач нелинейного программирования с ограничениями типа неравенств. В этом методе вместо вершин симплекса используется произвольный набор вершин, принадлежащих области допустимых значений. Бокс выбрал многогранник с более чем $(p+1)$ вершинами и назвал его комплексом, соответствующее название имеет и сам метод – комплексный.

При решении задач типа (А3) θ определяется явными ограничениями

$$\ell_j \leq \theta_j \leq u_j \text{ при } j=1, 2, \dots, p, \quad (\text{A11})$$

а также неявными ограничениями

$$g_i(\theta) \leq b_i \text{ при } i=1, 2, \dots, 2p. \quad (\text{A12})$$

Если целевая функция $S(\theta)$ выпукла, и $g_i(\theta)$ тоже выпуклы, то задача имеет единственное решение. Значения ℓ_j и u_j являются нижней и верхней границами переменных. В данном методе предполагается, что значения p , m , ℓ_j и u_j и вектор столбец начальных точек θ_1 , удовлетворяющих всем ограничениям, известны. Число вершин в комплексе Бокс положил равным $2p$.

Если θ_1 задан, то остальные точки, удовлетворяющие неравенству (A11), могут быть получены следующим образом:

$$\theta_{ij} = \ell_j + r(u_i - \ell_j) \quad (\text{A13})$$

для $j = 1, 2, \dots, p$, и $i = 1, 2, \dots, 2p$, где r – псевдослучайная равномерно распределенная переменная в интервале (0; 1). В программе 2 переменная r задана с помощью оператора *RND*.

Координаты вершины, выбираемые в соответствии с уравнением (A13) для данного i , будут автоматически удовлетворять неравенству (A11). Если эти точки удовлетворяют также неравенству (A12), они принимаются в качестве начальных точек. В случае нарушения ограничений (это может произойти для неравенств (A12)), вершина комплекса сдвигается на половину расстояния к центру тяжести построенного комплекса, то есть формируются координаты новой вершины $\theta'_i = (\theta_1, \theta_2, \dots, \theta_p)^T$ согласно выражению

$$\theta'_i = (\theta_i - \theta_c) * 0,5, \quad (\text{A14})$$

где θ_c – вектор-столбец координат центра тяжести комплекса на этапе его начального формирования.

Если координаты вершины, полученные с помощью соотношения (A14), всё еще не являются допустимыми, то описанная процедура (A14) повторяется вновь до тех пор, пока её координаты не будут принадлежать области допустимых значений. Аналогично корректируется положение и других вершин комплекса, если их координаты не удовлетворяют ограничивающим неравенствам.

В программе 2 вершины комплекса упорядочиваются в соответствии со значениями целевой функции $S(\theta)$. Процедура инициализации вершин комплекса реализуется в программе операторами в строках с номерами до 1000. Затем следует итерационный поиск минимума $S(\theta)$ внутри области ограничений. Согласно этой процедуре необходимо:

1. Найти вершину комплекса с наибольшим значением целевой функции $S_m(\theta)$, а также центр тяжести θ_0 остальных $(2p - 1)$ вершин.
2. С помощью операции отражения

$$\theta_r = \theta_0 + \alpha(\theta_0 - \theta_m)$$

получить новую вершину с координатами θ_r , используя коэффициент отражения $\sim$.

3. Проверить, являются ли координаты θ_r новой точки допустимыми.

а) Если координаты θ_r не являются допустимыми и не выполняется ограничение для ℓ_j , то полагаем $\theta_{rj} = \ell_j + 10^{-6}$; если не выполняется ограничение для u_j , то полагаем $\theta_{rj} = u_j - 10^{-6}$.

б) Если не выполняются неявные ограничения, то вершину (с координатами θ_r) перемещают на половину расстояния между точкой θ_r и центром θ_0 , т.е. θ_r (новое) = $(\theta_r + \theta_0)/2$. Затем производится повторная проверка на допустимость и шаг 3 повторяется до тех пор, пока не будет получена допустимая точка.

4. Если точка θ_r является допустимой, то вычисляется $S(\theta_r)$ и сравнивается с $S(\theta_m)$ - наибольшим значением невязки, полученным ранее. При $S(\theta_r) > S(\theta_m)$ точка θ_r смещается к центру θ_0 на половину расстояния между ними, т.е. θ_r (новое) = $(\theta_r + \theta_0)/2$ и процесс возвращается на шаг 3.

5. Если $S(\theta_r) < S(\theta_m)$, то координаты θ заменяются на θ_r , затем координаты вершин и значения целевых функций в вершинах комплекса снова упорядочиваются.

6. Вычисляются две величины, используемые при проверке сходимости метода: среднее квадратичное отклонение σ^2 для $2p$ значений целевой функции и минимальное расстояние d_m между двумя точками (вершинами) комплекса. Первая величина вычисляется в строках 3000 - 3040, а вторая – в строках 3100 - 3200.

7. Величины σ^2 и d_m проверяются на сходимость. Если обе эти величины достаточно малы, то процедура поиска минимума заканчивается. В противном случае необходимо вернуться на шаг 1, повторить процедуру.

Рассмотренные шаги 1-7 реализованы в программе до оператора в строке 3800. В случае сходимости, решение находится в строках 4000 - 4100.

Целевая функция вычисляется в подпрограмме, начинающейся с оператора 5000. Ограничения проверяются в подпрограмме, начинающейся с оператора 6000. Переменная IC=1 указывает на то, что были нарушены неявные, а переменная EC=1 – на то, что были нарушены явные ограничения. Массивы EC(J), $J = 1, 2, \dots, 2p$, и IC(L), $L = 1, 2, \dots$, указывают на конкретные ограничения, которые были нарушены.

Выбор числа вершин комплекса $2p$ и $\sim = 1,3$ является эмпирическим правилом, предложенным Боксом. Число вершин делает метод более гибким, давая возможность комплексу двигаться в различных направлениях. Кроме того, число вершин в некоторой степени препятствует вырождению комплекса, т.е. стягиванию его в подпространство размерности, меньшей p . Коэффициент отражения $\sim > 1$ позволяет комплексу расширяться и перемещаться в нужном направлении. Перемещения вершин на половину расстояния от исходных положений к центру сжимают комплекс. Поэтому комплекс может перемещаться внутри допустимой области вдоль границ и огибать углы в местах пересечения ограничений.

ПРОГРАММА 2

```

rem метод БОКСА
rem СПЕКТРОФОТОМЕТРИЯ
rem Программа с явными и неявными ограничениями"
rem АССОЦИАЦИЯ ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ
  key(1) on: on key(1) gosub 5200 :DEFDBL A-Z
  cls
  m=14: n=3: k=2*n: pp=0: a=1.3: iks = 1E10
option base 1
dim v(m),ye(m),v1(m),y5(m),y9(m),yp(m)
dim x(n),y(n),l(n),u(n),xc(n),xo(n),xr(n),xh(n)
dim c(k,n),f(k),g(m),ic(m),ec(2*n),yy(m+1)
for i=1 to m
  read v(i),ye(i): next I
  data 39.0e-3, 16600
  data 3.38e-3, 26300
  data 2.82e-3, 26600
  data 2.04e-3, 27500
  data 1.29e-3, 30400
  data 7.08e-4, 31800
  data 3.467e-4, 35600
  data 3.55e-5, 39900
  data 3.24e-5, 40000
  data 7.94e-5, 40500
  data 4.17e-6, 41900
  data 3.39e-6, 41800
  data 1.9e-6, 41800
  data .55e-6, 41000
rem Значения верхних и нижних границ
for j=1 to n:
  read l(j),u(j)
  ? using "#####.### ";l(j);u(j):next j
  data 0,1000,.0,50000,0,40000
  input "x";x:if x=1 then 480
  rem          Ввод нач.значений
480 for j=1 to n:x(j)=(l(j)+u(j))/2:c(1,j)=x(j):xc(j)=x(j):next j
?
cls
490
500 i=1
fe=0
520 gosub 5000:f(1)=z
600 i=i+1
620 for j=1 to n:c(i,j)=l(j)+rnd(77)*(u(j)-l(j)):x(j)=c(i,j):next j
640 im=1:gosub 6000
660 if ic=1 then goto 720
rem Рассчитать координаты " центра тяжести"
680 for j=1 to n:xc(j)=((i-1)*xc(j)+c(i,j))/i:next j
700 goto 760
720 for j=1 to n:c(i,j)=(c(i,j)+xc(j))/2:x(j)=c(i,j):next j

```

```

740 goto 640
760 gosub 5000:f(i)=z
780 if i<k goto 600
rem Упорядочить вершины комплекса в соответствии со значениями целевой функции
800 for j=1 to (k-1)
820 for i=j+1 to k
840 if f(j)<=f(i) goto 900
860 f=f(j):f(j)=f(i):f(i)=f
880 for l=1 to n:y(l)=c(j,l):c(j,l)=c(i,l):c(i,l)=y(l):next l
900 next i:next j
rem Запомнить наименьшее значение невязки
920 fm=f(1)
rem "Первая точка"
rem "Минимальное значение ="f(1)
rem "Минимальная точка"
rem Определить "центр тяжести" наилучших (K-1) точек (вершин комплекса)
rem и запомнить наихудшую точку
1200 for l=1 to n:xh(l)=c(k,l):xo(l)=(k*xc(l)-xh(l))/(k-1):next l
rem Получить отраженную точку
1400 for l=1 to n:xr(l)=(1+a)*xo(l)-a*xh(l):x(l)=xr(l):next l
rem Проверить, удовлетворяют ли координаты новой точки ограничениям
1500 im=0
1520 gosub 6000
1540 if ec=0 and ic=0 then goto 2000
rem Если точка является допустимой, то перейти к строке 2000
rem и вычислить значение целевой функции
1600 if ec=0 then goto 1800
rem Если явные ограничения нарушены, то переместить точку внутрь границ
1620 for j=1 to n
1640 if ec(j)=1 then xr(j)=l(j)+1e-4:x(j)=xr(j)
1660 if ec(j+n)=1 then xr(j)=u(j)-1e-4:x(j)=xr(j)
1680 next j
1800 if ic=0 then goto 2000
rem Если неявные ограничения нарушены, то
rem переместиться на половину расстояния к "центру тяжести"
1820 for l=1 to n:xr(l)=(xr(l)+xo(l))/2:x(l)=xr(l):next l
1840 goto 1500
2000 gosub 5000
if fe>700 then goto 490
fr=z
rem Если новое значение - наихудшее, то переместиться на половину расстояния
rem к точке ХО и вычислить новое значение целевой функции
2020 if fr<f(k) goto 2410
2040 for l=1 to n:xr(l)=(xr(l)+xo(l))/2:x(l)=xr(l):next l
2060 goto 1500
rem Обновить ХС и заменить наихудшую точку новой точкой
2410 f(k)=fr
2420 for l=1 to n
2440 xc(l)=k*xc(l)-c(k,l)+xr(l)
2460 xc(l)=xc(l)/k:c(k,l)=xr(l)

```

```

2480 next l
rem Упорядочить значения невязки и точки, в которых она вычислена
2500 for j=1 to (k-1)
2520 for i=j+1 to k
2540 if f(j)<=f(i) goto 2600
2560 f=f(j):f(j)=f(i):f(i)=f
2580 for l=1 to n:y(l)=c(j,l):c(j,l)=c(i,l):c(i,l)=y(l):next l
2600 next i:next j
2620 if f(1)<fm then pp=1
rem Если уменьшение функции не обнаружено, то проверка критерия
rem завершения поиска минимума не производится
2640 if pp=0 then goto 1200
rem Найти отклонение значений функции
3000 s1=0:s2=0
3020 for i=1 to k:s1=s1+f(i):s2=s2+f(i)*f(i):next i
3040 sd=abs(s2-s1^2/k):sd=sd/k
rem Найти максимальное расстояние между точками комплекса
3100 dm=0
3120 for i=1 to (k-1):for j=i+1 to k
3140 d=0
3160 for l=1 to n:d=d+(c(i,l)-c(j,l))^2:next l
3180 d=sqr(d)
3200 if d>dm then dm=d
3220 next j:next i
3400 if pp=0 then 3800
rem ? "Минимальное значение="f(1)
3560 for l=1 to n:q(l)=c(1,l):next l
for i=1 to n
print "c(";i;")="; using "#####.###"; l(i); c(1,i);u(i)
next i
for i1=1 to m
?spc(2) using"#####.## ";v(i1);v1(i1);v(i1)-v1(i1);ye(i1);y5(i1);ye(i1)-y5(i1)
next i1
3600 fm=f(1):pp=0
rem Проверка сходимости
3800 if sd>3e-5 goto 1200
3801 if dm>3e-2 then goto 1200
rem "Минимум найден"
if f(1) > iks then goto 1200
iks=f(1)
?
for i=1 to n
print" c(";i;")="; using "#####.#####"; c(1,i),
next i
?
print "RSS="; using "#####.#####"; F(1)
print "DM ="; using "#####.#####"; dm
print "SD ="; using "#####.#####"; sd
ym=0
for i=1 to m

```

```

        ym=ym+ye(i)
        next i
        ym=ym/m : yd=0
        for i=1 to m
            yd=yd+(ye(i)-ym)^2
        next i
        ar=1-(m-n-1)*F(1)/yd
        print "Коэф. детерминации ="; ar
        GOTO 490
? using "min=#####.#####";f(1)

4100 stop
5000
z1=0
z2=0
o5=0
for i1=1 to m
t7= 1/(4*x(1))
t8=-1+sqr(1+8*v(i1)*x(1))
v1(i1)=t7*t8
y5(i1)=(v1(i1)*x(2)/v(i1)+x(3)*(2*x(1)*v1(i1)^2)/v(i1))
next i1
z=0
oz=0
for i1=1 to m
z=z+(ye(i1)-y5(i1))^2
next i1
locate 1,55
? using "###.###^#####";z
5050 fe=fe+1
locate 1,10
? using "#####";fe
5100 return
5200 ? " *** "
5300 t$=inkey$:if t$="" then 5300
? " ** ":stop
return
6000 for ii=1 to k:ec(ii)=0:next ii:ec=0
6020 for ii=1 to m:ic(ii)=0:next ii:ic=0
rem 6050 if im=1 then goto 7100
6100 for ii=1 to n
6120 if x(ii)<l(ii) then ec(ii)=1:ec=1
6140 if x(ii)>u(ii) then ec(n+ii)=1:ec=1
6160 next ii
rem 7100 g(1)=x(2)
rem 7110 if g(1)<x(3) then ic(1)=1:ic=1
8000 RETURN
c( 1 )=      0.000      415.994      1000.000
c( 2 )=      0.000      41426.051      50000.000
c( 3 )=      0.000      12449.326      40000.000

```

0.04	0.01	0.03	16600.00	17109.33	-509.33
0.00	0.00	0.00	26300.00	25328.49	971.51
0.00	0.00	0.00	26600.00	26174.07	425.93
0.00	0.00	0.00	27500.00	27736.91	-236.91
0.00	0.00	0.00	30400.00	30007.44	392.56
0.00	0.00	0.00	31800.00	32913.18	-1113.18
0.00	0.00	0.00	35600.00	35935.24	-335.24
0.00	0.00	0.00	39900.00	40617.31	-717.31
0.00	0.00	0.00	40000.00	40684.41	-684.41
0.00	0.00	0.00	40500.00	39729.44	770.56
0.00	0.00	0.00	41900.00	41326.21	573.79
0.00	0.00	0.00	41800.00	41344.78	455.22
0.00	0.00	0.00	41800.00	41380.39	419.61
0.00	0.00	0.00	41000.00	41412.80	-412.80

$c(1) = 415.99444$ $c(2) = 41426.05049$ $c(3) = 12449.32584$

RSS = 5406095.758992

DM = 0.0002101

SD = 0.0000025

Коэф. детерминации = .934332214399653

Методы Марквардта и Бокса широко используются при решении задач, целевая функция которых записывается в виде суммы квадратов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Евсеев А.М. Математическое моделирование химических равновесий / А.М. Евсеев, Л.С. Евсеев. - М.: МГУ, 1988. - 192 с.
2. Барановский С.Ф. Агрегация 1,3,7-триметилксантина с метиленовым голубым в водном растворе / С.Ф. Барановский, П.А. Болотин, М.П. Евстигнеев // Журнал прикладной спектроскопии. - 2006. - Т. 73, № 2. - С. 158 - 163.
3. Львовский Е.Н. Статистические методы построения эмпирических формул / Е.Н. Львовский. - М.: Высш. шк., 1988. - 239 с.
4. Дрейпер Н. Прикладной регрессионный анализ. В 2-х т. // Н. Дрейпер, Г. Смит. - Т. 2 - М., 1987. - 351 с.
5. Демиденко Е.З. Оптимизация и регрессия / Е.З. Демиденко. - М.: Наука, 1989. - 296 с.
6. Тихонов А.Н. Методы решения некорректных задач / А.Н. Тихонов, В.Я. Арсенин. - М.: Наука, 1979. - 285 с.
7. Банди Б. Методы оптимизации. Вводный курс / Б. Банди. - М.: Радио-связь, 1988. - 128 с.
8. Минимизация в инженерных расчетах на ЭВМ / С.Ю. Гуснин и др. - Библиотека программ. - М.: Машиностроение, 1981. - 120 с.
9. Тюрин Ю.Н. Анализ данных на компьютере / Ю.Н. Тюрин, А.А. Макаров. - М.: ИНФРА-М, 2002. - 528 с.