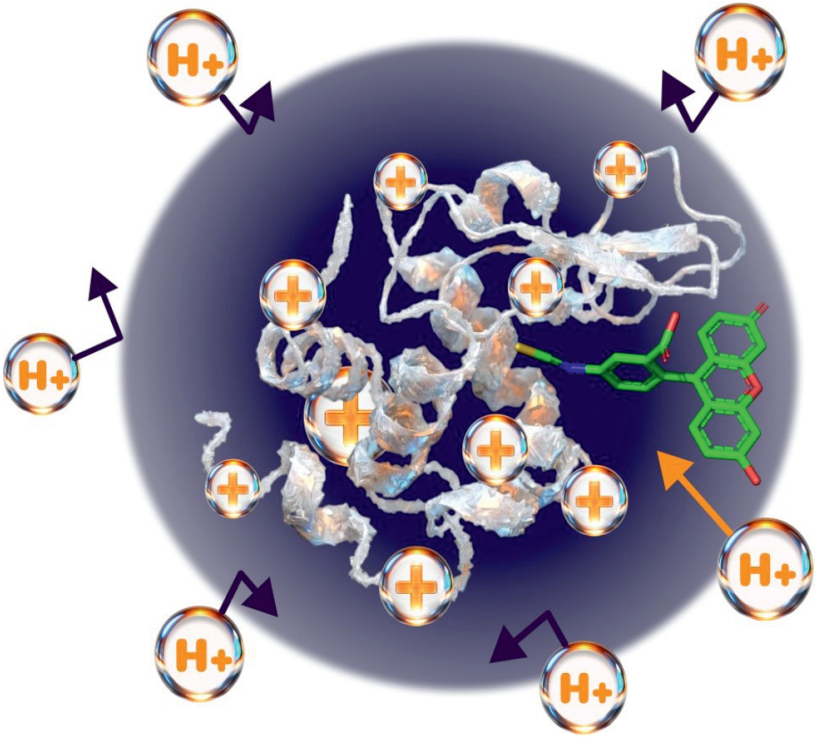
Слюсарева Е. А.
Суржикова Д. П.

Флуоресцеин: от метки к зонду



Е. А. Слюсарева, Д. П. Суржикова

ФЛУОРЕСЦЕИН: ОТ МЕТКИ К ЗОНДУ

Монография

Санкт-Петербург
Наукоемкие технологии
2026

УДК 535.3:547.6
ББК 24.5
С49

Рецензенты:
В. В. Салмин, доктор физико-математических наук, профессор Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный технический университет имени Н. Э. Баумана»;
О. П. Черкасова, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт автоматики и электрометрии Сибирского отделения Российской академии наук» (ИАиЭ СО РАН)

С49 Слюсарева Е. А., Суржикова Д. П. Флуоресцеин: от метки к зонду: монография / Е. А. Слюсарева, Д. П. Суржикова. – СПб.: Наукоемкие технологии, 2026. – 122 с.

ISBN 978-5-00271-145-1

Рассмотрены спектральные и фотофизические свойства органического красителя флуоресцеина в широком диапазоне значений pH. Представлены экспериментальные и теоретические результаты, демонстрирующие влияние процессов переноса протона на спектральные параметры молекулы как в основном, так и в возбужденном состояниях. Флуоресценция рассматривается как инструмент исследования быстрых процессов переноса протона, а также как аналитический сигнал при зондировании гомогенных сред и поверхности белков.

Предназначена для специалистов, чья научная или практическая деятельность связана с использованием флуоресцентных методов зондирования природных и искусственных функциональных материалов, а также студентов и аспирантов физических и химических специальностей вузов.

ISBN 978-5-00271-145-1 © Слюсарева Е. А., Суржикова Д. П., 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ 5

ГЛАВА 1. ЗНАКОМСТВО С ФЛУОРЕСЦЕИНОВЫМИ КРАСИТЕЛЯМИ 10

1.1. Основные понятия спектроскопии сложных молекул 10

1.2. Флуоресцеин и его структурные модификации 22

1.3. Примеры использования флуоресцеина для создания флуоресцентных меток, зондов и сенсоров 27

Заключение к 1 главе 31

Список литературы к 1 главе 31

ГЛАВА 2. СПЕКТРАЛЬНЫЕ И ФОТОФИЗИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ИОННЫХ ФОРМ ФЛУОРЕСЦЕИНА 35

2.1. Перенос протона в основном и возбужденном состояниях молекул ... 35

2.2. Ионные равновесия флуоресцеина в основном состоянии и их спектральные проявления 40

2.3. Трудности, возникающие при рассмотрениях ионных равновесий флуоресцеина в возбужденном состоянии 45

2.4. Подходы к определению ионных равновесий флуоресцеина в возбужденном состоянии 47

2.5. Ионные равновесия флуоресцеина и перенос протона в возбужденном состоянии 56

Заключение к 2 главе 62

Список литературы к 2 главе 62

ГЛАВА 3. ДИАНИОН-МОНОАНИОННОЕ РАВНОВЕСИЕ ФЛУОРЕСЦЕИНА С ТОЧКИ ЗРЕНИЯ СПЕКТРОСКОПИИ: ТЕОРИЯ И АНАЛИТИЧЕСКИЕ ПРИЛОЖЕНИЯ 66

3.1. Особенности протекания физико-химических процессов в равновесной системе «дианион-моноанион» 66

3.2. Спектральная чувствительность флуоресцеина к фосфат-ионам в водных растворах 68
3.3. Спектральная чувствительность флуоресцеина к изменению температуры 73
3.4. Понятие ратиометрического сигнала флуоресцеина 76
3.5. Термометрические характеристики ратиометрического сигнала флуоресцеина 79
3.6. Моделирование температурной зависимости ратиометрического сигнала 82
3.7. Влияние вязких сорастворителей на флуоресцентный сигнал флуоресцеина 85
3.8. Совместный эффект температуры и сорастворителей на спектры водных растворов флуоресцеина 89
Заключение к 3 главе 92
Список литературы к 3 главе 93
ГЛАВА 4. СПЕКТРАЛЬНОЕ ЗОНДИРОВАНИЕ ПОВЕРХНОСТИ БЕЛКА 96
4.1. Флуоресцентное зондирование поверхности белка с помощью внутренних и внешних меток 96
4.2. Параметры белка, получаемые методами молекулярного моделирования 103
4.3. Спектры поглощения и флуоресцентные свойства ФИТЦ, конъюгированного с белками 106
4.4. Жесткость связи в биоконъюгатах ФИТЦ-белок 111
4.5. Корреляция между параметрами поверхности белка и спектральными свойствами конъюгированного с белком ФИТЦ 112
Заключение к 4 главе 116
Список литературы к 4 главе 117

ВВЕДЕНИЕ

За полтора столетия, прошедших с момента синтеза, флуоресцеин нашел самое широчайшее применение в научных исследованиях, став настоящей «звездой» науки. Таким вниманием флуоресцеин обязан своей выдающейся способности: он почти без потерь преобразует ультрафиолетовое и сине-зеленое излучения в желто-зеленую флуоресценцию, что и определило название этого химического соединения, ставшего в итоге символом самого явления. Спустя десятилетия интенсивного использования стала очевидной его незаменимость в иммунофлуоресцентном анализе, флуоресцентном зондировании и биосенсорике в целом.

За это время естественнонаучная картина мира претерпела глобальные изменения. Были созданы фундаментальные основы квантовой механики, получили бурное развитие теория и методология органического синтеза, вычислительные методы квантовой химии. Произошло открытие принципа лазерного излучения и созданы высокочувствительные инструменты для регистрации оптических сигналов. Появились комплексные технологии, такие как оптический пинцет и методы флуоресцентной микроскопии сверхвысокого разрешения. Наконец, настоящим прорывом стали разработка методов секвенирования ДНК и полная расшифровка генома человека. Все эти достижения чрезвычайно повысили востребованность флуоресцеина и его гомологов в качестве инструментов для изучения биомакромолекул и живых систем.

Высокая эффективность флуоресцентного свечения, мерой которой служит квантовый выход, близкий к единице в основных растворителях, является важным, но не единственным фактором, объясняющим столь широкое применение этого соединения. Помимо превосходного квантового выхода, флуоресцеин обладает высокой поглощающей способностью и отличной растворимостью в воде. Кроме того, максимум в его спектре поглощения точно соответствует спектральной линии излучения аргонового лазера (488 нм), что делает его наиболее подходящим флуорофором для конфокальной лазерной сканирующей микроскопии и

проточной цитометрии. Дополнительным преимуществом является и то, что белковые конъюгаты флуоресцеина достаточно стабильны и не склонны к осаждению. Присущие флуоресцеину недостатки, такие как ограниченная фотостабильность и pH-чувствительность оптических свойств, успешно преодолеваются путём химической модификации. Масштаб использования флуоресцеина иллюстрирует тот факт, что в одной лишь книге «Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals» (R. P. Haugland, 6-е изд., 1996) слово «флуоресцеин» в названиях упоминаемых соединений встречается более тысячи раз, причем для значительной части производных флуоресцеина используются коммерческие названия (например, «бенгальская роза» или «токио грин»), никак не указывающие на происхождение красителя. Всё это позволяет уверенно утверждать, что дизайну химической структуры флуоресцеиновых молекул и созданию на их основе новых биосенсорных платформ в течение последних десятилетий уделялось огромное внимание.

Тем не менее авторы этой книги посчитали нужным еще раз обратиться к теме фундаментальных свойств флуоресцеина – как его классической структуры, так и широко известной модификации – флуоресцеин-5-изотиоцианата, способного ковалентно связываться с белками. Ряд оригинальных результатов авторов этой монографии последних лет позволил устранить «белые пятна» в понимании спектральных и связанных с ними структурных свойств флуоресцеина в широком диапазоне pH, а также дать количественное описание зависимости флуоресцентного сигнала от температуры, pH, диэлектрической проницаемости и концентрации электролита (в частности, фосфат-ионов). Все перечисленные параметры сами по себе критически важны для выявления механизмов функционирования биологических систем, а локализация зонда на поверхности глобул, образуемых биомакромолекулами, позволяет резко повысить информативность результатов измерений.

Заголовок книги – «Флуоресцеин: от метки к зонду» – отражает идею прямой зависимости информативности флуоресцентного сигнала с понима-

нием связи между строением молекулы и её оптическими свойствами. Для ясности необходимо чётко разграничить смысл ключевых терминов, фигурирующих в названии, а также понятий «флуоресцентный трейсер» и «сенсор».

Флуоресцеин впервые получил широкое применение именно в качестве флуоресцентного *трейсера* – вещества, используемого для визуального отслеживания движения жидкостей. Именно этот метод позволил доказать существование подземной гидрологической связи между европейскими реками: краситель, добавленный в воды Рейна, позже был обнаружен в Дунае. Сегодня этот подход активно применяется в медицинских технологиях. В частности, его вводят внутривенно в небольших количествах для изучения кровотока и диагностики состояния сосудов сетчатки глаза. Препарат является безопасным и полностью выводится из организма за несколько дней.

Флуоресцентная *метка* используется для маркировки и визуализации белков, нуклеиновых кислот, других биомакромолекул или клеток. Мечение позволяет визуализировать структуры, не обладающие собственной способностью к эффективному свечению. Чтобы получить больше информации, объекты метят сразу несколькими люминофорами, чувствительными к разным длинам волн возбуждения.

Флуоресцентный *зонд* – это специализированная флуоресцентная метка, имеющая расширенный функционал. С ее помощью можно не только «подсветить» объекты, но и обнаружить и даже измерить количество определенных веществ (аналитов) в образце и/или оценить параметры окружения. К таким параметрам относят температуру, pH, диэлектрическую проницаемость, гидрофобность и т. д.

Флуоресцентные *сенсоры* обычно состоят из флуорофора, линкера и распознающего фрагмента. Они взаимодействуют с целевым аналитом посредством связывания и предназначены для автоматического мониторинга и анализа образцов.

Кратко о структуре изложения. Книга состоит из четырёх глав. Первая глава носит обзорный характер и посвящена введению в основные понятия и

определения спектроскопии сложных молекул, к которым относится большинство красителей. Этот материал имеет самостоятельную ценность, поскольку представляет собой достаточно компактное изложение основ, подготавливающее читателя к восприятию оригинальных разделов, следующих далее. Библиография к данной главе составлена преимущественно из классических работ по спектроскопии, ознакомление с которыми позволит значительно расширить кругозор в этой области.

Вторая глава знакомит читателя с результатами экспериментального исследования ионных равновесий флуоресцеина в основном и возбуждённом состояниях. Его трехступенчатая диссоциация, затрагивающая хромофорные группы, приводит к сильной зависимости спектральных характеристик от кислотности (pH) среды. В библиографию этой и следующих глав включены как оригинальные публикации авторов, так и современные работы других исследователей.

В третьей главе изложены результаты исследования спектрального отклика одной из диссоциированных форм флуоресцеина, а именно его дианиона. Дианион образуется преимущественно в пределах «физиологического» диапазона pH, что чрезвычайно важно для разработки методов флуоресцентного зондирования биологических систем. Влияние параметров биологических сред, таких как вязкость, концентрация электролитов (фосфат-ионов) и температура, было изучено с помощью оптических методов как по отдельности, так и в комплексе.

Четвертая глава посвящена применению флуоресцеин-5-изотиоцианата (ФИТЦ) в качестве флуоресцентного зонда. Это производное флуоресцеина обладает оптическими характеристиками, близкими к исходной молекуле, поскольку содержит идентичный хромофор, но при этом может ковалентно связываться с белковой молекулой. Использование белков различного размера и молекулярной массы позволило обеспечить необходимое для выявления закономерностей разнообразие свойств на границе раздела фаз дисперсной си-

стемы «белок – биологическая среда». Локализация ФИТЦ на межфазной границе позволила выявить корреляции между оптическим сигналом зонда и особенностями поверхности белковой глобулы.

Возможность сказать новое слово в столь широко разработанной теме появилась благодаря почти десятилетнему циклу исследований, который был поддержан ведущими научными фондами и организациями (РФФИ, грант № 19-02-00450; РНФ, грант № 22-22-00724; Госзадание Минобрнауки, FSRZ-2020-0008). По итогам этой работы было опубликовано более 10 научных статей и защищена кандидатская диссертация по специальности «Оптика». Авторы выражают искреннюю благодарность своим коллегам-соавторам: А. Ю. Плотникову, М. А. Герасимовой, Л. А. Суковатому, А. С. Ципотану и А. В. Шамшурину. Особенно мы признательны Елене Владимировне Немцевой, единомышленнику, соавтору и первому читателю этого труда. Мы убеждены, что исследования далеки от завершения, и нас ждут новые проекты и задачи – такие же яркие и вдохновляющие, как свечение флуоресцеина.

ГЛАВА 1.
ЗНАКОМСТВО С ФЛУОРЕСЦЕИНОВЫМИ КРАСИТЕЛЯМИ

1.1. Основные понятия спектроскопии сложных молекул

Основными измеряемыми величинами в молекулярной спектроскопии являются положение и форма спектров поглощения и испускания, а также их амплитуда (интенсивность). Все они однозначно определяются химическим строением вещества – как молекулярной структурой, так и характером межмолекулярных взаимодействий.

Наиболее простыми с точки зрения описания структуры и оптических свойств объектами молекулярной спектроскопии являются изолированные двухатомные и высокосимметричные многоатомные (например, метан, фуллерен) молекулы. Спектроскопия таких объектов рассматривает электронные, колебательные и вращательные типы движений в рамках простых физических моделей (гармонический осциллятор, сферический волчок и т. д.), предоставляя базис для интерпретации спектров в случае молекул с большим числом атомов и произвольной симметрией. Важную роль в этих представлениях играет принцип Борна-Оппенгеймера [1, 2], который не только постулирует возможность раздельного описания указанных типов движений в молекуле, но и устанавливает соотношения между характерными величинами их энергий. Так, переходы между электронными уровнями лежат в УФ и видимой областях спектра, между колебательными – в ИК-области, между вращательными – в дальней ИК и микроволновой областях. Это формирует энергетическую схему молекул в виде дискретного ряда электронных уровней с надстройкой в виде набора колебательных и вращательных уровней.

С ростом числа атомов и уменьшением симметрии молекулы происходит увеличение плотности спектральных линий и усложнение характера колебаний молекулы. Эффективность перераспределения колебательной энергии внутри молекулы начинает играть важную роль в формировании сплошных

спектров. Предельным переходом является ситуация, когда вероятность такого перераспределения оказывается больше, чем обратное время жизни возбужденного электронного состояния. Этот переход служит неким «водоразделом» в ситуации простых и сложных молекул [3]. В сложных молекулах с большим числом атомов и системой сопряженных связей – а именно к таким молекулам относятся флуоресцеин и большинство органических красителей [4] – разрешить структуру широкой вибронной полосы зачастую не удается даже при сверхнизких температурах.

Фотофизические процессы в таких молекулах наглядно иллюстрируются с помощью диаграммы Яблонского [5–8]. В ее упрощенной версии отображены нижние синглетные (S_0, S_1) и триплетный (T_1) электронные уровни молекулы, колебательные уровни каждого электронного состояния, а также совокупность переходов между ними (рис. 1.1).

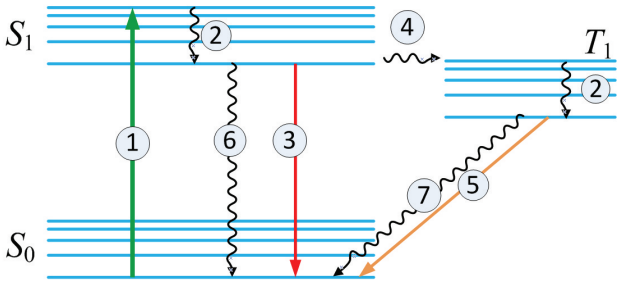


Рисунок 1.1. Диаграмма Яблонского

① *Поглощение* веществом электромагнитного излучения в УФ и видимой областях спектра связано с возбуждением внешних (валентных) электронов молекул. В отдельных случаях определенные полосы поглощения можно отнести к переходам электронов, которые локализованы в некоторых частях молекулы, но в целом поглощение электромагнитного излучения – это свойство системы ее связей. Формирование электронно-колебательной полосы по-

глощения сложной молекулы происходит в результате наложения двух статистических распределений: распределения вероятностей переходов между электронно-колебательными состояниями и распределения молекул по колебательным уровням исходного электронного состояния. По итогу в спектре поглощения формируется широкий пик (рис. 1.2, левый спектр), который представляет собой наложение многих полос. Он не информативен в отношении энергетической структуры электронно-колебательного состояния молекулы, свидетельствуя лишь о конкуренции вышеуказанных процессов.

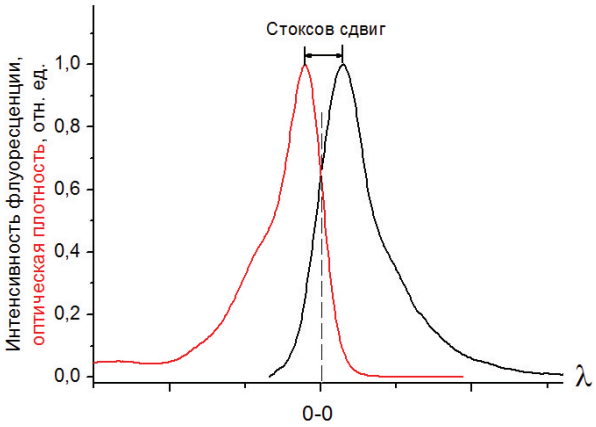


Рисунок 1.2. Характерный вид взаимного расположения спектров поглощения и флуоресценции сложных молекул

Представление спектра поглощения происходит, как правило, в виде зависимости от длины волны λ одной из трех величин. Первая – это оптическая плотность $D(\lambda)$, непосредственно определяемая в эксперименте. Остальные две – спектр экстинкции $\varepsilon(\lambda)$ и спектр сечения поглощения $\sigma(\lambda)$ – это разные варианты представления удельной поглощательной способности одной молекулы, которые связаны с первой величиной через закон Бугера-Ламберта-Бера:

$$T(\lambda) = 10^{-D} = 10^{-\varepsilon(\lambda)\cdot C\cdot l} = e^{-\sigma(\lambda)\cdot N\cdot l} \qquad (1.1)$$

Выражение (1.1) содержит пропускание T образца (отношение интенсивности прошедшего света к интенсивности падающего), его толщину l (в см), концентрацию N (в $см^{-3}$) или C (в M) поглощающего вещества.

② *Колебательная релаксация*. Если молекула оказалась в одном из возбужденных колебательных состояний, она быстро (в течение $10^{-12} \div 10^{-13}$ с) перейдет на более низкий термодинамически равновесный уровень, безызлучательно сбросив избыточную колебательную энергию. Этот уровень становится стартовым для следующего процесса возбуждения.

③ *Флуоресценция* – излучательный переход между уровнями одной мультиплетности. Предшествующая излучению релаксация на нижний колебательный уровень приводит к потере информации о том, на какой именно электронно-колебательный уровень перешла молекула путем фотовозбуждения и, как следствие, к независимости формы спектра испускания $\varphi(\lambda)$ от длины волны возбуждения. Это справедливо не только для возбуждения в состояния с энергией, соответствующей первой электронно-колебательной полосе (λ_2, λ_3), но и для более высокоэнергетических полос в коротковолновой части спектра (λ_1), рис. 1.3.

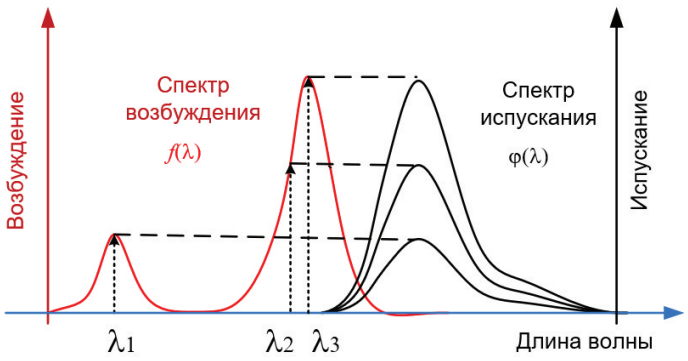


Рисунок 1.3. Рисунок, иллюстрирующий независимость формы спектра испускания сложной молекулы от длины волны возбуждения

Если форма спектра флуоресценции φ(λ) зависит только от самого вещества, то его амплитуда зависит от ряда факторов, включающих условия регистрации спектра. К факторам, зависящим от вещества, относится, прежде всего, квантовый выход флуоресценции ($\Phi_{фл}$), характеризующий эффективность преобразования поглощенных квантов в испущенные. Эта величина может варьироваться в пределах от нуля до единицы. На амплитуду спектра влияет также выбор длины волны возбуждения, определяющий долю поглощенной энергии (1-*T*). Наконец, интенсивность флуоресценции зависит от интенсивности возбуждающего света I_0, а также от эффективности сбора и доставки излучения на измерительную систему, в том числе от геометрии возбуждения, ширины щелей монохроматоров и т. д. Эти факторы можно учесть через эмпирический коэффициент *K*. Таким образом, итоговая формула для расчета интенсивности флуоресценции выглядит следующим образом:

$$I_{фл} = K\Phi_{фл} I_0 \left(1-T\right) = K\Phi_{фл} I_0 \left(1-10^{-\varepsilon_{возб} Cl}\right), \qquad (1.2)$$

где $\varepsilon_{возб}$ – молярный десятичный коэффициент экстинкции на длине волны возбуждения. Из уравнения (1.2) видно, что интенсивность флуоресценции $I_{фл}$, вообще говоря, не пропорциональна концентрации вещества *C*. Однако такая пропорциональность соблюдается в образцах с малой оптической плотностью ($D_{возб} \leq 0{,}1$), когда экспоненциальный член может быть с достаточной точностью аппроксимирован линейной зависимостью:

$$I_{фл} = K\,\Phi_{фл} I_0 \ln 10\, \varepsilon_{возб} Cl. \qquad (1.3)$$

Варьируя условия эксперимента, можно добиться высокой чувствительности регистрируемого сигнала флуоресценции по отношению к концентрации флуоресцирующего вещества. Идея измерения концентрации вещества флуоресцентным методом выглядит достаточно привлекательной, однако, чтобы ее реализовать, необходима предварительная процедура калибровки сигнала с использованием образцов сравнения с известной концентрацией.

В ряде задач можно обойтись без калибровки флуоресцентного сигнала, если использовать ратиометрический сигнал (*S*). Он представляет собой отношение двух сигналов флуоресценции, полученных при идентичных условиях, но на разных длинах волн возбуждения или испускания образца. Такая возможность реализуется, если образец представлен равновесной смесью двух форм (например, таутомеров) вещества либо сама молекула содержит несколько хромофоров. Пример расчета ратиометрического сигнала при «двойной» флуоресценции приведен на рис. 1.4. В главах 3, 4 будет рассмотрен другой случай представления ратиометрического сигнала, связанного с двумя разными ионными формами флуоресцеина. Ратиометрический сигнал *S* свободен от специфики установки и характеризует установившееся равновесие. Преимуществом ратиометрических измерений является также то, что они устраняют искажения данных, вызванные фотообесцвечиванием и нестабильностью освещения.

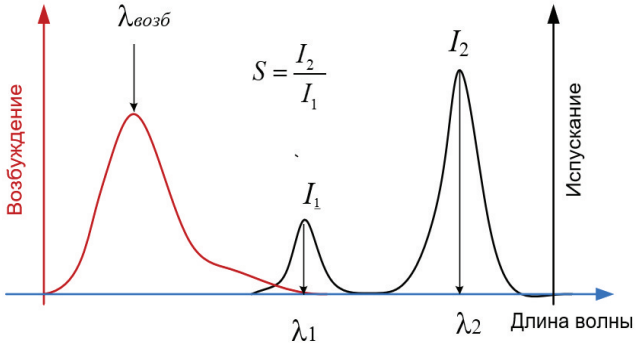


Рисунок 1.4. Пример расчета ратиометрического флуоресцентного сигнала

Рассматривая совместно спектры поглощения и флуоресценции, можно выделить ряд закономерностей (рис. 1.2) [4, 8]: спектр испускания всегда сдвинут по отношению к спектру поглощения в сторону длинных волн (стоксов сдвиг); спектральные кривые поглощения и испускания подчиняются правилу зеркальной симметрии. Вторая закономерность носит качественный характер;

при ее выполнении можно судить о том, насколько близки структуры колебательных уровней основного и возбужденного электронных состояний. Дополнительно можно выявить положение чисто электронного (0-0) перехода как спектральное расположение точки пересечения контуров.

Еще одним экспериментально измеряемым параметром флуоресценции является время жизни возбужденного (флуоресцентного) состояния $\tau_{фл}$. Измерение времени жизни флуоресцентного состояния происходит путем анализа временной зависимости спада интенсивности флуоресценции после возбуждения коротким (в предельном случае имеющим вид δ-функции) импульсом, которая для случая одного хромофора описывается экспоненциальной функцией:

$$I(t) = I(0)e^{-t/\tau_{фл}}. \tag{1.4}$$

Параметр $\tau_{фл}$ показывает время, за которое интенсивность затухает в e раз. В случае более сложного характера затухания функция $I(t)$ может быть представлена в виде суперпозиции нескольких экспонент с амплитудными вкладами B_i. В этой ситуации используется эффективный параметр в виде среднего значения флуоресцентного времени жизни:

$$\langle \tau_{фл} \rangle = \frac{\sum_i B_i \tau_i}{\sum_i B_i}. \tag{1.5}$$

Типичная величина $\tau_{фл}$ составляет наносекунды, но может варьироваться в пределах одного-двух порядков в зависимости от флуорофора и его окружения. Предельным значением времени жизни флуоресцентного состояния в отсутствие безызлучательных переходов является величина радиационного времени жизни $\tau_{рад}$. Радиационное время жизни можно рассчитать из уравнения Стриклера-Берга [9] на основании известного контура испускания $\varphi(\lambda)$ и сечения поглощения $\sigma(\lambda)$:

$$\tau_{\text{рад}} = \frac{n_{\text{погл}}}{8\pi c n_{\text{фл}}^3 \int \frac{\sigma(\lambda)}{\lambda} d\lambda} \frac{\int \varphi(\lambda)\lambda^3 d\lambda}{\int \varphi(\lambda) d\lambda}. \quad (1.6)$$

Здесь $n_{\text{фл}}$ и $n_{\text{погл}}$ – средние показатели преломления в полосе испускания и поглощения, соответственно, c – скорость света. Уравнение (1.6) – результат модификации классической теории атомной дисперсии для разрешенных синглет-синглетных молекулярных переходов. Степень различия между временем жизни флуоресцентного состояния и радиационным временем жизни характеризует уровень потерь энергии на безызлучательные процессы, а соотношение этих времен дает способ нахождения квантового выхода флуоресценции:

$$\Phi_{\text{фл}} = \frac{\tau_{\text{фл}}}{\tau_{\text{рад}}}. \quad (1.7)$$

Важным параметром люминесценции является ее поляризация [8,10]. Количественным критерием, определяющим эту характеристику, служит анизотропия r. В соответствии с обозначениями на рис. 1.5 она определяется следующей формулой:

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}}. \quad (1.8)$$

Поляризационные измерения люминесценции могут быть использованы для оценки размеров флуорофора. Соотношение между стационарной флуоресцентной анизотропией r и временем вращательной корреляции ϕ дается уравнением Перрена:

$$\frac{r_0}{r} = 1 + \frac{\tau_{\text{фл}}}{\phi}, \quad (1.9)$$

где r_0 – предельное значение анизотропии без учета вращательной диффузии. Извлечь информацию о гидродинамическом диаметре D излучателя (в приближении его сферической формы) можно, используя следующую формулу:

$$\phi = \frac{\eta V}{kT} = \frac{\eta \pi D^3}{6kT}, \qquad (1.10)$$

где η – вязкость раствора, T – температура, k – константа Больцмана.

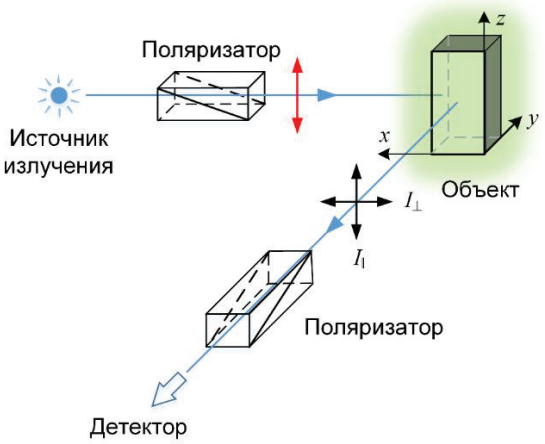


Рисунок 1.5. Схема измерения поляризованной люминесценции [11]

Еще одной важной характеристикой флуоресцентного свечения является спектр возбуждения $f(\lambda)$. Для его получения сканируется длина волны возбуждения, при этом длина волны регистрации флуоресценции остаётся постоянной. Такой подход позволяет сопоставить спектр возбуждения со спектром поглощения вещества. В простейшем случае однокомпонентной системы с низкой оптической плотностью их формы будут близки. В более сложных системах эти контуры могут сильно отличаться, сигнализируя о сложности состава смеси и межмолекулярных взаимодействиях.

④ После перехода в электронно-колебательное возбужденное состояние и колебательной релаксации альтернативой флуоресценции может стать *интеркомбинационный переход* из возбужденного синглетного состояния молекулы в первое триплетное [12, 13], представляющий собой безызлучательный

процесс с изменением спинового состояния. Его вероятность в молекулах, содержащих тяжелые атомы, может быть достаточно высока, что позволяет интеркомбинационному переходу успешно конкурировать с излучательным процессом. В случае молекул, не содержащих тяжелые атомы (к которым относится и молекула флуоресцеина), вклад этого процесса можно оценить как пренебрежимо малый.

⑤ С участием триплетного уровня возможен излучательный процесс – *фосфоресценция.* Фосфоресценция соответствует переходу с первого триплетного уровня, лежащего ниже соответствующего синглетного уровня, поэтому её спектр всегда сдвинут батохромно относительно спектра флуоресценции. Время жизни фосфоресцентного триплетного состояния на несколько порядков выше, чем у уже рассмотренного флуоресцентного состояния, что делает весьма вероятным тушение фосфоресценции за счет межмолекулярных процессов. Это приводит к тому, что при комнатной температуре фосфоресценция растворов практически не наблюдается, в то время как флуоресценцию проявляют многие соединения. Фосфоресценцию можно наблюдать только в очень вязких или замороженных растворах [7], в белках, но даже в этих случаях квантовый выход фосфоресценции, как правило, не превышает нескольких процентов.

Чтобы сформировать окончательный перечень возможных излучательных процессов, нужно предположить потенциальную возможность обратной интеркомбинационной конверсии из триплетного в первое синглетное состояние с последующим испусканием флуоресценции. Так называемая *замедленная флуоресценция* совпадает по своим спектральным характеристикам с обычной, но имеет характерное время жизни фосфоресценции. Все перечисленные излучательные процессы объединяются понятием *люминесценция*.

⑥ ⑦ Безызлучательные переходы между энергетическими уровнями одной и разной мультиплетности могут быть обусловлены *внутренней конверсией* либо *тушением* [8, 14]. В широком смысле под *тушением* понимают лю-

бые процессы дезактивации люминесцирующих состояний, являющиеся результатом взаимодействия возбужденных молекул с компонентами системы. Так, при увеличении соответствующего параметра наблюдают температурное и концентрационное тушение; кроме того, известно специфическое тушение, вызванное посторонними примесями.

Спектры флуоресценции и квантовый выход, как правило, в большей степени зависят от молекулярного окружения, чем спектры поглощения. Так, изменение полярности растворителя приводит к смещению спектров. Эта характеристика наиболее ярко проявляется у флуорофоров, которые имеют большие дипольные моменты в возбужденном состоянии, что приводит к сдвигу спектра флуоресценции в сторону длинных волн [8, 10, 15].

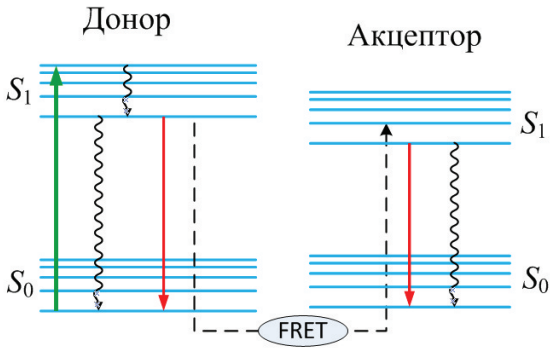


Рисунок 1.6. Энергетическая схема, иллюстрирующая процесс безызлучательного переноса энергии

Еще одним механизмом тушения флуоресцентного состояния является безызлучательная передача энергии другой (или точно такой же) молекуле, имеющей резонансные уровни энергии и расположенной на достаточно близком расстоянии. В англоязычной литературе это явление получило название FRET (аббревиатура Förster Resonance Energy Transfer). На рис. 1.6 представлена энергетическая схема переноса энергии от донора к акцептору. Экспериментально регистрируемым результатом такого процесса служит уменьшение

времени жизни донора в присутствии акцептора, а также разгорание флуоресценции акцептора при отсутствии его прямого возбуждения.

Для количественного описания эффективности переноса энергии вводят в рассмотрение критическое расстояние R_0 (радиус Фёрстера), на котором константа скорости переноса энергии равна константе скорости спонтанной дезактивации донора (Д) в отсутствие акцептора. Радиус Ферстера оказывается пропорционален интегралу от произведения спектральной функции испускания донора и поглощения акцептора и достаточно просто рассчитывается из спектральных данных [16, 17]. Для типичных донорно-акцепторных пар значения R_0 обычно лежат в пределах 4–8 нм. Согласно теории Фёрстера, удается связать между собой константу скорости переноса энергии ($k_{\text{ПЭ}}$) с расстоянием между донором и акцептором (R):

$$k_{\text{ПЭ}}(R) = \frac{1}{\tau_{\text{фл}}^{\text{Д}}}\left(\frac{R_0}{R}\right)^6. \qquad (1.11)$$

Благодаря простоте соотношения (1.11) и относительной экспериментальной доступности параметров R_0, флуоресцентного времени жизни донора и константы скорости $k_{\text{ПЭ}}$ методы на основе FRET широко используются для определения размеров биологических объектов. Таким образом, например, была сделана оценка толщины липидного бислоя, расстояния белок-холестерин, местоположения белковой глобулы в мембране, конформационных изменений в мембранных белках и др. [10].

Если соблюдается условие резонанса, а донор и акцептор располагаются на еще меньших расстояниях, не превышающих 1–2 нм, то вероятен безызлучательный перенос энергии по обменно-резонансному механизму. В отличие от ферстеровского (индуктивно-резонансного) переноса, здесь требуется прямой контакт электронных облаков донора и акцептора и имеет место обмен электронами между молекулами [17].

Различная природа и скорость протекания многообразия рассмотренных фотопроцессов формируют сложную картину динамики населенностей сложной молекулы, зависящую от свойств окружения. Понимание этих механизмов в конечном итоге определяет научную базу для создания методов флуоресцентного зондирования.

1.2. Флуоресцеин и его структурные модификации

Флуоресцеин был впервые синтезирован в 1871 г. немецким химиком Иоганном Фридрихом Вильгельмом Адольфом фон Байером, впоследствии Нобелевским лауреатом, путем конденсации фталевого ангидрида и резорцина при повышенной температуре в условиях кислотного катализа. В качестве катализатора могут использоваться как кислоты Бренстеда (серная, фосфорная, метансульфоновая), так и кислоты Льюиса (хлорид цинка). Синтез в среде метансульфоновой кислоты проходит в более мягких условиях, чем в расплаве исходных веществ при использовании хлорида цинка [18].

Флуоресцеин является слабой кислотой и образует соли, диссоциирующие в водных растворах. Так, динатриевая соль флуоресцеина (уранин) диссоциирует в водных средах с pH>7 с образованием дианиона флуоресцеина, который имеет интенсивную несимметричную полосу поглощения на первом синглет-синглетном переходе с максимумом около 488 нм, а также ряд коротковолновых полос, относящихся к более высоким синглетным уровням возбуждения (рис. 1.7). Спектр флуоресценции зеркально повторяет форму длинноволнового контура поглощения, а его максимум сдвинут примерно на 27 нм в сторону длинных волн. Помимо применения в качестве флуоресцентной метки/зонда, уранин используют для создания активных сред перестраиваемых лазеров [19] и в качестве стандарта для измерения квантового выхода люминесценции [20].

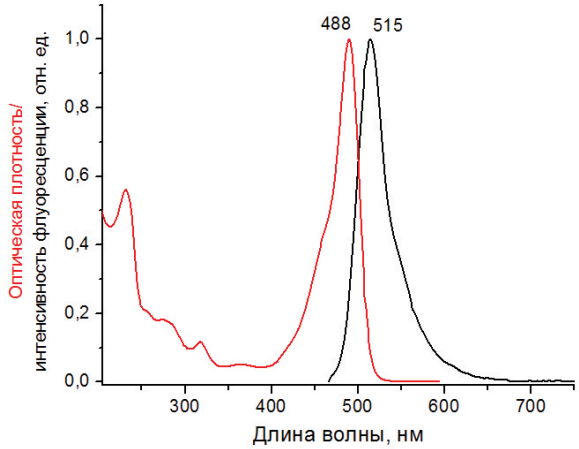


Рисунок 1.7. Спектры поглощения и флуоресценции дианиона флуоресцеина

Структура дианиона флуоресцеина достаточно хорошо изучена. Плоскости ксантенового ядра (трехциклической ароматической структуры с кислородом в центральном пирановом кольце) и бензольного кольца (рис. 1.8) в основном состоянии молекулы расположены практически ортогонально друг другу ($\beta \approx 0$). При возбуждении угол β меняется значительно: на 17° в водном растворе [21], на 25° в метаноле [22]. При этом незначительно нарушается планарность ксантенового трицикла – угол α меняется на 1–2 градуса. В работах [21, 22] обсуждается существование конформеров флуоресцеина, обусловленных двумя разными значениями угла γ.

При снижении pH до нейтрального (~6÷7) и кислого (≤5), флуоресцеин ступенчато диссоциирует, что будет подробно рассмотрено в следующей главе. Структурные изменения при переходе из основного в возбужденные состояния наблюдаются как у различных форм нейтральной молекулы, так и у анионной и катионной форм флуоресцеина [21].

С одной стороны, возможность модуляции спектральных свойств зонда в зависимости от pH открывает широкие перспективы для его использования в биовизуализации и сенсорике. С другой стороны, высокая чувствительность метки к различным параметрам окружающей среды является осложняющим

фактором. Для эффективной визуализации распределения аналита и установления однозначной корреляции между его концентрацией и интенсивностью свечения необходимо, чтобы сигнал был не только стабильным и воспроизводимым, но и однозначно интерпретируемым. В противном случае невозможно определить, какой именно фактор среды вызвал изменение аналитического сигнала. Поэтому наибольшую ценность представляют высокоспецифичные зонды.

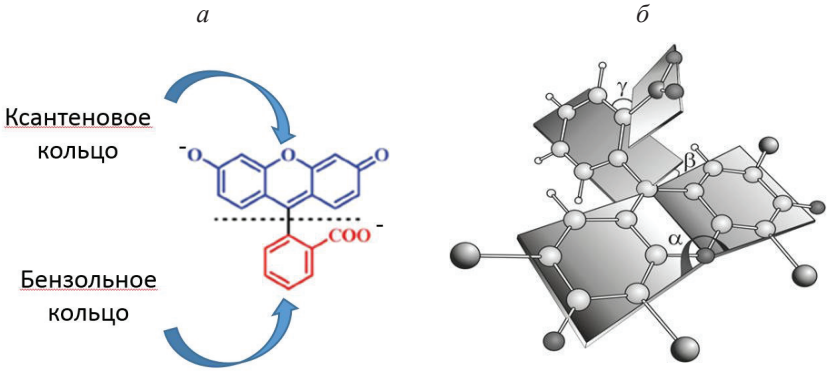


Рисунок 1.8. Структурная формула дианиона флуоресцеина (а) и взаимное расположение плоскостей ксантенового ядра и бензольного кольца с карбоксильной группой COO^- (б)

Повысить специфичность зонда можно за счет его химической модификации, направленной на блокировку чувствительности к нежелательным параметрам окружения, либо измерения должны проводиться в условиях строгого контроля большинства внешних факторов.

Известны успешные примеры химической модификации флуоресцеина в целях изменения его протолитических свойств путем вариации числа возможных ионных состояний и значений констант диссоциации. Так, в качестве новых перспективных флуорофоров был предложен Oregon Green 488, OG 488 (рис. 1.9 а), Tokyo Green, Granada Green (рис. 1.9 б) [23].

а *б*

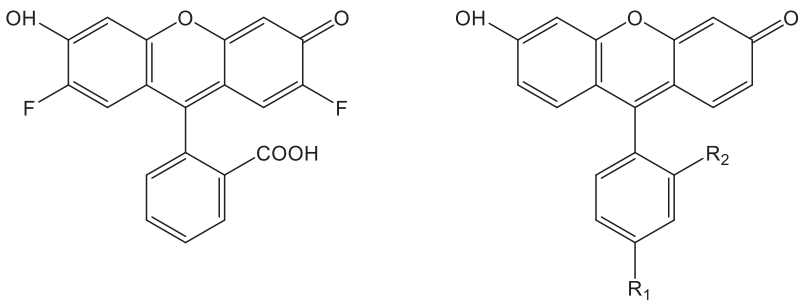


Рисунок 1.9. Перспективные флуоресцеиновые красители:
а) 2', 7'-дифторфлуоресцеин (*Oregon Green 488, OG 488*);
б) 9-1-2-метил-4-метоксифенил)-6-гидокси-3Н-ксантен-3-он
(серия *Tokyo Green, 2-Me-4-OMe TG*), R_1 = OMe, R_2 = Me;
9 [1 (4 трет бутил 2 метоксифенил)] 6 гидрокси 3Н ксантен-3-он
(*Granada Green, GG*), R_1 = *t*-Bu, R_2 = OMe

В то время как спектры возбуждения и излучения OG 488 практически совпадают со спектрами флуоресцеина, биоконъюгаты, приготовленные на его основе, обладают важными преимуществами, а именно большей фотостабильностью, более низким значением pK_a (4,7 против 6,4 для флуоресцеина), более высоким квантовым выходом флуоресценции и меньшим тушением при сопоставимых степенях мечения в белках. Еще одной особенностью протолитических свойств OG 488 является стимуляция реакции переноса протонов в возбужденном состоянии между нейтральной, моно- и дианионной формами ацетатным буфером. В то же время катион ведет себя как «супер-фотокислота», демонстрируя очень высокую скорость депротонирования. Такие свойства OG 488 оказываются весьма востребованными в различных флуориметрических методах для задач биомедицины и биохимии.

Галогензамещенные гомологи флуоресцеина (рис. 1.10) – эозин (2′, 4′, 5′, 7′ – тетрабромфлуоресцеин), эритрозин (2′, 4′, 5′, 7′ – тетрайодфлуоресцеин), бенгальский розовый (4, 5, 6, 7 – тетрахлор-2′, 4′, 5′, 7′ – тетрайодфлуоресцеин) – так же, как и флуоресцеин, имеют водорастворимые солевые

формы. Кроме перечисленных галогензамещенных флуоресцеинов существует ряд других синтетических ксантеновых красителей (2′, 7′ – дихлорфлуоресцеин, 4′, 5′ – дибромфлуоресцеин, тетрабром-дихлорфлуоресцеин и др.) с еще более плавным изменением свойств в зависимости от числа замещающих галогенов, однако не все из них растворяются в водных средах. Количество и местоположение тяжелых атомов галогенов влияет на перераспределение вероятностей процессов, обозначенных на рис. 1.1. В частности, происходит усиление интеркомбинационного перехода, уменьшение квантового выхода флуоресценции и батохромное смещение спектров [11]. Гомологи флуоресцеина используются в качестве внешних флуоресцентных и фосфоресцентных меток для детектирования растворенного кислорода, изучения функциональных свойств белков [24, 25]. Также возможно применение флуоресцеиновых красителей в полимерной матрице в качестве регистрирующих сред для оптической записи информации [26].

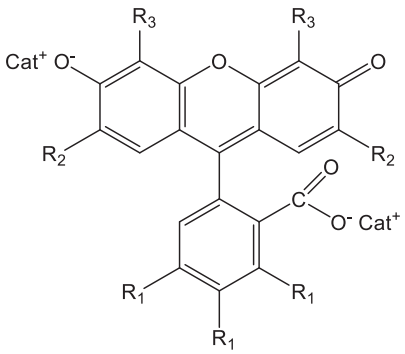


Рисунок 1.10. Схема молекулярной структуры галогензамещенных флуоресцеина:
4, 5 – дибромфлуоресцеин (R_1=R_2=H; R_3=Br; Cat=H),
эозин (R_1= H; R_2=R_3=Br; Cat=Na, K), эритрозин (R_1= H; R_2=R_3=I; Cat=Na),
бенгальский розовый (R_1= Cl; R_2=R_3=I; Cat=Na)

Флуоресцеин-5-изотиоцианат (ФИТЦ) − это производное флуоресцеина, содержащее функциональную группу −N=C=S в бензольном кольце (рис. 1.11). Благодаря этой группе ФИТЦ может ковалентно (а это обычно

означает «специфично» и «эффективно») связываться с аминогруппами различных молекул, придавая им способность к яркой зелёной флуоресценции.

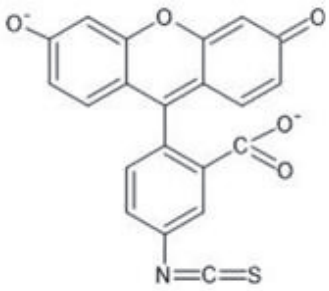


Рисунок 1.11. Структурная формула ФИТЦ

Перечисленные примеры лишь в малой степени иллюстрируют многообразие синтезированных на сегодняшний день гомологов флуоресцеина, число которых растет день ото дня.

1.3. Примеры использования флуоресцеина для создания флуоресцентных меток, зондов и сенсоров

В работе [27] с помощью флуоресцеина наблюдали ренатурацию нуклеиновой кислоты. Для этого использовали ДНК *E. coli* с N-4-аминоэтил-модифицированными остатками цитозина, способными образовывать связь с молекулами флуоресцеина (доля конъюгатов около 4% от общего числа цитозиновых остатков). Было обнаружено, что интенсивность испускания флуоресцеина, прикрепленного к одноцепочечной ДНК, уменьшается при восстановлении до двухцепочечной. Снижение интенсивности флуоресценции связано со сдвигом моноанион-дианионного равновесия флуоресцеина из-за изменений pH в окружении флуоресцентной метки [11].

Фосфат-ионы играют важную роль в передаче сигнала и накоплении энергии в биологических системах, однако определение их пространственного

распределения во внутриклеточной среде представляет собой сложную проблему. Краситель Tokyo Green (рис. 1.9 б) демонстрирует характерный перенос протона в возбужденном состоянии при физиологических значениях pH и при этом проявляет выраженную зависимость времени жизни флуоресценции от концентрации фосфатного буфера. Объясняется эта зависимость тем, что в возбужденном состоянии краситель подвергается реакции фосфат-опосредованного переноса протонов, приводящей к изменению интенсивности флуоресценции, которая в итоге зависит как от концентрации фосфата, так и от pH среды. Так, вышеуказанная методика позволила установить временной ход клеточной дифференцировки преостеобластов мышей [23].

Для аналогичных целей был использован краситель серии Granada Green (рис. 1.9 б) с «переключаемой» характеристикой спада флуоресценции on/off-типа. Особенностью данного красителя является более высокое значение константы анион-нейтрального равновесия (см. 2 главу), чем у флуоресцеина, при этом его нейтральная форма не флуоресцирует. Использование Granada Green для выявления концентрации фосфатов в живых преостеобластах мышей при pH 7,35 продемонстрировало преимущества данного красителя по сравнению с его предшественниками [28].

Амин-реактивные производные флуоресцеина (в частности, ФИТЦ) являются наиболее распространенными флуоресцентными реагентами для ковалентной маркировки биомакромолекул. Эти зонды используются для модификации белков, пептидов, лигандов, синтетических олигонуклеотидов и других биомолекул. Так, олигонуклеотидные конъюгаты ФИТЦ часто применяют в качестве гибридизационных зондов. Пептидные конъюгаты ФИТЦ и других флуоресцентных изотиоцианатов подвержены деградации Эдмана, что делает их полезными для высокочувствительного секвенирования аминокислот. Аминокислоты и пептиды, меченные ФИТЦ, были разделены капиллярным электрофорезом с пределом обнаружения менее 1000 молекул. ФИТЦ также использовался для обнаружения белков в гелях и на нитроцеллюлозных мем-

бранах. Кроме того, перенос энергии возбужденного состояния между молекулами флуоресцеина приводит к тушению флуоресценции, что позволило ученым проследить сборку флуоресцеин-меченого белка из субъединиц [29].

Одной из главных проблем при использовании флуоресцеина для измерения внутриклеточного pH является его высокая скорость утечки из клеток (высокая способность к трансмембранному переносу). Это затрудняет точное количественное определение кислотности среды внутри живой клетки. Эффективным решением этой задачи стало применение производного флуоресцеина − карбоксифлуоресцеин диацетата (5(6)-CFDA). В отличие от исходного красителя, карбоксифлуоресцеин при физиологических значениях pH несет дополнительный отрицательный заряд, что значительно тормозит его межклеточный перенос. При этом зонд сохраняет ключевое преимущество флуоресцеина: его спектральные характеристики зависят от уровня pH практически так же, как и у исходного соединения. Это позволяет проводить точные ратиометрические измерения, используя отношения сигналов флуоресценции, возбуждаемых на двух разных длинах волн − 490 нм и 450 нм. Эффективность подобных модификаций флуоресцеина была подтверждена на практике, они успешно применялись для измерения внутриклеточного pH в самых разнообразных биологических объектах, включая гладкие мышцы, клетки сои, проксимальные канальцы почек кролика и многие другие типы клеток [29].

Флуоресцеин широко используется в качестве флуорофора при создании флуоресцентных сенсоров для обнаружения неорганических ионов, в частности – металлов. Известно большое число примеров сенсоров на основе флуоресцеина для обнаружения катионов таких металлов, как медь, ртуть, цинк, серебро, золото, железо, палладий, кадмий, свинец, магний и др., а также анионов (например, фторид-анионов F^- или гипохлорит-анионов OCl^-) [30]. В ряде случаев сенсорная система допускает несколько разновидностей аналитического сигнала одновременно, предоставляя возможность многофакторного анализа. Так, сообщалось о возможности одновременного обнаружения двух

катионов, например, Cu^{2+} и Al^{3+}, Zn^{2+} и Al^{3+}, Cd^{2+} и Co^{2+}, а также анион-катионных пар (Al^{3+} и F^{-}, Hg^{2+} и F^{-}) [30]. Несмотря на то, что рассматриваемые методы ограниченно применимы для обнаружения малых молекул, с помощью флуоресцеина удается детектировать цистеин, CO (косвенно, с помощью медиаторов), NO, аденозинтрифосфат и др. [30].

Основываясь на приведенных примерах, можно выделить два основных подхода к конструированию флуоресцентно-чувствительных систем.

(i) Модуляция состояния хромофора. В основе этой стратегии лежит способность молекулы флуоресцеина обратимо переходить между двумя химическими формами. Одна из них, лактонная (бесцветная), не обладает флуоресценцией, тогда как другая, открытая (окрашенная), обладает яркой флуоресценцией, а переключение между ними является откликом на взаимодействие с аналитом (например, ионом металла при хелатировании). Одним из молекулярных механизмов такого «переключения» является фотоиндуцированный внутримолекулярный перенос протона или электрона.

(ii) Использование FRET (рис. 1.6). Этот подход основан на включении в структуру сенсора двух хромофоров, способных к безызлучательному переносу энергии. Ключевое преимущество такой конструкции заключается в том, что фрагменты молекулы уже расположены в непосредственной близости друг от друга. Это автоматически обеспечивает сближение хромофоров на расстояние, сопоставимое с ферстеровским радиусом, что является необходимым условием для эффективного переноса энергии. Взаимодействие одного из фрагментов с аналитом изменяет взаимное расположение или электронные свойства хромофоров. Это приводит к изменению фактора ориентации и/или расстояния между ними, что, в свою очередь, усиливает или ослабляет эффективность FRET.

Заключение к 1 главе

Структура молекулы флуоресцеина оказалась крайне удачной как с точки зрения ее способности к яркой флуоресценции, так и с точки зрения возможности ее химической модификации для придания новых свойств. На основе производных флуоресцеина создают амин-реактивные красители, которые способны избирательно связываться с аминогруппами белков и других биомолекул. Благодаря этому они широко используются для получения биоконъюгатов для иммунохимии, флуоресцентной гибридизации *in situ*, отслеживания клеток, маркировки рецепторов и флуоресцентной аналоговой цитохимии.

Увеличение фотостабильности, ограничение чувствительности к pH, уменьшение скорости утечки флуоресцеина из клеток – вот далеко не полный перечень задач для направленного химического синтеза структур на основе флуоресцеина. Более усложненные модификации молекулы способны превратить ее в полноценную сенсорную платформу на основе сложных физико-химических процессов, таких как безызлучательный перенос энергии, перенос заряда в основном и возбужденном состояниях. Такие сенсоры обладают высокой специфичностью, чувствительностью, высоким пространственным и временным разрешением – свойствами, за которые высоко ценят все современные флуоресцентные методы исследования.

Список литературы к 1 главе

1. Ельяшевич М. А. Атомная и молекулярная спектроскопия. Молекулярная спектроскопия / М. А. Ельяшевич. – Москва: URSS, 2009. – 528 с.

2. Бенуэлл К. Н. Основы молекулярной спектроскопии / К. Н. Бенуэлл; пер. с англ. под ред. Е. Б. Гордона. – Москва: Мир, 1985. – 384 с.

3. Непорент Б. С. Колебательная энергия и люминесценция сложных молекул / Б. С. Непорент, Б. И. Степанов // УФН. – 1951. – V. 43. – P. 380–425.

4. Теренин А. Н. Фотоника молекул красителей / А. Н. Теренин. – Л.: Наука, 1976. – 616 с.

5. Введение в фотохимию органических соединений / под ред. проф. Г. О. Беккера. – Л.: Химия, 1976. – 384 с.

6. Барлтроп Д. Возбужденные состояния в органической химии / Д. Барлтроп, Д. Койл. – М.: Мир, 1978. – 446 с.

7. Valeur B. Molecular fluorescence: principles and applications / B. Valeur, M. N. Berberan-Santos. – Weinheim: Wiley-VCH Verlag, 2012. – 592 p.

8. Лакович Дж. Основы флуоресцентной спектроскопии / Дж. Лакович. – М.: Мир, 1986. – 496 с.

9. Strickler S. J. Relationship between absorption intensity and fluorescence lifetime of molecules / S. J. Strickler, R. A. Berg // The Journal of Chemical Physics. – 1962. – V. 37. – № 4. – P. 814–822.

10. Владимиров Ю. А. Физико-химические основы фотобиологических процессов / Ю. А. Владимиров, А. Я. Потапенко. – М.: Высш. шк., 1989. – 199 с.

11. Слюсарева Е. А. Реакции с участием возбуждённых состояний флуоресцеиновых красителей: монография / Е. А. Слюсарева. – Красноярск: Сиб. федер. ун-т, 2020. – 170 с.

12. Мак-Глинн С. Молекулярная спектроскопия триплетного состояния / С. Мак-Глинн, Т. Адзуми, М. Киносита. – М.: Мир, 1972. – 448 с.

13. McClure D. S. Triplet-singlet transitions in organic molecules. Lifetime measurements of the triplet state / D. S. McClure // Journal of Chemical Physics. – 1949. – V. 17. – № 10. – P. 905–913.

14. Медведев Э. С. Теория безызлучательных переходов в многоатомных молекулах / Э. С. Медведев, В. И. Ошеров. – М.: Наука, 1983. – 280 с.

15. Бахшиев Н. Г. Спектроскопия межмолекулярных взаимодействий / Н. Г. Бахшиев. – Л.: Наука, 1972. – 265 с.

16. Förster Th. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz // Th. Förster // Ann. Phys. – 1948. – V.2. – P. 55–75.

17. Ермолаев В. Л. Безызлучательный перенос энергии электронного возбуждения / В. Л. Ермолаев, Е. Н. Бодунов, Е. Б. Свешникова, Т. А. Шахвердов. – Л.: Наука. – 1977. – 238 с.

18. Confalone P. N. The use of heterocyclic chemistry in the synthesis of natural and unnatural products / P. N. Confalone // J. Heterocycl. Chem. – 1990. – V. 27. – P. 31–47.

19. Лазеры на красителях / под ред. Ф. П. Шефера. – М.: Мир, 1976. – 329 с.

20. Magde D. Fluorescence quantum yields and their relation to lifetimes of rhodamine 6G and fluorescein in nine solvents. Improved absolute standards for quantum yields / D. Magde, R. Wong, P. G. Seybold // Photochemistry and Photobiology. – 2002. – V. 75. – P. 327–334.

21. Gerasimova M. A. Fluorescence and photoinduced proton transfer in the protolytic forms of fluorescein: Experimental and computational study / M. A. Gerasimova, F. N. Tomilin, E. Yu. Malyar, S. A. Varganov, D. G. Fedorov, S. G. Ovchinnikov, E. A. Slyusareva // Dyes and Pigm. – 2020. – V. 173. – P. 107851.

22. Слюсарева Е. А. Влияние галогензамещения на структуру и электронные спектры флуороновых красителей / Е. А. Слюсарева, Ф. Н. Томилин, А. Г. Сизых и др. // Оптика и спектроскопия. – 2012. – Т. 112. – № 4. – С. 555–563.

23. Parades J. M. Real-Time phosphate sensing in living cells using fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM) / M. D. Giron, M. J. Ruedas-Rama, A. Orte, L. Crovetto, E. M. Talavera, R. Salto, J. M. Alvarez-Pez // J. Phys. Chem. B – 2013. – V. 117. – № 27. – P. 8143–8149.

24. Li D.-H. A rapid method for the determination of molar ratio of fluorophore to protein by fluorescence anisotropy detection / D.-H. Li, Q.-Z. Zhu, D. Ye [et al.] // Analytica Chimica Acta. – 1999. – V. 389. – № 1–3. – P. 85–88.

25. Birla L. Absorption and steady state fluorescence study of interaction between eosin and bovine serum albumin / L. Birla, A.-M. Cristian, M. Hillebrand // Spectrochimica Acta Part A. – 2004. – V. 60. – P. 551–556.

26. 3D-лазерные информационные технологии / под ред. П. Е. Твердохлеба. – Новосибирск: Институт автоматики и электрометрии СО РАН, 2003. – 550 с.

27. Talavera E. M. Fluorescein-labeled DNA probes for homogeneous hybridization assays: Application to DNA E-coli renaturation / J. M. Alvarez-Pez, L. Ballesteros, R. Bermejo // Appl. Spectrosc. – 1997. – V. 51. – P. 401–406.

28. Martinez-Peragon, A. Rational design of a new fluorescent 'ON/OFF' xanthene dye for phosphate detection in live cells / D. Miguel, A. Orte, A. J. Mota, M. J. Ruedas-Rama, J. Justicia, J. M. Alvarez-Pez, J. M. Cuerva, L. Crovetto // Org. Biomol. Chem. – 2014. – V. 12. – № 33. – P. 6432–6439.

29. Haugland R. P. Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals / R. P. Haugland. – Molecular Probes, Inc., 1996. – 6th ed. – 679 p.

30. Sharma A. Small Organic Molecules-Based Fluorescent Biosensors and Their Applications / A. Sharma. – Boca Raton: CRC Press, 2025. – 220 p.

ГЛАВА 2.
СПЕКТРАЛЬНЫЕ И ФОТОФИЗИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ИОННЫХ ФОРМ ФЛУОРЕСЦЕИНА

2.1. Перенос протона в основном и возбужденном состояниях молекул

С точки зрения протолитической теории, перенос протона (H^+) от молекулы-донора (кислоты) к молекуле-акцептору (основанию) трактуется как кислотно-основная реакция, в результате которой происходит образование сопряжённой пары «кислота-основание». Перенос протона протекает как в прямом (диссоциация), так и в обратном (ассоциация) направлениях, что приводит к равновесию между протонированными и депротонированными формами соединения в основном электронном состоянии. В этом процессе могут участвовать хромофорные группы молекул (прямо или косвенно – например, через систему сопряженных π-связей), вследствие чего кислотно-основные превращения отражаются на их спектральных и фотофизических характеристиках.

Равновесие между ионными формами соединения в водном растворе описывается уравнением:

$$MH \rightleftarrows M^- + H^+, \qquad (2.1)$$

где MH представляет собой протонированную (кислотную) форму, M^- – депротонированную (основную) форму соединения, а H^+ – катион водорода, протон, высвобождающийся при диссоциации.

Согласно классической теории электролитической диссоциации Аррениуса, константа равновесия реакции K_a, равная отношению скоростей прямой и обратной реакции (2.1), может быть выражена через равновесные концентрации участвующих в реакции соединений:

$$K_a = \frac{[M^-][H^+]}{[MH]},$$
$$pK_a = -\lg\left(\frac{[M^-][H^+]}{[MH]}\right). \quad (2.2)$$

Константа равновесия используется в уравнении Хендерсона-Хассельбаха, которое позволяет рассчитать концентрацию протонированных и депротонированных форм соединения в зависимости от pH:

$$pH = pK_a + \lg\frac{[M^-]}{[MH]}. \quad (2.3)$$

Зависимость концентрации каждой формы от pH будет описываться сигмоидальной функцией [1]. Благодаря сочетанию протяженных областей постоянного значения с узкой зоной резкого изменения, обеспечивающей высокую чувствительность к изменению pH (рис. 2.1), эта функция удобна для практического использования. Кроме того, подобные зависимости хорошо описываются простыми аналитическими уравнениями, что существенно упрощает количественную обработку результатов измерений.

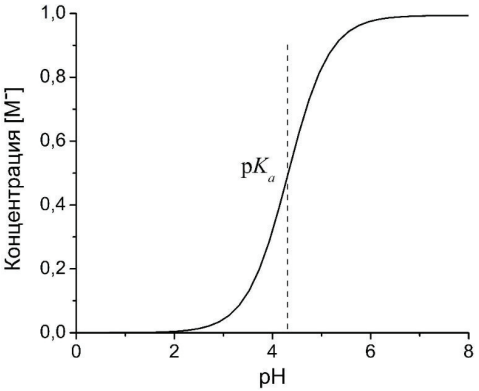


Рисунок 2.1. Результат расчета концентрации [M^-]
по формуле Хендерсона-Хассельбаха. pK_a взято равным 4,2

При наличии в составе соединения нескольких функциональных групп, проявляющих кислотно-основные свойства, диссоциация будет происходить ступенчато, при этом каждой ступени диссоциации будет соответствовать своя константа равновесия. Именно к таким соединениям и относится флуоресцеин.

В предыдущей главе были перечислены процессы, происходящие после фотовозбуждения органической молекулы (рис. 1.1). В случае соединений с выраженными кислотно-основными свойствами в этот список необходимо добавить межмолекулярный перенос протона [2–5], меняющий ионное состояние соединения. Так, при возбуждении нейтральной (MH) молекулы (рис. 2.2) возможен последующий переход в анионную (M^-) форму. Данный процесс обусловлен отщеплением протона H^+, сопровождаемым последующим испусканием излучения с возбужденного состояния уже анионной M^- (а не исходной нейтральной) формы. При условии, что равновесие в возбужденном состоянии успевает установиться за время жизни последнего, по аналогии с уравнением (2.2) можно ввести константу ионного равновесия K_a^*, характеризующую возбужденное состояние.

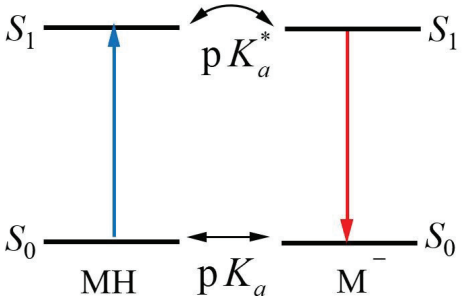


Рисунок 2.2. Схематическое представление процесса межмолекулярного фотопереноса протона от MH с образованием M^-формы

Значения десятичных логарифмов констант равновесия в основном (pK_a) и возбужденном (pK_a^*) состояниях могут сильно различаться. Впервые на этот факт указал Вебер [6] в 1931 году, продемонстрировав зависимость значений

констант равновесия от примененного метода исследования – абсорбционного или флуоресцентного. В 1949 году Фёрстер [7] интерпретировал данный феномен с позиции межмолекулярного переноса протона и впоследствии предложил методику количественного описания эффекта. Этот подход, получивший название «цикла Фёрстера», сочетает термодинамические соотношения со спектроскопическими данными для определения константы ионного равновесия исследуемого вещества в возбужденном состоянии (рис. 2.3).

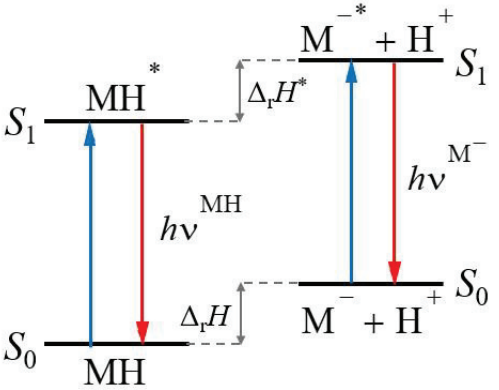


Рисунок 2.3. Электронные энергетические уровни кислотной (MH) и основной (M^-) форм в основном и возбужденном состояниях (цикл Фёрстера) и изменения энтальпии основного ($\Delta_r H$) и возбужденного ($\Delta_r H^*$) состояний

Для процесса переноса протона, сопровождаемого изменением молярной энтальпии кислотно-основной реакции при переходе из основного (значение энтальпии реакции $\Delta_r H$) в возбужденное ($\Delta_r H^*$) состояние, справедливо следующее энергетическое соотношение:

$$\Delta_r H^* - \Delta_r H = N_A h(\nu_{0-0}^{M^-} - \nu_{0-0}^{MH}), \qquad (2.4)$$

где h – постоянная Планка, ν_{0-0}^{MH} и $\nu_{0-0}^{M^-}$ – частоты чисто электронного (0-0) перехода MH и M^- форм. Принимая во внимание, что разница изменения энтальпий реакции в основном и возбужденном состояниях близка к разнице

стандартных энергий Гиббса (ΔG^0): $\Delta_r H^* - \Delta_r H \approx \Delta G^{*0} - \Delta G^0$, соотношение (2.4) принимает вид:

$$\Delta \mathrm{p}K_a = \frac{N_A h(\nu_{0-0}^{\mathrm{M}^-} - \nu_{0-0}^{\mathrm{MH}})}{2{,}303RT}, \qquad (2.5)$$

где $\Delta \mathrm{p}K_a$ – разница показателей констант равновесия в возбужденном ($\mathrm{p}K_a^*$) и основном ($\mathrm{p}K_a$) состояниях, R – универсальная газовая постоянная, T – температура. Уравнение (2.5) при переводе спектральных параметров в волновые числа выглядит следующим образом:

$$\Delta \mathrm{p}K_\alpha = hc\frac{\tilde{\nu}_{0-0}^{\mathrm{M}^-} - \tilde{\nu}_{0-0}^{\mathrm{MH}}}{2{,}303kT}, \qquad (2.6)$$

где k – постоянная Больцмана, $\tilde{\nu}_{0-0}^{\mathrm{MH}}$ и $\tilde{\nu}_{0-0}^{\mathrm{M}^-}$ – волновые числа 0-0 переходов MH и M^- форм соединения.

Цикл Фёрстера применим при следующих допущениях:

– разность энтальпий реакции переноса протона $\Delta_r H$ должна совпадать с разностью стандартных энтальпий соответствующих состояний;

– энтропия протонирования/депротонирования в основном и возбужденном состояниях предполагается одинаковой.

Корректное определение волновых чисел 0-0 переходов на основе анализа спектров может оказаться непростой задачей вследствие значительных ширины и перекрытия спектральных полос, тем не менее существуют подходы, позволяющие успешно решить эту проблему. Они будут рассмотрены в последующих разделах.

Работы Вебера [6], Фёрстера [7] и Веллера [8] положили начало систематическому исследованию молекулярных систем с переносом протона в возбужденном состоянии. Эффективность и направление данного процесса характеризуются разностью $\Delta \mathrm{p}K_a$, (2.6), отрицательное значение которой указывает на фотокислотный характер вещества, в то время как положительное,

напротив, соответствует фотооснованиям. В возбужденном состоянии молекулы фотокислот выступают в роли донора свободного (сольватированного) протона, увеличивая кислотность среды, фотооснования же в возбужденном состоянии присоединяют протоны к своей структуре.

Реакции отрыва и присоединения протона в возбужденном состояниях, как правило, являются обратимыми. Если для молекулы характерны кислотные свойства в возбужденном состоянии, то после релаксации в основное состояние происходит обратное присоединение протона, и цикл Фёрстера для нее замыкается (рис. 2.3).

2.2. Ионные равновесия флуоресцеина в основном состоянии и их спектральные проявления

Флуоресцеин, будучи двухосновной кислотой, способен к ступенчатой диссоциации, при этом нейтральная форма представлена разными таутомерными состояниями. Многообразие свойств ионных и таутомерных форм красителя необходимо учитывать, выбирая стратегию его применения в качестве флуоресцентной метки или зонда.

В водной среде флуоресцеин может существовать в виде четырех основных молекулярно-ионных форм, отличающихся зарядом: катион C (+1), нейтральная молекула N (0), моноанион M (–1) и дианион D (–2). Нейтральная форма N, в свою очередь, представлена тремя таутомерными формами: хиноидной Q (0), лактонной L (0) и цвиттерионной Z (0) (рис. 2.4). Предполагается, что переходы происходят преимущественно между ионными и молекулярными формами, заряды которых отличаются на единицу. Так, катионная форма C после диссоциации протона может обратимо переходить в различные таутомеры нейтральной формы N (Q, L, Z), а моноанионная форма M способна обратимо переходить в Q и Z формы [9].

В работах [9–12] были измерены спектры поглощения флуоресцеина в широком диапазоне pH, анализ которых позволил получить информацию о

спектрах поглощения отдельных ионных форм. Кроме того, методом спектрофотометрического титрования были получены значения констант pK_a для всех ступеней диссоциации. Протонирование и депротонирование молекулы может влиять на хромофорную группу красителя (ксантеновый трицикл), что придает каждой ионной форме уникальные спектральные характеристики (рис. 2.5).

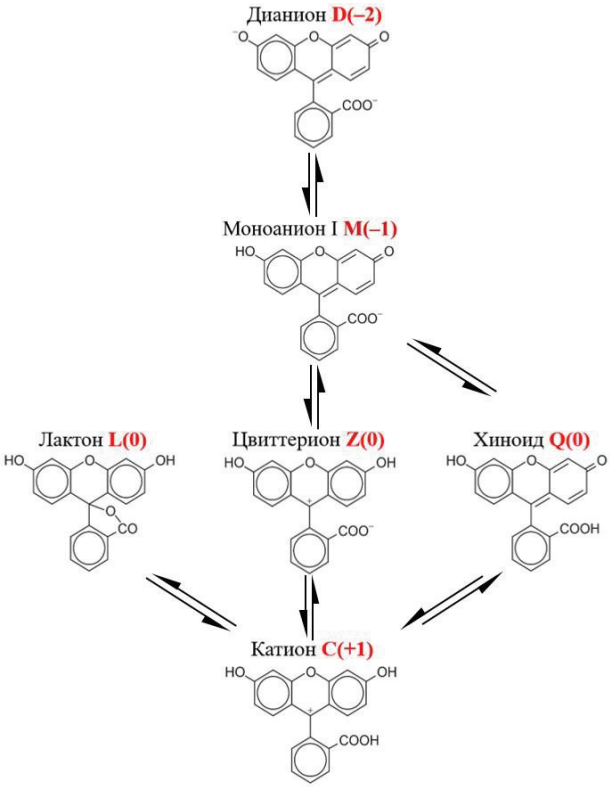


Рисунок 2.4. Структурные формулы ионных и таутомерных форм флуоресцеина

В целом спектры поглощения всех окрашенных форм представляют собой широкую бесструктурную полосу и существенно перекрываются между собой (рис. 2.5). Спектр поглощения D формы флуоресцеина имеет наибольший коэф-

фициент экстинкции по сравнению с другими формами (88000 $М^{-1}см^{-1}$ в максимуме поглощения в районе 488 нм). Формы M и Q имеют неразличимо близкие спектры с двойными максимумами около 453 и 475 нм и коэффициентом экстинкции 32200 $М^{-1}см^{-1}$, что объясняется одинаковыми хромофорными группами. Z и C формы имеют схожие по форме, но разрешимые спектры поглощения и молярный коэффициент 55000 $М^{-1}см^{-1}$ в максимумах спектра 437 и 434 нм, соответственно. L форма не поглощает в видимом диапазоне длин волн [9].

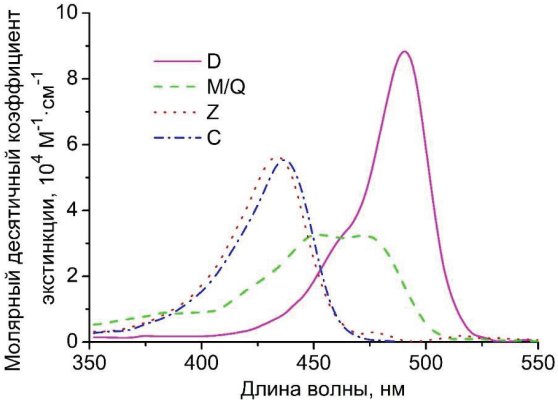


Рисунок 2.5. Спектры экстинкции ионных форм флуоресцеина. Адаптировано из [9]

Ионные равновесия флуоресцеина на трех ступенях его диссоциации можно записать следующим образом:

$$\begin{aligned} M &\rightleftarrows D + H^+ \quad (pK_a^{MD}), \\ N &\rightleftarrows M + H^+ \quad (pK_a^{NM}), \\ C &\rightleftarrows N + H^+ \quad (pK_a^{CN}). \end{aligned} \tag{2.7}$$

В табл. 2.1 представлены опубликованные ранее значения констант ионного равновесия флуоресцеина в основном состоянии.

Таблица 2.1. Ионные равновесия флуоресцеина в основном состоянии

Константа равновесия	Литературные источники				
	[9]		[10]	[11]	[12]
pK_a^{MD}	6,31		6,8	6,7	6,43
pK_a^{NM}	Q-M	3,27	4,45	4,4	4,31
	Z-M	3,46			
pK_a^{CN}	C-Q	3,20	2,14	2,2	2,08
	C-L	2,38			
	C-Z	3,01			

Расхождения в установленных значениях зависят от того, учитывалось ли таутомерное равновесие или авторы ограничились рассмотрением только ионных равновесий. Кроме того, расхождения могут быть связаны с использованием различных составов буферных растворов. Влияние состава буфера на ионное равновесие флуоресцеина будет рассмотрено в главе 3.

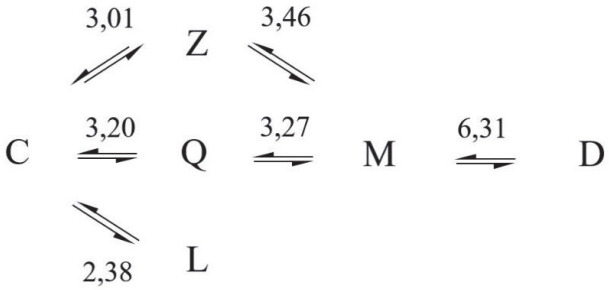


Рисунок 2.6. Схема ионных и таутомерных равновесий водных растворов флуоресцеина (над стрелками обозначены значения микроконстант равновесия). Адаптировано из [9]

Результаты, полученные Клонисом с соавторами [9], по-видимому, следует считать наиболее детальными, поскольку авторы рассмотрели ионное равновесие с учетом таутомеров нейтральной формы флуоресцеина (Q, L, Z). Были получены так называемые микроконстанты равновесия, что дало более полную картину распределения всех ионных и таутомерных форм флуоресцеина в основном состоянии в широком диапазоне pH (рис. 2.6).

Записав уравнение (2.3) для каждого из возможных равновесий между различными формами флуоресцеина в основном состоянии, а также условие сохранения общего количества флуоресцеина, получим систему уравнений для нормированных равновесных концентраций различных форм флуоресцеина:

$$\begin{cases} K_a^{MD}[M]-[H^+][D]=0 \\ K_a^{QM}[Q]-[H^+][M]=0 \\ K_a^{ZM}[Z]-[H^+][M]=0 \\ K_a^{CQ}[C]-[H^+][Q]=0 \\ K_a^{CZ}[C]-[H^+][Z]=0 \\ K_a^{CL}[C]-[H^+][L]=0 \\ [D]+[M]+[Q]+[Z]+[L]+[C]=1. \end{cases} \quad (2.8)$$

Решая систему уравнений для разных значений концентрации ионов водорода $[H^+]$, можно определить зависимость концентрации ионных и таутомерных форм флуоресцеина в основном состоянии в широком диапазоне pH (рис. 2.7). Согласно полученным данным, в диапазоне pH от 0 до 7 флуоресцеин существует в виде смеси двух-шести различных форм. Спектры поглощения отдельных ионных форм удается регистрировать лишь в предельно кислых (pH ≈ 0) и щелочных (pH>8) условиях, при которых преимущественно существуют соответственно C и D формы флуоресцеина. В области pH 1,5÷2,5 заметный вклад в равновесие вносят нейтральные формы флуоресцеина (L, Q, Z). При pH 3÷4 суммарная доля нейтрального состояния достигает максимума и преимущественно представлена L формой (около 70 %) при меньших вкладах Q и Z форм (порядка 15 % каждая). В интервале pH 4,5÷6,4 в системе уже преобладают M и D формы.

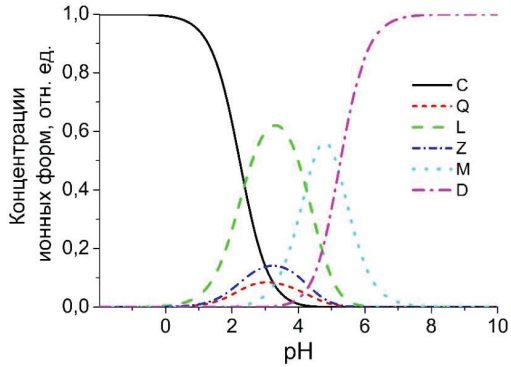


Рисунок 2.7. Зависимость концентрации ионных форм флуоресцеина от pH в основном состоянии [9,13]

2.3. Трудности, возникающие при рассмотрениях ионных равновесий флуоресцеина в возбужденном состоянии

При рассмотрении ионных равновесий в возбужденном состоянии необходимо выявить спектры флуоресценции «чистых» ионных форм, а также меру их интенсивности – квантовые выходы, для чего используют метод флуориметрического титрования. Однако интерпретация результатов, полученных этим методом, затруднена вследствие ряда обстоятельств:

(i) в диапазоне pH 0÷7 происходит одновременное возбуждение сразу нескольких ионных форм флуоресцеина (рис. 2.7);

(ii) селективное возбуждение отдельной формы невозможно независимо от выбора длины волны, поскольку спектры поглощения сильно перекрываются (рис. 2.5);

(iii) вследствие возможного переноса протона в возбужденном состоянии поглощать и испускать будут различные ионные состояния. Эффективность этого процесса зависит как от разности констант равновесия в основном и возбужденном состояниях (термодинамический аспект), так и от конкуренции скоростей реакции протонирования/депротонирования и флуоресцентных времен жизни этих состояний (кинетический аспект).

Первое затруднение для некоторых форм можно устранить выбором оптимального диапазона pH за пределами значений 0÷7. Так, спектр флуоресценции, квантовый выход (0,93) и флуоресцентное время жизни (4,1 нс) дианионного состояния в щелочной среде считаются надежно установленными [9]. Однако, как было продемонстрировано в [14], даже при использовании экстремально кислых сред, вплоть до 6,7 М раствора серной кислоты, не удается получить чистый контур флуоресценции катиона (рис. 2.8). В следующем разделе будет показано, что получаемый в этих условиях спектр состоит из суперпозиции контуров катионной и хиноидной форм, последняя из которых образуется именно за счет переноса протона в возбужденном состоянии.

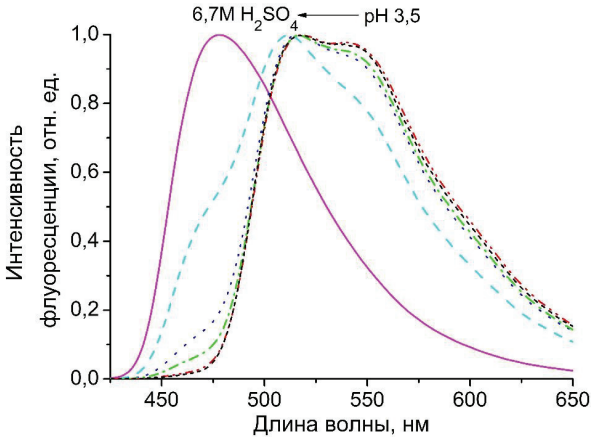


Рисунок 2.8. Спектры флуоресценции водных растворов флуоресцеина с различным значением pH на длине волны возбуждения 400 нм в кислой среде (от pH 3,5 до 6,7 М раствора серной кислоты)

Отдельно следует упомянуть, что определение квантовых выходов в отсутствие информации о типе возбуждаемой и излучающей молекул относительным методом (через сравнение подынтегрального значения кривой испускания и доли поглощенной энергии по отношению к аналогичным параметрам вещества с известным квантовым выходом) дает искаженную характеристику конкретной ионной формы.

Недостаточный учет указанных факторов привел к расхождению в значениях квантовых выходов различных ионных форм, полученных разными авторами [9, 11–12, 15], табл. 2.2, за исключением D формы. Ряд авторов полагали, что нейтральная форма имеет нулевой квантовый выход, т. е. не флуоресцирует. Некоторые авторы считали, что C форма не флуоресцирует, тогда как другие утверждали, что ее эффективность сопоставима с квантовым выходом D формы. Примечательно, что большинство исследователей не разделяли флуоресценцию формы N на вклады отдельных таутомеров, и только Клонис с соавторами [9] связали наблюдаемую флуоресценцию с излучением Q формы.

Таблица 2.2. Квантовые выходы ионных форм флуоресцеина (литературные данные)

Источник	Ионные формы флуоресцеина			
	C	N	M	D
[9]	0,9-1	0,29	0,36	0,93
[11]	0,9-1	0,20-0,25	0,25-0,35	-
[12]	0	0	0,37	0,93
[15]	0,39	0	0,26	0,93

Имеющиеся различия в значениях квантовых выходов флуоресценции объясняются как способом получения и интерпретации данных, так и высокой чувствительностью спектров испускания к условиям среды (pH, температура, ионы буфера), опосредованно влияющими на эффективность фотопереноса протона. Эти эффекты будут рассмотрены в следующей главе.

2.4. Подходы к определению ионных равновесий флуоресцеина в возбужденном состоянии

Для решения задачи определения спектральных характеристик ионных и таутомерных форм флуоресцеина в возбужденном состоянии нами использовалось сочетание метода Аленцева-Фока и моделирования кинетики фотоиндуцированных кислотно-основных реакций в условиях непрерывного фотовозбуждения. Ниже мы подробно рассмотрим каждый из указанных подходов.

1. Метод Аленцева-Фока для разделения перекрывающихся спектральных контуров.

Метод Аленцева-Фока [16] применяется для разделения перекрывающихся контуров спектральных полос произвольной, неизвестной заранее формы, на две составляющие χ_1 и χ_2, соответствующие двум разным флуорофорам. Условием применимости данного метода является частичная разнесенность искомых спектров, т. е. существование спектральных областей, свободных от перекрытия (рис. 2.8). Для анализа может использоваться пара спектров $f_1(\lambda)$ и $f_2(\lambda)$, зарегистрированных при различных значениях pH (рис. 2.8), где вклады двух флуоресцирующих форм заметно различаются. Искомые контуры χ_1 и χ_2 вычислялись по формулам:

$$\chi_1(\lambda) = \frac{f_2(\lambda) - a_2 f_1(\lambda)}{a_1 - a_2}, \tag{2.9}$$

$$\chi_2(\lambda) = f_1(\lambda) - \chi_1(\lambda). \tag{2.10}$$

Поэтапная процедура разделения спектров приведена на рис. 2.9, из нее можно легко уяснить смысл параметров a_1 и a_2.

В рассмотренном примере компонента χ_1 с максимумом около 478 нм была идентифицирована как спектр флуоресценции C формы. Компонента χ_2 с максимумом на 517 нм и выраженным плечом около 550 нм относится к спектру Q формы флуоресцеина. Максимум спектра флуоресценции C формы в области 475 нм совпадает с результатами квантово-химических расчетов [17].

Результат применения метода не зависит от выбора пары исходных контуров, а смещение равновесия двух искомых форм может регулироваться не только pH, но и другими внешними воздействиями (например, температурой).

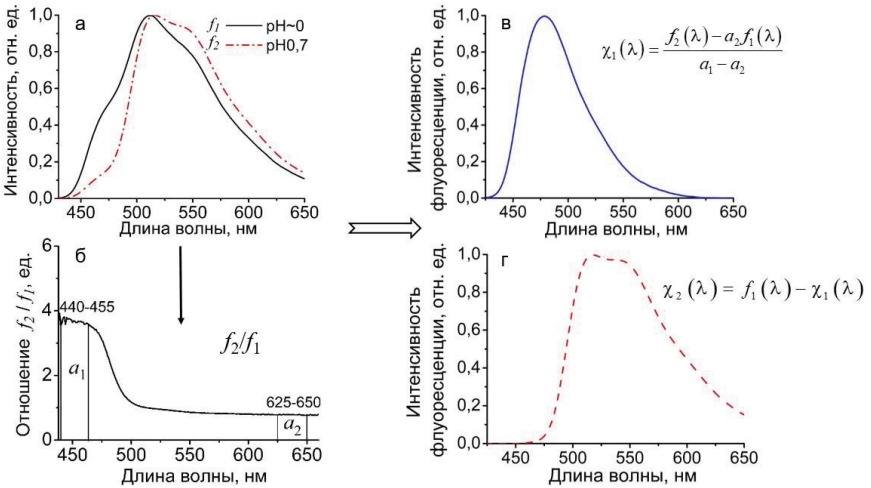


Рисунок 2.9. Этапы разделения (а-г) спектров флуоресценции методом Аленцева-Фока. Для примера взяты спектры при pH ~ 0 и pH 0,7, при которых флуоресцируют преимущественно C и Q формы [14]

2. Моделирование кинетики фотоиндуцированных кислотно-основных реакций в условиях непрерывного фотовозбуждения.

В возбужденном состоянии флуоресцеина существует конкуренция между переносом протона и другими процессами дезактивации, которые характеризуются константой скорости ~10^8 $с^{-1}$ [18]. Для анализа подобных систем эффективен кинетический подход, предложенный Веллером [8]. В рамках кинетической модели одновременно учитываются вероятности поглощения, излучения, протонирования и депротонирования. Применение этого метода, однако, было ограничено из-за необходимости точного определения множества скоростей реакций, которое вследствие короткого времени жизни синглетных состояний требовало инструментальных методов с высоким временным разрешением. Эти методы стали доступны лишь с середины 1980-х годов. Схема, основанная на упрощенной диаграмме Яблонского и обозначения констант, представлена на рисунке 2.10.

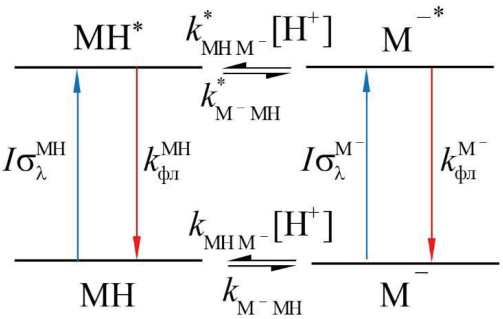


Рисунок 2.10. Кинетическая схема, основанная на диаграмме Яблонского, для описания концентрации ионных форм в основном возбужденном состояниях

Вероятность поглощения электромагнитного излучения ионными формами флуоресцеина определяется параметром сечения поглощения σ_λ ($см^2$) (1.1). Вероятность излучательных процессов $k_{фл}$ ($с^{-1}$) представляет собой величину, обратную флуоресцентному времени жизни ($\tau_{фл}$) для каждой формы (2.11).

$$k_{фл} = \frac{1}{\tau_{фл}}. \tag{2.11}$$

Индексы C, Z, Q, L, M и D указывают на принадлежность соответствующих констант к конкретной протолитической форме красителя. Вероятности процессов депротонирования/протонирования ионных форм флуоресцеина учитываются через соответствующие константы скоростей $k_{M^-\,MH}$ ($с^{-1}$) и $k_{MH\,M^-}$ ($с^{-1}\cdot М^{-1}$). Десятичный логарифм отношения этих констант равен показателю константы ионного равновесия pK_a на соответствующей ступени диссоциации:

$$pK_a = -\lg\left(\frac{k_{MH\,M^-}}{k_{M^-\,MH}}\right). \tag{2.12}$$

Условия эксперимента задаются интенсивностью падающего излучения I, которая с учетом характеристик используемого источника излучения может быть рассчитана по формуле:

$$I = \frac{E}{Yh\nu}, \tag{2.13}$$

где E – мощность излучения, попадающего на образец (Вт), Y – площадь щелевого пятна (см^2); ν – частота возбуждающего излучения (с$^{-1}$). Типичное значение величины I составляет порядка 10^{20} см$^{-2}$с$^{-1}$.

Влияние pH растворителя на распределение концентрации ионных и таутомерных форм флуоресцеина как в основном, так и в возбужденном состояниях учитывается в модели в виде сомножителя [H$^+$] (рис. 2.10, 2.11).

Для нахождения относительных концентраций в основном и возбужденном состояниях флуоресцеина в широком диапазоне pH необходимо учесть полный комплект ионных и таутомерных форм красителя, а также процессы их взаимного превращения. В основном состоянии существуют все шесть форм – C, Z, Q, L, M и D. В возбужденном состоянии флуоресцеин представлен пятью ионными формами – C*, Z*, Q*, M* и D*, среди которых Q* и Z* представляют собой таутомеры нейтральной формы. Лактонная форма не поглощает в видимом диапазоне, поэтому ее возбужденное состояние не учитывается. Тем не менее в основном состоянии вклад L формы в общую картину протолитических превращений значителен (рис. 2.7).

Для каждой ионной формы флуоресцеина составлены кинетические уравнения, описывающие процессы активации и дезактивации. Например, концентрация возбужденного состояния C* формы определяется поглощением света из основного состояния C (увеличение), излучательным переходом в основное состояние C*→C (уменьшение) и безызлучательными переходами вследствие переноса протона в возбужденном состоянии C*→Z* и C*→Q* (уменьшение), а также обратными переходами Z*→C* и Q*→C* (увеличение) (рис. 2.11).

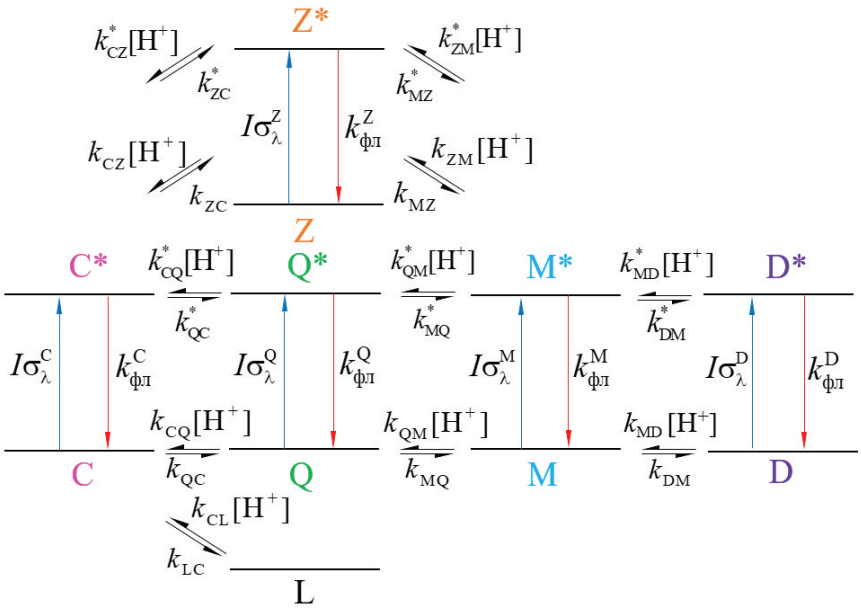


Рисунок 2.11. Схема уровней и кинетическая схема процессов, происходящих в смеси ионных форм флуоресцеина

Решение полученной системы уравнений дает набор стационарных концентраций при непрерывном возбуждении на заданной длине волны. Влияние среды – температура, протонные донорные/протонакцепторные добавки – отражено в сдвигах ионного равновесия через изменение констант протонирования/депротонирования (2.12). Модель обеспечивает сохранение общей нормированной концентрации флуоресцеина во всем диапазоне pH (2.14).

$$C+C^*+Z+Z^*+Q+Q^*+L+M+M^*+D+D^*=1. \qquad (2.14)$$

При моделировании были использованы данные, приведенные в работах [18, 19]. Соответствующие константы протонирования/депротонирования были пересчитаны согласно выражению (2.12) с учетом ионных равновесий, описанных в таблице 2.3. Флуоресцентные времена жизни ($\tau_{фл}$) для расчета

констант излучательных процессов были взяты из [9, 14, 20]. Значения молярных десятичных коэффициентов экстинкции ε_λ были взяты из [9] и переведены в значения сечения поглощения σ_λ (1.1).

Таблица 2.3 Константы ионного равновесия, протонирования, депротонированния в основном и возбужденном состояниях для различных ступеней диссоциации флуоресцеина (полужирным шрифтом выделены результаты, полученные впервые)

Ступень диссоциации	Основное состояние		Возбужденное состояние	
	Символ	Значение	Символ	Значение
M↔D	pK_a^{MD}	6,31 [9]	$pK^*_a{}^{MD}$	**5,47** *в*
	k_{DM} (c^{-1})	1,27 *а*	k^*_{DM} (c^{-1})	$2{,}31\cdot10^{3}$ *а*
	k_{MD} ($c^{-1}\cdot M^{-1}$)	$2{,}60\cdot10^{6}$ [18]	k^*_{MD} ($c^{-1}\cdot M^{-1}$)	$9{,}20\cdot10^{8}$ [18]
Q↔M	pK_a^{QM}	3,27 [9]	$pK^*_a{}^{QM}$	**3,30** [14]
	k_{MQ} (c^{-1})	$3{,}90\cdot10^{5}$ *б*	k^*_{MQ} (c^{-1})	$3{,}90\cdot10^{7}$ [19]
	k_{QM} ($c^{-1}\cdot M^{-1}$)	$7{,}26\cdot10^{8}$ *а*	k^*_{QM} ($c^{-1}\cdot M^{-1}$)	$7{,}26\cdot10^{10}$ *а*
Z↔M	pK_a^{ZM}	3,46 [9]	$pK^*_a{}^{ZM}$	**–0,50** [14]
	k_{MZ} (c^{-1})	$1{,}87\cdot10^{5}$ *а*	k^*_{MZ} (c^{-1})	$1{,}04\cdot10^{11}$ [19]
	k_{ZM} ($c^{-1}\cdot M^{-1}$)	$5{,}40\cdot10^{8}$ *б*	k^*_{ZM} ($c^{-1}\cdot M^{-1}$)	$3{,}29\cdot10^{10}$ *а*
C↔Q	pK_a^{CQ}	3,20 [9]	$pK^*_a{}^{CQ}$	**–0,60** [14]
	k_{QC} (c^{-1})	$1{,}07\cdot10^{4}$ *а*	k^*_{QC} (c^{-1})	$1{,}04\cdot10^{11}$ [19]
	k_{CQ} ($c^{-1}\cdot M^{-1}$)	$1{,}70\cdot10^{7}$ *б*	k^*_{CQ} ($c^{-1}\cdot M^{-1}$)	$2{,}61\cdot10^{10}$ *а*
C↔Z	pK_a^{CZ}	3,01 [9]	$pK^*_a{}^{CZ}$	**3,10** [14]
	k_{ZC} (c^{-1})	$1{,}66\cdot10^{4}$ *а*	k^*_{ZC} (c^{-1})	$1{,}04\cdot10^{11}$ [19]
	k_{CZ} ($c^{-1}\cdot M^{-1}$)	$1{,}70\cdot10^{7}$ *б*	k^*_{CZ} ($c^{-1}\cdot M^{-1}$)	$1{,}31\cdot10^{14}$ *а*
C↔L	pK_a^{CL}	2,38[9]		-
	k_{LC}(c^{-1})	$7{,}09\cdot10^{4}$ *а*		-
	k_{CL} ($c^{-1}\cdot M^{-1}$)	$1{,}70\cdot10^{7}$ *б*		-

а – расчет по формуле (2.12);

б – значение, на два порядка меньшее, чем полученное в [18] для возбужденного состояния;

в – получено через цикл Фёрстера (2.6).

Индивидуальные характеристики исследуемого вещества задавались путем ввода спектров поглощения ионных форм, констант ионного равновесия в основном и возбужденном состояниях и флуоресцентных времен жизни. Условия эксперимента определялись двумя независимыми (варьируемыми) параметрами: длиной волны возбуждения (два фиксированных значения) и интенсивностью излучения источника. Моделирование осуществлялось с помощью

программы [21], обеспечивавшей вывод результатов в виде графических зависимостей относительной концентрации ионной формы в основном и возбужденном состояниях от pH, а также в формате численных данных для заданных значений pH.

В случае флуоресцеина скорость переноса протона существенно зависит от ступени диссоциации. Так, при диссоциации катионной формы она значительно превышает скорость дезактивации возбужденного состояния (10^{11}с$^{-1}$) [19], в результате чего перенос протона протекает эффективно и сопровождается интенсивным излучением образовавшейся нейтральной формы. При диссоциации же моноанионной формы скорость переноса протона оказывается сравнимой с константой скорости излучения (10^8 с$^{-1}$) [18], что открывает широкие возможности для управления процессом переноса протона при решении различных задач химического анализа.

Таблица 2.4. Значения флуоресцентных времен жизни $\tau_{фл}$ и вероятности излучательного процесса $k_{фл}$ для разных ионных форм флуоресцеина (полужирным шрифтом выделены результаты, полученные впервые)

Форма	Значение $\tau_{фл}$ ($\cdot 10^{-9}$ с)	Символ константы	Значение $k_{фл}$ (10^8 с$^{-1}$)*
C	**3,55** [14]	$k_{фл}^{C}$	**2,82**
Q	**3,00** [14]	$k_{фл}^{Q}$	**3,33**
Z	**3,55** [14]	$k_{фл}^{Z}$	**2,82**
M	**3,30** [20]	$k_{фл}^{M}$	**3,03**
D	4,10 [9]	$k_{фл}^{D}$	2,44

Зависимость распределения концентрации возбужденных состояний от длины волны возбуждения можно проиллюстрировать результатами расчета для двух длин волн возбуждения: 488 нм, на которой поглощает преимущественно D форма, и 435 нм, на которой поглощают преимущественно M и Q формы (рис. 2.12).

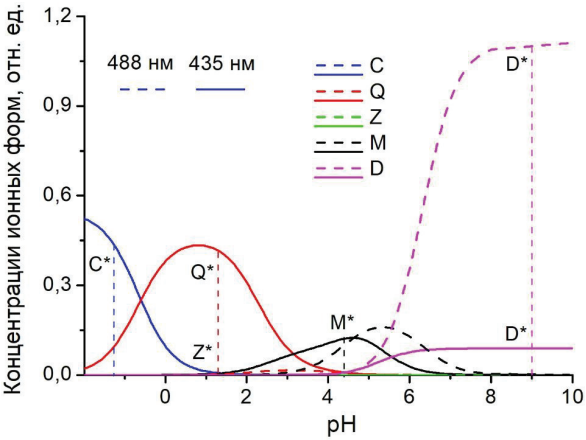


Рисунок 2.12. Результат моделирования концентрации ионных и таутомерных форм в возбужденном состоянии при длинах волн возбуждения 435 и 488 нм [20]

Вследствие селективности возбуждения в избранном спектральном диапазоне (рис. 2.5), а также переноса протона в возбужденном состоянии, соотношение концентраций ионных форм в возбужденном и основном состояниях при фиксированном pH различается (рис. 2.7). При этом соотношение концентраций для D и M форм зависит не только от pH, но и от длины волны возбуждения. Были найдены значения pH, при которых после установления равновесия излучают только «чистые» ионные формы. Они указаны вертикальными пунктирными линиями на рисунке 2.12 и составляют 6,7 M H_2SO_4 (для высококонцентрированных сильных кислот определение значения pH либо затруднено, либо невозможно по ряду причин), pH 1,3, pH 4,4 и pH 9,0 для C, Q, M и D форм соответственно. Указанные значения справедливы для обеих длин волн возбуждения – 435 и 488 нм, что предоставляет возможность количественной оценки параметров окружения красителя, влияющих на его флуоресценцию, путем анализа различий спектров, полученных для этих длин волн возбуждения.

2.5. Ионные равновесия флуоресцеина и перенос протона в возбужденном состоянии

Благодаря описанным подходам, главным образом моделированию распределения ионных и таутомерных форм флуоресцеина в возбужденном состоянии, удалось подобрать условия (pH 1,3 и pH 4,4) регистрации спектров двух «чистых» форм флуоресцеина (рис. 2.13). При обеспечении этих значений pH должна наблюдаться независимость формы спектра флуоресценции от длины волны возбуждения, что было продемонстрировано экспериментально (рис. 2.14).

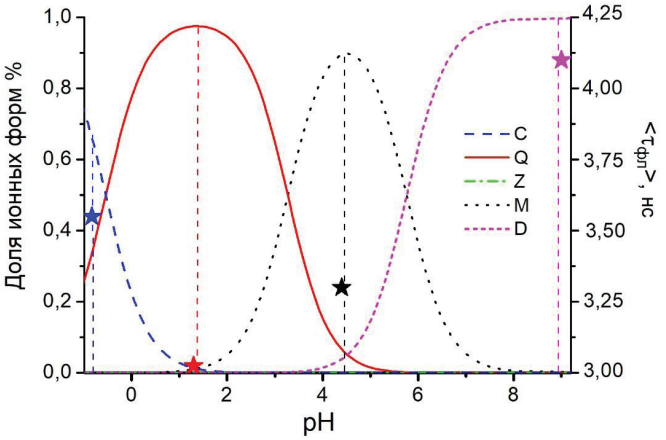
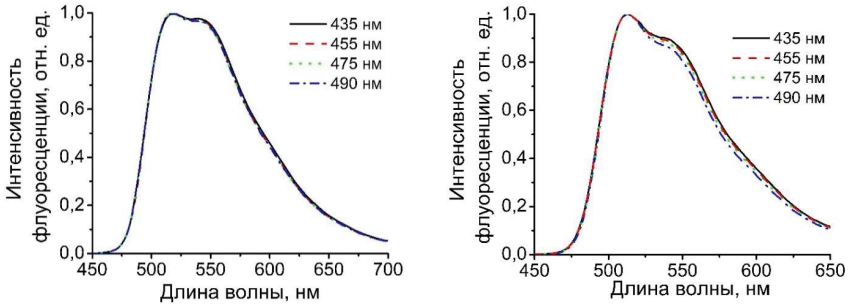


Рисунок 2.13. Нормированная концентрация ионных и таутомерных форм флуоресцеина в возбужденном состоянии (линии) и средние флуоресцентные времена жизни (символы) в широком диапазоне pH [20] на длине волны возбуждения 453 нм

Действительно, форма спектров флуоресценции при pH 1,3 не зависит длины волны возбуждения в диапазоне 435÷490 нм, что свидетельствует о том, что в растворе после протекания всех быстрых процессов сформировался излучатель одного типа (Q форма флуоресцеина) в возбужденном состоянии (рис. 2.14 а). Аналогично, для M формы при pH 4,4 зарегистрирована слабая зависимость от длины волны возбуждения в этом диапазоне (рис. 2.14 б). Не-

большое влияние длины волны возбуждения на форму спектра связано с влиянием D формы, которая имеет высокий квантовый выход и даже в минимальных концентрациях вносит возмущение. Окончательно спектр флуоресценции M формы флуоресцеина был получен за вычетом вклада D формы.



а *б*

Рисунок 2.14. Спектры флуоресценции раствора флуоресцеина при pH 1,3(а) и pH 4,4(б) при длинах волн возбуждения 435÷490 нм

Согласно результатам моделирования (рис. 2.13), измерить чистый контур катиона без примеси хиноида невозможно даже в экстремально кислой среде, однако применение метода Аленцева-Фока позволило успешно решить эту задачу и получить раздельно вклады хиноидной и катионной форм. Форма спектра флуоресценции хиноида, полученная методом Аленцева-Фока и измеренная при pH 1,3, полностью совпадает, подтверждая корректность использованного подхода.

На рис. 2.15 приведены спектры всех четырех флуоресцирующих форм флуоресцеина, три из которых (для катионной, хиноидной и моноанионной форм) были получены нами впервые, а спектр дианиона представлен при pH>8. Из рисунка видно, что спектр флуоресценции дианионной формы существенно перекрывается спектрами M и Q форм. Максимумы спектров флуоресценции M и D форм наблюдаются на длине волны 513 нм, тогда как для формы Q положение максимума смещено до 518 нм. Контуры спектров форм

Q и M в целом схожи, наблюдаемое расхождение в красной области спектра отражает различия в вибронной структуре энергетических уровней (рис. 2.4). Максимум флуоресценции C формы расположен на 478 нм. Сильное перекрытие полученных спектров отдельных форм еще раз подчеркивает сложность задачи их разделения в случае одновременного присутствия нескольких форм и неявных условий наблюдения «чистых» контуров.

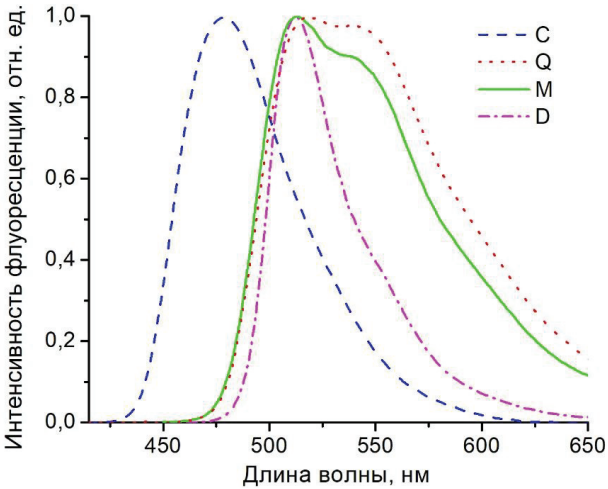


Рисунок 2.15. Спектры флуоресценции ионных форм флуоресцеина

В условиях, допускающих получение «чистых» спектральных контуров ионных форм, для последних были измерены спады флуоресценции и оценены средние флуоресцентные времена жизни, что послужило отправной точкой для расчета квантовых выходов на основе формулы (1.6). Для этого дополнительно по формуле Стриклера-Берга с учетом известных контуров поглощения и полученных нами спектров испускания были рассчитаны радиационные времена жизни $\tau_{рад}$ (табл. 2.5).

Таблица 2.5. Фотофизические характеристики ионных форм флуоресцеина

	Ионные формы в возбужденном состоянии			
	C*(pH<0)	Q*(pH 1,3)	M*(pH 4,4)	D*(pH>8)
$<\tau_{фл}>$, нс	3,55±0,10	3,00±0,10	3,30±0,10	4,10±0,10
$\tau_{рад}$, нс	3,85	7,13	7,17	4,41
$\Phi_{фл}$	0,92±0,07	0,42±0,04	0,46±0,05	0,93±0,06

Флуоресцентные времена жизни ионных форм флуоресцеина лежат в диапазоне 3,00÷4,10 нс. Значение для Q формы близко к опубликованным данным [9], тогда как для C формы флуоресцентное время $\tau_{фл}$ было уточнено: найденные ранее значения были равны 3,5 и 4,4 нс [9, 11]. Измеренное среднее флуоресцентное время жизни возбужденного состояния D формы составило 4,1 нс (рис. 2.14), что также согласуется с данными [9]. Найденное для M формы значение флуоресцентного время жизни 3,3 нс лежит в пределах варьирования имеющихся литературных данных от 3,0 до 3,7 нс [9, 12, 16]. Сравнивая табл. 2.5 и табл. 2.2, можно заключить, что наилучшее соответствие достигнуто с данными работы [9], где при интерпретации результатов учитывались эффекты таутомерии нейтральной формы флуоресцеина.

Чтобы перейти к нахождению констант ионных равновесий в возбужденном состоянии через цикл Фёрстера (2.6), необходимо определить волновые числа 0-0 переходов ионных форм, заряд которых отличается на единицу. Для этого контуры спектров поглощения и испускания нормируют [22]. Волновое число чисто электронного перехода соответствует спектральному положению пересечения контуров поглощения и флуоресценции (рис. 2.16).

Волновые числа чисто электронного перехода и результат расчета значения pK^*_a через цикл Фёрстера (2.6) для всех ступеней диссоциации представлены в табл. 2.6. ΔpK_a принимает различные значения: как отрицательные (C-Q, Z-M, M-D равновесия), так и положительные (C-Z равновесие), или же близкие к нулю (Q-M равновесие). Величина и знак ΔpK_a полностью определяется разностью волновых чисел 0-0 переходов и указывает на направление переноса протона (фотоотрыв или фотоприсоединение).

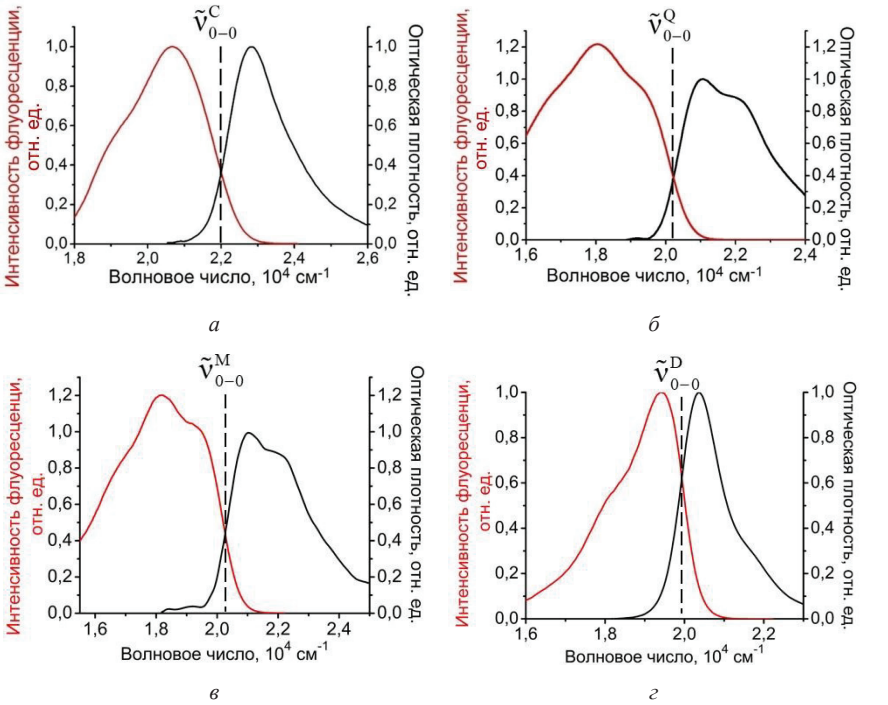


Рисунок 2.16. Спектры поглощения и флуоресценции C(а), Q(б), M(в) и D(г) ионных форм флуоресцеина в зависимости от волнового числа

Таблица 2.6. Положение 0-0 переходов для различных ионных форм и значение показателей констант ионного равновесия в основном и возбужденном состояниях для разных ступеней диссоциации флуоресцеина

Ионная форма	Положение 0-0 перехода, 10^4 см$^{-1}$	Равновесие	pK_a [9]	ΔpK_a [б]	pK_a^*
C	2,21	C-Q	3,20	–3,80	–0,60
Q	2,03	Q-M	3,27	0,03	3,30
Z	2,21 [а]	C-Z	3,01	0,09	3,10
M	2,03 [а]	Z-M	3,46	–3,96	–0,50
D	1,99	M-D	6,31	–0,84	5,47

[а] волновые числа 0-0 переходов Z и M- форм были получены в предположении подобия хромофорных групп Z и C-форм, а также Q и M-форм [9];

[б] рассчитано из цикла Фёрстера (2.6).

Полученные результаты можно представить графически в виде схемы равновесий между ионными и таутомерными формами флуоресцеина в возбужденном состоянии с указанием ΔpK_a как меры эффективности переноса протона (рис. 2.17). В возбужденном состоянии происходит фотоотрыв протона: от C формы с образованием Q формы, от Z формы с образованием M формы и от M формы с образованием D формы флуоресцеина. Это приводит к уменьшению констант ионного равновесия: значения pK_a в возбужденном состоянии для указанных ступеней диссоциации по сравнению с основным состоянием уменьшаются на величину от 0,84 до 3,96. Тем самым на указанных ступенях флуоресцеин проявляет выраженные фотокислотные свойства.

Наибольшая разница ΔpK_a выявлена для C-Q ступени диссоциации. Именно поэтому получение флуоресценции «чистой» C формы существенно затруднено, в отличие от D формы, для которой достаточно обеспечить щелочную среду с pH>8. Флуоресценция Z формы не наблюдается вследствие эффективного переноса протона с образованием C и M форм. Значения констант ионного равновесия в основном и возбужденном состояниях для Q-M ступени диссоциации оказываются близкими, что равнозначно отсутствию переноса протона во возбужденном состоянии.

Следует подчеркнуть, что приведенные численные значения pK^*_a получены для стандартных водных растворов при комнатной температуре. При переходе к другим растворителям или к более сложным биологическим средам возможны систематические сдвиги pK_a и спектральных характеристик.

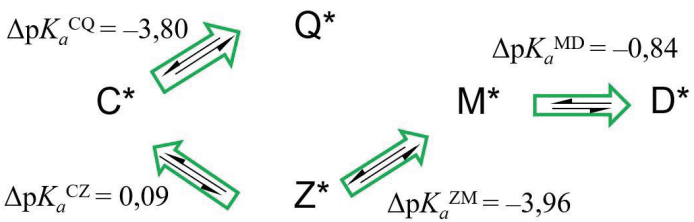


Рисунок 2.17. Направление и эффективность переноса протона в возбужденном состоянии ионных и таутомерных форм флуоресцеина. Зелеными стрелками показано направление смещения равновесия в возбужденном состоянии

Заключение к 2 главе

Благодаря комплексному рассмотрению всех ионных и таутомерных форм флуоресцеина в основном и возбужденном состояниях, основываясь на известных спектрах поглощения этих форм и применяя классические и современные экспериментальные и расчетные методы, впервые удалось составить полную картину ионных равновесий в возбужденном состоянии флуоресцеина. На большинстве ступеней диссоциации флуоресцеин ведет себя как фотокислота, демонстрируя наибольшую эффективность на C-Q ступени. Потенциально флуоресцирующая цвиттерионная форма не успевает совершить излучательный переход из-за эффективного фотоотрыва протона с переходом в моноанионную форму.

Несмотря на то, что ряд форм существует лишь в равновесии с другими (катионная, хиноидная, моноанионная), удалось выяснить их индивидуальные флуоресцентные свойства, характеризующиеся достаточно высокими значениями квантового выхода (0,42÷0,93) и флуоресцентного времени жизни (3,0÷4,1 нс). При этом наиболее интенсивную флуоресценцию проявляют катионная и дианионная формы. Последняя к тому же может быть изучена в чистом виде в щелочной среде с pH>8.

На M-D ступени диссоциации константа скорости переноса протона оказывается сравнимой с константой скорости излучательного процесса, что открывает возможности использования спектральных и время-разрешенных флуоресцентных параметров для решения аналитических задач.

Список литературы к 2 главе

1. Kim H. N. Study on various fluorescein derivatives as pH sensors / H. N. Kim, K.M.K. Swamy, J. Yoon // Tetrahedron Letters. – 2011. – V. 52. – Is. 18. – P. 2340–2343.

2. Karton-Lifshin N. Ultrafast excited-state intermolecular proton transfer of cyanine fluorochrome dyes / N. Karton-Lifshin, I. Presiado, Y. Erez,

R. Gepshtein, D. Shabat, D. Huppert // J. Phys. Chem. A. – 2012. – V. 116. – Is. 1. – P. 85–92.

3. Cesaretti A. Excited-state proton transfer in push-pull N-methyl pyridium reversible super-photoacids ruled by intramolecular hydrogen-bond-like interactions / A. Cesaretti, C. Bonaccorso, M. Alebardi, A. Grasso, R. Quinzi, B. Carlotti, F. Elisei, C. G. Fortuna, A. Spalletti // Chem. Eur. J. – 2025. – V. 31. – № e02289.

4. Simkovitch R. Comparison of the rate of excited-state proton transfer from photoacids to alcohols and water / R. Simkovitch, S. Shomer, R. Gepshtein, M. E. Roth, D. Shabat, D. Huppert // J. Photochem. Photobiol. A Chem. – 2014. – V. 277. – P. 90–101.

5. Tolbert L. M. Excited-state proton transfer: from constrained systems to "super" photoacids to superfast proton transfer / L. M. Tolbert, K. M. Solntsev // Acc. Chem. Res. – 2002. – V. 35. – Is. 1. – P. 19–27.

6. Weber K. Über die enge Beziehung der Fluorescenzauslöschung zur Hemmung photochemischer Reaktionen / K. Weber // Z. Phys. Chem. – 1931. – V. 15. – P. 18–44.

7. Förster T. Fluoreszenzspektrum und Wasserstoffionenkonzentration / T. Förster // Naturwissenschaften. – 1949. – V. 36. – P. 186–187.

8. Weller A. Quantitative Untersuchungen der Fluoreszenzumwandlung bei Naphtholen / A. Weller // Z. Elektrochem. – 1952. – V. 56. – P. 662–668.

9. Klonis N. Spectral properties of the prototropic forms of fluorescein in aqueous solution / N. Klonis, W. H. Sawyer // J. Fluoresc. – 1996. – V. 6. – P. 147–157.

10. Мчедлов-Петросян Н. О. Флуоресцеиновые красители в растворах – хорошо изученные системы? / Н. О. Мчедлов-Петросян // Вестн. Харьков. нац. ун-та. Химия. – 2004. – Т. 626. – Вып. 11 (34). – С. 221–313.

11. Martin M. M. The pH dependence of fluorescein fluorescence / M. M. Martin, L. Lindqvist // J. Lumin. – 1975. – V. 10. – Is. 6. – P. 381–390.

12. Sjöback R. Absorption and fluorescence properties of fluorescein / R. Sjöback, J. Nygren, M. Kubista // Spectrochim. Acta A. – 1995. – V. 51. – Is. 6. – P. L7–L21.

13. Третьякова В. И. Динамика населенностей ионных форм флуоресцеина в протонном растворителе в основном и возбужденном состояниях: магистерская диссертация: 16.04.01 / Третьякова Виктория Игоревна; Сибирский федеральный университет. – Красноярск, 2020. – 40 с.

14. Surzhikova D. Emission properties of fluorescein in strongly acidic solutions / D. Surzhikova, M. Gerasimova, V. Tretyakova, A. Plotnikov, E. Slyusareva // J. Photochem. Photobiol. A. – 2021. – V. 413. – № 113233.

15. Leonhardt H. Acid-base equilibria of fluorescein and 2', 7'-dichlorofluorescein in their ground and fluorescent states / H. Leonhardt, L. Gordon, R. Livingston // J. Phys. Chem. – 1971. – V. 75. – P. 245–249.

16. Fok M. V. Separation of complex spectra into individual bands by the generalized Alentsev method / M. V. Fok // Lebedev Phys. Inst. Ser. – 1973. – V. 59. – P. 1–22.

17. Gerasimova M. A. Fluorescence and photoinduced proton transfer in the protolytic forms of fluorescein: experimental and computational study / M. A. Gerasimova, F. N. Tomilin, E. Y. Malyar, S. A. Varganov, D. G. Fedorov, S. G. Ovchinnikov, E. A. Slyusareva // Dyes Pigm. – 2020. – V. 173. – № 107851.

18. Alvarez-Pez J. M. Fluorescein excited-state proton exchange reactions: Nanosecond emission kinetics and correlation with steady-state fluorescence intensity / J. M. Alvarez-Pez, L. Ballesteros, E. Talavera, J. Yguerabide // J. Phys. Chem. A. – 2001. – V. 105. – P. 6320–6332.

19. Orte A. Three-state 2', 7'-difluorofluorescein excited-state proton transfer reactions in moderately acidic and very acidic media / A. Orte, E. M. Talavera, A. L. Macanita, J. C. Orte, J. M. Alvarez-Pez // J. Phys. Chem. A. – 2005. – V. 109. – P. 8705–8718.

20. Surzhikova D. P. Protolytic equilibrium of excited states of fluorescein / D. P. Surzhikova, M. A. Gerasimova, E. A. Slyusareva // Russ. Phys. J. – 2022. – V. 64. – Is. 11. – P. 2102–2109.

21. Суржикова Д. П. Программа расчета протолитического равновесия органического красителя с трехступенчатой диссоциацией в основном и возбужденном состояниях / Д. П. Суржикова, Е. А Слюсарева, А. С. Ципотан, А. В. Шамшурин // Свидетельство о гос. регистрации программы для ЭВМ: 2021616577, от 23.04.2021.

22. Birks J. B. The relations between the fluorescence and absorption properties of organic molecules / J. B. Birks, D. J. Dyson // Proc. R. Soc. Lond. A. – 1963. – V. 275. – P. 135–148.

ГЛАВА 3.
ДИАНИОН-МОНОАНИОННОЕ РАВНОВЕСИЕ ФЛУОРЕСЦЕИНА С ТОЧКИ ЗРЕНИЯ СПЕКТРОСКОПИИ: ТЕОРИЯ И АНАЛИТИЧЕСКИЕ ПРИЛОЖЕНИЯ

3.1. Особенности протекания физико-химических процессов в равновесной системе «дианион-моноанион»

Равновесие между дианионной и моноанионной формами флуоресцеина широко используется в химическом анализе. Это обусловлено следующими причинами:

1. *Физиологическая значимость.* Это равновесие наблюдается в диапазоне pH 5÷8, в котором лежат типичные значения для ряда биологических жидкостей и большого числа биомакромолекул.

2. *Аналитические возможности*. Дианион и моноанион флуоресцеина характеризуются разными по форме, амплитуде и положению спектрами поглощения, а также квантовыми выходами флуоресценции. Это позволяет количественно и качественно отслеживать состояние равновесия.

3. *Динамика процессов.* Скорость установления ионного равновесия в возбужденном состоянии флуоресцеина сопоставима со скоростью его излучательного распада (~10^8 $с^{-1}$). Это делает флуоресценцию инструментом, чувствительным к быстрым процессам переноса протона: их ускорение или замедление отражается на кинетических и спектральных характеристиках флуоресценции.

Кинетическая схема выделенной ступени диссоциации с указанием обозначения констант скоростей процессов приведена на рис. 3.1.

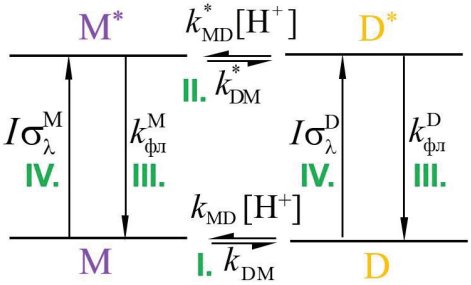


Рисунок 3.1. Кинетическая схема фотопроцессов, протекающих в смеси моноанионных и дианионных форм флуоресцеина с указанием обозначения констант скоростей и нумерацией обсуждаемых в тексте процессов

Экспериментально регистрируемые спектры поглощения и флуоресценции при pH 5÷8 представляют собой суперпозицию контуров моноанионной и дианионной форм, вклад которых в общем случае обусловлен следующими конкурирующими процессами и характеризующими их константами скоростей:

I. Ионное равновесие в основном состоянии с константой pK_a. Константа ионного равновесия определяется отношением констант скоростей протонирования/депротонирования в основном состоянии (2.12).

II. Ионное равновесие в возбужденном состоянии с константой pK_a^*. Константа ионного равновесия определяется отношением констант скоростей протонирования/депротонирования в возбужденном состоянии.

III. Скорость дезактивации возбужденного состояния. Согласно (1.7) и (2.11), $k_{фл}$ обратно пропорциональна времени жизни флуоресцентного возбужденного состояния $\tau_{фл}$ и квантовому выходу флуоресценции $\Phi_{фл}$.

IV. Вероятность поглощения $I\sigma_\lambda$.

Эффективность перечисленных процессов в значительной мере определяется внешними воздействиями, которые могут приводить к заметным изменениям в спектрах поглощения и флуоресценции. В качестве примеров подобных воздействий были рассмотрены влияние фосфат-ионов, температуры и добавление сорастворителей различной природы. Варьируя эти параметры,

можно определить термодинамические величины, такие как изменение энтальпии реакции депротонирования, а также смоделировать поведение физиологических жидкостей при изменении вязкости и концентрации электролитов.

3.2. Спектральная чувствительность флуоресцеина к фосфат-ионам в водных растворах

Использование флуоресцентного зондирования для определения концентрации фосфат-ионов обусловлено как важной ролью последних в функционировании живых систем, так и заметным их влиянием на равновесие флуоресцеина. Фосфат-ионы поддерживают гомеостаз, служат ключевыми участниками клеточного энергетического обмена, входят в состав АТФ, АДФ, креатинфосфата, нуклеиновых кислот и фосфолипидов, а также участвуют в перераспределении метаболических потоков в клетке [1, 2]. Предположительный механизм воздействия фосфат-ионов на равновесие флуоресцеина заключается в ускорении реакции депротонирования аниона (процессы I и II, рис. 3.1).

Для выявления связи между спектрально наблюдаемым равновесием флуоресцеина и концентрацией моно- и дигидрофосфат-ионов (HPO_4^- и $H_2PO_4^-$) были использованы растворы фосфатного буфера в характерном для него диапазоне pH с концентрацией ионов 0,1 М, 0,5 М, 1 М. Для количественной оценки констант ионного равновесия спектры поглощения и флуоресценции, измеренные при различных значениях pH, были разложены на компоненты, соответствующие D и M формам [3, 4], с определением амплитуд P_1 и P_2, скорректированных с учетом различий в молярном коэффициенте экстинкции и квантовом выходе флуоресценции $\Phi_{фл}$ дианиона и моноаниона (рис. 3.2).

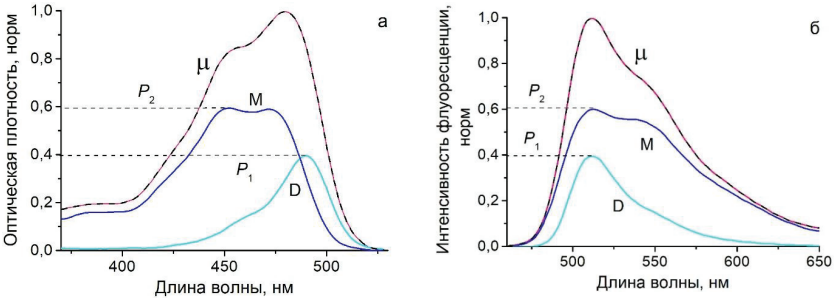


Рисунок 3.2. Пример разложения спектров поглощения (а) и флуоресценции (б) на составляющие M и D форм, из которого были найдены амплитуды P_1 и P_2. μ – исходный экспериментально регистрируемый спектр

Ионное равновесие в основном состоянии

Полученные значения относительной концентрации (P_1) дианионной формы нормировались на ее максимальное значение, а зависимость от pH аппроксимировалась функцией Больцмана. Кажущиеся константы равновесия (с индексом «*app*» от «apparent») определялись как значения pH, соответствующие точке перегиба зависимости, следующей из уравнения Хендерсона-Хассельбаха (2.3) (рис. 3.3). В отличие от термодинамических значений констант равновесия, которые следует рассматривать как предельно достижимые, кажущиеся константы характеризуют систему с учетом кинетического фактора, учитывающего конкурирующие процессы заселения и релаксации уровней. Выявились малые по величине, но достоверные различия между pK_a^{app} для предельных значений использованных концентраций фосфат-ионов (табл. 3.1).

Найденное значение pK_a^{app} (6,52) при максимальной концентрации фосфат-ионов 1 М согласуется с опубликованными ранее данными [5]. Фосфат-ионы смещают дианион-анионное равновесие в щелочную сторону: при pH 6,3 разница в концентрации D формы между растворами, содержащими 0,1 и 1 М фосфат-ионов, достигает примерно 15%. Факт влияния электролитов на ион-

ное равновесие хорошо известен, однако характер этого влияния в зависимости от природы электролита может быть достаточно сложным. Так, при увеличении концентрации KCl до ~0,7 М дианион-анионное равновесие флуоресцеина смещается сначала в область моноаниона, а при дальнейшем увеличении – в область дианиона [6].

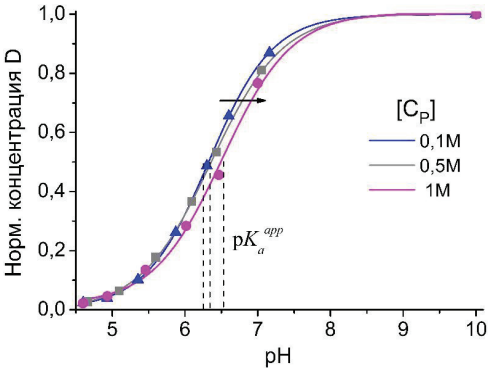


Рисунок 3.3. Калибровочная кривая для нахождения константы дианион-анионного равновесия в основном состоянии.

Ионное равновесие в возбужденном состоянии

Как было показано во второй главе, относительные концентрации ионных форм в возбужденном состоянии зависят от длины волны возбуждения, что отражается на величине кажущейся константы ионного равновесия pK_a^{app*}, полученной декомпозицией спектров флуоресценции (рис. 3.4). Это предположение полностью подтвердилось для длин волн возбуждения 488 и 435 нм, которые выбирались исходя из условий преимущественного возбуждения в полосе моноанионов и дианионов флуоресцеина (табл. 3.1). Максимальное значение pK_a^{app*} (6,34) было достигнуто при минимальной концентрации фосфат-ионов и возбуждении в полосе моноанионов. При увеличении концентрации фосфат-ионов кажущаяся константа ионного равновесия имеет тенденцию к уменьшению на длине волны возбуждения 435 нм и к увеличению при возбуждении на 488 нм.

Таблица 3.1. Кажущиеся константы равновесия флуоресцеина в основном и возбужденном состояниях при разных концентрациях фосфат-ионов

$[C_P]$, М	pK_a^{app}	pK_a^{app*}	ΔpK_a^{app}	pK_a^{app*}	ΔpK_a^{app}
		λ_{exc} = 435 нм		λ_{exc} = 488 нм	
0,1	6,35 ± 0,03	6,34 ± 0,04	–0,01 ± 0,05	5,42 ± 0,04	–0,93 ± 0,07
0,5	6,39 ± 0,03	5,99 ± 0,03	–0,40 ± 0,04	5,44 ± 0,04	–0,95 ± 0,08
1	6,52 ± 0,04	5,92 ± 0,06	–0,60 ± 0,06	5,62 ± 0,04	–0,90 ± 0,09

$[C_P]$ – концентрации фосфат-ионов. Изменение константы равновесия при возбуждении ΔpK_a^{app} рассчитано как разность констант равновесия в возбужденном и основном состояниях

Обнаруженные различия легко объяснить, если принять во внимание конкуренцию процессов, обозначенных на рис. 3.2. Наблюдаемая зависимость параметра ионного равновесия от длины волны возбуждения указывает на то, что времени жизни возбужденного состояния недостаточно для достижения ионного равновесия с участием возбужденной формы флуоресцеина.

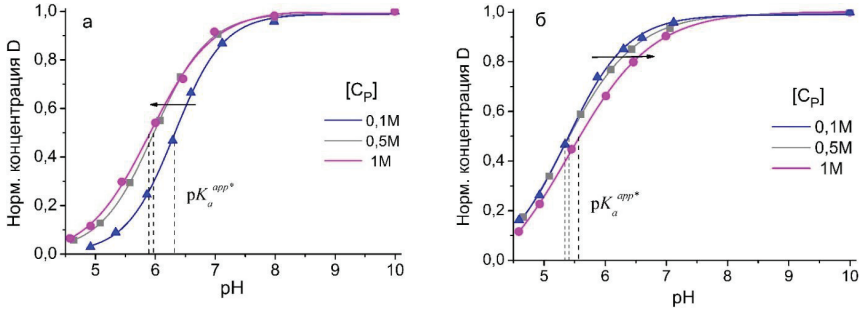


Рисунок 3.4. Калибровочная кривая для нахождения констант равновесия M-D диссоциации pK_a^{app*} в возбужденном состоянии при двух длинах волн возбуждения 435 (а) и 488 (б) нм

Вследствие малой концентрации в диапазоне pH 5÷8 гидроксил-анионы OH^- не могут в достаточной мере связывать высвобождающиеся в процессе реакции ионы водорода ввиду высокой скорости процесса релаксации возбужденного состояния (табл. 3.1, [5]). В этих условиях основными акцепторами

протона могут выступать ионы HPO_4^{2-} – увеличение их концентрации способствует ускорению депротонирования аниона (при возбуждении на 435 нм). Это подтверждается и данными [5], где показано, что при низком содержании фосфат-ионов перенос протона не реализуется.

В контексте обсуждения конкуренции процессов с участием возбужденных состояний флуоресцеина большой интерес представляют значения разности кажущихся констант равновесия в возбужденном и основном состояниях (ΔpK_a^{app}), величины и знак которых указывают на эффективность и направление перенос протона в возбужденном состоянии. При возбуждении 488 нм в полосе дианиона ΔpK_a^{app} не зависит от концентрации фосфат-ионов и близко к своему предельному значению –0,84 (рис. 2.17), говорящем о фотокислотных свойствах флуоресцеина на рассматриваемой ступени диссоциации. При возбуждении в полосе моноанионов (435 нм) фотокислотные свойства флуоресцеина проявляются не столь ярко, но достигают своего предельного значения при концентрации фосфат-ионов около 1,5 М (получено путем экстраполяции зависимости на рис. 3.5). Таким образом, наличие фосфат-ионов может рассматриваться как фактор, позволяющий реализовать термодинамически обоснованный фотоперенос протона в системе.

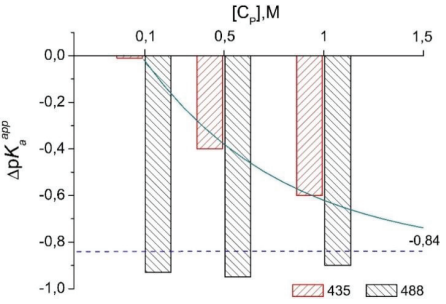
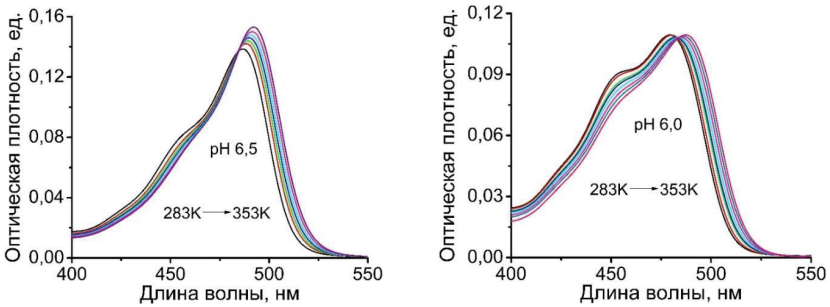


Рисунок 3.5. ΔpK_a^{app} при длинах волн возбуждения 435 и 488 нм при вариации концентрации фосфат-ионов. Пунктиром нанесено предельное значение $\Delta pK_a = -0{,}84$, сплошная – экстраполированная кривая значений для длины волны возбуждения 435 нм

3.3. Спектральная чувствительность флуоресцеина к изменению температуры

Еще одним важным фактором, влияющим на ионные равновесия, является температура, от которой напрямую зависит энергия Гиббса реакции диссоциации. При изучении термодинамических характеристик реакции отрыва протона использовались фиксированные значения концентрации фосфат-ионов на уровне 1 М и pH 6,0 и 6,5. Эти значения pH соответствуют области перегиба функции концентрации ионных форм при изменении кислотности растворителя.

Ионное равновесие в основном состоянии



а *б*

Рисунок 3.6. Спектры поглощения растворов флуоресцеина при pH 6,5 (а) и 6,0 (б) в диапазоне температур 283÷353K

При повышении температуры раствора флуоресцеина в диапазоне 283÷353K в спектрах поглощения наблюдаются батохромный сдвиг и изменение формы полос (рис. 3.6). Для декомпозиции этих спектров и нахождения температурной зависимости константы равновесия при этих же температурах измерены спектры поглощения при pH 5,0 и pH 11,0, рассматриваемые нами как спектры дианионной и моноанионной форм соответственно (рис. 3.7).

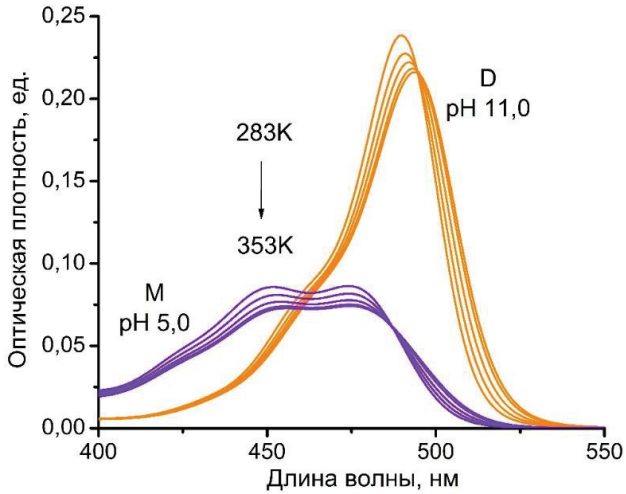


Рисунок 3.7. Спектры поглощения растворов флуоресцеина при pH 5,0 (M) и 11,0 (D) в диапазоне температур 283÷353 K

Установлено, что с повышением температуры значение константы равновесия уменьшается. Анализ температурной зависимости смещения ионного равновесия в основном состоянии позволяет определить тепловой эффект реакции на основе изменения молярной энтальпии реакции $\Delta_r H$. Количественная оценка $\Delta_r H$ была выполнена с использованием уравнения Вант-Гоффа [7]:

$$-\frac{\mathrm{d}\ln K_a}{\mathrm{d}(1/T)} = \frac{\Delta_r H}{R}. \qquad (3.1)$$

Значения $\Delta_r H$, выявленные на основании двух экспериментов при pH 6,5 и 6,0, составили близкие значения 7,4±0,4 и 7,3±0,4 кДж·моль$^{-1}$ соответственно (рис. 3.8). Положительный знак изменения молярной энтальпии указывает на эндотермический характер реакции переноса протона в основном состоянии. Полученные значения несколько ниже ранее опубликованного значения (9,8 кДж·моль $^{-1}$ [8]), найденного без детализации состава буферной системы.

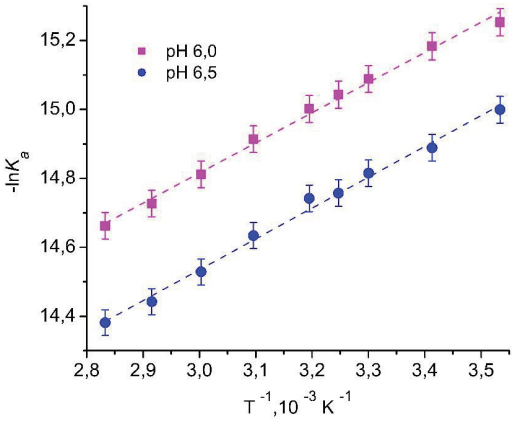


Рисунок 3.8. График Вант-Гоффа для определения изменения молярной энтальпии реакции переноса протона ($\Delta_r H$) флуоресцеина в буфере при pH 6,5 (круглые символы), при pH 6,0 (квадратные символы)

Ионное равновесие в возбужденном состоянии

Оценка температурного сдвига константы ионного равновесия в возбужденном состоянии (ΔpK_a^*) была проведена на основе цикла Фёрстера с использованием температурных зависимостей pK_a. Волновое число 0-0 перехода определяли отдельно для каждой ионной формы (рис. 3.9): дианион – при pH 11, моноанион – при pH 5,0 (поглощение) и 4,4 (флуоресценция) (см. раздел 2.5).

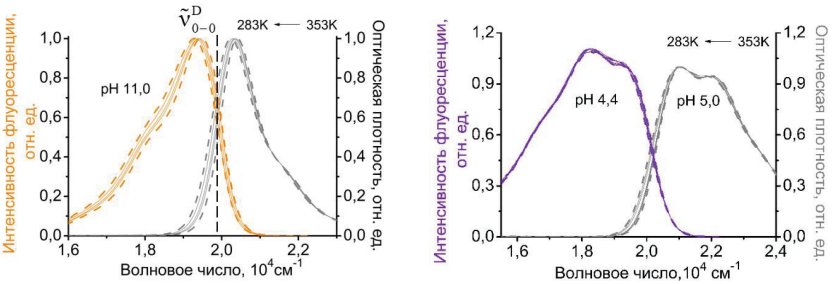


Рисунок 3.9. Спектры поглощения и флуоресценции D (а) и M (б) форм флуоресцеина, представленные в зеркальных координатах в интервале температур 283÷353 K

С повышением температуры в диапазоне 283÷353K спектры поглощения и флуоресценции смещаются в область меньших волновых чисел, что сопровождается увеличением разности волновых чисел $\tilde{\nu}^{M}_{0-0} - \tilde{\nu}^{D}_{0-0}$ в уравнении цикла Фёрстера (2.6) с 400 до 510 см$^{-1}$. Это приводит к снижению pK_a^* с 5,86 до 5,54. Величина ΔpK_a^*, определяемая как разность показателей констант равновесий в возбужденном состоянии, составляет 0,28±0,04 (pH 6,0) и 0,27±0,04 (pH 6,5), что сопоставимо со значениями для основного состояния (0,26±0,01 и 0,27±0,01). Полученные результаты свидетельствуют о согласованном температурном сдвиге равновесия в основном и возбужденном состояниях.

Повышение температуры может сопровождаться снижением квантового выхода флуоресценции вследствие усиления безызлучательных каналов дезактивации, что проявляется в уменьшении интенсивности излучения и сокращении времени жизни возбужденного состояния [9]. Однако для D формы флуоресцеина изменение этого параметра при нагревании не превышает 3% и находится в пределах погрешности его определения [10, 11]. Аналогичное поведение, по-видимому, характерно и для других ионных форм.

3.4. Понятие ратиометрического сигнала флуоресцеина

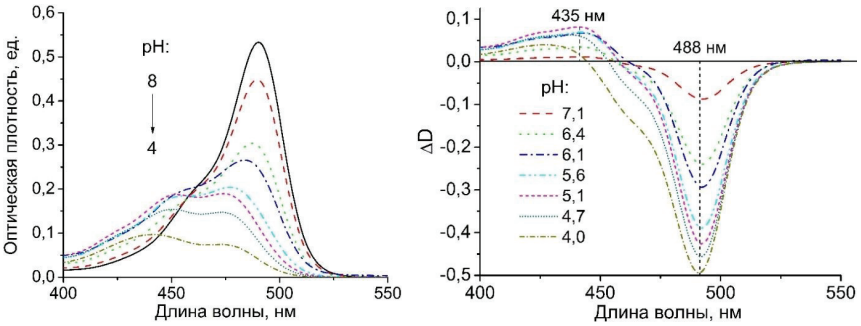
При ратиометрическом флуоресцентном зондировании в качестве сигнала используется безразмерная величина – отношение интенсивностей флуоресценции. Это могут быть полученные при двух разных длинах волн возбуждения интегральные или ассоциированные с определенной длиной волны испускания интенсивности, либо же интенсивности, полученные при одной длине волны возбуждения, но измеренные на разных длинах волн испускания. Спектральные условия получения ратиометрического сигнала специфичны к флуорофору и определяются максимальной спектральной чувствительностью последнего к внешнему воздействию. В биоаналитической химии, биофизике и смежных дисциплинах такой подход позволяет характеризовать физико-хи-

мическое состояние исследуемых систем при минимальном влиянии инструментальных факторов (таких как концентрация флуорофора, нестабильность источника возбуждения, фотообесцвечивание), что в совокупности существенно повышает точность и воспроизводимость измерений.

При использовании флуоресцеина в физиологическом диапазоне pH ратиометрический метод реализуется путем поочередного возбуждения красителя на двух длинах волн, обеспечивающих преимущественное возбуждение либо моноанионной, либо дианионной форм, и последующего сравнения полученных интегральных интенсивностей испускания. Чувствительность к изменению соотношения M и D форм, обусловленная почти двукратной разницей в соответствующих значениях квантового выхода флуоресценции, обеспечивает возможность определения pH и других параметров [12]. Связь факторов, оказывающих существенное влияние на перенос протона (температура и содержание сорастворителей), с ратиометрическим флуоресцентным сигналом флуоресцеина будет рассмотрена ниже.

Для выбора оптимальных длин волн возбуждения и последующего построения ратиометрического флуоресцентного сигнала (S) были проанализированы спектры поглощения водных растворов флуоресцеина для ряда значений pH в окрестности значения константы моноанион-дианионного равновесия (pK_a 6,3 [3]).

При снижении pH (рис. 3.10) форма спектра и амплитуда изменяются, что обусловлено увеличением доли M и Q ионных форм флуоресцеина [3]. Наиболее подходящие длины волн возбуждения могут быть найдены через построение разностных спектров, полученных вычитанием спектра дианиона при pH 8 (рис. 3.10 б). Наибольшая вариабельность интенсивности спектров наблюдалась на длинах волн 488 и 435 нм, ассоциированных с преимущественным поглощением D и M ионных форм флуоресцеина соответственно.



а *б*

Рисунок 3.10. Спектры поглощения (а) и разностные спектры поглощения (б) растворов флуоресцеина при pH 4÷8

Ратиометрический сигнал представляет собой отношение интегральных интенсивностей флуоресценции при возбуждении на 488 нм (I^{488}) и 435 нм (I^{435}):

$$S = \frac{I^{488}}{I^{435}}. \tag{3.2}$$

Он также может быть рассчитан на основе знания концентраций флуоресцирующих форм в возбужденном состоянии (D^*, M^*) при соответствующих длинах волн возбуждения и значений квантового выхода флуоресценции ($\Phi_{фл}^{D}$, $\Phi_{фл}^{M}$):

$$\frac{I^{488}}{I^{435}} = \frac{\Phi_{фл}^{M} M_{488}^{*} + \Phi_{фл}^{D} D_{488}^{*}}{\Phi_{фл}^{M} M_{435}^{*} + \Phi_{фл}^{D} D_{435}^{*}}. \tag{3.3}$$

Исходными параметрами для расчета являются результаты моделирования кинетики фотоиндуцированных кислотно-основных реакций в условиях непрерывного фотовозбуждения (см. раздел 2.4), а также экспериментальные данные (см. раздел 2.5). Инструментальные факторы, влияющие на интенсивность флуоресценции (1.2), выражаются в виде множителя, одинакового для

числителя и знаменателя формулы (3.3), и, следовательно, не влияют на результат. Полученная экспериментально зависимость S(pH) совпала с расчетной (рис. 3.11) при задании в качестве входных данных условий эксперимента.

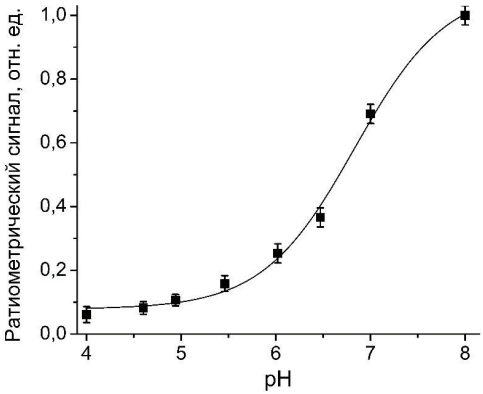
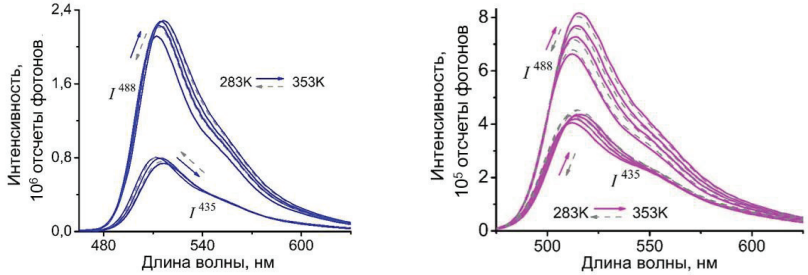


Рисунок 3.11. Экспериментальное значение нормированного ратиометрического сигнала при концентрации фосфат-ионов 1 М и рассчитанное по формуле 3.2

3.5. Термометрические характеристики ратиометрического сигнала флуоресцеина

Характер влияния температуры в интервале 283÷353K на спектры флуоресценции при pH 6,5 и 6,0 достаточно сложен (рис. 3.12): с повышением температуры наблюдается батохромный сдвиг максимума излучения; при возбуждении на 488 нм интенсивность флуоресценции возрастает, тогда как при 435 нм ее изменение зависит от pH – при 6,5 она уменьшается, а при 6,0 – увеличивается. Изменения носят обратимый характер, при охлаждении спектры возвращаются к исходному виду.

В то же время температурное поведение ратиометрического сигнала S для pH 6,0 и 6,5 в интервале температур 283÷353 K имеет простой характер линейной зависимости с близкими угловыми коэффициентами $(1{,}53\pm0{,}03)\cdot10^{-2}K^{-1}$ и $(1{,}54\pm0{,}03)\cdot10^{-2}K^{-1}$ соответственно. Такая функциональная связь хорошо подходит для решения задач термометрии.



а б

Рисунок 3.12. Спектры флуоресценции растворов флуоресцеина при pH 6,5 (а) и 6,0 (б) в диапазоне температур 283÷353K при возбуждении 488 нм и 435 нм. Сплошные линии – цикл нагревания, пунктирные линии – охлаждения

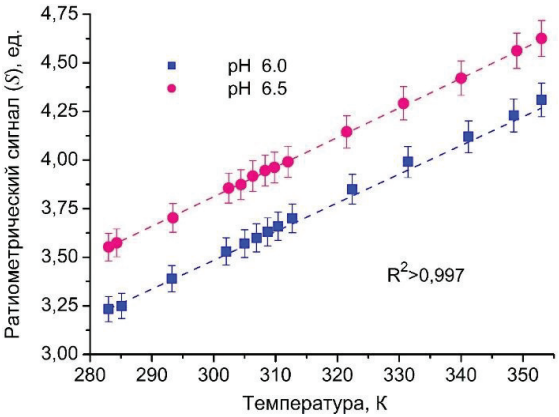


Рисунок 3.13. Температурная зависимость ратиометрического сигнала (*S*) в диапазоне температур 283÷353K для pH 6,5 и 6,0

Для оценки возможности использования ратиометрического сигнала в качестве оптического термометрического параметра были определены тепловая чувствительность (3.4), относительная тепловая чувствительность (3.5) и тепловое разрешение (3.6):

$$S_a = \frac{dS}{dT}, \tag{3.4}$$

$$S_r = \frac{1}{S}\frac{dS}{dT}, \tag{3.5}$$

$$\Delta T = \frac{1}{S_r}\frac{\delta S}{S}. \tag{3.6}$$

Значения этих параметров приведены в табл. 3.2. Для сравнения в ней также представлены ратиометрические сигналы других люминофоров, применяемых для термометрии в живых клетках (HeLa) в физиологическом диапазоне температур 30–44° С. Представлены данные для углеродных квантовых точек с двойной (синей и красной) флуоресценцией (dCDs) [13], комплексов наночастиц лантаноидов Eu^{3+}/Sm^{3+}@PF-127 NPs [14] и катионного порфирина фосфора(V) $MPyPP(OH)_2$ [15].

Таблица 3.2. Термометрические характеристики ратиометрического сигнала флуоресцеина при фиксированных pH 6,0 и 6,5 и литературные данные

Флуоресцентный сигнал	S_a, 10^{-2} K^{-1}	S_r, K^{-1}	ΔT, K
Флуоресцеин, *S*, pH 6,0	1,54	0,35%	7
Флуоресцеин, *S*, pH 6,5	1,53	0,33%	7
dCDs [13]	4,8	1,97%	0,4
Eu^{3+}/Sm^{3+}@PF-127 NPs [14]	1,8	1,90%	0,1
$MPyPP(OH)_2$ [15]	2,30	0,61%	0,3–1,1

Полученные для флуоресцеина значения оказались несколько хуже опубликованных характеристик. Повышение температурного разрешения для флуоресцеина до 2K возможно за счет более точного контроля pH среды и оптимизации длины волны возбуждения с учетом температурного сдвига спектра поглощения. Перспективы повышения метрологических характеристик метода вкупе с низкой токсичностью красителя открывают возможность его применения для мониторинга температуры в реальном времени.

3.6. Моделирование температурной зависимости ратиометрического сигнала

Для оценки температурного вклада в наблюдаемый ратиометрический сигнал и раскрытия механизмов этого влияния была использована модель фотоиндуцированных кислотно-основных реакций в условиях непрерывного фотовозбуждения, рассмотренная в разделе 2.4. Возможные механизмы этого влияния обозначены на рис. 3.1.

Изменение равновесия в основном (I) и возбужденном (II) состояниях в модели учитывается через температурную зависимость констант депротонирования k_{DM} и k^*_{DM}. Для их расчета использованы средние значения pK_a и pK_a^* при pH 6,0 и 6,5 при фиксированной температуре. Константы k_{DM} и k^*_{DM} определялись по формуле (2.12) при заданных значениях констант протонирования k_{MD} и k^*_{MD} (табл. 2.3).

Механизм (III), связанный со снижением квантового выхода, не учитывался в модели, поскольку его изменение в исследуемом температурном диапазоне не превышает погрешности измерений. Фактор (IV), связанный с температурным изменением формы спектра поглощения σ^M_λ и σ^D_λ (рис. 3.7), учитывается через уменьшение соответствующих величин вследствие снижения оптической плотности отдельных ионных форм при нагревании [16] (рис. 3.10).

Таблица 3.3. Параметры, использованные для моделирования сигнала S при вариации температуры

T, К	σ^M_λ, 10^{-17}см^2 [16]		σ^D_λ, 10^{-17}см^2 [16]		pK_a^{app}	$\Phi^M_{фл}$	$\Phi^D_{фл}$	pK_a^* &	$k^*_{DM}\cdot10^3$, с$^{-1\#}$	k_{DM}, с$^{-1\#}$
	435 нм	488 нм	435 нм	488 нм						
283	9,13	8,49	3,08	33,4	6,58$	0,46	0,93	5,69	1,88	0,68
298	8,81	7,91	2,98	33,1	6,52[17]	0,46	0,93	5,47	3,12	0,79
353	8,73	10,1	3,04	30,9	6,31$	0,43	0,90	5,41	3,58	1,24

$ – рассчитано как среднее значение для pH 6,0 и 6,5; & – рассчитано по (2.6); # – рассчитано по (2.12).

Константы, использованные при моделировании ратиометрического сигнала (3.3), приведены в табл. 3.3.

Ниже представлены результаты моделирования сигналов *S* для двух значений pH 6,0 и 6,5 в диапазоне температур 283÷353К при учете разных комбинаций механизмов I–III (рис. 3.1).

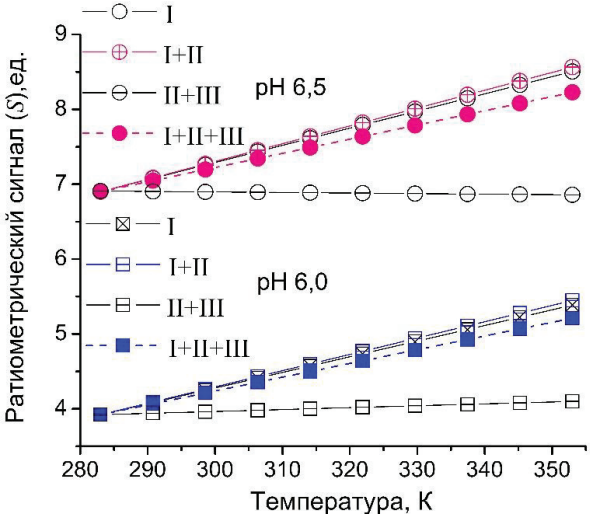


Рисунок 3.14. Модельный *S* сигнал флуоресцеина для pH 6,0, 6,5. Незакрашенные символы – оценка с вкладом различных механизмов. Сплошные символы – суммарный вклад трех механизмов

На рис. 3.14 показано, что модельные сигналы *S*, как и экспериментальные, линейно зависят от температуры в исследуемом диапазоне, однако угол наклона этих зависимостей определяется числом и типом учтенных механизмов. Значения тепловой чувствительности приведены в табл. 3.4. Основной вклад вносит смещение равновесия в основном состоянии (I): при исключении этого эффекта тепловая чувствительность становится близкой к нулю, и сигнал *S* остается практически постоянным во всем температурном диапазоне. Температурное изменение формы спектра поглощения (III) является следую-

щим по значимости фактором и приводит к уменьшению тепловой чувствительности. Вклад изменения равновесия в возбужденном состоянии (II) незначителен.

Данные табл. 3.4 показывают, что тепловая чувствительность модельного сигнала *S*, учитывающего суммарный вклад механизмов (I–III), наиболее близка к экспериментальному значению. Указанное соответствие наблюдается для обоих значений pH и говорит о наиболее существенных механизмах, формирующих линейную зависимость ратиометрического сигнала от температуры.

Таблица 3.4. Тепловая чувствительность ратиометрического сигнала флуоресцеина при pH 6,0 и 6,5 (полужирным шрифтом обозначены значения, наиболее близкие к экспериментальным)

	Эксперимент	Моделирование	
	Тепловая чувствительность S_a, 10^{-2} K^{-1}	Механизм температурного влияния	Тепловая чувствительность S_a, 10^{-2} K^{-1}
pH 6,0	1,54±0,03	I	2,09
		I+II	2,19
		II+III	0,25
		I+II+III	**1,84**
pH 6,5	1,53±0,03	I	2,29
		I+II	2,38
		II+III	0,07
		I+II+III	**1,90**

Для определения границ применимости флуоресцеина в качестве термочувствительного флуоресцентного зонда была рассчитана зависимость ратиометрического сигнала от pH по формуле (3.3). Тепловая чувствительность имеет ненулевые значения в диапазоне pH 5÷7,5 и достигает наибольшего значения вблизи pK_a (6,31) [3]. Данная зависимость определяет диапазон аналитического применения ратиометрического сигнала.

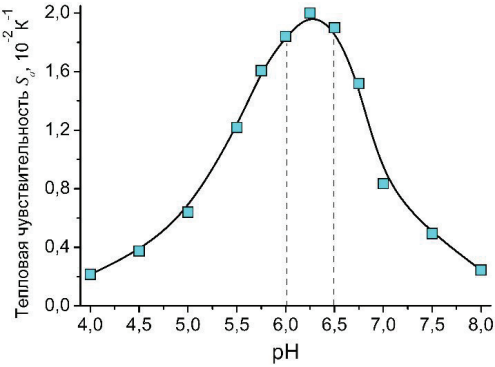


Рисунок 3.15. Зависимость тепловой чувствительности модельного *S* сигнала от pH

3.7. Влияние вязких сорастворителей на флуоресцентный сигнал флуоресцеина

Присутствие вязких сорастворителей рассматривается как фактор, влияющий на спектральные свойства флуоресцеина. В работе [18] была изучена чувствительность ратиометрического флуоресцентного сигнала *S* к вязкости среды, которая, как известно, влияет на скорость (био)химических реакций и клеточный метаболизм. В работе [19] для тех же целей вязкость раствора варьировали в диапазоне 1÷5 сП путем добавления глицерина и сахарозы, моделируя условия, близкие к внутриклеточным.

Спектры поглощения флуоресцеина и константа ионного равновесия в основном состоянии

При повышении вязкости среды за счет добавок сорастворителей различной природы спектры поглощения сохраняют форму, но испытывают батохромный сдвиг (рис. 3.16 а). При pH 6,5 спектры могут быть представлены в виде суммы компонент, соответствующих M и D формам, по методике, описанной в разделе 3.2. В присутствии глицерина (40 вес. %) и сахарозы (30 вес. %) полученные значения pK_a при температуре 298K остаются близкими к таковым для буферного раствора (табл. 3.5). Подобные значения

наблюдаются и для водных растворов некоторых неионных полимеров, например, декстрана-70 и сополимера сахарозы и эпихлоргидрина (фиколл 400) [20].

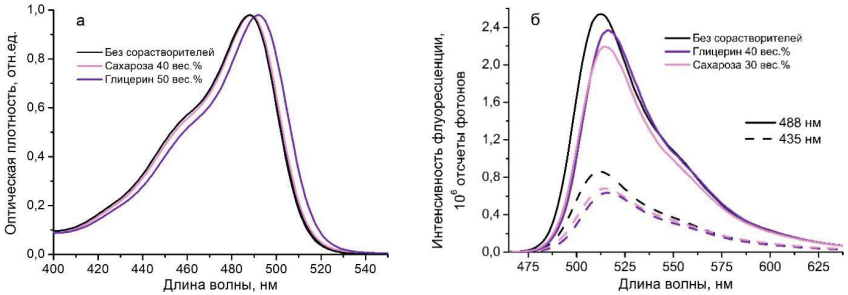


Рисунок 3.16. Спектральные свойства флуоресцеина в вязкой среде при pH 6,5: (а) спектры поглощения в буфере (черный), в присутствии 40% сахарозы (розовый) и 50% глицерина (фиолетовый); (б) спектры флуоресценции в буфере (черный) и в присутствии 30% сахарозы (розовый) и 40% глицерина (фиолетовый) при длинах волн возбуждения 435 нм (пунктирные линии) и 488 нм (сплошные линии)

Таблица 3.5. Параметры температурной зависимости ратиометрического сигнала флуоресцеина S и термодинамические параметры его равновесия при pH 6,5 в вязких средах

Растворитель (буферный раствор pH 6,5)	pK_a при 298 K	ΔpK_a $	Тепловая чувствительность S_a, $10^{-2}K^{-1}$	$\Delta_t H$, кДж·моль$^{-1}$
Без сорастворителей	6,45 ± 0,10	–0,71 ± 0,09	1,53 ± 0,03	7,4 ± 0,4
Сахароза (30 вес. %)	6,55 ± 0,11	–0,65 ± 0,08	1,01 ± 0,05	4,6 ± 0,4
Глицерин (40 вес. %)	6,43 ± 0,09	–0,69 ± 0,09	0,80 ± 0,04	3,7 ± 0,3

$ определяется с помощью уравнения (2.6).

Спектры флуоресценции и константа ионного равновесия в возбужденном состоянии флуоресцеина

Влияние сорастворителей, повышающих вязкость раствора, на флуоресценцию при возбуждении на длинах волн 435 и 488 нм проявляется как в батохромном сдвиге, так и снижении интенсивности при неизменной концентрации красителя (рис. 3.16 б). Изменения абсорбционных и флуоресцентных

свойств флуоресцеина в растворах с различной вязкостью приводят к изменению ратиометрического сигнала (рис. 3.17).

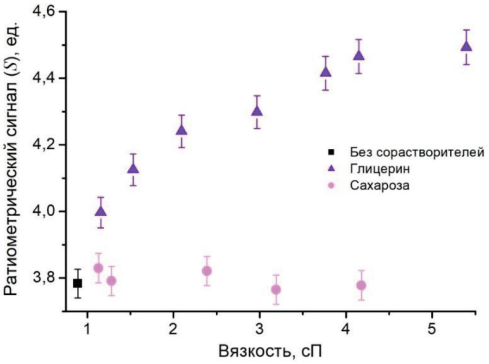


Рисунок 3.17. Зависимости ратиометрического сигнала *S* флуоресцеина от вязкости при температуре среды 298K и pH 6,5 в присутствии глицерина (фиолетовые символы) и сахарозы (розовые символы). Черный символ – данные, полученные без сорастворителей

Зависимость ратиометрического сигнала *S* от вязкости раствора определяется природой сорастворителя. Так, при добавлении глицерина *S* возрастает нелинейно (максимальное изменение составляет 19%), тогда как в случае сахарозы практически не меняется (рис. 3.17). Для объяснения возможных причин такого различия проанализируем факторы, влияющие на ратиометрический сигнал.

I. Смещение спектров поглощения, обусловленное изменением полярности и водородного окружения красителя.

Установлено, что снижение полярности среды сопровождается батохромным сдвигом спектров поглощения для всех исследованных форм флуоресцеина: моноанионной (pH 5), дианионной (pH 11) и их равновесной смеси (pH 6,5) [16]. При pH 5 и 6,5 батохромный сдвиг менее выражен в растворах сахарозы, что связано со специфическим взаимодействием с моноанионной формой. Это отражается на ратиометрическом сигнале (рис. 3.17) через изменение эффективности возбуждения моноаниона при 435 нм.

Методом молекулярной динамики проведено моделирование поведения M и D форм флуоресцеина в воде и водных смесях с глицерином (40 вес. %) и сахарозой (30 вес. %) [16]. На основе функций распределения минимальных расстояний (MDDF) были рассчитаны коэффициенты преимущественного взаимодействия (Г) ионных форм флуоресцеина с водой или сорастворителем (рис. 3.18), которые показали обеднение гидратной оболочки красителя в вязких средах. Установлено, что сахароза более эффективно вытесняет воду из гидратной оболочки флуорофора, тогда как глицерин проявляет большую аффинность к M форме флуоресцеина. То есть вблизи красителя полярность и структура сети водородных связей отличаются от характеристик объемной среды, и наблюдаемый батохромный сдвиг спектров преимущественно объясняется специфическими водородными связями и гидрофобными взаимодействиями в приповерхностном слое флуорофора.

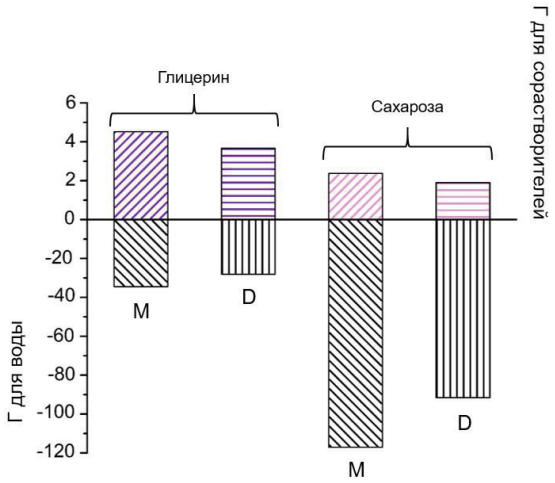


Рисунок 3.18. Коэффициенты преимущественного взаимодействия (Г) воды (черным), глицерина (синим) и сахарозы (красным) с M и D формами флуоресцеина, полученные в результате молекулярного моделирования 40%-го раствора глицерина и 30%-го раствора сахарозы. Г > 0 означает, что концентрация молекул вблизи флуоресцеина выше, чем в объемном растворе; Г< 0 означает, что молекулы исключены из гидратной оболочки флуоресцеина. Адаптировано из [16]

II. Изменение ионного равновесия в возбужденном состоянии и квантового выхода ионных форм при добавлении сорастворителей.

Влияние сорастворителей на смещение показателя константы равновесия в возбужденном состоянии pK_a^* оценено с использованием цикла Фёрстера (2.6) по аналогии с температурным анализом. Величины ΔpK_a в растворах сахарозы (30 вес. %) и глицерина (40 вес. %) близки к значениям в буферной системе (табл. 3.5). При этом pK_a^* смещён в сторону образования D формы примерно на 0,7 относительно основного состояния, что свидетельствует о несущественном вкладе процессов перераспределения заряда в формирование зависимости ратиометрического сигнала от вязкости среды.

Изменение квантового выхода флуоресценции ионных форм при снижении полярности среды вносит дополнительный вклад в ратиометрический сигнал. Для дианиона его изменение незначительно (~2%) в менее полярных растворителях по сравнению с водой [21], что согласуется с данными для вязких сред при pH 11. Для моноанионной формы, напротив, наблюдается увеличение на 8÷36% в бинарных водно-органических смесях [22], что приводит к снижению ратиометрического сигнала по сравнению с ожидаемым из протолитического равновесия.

3.8. Совместный эффект температуры и сорастворителей на спектры водных растворов флуоресцеина

Термодинамические параметры реакции переноса протона флуоресцеина на дианион-анионной ступени, полученные в буферном растворе, соответствуют случаю идеальной системы. Однако в реальных условиях, например, в физиологических жидкостях, флуоресцентный зонд испытывает дополнительное действие межмолекулярных сил со стороны сорастворителей различной природы и концентрации. Термодинамические параметры реакции переноса протона (например, изменение молярной энтальпии реакции), а значит, и спектральные отклики зонда в этом случае будут отличаться от обсуждае-

мых в разделе 3.3. Выявление совместного эффекта от присутствия сорастворителей и изменения температуры на наблюдаемые спектральные параметры зонда стало задачей отдельного исследования.

Для измерения поглощения и флуоресценции в диапазоне от 283 до 353K было использовано фиксированное значение pH (6,5) и достаточно высокие концентрации сорастворителей (30 вес. % сахарозы и 40 вес. % глицерина), что позволило произвести декомпозицию спектров поглощения и определить константы ионного равновесия в основном состоянии по методике, описанной в разделе 3.2.

Было установлено, что с повышением температуры значение константы ионного равновесия уменьшается, при этом угловые коэффициенты соответствующих зависимостей в шкале $-\ln K_a(T^{-1})$, позволяющей линеаризовать экспериментальные данные согласно уравнению Вант-Гоффа (3.1), различаются для буферного раствора и вязких сред (рис. 3.19). На основе уравнения (3.1) было вычислено изменение молярной энтальпии реакции $\Delta_r H$.

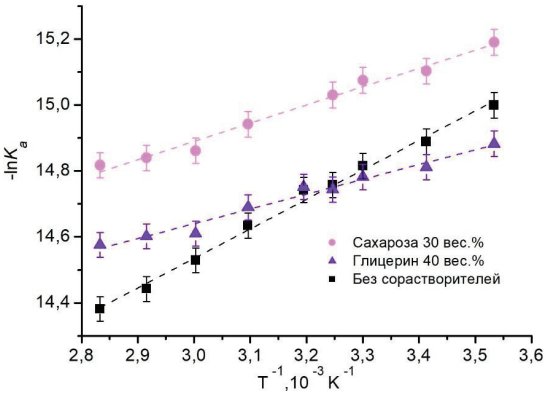


Рисунок 3.19. График Вант-Гоффа для определения изменения молярной энтальпии реакции переноса протона $\Delta_r H$ в буфере (черные символы) и в присутствии сахарозы (30%) (розовые символы) и глицерина (40%) (фиолетовые символы) при pH 6,5

Было обнаружено, что изменение молярной энтальпии реакции депротонирования уменьшается по сравнению с буферным раствором без органических сорастворителей, причем в растворе сахарозы данный эффект выражен сильнее, чем в растворе глицерина. Температурные зависимости являются обратимыми и воспроизводятся при охлаждении, свидетельствуя об обратимости обсуждаемой реакции переноса протона.

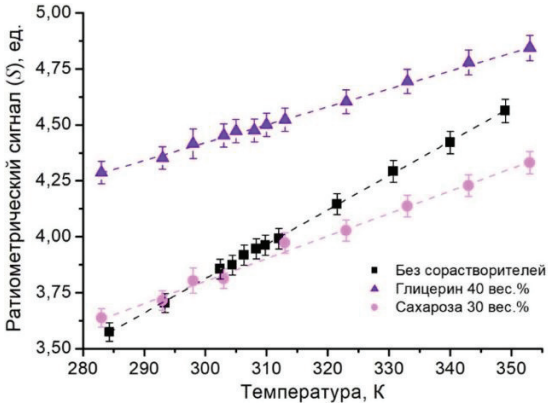


Рисунок 3.20. Зависимости ратиометрического сигнала *S* флуоресцеина от температуры среды при pH 6,5 в присутствии глицерина (фиолетовые символы) и сахарозы (розовые символы). Черные символы обозначают данные, полученные без сорастворителей

Важным остается вопрос о сохранении термометрических характеристик ратиометрического сигнала в присутствии сорастворителей. С ростом температуры величина *S* растет, зависимость остаётся линейной в присутствии сорастворителей (рис. 3.20), однако угловой коэффициент этой зависимости (или тепловая чувствительность S_a) снижается (табл. 3.5). Характер связи между тепловой чувствительностью и изменением молярной энтальпии реакции может быть выведен из зависимости изменения S_a от состояния ионного равновесия флуоресцеина, как это было показано в разделе 3.6. Выявленная линейность этой связи (рис. 3.21) может существенно расширить спектр аналитических применений флуоресцеина, что, однако, потребует дополнительной верификации.

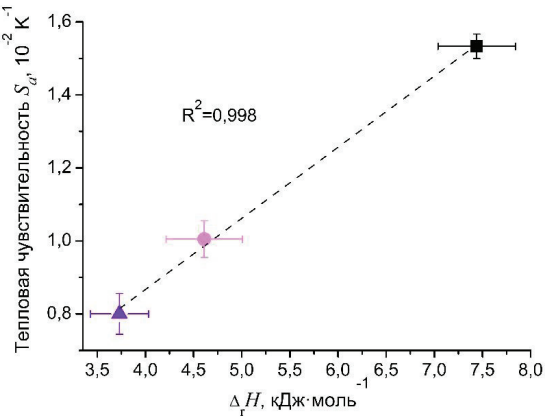


Рисунок 3.21. Тепловая чувствительность ратиометрического сигнала в зависимости от изменения энтальпии реакции в отсутствие и в присутствии сорастворителей. Пунктирные линии – линейная аппроксимации данных

Заключение к 3 главе

Флуоресцеин, рассматриваемый в роли флуоресцентного зонда в водном растворе в диапазоне pH 5÷8, оказался весьма чувствительным к присутствию фосфат-ионов и вязких сорастворителей, а также изменению температуры. Поэтому изучение влияния каждого из факторов требует строгой фиксации остальных экспериментальных параметров, в первую очередь – pH.

Обладая выраженными фотокислотными свойствами на дианион-анионной ступени диссоциации, реализовать их в полной мере флуоресцеин способен лишь при достаточно высокой концентрации гидрофосфат- и дигидрофосфат-ионов (не менее 1,5 М). При меньших концентрациях акцепторов протонов при комнатной температуре и возбуждении в полосе моноанионов дианион-анионное равновесие не успевает установиться за время жизни возбужденного состояния.

Изменение молярной энтальпии реакции депротонирования в основном состоянии флуоресцеина (7,4 ± 0,4 кДж/моль) указывает на эндотермический характер реакции и в присутствии вязких сорастворителей понижается.

Спектральный отклик на внешние воздействия может формироваться как суперпозиция вкладов одновременно нескольких механизмов: смещения ионного равновесия в основном и возбужденном состояниях, изменения квантового выхода флуоресценции, а также спектральных сдвигов. Использованная нами для количественных оценок безразмерная величина – ратиометрический сигнал – учитывает все эти вклады и представляет собой удобный аналитический параметр. Выявленная линейная зависимость ратиометрического сигнала флуоресцеина от температуры в диапазоне 283 до 353K с температурной чувствительностью около $1{,}5 \cdot 10^{-2} K^{-1}$ при pH 6,0-6,5 может быть использована для решения задач термометрии и химического анализа.

Список литературы к 3 главе

1. Austin S. Phosphate homeostasis – a vital metabolic equilibrium maintained through the INPHORS signaling pathway / S. Austin, A. Mayer // Front. Microbiol. – 2020. – V. 11. – P. 1367.

2. Bergwitz C. Primary disorders of phosphate metabolism / C. Bergwitz, H. Jüppner // Endotext [Internet]. – South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc., 2022. – URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279172/ (дата обращения: 24.05.2026).

3. Klonis N. Spectral properties of the prototropic forms of fluorescein in aqueous solution / N. Klonis, W. H. Sawyer // J. Fluoresc. – 1996. – V. 6. – P. 147–157.

4. Surzhikova D. P. Protolytic equilibrium of excited states of fluorescein / D. P. Surzhikova, M. A. Gerasimova, E. A. Slyusareva // Russ. Phys. J. – 2022. – V. 64. – P. 2102–2109.

5. Yguerabide J. Steady-state fluorescence method for evaluating excited state proton reactions: application to fluorescein / J. Yguerabide, E. Talavera, J. M. Alvarez, B. Quintero // Photochem. Photobiol. – 1994. – V. 60. – P. 435–441.

6. Mchedlov-Petrosyan N. O. Acid–base and aggregation equilibria of xanthene dyes in aqueous solutions / N. O. Mchedlov-Petrosyan // Vestn. Kharkov. Nats. Univ. – 2004. – V. 626. – № 11 (34). – P. 221.

7. Atkins P. W. Atkins' Physical Chemistry. 11th ed. / P. W. Atkins // Oxford: Oxford University Press. – 2018. – 944 p.

8. Sjöback R. Absorption and fluorescence properties of fluorescein / R. Sjöback, J. Nygren, M. Kubista // Spectrochim. Acta A. – 1995. – V. 51. – Is. 6. – P. L7-L21.

9. Liu T. Molecular structure perspective on temperature-sensitive properties of rhodamine aqueous solutions / T. Liu, J. Huang, H. Ding, C. Zhan, S. Wang // Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc. – 2022. – V. 275. – P. 121166.

10. Surzhikova D. P. Mechanisms of temperature dependence of the ratiometric signal of fluorescein / D. P. Surzhikova, N. Yu. Romanova, E. A. Slyusareva // Proc. SPIE. – 2023. – V. 12920. – № 129200Z.

11. Birks J. B. Fluorescence quantum yield measurements / J. B. Birks // J. Res. Natl. Bur. Stand. A Phys. Chem. – 1976. – V. 80A. – Is. 3. – P. 389–399.

12. He C. Nanoscale metal–organic frameworks for real-time intracellular pH Sensing in live cells / K. Lu, W. Lin // J. Am. Chem. Soc. – 2014. – V. 136. – Is. 35. – P. 12253–12256.

13. Macairan J. R. Intracellular ratiometric temperature sensing using fluorescent carbon dots / J. R. Macairan, D. B. Jaunky, A. Piekny, R. Naccache // Nanoscale Adv. – 2018. – V. 1. – Is. 1. – P. 105–113.

14. Yin N. Dual lanthanide complexes-loaded ratiometric nanothermometer for elucidating intracellular variations of temperature and calcium transport / N. Yin, Y. Yu, X. Wang, Y. Shu, J. Wang // Chem. Eng. J. – 2024. – V. 490. – № 151645.

15. Kolesnikov I. E. Thermosensitive phosphorus (V) porphyrin: Toward subcellular ratiometric optical temperature sensing / I. E. Kolesnikov, A. A. Kalinichev, A. I. Solomatina, M. A. Kurochkin, I. N. Meshkov, E. Yu. Kolesnikov, Yu. G. Gorbunova // Sens. Actuators A: Phys. – 2022. – V. 347. – № 113917.

16. Surzhikova D. P. Functioning of a fluorescein pH-probe in aqueous media: impact of temperature and viscosity / D. P. Surzhikova, L. A. Sukovatyi, E. V. Nemtseva, E. N. Esimbekova, E. A. Slyusareva // Micromachines. – 2023. – V. 14. – № 1442.

17. Surzhikova D. S. Effect of phosphate ions on the dianion–anion equilibrium of fluorescein excited state / D. S. Surzhikova, M. A. Gerasimova, E. A. Slyusareva // Bull. Russ. Acad. Sci. Phys. – 2022. – V. 86. – P. 1203–1206.

18. Persson L. B. Cellular control of viscosity counters changes in temperature and energy availability / L. B. Persson, V. S. Ambati, O. Brandman // Cell. – 2020. – V. 183. – Is. 6. – P. 1572–1585.

19. Puchkov E. O. Intracellular viscosity: methods of measurement and role in metabolism / E. O. Puchkov // Biochemistry (Moscow) Suppl. Ser. A Membr. Cell Biol. – 2013. – V. 7. – Is. 4. – P. 270–279.

20. Zaslavsky B. Yu. Influence of non-ionic polymers on solvent properties of water as detected by studies of acid–base equilibria of sulphonephthalein and fluorescein dyes / B. Yu. Zaslavsky, L. M. Miheeva, N. D. Gulaeva, A. A. Borovskaya, M. I. Rubtsov, L. L. Lukatskaya, N. O. Mchedlov-Petrossyan // J. Chem. Soc., Faraday Trans. – 1991. – V. 87. – Is. 7. – P. 931–938.

21. Magde D. Fluorescence quantum yields and their relation to lifetimes of rhodamine 6G and fluorescein in nine solvents: improved absolute standards for quantum yields / D. Magde, R. Wong, P. G. Seybold // Photochem. Photobiol. – 2002. – V. 75. – Is. 4. – P. 327–334.

22. Naderi F. Solvatochromism of fluorescein in aqueous aprotic solvents / F. Naderi, A. Farajtabar // J. Mol. Liq. – 2016. – V. 221. – P. 102–107.

ГЛАВА 4.
СПЕКТРАЛЬНОЕ ЗОНДИРОВАНИЕ ПОВЕРХНОСТИ БЕЛКА

4.1. Флуоресцентное зондирование поверхности белка с помощью внутренних и внешних меток

Функции белков во многом определяются способностью белковых макромолекул взаимодействовать как с малыми молекулами (лигандами, субстратами), так и с другими макромолекулами (включая сами белки) во внутриклеточной среде. В свою очередь, эта способность определяется поверхностными свойствами белковых молекул, представляющих собой сложным образом уложенную полипептидную цепь. Высокая эффективность и специфичность молекулярных взаимодействий белков является продуктом длительной эволюции живых организмов, и в настоящее время это свойство широко используется в научной практике как для фундаментальных исследований, так и для решения прикладных задач. Связывание белками молекул-мишеней может быть описано в терминах электростатических и/или гидрофобных взаимодействий, которые могут играть как позитивную роль, обеспечивая высокую эффективность связи [1], так и негативную, приводя к неконтролируемой агрегации [2–4].

Вблизи поверхности белковой макромолекулы многие параметры среды (растворителя), такие как pH, полярность, концентрации сорастворителей и электролитов, могут отклоняться от своих объемных значений вдали от поверхности [5]. Предметом особого интереса является зарядовая неоднородность белковой поверхности, играющая существенную роль в фазовом поведении белково-полимерных смесей [6], адсорбции белков на заряженных и функционализированных твердых поверхностях [7], механизмах стабилизации белок-белковых комплексов [8], а также в ряде других явлений, связанных

с биосовместимостью материалов и регуляцией межмолекулярных взаимодействий. Несмотря на повышенное внимание к этому параметру, до настоящего времени не предложен универсальный экспериментальный подход, позволяющий оценить его количественную характеристику, которая имеет принципиальное значение для понимания разнообразных биологических функций белков и рационального дизайна макромолекул с заданными функциональными свойствами. Изменение полярности белковой поверхности может свидетельствовать о модификации гидрофобных взаимодействий, стабилизирующих её трехмерную структуру, и, как следствие, о нарушении нативного конформационного состояния (природной, функционально активной формы белка). Для оценки поверхностных состояний белков особое распространение получили методы флуоресцентной спектроскопии с использованием внутренних и внешних флуоресцентных меток.

Триптофан и тирозин (ароматические аминокислоты, входящие в состав белка) играют роль естественных внутренних флуоресцентных меток, чувствительных к конформационным перестройкам макромолекул. Тирозин, обладая более низким квантовым выходом флуоресценции по сравнению с триптофаном, во многих случаях является донором энергии для триптофановых аминокислотных остатков, в результате чего часть энергии, поглощенной тирозином, проявляется в виде усиленной флуоресценции триптофана. Поэтому, говоря о собственной люминесценции белков, в подавляющем большинстве случаев подразумевают испускание триптофановых остатков. Индивидуальные компоненты стационарных спектров флуоресценции сложных белков могут быть идентифицированы на основе дискретной модели состояний триптофановых остатков, предложенной Э. А. Бурштейном и соавторами [9]. Используя статистический анализ форм и положений спектров люминесценции триптофана для большого числа белков в различных условиях, а также сопоставляя эти данные со структурными параметрами, такими как полярность и подвижность микроокружения флуорофора, авторы выделили пять наиболее вероят-

ных спектральных форм (классов) триптофановых остатков в составе белковых молекул. Это позволяет связывать регистрируемый флуоресцентный сигнал с определенным триптофановым остатком и прослеживать конформационную стабильность белков при денатурации без использования внешних красителей – по уменьшению интенсивности и красному смещению максимума флуоресценции триптофана, обусловленными ростом доступности воды и других тушителей [10] (рис. 4.1).

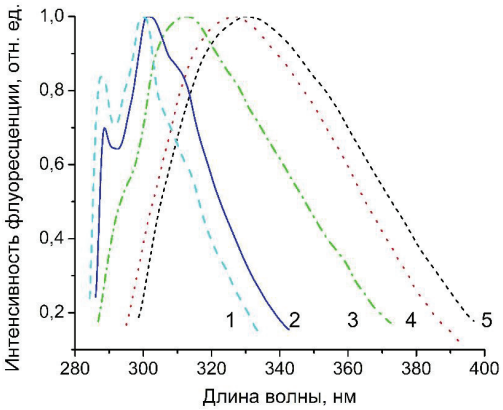


Рисунок 4.1. Спектр флуоресценции индола (хромофорной группы триптофана) в неполярном и полярном растворителях, гексане (1) и воде (5) соответственно. Промежуточные спектры 2–4 соответствуют различным концентрациям гексано-бутанольной смеси. Адаптировано из [11]

Дополнительным источником информации является время-разрешенная флуоресцентная спектроскопия триптофана, которая позволяет в рамках единого методологического подхода количественно описывать размеры и форму белковых частиц, ориентацию пептидных фрагментов в мембранах, степень гидратации и полярности микросреды, а также характеристики связывания и конформационных переходов, сопровождающих взаимодействие биологических макромолекул, например, с лекарственными веществами [12].

В работе Е. В. Немцевой с соавторами [13] рассмотрено затухание флуоресценции триптофановых остатков трех модельных белков: сывороточный

альбумин человека (ЧСА, один остаток триптофана), сывороточный альбумин быка (БСА, два остатка триптофана) и бактериальная люцифераза *Photobacterium leiognathi* (БЛ, семь остатков триптофана). Во всех трех белках триптофановые остатки располагаются в различном микроокружении – от глубоко гидрофобных до расположенных в приповерхностной области. Авторами установлено, что в изученных белках в нативном и денатурированном состояниях затухание собственной флуоресценции триптофановых остатков описывается суммой трех экспоненциальных компонент с существенно различающимися временами жизни. В нативном состоянии (рис. 4.2 а) для всех белков выявлен единый набор времен, не зависящий от числа триптофановых остатков и особенностей их расположения в трехмерной структуре белка: «длинная» компонента с временем жизни флуоресцентного состояния около 6÷7 нс, «средняя» компонента с временем жизни 2,0÷2,3 нс и «короткая» компонента с временем $\leq$ 0,16 нс, причем вклад последней в суммарный стационарный спектр флуоресценции оказывается незначительным. Похожие наборы значений были получены и для ряда других белков с различным содержанием триптофанов, что позволяет связывать эти времена с определенными конформационными состояниями триптофановых остатков, а не с конкретным типом белка [14].

Дополнительно показано, что денатурация белков гуанидингидрохлоридом (рис. 4.2 б) приводит к согласованному снижению времен жизни «длинной» и «средней» компонент примерно до 4,4÷4,6 нс и 1,7÷1,8 нс соответственно, при одновременном выравнивании их вкладов в суммарный спектр, а также к выраженному батохромному сдвигу как стационарных, так и временно-разрешенных спектров излучения. Это свидетельствует об увеличении полярности и подвижности микросреды триптофана в развернутой полипептидной цепи.

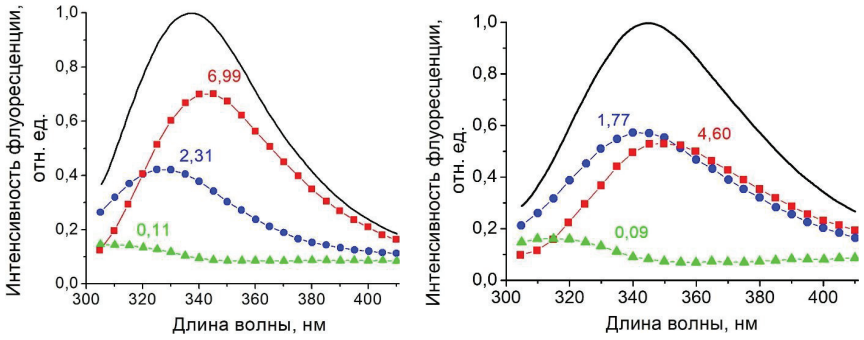


Рисунок 4.2. Разложение спектра флуоресценции белка на компоненты, ассоциированные с временами жизни (в нс) флуоресцентного состояния, для ЧСА в нативном (а) и денатурированном (б) состояниях. Адаптировано из [13]

Существенным результатом стало выявление близких значений длин волн максимума и полуширин спектральных контуров, соответствующих разным временным компонентам для всех белков внутри одной конформационной группы (рис. 4.2 а, б). В нативном состоянии максимумы компонент с длинным, средним и коротким временем жизни располагаются примерно при 342, 328 и 315 нм, тогда как в денатурированном состоянии смещаются к 350, 343 и 317÷320 нм соответственно, что свидетельствует о фундаментальном сходстве спектрально-временных характеристик триптофана в белках различной природы и степени сложности.

Интерпретация флуоресценции внутренних триптофановых остатков остается сложной задачей из-за совместного влияния множества факторов, включая полярность среды, тушение соседними аминокислотными остатками, pH, температуру, присутствие денатурантов и других модифицирующих агентов [12, 15]. При аккуратном экспериментальном исполнении время-разрешенная флуоресценция этого природного флуорофора остается одним из наиболее информативных и наименее инвазивных методов исследования структуры и динамики биомолекул.

Наряду с естественной флуоресцентной меткой триптофаном для оценки электростатических свойств белков была предложена его синтетическая производная 4-цианотриптофан (4-CN-Trp) – неприродная аминокислота с яркосиней флуоресценцией с более высоким квантовым выходом, чем у триптофана. Имеются оценки полярности и электрического поля в однородном растворителе в отсутствие белка, полученные с помощью этого флуорофора [16]. Однако даже при таких успешных подходах говорить о полноценной оценке электростатических свойств белка пока не приходится.

Помимо рассмотренных внутренних флуоресцентных меток белка, для оценки его поверхностных свойств могут использоваться и внешние метки – низкомолекулярные флуорофоры и красители (в том числе специально синтезированные), способные специфично реагировать как в целом на присутствие белков в растворе, так и на отдельные параметры их поверхности [17]. Для реализации последней задачи необходимо быть уверенным, что краситель в течение всего времени измерения находится именно на поверхности белка. Решить проблему локализации метки можно с помощью флуоресцентного зонда – флуоресцеин-5-изотиоцианата, который при проведении стандартной процедуры ковалентно связывается с NH_2-группами на поверхности белковой макромолекулы.

Анализ спектров поглощения ФИТЦ, конъюгированного с белком в работе Т. Отосу и соавторов [18], представляет собой важный шаг к количественному описанию локального pH на поверхности растворимых глобулярных белков и демонстрирует экспериментальный подход, позволяющий отделить вклад локальной диэлектрической среды вблизи белка от градиента pH. Авторы используют лизоцим куриного белка (ЛКБ) как модельный объект, хорошо охарактеризованный в исследованиях сворачивания, кристаллизации и структурной стабильности, и известный высоким значением изоэлектрической точки (p$I \approx 11{,}4$), что гарантирует наличие положительного заряда в широком диапазоне pH. Важной предпосылкой выбранной модели является кон-

формационная устойчивость ЛКБ в интервале pH 3÷9, что позволяет интерпретировать изменения спектральных характеристик зонда именно в терминах изменения протонирования и микросреды, а не глобальной денатурации белка.

В результате проведенного спектрального анализа pH-зависимых спектров поглощения ФИТЦ, конъюгированного с лизоцимом, было показано, что локальный pH вблизи поверхности белка систематически выше, чем pH в объеме раствора. Это было установлено путем сопоставления «кажущихся» констант кислотности зонда pK_a, определяемых относительно объемного pH, с его «внутренними» pK_a, измеренными в модельной среде с эквивалентной диэлектрической постоянной (в водно-ацетоновом растворе). Положительное смещение pK_a авторы интерпретируют как следствие электростатического отталкивания протонов от положительно заряженной поверхности белка с высокой изоэлектрической точкой (рис. 4.3).

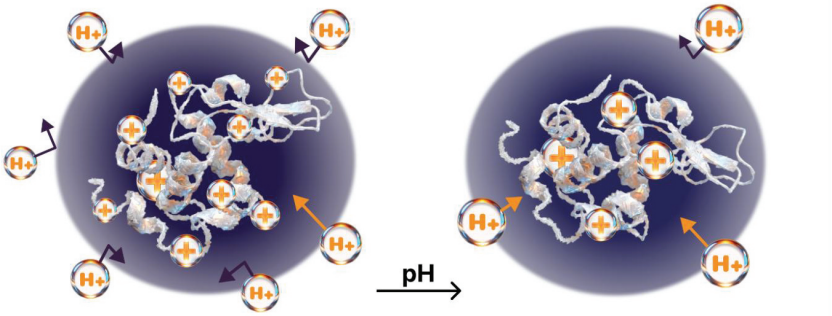


Рисунок 4.3. Иллюстрация электростатического отталкивания протонов от заряженной поверхности белка при изменении pH

Анализ показал, что разность между локальным и объемным pH возрастает при снижении pH объемной фазы, то есть по мере усиления суммарного положительного заряда белка за счет протонирования дополнительных ионизируемых групп. Аналогичные закономерности были обнаружены и для другого белка – папаина, что свидетельствует о том, что pH-зависимое отталкива-

ние протонов является общей характеристикой белков с высоким p*I*, а определяющим фактором локального pH служит именно суммарный заряд белковой глобулы, а не специфические локальные взаимодействия зонда. Полученные данные подчеркивают необходимость учитывать локальный pH при интерпретации протонирования функциональных аминокислот и, следовательно, при описании каталитической активности и связывания лигандов на поверхности белков.

4.2. Параметры белка, получаемые методами молекулярного моделирования

Знание кристаллической структуры белка и широкий набор доступных методов расчета, обзор которых выходит за рамки монографии (см., например, [19–20]), позволяют визуализировать форму белка, зарядовое распределение на поверхности, а также количественно оценить ряд важных параметров. К таким параметрам можно отнести:

1. Общий заряд белка при фиксированном pH, q_n, *e*.
2. Общую площадь поверхности, доступную растворителю, SASA, нм ^{2}.
3. Площадь гидрофобной поверхности $SASA_{phob}$, нм ^{2}.
4. Радиус инерции R_g, нм.

Определение суммарного заряда и распределения заряженных групп на поверхности белка является принципиально важным для описания его растворимости, устойчивости в растворе и склонности к агрегации. Расчет общей площади поверхности позволяет количественно охарактеризовать степень компактности и развернутости белковой молекулы, тогда как площадь гидрофобной поверхности описывает долю неполярных участков, доступных водной фазе, и тем самым отражает состояние гидрофобного ядра белка. Радиус инерции выступает ключевым параметром для характеризации компактности свернутого состояния белка и анализа его изменений во времени, в том числе при конформационных переходах и частичной денатурации.

Авторы [21] провели соответствующие расчеты для четырех глобулярных белков, различающихся по молекулярной массе, зарядовым характеристикам, топологии и биологической функции – от компактного фермента врожденного иммунитета до крупного транспортного белка сыворотки и фермента биолюминесцентной системы. Это лизоцим куриного белка (ЛКБ), карбонгидраза Б быка II (КАБ), бычий сывороточный альбумин (БСА) и бактериальная люцифераза из *Photobacterium leiognathi* (БЛ). Такой выбор обеспечивает широкий диапазон величины заряда, общей и гидрофобной площади поверхности и компактности структуры.

Распределение зарядов на поверхности белков при pH 6,5 наглядно представлено на рисунке 4.4 и демонстрирует, что поверхность ЛКБ преимущественно и достаточно равномерно заряжена положительно, тогда как КАБ характеризуется наибольшей площадью незаряженной области. Поверхность БСА, несмотря на отрицательное значение суммарного заряда q_n, содержит выраженный положительно заряженный участок, а поверхность БЛ в рассматриваемых условиях в целом равномерно заряжена отрицательно. Полученные методами молекулярного моделирования характеристики белков отражены в табл. 4.1.

Таблица 4.1. Зарядовые и структурные характеристики исследованных белков

№	Параметр	Белки			
		ЛКБ	КАБ	БСА	БЛ
1	M_w, кДа	14,3	29,0	66,6	79,0
2	p*I*	11,4	5,9	4,8	4,7
3	q_n при pH 6,50, *e*	+9	–2	–11	–21
4	SASA, нм^2	68,7	114,5	287,7	286,3
5	$SASA_{phob}$, нм^2	29,2	58,2	145,5	131,8
6	q_{nd}, *e*/нм^2	$+1{,}31\cdot10^{-1}$	$-1{,}75\cdot10^{-2}$	$-3{,}82\cdot10^{-2}$	$-7{,}33\cdot10^{-2}$
7	R_g, Å	16,4	18,0	27,0	26,9

* Mw – молекулярная масса и p*I* – изоэлектрическая точка взяты из [18, 22–24];
q_n – общий заряд белка;
SASA – общая площадь поверхности, доступная растворителю;
$SASA_{phob}$ – площадь гидрофобной поверхности;
q_{nd} – удельный заряд белка (q_n/SASA);
e – элементарный заряд;
R_g – радиус инерции.

Детальный анализ структурных свойств ЛКБ, КАБ, БСА и БЛ выявил ряд закономерностей в этом наборе:

(i) при pH 6,50 суммарный заряд белков изменяется от +9 (ЛКБ) до –21 (БЛ), что обусловлено различием их значений p*I*;

(ii) БСА и БЛ, несмотря на различие молекулярных масс примерно на 18%, характеризуются очень близкими значениями параметров SASA и R_g, что обусловлено достаточно сложной формой этих молекул (рис. 4.3);

(iii) поверхность БСА обладает наибольшей гидрофобной (незаряженной) областью.

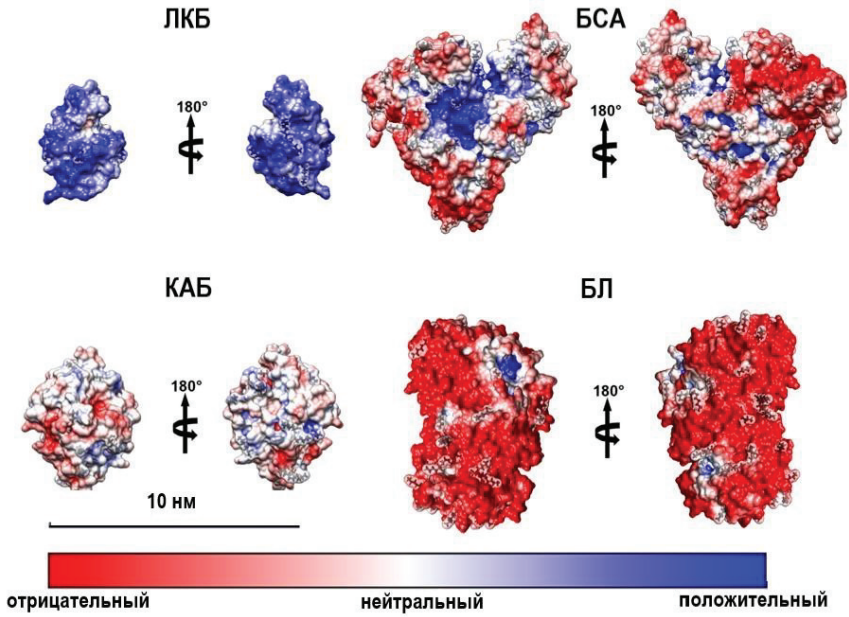


Рисунок 4.4. Распределение электростатического потенциала при pH 6,50 на поверхности белков: ЛКБ, КАБ, БСА и БЛ. Белки показаны в одном масштабе [21]

4.3. Спектры поглощения и флуоресцентные свойства ФИТЦ, конъюгированного с белками

В растворе с фиксированными характеристиками (pH 6,5, фосфатный буфер 0,05 М, температура 25 °С) для ФИТЦ, коньюгированного с четырьмя различными белками, были получены спектры поглощения, отличные как друг от друга, так и от поглощения ФИТЦ в свободном состоянии (рис. 4.5). Спектральное различие проявляется как в форме контура, так и в положении максимума. Самый большой батохромный сдвиг по сравнению с меткой в свободном состоянии показал конъюгат ФИТЦ-БСА. Батохромные сдвиги полос поглощения флуоресцеина объясняются снижением полярности микросреды [18], тогда как деформация формы спектра указывает на изменение ионного равновесия.

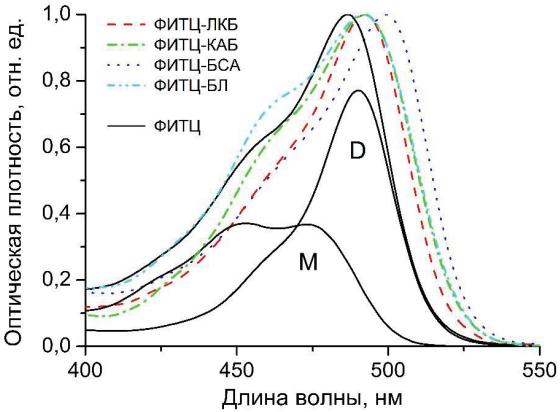


Рисунок 4.5. Спектры поглощения ФИТЦ, свободного и ковалентно связанного с белками, в буфере pH 6,50 и пример разложения спектров поглощения свободного ФИТЦ на моноанионную (M) и дианионную (D) составляющие

Ионное равновесие метки на поверхности белка оценивается по соотношению концентраций дианионной и анионной форм флуоресцеина, которое можно оценить количественно путем разложения на соответствующие кон-

туры с определением их амплитудного вклада. Такое разложение было выполнено по методу, описанному в главе 3, и позволило определить два независимых параметра: соотношение концентраций D и M форм ([D]/[M]) и сдвиг максимума полосы поглощения D формы ($\Delta\lambda_D$) относительно спектра ФИТЦ в свободном состоянии (табл. 4.2). Оба параметра в исследованном ряду красителей варьируются в широких пределах: величина [D]/[M] изменялась от 0,90/0,10 (ЛКБ) до 0,24/0,76 (БЛ), максимальное значение $\Delta\lambda_D$ составило 12,1 нм (БСА).

Сдвиг полосы поглощения D формы ФИТЦ, ковалентно связанного с белками, относительно спектра свободного ФИТЦ в буферном растворе при pH 9, где преобладает D форма, может рассматриваться как мера изменения полярности микроокружения зонда. Для количественной интерпретации этого эффекта в качестве калибровки была использована линейная зависимость между диэлектрической проницаемостью среды ε водно-ацетоновых растворов и спектральным сдвигом максимума поглощения D формы ФИТЦ ($\Delta\lambda_D$), предложенная в работе Отосу и соавторов [18]. На основании этой зависимости была вычислена локальная диэлектрическая проницаемость ε_{local} вблизи поверхности белков (табл. 4.2). Значения ε_{local} оказались существенно ниже диэлектрической проницаемости объемной водной фазы; при этом получено, что наиболее гидрофобное (наименее полярное) микроокружение для ФИТЦ формирует БСА.

Таблица 4.2. Экспериментальные параметры, полученные из спектров поглощения ФИТЦ в свободном и связанном состояниях

№	Параметр*	ФИТЦ в буфере pH 6,50	ФИТЦ, связанный с белком, в буфере pH 6,50			
			ЛКБ	КАБ	БСА	БЛ
1	[D]/[M]	0,61/0,39	0,90/0,10	0,40/0,60	0,58/0,42	0,24/0,76
2	$\Delta\lambda_D$, нм	0	2,9	7,2	12,1	10,5
3	ε_{local}	81	66±2	44±3	18±2	27±3
4	R^2	0,999	0,998	0,988	0,999	0,998

* [D]/[M] – относительные концентрации D и M форм ФИТЦ;
$\Delta\lambda_D$ – батохромный сдвиг спектра поглощения D формы;
ε_{local} – локальные свойства среды ФИТЦ, полученные из спектра поглощения;
R^2 – коэффициент детерминации нелинейной аппроксимации данных.

Стационарные спектры флуоресценции ФИТЦ, конъюгированного с белками, были зарегистрированы в буфере (pH 6,50) при возбуждении на 488 и 435 нм, при которых преимущественно возбуждаются D и M формы соответственно (рис. 4.5). Установлено, что максимум спектра флуоресценции ФИТЦ в связанном состоянии смещен в красную область по сравнению со свободным ФИТЦ (рис. 4.6, вставка). Тем не менее величина этого смещения не превышает 3 нм, что значительно меньше, чем сдвиг спектров поглощения.

Форма спектров флуоресценции конъюгатов ФИТЦ-ЛКБ (рис. 4.6) не зависит от длины волны возбуждения, что указывает на преимущественное излучение одной D формы при обоих условиях возбуждения. В случае ФИТЦ-БСА и ФИТЦ-БЛ увеличение интенсивности флуоресценции в диапазоне 550–600 нм при возбуждении на 435 нм по сравнению с возбуждением на 488 нм позволяет заключить, что M форма вносит заметный вклад в флуоресценцию ФИТЦ, связанного с этими белками.

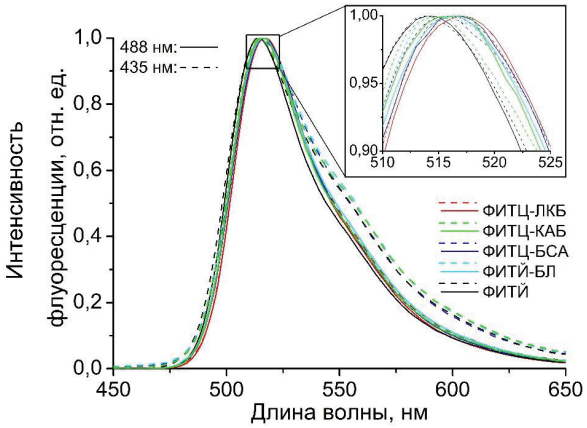


Рисунок 4.6. Спектры флуоресценции ФИТЦ, свободного и ковалентно связанного с белками, в буфере pH 6,50 при возбуждении при 435 и 488 нм

В дальнейшем был проанализирован ратиометрический сигнал *S* зонда на поверхности белков, получаемый как отношение интегральных сигналов

флуоресценции при двух длинах волн возбуждения – 435 и 488 нм. Ратиометрический флуоресцентный сигнал для разных биоконъюгатов существенно различался, принимая значения в интервале 4,69÷8,70. Это свидетельствует о высокой чувствительности отклика зонда к специфике поверхности белка, с которым он связан (табл. 4.3).

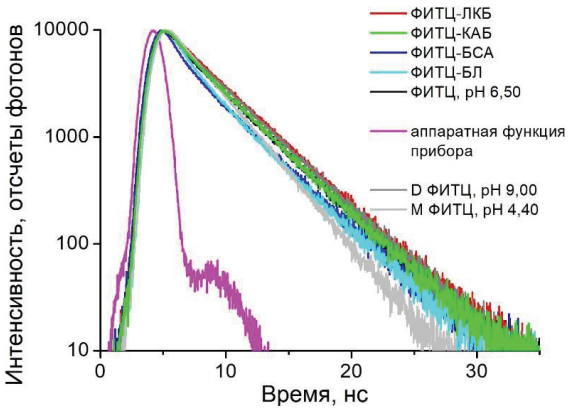


Рисунок 4.7. Затухание флуоресценции ФИТЦ в растворах при pH 9,00 (преимущественно D), 4,40 (преимущественно M), 6,50 (смесь D и M) и в связанном с белком состоянии при pH 6,50. Розовым цветом показана аппаратная функция прибора

Спады флуоресценции свободного ФИТЦ и его конъюгатов с белками регистрировали при возбуждении на длине волны 453 нм (рис. 4.7), и для каждого спада рассчитывали среднее время жизни $\langle \tau_{фл} \rangle$ (табл. 4.3). Для ФИТЦ, связанного с белками, $\langle \tau_{фл} \rangle$ определяется рядом факторов, среди которых основными являются: (i) соотношение концентраций M и D форм; (ii) близость к зонду триптофановых остатков в белке, способных выступать в качестве тушителей [25]. Оба фактора зависят от природы белка и отражают либо зарядовые свойства его поверхности, либо аминокислотный состав окружения ФИТЦ. Среднее время жизни возбужденного состояния ФИТЦ в связанном состоянии изменяется в диапазоне от 2,9 нс (для ФИТЦ-БЛ) до 3,8 нс (для ФИТЦ-ЛКБ). Первое значение близко к времени жизни моноанионной формы,

второе приближается к времени жизни дианионной формы (табл. 4.3). Для свободного ФИТЦ в растворе при pH 6,50 $\langle \tau_{фл} \rangle$ составляет 3,5 нс, что лежит в пределах величин, характерных для D и M форм [26].

Стационарная анизотропия флуоресценции была измерена с целью нахождения размера вращающегося излучателя (1.9 и 1.10). Для этого использовали стационарную анизотропию r^{453} и среднее время жизни флуоресцентного состояния, измеренные при возбуждении на длине волны 453 нм (табл. 4.3).

Значения r^{453} лежат в диапазоне от 0,024 (для свободного ФИТЦ) до 0,172 (для ФИТЦ-ЛКБ). Предполагая сферическую форму излучателя и принимая вязкость буфера при комнатной температуре в 1 сП, был рассчитан кажущийся радиус $R_г$ (табл. 4.3). Полученные значения указывают на максимальное значение размера ФИТЦ-ЛКБ по сравнению с другими конъюгатами.

Таблица 4.3. Экспериментальные параметры ФИТЦ, полученные методом стационарной, время-разрешенной и поляризованной флуоресценции в свободном и связанном состояниях

№	Параметр*	ФИТЦ в буфере pH 6,50	ФИТЦ, связанный с белком, в буфере pH 6,50			
			ЛКБ	КАБ	БСА	БЛ
1	S, ед.	5,44±0,08	8,70±0,13	5,82±0,09	5,21±0,08	4,69±0,09
2	$\langle \tau_{фл} \rangle$, нс ($\chi^2$)	3,5 (1,02)	3,8 (1,04)	3,5 (1,00)	3,1 (1,05)	2,9 (1,17)
3	r^{453}	0,024±0,015	0,172±0,006	0,038±0,013	0,120±0,018	0,067±0,007
4	$R_г$, нм	1,30±0,28	1,52±0,06	0,75±0,17	1,16±0,17	0,88±0,07

* S – ратиометрический сигнал;

$\langle \tau_{фл} \rangle$ – среднее время жизни флуоресцентного состояния и χ^2 – статистический параметр;

r^{453} – стационарная анизотропия флуоресценции при возбуждении на 453 нм;

$R_г$ – кажущийся радиус излучателя, рассчитанный по формулам (1.9 и 1.10) со значениями r^{453} и $\langle \tau_{фл} \rangle$.

4.4. Жесткость связи в биоконъюгатах ФИТЦ-белок

Ковалентное связывание ФИТЦ с белком гарантирует его локализацию вблизи поверхности на расстоянии, сопоставимом с характерным размером группы −N=C=S. Однако при наличии дополнительных взаимодействий между поверхностью белка и зондом, например, электростатических или гидрофобных, может возникнуть еще большее сближение с самим остовом ФИТЦ и/или его отдельными функциональными группами. Такая ситуация трактуется в терминах увеличения жесткости связи биоконъюгата и может быть исследована в рамках метода поляризованной люминесценции. Этот метод (глава 1) позволяет определить размер биоконьюгата (R_r): в случае жесткой связи он будет близок к размеру белка (R_g), уменьшение же жесткости приведет к свободному вращению метки вокруг белка и уменьшению кажущегося размера вращающегося излучателя.

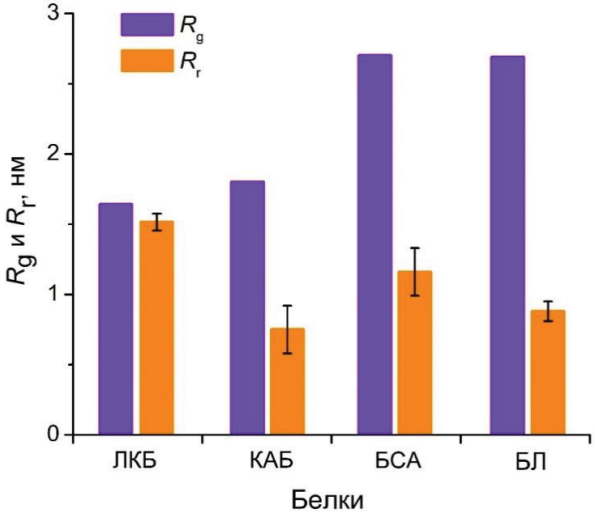


Рисунок 4.8. Радиус инерции белков R_g (фиолетовый) для ФИТЦ-меченных белков и кажущийся радиус вращающегося излучателя R_r, полученный из анизотропии и времени жизни флуоресцентного состояния (оранжевый) [21]

Подобное исследование было проведено для биоконъюгатов ФИТЦ (рис. 4.8). Согласие значений R_r и R_g в пределах погрешности наблюдалось только для системы ФИТЦ-ЛКБ, тогда как для остальных белков оценка размера излучателя показала более чем в два раза заниженное значение размера белка. Это свидетельствует о нежесткой связи ФИТЦ с белком.

Более высокая жесткость связывания ФИТЦ с ЛКБ обусловлена зарядовыми свойствами ФИТЦ (заряд $-e$ либо $-2e$) и поверхности лизоцима (заряд $+9e$, табл. 4.1), что способствует электростатическому притяжению между ними. Три других белка имеют отрицательно заряженную поверхность, а наибольшее расхождение между R_r и R_g выявлено именно для конъюгата ФИТЦ с бактериальной люциферазой, которая имеет наибольший из этого ряда отрицательный заряд ($-21e$).

Полученный результат подчеркивает необходимость учета зарядовых характеристик зонда и белковой поверхности при использовании методов поляризационной спектроскопии для оценки эффективного размера излучателя, с одной стороны, и открывает возможность использования ФИТЦ для зондирования зарядовых свойств поверхности макромолекулы, с другой.

4.5. Корреляция между параметрами поверхности белка и спектральными свойствами конъюгированного с белком ФИТЦ

Теперь, когда определен комплект параметров поверхности четырех белков, рассчитанных методами молекулярного моделирования, и ряд спектральных и время-разрешенных данных для ФИТЦ на поверхности белка, может быть выполнен корреляционный анализ между ними. Для четырех исследованных белков эта оценка проводилась с использованием коэффициента линейной корреляции Пирсона X (4.1), значения которого лежат в интервале от -1 до $+1$ и позволяют судить о наличии прямой (при стремлении к $+1$) либо

обратной (при стремлении к –1) линейной зависимости между сопоставляемыми величинами.

$$X = \frac{\sum (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2 (y_i - \bar{y})^2}}, \qquad (4.1)$$

где, x и y – переменные, $\bar{x}$ и $\bar{y}$ – средние значения переменных.

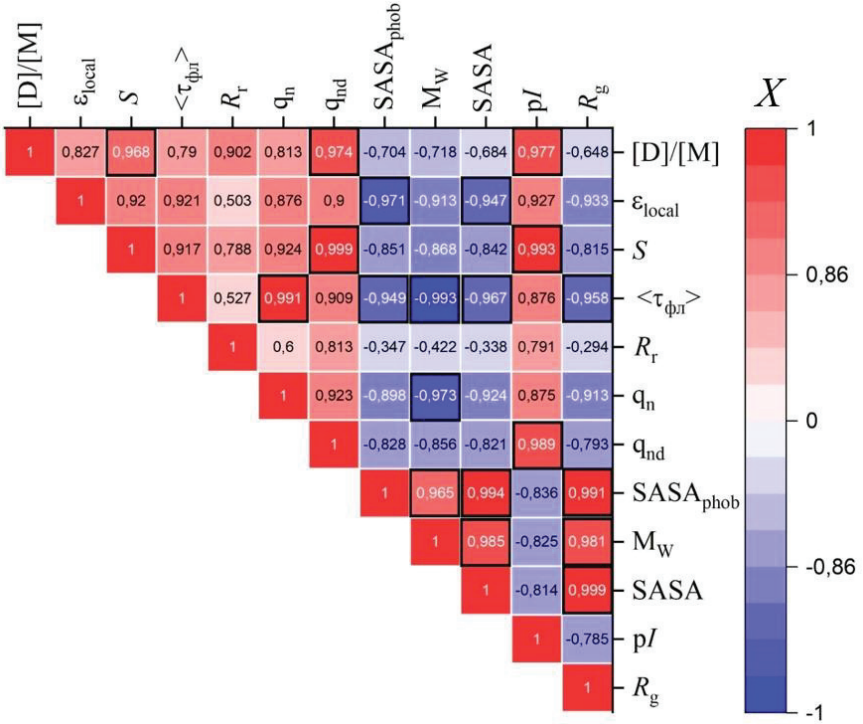


Рисунок 4.9. Корреляционная матрица, показывающая коэффициенты корреляции Пирсона (X) между параметрами отклика зонда и структурными характеристиками белков. Обозначения и значения параметров приведены в таблицах 4.1, 4.2 и 4.3. Корреляции, значимые на уровне $p < 0,05$, выделены черным квадратом

Анализ парных коэффициентов корреляции (рис. 4.9) выявил высокую степень связи между структурными характеристиками белков: значение $X \geq 0,965$ получено для любой пары параметров R_g, M_w, SASA, $SASA_{phob}$. Этот

факт отражает общую закономерность для белков живых организмов: при существенно различающейся длине полипептидной цепи они обладают сопоставимой плотностью упаковки, а изоэлектрическая точка pI коррелирует с длиной белка [27, 28]. Выявленные корреляции позволяют предположить, что для предварительного прогноза влияния конкретного белка на конъюгированный с ним зонд может быть использован любой из перечисленных выше структурных параметров.

Также анализ экспериментальных данных выявил прямую зависимость между соотношением концентраций ионных форм [D]/[M] и ратиометрическим сигналом I^{488}/I^{435} (S), $X \geq 0{,}968$. Такая связь представляется естественной, поскольку дианионно-моноанионное равновесие зонда является основным фактором, определяющим величину ратиометрического сигнала, тогда как дополнительные факторы (например, спектральные сдвиги полос поглощения [29]) в рассматриваемых условиях имеют второстепенное значение.

С точки зрения практического применения наиболее перспективными представляются следующие найденные закономерности:

(i) сильная прямая связь между ратиометрическим сигналом I^{488}/I^{435} (S) и удельным зарядом q_{nd} белка ($X \geq 0{,}999$). В свою очередь, S сильно коррелирует с изоэлектрической точкой белка pI ($X \geq 0{,}993$). При этом корреляция S и отношения [D]/[M] с суммарным зарядом белка q_n существенно слабее ($X \leq 0{,}924$). Такая зависимость может указывать на преимущественно неспецифический характер отклика зонда на зарядовую структуру поверхности белка, то есть на его малую чувствительность к локальной неоднородности распределения заряда. В этих условиях наиболее удобным интегральным параметром для оценки удельного заряда поверхности белка является именно ратиометрический флуоресцентный сигнал I^{488}/I^{435};

(ii) сильная обратная связь между кажущейся диэлектрической проницаемостью $\varepsilon_{\mathrm{local}}$ и площадью гидрофобной поверхности белка $\mathrm{SASA}_{\mathrm{phob}}$ ($X = -0{,}971$). Такая взаимосвязь согласуется с представлением о том, что

наблюдаемый спектральный сдвиг дианионной формы ФИТЦ обусловлен снижением полярности микроокружения зонда. Следовательно, спектральный сдвиг, легко поддающийся экспериментальному определению, может рассматриваться как ориентировочный параметр для оценки полярности белковой поверхности;

(iii) высокая линейная связь среднего времени жизни флуоресцентного состояния с рядом теоретических параметров ($|X| \geq 0{,}949$). Среднее время жизни обратно коррелирует с общей площадью поверхности белка (SASA), площадью гидрофобной поверхности ($SASA_{phob}$), радиусом инерции R_g и молекулярной массой белка M_w. Это согласуется с представлениями о чувствительности флуоресцентного параметра к морфологии поверхности. Одновременно проявляется и чувствительность к зарядовым характеристикам: обнаружена прямая связь среднего времени жизни с суммарным зарядом поверхности белка.

Предыдущие исследования (глава 3) показали, что спектральные свойства флуоресцеина весьма чувствительны к параметрам объемной фазы раствора. Помимо pH, ратиометрический сигнал I^{488}/I^{435} чувствителен к вариации температуры, концентрации фосфат-ионов и полярности растворителя, поэтому при анализе данных на границе поверхности белка все вышеуказанные параметры требуют строгой фиксации. Несмотря на данное ограничение, оптические сигналы флуоресцеина могут служить информативным инструментом для регистрации конформационных переходов белков, индуцируемых, в частности, связыванием субстратов, ингибиторов или иных лигандов в физиологических условиях. Описанный выше подход может быть усовершенствован путем контроля положения флуоресцентной метки на поверхности белка.

Заключение к 4 главе

Поверхностные свойства белков могут быть охарактеризованы в условиях, близких к их функциональному состоянию, на основе анализа оптического отклика ФИТЦ, конъюгированного с белком.

Спектральный сдвиг максимума полосы поглощения ФИТЦ отражает изменение локальной диэлектрической проницаемости вблизи поверхности белка. В свою очередь, для этой величины установлена обратная корреляционная зависимость от площади незаряженной (гидрофобной) поверхности белков. Ионное равновесие ФИТЦ вблизи поверхности белка оказывается смещенным по сравнению с объемной фазой. В обоих случаях рассматривается отклонение локальных (приповерхностных) характеристик системы от параметров объемной фазы. Ратиометрический флуоресцентный сигнал (I^{488}/I^{435}) демонстрирует высокую степень корреляции как с экспериментально определяемым параметром смещения ионного равновесия ФИТЦ, так и с теоретически рассчитанным удельным зарядом белка. При этом показано, что даже без уточнения конкретного сайта ковалентного присоединения зонда к белку его флуоресцентный отклик адекватно отражает как удельный заряд белка, так и площадь его гидрофобной поверхности.

Показано, что противоположный знак заряда ФИТЦ и белка (как это наблюдалось для лизоцима куриного белка) приводит к формированию жесткого комплекса, что проявляется в повышенном значении анизотропии флуоресценции

Исследованный набор белков охватывает широкий диапазон суммарных зарядов (от +9e до –21e) и молекулярных масс (от 14,3 до 79 кДа), что позволяет предположить возможность распространения полученных выводов на широкий класс биологических макромолекул. Результаты способствуют повышению информативности оптических методов зондирования в биологии и медицине, где микро- и наноразмерные объекты не могут быть детально охарактеризованы с использованием прямых методик исследования.

Список литературы к 4 главе

1. Fernandes F. Electrostatically driven lipid–protein interaction: Answers from FRET / F. Fernandes, A. Coutinho, M. Prieto, L.M.S. Loura // Biochim. Biophys. Acta-Biomembr. – 2015. – V. 1848. – Is. 9. – P. 1837–1848.

2. Chiti F. Protein Misfolding, Functional Amyloid, and Human Disease / F. Chiti, C. M. Dobson // Annu. Rev. Biochem. – 2006. – V. 75. – P. 333–366.

3. Dobson C. M. Protein folding and misfolding / C. M. Dobson // Nature. – 2003. – V. 426. – P. 884–890.

4. Stefani M. Protein aggregation and aggregate toxicity: New insights into protein folding, misfolding diseases and biological evolution / M. Stefani, C. M. Dobson // J. Mol. Med. – 2003. – V. 81. – Is. 11. – P. 678–699.

5. Noriega R. Measuring the Multiscale Dynamics, Structure, and Function of Biomolecules at Interfaces // J. Phys. Chem. B. – 2021. – V. 125. – № 22. – P. 5667–5675.

6. Kim S. Effect of protein surface charge distribution on protein–polyelectrolyte complexation / S. Kim, H. V. Sureka, A. B. Kayitmazer, G. Wang, J. W. Swan, B. D. Olsen // Biomacromolecules. – 2020. – V. 21. – Is. 8. – P. 3026–3037.

7. Boubeta F. M. Electrostatically driven protein adsorption: charge patches versus charge regulation / F. M. Boubeta, G.J.D.A.A. Soler-Illia, M. Tagliazucchi // Langmuir. – 2018. – V. 34. – Is. 51. – P. 15727–15738.

8. Grassmann G. Electrostatic complementarity at the interface drives transient protein-protein interactions / G. Grassmann, L. Di Rienzo, G. Gosti, M. Leonetti, G. Ruocco, M. Miotto, E. Milanetti // Sci. Rep. – 2023. – V. 13. – Is. 1. – № 10207.

9. Burstein E. A. Fluorescence and the location of tryptophan residues in protein molecules / E. A. Burstein, N. S. Vedenkina, M. N. Ivkova // Photochem. Photobiol. – 1973. – V. 18. – Is. 4. – P. 263–279.

10. Yammine A. Tryptophan fluorescence quenching assays for measuring protein-ligand binding affinities: principles and a practical guide / A. Yammine, J. Gao, A. H. Kwan // Bio-protocol. – 2019. – V. 9. – № 11. – P. e3253–e3253.

11. Лакович Дж. Основы флуоресцентной спектроскопии / Дж. Лакович. – М.: Мир, 1986. – 496 с.

12. Carabadjac I. Time-resolved fluorescence of tryptophan in biophysical chemistry and pharmaceutical research - the pleasures and nightmares dealing with nature's own fluorophore / I. Carabadjac, H. Heerklotz // Q. Rev. Biophys. – 2025. – V. 58. – Is. e18. – P. 1–22.

13. Nemtseva E. V. Similarity of decay-associated spectra for tryptophan fluorescence of proteins with different structures / E. V. Nemtseva, O. O. Lashchuk, M. A. Gerasimova // Biophysics. – 2016. – V. 61. – P. 193–199.

14. Albani J. R. Origin of tryptophan fluorescence lifetimes. Part 2: fluorescence lifetimes origin of tryptophan in proteins / J. R. Albani // J. Fluoresc. – 2014. – V. 24. – Is. 1. – P. 105–117.

15. Žoldák G. The fluorescence intensities ratio is not a reliable parameter for evaluation of protein unfolding transitions / G. Žoldák, D. Jancura, E. Sedlák // Protein Sci. – 2017. – V. 26. – Is. 6. – P. 1236–1239.

16. Yang Y. 4-Cyanotryptophan as a sensitive fluorescence probe of local electric field of proteins / Y. Yang, R. Feng, F. Gai // J. Phys. Chem. B. – 2023. – V. 127. – № 2. – P. 514–519.

17. Asamoah O. K. A fluorometric approach to local electric field measurements in a voltage-gated ion channel / O. K. Asamoah, J. P. Wuskell, L. M. Loew, F. Bezanilla // Neuron. – 2003. – V. 37. – № 1. – P. 85–98.

18. Otosu T. Local pH at the surface of hen egg white lysozyme / T. Otosu, K. Kobayashi, S. Yamaguchi // Chem. Phys. Lett. – 2018. – V. 693. – P. 165–169.

19. Lisitsa A. E. The role of cosolvent–water interactions in effects of the media on functionality of enzymes: a case study of Photobacterium leiognathi luciferase / A. E. Lisitsa [et al.] // Life. – 2023. – V. 13. – № 6. – P. 1384.

20. Tiessen A. Mathematical modeling and comparison of protein size distribution in different plant, animal, fungal and microbial species reveals a negative correlation between protein size and protein number, thus providing insight into the evolution of proteomes / A. Tiessen, P. Pérez-Rodríguez, L. J. Delaye-Arredondo // BMC Res. Notes. – 2012. – V. 5. – № 1. – P. 85.

21. Surzhikova D. P. Local optical probing of proteins of various sizes and charges with FITC label / D. P. Surzhikova, E. V. Nemtseva, L. A. Sukovatyi, A. V. Borgoyakova, E. A. Slyusareva // Biophys. Chem. – 2025. – V. 325. – P. 107488.

22. Krishnamurthy V. M. Carbonic anhydrase as a model for biophysical and physical-organic studies of proteins and protein–ligand binding / V. M. Krishnamurthy [et al.] // Chem. Rev. – 2008. – V. 108. – Is. 3. – P. 946–1051.

23. Lang D. Bacterial luciferase of Vibrio harveyi MAV: purification, characterization and crystallization / D. Lang, H. Erdmann, R. D. Schmid // Enzyme Microb. Technol. – 1992. – V. 14. – Is. 6. – P. 479–485.

24. Aravind U. K. Transport studies of BSA, lysozyme and ovalbumin through chitosan/polystyrene sulfonate multilayer membrane / U. K. Aravind, J. Mathew, C. T. Aravindakumar // J. Membr. Sci. – 2007. – V. 299. – Is. 1–2. – P. 146–155.

25. Togashi D. M. Investigating tryptophan quenching of fluorescein fluorescence under protolytic equilibrium / D. M. Togashi, B. Szczupak, A. G. Ryder, A. Calvet, M. O'Loughlin // J. Phys. Chem. A. – 2009. – V. 113. – Is. 12. – P. 2757–67.

26. Liu B. A Photostable pH-Invariant fluorescein derivative for single-molecule microscopy / B. Liu, S. Fletcher, M. Avadisian, P. T. Gunning, C. C. Gradinaru // J. Fluoresc. – 2009. – V. 19. – P. 915–920.

27. Estrada E. V. Diffusive intracellular interactions: On the role of protein net charge and functional adaptation / E. V. Estrada, N. Zhang, H. Wennerström, J. Danielsson, M. Oliveberg // Curr. Opin. Struct. Biol. – 2023. – V. 81. – P. 102625.

28. Kiraga J. The relationships between the isoelectric point and: length of proteins, taxonomy and ecology of organisms / J. Kiraga, P. Mackiewicz, D. Mackiewicz, M. Kowalczuk, P. Biecek, N. Polak, K. Smolarczyk, M. R. Dudek, S. Cebrat // BMC Genomics. – 2007. – V. 8. – P. 163.

29. Surzhikova D. P. Functioning of a fluorescein pH-probe in aqueous media: impact of temperature and viscosity / D. P. Surzhikova, L. A. Sukovatyi, E. V. Nemtseva, E. N. Esimbekova, E. A. Slyusareva // Micromachines. – 2023. – V. 14. – Is. 7. – P. 1442.



Слюсарева Евгения Алексеевна, доктор физико-математических наук по научной специальности 01.04.05 «Оптика». В 1993 году окончила Красноярский государственный университет по специальности «физика». Работает в Сибирском федеральном университете профессором базовой кафедры фотоники и лазерных технологий. Читает лекционные курсы «Оптика», «Спектроскопия атомов и молекул», руководит научной работой аспирантов и магистрантов. Под ее руководством защищены две кандидатские диссертации по специальности 1.3.6. «Оптика». Область научных интересов: биофотоника, оптическая спектроскопия, флуоресцентное зондирование. Руководитель грантов РФФИ, РНФ, госзадания Министерства науки и высшего образования РФ. Автор более десяти учебно-методических работ, 150 научных работ, в том числе одной монографии. Является лауреатом государственной премии Красноярского края в области профессионального образования, награждена почётной грамотой Министерства науки и высшего образования РФ.



Суржикова Дарья Павловна, кандидат физико-математических наук по научной специальности 1.3.6. «Оптика». В 2021 окончила Сибирский федеральный университет по направлению 16.04.01 «Техническая физика». Работает в Сибирском федеральном университете старшим преподавателем на базовой кафедре фотоники и лазерных технологий. Область научных интересов: оптическая спектроскопия, флуоресцентное зондирование. Исполнитель грантов РФФИ, РНФ, госзадания Министерства науки и высшего образования РФ. Автор более 30 научных работ. Является лауреатом государственной премии Красноярского края в области профессионального образования в номинации «Аспиранты».

Научное издание

Слюсарева Евгения Алексеевна
Суржикова Дарья Павловна

Флуоресцеин: от метки к зонду

Монография

Корректор *О. А. Гильфанова*
Верстка *Ю. Н. Сафонкина*
Главный редактор *В. М. Коровин*

Издательство «Наукоемкие технологии»
ООО «Корпорация «Интел Групп»
https://publishing.intelgr.com
E-mail: publishing@intelgr.com
Тел.: +7 (812) 945-50-63
Интернет-магазин издательства
https://shop.intelgr.com/

Подписано в печать 02.07.2026.
Формат 60×84/16
Объем 7,5 п.л.
Тираж 500 экз.

ISBN 978-5-00271-145-1

