

УДК 544.4+541.182

КИНЕТИКА ЩЕЛОЧНОГО ГИДРОЛИЗА ДИЛАУРИЛФЛУОРЕСЦЕИНА В ВОДНО-ЭТАНОЛЬНОЙ СМЕСИ И МИЦЕЛЛЯРНОМ РАСТВОРЕ ЦЕТИЛТРИМЕТИЛАММОНИЙ БРОМИДА

Т. А. Чейпеш, Ю. В. Таранец, Н. О. Мчедлов-Петросян

Спектрофотометрическим методом определены константы скорости двух последовательных реакций гидролиза дилаурилфлуоресцеина в смеси вода – этанол (50% масс.) и мицеллярном растворе цетилтриметиламмоний бромида (ЦТАБ). В обеих системах скорость гидролиза второй сложноэфирной группы превышает скорость гидролиза первой приблизительно в 4 раза, что можно объяснить значительной стабилизацией лактонной нейтральной структуры индикатора в неводных средах.

Ключевые слова: дилаурилфлуоресцеин, щелочной гидролиз, константа скорости, мицеллы ЦТАБ, диэфир.

Гидролиз сложных диэфиров флуоресцеина, в частности, диацетилфлуоресцеина, часто применяется при исследовании активности ферментов в биологических средах [1–3] или организованных растворах [4,5], а также при оценке активности микроорганизмов в различных природных объектах [6–9].

Реакции неферментативного гидролиза производных флуоресцеина изучались реже, однако можно предположить, что их скорость значительно зависит от микроокружения красителя. Помимо диэлектрических и реологических свойств среды, в случае организованных растворов важную роль играет концентрация гидроксильных ионов в области локализации индикатора, которая может существенно отличаться от соответствующего значения этой величины в объемной фазе [10–13]. Поэтому применение подобных реакций как инструмента для выявления особенностей различных наноразмерных агрегатов, например, мицелл поверхностно-активных веществ, может оказаться весьма полезным.

Для исследования кинетики реакций этого типа чаще всего регистрируют изменение оптических свойств индикаторов. Действительно, гидролиз сложноэфирных групп, расположенных в хромофорной ксантеновой части красителей, приводит к значительным изменениям их спектральных свойств, что позволяет проследить ход реакции.

Для сравнения активности ферментов в различных образцах часто оказывается удобным и достаточным зафиксировать степень превращения диэфира в конечный продукт, флуоресцеин, применяя, например, метод Шнюрера и Россваля [14]. При этом через определенный промежуток времени после начала реакции реакцию замедляют добавлением ацетона и измеряют поглощение при длине волны 490 нм, соответствующей максимуму спектра дианиона флуоресцеина в водных растворах. Данный подход реализован, например, при исследовании почв в работах Тейлора [6] и Грина [7] или с небольшими модификациями в работах других авторов [9,15]. Для этих целей также можно контролировать интенсивность флуоресценции дианиона флуоресцеина [16].

Другие исследователи фиксировали зависимость интенсивности флуоресценции от времени, которая имеет линейный характер в случае как ферментативного, так и неферментативного гидролиза [17–19].

Следует подчеркнуть, что во всех упомянутых выше работах гидролиз диэфиров флуоресцеина рассматривается как одностадийный процесс. Однако, учитывая наличие двух сложноэфирных групп, необходимо рассматривать реакцию как совокупность двух последовательных стадий [20–22] (здесь **R** – ацильная группа):



Так как эксперимент в большинстве случаев проводится в условиях избытка щелочи или в буферном растворе, то убылью концентрации OH^- в ходе реакции можно пренебречь и представить процесс как последовательные реакции псевдопервого порядка [20,21]. В этом случае

константы скорости реакций псевдопервого порядка будут связаны с истинными константами скорости следующим соотношением:

$$k'_i = k_i c_{\text{OH}^-} \quad (1)$$

В этом случае текущие концентрации (в мольных долях от общей концентрации красителя, α_i) частиц – участников реакции в каждый момент времени, t , можно выразить в виде уравнений (2–4) [23]:

$$\alpha_{\text{R}_2\text{FI}} = \frac{[\text{R}_2\text{FI}]}{c_{\text{R}_2\text{FI}}^0} = e^{-k'_1 t} \quad (2)$$

$$\alpha_{\text{RFI}^-} = \frac{[\text{RFI}^-]}{c_{\text{R}_2\text{FI}}^0} = \frac{k'_1}{k'_2 - k'_1} (e^{-k'_1 t} - e^{-k'_2 t}) \quad (3)$$

$$\alpha_{\text{FI}^{2-}} = \frac{[\text{FI}^{2-}]}{c_{\text{R}_2\text{FI}}^0} = 1 - \frac{k'_2}{k'_2 - k'_1} e^{-k'_1 t} + \frac{k'_1}{k'_2 - k'_1} e^{-k'_2 t} \quad (4)$$

Здесь $c_{\text{R}_2\text{FI}}^0$ – исходная концентрация красителя, в квадратных скобках даны текущие концентрации соответствующих частиц.

Ранее были предприняты попытки определить значения k'_1 и k'_2 для гидролиза диацетилфлуоресцеина в водных растворах. Так, Зонтаг определял эти значения, исходя из зависимости интенсивности флуоресценции при 516 нм от времени, т.е. контролируя лишь образование ярко флуоресцирующего дианиона FI^{2-} [20]. Расчет двух значений констант скорости, исходя лишь из одной кинетической кривой, может быть источником значительных неопределенностей при недостаточном количестве измерений.

Гофман и Зернец [22] предложили другой метод определения k'_1 и k'_2 , основанный на изменении интенсивности флуоресценции в растворах диацетата и моноацетата флуоресцеина в присутствии фосфатных буферных растворов. При этом уменьшение длины волны возбуждения ($\lambda_{\text{ex}} = 365$ нм) позволило авторам изучить гидролиз по первой ступени, в условиях, когда флуоресценция дианиона флуоресцеина пренебрежимо мала. В этой работе также отмечено, что неферментативный гидролиз является реакцией первого порядка. Определение же k'_2 было затруднено, вследствие быстрого гидролиза моноацетата флуоресцеина и невозможности получить раствор этого вещества без примеси интенсивно флуоресцирующего флуоресцеина.

Перспективным для отдельного определения констант скорости гидролиза может оказаться метод электронной спектроскопии. В ходе реакции в хромофорной части красителя происходят значительные структурные изменения, следовательно, спектры поглощения разных форм значительно различаются (рисунок 1). В самом деле, растворы диэфиров флуоресцеина в условиях эксперимента существуют в форме лактона, который не поглощает свет в видимой области. Для дианиона флуоресцеина характерна интенсивная полоса поглощения с максимумом в области 490 – 500 нм. Так как в ходе реакции промежуточная форма – моноэфир флуоресцеина – образуется в небольшом количестве, то получить в чистом виде спектр этой частицы не представляется возможным. Однако можно предположить, что ее полоса поглощения совпадает со спектром моноанионов метоксифлуоресцеина или флуоресцеина, которые имеют сходное строение хромофорной ксантеновой части красителя и могут быть измерены экспериментально. Можно допустить, что моноанионная форма существует также в виде бесцветного лактона. Однако доказательств его существования в водных растворах для метоксифлуоресцеина и флуоресцеина нами найдено не было. Результаты подробного исследования этой проблемы будут опубликованы в следующей работе.

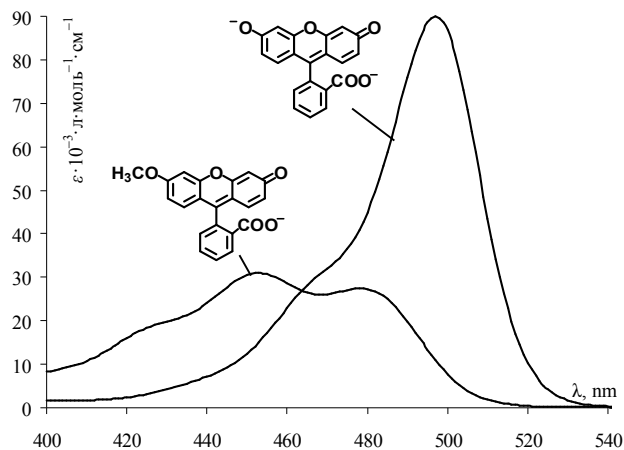
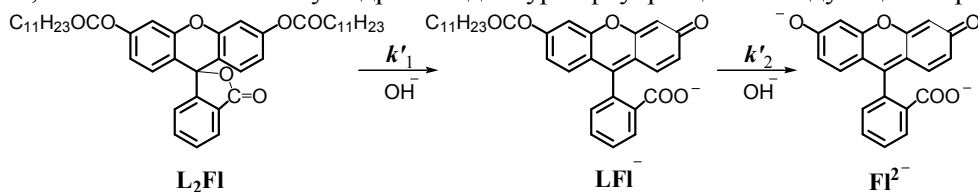


Рисунок 1. Спектры поглощения дианиона флуоресцеина и моноаниона метоксифлуоресцеина в смеси вода – этанол (50 % масс.).

В данной работе спектрофотометрический метод был применен для исследования кинетики гидролиза дилаурилфлуоресцеина как в истинных (водно-этанольных), так и мицеллярных растворах. Выбор водно-этанольного растворителя был обусловлен высокой гидрофобностью дилаурилфлуоресцеина и, как следствие, его низкой растворимостью в водных растворах с одной стороны и необходимостью создания микроокружения зонда, подобного мицеллярному, с другой.

Дилаурилфлуоресцеин является гидрофобным соединением и полностью связывается мицеллярной псевдофазой в водных растворах. Это обстоятельство позволяет рассматривать этот индикатор в качестве перспективного зонда для исследования различных мицеллоподобных агрегатов. Учитывая отсутствие лактонной структуры моноаниона и бесцветность молекулярной формы, можно записать схему гидролиза дилаурилфлуоресцеина следующим образом:



Как видно из рисунка 1, имеется диапазон длин волн, в котором два спектра частиц FI^{2-} и LFI^- практически не перекрываются. Это обстоятельство можно использовать для оценки значений k'_1 и k'_2 отдельно. Предположим также, что скорость внутримолекулярной перегруппировки, которая приводит к превращению лактонной структуры LFI^- в карбоксилатную, очень высока.

Экспериментальная часть

Измерения оптического поглощения проводились при помощи спектрофотометра Hitachi U-2000, оснащенного термостатируемым кюветным отделением. Для измерения ЭДС цепи с переносом со стеклянным электродом компенсационным методом использовали потенциометр постоянного тока П 37-1, класс точности 0.01, и рН-метр милливольтметр рН-121 в качестве нуля-инструмента. Калибровка электрода проводилась по стандартным буферным растворам (рН 9.18; 6.86; 4.01; 1.68) Для термостатирования рабочих растворов использовали водяной ультратермостат УТ-15 с точностью термостатирования $\pm 0.05^\circ\text{C}$.

Исходный раствор дилаурилфлуоресцеина в ацетоне смешивали с этанолом (96% об.) или раствором ЦТАБ, выдерживали 15 – 20 мин для установления рабочей температуры и добавляли боратный буферный раствор, предварительно нагретый до той же температуры. Время добавления буферного раствора считали временем начала реакции. В рабочем растворе объемная доля ацетона не превышала 1 – 2 %. Кислотность раствора определяли потенциометрически.

Концентрации индикатора рабочем растворе составляли $(5 - 10) \cdot 10^{-6}$ моль/л. Концентрации ЦТАБ и индикатора выбирались таким образом, чтобы концентрация мицелл вдвое превышала концентрацию субстрата.

При исследовании фиксировали зависимости оптического поглощения рабочего раствора от времени при одной длине волны, либо получали полный спектр раствора. Время измерения спектра составляло 29 с, учет которого незначительно изменял результаты расчета. Эксперимент проводили в условиях термостатирования при 25 °С.

Результаты и обсуждение

Располагая набором спектров поглощения растворов дилаурилфлуоресцеина в щелочной среде, измеренных через разные промежутки времени от начала реакции, с учетом бесцветности дилаурилфлуоресцеина, можно рассчитать текущие концентрации всех форм по уравнениям:

$$\frac{A_{\lambda_i} \varepsilon_{\lambda_i, \text{FI}^{2-}}}{A_{\lambda_i, \infty}} = \alpha_{\text{LFI}^-} \varepsilon_{\lambda_i, \text{LFI}^-} + \alpha_{\text{FI}^{2-}} \varepsilon_{\lambda_i, \text{FI}^{2-}} \quad (5)$$

$$\alpha_{\text{L}_2\text{FI}} + \alpha_{\text{LFI}^-} + \alpha_{\text{FI}^{2-}} = 1 \quad (6)$$

где A_{λ_i} и $A_{\lambda_i, \infty}$ – светопоглощение при i -й длине волны в данный момент времени и в условиях полного превращения красителя в дианион соответственно, ε_{λ_i} – коэффициент молярного поглощения соответствующей частицы при той же длине волны, которые были получены экспериментально для частицы FI^{2-} и смоделированы спектром метоксифлуоресцеина или моноаниона флуоресцеина для частицы LFI^- . Далее, исходя из зависимостей мольных долей трех частиц от времени, по уравнениям (2 – 4), можно рассчитать константы скорости реакций псевдопервого порядка.

Анализируя серии спектров поглощения в процессе протекания реакции при нормировании спектров к поглощению в области максимума поглощения (рисунок 2), можно увидеть, что соотношение поглощения при длинах волн 500 и 440 нм изменяется с течением времени, что подтверждает образование обнаружимого количества промежуточного аниона LFI^- в ходе реакции. Об этом также свидетельствует наличие максимума на зависимости поглощения при 430 нм от времени (рисунок 3).

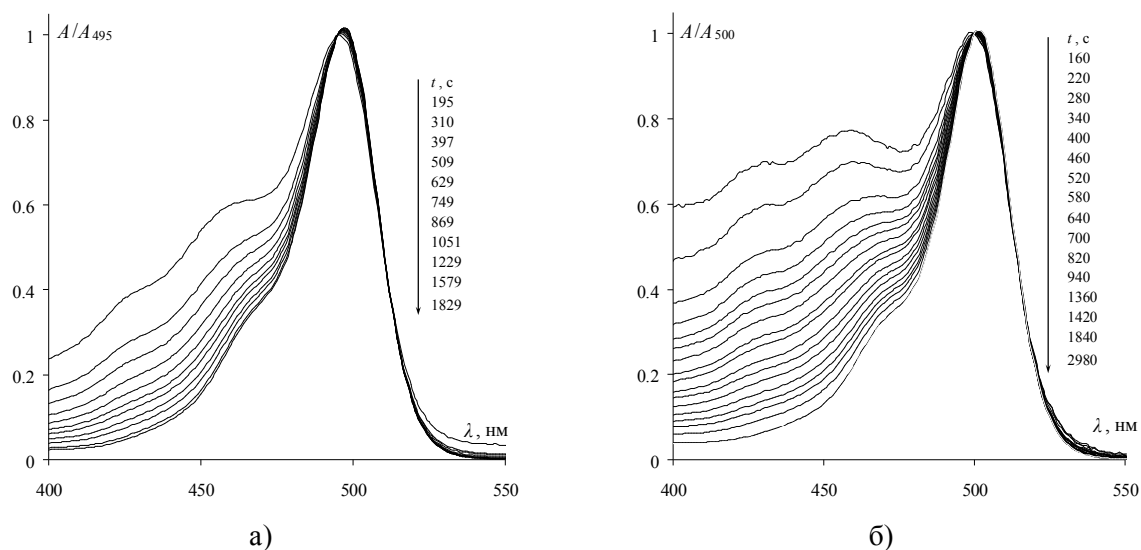


Рисунок 2. Нормированные спектры поглощения раствора дилаурилфлуоресцеина в ходе реакции гидролиза в боратном буферном растворе в смеси вода – этанол (50 % масс., $\text{pH} = 10.8$) (а) и растворе цетилтриметиламмоний бромидом ($c = 3 \cdot 10^{-3}$ моль/л, $\text{pH} = 9.0$) (б). На рисунке t – время от начала реакции.

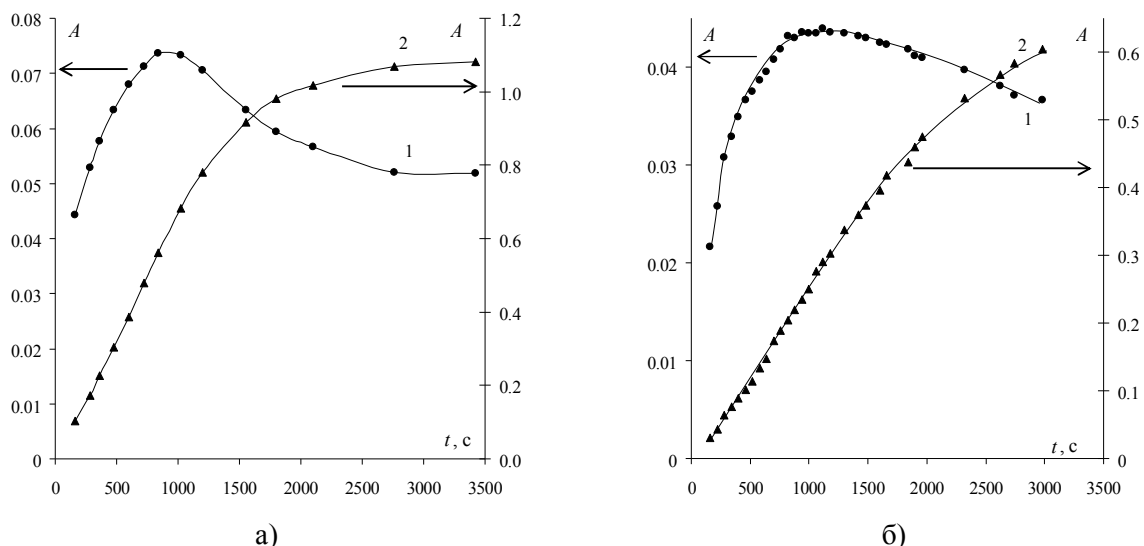


Рисунок 3. Зависимость светопоглощения раствора дилаурилфлуоресцеина в смеси вода – этанол (50 % масс.) (а) и растворе цетилтриметиламмоний бромида ($c = 3 \cdot 10^{-3}$ моль/л) (б) от времени при 430 нм (1) и 500 нм (2).

В результате расчетов получены зависимости мольных долей трех частиц от времени (рисунок 4). Положение максимума кривой (2) зависит от значений k'_1 и k'_2 [23]:

$$t_{\max} = \frac{\ln k'_2 - \ln k'_1}{k'_2 - k'_1} \quad (7)$$

$$\alpha_{\text{LFI}^-}_{\max} = \left(\frac{k'_2}{k'_1} \right)^{\frac{k'_2/k'_1}{1-k'_2/k'_1}} \quad (8)$$

О справедливости сделанных допущений и расчетов свидетельствует линейный характер зависимости логарифма доли дилаурилфлуоресцеина от времени, который можно прогнозировать, исходя из уравнения (2). Исходя из данной зависимости, можно рассчитать значение k'_1 . Аналогично была исследована кинетика гидролиза в мицеллярной среде ЦТАБ в водных растворах дилаурилфлуоресцеина (рисунки 2–4).

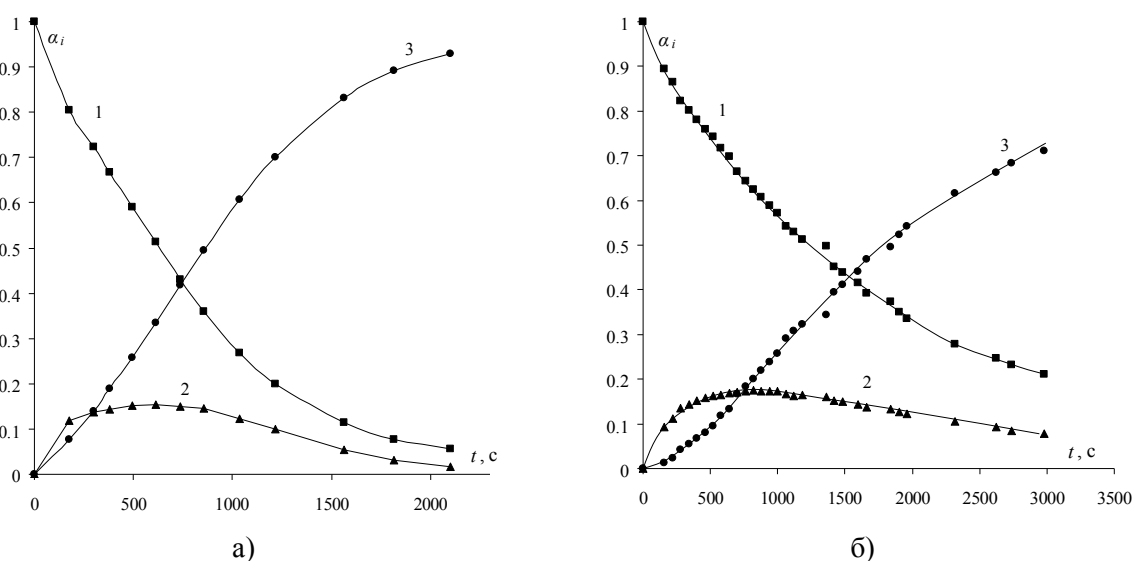


Рисунок 4. Зависимость мольной доли дилаурилфлуоресцеина L_2FI (1), аниона монолаурилфлуоресцеина LFI^- (2) и дианиона флуоресцеина FI^{2-} (3) от времени в процессе реакции щелочного гидролиза в смеси вода – этанол (50 % масс.) (а) и растворе цетилтриметиламмоний бромида ($c = 3 \cdot 10^{-3}$ моль/л) (б)

Таблица 1. Константы щелочного гидролиза дилаурилфлуоресцеина в различных средах.

Среда	$k'_1, \text{с}^{-1}$	$k'_2, \text{с}^{-1}$	k'_2 / k'_1
Смесь вода – этанол (50 % масс.) $p\alpha_{\text{H}^+}^* = 10.6$	$1.3 \cdot 10^{-3}$	$5.6 \cdot 10^{-3}$	4.3
Мицеллярный раствор ЦТАБ pH = 9.0	$5.5 \cdot 10^{-4}$	$2.0 \cdot 10^{-3}$	3.6

Как видно из таблицы 1, гидролиз по второй ступени в водно-этанольной среде проходит быстрее, чем по первой. Для субстрата, локализованного в слое Штерна мицелл ЦТАБ, данная тенденция сохраняется. Качественно это согласуется с полученными ранее результатами для гидролиза диацетилфлуоресцеина в водных растворах в присутствии фосфатного буфера, однако в этом случае скорость гидролиза по второй ступени лишь в 1.5 раза превышает скорость гидролиза по первой ($k'_1 = 1.5 \cdot 10^{-4} \text{с}^{-1}$, $k'_2 = 2.5 \cdot 10^{-4} \text{с}^{-1}$ при pH = 7) [22].

Такое ускорение второй ступени гидролиза, по сравнению с первой, кажется странным, если учесть, что в результате гидролиза по первой ступени образуется отрицательно заряженная частица, и взаимодействие с гидроксид-ионом должно быть затруднено. Действительно, в литературе описаны методы получения моноэфиров дикарбоновых кислот, в том числе и янтарной, при гидролизе соответствующих диэфиров с выходом 70 % и более [24,25]. Также в качестве примера можно привести омыление диметилфталата в водной среде, для которого значение k'_1 превышает k'_2 по меньшей мере в 10 раз [26,27].

Наблюдаемое поведение субстрата можно объяснить стабилизацией нейтральной лактонной формы, которая хорошо выражена в неполярной или малополярной неводной среде. Так, с уменьшением полярности растворителя доля нейтрального лактонного таутомера увеличивается, по сравнению с хиноидным, что затрудняет депротонирование моноаниона. В конечном счете, это приводит в некоторых случаях к инверсии констант ступенчатой диссоциации [28]. В данном случае хорошо прослеживается аналогия между протолитическими равновесиями и кинетикой гидролиза производных флуоресцеина.

Литература

1. Li X., Higashikubo R., Taylor J.-S. Use of multiple carboxylates to increase intracellular retention of fluorescent probes following release from cell penetrating fluorogenic conjugates // *Bioconjug. Chem.* – 2008. – Vol. 19. – № 1. – P. 50–56.
2. Swisher R., Carroll G.C. Fluorescein diacetate as an estimator of microbial biomass on coniferous needle surfaces // *Microb. Ecol.* – 1980. – Vol. 6. – № 3. – P. 217–226.
3. Sontag W. Changes of fluoresceindiacetate hydrolysis and transport in mammalian cells after ultra-violet and gamma irradiation // *Radiat. Environ. Biophys.* – 1977. – Vol. 14. – № 1. – P. 13–20.
4. Малеваний С.В., Водолазкая Н.А., Мчедлов-Петросян Н.О., Орлов В.Д. Стабилизация холинэстеразы в мицеллярной среде цвиттерионного поверхностно-активного вещества // *Доп. НАН України.* – 2003. – № 1. – С. 145–148.
5. Малеваний С.В., Водолазкая Н.А., Мчедлов-Петросян Н.О., Орлов В.Д. Диацетилфлуоресцеин как флуорогенный субстрат холинэстеразы // *Вісник ХНУ.* – 2000. – № 495, вип. 6 (29). – С. 34–39.
6. Taylor J.P., Wilson B., Mills M.S., Burns R.G. Comparison of microbial numbers and enzymatic activities in surface soils and subsoils using various techniques // *Soil Biol. Biochem.* – 2002. – Vol. 34. – № 3. – P. 387–401.
7. Green V.S., Stott D.E., Diack M. Assay for fluorescein diacetate hydrolytic activity: Optimization for soil samples // *Soil Biol. Biochem.* – 2006. – Vol. 38. – № 4. – P. 693–701.
8. Battin T.J. Assessment of fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total esterase activity in natural stream sediment biofilms // *Sci. Total Environ.* 1997. Vol. 198, № 1. P. 51–60.
9. Adam G., Duncan H. Development of a sensitive and rapid method for the measurement of total microbial activity using fluorescein diacetate (FDA) in a range of soils // *Soil Biol. Biochem.* – 2001. – Vol. 33. – № 7-8. – P. 943–951.

10. Blaskó A., Taylor J.P., Wilson B., Mills M.S. Burns R.G. Micellar rate effects on reactions of hydroxide ion with phosphate and thiophosphinate esters // *J. Phys. Org. Chem.* – 1991. – Vol. 4. – № 10. – P. 618–628.
11. Bunton C.A. Micellar rate effects: assumptions and approximations // *Arkivoc.* – 2011 (vii). – P. 490–504.
12. Mchedlov-Petrosyan N.O. Protolytic equilibrium in lyophilic nanosized dispersions: Differentiating influence of the pseudophase and salt effects // *Pure Appl. Chem.* – 2008. – Vol. 80. – № 7. – P. 1459–1510.
13. Bunton C.A., Nome F., Quina F.H. Romsted L.S. Ion binding and reactivity at charged aqueous interfaces // *Acc. Chem. Res.* – 1991. – Vol. 24. – № 12. – P. 357–364.
14. Schnürer J., Rosswall T. Fluorescein Diacetate Hydrolysis as a measure of total microbial activity in soil and litter // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1982. – Vol. 43. – № 6. – P. 1256–1261.
15. Breeuwer P., Drocourt J.-L., Bunschoten N., Zwietering M.H., Rombouts F.M., Abee T. Characterization of uptake and hydrolysis of fluorescein diacetate and carboxyfluorescein diacetate by intracellular esterases in *Saccharomyces cerevisiae*, which result in accumulation of fluorescent product. // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1995. – Vol. 61. – № 4. – P. 1614–1619.
16. Vitecek J., Petrova J., Adam V. Havel L., Kramer K.J., Babula P., Kizek R.A. A fluorimetric sensor for detection of one living cell // *Sensors.* – 2007. – Vol. 7. – № 3. – P. 222–238.
17. Ge F.-Y., Chen L.-G., Zhou X.-L., Pan H.-Y., Yan F.-Y. Bai G.-Y. Yan X.-L. Synthesis and study on hydrolytic properties of fluorescein esters // *Dyes and Pigments* – 2007. – Vol. 72. – № 3. – P. 322–326.
18. Eshghi H., Mirzaie N., Asoodeh A. Synthesis of fluorescein aromatic esters in the presence of P_2O_5/SiO_2 as catalyst and their hydrolysis studies in the presence of lipase // *Dyes and Pigments* – 2011. – Vol. 89. – № 2. – P. 120–126.
19. Rotman B., Papermaster B.W. Membrane properties of living mammalian cells as studied by enzymatic hydrolysis of fluorogenic esters // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 1966. – Vol. 55. – № 1. – P. 134–141.
20. Sontag W. A Comparative kinetic study on the conversion of fluoresceindiacetate to fluorescein in living cells and in vitro // *Radiat. Environ. Biophys.* – 1977. – Vol. 14. – № 1. – P. 1–12.
21. Anzo K., Harada M., Okada T. Enhanced kinetics of pseudo first-order hydrolysis in liquid phase coexistent with ice // *J. Phys. Chem. A.* – 2013. – Vol. 117. – № 41. – P. 10619–10625.
22. Hofmann J., Sernetz M. A Kinetic study on the enzymatic hydrolysis of fluoresceindiacetate and fluorescein-di- β -D-galactopyranoside // *Anal. Biochem.* – 1983. – Vol. 131. – № 1. – P. 180–186.
23. Эмануэль Н.М., Кнорре Д.Г. Курс химической кинетики. – М: Высш. шк., 1984. – С. 251 – 254.
24. Niwayama S. Highly efficient selective monohydrolysis of symmetric diesters // *J. Org. Chem.* – 2000. – Vol. 65. – № 18. – P. 5834–5836.
25. Niwayama S., Wang H., Hiraga Y., Clayton J.C. Influence of co-solvents in the highly efficient selective monohydrolysis of a symmetric diester // *Tetrahedron Lett.* – 2007. – Vol. 48. – № 48. – P. 8508–8510.
26. Bahram M. Mean centering of ratio spectra as a new method for determination of rate constants of consecutive reactions. // *Anal. Chim. Acta.* – 2007. – Vol. 603. – № 1. – P. 13–19.
27. Tjahjono M., Huiheng Ch., Widjaja E., Sa-ei K., Garland M. Combined on-line transmission FTIR measurements and BTEM analysis for the kinetic study of a consecutive reaction in aqueous-organic phase medium // *Talanta.* – 2009. – Vol. 79. – № 3. – P. 856–862.
28. Mchedlov-Petrosyan N.O., Mayorga R.S. Extraordinary character of the solvent influence on protolytic equilibria: inversion of the fluorescein ionization constants in H_2O -DMSO mixtures // *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* – 1992. – Vol. 88. – № 20. – P. 3025–3032.

References

1. Li X., Higashikubo R., Taylor J.-S. Use of multiple carboxylates to increase intracellular retention of fluorescent probes following release from cell penetrating fluorogenic conjugates // *Bioconjug. Chem.* – 2008. – Vol. 19. – № 1. – P. 50–56.

2. Swisher R., Carroll G.C. Fluorescein diacetate as an estimator of microbial biomass on coniferous needle surfaces // *Microb. Ecol.* – 1980. – Vol. 6. – № 3. – P. 217–226.
3. Sontag W. Changes of fluoresceindiacetate hydrolysis and transport in mammalian cells after ultra-violet and gamma irradiation // *Radiat. Environ. Biophys.* – 1977. – Vol. 14. – № 1. – P. 13–20.
4. Maljovany S.V., Vodolazkaya N.A., Mchedlov-Petrossyan N.O., Orlov V.D. Stabilizaciya holinesterazy' v micellyarnoy srede cvitterionnogo poverhnostno-aktivnogo vesch'estva // *Dop. NAN Ukrainy.* – 2003. – № 1. – P. 145–148 [in Russian].
5. Maljovany S.V., Vodolazkaya N.A., Mchedlov-Petrossyan N.O., Orlov V.D. Diacetylfluorescein kak fluorogenny'y substrat holinesterazy' // *Visn. Hark. nac. univ., № 495, Ser. Him., issue 6(29), P. 34–39* [in Russian].
6. Taylor J.P., Wilson B., Mills M.S., Burns R.G. Comparison of microbial numbers and enzymatic activities in surface soils and subsoils using various techniques // *Soil Biol. Biochem.* – 2002. – Vol. 34. – № 3. – P. 387–401.
7. Green V.S., Stott D.E., Diack M. Assay for fluorescein diacetate hydrolytic activity: Optimization for soil samples // *Soil Biol. Biochem.* – 2006. – Vol. 38. – № 4. – P. 693–701.
8. Battin T.J. Assessment of fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total esterase activity in natural stream sediment biofilms // *Sci. Total Environ.* – 1997. – Vol. 198. – № 1. – P. 51–60.
9. Adam G., Duncan H. Development of a sensitive and rapid method for the measurement of total microbial activity using fluorescein diacetate (FDA) in a range of soils // *Soil Biol. Biochem.* – 2001. – Vol. 33. – № 7-8. – P. 943–951.
10. Blaskó A., Taylor J.P., Wilson B., Mills M.S., Burns R.G. Micellar rate effects on reactions of hydroxide ion with phosphate and thiophosphinate esters // *J. Phys. Org. Chem.* – 1991. – Vol. 4. – № 10. – P. 618–628.
11. Bunton C.A. Micellar rate effects: assumptions and approximations // *Arkivoc.* – 2011 (vii). – P. 490–504.
12. Mchedlov-Petrossyan N.O. Protolytic equilibrium in lyophilic nanosized dispersions: Differentiating influence of the pseudophase and salt effects // *Pure Appl. Chem.* – 2008. – Vol. 80. – № 7. – P. 1459–1510.
13. Bunton C.A., Nome F., Quina F.H., Romsted L.S. Ion binding and reactivity at charged aqueous interfaces // *Acc. Chem. Res.* – 1991. – Vol. 24. – № 12. – P. 357–364.
14. Schnürer J., Rosswall T. Fluorescein Diacetate Hydrolysis as a measure of total microbial activity in soil and litter // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1982. – Vol. 43. – № 6. – P. 1256–1261.
15. Breeuwer P., Drocourt J.-L., Bunschoten N., Zwietering M.H., Rombouts F.M., Abee T. Characterization of uptake and hydrolysis of fluorescein diacetate and carboxyfluorescein diacetate by intracellular esterases in *Saccharomyces cerevisiae*, which result in accumulation of fluorescent product. // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1995. – Vol. 61. – № 4. – P. 1614–1619.
16. Vitecek J., Petrlova J., Adam V., Havel L., Kramer K.J., Babula P., Kizek R.A. A fluorimetric sensor for detection of one living cell // *Sensors.* – 2007. – Vol. 7. – № 3. – P. 222–238.
17. Ge F.-Y., Chen L.-G., Zhou X.-L., Pan H.-Y., Yan F.-Y., Bai G.-Y., Yan X.-L. Synthesis and study on hydrolytic properties of fluorescein esters // *Dyes and Pigments* – 2007. – Vol. 72. – № 3. – P. 322–326.
18. Eshghi H., Mirzaie N., Asoodeh A. Synthesis of fluorescein aromatic esters in the presence of P₂O₅/SiO₂ as catalyst and their hydrolysis studies in the presence of lipase // *Dyes and Pigments* – 2011. – Vol. 89. – № 2. – P. 120–126.
19. Rotman B., Papermaster B.W. Membrane properties of living mammalian cells as studied by enzymatic hydrolysis of fluorogenic esters // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 1966. – Vol. 55. – № 1. – P. 134–141.
20. Sontag W. A Comparative kinetic study on the conversion of fluoresceindiacetate to fluorescein in living cells and in vitro // *Radiat. Environ. Biophys.* – 1977. – Vol. 14. – № 1. – P. 1–12.
21. Anzo K., Harada M., Okada T. Enhanced kinetics of pseudo first-order hydrolysis in liquid phase coexistent with ice // *J. Phys. Chem. A.* – 2013. – Vol. 117. – № 41. – P. 10619–10625.
22. Hofmann J., Sernetz M. A Kinetic study on the enzymatic hydrolysis of fluoresceindiacetate and fluorescein-di-β-D-galactopyranoside // *Anal. Biochem.* – 1983. – Vol. 131. – № 1. – P. 180–186.

23. Emanuel N. M., Knorre D. G. Kurs himicheskoy kinetiki. – Moskow: Vy'sshaya shkola, 1984. – P. 251 – 254 [in Russian].
24. Niwayama S. Highly efficient selective monohydrolysis of symmetric diesters // J. Org. Chem. – 2000. – Vol. 65. – № 18. – P. 5834–5836.
25. Niwayama S., Wang H., Hiraga Y., Clayton J.C. Influence of co-solvents in the highly efficient selective monohydrolysis of a symmetric diester // Tetrahedron Lett. – 2007. – Vol. 48. – № 48. – P. 8508–8510.
26. Bahram M. Mean centering of ratio spectra as a new method for determination of rate constants of consecutive reactions. // Anal. Chim. Acta. – 2007. – Vol. 603. – № 1. – P. 13–19.
27. Tjahjono M., Huiheng Ch., Widjaja E., Sa-ei K., Garland M. Combined on-line transmission FTIR measurements and BTEM analysis for the kinetic study of a consecutive reaction in aqueous-organic phase medium // Talanta. – 2009. – Vol. 79. – № 3. – P. 856–862.
28. Mchedlov-Petrosyan N.O., Mayorga R.S. Extraordinary character of the solvent influence on protolytic equilibria: inversion of the fluorescein ionization constants in H₂O-DMSO mixtures // J. Chem. Soc., Faraday Trans. – 1992. – Vol. 88. – № 20. – P. 3025–3032.

Поступила в редакцию 11 мая 2014 г.

Т. О. Чейпеш, Ю. В. Таранец, М. О. Мчедлов-Петросьян. Кинетика лужного гідролізу дилаурилфлуоресцеїну в водно-етанольній суміші та мицелярному розчині цетилтриметиламоній броміду.

Спектрофотометричним методом визначені константи швидкості двох послідовних реакцій гідролізу дилаурилфлуоресцеїну в суміші вода – етанол (50% мас.) та мицелярному розчині цетилтриметиламоній броміду (ЦТАБ). В обох системах швидкість гідролізу другої естерної групи перевищує швидкість гідролізу першої приблизно у 4 рази, що можна пояснити значною стабілізацією лактонної нейтральної форми індикатора в малополярних середовищах.

Ключові слова: дилаурилфлуоресцеїн, гідроліз, константа швидкості, мицели ЦТАБ, діестер.

T. A. Cheipesh, Yu. V. Taranets, N. O. Mchedlov–Petrosyan. Kinetics of alkaline hydrolysis of dilaurylfluorescein in aqueous ethanol and micellar solution of cetyltrimethylammonium bromide.

The rate constants of two consecutive reactions of dilaurylfluorescein hydrolysis in the aqueous ethanol (50% wt.) and cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) micellar solutions were determined by spectrophotometrical method. In both systems, the rate of hydrolysis of the second ester group exceeds the rate of hydrolysis of the first one ca. in 4-fold, due to the significant stabilization of the neutral lactone form of indicator in low-polar media.

Key words: dilauryl fluorescein, hydrolysis, rate constant, CTAB micelles, diester.

Kharkov University Bulletin. 2014. № 1123. Chemical Series. Issue 23 (46).