

УДК 543.42.062+544.77+547.633.6

ПРОТОЛИТИЧЕСКИЕ РАВНОВЕСИЯ И СПЕКТРАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ФЛУОРЕСЦЕИНИЗОТИОЦИАНАТА В РАЗЛИЧНЫХ ЖИДКИХ СРЕДАХ**Н. А. Водолазкая**

В работе изучены протолитические равновесия флуоресцеинизотиоцианата в водных растворах бутирилхолинэстеразы и в 50%-ной (по массе) смеси вода-этанол. Рассчитаны значения pK_a ступенчатой диссоциации красителя в изученных жидких средах. Получены спектральные характеристики предельных форм индикатора и сделаны выводы о характере таутомерии флуоресцеинизотиоцианата.

Ключевые слова: флуоресцеинизотиоцианат, водно-этанольная смесь, протолитическое равновесие, константа диссоциации, спектры поглощения.

В последние годы производное флуоресцеина – флуоресцеинизотиоцианат (ФИТЦ) (рис. 1) – находит широкое применение в биохимии, благодаря его ценным оптическим свойствам, а также возможности осуществления ковалентной привязки флуорофора к биомолекулам через группу NCS.

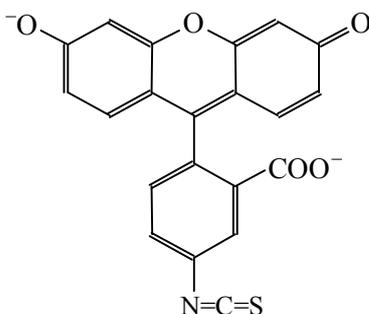


Рисунок 1. Структурная формула дианиона (R^{2-}) флуоресцеинизотиоцианата, изомер I.

Например, имеется ряд работ [1–5], в которых ФИТЦ прививают к молекуле белка, а затем по люминесценции метчика судят о путях распространения антител в организме. Появились также работы, в которых по тушению флуоресценции ФИТЦ определяют активность белка холинэстеразы в плазме крови [6–8]. Однако во всех вышеуказанных работах количественные характеристики кислотно-основных равновесий флуоресцеинизотиоцианата в растворах биомолекул, как и в других жидких средах, определены не были. Ранее нами исследованы протолитические равновесия ФИТЦ в воде и в мицеллах цетилпиридиний хлорида [9].

Поэтому цель настоящего исследования состояла в определении значений pK_a флуоресцеинизотиоцианата в водных растворах бутирилхолинэстеразы при ее концентрации 1 г/л, а также в 50%-ной (по массе) смеси вода-этанол ($\epsilon = 49$ [10]), которая позволяет увеличить растворимость нейтральных форм флуоресцеиновых красителей и улучшить разрешение полос поглощения моно- и дианионов, в то же время сопоставить полученные данные с параметрами протолитических равновесий ФИТЦ в катионных мицеллах [9], благодаря близкой полярности этих сред.

Экспериментальная часть

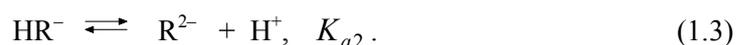
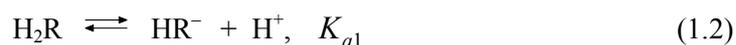
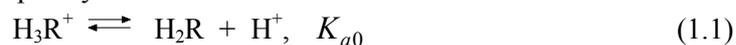
Нами использован препарат флуоресцеинизотиоцианата (изомер I) фирмы Sigma (98% основного вещества), любезно предоставленного проф. Г.П. Горбенко. Препарат бутирилхолинэстеразы (сыворотки крови лошади), предоставленный нам С.В. Малеваным, ранее уже использовался в проводимых на кафедре исследованиях [11].

Хлорид натрия, фосфорная, уксусная и хлороводородная кислоты были квалификации ХЧ; тетраборат натрия перекристаллизовывали из воды при температуре 60 °С, затем сушили на воздухе. Ацетон перегоняли, после чего подвергали осушке прокаленным поташом. Затем растворитель снова перегоняли, собирая фракцию с $t_{кип.}$ 56 – 56.5 °С. При исследовании свойств ФИТЦ в водно-этанольной смеси с массовой долей спирта 50% (мольная доля 0.28) количество вносимого этилового спирта уточняли весовым методом. Растворы с содержанием этилового спирта готовились из 96%-ного азеотропа высокой чистоты; отсутствие альдегидов контролировали по ультрафиолетовым спектрам. Для приготовления буферных растворов использовался раствор NaOH, защищенный от CO₂. Значения pH ($pa_{H^+}^*$) варьировали при помощи боратных, фосфатных и ацетатных буферных растворов, а также растворов HCl и NaOH. Ионная сила во всех системах составляла 0.05 М (NaCl + компоненты буферного раствора или HCl). Кислотность варьировали от pH = 12 до 3 М HCl, при pH < 1.3 ионная сила превышала значение 0.05 М. Рабочие растворы готовили объемным методом путем отбора аликвот исходных растворов при термостатировании (25.0±0.1 °С). Спектры поглощения измеряли на приборе СФ-46 в 1- и 5-сантиметровых кюветах. Исходные растворы красителя готовили в воде, в ацетоне и в 96%-ном этаноле для исследования в соответствующих средах.

Значения pH ($pa_{H^+}^*$) определяли при 25 °С с помощью стеклянного электрода в цепи с переносом, градуированной по стандартным буферным растворам (1.68, 4.01, 6.86, 9.18). В водно-этанольной смеси использовалась шкала $pa_{H^+}^*$ ($pa_{H^+}^* = -\lg a_{H^+}^*$); здесь $a_{H^+}^* = (H^+)$ – активность ионов лиония, стандартизованная с использованием представлений о гипотетическом растворе в данном растворителе с активностью ионов лиония, равной единице, и со свойствами бесконечно разбавленного раствора. Значения $pa_{H^+}^*$ в смеси вода-этанол с массовой долей спирта 50% оценивали, внося поправку в инструментальное значение, $pH_{инстр}: pa_{H^+}^* = pH_{инстр} - 0.20$ [12].

Результаты и обсуждение

Диссоциация флуоресцеиновых индикаторов в растворах (за исключением экстремально кислых и щелочных сред) протекает в три ступени:



Значения pK_a , отвечающие данным равновесиям ступенчатой диссоциации красителя, были определены по стандартной спектрофотометрической методике с потенциометрическим контролем pH водной фазы [9]. Для описания кислотно-основных свойств ФИТЦ в растворах бутирилхолинэстеразы использовали так называемую «кажущуюся» константу диссоциации, K_a^a [9].

На схеме 1 приведены возможные структуры ФИТЦ в растворах.

Основное уравнение, связывающее поглощение A при текущем значении pH ($pa_{H^+}^*$) со значениями констант диссоциации и поглощением индивидуальных ионных и молекулярной форм при фиксированной длине волны λ , концентрации красителя C и толщине поглощающего слоя l , имеет следующий вид:

$$A = \frac{A_{H_3R^+} h^3 + A_{H_2R} h^2 K_{a0} + A_{HR^-} h K_{a0} K_{a1} + A_{R^{2-}} K_{a0} K_{a1} K_{a2}}{h^3 + h^2 K_{a0} + h K_{a0} K_{a1} + K_{a0} K_{a1} K_{a2}}, \quad (1.4)$$

где A – поглощение при соответствующем значении pH ($pa_{H^+}^*$); $A_{R^{2-}}$, A_{HR^-} , A_{H_2R} и $A_{H_3R^+}$ – поглощения в условиях полного превращения красителя в соответствующую форму; $h = 10^{-pH}$.

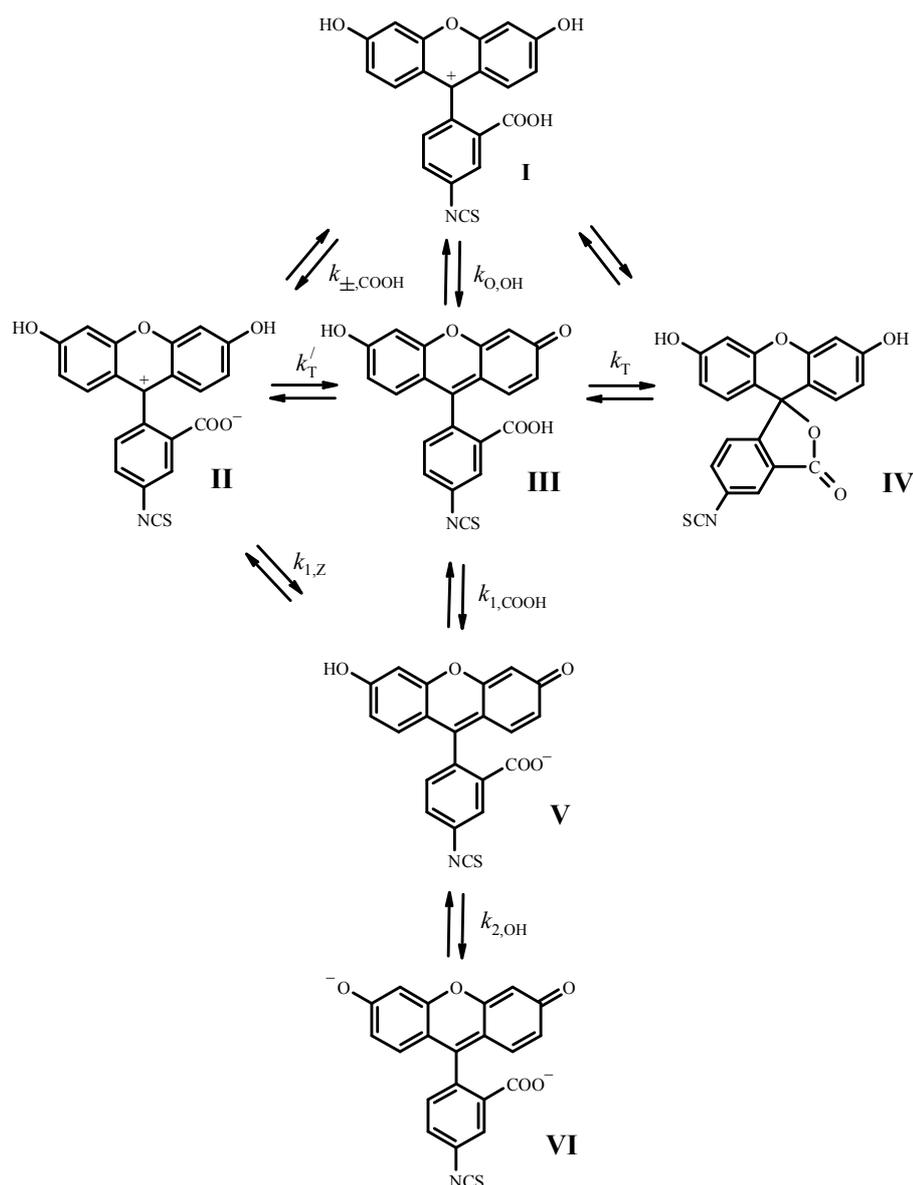


Схема 1. Возможные структуры (I–VI) ФИТЦ в растворах.

$$K_T = [IV]/[III]; K_T' = [II]/[III]; K_T'' = K_T / K_T' = [IV]/[II]; k_{\pm,COOH} = a_{H^+} a_{II} / a_I; k_{O,OH} = a_{H^+} a_{III} / a_I; \\ k_{1,Z} = a_{H^+} a_V / a_{II}; k_{1,COOH} = a_{H^+} a_V / a_{III}; k_{2,OH} = a_{H^+} a_{VI} / a_V.$$

При рассмотрении только двух равновесий 1.2 и 1.3 уравнение (1.4) упрощается и принимает следующий вид:

$$A = \frac{A_{H_2R} h K_{a1}^{-1} + A_{HR^-} + A_{R^{2-}} (h)^{-1} K_{a2}}{h K_{a1}^{-1} + 1 + (h)^{-1} K_{a2}}. \quad (1.5)$$

Спектры различных форм флуоресцеиновых красителей в смешанных или чистых растворителях измеряются непосредственно (H_3R^+ и R^{2-}) или уточняются путем последовательных приближений (H_2R и HR^-). В этом случае используются уравнения:

$$A_{HR^-} = A + (A - A_{H_2R}) h (K_{a1})^{-1} + (A - A_{R^{2-}}) (h)^{-1} K_{a2}; \quad (1.6)$$

$$A_{H_2R} = A + (A - A_{H_3R^+}) h (K_{a0})^{-1} + (A - A_{HR^-}) (h)^{-1} K_{a1} + (A - A_{R^{2-}}) h^{-2} K_{a1} K_{a2}. \quad (1.7)$$

Для расчетов значений pK_a использовались 16 растворов с переменными значениями pH в 3%-ном ацетоне, 24 раствора в системе вода-этанол (50% по массе) и 14 растворов в присутствии бутирилхолинэстеразы.

Зависимости поглощения от pH ($pa_{H^+}^*$) ФИТЦ в различных средах представлены на рисунках 2 и 3.

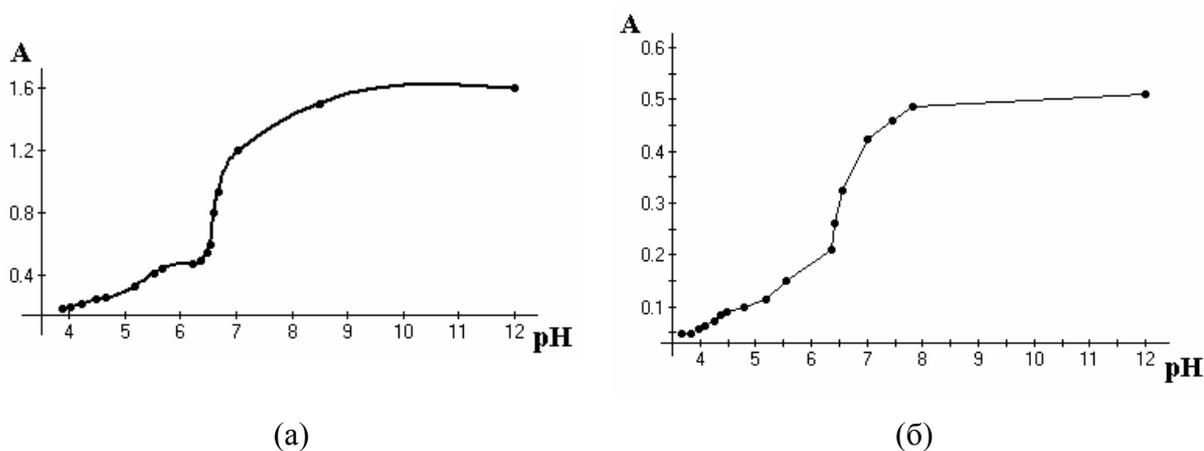


Рисунок 2. Зависимость поглощения от pH флуоресцеинизотиоцианата в растворах бутирилхолинэстеразы при $\lambda = 490$ нм (а) и в 3%-ном водном ацетоне при $\lambda = 495$ нм (б).

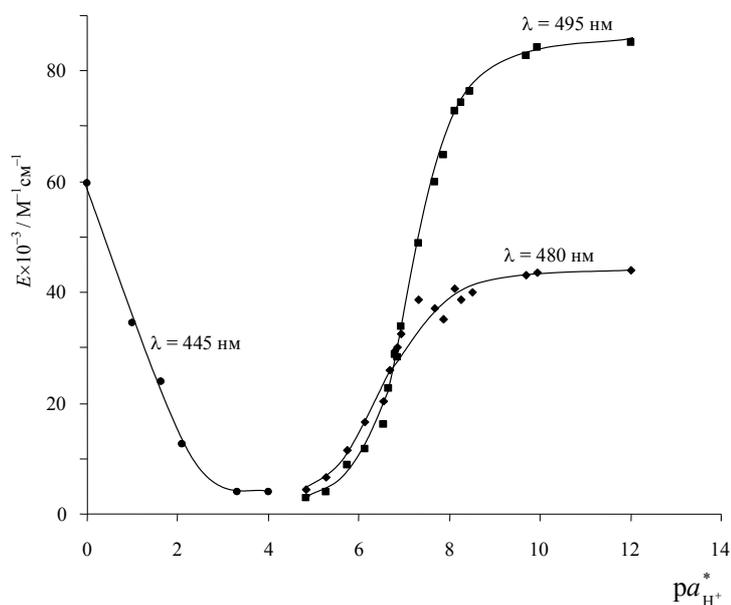


Рисунок 3. Зависимость молярного коэффициента поглощения флуоресцеинизотиоцианата от $pa_{H^+}^*$ в смеси вода-этанол с массовой долей спирта 50% при разных длинах волн.

Расчеты значений pK_a проводились с использованием компьютерной программы CLINP [13] при постоянных значениях концентрации ФИТЦ и длине поглощающего слоя на широком диапазоне длин волн на основании уравнения (1.5). Значения pK_{a0} , характеризующее равновесие 1.1 флуоресцеиновых красителей, рассчитывают изолированно по уравнению:

$$pK_{a0} = pH + \lg \frac{A_{H_2R} - A}{A - A_{H_3R^+}}, \quad (1.8)$$

где A – поглощение красителя при соответствующем значении pH ($pa_{H^+}^*$); A_{H_2R} , $A_{H_3R^+}$ – значения A при полном превращении красителя в форму H_2R и H_3R^+ . Для расчетов использовали растворы со значениями pH ($pa_{H^+}^*$) = 1.6–3.6 (HCl + NaCl).

О полном превращении красителя в форму H_3R^+ судят по совпадению спектров при варьировании кислотности растворов.

Полученные значения pK_a флуоресцеинизотиоцианата в различных жидких средах приведены в таблице 1.

Таблица 1. Значения pK_a флуоресцеинизотиоцианата в различных жидких средах ($I = 0.05$ М), 25°C

Система	pK_a		
	pK_{a0}	pK_{a1}	pK_{a2}
Вода [9]	2.05 ± 0.03	4.35 ± 0.02	6.62 ± 0.01
3%-ный водный ацетон	2.06 ± 0.03	4.40 ± 0.05	6.68 ± 0.10
50%-ный по массе водный этанол	1.34 ± 0.09	6.80 ± 0.08	7.63 ± 0.10
Раствор бутирилхолинэстеразы	1.83 ± 0.09	4.26 ± 0.11	6.79 ± 0.09
Катионные мицеллы цетилпиридиний хлорида ($C_{ПАВ} = 0.003$ М) [9]	1.36 ± 0.18	4.31 ± 0.01	6.00 ± 0.01

Из данных таблицы 1 видно, что значения показателей констант диссоциации ФИТЦ в растворах бутирилхолинэстеразы мало отличаются от таковых в воде. Следовательно, присоединение данного индикатора к молекуле фермента лишь незначительно сказывается на протолитических свойствах ФИТЦ. Полученные данные для красителя в 3%-ном водном ацетоне практически совпадают со значениями pK_a в воде, что говорит об отсутствии гидролиза тиоцианатной группы красителя.

При переходе от воды к смеси вода-этанол с массовой долей спирта 50% наблюдается снижение величины pK_{a0} и возрастание pK_{a1} и pK_{a2} индикаторов (табл. 1), что обусловлено типом заряда кислотно-основной пары [14] (+/0; 0/– и –/2– соответственно).

В таблице 2 даны спектральные характеристики сопряженных форм флуоресцеинизотиоцианата в различных жидких средах. На рисунке 4 приведены спектры поглощения сопряженных форм ФИТЦ в смеси вода-этанол с массовой долей спирта 50%.

Давно известно, что для флуоресцеина и его галогенпроизводных характерен заметный сдвиг положения равновесия нейтральной формы H_2R в сторону лактона, бесцветного вследствие sp^3 -гибридизации (структура IV, схема 1), при переходе от воды к водно-органическим смесям или мицеллярным средам [14]. Так, небольшое снижение значений E_{max} нейтральной формы ФИТЦ в растворах бутирилхолинэстеразы и в 3%-ном водном ацетоне по сравнению с водным раствором (таблица 2) связано с увеличением доли лактонного таутомера IV. В водно-этанольной среде наблюдается резкое снижение интенсивности поглощения света ФИТЦ при переходе от катионной и анионной форм к нейтральной (табл. 2, рис. 4). Это указывает на образование бесцветных лактонных молекулярных структур в этой среде вследствие дефицита во-

дородных связей по сравнению с водой [14]. Характерным для изученной смеси вода-этанол является также исчезновение цвиттер-иона (структура II) из равновесной смеси таутомеров как для флуоресцеина [14], так и для ФИТЦ (табл. 2). Этот факт находит объяснение с учетом типов зарядов [14]. Цвиттер-ион для этих соединений наблюдается лишь в водных растворах или водно-органических смесях с высоким содержанием воды [14], например, как в 3%-ном водном ацетоне или в растворе бутирилхолинэстеразы (табл. 2).

Таблица 2. Спектральные характеристики сопряженных форм флуоресцеинизотиоцианата в различных жидких средах, 25°C

Система	λ_{\max} , нм ($E_{\max} \cdot 10^{-3}, \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)			
	H_3R^+	H_2R	HR^-	R^{2-}
Вода [9]	441 (59.8)	435 (24.0); 475 (19.0)	455 (35.0); 475 (35.0)	488 (86.5)
3%-ный водный ацетон	435 (51.0)	445 (17.0); 485 (13.0)	455 (25.0); 485 (25.0)	495 (69.0)
50%-ный (по массе) водный этанол	445 (56.0)	440 (3.7); 480 (2.5)	490 (51.0)	494 (84.0)
Раствор бутирилхолинэстеразы	440 (62.9)	435 (15.2)	455 (25.0); 475 (25.0)	489 (84.8)
Катионные мицеллы цетилпиридиний хлорида ($C_{\text{ПАВ}} = 0.003 \text{ M}$) [9]	441 (54.0)	455-460 (3.0); 485 (2.5)	455-460 (32.0); 485 (29.0)	504 (82.0)

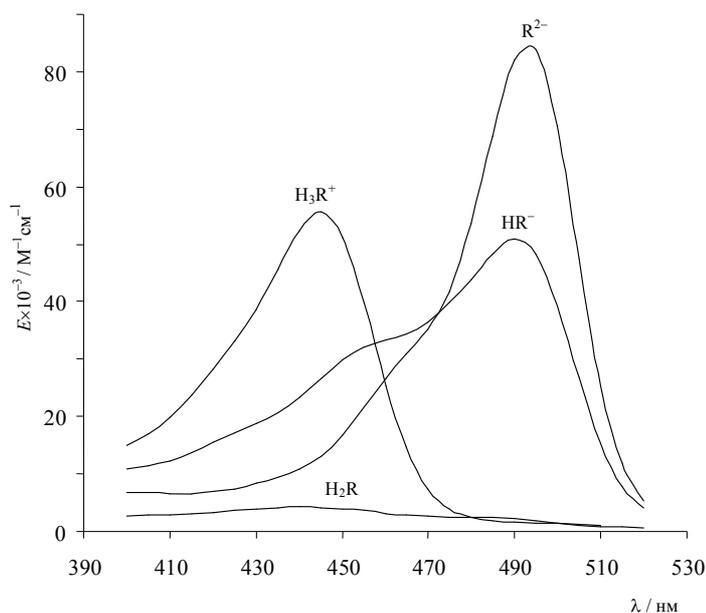


Рисунок 4. Спектры поглощения молекулярной и ионных форм флуоресцеинизотиоцианата в смеси вода-этанол с массовой долей спирта 50%.

Характер спектра моноаниона HR^- во всех изученных средах показывает, что моноанион существует в растворах в виде таутомера V (схема 1, табл. 2, рис. 4), так как не наблюдается bathochromic смещения полосы поглощения HR^- относительно полосы R^{2-} , характерного для таутомера моноаниона с протонированной карбоксильной группой ($\text{COO}^- \rightarrow \text{COOH}$) [14]. Такой характер таутомерии присущ и флуоресцеину в растворах [14].

Таким образом, присоединение молекулы флуоресцеинизотиоцианата к молекуле бутирилхолинэстеразы не приводит к заметным изменениям протолитических свойств красителя.

В ходе исследования ступенчатой диссоциации флуоресцеинизотиоцианата в растворах бутирилхолинэстеразы реально существуют следующие частицы (схема 1):



в смеси вода-этанол с массовой долей спирта 50% –



Благодарность

Автор выражает благодарность кандидату химических наук Н.В. Саламановой за определение значений констант диссоциации индикатора в водных средах, содержащих бутирилхолинэстеразу, и в 3%-ном водном ацетоне, а также профессору Н.О. Мchedлов-Петросяну за плодотворное обсуждение результатов.

Литература

1. Красовицкий Б.М., Болотин Б.М. Органические люминофоры. – М.: Химия, 1984. – 336с.
2. Metallo S.J., Kane R.S., Holmlin R.E., Whitesides G.M. // J. Am. Chem. Soc. – 2003. – Vol. 125. – P. 4534-4540.
3. Gök E., Olgaz S. // J. Fluorescence. – 2004. – Vol. 14. – P. 203-206.
4. Kim T.H., Park T.G. // Int. J. Pharmaceutics. – 2004. – Vol. 271. – P.207-214.
5. Haugland R.P. Handbook of Fluorescent Probes and Research Products, 9th ed. – Eugen, OR: Molecular Probes, Inc., 2002. – 966 p.
6. Tsai H.C., Doong R.A. // Water Science and Technology. – 2000. – Vol.42. – P. 283-290.
7. Monteith D.K., Theiss J.R., Haskins J.R. // Archives of Toxicology. – 1998. – Vol.72. – P. 147-156.
8. Rogers K.R., Cao C.J., Valdes J.J., Eldefrawi A.T., Eldefrawi M.E. // Fundamental and Applied Toxicology. – 1991. – Vol.16. – P. 810-820.
9. Mchedlov-Petrossyan N.O., Isaenko Y.V., Vodolazkaya N.A., Goga S.T. // Вісник Харківського національного університету. – 2006. – № 731, Вип. 14 (37). – С. 188-194.
10. Мchedлов-Петросян Н.О. // Теоретические методы описания свойств растворов. – Иваново, 1987. – С. 93-103.
11. Малеваний С.В., Водолазкая Н.А., Мchedлов-Петросян Н.О., Орлов В.Д. // Доповіді Національної академії наук України. –2003. – №1. – С. 145–148.
12. Бейтс Р. Определение рН / Р. Бейтс. – Л.: Химия, 1972. – 400 с.
13. <http://www-chemo.univer.kharkov.ua/kholin/clinp.html>.
14. Мchedлов-Петросян Н.О. // Вестник Харьковского национального университета. Химия. – 2004. – № 626, Вып.11 (34). – С. 221-312.

References

1. Krasovitskiy B.M., Bolotin B.M. Organicheskie ljuminofory. M.: Chimija, 1984. – 336 s.
2. Metallo S.J., Kane R.S., Holmlin R.E., Whitesides G.M. // J. Am. Chem. Soc. – 2003. – Vol. 125. – P. 4534-4540.
3. Gök E., Olgaz S. // J. Fluorescence. – 2004. – Vol. 14. – P. 203-206.
4. Kim T.H., Park T.G. // Int. J. Pharmaceutics. – 2004. – Vol. 271. – P.207-214.
5. Haugland R.P. Handbook of Fluorescent Probes and Research Products, 9th ed. – Eugen, OR: Molecular Probes, Inc., 2002. – 966 p.
6. Tsai H.C., Doong R.A. // Water Science and Technology. – 2000. – Vol.42. – P. 283-290.
7. Monteith D.K., Theiss J.R., Haskins J.R. // Archives of Toxicology. – 1998. – Vol.72. – P. 147-156.
8. Rogers K.R., Cao C.J., Valdes J.J., Eldefrawi A.T., Eldefrawi M.E. // Fundamental and Applied Toxicology. – 1991. – Vol.16. – P. 810-820.
9. Mchedlov-Petrossyan N.O., Isaenko Y.V., Vodolazkaya N.A., Goga S.T. // Visnyk Kharkivs'kogo Natsional'nogo universytetu. – 2006. – № 731, Vyp. 14 (37). – S. 188-194.

10. Mchedlov-Petrossyan N.O. // Teoreticheskie metody opisaniia svojstv rastvorov. – Ivanovo, 1987. – S. 93-103.
11. Maljovany S.V., Vodolazkaya N.A., Mchedlov-Petrossyan N.O., Orlov V.D. // Dopovidi Natsional'noj akademii nauk. –2003. – №1. – S. 145–148.
12. Bejts R. Opredelenie pH. – L.: Chimija, 1972. – 400 s.
13. <http://www-chemo.univer.kharkov.ua/kholin/clinp.html>.
14. Mchedlov-Petrossyan N.O. // Visnyk Kharkivs'kogo Natsional'nogo universytetu. – 2004. – № 626, Вып. 11 (34). – С. 221-312.

Поступила в редакцию 25 декабря 2012 г.

Н. О. Водолазья. Протолітичні рівноваги та спектральні характеристики флуоресцеїнізотіоціанату у різних рідких середовищах.

У роботі вивчено протолітичні рівноваги флуоресцеїнізотіоціанату у водних розчинах бутирилхолінестерази та у 50%-ній (за масою) суміші вода-етанол. Розраховано значення pK_a ступінчастої дисоціації барвника у досліджених рідких середовищах. Одержано спектральні характеристики граничних форм індикатора та зроблено висновки щодо характеру таутомерії флуоресцеїнізотіоціанату.

Ключові слова: флуоресцеїнізотіоціанат, водно-етанольна суміш, протолітична рівновага, константа дисоціації, спектри поглинання.

N. A. Vodolazkaya. Protolytic equilibria and spectral characteristics of fluorescein isothiocyanate in different liquid media.

Protolytic equilibria of fluorescein isothiocyanate in butyrylcholin esterase solutions and in ethanol-water mixture (50% wt) have been studied. The pK_a values of stepwise dissociation of dye are calculated in investigated liquid media. Spectral characteristics of indicator conjugate forms have been obtained and conclusions were drawn regarding the nature of tautomerism of fluorescein isothiocyanate.

Key words: fluorescein isothiocyanate, water-ethanol mixture, protolytic equilibrium, dissociation constant, absorption spectra.

Kharkov University Bulletin. 2013. № 1085. Chemical Series. Issue 22 (45).