

УДК 544.363

НЕКОТОРЫЕ ПОДХОДЫ К ОБРАБОТКЕ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИХ ДАННЫХ. РАСЧЕТ СТУПЕНЧАТЫХ КОНСТАНТ ИОНИЗАЦИИ ТРЕХ- И ЧЕТЫРЕХОСНОВНЫХ ФЛУОРЕСЦЕИНОВЫХ КРАСИТЕЛЕЙ

Т. А. Чейпеш

Проанализирована возможность применения некоторых методов, включая разновидность метода факторного анализа, для расчета констант ионизации и спектров индивидуальных ионных форм трех- и четырехосновных красителей на примере флуоресцеина и 4' аминокфлуоресцеина.

Ключевые слова: константа ионизации, флуоресцеиновые красители, многоволновая спектрофотометрия, метод многофакторного разрешения кривых.

Многоосновные красители широко используются для исследования различных сред, в том числе и организованных растворов. Важным этапом решения некоторых задач является определение констант ионизации красителей, а также оптических характеристик их ионных форм. Очевидно, что для этих целей одним из наиболее удобных экспериментальных методов является метод многоволновой спектрофотометрии, который многократно и успешно применялся, например, в случае флуоресцеиновых красителей [1–6].

Большинство подходов, применяемых при обработке полученных спектрофотометрических данных, позволяют совместно рассчитать спектры ионных форм и константы ионизации красителей. Однако в некоторых случаях более целесообразно применение методов независимого разложения спектров смеси на составляющие, позволяющие оценить равновесный состав смеси без привлечения информации относительно кислотности среды. В последнем случае дальнейший расчет константы ионизации сводится к простейшим арифметическим действиям.

Для модифицированных флуоресцеинов, которые содержат дополнительную функциональную группу, способную участвовать в протолитических превращениях, процесс вычисления констант ионизации и спектров поглощения ионных форм красителей усложняется. Кроме дополнительной четвертой ступени ионизации, следует учесть сложную структуру спектров поглощения индивидуальных форм флуоресцеинов, наложение и низкую интенсивность некоторых из них, а также значительное сближение констант ионизации в неводных средах [2]. Указанные особенности существенно ограничивают набор методов, которые могут адекватно применяться для расчета констант ионизации и спектров поглощения ионных форм, недоступных непосредственному измерению.

В данной работе оценена целесообразность применения некоторых методов расчета констант ионизации и спектров отдельных ионных форм при обработке как модельных, так и экспериментально полученных спектрофотометрических данных для трех- и четырехосновного флуоресцеиновых красителей – флуоресцеина и 4'-аминокфлуоресцеина.

На начальном этапе методы тестировали с помощью модельных данных, полученных путем смешения спектров индивидуальных форм, исходя из известных констант ионизации, на которые были спроецированы указанные ранее особенности трех- и четырехосновных флуоресцеиновых красителей. Кроме того, путем внесения погрешностей, распределенных по закону Лапласа, была учтена возможность появления грубых промахов. При этом оценивалось различие между полученными оценками и исходными параметрами. Далее процедуры расчета были применены к реальным экспериментальным данным – водным растворам флуоресцеина и аминокфлуоресцеина.

Подготовка исследуемых данных

Брутто-схему ионизации флуоресцеина можно описать уравнениями 2 – 4. При наличии в молекуле флуоресцеина дополнительной аминогруппы появляется возможность образования двухзарядного катиона (уравнение 1).





Модельные данные представлены в виде матрицы \mathbf{X} размера $m \times n$, в которой объединены спектры m смесей индивидуальных форм трех- (**FI**) и четырехосновного (**AFI**) красителей переменного состава при n длинах волн. Матрицу \mathbf{X} генерировали, исходя из заданных значений оптического поглощения ионных форм и pK_a . При фиксированной длине волны поглощение раствора четырехосновного красителя вычисляли по уравнению (5). Для трехосновного красителя уравнение аналогично.

$$A = \frac{A_{\text{H}_4\text{R}^{2+}} h^4 + A_{\text{H}_3\text{R}^+} h^3 K_{a(-1)} + A_{\text{H}_2\text{R}} h^2 K_{a(-1)} K_{a0} + A_{\text{HR}^-} h K_{a(-1)} K_{a0} K_{a1} + A_{\text{R}^{2-}} K_{a(-1)} K_{a0} K_{a1} K_{a2}}{h^4 + h^3 K_{a(-1)} + h^2 K_{a(-1)} K_{a0} + h K_{a(-1)} K_{a0} K_{a1} + K_{a(-1)} K_{a0} K_{a1} K_{a2}} \quad (5)$$

где $A_{\text{H}_4\text{R}^{2+}}$, $A_{\text{H}_3\text{R}^+}$, $A_{\text{H}_2\text{R}}$, A_{HR^-} , $A_{\text{R}^{2-}}$ – поглощения соответствующих индивидуальных форм, $h=10^{-\text{pH}}$.

В качестве исходных спектров поглощения, вообще говоря, можно выбрать любые кривые, например, представляющие собой линейную комбинацию кривых Гаусса. Однако в данном случае, чтобы приблизить модельные данные к реальным исследуемым системам, использовали спектры индивидуальных форм флуоресцеина и 4'-аминофлуоресцеина (рисунок 1), полученные из экспериментальных данных с использованием программы CLINP [7].

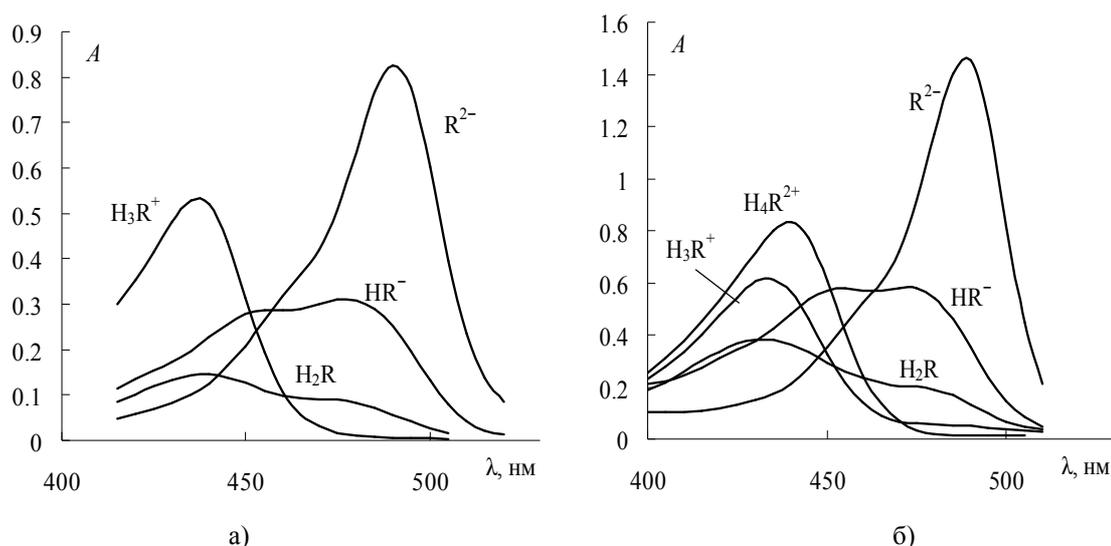


Рисунок 1. Исходные спектры поглощения трехосновного (а) и четырехосновного красителя (б), используемые для создания массива модельных данных

Значения pK_{a2} , pK_{a1} , pK_{a0} и $pK_{a(-1)}$ принимались равными 5.0, 4.5, 2.0 и 1.5 соответственно. Такие величины приблизительно отвечают экспериментальным значениям pK_a флуоресцеиновых красителей в водных и водно-органических средах [2]. В значения pH, а также в спектры поглощения методом обратной функции вносились погрешности, распределенные по нормальному закону (**G**) или по закону Лапласа (**L**), характеризующиеся нулевым средним, стандартным отклонением 0.01.

Экспериментальные данные, полученные совместно с проф. Н. А. Водолазкой и Е. С. Загорулько, представляли собой спектры поглощения серии из 23 и 27 растворов флуоресцеина в воде (**FI-Exp**) и аминофлуоресцеина в 50% (масс.) водном этаноле (**AFI-Exp**), измеренные при помощи спектрофотометра СФ-46 в диапазоне длин волн от 415 до 520 нм. Значения pH растворов (диапазон от 8.5 – 1.2) определяли в цепи с переносом со стеклянным электродом при постоянной ионной силе.

Результаты и обсуждение

Значения рассчитанных показателей констант ионизации красителей, а также их стандартные отклонения (в скобках) представлены в таблице 1. Для сравнения качества оценки разными методами констант и спектров ионных форм сравнивали значения поглощения, найденные из рассчитанных параметров $A_{i,calc}$, с исходными значениями $A_{i,obs}$, вычисляя величину χ^2 :

$$\chi^2 = \sum_i \frac{(A_{i,calc} - A_{i,obs})^2}{A_{i,obs}} \quad (6)$$

Расчет констант ионизации по методу Тамера – Фойгта [8] основан на анализе зависимостей поглощения от pH раствора, имеющих экстремум. Данный метод не требует применения специального программного обеспечения, не является итерационным и позволяет вычислить значения двух достаточно близких констант ионизации. Однако при сильном сближении констант ионизации флуоресцеинов или интенсивности полос поглощения ионных форм, когда экстремум зависимости $A = f(\text{pH})$ выражен слабо, использование этого метода может повлечь за собой значительные ошибки расчета. В исследуемых системах данный метод удалось применить лишь для расчета значений K_{a1} и K_{a2} красителей. При этом диссоциацию по уравнениям (3) и (4) предполагали независимой от диссоциации (1) и (2) и определяли положения максимумов 2 – 4 зависимостей при длине волны 430 – 450 нм. В случае флуоресцеина рассчитанное для изолированного равновесия (2) значение K_{a0} позволило вычесть вклад катиона H_3R^+ в поглощение нейтральной формы. Из рассчитанных констант ионизации вычисляли спектры моноаниона красителей.

Для определения спектров неизвестных форм, исходя лишь из спектров смесей переменного состава, в некоторых случаях прибегают к аппроксимации последних определенным набором кривых Гаусса [9]. В исследуемых системах, ввиду сложности полос поглощения, поставленная задача сводится к совместному определению 11 и 14 неизвестных параметров для трех и четырех равновесий соответственно, решить которую в данном контексте не представляется возможным. Лучшие результаты можно ожидать при применении группы методов, основанных на факторном анализе или методе главных компонент [3 – 6], которые также не требуют априорной информации о схеме ионных равновесий и о структуре спектров поглощения неизвестных форм.

На начальном этапе анализа с применением F-теста Малиновского [10, 11] было определено количество независимых компонент для каждой системы. Во всех случаях эта величина совпала с количеством ионных форм, предсказанных схемой диссоциации. Это подтверждает адекватность применения методов факторного анализа для данных красителей.

После линейного преобразования исходной матрицы \mathbf{X} можно получить совокупность ортонормированных базисных векторов – "матрицу нагрузок", а также "матрицу счетов", содержащую проекции данных на базисные векторы. При вращении базисных векторов элементы двух последних матриц приобретают физический смысл концентраций ионных форм и их спектров.

В работе был использован метод многофакторного разрешения кривых (multivariate curve resolution) с применением переменного метода наименьших квадратов (alternating least-squares) – MCR-ALS [12]. При расчетах для спектров поглощения и концентраций применялся алгоритм неотрицательных наименьших квадратов. Затем, зная спектры поглощения и мольные доли поглощающих частиц в смеси и используя значения pH для каждого раствора, рассчитывали константы ионизации и величину χ^2 .

В таблице 1 содержатся также оценки констант ионизации и спектров ионных форм, полученные с использованием программы CLINP [7]. Последний метод имеет преимущество перед остальными, так как его итерационная процедура предполагает одновременное определение всех искомых параметров. Это же является причиной значительного снижения значений χ^2 .

Таблица 1. Показатели констант ионизации красителей, рассчитанные с использованием разных подходов

| Исходные данные Метод | Трехосновный краситель | | | | | | Четырехосновный краситель | | | | | |
|-----------------------------|------------------------|----------|------------------------|----------|------------------------|----------|---------------------------|----------|------------------------|----------|------------------------|----------|
| | FI-G (14×19)* | | FI-L (14×19) | | FI-Exp** (20×19) | | AFI-G (21×19) | | AFI-L (21×19) | | AFI-Exp** (22×17) | |
| | pK_{ai} (σ) | χ^2 | pK_{ai} (σ) | χ^2 | pK_{ai} (σ) | χ^2 | pK_{ai} (σ) | χ^2 | pK_{ai} (σ) | χ^2 | pK_{ai} (σ) | χ^2 |
| Тамера – Фойгта | 5.29 (0.68) | 1.0 | 5.25 (0.56) | 0.84 | 6.47 (0.37) | 1.4 | 4.41 (0.21) | – | 4.37 (0.12) | – | 6.62 (0.25) | – |
| | 4.23 (0.68) | | 4.33 (0.56) | | 4.63 (0.37) | | 4.25 (0.21) | | 4.04 (0.12) | | 4.63 (0.25) | |
| | 2.00 (0.10) | | 2.06 (0.08) | | 1.88 (0.05) | | | | | | | |
| MCR-ALS | 4.91 (0.018) | 0.27 | 5.13 (0.012) | 0.24 | – | – | 4.54 (0.006) | 0.12 | 4.48 (0.006) | 0.18 | – | – |
| | 4.62 (0.027) | | 4.31 (0.020) | | | | 3.85 (0.014) | | 3.87 (0.012) | | | |
| | 2.05 (0.013) | | 2.21 (0.014) | | | | 2.67 (0.019) | | 2.33 (0.020) | | | |
| | | | 1.46 (0.015) | | | | 1.42 (0.019) | | | | | |
| CLINP | 4.72 (0.025) | 0.10 | 5.20 (0.022) | 0.060 | 6.69 (0.012) | 0.17 | 4.55 (0.011) | 0.071 | 4.47 (0.012) | 0.088 | 6.60 (0.010) | 0.12 |
| | 4.68 (0.048) | | 4.40 (0.032) | | 4.25 (0.022) | | 3.91 (0.025) | | 3.91 (0.027) | | 4.81 (0.11) | |
| | 1.98 (0.014) | | 2.07 (0.011) | | 2.14 (0.013) | | 1.97 (0.054) | | 2.05 (0.045) | | 3.50 (0.098) | |
| | | | | | | | 1.60 (0.041) | | 1.27 (0.073) | | 2.09 (0.026) | |

* В скобках в этой строке дан размер исходной матрицы X

**Экспериментальные данные

Полученные при обработке модельных данных показатели констант ионизации и спектры ионных форм можно сравнить с соответствующими исходными, "истинными" значениями. В спектрах поглощения наибольшие различия наблюдались в случае моноаниона HR^- красителей (рисунок 2).

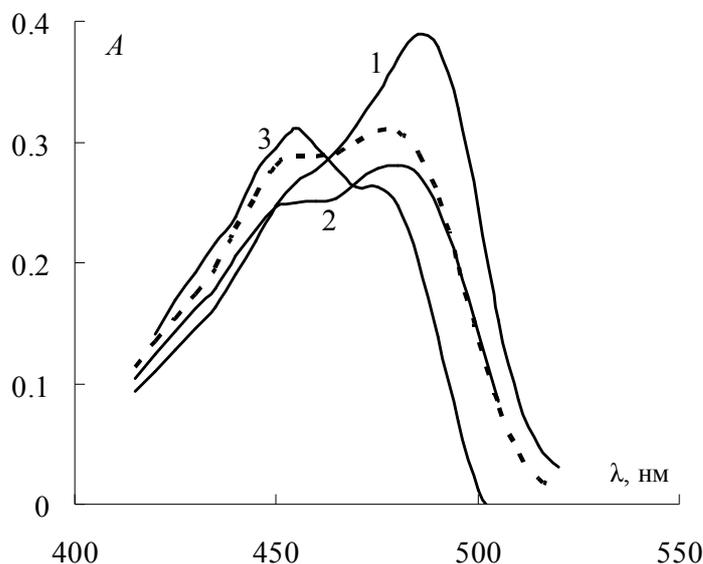


Рисунок 2. Спектры поглощения моноаниона флуоресцеина, рассчитанные из модельных данных FI-G по методу Тамера – Фойгта (1), MCR-ALS (2) и с помощью программы CLINP (3). Пунктирной линией обозначен исходный спектр.

Оценки pK_a по модельным данным, сделанные по методу Тамера – Фойгта, наиболее заметно отличаются от исходных значений. Это проявляется также в рассчитанных спектрах поглощения. Спектр поглощения моноаниона HR^- флуоресцеина, представленный кривой (1) на рисунке 2, отражает влияние примеси дианиона R^{2-} , для которого характерна интенсивная полоса с максимумом в области 490 нм. Аналогичные результаты дает расчет параметров для четырехосновного красителя. Оценки поглощения ионных форм по методу MCR-ALS удовлетворительно описывают модельные данные даже в случае четырехосновного красителя. Следует отметить, что различия между рассчитанными и исходными значениями pK_a приблизительно одинаковы для подходов MCR-ALS и CLINP. Однако первый лучше воспроизводит форму спектра.

В случае экспериментальных данных вполне ожидаемо, что матричный подход, реализованный в программе CLINP, дает лучшие оценки искомых параметров, по сравнению с методом Тамера – Фойгта, о чем можно судить, сопоставляя стандартные отклонения этих величин и значения χ^2 . Попытка применить MCR-ALS для экспериментальных данных была неудачной, ввиду расхождения итерационного процесса. В дальнейшем для решения этой проблемы предполагается использование методов, более эффективно обеспечивающих сходимость.

В заключение следует отметить, что метод многофакторного разрешения кривых, может быть весьма эффективным при обработке спектрофотометрических данных флуоресцеиновых красителей. В дальнейшем предполагается развитие данного подхода для эффективного его применения к различным экспериментальным данным.

Автор выражает благодарность проф. Н. О. Мчедлову-Петросяну за научную идею работы и ряд ценных замечаний.

Литература

1. Мчедлов-Петросян Н. О. Флуоресцеиновые красители в растворах – хорошо изученные системы? // Вісн. Харк. нац. унів. 2004. №626. Хімія. 11(34). С. 221.

2. Mchedlov-Petrosyan N. O., Kleshchevnikova V. N. Influence of the cetyltrimethylammonium chloride micellar pseudophase on the protolytic equilibria of oxyxanthene dyes at high bulk phase ionic strength // *J. Chem. Soc., Faraday Transactions*. 1994. 90(4). P. 629.
3. Aschi M., D'Archivio A. A., Fontana A., Formiglio A. Physicochemical properties of fluorescent probes: Experimental and computational determination of the overlapping pKa values of carboxylfluorescein // *J. Org. Chem.* 2008. 73. P. 3411.
4. Batistela V. R., Pellosi D. S., de Souza F. D., da Costa W. F., de Oliveira Santin S. M. de Souza V. R., Caetano W., de Oliveira H. P. M., Scarminio I. S., Hioka N. pKa determinations of xanthene derivatives in aqueous solutions by multivariate analysis applied to UV-Vis spectrophotometric data // *Spectrochim. Acta A*. 2011. 79. P. 889.
5. Niazi A., Yazdanipour A., Ghasemi J., Amini A., Bozorgzad S., Kubista M. Spectrophotometric investigation of the acidity constants of fluorescein in various water-organic solvent media // *Chem. Eng. Comm.* 2008. 195(10). P. 1257.
6. Gholivand M. B., Ghasemi J. B., Saaidpour S., Mohajeri A. Spectrophotometric study of the effects of surfactants and ethanol on the acidity constants of fluorescein // *Spectrochim. Acta A* 2008. 71(3) P.1158.
7. <http://www-chemo.univer.kharkov.ua/kholin/clinp.html>
8. Thamer B. J., Voigt A. F. The spectrophotometric determination of overlapping dissociation constants of dibasic acids. The acid constants of isophthalic, terephthalic and chloranilic acids // *J. Phys. Chem.* 1952. 56. P. 225.
9. Hu Y., Li W., Hu J. Resolving overlapped spectra with curve fitting // *Spectrochim. Acta A* 2005. 62. P. 16.
10. Practical guide to chemometrics (2nd ed.) / Ed. P. Gemperline. Boca Raton: Taylor & Francis Group, 2006, 520 p.
11. Malinowski, E.R., Statistical F-tests for abstract factor analysis and target testing // *J. Chemom.* 1988. 3. P. 49.
12. Jaumot J., Gargallo R., de Juan A., Tauler R. A graphical user-friendly interface for MCR-ALS: a new tool for multivariate curve resolution in MATLAB // *Chemometr. and Intell. Lab. Systems*. 2005. 76. P. 101.

References

1. Mchedlov-Petrosyan N. O. Fluoresceinovye krasiteli v rastvorah – horosho izuchenny'e sistemy? // *Visn. Hark. nac. univ.* 2004. № 626, Ser. Him., 11(34), P. 221. [in Russian].
2. Mchedlov-Petrosyan N. O., Kleshchevnikova V. N. Influence of the cetyltrimethylammonium chloride micellar pseudophase on the protolytic equilibria of oxyxanthene dyes at high bulk phase ionic strength // *J. Chem. Soc., Faraday Transactions*. 1994. 90(4). P. 629.
3. Aschi M., D'Archivio A. A., Fontana A., Formiglio A. Physicochemical properties of fluorescent probes: Experimental and computational determination of the overlapping pKa values of carboxylfluorescein // *J. Org. Chem.* 2008. 73. P. 3411.
4. Batistela V. R., Pellosi D. S., de Souza F. D., da Costa W. F., de Oliveira Santin S. M. de Souza V. R., Caetano W., de Oliveira H. P. M., Scarminio I. S., Hioka N. pKa determinations of xanthene derivatives in aqueous solutions by multivariate analysis applied to UV-Vis spectrophotometric data // *Spectrochim. Acta A*. 2011. 79. P. 889.
5. Niazi A., Yazdanipour A., Ghasemi J., Amini A., Bozorgzad S., Kubista M. Spectrophotometric investigation of the acidity constants of fluorescein in various water-organic solvent media // *Chem. Eng. Comm.* 2008. 195(10). P. 1257.
6. Gholivand M. B., Ghasemi J. B., Saaidpour S., Mohajeri A. Spectrophotometric study of the effects of surfactants and ethanol on the acidity constants of fluorescein // *Spectrochim. Acta A* 2008. 71(3) P.1158.
7. <http://www-chemo.univer.kharkov.ua/kholin/clinp.html>
8. Thamer B. J., Voigt A. F. The spectrophotometric determination of overlapping dissociation constants of dibasic acids. The acid constants of isophthalic, terephthalic and chloranilic acids // *J. Phys. Chem.* 1952. 56. P. 225.
9. Hu Y., Li W., Hu J. Resolving overlapped spectra with curve fitting // *Spectrochim. Acta A* 2005. 62. P. 16.

10. Practical guide to chemometrics (2nd ed.) / Ed. P. Gemperline. Boca Raton: Taylor & Francis Group, 2006, 520 p. ISBN 1-57444-783-1.
11. Malinowski, E.R., Statistical F-tests for abstract factor analysis and target testing // J. Chemom. 1988. 3. P. 49.
12. Jaumot J., Gargallo R., de Juan A., Tauler R. A graphical user-friendly interface for MCR-ALS: a new tool for multivariate curve resolution in MATLAB // Chemometr. and Intell. Lab. Systems. 2005. 76. P. 101.

Поступила в редакцию 17 октября 2013 г.

Т. О. Чейпеш. Деякі підходи до обробки спектрофотометричних даних. Розрахунок ступінчастих констант іонізації трьох- та чотирьохосновних флуоресцеїнових барвників.

Проаналізована можливість застосування деяких методів, включаючи різновид методу факторного аналізу, для розрахунку констант іонізації і спектрів індивідуальних форм трьох- та чотирьохосновних барвників на прикладі флуоресцеїну та 4' амінофлуоресцеїну.

Ключові слова: константа іонізації, флуоресцеїнові барвники, багатохвильова спектрофотометрія, метод багатфакторного розділення кривих.

T. A. Cheipesh. Some approaches to spectrophotometric data processing. Calculation of ionization constants of tribasic and tetrabasic fluorescein dyes.

The applicability of certain methods, including a variant of the factor analysis method, for computation of ionization constants and limiting ionic forms spectra of tribasic and tetrabasic dyes was analyzed on the example of fluorescein and 4' aminofluorescein.

Key words: ionization constant, fluorescein dyes, multiwavelength spectrophotometry, multivariate curve resolution.

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

Таблица 1. Показатели констант ионизации красителей, рассчитанные с использованием разных подходов

| Исходные данные Метод | Трехосновный краситель | | | | | | Четырехосновный краситель | | | | | |
|-----------------------------|------------------------|----------|------------------------|----------|------------------------|----------|---------------------------|----------|------------------------|----------|------------------------|----------|
| | FI-G (14×19)* | | FI-L (14×19) | | FI-Exp** (20×19) | | AFI-G (21×19) | | AFI-L (21×19) | | AFI-Exp** (22×17) | |
| | pK_{ai} (σ) | χ^2 | pK_{ai} (σ) | χ^2 | pK_{ai} (σ) | χ^2 | pK_{ai} (σ) | χ^2 | pK_{ai} (σ) | χ^2 | pK_{ai} (σ) | χ^2 |
| Тамера – Фойгта | 5.29 (0.68) | 1.0 | 5.25 (0.56) | 0.84 | 6.47 (0.37) | 1.4 | 4.41 (0.21) | – | 4.37 (0.12) | – | 6.62 (0.25) | – |
| | 4.23 (0.68) | | 4.33 (0.56) | | 4.63 (0.37) | | 4.25 (0.21) | | 4.04 (0.12) | | 4.63 (0.25) | |
| | 2.00 (0.10) | | 2.06 (0.08) | | 1.88 (0.05) | | | | | | | |
| MCR-ALS | 4.91 (0.018) | 0.27 | 5.13 (0.012) | 0.24 | – | – | 4.54 (0.006) | 0.12 | 4.48 (0.006) | 0.18 | – | – |
| | 4.62 (0.027) | | 4.31 (0.020) | | | | 3.85 (0.014) | | 3.87 (0.012) | | | |
| | 2.05 (0.013) | | 2.21 (0.014) | | | | 2.67 (0.019) | | 2.33 (0.020) | | | |
| | | | 1.46 (0.015) | | | | 1.42 (0.019) | | | | | |
| CLINP | 4.72 (0.025) | 0.10 | 5.20 (0.022) | 0.060 | 6.69 (0.012) | 0.17 | 4.55 (0.011) | 0.071 | 4.47 (0.012) | 0.088 | 6.60 (0.010) | 0.12 |
| | 4.68 (0.048) | | 4.40 (0.032) | | 4.25 (0.022) | | 3.91 (0.025) | | 3.91 (0.027) | | 4.81 (0.11) | |
| | 1.98 (0.014) | | 2.07 (0.011) | | 2.14 (0.013) | | 1.97 (0.054) | | 2.05 (0.045) | | 3.50 (0.098) | |
| | | | | | | | 1.60 (0.041) | | 1.27 (0.073) | | 2.09 (0.026) | |

* В скобках в этой строке дан размер исходной матрицы X

**Экспериментальные данные