

УДК 543.426

## ВЛИЯНИЕ ФОСФАТ-ИОНОВ НА ДИАНИОН-АНИОННОЕ РАВНОВЕСИЕ ФЛЮОРЕСЦЕИНА В ВОЗБУЖДЕННОМ СОСТОЯНИИ

© 2022 г. Д. П. Суржикова<sup>1</sup>, \*, М. А. Герасимова<sup>1</sup>, Е. А. Слюсарева<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования “Сибирский федеральный университет”, Красноярск, Россия

\*E-mail: darya19578@yandex.ru

Поступила в редакцию 01.06.2022 г.

После доработки 15.06.2022 г.

Принята к публикации 22.06.2022 г.

Построены калибровочные кривые для нахождения константы равновесия флуоресцеина в возбужденном состоянии путем разложения спектра испускания на контуры дианиона и аниона. Показано, что процесс фотопереноса протона на дианион-анионной ступени диссоциации конкурирует с излучательными процессами, причем его эффективность растет с увеличением концентрации фосфат-ионов, выступающих в роли акцепторов протонов. Изменение кажущейся константы диссоциации  $\Delta pK_{app2}$  при фотовозбуждении в полосу поглощения дианиона (488 нм) близко к предельному значению, найденному по циклу Фёрстера ( $\Delta pK_a = -0.71$ ).

DOI: 10.31857/S0367676522100210

### ВВЕДЕНИЕ

Сигнал большинства оптических рН-индикаторов основан на изменении спектральных свойств в зависимости от зарядового состояния флуорофора (например, при протонировании). Чувствительность таких индикаторов определяется углом наклона линейного участка сигмоидной зависимости концентрации соответствующей ионной формы от рН, следующей из уравнения Хендерсона–Хассельбаха [1]. Однако этот метод определения рН имеет ограниченную применимость в реальных биологических системах из-за того, что ионные равновесия в основном состоянии могут быть сильно смещены вследствие высокой концентрации неорганических ионов. Так, при увеличении ионной силы до 3 М изменение константы диссоциации  $pK_a$  в основном состоянии, определенное оптическими методами, может составлять более 1.2 единиц рН [2].

Равновесие возбужденного состояния зачастую смещено относительно основного состояния, благодаря чему индикатор становится фото-кислотой или фотооснованием. Изменение  $pK_a$  при фотовозбуждении в рамках термодинамического цикла Фёрстера [3] пропорционально разности частот 0–0 переходов депротонированной ( $A^-$ ) и протонированной ( $AH$ ) форм:

$$\Delta pK_a = h \frac{V_{00}^{A^-} - V_{00}^{AH}}{2.3kT}. \quad (1)$$

Ионное равновесие в возбужденном состоянии также подвержено влиянию неорганических ионов, присутствующих в растворе. Из-за конкуренции между переносом протона и испусканием фотона, флуоресцентный сигнал становится весьма чувствительным к концентрации доноров/акцепторов протонов.

Флуоресцеин является примером рН-индикатора, дианион-анионное равновесие которого приходится на физиологический диапазон рН ( $pK_a$  6.31 [4]), что обуславливает его привлекательность для использования в качестве внутриклеточного рН зонда [5]. Было обнаружено, что на этой ступени диссоциации флуоресцеин является фото-кислотой [6–10], а опубликованные значения константы диссоциации в возбужденном состоянии  $pK_a^*$  находятся в пределах 5.54–6.31 [6, 9, 10]. Подобный разброс значений связан, как правило, с различием типов и концентрацией окружающих ионов, а также с методикой определения самой константы диссоциации.

В настоящей работе мы оценили влияние фосфат-ионов (равновесная смесь моно- и дигидрофосфат-ионов буферного раствора) на ионное равновесие флуоресцеина в основном и возбужденном состояниях. Для этого мы впервые использовали разложение наблюдаемого контура поглощения и испускания при разном рН на контуры ионных форм с определением их амплитудного вклада. Фосфат-ионы стимулируют реакцию фотопереноса протона, участвуя в регулиро-

вании метаболизма и в поддержании гомеостаза в реальных биологических системах. Понимание степени влияния фосфат-ионов на дианион-анионное равновесие в возбужденном состоянии способствует расширению сенсорных приложений флуоресцеина.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### *Материалы и методы*

В работе была использована динатриевая соль флуоресцеина  $C_{20}H_{10}Na_2O_5$  (Fluka). В качестве растворителя использовался фосфатный буфер (рН 5.6–7.1) при трех значениях суммарной молярности фосфат-ионов ( $H_2PO_4^-$ ,  $HPO_4^{2-}$ ) [ $C_p$ ]: 0.1, 0.5 и 1 М. Для приготовления растворов с рН, выходящим за пределы указанного диапазона, использовались соляная кислота HCl и гидроксид калия КОН. В исследованном диапазоне рН флуоресцеин находится преимущественно в двух ионных формах: дианионной (диссоциирован по карбоксильной и гидроксильной группам) и анионной (диссоциирован по карбоксильной группе); в меньшей степени в цвиттерионной нейтральной форме (константа равновесия анион-нейтрального равновесия 3.46 [4]). Концентрация красителя в растворах составляла около  $8 \cdot 10^{-6}$  М. Измерения проводились через 30 мин после приготовления раствора.

Контроль рН раствора осуществлялся с помощью рН-метра SevenCompact S220 (Mettler Toledo, Швейцария). Спектры поглощения были получены на спектрофотометре Lambda 35 (PerkinElmer, США). Спектры испускания измерялись на спектрофлуориметре Fluorolog 3-22 (Horiba Jobin Yvon, США) при возбуждении в полосе поглощения аниона ( $\lambda_{exc} = 435$  нм) и дианиона ( $\lambda_{exc} = 488$  нм). Полученные спектры корректировались на спектральную чувствительность детектора и реабсорбцию. Все измерения проводились при комнатной температуре с использованием кюветы сечением  $1 \times 1$  см при L-геометрии возбуждения.

### *Разложение составных спектров*

Для разложения экспериментальных спектров поглощения и испускания на составляющие, соответствующие отдельным ионным формам, использовалось программное обеспечение OriginPro (OriginLab, США), реализующее алгоритм нелинейной аппроксимации Левенберга–Марквардта. Качество разложения оценивалось с использованием взвешенных остатков и значения  $\chi^2$ . Использовались контуры поглощения дианионной (D), анионной (M) и цвиттерионной (Z) форм [4], а также контуры испускания  $M^*$  и  $D^*$  форм [11].

### *Определение констант диссоциации в основном и возбужденном состояниях*

Концентрации ионных форм флуоресцеина в основном состоянии были рассчитаны на основании полученных амплитудных вкладов каждой формы в измеренные спектры поглощения с учетом известных молярных коэффициентов экстинкции в максимуме спектров ( $87700 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$  для D,  $32700 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$  для M,  $55000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$  для Z [4]). Полученное значение для дианионной формы D нормировалось на его максимальное значение при рН 10. Зависимость от рН аппроксимировалась функцией Больцмана. Значение кажущейся (полученной без контроля ионной силы раствора) константы  $pK_{app}$  определялось как середина перехода в рН шкале.

Аналогичным образом, на основании полученных амплитудных вкладов каждой формы в измеренные спектры испускания с учетом известных квантовых выходов (0.93 для D и 0.36 для M [4]) были рассчитаны концентрации ионных форм флуоресцеина в возбужденном состоянии. Полученное значение для дианионной формы D нормировалось на его максимальное значение при рН 10. Зависимость от рН аппроксимировалась функцией Больцмана. Кажущаяся константа диссоциации в возбужденном состоянии  $pK_{app}^*$  определялась как значение середины перехода.

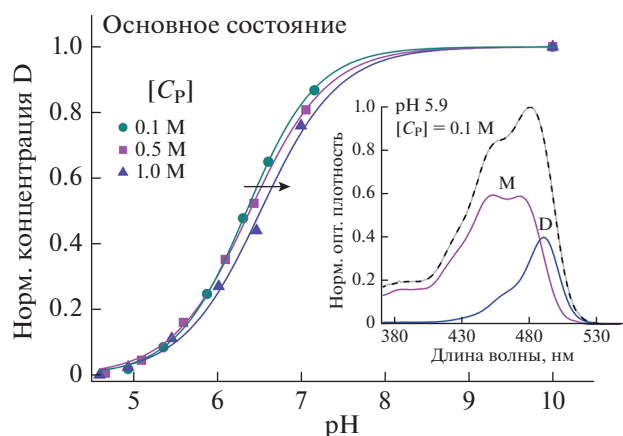
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### *Ионное равновесие в основном состоянии*

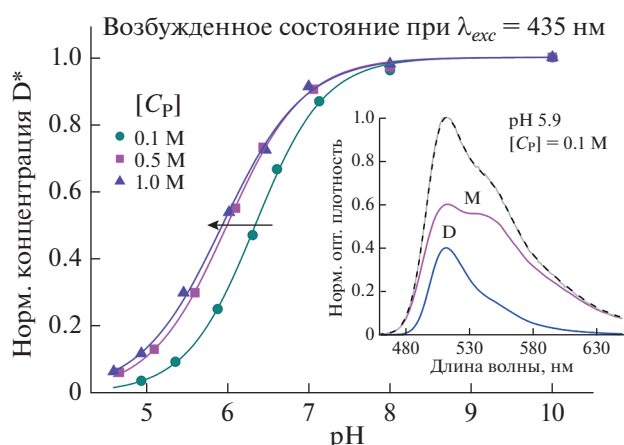
Калибровочные кривые для нахождения константы диссоциации в основном состоянии представлены на рис. 1. Найденное значение  $pK_{app}$  при концентрации фосфат-ионов 1 М близко к опубликованному ранее [9]. Присутствие фосфат-ионов незначительно смещает дианион-анионное равновесие в сторону больших значений рН (табл. 1, рис. 1). Это смещение (около 0.1 ед. рН), тем не менее, оказывает влияние на концентрацию ионных форм в основном состоянии. Так, при рН 6.3 разница концентраций D формы при концентрации фосфат-ионов 0.1 и 1 М достигает 20%. Влияние ионов различной химической природы на смещение константы диссоциации достаточно специфично. Так, при увеличении концентрации KCl до  $\sim 0.7$  М дианион-анионное равновесие флуоресцеина смещается в сторону меньших значений рН, а при дальнейшем увеличении растет [12].

### *Ионное равновесие в возбужденном состоянии*

Рассчитанное по (1) значение разницы констант диссоциации в возбужденном и основном состоянии флуоресцеина  $\Delta pK_a = -0.71$  единиц



**Рис. 1.** Калибровочная кривая для нахождения константы дианион-анионной диссоциации  $pK_{app}^*$  в основном состоянии. Вставка – пример разложения спектра поглощения на составляющие, из которого была найдена нормированная концентрация дианиона.



**Рис. 2.** Калибровочная кривая для нахождения константы дианион-анионной диссоциации  $pK_{app}^*$  в возбужденном состоянии. Вставка – пример разложения спектра испускания (возбуждение 435 нм) на составляющие, из которого была найдена нормированная концентрация дианиона.

pH. Оно соответствует предельной ситуации, при которой за время жизни возбужденного состояния успевает полностью установиться новое ионное равновесие. Однако этого может не произойти, если излучательные (или другие релаксационные процессы) окажутся более вероятными. В этом случае краситель перейдет в основное состояние прежде, чем изменит свое ионное состояние, и кажущаяся константа диссоциации  $\Delta pK_{app}$  окажется по модулю меньше ожидаемого значения. При вероятности установления равновесия ниже вероятности процессов дезактивации возбуждения  $\Delta pK_{app}$  может быть близко к нулю. Промежуточное значение говорит от том, что обсуждаемые процессы сравнимы по скорости.

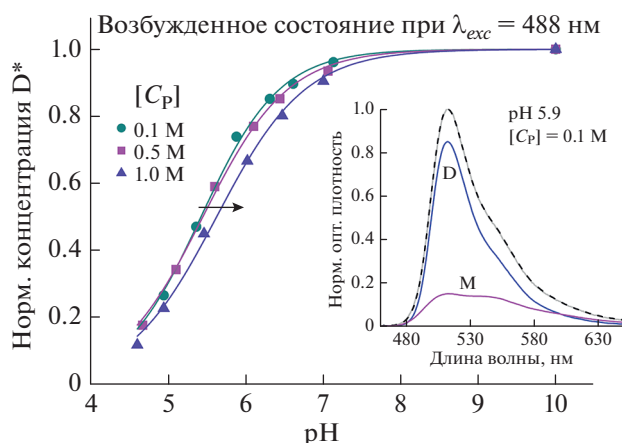
Кажущаяся константа диссоциации  $\Delta pK_{app}$  в возбужденном состоянии проявляет сильную зависимость от  $\lambda_{exc}$  (рис. 2 и 3, табл. 1). Для  $[C_P] = 0.1$  М разница между данными, полученными при двух длинах волн возбуждения, составила почти единицу pH. При pH 6.3 при возбуждении на длине волны 435 нм разница концентраций D формы в присутствии 0.1 и 1 М фосфат-ионов со-

ставляет 35%, а при возбуждении на длине волны 488 нм – 11%. Зависимость концентрации возбужденного состояния от длины волны возбуждения указывает на то, что за время жизни возбужденного состояния ионное равновесие не успевает установиться.

При обсуждении зависимости  $pK_{app}^*$  от концентрации фосфат-ионов при  $\lambda_{exc} = 435$  нм (табл. 1) примем во внимание, что концентрации  $H^+$  и  $OH^-$  низки в исследуемой области pH 5–8, поэтому молекулы воды не акцептируют протоны достаточно эффективно, чтобы конкурировать с процессами релаксации возбужденного состояния [9]. Реакцию депротонирования аниона можно ускорить путем увеличения концентрации фосфат-ионов. В исследуемой области pH основной протон-акцепторной формой являются ионы  $HPO_4^{2-}$ . В [9] было показано, что при низких концентрациях фосфат-ионов, перенос протона не происходит. Согласно нашим данным, фосфат-ионы при концентрации более 0.1 М запускают эту реакцию ( $\Delta pK_{app1} \neq 0$ ). Грубая экстраполяция

**Таблица 1.** Константы диссоциации флуоресцеина в основном и возбужденном состояниях

$[C_P], M$	$pK_{app}$	$pK_{app1}^*$	$\Delta pK_{app1}$	$pK_{app2}^*$	$\Delta pK_{app2}$
		$\lambda_{exc} = 435$ нм		$\lambda_{exc} = 488$ нм	
0.1	$6.35 \pm 0.03$	$6.34 \pm 0.04$	$-0.01 \pm 0.05$	$5.42 \pm 0.04$	$-0.93 \pm 0.07$
0.5	$6.39 \pm 0.03$	$5.99 \pm 0.03$	$-0.40 \pm 0.04$	$5.44 \pm 0.04$	$-0.95 \pm 0.08$
1	$6.52 \pm 0.04$	$5.92 \pm 0.06$	$-0.60 \pm 0.06$	$5.62 \pm 0.04$	$-0.90 \pm 0.09$



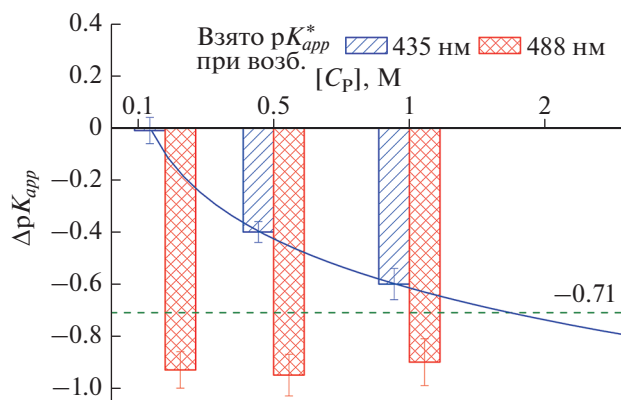
**Рис. 3.** Калибровочная кривая для нахождения константы дианион-анионной диссоциации  $pK_{app2}^*$  в возбужденном состоянии. Вставка – пример разложения спектра испускания (возбуждение 488 нм) на составляющие, из которого была найдена нормированная концентрация дианиона.

зависимости  $\Delta pK_{app1}$  от концентрации фосфат-ионов к предельному значению, полученному при возбуждении на 488 нм, показывает, что при концентрации фосфат-ионов около 2.5–3 М достигается ионное равновесие.

При длине волны возбуждения 488 нм значение  $\Delta pK_{app2}$  близко предельному значению ( $-0.71$ ), что говорит о том, что скорость релаксации возбуждения дианиона меньше, чем у аниона. Близкое значение  $\Delta pK_a = -0.64$  было получено в [10] методом время-разрешенной флуоресцентной спектроскопии.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ вклада контуров отдельных ионных форм в регистрируемые спектры поглощения и испускания дает возможность построения калибровочных кривых для расчета констант диссоциации в основном и возбужденном состояниях. Длина волны возбуждения и концентрация фосфат-ионов в целом регулируют протекание реакций, определяющих соотношение анионов и дианионов флуоресцеина в возбужденном состоянии, то есть, ионное равновесие в условиях возбуждения. Константы диссоциации в возбужденном состоянии при преимущественном возбуждении анионов оказались зависящими от концентрации (моно)гидрофосфат-ионов, выступающих в изучаемой системе в качестве акцепторов протонов в реакции фотопереноса протона. Увеличением концентрации фосфат-ионов более 2.5 М можно повысить эффективность про-



**Рис. 4.**  $\Delta pK_{app1}$  и  $\Delta pK_{app2}$  при длинах волн возбуждения 435 и 488 нм при вариации концентрации фосфат-ионов. Пунктиром нанесено предельное значение  $\Delta pK_a = -0.71$ , рассчитанное по (1). Добавлена линия предполагаемой зависимости  $\Delta pK_{app1}$  до достижения предельного значения.

текания реакции фотопереноса и достичь дианион-анионного равновесия за время жизни возбужденного состояния.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 22-22-00724). Авторы благодарят А. Плотникова за помощь в анализе экспериментальных данных.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Po H.N., Senozan N.M.* // J. Chem. Educ. 2001. V. 78. No. 11. P. 1499.
2. *Edmonds T.E., Flatters N.J., Jones C.F. et al.* // Talanta. 1988. V. 35. P. 103.
3. *Valeur B., Berberan-Santos M.N.* Molecular fluorescence: principles and applications. Weinheim: Wiley-VCH, 2012.
4. *Klonis N., Sawyer W.H.* // J. Fluoresc. 1996. V. 6. No. 3. P. 147.
5. *Le Guern F., Mussard V., Gaucher A. et al.* // Int. J. Mol. Sci. 2020. V. 21. No. 23. Art. No. 9217.
6. *Gerasimova M.A., Tomilin F.N., Malyar E.Yu. et al.* // Dyes Pigm. 2020. V. 173. Art. No. 107851.
7. *Alvarez-Pez J.M., Ballesteros L., Talavera E. et al.* // J. Phys. Chem. A. 2001. V. 105. P. 6320.
8. *Surzhikova D., Gerasimova M., Tretyakova V. et al.* // J. Photochem. Photobiol. A. 2021. V. 413. Art. No. 113233.
9. *Yguerabide J., Talavera E., Alvarez J.M. et al.* // Photochem. Photobiol. 1994. V. 60. P. 435.
10. *Слюсарева Е.А., Герасимова М.А.* // Изв. вузов. Физ. 2013. Т. 56. № 12. С. 48; *Слюсарева Е.А., Герасимова М.А.* // Russ. Phys. J. 2014. V. 56. No. 12. P. 1370.
11. *Суржикова Д.П., Герасимова М.А., Слюсарева Е.А.* // Изв. вузов. Физ. 2021. Т. 64. № 11. С. 108; *Surzhi-*

*kova D.P., Gerasimova M.A., Slyusareva E.A. // Russ. Phys. J. 2022. V. 64. No. 11. P. 2102.*

12. *Мчедлов-Петросян H.O. // Вест. Харьков. нац. ун-та. 2004. Т. 626. № 11(34). С. 221.*

## **Effect of phosphate ions on dianion-anion equilibrium of fluorescein excited state**

**D. P. Surzhikova<sup>a, \*</sup>, M. A. Gerasimova<sup>a</sup>, E. A. Slyusareva<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>*Siberian Federal University, Krasnoyarsk, 660041, Russia*

<sup>\*</sup>*e-mail: darya19578@yandex.ru*

The calibration curves were obtained to determine the value of the equilibrium constant of fluorescein in the excited state using the decomposition of the emission spectrum into the separate contours corresponding single ionic forms (e.g., dianion and anion). We demonstrated that the photoinduced proton transfer taking place between dianion and anion competes with radiative processes, and its efficiency increases with the concentration of phosphate ions acting as proton acceptors. The change in the apparent dissociation constant  $\Delta pK_{app2}$  during photoexcitation into the absorption band of the fluorescein dianion (488 nm) was found to be close to the limit value determined from the Förster cycle ( $\Delta pK_a = -0.71$ ).