

УДК 541.141

## МЕХАНИЗМ ТУШЕНИЯ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ РИБОФЛАВИНА НУКЛЕОФИЛАМИ

В.Л. Иванов, Б.М. Ужинов, С.Ю. Ляшкевич

(кафедра химической кинетики; e-mail: ivanov@photo.chem.msu.ru)

Показано, что тушение флуоресценции рибофлавина (РФ) нуклеофилами: сульфит-, нитрит-, роданид-, иодид- и бромид-ионами протекает как по динамическому, так и по статическому механизму. Определены константы тушения возбужденного РФ анионами и константы равновесия РФ в основном состоянии с анионами. В присутствии малых концентраций нуклеофилов с помощью импульсного фотолиза обнаружено образование радикалов РФ.

**Ключевые слова:** рибофлавин, тушение флуоресценции, нуклеофилы.

Рибофлавин (РФ) широко используют в качестве сенсibilизатора радикальных, цепных радикальных и ион-радикальных реакций [1–3]. Кроме того, РФ применяют в качестве фотосенсibilизатора в биологических системах [4–7]. Будучи широко распространенным в природе, он может быть использован для фоторазложения галогенароматических ядохимикатов. РФ поглощает свет в видимой области спектра, и его фотофизические и фотохимические свойства хорошо изучены [8–11].

Ранее нами показано, что соли сильно влияют на протекание фотосенсibilизированных ион-радикальных цепных реакций замещения в ароматическом ядре [3]. В настоящей работе мы подробно исследовали взаимодействие анионов солей (нуклеофилов) с возбужденным РФ. Выбор анионов обусловлен их редокс-потенциалами, т.е. способностью вступать в реакции переноса электрона с образованием реакционноспособных частиц на стадии фотоинициирования с последующим их участием, в частности, в цепных реакциях замещения. Тушение флуоресценции ароматических соединений анионами изучено в работах [12, 13]. Установлено, что ключевая стадия тушения флуоресценции – перенос электрона с аниона на ароматическую молекулу.

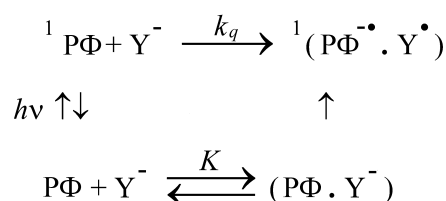
### Методика эксперимента

Использовали: рибофлавин фирмы “Aldrich” без дополнительной очистки; соли марки “ч.д.а.”. Все эксперименты проводили в дистиллированной воде. Спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре “Shimadzu UV-2101PC”, спектры флуоресценции регистрировали на спектрофлуориметре “Perkin Elmer LS-55”. Кинетику затухания флуоресценции измеряли с помощью наносекундного спектрометра

“SP-70” (“Applied Photophysics”). Установка импульсного фотолиза описана ранее [14].

### Результаты и обсуждение

Тушение флуоресценции РФ производится сульфит-, нитрит-, роданид-, иодид- и бромид-ионами. При этом зависимость тушения флуоресценции в координатах уравнения Штерна–Фольмера во всех случаях носит нелинейный характер (рис. 1). В присутствии солей, за исключением сульфита, спектр поглощения РФ не меняется. Возбуждение проводилось при  $\lambda = 445$  нм. При исследовании тушения флуоресценции оптическая плотность раствора РФ при  $\lambda = 445$  нм составляла 0,15. Нелинейная зависимость  $I_0/I$  от концентрации соли хорошо описывается квадратным уравнением. Параболическая зависимость тушения флуоресценции свидетельствует о том, что тушение протекает как по динамическому, так и по статическому пути [15] по схеме:



Изменение квантового выхода флуоресценции в этом случае описывается следующим уравнением:

$$\frac{\varphi_0}{\varphi} = (1 + K \cdot c)(1 + \varkappa \cdot c), \quad (1)$$

где  $\varphi_0$  и  $\varphi$  – квантовые выходы флуоресценции РФ в отсутствие и в присутствии соли соответственно,  $K$  – константа равновесия взаимодействия РФ в основном состоянии с анионами,  $\varkappa$  – константа Штерна–Фольмера динамического тушения флуоресценции

РФ анионами, равная  $k_q \cdot \tau_0$ , где  $k_q$  – константа скорости динамического тушения,  $\tau_0$  – время жизни возбужденного состояния РФ,  $c$  – концентрация соли.

Известно [12], что тушение возбужденных ароматических соединений анионами протекает по механизму переноса электрона. Однако при этом не наблюдается статического тушения флуоресценции. Для подтверждения наличия статического тушения флуоресценции РФ нуклеофилами была измерена кинетика флуоресценции РФ как в отсутствие, так и в присутствии солей. Величины констант Штерна–Фольмера  $\varepsilon_{\tau}$ , определенные по кинетике затухания флуоресценции РФ, приведены в таблице. На рис. 1 представлены данные по изменению интенсивности флуоресценции РФ и изменению времени жизни флуоресценции РФ от концентрации нитрит- и иодид-ионов. Расчет величин  $K$  и  $\varepsilon$  проводили по формулам (2) и (3):

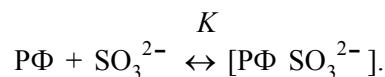
$$\frac{I_0}{I} - 1 = (\varepsilon + K) + \varepsilon \cdot K \cdot c, \quad (2)$$

$$\frac{I_0 \cdot \tau}{I \cdot \tau_0} = 1 + K \cdot c. \quad (3)$$

На рис. 2 приведены зависимости  $(I_0/I) - 1/[KNO_2]$  (а) и  $(I_0/I)/(\tau_0/\tau)$  (б) от концентрации  $KNO_2$ . Полученные величины  $\varepsilon + K$  и  $\varepsilon K$  (23 и 150 соответственно) позволили определить значения  $\varepsilon$  и  $K$ , которые в данном случае оказались одинаковыми и равными 11,5. Величина  $K$ , полученная по уравнению 3, равна 11,7. Следует отметить, что величины констант  $\varepsilon$  тушения флуоресценции РФ нуклеофила-

ми, рассчитанные по уравнению (2), совпадают с величинами констант  $\varepsilon_{\tau}$ , определенными по зависимости времени жизни флуоресценции РФ от концентрации нитрит-ионов. Значения величин  $\varepsilon$ ,  $\varepsilon_{\tau}$  и  $K$  приведены в таблице. Константы скорости тушения флуоресценции РФ нуклеофилами близки к диффузионным от  $2 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$  для нитрит-иона до  $6 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$  для иодид-иона. Время жизни флуоресценции РФ равно 5 нс.

Изученные нами анионы являются сильными донорами электронов и могут образовывать с РФ комплексы с переносом заряда в основном состоянии, что приводит к тушению флуоресценции РФ по статическому механизму. В присутствии сульфита натрия происходит уменьшение оптической плотности спектра поглощения РФ пропорционально в обеих полосах (350 и 450 нм). В течение 10–15 мин спектр стабилизируется и в дальнейшем не меняется. Уменьшение оптической плотности спектра поглощения РФ обусловлено взаимодействием сульфит-иона с кетонной группой молекулы РФ [16]. В результате этого взаимодействия кетонная группа выбывает из сопряжения и сульфопроизводное РФ не поглощает свет в видимой и ближней УФ-области. Реакция взаимодействия сульфита с РФ обратима, и между РФ и его сульфопроизводным устанавливается равновесие:



По данным изменения спектра поглощения РФ при разных концентрациях сульфита была определена константа равновесия:  $0,63 \pm 0,05 \text{ M}^{-1}$ . В результате ана-

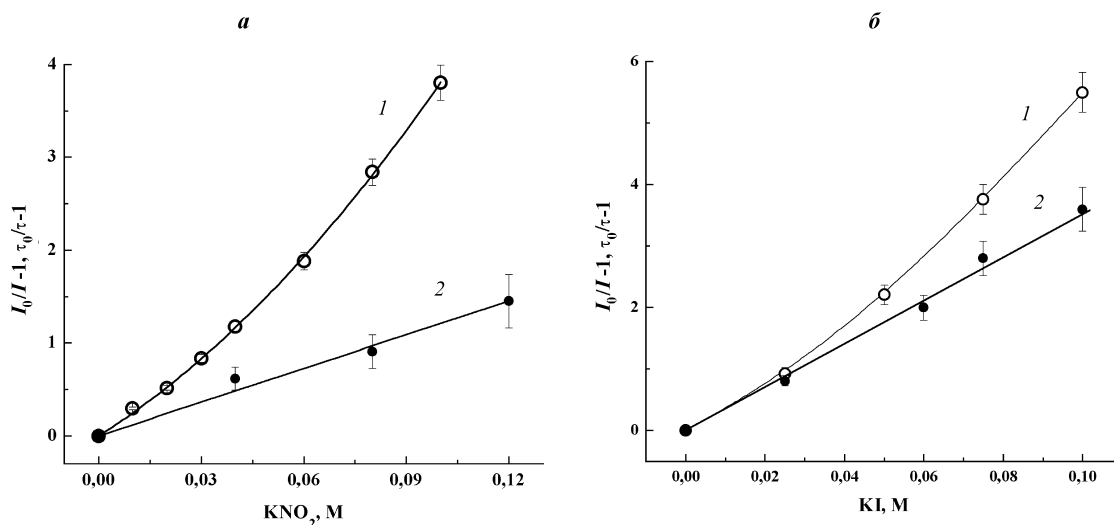


Рис. 1. Зависимость  $I_0/I - 1$  (1) и  $\tau_0/\tau - 1$  (2) от концентрации нитрита (а) и иодида калия (б)

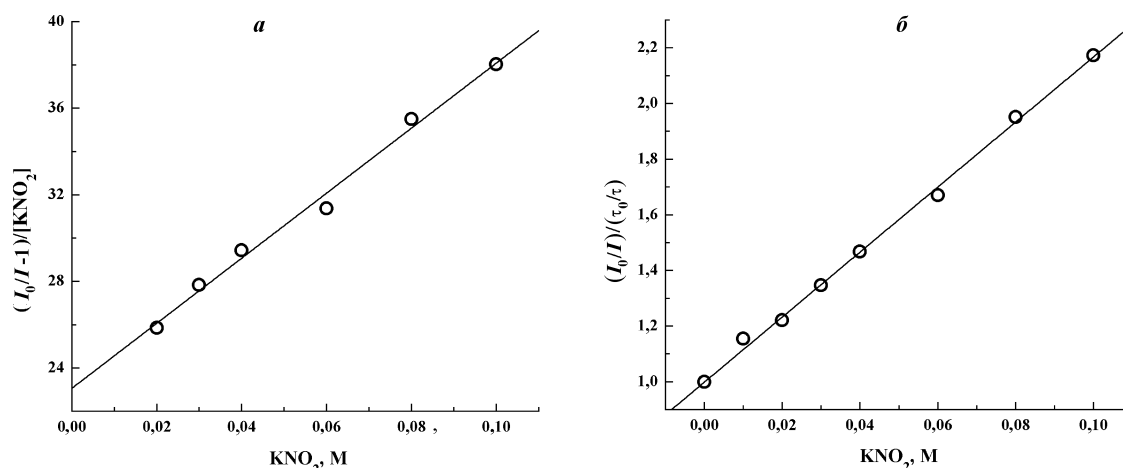


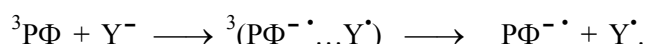
Рис. 2. Зависимость величин  $(I_0/I-1)/[KNO_2]$  (а) и  $(I_0/I)/(\tau_0/\tau)$  (б) от концентрации  $KNO_2$

лиза зависимости  $1/I$  от концентрации сульфит-иона с учетом статического тушения получена величина константы Штерна–Фольмера динамического тушения, равная  $20 \pm 1 \text{ M}^{-1}$ , и величина константы статического тушения, равная  $0,7 \pm 0,1 \text{ M}^1$ . Следует отметить, что величина константы статического тушения совпадает с константой равновесия реакции сульфит-иона с РФ, измеренной нами по спектрам поглощения.

В случае других анионов не наблюдается изменения спектров поглощения РФ, так как они не образуют химических связей с РФ, в отличие от сульфит-иона. При этом, по-видимому, образуются комплексы с переносом заряда, спектры которых не отличаются от спектра свободного РФ. Комплексы РФ с нуклеофилами при возбуждении не флуоресцируют, что приводит к возрастанию тушения флуоресценции РФ по сравнению с уменьшением времени жизни флуоресценции РФ при увеличении концентрации нуклеофилов.

При импульсном фотолизе РФ в присутствии малых концентраций нуклеофилов ( $< 0,01 \text{ M}$ ) происходит образование радикалов РФ ( $\text{РФН}^\bullet$ ), которые поглощают в области 500–600 нм (рис. 3). Выход радикалов  $\text{РФН}^\bullet$  растет при малых концентрациях нуклеофилов с  $10^{-5}$  до  $0,01 \text{ M}$ , затем резко падает при концентрации нуклеофилов  $> 0,01 \text{ M}$ , что связано с тушением флуоресценции РФ нуклеофилами (рис. 4). Образование  $\text{РФН}^\bullet$  при низких концентрациях нуклеофилов происходит в результате тушения триплетных молекул РФ нуклеофилами (рис. 5). Константа скорости тушения триплетных молекул РФ иодид-ионами равна  $1 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ . Тушение триплетных молекул РФ анионами обусловлено реакцией переноса электрона с образованием триплет-

ной ион-радикальной пары, которая диссоциирует на свободные ион-радикалы, в данном случае на анион-радикал РФ и радикал нуклеофила:



Поскольку значение рК анион-радикала РФ равно 8,3 [17], в нейтральной воде происходит протонирование и образование радикала  $\text{РФН}^\bullet$ .

При тушении флуоресценции РФ нуклеофилами первичным продуктом тушения также является ион-радикальная пара. Но поскольку она образуется в синглетном состоянии, то в результате обратного переноса электрона происходит рекомбинация, и система

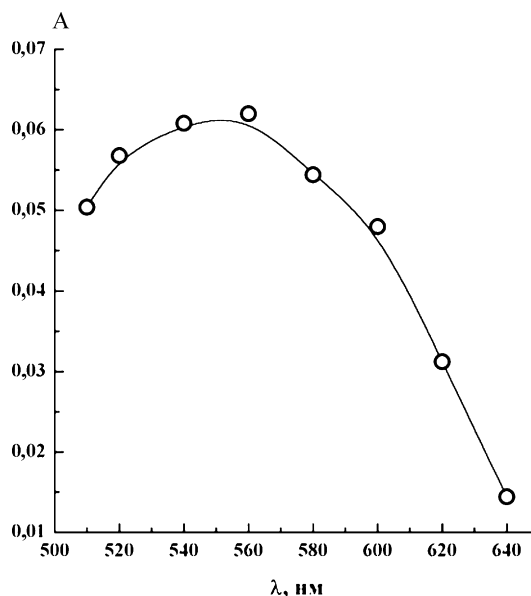


Рис. 3. Спектр поглощения радикала РФ в присутствии нитрит-иона

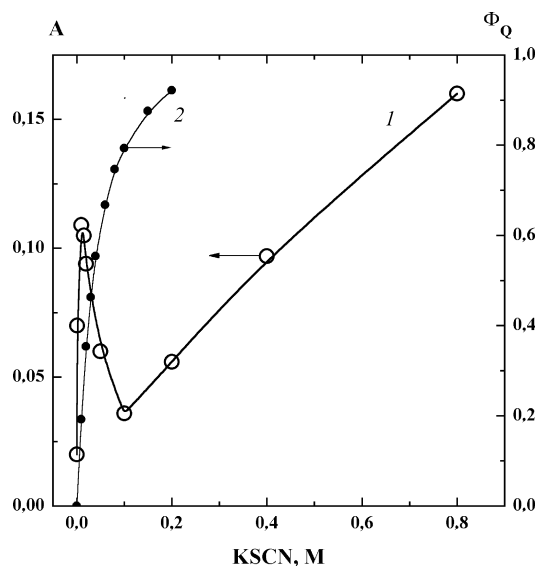


Рис. 4. Зависимость оптической плотности промежуточных продуктов при 560 нм при импульсном фотолизе РФ от концентрации роданид-ионов (1), квантовый выход тушения флуоресценции РФ роданид-ионами (2)

возвращается в исходное состояние, т.е. диссоциации на свободные ион-радикалы не происходит.

В случае роданид-иона наблюдается увеличение оптической плотности при 560 нм с увеличением концентрации роданида. Однако спектр поглощения промежуточного продукта при больших концентрациях роданида отличается от спектра поглощения радикала РФ и обусловлен суммарным поглощением радикала

РФН<sup>•</sup> и анион-радикала роданида (SCN)<sub>2</sub><sup>-•</sup>, который образуется при взаимодействии радикала роданида с анионом роданида [13]. Поскольку образование (SCN)<sub>2</sub><sup>-•</sup> наблюдается при практически полностью потушенной флуоресценции РФ, можно предположить, что роданид-анионы взаимодействуют с радикалами роданида, которые находятся в синглетной ион-радикальной паре. Аналогичная картина наблюдается и в случае бромид-иона, но при этом наблюдается увели-

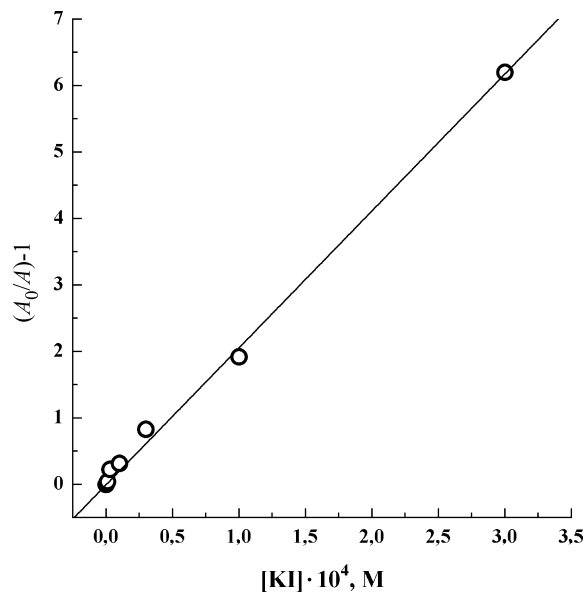


Рис. 5. Тушение триплетных молекул РФ иодид-анионами

**Константы Штерна-Фольмера тушения флуоресценции РФ нуклеофилами, константы равновесия между РФ и нуклеофилами, редокс потенциалы анионов**

| Нуклеофил                    | $E^0(X/X^-)В,$<br>(нвэ) [20] | $\alpha, M^{-1}$ | $\alpha_{\tau}, M^{-1}$ | $K, M^{-1}$ | $\alpha, M^{-1}$ | $\alpha_{\tau}, M^{-1}$ | $K, M^{-1}$ |
|------------------------------|------------------------------|------------------|-------------------------|-------------|------------------|-------------------------|-------------|
|                              |                              | pH 7             |                         |             | pH 9,2           |                         |             |
| Br <sup>-</sup>              | 1,92                         | 21,5±0,5         | —                       | 0,5±0,1     | 14               | —                       | —           |
| SCN <sup>-</sup>             | 1,66                         | 20±2             | 26±5                    | 6,5±2       | 15±1             | —                       | 3±0,5       |
| N <sub>3</sub> <sup>-</sup>  | 1,35                         | 26±2             | —                       | 7±2         | 15±1             | —                       | 1,6±0,2     |
| I <sup>-</sup>               | 1,33                         | 30±3             | 35±5                    | 6,5±1       | 25±2             | —                       | 1,3±0,2     |
| NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> | 1,04                         | 11,5±1           | 12±1                    | 11,5±1      | 15±1             | —                       | 0,45        |
| SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> | —                            | —                | —                       | —           | 20±1             | 18±2                    | 0,63        |

чение поглощения лишь радикала  $\text{RFH}^\bullet$ , поскольку  $\text{Br}_2^{\cdot-}$  в этой области не поглощает. Это может происходить в результате замены одноименнозаряженных партнеров:



В работах [18, 19] использование импульсного радиолиза и импульсного фотолиза позволило наблюдать уменьшение времени жизни ароматических анион-радикалов с изменением их спектров поглощения в присутствии неорганических солей, что связано с образованием новых ион-радикальных пар.

Таким образом, нуклеофилы тушат флуоресценцию РФ как по динамическому, так и по статическому механизму. Константы скорости динамического тушения флуоресценции близки к диффузионным. Константы статического тушения увеличиваются с уменьшением редокс-потенциалов нуклеофилов и связаны с реакцией переноса электрона и образованием комплексов переноса заряда. При малых концентрациях нуклеофилов в результате тушения триплетных молекул РФ наблюдается образование радикалов  $\text{RFH}^\bullet$ , концентрация которых уменьшается с увеличением квантового выхода тушения флуоресценции РФ.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lu C., Lin W., Wang W., Han Z., Yao S., Lin N. // Phys. Chem. Chem. Phys. 2000. **2**. N 3. P. 329.
2. Соловейчик О.М., Демьяшевич А.Б., Гордина Т.А., Каретникова Г.А., Мхитаров Р.Ф., Кузьмин М.Г. // Хим. физика. 1986. **5**. № 12. С. 1655.
3. Иванов В.Л., Ляшкевич С.Ю. // Химия высоких энергий. 2006. **40**. № 6. С. 438.
4. Lu C-Y., Wang W-F., Lin W-Z., Han Z-H., Yao S-D., Lin N-Y. // J. Photochem. Photobiol., B: Biol. 1999. **52**. N 1-3. P. 111.
5. Criado S., Pajares A., Gianotti J., Stettler G., Escalada J.P., Bertolotti S., Amat-Guerri F., Garcia N.A. // J. Photochem. Photobiol., B: Biol. 2003. **71**. N 1-3. P. 19.
6. Lu C., Lin W., Wang W., Han Z., Yao S., Lin N. // Phys. Chem. Chem. Phys. 2000. **2**. N 3. P. 329.
7. Edwards A.M., Silva E. J. // J. Photochem. Photobiol., B: Biol. 2001. **63**. N 1-3. P. 126.
8. Smith E.C., Metzler D.E. // J. Am. Chem. Soc. 1963. **85**. N 20. P. 3285.
9. Song P-S., Smith E.C., Metzler D.E. // J. Am. Chem. Soc. 1965. **87**. N 18. P. 4181.
10. Islam S.D.M., Penzkofer A., Hegemann P. // Chem. Physics. 2003. **291**. N 1. P. 97.
11. Porcal G., Bertolotti S.G., Previtali C.M., Encinas M.V. // Phys. Chem. Chem. Phys. 2003. **5**. N 19. P. 4123.
12. Shizuka H., Nakamura M., Morlta T. // J. Phys. Chem. A 1980. **84**. N 8. P. 989.
13. Sato C., Kikuchi K., Ishikawa H., Iwahashi M., Ikeda H., Takahashi Y., Miyashi T. // Chem. Phys. Lett. 1997. **276**. N 3-4. P. 210.
14. Иванов В.Л., Артюхин А.Б. // Химия высоких энергий. 1998. **32**. № 5. С. 372.
15. Лакович Дж. Основы флуоресцентной спектроскопии. М., 1986. С. 271.
16. Чичибабин А.Е. Основные начала органической химии. Т. 1. М., 1963. С. 244.
17. Land E. J., Swallow A. J. // Biochemistry. **8**. N 5. 1969.
18. Yamamoto Y., Nishida S., Hayashi K. // J. Chem. Soc. Faraday Trans. I. 1987. **83**. N 6. P. 1795.
19. Gersdorf J., Mattay J., Gorner H. // J. Am. Chem. Soc. 1987. **109**. N 4. P. 1203.
20. Loeffl, Rabani J., Treinin A., Linschitz H. // J. Am. Chem. Soc. 1993. **115**. N 20. P. 8933.

Поступила в редакцию 20.01.10

## THE MECHANISM OF FLUORESCENCE QUENCHING OF RIBOFLAVIN BY NUCLEOPHILES

V.L. Ivanov, B.M. Uzhinov, S.Yu. Lyashkevich

(Division of Kinetic Chemistry)

**It was shown that the quenching of riboflavin (RF) fluorescence by nucleophiles: sulfite-, nitrite, thiocyanate-, iodide- and bromide-ions proceeds both dynamic and the static mechanism. The rate quenching constants of excited RF by anions and the equilibrium constants of RF in the ground state with anions have been determined. At flash photolysis RF in the presence of small concentrations of nucleophiles the formation of radicals RF was observed.**

**Key words:** riboflavin, fluorescence quenching, nucleophiles.

**Сведения об авторах:** Иванов Владимир Леонидович – вед. науч. сотр. кафедры химической кинетики химического факультета МГУ, докт. хим. наук (ivanov@photo.chem.msu.ru); Ужинов Борис Михайлович – глав. науч. сотр. кафедры химической кинетики химического факультета МГУ, докт. хим. наук; Ляшкевич Светлана Юрьевна – мл. науч. сотр. кафедры химической кинетики химического факультета МГУ.