

УДК 539.194:535.37

DOI: 10.17223/00213411/64/5/123

*О.Н. ЧАЙКОВСКАЯ<sup>1</sup>, В.С. ЧАЙДОНОВА<sup>1,2</sup>, М.В. АШМАРИНА<sup>1</sup>***СПЕКТРЫ ПОГЛОЩЕНИЯ И ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ СУЛЬГИНА  
В ПРИСУТСТВИИ МЕТИЛЕНОВОГО СИНЕГО \***

Чувствительное и селективное обнаружение остаточного количества антибиотиков является важным вопросом в отношении здоровья человека, окружающей среды и общественной безопасности. Для разработки флуоресцентного метода анализа проведено исследование спектрально-люминесцентных свойств комплекса сульгина и метиленового синего в воде. Оценка свойств молекул, вступающих в специфические и ван-дер-ваальсовы, гидрофобные и электростатические взаимодействия между сульгином и метиленовым синим, изучалась с помощью метода спектроскопии электронного поглощения и флуоресценции. Показано, что константа взаимодействия между сульгином и метиленовым синим в воде составляет  $2.5 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ .

**Ключевые слова:** сульгин, метиленовый синий, спектры электронного поглощения, тушение флуоресценции, константа взаимодействия.

**Введение**

В настоящее время существует острая необходимость дальнейшего развития методов анализа остаточных концентраций антибиотиков в пищевых продуктах. Создание новых вариантов флуоресцентных меток с длиной волны флуоресценции более 600 нм является актуальной задачей, которая имеет большое теоретическое и практическое значение. Введение зондов в практику экспериментальной работы невозможно без выяснения механизмов, лежащих в основе их спектральных свойств, а также изучения связи между их структурой и оптическими проявлениями. Накопление лекарств в организме человека в связи с потреблением молока и молочных продуктов наносит большой вред его здоровью. Это связано, прежде всего, с тем, что часто снижается иммунитет, может развиваться аллергия или дисбактериоз. По некоторым данным – наблюдается увеличение веса. Тетрациклин может стать причиной снижения аппетита, вызвать проктит или гастрит, а также фотосенсибилизацию кожи (повышенную чувствительность к УФ-лучам). Сульгин оказывает противодиарейное и антибактериальное действие, проявляет высокую активность в отношении возбудителей кишечных инфекций [1–5], однако вызывает заболевания органов ЖКТ. Остаточные количества антибиотиков вредят печени и способны нарушить состав крови. Стрептомицин вреден для нервной системы. Левомицетин, который ветеринары применяют довольно часто, угнетает кроветворную систему. Антибиотики подавляют активность ферментов, изменяют микрофлору в человеческом организме, распространяя ее устойчивые виды. Кипячения эти медикаменты не боятся. В сухом молоке их не меньше, чем в исходном сырье, при сушке они не разрушаются. Накопление антибиотиков становится причиной возникновения устойчивости (резистентности) организма по отношению к медикаментам. При воспалительном заболевании лекарства окажутся неэффективными. С практической точки зрения очень важно разработать экспрессный метод анализа антибиотиков в пищевых продуктах.

Флуоресцентная спектроскопия является надежным методом исследования веществ при низких концентрациях в фотовозбужденных состояниях. Для разработки метода в данной работе проведено изучение спектральных свойств сульгина в присутствии метиленового синего в воде. Методы спектроскопии электронного поглощения и флуоресценции используются для оценки свойств исследуемых молекул, вступающих в специфические и ван-дер-ваальсовы, гидрофобные и электростатические взаимодействия между сульгином и метиленовым синим (МВ).

**Объекты и методы исследования**

Объекты нашего исследования – *n*-аминобензолсульфонилгуанидина моногидрат (сульгин), синтезирован коммерческой фирмой «Sigma-Aldrich» (артикул Si-Al S8751-25G), и метиленовый синий. Структурные формулы объектов приведены на рис. 1. Сульгин – белый мелкокристаллический порошок, мало растворим в воде. Для получения матричного раствора сульгина при концен-

\* Результаты были получены при финансовой поддержке РФФИ (проект № 20-32-90116).

трации 1 мМ сухую навеску растворяли в дистиллированной воде с помощью ультразвуковой мешалки. Спектры поглощения и флуоресценции исследуемых растворов регистрировали на спектрофотометре VARIAN Cary 5000 Scan UV-VIS-NIR («AgilentTech.», США – Нидерланды – Австралия) и спектрофлуориметре VARIAN Cary Eclipse («AgilentTech.», США – Нидерланды – Австралия) при комнатной температуре в области 200–800 нм. Измерения проводились с помощью кварцевой кюветы с длиной оптического пути 10 мм. Окислительно-восстановительные и агрегационные свойства МВ используются в молекулярно-биофизических исследованиях и нанотехнологиях при моделировании биофизических процессов и разработке схем функционирования наноразмерных устройств на молекулярном уровне [6–9]. Полезные применения МВ в нанотехнологиях основываются на связи его агрегационных свойств: переход мономер – димер. Молекулярный механизм биологического действия для мономерной и димерной форм МВ различается.

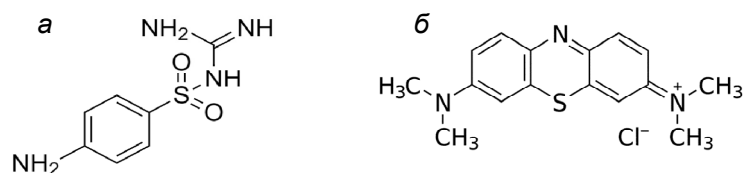


Рис. 1. Структуры сульфгина (а) и метиленового синего (б)

Методом производной спектофотометрии были получены полосы, проявляющиеся лишь в виде скрытых максимумов и нечетких перегибов в спектре поглощения. Этот метод основан на тех же принципах, что и обычная спектофотометрия, однако аналитическим сигналом служит не оптическая плотность, а ее производная  $n$ -го порядка (обычно по длине волны). Дифференцирование спектра позволяет более четко находить положение максимума полосы поглощения, а также сужает полосы и позволяет определять вещества, поглощающие при близких длинах волн, исходные спектры которых частично накладываются друг на друга. Согласно этой методике, удалось выделить электронные переходы в экспериментальных спектрах поглощения сульфгина, метиленового синего и их смеси в воде.

Спектроскопические характеристики сульфгина находили из спектра поглощения и рассчитывали по известным формулам:

$$\varepsilon = \frac{D}{C \cdot l}, \quad (1)$$

где  $\varepsilon$  – коэффициент экстинкции;  $D$  – оптическая плотность в максимуме;  $C$  – концентрация вещества в растворе;  $l$  – оптическая толщина раствора в сантиметрах;

$$f = 4.32 \cdot 10^{-9} F \int \varepsilon_{\nu} \delta \nu, \quad (2)$$

где  $f$  – сила осциллятора;  $F$  – корректирующий множитель;  $\nu$  – частота;

$$F = \frac{9n}{(n^2 + 2)^2}, \quad (3)$$

где  $n$  – коэффициент поглощения растворителя;

$$\tau^0 = \frac{3.5 \cdot 10^8}{\bar{\nu}^2 \int \varepsilon_{\nu} \delta \nu}, \quad (4)$$

где  $\tau^0$  – среднее время жизни синглетного возбужденного состояния;  $\bar{\nu}^2$  – средняя частота полосы поглощения в  $\text{см}^{-1}$ ;

$$\frac{S_2}{S_1} = \frac{\varphi_2 D_2}{\varphi_1 D_1}, \quad (5)$$

где  $S_1, S_2$  – площади под спектрами флуоресценции фенола и сульфгина соответственно;  $\varphi_1, \varphi_2$  – квантовые выходы фенола и сульфгина;  $D_1, D_2$  – оптические плотности поглощения на длине волны возбуждения флуоресценции фенола и сульфгина;

$$\varphi \cdot \tau^0 = \tau, \quad (6)$$

где  $\tau$  – собственное время жизни флуоресценции.

## Результаты и их обсуждение

### Электронные спектры поглощения и флуоресценции сульгина и метиленового синего

В работе [10] приведены исследования электронных спектров МВ в различных растворителях и описана природа электронных переходов. Было показано, что моделирование комплексообразования МВ путем присоединения атома кислорода к атому серы и протонирования по атому азота фенотиазинового кольца описывает появление длинноволновой полосы в спектре поглощения молекулы в области 650–700 нм при переходе от неполярного растворителя к полярному. Следует ожидать взаимодействия окружения с молекулой МВ по центральным атомам азота и серы. Авторы сделали вывод, что взаимодействие по центральным атомам азота и серы с молекулами растворителя намного эффективнее, чем по атомам азота  $N(CH_3)_2$ -групп.

На рис. 2 приведены спектры поглощения сульгина, МВ и их комплекса в воде. Вертикальными стрелками с помощью второй производной указаны электронные переходы, образующие экспериментальные полосы в спектрах индивидуальных молекул и их комплекса с молекулами воды.

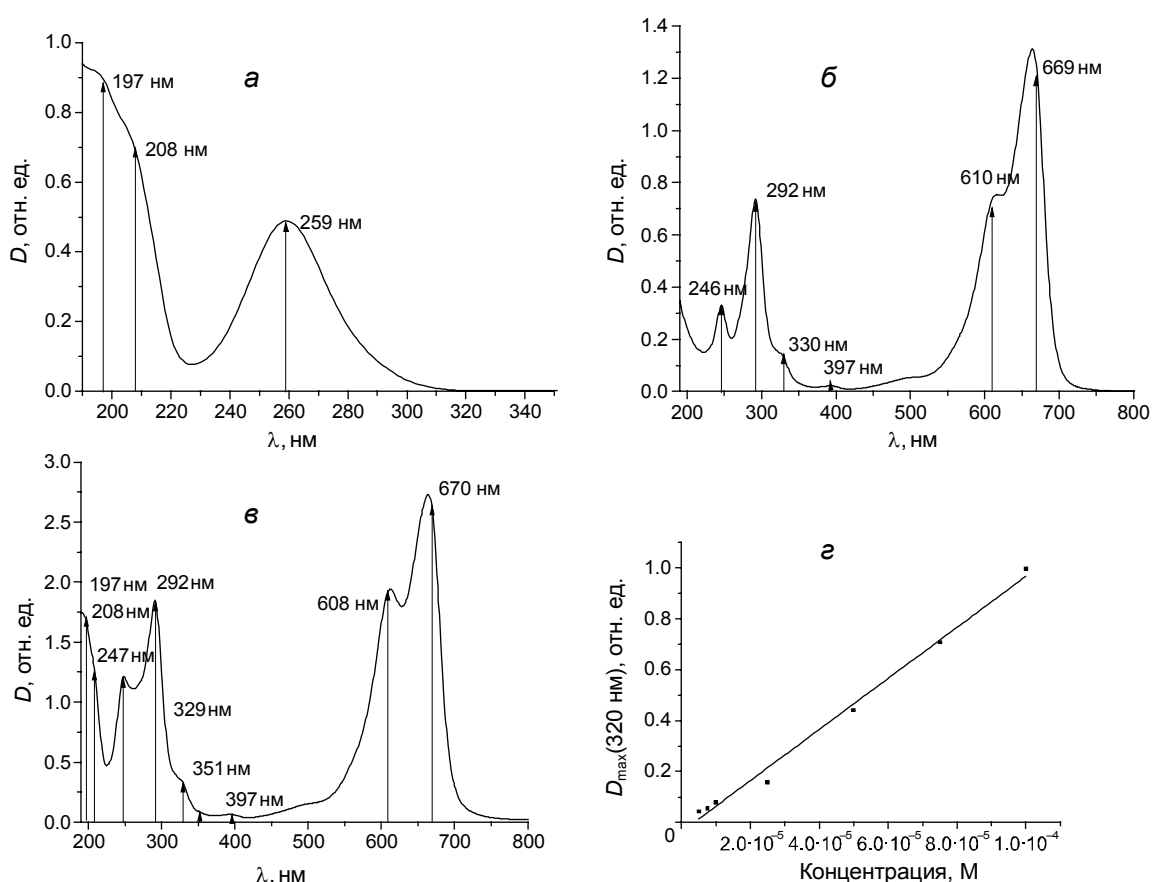


Рис. 2. Спектры поглощения сульгина 0.05 мМ (а), метиленового синего 0.05 мМ (б) и их комплекса (в) в воде. Изменение оптической плотности поглощения МВ в воде от концентрации (г). Стрелками указаны электронные переходы, полученные методом второй производной

Длинноволновая полоса поглощения сульгина в воде образована одним электронным переходом, коротковолновая – двумя (рис. 2, а). Интерес представляет спектр поглощения комплекса сульгина и МВ в воде, приведенный на рис. 2, в. Из рисунка видно, что в спектре появляются дополнительные электронные переходы, которые указывают на образование молекулярного комплекса в основном состоянии. Этот комплекс достаточно устойчивый. Изменение оптической плотности поглощения МВ в воде от концентрации приведено на рис. 2, г. Из рисунка видно, что в пределах концентраций от  $5 \cdot 10^{-6}$  до  $10^{-4}$  М изменение интенсивности поглощения имеет линейную зависимость. Это говорит о том, что МВ в воде находится в мономерной форме. Совсем противоположная ситуация наблюдается в спектрах флуоресценции МВ в воде (рис. 3). Линейная зависимость интенсивности флуоресценции МВ сохраняется только до 0.02 мМ (рис. 4). При увеличении

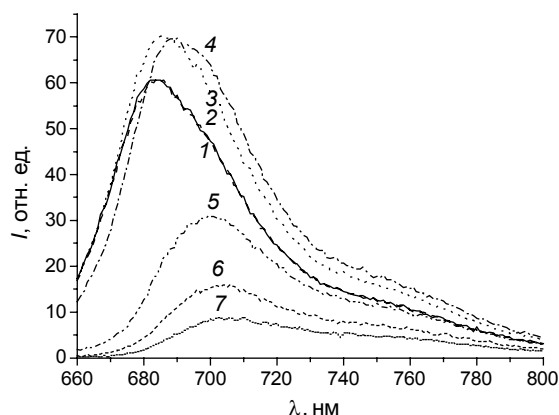


Рис. 3. Изменение интенсивности флуоресценции МВ в воде от концентрации, М: кр. 1 –  $5 \cdot 10^{-6}$ ; кр. 2 –  $7.5 \cdot 10^{-6}$ ; кр. 3 –  $10^{-5}$ ; кр. 4 –  $2.5 \cdot 10^{-5}$ ; кр. 5 –  $5 \cdot 10^{-5}$ ; кр. 6 –  $7.5 \cdot 10^{-5}$ ; кр. 7 –  $10^{-4}$ . Длина волны возбуждения флуоресценции 660 нм

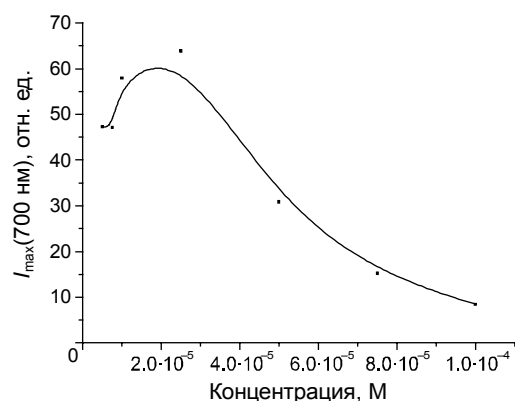


Рис. 4. Зависимость интенсивности флуоресценции МВ в воде от концентрации. Длина волны возбуждения флуоресценции 660 нм

концентрации МВ в воде максимум полосы флуоресценции сдвигается в область длинных волн и интенсивность полосы падает. Это, по-видимому, связано с образованием димеров в возбужденном состоянии. Для сульгина линейная зависимость интенсивности в спектрах поглощения от концентрации сохраняется в области от  $5 \cdot 10^{-6}$  до  $2 \cdot 10^{-4}$  М. В спектрах флуоресценции зависимость интенсивности сульгина от концентрации имеет линейный характер в пределах  $5 \cdot 10^{-6}$ – $7.5 \cdot 10^{-5}$  М. На рис. 5 приведены спектры флуоресценции сульгина в воде. Квантовый выход флуоресценции составляет 0.28 (таблица).

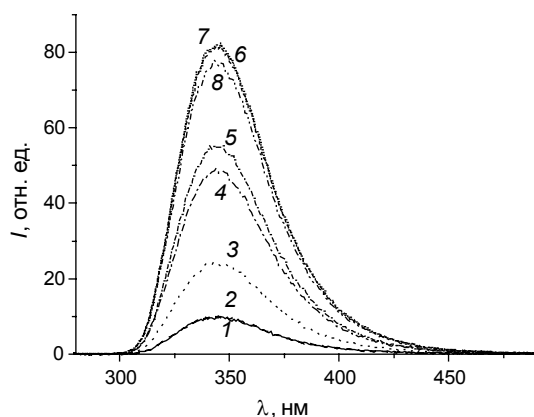


Рис. 5. Спектры флуоресценции сульгина в воде: кр. 1 –  $5 \cdot 10^{-6}$ ; кр. 2 –  $7.5 \cdot 10^{-6}$ ; кр. 3 –  $10^{-5}$ ; кр. 4 –  $2.5 \cdot 10^{-5}$ ; кр. 5 –  $5 \cdot 10^{-5}$ ; кр. 6 –  $7.5 \cdot 10^{-5}$ ; кр. 7 –  $10^{-4}$ ; кр. 8 –  $2.5 \cdot 10^{-4}$  М. Длина волны возбуждения флуоресценции 260 нм

#### Спектральные характеристики сульгина в воде

$\nu_{\text{погл}}/\lambda_{\text{погл}}$ , см <sup>-1</sup> /нм	$\nu_{\text{фл}}/\lambda_{\text{фл}}$ , см <sup>-1</sup> /нм	$\Delta\nu_{1/2}$ , см <sup>-1</sup>	$\nu_{\text{СТ}}$ , см <sup>-1</sup>	$\epsilon$ , 1/(см·М)	$\tau^0 \cdot 10^7$ , с	$\tau \cdot 10^7$ , с	$f$	$k_r \cdot 10^{-8}$ , с <sup>-1</sup>	$\phi$
50800/197	29000/340	4700	9700	13200	2.3	0.6	0.19	4	0.28
48100/207									
38600/270									

Примечание.  $\nu_{\text{погл}}$  ( $\lambda_{\text{погл}}$ ) – максимум полосы поглощения;  $\nu_{\text{фл}}$  ( $\lambda_{\text{фл}}$ ) – максимум полосы флуоресценции;  $\tau$  – время жизни возбужденного состояния;  $f$  – сила осциллятора;  $k_r$  – константа скорости радиационной конверсии;  $\epsilon$  – молярный коэффициент экстинкции;  $\nu_{\text{СТ}}$  – стоксов сдвиг;  $\Delta\nu_{1/2}$  – полуширина полосы на полувывоте,  $\phi$  – квантовый выход флуоресценции.

## Спектры флуоресценции сульфгина в присутствии метиленового синего

Как указывалось выше, спектр поглощения смеси сульфгина и МВ в воде (см. рис. 2, в) не является суммарным спектром отдельных компонент, появляются полосы, которые принадлежат комплексу сульфгина и МВ. Спектры флуоресценции смеси сульфгин + МВ в воде регистрировали на двух длинах волн возбуждения: 260 и 660 нм (рис. 6 и 7). При возбуждении в область 260 нм зафиксирована флуоресценция сульфгина в смеси. В присутствии МВ интенсивность флуоресценции сульфгина снижается (рис. 6). Более заметные изменения происходят в полосе флуоресценции МВ (рис. 7): интенсивность падает почти на порядок. Это означает, что происходит тушение флуорес-

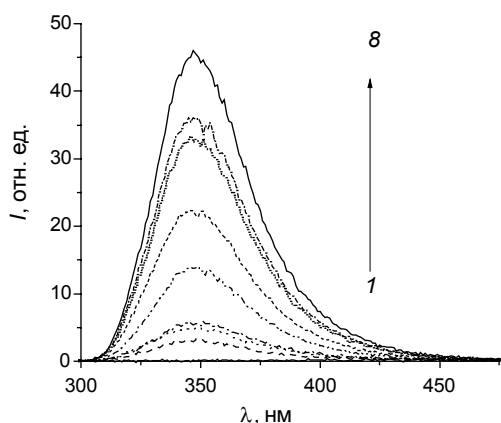


Рис. 6. Спектр флуоресценции смеси МВ и сульфгина в воде. Концентрация МВ в воде – 0.05 мМ. Концентрация сульфгина, М: кр. 1 –  $5 \cdot 10^{-6}$ ; кр. 2 –  $7.5 \cdot 10^{-6}$ ; кр. 3 –  $10^{-5}$ ; кр. 4 –  $2.5 \cdot 10^{-5}$ ; кр. 5 –  $5 \cdot 10^{-5}$ ; кр. 6 –  $7.5 \cdot 10^{-5}$ ; кр. 7 –  $10^{-4}$ ; кр. 8 –  $2.5 \cdot 10^{-4}$ . Длина волны возбуждения флуоресценции 250 нм

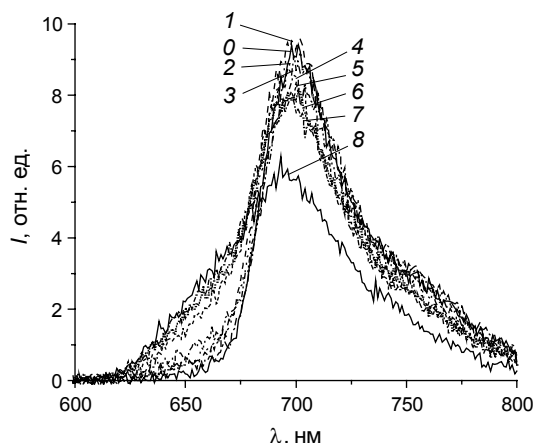


Рис. 7. Спектр флуоресценции смеси МВ и сульфгина в воде. Концентрация МВ в воде – 0.05 мМ. Концентрация сульфгина, М: кр. 1 –  $5 \cdot 10^{-6}$ ; кр. 2 –  $7.5 \cdot 10^{-6}$ ; кр. 3 –  $10^{-5}$ ; кр. 4 –  $2.5 \cdot 10^{-5}$ ; кр. 5 –  $5 \cdot 10^{-5}$ ; кр. 6 –  $7.5 \cdot 10^{-5}$ ; кр. 7 –  $10^{-4}$ ; кр. 8 –  $2.5 \cdot 10^{-4}$ . Длина волны возбуждения флуоресценции 660 нм

ценции МВ сульфгином (рис. 8). Прямолинейная зависимость в координатах Штерна – Фольмера [11] обычно указывает на существование в растворе одного типа флуорофоров, одинаково доступных тушителю. Константа взаимодействия МВ с сульфгином равна  $2.5 \cdot 10^{-3} \text{ M}^{-1}$ . Если принять во внимание, что время затухания флуоресценции МВ около 3 нс, то кажущаяся бимолекулярная константа тушения окажется равной  $8 \cdot 10^{11} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ . Полученное значение больше, чем это возможно для диффузно контролируемой реакции. Для идентификации статистического и динамического тушения необходимы исследования времен затухания флуоресценции или зависимости тушения от температуры. Из анализа спектров поглощения МВ и сульфгина (см. рис. 2) можно сделать вывод, что образуется комплекс между МВ и сульфгином уже в основном состоянии. Связанные в комплекс МВ и сульфгин не флуоресцируют, и наблюдается флуоресценция только несвязанных флуорофоров (рис. 6 и 7).

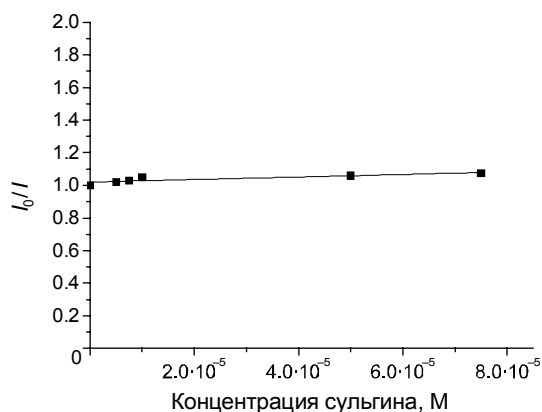


Рис. 8. Тушение флуоресценции МВ в воде. Концентрация МВ в воде – 0.05 мМ

### Заключение

Полученные результаты могут быть полезными на практике для микроскопии биологических тканей, где необходим свет с большей длиной волны для лучшего проникновения в биологические образцы. Это объясняется тем, что вода, меланин и гемоглобин – основные вещества, которые поглощают свет в биологических тканях, имеют минимальный коэффициент экстинкции в диапазоне длин волн от 600 до 900 нм. Сульфгин в воде обладает хорошей поглощательной способностью ( $\epsilon =$

= 13200 см<sup>-1</sup>·М<sup>-1</sup>), высоким стоксовым сдвигом (9700 см<sup>-1</sup>) и относительно высоким квантовым выходом флуоресценции ( $\phi = 0.28$ ). Практическая значимость полученных результатов заключается в том, что использование метиленового синего с максимумом флуоресценции около 700 нм может повысить чувствительность детекции флуоресценции при обнаружении сульгина в биологических системах. Константа взаимодействия метиленового синего с сульгином составляет 2500 М<sup>-1</sup>.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Сульгин [Электронный ресурс] // База таблеток. URL: <https://bazatabletok.ru>. (дата обращения: 19.04.2021).
2. Евгенийев М.И., Гармонов С.Ю., Шакирова Л.Ш., Дегтерев Е.В. // Химико-фармацевтический журн. – 2002. – Т. 36. – № 10. – С. 43–48.
3. Толмачева В.В., Апяри В.В., Ярыкин Д.И., Дмитриенко С.Г. // Журн. аналит. химии. – 2016. – Т. 71. – № 8. – С. 867–873.
4. Магомедова Э.Ф., Пиняскин В.В., Шабанов О.М. // Вестник ДГУ. Естественные науки. – 2004. – Вып. 1. – С. 27–33.
5. Клокова Е.В., Дмитриенко С.Г. // Вестн. Моск. ун-та. Серия 2. Химия. – 2008. – Т. 49. – № 5. – С. 339–343.
6. Burhenne J., Riedel K.D., Rengelshausen J., et al. // J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. – 2008. – V. 863. – No. 2. – P. 273–282.
7. Yang F., Xia S., Liu Z., et al. // Electrophoresis. – 2011. – V. 32. – No. 6–7. – P. 659–64.
8. Kertesz V. and Van Berkel G.J. // Electroanalysis. – 2001. – V. 13. – No. 17. – P. 1425–1430.
9. Burhenne J., Riedel K.D., Rengelshausen J., et al. // J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. – 2008. – V. 863. – No. 2. – P. 273–282.
10. Чайковская О.Н., Краюхина В.С., Помогаев В.А., Чайдонов А.И. // Изв. вузов. Физика. – 2018. – Т. 61. – № 10. – С. 9–14.
11. Valeur B. Molecular Fluorescence.– Weinheim, Germany: WILEY-VCH Verlag GmbH, 2002. – 387 p.

Поступила в редакцию 24.02.2021.

<sup>1</sup> Национальный исследовательский Томский государственный университет,  
г. Томск, Россия

<sup>2</sup> ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Хакасия», г. Абакан, Россия

**Чайковская** Ольга Николаевна, д.ф.-м.н., профессор НИ ТГУ, e-mail: [olgatchaikovskaya@gmail.com](mailto:olgatchaikovskaya@gmail.com);

**Чайдонова** Влада Сергеевна, мл. науч. сотр. лаб. фотофизики и фотохимии молекул НИ ТГУ, физик-эксперт ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Хакасия», e-mail: [krauyvlada0523@mail.ru](mailto:krauyvlada0523@mail.ru);

**Ашмарина** Мария Владимировна, инженер лаб. фотофизики и фотохимии молекул НИ ТГУ, e-mail: [mariaashmarina6@gmail.com](mailto:mariaashmarina6@gmail.com).