

УДК 535.373

## НИЗКОТЕМПЕРАТУРНАЯ ФЛУОРЕСЦЕНЦИЯ ИНДИКАТОРНЫХ КРАСИТЕЛЕЙ И ЕЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРОЦЕССОВ, ПРОТЕКАЮЩИХ В БИОСЕНСОРАХ НА ГЛЮКОЗУ

Т.С. Киян, В.Н. Мельников, В.Т. Коппе, В.В. Бобков, Ю.Е. Логачев

Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина, пл. Свободы, 4, Харьков 61077

E-mail: plip@lin.com.ua

Поступила в редакцию 13 марта 2006 г.

Проведены измерение и анализ спектров флуоресценции ряда индикаторных красителей сульфоталеиновой группы при низкой (азотной) температуре и использовании в качестве растворителей пентанола, глицерина и смеси "Na-фосфатный буфер + глицерин". Рассмотрена возможность использования красителей этой группы для исследования процессов, протекающих в биосенсоре на глюкозу, основанном на каталитическом окислении глюкозы в присутствии глюкозооксидазы. Показано влияние введения глюконовой кислоты (продукта ферментативного окисления глюкозы) на низкотемпературные спектры флуоресценции красителей в растворе, являющемся смесью Na-фосфатного буфера с глицерином. Исследовано влияние времени взаимодействия компонентов модельного раствора на низкотемпературные спектры флуоресценции. При больших временах взаимодействия отмечались изменения, подобные тем, что наблюдались при введении в модельный раствор глюконовой кислоты.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** флуоресцентная спектроскопия, низкотемпературная флуоресценция, сульфоталеиновые индикаторные красители, биосенсор на глюкозу

На протяжении длительного периода времени флуоресцентный анализ остается доминирующим аналитическим методом в медицинском тестировании и биотехнологии [1, 2], при исследовании молекулярных связей в сложных органических молекулах [3]. В последние годы флуоресцентный анализ с успехом применяется также при исследовании динамики молекулярных процессов [4].

Часто природные флуоресцентные свойства органических макромолекул не позволяют получить в эксперименте нужную информацию. В этих случаях в качестве флуоресцентных меток можно использовать органические красители и по изменению их спектральных характеристик следить за процессами, протекающими в исследуемых биологических системах. К сожалению, многие органические красители, молекулы которых могли бы быть использованы в качестве меток, не дают флуоресценции при комнатной температуре, несмотря на интенсивное поглощение света [5 с. 120-125]. В то же время они интенсивно флуоресцируют в видимой области спектра при низких (азотных) температурах. Использование низкотемпературной флуоресценции позволяет расширить возможности оптических методов исследования органических структур еще, по крайней мере, по двум причинам. Во-первых, при температуре жидкого азота, т.е. в фазе твердого раствора, для многих объектов наблюдается структуризация полос флуоресценции (эффект Шпольского). Этот эффект, широко используемый, например, при идентификации и анализе ароматических углеводородов [6, 7], дает возможность более точно фиксировать изменения в спектрах флуоресценции (интенсивности полос и положение их максимумов) при исследовании процессов взаимодействия между органическими веществами, входящими в состав исследуемых смесей. Во-вторых, при низкой температуре возможна регистрация излучения с короткоживущих высоковозбужденных состояний [8].

Целью данной работы было исследование некоторых характеристик низкотемпературной флуоресценции индикаторных красителей сульфоталеиновой группы, перспективных для изучения процессов, протекающих в системах, моделирующих биосенсор на глюкозу, а также выяснение возможности их использования при исследовании окисления глюкозы, катализируемого глюкозооксидазой.

### ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Выбор объектов исследования осуществлялся с учетом перспективности их использования для исследования процессов, происходящих в биосенсорах на глюкозу. Одним из наиболее важных критериев при этом была величина pH раствора, при которой происходит изменение окраски красителя. Это связано с тем, что одним из продуктов реакции окисления глюкозы в присутствии глюкозооксидазы является глюконовая кислота [9], а индикаторные красители сульфоталеиновой группы очень чувствительны к изменению pH среды [10 с. 137-162]. В качестве объектов исследования были выбраны такие красители сульфоталеиновой группы: феноловый красный (ФК), феноловый красный водорастворимый (ФКВ), бромфеноловый синий (БФС), бромкрезоловый пурпуровый (БКП), бромтимоловый синий (БТС). Все эти красители имеют сходную химическую структуру – три бензольных кольца, связанных между собой посредством атома углерода. Наиболее простым соединением

этой группы является ФК, структура которого повторяется в остальных красителях с различными концевыми добавками. Структурные формулы красителей можно найти в работе [10 с. 141-162].

Низкотемпературная флуоресценция растворов красителей исследовалась на экспериментальной установке, которая состояла из трех основных узлов:

- источник возбуждения флуоресценции (дейтериевая лампа ДДС-30 со светофильтром УФС-1);
- кювета с исследуемым раствором, помещенная в термостат с жидким азотом;
- система регистрации излучения.

Система регистрации включала дифракционный монохроматор МДР-23, соединенный с фотоумножителем ФЭУ-106, электрометрический усилитель У5-6 и самопишущий потенциометр ЛКС4-003. Фотокатод фотоумножителя для снижения фонового сигнала охлаждался парами жидкого азота. Возбуждающее излучение от лампы ДДС-30 к кювете с исследуемым раствором и флуоресценция раствора красителя к системе регистрации передавались с помощью системы металлических зеркал. Низкотемпературные спектры флуоресценции в данной работе анализировались в видимой области, от 400 до 750 нм.

В качестве растворителей использовались глицерин и амиловый спирт (н-пентанол), которые являются хорошими растворителями красителей сульфоталеиновой группы. В связи с тем, что моделирование процессов, протекающих в биосенсоре на глюкозу, планировалось проводить в буферных растворах, в качестве растворителя использовался также Na-фосфатный буфер с pH 7,3–7,4 ( $C = 100$  мМ). В этом случае к раствору красителя в буфере добавлялось некоторое количество глицерина (~ 20 % или более), поскольку флуоресценция исследованных красителей в чистом буфере в видимой области спектра не зарегистрирована даже при азотной температуре.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Низкотемпературные спектры флуоресценции растворов в глицерине и пентаноле каждого из красителей ФК, БФС, БКП, БТС расположены на участке 450–750 нм и имеют несколько максимумов. В качестве примера на рис. 1 приведен спектр флуоресценции раствора ФК в глицерине, а на рис. 2 – в пентаноле (сплошные линии). Спектры нормированы на максимальную интенсивность. Компьютерная обработка полученных спектров с аппроксимацией Лоренцевыми кривыми показала, что для всех исследованных красителей спектры состоят из трех-четырех отдельных полос. Наблюдается хорошее совпадение экспериментально полученного спектра и суммарной кривой, рассчитанной по модели Лоренца. На рис. 1 и 2 приведены также расчетные кривые для фенолового красного (пунктирные линии). Значения максимумов ( $\lambda_{\max}$ ) составляющих полос, полученные из расчета, для всех измеренных спектров растворов красителей в глицерине и в пентаноле, а также относительные интенсивности этих полос, определенные как площадь под кривой, приведены в таблице.

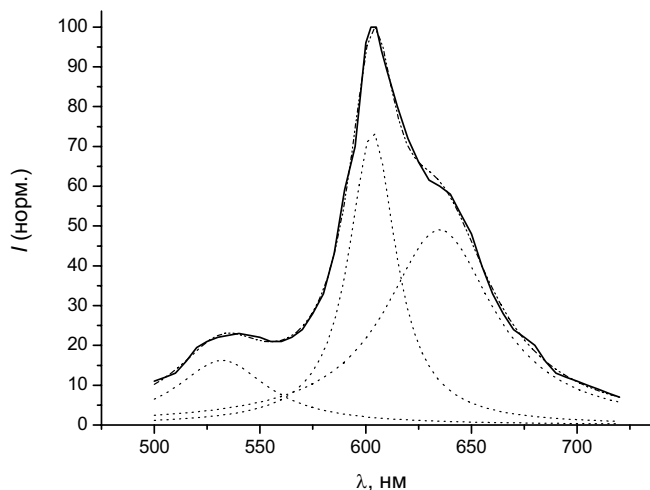


Рис. 1. Спектр низкотемпературной флуоресценции фенолового красного в глицерине (сплошная линия) при концентрации красителя  $C = 4$  мМ. Пунктирные линии – расчет по модели Лоренца

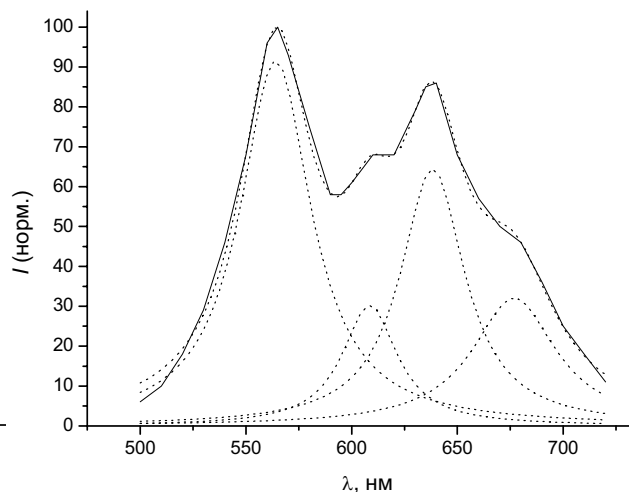


Рис. 2. Спектр низкотемпературной флуоресценции фенолового красного в пентаноле (сплошная линия) при концентрации красителя  $C = 4$  мМ. Пунктирные линии – расчет по модели Лоренца

Анализ результатов показал, что общим для спектров флуоресценции красителей данной группы является наличие полос в зеленой ( $\lambda_{\max} \sim 540$  нм) и оранжевой ( $\lambda_{\max} \sim 640$  нм) областях спектра. Для всех исследованных красителей характерно также наличие полосы на участке 670–685 нм. Интенсивность этой полосы в большинстве случаев мала, как, например, для раствора ФК в глицерине (см. рис. 1). В спектре ФК кроме этих полос регистрируется полоса в районе  $\lambda \sim 600$  нм, интенсивность которой зависит от типа растворителя. Все остальные исследованные красители имеют полосу в районе  $\lambda \sim 580$  нм, которая отсутствует в спектре ФК. Такое отличие

спектра ФК от спектров остальных красителей исследуемой группы связано, скорее всего, с различием в химической структуре молекул. Действительно, в молекулах БФС, БКП и БТС, в отличие от ФК, дополнительно присутствуют атомы Br, а также группы  $-CH_3$  и  $-CH(CH_3)_2$ . Это, вероятно, приводит к смещению возбужденного электронного состояния, переход с которого дает полосу в районе 600 нм для ФК, на величину  $\Delta E \sim 0,1$  эВ, что в свою очередь приводит к смещению этой полосы в район  $\sim 580$  нм для БФС, БКП и БТС.

Таблица

Положение расчетных максимумов ( $\lambda_{\max}$ ) составляющих полос низкотемпературной флуоресценции и относительные интенсивности этих полос ( $Y$ ) для растворов красителей сульфоталеиновой группы в глицерине и в пентаноле при концентрации растворов 4 мМ

Феноловый красный				Бромфеноловый синий				Бромкрезоловый пурпуровый				Бромтимоловый синий			
Глицерин		Пентанол		Глицерин		Пентанол		Глицерин		Пентанол		Глицерин		Пентанол	
$\lambda_{\max}$ , нм	$Y$ , отн. ед.	$\lambda_{\max}$ , нм	$Y$ , отн. ед.	$\lambda_{\max}$ , нм	$Y$ , отн. ед.	$\lambda_{\max}$ , нм	$Y$ , отн. ед.	$\lambda_{\max}$ , нм	$Y$ , отн. ед.	$\lambda_{\max}$ , нм	$Y$ , отн. ед.	$\lambda_{\max}$ , нм	$Y$ , отн. ед.	$\lambda_{\max}$ , нм	$Y$ , отн. ед.
534	1000	563	5000	537	1700	553	3300	543	6000	547	5300	~540	~100	550	1600
				578	2100	586	3900	584	2900	584	2500	580	8200	580	5400
604	2800	608	1400												
634	3900	638	3300	639	7670	643	4800	641	1100	641	2900	642	2800	643	4600
		675	1900									679	1000		

В данной работе возбуждение молекул красителей осуществлялось ультрафиолетом с длиной волны 310 нм, что соответствует энергии кванта  $E = 4$  эВ. В то же время энергии перехода, соответствующие максимумам полос флуоресценции, наблюдаемых в видимой области, составляли от 1,8 эВ ( $\lambda_{\max} = 680$  нм) до 2,3 эВ ( $\lambda_{\max} = 534$  нм). Расстояние между соседними максимумами в пределах одного спектра в энергетическом эквиваленте было не менее 0,1 эВ, что существенно превосходит расстояние между колебательными уровнями, которое для молекул данного типа не превышает  $E_{\text{кол}} = 0,01$  эВ даже при комнатной температуре. В наших условиях исследование фотолюминесценции проводилось при температуре жидкого азота, поэтому уширение полос за счет влияния колебаний молекулы должно быть еще меньше. В связи с этим можно считать, что наблюдаемые нами полосы в спектре люминесценции соответствуют переходам между различными электронными состояниями молекулы.

Как видно из рисунков 1 и 2, низкотемпературные спектры флуоресценции в нашем случае не являются квазилинейчатыми, как в случае ароматических углеводородов [6]. Наличие квазилинейчатых спектров при низких температурах наблюдается только в отсутствие химического взаимодействия между молекулами красителя и растворителя [11 с. 226]. Авторы этой работы считают, что при использовании полярных растворителей, таких как спирты и глицерин, структурным элементом которых являются гидроксильные группы, возникающее взаимодействие между молекулами полярного растворителя и молекулами растворенного органического вещества препятствует структуризации спектров флуоресценции при низких температурах, что наблюдается и в нашем случае.

При переходе от глицерина к пентанолу наблюдается перераспределение интенсивности в полосах и в некоторых случаях смещение полос по шкале длин волн. Изменение положения основных полос в спектрах флуоресценции на шкале длин волн связано с дипольным взаимодействием системы молекула красителя – растворитель. Это приводит к смещению энергетических уровней, как основного, так и возбужденного состояний в молекуле красителя на величину энергии сольватации и, следовательно, к смещению  $\lambda_{\max}$  и разной заселенности возбужденных электронных состояний [5 с. 159]. Величина смещения определяется как дипольным моментом, так и степенью поляризуемости электронной оболочки молекулы. В зависимости от значения этих параметров может наблюдаться как коротковолновое, так и длинноволновое (как в нашем случае) смещение полос.

В связи с тем, что процессы взаимодействия, протекающие в системе “глюкоза + глюкозооксидаза”, исследуются в буферных растворах, были проведены измерения низкотемпературных спектров флуоресценции растворов красителей в Na-фосфатном буфере с pH 7,3–7,4. Оказалось, что чисто буферные растворы исследованных красителей не флуоресцируют даже при азотной температуре, однако, если в рабочие растворы добавлялся глицерин в количестве  $\sim 20\%$  или более, флуоресценция возникала вновь. Измеренные спектры флуоресценции растворов красителей в буфере (содержание глицерина – 20%) приведены на рис. 3. При сравнении этих спектров со спектрами красителей в пентаноле и глицерине было установлено, что практически неизменным остался только спектр ФК. Для спектров остальных красителей характерно существенное ослабление полосы в зеленой области спектра; в случае БФС эта полоса исчезает полностью.

При дальнейших исследованиях процессов взаимодействия в модельной системе “глюкоза + глюкозооксидаза” использовались, в основном, красители ФК или ФКВ, спектр низкотемпературной флуоресценции которого очень близок к спектру ФК. В некоторых случаях использовался также краситель БКП. Это связано с тем, что спектры флуоресценции этих красителей в буферном растворе остаются достаточно интенсивными с хорошо

выраженными максимумами в зеленой и красной областях спектра. Оптимальная концентрация красителя для исследования процессов в модельной системе выбиралась из выполнения таких условий: полосы в разных областях спектра имеют достаточную интенсивность и слабо зависят от концентрации красителя. Из исследований зависимости флуоресценции ФКВ от концентрации красителя в области концентраций от 0,4 мМ до 4 мМ было показано, что этим условиям удовлетворяют концентрации красителя  $C > 2$  мМ.

Проведены эксперименты по выяснению возможности использования индикаторных красителей сульфоталениновой группы ФКВ и БКП для изучения процессов окисления глюкозы в присутствии глюкозооксидазы.

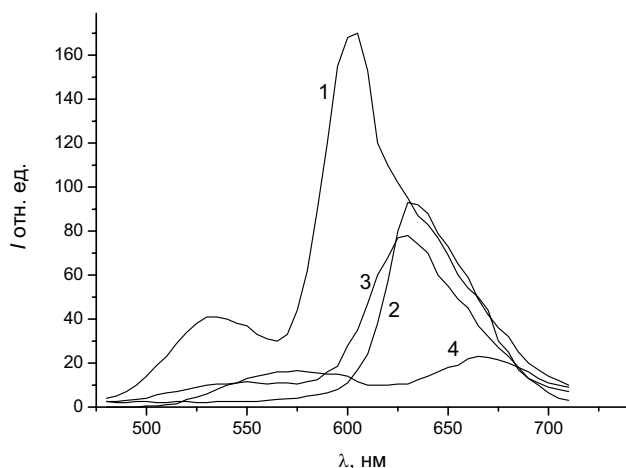


Рис. 3. Спектры низкотемпературной флуоресценции красителей ФК (1), БФС (2), БКП (3), БТС (4) в Na-фосфатном буфере с добавлением глицерина до 20%-й концентрации

красителя ФКВ, полученные по описанной методике, без добавления глюконовой кислоты и при ее присутствии с концентрацией 200 мМ. На рис. 5 приведены спектры флуоресценции для красителя БКП, полученные в аналогичных экспериментальных условиях. Концентрации красителей в обоих случаях были 4 мМ. Как видно (см. рис. 4), в случае красителя ФКВ добавление глюконовой кислоты приводит к следующим изменениям: полоса с  $\lambda_{\max} \approx 530$  нм усиливается приблизительно в 4 раза и смещается в сторону больших длин волн до  $\lambda_{\max} = 552$  нм;

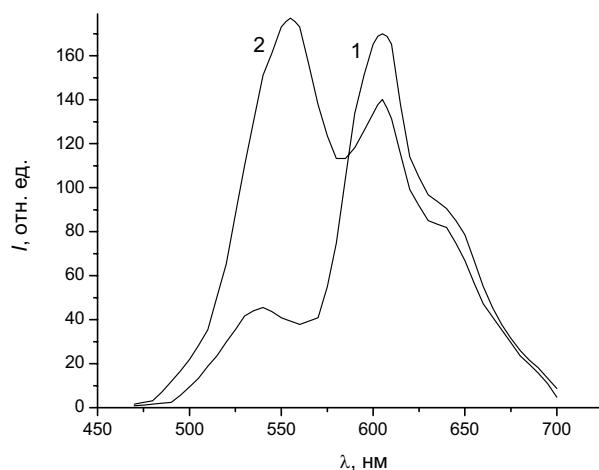


Рис. 4. Спектры флуоресценции проб буферных растворов в глицерине (1 : 5,6) красителя ФКВ (1) и при добавлении к буферному раствору ФКВ глюконовой кислоты до концентрации 200 мМ (2)

интенсивность полосы с  $\lambda_{\max} \approx 635$  нм при этом несколько уменьшается. В случае красителя БКП (см. рис. 5) наблюдается существенное, почти в 10 раз, усиление зеленой полосы с  $\lambda_{\max} = 543$  нм и ослабление полосы с  $\lambda_{\max} = 641$  нм.

Были проанализированы также изменения спектра низкотемпературной флуоресценции красителя ФКВ при изменении выдержки (время реакции) модельного раствора, содержащего одновременно глюкозу (300 мМ), глюкозооксидазу (1,86 мг/мл) и краситель (4 мМ) в 100 мМ Na-фосфатном буфере. Выдержка раствора до измерения составляла от 1 до 120 мин. при комнатной температуре (20–22 °С). Как было установлено при исследо-

Как уже отмечалось, одним из продуктов ферментативного окисления глюкозы является глюконовая кислота. Для выявления влияния глюконовой кислоты на низкотемпературные спектры флуоресценции растворов красителей в буфере к этим растворам добавлялась глюконовая кислота при концентрации от 3 мМ до 200 мМ. Для проведения измерений буферные растворы смешивались с глицерином в соотношении 1 : 5,6. Анализ полученных спектров показал, что при концентрациях глюконовой кислоты менее 30 мМ ее влияние на спектры флуоресценции было несущественным. Изменения в спектрах, которые в основном сводятся к усилению полосы в зеленой области спектра, наблюдались, начиная с концентраций глюконовой кислоты 30 мМ, с резким усилением этих эффектов при концентрации 100 мМ. Дальнейшее повышение концентрации глюконовой кислоты приводит к незначительным изменениям в спектрах флуоресценции. На рис. 4 приведены низкотемпературные спектры флуоресценции буферного раствора

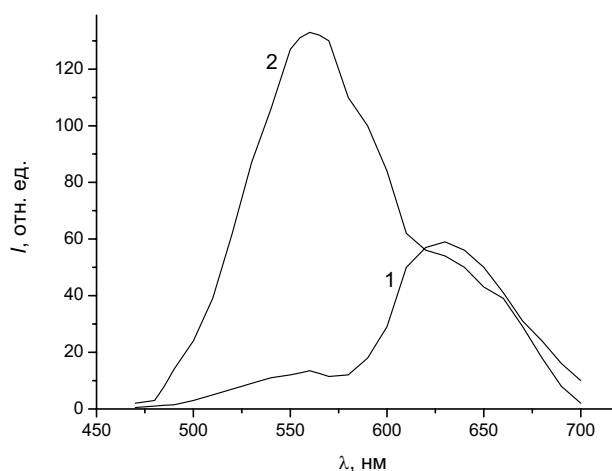


Рис. 5. Спектры флуоресценции проб буферных растворов в глицерине (1 : 5,6) красителя БКП (1) и при добавлении к буферному раствору БКП глюконовой кислоты до концентрации 200 мМ (2)

вании таких систем с использованием метода МСВИ (см. статью Мельников В.Н., Литвинов В.А., Коппе В.Т., Бобков В.В., Товстяк В.В. “Об использовании метода МСВИ для исследования взаимодействия компонентов биосенсора на глюкозу” в данном выпуске “Вестника”), введение пробы модельного раствора в глицерин останавливает реакцию окисления глюкозы; в указанной работе было установлено также, что при растворении компонентов модельной смеси непосредственно в глицерине реакция не происходит. Данные приемы использовались и в настоящей работе для фиксирования малых времен взаимодействия в модельных растворах и для получения контрольных растворов, в которых глюконовая кислота отсутствует.

Полученные низкотемпературные спектры флуоресценции приведены на рис. 6. Результаты компьютерной обработки этих спектров представлены на рис. 7 (спектры нормированы на интенсивность полосы с  $\lambda_{\max} \approx 604$  нм, которая оставалась практически неизменной для всех выдержек).

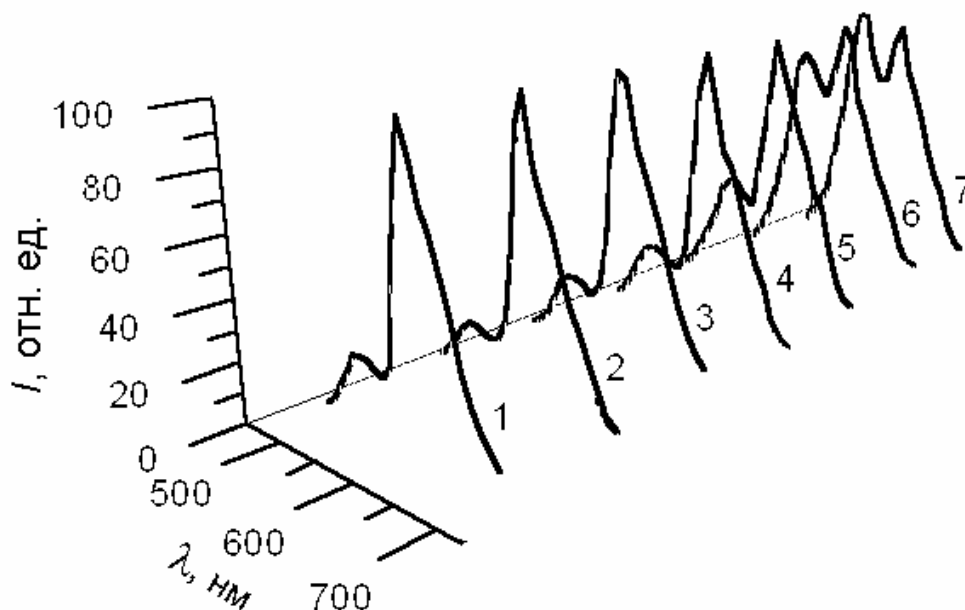


Рис. 6. Низкотемпературные спектры флуоресценции раствора, содержащего одновременно глюкозу (300 мМ), глюкозооксидазу (1,86 мг/мл) и краситель ФКВ (4 мМ) в 100 мМ Na-фосфатном буфере. Время реагирования компонентов раствора, мин.: 1 – 0 (контроль); 2 – 1; 3 – 3; 4 – 10; 5 – 30; 6 – 60; 7 – 120

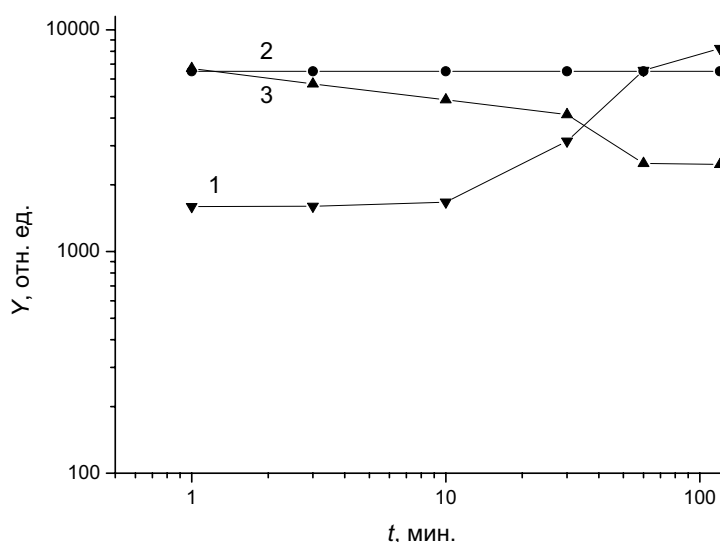


Рис. 7. Компьютерная обработка с аппроксимацией Лоренцевыми кривыми спектров флуоресценции для модельных растворов при различных выдержках. Положение максимумов полос  $\lambda_{\max}$ , нм: 1 – 526–552; 2 – 602–606; 3 – 633–648. Значения  $\lambda_{\max}$  смещались в длинноволновую область по мере увеличения выдержки

Как видно, при малых выдержках модельного раствора (времена 1–10 мин.) спектры флуоресценции мало чем отличаются от спектра для контрольного образца (спектр 1), не содержавшего глюконовую кислоту. Дальнейшее увеличение выдержки модельного раствора приводит к изменениям, подобным тем, что наблюдались при добавлении больших количеств глюконовой кислоты к буферному раствору красителя, как было описано

выше. Спектр 7 на рис. 6 уже очень сильно напоминает спектр на рис. 4 (кр. 2). Это дает основания считать, что при таких выдержках модельного раствора концентрация глюконовой кислоты в растворе сопоставима с ее концентрацией в растворе, результаты анализа которого приведены на рис. 4 (200 мМ).

### ВЫВОДЫ

Результаты исследований низкотемпературных спектров ряда индикаторных красителей сульфопфталеиновой группы показали, что при низких температурах все они имеют яркую флуоресценцию в видимой области. Компьютерная обработка полученных спектров с аппроксимацией Лоренцевыми кривыми показала, что для всех исследованных красителей спектры состоят из трех-четырех отдельных полос, которые являются результатом электронных переходов между различными электронными состояниями. Наблюдается хорошее совпадение экспериментально полученного спектра и суммарной кривой, рассчитанной по модели Лоренца.

Полученный в эксперименте отклик низкотемпературных спектров ФКВ и БКП на присутствие в растворе глюконовой кислоты позволяет использовать эти красители при исследовании процессов, протекающих в системах, моделирующих биосенсор на глюкозу. Этот вывод подтверждается также результатами исследования модельных растворов, содержащих одновременно глюкозу, глюкозооксидазу и краситель в Na-фосфатном буфере, в зависимости от выдержки раствора.

Работа выполнена при поддержке Научно-Технологического Центра Украины, проект № 2155.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rozenzweig Z. and Kopelman R. Analytical Properties and Sensor Size Effects of a Micrometer-Sized Optical Fiber Glucose Biosensor // *Anal. Chem.* – 1996 – V. 68. – P. 1408–1413.
2. D' Auria S. and Lakowicz J. Enzyme fluorescence as sensing tool: new perspectives in biotechnology // *Current Opinion in Biotechnology.* – 2001. – V. 12. – P. 99–104.
3. Базыль О.К., Чайковская О.Н., Артюхов В.Я., Майер Г.В. Квантовохимическое исследование спектрально-люминесцентных свойств и фотолитиза молекулы метил[(4-аминофенил)сульфонил]карбоната // *Опт. и спектр.* – 2004. – Т. 97, № 1. – С. 42–54.
4. Haouz Ah., Twist Ch, Christian Zentz Patrick Tauc, Alpert B. Dynamic and Structural Properties of glucose oxidase enzyme // *Eur. Biophys J.* – 1998. – V. 27. – P. 19–25.
5. Теренин А.Н. Фотоника молекул красителей. – Л.: Наука, 1967. – 616 с.
6. Теплицкая Т.А., Алексеева Т.А., Вальдман М.Н. Атлас квазилинейных спектров люминесценции. – М.: Изд. МГУ, 1978. – 174 с.
7. Алексеева Т.А., Теплицкая Т.А. Спектрофлуорометрические методы анализа ароматических углеводов. – Л.: Гидрометиздат, 1981. – 304 с.
8. Ермолаев В.Л., Любимцев В.А. Каскадность процесса релаксации по высоким возбужденным синглетным уровням молекул красителей в растворах. // *Опт. и спектр.* – 1986. – Т. 60 – № 1. – С. 74–81.
9. Гулый М.Ф. и др. Фермент глюкозооксидаза и его применение. – Киев: Наукова думка, 1964. – 144 с.
10. Индикаторы. Под ред. Э. Бишоп. – М.: Мир, 1976. – Т. 1. – 496 с.
11. Лакович Дж. Основы флуоресцентной спектроскопии. – М.: Мир, 1986. – 496 с.

### LOW TEMPERATURE FLUORESCENCE OF INDICATOR DYES AND ITS USING FOR STUDYING OF PROCESSES IN GLUCOSE BIOSENSORS

T.S. Kiyany, V.N. Melnykov, V.T. Koppe, V.V. Bobkov, Yu.E. Logachov

V.N. Karazin Kharkov National University, Svobody sq. 4, Kharkov 61077

E-mail: plip@lin.com.ua

Fluorescence spectra of a number of indicator sulfophthalein dye at low (liquid nitrogen) temperature using as solvents pentanol, glycerol and "sodium phosphate buffer + glycerol" composite were measured and analyzed. The possibility of such dyes using for studying of processes going in glucose biosensors that based on catalytic oxidizing of glucose in the presence of glucose oxidase was considered. The influence of introduction of gluconic acid (product of enzymic glucose oxidation) on low temperature fluorescence spectra of dyes in "sodium phosphate buffer + glycerol" solvent was shown. The influence of interaction time of components in the model solvent on low temperature fluorescence spectra was studied. At a longer interaction time there were noted changing similar to ones at the introduction of gluconic acid in the model solvent.

**KEY WORDS:** fluorescence spectroscopy, low temperature fluorescence, indicator sulfophthalein dyes, glucose biosensor.