

ЭЛЕКТРОННЫЕ СОСТОЯНИЯ АКРИДИНОВОГО ОРАНЖЕВОГО В ВОДНОМ РАСТВОРЕ

Костюкова Л.О.¹, Леонтьева С.В.¹, Воронин Д.П.², Рыбакова К.А.²,
Бучельников А.С.², Костюков В.В.²

¹Черноморское высшее военно-морское училище им. П.С. Нахимова
ул. Дыбенко, 1а, г. Севастополь, 299028, РФ

²Севастопольский государственный университет
ул. Университетская, 33, г. Севастополь, 299053, РФ; e-mail: viktor_kostukov@mail.ru
Поступила в редакцию: 11.07.2020

Аннотация. При помощи нестационарной теории функционала плотности изучены электронные состояния молекулы флуоресцентного красителя акридинового оранжевого в катионной (протонированной) и нейтральной формах в водном растворе. Исследованы переходы между этими состояниями, соответствующие поглощению молекул красителя в видимой области спектра. Вычислены и проанализированы с точки зрения теории сольватохромизма дипольные моменты основного и возбужденных состояний.

Ключевые слова: акридиновый оранжевый, нестационарная теория функционала плотности, модель поляризуемой сплошной среды, электронные переходы, молекулярные орбитали, сольватохромизм.

ВВЕДЕНИЕ

Акридиновый оранжевый (3,6-диметиламиноакридин, АО – рис. 1) – флуоресцентный краситель, который широко используется на практике в течение многих лет.

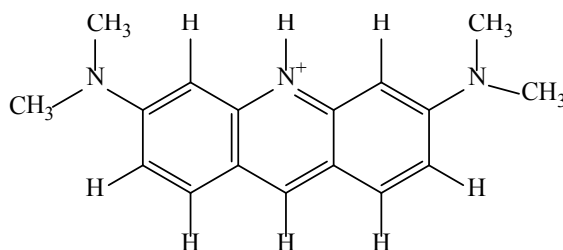


Рисунок 1. Структурная формула катиона АО

Основными направлениями его применения являются окрашивание тканей и клеток, зондирование различных систем и фотодинамическая терапия. В частности, АО используется как оптический зонд для исследования свойств мембран и мицелл поверхностно-активных веществ. Фотодинамическое действие АО на клетки обусловлено его связыванием с ДНК и индуцированным им переходом кислорода в синглетное состояние.

Связывание АО с нуклеиновыми кислотами интенсивно исследуется экспериментально на протяжении многих лет, в основном, оптическими методами. Молекула АО может образовывать комплекс с одно- и двухнитевыми молекулами нуклеиновых кислот в основном посредством интеркаляции. При интеркаляции в двойную спираль ДНК максимум испускания АО в водном растворе смещается от 514 нм до 530 нм, а при связывании с однонитевой РНК – до 640 нм [1]. При этом АО может использоваться как флуоресцентный зонд для изучения комплексообразования с ДНК других соединений.

Кроме нуклеиновых кислот, АО способен эффективно связываться с аминокислотами и белками, органическими крупными и малыми молекулами, что также в основном исследовалось при помощи оптических экспериментов. В случае последних наибольший интерес представляет фотоиндуцированные переносы заряда и энергии в гетерокомплексах и обусловленное им изменение флуоресценции.

Агрегация АО исследована достаточно подробно – как в растворах, так и в кристалле, на поверхности глины, белкового комплекса, мицелл поверхностно-активных веществ. Разбавленный водный раствор АО (мономерная форма) имеет максимум поглощения $\lambda_{\text{max}}=492$ нм, при увеличении концентрации максимум поглощения смещается до $\lambda_{\text{max}}=465$ нм (димер), изобестической точке соответствует 472 нм. При концентрации выше $(4...5)\times 10^{-5}$ М максимум соответствует $\lambda_{\text{max}}=450$ нм (агрегаты высших порядков), а изобестическая точка исчезает. Агрегация АО в водном растворе очень сильна (константа димеризации по данным разных авторов $K_d \approx 15000$ М), и поэтому растворы АО не подчиняются закону Бэра [2].

При $\text{pH} < 10$ молекула АО протонируется и находится в растворе в кислотной форме (катион) с $\lambda_{\text{max}}=492$ нм (рис. 1). В сильнощелочной среде ($\text{pH} > 10$) АО существует в виде нейтрального основания с $\lambda_{\text{max}}=435$ нм [3]. Для получения раствора основания АО в протонном растворителе необходимо добавление щелочи; апротонный растворитель должен быть тщательно очищен от протонных примесей: даже следов последних достаточно для протонирования нейтральных молекул АО. Нейтральная форма АО не агрегирует в воде и органических

растворителях [2,3], поэтому ее растворы подчиняются закону Бэра. Следовательно, в интенсивной агрегации катионов АО важную роль играет взаимодействие их дипольных моментов.

Выполнено значительное число исследований оптических свойств АО. Данный краситель проявляет метакромизм, т.е. максимумы поглощения и испускания АО существенно зависят от его ближайшего молекулярного окружения, т.е. от связанных с ним молекул. На этом явлении основано практическое использование АО как оптического зонда (см. выше). В то же время сольватокромизм АО (как кислотной AON^+ , так и основной AO^0 форм) весьма слаб. При увеличении полярности растворителя максимумы поглощения и испускания и незначительно смещаются в длинноволновую область (батохромный сдвиг). Это свидетельствует о большей стабилизации растворителем возбужденного состояния молекулы по сравнению с основным. Следовательно, дипольный момент АО в возбужденном состоянии должен быть больше, чем в основном [4].

Несмотря на долгую историю экспериментальных исследований оптических свойств АО, до сих пор не дано их последовательное теоретическое объяснение. Экспериментальное и теоретическое изучение основного и возбужденного состояний AON^+ было выполнено в [5]. В [6] вычислены ИК спектры поглощения AON^+ . В [7] методами квантовой химии в приближении PPP (Pariser-Pople-Parr) было установлено, что для AON^+ поглощение в УФ части спектра приводит к поляризации молекулы поперек хромофора, а в видимой - вдоль хромофора. Однако этот результат противоречит выводам [8,9]. Оптические спектры АО до сих пор не вычислены теоретически. В настоящей работе при помощи нестационарной теории функционала плотности (Time-Dependence Density Functional Theory, TD-DFT) согласно методике [10] нами выполнен расчет фотоиндуцированных электронных переходов в молекулах AON^+ и AO^0 в водном растворе.

МЕТОДЫ

Исходная пространственная структура молекулы АО была взята из базы данных <http://www.chemspider.com> (ChemSpider ID 56136). Добавление атомов водорода и их предварительная оптимизация выполнялись при помощи программы HyperChem8.0. Все основные вычисления выполнялись при помощи программного пакета Gaussian16. Визуализация пространственных структур и поверхностей выполнена при помощи пакета GaussView. Водное окружение задавалось неявно при помощи модели поляризуемой сплошной среды (Polarizable Continuum Model-PCM), адаптированной для TD-DFT [11,12]. Ее особенностью является совместное использование равновесной и неравновесной сольватации. При поглощении фотона молекулой растворенного вещества, находящегося в основном состоянии S_0 (координаты ядер GS на рис. 2) согласно принципу Франка-Кондона в ней происходит перераспределение электронной плотности при неизменных положениях ядер, т.е. молекула растворенного вещества переходит в возбужденное неравновесное (Франк-Кондон, FC) состояние (вертикальный переход «поглощение» на рис. 2). При этом аналогичный процесс (поляризация при неподвижных ядрах) происходит в ближайшей сольватной оболочке (неравновесная сольватация).

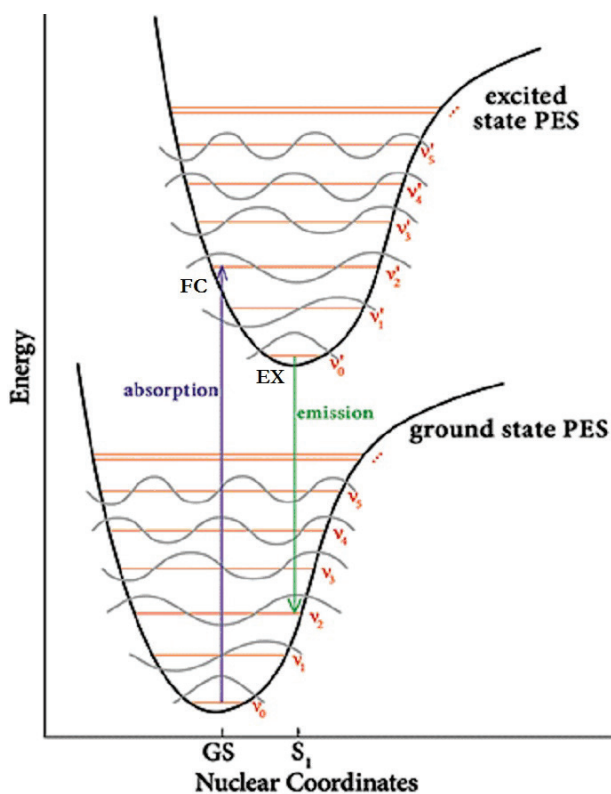


Рисунок 2. Энергетические диаграммы электронных и колебательных переходов [10]

После этого система «растворенное вещество-растворитель» релаксирует к равновесному возбужденному состоянию (EX) с координатами ядер S_1 (рис. 2) путем смещения ядер и соответствующего этому перераспределения электронной плотности (равновесная сольватация). Из состояния S_1 при флуоресценции молекула может испустить фотон (вертикальный переход «поглощение» на рис. 2). В настоящей работе квантовохимический расчет AOH^+ и AO^0 выполнялся на уровне теории X3LYP/6-31G(d,p), который показал наилучшее совпадение расчетных максимумов поглощения с экспериментальными для водных растворов обеих форм красителя. Функционал X3LYP [13] представляет собой существенно усовершенствованную версию популярнейшего, но устаревшего функционала B3LYP.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На уровне теории X3LYP/6-31G(d,p) катион AOH^+ имеет 400 молекулярных орбиталей (МО), из которых 71 занята, а 329 свободны. Таким образом, МО №71 является наивысшей занятой (HOMO), а МО №72 – наименьшей незанятой (LUMO). Нейтральная форма AO^0 содержит 395 МО, из которых также 71 занята, а 324 свободны. Как упоминалось выше, водный раствор катиона AOH^+ имеет максимум поглощения в видимой области $\lambda_{max}=492$ нм ($\pi \rightarrow \pi^*$ переход). Согласно нашим расчетам, он обусловлен, главным образом, синглетным переходом HOMO→LUMO. При этом максимум поглощения водного раствора нейтральной формы AO^0 $\lambda_{max}=435$ нм определяется переходом HOMO→(LUMO+1) (табл. 1).

Таблица 1. Расчетные фотоиндуцированные переходы в протонированной и нейтральной формах красителя

AOH ⁺				
Переход	Задействованные орбитали	Вклад, %	Сила осциллятора <i>f</i>	Энергия перехода (эВ/нм)
S ₀ →S ₁	HOMO→LUMO	98	0,8823	2,84/437
	(HOMO-1)→(LUMO+1)	2		
S ₀ →S ₂	(HOMO-1)→LUMO	98	0,0002	3,05/407
S ₀ →S ₃	(HOMO-2)→LUMO	73	0,0185	4,06/305
	(HOMO-1)→(LUMO+1)	24		
AO ⁰				
S ₀ →S ₁	HOMO→LUMO	99	0,0085	2,93/424
S ₀ →S ₂	HOMO→(LUMO+1)	5	0,5132	3,09/402
	(HOMO-1)→LUMO	94		
S ₀ →S ₃	(HOMO-3)→LUMO	99	0,0009	4,04/307

Распределение электростатического потенциала в основном и возбужденных состояниях вблизи поверхности АО показано на рисунке 2 (оттенки красного соответствуют положительным значениям потенциала, синего – отрицательным).

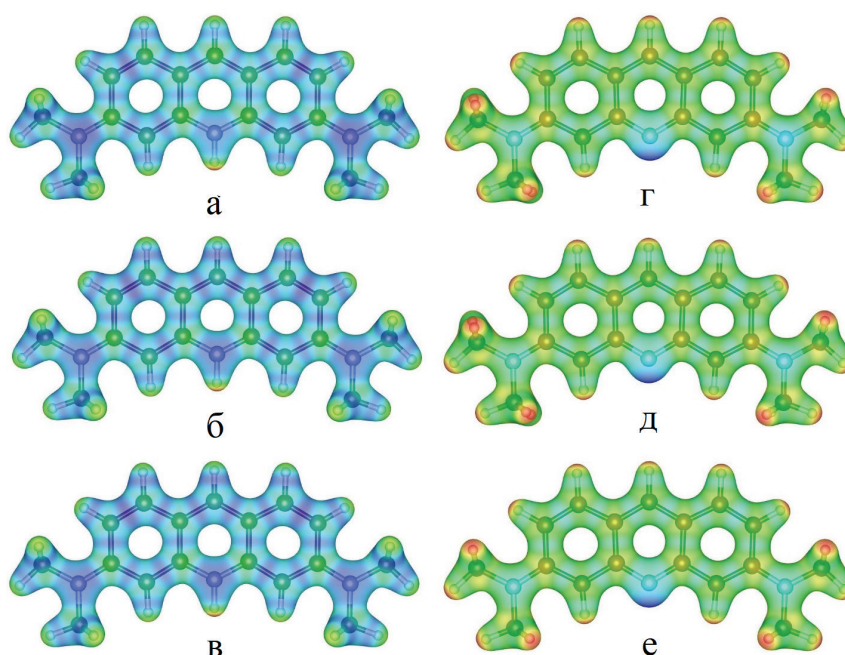
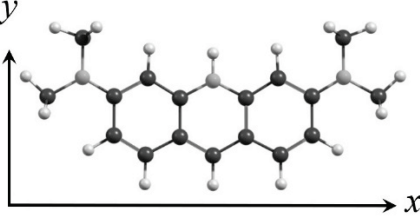


Рисунок 3. Визуализация электростатического потенциала молекул AOH^+ и AO^0 соответственно в основном (а,г), франк-кондоновском (б,д) и равновесном возбужденном (в,е) состояниях

Как видно из рисунка 3, данное распределение существенно различно для протонированной и непротонированной форм красителя. В то же время, между собой основное и возбужденные состояния для данной формы молекулы отличаются незначительно. Это свидетельствует о незначительном внутримолекулярном переносе заряда при фотовозбуждении как AOH^+ , так и AO^0 .

Результаты расчета дипольных моментов AOH^+ и AO^0 (табл. 2) согласуются с экспериментальными результатами и теоретическими результатами других авторов [5] и качественно соответствуют стандартной теории сольватохромизма (см. ВВЕДЕНИЕ): $\mu_{\text{gs}} < \mu_{\text{ex}}$.

Таблица 2. Расчетные дипольные моменты (Д) катионной и нейтральной форм красителя

			
Координатные оси направлены вдоль главных осей инерции молекул			
Дипольный момент	Основное состояние	Франк-кондоновское состояние	Равновесное возбужденное состояние
AOH^+			
μ_x	0,004	0,002	0,002
μ_y	-2,48	-4,87	-4,86
μ_z	0,0005	0,0004	0,0001
μ	2,48	4,87	4,86
AO^0			
μ_x	-0,01	0,01	-0,008
μ_y	0,75	-1,81	-2,00
μ_z	0,0008	0,0006	0,0000
μ	0,75	1,81	2,00

ВЫВОДЫ

1. Поглощение света протонированной формой AOH^+ соответствует электронному переходу $S_0 \rightarrow S_1$, $\text{HOMO} \rightarrow \text{LUMO}$, а нейтральной $\text{AO}^0 - S_0 \rightarrow S_2$, в основном ($\text{HOMO}-1 \rightarrow \text{LUMO}$) и, в значительно меньшей степени, $\text{HOMO} \rightarrow (\text{LUMO}+1)$.
2. Распределение электронной плотности и электростатического потенциала существенно различаются для AOH^+ и AO^0 .
3. Фотоиндуцированный перенос заряда незначителен как для AOH^+ , так и для AO^0 .
4. Расчетные дипольные моменты для AOH^+ и AO^0 согласуются с экспериментальными данными других авторов и качественно соответствуют стандартной теории сольватохромизма.

Список литературы / References:

1. Darzynkiewicz Z. Differential Staining of DNA and RNA in Intact Cells and Isolated Cell Nuclei with Acridine Orange. *Methods Cell Biol.*, 1990, vol. 33, pp. 285-298.
2. Costantino L., Guarino G., Ortona O., Vitagliano V. Acridine Orange Association Equilibrium in Aqueous Solution. *J. Chem. Eng. Data*, 1984, vol. 29, pp. 62-66.
3. Ferguson J., Mau A.W.H. Absorption studies of acid-base equilibria of dye solutions. *Chem. Phys. Lett.*, 1972, vol. 17, pp. 543-546.
4. Reichardt C. Solvatochromic Dyes as Solvent Polarity Indicators. *Chem. Rev.*, 1994, vol. 94, pp. 2319-2358.
5. Sharma V.K., Sahare P.D., Rastogi R.C., Ghoshal S.K., Mohan D. Excited state characteristics of acridine dyes: acriflavine and acridine orange. *Spectrochim. Act. A.*, 2003, vol. 59, pp. 1799-1804.
6. Lagutschenkov A., Dopfer O. Infrared spectrum of a protonated fluorescence dye: Acridine orange. *J. Mol. Spectr.*, 2011, vol. 268, pp. 66-77.
7. Ito H., I'Haya Y.J. The electronic structures and spectra of proflavine, acridine orange, and their DNA complexes. *Int. J. Quant. Chem.*, 1968, vol. 2, pp. 5-21.
8. Yukio M., Kiwamu Y. Film Dichroism. II. Linearly-polarized Absorption Spectra of Acridine Dyes in the Stretched Poly (vinyl alcohol) Films. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1979, vol. 52, pp. 3163-3170.
9. Kiwamu Y., Mitsuaki S. Film Dichroism. VI. Linearly-polarized Absorption Spectra of Neutral and Divalent 3,6-Diaminoacridine Dyes in the Stretched Poly (vinyl alcohol) Film. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1983, vol. 56, pp. 55-59.
10. Foresman J.B., Frisch A.E. Exploring Chemistry with Electronic Structure Methods, 3rd ed. - Gaussian, Inc., Wallingford, CT. 2015.

11. Cossi M., Barone V. Time-dependent density functional theory for molecules in liquid solutions. *J. Chem. Phys.*, 2001, vol. 115, pp. 4708-4717.
12. Scalmani G., Frisch M.J. Continuous surface charge polarizable continuum models of solvation. I. General formalism. *J. Chem. Phys.*, 2010, vol. 132, p. 114110.
13. Xu X., Goddard W.A. The X3LYP extended density functional for accurate descriptions of nonbond interactions, spin states, and thermochemical properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004, vol. 101, pp. 2673-2677.

ELECTRONIC STATES OF ACRIDINE ORANGE IN AQUEOUS SOLUTION

Kostyukova L.O.¹, Leontyeva S.V.¹, Voronin D.P.², Rybakova K.A.², Buchelnikov A.S.², Kostyukov V.V.²

¹ Nakhimov Black Sea Higher Naval School
Dybenko st., 1a, Sevastopol, 299028, Russia

² Sevastopol State University

Universitetskaya str., 33, Sevastopol, 299053, Russia; e-mail: viktor_kostukov@mail.ru

Abstract. The electronic states of the acridine orange fluorescent dye molecule in cationic (protonated) and neutral forms in an aqueous solution were studied by the time-dependence density functional theory. Transitions between these states corresponding to absorption of dye molecules in the visible region of the spectrum are investigated. The dipole moments of the ground and excited states are calculated and analyzed from the point of view of the theory of solvatochromism.

Key words: acridine orange, time-dependence density functional theory, polarizable continuum model, electronic transitions, molecular orbitals, solvatochromism.