

Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение высшего образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
Институт инженерной физики и радиоэлектроники  
Базовая кафедра фотоники и лазерных технологий

УТВЕРЖДАЮ  
Заведующий баз.каф. ФИЛТ  
\_\_\_\_\_ А.Н. Втюрин  
«\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2020 г.

## МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

**Динамика населенностей ионных форм флуоресцеина в протонном  
растворителе в основном и возбужденном состояниях**

16.04.01 Техническая физика

16.04.01.02 Оптическая физика и квантовая электроника

Научный руководитель	профессор, д-р физ.-мат. наук	Е.А. Слюсарева
Выпускник		В.И. Третьякова
Рецензент	зав.каф., д-р физ.-мат. наук	А.И. Лямкин

Красноярск 2020

## **РЕФЕРАТ**

Выпускная квалификационная работа по теме «Динамика населеностей ионных форм флуоресцина в протонном растворителе в основном и возбужденном состояниях» содержит 40 страниц текстового документа, 1 приложение, 15 использованных источников, 10 иллюстраций, 3 таблицы и 23 формулы.

**ВОДОРОДНЫЙ ПОКАЗАТЕЛЬ, ИОННАЯ ФОРМА, КОНСТАНТА ДИССАЦИАЦИИ, ИОННОЕ РАВНОВЕСИЕ, ВОЗБУЖДЕННОЕ СОСТОЯНИЕ, ФОТОИНДУЦИРОВАННЫЙ ПЕРЕНОС ПРОТОНА, ФЛУОРЕСЦЕИН, МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ, ЯЗЫК MATLAB.**

Цель – моделирование населеностей ионных форм флуорофора с многоступенчатой диссоциацией в основном и возбужденном состоянии.

Задачи: создание математической модели и реализация алгоритма на языке MATLAB, апробация разработанной модели на примере флуоресцина, анализ эффективности фотоиндуцированного переноса протона.

В результате была создана математическая модель ионного равновесия флуорофора с многоступенчатой диссоциацией (в общем случае) и разработан алгоритм программы на языке MATLAB. Благодаря разработанной компьютерной программе, которая испытана и проверена на точность на примере анализа населеностей ионных форм флуоресцина в основном состоянии, впервые были смоделированы концентрации ионных форм красителя в возбужденном состоянии.

Проведен анализ направленности и эффективности переноса протона в возбужденном состоянии в зависимости от pH. Выявлены основные закономерности поведения ионных равновесий, а также выявлен наиболее перспективный диапазон pH с точки зрения применения в биомедицинских исследованиях.

## СОДЕРЖАНИЕ

Введение.....	4
1 Литературный обзор .....	6
1.1 Ионные равновесия органических молекул .....	6
1.2 Флуоресцеин как пример системы с многоступенчатой диссоциацией.....	8
1.3 Перенос протона в возбужденном состоянии .....	11
1.4 Роль ионных равновесий в технике и биологии .....	14
1.5 Водородный показатель ряда физиологических жидкостей .....	16
1.6 Методы моделирования.....	18
2 Математическое моделирование как метод изучения динамики населенностей многокомпонентных систем .....	20
3 Результаты и их обсуждение.....	22
3.1 Математическая модель .....	22
3.2 Динамика населенностей ионных форм флуоресцеина в зависимости от pH в основном состоянии .....	25
3.3 Динамика населенностей ионных форм флуоресцеина в зависимости от pH в возбужденном состоянии.....	27
3.4 Направление и эффективность переноса протона в возбужденном состоянии .....	30
Заключение .....	34
Список использованных источников .....	35
Приложение А Алгоритм моделирования .....	37

## **ВВЕДЕНИЕ**

Кислотно-щелочной баланс межклеточной жидкости и самой клетки обеспечивает здоровую жизнедеятельность организма. Поэтому активность ионов водорода (рН) является очень важным индикатором в биомедицинских исследованиях. Так отклонения рН крови человека от нормы (7,35 – 7,45) наблюдается при некоторых распространенных типах заболеваний – таких как злокачественные опухоли или болезнь Альцгеймера. Таким образом, актуальной проблемой является потребность в выявлении малейших, незначительных колебаний кислотно-щелочного баланса клетки, что позволит диагностировать болезни на более ранних стадиях.

Флуороновые красители, в том числе флуоресцеин широко используются в биологии и медицине в качестве различных маркеров для мониторинга внутриклеточных процессов. Изменение рН в окружении флуоресцентной метки приводит к сдвигу ионного равновесия, то есть меняется соотношение между ионными формами красителя, что в свою очередь влияет на интенсивность флуоресценции, которая и служит сигналом для медицинского персонала, который проводит исследование.

Разница между двумя поведениями ионных равновесий в основном и возбужденном состояниях описывает явление фотоиндуцированного переноса протона. Этот процесс имеет высокую практическую значимость в биомедицинских исследованиях, так как на его основе сегодня ведутся работы по созданию высокоточного биосенсорного датчика, чувствительного к малейшему колебанию ионного равновесия. Помимо высокой точности такой биодатчик обладает рядом преимуществ, а именно неинвазивность метода исследования и возможность проведения измерений в реальном времени. Именно с этой точки зрения изучение динамики населенностей ионных состояний является актуальной, насущной задачей современной науки, и открывает возможности создания таких сенсоров, использующих перенос протона в возбужденном состоянии.

Цель научно-исследовательской работы – моделирование населенностей ионных форм флуорофора с многоступенчатой диссоциацией в основном и возбужденном состояниях.

Для достижения цели поставлены следующие задачи:

- создание математической модели и реализация алгоритма на языке MATLAB;
- апробация разработанной модели на примере флуоресцеина;
- анализ эффективности фотоиндуцированного переноса протона.

# 1 Литературный обзор

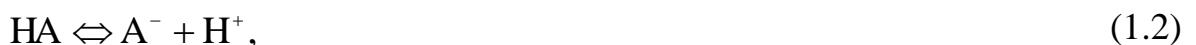
## 1.1 Ионные равновесия органических молекул

Ионные состояния красителей меняются в зависимости от кислотности раствора. Для количественного выражения кислотности используется показатель pH – единица измерения активности ионов водорода в любом веществе. Активность водорода определяется как отрицательный десятичный логарифм концентрации водородных ионов, выраженной в молях на литр (1.1).

$$\text{pH} = -\log[\text{H}^+], \quad (1.1)$$

где  $\text{H}^+$  – ион водорода.

Концентрация протонов может быть определена при помощи оптических методов с использованием pH-индикаторов, спектральные характеристики которых зависят от окружения. Кислотно-основное равновесие pH-индикаторов имеет вид (1.2).



где  $\text{A}^-$  – анион кислоты;

$\text{HA}$  – равновесная концентрация в растворе частицы  $\text{HA}$ .

Кислотно-основная диссоциация в растворах обычно является обратимым процессом, поэтому каждую из возможных реакций диссоциации характеризует константа равновесия  $K_a$ , равная отношению произведения концентрации диссоциированных ионов к концентрации недиссоциированных молекул электролита (1.3). Константа равновесия показывает, во сколько раз скорость диссоциации больше скорости ассоциации. Чем больше  $K_a$ , тем сильнее диссоциирует электролит, то есть, тем легче он распадается на ионы, которых в

растворе становится много. Константа диссоциации зависит от природы электролита и растворителя, температуры и не зависит от концентрации раствора. Так совокупность констант определяет равновесные концентрации ионных форм при различном значении pH.

$$K_a = \frac{[A^-][H^+]}{HA}, \quad (1.3)$$

где  $K_a$  – константа равновесия.

Равновесные концентрации кислотных и основных форм можно определить с помощью уравнения Хендерсона-Хассельбаха (1.4).

$$pH = pK_a + \log_{10} \left( \frac{A^-}{H^+} \right). \quad (1.4)$$

При этом  $pK_a$  определяется следующим образом (1.5).

$$pK_a = -\log_{10} K_a. \quad (1.5)$$

На рисунке (1) представлен график, в котором сигмоидальная кривая представляет равновесие протонированной и депротонированной форм флуорофора при одноступенчатой диссоциации. Пунктирной линией показана точка перегиба в том месте, где и находится равновесная точка – константа диссоциации.

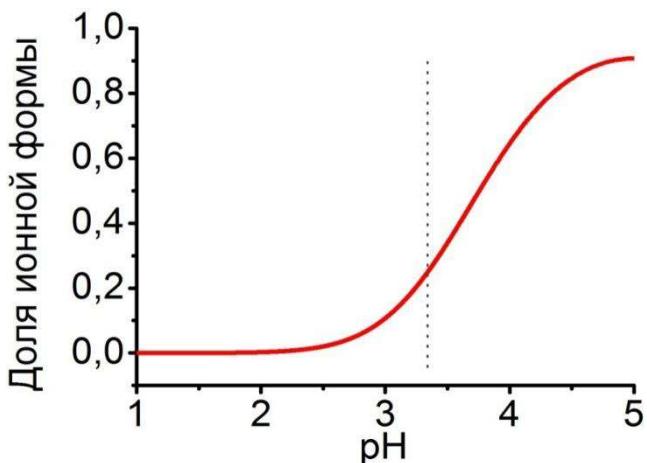


Рисунок 1 – Равновесная концентрация при одноступенчатой диссоциации

Флуороновые красители могут принимать различные ионные формы благодаря процессу диссоциации. Более подробно этот процесс рассмотрен в следующей главе на примере флуоресцеина.

## 1.2 Флуоресцеин как пример системы с многоступенчатой диссоциацией

Флуороновые красители представляют собой гомологичный ряд соединений на основе флуоресцеина с постепенным замещением атомов водорода атомами галогенов. Замещение атомов водорода более тяжелыми атомами в ряду флуороновых красителей приводит к перераспределению вероятности излучательных и безызлучательных переходов.

В данной главе будет описан трехступенчатый процесс образования катиона флуоресцеина путем протонирования. Протирование (протонизация) – это присоединение протона к атому, молекуле или иону, в ходе которого изменяется зарядprotoфильной частицы (основания). Ионы  $R^{2-}$  протонируются, последовательно превращаясь в формы  $HR^-$ ,  $H_2R$  и  $H_3R^+$ .

Итак, диссоциация флуоресцеина в растворах (за исключением экстремально кислых и щелочных сред) протекает в три ступени (1.6 – 1.8).



Используемая нумерация констант в общем виде выглядит следующим образом: константа  $\text{p}K_{a(1-z)}$  отвечает равновесию  $\text{H}_i\text{R}^z \leftrightarrow \text{H}_{i-1}\text{R}^{z-1} + \text{H}^+$ . Катион флуоресцина  $\text{H}_3\text{R}^+$  является, таким образом, трехосновной кислотой. Принятое обозначение  $\text{p}K_a$  используется для констант диссоциации, не учитывающих таутомеризацию ионных и молекулярных форм (их называют брутто-константами).

На рисунке 2 представлены различные ионные формы флуоресцина.

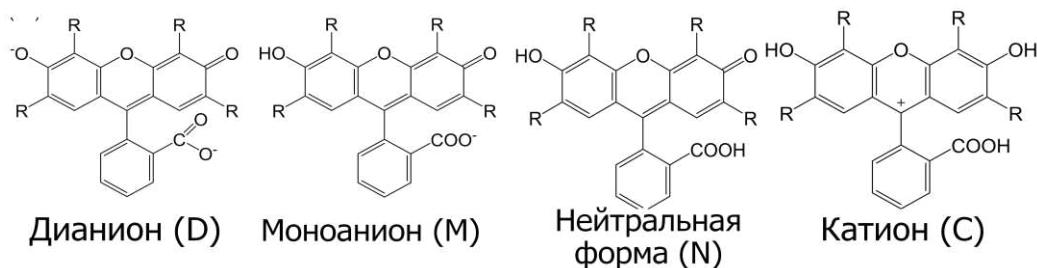


Рисунок 2 – Ионные формы флуоресцина

Окисление дианиона флуоресцина сначала протонирует фенол до возникновенияmonoаниона флуоресцина, затем карбоксильную кислоту, формируя нейтральную форму флуоресцина. Дальнейшее окисление приводит к возникновению катиона флуоресцина. Таким образом, ионные формы образуются последовательно, одна за другой и отличаются друг от друга зарядом. Дианион ( $\text{R}^{2-}$ ) и monoанион ( $\text{HR}^-$ ) – отрицательно заряжены, нейтральная форма ( $\text{H}_2\text{R}$ ) имеет нулевой заряд, так как к отрицательно заряженным ионам кислорода присоединился ион водорода, потому форма и названа нейтральной, что количество положительно заряженных частиц равно отрицательно заряженными. Катион отличается от нейтрального состояния еще

на единицу заряда и это уже положительно заряженная ионная форма ( $\text{H}_3\text{R}^+$ ), так как имеет избыток положительных зарядов над отрицательными.

В зависимости от значений  $pK_a$  схема реакции распада может быть представлена по разным моделям (рис. 3). В данной работе была рассмотрена модель Е, когда нейтральная форма флуоресцеина представляет собой смесь трех таутомерных форм: лактон (L), цвиттерион (Z) и хинойд (Q). Все таутомеры являются нейтральными по своему заряду, то есть у каждого число положительно и отрицательно заряженных частиц равно. Они отличаются лишь тем, к какому из отрицательно заряженных ионов кислорода произошло присоединение положительно заряженного водорода, что наглядно представлено на рисунке 4.

MODEL	MECHANISM
A	$\text{C} \xrightleftharpoons{K_c} \text{N} \xrightleftharpoons{K_n} \text{MI} \xrightleftharpoons{K_m} \text{D}$
B	$\text{C} \rightleftharpoons \text{L} \rightleftharpoons \text{MI} \rightleftharpoons \text{D}$
C	$\text{C} \rightleftharpoons \text{Q} \rightleftharpoons \text{MI} \rightleftharpoons \text{D}$
D	$\text{C} \rightleftharpoons \text{Z} \rightleftharpoons \text{MI} \rightleftharpoons \text{D}$
E	$\text{C} \rightleftharpoons \text{Q} \rightleftharpoons \text{MI} \rightleftharpoons \text{D}$ $\text{C} \rightleftharpoons \text{Z} \rightleftharpoons \text{MI} \rightleftharpoons \text{D}$

Рисунок 3 – Модели реакции распада флуоресцеина. Задано из [8]



Рисунок 4 – Таутомеры нейтральной формы флуоресцина

Таутомеры одного и того же ионного состояния имеют разную структуру и спектральные свойства, поэтому для лучшего понимания полной картины ионного равновесия наиболее ценными являются микроконстанты диссоциации, которые характеризуют частные равновесия для отдельных таутомерных форм. Они обозначаются через  $pK_a$ . В рамках модели Е наиболее достоверные значения микроконстант диссоциации флуоресцина в основном состоянии были получены Клонисом и соавторами [8] (рисунок 5).

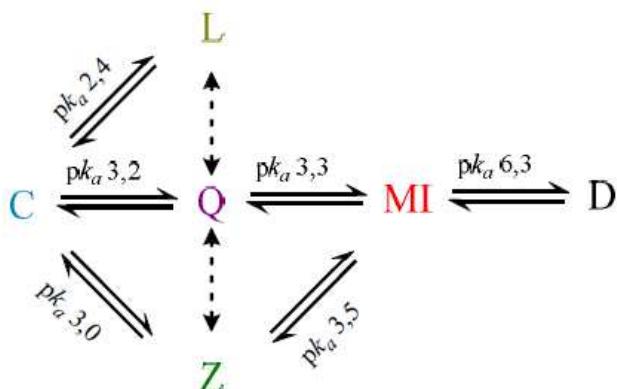


Рисунок 5 – Схема таутомерных и ионных равновесий флуоресцина с указанием  $pK_a$  соответствующей реакции

### 1.3 Перенос протона в возбужденном состоянии

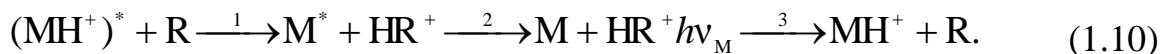
Молекула может релаксировать из фотовозбужденного в основное состояние путем безызлучательной передачи энергии другой молекуле. При рассмотрении возбужденного состояния в качестве конкурентного испусканию

процесса по отношению к основному состоянию следует рассматривать фотоиндуцированный перенос протона.

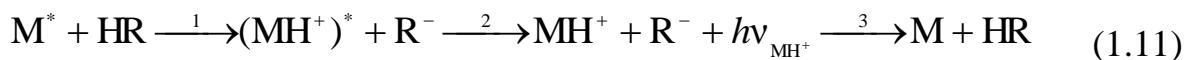
В подходящих растворителях кислотные группы молекул красителей подвергаются диссоциации. В результате этого процесса образуется сольватированный ион водорода, а нейтральная молекула красителя превращается в анион. Перенос протона происходит с участием молекул ближайшего окружения (растворителя), которые выступают донором (акцептором) протона в этом процессе. Обозначив через  $\text{MH}$  молекулу красителя, данную реакцию можно изобразить в следующем виде (1.9).



Фотоотдача возбужденной молекулой  $\text{MH}^+$  протона  $\text{H}^+$  основанию  $\text{R}$  (1), испускание флуоресценции молекулой  $\text{M}$  (2) и присоединение протона от кислоты  $\text{HR}$  невозбужденной молекулой (3) могут быть проиллюстрированы в рамках следующей схемы (1.10).



Фотоиндуцированное присоединение  $\text{H}^+$  (1), испускание молекулой  $\text{MH}^+$  кванта флуоресценции (2) и отдача протона молекулой  $\text{MH}^+$  (3) в аналогичных обозначениях выглядит следующим образом (1.11).



Существует несколько основных спектрально-флуоресцентных способов изучения переноса протона в возбужденном состоянии. Рассмотрим два из них: цикл Фёрстера и флуоресцентное титрование.

Цикл Фёрстера. Связь между сдвигом частоты 0-0 перехода, сопровождающим протонирование ( $v_{\text{MH}^+} - v_{\text{M}}$ ), и разницей показателей константы диссоциации  $\Delta pK_a$  между ее величиной в основном и возбужденном состояниях без учета незначительных энтропийных эффектов формализуется в формулу Фёрстера и описывается следующим образом (1.12).

$$\Delta pK_a = pK_a - pK_a^* = h \frac{v_{\text{MH}^+} - v_{\text{M}}}{2,3kT}, \quad (1.12)$$

где  $h$  – постоянная Планка;

$k$  – постоянная Больцмана;

$T$  – температура.

Таким образом, для того, чтобы выполнить расчет для конкретной молекулы, необходимо знать  $pK_a$  в основном состоянии и меру разностей энергий между электронными уровнями основного и возбужденного состояния протонированной и депротонированной форм. Определить константу диссоциации в возбужденном состоянии сложнее из-за проблемы нахождения энергии 0-0 переходов. Но даже если нет возможности определить точное значение  $pK_a^*$ , то с помощью цикла Фёрстера удается найти направление изменения показателя константы диссоциации при возбуждении, что является важной характеристикой.

Флуоресцентное титрование. Значение  $pK_a^*$ , рассчитанное по формуле Фёрстера, дает оценку величине диапазона кислотности, в котором возможен процесс переноса протона. Но это не гарантирует, что фотоиндуцированный перенос протона кинетически реализуем, то есть наиболее вероятен по сравнению с другими конкурирующими процессами в возбужденном состоянии. Дополнительную информацию могут дать стационарные спектры флуоресценции. Для этого необходимо измерить спектры испускания протонированной и депротонированной форм при различных значениях  $\text{pH}$ .

Точка перегиба кривых зависимости интенсивности флуоресценции от кислотности дает первое приближение к значению  $pK_a^*$ . Использование этого метода предполагает, что равновесие между протонированной и депротонированной формами успевает установиться за время жизни флуоресцентного состояния и что времена жизни  $M$  и  $MH^+$  равны.

#### **1.4 Роль ионных равновесий в технике и биологии**

Кислотно-основное состояние (КОС) – один из основных показателей, характеризующих функционирование организма человека как единого целого. Кислотно-основное состояние определяется соотношением между водородными и гидроксильными ионами. Истинная кислотность зависит от активности и концентрации ионов водорода ( $H^+$ ), а щелочная реакция (реакция основания) – от концентрации ионов гидроксила ( $OH^-$ ). Концентрация ионов водорода ( $pH$ ) нейтрального раствора равна 7,  $pH$  кислого раствора  $< 7$ ,  $pH$  щелочного раствора  $> 7$ . В здоровом организме  $pH$  крови колеблется в узких пределах – 7,35-7,45 за счет постоянного образования в процессе обмена веществ щелочных и кислотно-реагирующих соединений.

Особая роль показателям КОС отводится в практике спортивной медицины при оценке контроля за эффективностью тренировочного процесса. Эти показатели могут быть использованы для выявления уровня энергообеспечения мышечной деятельности, функционального состояния сердечно-сосудистой и дыхательной систем, адаптации к спортивной нагрузке. Причинами нарушений КОС и ионного равновесия в организме при физической нагрузке могут быть длительная работа в гликолитическом режиме, анемия, недостаток бикарбонатов. Как следствие изменяется буферная емкость крови, происходит накапливание молочной кислоты ( $La$ ), сдвиг  $pH$  крови в кислую сторону (ацидоз). Решающую роль играет скорость увеличения концентрации молочной кислоты. Итогом запаздывания утилизации  $La$  становится резкое

снижение физической работоспособности спортсмена. Таким образом, снижение внутриклеточного рН, вызванное увеличенной концентрацией La, препятствует мышечному сокращению, снижает способность мышц к поддержанию силы.

Помимо повышенной физической нагрузки отклонения значений рН внутри клетки часто связаны с биологической дисфункцией. Протекание патологических процессов в организме может быть выражено развитием ацидоза или алкалоза (защелачивания). Так отклонения кислотности от нормы наблюдается при некоторых распространенных типах заболеваний – таких, как злокачественные опухоли и болезнь Альцгеймера. Таким образом, активность ионов водорода является важным показателем в биомедицинских исследованиях и других приложениях.

Многоступенчатая диссоциация красителей, затрагивающая структуру хромофорных групп, приводит к ярким зависимостям спектральных характеристик красителей от рН окружения. Разница между двумя поведениями ионных равновесий в основном и возбужденном состояниях описывает интересное с фундаментальной и прикладной точек зрения явление фотоиндуцированного переноса протона в возбужденном состоянии. Когда речь идет о процессах с участием фотовозбужденных состояний красителей, наиболее практически значимым их применением является использование в качестве чувствительных компонент сенсоров и различных маркеров. Зависимость эффективности переноса протона не только от самого флуорофора, но и от его протодонорного окружения открывает возможности создания сенсоров, использующих перенос протона в возбужденном состоянии. Преимуществами таких устройств является высокая чувствительность, присущая флуоресцентным методам, и возможность проведения измерений в реальном времени.

Чувствительный элемент биосенсора (в данном случае – флуорофор) должен отвечать ряду требований к химическим и спектральным свойствам. Во-первых, флуорофору должна быть присуща либо одноступенчатая, либо

многоступенчатая, но не перекрывающаяся в шкале pH диссоциация. Вторых, соседние протонированные/депротонированные формы должны характеризоваться флуоресценцией, максимально разнесенной в спектральной шкале и/или по временным параметрам, что необходимо для однозначной интерпретации аналитического сигнала флуоресценции. И, наконец, в актуальном диапазоне pH эффективность переноса протона должна регулироваться наличием ионной добавки, в роли которой в данном случае выступает сам аналит. При этом изменение эффективности переноса протона должно способствовать конкуренции с излучательным процессом. В данное время ведутся активные исследования, направленные на оптимизацию указанных требований, что является насущной задачей современной науки о красителях.

## **1.5 Водородный показатель ряда физиологических жидкостей**

Все физиологические жидкости организма (желудочный сок, плазма крови, внеклеточная, внутриклеточная и спинномозговая жидкости) представляют собой водные растворы. Компонентами данных систем является катионы и анионы сильных электролитов ( $K^+$ ;  $Na^+$ ;  $Mg^{2+}$ ;  $H_2PO_4^-$ ;  $HCO_3^-$ ;  $Cl^-$ ), а также органические соединения (глюкоза, полисахариды, белки), являющихся слабыми электролитами. Важными функциями электролитов организма являются: поддержание осмотического давления и значения ионной силы биологических жидкостей, влияние на биоэлектрические потенциалы, свертывание крови и другие функции.

Ранее мы выяснили, что особенную физиологическую активность проявляют ионы водорода и гидроксид-ионы, которые определяют кислотность внутренних сред организма, влияют на активность ферментов. Важным этапом в понимании многих физиологических явлений является рассмотрение свойств растворов электролитов и кислотно-основного состояния биологических жидкостей, которые позволяют объяснить механизм поддержания водно-

солевого баланса и определить нарушения работы различных систем организма на стадии диагностики заболевания. Значение pH различных биологических жидкостей и тканей тела человека можно представить в табличной форме для лучшей наглядности (таблица 1.1).

Таблица 1.1 – Значение pH различных биологических жидкостей и тканей тела человека

Наименование показателя	Значение показателя
1. Плазма крови	7,4±0,05
2. Слюна	6,35-6,85
3. Желудочный сок	1,5-2,0
4. Моча	4,8-7,5
5. Спинномозговая жидкость	7,4±0,05
6. Сок поджелудочной железы	7,5-8
7. Содержимое тонкой кишки	7-8
8. Желчь в пузыре	5,4-6,9
9. Молоко	6,6-6,9
10. Слезная жидкость	7,4±0,1
11. Кожа	6,2-7,5

Так, pH крови – одна из наиболее ограниченных физиологических констант организма. Сдвиг этого показателя хотя бы на 0,1 от нормы может привести к тяжелой патологии. При сдвиге pH крови на 0,2 развивается коматозное состояние, на 0,3 – человек погибает.

В лабораторных исследованиях интересны также показатели pH мочи и слюны. Результаты pH тестов мочи показывают, насколько хорошо организм усваивает минералы, такие как кальций, натрий, калий и магний, которые регулируют уровень кислотности в организме. Результаты тестирования pH слюны показывают активность ферментов пищеварительного тракта, особенно печени и желудка. Этот показатель дает представление о работе как всего организма в целом, так и отдельных его систем.

## **1.6 Методы моделирования**

Моделированием называется замещение одного объекта другим с целью получения информации о важнейших свойствах объекта-оригинала с помощью объекта-модели. Таким образом, оно может быть определено как представление объекта моделью для получения информации об этом объекте путем проведения экспериментов с его моделью. Если результаты моделирования подтверждаются и могут служить основой для прогнозирования процессов, протекающих в исследуемых объектах, то говорят, что модель адекватна объекту.

При моделировании, выборе и формулировке модели определяющими обстоятельствами являются объект, цель и метод (средства) моделирования.

Математические модели позволяют решать многие практические задачи, в том числе химические. Чтобы построить такую модель и работать с ней, необходимо овладеть рядом умений.

Формализация – построение модели объекта или явления, т. е. перевод конкретной задачи с естественного языка на математический язык формул, уравнений, неравенств, систем, структурных соотношений и их связей. Это выражается в выборе алгоритма для решения уравнений и неравенств, построении графиков и т. п.

Владение компьютерными технологиями – это создание программ, «переводящих» модель и алгоритм на доступный компьютеру язык. Их можно назвать «электронным» эквивалентом изучаемого объекта, пригодным для непосредственного испытания на «экспериментальной установке» – компьютере.

Интерпретация – перевод результатов с математического языка на язык исходной задачи, описание области применения полученных результатов.

Все эти мыслительные процессы составляют процесс математического моделирования.

Процесс построения математической модели объекта или явления состоит из нескольких этапов. Далее представлены основные этапы математического моделирования.

а) Построение модели. На этом этапе выбирается некоторый «нематематический» объект – явление природы, механизм химической реакции, молекулы вещества и т. д.

б) Решение математической задачи, к которой приводит модель. На этом этапе большое внимание уделяется разработке алгоритмов и численных методов решения задачи на персональном компьютере, при помощи которых результат может быть найден с необходимой точностью и за допустимое время.

в) Интерпретация полученных следствий из математической модели. На этом этапе создаются программы, «переводящие» модель и алгоритм эквивалентом изучаемого объекта, уже пригодным для непосредственного выведенных из модели на языке математики, интерпретируются на языке, принятом в данной области.

г) Проверка адекватности модели. На этом этапе выясняется, согласуются ли результаты эксперимента с теоретическими (расчетными) следствиями из модели в пределах определенной точности.

В результате исследования модели не только достигается поставленная цель, но и должна быть установлена всеми возможными способами адекватность – соответствие объекту и сформулированным предположениям.

Неадекватная модель может дать результат, сколь угодно отличающийся от истинного, и должна быть либо отброшена, либо соответствующим образом модифицирована.

д) Модификация модели. На этом этапе происходит усложнение либо обновление модели, чтобы она имела широкое практическое применение.

## **2 Математическое моделирование как метод изучения динамики населенностей многокомпонентных систем**

В данной работе методы математического моделирования реализованы с применением программного пакета MATLAB R2014a. MATLAB (сокращение от англ. «Matrix Laboratory») – пакет прикладных программ для решения задач технических вычислений. Он работает на большинстве современных операционных систем, включая Linux, Mac OS, Solaris и Windows. Язык MATLAB является высокоуровневым интерпретируемым языком программирования, включающим основанные на матрицах структуры данных, широкий спектр функций, интегрированную среду разработки, объектно-ориентированные возможности и интерфейсы к программам, написанным на других языках программирования.

Программы, написанные на MATLAB, бывают двух типов – функции и скрипты. Функции имеют входные и выходные аргументы, а также собственное рабочее пространство для хранения промежуточных результатов вычислений и переменных. Скрипты же используют общее рабочее пространство. Как скрипты, так и функции сохраняются в виде текстовых файлов и компилируются в машинный код динамически. Существует также возможность сохранять так называемые pre-parsed программы – функции и скрипты, обработанные в вид, удобный для машинного исполнения. В общем случае такие программы выполняются быстрее обычных, особенно если функция содержит команды построения графиков. Основной особенностью языка MATLAB являются его широкие возможности по работе с матрицами.

С помощью программного пакета MATLAB в рамках данной работы была создана математическая модель, с применением которой автоматизирован процесс расчета населенностей ионных форм флуоресцина как в основном, так и возбужденном состоянии, что позволяет анализировать динамику поведения ионных равновесий на различных диапазонах рН. Разработанная программа

представляет собой функции и скрипты, содержащие последовательный набор определенных команд.

Таким образом, с помощью созданной на языке MATLAB программы имеется возможность оперативного получения точных результатов расчета в виде массива данных, пригодного для использования в других программах, – например, таких как Microsoft Excel, Origin или текстовом документе (.txt). Также имеется возможность визуальной оценки и анализа результатов в виде графиков, которые наглядно позволяют увидеть динамические изменения. Так, меняя только входные данные, а именно константы равновесия и диапазон pH, мы можем быстро получать итоговые значения в формализованном виде и выводить графики.

### **3 Результаты и обсуждение**

#### **3.1 Математическая модель**

В данной работе рассмотрена схема реакции распада по модели Е (рисунок 3), когда нейтральная форма флуоресцина представляет собой смесь трех таутомерных форм: лактон (L), цвиттерион (Z) и хинойд (Q). Итак, мы наблюдаем шесть ступеней диссоциации. Модель многоступенчатой диссоциации значительно более сложная для анализа, нежели однодвухступенчатые модели, в связи с чем возникает необходимость в моделировании ионных состояний. Таким образом, важным этапом научной работы стало создание рабочей модели с целью автоматизации трудоемкого процесса расчета населенностей различных ионных форм.

Процесс диссоциации флуоресцина подразумевает определение константы равновесия на каждом из этапов образования катиона. Введем обозначения:

$K_{a_2}$  – константа равновесия при переходе от ионной формы дианиона к ионной форме моноаниона;

$K_{a_1}$  – константа равновесия при переходе от ионной формы моноаниона к нейтральной форме (хинойд);

$K_{a_0}$  – константа равновесия при переходе от нейтральной формы (хинойд) к ионной форме катиона;

$K_{a_3}$  – константа равновесия при переходе от моноанионной формы к нейтральной форме (цвиттерион);

$K_{a_4}$  – константа равновесия при переходе от нейтральной формы (цветтерион) к ионной форме катиона;

$K_{a_5}$  – константа равновесия при переходе от нейтральной ионной формы (лактон) к ионной форме катиона;

[D] – дианион;

[M] – моноанион;

[Q] – нейтральная форма (хинойд);

[Z] – нейтральная форма (цвиттерион);

[L] – нейтральная форма (лактон);

[C] – катион.

Таким образом, используя (1.3), при переходах от одной ионной формы к другой константы равновесия имеют вид (3.1 – 3.6).

$$K_{a2} = \frac{[D][H^+]}{[M]}; \quad (3.1)$$

$$K_{a1} = \frac{[M][H^+]}{[Q]}; \quad (3.2)$$

$$K_{a3} = \frac{[M][H^+]}{[Z]}; \quad (3.3)$$

$$K_{a0} = \frac{[Q][H^+]}{[C]}; \quad (3.4)$$

$$K_{a4} = \frac{[Z][H^+]}{[C]}; \quad (3.5)$$

$$K_{a5} = \frac{[L][H^+]}{[C]}. \quad (3.6)$$

Итак, введя константы равновесия, мы можем представить процесс изменения ионных форм флуоресцина в виде системы уравнений (3.7) и рассчитать населенности уровней при известных значениях pH.

$$\begin{cases} K_{a2}[M] - [H^+][D] = 0 \\ K_{a1}[Q] - [H^+][M] = 0 \\ K_{a0}[C] - [H^+][Q] = 0 \\ K_{a3}[Z] - [H^+][M] = 0 \\ K_{a4}[C] - [H^+][Z] = 0 \\ K_{a5}[C] - [H^+][L] = 0 \end{cases} \quad (3.7)$$

При расчетах также необходимо учитывать закон сохранения вещества (3.8).

$$[D] + [M] + [Q] + [Z] + [L] + [C] = 1 \quad (3.8)$$

Для того чтобы система линейных уравнений (3.8) имела решение матричным методом, ее необходимо преобразовать. Матричный метод может применяться в решении систем линейных уравнений, в которых число неизвестных равно числу уравнений, то есть систем линейных уравнений с квадратной матрицей коэффициентов при неизвестных. Другое условие применимости матричного метода – невырожденность матрицы коэффициентов при неизвестных, то есть неравенство нулю определителя этой матрицы. Систему линейных уравнений, при выполнении вышеприведенных условий, можно представить в матричном виде, а затем решить её путём отыскания обратной матрицы к матрице системы. Выразив одну из неизвестных переменных  $[D]$ , используя выражение (3.8) и произведя математическое преобразование, система уравнений (3.7) примет вид (3.9).

$$\begin{cases} K_{a2}[M] + [H^+][M] + [H^+][Q] + [H^+][C] + [H^+][Z] + [H^+][L] = [H^+] \\ K_{a1}[Q] - [H^+][M] = 0 \\ (K_{a0} - K_{a4})[C] - [H^+][Q] + [H^+][Z] = 0 \\ K_{a3}[Z] - [H^+][M] = 0 \\ K_{a5}[C] - [H^+][L] = 0 \end{cases} \quad (3.9)$$

Далее необходимо записать систему уравнений (3.9) в матричном виде. Обозначим отдельно как  $A$  матрицу коэффициентов при неизвестных и как  $b$  матрицу неизвестных  $[M]$ ,  $[Q]$ ,  $[Z]$ ,  $[C]$  и  $[L]$  как  $x$  матрицу свободных членов (правая часть уравнений), соблюдая равенство  $A \times b = x$ . Тогда система уравнений (3.9) в матричном выражении принимает следующий вид (3.10).

$$\begin{pmatrix} K_{a_2} + [H^+] & [H^+] & [H^+] & [H^+] & [H^+] \\ -[H^+] & K_{a_1} & 0 & 0 & 0 \\ 0 & -[H^+] & [H^+] & K_{a_0} - K_{a_4} & 0 \\ -[H^+] & 0 & K_{a_3} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & K_{a_5} & -[H^+] \end{pmatrix} \times \begin{pmatrix} [M] \\ [Q] \\ [Z] \\ [C] \\ [L] \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} [H^+] \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix} \quad (3.10)$$

### **3.2 Динамика населенностей ионных форм флуоресцина в зависимости от pH в основном состоянии**

На основе разработанной математической модели с применением программного пакета MATLAB R2014a было проведено компьютерное моделирование динамики населенностей различных ионных форм в основном состоянии. Апробация модели и проверка ее адекватности осуществлена также на примере флуоресцина.

Как мы рассмотрели ранее в пункте 1.5, под моделированием подразумевается проведение эксперимента с моделью конкретного объекта-оригинала. Так, в качестве эталонных значений для  $K_{a_2}$ ,  $K_{a_1}$ ,  $K_{a_0}$ ,  $K_{a_3}$ ,  $K_{a_4}$ ,  $K_{a_5}$  приняты значения, полученные из анализа данных спектральных свойств прототропных форм флуоресцина. Источником послужила статья, опубликованная в [8]. Согласно указанным данным константы равновесия принимают следующие значения (таблица 3.1).

Таблица 3.1 – Значения констант равновесия в основном состоянии

Наименование показателя	Значение показателя
1. $pK_{a2}$	6,3
2. $pK_{a1}$	3,3
3. $pK_{a0}$	3,2
4. $pK_{a3}$	3,5
5. $pK_{a4}$	3,0
6. $pK_{a5}$	2,4

Результаты моделирования представлены на рисунке 6.

Изъят рисунок

Рисунок 6 – Доли ионных форм флуоресцеина в основном состоянии при различных значениях pH

Чтобы определить адекватность проведенного эксперимента, следует провести сравнительный анализ полученных результатов с объектом-оригиналом (рисунок 7) [8]. Как видно, графики 6 и 7 близки. Таким образом, модель признается адекватной – соответствующей объекту-оригиналу. Из этого следует, что результаты моделирования подтверждаются, и данная работающая модель может быть применена для последующих исследований.

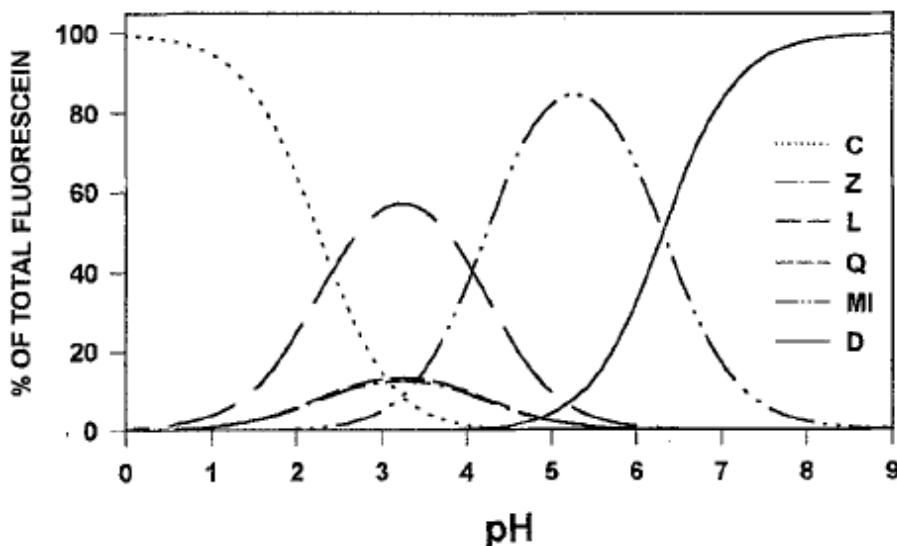


Рисунок 7 – Зависимость pH различных форм флуоресцеина в водном растворе.

Заимствовано из [8]

Смоделированные концентрации ионных форм в основном состоянии позволяют выявить основные закономерности:

- а) в чистом состоянии, когда существует одна ионная форма, могут быть получены только дианион при  $\text{pH} > 8$  и катион при  $\text{pH} < 1$ ;
- б) при  $\text{pH}$  от 6 до 8 существуют две поглощающие формы (моноанион и дианион), чем обусловлено применение флуоресцеина в качестве pH-индикаторов в физиологически средах;
- в) в остальных диапазонах при  $\text{pH}$  от 1 до 8 наблюдается многообразие ионных состояний: три и более поглощающих форм, так на отрезке  $\text{pH}$  от 1 до 6 нейтральная форма представлена всеми тремя таутомерами (лактон (L), цвиттерион (Z), хинойд (Q)).

### 3.3 Динамика населенностей ионных форм флуоресцеина в зависимости от pH в возбужденном состоянии

Спектры флуоресценции красителей так же, как и их спектры поглощения очень чувствительны к изменению  $\text{pH}$ . При этом для флуоресцеина и его гомологов отсутствуют надежные спектральные данные об индивидуальных

контурах испускания ряда ионных форм из-за переноса протона в возбужденном состоянии. Методом спектрофотометрического титрования успешно изучены только ионные равновесия основного состояния. Проблемы же анализа спектра испускания заключаются в следующем:

- а) несколько ионных форм существуют одновременно;
- б) спектры флуоресценции ионных форм сильно перекрываются, они имеют различный квантовый выход;
- в) перенос протона в возбужденном состоянии приводит к тому, что поглощает одна форма, а испускает другая.

Спектры испускания флуоресцеина наглядно отображены на рисунке 8.

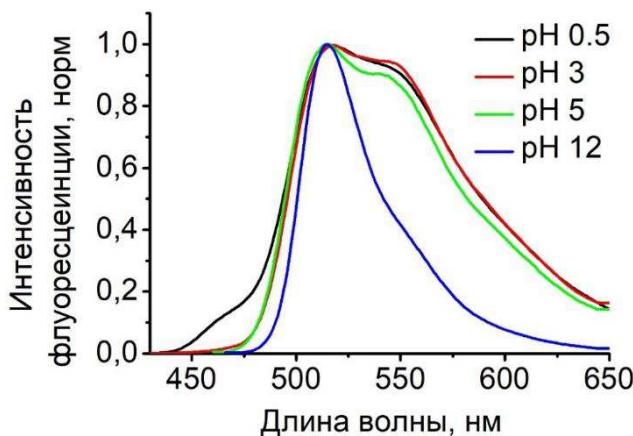


Рисунок 8 – Спектры флуоресценции флуоресцеина

Моделирование концентраций ионных форм в возбужденном состоянии является надежным способом изучения спектральных свойств различных ионных форм и динамики ионных равновесий в возбужденном состоянии.

Далее проведен расчет населенностей ионных форм флуоресцеина в возбужденном состоянии, вызванном фотовоздействием. Важно отметить, что при переносе протона константы диссоциации в основном и в возбужденном состояниях не равны между собой. В данном случае значения констант равновесия в возбужденном состоянии были получены независимыми экспериментальными методами, в которых удалось разделить сложные контуры флуоресценции на отдельные составляющие и найти частоты 0-0 переходов, и

рассчитаны с помощью формулы Фёрстера (1.12). Таким образом, константы равновесия принимают следующие значения (таблица 3.2).

Таблица 3.2 – Значения констант равновесия в возбужденном состоянии

Наименование показателя	Значение показателя
1. $pK_{a2}^*$	4,89
2. $pK_{a1}^*$	4,10
3. $pK_{a0}^*$	-1,48
4. $pK_{a3}^*$	0,45
5. $pK_{a4}^*$	2,18

Как видно, коэффициент  $pK_{a5}^*$  отсутствует, это связано с тем, что в возбужденном состоянии флуоресцеин не имеет лактонной формы (L), так как она не поглощает в видимой области. Применяя ранее разработанную математическую модель, получены следующие результаты (рисунок 9).

Изъят рисунок

Рисунок 9 – Доли ионных форм флуоресцеина в возбужденном состоянии при различных значениях pH

В результате были выявлены основные закономерности. Во-первых, поведения ионных равновесий в основном и возбужденном состояниях различаются, видна явная динамика населенностей различных ионных форм. В

области отрицательных значений при рН от -2 до 0 существует два ионных состояния – катионное (C) и хинойдное (Q). Если катионная форма (C) при  $\text{рН} > 0$  угасает, то хинойдная форма (Q) продолжает активно испускать вплоть до  $\text{рН} = 5$ . В диапазоне рН от 3 до 5 наблюдается три флуоресцирующих формы: хинойдная (Q), моноанион (M) и дианион (D). А при  $\text{рН} > 7$  продолжает флуоресцировать только дианион (D).

Во-вторых, количество флуоресцирующих форм меньше, чем поглощающих. Так мы видим, что нейтральная форма представлена хинодом (Q), а цвиттерионная форма (Z) не флуоресцирует, также отсутствует лактонная форма (L). Такая ситуация свидетельствует о том, что поглощает одна форма, а испускает другая.

В-третьих, различия в поведении ионных равновесий обусловлены фотоиндуцированным переносом протона. Более подробно влияние данного явления рассмотрено в следующем пункте.

### **3.4 Направление и эффективность переноса протона в возбужденном состоянии**

Изучение динамики населенностей ионных форм на примере флуоресцеина позволило более подробно исследовать процесс переноса протона в возбужденном состоянии. На основе моделирования концентраций ионных форм флуоресцеина мы выявили, что поведения ионных равновесий в основном и возбужденном состояниях различаются. На рисунке 10 наглядно представлены такие различия. С помощью разностного графика мы имеем возможность оценить диапазоны рН, в которых происходит перенос протона, а также направление и эффективность данных процессов. По оси X отображается диапазон рН, по оси Y – разностное значение концентраций ионных форм в возбужденном и в основном состояниях согласно (3.11).

$$\Delta N = N_B - N_O, \quad (3.11)$$

где  $N_B$  – значения в возбужденном состоянии;

$N_O$  – значения в основном состоянии;

$\Delta N$  – разностное значение.

Изъят рисунок

Рисунок 10 – Разностное значение концентраций ионных форм в возбужденном и в основном состояниях

Согласно графику (рисунок 10) мы наблюдаем, что населенности ионных состояний красителя находятся как в положительной, так и в отрицательной области значений. Ионные формы, имеющие положительные значения, – это те формы, у которых избыток возбужденных состояний над основным, то есть которые образовались в процессе переноса протона. Это произошло за счет тех форм, которые находятся в отрицательной области, именно из них образовались флуоресцирующие состояния в результате переноса протона.

Результирующий график также показывает, что явление переноса протона присуще только соседним ионным состояниям, тем, заряд которых отличается на единицу (рисунок 2). Перенос протона может быть осуществлен как в одном,

так и в другом направлении, то есть происходит как фотоотрыв, так и фотоприсоединение протона согласно схемам (1.10) и (1.11) соответственно.

Видно, что в диапазоне pH от -2 до 4 произошел фотоотрыв и в результате переноса протона хинойдная форма (Q) образовалась за счет катиона (C), который отдал протон водорода. В свою очередь в диапазоне pH от 2 до 5 формирование моноаниона (M) произошло за счет цвиттерионной формы (Z), которая оказалась в области отрицательных значений. Интересен тот факт, что моделирование концентраций ионных состояний флуоресцеина показало, что цвиттерионная форма (Z) не флуоресцирует. Однако при фотоиндуцированном переносе протона этот таутомер способствует формированию другой ионной формы (моноанионной). Таким образом, анализ динамики населенностей ионных форм в основном и в возбужденном состояниях показал, что нефлуоресцирующая ионная форма может играть важную роль в формировании ионных равновесий при переносе протона.

В диапазоне pH от 5 до 8 наблюдается следующий фотоотрыв: моноанион (M) отдал протон водорода и в результате дианионная форма (D) образовалась за счет моноанионной (M). Как видно из анализа результатов моноанион (M) – единственное ионная форма, которая и сама флуоресцирует, и участвует в образовании другой ионной формы в результате переноса протона, в зависимости от pH. При  $pH \approx 4,5$  разностная населенность равна нулю, то есть населенности основного и возбужденного состояний равны, это означает, что переноса протона нет.

Таким образом, можно сделать вывод, что перенос протона происходит на всем рассматриваемом диапазоне pH, сменяя лишь ионные формы, участвующие в данном процессе на разных участках.

Также необходимо отметить следующее. В диапазоне pH от 2 до 6 наблюдается многообразие ионных форм и процессов. Флуоресцируют в этом диапазоне дианион (D), моноанион (M), хинойд (Q), наблюдается много явлений переноса протона с участием различных ионных состояний. Это

создает трудности для анализа в данном рН-диапазоне. Также анализ протолитических свойств и динамики населенностей в рамках данного диапазона (равно как и в диапазоне рН от -2 до 2) является наименее востребованным. Это связано с тем, что данные диапазоны пригодны лишь для исследования отклонений кислотно-щелочного баланса мочи и желудочного сока.

В диапазоне рН от 6 до 8 также происходят процессы переноса протона, в которых участвуют дианионная (D) и моноанионная (M) формы. Анализ динамики ионных состояний, сопровождающейся переносом протона, наиболее актуален для биомедицинских исследований именно в диапазоне рН от 6 до 8. Это обусловлено тем, что в данном диапазоне исследованиям отклонений кислотно-щелочного баланса подвержены различные биологические жидкости человека, в том числе кровь, слюна, моча, спинномозговая жидкость, сок поджелудочной железы. Известно, что отклонения от нормы кислотно-щелочного баланса могут приводить к серьезным заболеваниям, что подтверждает актуальность и необходимость исследований динамики ионных равновесий с участием переноса протона в этой области рН.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

В результате проведенной работы была создана математическая модель ионного равновесия флуорофора с многоступенчатой диссоциацией (в общем случае) и разработан алгоритм программы на языке MATLAB. Благодаря разработанной компьютерной программе, которая испытана и проверена на точность на примере анализа населенностей ионных форм флуоресцина в основном состоянии, впервые были смоделированы концентрации ионных форм красителя в возбужденном состоянии. Полученная модель признана адекватной. Разработанная программа позволяет моделировать равновесия флуорофоров, проявляющих многообразие ионных и тautомерных состояний.

Проведен анализ направленности и эффективности переноса протона в возбужденном состоянии в зависимости от pH. Выявлены основные закономерности поведения ионных равновесий:

- на рассматриваемом диапазоне pH наблюдается несколько явлений переноса протона, а также многообразие ионных форм, участвующих в данных процессах;
- явление переноса протона присуще только соседним ионным состояниям, заряд которых отличается на единицу;
- моноанион ( $M$ ) – единственное ионное состояние, которое в зависимости от диапазона pH либо является флуоресцирующим, либо участвует в образовании другого флуоресцирующего ионного состояния (дианиона ( $D$ )) в результате переноса протона.

Также выявлен наиболее перспективный диапазон pH с точки зрения применения в биомедицинских исследованиях: от 6 до 8. В этом диапазоне перенос протона происходит с участием моноанионной и дианионной форм и наблюдается фотоотрыв протона от моноаниона и образование из него дианиона. Перенос протона в данном диапазоне позволяет проводить исследование отклонений кислотно-щелочного баланса различных биологических жидкостей человека.

## **СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ**

1. Поддубных, Л. П. Аналитическая химия : учеб.-метод. пособие / Л. П. Поддубных, Т. В. Ступко. – Красноярск : Краснояр. гос. аграр. ун-т, 2013. – 140 с.
2. Дьяконов, В. MATLAB учебный курс : учебник / В. Дьяконов. – СПб : Питер, 2001. – 560 с.
3. Слюсарева, Е. А. Оптическая спектроскопия: сложные молекулы : учеб. пособие / Е. А. Слюсарева, М. А. Герасимова, Н. В. Слюсаренко. – Красноярск : Сиб. федер. ун-т, 2018. – 116 с.
4. Пушкарева, Т. П. Математическое моделирование химических процессов: учеб. пособие / Т. П. Пушкарева, А. В. Перегудов. – Красноярск : Краснояр. гос. пед. ун-т, 2013. – 116 с.
5. Лакович, Дж. Основы флуоресцентной спектроскопии : монография / Дж. Лакович. – Пер. с англ. – М.: Мир, 1986. – 496 с.
6. Слюсарева, Е. А. Зависимость от pH абсорбционных и флуоресцентных свойств водных растворов флуороновых красителей / Е. А. Слюсарева, М. А. Герасимова // Известия высших учебных заведений Физика. – 2013. – № 12. – С. 48–54.
7. Филиппов, А.Ф. Сборник задач по дифференциальным уравнениям : учеб. пособие / А.Ф. Филиппов. – Москва-Ижевск: НИЦ «Регулярная и хаотическая динамика». – 2004. – 176 с.
8. Klonis, N. Spectral Properties of the Prototropic Forms of Fluorescein in Aqueous Solution / N. Klonis, W. H. Sawyer // Journal of Fluorescence. – 1996. – № 3. – Р. 147–157.
9. Gerasimova, M.A. Fluorescence and photoinduced proton transfer in the protolytic forms of fluorescein: Experimental and computational study/ M.A. Gerasimova, F.N. Tomilin, E.Yu. Malyar, S.A. Varganov, D.G. Fedorov, S.G. Ovchinnikov, E.A. Slyusareva // Dyes and Pigments. – 2020. – № 173. – Р. 1–9.

10. Chunbai, He. Nanoscale Metal – Organic Frameworks for Real-Time Intracellular pH Sensing in Live Cells / He. Chunbai, Lu.Kuangda, Lin.Wenbin // J. Am. Chem. Soc. - 2014. - Vol. 136. - 12253–12256.
11. Yguerabide, J. Steady-state fluorescence method for evaluating excited-state proton reactions – application to fluorescein / J. Yguerabide, E. Talavera, J.M. Alvarez, B. Quintero // Photochem. Photobiol. – 1994. – Vol. 60, №5. – P. 435 – 441.
12. Martin, M.M. The pH dependence of fluorescein fluorescence/ M.M. Martin, L. Lindqvist // J. Luminesc. – 1975. – V. 10. – P. 381-390.
13. Johnson, I.D. Practical considerations in the selection and application of fluorescent probes / I.D. Johnson // Handbook of biological confocal microscopy. – New York: Springer, 2006. – P. 353–367.
14. Мейстер, Т.Г. Электронные спектры многоатомных молекул / Т.Г. Мейстер. – Л.: Изд-во ЛГУ, 1969.
15. Sjoback R. Absorption and fluorescence properties of fluorescein /J. Nygren, M. Kubista // Spectrochim. Acta A, 1995.– V.51. – P.L7-L21.

## **ПРИЛОЖЕНИЕ А**

Изъято 4 страницы

Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение высшего образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
Институт инженерной физики и радиоэлектроники  
Базовая кафедра фотоники и лазерных технологий

УТВЕРЖДАЮ  
Заведующий баз.каф. ФИЛТ

  
А.Н. Втюрин  
« 07 » июля 2020 г.

## МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

**Динамика населенностей ионных форм флуоресцина в протонном  
растворителе в основном и возбужденном состояниях**

16.04.01 Техническая физика

16.04.01.02 Оптическая физика и квантовая электроника

Научный  
руководитель



профессор,  
д-р физ.-мат. наук

Е.А. Слюсарева

Выпускник



В.И. Третьякова

Рецензент



зав.каф.,  
д-р физ.-мат. наук

А.И. Лямкин

Красноярск 2020