

СПЕКТРАЛЬНО-ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ МАРКЕРОВ СЕМЕЙСТВА ФЛЮОРЕСЦЕИНА В ОБРАТНЫХ МИЦЕЛЛАХ РАЗНОГО РАЗМЕРА

О. И. Волкова, А. А. Кулешова, А. М. Салецкий*

УДК 535.343;535.372

Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова,
119991, Москва, Россия; e-mail: sam@physics.msu.ru

(Поступила 29 апреля 2020)

Исследованы спектрально-люминесцентные характеристики молекул эозина, эритрозина и бенгальского розового в обратных мицеллах бис(2-этилгексил)сульфосукцинат натрия. Внедрение молекул красителей в обратные мицеллы вызывает увеличение их гидродинамических радиусов R_h , при этом наблюдается линейная зависимость этого увеличения ΔR_h от степени гидратации w . Рост R_h вызывает сдвиг спектров поглощения и флуоресценции и увеличение стоковского сдвига. С повышением R_h возрастает отношение дипольных моментов молекул в возбужденном и основном состояниях μ_e/μ_g .

Ключевые слова: красители, мицеллы, гидродинамический радиус, степень гидратации, спектры поглощения и флуоресценции, дипольный момент, возбужденное и основное состояние.

We investigate the spectral-luminescent characteristics of eosin, erythrosin, and rose bengal molecules in reverse micelles of sodium bis(2-ethylhexyl)sulfosuccinate of sodium. It has been established that the incorporation of dye molecules into reverse micelles causes an increase in their hydrodynamic radii R_h . Meanwhile, a linear dependence of this increase ΔR_h on the degree of hydration w is observed. Magnification of R_h causes a shift in the absorption and fluorescence spectra as well as an additional Stokes shift. It is shown that with increasing R_h , the ratio of the dipole moments of the excited and ground states μ_e/μ_g also increases.

Keywords: dyes, micelles, hydrodynamic radius, degree of hydration, absorption and fluorescence spectra, dipole moment, excited and ground state.

Введение. Галогенопроизводные флуоресцеина эозин (Э), эритрозин (ЭР), бенгальский розовый (БР), которые являются анионными при pH 7.4, широко применяются в медицине в качестве контрастных веществ и в фотодинамической терапии. Несмотря на то что эти красители имеют спектральные характеристики, не совпадающие с областью терапевтического окна, они применяются для диагностики и лечения раковых опухолей на поверхности кожи. В [1] сообщается о создании комплекса БР—амфипатический пептид для лечения меланомы. Имея высокие квантовые выходы для генерации синглетного кислорода, эти красители становятся потенциальными фотосенсибилизаторами для нового направления фотодинамической терапии — антимикробной фотодинамической терапии. Например, БР используется для лечения инфекционного кератита (инфекции роговицы глаза) [2]. Стоматологическое лечение, диагностика злокачественных поражений полости рта осуществляются также с привлечением антимикробной фотодинамической терапии с использованием этих красителей [3]. Кроме того, красители гомологичной серии производных флуоресценции широко используются в качестве наномаркеров для исследования биологических объектов, в частности белков, методами КР-спектроскопии [4, 5], флуоресцентной спектроскопии [6, 7] и, как обладающие высоким квантовым выходом фосфоресценции, спектроскопии триплетного зонда [8, 9]. В связи с вышеизложенным актуально исследование спектрально-флуоресцентных характеристик указанных красителей в простых моделях клеток, которыми являются обратные мицеллы.

SPECTRAL-LUMINESCENT CHARACTERISTICS OF THE MARKERS OF THE FLUORESCCEIN FAMILY IN REVERSE MICELLAS OF DIFFERENT SIZES

O. I. Volkova, A. A. Kuleshova, A. M. Saletsky* (M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991, Russia; e-mail: sam@physics.msu.ru)

Обратные мицеллы представляют собой наноразмерные частицы, состоящие из молекул поверхностно-активного вещества, которые собираются вокруг водного ядра, суспендированного в неполярном растворителе. Размер мицелл зависит от степени гидратации $w = [\text{H}_2\text{O}]/[\text{AOT}]$, где $[\text{H}_2\text{O}]$ и $[\text{AOT}]$ — молярные концентрации воды и поверхностно-активного вещества в растворе. Наноразмерное водное ядро обратных мицелл действует как “нанореактор”, внутри которого контролируемые реакции приводят к образованию широкого спектра наноструктур с относительно узким распределением по размерам [10]. Обратные мицеллы привлекают большое внимание, поскольку охватывают широкий спектр практических применений, наибольший прогресс достигнут в синтезе наночастиц [11—14] и разработке передовых средств доставки лекарств [15, 16]. Такие “нанореакторы” используются для изучения эффекта наноконфигурации на поведение молекул воды, структурных изменений в белках и молекулах красителей. В последние несколько лет появилось большое количество работ, посвященных спектроскопическому исследованию молекул красителей в обратных мицеллах [17—20].

В настоящей работе исследованы спектрально-флуоресцентные характеристики молекул эозина, эритрозина и бенгальского розового в обратных мицеллах разного размера.

Эксперимент. Материалы. Использованы бис(2-этилгексил)сульфосукцинат натрия (AOT) (Sigma Aldrich, Германия, чистота > 99%), декан (Sigma Aldrich, Германия, чистота > 99 %) и анионные красители Э, ЭР, БР фирмы Sigma Aldrich без дополнительной очистки. Растворы приготавливали из сухих реактивов AOT, красителя и гептана: вначале 10 мас.% раствор AOT в гептане (взвешивали 1 г AOT и 9 г гептана), затем в 2 мл AOT в гептане добавляли разведенный в воде краситель в количестве 100—500 мкл (степень гидратации $w = 0—70$). Концентрация красителей $C = 10^{-5}$ моль/л.

Определение размеров мицелл. Для определения размеров мицелл использован метод динамического рассеяния света. Методика определения R_h мицелл описана в [21] и основана на определении временной корреляционной функции рассеянного света в мицеллярных растворах:

$$G(\tau) = \frac{\langle I(t)I(t+\tau) \rangle}{\langle I^2(t) \rangle}, \quad (1)$$

где $I(t)$ и $I(t+\tau)$ — интенсивность рассеянного света при временах t и $t+\tau$.

Для монодисперсного коллоидного раствора

$$G(\tau) = A \exp(-Dq^2\tau), \quad (2)$$

где A — постоянная прибора; D — коэффициент диффузии; q — вектор рассеяния, $q = 4\pi(n/\lambda)\sin(\theta/2)$, где θ — угол рассеяния, $\theta = 90^\circ$; λ — длина волны рассеянного света; n — показатель преломления раствора.

Определены коэффициент диффузии D и в рамках модели Стокса—Эйштейна—Дебая в предположении сферической формы мицелл гидродинамический радиус

$$R_h = \frac{kT}{6\pi\eta D}, \quad (3)$$

где k — постоянная Больцмана; T — температура; η — вязкость растворителя.

Измерение динамического рассеяния света и анализ размеров частиц осуществлялись на приборе Photocor Compact с помощью полупроводникового лазера с $\lambda = 638$ нм, мощностью 25 мВт, точность измерения $\delta R_h = \pm 0.3$ нм.

Измерение спектрально-люминесцентных характеристик мицеллярных растворов красителей. Спектры поглощения молекул красителей в обратных мицеллах измерены при $T = 295$ К на спектрофотометре Perkin Elmer Lambda 35 (ширина щели 0.5 нм), их флуоресцентные характеристики — на спектрофлуориметре Perkin Elmer LS 55 (спектральное разрешение 0.1 нм, воспроизводимость длин волн ± 0.5 нм). Для уменьшения погрешностей измерений спектры усреднялись по 10 сканам.

Результаты и их обсуждение. На рис. 1 представлены зависимости гидродинамического радиуса R_h мицелл без внедренных красителей от степени гидратации w , определенные с помощью соотношения (3) (кривая 1). Видно, что зависимость $R_h(w)$ линейная. При добавлении в мицеллярный раствор молекул красителей R_h мицелл увеличивается. Представлены также зависимости $\Delta R_h = R_h^{\text{Dye}} - R_h$ (R_h^{Dye} — гидродинамический радиус мицелл, содержащих молекулы красителей; R_h — гидродинамический радиус мицелл, не содержащих молекулы красителей) от степени гидратации w . Видно, что для всех w и красителей гидродинамический радиус мицелл с молекулами краси-

телей больше, чем для мицелл без молекул красителей. При увеличении w возрастает R_h для всех трех красителей, при этом, если для Э (кривая 2) и БР (кривая 4) ΔR_h увеличивается незначительно, то для ЭР (кривая 3) значительно (5 нм при $w \sim 70$). Для установления зависимостей спектрально-флуоресцентных характеристик молекул красителей от размеров мицелл использованы значения R_h для мицелл с внедренными молекулами красителей.

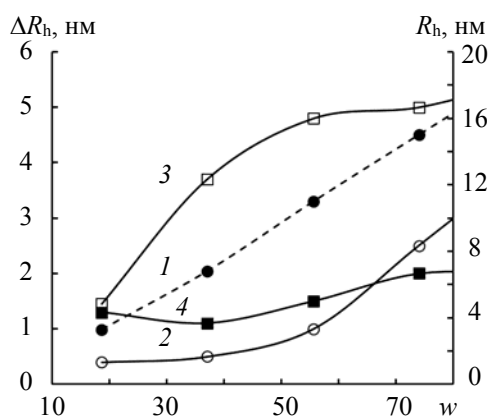


Рис. 1. Зависимости R_h (1) и ΔR_h (2—4) от w для мицелл, не содержащих молекулы красителей (1) и содержащих Э (2), ЭР (3) и БР (4)

Измерены спектры поглощения и флуоресценции молекул Э, ЭР и БР в водно-мицеллярных растворах. На рис. 2, а представлены спектры поглощения Э для различных R_h . Наблюдаются сдвиг спектра поглощения в коротковолновую область и увеличение оптической плотности D с ростом R_h (кривые 1—4). Для исследуемой области R_h оптическая плотность и длина волны максимума спектра поглощения не достигают таких же значений для водных растворов (кривая 5). Аналогичные изменения спектров поглощения Э в мицеллярных растворах при различных R_h отмечены в [22].

На рис. 2, б представлены зависимости положения максимумов спектров поглощения и оптической плотности для исследуемых красителей в водно-мицеллярных растворах. С ростом R_h наблюдается коротковолновый сдвиг спектров поглощения для Э (кривая 1) и ЭР (кривая 2), при этом сдвиг спектров поглощения для Э и ЭР при изменении R_h в интервале 4—20 нм одинаков (~6 нм). Для БР (кривая 3) сдвига спектра поглощения в исследуемой области R_h не наблюдается. При увеличении размеров мицелл повышается оптическая плотность молекул красителей (кривые 4—6), причем для Э и ЭР увеличение значительное по сравнению с БР. Смещение спектров поглощения при изменении R_h может быть обусловлено уменьшением полярности среды и процессами ассоциации молекул. В связи с тем что растворы малой концентрации, влияние процессов ассоциации молекул красителей на спектры поглощения молекул можно не учитывать. Поведение спектров поглощения (длинноволновый сдвиг) анионных красителей в мицеллярных системах по сравнению с водными растворами обусловлен уменьшением полярности среды, связанным с локализацией молекул красителей на границе мицелл. Молекулы красителей семейства флуоресцеина могут существовать в различных формах, основными являются анионные и дианионные с коротковолновым и длинноволновым спектрами поглощения. Поскольку дианионная форма красителей Э, ЭР и БР имеет большее поглощение, увеличивается поглощение с ростом R_h , обусловленное переходом в структуре молекул от анионной формы к дианионной.

Перестройка структуры молекул при изменении их микроокружения приводит к изменению их дипольных молекул, что должно отражаться на изменении спектральных характеристик растворов красителей, в первую очередь стоксовых сдвигов $\Delta\nu = \nu_a - \nu_f$ (ν_a, ν_f — частоты максимумов спектров поглощения и флуоресценции). Для вычисления $\Delta\nu$ измерены спектры флуоресценции красителей в мицеллярных системах с различными R_h и определены положения их максимумов.

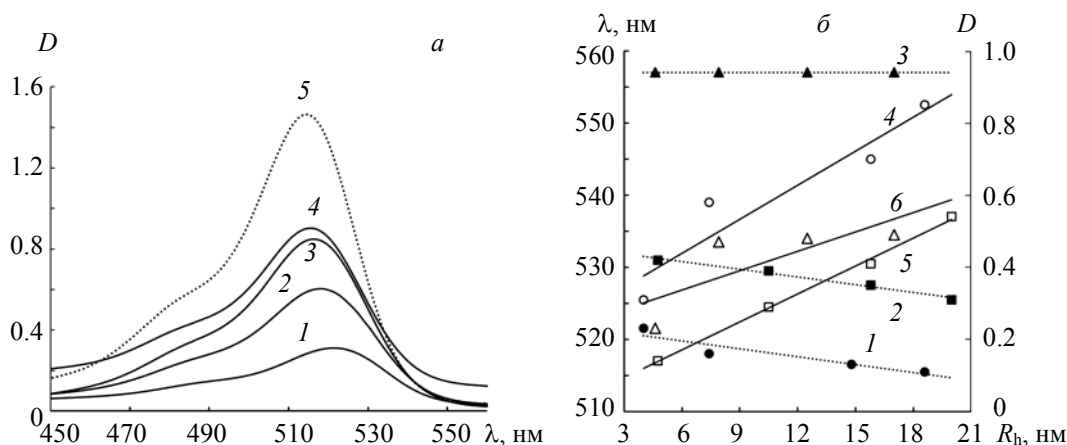


Рис. 2. Спектры поглощения Э ($C = 10^{-5}$ моль/л) в мицеллярных (1—4) и водных растворах (5) для $R_h = 4$ (1), 7.4 (2), 14.8 (3) и 18.6 нм (4) (a); зависимости положения максимумов спектров поглощения в мицеллярных растворах (1—3) и оптической плотности D в максимуме поглощения (4—6) от R_h для Э (1, 4), ЭР (2, 5) и БР (3, 6) (б)

На рис. 3 (кривые 1—3) представлены зависимости максимумов спектров флуоресценции красителей от R_h . Видно, что в мицеллярных растворах имеются сдвиги не только спектров поглощения, но и спектров флуоресценции красителей в зависимости от гидродинамического радиуса R_h . Эти сдвиги различаются для спектров поглощения и спектров флуоресценции и для разных молекул красителей. Так, при увеличении R_h для Э сдвиг спектра поглощения 6 нм, при этом положение максимума спектра флуоресценции изменяется на 4 нм (кривая 1). Для БР , наоборот, сдвиг максимума спектра поглощения отсутствует, в то время как максимум спектра флуоресценции сдвигается в длинноволновую область на 5 нм (кривая 3). Наибольшие для исследуемых красителей сдвиги спектров поглощения и флуоресценции наблюдаются для ЭР : спектр поглощения на 6 нм (рис. 2, б, кривая 2), флуоресценции на 7 нм (рис. 3, кривая 2).

На основе измеренных спектров поглощения и флуоресценции молекул красителей в мицеллах вычислены стоксовы сдвиги $\Delta\nu = \nu_a - \nu_f$ для всех молекул красителей и различных R_h . На рис. 3 представлены зависимости $\Delta\nu$ от R_h для исследуемых красителей. Стоксовы сдвиги спектров различаются для разных молекул. Минимальные $\Delta\nu$ (при $R_h \sim 4$) наблюдаются для $\text{БР} \sim 540 \text{ см}^{-1}$ и $\text{ЭР} \sim 580 \text{ см}^{-1}$, максимум $\Delta\nu \sim 900 \text{ см}^{-1}$ имеет Э . С ростом R_h для Э и ЭР увеличивается $\Delta\nu$. При этом для Э изменения стоксова сдвига $d(\Delta\nu) = \Delta\nu_{\omega_0=90} - \Delta\nu_{\omega_0=20} \approx 240 \text{ см}^{-1}$, в то время как для ЭР $d(\Delta\nu) \approx 120 \text{ см}^{-1}$. Для БР стоксов сдвиг уменьшается незначительно $d(\Delta\nu) \approx 70 \text{ см}^{-1}$.

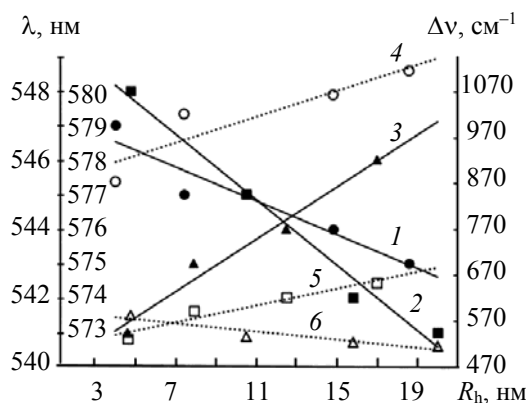


Рис. 3. Зависимости максимума спектров флуоресценции (1—3) и стоксовых сдвигов $\Delta\nu$ спектров (4—6) красителей Э (1, 4), ЭР (2, 5) и БР (3, 6) от R_h

Изменение стоксова сдвига спектров указывает на то, что геометрия молекул красителей в возбужденном состоянии может отличаться от основного состояния. Поэтому при исследовании поведения молекул красителей в мицелле важно изменение дипольного момента молекулы при возбуждении. Для получения информации об изменении дипольного момента в возбужденном состоянии определим отношение μ_e/μ_g , где μ_e и μ_g — дипольные моменты молекул красителей в возбужденном и основном состояниях. Отношение μ_e/μ_g определялось из формулы [23—25]:

$$\mu_e / \mu_g = \frac{m_1 + m_2}{m_1 - m_2}, \quad (4)$$

где $m_1 = \frac{v_a - v_f}{f(\varepsilon, n)}$; $m_2 = \frac{v_a + v_f}{f(\varepsilon, n) + 2g(n)}$; $f(\varepsilon, n) = \frac{2n^2 + 1}{n^2 + 1} \left(\frac{\varepsilon - 1}{\varepsilon + 2} - \frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \right)$ — функция полярности растворителя; $g(n) = \frac{3}{2} \frac{n^4 - 1}{(n^2 + 2)^2}$; ε — диэлектрическая проницаемость среды; n — показатель преломления среды.

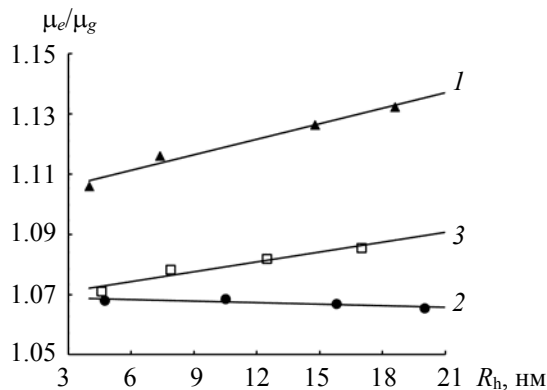


Рис. 4. Зависимости отношения μ_e/μ_g от R_h для Э (1), ЭР (2) и БР (3)

На рис. 4 представлены зависимости μ_e/μ_g от R_h мицелл для исследуемых красителей. С увеличением R_h возрастает отношение μ_e/μ_g для Э и БР и незначительно уменьшается для ЭР. Такое изменение отношения μ_e/μ_g с увеличением размера мицелл связано в первую очередь с изменением локализации молекул красителей в объеме обратной мицеллы.

Заключение. Исследованы спектрально-флуоресцентные характеристики молекул гомологичной серии производных флуоресцеина в обратных мицеллах АОТ, которые представляют собой привлекательную модель таких сложных биологических систем, как мембраны. Установлено, что внедрение молекул красителей в обратные мицеллы вызывает увеличение их гидродинамических радиусов R_h с линейной зависимостью роста $\Delta R_h(w)$. Измерены спектрально-флуоресцентные характеристики молекул красителей в мицеллах для различных R_h . Установлено изменение этих характеристик: сдвиг спектров поглощения и флуоресценции, увеличение стоксова сдвига спектров с ростом R_h . Стоксовы сдвиги спектров различаются для исследуемых молекул красителей: минимальные для бенгальского розового $\sim 540 \text{ см}^{-1}$ и эритрозина $\sim 580 \text{ см}^{-1}$, наибольший — для эозина $\sim 900 \text{ см}^{-1}$. С ростом R_h для эритрозина и бенгальского розового увеличивается $\Delta\nu$, а для эозина незначительно уменьшается на $\sim 70 \text{ см}^{-1}$. Изменение стоксова сдвига связано с различием отношения зависимости μ_e/μ_g для разных R_h мицелл для исследуемых красителей. С ростом R_h увеличивается отношение дипольных моментов возбужденного и основного состояний μ_e/μ_g , обусловленное структурной реорганизацией мицелл.

Размер обратных мицелл может регулироваться изменением степени гидратации w , что делает их особенно полезными для мониторинга динамики ограниченных жидкостей, в частности высокоструктурированной внутримицеллярной воды, являющейся аналогом водной среды в биологических системах. Спектральные характеристики флуоресценции молекул красителей эозина, эритрозина и бенгальского розового могут быть использованы для мониторинга организации и динамики мицеллярных структур, в том числе конформации и динамики белков, включенных в такие наносборки.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 19-32-90123.

- [1] **S. K. Dhillon, S. L. Porter, N. Rizk, Y. Sheng, Th. McKaig, K. Burnett, B. White, H. Nesbitt, R. N. Matin, A. P. McHale, B. Callan, J. F. Callan.** *J. Med. Chem.*, **63** (2020) 1328—1336
- [2] **A. Naranjo, A. Arboleda, J. D. Martinez, H. Durkee, C. Aguilar, N. Relhan, N. Nikpoor, A. Galor, S. R. Dubovy, R. Leblanc, H. W. Flynn Jr, D. Miller, Jean-Marie Parel, G. Amescua.** *Am. J. Ophthalmol.*, **208** (2019) 387—396
- [3] **K. Shitomi, H. Miyaji, S. Miyata, T. Sugaya, N. Ushijima, T. Akasaka, H. Kawasaki.** *Photodiagnos. Photodynam. Therapy*, **30** (2020) 101647
- [4] **I. M. Vlasova, D. V. Polyansky, A. M. Saletsky.** *Laser Phys. Lett.*, **4** (2007) 390—394
- [5] **I. M. Vlasova, A. M. Saletsky.** *Laser Phys.*, **20**, N 9 (2010) 1844—1848
- [6] **I. M. Vlasova, A. M. Saletsky.** *J. Mol. Struct.*, **936**, N 1-3 (2009) 220—227
- [7] **И. М. Власова, А. А. Власов, А. А. Кулешова, Ю. А. Гордеева, А. М. Салецкий.** *Журн. физ. химии*, **94**, № 1 (2020) 114—120
- [8] **А. М. Салецкий, А. Г. Мельников, А. Б. Правдин, В. И. Кочубей, Г. В. Мельников.** *Журн. прикл. спектр.*, **72**, № 5 (2005) 660—663 [A. M. Saletsky, A. G. Melnikov, A. B. Pravdin, V. I. Kochubey, G. V. Melnikov. *J. Appl. Spectr.*, **72** (2005) 723—727]
- [9] **С. Н. Летуга, А. Ф. Кувандыкова, С. Н. Пашкевич, А. М. Салецкий.** *Журн. хим. физики*, **87**, N 9 (2013) 1602—1608
- [10] **Y. Alvarado, C. Muro, J. Illescas, M. C. Díaz, F. Riera.** *Biomolecules*, **9**, N 5 (2019) 15
- [11] **T. Hashimoto, Y. Ye, M. Ui, T. Ogawa, T. Matsui, Y. Tanaka.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **514**, N 1 (2019) 31—36
- [12] **I. H. Lone, N. R. E. Radwan, J. Aslam, A. Akhter.** *Curr. Nanosci.*, **15**, N 2 (2019) 129—136
- [13] **M. S. Orellano, C. Porporatto, J. J. Silber, R. D. Falcone, N. M. Correa.** *Carbohydr. Polym.*, **171** (2017) 85—93
- [14] **S. Yi, F. Dai, C. Zhao, Y. A. Si.** *Sci. Rep.*, **7**, N 1 (2017) 9806
- [15] **V. Piazzini, M. D'Ambrosio, C. Luceri, L. Cinci, E. Landucci, A. Rita Bilia, M. Camilla Bergonzi.** *Molecules*, **24** (2019) 1688—1708
- [16] **P. Singh, N. Verma.** *Int. J. Pharmac. Sci. Res.*, **9**, N 4 (2018) 1397—1404
- [17] **О. И. Волкова, А. Н. Баранов, А. М. Салецкий.** *Журн. прикл. спектр.*, **85**, № 3 (2018) 373—376 [O. I. Volkova, A. N. Baranov, A. M. Saletsky. *J. Appl. Spectr.*, **85** (2018) 381—384]
- [18] **A. Rahdar, M. Aliahmad, A. M. Kor, D. Sahoo.** *Spectrochim. Acta A: Mol. Biomol. Spectrosc.*, **210**, (2019) 165—170
- [19] **E. Bozkurt, Y. Onganer.** *J. Mol. Struct.*, **1173** (2018) 490—497
- [20] **M. Hoseini, A. Sazgarnia, S. Sharifi.** *Opt. Quantum Electron.*, **51** (2019) 144 (1—21)
- [21] **A. V. Potapov, D. B. Alekseev, I. G. Alekseeva, A. M. Saletsky.** *Laser Phys. Lett.*, **4**, N 1 (2007) 61—65
- [22] **E. M. Arbeloa, G. V. Porcal, S. G. Bertolotti, C. M. Previtali.** *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, **252** (2013) 31—36
- [23] **E. Lippert.** *Z. Elektrochem.*, **61** (1957) 962—975
- [24] **U. S. Raikar, C. G. Renuka, Y. F. Nadaf, B. G. Mulimani, A. M. Karguppikar, M. K. Soudagar.** *Spectrochim. Acta A: Mol. Biomol. Spectrosc.*, **65** (2006) 673—677
- [25] **A. Rahdar, M. Aliahmad, A. Moradi Kor, D. Sahoo.** *Spectrochim. Acta A: Mol. Biomol. Spectrosc.*, **210** (2019) 165—170