

**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  $\Delta R_h$  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  $\mu_e/\mu_g$ .*

**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  $\Delta R_h$  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  $\mu_e/\mu_g$  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  $\theta$  — угол рассеяния,  $\theta = 90^\circ$ ;  $\lambda$  — 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;  $\eta$  — 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  $\pm 0.5$  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  $\Delta R_h = R_h^{\text{Dye}} - R_h$  ( $R_h^{\text{Dye}}$  — 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)  $\Delta R_h$  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.

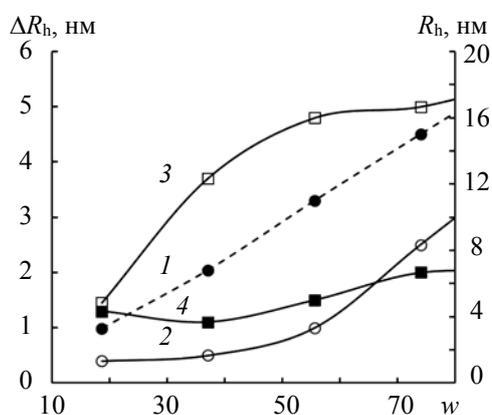


Рис. 1. Зависимости  $R_h$  (1) и  $\Delta R_h$  (2—4) от  $w$  для мицелл, не содержащих молекулы красителей (1) и содержащих Э (2), ЭР (3) и БР (4)

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  $\Delta\nu = \nu_a - \nu_f$  ( $\nu_a, \nu_f$  — 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.

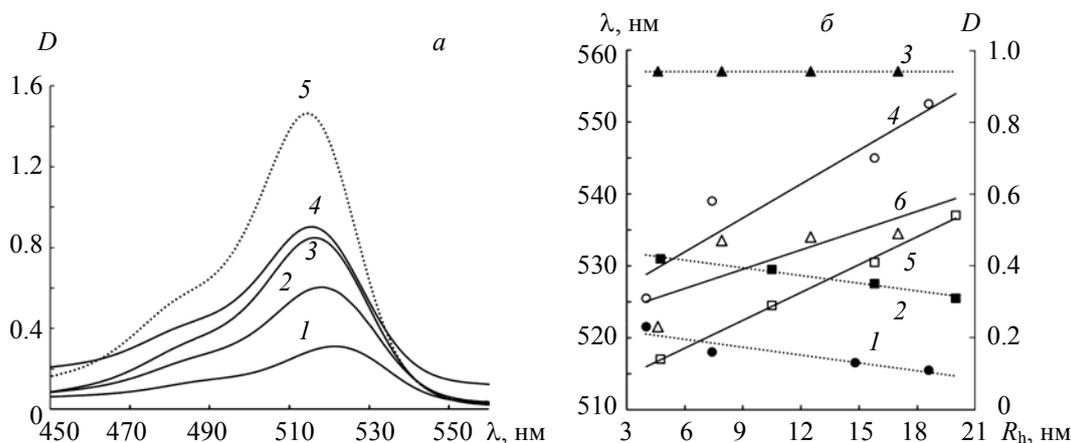


Рис. 2. Спектры поглощения Э ( $C = 10^{-5}$  моль/л) в мицеллярных (1—4) и водных растворах (5) для  $R_h = 4$  (1), 7.4 (2), 14.8 (3) и 18.6 нм (4) (а); зависимости положения максимумов спектров поглощения в мицеллярных растворах (1—3) и оптической плотности  $D$  в максимуме поглощения (4—6) от  $R_h$  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 БР  $\sim 540$   $\text{см}^{-1}$  и 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  $d(\Delta\nu) \approx 70$   $\text{см}^{-1}$ .

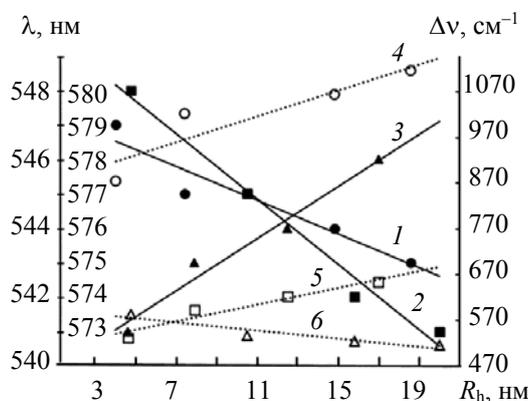


Рис. 3. Зависимости максимума спектров флуоресценции (1—3) и стоксовых сдвигов  $\Delta\nu$  спектров (4—6) красителей Э (1, 4), ЭР (2, 5) и БР (3, 6) от  $R_h$

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  $\mu_e/\mu_g$ , где  $\mu_e$  и  $\mu_g$  — дипольные моменты молекул красителей в возбужденном и основном состояниях. Отношение  $\mu_e/\mu_g$  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;  $g(n) = \frac{3}{2} \frac{n^4 - 1}{(n^2 + 2)^2}$ ;  $\varepsilon$  — диэлектрическая проницаемость среды;  $n$  — показатель преломления среды.

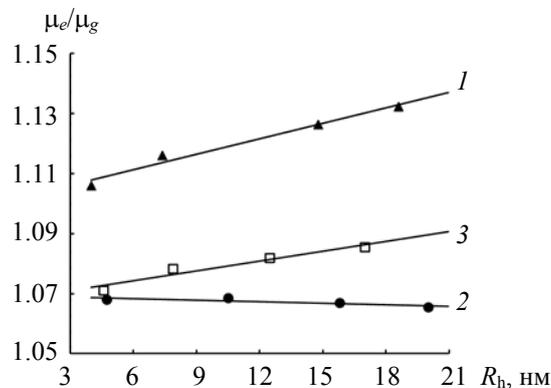


Рис. 4. Зависимости отношения  $\mu_e/\mu_g$  от  $R_h$  для Э (1), ЭР (2) и БР (3)

На рис. 4 представлены зависимости  $\mu_e/\mu_g$  от  $R_h$  мицелл для исследуемых красителей. С увеличением  $R_h$  возрастает отношение  $\mu_e/\mu_g$  для Э и БР и незначительно уменьшается для ЭР. Такое изменение отношения  $\mu_e/\mu_g$  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  $\mu_e/\mu_g$  для разных  $R_h$  мицелл для исследуемых красителей. С ростом  $R_h$  увеличивается отношение дипольных моментов возбужденного и основного состояний  $\mu_e/\mu_g$ , 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