

ФЛУОРЕСЦЕНЦИЯ 5- и 6-КАРБОКСИФЛУОРЕСЦЕИНОВЫХ БИФЛУОРОФОРОВ

В. А. Поводайло^{1*}, **С. А. Тихомиров**¹, **Д. Л. Яковлев**¹,
И. Л. Лысенко², **Ф. Фан**², **В. В. Шманай**²

УДК 535.372

¹ Институт физики НАН Беларуси,
220072, Минск, Беларусь; e-mail: poved@ifanbel.bas-net.by

² Институт физико-органической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

(Поступила 28 октября 2020)

Синтезированы бифлуорофоры (5-FAM)₂ и (6-FAM)₂ на каркасе 3,5-диаминобензойной кислоты, позволяющем вставлять две молекулы флуорофора в один сайт. Несмотря на сходство структур изомеров 5- и 6-карбоксихлорофесцеинов (5-FAM и 6-FAM), фотофизическое поведение соответствующих бифлуорофоров различается. Квантовый выход люминесценции (6-FAM)₂ в буферном растворе с pH 8.5 в 2.4 раза ниже, чем для (5-FAM)₂. При увеличении вязкости раствора в случае использования водно-глицериновой смеси и при изменении микровязкости в случае мицеллярного раствора замедляется структурная релаксация молекул в возбужденном состоянии, что приводит к увеличению интенсивности флуоресценции, времени жизни возбужденных состояний и степени поляризации, т. е. фотофизические свойства синтезированных соединений в значительной степени контролируются вязкостью среды.

Ключевые слова: интенсивность флуоресценции, время жизни флуоресценции, карбоксихлорофесцеин, флуоресцентные биомолекулы, клик-химия.

Bifluorophores (5-FAM)₂ and (6-FAM)₂ were synthesized on a 3,5-diaminobenzoic acid framework which allows two fluorophore molecules to be inserted into a single site. Despite the similarity of the structures of the 5- and 6-carboxyfluorescein isomers (5-FAM and 6-FAM), the photo-physical behavior of the corresponding bifluorophores differs. The luminescence quantum yield of (6-FAM)₂ in a buffer solution with pH 8.5 is 2.4 times lower than for (5-FAM)₂. It is shown that structural relaxation of molecules in the excited state slows down as a result of the solution viscosity increasing in the case of using a water-glycerol mixture and the increasing in the microviscosity in the case of micellar solution. This slowing down leads to an increase of the fluorescence intensity, lifetime of excited states and the degree of polarization, i.e. the photo-physical properties of the synthesized compounds largely controlled by the viscosity of the medium.

Keywords: fluorescence intensity, fluorescence lifetime, carboxyfluorescein, fluorescent biomolecules, click chemistry.

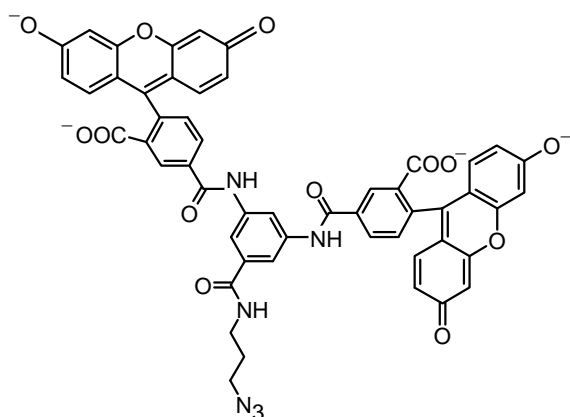
Введение. Флуоресцеин и аналоги флуоресцеина — одни из наиболее часто используемых флуоресцентных зондов в биоаналитических исследованиях. Такая популярность обусловлена свойствами этих красителей: высоким квантовым выходом флуоресценции, достаточной фотостабильностью, растворимостью в воде, высоким молярным коэффициентом поглощения в первой электронной полосе в сине-зеленой области спектра, легкостью введения функциональной группы для ковалентного связывания с молекулой мишени [1]. Флуоресцеиновые производные ковалентно присоединяются к белкам, нуклеиновым кислотам, аминокислотам, углеводам и другим биомолекулам [2—5]. Флуорофоры на основе флуоресцеина широко применяются в экспериментах по резонансной передаче

FLUORESCENCE OF THE 5- and 6-CARBOXYFLUORESCIEIN BIFLUOROPHORES

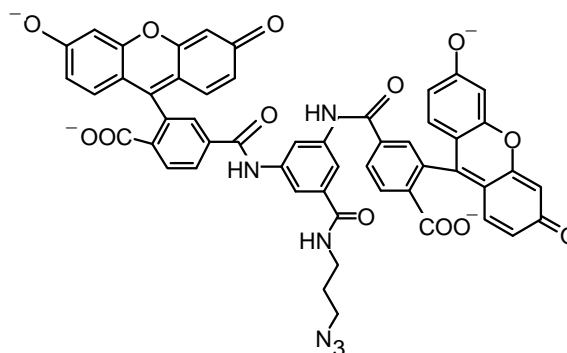
V. A. Povedailo^{1*}, **S. A. Tikhomirov**¹, **D. L. Yakovlev**¹, **I. L. Lysenko**², **F. Fan**², **V. V. Shmanai**²
(¹ B. I. Stepanov Institute of Physics of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, 220072, Belarus; e-mail: poved@ifanbel.bas-net.by; ² Institute of Physical and Organic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus)

энергии для определения межмолекулярного расстояния, как датчики рН раствора, секвенирования ДНК, в флуоресцентной микроскопии, проточной цитометрии и др. [6].

В качестве флуоресцентных маркеров при биоанализе часто используются 5- и 6-карбоксифлуоресцеины (5-FAM, 6-FAM) [7, 8], при этом обычно приходится работать с ограниченной концентрацией исследуемого объекта. Для увеличения чувствительности флуоресцентной регистрации анализируемого вещества синтезированы бифлуорофоры на основе 5-FAM и 6-FAM, ковалентно соединенных между собой линкером. В этом случае появляется возможность фактической посадки двух молекул флуорофора за счет ковалентной связи линкерной группы на одну точку связывания мишени, что может привести к увеличению чувствительности метода. При выборе линкера важное значение имеют его длина и жесткость для исключения возможности сближения флуорофоров, достаточного для образования димера, что приводит к безызлучательному переносу энергии. Анализируемое вещество присоединяли к линкеру посредством [3+2] азид-алкинового циклоприсоединения (клик-химия), для чего синтезировали азидные производные двух бифлуорофоров:



Дианионная форма (5-FAM)₂



Дианионная форма (6-FAM)₂

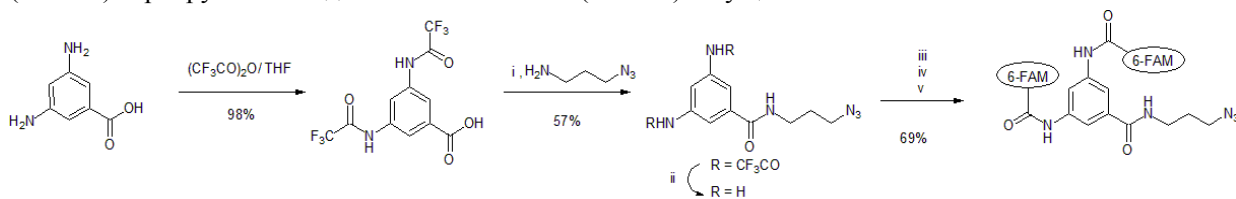
Измерения энергетических характеристик синтезированных бифлуорофоров в растворе показывают, что интенсивность флуоресценции (6-FAM)₂ существенно ниже интенсивности (5-FAM)₂ в одинаковых условиях. В данной работе на основе исследования особенностей флуоресцентных свойств синтезированных соединений в средах с различной вязкостью проанализированы причины наблюдаемых эффектов.

Методика эксперимента. Исследования проводили в растворе *трис*-ацетатного буфера с рН 8.5 при температуре 20 °С. Спектры поглощения зарегистрированы на спектрофотометре Varian Cary 500, спектры флуоресценции и степени поляризации флуоресценции в стационарном режиме — на спектрометрическом комплексе Horiba Scientific Fluorolog 3. При измерении степени поляризации флуоресценции проводился статистический набор данных для ограничения ошибки значением, не превышающим ±15 % от измеряемой величины. Отношение квантовых выходов флуоресценции η красителей:

$$\eta = \frac{I}{I_{\text{ref}}} \frac{D_{\text{ref}}}{D} \frac{n^2}{n_{\text{ref}}^2},$$

где I и I_{ref} — интегральные интенсивности; D и D_{ref} — оптические плотности; n и n_{ref} — показатели преломления растворителя образца и стандарта сравнения.

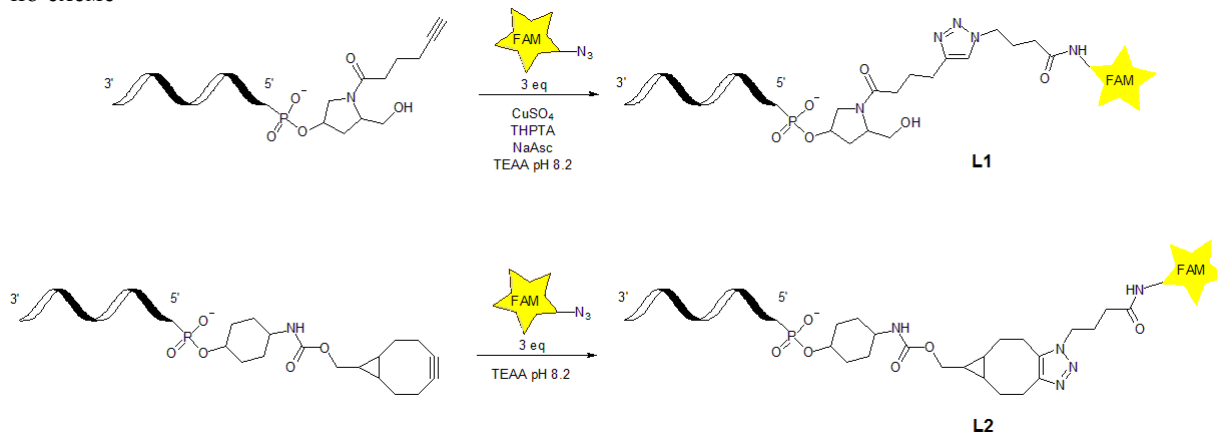
В экспериментах с мицеллами поверхностно-активного вещества (ПАВ) в растворе концентрация (5-FAM)₂ и (6-FAM)₂ постоянная и составляет $4.6 \cdot 10^{-6}$ М, концентрация ПАВ Тритон X-100 (TX-100) варьируется от 0 до 103.4 мМ. Синтез (6-FAM)₂ осуществлен по схеме



i: ДЦК, НОВт, ДИПЭА, ДМФА, 12 ч; ii: K₂CO₃, метанол, H₂O, 12 ч;
iii: 6-FAM(Piv)₂Pfp, Et₃N, ДМАП, ДМФА, 48 ч; iv: водный аммиак, ацетон, 1 ч; v: HCl

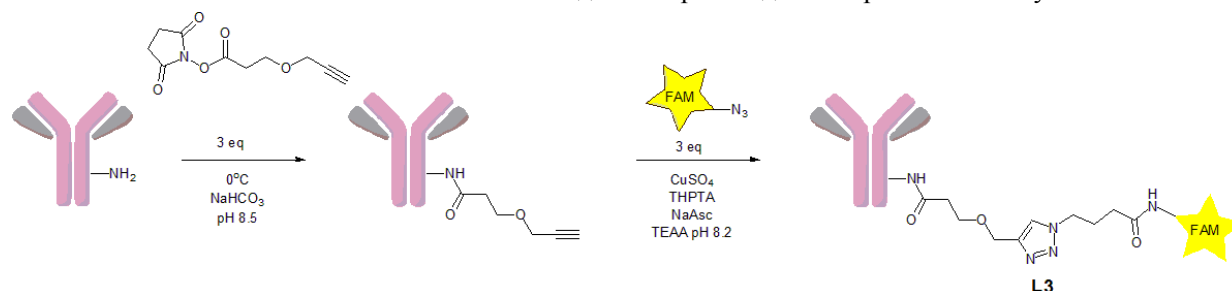
После хроматографической очистки полученного продукта удаляли пивалатные защитные группы в присутствии концентрированного аммиака с последующей обработкой разбавленной соляной кислотой. Суммарный выход на шесть стадий 38 %.

Конъюгаты одноцепочечных олигонуклеотидов с азидными производными красителей получены по схеме



Ацетиленовый или бициклонониновый (БЦН) фрагмент в олигонуклеотиды вводили в твердофазном синтезе с использованием соответствующих амидофосфитов. Продукты конъюгации выделяли с помощью ВЭЖХ.

Конъюгаты моноклональных антител с азидными производными красителей получены по схеме



Ацетиленовый фрагмент в антитела вводили с использованием N-гидроксисукцинимидного эфира пропилоксипропионовой кислоты. Продукты конъюгации выделяли с помощью гель-проникающей хроматографии. На приведенных схемах L1, L2 и L3 — линкеры.

Результаты и их обсуждение. На рис. 1 представлены спектры поглощения и флуоресценции образцов (5-FAM)₂ и (6-FAM)₂ в буферном растворе. Как видно, спектры поглощения первой электронной полосы обоих соединений совпадают, что указывает на слабое влияние фталевого фрагмента, линкера и азидной группы на ксантеновый хромофор. Максимум спектра флуоресценции бифлуорофора (5-FAM)₂ составляет 525 нм и смещен в низкочастотную область на 6 нм по отношению к (6-FAM)₂. Измерение энергетических характеристик показывает неожиданный результат: квантовый выход флуоресценции (5-FAM)₂ в буферном растворе с pH 8.5 в 2.4 раза выше, чем у (6-FAM)₂. Известно, что на интенсивность флуоресценции образцов влияют такие факторы, как pH, температура, полярность, вязкость сольватной оболочки, концентрация красителя и интенсивность возбуждающего излучения. Для выяснения причин наблюдаемого эффекта проведены дополнительные фотофизические исследования по измерению времени жизни возбужденного состояния бифлуорофоров (5-FAM)₂ и (6-FAM)₂, поляризации флуоресценции и их относительных интенсивностей в мицелярном растворе и водно-глицериновой смеси.

Для мономерных форм красителей в буферном растворе с pH 8.5 значения времен жизни (τ) сравнимы и составляют 4.28 нс для 5-FAM и 4.22 нс для 6-FAM. Спектры поглощения обоих соединений совпадают и имеют максимум 492 нм, а спектры флуоресценции одинаковы по форме, но немного смещены по частоте: максимум 5-FAM соответствует 519 нм, 6-FAM — 515 нм, что согласуется с [9]. Относительные квантовые выходы мономеров в натрий-фосфатном буфере (pH 7.4) равны 0.915 и 0.834 для 6-FAM и 5-FAM [10]. Иная картина наблюдается для бифлуорофоров. Время жизни (5-FAM)₂ в возбужденном состоянии $\tau = 4.17$ нс немного ниже, чем значения для мономера, тогда как у (6-FAM)₂ обнаруживается почти двукратное снижение до $\tau = 2.08$ нс.

Выполнены предварительные теоретические расчеты равновесной конфигурации молекул $(5\text{-FAM})_2$ и $(6\text{-FAM})_2$ в основном состоянии с помощью программы Gaussian 09. Оптимизация осуществлялась с использованием полуэмпирического метода PM6. Расчет проводился для дианионной формы в воде и без противоиона. Рассчитанные равновесные конфигурации представляют собой развернутые $(5\text{-FAM})_2$ и скрученные $(6\text{-FAM})_2$ структуры. Минимальное расстояние между центрами масс ксантовых фрагментов у $(6\text{-FAM})_2$ при конформационных переходах $\leq 5.53 \text{ \AA}$, тогда как у $(5\text{-FAM})_2$ флуорофоры расположены на расстояниях $\sim 20 \text{ \AA}$. Из-за близких расстояний между ксантовыми хромофорами в синтезированном $(6\text{-FAM})_2$ можно ожидать эффективного переноса энергии электронного возбуждения между идентичными фрагментами вследствие сильного перекрытия длинноволновой полосы поглощения и флуоресценции, так называемый homo-FRET [11]. Константа скорости переноса энергии донорно-акцепторных пар определяется областью перекрытия спектров, а также коэффициентом экстинкции в области перекрытия. Как видно из рис. 1, области перекрытия обоих соединений практически совпадают. Измеренные коэффициенты экстинкции также близки: $\sim 140000 \text{ л/М} \cdot \text{см}$. Передача энергии между двумя идентичными хромофорами уменьшает степень поляризации флуоресценции, но не общее время жизни бифлуорофора. Сходство спектральных характеристик в области перекрытия (рис. 1) и существенные различия времен жизни возбужденных состояний $(5\text{-FAM})_2$ и $(6\text{-FAM})_2$ свидетельствуют о слабом проявлении механизма homo-FRET для $(6\text{-FAM})_2$ бифлуорофора. Тушение флуоресценции для $(6\text{-FAM})_2$ в сравнении с $(5\text{-FAM})_2$ может быть связано главным образом с конформационной структурной перестройкой молекул в возбужденном состоянии, которая в значительной степени должна контролироваться вязкостью среды.

Контроль вязкости среды осуществлялся за счет использования водно-глицериновой смеси с изменяемым содержанием глицерина. При смешивании глицерина с буферным раствором (в расчетах принималось с водой, $T = 20 \text{ }^\circ\text{C}$) вязкость раствора при разном процентном содержании глицерина оценивалась в соответствии с [12]. Концентрация бифлуорофора постоянная $4.6 \cdot 10^{-6} \text{ М}$. На рис. 2 представлены зависимости относительного квантового выхода (η) и времени жизни возбужденного состояния для $(6\text{-FAM})_2$ от вязкости раствора. С добавлением небольшого количества глицерина наблюдается резкий рост η с дальнейшим выходом на плато, аналогичная картина имеет место и при измерении времени жизни τ .

Полученный результат можно объяснить следующим образом. При электронном возбуждении молекула бифлуорофора $(6\text{-FAM})_2$ в буферном водном растворе переходит в неравновесное конфигурационное состояние с последующей быстрой релаксацией по соответствующей координате во флуоресцентное состояние. В равновесном конфигурационном состоянии пространственное расположение фрагментов бифлуорофора приводит к частичному тушению флуоресценции и сопровождается уменьшением времени жизни и квантового выхода. Увеличение вязкости среды приводит к затруднению переходов между конформациями и сопровождается ростом квантового выхода флуоресценции и времени жизни возбужденного состояния.

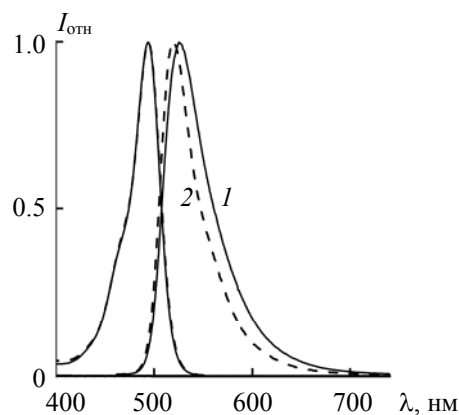


Рис. 1. Нормированные спектры поглощения и флуоресценции $(5\text{-FAM})_2$ (1) и $(6\text{-FAM})_2$ (2) в буферном растворе, pH 8.5

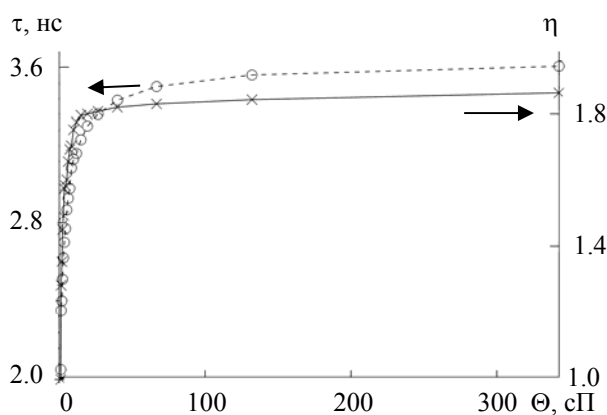


Рис. 2. Зависимости относительного квантового выхода флуоресценции η (\times) и времени жизни возбужденного состояния τ (\circ) $(6\text{-FAM})_2$ от вязкости водно-глицериновой смеси

Для снижения конформационной подвижности молекул в спектроскопии используется также внедрение флуорофора в полость молекулярного остова [13]. Известно, что у амфифильных соединений ПАВ в водной среде при определенных концентрациях образуются мицеллы, микровязкость которых существенно выше вязкости раствора [14]. Вязкость самого раствора, в котором находятся мицеллы TX-100, не изменяется до концентраций ПАВ 10^{-3} М, а затем возрастает [15]. Исследовано взаимодействие бифлуорофоров (5-FAM)₂ и (6-FAM)₂ с широко распространенным амфифильным соединением Тритон X-100. В водной среде пороговая концентрация мицеллообразования (ПКМ) TX-100 составляет 0.24 мМ и зависит от концентрации электролита [16]. Молекулы красителя способны взаимодействовать с мицеллой ПАВ и связываться внутри, на поверхности или около мицелл, что может изменять длину волны поглощения и флуоресценции, а также силу осциллятора поглощения красителя [17]. Экспериментальные исследования растворов (5-FAM)₂ и (6-FAM)₂ при добавлении TX-100 проведены в широком интервале концентраций ПАВ 0—103.4 мМ, что соответствует ~430-кратному превышению над ПКМ.

Результаты измерений интенсивности флуоресценции (6-FAM)₂ и (5-FAM)₂ от концентрации TX-100 при постоянной концентрации бифлуорофора $4.6 \cdot 10^{-6}$ М приведены на рис. 3. При концентрации TX-100 ниже ПКМ заметных изменений интенсивности флуоресценции не наблюдается, что свидетельствует об отсутствии значительного взаимодействия (5-FAM)₂ или (6-FAM)₂ с отдельной молекулой TX-100. Когда концентрация TX-100 > ПКМ, наблюдается резкий, практически линейный рост интенсивности флуоресценции (6-FAM)₂, который достигает переломной точки при концентрации TX-100 $C = 6.03$ мМ (рис. 3, а). У (5-FAM)₂ интенсивность флуоресценции снижается с увеличением концентрации ПАВ (рис. 3, б). В предположении, что мицелла состоит из 130 молекул TX-100, и при общепринятом допущении, что концентрация свободных молекул TX-100 в растворе равна ПКМ [18], можно определить концентрацию мицелл C_m в точке, соответствующей переходу в насыщение:

$$C_m = (C - \text{ПКМ})/130,$$

где $C_m = 44 \cdot 10^{-6}$ М, или в среднем на одну молекулу (6-FAM)₂ приходится ~10 мицелл. Ксантоновые красители с соединениями ПАВ исследованы в [19—21], где отмечено очень слабое взаимодействие флуоресцеина с TX-100.

Одновременно с интенсивностью флуоресценции измерены степени поляризации флуоресценции бифлуорофоров. Изменение вязкости растворителя приводит к изменению анизотропии флуоресценции. Для молекул (5-FAM)₂ и (6-FAM)₂ в растворах с низкой вязкостью скорость вращательной диффузии обычно выше, чем скорость эмиссии. С повышением вязкости наблюдается резкое увеличение P в начальный период возрастания концентрации с дальнейшим выходом на постоянное значение для обоих соединений (рис. 6). В области концентраций TX-100 от 0 до ПКМ поляризация флуоресценции $P \cong 3\%$ обусловлена вращением молекул (6-FAM)₂ в буферном растворе с низкой вязкостью ($\eta \cong 1$ сР). При концентрациях, превышающих ПКМ, молекулы бифлуорофора могут связываться с мицеллами, микровязкость которых возрастает до 54 сР [14]. На рис. 3 представлены также зависимости времени жизни возбужденного состояния бифлуорофоров от концентрации TX-100 в растворе.

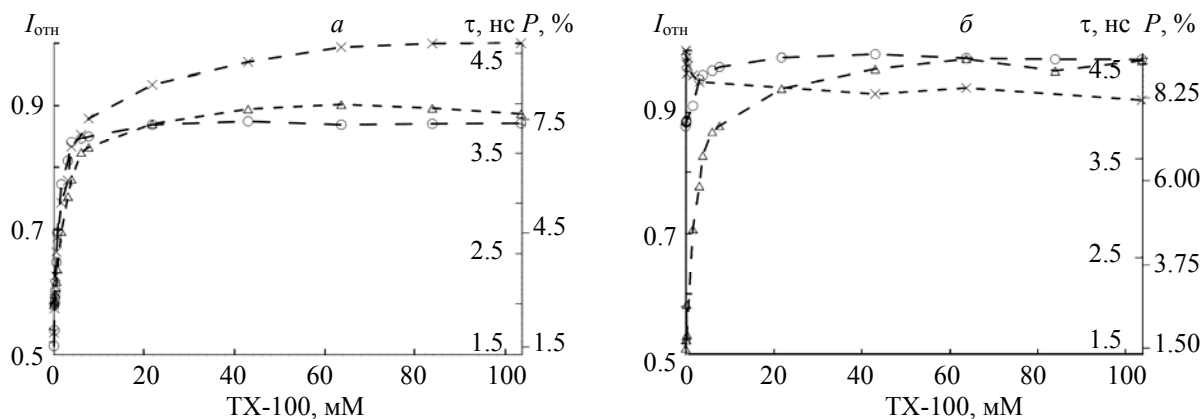


Рис. 3. Зависимости интенсивности флуоресценции $I_{отн}$ (×), времени жизни возбужденного состояния τ (○) и степени поляризации флуоресценции P (Δ) (6-FAM)₂ (а) и (5-FAM)₂ (б) в буферном растворе от концентрации TX-100

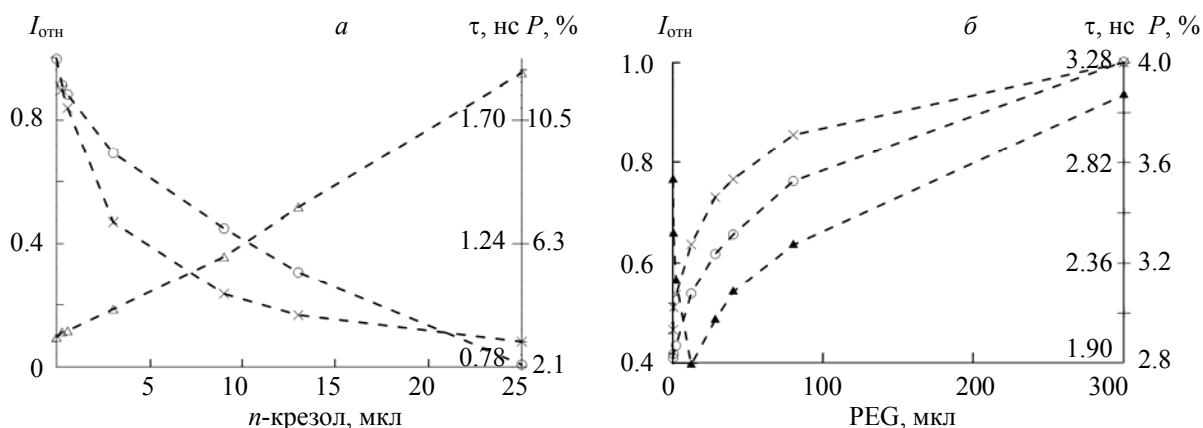


Рис. 4. Зависимости интенсивности флуоресценции $I_{отн}$ (\times), времени жизни возбужденного состояния τ (\circ) и степени поляризации флуоресценции P (Δ) (6-FAM)₂ в буферном растворе при добавлении *n*-крезола (а) и PEG (б)

Начиная с ПКМ, наблюдается резкое возрастание τ , особенно существенное для (6-FAM)₂, с выходом на стационарное значение ~ 3.75 нс у (6-FAM)₂ и ~ 4.6 нс у (5-FAM)₂.

Поскольку бифлуорофор при взаимодействии с мицеллой может находиться внутри, на поверхности или около мицеллы, для получения более полной информации проведены эксперименты по взаимодействию (6-FAM)₂ с *n*-крезолом и полиэтиленгликолем (PEG) как компонентами, моделирующими гидрофобную ароматическую углеводородную группу и гидрофильную полиоксипропиленовую цепь TX-100 (рис. 4). С увеличением концентрации *n*-крезола наблюдается тушение флуоресценции (6-FAM)₂, что проявляется уменьшением интенсивности и τ . Степень поляризации флуоресценции при этом возрастает от 3 до 12.1 %, что объясняется непрерывным снижением τ до 0.78 нс. Иная картина наблюдается при взаимодействии с PEG (рис. 4, б). С увеличением концентрации PEG возрастают интенсивность флуоресценции бифлуорофора, τ и степень поляризации, аналогично рис. 3, а. Таким образом, бифлуорофор взаимодействует не с гидрофобным ядром мицеллы, а с цепочками PEG, находящимися снаружи мицелл. Следует также отметить, что проникновение бифлуорофора внутрь мицеллы затруднено вследствие больших размеров молекулы.

Относительный квантовый выход флуоресцентных меток с ковалентно присоединенным белком. Измерены относительные квантовые выходы флуоресценции комплексов 5-FAM, 6-FAM и (5-FAM)₂, (6-FAM)₂, ковалентно связанных с моноклональным антителом. В табл. 1 представлены отношения квантовых выходов (η) флуоресценции комплексов с моноклональным антителом (mab) к квантовым выходам флуорофоров и длины волн максимумов соответствующих спектров флуоресценции. Видно, что для комплекса с флуорофором (6-FAM)₂ относительный квантовый выход возрастает, а для мономерных меток и (5-FAM)₂ снижается. Причины падения η комплексов по отношению к флуорофорам обусловлены PET-процессами. Белок моноклонального антитела содержит триптофан, который является эффективным тушителем ксантеновых красителей. Селективное тушение переносом электрона с триптофана на электронно-возбужденный краситель основано на низком потенциале окисления триптофана ~ 0.8 – 1.0 В при нейтральном pH [22]. Повышение квантового выхода флуоресценции в комплексе (6-FAM)₂-L3-mab по сравнению с (6-FAM)₂ может быть связано с особенностями флуорофора (6-FAM)₂ и влиянием связывания флуорофора с массивной биомолекулой на конфигурационную подвижность метки в возбужденном состоянии аналогично тому, как это наблюдалось для мицеллярного раствора.

Т а б л и ц а 1. Относительные квантовые выходы флуоресценции (η) комплекс/флуорофор и соотношение их длин волн (нм) в максимумах спектров флуоресценции

Комплекс/флуорофор	η	$\lambda_{компл}^{макс}/\lambda_{фл}^{макс}$
5-FAM-L3-mab/5-FAM	0.86	525/525
(5-FAM) ₂ -L3-mab/(5-FAM) ₂	0.52	526/527
6-FAM-L3-mab/6-FAM	0.86	518/521
(6-FAM) ₂ -L3-mab/(6-FAM) ₂	1.25	521/524.5

Заключение. Исследовано влияние вязкости на фотофизические свойства растворов впервые синтезированных карбоксифлуоресцеиновых бифлуорофоров (5-FAM)₂ и (6-FAM)₂. Установлено, что при большом сходстве структуры бифлуорофоров существенно различаются их люминесцентные свойства. Квантовый выход люминесценции (6-FAM)₂ в буферном растворе с pH 8.5 в 2.4 раза ниже, чем (5-FAM)₂. Как при увеличении вязкости раствора в случае использования водно-глицериновой смеси, так и при изменении микровязкости в случае мицелярного раствора замедляется структурная релаксация молекул в возбужденном состоянии, что приводит к увеличению интенсивности флуоресценции, времени жизни возбужденных состояний и степени поляризации, т. е. фотофизические свойства синтезированных соединений в значительной степени контролируются вязкостью среды.

Измерения квантовых выходов флуоресценции комплексов синтезированных бифлуорофоров с биомолекулами по отношению к квантовому выходу флуоресценции самих флуорофоров показывают, что комплексы с (6-FAM)₂ увеличивают квантовый выход по отношению к флуорофору, тогда как комплексы с (5-FAM)₂ его снижают. Повышение квантового выхода связано с особенностями структуры флуорофора (6-FAM)₂ и влиянием массивной биомолекулы на конфигурационную подвижность метки в возбужденном состоянии. Для комплексов с белком, в цепочке которого присутствует триптофан или гуанин, характерно снижение квантового выхода по отношению к квантовому выходу флуорофора, которое обусловлено тушением флуоресценции путем переноса электрона с триптофана или гуанина на электронно-возбужденный краситель.

Полученные результаты могут быть использованы в биоаналитических исследованиях для повышения чувствительности полимеразной цепной реакции с детектированием в режиме реального времени, при поиске новых чувствительных индикаторов (сенсоров) вязкости, а также при моделировании липидных бислоев, во внутренних мембранах живых клеток, в атмосферных аэрозолях и в полимерных образцах.

Работа выполнена при поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (проект № Ф20В-003).

- [1] X.-F. Zhang, J. Zhang, L. Liu. *J. Fluores.*, **24**, N 3 (2014) 819—826
- [2] M. Rodriguez, J. Lapierre, C. R. Ojha, A. Kaushik, E. Batrakova, F. Kashanchi, S. M. Dever, M. Nair, N. El-Hage. *Sci. Rep.*, **7** (2017) 1862
- [3] Y. L. Sun, Y. H. Sun, R. L. Zhao, K. S. Gao. *BMC Biotechnol.*, **16** (2016) 46
- [4] M. Wiese, K. Castiglione, M. Hensel, S. Ulrike, B. Christian, J. Jantsch. *J. Immunol. Methods*, **353** (2010) 102—110
- [5] F. Hsiao, P.-Y. Huang, T. Aoyagi, S.-F. Chang, J. Liaw. *J. Food Drug Anal.*, **26** (2018) 869—878
- [6] J. R. Lakowicz. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, New York, Springer Science + Business Media LLC (2006)
- [7] В. А. Поведайло, А. П. Ступак, Д. А. Цыбульский, В. В. Шманай, Д. Л. Яковлев. *Журн. прикл. спектр.*, **84**, № 3 (2017) 434—442 [V. A. Povedailo, A. P. Stupak, D. A. Tsybulsky, V. V. Shmanai, D. L. Yakovlev. *J. Appl. Spectr.*, **84**, N 3 (2017) 452—459]
- [8] А. П. Блохин, М. В. Квач, В. А. Поведайло, В. В. Шманай, Д. Л. Яковлев. *Журн. прикл. спектр.*, **84**, № 1 (2017) 26—32 [A. P. Blokhin, M. V. Kvach, V. A. Povedailo, V. V. Shmanai, D. L. Yakovlev. *J. Appl. Spectr.*, **84**, N 1 (2017) 19—24]
- [9] M. V. Kvach, D. A. Tsybulsky, A. V. Ustinov, I. A. Stepanova, S. L. Bondarev, S. V. Gontarev, V. A. Korshun, V. V. Shmanai. *Bioconjug. Chem.*, **18**, N 5 (2007) 1691—1696
- [10] T. Mineno, T. Ueno, Y. Urano, H. Kojima, T. Nagano. *Org. Lett.*, **8**, N 26 (2006) 5963—5966
- [11] F. T. S. Chan, C. F. Kaminski, G. S. Kaminski Schierle. *ChemPhysChem*, **12** (2011) 500—509
- [12] N.-S. Cheng. *Ind. Eng. Chem. Res.*, **47** (2008) 3285—3288
- [13] C. Marquez, F. Huang, W. M. Nau. *IEEE Trans. Nanobiosci.*, **3** (2004) 39—45
- [14] S. S. Kumari, S. K. Saha. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **18** (2016) 1551—1563
- [15] K. Szymczyk, A. Taraba. *J. Therm. Anal. Calorim.*, **126** (2016) 315—326
- [16] U. Anand, C. Jash, S. Mukherjee. *Interface Sci.*, **364** (2011) 400—406
- [17] Y. Gao, C. Yu, G. An. *J. Dispers. Sci. Technol.*, **21** (2000) 279—304
- [18] A. R. Petcu, E. A. Rogoza, C. A. Lazar, N. L. Olteanu, A. Meghea, M. Mihaly. *Arab. J. Chem.*, **9** (2016) 9—17
- [19] B.B. Bhowmik, P. Ganguly. *Spectrochim. Acta A*, **61** (2005) 1997—2003
- [20] J. Kibblewhite, G. G. Drummond, F. Grieser, P. J. Thistlethwaite. *J. Phys. Chem.*, **93** (1989) 7464—7473
- [21] A. Song, J. Zhang, M. Zhang, T. Shen, J. Tang. *Colloid. Surf.*, **167** (2000) 253—262
- [22] H. Neuweiler, A. Schulz, M. Bohmer, J. Enderlein, M. Sauer. *JACS*, **125** (2003) 5324—5330