

УДК 535.37

## ВЛИЯНИЕ ОКРУЖЕНИЯ НА ФЛУОРЕСЦЕНЦИЮ ЛАНТАНОИДНЫХ КОМПЛЕКСОВ ПОРФИРИНОВ.

### I. Флуоресценция Yb комплекса мезотетра(p-сульфофенил)порфирина в мицеллярных растворах

Г. К. Чудинова, И. А. Наговицын, В. В. Савранский

*Проведено сравнительное исследование влияния поверхностно-активных веществ (ПАВ) различной полярности (анионного додецилсульфата натрия – SDS, катионного цетилтриметиламмония бромид – СТАВ, нейтрального – Тритона X-100) на флуоресценцию Yb комплекса мезотетра(p-сульфофенил)порфирина (YbТСФП) в растворах. На флуоресценцию YbТСФП существенно влияют свойства и полярность групп ПАВ, взаимодействующих с ионом Yb<sup>3+</sup>. Наибольшее усиление ИК флуоресценции YbТСФП (в 4.5 раза) относительно водного раствора последнего достигается при его встраивании в мицеллы анионного додецилсульфата натрия.*

В последние 20 лет для методов биохимического и медицинского анализов широко используются соединения, флуоресцирующие в дальней красной и ближней ИК областях спектра. Например, Yb комплексы порфиринов предложено использовать для диагностики злокачественных опухолей [1, 2]. Для фотодинамической терапии разрабатываются фотосенсибилизаторы второго поколения с усиленным поглощением в красной области спектра [3].

Yb комплексы порфиринов флуоресцируют в области 922 – 1040 нм с наиболее интенсивной полосой в области 974 – 980 нм [4, 5]. Использование Yb комплексов в качестве флуоресцентных маркеров для биохимического анализа и биофизических исследований

очень перспективно, так как в ближней ИК области спектра (920 – 1000 нм) практически отсутствует фоновая флуоресценция белков, что позволяет значительно увеличить чувствительность анализа [6 – 8]. Основной недостаток ИК флуоресценции – низкий квантовый выход, а кроме того, вода является тушителем такой флуоресценции.

Флуоресцентные маркеры встраивают в организованные системы, такие как мицеллы, липосомы, циклодекстрины [9, 10], коллоидные [11] и микрокристаллические среды [12], которые могут значительно увеличить флуоресценцию люминофора [13, 14]. Так усиление флуоресценции *Yb* комплексов порфиринов наблюдается при встраивании их в мицеллярные или липосомальные растворы [15].

Не только редкоземельные комплексы порфиринов, но и безметалльные порфирины, а также комплексы порфиринов с другими металлами эффективно используются для разработки хемо- и биосенсоров [16 – 18], методов иммуноанализа с флуоресцентной регистрацией [19].

Исследование порфиринов в мицеллярных средах представляет самостоятельный научный интерес. В работах последних лет представлены исследования флуоресцентных свойств порфиринов в прямых [20 – 23] и обратных [24 – 26] мицеллах. Исследуются взаимодействия порфиринов с липопротеидами [27], водорастворимыми белками [28], мицеллами, содержащими ДНК [29].

Мицеллы – динамические образования; они могут обмениваться поверхностно-активными веществами с окружающим раствором [30]. Мицеллы можно рассматривать как вязкие и полярные растворители. Полярность и микровязкость упорядоченного молекулярного ансамбля значительно влияет на флуоресцентные характеристики. Было показано, что высокая микровязкость мицелл увеличивает флуоресценцию таких соединений как цианиновые красители, содержащих систему сопряженных двойных связей [31, 32]. Тип поверхностно-активного вещества влияет на свойства светочувствительных веществ, встроенных в мицеллы [33, 34]. Например, квантовый выход фотоионизации в мицеллах SDS больше, чем в мицеллах Тритона X-100 [35, 36].

Встраивание флуоресцирующего вещества в ленгмюровские пленки, представляющие собой двумернокристаллические структуры, может значительно увеличить квантовый выход флуоресценции, как то происходит в мицеллярных системах. Нами были впервые исследованы флуоресценция в ИК диапазоне и сенсibilизированная флуоресценция *Yb*-, *Dy*-, *Tm*-комплексов мезотетрафенилпорфиринов в ленгмюровских пленках [37 – 40]. Следует отметить ряд работ, посвященных изучению сенсibilизированной флуоресценции в видимом диапазоне спектра  $\beta$ -дикетонатных комплексов редкоземель-

ных элементов (в основном комплексов  $Eu^{3+}$ ) в ленточных пленках [41 – 46].

Итак, исследования флуоресценции различных соединений в конденсированных системах являются основой для поиска условий наиболее эффективного применения исследуемых маркеров для методов биохимического и медицинского анализов с флуоресцентной регистрацией, а использование соединений, флуоресцирующих в ИК диапазоне, позволяет снизить до минимума флуоресценцию белка (флуоресценцию фона) и, тем самым, повысить чувствительность анализа.

В настоящей работе исследовано влияние поверхностно-активных веществ на флуоресцентные характеристики  $Yb$  комплекса мезотетра(*p*-сульфофенил)порфирина ( $YbTCS\Phi\Pi$ ).

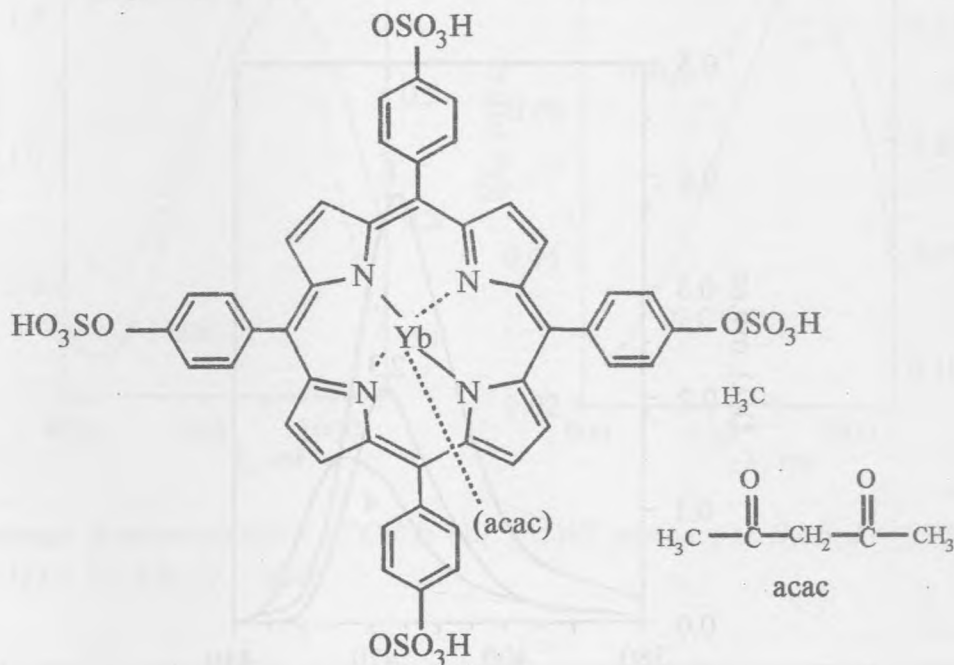


Рис. 1. Структурная формула  $Yb$  комплекса мезотетра(*p*-сульфофенил)порфирина.

Водорастворимый комплекс  $YbTCS\Phi\Pi$  был синтезирован согласно работам [47, 48]. Структурная формула  $YbTCS\Phi\Pi$  приведена на рис. 1. Были использованы следующие ПАВ (фирма Serva, Германия): (1) анионный – додецилсульфат натрия (SDS) –  $CH_3-(CH_2)_{11}OSO_3Na$ ; (2) катионный – цетилтриметиламмоний бромид (СТАВ) –  $CH_3-(CH_2)_{15}N(CH_3)_3Br$ ; (3) неионогенный – Тритон X-100 –  $CH_3-C(CH_3)_2CH_2-C(CH_3)_2$ -фенил- $[CH_2-CH_2-O]_nH$  ( $n = 9, 10$ ). Раствор  $YbTCS\Phi\Pi$  готовили в тридистиллированной воде в концентрации  $10^{-3} M$ . Для спектральных измерений раствор  $YbTCS\Phi\Pi$

смешивали с 1% (масс.) водным раствором ПАВ таким образом, чтобы концентрация порфирина составляла  $10^{-6}$  М. Спектры поглощения измеряли на спектрофотометре Shimadzu UV-VIS 3100, спектры флуоресценции на спектрофлуориметре Shimadzu 5001 (Япония). При измерении спектров флуоресценции щели возбуждения/регистрации составляли 3/20 нм. Отметим, что в работе [49] флуоресценцию Yb комплексов порфиринов в растворах измеряли при щелях, составляющих 0.4 мм (возбуждения и регистрации). В нашей работе для того, чтобы уменьшить влияние рассеянного света при измерении спектров флуоресценции, использовали фильтр ЖС-16. Интегральная интенсивность флуоресценции – величина, использованная ниже, – это площадь под кривой спектра флуоресценции. Отклик спектрофлуориметра в ИК диапазоне тестировали с помощью арсенидогаллиевых диодов [50], излучающих в ИК диапазоне ( $\approx 930$  нм).

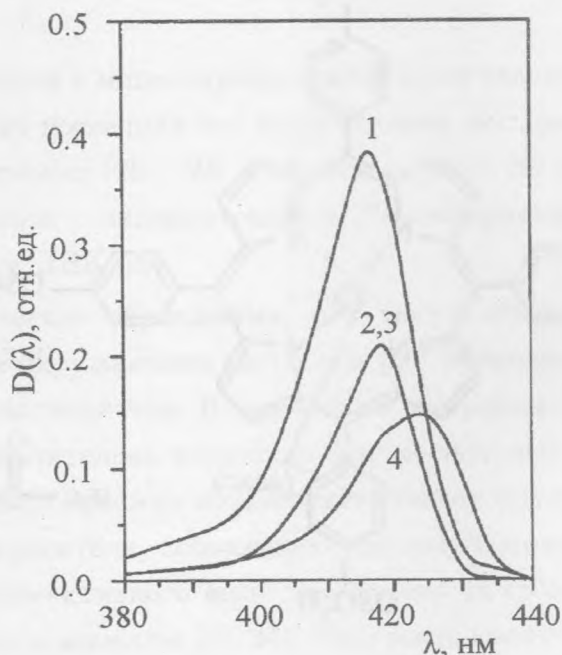


Рис. 2. Спектры поглощения  $D(\lambda)$  раствора YbTCPII ( $10^{-6}$  М): 1 – вода; 2 – 1% SDS; 3 – 1% Тритон X-100; 4 – 1% СТАВ.

В спектре поглощения YbTCPII полоса Соре смещена на 3 нм в длинноволновую область в SDS и в Тритоне X-100 (418 нм) и на 10 нм в СТАВ (425 нм) относительно полосы в водном растворе (415 нм) (рис. 2). Эта разница, по-видимому, вызвана изменением окружения центрального иона Yb<sup>3+</sup> в порфириновом макроцикле при взаимодействии с активными группами ПАВ. На рис. 3. показаны спектры ИК флуоресценции

*YbTCФП* в 1% растворах ПАВ: I – SDS; II – Triton X-100; III – СТАВ и IV – вода. Спектр имеет один максимум при 980 нм в ПАВ и 2 максимума при 970; 1000 нм в воде. Полоса поглощения во всех ПАВ смещена в длинноволновую область, а интенсивность флуоресценции падает в ряду: SDS > Тритон X-100 > H<sub>2</sub>O > СТАВ. Ионные мицеллы имеют различный заряд поверхности, следовательно сольubilизация флуорофора в ионных мицеллах подвергает его воздействию внешнего электрического поля на водно-мицеллярной поверхности, что и приводит к изменению флуоресценции.

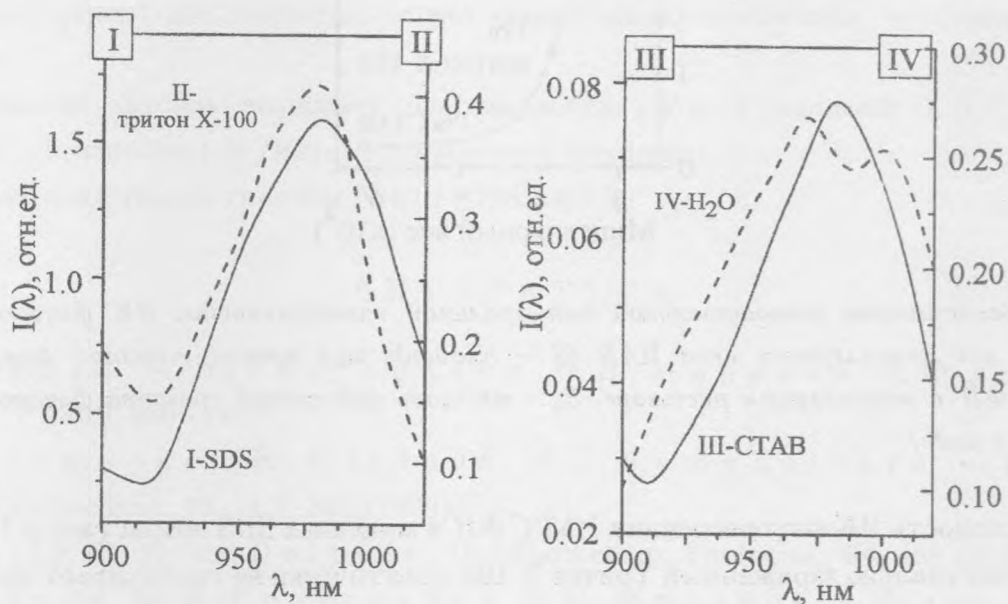


Рис. 3. Спектры флуоресценции *YbTCФП* ( $10^{-6}$  M) 1% растворах ПАВ: I – SDS; II – Тритон X-100; III – СТАВ; IV – вода.

Можно было бы ожидать во всех случаях увеличения интенсивности флуоресценции *YbTCФП* в мицеллах по сравнению с водной средой, которая является ее тушителем. Ион  $Yb^{3+}$  в *YbTCФП*, как и СТАВ, имеет положительный заряд; влияние встраивания *YbTCФП* в мицеллы положительно заряженного СТАВ не только не способствует усилению, но приводит к снижению интенсивности ИК флуоресценции. В противоположность этому разница зарядов порфиринового комплекса и SDS приводит к значительному возгоранию флуоресценции.

На рис. 4 показана зависимость интегральной интенсивности флуоресценции *YbTCФП* от мицеллярного веса ПАВ (средняя масса одной мицеллы в а.е., данные взяты из [51]) относительно интегральной интенсивности *YbTCФП* в водном раство-

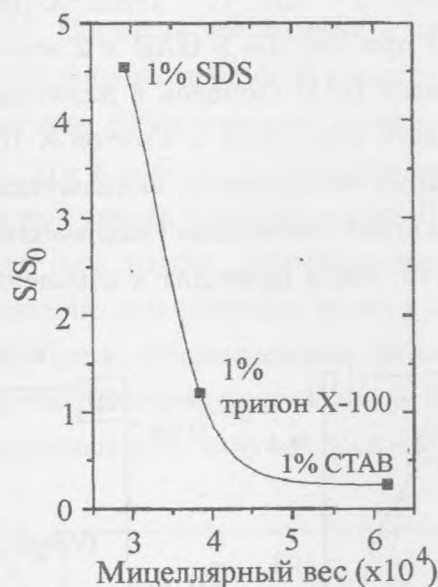


Рис. 4. Зависимость относительной интегральной интенсивности ИК флуоресценции  $YbTCФП$  от мицеллярного веса ПАВ ( $S$  – площадь под кривой спектра флуоресценции  $YbTCФП$  в мицеллярном растворе,  $S_0$  – площадь под кривой спектра флуоресценции  $YbTCФП$  в воде).

ре. Интенсивность ИК флуоресценции  $YbTCФП$  в мицеллах SDS возрастает в 4.5 раза, тогда как нейтрально заряженный Тритон X-100 практически не увеличивает интенсивность флуоресценции  $YbTCФП$ . По-видимому, отрицательный заряд кислорода в SDS создает эффективные условия передачи энергии возбуждения на  $Yb$  ион с порфиринового макроцикла. Тушение положительно заряженным СТАВ приводит к восьмикратному снижению интенсивности флуоресценции по сравнению с мицеллами SDS. Такое снижение флуоресценции также может быть вызвано взаимодействием  $Yb^{3+}$  с атомом брома, присутствующим в СТАВ, который является тушителем флуоресценции, как и многие тяжелые атомы [52]. Тушение флуоресценции водорастворимого порфирина в мицеллах СТАВ также исследовано в работе [53].

Таким образом, показано, что микроокружение и его полярность влияет на эффективность флуоресценции  $YbTCФП$  в целом (при встраивании в мицеллы), и в особенности, на ион  $Yb^{3+}$ , флуоресценция которого регистрируется в ИК диапазоне. Наибольшее усиление ИК флуоресценции  $YbTCФП$  (в 4.5 раза) относительно водного раствора последнего достигается при его встраивании в мицеллы анионного додецилсульфата натрия.

Отметим, что выяснение фотофизических параметров (тонкая структура спектра, квантовые выходы и т.д.)  $YbTc\Phi\Pi$  не является целью настоящей статьи. В настоящей работе был определен тип ПАВ (анионный – додецилсульфат натрия), встраивание в мицеллы которого, способствует наибольшему из исследованных ПАВ усилению флуоресценции  $YbTc\Phi\Pi$ .

Проведенные исследования могут быть полезны для разработки новых методов иммуноанализа с использованием маркеров, флуоресцирующих в ИК области, где отсутствует фоновая флуоресценция белка. Применение методик, повышающих эффективность флуоресценции маркера, может значительно увеличить чувствительность анализа.

Коллектив авторов выражает благодарность к.х.н. Румянцевой В. Д. (МГАТХТ им. М. В. Ломоносова) за синтез иттербиевого комплекса.

Работа поддержана грантом N НШ-1788.2003.2.

#### ЛИТЕРАТУРА

- [1] Г а й д у к М. И., Г р и г о р ь я н ц В. В., М и р о н о в А. Ф. и др. ДАН СССР, **309**, 980 (1989).
- [2] S c h o m a s k e r K., G a i d o u k M. I., R u m y a n t s e v a V. D., et al. Nuklearmedizin, **38**, N 7, 285 (1999).
- [3] B o y l e R. W. and D o l p h i n D. Photochem. Photobiol., **64**, 469 (1996).
- [4] Г а й д у к М. И., Г р и г о р ь я н ц В. В., М и р о н о в А. Ф. и др. Журнал прикладной спектроскопии, **46**, N 1, 163 (1986).
- [5] W o n g C.- P. Inorg. Sintesis series, **22**, 156 (1983).
- [6] R o s e l l i C., B o u s s a c A., M a t t i o l i T. A., et al. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, **93**, 14333 (1996).
- [7] R o s e l l i C., B o u s s a c A., and M a t t i o l i T. A. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, **91**, N 26, 12897 (1994).
- [8] M a t t i o l i T. A., R o s e l l i C., and B o u s s a c A. Biochim. Biophys. Acta, **1101**, N 1, 121 (1992).
- [9] Y a n g R., L i K., W a n g K., et al. Anal. Chem., **75**, N 3, 612 (2003).
- [10] M a z z a g l i a A., A n g e l i n i N., D a r c y R., et al. Chemistry, **9**, N 23, 5762 (2003).
- [11] C h e n C., X i a n g J., X u G., and Z h o u B. Chem. Phys. Lett., **315**, N 5 – 6, 371 (1999).

- [12] Trau D., Yang W., Seydack M., Caruso F., et al. *Anal. Chem.*, **74**, N 21, 5480 (2002).
- [13] Acharya K. R., Bhattacharya S. C., and Moulik S. P. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, **109**, 29 (1997).
- [14] Iben I. B. T., Stavola M., Macgregor R. B., et al. *Biophys. J.*, **59**, 1040 (1991).
- [15] Соловьев К. Н., Цвирко М. П., Качура Т. Ф. *Оптика и спектроскопия*, **40**, N 4, 648 (1976).
- [16] Nakamura C., Takeda S., Kageshima M., et al. *Biopolymers*, **76**, N 1, 48 (2004).
- [17] Zhang X. B., Guo C. C., Li Z. Z., et al. *Anal. Chem.*, **74**, N 4, 821 (2002).
- [18] Damos F. S., Sotomayor Mdel P., Kubota L. T., et al. *Analyst*, **128**, N 3, 255 (2003).
- [19] Савицкий А. П. "Флуоресцентный иммуноанализ". В: *Итоги науки и техники, серия Биотехнология*, **3**, 117 (1987).
- [20] Kim J. -O., Lee Y. -A., Yun B. H., et al. *Biophys. J.*, **86**, 1012 (2004).
- [21] Lebold T. P., Yeow E. K. L., and Steer R. P. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **3**, N 2, 160 (2004).
- [22] Gandini S. C. M., Yushmanov V. E., and Tabak M. *J. Inorg. Biochem.*, **85**, N 4, 263 (2001).
- [23] Guo L. and Liang Y. Q. *Spectrochim. Acta A: Mol. Biomol. Spectrosc.*, **59**, N 2, 219 (2003).
- [24] Gerhardt S. A., Lewis J. W., Zhang J. Z., et al. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2**, N 9, 934 (2003).
- [25] Yu J., Wang X., Zhang B., Chen J., et al. *PCCP: Phys. Chem. Chem. Phys.*, **5**, N 17, 3660 (2003).
- [26] Togashi D. M. and Costa S. M. B. *PCCP: Phys. Chem. Chem. Phys.*, **4**, N 7, 1141 (2002).
- [27] Bonneau S., Vever-Bizet C., Morlière P., et al. *Biophys. J.*, **83**, 3470 (2002).
- [28] Andrade S. M. and Costa S. M. B. *Biophys. J.*, **82**, 1607 (2002).
- [29] De Paoli V. M., De Paoli S. H., Borissevitch I. E., Tedesco A. C. *J. Alloys Comp.*, **344**, N 1-2, 27 (2002).



- [30] Adler A., Longo F. R., Finarelli J. D., et al. *J. Org. Chem.*, **32**, 476 (1967).
- [31] Kuzmin M. and Zaitsev N. "Kinetics of photochemical charge separation in micellar solutions" in: "The Interface Structure and Electrochemical Processes at the Boundary Between Two Immiscible Liquids", Ed.: Kazariņov V., Berlin, Heidelberg Springer-Verlag 1987, p. 207.
- [32] Aikawa M., Yekta A., Lin J.-M., and Turro N. J. *Photochem. Photobiol.*, **32**, 297 (1980).
- [33] Shinoda K., Tamamushi B.-I., Nakagawa T., and Isemura T. "Colloidal surfactants. Some photochemical properties". New York and London, Academic Press, 1963.
- [34] Gelbart W. M., Ben-Shaul A., and Roux D. "Micelles, membranes, microemulsions, and monolayers", New York, Springer-Verlag, 1994.
- [35] Humphry-Baker R. and Gratzel M. *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 847 (1980).
- [36] Bernas A., Grand D., Hauteclocque S., and Chaurbaudet A. *J. Phys. Chem.*, **85**, 3684 (1981).
- [37] Чудинова Г. К., Наговицын И. А., Карпов Р. Е., Савранский В. В. *Квантовая электроника*, **33**, N 9, 765 (2003).
- [38] Chudinova G., Rumiantsева V., and Chudinov A. European Conference Thin Organized Films, Proceedings, 1998, Potsdam, Germany, University of Potsdam, Institute of Physics, 1988, p. 342.
- [39] Chudinova G., Rumiantsева V., and Nagovitsyn I. VIIIth International Conference on Spectroscopy and Chemistry of Porphyrins and their Analogs, Book of Abstracts, Minsk, Republic of Belarus, Sept, 22 - 26, 1998, Published by the B. I. Stepanov Institute of Physics, 1988, p. 81.
- [40] Наговицын И. А., Чудинова Г. К., Румянцева В. Д., Лобанов А. В. VI Международная конференция "Наукоемкие химические технологии", тезисы докладов, 1999, 25 - 29 октября, Москва, МГАТХТ им. Ломоносова, 1999, с. 208.
- [41] Yang J.-H., Zhu G.-Y., and Wu B. *Anal. Chim. Acta*, **198**, 287 (1987).
- [42] Ci Y.-X. and Lan Z.-H. *Anal. Lett.*, **21**, N 8, 1499 (1988).
- [43] Yang Jinghe, Ren Xuezheng, Zou Huabin, Shi Ruiping. *Analyst*, **115**, 1505 (1990).

- [44] Xu Y.-Y., Hemmila I., Mukkala V.-M., et al. *Analyst*, **116**, 1155 (1991).
- [45] Zhong C., Feng Y., Yang K., and Zhu G. *Chem. Lett.*, 775 (1996).
- [46] Zhong G.-L. and Yang K.-Z. *Langmuir*, **14**, 5502 (1998).
- [47] Gaiduk M., Grigoryants V., Mironov A., and Romyantseva V. *Proc. Estonian Acad. Sci. Phys. Math.*, **40**, N 3, 198 (1991).
- [48] Adler A., Longo F. R., Finarelli J. D., et al. *J. Org. Chem.*, **32**, 476 (1967).
- [49] Meng J. X., Li K. F., Yuan J., et al. *Chem. Phys. Lett.*, **332**, 313 (2000).
- [50] Иванов В. И., Аксенов А. И., Юшин А. М. "Полупроводниковые оптоэлектронные приборы. Справочник" под ред. Н. Н. Горюнова, М., Энергоатомиздат, 1984, с. 31.
- [51] Shinoda K., Tamamushi B.-I., Nakagawa T., and Isemita T. "Colloidal surfactants. Some photochemical properties", New York and London, Academic Press, 1963.
- [52] Лакович Дж. "Основы флуоресцентной спектроскопии", М., Мир, 1986.
- [53] Lebold T. P., Yeow E. K., and Steer R. P. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **3**, N 2, 160 (2004).

ЦЕНИ Института общей физики  
им. А. М. Прохорова РАН

Поступила в редакцию 7 апреля 2004 г.