

УДК 535.343.32:535.372:547.97

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССОВ КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЯ В СИСТЕМЕ «ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ ЗОНД–ПАВ» В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ ПРИ КОНЦЕНТРАЦИИ ПАВ НИЖЕ И ВЫШЕ ККМ

А.С. Лебедь, С.Л. Ефимова*, Г.Я. Гуральчук, А.В. Сорокин, И.А. Боровой,
Ю.В. Малюкин

Институт сцинтилляционных материалов НАН Украины, пр. Ленина, 60, 61001 г. Харьков, Украина

*e-mail: ephimova@isma.kharkov.ua

Поступила в редакцию 15 апреля 2010 г.

Принята 20 мая 2010 г.

Методом оптической спектроскопии исследовано взаимодействие катионного карбоцианинового красителя 3,3'-диэтилоксакарбоцианин бромид (DiOC_2) с анионным поверхностно-активным веществом додецилсульфат натрия (ДСН) при концентрациях ДСН ниже и выше критической концентрации мицеллообразования (ККМ). Показано, что в зависимости от концентрации ПАВ в растворе образуются ассоциаты разного типа: ионные пары красителя с ДСН (D^+S^-), псевдомицеллы ДСН, содержащие агрегаты красителя, или мицеллы ДСН, сольбилизирующие краситель в мономерной форме. С помощью метода Бенеси–Гильдебранда рассчитана константа связывания красителя DiOC_2 с мицеллами ДСН и доля красителя, связанного с мицеллами. Полученные значения относительно невелики и позволяют сделать вывод о том, что кулоновское взаимодействие между катионом красителя и отрицательно заряженной мицеллой ДСН не является достаточным для эффективного связывания красителя с мицеллой.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: флуоресцентный зонд, поверхностно-активное вещество, мицелла ПАВ, константа связывания, межмолекулярное взаимодействие.

ДОСЛІДЖЕННЯ ПРОЦЕСІВ КОМПЛЕКСОУТВОРЕННЯ У СИСТЕМІ «ФЛУОРЕСЦЕНТНИЙ ЗОНД-ПАВ» У ВОДНИХ РОЗЧИНАХ, ЩО МІСТЯТЬ ПАВ КОНЦЕНТРАЦІЄЮ НИЖЧЕ ТА ВИЩЕ ЗА ККМ

А.С. Лебедь, С.Л. Єфімова*, Г.Я. Гуральчук, О.В. Сорокін, І.А. Боровой, Ю.В. Малюкін

Інститут сцинтиляційних матеріалів НАН України, пр. Леніна, 60, Харків 61001, Україна

Методом оптичної спектроскопії у водних розчинах досліджено взаємодію катионного карбоціанінового барвника 3,3'-діетілоксакарбоціанін бромід (DiOC_2) з аніонною поверхнево-активною речовиною додецилсульфат натрію (ДСН), концентрація якого варіювалася у широкому діапазоні (нижче та вище критичної концентрації мицелоутворення (ККМ)). Показано, що залежно від концентрації ПАВ, у розчині утворюються асоціати різних типів: іонні пари барвника з ДСН (D^+S^-), псевдомицели ДСН, які містять агрегати барвника, міцели ДСН, що сольобілізують барвник у мономерній формі. За допомогою методу Бенесі-Гільдебранда розраховано константу зв'язування барвника DiOC_2 з мицелами ДСН, а також частку барвника, що зв'язався з мицелами ДСН. Отримані параметри є відносно невеликими, що свідчить про те, що кулонівська взаємодія між катионом барвника та негативно зарядженою мицелою ДСН не є визначальною для ефективного зв'язування барвника з мицелою.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: флуоресцентний зонд, поверхнево-активна речовина, міцела ПАВ, константа зв'язування, міжмолекулярна взаємодія.

STUDY OF COMPLEX FORMATION PROCESSES IN THE SYSTEM “FLUORESCENT PROBE–SURFACTANT” IN AQUEOUS SOLUTIONS AT SURFACTANT CONCENTRATION BEFORE AND ABOVE CMC

A.S. Lebed, S.L. Yefimova*, G.Ya. Guralchuk, A.V. Sorokin, I.A. Borovoy, Yu.V. Malyukin

Institute for Scintillation Material, NAS of Ukraine, 60 Lenin ave., Kharkov 61001, Ukraine

Using optical spectroscopy technique, the interaction of cationic carbocyanine dye 3,3'-diethyloxycarbocyanine bromide (DiOC_2) with anionic surfactant sodium dodecyl sulphate (SDS) has been investigated in aqueous solutions at SDS concentrations before and above the critical micelle concentration (CMC). It has been shown that depending on the surfactant concentration in the solution, different types of associates can be revealed, such as: dye-surfactant D^+S^- ion pairs, submicelles which contain dye aggregates, or the normal SDS micelles which solubilize dye monomers. Using Benesi-Hildebrand equation, the binding constant of the dye to the micelles and the fraction of the dye bound to the micelles have been calculated. The obtained values are relatively small that allows us to conclude that the Coulomb interactions are not sufficient to the effective binding of the positively charged dye to the negatively charged micelle.

KEY WORDS: fluorescent probe, surfactant, surfactant micelle, binding constant, intermolecular interaction.

Во флуоресцентных методах анализа (флуоресцентная микроскопия, флуоресцентная спектроскопия и микроспектроскопия), применяемых в биологических исследованиях и медицинской диагностике, в качестве зондов и метчиков очень широко используются карбоцианиновые красители [1]. Привлекательными спектральными свойствами карбоцианинов, обуславливающими их применение, является экстремально высокое значение коэффициента молярного поглощения ($> 100 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$) и высокая фотостабильность [1]. Флуоресцентные зонды этого класса с короткими углеводородными радикалами (< 7 углеродных атомов) используются как потенциал-чувствительные сенсоры, для визуализации клеточных органелл (митохондрии, эндоплазматическая сеть) [1]. Карбоцианины с длинными углеводородными радикалами (> 12 углеродных атомов) обладают ярко выраженными липофильными свойствами и используются для мониторинга нейронов, трайсинга липопротеинов, долговременного наблюдения клеток в культуре, включая трансплантацию клеток, криоконсервирование, изучение жизнеспособности клеточных культур в связи с этими процессами и др. [1-4]. Индо- (DiI), тиа- (DiS) и окса- (DiO) карбоцианины с короткими углеводородными радикалами были одними из первых потенциалометрических флуоресцентных зондов [5]. Эти катионные красители аккумулируются на клеточных мембранах, проникая внутрь липидного бислоя [6]. Отрицательный заряд на внутренней поверхности клеточной мембраны способствует проникновению катионного красителя внутрь клетки по электро-химическому градиенту. Накопление красителя и его агрегация приводит к снижению интенсивности флуоресценции и сдвигу спектра флуоресценции в длинноволновую область спектра («красный» сдвиг) [7,8]. Оксакарбоцианины DiO с короткими углеводородными радикалами довольно часто используются в качестве потенциал-чувствительных зондов для измерения мембранного потенциала разных видов бактерий и клеток и изучения влияния различных факторов, например, в случае бактерий – лекарственных препаратов, на его изменение [2,5,7-9]. Изменение мембранного потенциала оценивается по изменению соотношения «зеленой» и «красной» флуоресценции красителя, то есть по соотношению флуоресценции мономерной и агрегатной его формы [5-9]. Однако, несмотря на широкое использование оксакарбоцианинов в биологических и медицинских исследованиях, работы по спектроскопии этих флуоресцентных зондов малочисленны, в них не рассматриваются причины и механизмы агрегации, тип образующихся агрегатов [10-12].

В настоящей работе, в качестве первого шага по исследованию агрегации оксакарбоцианиновых флуоресцентных зондов в клетках, приведены результаты исследований спектроскопическими методами взаимодействия катионного красителя 3,3'-диэтилоксакарбоцианин бромид (DiOC_2) с анионным поверхностно-активным веществом (ПАВ) додецилсульфат натрия (ДСН) при концентрации ДСН выше и ниже критической концентрации мицеллообразования (ККМ).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Карбоцианиновый краситель 3,3'-диэтилоксакарбоцианин бромид (DiOC_2) (рис.1а) синтезирован по известной методике в Институте сцинтилляционных материалов НАН Украины [13]. Степень чистоты контролировалась методом тонкослойной хроматографии. ДСН (Sigma Aldrich) (рис.1б) использовался без дополнительной очистки. Для приготовления исходных растворов красителя и ПАВ применялся этанол спектроскопической чистоты (Sigma Aldrich). Для приготовления водных растворов

красителя с ПАВ использовалась дистиллированная вода двойной перегонки. Концентрация ДСН варьировалась от 1×10^{-6} до 5×10^{-2} М.

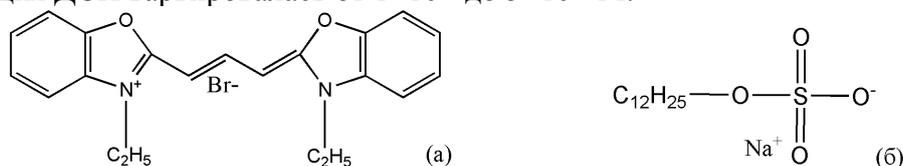


Рис.1. Структурные формулы исследованных соединений: а) 3,3'-диэтилоксакарбоцианин бромид (DiOC₂); б) додецилсульфат натрия (ДСН).

Растворы готовились по следующей схеме. Сначала готовились исходные растворы красителя DiOC₂ и ДСН в этаноле концентрацией 1×10^{-3} и 1×10^{-4} М. Использование этанола, а не более летучих растворителей, таких как хлороформ или ацетон, объясняется плохой растворимостью ДСН в последних. Для приготовления же растворов с небольшой концентрацией ДСН, необходимы очень маленькие количества вещества, которые невозможно взять в виде навески. При проведении исследований готовились серии растворов с определенным соотношением краситель:ДСН, для чего исходные растворы DiOC₂ и ДСН смешивались в заданном соотношении. После полного испарения этанола добавлялось требуемое количество дистиллированной воды двойной перегонки. Растворы нагревались до температуры 80°C при перемешивании и охлаждались до комнатной температуры. Для приготовления растворов с более высокими концентрациями ПАВ необходимое количество ДСН помещалось в пробирку в виде навесок перед добавлением красителя в этаноле. Дальнейшая процедура аналогична описанной выше.

Спектры поглощения регистрировали с помощью UV-Vis спектрофотометра Specord 200 (Analytic, Йена) с применением кварцевой кюветы с длиной оптического пути 2 мм. Все измерения проводили как минимум трижды при температуре 20°C. Для регистрации спектров флуоресценции использовался спектральный комплекс на базе двух решетчатых монохроматоров МДР-23. Один из них использовался для регистрации спектров, а второй – для выделения необходимой длины волны возбуждения из спектра ксеноновой лампы (FWHM ~ 0.5 нм).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как видно из структурной формулы, DiOC₂ относится к солевым красителям, т.е. в полярных растворителях он диссоциирует с образованием катиона и аниона, а имеющиеся углеводородные радикалы C₂H₅ не достаточно длинны, чтобы сообщать молекуле гидрофобные свойства (рис.1а). Благодаря такой структуре, краситель DiOC₂ хорошо растворяется в воде. Более того, анализ спектров поглощения DiOC₂ в диапазоне концентраций от 1×10^{-6} до 1×10^{-3} М (данные не приводятся) показывает, что закон Бугера-Ламберта-Берра выполняется, т.е. краситель находится в водных растворах в мономерной форме. Ранее в наших работах [14,15] было показано, что в водных растворах, содержащих мицеллы ДСН, т.е. при концентрации ДСН выше ККМ (8×10^{-3} М [16]), краситель DiOC₂ сольбилизируется мицеллами, о чем свидетельствовал длинноволновый сдвиг спектров поглощения (на 8 нм) и резкое увеличение интенсивности флуоресценции красителя в таких растворах. Такое поведение красителя DiOC₂ дало нам возможность детально изучить его взаимодействие с ДСН в широком диапазоне концентраций ПАВ, т.е. при концентрациях ДСН как выше, так и ниже ККМ.

Для этого снимались спектры поглощения и флуоресценции водных растворов, содержащих краситель DiOC₂ постоянной концентрации 2×10^{-5} М, и ДСН, концентрация которого варьировалась от 1×10^{-6} до 5×10^{-2} М. Как видно из рис.2а, спектры поглощения DiOC₂ претерпевают значительные изменения при вариации концентрации ПАВ в растворе. На графике зависимости интенсивности главного максимума поглощения красителя ($\lambda_{\max} = 480$ нм) от концентрации ДСН можно условно выделить три области (рис.2б).

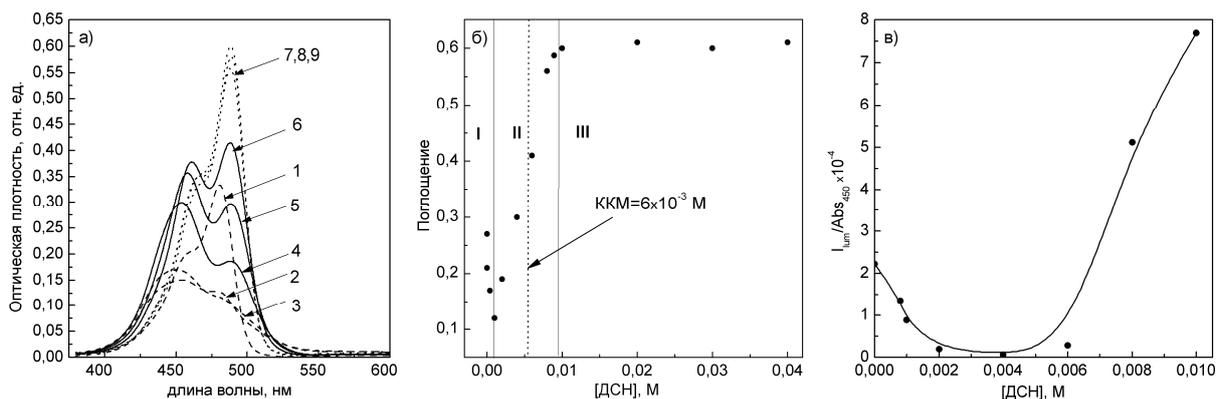


Рис.2. а) Спектры поглощения красителя DiOC₂ в водных растворах с разной концентрацией ДСН: 1 – без ДСН, 2 – 8×10^{-4} М, 3 – 1×10^{-3} М, 4 – 2×10^{-3} М, 5 – 4×10^{-3} М, 6 – 6×10^{-3} М, 7 – 8×10^{-3} М, 8 – 1×10^{-2} М, 9 – 2×10^{-2} М; б) Зависимость интенсивности главного максимума поглощения красителя DiOC₂ от концентрации ДСН; в) Зависимость интенсивности флуоресценции красителя DiOC₂ от концентрации ДСН. [DiOC₂] = 2×10^{-5} М.

В первой области, соответствующей концентрациям ДСН от 0 до 1×10^{-3} М, наблюдается падение интенсивности главного максимума поглощения. При этом спектр поглощения заметно уширяется и появляется новая полоса на длине волны 450 нм (рис.2а). Такие изменения спектров поглощения при концентрации ДСН ниже ККМ свидетельствуют о формировании молекулярных комплексов $D_m^+ S_n^-$ между катионами красителя DiOC₂ (D^+) и анионами ДСН (S^-) в результате электростатических взаимодействий, что может быть описано равновесной реакцией [17-20]:



Определение состава (стехиометрии) комплекса будет рассмотрено нами ниже. Важно отметить, что такие комплексы являются электрически нейтральными, следовательно, их образование понижает действие электростатических сил отталкивания между катионами красителя, что приводит к образованию ассоциатов состава $(D_m^+ S_n^-)_k$. Агрегация красителя по описанному механизму в растворах, содержащих противоположно заряженное ПАВ в концентрации намного ниже ККМ, является довольно типичным явлением [17,21], а образование подобных ассоциатов приводит к трансформации спектра поглощения, в нашем случае, к образованию коротковолновой полосы с $\lambda_{\max} = 450$ нм (рис.2а).

При повышении концентрации ДСН от 1×10^{-3} до 1×10^{-2} М (вторая область на рис.2б) происходит увеличение интенсивности и длинноволновый сдвиг главного максимума поглощения (рис.2а). Это свидетельствует о том, что молекулы красителя находятся в другом микроокружении (сольватохромный эффект), т.е. можно предположить, что в растворе начинается образование мицелл [17,22-24]. Однако эта концентрационная область в свою очередь также характеризуется двумя отдельными

«подобластями». А именно, при концентрациях ДСН от 1×10^{-3} до 6×10^{-3} М спектр поглощения имеет сложную структуру (рис.2а). Наблюдаем две полосы поглощения, причем интенсивность коротковолновой полосы также повышается с ростом концентрации ДСН. Этот концентрационный диапазон соответствует образованию в растворах мицелл, обогащенных молекулами красителя («dye-rich induced micelle»), т.е. мицелл ПАВ, содержащих агрегаты типа $(D_m^+ S_n^-)_k$ [17,22-24]. Когда же концентрация ДСН превышает значение 6×10^{-3} М, спектр поглощения красителя принимает традиционный вид (рис.2а). При этом интенсивность полосы поглощения значительно больше, чем в случае поглощения красителя в воде без ДСН, а ее максимум смещен на 10 нм в длинноволновую область. То есть можно заключить, что в растворах происходит деагрегация красителя, образуются «истинные» мицеллы ДСН, сольбилизирующие краситель в мономерной форме [17,22-24]. Встраиваясь в мицеллы ПАВ, краситель попадает в неполярное углеводородное окружение, что и оказывает влияние на интенсивность и положение полосы поглощения [25,26].

На третьем участке (рис.2б) кривая зависимости выходит в насыщение, т.е. при концентрациях ДСН выше 1×10^{-2} М изменений в спектре поглощения не происходит. Очевидно, весь краситель сольбилизируется мицеллами ДСН.

На рис.2в приведена зависимость величины I_{lum}/Abs_{450} (I_{lum} – интенсивность люминесценции, Abs_{450} – поглощение на длине волны возбуждения (450 нм)) от концентрации ДСН. Соотношение I_{lum}/Abs_{450} можно представить как грубую оценку квантового выхода флуоресценции красителя. Полученная зависимость изменения квантового выхода флуоресценции от концентрации ДСН (рис.2в) находится в хорошем соответствии с представленными выше данными по влиянию ДСН на спектры поглощения. При повышении концентрации ДСН от 0 до 1×10^{-3} М (в первой области) интенсивность флуоресценции постепенно понижается. Это подтверждает образование в растворах нелюминесцирующих ассоциатов из молекулярных комплексов краситель-ПАВ. Во второй концентрационной области, с которой мы связываем образование «dye-rich» мицелл, квантовый выход не меняется, вплоть до концентрации ДСН 6×10^{-3} М, выше которой наблюдается резкое увеличение квантового выхода. Резкое увеличение интенсивности флуоресценции красителя подтверждает сделанный из анализа спектров поглощения вывод об образовании «нормальных» мицелл и деагрегации красителя. Кроме того, такое резкое увеличение интенсивности флуоресценции связано также с изменением микроокружения молекул красителя вследствие его встраивания в мицеллы ДСН [25-27]. К тому же процесс сольбилизации приводит к жесткой фиксации молекулы красителя в объеме мицеллы, что осложняет транс-цис изомеризацию и тем самым способствует выключению безызлучательных каналов релаксации энергии электронного возбуждения, а значит, увеличивает квантовый выход флуоресценции [27].

Таким образом, анализ спектров поглощения и флуоресценции свидетельствует о том, что в изучаемой нами системе образование «истинных» мицелл ДСН начинается при концентрации ПАВ 6×10^{-3} М, которую и следует принять за ККМ ДСН. Более низкое значение ККМ по сравнению с таковым в водном растворе, не содержащем каких-либо добавок (8×10^{-3} М [16]), не является удивительным, поскольку известно, что процесс мицеллообразования является очень чувствительным к слабым изменениям ионной силы водного раствора [17]. Примеси, такие как спирты, соли, органические молекулы и т. д., могут изменять величину ККМ ПАВ. В основном, органические молекулы (или ионы) приводят к уменьшению ККМ [17].

Комплексообразование в растворах при малых концентрациях ПАВ

Для определения стехиометрии молекулярного комплекса краситель-ПАВ $D_m^+S_n^-$, образующегося в растворе при концентрациях ДСН намного ниже ККМ, мы воспользовались хорошо известным методом Остромысленского-Жоба [18,28,29].

Стехиометрия комплекса, согласно Жобу, определяется по эквимольным диаграммам, которые строятся для растворов одинаковой начальной концентрации $C_D^0 = C_S^0 = C^0$. Нами была выбрана концентрация исходных растворов 1×10^{-4} М, т.к. при этой концентрации краситель в воде не образует агрегаты, а ДСН не образует мицеллы. Исходные растворы смешиваются в антибатных соотношениях, но таким образом, чтобы суммарное количество грамм-молей обоих компонентов в общем объеме смеси всегда оставалось постоянным ($C_S + C_D = C^0 = \text{const}$). То есть, x объемных единиц исходного раствора красителя добавляется к $(1-x)$ объемным единицам раствора ПАВ. По такой методике готовится серия растворов с отношением компонентов от 1:9 до 9:1 и измеряются их спектры поглощения [18,28,29].

График Жоба (рис.3а) представляет собой зависимость так называемого исправленного поглощения ΔE растворов от объемной доли красителя x . Кривая зависимости имеет минимум при соотношении компонентов комплекса, соответствующем стехиометрическим коэффициентам в уравнении образования комплекса (ур.1), т.е. при $C_D / C_S = m / n$ [28,29].

Величина ΔE представляет собой разницу между измеренным E_{exp} и теоретическим E_{teor} поглощением. E_{teor} – поглощение раствора в случае, если бы не имело места комплексообразование, E_{exp} – сумма поглощений всех компонентов, присутствующих в растворе:

$$E_{teor} = \varepsilon_D C_D^0 x + \varepsilon_S C_S^0 (1-x), \quad (2)$$

$$E_{exp} = \varepsilon_D C_D + \varepsilon_S C_S + \varepsilon_{DS} C_{DS}, \quad (3)$$

где ε_D и ε_S молярные коэффициенты поглощения красителя и ПАВ, соответственно; C_D и C_S концентрации красителя и ПАВ в смесях; ε_{DS} и C_{DS} – молярный коэффициент поглощения и концентрация комплекса в растворе.

Учитывая, что в видимом диапазоне ДСН не поглощает свет, исправленное поглощение может быть рассчитано с помощью уравнения:

$$\Delta E = E_{exp} - \varepsilon_D C_D l x, \quad (4)$$

где ε_D – молярный коэффициент поглощения красителя, l – длина оптического пути (в см).

На рис.3а представлен график Жоба для красителя DiOC₂ и ПАВ ДСН. Минимум на графике Жоба соответствует значению $x = 0,5$, т.е. краситель DiOC₂ и молекулы ДСН образуют в воде комплексы D^+S^- составом 1:1 [18,28,29].

Для расчета константы равновесия мы воспользовались методом Schaeppi-Treadwell [18]. Метод позволяет определить с помощью графика Жоба долю связанного с ПАВ красителя. Полагается, что если график Жоба имеет вид двух прямых, сходящихся в точке экстремума, то происходит полная ассоциация ионов. Если же в области точки экстремума кривая имеет параболическую форму, это свидетельствует о неполной ассоциации [18]. В этом случае по графику можно определить, какое количество вещества не связалось в комплексы. Для этого линейные участки кривой экстраполируются до их пересечения. Точка пересечения соответствует теоретическому значению ΔE_0 , которое достигалось бы при полном связывании ионов.

Отношение экспериментального значения ΔE к теоретическому ΔE_0 дает степень ассоциации $(1-\alpha)$ [18]:

$$\frac{\Delta E}{\Delta E_0} = 1 - \alpha, \quad (5)$$

где α – доля несвязанных ионов.

Рассчитанное нами количество связанного с ДСН красителя DiOC_2 составило 90%. Зная величину α можно рассчитать константу равновесия K :

$$K = \frac{[DS]}{[D][S]} = \frac{1-\alpha}{(C_0/2)\alpha^2} = \frac{2(1-\alpha)}{C_0\alpha^2}, \quad (6)$$

Константа равновесия реакции, происходящей при образовании комплекса краситель-ПАВ между катионом DiOC_2 и анионом ДСН, составила по нашим расчетам $2,25 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$.

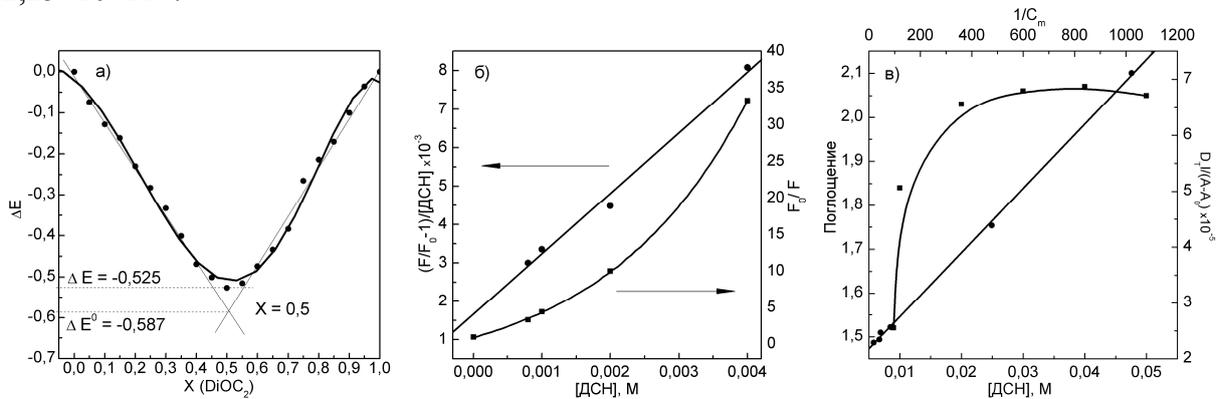


Рис.3. а) График Жоба для системы DiOC_2 -ДСН в водном растворе; б) Графики уравнения Штерна-Фольмера для описания тушения флуоресценции красителя DiOC_2 , $[\text{DiOC}_2] = 2 \times 10^{-5} \text{ M}$; в) Графики уравнения Бенеси-Гильдебранда для определения константы связывания красителя DiOC_2 с мицеллами ДСН, $[\text{DiOC}_2] = 2 \times 10^{-4} \text{ M}$.

Как указывалось выше, образование комплексов D^+S^- и последующая агрегация красителя в растворе в диапазоне концентрации ДСН от 0 до $1 \times 10^{-3} \text{ M}$ приводит к тушению флуоресценции (рис.2в). Для количественной оценки тушения флуоресценции использовалось уравнение Штерна-Фольмера [30]:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SF}[Q], \quad (7)$$

где F_0 и F - интенсивность флуоресценции в отсутствие и в присутствии тушителя соответственно, $[Q]$ - концентрация тушителя, в нашем случае, ДСН, K_{SF} - константа Штерна-Фольмера.

Данные по тушению обычно представляют в виде графика в координатах F_0/F от $[Q]$, поскольку ожидается, что изменение интенсивности флуоресценции красителя в растворе должно линейно зависеть от концентрации тушителя [30]. Отметим, что величина $1/K_{SF}$ равна концентрации тушителя, при которой интенсивность флуоресценции понижается в 2 раза [30].

На рис.3б видно, что график Штерна-Фольмера отклоняется вверх и вогнут по отношению к оси ординат. Такой вид графика характерен для смешанного динамического и статического типов тушения [30]. То есть, для тех случаев, когда флуоресценция может быть потушена как за счет образования комплекса с тушителем,

так и за счет столкновений с молекулами тушителя. В таких случаях используют модифицированное уравнение Штерна-Фольмера [30]:

$$\frac{F_0}{F} = (1 + K_{дин}[ДСН])(1 + K_{ст}[ДСН]). \quad (8)$$

Это уравнение может быть преобразовано для графического определения статической и динамической констант тушения следующим образом:

$$\frac{F_0/F - 1}{[ДСН]} = (K_{дин} + K_{ст}) + K_{дин}K_{ст}[ДСН]. \quad (9)$$

В этом случае график зависимости величины $\frac{F_0/F - 1}{[ДСН]}$ от концентрации ДСН представляет собой прямую линию, которая отсекает на оси ординат отрезок, равный $K_{ст} + K_{дин}$, а её наклон равен $K_{ст} \times K_{дин}$ (рис.3б). Решение квадратного уравнения дает нам значения констант $K_{ст} = 1492 \text{ М}^{-1}$ и $K_{дин} = 920 \text{ М}^{-1}$. Видно, что вклад статического тушения значительно больше, чем динамического, т.е. тушение люминесценции красителя DiOC₂ происходит в основном за счет образования комплексов с молекулами ДСН.

Комплексообразование в растворах при концентрации ПАВ выше ККМ.

Как уже отмечалось выше, при концентрации ПАВ от $6 \times 10^{-3} \text{ М}$ до $5 \times 10^{-2} \text{ М}$ в растворе происходит образование «истинных» мицелл и солюбилизация ими молекул красителя DiOC₂. Можно сказать, что в этом концентрационном диапазоне ПАВ происходит образование комплекса «краситель-мицелла ПАВ». Если рассматривать мицеллу ПАВ как отдельную частицу M , то процесс солюбилизации молекулы красителя D может быть описан, как равновесная реакция:



где DM – комплекс мицеллы с молекулой красителя, K_b – константа связывания.

Для определения константы связывания красителя DiOC₂ с мицеллами ДСН мы использовали уравнение Бенеша-Гильдебранда в следующей модифицированной форме [18-20,29]:

$$\frac{D_T l}{A_0 - A} = \frac{1}{\varepsilon_m - \varepsilon_0} + \frac{1}{K_b(\varepsilon_m - \varepsilon_0)C_m}, \quad (11)$$

где D_T – концентрация красителя в растворах ($2 \times 10^{-4} \text{ М}$), l – длина оптического пути, A и A_0 – поглощение красителя в присутствии и в отсутствие ДСН, соответственно, ε_0 – молярный коэффициент поглощения красителя в водном растворе, не содержащем ДСН, ε_m – молярный коэффициент поглощения красителя, полностью связанного с ПАВ, C_m – концентрация ПАВ, образующего мицеллы ([общая концентрация ПАВ]-ККМ).

Как видно из уравнения (11), константа связывания K_b может быть определена по наклону графика зависимости величины $D_T/(A_0 - A)$ от $1/C_m$, а величина $\frac{1}{\varepsilon_m - \varepsilon_0}$ – как

отрезок, отсекаемый прямой на оси ординат. При построении такого графика для системы «DiOC₂-мицелла ДСН» мы использовали спектры поглощения растворов красителя, содержащих ДСН в концентрации выше $6 \times 10^{-3} \text{ М}$.

Из рис.3в видно, что полученный график имеет линейный вид. Тангенс угла наклона прямой дает нам значение константы связывания K_b , которое составило 460 М^{-1} .

Можно также оценить эффективность связывания красителя с мицеллами, рассчитав долю красителя, солюбилизированного мицеллами (f_{mic}), используя полученные из уравнения параметры по следующей формуле [19]:

$$f_{mic} = \frac{\Delta A}{D_T l (\varepsilon_m - \varepsilon_0)}, \quad (12)$$

Расчеты показали, что эта величина составляет 0,83, то есть в водно-мицеллярном растворе 83% молекул красителя DiOC₂ связывается с мицеллами ДСН.

Полученные значения константы связывания K_b и доли красителя, связанного с мицеллами ПАВ, f_{mic} невелики по сравнению с подобными параметрами, полученными для других систем [14,18-20] и позволяют сделать вывод о том, что кулоновское взаимодействие между катионом красителя DiOC₂ и отрицательно заряженной мицеллой ДСН не является достаточным для эффективного связывания красителя с мицеллами.

ВЫВОДЫ

Исследование влияния ДСН в широком диапазоне концентраций на оптические свойства катионного флуоресцентного зонда DiOC₂ в водных растворах показывает, что в подобных растворах имеет место образование комплексов между противоположно заряженными молекулами красителя DiOC₂ и ПАВ ДСН, состав которых зависит от концентрации ПАВ. При низких концентрациях ДСН (намного меньше ККМ) в растворе образуются ионные пары D^+S^- состава 1:1, при этом 10 % молекул DiOC₂ остается в растворе в несвязанном виде. Образование D^+S^- комплексов снижает действие электростатических сил отталкивания между катионами зонда, что приводит к образованию ассоциатов состава $(D^+S^-)_k$. При повышении концентрации ПАВ выше ККМ, в растворе образуются комплексы «флуорофор-мицелла ПАВ». Полученные значения константы связывания (K_b) и доли красителя, связанного с мицеллами ПАВ, (f_{mic}) невелики и позволяют сделать вывод о том, что кулоновское взаимодействие между катионом DiOC₂ и отрицательно заряженной мицеллой ДСН не является достаточным для эффективного связывания зонда с мицеллами.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hauglang R.P. Handbook of Fluorescent Probes and Research Products // 9th Edition, New York: Molecular probes. – 2002. – 676 p.
2. Гончарук Е.И., Онищенко Е.В., Тимон В.В., Петренко Т.Ф., Боровой И.А., Малюкин Ю.В., Грищенко В.И. Применение карбоцианиновых флуоресцентных зондов для оценки функционального состояния культивированных клеток после криоконсервации // Биополимеры и клетка. – 2008. – т. 24, № 3. – С.225-231.
3. Малюкин Ю.В., Боровой И.А., Кавок Н.С., Геращенко А.В., Погребняк Н.Л., Ефимова С.Л., Лебеденко А.Н. Накопление оксакарбоцианинов с различной длиной алкильных цепей в клетках костного мозга и гепатоцитах // Биофизика. – 2007. – т. 52, № 4. – С.667-673.
4. Goncharuk E.I., Borovoy I.A., Pavlovich E.V., Malyukin Yu.V., Grischenko V.I. Newly synthesized fluorescent probes, their characteristics and behavior in proliferating cultures // Biopolymers and Cell. – 2009. – v.25, № 6. – P.484-490.
5. Waggoner A.S. Dye indicators of membrane potential // Ann. Rev. Biophys. Bioeng. – 1979. – v.8. – P.47-68.
6. van Veen H.W., Abee T., Kortstee G.J., Pereira H., Konings W.N., Zehnder A.J. Generation of a proton motive force by the excretion of metal-phosphate in the polyphosphate-accumulating Acinetobacter johnsonii strain 210A // J. Biol. Chem. – 1994. – v.269, №47. – P.29509-29514.
7. Novo D., Perlmutter N.G., Hunt R.H., Shapiro H.M. Accumulate flow cytometric membrane potential measurement in bacteria using diethyloxycarbocyanine and a ratiometric technique // Cytometry. – 1999. – v.35. – P.55-63.

8. Novo D., Perlmutter N.G., Hunt R.H., Shapiro H.M. Multiparameter flow cytometric analysis of antibiotic effects on membrane potential, membrane permeability, and bacterial counts of staphylococcus aureus and micrococcus luteus // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2000. – v.44, №4. – P.827-834.
9. Xu J., Zhou F., Ji B.-P., Pei R.-S. and Xu. N. The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against Escherichia coli // *Letters in Applied Microbiology*. – 2008. – v.47, №3. – P.174-179.
10. Wiegand D. H. and Vanýsek P. Spectroscopic and Fluorometric Characterization of Oxacyanine Dyes in Water and Nitrobenzene // *Appl. Spectrosc.* – 1988. – v.42. – P.958-961.
11. Koti A.S.R., Periasamy N. Cyanine induced aggregation in meso-tetrakis(4-sulfonatophenyl)porphyrin anions // *Journal of Material Chemistry*. – 2002. - v.12, №8. – P.2312-2317.
12. Sims P.J., Waggoner A.S., Wang C.H., Hoffman J.F. Studies on the mechanism by which cyanine dyes measure membrane potential in red blood cells and phosphatidylcholine vesicles // *Biochemistry*. – 1974. – v.13. – P.3315-3330.
13. Кіпріанов А.І., Пилогін Г.П. Синтез та оптичні властивості деяких похідних оксакарбоціанінових барвників // *Учені зап. Харків. Ун-ту*. – 1937. – т.10. – С.91-98.
14. Лебедь А.С., Ефимова С.Л., Гуральчук Г.Я., Сорокин А.В., Боровой И.А., Малюкин Ю.В. Влияние гидрофобности катионных карбоцианиновых красителей DiOСn на эффективность связывания с мицеллами анионного поверхностно-активного вещества // *ЖПС*. – 2010. – т.77, №2. – С.198-203.
15. Ефимова С.Л. Влияние гидрофобности органических флуорофоров на эффективность безызлучательного переноса энергии электронного возбуждения в водно-мицеллярных растворах // *Біофізичний Вісник*. – 2008. – т.21, вип.2. – С.107-114.
16. Абрамзон А.А. Поверхностно - активные вещества // *Л.: Химия* – 1981. – 304 с.
17. Diaz Garcia M.E., Sanz-Medel A. Dye-surfactant interaction: a review // *Talanta*. – 1986. – v.33, №3. – P.255-264.
18. Forte-Tavcer P. Interaction between some anionic dyes and cationic surfactants with different alkyl chain length studied by the method of continuous variations // *Dyes and Pigments*. – 2004. – v.63. – P.181-189.
19. Göktürk S., Tuncay M. Spectral studies of safranin-O in different surfactant solutions // *Spectrochimica Acta Part A*. – 2003. – v.59. – P.1857-1866.
20. Göktürk S. Effect of hydrophobicity on micellar binding of carminic acid // *J. Photochem. Photobiol. A*. – 2005. – v.169. – P.115-121.
21. Ищенко А.А., Шаповалов С.А. Разнородная ассоциация ионов красителей в растворах (обзор) // *ЖПС*. – 2004. – т.71, №5. – С.557-578.
22. Bielska M., Sobczynska A., Prochaska K. Dye-surfactant interaction in aqueous solution // *Dyes and Pigments*. – 2009. – v.80. – P.201-205.
23. Akbas H., Taner T. Spectroscopic studies of interactions between C.I. Reactive Orange 16 with alkyltrimethylammonium bromide surfactants // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. – 2009. – v.73. – P.150-153.
24. Sato H., Kawasaki M., Kasatani K., Nakashima N., Yoshihara K. Interaction of cationic dye and anionic detergent above and below the critical micelle concentration as revealed by fluorescence characteristics – *Bull. Chem. Soc. Jpn.* – 1983. – v.56. – P.3588-3594.
25. Теренин А.Н. Фотоника молекул красителей – *Л.: Наука*. – 1967. – 616с.
26. Деревянко Н.А., Дядюша Г.Г., Ищенко А.А., Толмачев А.И. Влияние природы растворителя на положение, интенсивность и форму полос поглощения полиметиновых красителей // *Теоретическая и экспериментальная химия*. – 1983. – т.2. – С.169-178.
27. Mishra A., Behera R.K., Behera P.K., Mishra B.K., Behera G.B. Cyanines during the 1990s: a review – *Chem.Rev.* – 2000. – v.100. – P.1973-2011.
28. Кольчев В.Б., Парамонов В.И. – в кн.: *Спектроскопические методы в химии комплексных соединений* / Под редакцией В.М. Вдовенко. М.; Л.: Химия, 1964, с. 30-73.
29. Свердлова О.В. Электронные спектры в органической химии // *Л.: Химия*. – 1985. – 248 с.
30. Лакович Дж. Основы флуоресцентной спектроскопии // *М.: Мир*. – 1986. – 496 с.