

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова

Химический факультет

кафедра высокомолекулярных соединений

Панова Т.В., Беркович А.К., Ефимова А.А.,

Сыбачин А.В., Челушкин П.С.

Утверждено учебно-методической комиссией
кафедры высокомолекулярных соединений

**МЕТОДИЧЕСКИЕ РАЗРАБОТКИ К СПЕЦПРАКТИКУМУ ПО
ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ ПОЛИМЕРОВ**

МОСКВА - 2026

"Методические разработки к спецпрактикуму по флуоресцентной спектроскопии полимеров" предназначены для студентов химического факультета Московского государственного университета им. М.В.Ломоносова, специализирующихся в области высокомолекулярных соединений. Разработки содержат методические указания для выполнения студентами практических работ по флуоресцентной спектроскопии полимеров. Описанию экспериментальной задачи предшествует теоретический раздел, в котором содержатся основные сведения, необходимые для выполнения работы.

1. Введение	5
2. Теоретические основы люминесцентной спектроскопии.....	6
<i>Люминесценция. Фотовозбуждение.</i>	
<i>Два закона фотохимии.</i>	
<i>Квантовая природа света.</i>	
<i>Диаграмма Яблонского (природа флуоресценции, внутренняя конверсия, испускание в первом возбуждённом состоянии).</i>	
<i>Положение спектров флуоресценции и поглощения. Правило зеркальной симметрии. Закон Стокса.</i>	
<i>Интенсивность испускания люминесценции. Принцип Франка-Кондона.</i>	
<i>Сольватация растворителем.</i>	
<i>Анизотропия флуоресценции.</i>	
<i>Фосфоресценция, принцип Паули, диаграмма Яблонского с синглетной и триплетной системами, интеркомбинационная конверсия, положение спектров фосфоресценции.</i>	
<i>Кинетика процесса испускания, время жизни возбуждённого состояния.</i>	
<i>Динамическое и статическое тушение люминесценции.</i>	
<i>Фёстеровский резонансный перенос энергии.</i>	
3. Примеры практического использования фотолюминесценции растворов в полимерной химии и молекулярной биологии.....	22
<i>Применение метода тушения люминесценции для исследования взаимодействия полиэлектролитов с противоположно заряженными объектами и в биомедицинских приложениях.</i>	
<i>Применение метода релаксации растворителя для исследования сольватации полимерных цепей и сегментальной подвижности в полимерных системах.</i>	
<i>Измерение сегментальной подвижности флуоресцентно-меченых полимеров методом анизотропии люминесценции.</i>	
<i>Применение Фёстеровского резонансного переноса энергии для исследования биомакромолекул.</i>	
<i>Применение флуоресцентной корреляционной спектроскопии для исследования диффузии макромолекул.</i>	
4. Экспериментальная часть.	31
<i>Задача 1. Оценка степени связывания полигистидина с ДНК в присутствии синтетических полианионов.</i>	

Задача 2. Влияние степени полимеризации полиионов на устойчивость интерполиэлектролитных комплексов в водно-солевых средах.

Задача 3. Определение критической концентрации мицеллообразования блок-сополимеров этиленоксида и пропиленоксида в водных растворах.

5. Литература.....43

1. Введение

За последние десятилетия различные варианты люминесцентной спектроскопии стали удобным и важным методом исследования конформационного состояния и динамики синтетических и природных макромолекул, что обусловлено двумя основными причинами:

- во-первых, само по себе явление люминесценции связано с пребыванием молекул-люминофоров в возбуждённом состоянии, в котором они активно подвергаются воздействию окружающих молекул. В результате все основные характеристики люминесценции (длины волн возбуждения и эмиссии, времена жизни возбуждённых состояний, степень анизотропии поляризации) несут в себе опосредованную информацию о том микроокружении, в котором пребывает люминофор. При этом на фотофизические свойства люминофора оказывают воздействие только те молекулы, которые находятся вокруг него в пределах очень небольшого объёма, поэтому люминесцентные зонды идеальны для исследования наноразмерных объектов.

- во-вторых, следует отметить, что обычно люминофоры находятся в возбуждённом состоянии в течение достаточно продолжительного времени (от десятых долей наносекунды до нескольких миллисекунд); за это время успевает произойти не только реорганизация сольватной оболочки люминофора, но и целый ряд процессов, характерных для макромолекул (перемещения отдельных сегментов макромолекул, нерадиационный перенос энергии с возбуждённого люминофора на молекулу-акцептор или тушитель, которыми, в частности, могут служить и различные функциональные группы в составе макромолекул). Кроме того, эксперименты по флуоресцентной корреляционной спектроскопии позволяют получать зависимость интенсивности люминесценции от времени на интервалах, сравнимых с временами трансляционной диффузии макромолекул в целом. Измерение целого ряда люминесцентных характеристик (например, таких как анизотропия поляризации люминесценции, зависимость Стоксова сдвига от времени) или проведение экспериментов по флуоресцентной корреляционной спектроскопии позволяют получить информацию о динамических процессах, протекающих как на уровне отдельных сегментов макромолекулы, так и на уровне макромолекулы в целом.

В результате, благодаря совершенно новым возможностям, которые открывают перед исследователями люминесцентные методы, а также благодаря колоссальному прогрессу инструментальной базы для проведения люминесцентных экспериментов, на данный момент различные экспериментальные флуоресцентные методики становятся стандартной опцией спектрофлуориметров массового производства и пригодны для рутинного исследования полимеров. Однако при проведении люминесцентных экспериментов и интерпретации их результатов следует помнить два принципиальных момента: 1) данные, полученные в ходе люминесцентных экспериментов, несут только опосредованную информацию об исследуемой

системе (в данном случае - макромолекуле) и их корректная интерпретация практически всегда требует дополнительных знаний о системе, полученных независимыми методами; 2) за исключением флуоресцентных белков, несущих в себе эндогенные люминофоры, проведение люминесцентного эксперимента требует внедрения в исследуемую систему люминесцентных зондов, которые в той или иной степени изменяют микроокружение, в которое попадают; в результате получаемые в ходе люминесцентного эксперимента данные содержат в себе информацию о «возмущённых» участках исследуемой системы, и перенос выводов о свойствах этих участков на свойства всей системы в целом может быть некорректен и также требует подтверждения независимыми методами.

2. Теоретические основы люминесцентной спектроскопии

Люминесценция. Фотовозбуждение.

Люминесценция представляет собой любой тип испускания света веществом (за исключением свечения нагретых тел), возникающее вследствие поглощения энергии и последующего перехода электронов из возбуждённого в основное состояние с испусканием поглощенной ранее энергии (или некоторой её части) в виде светового излучения. В зависимости от природы внешнего источника энергии люминесценция подразделяется на несколько видов, а именно – хемилюминесценцию, при которой излучение возникает в результате протекания химической реакции; радиолюминесценцию, возбуждаемую ионизирующим излучением; биолюминесценцию (к которой относят свечение живых организмов и которая представляет собой подвид хемилюминесценции, генерируемой в результате протекания биохимических реакций); электролюминесценцию, т.е. свечение под действием электрического поля, или пропущенного электрического тока; катодолюминесценцию, т.е. свечение под действием быстрых электронов; триболюминесценцию, или люминесценцию трения, а также фотолюминесценцию, возникающую при облучении вещества ИК, УФ или видимым светом. Наибольшее значение в практике физико-химического анализа приобрела фотолюминесценция, подразделяющаяся, в свою очередь, на флуоресценцию и фосфоресценцию. Эти два процесса различаются природой возбуждённого состояния.

В фотохимии обычно используют облучение ультрафиолетовым или видимым светом, поскольку при поглощении света таких длин волн возбуждаются внешние электроны молекулы, которые принимают участие в образовании связей, и, следовательно, возбуждение которых может приводить к протеканию химических реакций. Вещества, обладающие флуоресцентными свойствами, как правило, являются многоядерными ароматическими соединениями. Некоторые типичные флуорофоры представлены на Рис.1.

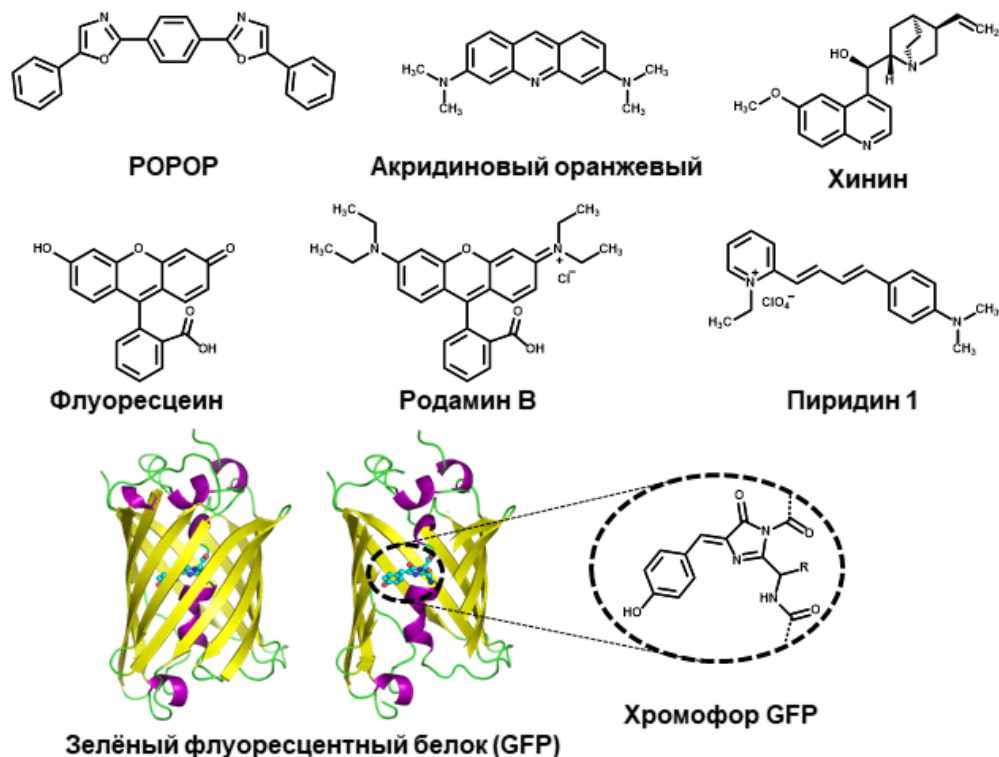


Рис. 1. Структуры некоторых типичных флуоресцирующих соединений.

Многие флуорофоры встречаются в повседневной жизни. Одним из наиболее широко распространенных флуорофоров является хинин, основной алкалоид коры хинного дерева с сильным горьким вкусом, обладающий жаропонижающим и обезболивающим свойствами, а также выраженным противомаларийным действием. Другим интересным типом природных флуорофоров являются флуоресцентные белки, из которых наиболее известен зелёный флуоресцентный белок (англ. green fluorescent protein, GFP), выделенный из медузы *Aequorea victoria*, благодаря которому она флуоресцирует зелёным светом. В составе подавляющего большинства белков есть флуоресцентные аминокислоты – триптофан и тирозин. Ещё большее разнообразие характерно для синтетических флуорофоров. Зеленое или красно-оранжевое свечение, которое иногда можно увидеть в антифризе, обусловлено присутствием следовых количеств флуоресцеина и родамина, соответственно (Рис.1). Многоядерные ароматические углеводороды, такие как антрацен и перилен, также флуоресцируют, что используется экологами при мониторинге окружающей среды для обнаружения бензиновых загрязнений. Испускают флуоресценцию и некоторые замещённые органические соединения, например, 1,4-бис(5-фенилоксазол-2-ил)бензол (POPOP, Рис.1), который используют в сцинтилляционных измерениях, а также пиридин 1 и родамин, применяющиеся в лазерной технике. Важное место в биологических исследованиях играют флуорофоры, селективно связывающиеся с тем или иным

типом биологических макромолекул, например, селективные зонды на ДНК, типа этидий бромиды или акридинового оранжевого (Рис.1), люминесценция которых разгорается после внедрения (интеркаляции) в двойную спираль ДНК. На данный момент коммерчески доступны десятки люминофоров, селективно окрашивающих либо отдельные биомacroмолекулы, либо определённые клеточные органеллы.

Явление люминесценции впервые обнаружено и описано достаточно давно, однако окончательно теория люминесценции была разработана в первой половине XX века на основе квантовой теории света.

Два закона фотохимии.

Согласно первому закону фотохимии, сформулированному Теодором Гротгусом в 1817 году, фотохимическое превращение может быть инициировано только тем светом, который поглощает вещество. Второй закон фотохимии, открытый Эйнштейном в 1912 году, говорит о том, что на одну молекулу вещества, участвующего в фотохимической реакции, поглощается один квант света.

Квантовая природа света.

Квантовый характер излучения был постулирован Планком в 1900 г. Согласно этой гипотезе, энергия любой системы при поглощении или испускании электромагнитного излучения с частотой ν может изменяться только на величину, кратную энергии кванта $h\nu$. Величина энергии поглощенного кванта равна разности энергий уровней, между которыми осуществляется переход электрона:

$$h\nu = E_2 - E_1 = \Delta E,$$

где ν – частота поглощаемого света, E_2 и E_1 – энергии уровней, между которыми осуществляется переход. Иными словами, энергия системы может изменяться только дискретно. Квант электромагнитного излучения (фотон) в химии обычно обозначают как $h\nu$, где h – постоянная Планка, а ν – частота. Произведение указанных величин представляет собой энергию фотона.

Диаграмма Яблонского (природа флуоресценции, внутренняя конверсия, испускание в первом возбуждённом состоянии).

Для иллюстрации процессов, происходящих в ходе поглощения и испускания света, обычно используют различные виды диаграммы Яблонского. На Рис.2 показана диаграмма, на которой для упрощения не рассматриваются процессы тушения, переноса энергии и

взаимодействия с растворителем. По оси ординат на данной диаграмме отображается энергия системы, находящейся в различных квантовых состояниях.

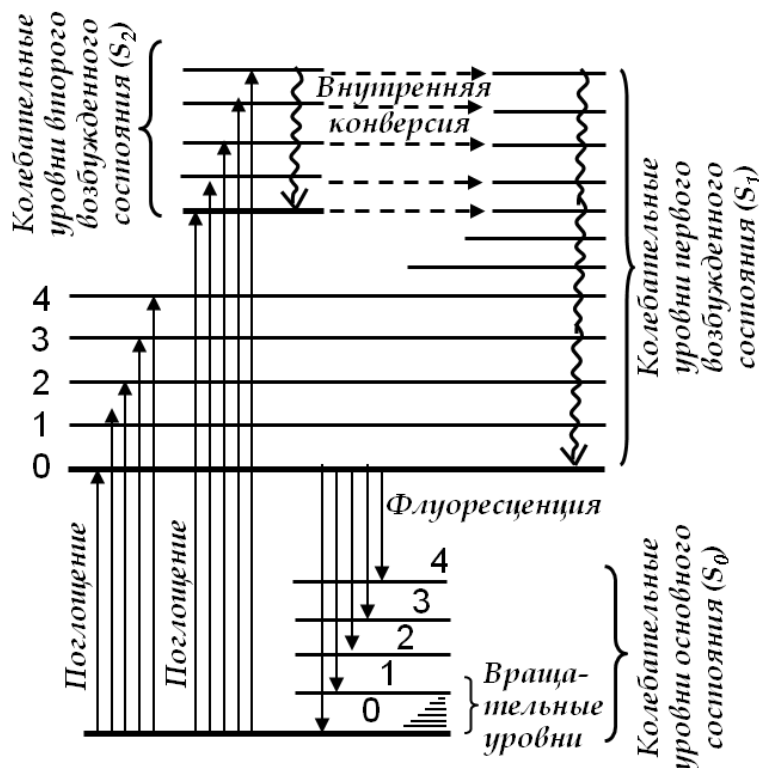


Рис. 2. Диаграмма Яблонского, описывающая явления поглощения света, колебательной релаксации, внутренней конверсии и флуоресценции (процессы поглощения или испускания кванта света изображены прямыми вертикальными линиями; процессы колебательной релаксации изображены волнистыми вертикальными линиями).

Основное (S_0), первое (S_1) и второе (S_2) возбужденные электронные состояния расщепляются на колебательные уровни, обозначенные на схеме 0, 1, 2, 3, 4, каждый из которых, в свою очередь, делится на серию тесно расположенных вращательных подуровней. В растворе при комнатной температуре практически все молекулы находятся в невозбужденном состоянии и расположены на нулевом электронном уровне состояния S_0 . При этом электронная оболочка находится в синглетном состоянии, т. е. все электроны спарены и суммарный спин равен нулю. Суммарная энергия определенного состояния молекулы, E , включает в себя энергию электронного возбуждения ($E_{эл}$), колебательную энергию ($E_{кол}$) и вращательную энергию ($E_{вращ}$):

$$E = E_{эл} + E_{кол} + E_{вращ}$$

Соответственно, полное изменение энергии при поглощении кванта света, ΔE , составляет:

$$h\nu = \Delta E = \Delta E_{эл} + \Delta E_{кол} + \Delta E_{вращ}$$

При поглощении молекулами света определенной длины волны происходит переход электронов из основного в возбуждённое состояние, например переход $S_0 \rightarrow S_2$. При поглощении молекулой света другой длины волны электрон переходит на уровень, соответствующий энергии поглощаемого света. Так, при поглощении меньшей энергии (по сравнению с той, которая необходима для перехода на уровень S_2), электрон переходит на более низкий уровень ($S_0 \rightarrow S_1$). Поскольку каждая молекула имеет несколько возбуждённых синглетных уровней, каждый из которых, к тому же, расщепляется на колебательные и вращательные подуровни, количество электронных переходов в молекуле велико и спектры поглощения и возбуждения являются непрерывными.

Следует обратить внимание на то, что низшие колебательные уровни верхнего электронного состояния (например, S_2), могут иметь такую же полную энергию, как и высшие колебательные уровни расположенного ниже электронного состояния (S_1).

При поглощении света возбуждение флуорофора происходит обычно до различных высших колебательных подуровней электронных уровней S_1 или S_2 , время такого перехода составляет порядка 10^{-15} с. После этого молекула быстро (в течение 10^{-14} – 10^{-12} с) теряет избыток энергии при столкновении с окружающими молекулами (волнистые линии на Рис.2). При этом осуществляется переход на нижний колебательный уровень (0) состояния S_1 (данный процесс называется колебательной релаксацией). Параллельно в молекулах, находящихся в возбуждённом состоянии, протекает другой процесс – внутренняя конверсия, которая представляет собой переход молекул с нижних колебательных уровней верхнего состояния (например, S_2) на имеющие ту же полную энергию верхние колебательные уровни более низкого электронного состояния (например, S_1 ; горизонтальные линии на Рис.2). Таким образом, в подавляющем большинстве случаев при попадании молекулы в любое состояние, расположенное выше нулевого колебательного уровня состояния S_1 , в результате упомянутых выше процессов она быстро возвращается в это состояние. Внутренняя конверсия и переходы на нулевой колебательный уровень состояния S_1 происходят за времена порядка 10^{-12} с и обычно полностью заканчиваются до момента испускания фотона. В ряде случаев (в основном, для молекул с жёстким каркасом) внутренняя конверсия из нижнего колебательного уровня первого возбуждённого состояния в основное протекает сравнительно медленно (время жизни состояния S_1 – порядка 10^{-9} с и более). Поэтому в первом возбуждённом состоянии наблюдаются процессы испускания, хотя их скорость и не очень велика. Переход электронов с нижнего колебательного уровня (0) состояния S_1 на основной ($S_1 \rightarrow S_0$) с испусканием фотона называют флуоресценцией. Сам акт испускания фотона происходит на временах порядка 10^{-15} с, однако поскольку

скоростьюопределяющей стадией процесса является пребывание системы на нижнем колебательном уровне первого возбуждённого состояния, то экспериментально наблюдаемые времена жизни возбуждённого состояния при флуоресценции составляют порядка 10^{-8} - 10^{-10} с. Важно, что в данном случае в возбуждённом синглетном состоянии спины электронов, находящихся на более высокой и более низкой орбиталях, имеют противоположную ориентацию (спарены). При возвращении электрона из возбуждённого синглетного состояния на основной уровень ориентация спина не меняется, поэтому на такой переход не распространяются квантовомеханические правила запрета. Таким образом, флуоресценция – это испускание кванта света, которое происходит при возвращении спаренного электрона с низшего колебательного уровня состояния S_1 на любой из колебательных уровней основного электронного состояния. Из этого следует, что спектр люминесценции не зависит от длины волны возбуждения.

Квантовый выход флуоресценции, ϕ , характеризует эффективность процесса и определяется как отношение количества испускаемых и поглощаемых фотонов. Таким образом, квантовый выход варьируется в пределах $0 \leq \phi \leq 1$, т. е. теоретически квантовый выход может достигать 1. На практике, поскольку наряду с излучательными переходами (т. е. собственно флуоресценцией) протекают и различные безызлучательные процессы (например, колебательная релаксация на основной уровень), квантовый выход флуоресценции зачастую меньше 1. Чем больше молярный коэффициент поглощения при длине волны возбуждающего света, и чем выше квантовый выход флуоресценции для данного флуорофора, тем интенсивнее его флуоресценция. С другой стороны, в силу протекания процессов колебательной релаксации, часть поглощенной энергии преобразуется в тепловую ($E_{тепл}$), поэтому энергия кванта при излучении всегда оказывается меньше энергии поглощенного кванта на величину $E_{тепл}$:

$$h\nu = h\nu_{ногл} - E_{тепл}$$

Таким образом, отношение количества излучённой в виде флуоресценции энергии к энергии, поглощённой флуорофором, всегда меньше 1.

Положение спектров флуоресценции и поглощения.

Правило зеркальной симметрии. Закон Стокса.

При комнатной температуре поглощение происходит как правило только с нулевого колебательного уровня основного состояния S_0 , а испускание - с нулевого колебательного уровня первого возбуждённого состояния S_1 . Поэтому только указанный переход, называемый 0-0 переходом, имеет одну и ту же энергию поглощения и испускания, а остальные отвечают большим или меньшим энергиям. Спектр флуоресценции расположен с длинноволновой стороны

первой (длинноволновой) полосы поглощения и перекрывается с ней при длине волны перехода 0-0. Форма полос поглощения и испускания определяется распределением колебательных уровней состояний S_1 и S_2 по энергиям. Это распределение часто одинаково для обоих состояний, поэтому спектр испускания близок к зеркальному отражению спектра поглощения по энергиям. Из диаграммы Яблонского (Рис.2) следует, что энергия испускания меньше энергии поглощения, т. е. флуоресценция обычно наблюдается при больших длинах волн, чем поглощение света, как это показано на Рис.3 на примере спектров 7-гидрокси-4метилкумарина и цианинового люминофора Су3.5.

Это правило было сформулировано Стоксом, а сдвиг спектров поглощения и испускания называют Стоксовым сдвигом. Если бы расположение уровней, показанное на Рис.2, было единственным фактором, влияющим на поглощение и испускание света, то спектры поглощения и флуоресценции представляли бы собой последовательности одинаковых по интенсивности полос, идущих к коротким и длинным волнам. На самом деле интенсивности полос существенно различаются. Эту особенность можно объяснить, принимая во внимание принцип Франка-Кондона.

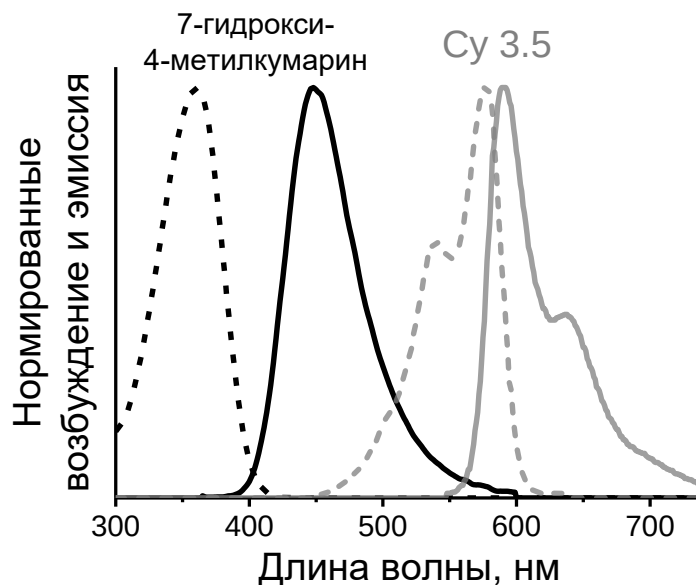


Рис. 3. Спектры возбуждения и эмиссии 7-гидрокси-4метилкумарина (чёрный) и цианинового люминофора Су3.5 (серый). Спектры возбуждения представлены пунктирной, а спектры эмиссии – сплошной линией.

Интенсивность испускания люминесценции. Принцип Франка-Кондона.

Согласно принципу Франка-Кондона, за время поглощения света, которое составляет порядка 10^{-15} с, не изменяется ни положение, ни импульс ядер атомов в молекуле. Иными словами, конфигурации ядер и их относительное движение до поглощения света и сразу же после этого одинаковы. Рассмотрим, как это влияет на интенсивности различных колебательных полос. На Рис.4 показана зависимость потенциальной энергии от межатомного расстояния для двухатомной молекулы.

Кривая MN соответствует потенциальной энергии системы в основном состоянии, горизонтальные линии отвечают молекулам, имеющим различное количество квантов колебательной энергии. Молекулы с числом квантов, равным нулю, слегка колеблются около среднего межатомного расстояния (вдоль части кривой CD), молекулы с тремя колебательными квантами колеблются вдоль кривой AB. Точки прямой AB соответствуют молекулам с тремя колебательными квантами, но различными значениями потенциальной и кинетической энергии. Полная энергия таких молекул при этом постоянна и равна расстоянию от минимума кривой MN (точка E) до линии AB.

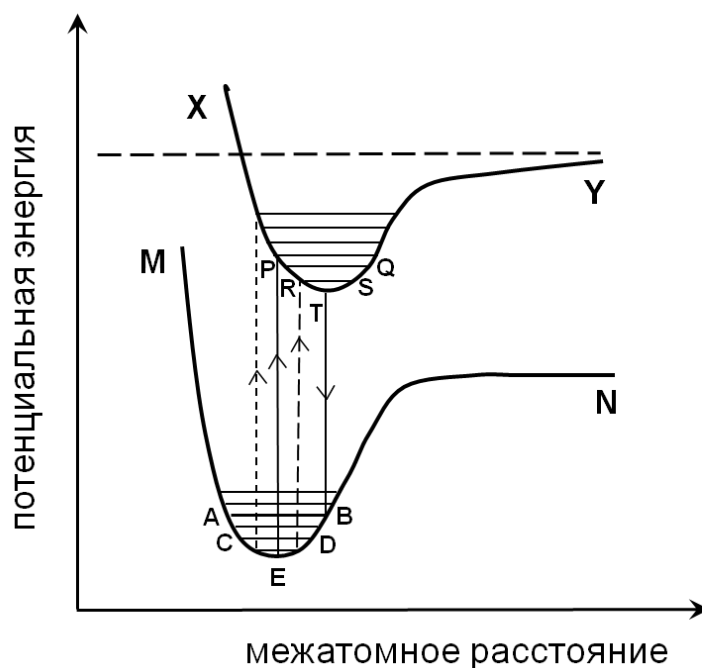


Рис. 4. Принцип Франка-Кондона в применении к двухатомной молекуле.

Кривая XY соответствует электронно-возбужденному состоянию, ее расположение над кривой MN соответствует большей энергии электронного возбуждения. В возбужденном состоянии заполняемая электроном орбиталь обычно имеет больший размер по сравнению с основным состоянием, поэтому положение равновесия на кривой XY (середина отрезка RS) соответствует

большему межъядерному расстоянию по сравнению с основным (середина отрезка CD). В момент поглощения кванта света молекула может находиться в различных точках кривой CD. Согласно принципу Франка-Кондона, наиболее вероятен переход, при котором не изменяется ни импульс, ни положение ядер, например, по линии EP. Из решения волнового уравнения следует, что наиболее вероятное расстояние между ядрами для молекулы с нулевой колебательной энергией соответствует середине отрезка CD или RS. При поглощении света возможны различные переходы, но наиболее вероятен переход, отвечающий прямой EP. Другие переходы, более длинноволновые или более коротковолновые, происходят с меньшей вероятностью. С уменьшением межъядерного расстояния потенциальная кривая становится круче и интенсивность в спектре поглощения спадает в направлении коротких волн более полого, чем с длинноволновой стороны от максимума (Рис.3). После возбуждения и перехода на верхний колебательный уровень (PQ) молекула быстро теряет избыток колебательной энергии и переходит на уровень RS, с которого возможен переход в основное состояние с испусканием флуоресценции. Согласно принципу Франка-Кондона, наиболее интенсивная полоса испускания соответствует вертикальному отрезку, проведенному из середины RS в точку B, а менее интенсивные – переходам на колебательные уровни основного состояния, находящиеся на отрезке AB. Форма спектра испускания зависит от относительного расположения минимумов кривых MN и XY. Обычно кривые не очень сильно сдвинуты относительно друг друга по оси абсцисс и справа от вертикали кривая основного состояния круче, чем слева. Поэтому в направлении длинных волн интенсивность флуоресценции спадает более полого, чем в направлении коротких волн (Рис.3).

Сольватация растворителем.

Рассмотрим процессы, сопровождающие поглощение и испускание света веществом в растворе, связанные со взаимодействием молекул растворителя и растворенного вещества. Молекулы растворенного вещества сольватированы за счет диполь-дипольных взаимодействий с молекулами растворителя. Степень сольватации регулируется электронной плотностью в молекуле, которая определяет величину дипольного момента – постоянного в случае полярных молекул и наведённого в случае неполярных. В возбуждённом состоянии распределение электронной плотности иное по сравнению с основным состоянием, поэтому при возбуждении изменяется постоянный дипольный момент и поляризуемость, от которой зависит наведённый дипольный момент, а, следовательно, должна измениться и степень сольватации. Поглощение света происходит очень быстро (за временной интервал порядка 10^{-15} с), и в жидкости при комнатной температуре молекула сразу же после возбуждения оказывается в неравновесном

состоянии сольватации с большей, чем равновесная, свободной энергией Гиббса (переход $1 \rightarrow 2$ на Рис.5). Время жизни возбуждённого состояния достаточно велико (порядка 10^{-9} с) и до момента испускания, сначала за времена порядка 10^{-14} – 10^{-12} с происходит колебательная релаксация люминофора (переход $2 \rightarrow 2'$ на нижний колебательный уровень первого возбуждённого состояния), а затем за времена от 10^{-13} до 10^{-10} с происходит переход в равновесное состояние сольватации с меньшей энергией (переход $2' \rightarrow 3$ на Рис.5). Этот процесс называется релаксацией растворителя, и он приводит к понижению свободной энергии Гиббса системы люминофор-растворитель. При испускании света молекула люминофора (также за время порядка 10^{-15} с) переходит в основное состояние, степень же сольватации при этом по-прежнему соответствует возбуждённому состоянию с большей, чем равновесная, энергией Гиббса (переход $3 \rightarrow 4$ на Рис.5). После этого также происходит колебательная релаксация и затем релаксация растворителя, сопровождающаяся уменьшением степени сольватации и понижением свободной энергии Гиббса до исходного состояния ($4 \rightarrow 1$ на Рис.5). Видно, что поглощаемая энергия оказывается больше испускаемой, разность при этом расходуется на нагревание растворителя в процессах релаксации $2 \rightarrow 3$ и $4 \rightarrow 1$.

Размеры электронной оболочки молекулы в возбуждённом состоянии больше по сравнению с основным, поэтому поляризуемость при возбуждении увеличивается. Даже при постоянном дипольном моменте это должно приводить к увеличению степени сольватации и возникновению разности энергий возбуждения и испускания.

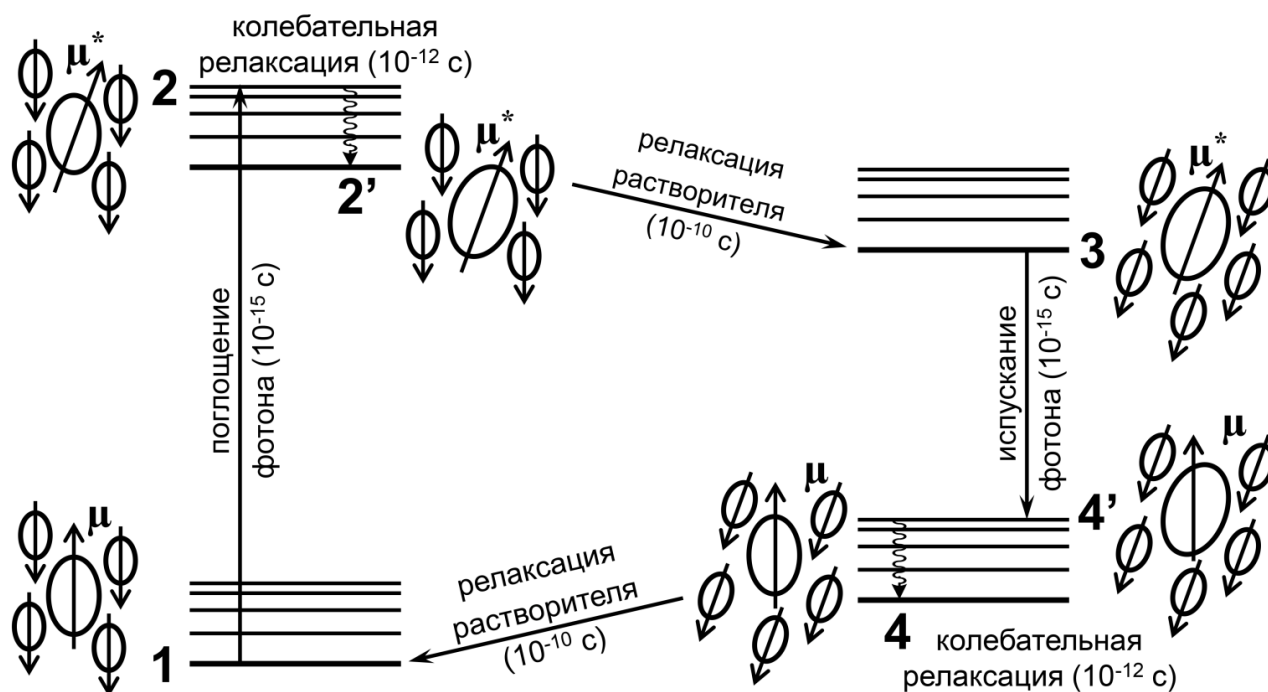


Рис. 5. Изменение сольватации при поглощении и испускании света.

Таким образом, процессы релаксации растворителя приводят к увеличению Стоксова сдвига, и по его величине можно судить о характере взаимодействия вещества с растворителем в данной системе при заданных условиях. Так, уравнение Липперта позволяет исследовать локальную полярность микроокружения как функцию Стоксова сдвига:

$$\Delta\nu = \frac{2(\mu^* - \mu)^2}{\hbar c a^3} \left(\frac{\varepsilon - 1}{2\varepsilon + 1} - \frac{n^2 - 1}{2n^2 + 1} \right),$$

где $\Delta\nu$ – Стоксов сдвиг, μ^* и μ – дипольные моменты люминофора в основном и возбуждённом состояниях, соответственно; $\hbar$ – постоянная Планка; c – скорость света в вакууме; a – радиус полости, в которой помещается люминофор; ε и n – локальная диэлектрическая проницаемость и показатель преломления среды, соответственно.

Кроме того, исследование полимерных систем с люминофорами в боковой цепи с помощью быстрых спектроскопических методик с разрешением по времени, сравнимым со скоростью релаксации растворителя, даёт возможность получения опосредованной информации о сольватации полимерных цепей и динамике сегментов, поскольку в данном случае скорость перестройки сольватной оболочки люминофора будет зависеть от процессов сольватации полимерных цепей. Действительно, при поглощении фотона люминофор довольно быстро (в течение 10^{-12} с) переходит в основное колебательное состояние первого возбуждённого уровня (и, таким образом, становится способен к испусканию фотонов); однако к этому моменту релаксация растворителя ещё не завершена, и свободная энергия Гиббса люминофора выше равновесной. С другой стороны, поскольку процесс испускания фотонов носит статистический характер, то значимая часть фотонов испускается из различных неравновесных состояний, и в результате энергия этих фотонов выше таковой для фотонов, излучённых люминофором с полностью релаксировавшей сольватной оболочкой. На практике это выражается в том, что измерение зависимости приведённого Стоксова сдвига ($C(t)$) от времени носит вид уменьшающейся функции, выходящей на плато (Рис.6):

$$C(t) = \frac{v_{max}(t) - v_{max}(\infty)}{v_{max}(t=0) - v_{max}(\infty)},$$

где v_{max} – длина волны максимума люминесценции либо в нулевой момент времени ($v_{max}(t=0)$; теоретически рассчитываемая величина), либо в произвольный момент времени t ($v_{max}(t)$), либо после выхода на плато ($v_{max}(\infty)$).

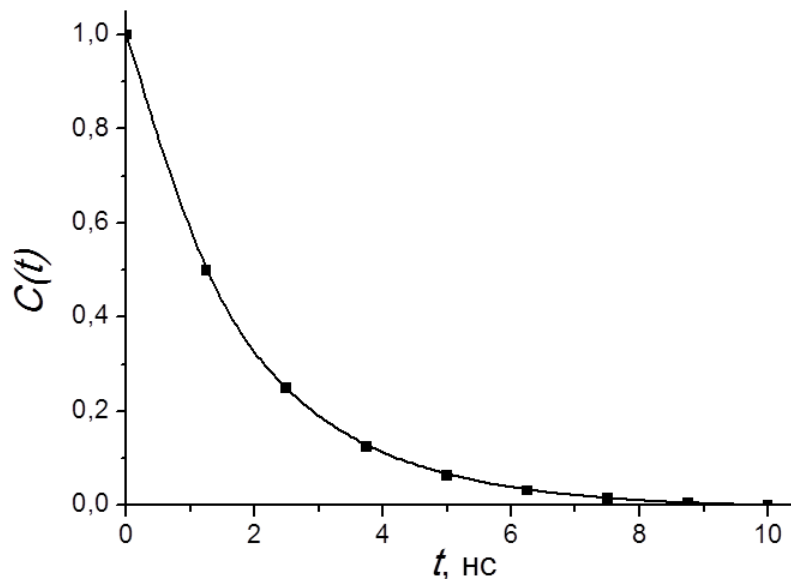


Рис. 6. Типичный вид зависимости приведённого Стоксова сдвига ($C(t)$) от времени.

Аппроксимация этой функции даёт в простейшем случае моноэкспоненциальную зависимость (однако на практике зачастую удовлетворительно аппроксимируется только би- или даже мультиэкспонентами), из характеристического времени затухания данной функции можно сделать выводы о характеристическом времени релаксации растворителя в сольватной оболочке полимера.

Анизотропия флуоресценции.

Другим важным явлением, позволяющим получать дополнительную информацию о динамике полимерных систем, является эффект возникновения анизотропии люминесценции, генерируемой с помощью плоскополяризованных источников возбуждения, и дальнейшей её изотропизации. Данное явление основано на том факте, что вероятность возбуждения данной молекулы люминофора пропорциональна косинусу угла между собственным дипольным моментом молекулы и направлением электрической составляющей электромагнитной волны. В результате, при прохождении через образец плоскополяризованного света, в нём преимущественно возбуждаются люминофоры с параллельной ориентацией относительно плоскости поляризации (Рис.7). Поскольку дипольные моменты люминофора при возбуждении и эмиссии строго коррелируют между собой (в подавляющем большинстве случаев они параллельны), то можно предположить, что и испускаемое излучение будет поляризованным.

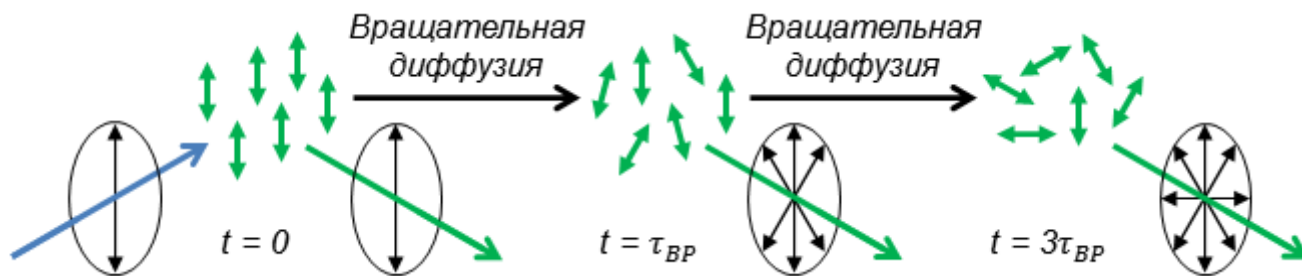


Рис. 7. Схема возбуждения люминофоров поляризованным светом.

Данное предположение действительно подтверждается на практике, однако плоскополяризованное люминесцентное излучение имеет ярковыраженную тенденцию к изотропизации (т. е. потере преимущественной поляризации), обусловленную вращательным движением молекул люминофора. Действительно, если за время жизни возбуждённого состояния молекулы люминофора успевают претерпеть достаточное количество соударений, чтобы полностью потерять информацию о своих первоначальных ориентациях, никакой практически наблюдаемой анизотропии люминесценции наблюдаться не будет. Если же молекулы люминофора зафиксированы предельно жестко (например, в аморфной структуре полимера или замороженного растворителя), то степень анизотропии $r(t)$ люминесценции будет максимальна. Математически степень анизотропии можно выразить через следующее соотношение:

$$r(t) = \frac{I_{\parallel}(t) - I_{\perp}(t)}{I_{\parallel}(t) + 2I_{\perp}(t)},$$

где $I_{\parallel}(t)$ и $I_{\perp}(t)$ – интенсивности параллельно и перпендикулярно поляризованных компонент люминесценции; экспериментально данные величины измеряются либо при параллельном, либо скрещенном положениях поляроидов, расположенных между источником света и кюветой (1) и перед детектором (2), Рис.7. При этом, хотя анизотропия флуоресценции в общем виде зависит от времени, на практике используют измерения $r(t)$ как в стационарном (steady-state), так и время-разрешённом режимах. Очевидно, что $r(t)$ – положительная величина, которая имеет максимальное значение при фиксации люминофоров в жесткой матрице, и спадает до 0 при нахождении люминофоров в растворах с низкой вязкостью.

Таким образом, измерение анизотропии люминесценции позволяет сопоставить динамику процессов, происходящих в микроокружении люминофора, со временем его жизни, а в случае время-разрешённых экспериментов – получить количественную оценку характеристических времён протекания этих процессов.

Фосфоресценция, принцип Паули, диаграмма Яблонского с синглетной и триплетной системами, интеркомбинационная конверсия, положение спектров фосфоресценции. Кинетика процесса испускания, время жизни возбуждённого состояния.

При поглощении света и переходе в возбуждённое электронное состояние ориентация спина может оставаться неизменной, как это происходит в случае синглетных переходов, описанных выше (Рис.2). Однако, в некоторых случаях направление спина при пребывании в возбуждённом состоянии может изменяться на противоположное. Такие переходы называются синглет-триплетными. На Рис.8 показана диаграмма Яблонского, содержащая как синглетные основное и возбуждённые (S_0 , S_1 и S_2), так и триплетные возбуждённые (T_1 и T_2) электронные состояния.

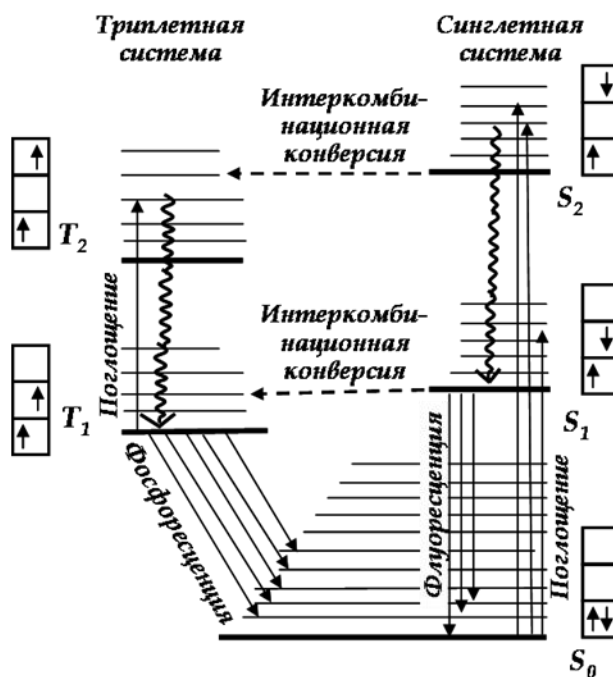


Рис. 8. Диаграмма Яблонского, триплетные и синглетные состояния, интеркомбинационная конверсия.

В триплетном состоянии электроны на двух различных по энергии орбиталях не спарены и имеют одинаковую ориентацию спинов. Переход с основного электронного состояния S_0 на триплетный уровень запрещен, электрон может попасть сюда лишь с возбуждённого синглетного уровня, такой переход называется интеркомбинационной конверсией (переходы $S_1 \rightarrow T_1$, $S_2 \rightarrow T_2$). Излучательный триплет-синглетный переход из состояния T_1 в основное состояние S_0 называется фосфоресценцией. Таким образом, фосфоресценция – это испускание кванта электромагнитного

излучения при переходе между состояниями различной мультиплетности, например, из возбуждённого триплетного состояния в основное синглетное. Переходы синглет-триплет и триплет-синглет теоретически запрещены, но осуществимы на практике. Скорости испускания при переходе электрона с триплетного уровня на основной синглетный составляют порядка 10^{-15} с, а время жизни в возбуждённом триплетном состоянии – от десятков наносекунд до миллисекунд; таким образом, фосфоресценция является гораздо более медленным процессом, чем флуоресценция. Возможны и большие времена жизни, примером такой фосфоресценции являются светящиеся в темноте игрушки: после облучения светом фосфоресцирующие вещества испускают свет в течение достаточно длительного времени, пока молекулы люминофора возвращаются в основное состояние. В растворах органических люминофоров при комнатной температуре фосфоресценция обычно не наблюдается из-за протекания различных процессов дезактивации, конкурирующих с испусканием, однако, если раствор заморозить, исключив тем самым возможность столкновения молекул, фосфоресценцию можно наблюдать. Явление фосфоресценции при обычных температурах можно наблюдать в случае металлоорганических соединений иридия, платины, рения и др. Структурной особенностью данных соединений является наличие тяжелого атома металла: благодаря спин-орбитальным взаимодействиям, вызванным этим атомом, происходит ослабление квантовомеханических правил запрета на переходы с изменением мультиплетности спина. Поскольку триплетный уровень расположен ниже синглетного возбуждённого уровня, спектр фосфоресценции обычно сдвинут в сторону больших длин волн (меньших энергий) по сравнению с флуоресценцией, т. е. обладает большим Стоксовым сдвигом (Рис.8).

Динамическое и статическое тушение люминесценции.

Взаимодействие молекул люминофора с локальным микроокружением может приводить к существенному уменьшению интенсивности, или тушению, люминесценции. Тушение люминесценции бывает статическим и динамическим. При статическом тушении люминофор в основном электронном состоянии образует нефлуоресцентный комплекс с тушителем. При этом та часть люминофоров, которая не образовала комплекса, сохраняет свою люминесценцию (и характерное время жизни). Поэтому относительное понижение интенсивности люминесценции, I/I_0 (где I_0 и I – интенсивности люминесценции до и после добавления тушителя в систему, соответственно), позволяет рассчитать долю несвязанных с тушителем люминофоров в системе, а сохранение наблюдаемого времени жизни до и после добавления тушителя (т. е. независимость

времени жизни люминесценции от концентрации тушителя) является подтверждением статического механизма тушения люминесценции.

При динамическом тушении образуется обычное возбуждённое состояние, которое разрушается тушителем ещё до того, как успевает произойти эмиссия фотона. При этом степень тушения люминесценции зависит от количества эффективных соударений с тушителем и описывается уравнением Штерна-Фольмера:

$$\frac{I_0}{I} = \frac{\tau_0}{\tau} = 1 + k_q \tau_0 [Q],$$

где $I_0(\tau_0)$ и $I(\tau)$ – интенсивности (времена жизни) люминесценции до и после добавления тушителя в систему, соответственно; k_q – константа скорости динамического тушения, $[Q]$ – концентрация тушителя. Из уравнения Штерна-Фольмера видно, что в случае динамического тушения время жизни и интенсивность люминесценции уменьшаются симбатно. Классическим примером динамического тушения люминесценции является тушение фосфоресценции молекулярным кислородом – уникальной молекулой, чьё основное состояние является триплетным. Как следствие, перенос энергии с возбуждённого триплетного состояния люминофора на основное триплетное состояние кислорода является разрешённым.

Фёстеровский резонансный перенос энергии.

Другим вариантом взаимодействия люминофоров с локальным микроокружением является Фёстеровский резонансный перенос энергии (Förster Resonance Energy Transfer, FRET). Данное явление представляет собой процесс безызлучательного переноса энергии с первого возбуждённого состояния одного люминофора (называемого FRET-донором), на один из возбуждённых уровней другого люминофора (называемого FRET-акцептором), которые вместе образуют так называемую FRET-пару. Поскольку данный процесс является следствием диполь-дипольного взаимодействия молекул люминофоров и происходит без их непосредственного контакта, то для его осуществления необходимо выполнение нескольких условий: 1) сильное перекрытие спектров эмиссии FRET-донора и FRET-акцептора (в терминах диаграммы Яблонского – равенство энергии излучения фотона FRET-донором и энергии поглощения фотона FRET-акцептором, Рис.9а); 2) пространственное сближение компонентов FRET-пары на расстояние менее некоторой характеристической длины (называемой также Фёстеровским радиусом); в силу убывания силы диполь-дипольного взаимодействия по закону r^{-6} , обычно Фёстеровский радиус варьируется в пределах 2-5 нм; 3) сонаправленность дипольных моментов FRET-донора и FRET-акцептора.

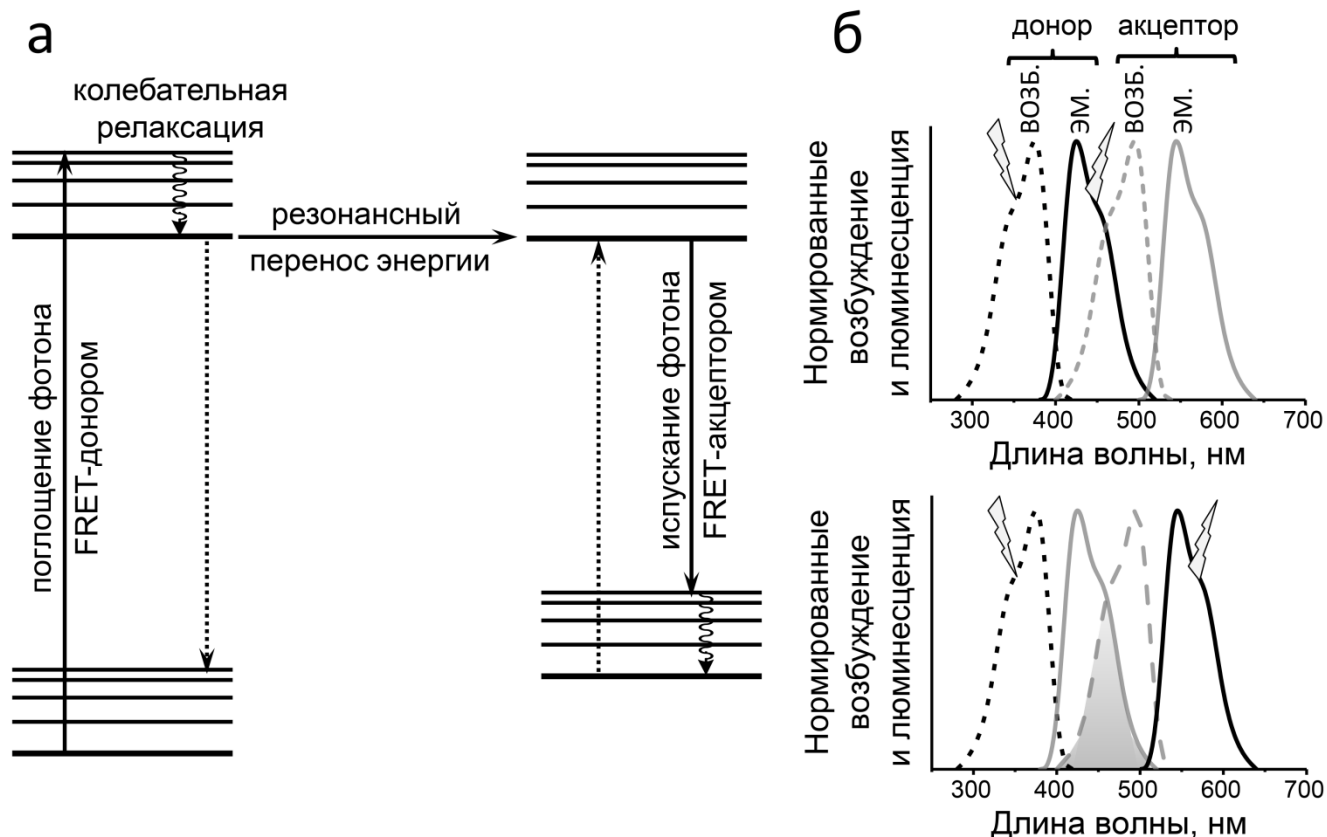


Рис. 9. а) Вариант диаграммы Яблонского, описывающий перенос энергии по механизму FRET. б) Экспериментальное наблюдение FRET. Чёрным цветом выделены активные полосы поглощения и эмиссии. Серым выделена область перекрывания спектра эмиссии FRET-донора и спектра возбуждения FRET-акцептора.

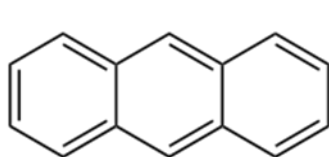
Экспериментально возникновение FRET фиксируется либо по сдвигу спектра эмиссии в красную область на несколько десятков нанометров, либо по уменьшению времени жизни возбуждённого состояния FRET-донора, поскольку по своей сути FRET является разновидностью динамического тушения флуоресценции, где в качестве тушителя берётся другой люминофор (Рис.9б).

3. Примеры практического использования фотолюминесценции растворов **в полимерной химии и молекулярной биологии**

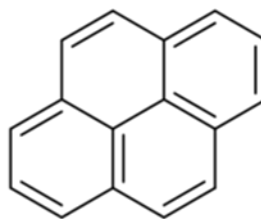
В современной полимерной химии различные варианты метода флуоресцентной спектроскопии активно применяются для исследования поведения полимеров в растворах. Флуориметрические измерения в таких системах позволяют получать информацию о взаимодействии молекул растворителя с флуорофором, конформационных изменениях молекул, а также о связывании макромолекул друг с другом.

Применение метода тушения люминесценции для исследования взаимодействия полиэлектролитов с противоположно заряженными объектами и в биомедицинских приложениях.

Метод тушения флуоресценции очень удобен для изучения закономерностей межмолекулярных реакций в растворах полимеров, в частности полиэлектролитов. В качестве метки используют, например, антрацен или пирен (Рис.10).



(a)



(б)

Рис. 10. Структурные формулы молекул антрацена (а) и пирена (б).

Известно, что взаимодействие двух противоположно заряженных полиэлектролитов в растворе за счет образования межцепных солевых связей приводит к получению новых соединений – интерполиэлектролитных комплексов. Используя флуоресцентно меченый полиэлектролит и полиэлектролит, содержащий группы-тушители флуоресценции, можно исследовать закономерности протекания реакций образования и разрушения таких комплексов. В качестве типичного примера рассмотрим реакцию между полиметакриловой кислотой (ПМАК) и поли-*N*-этил-4-винилпиридиний бромидом (ПВПБ). В случае избыточного содержания одного из заряженных компонентов образующиеся комплексы растворимы в воде и происходящие с такими соединениями трансформации можно изучать методом флуоресцентной спектроскопии. Флуоресцентную метку ковалентно присоединяют к молекулам ПМАК, причем для проведения измерений достаточно одной метки на 150-350 мономерных звеньев. Взаимодействие меченой ПМАК* с противоположно заряженным поликатионом можно изучать, используя ПВПБ, который эффективно тушит флуоресценцию пиренильных групп (Рис.11а). Таким образом, измеряя интенсивность флуоресценции в описанной системе, можно следить за взаимодействием макроионов друг с другом. Образование комплекса приводит к уменьшению относительной интенсивности флуоресценции меток на цепях ПМАК*, I/I_0 , которую тушат связывающиеся с ними звенья ПВПБ (где I – интенсивность флуоресценции исследуемого раствора, а I_0 – интенсивность флуоресценции раствора исходного раствора ПМАК в отсутствии поликатиона).

При смешении водных растворов ПВПБ и меченной ПМАК* в присутствии 0,3 М NaCl вначале наблюдается скачкообразное падение интенсивности флуоресценции, соответствующее быстрому образованию некоторого числа контактов между цепями. Затем величина I/I_0 постепенно снижается до некоторого равновесного уровня (Рис.11б, кривая 1), в конечном итоге достигая величины, соответствующей равномерному распределению анионов ПМАК* по цепям ПВПБ (Рис.11б, кривая 2).

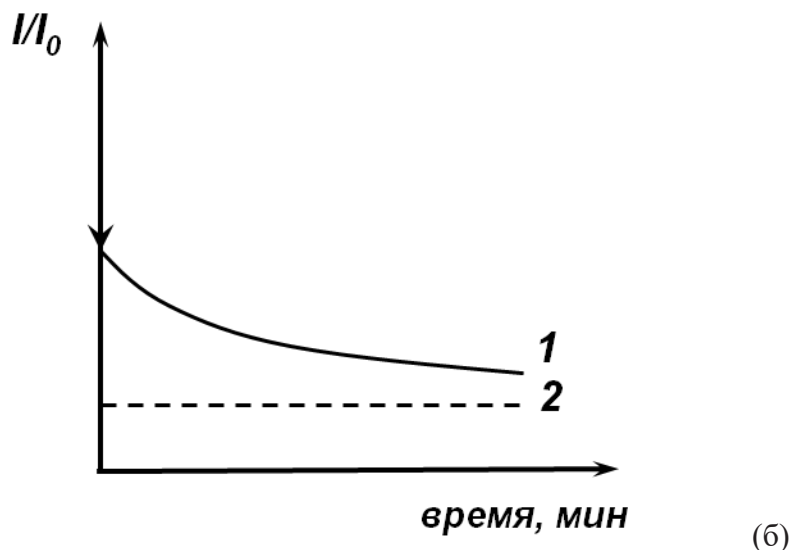
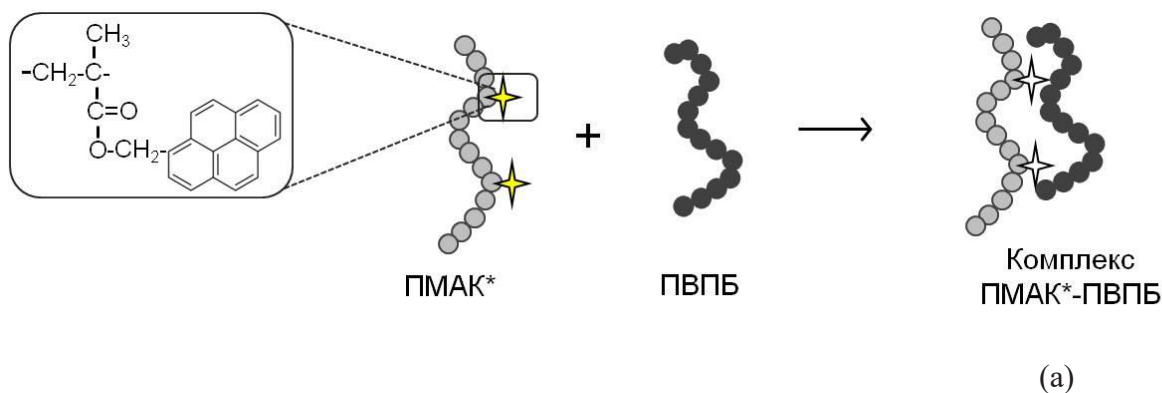


Рис. 11. Схема реакции между ПМАК* и ПВПБ (а) и кривая затухания интенсивности люминесценции ПМАК* при смешении с ПВПБ (б).

Флуориметрическим методом был установлен механизм описанной реакции, а также выявлена роль низкомолекулярных ионов во взаимодействии противоположно заряженных полиионов. При добавлении к образовавшемуся комплексу достаточного количества низкомолекулярного электролита происходит разрушение солевых связей и распад комплекса, в этом случае наблюдается возгорание флуоресценции высвобождающейся ПМАК*.

Таким образом, методом тушения флуоресценции можно следить за протеканием реакций соединения, обмена и замещения между полианионами и поликатионами в растворах.

Еще одним примером применения метода тушения флуоресценции является изучение взаимодействия полимеров с бислойнными везикулами – липосомами. Для этого используют липосомы, содержащие некоторое количество (обычно доли процента) флуоресцентно меченого липида и полимер, являющийся тушителем флуоресценции. Измеряя величину относительной флуоресценции в такой модельной системе в различных условиях, можно установить, находятся ли липосомы в контакте с полимером и оценить, например, устойчивость комплексов полимер – липосома.

Метод тушения фосфоресценции успешно используется в визуализации и картировании распределения кислорода в биологических объектах: различные полимерные наночастицы (типа NanO2, Рис.12), содержащие фосфоресцентные группы, тем или иным способом распределяются в биологических образцах, после чего методом растрового сканирования в каждой точке объекта определяется время жизни люминесценции, из которого по уравнению Штерна-Фольмера рассчитывается парциальное давление кислорода.

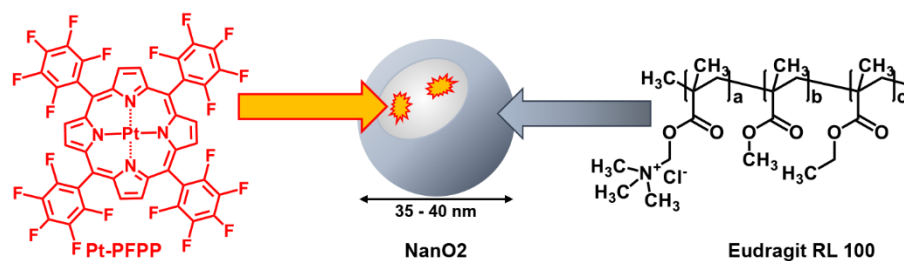


Рис. 12. Схема флуоресцентных кислородных сенсоров типа NanO2.

Применение метода релаксации растворителя для исследования сольватации полимерных цепей и сегментальной подвижности в полимерных системах.

Как было описано ранее в теоретической части, исследование полимерных систем с помощью быстрых спектроскопических методик даёт возможность исследования процессов сольватации полимерных цепей и сегментальной динамики, поскольку в данном случае скорость перестройки сольватной оболочки люминофора будет зависеть от процессов сольватации полимерных цепей. Исторически методология исследования сольватации растворителя была разработана для исследования липидных бислоёв биологических мембран; для этой цели были использованы амфифильные зонды, аналогичные соединению patman (Рис.13).

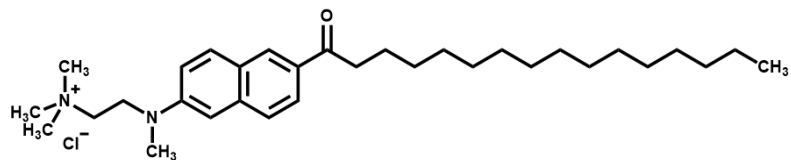


Рис. 13. Структурная формула люминесцентного поверхностно-активного зонда patman.

Благодаря гидрофобному алифатическому хвосту подобные соединения встраиваются в липидный бислой, причём гидрофобный хвост «заякоривается» в глубине бислоя (Рис.14а), тогда как гидрофильная «голова» находится в районе межфазной границы. В результате, люминесцентные исследования методом релаксации растворителя дают информацию о гидратации полярных групп липидного бислоя.

Аналогичным образом данные соединения могут быть использованы для исследования полимерных наночастиц. В частности, они были с успехом использованы при исследовании водных дисперсий полимерных мицелл (сферических агрегатов, состоящих из гидрофобного ядра и гидрофильной оболочки, Рис.14б) плуроников (триблок-сополимеров полиэтиленоксида (ПЭО) и полипропиленоксида (ППО), ПЭО-*b*-ППО-*b*-ПЭО) и diblock-сополимеров стирола с этиленоксидом или ионными сомономерами. В данном случае алифатический хвост амфифильного зонда «заякоривается» в гидрофобном ядре мицелл, а полярная «голова» с люминофором локализуется в районе межфазной границы «ядро-оболочка», в области с большой объёмной долей гидрофильных сегментов.

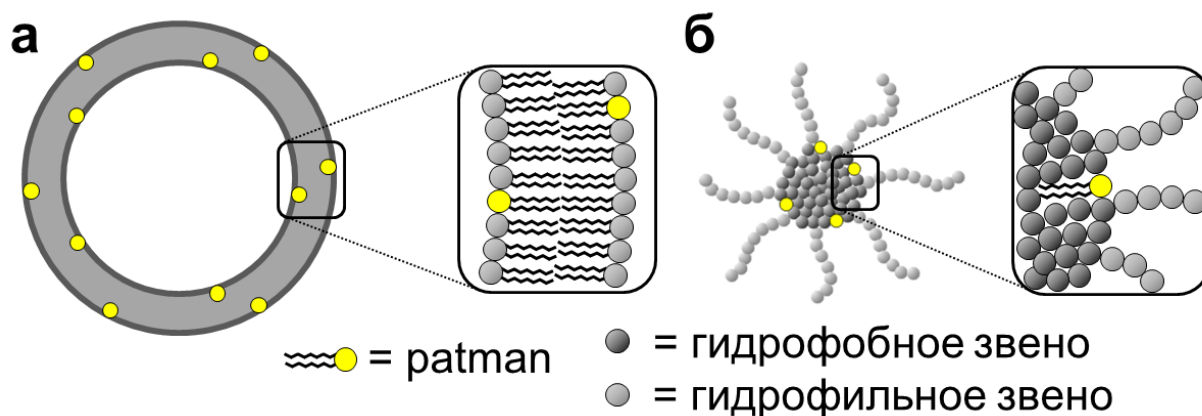


Рис. 14. Схема локализации амфифильного флуоресцентного зонда в липидном бислое (а) и полимерной мицелле (б).

Благодаря такому расположению полярные «головы» люминофоров становятся конкурентами за связывание молекул воды, и существенное влияние на скорость перестройки их сольватной оболочки (т.е. собственно релаксации растворителя) начинают оказывать степень

сольватации и динамика гидрофильных блоков. В результате динамика изменения Стоксова сдвига и его выхода на плато значительно снижается по сравнению с таковой для чистого растворителя, что позволяет оценить вышеперечисленные характеристики мицелл.

Таким образом, данные о динамике изменения Стоксова сдвига, полученные методом релаксации растворителя, позволяют установить степень гидратации и подвижность гидрофильных сегментов полимерных мицелл плуроников и амифильных диблок-сополимеров на основе стирола, находящихся вблизи межфазной границы «ядро-оболочка». Однако следует отметить, что информация, полученная данным методом, требует аккуратной интерпретации с привлечением структурной информации, полученной из ряда независимых методов, например, данных светорассеяния или рассеяния нейтронов, а также параллельного исследования анизотропии люминесценции используемого зонда.

Измерение сегментальной подвижности флуоресцентно-меченых полимеров методом анизотропии люминесценции.

Как было сказано в теоретической части, измерение анизотропии люминесценции позволяет сопоставить динамику процессов, происходящих в микроокружении люминофора, со временем его жизни, или даже получить количественную оценку характеристических времён протекания этих процессов. В случае, если флуорофор ковалентно присоединён к боковой цепи полимера, возникает возможность измерения сегментальной динамики и её изменения в результате различных процессов, происходящих с макромолекулами (конформационных переходов, процессов агрегации, и т.п.).

В частности, данный метод широко используется для исследования конформационных переходов в макромолекулах полиэлектролитов, процессов агрегации (в частности, мицеллообразования в растворах амфифильных диблок-сополимеров), а также динамики образования третичной структуры («фолдинга») белков и РНК.

При использовании время-разрешённых методик исследования анизотропии люминесценции получают экспоненциально затухающую кривую, выходящую либо на ноль, либо на определённое ненулевое значение (так называемая остаточная анизотропия люминесценции); экстраполяция данной зависимости моно- или мультиэкспоненциальными функциями даёт информацию о количестве независимых релаксационных процессов, наблюдающихся в системе и их характеристических временах; наличие остаточной анизотропии люминесценции свидетельствует о нахождении люминофора в достаточно жёстком микроокружении, препятствующем полной изотропизации системы за время жизни, сопоставимое с временем жизни люминофора.

FRET используется в химии полимеров для исследования конформационных изменений макромолекул, особенно – при изучении динамики образования третичных структур биомакромолекул (белков и РНК; Рис.15а); ещё большее распространение FRET получил при исследовании взаимодействия различных белков в клетке, когда выбираются два различных белка и селективно метятся FRET-донором и FRET-акцептором, соответственно, после чего их взаимодействие отслеживается либо по возникновению эмиссии FRET-акцептора, либо по уменьшению времени жизни FRET-донора (Рис.15б). Аналогичным образом можно также отслеживать активность различных ферментов: для этого синтезируют FRET-пару с коротким линкером, который может селективно расщепляться под действием того или иного фермента; при попадании такого конструктора внутрь клетки происходит более или менее быстрое (в зависимости от активности фермента) расщепление линкера с уменьшением FRET-сигнала (и, соответственно, увеличением интенсивности и времени жизни люминесценции FRET-донора; Рис.15в).

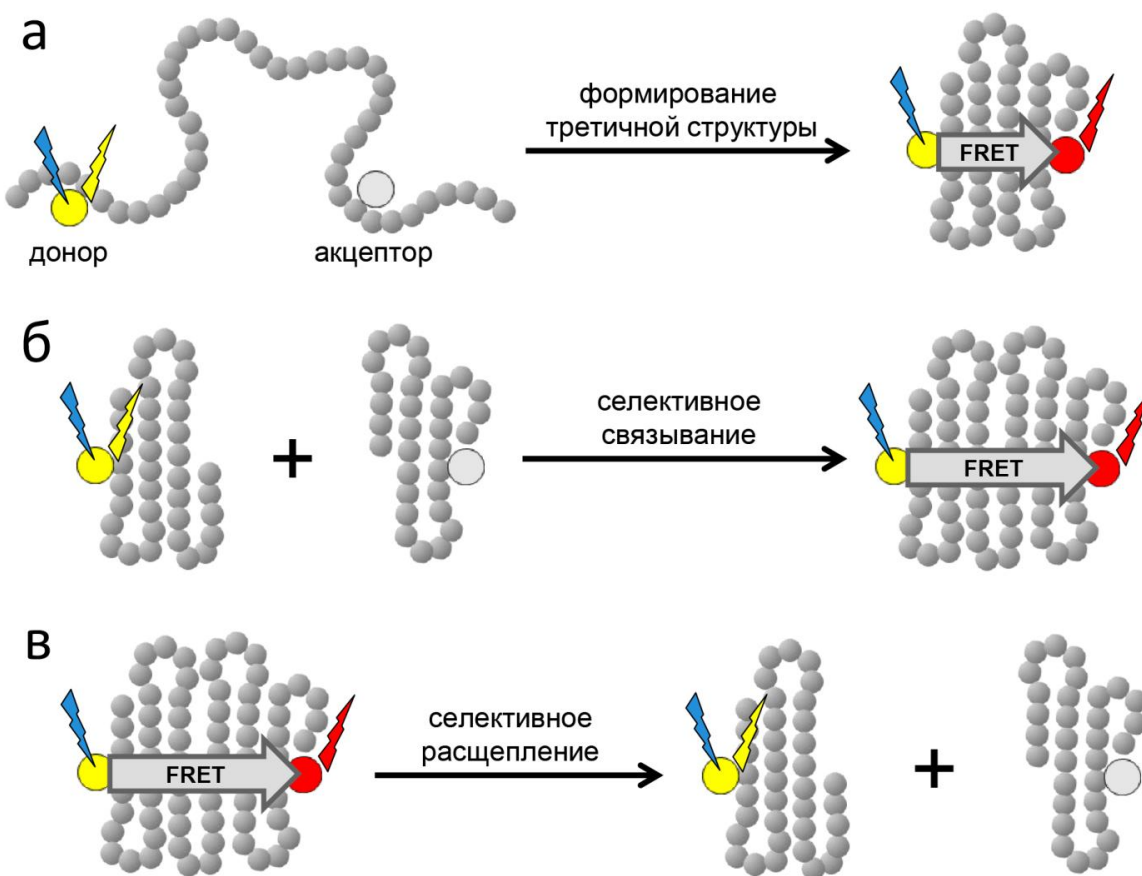


Рис. 15. Варианты использования FRET при исследовании биомакромолекул: а) исследование образования третичной структуры белков и РНК; б) исследование специфического взаимодействия белков; в) исследование активности ферментов.

*Применение флуоресцентной корреляционной спектроскопии
для исследования диффузии макромолекул.*

Метод флуоресцентной корреляционной спектроскопии основан на той же методологии, что и метод динамического рассеяния света: при броуновском движении возникают флуктуации концентрации молекул в растворе. Как следствие, при облучении раствора полимера электромагнитным излучением в так называемом «рассеивающем» (в случае динамического рассеяния света) или «излучающем» (в случае флуоресцентной корреляционной спектроскопии) объёме происходит постоянное изменение количества и взаимного пространственного расположения макромолекул, в результате чего можно наблюдать изменения во времени интенсивности рассеяния света (в случае детектирования света той же длины волны), либо – интенсивности люминесценции (в случае детектирования люминесценции облучаемого раствора).

В обоих методах экспериментально наблюдаемой величиной является автокорреляционная функция; в случае метода флуоресцентной корреляционной спектроскопии её можно записать следующим образом:

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

где $I(t)$ и $I(t + \tau)$ – интенсивности люминесценции в момент времени t и $t + \tau$. Типичный вид зависимости интенсивности люминесценции от времени и построенной на её основе автокорреляционной функции представлены на Рис.16.

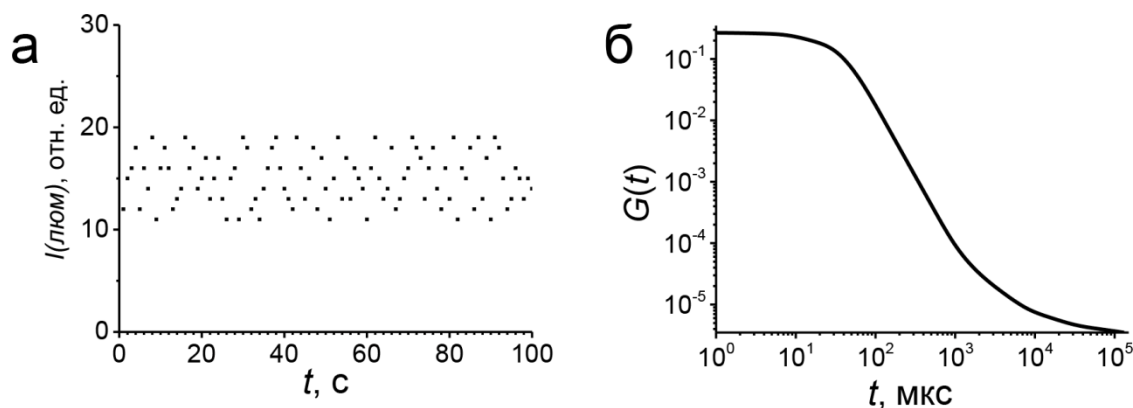


Рис. 16. Зависимость интенсивности люминесценции от времени (а) и построенная на её основе автокорреляционная функция.

Далее, по аналогии с динамическим рассеянием света, из данной автокорреляционной функции можно вычислить коэффициент трансляционной диффузии макромолекул D , и из него

по уравнению Эйнштейна-Стокса рассчитать радиус эквивалентной гидродинамической сферы R_h :

$$R_h = \frac{kT}{6\pi\eta D_0},$$

где k – постоянная Больцмана; T – абсолютная температура; η – вязкость растворителя; D_0 – экстраполяция коэффициента трансляционной диффузии на нулевую концентрацию.

В целом, методы флуоресцентной корреляционной спектроскопии и динамического рассеяния света дают аналогичную информацию, однако в силу ряда особенностей они несколько различаются по областям своего практического применения. Перечислим основные отличия методов:

- метод динамического рассеяния света более применим для исследования синтетических макромолекул, поскольку даёт более воспроизводимые результаты и не требует от образца способности к люминесценции; однако метод требует значительных концентраций образца для обеспечения приемлемого по интенсивности сигнала рассеянного света; кроме того, данный метод позволяет получать угловые зависимости параметров рассеяния, тем самым увеличивая надёжность интерпретации данных;
- метод флуоресцентной корреляционной спектроскопии более применим для растворов биомолекул, находящихся при слишком малых концентрациях, чтобы давать значимый сигнал рассеяния света; тогда как использование эффективных люминофоров даёт люминесценцентный сигнал достаточной интенсивности даже при низких концентрациях макромолекул;
- метод динамического рассеяния света даёт z-средние значения коэффициента диффузии и потому чувствителен к наиболее крупным и сильно рассеивающим частицам в смеси; поэтому исследование малых частиц в полидисперсных смесях методом динамического рассеяния света зачастую затруднительно; напротив, метод флуоресцентной корреляционной спектроскопии даёт среднечисловые значения коэффициента диффузии, поэтому отражает вклад частиц разного размера пропорционально их числу и в целом менее чувствителен к такому важному побочному фактору, как пыль в образце, который часто вносит искажения в данные светорассеяния.

Таким образом, метод флуоресцентной корреляционной спектроскопии более применим для исследования биомолекул, которые приходится регистрировать при низких концентрациях, а также может служить комплементарным дополнением к методу динамического рассеяния света в случае исследования полидисперсных систем.

4. Экспериментальная часть

Задача 1. Оценка степени связывания полигистидина с ДНК в присутствии синтетических полианионов.

Этидий бромид (ЭБ) – флуорофор, способный встраиваться между азотистыми основаниями молекулы ДНК. Этот процесс сопровождается резким увеличением интенсивности флуоресценции (*I*). Возгорание флуоресценции связано с тем, что при фотооблучении свободного (несвязанного с ДНК) зонда в растворе его флуоресценция подвергается тушению за счёт взаимодействия с растворителем. Однако после интеркаляции между парами оснований двойной спирали ДНК катион этидия экранируется от контакта с растворителем, тем самым почти полностью предотвращая тушение флуоресценции.

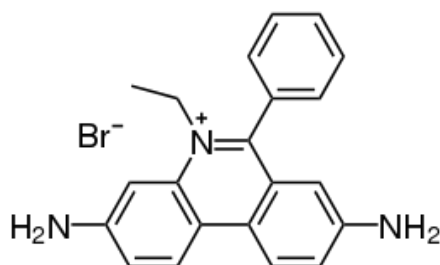


Рис. 17. Структурная формула бромистого этидия.

Комплексы ДНК-ЭБ демонстрируют очень высокую стабильность благодаря специфическим взаимодействиям катионов плоской молекулы этидия с основаниями ДНК и не диссоциируют даже в концентрированных растворах низкомолекулярных солей. ЭБ внедряется в двойную спираль, не нарушая принцип формирования пар азотистых оснований Уотсона – Крика. Однако, для осуществления интеркаляции пары оснований должны сместиться, что отражается в последовательном увеличении шага спирали и снижении гибкости цепи в ходе добавления красителя. Включение молекул ЭБ подчиняется принципу исключения ближайшего соседа: каждый второй сайт (ближайший сосед вдоль оси двойной спирали ДНК) остается свободным. Таким образом, в насыщенном комплексе на одну молекулу ЭБ приходится две пары оснований. Первые попытки использовать флуоресцентные свойства ЭБ для понимания взаимодействия ДНК с положительно заряженными партнерами были описаны почти четыре десятилетия назад. Эти исследования были посвящены связыванию природных олигомерных аминов, прежде всего спермина и спермидина, при добавлении которых в растворы комплекса ДНК-ЭБ наблюдалось тушение флуоресценции. Этот результат позволил оценить константы связывания по концентрации тушителя, при которой значение интенсивности флуоресценции уменьшалось в 2 раза. Для спермидина, содержащего три аминогруппы в молекуле, эта константа составила 3×10^5

моль/л, тогда как для спермина с учетом дополнительной аминогруппы эта величина была на порядок выше (5×10^6 моль/л).

Для лечения ряда заболеваний необходимо обеспечить доставку молекул ДНК в клетки. С этой целью могут использоваться как вирусные системы, так и синтетические на основе поликатионов, катионных липидов, ПАВ, дендримеров и пр.

Для комплексов ДНК-поликатион характерны очень высокие константы взаимодействия. Чрезмерно высокое сродство поликатиона к ДНК может быть ограничивающим этапом трансфекции из-за сложности высвобождения ДНК из комплекса с полимерным носителем. Считается, что освобождение ДНК происходит через взаимодействие ДНК-поликатионного комплекса с заряженными внутриклеточными компонентами. Поэтому представляет интерес исследование избирательного связывания поликатиона с ДНК и синтетическими полианионами-конкурентами, моделирующее отделение ДНК от поликатиона в живых клетках.

Реагенты:

Водный раствор ЭБ концентрации 10^{-3} М в фосфатном буфере с рН 5.

Этидий бромид - токсичное вещество, которое относится к мощным мутагенам, поэтому работу с ним следует проводить в перчатках и избегать попадания его растворов на кожу!

Водный раствор хлорида натрия концентрации 4М.

Водный раствор полипептида – поли-L-гистидин гидрохлорида степени полимеризации 90 концентрации 10^{-3} осново-моль/л.

Водно-солевой раствор (0.9% NaCl) ДНК из тимуса телёнка (~10,000 пар оснований), концентрация фосфатных групп [Р] = 10^{-3} моль/л .

Водный раствор полистиролсульфоната натрия (ПСС) степени полимеризации 500, концентрация 10^{-4} осново-моль/л.

Водный раствор полиметакриловой кислоты (ПМАК) степени полимеризации 1800, концентрация 10^{-4} осново-моль/л.

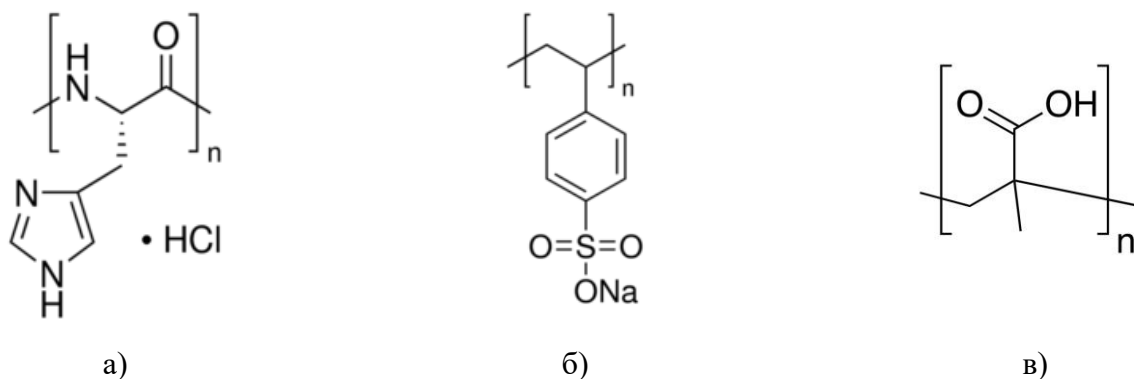


Рис. 18. Структурные формулы молекул поли-L-гистидин гидрохлорида (а), полистирол-сульфоната натрия (б) и полиметакриловой кислоты (в).

Оборудование:

Флуоресцентный спектрофлуориметр.

Кварцевая кювета с оптическим путём 1 см.

Измерения проводят при длине волны возбуждения $\lambda = 535$ нм и длине волны испускания $\lambda = 595$ нм при постоянном перемешивании в термостатируемой ячейке ($T = 25^\circ\text{C}$).

Порядок работы:

- 1) Готовят 2 мл раствора ДНК/ЭБ в буфере так, чтобы концентрация фосфатных групп составила $[\text{P}] = 4 \times 10^{-5}$ моль/л, концентрация $[\text{ЭБ}] = 1 \times 10^{-5}$ моль/л, концентрация хлорида натрия 0.05 М.
- 2) Включают спектрофлуориметр и проводят измерение интенсивности флуоресценции (I_0) раствора.
- 3) Готовят 2 мл комплекса раствора ДНК/ЭБ и поли-L-гистидина в буфере таким образом, чтобы концентрация фосфатных групп составила $[\text{P}] = 4 \times 10^{-5}$ моль/л, концентрация $[\text{ЭБ}] = 1 \times 10^{-5}$ моль/л, соотношение концентраций гистидиновых оснований к фосфатным группам было равным 0.1, а концентрация хлорида натрия 0.05 М.
- 4) Проводят измерение интенсивности флуоресценции (I) раствора из п.3.
- 5) Повторяют шаги в пп.3-4 до достижения соотношения концентраций гистидиновых оснований к фосфатным группам 3.0 с шагом 0.2.
- 6) Готовят 2 мл раствора смеси ДНК/ЭБ и ПМАК в буфере так, чтобы концентрация фосфатных групп составила $[\text{P}] = 4 \times 10^{-5}$ моль/л, концентрация $[\text{ЭБ}] = 1 \times 10^{-5}$ моль/л, концентрация карбоксильных групп 4×10^{-5} моль/л, концентрация хлорида натрия 0.05 М.
- 7) Проводят измерение интенсивности флуоресценции (I_0) раствора из п.6.

- 8) Повторяют шаги в пп. 3-4 до достижения соотношения концентраций гистидиновых оснований к фосфатным группам 3.0
- 9) Готовят 2 мл раствора смеси ДНК/ЭБ и ПСС в буфере так, чтобы концентрация фосфатных групп составила $[P]=4 \times 10^{-5}$ моль/л, концентрация $[ЭБ]=1 \times 10^{-5}$ моль/л, концентрация стиролсульфонатных групп 4×10^{-5} моль/л, концентрация хлорида натрия 0.05 М.
- 10) Проводят измерение интенсивности флуоресценции (I) раствора из п.9.
- 11) Повторяют шаги в пп. 3-4 до достижения соотношения концентраций гистидиновых оснований к фосфатным группам 3.0.
- 12) На одном графике строят зависимости относительной интенсивности флуоресценции (I/I_0) от соотношения гистидиновых к фосфатным группам, принимая за значение I_0 интенсивности флуоресценции растворов кислот без поликатиона.

Задание

Оцените степень связывания полигистидина с ДНК в присутствии синтетических полианионов.

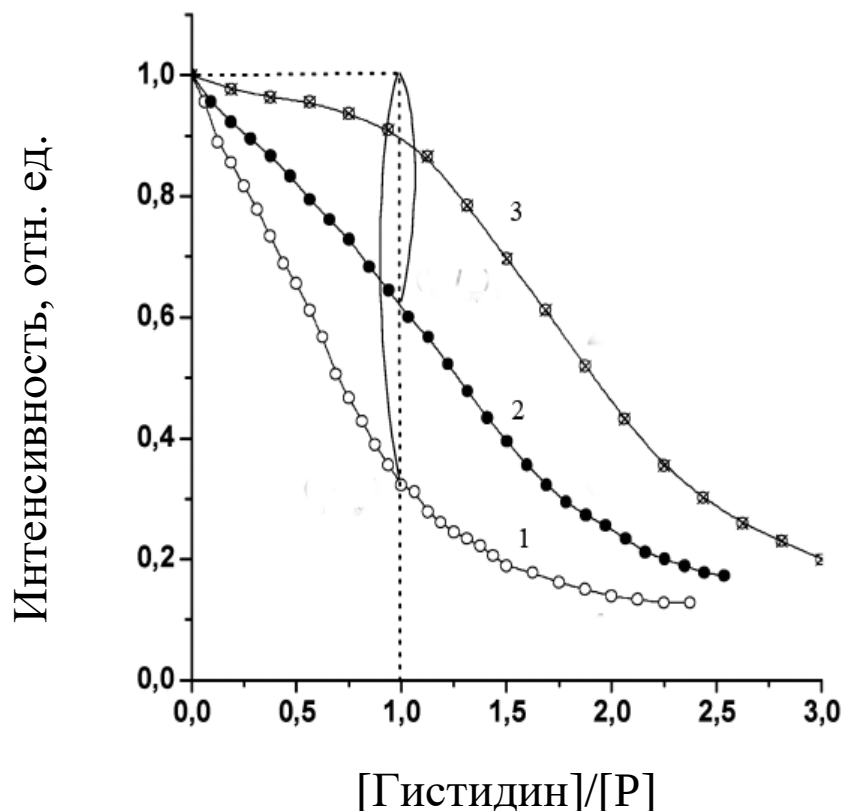


Рис. 19. Относительная интенсивность флуоресценции растворов поликомплексов ДНК-ЭБ с полигистидином от соотношения концентраций $[Гистидин]/[P]$. Раствор ДНК-ЭБ (1), смесь ДНК-ЭБ с ПМАК (2), смесь ДНК-ЭБ с ПСС (3).

Для оценки степени связывания полигистидина с ДНК строят зависимость относительной интенсивности флуоресценции растворов поликомплексов ДНК-ЭБ с полигистидином от соотношения концентраций $[Гистидин]/[P]$ (Рис.19). По графику при соотношении $[Гистидин]/[P] = 1$ определяют значение относительной интенсивности для смеси поликислот и для раствора ДНК-ЭБ. Из соотношения $(1-I^{CM})/(1-I^{ДНК})$, где I^{CM} - значение относительной флуоресценции для смеси поликислот в комплексе с полигистидином, $I^{ДНК}$ - интенсивность для ДНК в комплексе с полигистидином, рассчитывают долю молекул полигистидина, связанную с поликислотой.

Вопросы к задаче:

- 1) Какова доля полигистидина, связавшаяся с ДНК в смеси с ПМАК?
- 2) Какова доля полигистидина, связавшаяся с ДНК в смеси с ПСС? Объясните наблюдаемые различия.
- 3) Приведите расчёты для приготовления рабочих растворов, какие объёмы исходных компонентов необходимо взять для приготовления смесей в точке $[Гистидин]/[P]=1$?
- 4) К чему может привести уменьшение доли ЭБ в системе в 2 раза?

Задача 2. Влияние степени полимеризации полиионов на устойчивость интерполиэлектrolитных комплексов в водно-солевых средах.

Интерполиэлектrolитные комплексы (ИПЭК), представляющие собой продукты реакций между противоположно заряженными макромолекулами, рассматриваются в настоящий момент не только как объекты фундаментальных исследований, но и как материалы, используемые в биомедицине, в качестве основы для создания связующих для дисперсных систем, для очистки сточных вод и т.д. Технология получения ИПЭК в основном базируется на получении и переработке водно-солевых растворов комплексов. Фундамент для таких технологий заложен при изучении фазовых равновесий в системах ИПЭК-низкомолекулярная соль-вода. Схема реакции образования ИПЭК представлена на Рис.20.

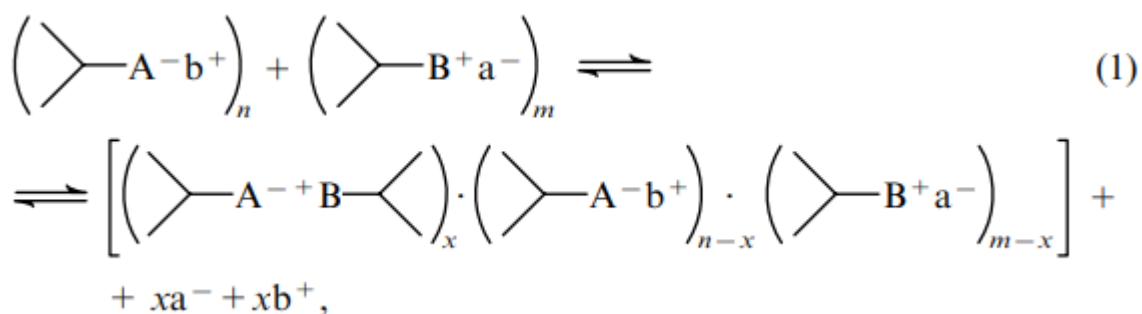


Рис. 20. Реакция образования ИПЭК.

Смещения равновесия в таких реакциях можно достичь изменением концентрации низкомолекулярной соли в системе. Одним из наиболее удобных способов регистрации обратимости взаимодействия компонентов ИПЭК в водно-солевых средах является метод тушения флуоресценции, основанный на изменении интенсивности флуоресценции расположенной на одном из полиэлектролитов метки при контакте с функциональными группами молекулы-тушителя флуоресценции. Для исследования процессов, протекающих в системе, содержащей поликатион, полианион и низкомолекулярную соль, традиционно используют меченные пиреном (см. Рис.11) производные полиакриловой или полиметакриловой кислоты, а в качестве тушителя используют кватернизованные производные поли-4-винилпиридина (Рис.21).

Анализ влияния степени полимеризации компонентов ИПЭК на его диссоциацию в водно-солевых средах показал, что степень полимеризации более короткого полиэлектролита в паре поликатион/полианион в ИПЭК является фактором, определяющим концентрацию соли, необходимую для смещения равновесия реакции (1) в сторону исходных компонентов.

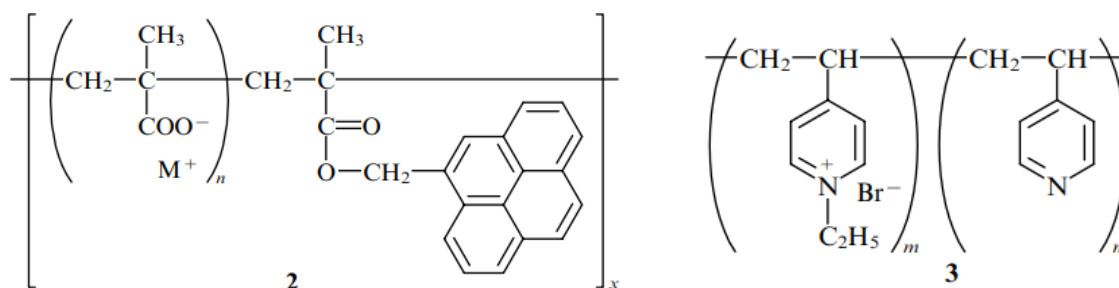


Рис. 21. Структурные формулы ПМАК* и ПВПБ.

Степень полимеризации компонентов ИПЭК может оказать принципиальное влияние не только на диссоциацию комплекса в условиях заданной ионной силы, но и на обменные реакции с биологическими макромолекулами, например, в процедурах биосепарации. Поэтому изучение влияния степени полимеризации более короткого полимера в паре поликатион – полианион на поведение комплекса в водно-солевых средах является одной из ключевых задач при изучении поведения ИПЭК.

Реагенты:

Буфер Трис концентрации 10^{-2} М рН 9.

Водный раствор хлорида натрия концентрации 4 М.

Водные растворы поли-*N*-этил-4-винилпиридиний бромида (ПВПБ) со степенями полимеризации 20, 40, 100 и 300 концентрации 10^{-3} осново-моль/л.

Водный раствор флуоресцентно меченной полиметакриловой кислоты (ПМАК*) степени полимеризации 3900, концентрация 10^{-3} осново-моль/л.

Оборудование:

Флуоресцентный спектрофлуориметр.

Кварцевая кювета с оптическим путём 1 см.

Измерения проводят при длине волны возбуждения $\lambda = 343$ нм и длине волны испускания $\lambda = 395$ нм при постоянном перемешивании в термостатируемой ячейке ($T = 25$ °С).

Порядок работы:

- 1) Готовят 2 мл раствора ПМАК* в буфере так, чтобы концентрация карбоксилатных групп составила $[\text{COO}^-] = 4 \times 10^{-7}$ моль/л, концентрация хлорида натрия 0.005 М.

- 2) Включают спектрофлуориметр и проводят измерение интенсивности флуоресценции раствора.
 - 3) Полученный раствор ПМАК* последовательно титруют раствором ПВПБ степени полимеризации 20 таким образом, чтобы каждое добавление порции титранта увеличивало состав комплекса $\phi = [N^+]/[COO^-]$ не более, чем на 0.1. После каждого добавления титранта смесь перемешивают не менее 1 мин, а затем проводят измерение интенсивности флуоресценции раствора. Титрование проводят до выхода значения интенсивности флуоресценции на плато.
 - 4) К полученному комплексу добавляют раствор NaCl таким образом, чтобы каждое добавление порции титранта увеличивало концентрацию соли в системе не более чем на 0.01 моль/л. После каждого добавления титранта смесь перемешивают не менее 1 мин, а затем проводят измерение интенсивности флуоресценции раствора. Титрование проводят до выхода значения интенсивности флуоресценции на плато или начала снижения интенсивности флуоресценции в системе.
 - 5) Для учёта разбавления системы снова готовят 2 мл раствора ПМАК* в буфере так, чтобы концентрация карбоксилатных групп составила $[COO^-] = 4 \times 10^{-5}$ моль/л, концентрация хлорида натрия 0.005 М.
 - 6) Полученный раствор ПМАК* титруют раствором хлорида натрия с тем же шагом, что и в п.4. Титрование ведут до достижения объёма добавленного титранта, равного суммарному объёму растворов ПВПБ и NaCl добавленных в ходе выполнения пп.3-4.
 - 7) Повторяют шаги в п. 1-6 для ПВПБ степени полимеризации 40.
 - 8) Повторяют шаги в п. 1-6 для ПВПБ степени полимеризации 100.
 - 9) Повторяют шаги в п. 1-6 для ПВПБ степени полимеризации 300.
 - 10) На одном графике строят зависимости относительной интенсивности флуоресценции (I/I_0) от соотношения $\phi = [N^+]/[COO^-]$, при этом за значение I_0 принимают интенсивности флуоресценции раствора ПМАК* без поликатиона.
 - 11) На одном графике строят зависимости относительной интенсивности флуоресценции (I/I_0) от концентрации добавленного к ИПЭК раствора хлорида натрия, при этом за значение I_0 принимают интенсивности флуоресценции раствора ПМАК* без поликатиона.
- В случае необходимости учитывают влияние разбавления на интенсивность флуоресценции метки.

Задание

Оцените влияние степени полимеризации ПВПБ на величину концентрации NaCl, необходимой для полной диссоциации ИПЭК на исходные компоненты.

Для оценки концентрации NaCl, необходимой для диссоциации ИПЭК на графике зависимости относительной интенсивности флуоресценции ИПЭК от концентрации NaCl находят точку C_{NaCl}^* , соответствующую выходу кривой на плато. На отдельном графике строят зависимость полученных значений C_{NaCl}^* от степени полимеризации ПВПБ.

Вопросы к задаче:

- 1) Каково влияние степени полимеризации ПВПБ на концентрацию NaCl, необходимую для полной диссоциации ИПЭК в водно-солевом растворе?
- 2) Как на основе полученных экспериментальных данных оценить устойчивость к диссоциации в водно-солевом растворе ИПЭК, сформированном при участии ПВПБ со степенью полимеризации 60?
- 3) Объясните наблюдаемую зависимость полученных значений C_{NaCl}^* от степени полимеризации ПВПБ.
- 4) Предложите метод фракционирования полиэлектролитов на основании подхода, использованного при выполнении задачи.

Задача 3. Определение критической концентрации мицеллообразования блок-сополимеров этиленоксида и пропиленоксида в водных растворах.

Плюроники (Pluronic®) представляют собой неионогенные триблок-сополимеры с центральным гидрофобным блоком полипропиленоксида, модифицированным с обеих сторон гидрофильными блоками полиэтиленоксида (Рис.22). Такая амфифильная структура придаёт плюроникам свойства поверхностно-активных веществ. Плюроники нашли широкое применение в косметической химии, а также в биомедицине.

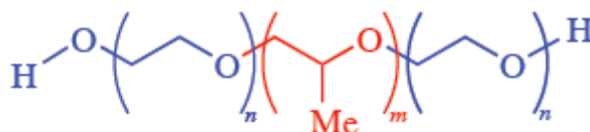


Рис. 22. Структура триблок-сополимера этиленоксида и пропиленоксида.

В водном растворе индивидуальные цепи Плюроников при определённых концентрациях и температурах способны ассоциировать с образованием мультимолекулярных агрегатов (мицелл). Критическая концентрация мицеллообразования (ККМ) определяет начало образования таких мицелл и соответствует максимально достижимой концентрации единичных макромолекул в растворе при данной температуре. ККМ является важным параметром с точки зрения различий в действии единичных цепей и мицелл Плюроников на клетки. Неассоциированные макромолекулы Плюроников с гидрофильно-липофильным балансом <20 сенсibiliзируют клетки с множественной лекарственной устойчивостью и делают устойчивые к химиотерапии раковые клетки чувствительными к химиотерапии, в то время как мицеллы Плюроников влияют на жизнеспособность клеток. Таким образом, информация о величине ККМ и, как следствие, о поведении Плюроников в растворе, является критически важной для практического применения данных полимеров.

Один из методов определения ККМ амфифильных макромолекул основан на использовании различий в интенсивности флуоресценции зонда в водном (гидрофильном) окружении и в гидрофобной области полимерных мицелл. Примером такого зонда может служить 1,6-дифенил-1,3,5-гексатриен (ДФГТ).

Реагенты:

Фосфатно-солевой буферный раствор (ФСБ).

Раствор ДФГТ в ФСБ концентрации 0.003 мг/мл.

Серия растворов Плюроники (L61, L64, L81, F87, P123) в широком диапазоне концентраций от 0.1 мкМ до 150 мкМ.

Оборудование:

Флуоресцентный спектрофлуориметр.

Кварцевая кювета с оптическим путём 1 см.

Измерения проводят при длине волны возбуждения $\lambda = 366$ нм и длине волны испускания $\lambda = 433$ нм при постоянном перемешивании в термостатируемой ячейке ($T = 37$ °C).

Порядок работы:

- 1) Готовят 2 мл раствора ДФГТ в буфере так, чтобы его концентрация составила 5 мкМ.
- 2) К серии растворов Плюроника L61 добавляют рассчитанное количество ДФГТ так, чтобы его концентрация составила 5 мкМ.
- 3) Полученные растворы термостатируют в течение 1 часа.
- 4) Включают спектрофлуориметр и проводят измерение интенсивности флуоресценции серии растворов полимера, содержащих метку ДФГТ и контрольного раствора ДФГТ без полимера.
- 5) На графике строят зависимость интенсивности флуоресценции метки в абсолютных единицах от концентрации Плюроника в растворе.
- 6) Повторяют шаги, описанные в п. 2-5 для Плюроника L64.
- 7) Повторяют шаги, описанные в п. 2-5 для Плюроника L81.
- 8) Повторяют шаги, описанные в п. 2-5 для Плюроника L87.
- 9) Анализируют полученные графики. Если на графиках отсутствует начальный участок, параллельный оси абсцисс, то для данной серии Плюроника готовят растворы с меньшими концентрациями и повторяют измерения согласно пп.2-5.

Задание

Определите значения ККМ для Плюроники L61, L64, L81, F87, P123.

Для оценки значений ККМ на графике зависимости интенсивности флуоресценции ДФГТ от концентрации Плюроника необходимо определить возрастающий линейный участок, соответствующий увеличению гидрофобности окружения ДФГТ. Пересечение прямой, аппроксимирующей этот участок с начальным линейным участком, параллельным оси абсцисс и отражающим гидрофильное окружение метки в отсутствие мицелл Плюроники, позволяет определить концентрацию, при которой начинается ассоциация макромолекул.

Вопросы к задаче:

- 1) Какова взаимосвязь между полученными значения ККМ и структурами исследуемых Плуриоников?
- 2) Какие методы определения ККМ вам известны? Все ли они применимы для определения ККМ Плуриоников и почему?
- 3) Как изменятся результаты определения ККМ при изменении температуры эксперимента?

5. Литература

1. Паркер С. Фото-люминесценция растворов, Мир, 1972, 512 с.
2. Лакович Дж. Основы флуоресцентной спектроскопии, Мир, 1986, 496 с.
3. Lebedeva N.S., Yurina E.S., Gubarev Y.A. Spectral and thermochemical research of the DNA polyplex with chitosan formation process and the influence of anionic and cationic compounds. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2019**, V. 215, p. 153-157.
4. Shorter S.A., Pettit M.W., Dyer P.D.R., Coakley Youngs E., Gorringer-Patrick M.A.M., El-Daher S., Richardson S. Green fluorescent protein (GFP): is seeing believing and is that enough? *J. Drug Target.* **2017**, V. 25, p. 809-817.
5. Ghosh A., Enderlein J. Advanced fluorescence correlation spectroscopy for studying biomolecular conformation. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2021**, V. 70, p. 123-131.
6. Ghosh A., Karedla N., Thiele J.C., Gregor I., Enderlein J. Fluorescence lifetime correlation spectroscopy: Basics and applications. *Methods.* **2018**, V. 140-141, p. 32-39.
7. Luo Y., Granzhan A., Verga D., Mergny J.L. FRET-MC: A fluorescence melting competition assay for studying G4 structures in vitro. *Biopolymers.* **2021**, V. 112, e23415.
8. Kabanov V.A. Polyelectrolyte complexes in solution and in bulk. *Russ. Chem. Rev.* **2005**, V. 74, p. 3-20.
9. Пергушов Д.В., Изумрудов В.А., Зезин А.Б., Кабанов В.А. Влияние степени полимеризации полиионов на устойчивость интерполиэлектrolитных комплексов в водно-солевых средах. *Высокомолек. Соед.* **1995**, V. 10, p. 1739-1746.
10. Iakimov N. P., E. Fomin O., Melik-Nubarov N. S., Grozdova I. D. Determination of critical micelle concentrations of Pluronic. *Mendeleev. Commun.* **2025**, V. 35, p. 437-439