

Изменение люминесцентных свойств пирена в растворе поверхностно-активного вещества в присутствии сывроточного альбумина

С. Р. Сокольникова,^{*} Д. А. Татаринов,[†] Н. А. Мыслицкая[‡]
*Калининградский государственный технический университет,
факультет фундаментальной подготовки, кафедра физики
Россия, 236022, Калининград, Советский проспект, д. 1
(Статья поступила 21.06.2019; Подписана в печать 18.07.2019)*

В работе изучены люминесцентные свойства представителя полициклических ароматических углеводородов — пирена в мицеллярном растворе, образованного молекулами анионного поверхностно-активного вещества — натрия диоктилсульфосукцината. Зафиксировано увеличение интенсивности флуоресценции пирена, объясняемое солюбилизацией молекул полициклических ароматических углеводородов в мицеллярных структурах. Был изучен диполь-дипольный перенос энергии по Ферстеру (FRET), где акцептором является пирен, а донором бычий сывроточный альбумин. Рассчитан средний размер мицелл поверхностно-активного вещества и агрегационное число при концентрации мицеллярного раствора 10^{-3} М.

PACS: 33.50.Dq

УДК: 535.3

Ключевые слова: люминесцентный анализ, пирен, полициклические ароматические углеводороды, поверхностно-активные вещества, альбумин.

ВВЕДЕНИЕ

Пирен — один из представителей полициклических ароматических углеводородов (ПАУ). ПАУ являются сильными экотоксикантами, образующимися в результате горения органических веществ. При попадании в организм они встраиваются в структуру молекул ДНК, вызывая нарушения и приводя к возникновению мутаций, способствующих развитию онкологических заболеваний [1].

Канцерогенная активность ПАУ в большинстве случаев обусловлена бенз(а)пиреном (БП). Поэтому об уровне загрязнения объектов окружающей среды и степени опасности для человека можно судить по присутствию БП. В настоящей работе в качестве объекта исследования был выбран пирен, так как он обладает схожими люминесцентными свойствами с БП.

В соответствии российским законодательством предельно допустимые среднесуточные концентрации БП в атмосферном воздухе 0,001 мг/л. В почве предельно допустимая концентрация 0,02 мг/кг. В соответствии с ТР ТС 021/2011 для большинства продуктов предельно допустимая концентрация БП — не более 1 мкг/кг, для копченой рыбы — не более 5 мкг/кг [2, 3].

Определение содержания ПАУ относится к числу сложных аналитических задач ввиду низких концентраций этих веществ в объектах окружающей среды, для ее решения применяются современные методы анализа [4].

Целью настоящей работы было изучение люминесцентных свойств пирена при флуоресцентном мето-

де анализа с использованием раствора поверхностно-активного вещества и исследование влияния диполь-дипольного переноса энергии на люминесцентные свойства пары донор-акцептор.

1. ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

На сегодняшний день для определения ПАУ в большинстве случаев применяется метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Лабораторная методика включает в себя три этапа: извлечение и концентрирование анализируемого вещества, разделение и детектирование [5]. Данный метод отличается дороговизной, сложностью и требует больших затрат времени на проведение исследований. Последние научные разработки позволяют создавать более чувствительные, надежные и экспрессные методики контроля ПАУ [6]. Одним из развивающихся способов обнаружения ПАУ является люминесцентный метод анализа. В настоящее время для повышения эффективности метода часто используются растворы ПАВ. С их помощью удается повысить интенсивность люминесценции анализируемых веществ благодаря концентрированию молекул в мицеллах ПАВ [7]. Отличительной особенностью ПАВ является наличие химической структуры молекул с двумя разными функциональными группами: длинным углеводородным гидрофобным радикалом R и гидрофильную полярную группу (ПГ). Мицеллы образуются в результате самосборки этих молекул. В водном растворе гидрофобные молекулы образуют ядро, а гидрофильные — гидрофильной группой, а оболочка — гидрофобными радикалами, в этом случае мицелла называется обратной (рис. 1,б) [8, 9].

В последнее время проводится много исследований по применению эффектов переноса энергии для увеличения интенсивности люминесценции. Одним из при-

*E-mail: sokolsofy@mail.ru

†E-mail: danni_039@mail.ru

‡E-mail: myslitskaya@gmail.com

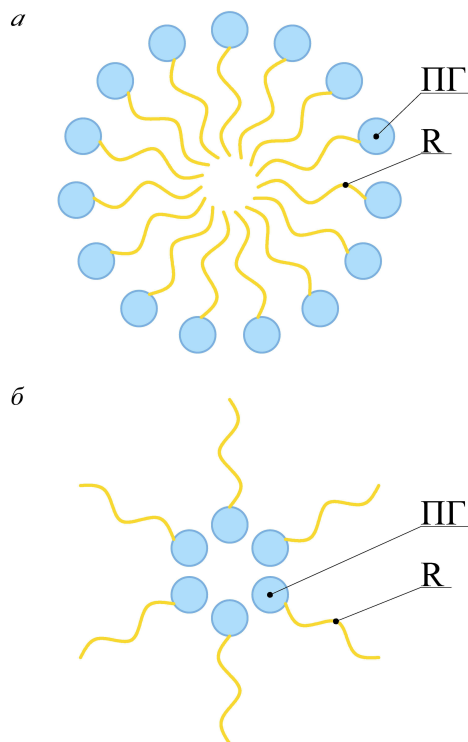


Рис. 1: Схематическое изображение мицеллы ПАВ. а — в воде — прямая мицелла и б — в неполярной среде — обратная мицелла

оритетных направлений исследований подобного типа является резонансный безызлучательный перенос энергии излучения по механизму Фёрстера (FRET). Он, в силу своего безызлучательного характера и протекания на малых расстояниях (менее 100 \AA), помимо увеличения интенсивности люминесценции позволяет производить расчеты параметров взаимного расположения донора и акцептора, среди которых расстояние между ними и степень комплексообразования [10].

Эффективность переноса энергии излучения определяется по формуле:

$$E = \frac{1}{1 + \left(\frac{R}{R_0}\right)^6}, \quad (1)$$

где R — расстояние между донором и акцептором, R_0 — критический радиус (расстояние между донором и акцептором, при котором вероятность переноса равна вероятности спонтанной дезактивации донора), определяемый формулой:

$$R_0 = \left[(2.8 \times 10^{17} \cdot k^2 \cdot Q_D \cdot n^{-4} \cdot J(\lambda)) \right]^{\frac{1}{6}}, \quad (2)$$

здесь Q_D — квантовый выход люминесценции донора в отсутствие тушителя, k^2 — ориентационный фактор, n — показатель преломления среды, $J(\lambda)$ — интеграл

перекрытия, рассчитываемый по формуле:

$$J(\lambda) = \int F_D(\lambda) \cdot \varepsilon_A(\lambda) \cdot \lambda^4 d\lambda, \quad (3)$$

где F_D — квантовая спектральная плотность излучения люминесценции донора, нормированная на единицу, $\varepsilon_A(\lambda)$ — молярный коэффициент экстинкции акцептора, λ — длина волны возбуждения. Эффективность диполь-дипольного переноса можно также рассчитать по формуле:

$$E = \left[\frac{G(\lambda_1)}{G(\lambda_1)} - \frac{\varepsilon_A(\lambda_2)}{\varepsilon_A(\lambda_1)} \right] \cdot \frac{\varepsilon_A(\lambda_1)}{\varepsilon_A(\lambda_2)}, \quad (4)$$

где G — интенсивность возбуждения акцептора, ε — коэффициент молярной экстинкции для донора и акцептора. Данные величины берутся для двух длин волн λ_1 — длина волны, на которой донор поглощает плохо, по сравнению с акцептором, и λ_2 — максимум поглощения донора [11].

По значению эффективности переноса энергии из формулы (1) также можно найти среднее расстояние между донором и акцептором:

$$R = R_0 \left(\frac{1}{E} - 1 \right)^{\frac{1}{6}}. \quad (5)$$

2. МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

В настоящей работе для проведения люминесцентного анализа использовалась модульная система HORIBA Fluorolog-3 TCSPC. Схема установки представлена на рис. 2. Спектры поглощения образцов были получены на спектрофотометре UV Probe Shimadzu. Для экстракции ПАУ применялся водный раствор анионного ПАВ (натрий диоктилсульфосукцинат) в концентрации 0.1 моль/л. Растворы исследуемых образцов были приготовлены на дистиллированной воде. В качестве растворителя в контрольном образце пирена использовался толуол (ГОСТ 14710-78).

В первой части эксперимента были измерены спектры люминесценции образцов пирена, растворенного в различном количестве в толуоле и в водном р-ре ПАВ. Люминесцентный анализ проводился при следующих условиях: исследуемый образец находился в кварцевой кювете толщиной 10 мм. Ширина дифракционной щели возбуждения и эмиссии 2 нм, скорость регистрации спектров 300 нм/мин. Угол регистрации сигнала составлял 90° по отношению к возбуждающему световому потоку, время задержки 0.02 мс, температура 25°C .

Во второй части эксперимента определялся пирен в бычьем сывороточном альбумине (BSA.0025ф, содержание в-ва $>99\%$, Германия). Метод основан на тушении флуоресценции белковых макромолекул при

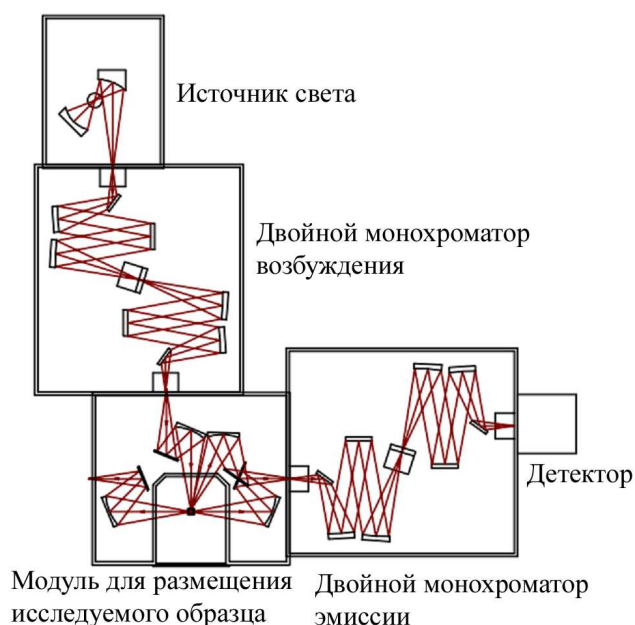


Рис. 2: Схема установки HORIBA Fluorolog-3 TCSPC

связывании с ПАУ, а также на регистрации собственной флуоресценции молекул пирена. В работе использовались растворы альбумина с концентрацией $C = 10^{-4}$ моль/л. Измерения проводились в среде, близкой к нейтральной (pH 7.4). Значение pH контролировалось на pH-метре (F20-STANDARD, METTLER TOLEDO, США).

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Результаты проведенной спектроскопии представлены на рис. 3. Установлено, что интенсивность флуоресценции пирена в растворе ПАВ значительно возрастает по сравнению с интенсивностью флуоресценции пирена в толуоле.

Таким образом, интенсивность флуоресценции пирена будет зависеть от природы растворителя, что обуславливает эффективность использования ПАВ из-за проникновения молекул ПАУ в мицеллярные агрегаты [8].

С целью изучения процессов, происходящих в паре мицелла-пирен, было использовано явление диполь-дипольного переноса энергии электронного возбуждения по Ферстеру (FRET) между донором энергии сывороточным белком — альбумином и представителем ПАУ — пиреном.

Как видно из рис. 4 в результате переноса энергии наблюдается снижение интенсивности флуоресценции альбумина на фоне увеличения интенсивности флуоресценции пирена. По формуле (3) был вычислен интеграл перекрытия J , характеризующий перекрытие спектров флуоресценции донора и молярной экстинк-

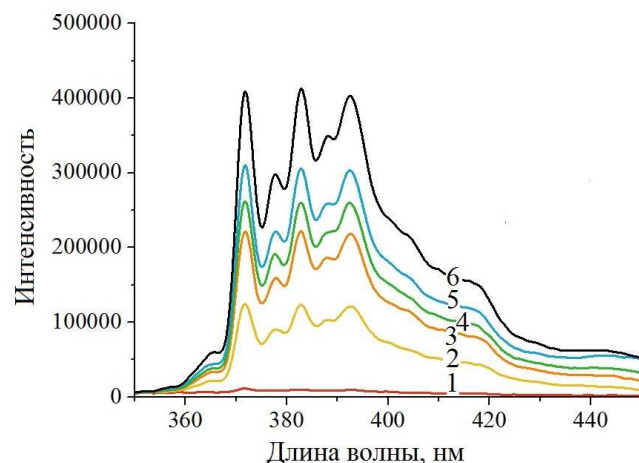
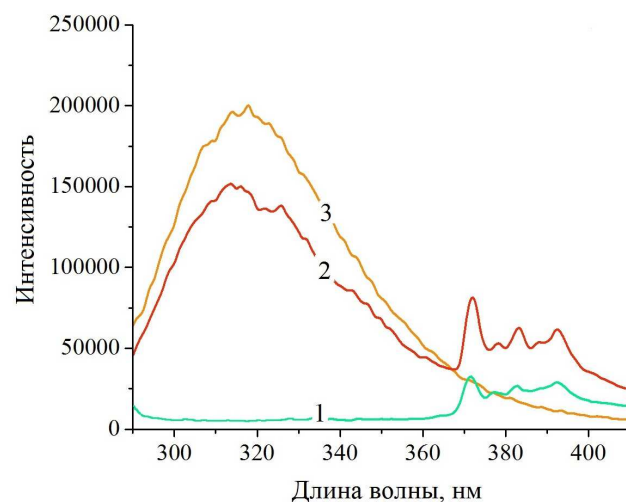


Рис. 3: Спектры флуоресценции пирена при различных концентрациях: в толуоле 1 — 100 мкмоль/л; в растворе ПАВ: 2 — 20 мкмоль/л; 3 — 40 мкмоль/л; 4 — 60 мкмоль/л; 5 — 80 мкмоль/л; 6 — 100 мкмоль/л

ции акцептора (пирена): $J = 3.43 \times 10^{-14} \text{ см}^3/\text{М}$.

Рис. 4: Спектры флуоресценции образцов в растворе ПАВ (концентрация 10^{-3} М): 1 — пирена (концентрация 10^{-5} М); 2 — пирена (концентрация 10^{-5} М) с альбумином (10^{-4} М); 3 — альбумина (10^{-4} М). Спектры получены при возбуждении светом с длиной волны 280 нм

Значение ориентационного фактора было принято равным $k^2 = \frac{2}{3}$, соответствующему хаотическому распределению ориентации дипольных моментов донора и акцептора, квантовый выход донора Q_D был измерен на модульной системе HORIBA Fluorolog-3 TCSPC, его значение составило 7%, показатель преломления среды, в которой происходит перенос энергии — ПАВ был определен при помощи эллипсометра $n = 1.412$.

В результате вычислений (2) для критического радиуса было получено значение $R_0 = 27 \text{ \AA}$. Согласно фор-

муле (4) эффективность переноса энергии $E = 0.25$, среднее расстояние между донором и акцептором составило $R = 32 \text{ \AA}$.

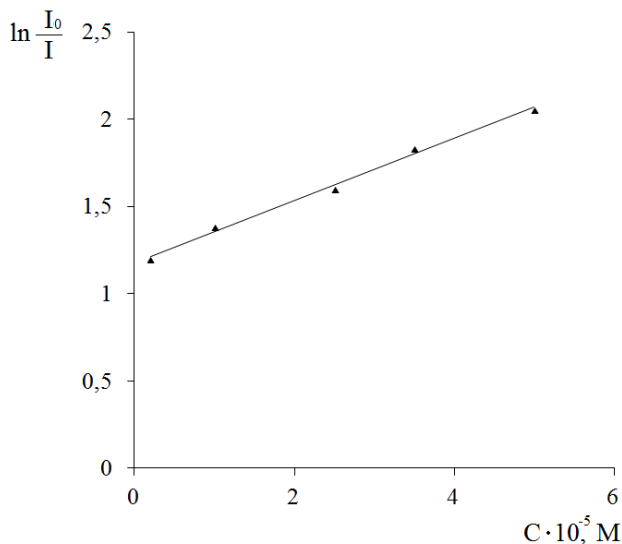


Рис. 5: Зависимость логарифма величины тушения замедленной флуоресценции донора энергии (альбумин) от концентрации акцептора (пирен)

Вероятность попадания молекулы пирена в мицеллу ПАВ было описано распределением Пуассона:

$$P_{empty} = \left(1 - \frac{1}{N}\right)^C = \left[\left(1 - \frac{1}{N}\right)^N\right]^{\frac{C}{N}}$$

Здесь N — концентрация мицелл, C — объемная концентрация тушителя (пирена). При $N > \infty$, $C > \infty$

$$P_{empty} = \lim_{N \rightarrow \infty} \left[\left(1 - \frac{1}{N}\right)^N\right]^{\frac{C}{N}} = e^{-\frac{C}{N}}$$

Так как интенсивность флуоресценции пропорциональна среднему времени жизни, то:

$$\frac{I}{I_0} = \frac{\tau}{\tau_0} = P_{empty} = e^{-\frac{C}{N}} \quad (6)$$

Если пренебречь тем, что свободные мицеллы ПАВ отсутствуют, то концентрация мицелл N будет равна отношению S — объемной концентрации ПАВ к N_{agr} — числу агрегации:

$$N = \frac{S}{N_{agr}}$$

Тогда формула (6) примет вид:

$$\ln\left(\frac{I_0}{I}\right) = \frac{N_{agr}}{S} \cdot C \quad (7)$$

Здесь I_0 — интенсивность люминесценции альбумина в растворе ПАВ, I — интенсивность люминесценции альбумина с пиреном в растворе ПАВ.

По экспериментальным данным была построена зависимость в координатах Штерна-Фольмера, представленная на рис. 5. При построении графика в осях $\ln\left(\frac{I_0}{I}\right)$ и концентрации C , угловой коэффициент будет равен обратной концентрации мицелл. Исходя из данной зависимости с учетом формулы (7) через угловой коэффициент было рассчитано агрегационное число $N_{agr} = 25$.

Организованная структура пары мицелла-пирен облегчает перенос энергии возбуждения от донора к акцептору. Таким образом, эффективность переноса энергии возрастает при мицеллярном концентрировании ПАВ, а, значит, повышается общая эффективность сенсibilизированной флуоресценции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Экспериментально было изучено влияние прямых мицелл на интенсивность люминесценции ПАУ. Установлено, что концентрирование пирена в прямых мицеллах ПАВ позволяет добиться значительного увеличения интенсивности флуоресценции. Также был исследован диполь-дипольный перенос энергии по Ферстеру (FRET) в паре мицелла-пирен с бычьим сычужным альбумином. В результате обсуждения результатов проведенных экспериментов были рассчитаны: средний радиус мицеллы ПАВ $R = 32 \text{ \AA}$ и агрегационное число $N_{agr} = 25$.

[1] Страшко А. В. Разработка полисахаридных матриц и условий твердофазного люминесцентного определения полициклических ароматических углеводородов для экологического мониторинга водных сред. Дис. канд. техн. наук : 03.02.08. Саратов: Саратов. гос. ун-т, 2015.
[2] ГН 2.1.6.3492-17. Постановление №165 об утверждении гигиенических нормативов ГН 2.1.6.3492-17. Предельно допустимые концентрации загрязняющих веществ в атмосферном воздухе городских и сельских поселений. Введ. 2017-12-22. Изм. от 31.05.2018 г.

[3] ТР ТС 021/2011. Технический регламент Таможенного Союза. О безопасности пищевой продукции. Введ. 2011-12-09. с. 127–152.
[4] Lerner D. A., Martin M. A. // J. Analysis. 2000. **28**, N 8. P. 649.
[5] Басова Е. М., Иванов В. М. // Вестн. Моск. ун-та. Химия. 2011. **52**, №.3. С. 163.
[6] Wang H., Campiglia A. D. // J. Talanta. 2010. **83**. P. 233.
[7] Clapp A. R., Medintz I. L., Mauro J. M., Fisher B. R., Bawendi M. G., Mattoussi H. // J. Am. Chem. Soc. 2004.

126. P. 301.
- [8] Sachko A. V., Zakordonskii V. P., Voloshinovskii A. S. // Russian Journal of Physical Chemistry. 2013. **87**, № 3. P. 407.
- [9] Селиванова Н.М., Кузочкова М.А., Галяметдинов Ю.Г. // Вестн. Моск. ун-та. Химия. 2011. **52**, №.3. С. 163.
- [10] David W. Piston, Gert-Jan Kremers // J. Trends in Biochemical Sciences. **32**, N 9. P. 407.
- [11] Myslitskaya N. A., Samusev I. G., Bryukhanov V. V. // Russian Physics Journal. 2014. **57**, № 7. С. 920.

Change of luminescent properties of pyrene in surface-active substance solution using an albumin

S. R. Sokolnikova^a, D. A. Tatarinov^b, N. A. Myslitskaya^c

Kaliningrad state technical university, Fundamental Training Faculty, Department of Physics. Kaliningrad 236022, Russia
E-mail: ^asokolsofy@mail.ru, ^bdanni_039@mail.ru, ^cmyslitskaya@gmail.com

The aim of this work is to research luminescent properties of the representative of polycyclic aromatic hydrocarbons — pyrene in micellar solution, formed by molecules of anionic surfactant — dioctylsulfosuccinate sodium. The increase of luminescent emission of pyrene explained with solubilization of molecules of polycyclic aromatic hydrocarbons in micelle structures was recorded. The dipole - dipole transfer of energy on Ferstera (FRET) where an acceptor is pyrene, and the donor is a bull albumin is studied. The average size of micelles of a surface-active substance and aggregation number at concentration of micellar solution of 10^{-3} M is calculated

PACS: 33.50.Dq

Keywords: luminescent analysis, pyrene, polycyclic aromatic hydrocarbons, surface-active substances, albumin.

Received 21 June 2019.

Сведения об авторах

1. Сокольников Софья Руслановна — студентка; тел.: (4012)69-01-50, e-mail: sokolsofy@mail.ru.
 2. Татаринов Данила Алексеевич — студент; тел.: (4012)69-01-50, e-mail: danni_039@mail.ru.
 3. Мыслицкая Наталья Александровна — канд. физ.-мат. наук, доцент; тел.: (4012)69-01-50, e-mail: myslitskaya@gmail.com.
-