

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ  
УНИВЕРСИТЕТ им. М.В. ЛОМОНОСОВА  
ФИЗИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

*На правах рукописи*

**Волкова Оксана Игоревна**

**ИССЛЕДОВАНИЕ СПЕКТРАЛЬНО-ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ  
ХАРАКТЕРИСТИК ФЛУОРОНОВЫХ КРАСИТЕЛЕЙ В АНИОННЫХ  
ОБРАТНЫХ МИЦЕЛЛАХ**

01.04.05 - оптика

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискателя ученой степени кандидата физико-  
математических наук

Научные руководители:

доктор физико-математических наук,

профессор А.М. Салецкий

кандидат физико-математических наук

А.А. Кулешова

Москва, 2022 г.

## Содержание

Введение.....	3
ГЛАВА 1.....	12
1.1 Флуороновые красители: применение, спектрально-люминесцентные характеристики.....	12
1.2 Применение и структура нанореакторов на основе обратных мицелл.....	12
1.3 Спектрально-люминесцентные характеристики молекул красителей, внедренных в обратные мицеллы.....	13
1.4 Ассоциация молекул красителей. Димеризация молекул флуороновых красителей.....	21
1.5 Спектрально-люминесцентные характеристики молекул красителей с белком, внедренных в обратные мицеллы.....	21
ГЛАВА 2. Объекты и методы исследования.....	26
ГЛАВА 3. Исследования взаимодействия комплекса водных обратных мицелл с флуоресцеиновыми красителями.....	33
3.1. Результаты исследования динамического рассеяния света мицеллярных структур.....	33
3.2. Фотофизические процессы в водно-мицеллярных растворах молекул флуоресцеина.....	39
3.3. Спектральные характеристики галогенпроизводных флуоресцеина в водно-мицеллярных растворах.....	52
3.4. Фотофизические процессы в молекулах галогенпроизводных флуоресцеина в анионных обратных мицеллах.....	66

3.5. Процессы димеризации молекул флуороновых красителей в мицеллярных структурах.....	74
Основные результаты и выводы.....	94
Список использованных источников.....	97

## **Введение**

Диссертационная работа посвящена исследованию фотофизических процессов связи комплекса бис(2-этилгексил)сульфосукцината натрия (в дальнейшем обозначаемая как АОТ) в гептане с флуоресцеиновыми красителями, принадлежащими одному семейству (флуоресцеин и его галогенпроизводные: эозин, эритрозин, и бенгальский розовый).

### **Актуальность работы и степень ее разработанности**

В последние годы спектрально-люминесцентные методы широко применяются для мониторинга состояния клеток, белков, живых тканей и других биологических объектов. Большую роль в таких исследованиях играет метод флуоресцентного зонда, в качестве которого используются молекулы красителей. Перспективными для этих целей являются флуороновые красители (флуоресцеин и его галогенпроизводные). Эти красители являются анионными при физиологических значениях pH (7,4) широко применяются в медицине, как в качестве контрастных веществ, так и в фотодинамической терапии [1]. Несмотря на то, что эти красители имеют спектральные характеристики, не совпадающие с областью терапевтического окна, они применяются для диагностики и лечения раковых опухолей на поверхности кожи, используются в клеточной биологии. Имея высокие квантовые выходы для генерации синглетного кислорода, эти красители становятся потенциальными фотосенсибилизаторами для нового направления фотодинамической терапии - антимикробной фотодинамической терапии [2]. Флуороновые красители уникальны в плане реализации последовательного замещения атомов водорода атомами галогенов. Такое галоген-замещение в структуре красителя флуоресцеина приводит к изменению электроотрицательности красителя за счет перераспределения частичных зарядов между атомами флуоресцентного маркера, что влияет на видоизменение электронной и пространственной структур, отображается на спектроскопических характеристиках, на гидрофильно-гидрофобных

свойствах полученного ряда флуорофоров [3]. Кроме того, красители гомологичной серии производных флуоресцеина широко используются в качестве наномаркеров для исследования биологических объектов, в частности белков, методами рамановской спектроскопии [4], флуоресцентной спектроскопии [5] и, как обладающие высоким квантовым выходом фосфоресценции, спектроскопии триплетного зонда [6].

Исследования взаимодействия белок-краситель позволяют определять структурные изменения в окружающей белок среде. Большинство исследований *in vitro* посвящено изучению белков в сильно разбавленных буферных растворах [7]. В то время как, биомолекулы функционируют в замкнутом пространстве биологической клетки (в замкнутом нанокружении). Поэтому для исследований, приближенных к реальным условиям, необходимо установление влияния пространственного ограничения на спектрально-люминесцентные характеристики как белков, так и красителей-зондов. Такое пространственное ограничение возможно осуществить в четырех различных модельных структурах: нанопорах, обратных мицеллах, органических растворителях и гидратных оболочках.

Наиболее перспективным является использования для этих целей наноструктуры с «мягкими» стенками.

К таким структурам относятся обратные мицеллы, которые представляют собой наноразмерные частицы, состоящие из молекул поверхностно-активного вещества, которые собираются вокруг водного ядра, суспендированного в неполярном растворителе. Размер мицелл можно менять, изменяя соотношение воды и поверхностно-активного вещества. Эти системы привлекли большое внимание, поскольку они охватывают впечатляюще широкий спектр практических применений, наибольший прогресс при этом был достигнут в синтезе наночастиц [8] и в разработке передовых средств доставки лекарств [9].

В связи с вышеизложенным становится актуальным исследование спектрально-флуоресцентных характеристик этих красителей в простых моделях клеток, которыми являются обратные мицеллы.

### **Цель и задачи диссертационной работы**

**Цель работы** заключается в исследовании спектрально-флуоресцентных характеристик молекул флуороновых красителей, процессов их комплексообразования в условиях пространственного ограничения в обратных мицеллах АОТ, влияние на эти характеристики галогензамещения в молекулах красителей и размеров мицелл

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**:

- измерение размеров обратных мицелл при внедрении в них молекул флуороновых красителей при различных степенях гидратации;
- исследование спектрально-люминесцентных характеристик и времен вращательной корреляции молекул флуоресцеина в обратных мицеллах различного размера;
- изучение влияния галогензамещения в молекулах флуоресцеина и структуры обратных мицелл на изменение их дипольных моментов возбужденных состояниях, среднего времени жизни и степени анизотропии флуоресценции;
- установление влияния тяжелого атома на время вращательной корреляции молекул красителей флуоресцинового ряда для различных размеров и структур обратной мицеллы;
- определение эффективности процессов димеризации молекул флуоресциновых красителей в мицеллах АОТ, установление структуры димеров, влияние на процессы димеризации внутреннего тяжелого атома, величины заряда ионов красителей, влияние на эти процессы размеров и структуры обратных мицелл;

- установление термодинамических параметров димеризации молекул флуороновых красителей в обратных мицеллах разного размера.

### **Объект и предмет исследования**

**Объектами исследования** являются флуороновые красители, выбор которых связан с последовательным замещением атомов водорода атомами галогенов (Br –у эозина, I –у эритрозина, I и Cl–у бенгальского розового), внедренные в обратные мицеллы АОТ при варьировании их степени гидратации и других параметров рассматриваемой системы.

**Предмет исследования.** Спектрально-люминесцентные характеристики флуороновых красителей в водно-мицеллярных растворах. Исследования влияния пространственного ограничения на эти характеристики и комплексообразование молекул красителей в основном состоянии и его параметры.

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**:

- определение агрегатного состояния и степени димеризации эозина К (Э), эритрозина (ЭР), флуоресцеина (Ф) и бенгальского розового (БР) в водных обратных мицеллах АОТ в гептане;
- определение радиусов обратных мицеллярных систем с красителями семейства флуоресцеина  $R_h$  при увеличении температуры от комнатной ( ) до ;
- определение углов  $\alpha$  между молекулами в димере красителей семейства флуоресцеина в водных обратных мицеллах АОТ в гептане;
- определение термодинамических параметров димеризации красителей семейства флуоресцеина в водных обратных мицеллах АОТ в гептане;

- определение параметров вращательной диффузии в водных обратных мицеллах АОТ в гептане;
- определение величины стоково сдвига  $\Delta \nu$  от  $R_h$  для всех рассматриваемых красителей;
- определение зависимости  $R_h$  от отношения дипольных моментов молекул в возбужденном и основном состояниях  $\frac{\mu_e}{\mu_g}$ .

### **Методология исследования**

В работе используется методология физической оптики и молекулярной спектроскопии. При выполнении диссертационной работы осуществляется комплексное использование современных оптических методов исследования сложных молекулярных и биологических систем. Это абсорбционная и флуоресцентная спектроскопия, кинетическая пикосекундная спектроскопия, корреляционная спектроскопия рассеянного света.

### **Научная новизна**

- Зафиксировано увеличение размеров обратных мицелл при внедрении в них молекул флуороновых красителей обусловлено изменением электростатического взаимодействия между молекулами анионных красителей и гидратированными группами ПАВ. Влияние внутреннего «тяжелого атома» на размер обратных мицелл связан с перераспределением зарядов между атомами в молекулах, приводящее к изменению этих взаимодействий.
- Обнаружено, что изменение спектрально–флуоресцентных характеристик молекул флуороновых красителей в обратных мицеллах при увеличении их гидродинамических радиусов обусловлено увеличением отношения дипольных моментов возбужденного и основного состояния связанное с реорганизацией мицелл.

- Показано, что «эффект внутреннего тяжелого атома» в галогенпроизводных флуоресцеина, внедренных в обратные мицеллы сказывается на величине времени вращательной корреляции молекул, которое уменьшается для всех исследованных красителей с ростом гидродинамических радиусов мицелл и связано с уменьшением микровязкости водного пула мицеллы.
- Установлено, что эффективности процессов димеризации молекул флуороновых красителей в мицеллах АОТ увеличиваются с ростом размера мицелл и регламентируются величиной массы внутреннего тяжелого атома и величиной заряда ионов красителей. Показано, что реакции димеризации в исследованных системах управляется энтальпией с энтальпийно-энтропийной компенсацией в димерных реакциях. Рост  $\Delta H$  при увеличении молекулярного веса галогена в молекуле красителя способствует димерной стабильности.

### **Практическая значимость**

Полученные данные в работе об эффективности связывания флуоресцентного красителя с водными обратными мицеллами позволяют получить простые модели клеток, которыми являются обратные мицеллы и оценить факторы, влияющие на него, и в соответствии с полученной информацией модифицировать данный процесс.

Результаты по исследованию процессов димеризации молекул красителя, влияния локализации молекул в обратных мицеллах на эффективность димеризации и структуру димеров наномаркеров семейства флуоресцеина (флуоресцеина, эритрозина, эозина и бенгальского розового) представляют интерес не только для применения флуоресцентных зондов, но и предоставляют данные о процессе комплексообразования молекул в ограниченных условиях, что значимо для фундаментальной фотохимии.

### Положения, выносимые на защиту

- Увеличение размеров обратных мицелл при внедрении в них молекул флуороновых красителей обусловлено изменением электростатического взаимодействия между молекулами анионных красителей и гидратированными группами ПАВ. Влияние внутреннего «тяжелого атома» на размер обратных мицелл связан с перераспределением зарядов между атомами в молекулах, приводящее к изменению этих взаимодействий.
- Изменение спектрально-флуоресцентных характеристик флуоресцеина при увеличении размеров обратных мицелл связано с ростом доли анионной формы красителя и сопровождается ростом дипольного момента молекул красителя в возбужденном состоянии, обусловленное структурной реорганизацией мицелл при увеличении их размеров.
- Экспериментально установленное уменьшение времени вращательной корреляции молекул флуоресцеина с ростом  $R_h$ , указывает на увеличение микровязкости окружения молекул красителя и объясняется локализацией молекул красителя в области поверхностной воды мицеллы.
- Изменение спектрально – флуоресцентных характеристик молекул флуороновых красителей в обратных мицеллах при увеличении их гидродинамических радиусов обусловлено увеличением отношения дипольных моментов возбужденного и основного состояния связанное с реорганизацией мицелл.
- С ростом размера обратных мицелл АОТ увеличивается подвижность молекул воды и уменьшается эффект геометрического ограничения молекул красителей, которые сопровождаются уменьшением среднего времени возбужденного состояния и степени анизотропии флуоресценции галогенпроизводных флуоресцеина.

- «Эффект внутреннего тяжелого атома» в галогенпроизводных флуоресцеина, внедренных в обратные мицеллы сказывается на величине времени вращательной корреляции молекул, которое уменьшается для всех исследованных красителей с ростом  $R_h$ , что указывает на уменьшение микровязкости ограниченной водной среды внутри мицеллы.
- Зависимость эффективности процессов димеризации молекул флуороновых красителей в мицеллах АОТ от их размеров обусловлена величиной массы внутреннего тяжелого атома (эффект «внутреннего тяжелого атома») и величиной заряда ионов красителей (увеличение доли анионных форм молекул красителей). При этом структура димеров красителей практически не отличается.
- Для всех исследованных водно-мицеллярных растворов красителей при всех значениях гидродинамического радиуса термодинамические параметры димеризации  $\Delta H < 0$  и  $\Delta S < 0$ , указывающее на то, что реакции димеризации в исследованных системах управляется энтальпией с энтальпийно-энтропийной компенсацией в димерных реакциях. При этом чем выше молекулярный вес галогена в молекуле красителя, тем эффективней увеличение  $\Delta H$  способствует димерной стабильности.

**Личный вклад автора.** Личный вклад автора заключается в проведение экспериментальных исследований, обработке, анализе, обобщении полученных результатов и их апробации.

#### **Апробация работы**

Результаты работы представлены в 6-х докладах на следующих конференциях: VI Международная конференция по фотонике и информационной оптике (МИФИ), Москва, Россия (1-3 февраля, 2017); XXIV и XXV международные конференции студентов, аспирантов и молодых

ученых по фундаментальным наукам «Ломоносов», Москва, Россия (20 апреля, 2017; 10 апреля, 2018); “Week of Doctoral Students 2018”(WDS 2018), Прага, Чешская Республика (5-7 июня, 2018); “Week of Doctoral Students 2019”(WDS 2019), Прага, Чешская Республика (4-6 июня, 2019); XXIX международные конференции студентов, аспирантов и молодых ученых по фундаментальным наукам «Ломоносов», Москва, Россия (12 апреля, 2022).

### **Публикации**

Основные результаты диссертации изложены в 11 печатных работах, в том числе в 6 статьях в рецензируемых научных журналах, удовлетворяющих Положению о присуждении учёных степеней в МГУ имени М.В. Ломоносова, и в 5 публикациях в сборниках тезисов конференций: Волкова О.И., Баранов А.Н, Салецкий А. М. Процессы ассоциации молекул эозина в обратных мицеллах // Журнал прикладной спектроскопии, 2018 г, Т 85, № 3, стр. 373-376; Волкова О.И., Баранов А.Н., Кулешова А.А, Салецкий А. М. Spectral Investigations of the Dye's Molecules Behavior in the Reverse Micelles Solutions // в сборнике Faculty of mathematics and physics Charles University Czech Republic, 2019 г, Т 19, стр. 45-48; Волкова О.И., Кулешова А.А, Корватовский Б.Н., Салецкий А. М. Фотофизические процессы в молекулах галогенпроизводных флуоресцеина в анионных обратных мицеллах // Оптика и спектроскопия, 2020 г, Т 128, № 12, стр. 1842-1848; Волкова О.И., Кулешова А.А, Салецкий А. М. Спектрально-люминесцентные характеристики маркеров семейства флуоресцеина в обратных мицеллах разного размера // Журнал прикладной спектроскопии, 2020 г, Т 87, № 5, стр. 802-807; Волкова О.И., Кулешова А.А, Салецкий А. М. Влияние наноразмерных обратных мицелл на фотофизические свойства молекул разного размера // Вестник Московского университета, 2020 г, серия 3, № 512 стр. 75-80; Gorodnichev E.S., Kuleshova A.A., Volkova O.I., Saletsky A.M. The binding of bovine serum albumin with dye molecules at different pH values. Fluorescence lifetime studies// Laser Physics, 2021 г, v.31, n 6, p. 065601;

Volkova O.I., Kuleshova A.A., Saletsky A.M. Spectroscopy study of dimerization of fluorone dyes in aot reverse micelles // Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, издательство Pergamon Press Ltd.

## ГЛАВА 1.

### 1.1 Флуороновые красители: применение, спектрально - люминесцентные характеристики.

В работе [10] исследовались спектры поглощения и люминесценции красителей флуоресцеина (Fl), дибромфлуоресцеина ( $\text{Br}_2\text{-Fl}$ ), эозина ( $\text{Br}_4\text{-Fl}$ ), эритрозина ( $\text{I}_4\text{-Fl}$ ) и бенгальского розового ( $\text{I}_4\text{Cl}_4\text{-Fl}$ ) в метаноле. Были выявлены конформационные изменения в структуре молекул флуоронов в ряду от флуоресцеина до бенгальского розового, связанные с перераспределением зарядов, которые вызывают изменения длин связей и углов между связями. В ряду  $\text{Fl-I}_4\text{Cl}_4\text{-Fl}$  было обнаружено красное смещение спектров и уменьшение Стоксова сдвига.

В работах [11 - 13] описывается взаимодействие красителей с различными видами растворителей и говорится о том, что полярные взаимодействия флуоресцентных наномаркеров с растворителем являются основной причиной возникновения спектральных сдвигов флуорофоров. С помощью межмолекулярных водородных связей объясняется сдвиг в длинноволновую область спектров поглощения и спектров флуоресценции красителей при взаимодействии флуоресцентных маркеров с растворителем.

В статье [14] был исследован механизм абсорбции флуоресцеина, эозина Y, эритрозина B. Выявлен разброс адсорбционных свойств красителей, который связан с различиями ионными формами, а также с их полярностью и гидрофобностью. Обнаружено, что на форму спектров поглощения красителей влияет pH.

### 1.2 Применение и структура нанореакторов на основе обратных мицелл.

В работе [15] с помощью Triton X-100 и н-гексанола были получены стабильные обратные микроэмульсии, которые использовались, как нано-реакторы для получения сферических частиц 1,1-диамино-2,2-динитроэтилен (FOX-7).

В [16] с помощью АОТ в изооктане, как нано-реакторе обратных мицеллярных частиц, был синтезирован и исследован полимер (п-фениленвинилен). С помощью УФ –видимых спектров было обнаружено, что при маленьком значении  $W_0$  по спектрам поглощения было выявлено, что полимер имеет мало повторяющихся звеньев; с увеличением  $W_0$  увеличивается интенсивность спектров поглощения и было обнаружено, что полимер имеет более сопряжённую систему. Длина цепи полимера контролировалась с помощью размера обратной мицеллярной капли (при  $W_0 = 5-20$  нм размер частиц составляет 9 – 74 нм).

В статье [17] с помощью поверхностно-активных веществ АОТ в гексане и Tween 60 и Triton X-100 в 1-бутаноле были образованы обратные мицеллярные нано-реакторы, в которых исследовались наночастицы биополимера. С помощью динамического рассеяния света были получены размеры мицеллярных мицелл с полимерами от 40 до 300 нм в зависимости от ПАВ.

В работе [18] были синтезированы частицы золота в обратных мицеллярных системах и исследованы с помощью динамического и статистического рассеяния света. Обнаружено, что комплекс имеет однородную сферическую структуру с размером частиц 2 нм.

### **1.3 Спектрально-люминесцентные характеристики молекул красителей, внедренных в обратные мицеллы.**

В [19] были получены частицы Au-TiO<sub>2</sub> и Ag/Au-TiO<sub>2</sub> с помощью систем обратных мицелл вода/АОТ/циклогексан и вода/Тритон X-100/циклогексан, размер комплекса составил от 15 нм до 90 нм. Данные комплексы исследовались с помощью рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии, на электронном микроскопе и с помощью порошковой рентгеновской спектроскопии.

В работах [20-23] были синтезированы в нано-реакторах поверхностно-активных веществ такие частицы, как платина, палладий, родий с помощью комплексов вода/Твин 80/Спан 20/этилолеат и сипероник 10/изооктан (средний размер частиц менее 7 нм) [20], наножелезос помощью комплекса изооктан/Спан 80/Твин 60 (размер частиц составил 80-90) [21], оксид никеля с помощью комплекса Твин 90/АОТ/н-пропанол/циклогексан (средний размер частиц 14 нм) [22] и частицы TiO<sub>2</sub> и SiO<sub>2</sub> получены с помощью комплекса Твин 20/Твин 80/Спан 20/Спан 80/декан/вода (размер частиц составил 30-120) [23].

В статье [24] с помощью обратных микроэмульсий системы Спан-Твин 80/масло/ацетат цинка были синтезированы наночастицы оксида цинка, размер частиц составил 14 нм. В работе [25] были получены наночастицы оксида никеля с помощью системы, состоящей из неионного ПАВа пищевого эфира сахарозы (S-1170 /1-бутанол/тетрадекан/вода), размеры частиц монодисперсны и однородны и увеличиваются с увеличением концентрации реагентов (при C=0,010 М размер частиц 3-9 нм, при C=0,100 М размер частиц в диапазоне 5-12 нм).

В статье [26] по спектрам поглощения выявлено, что в системе прямых мицелл (система водонерастворимого красителя ПФ - 103 и пентадецилсульфат натрия) зонд может находиться в разных формах, как в мономерной, так и в димерной в зависимости от концентрации ПАВ.

В работах [27], [28] и [29] были исследованы фотофизические свойства нильского голубого в прямых (додецилсульфат натрия) и обращенных мицеллах (АОТ). Изучены фотофизические свойства метилового оранжевого и кристаллического фиолетового в неионном ПАВ (тритон X-114) и в катионном ПАВ (додецилсульфат натрия), конго красного в обращенных мицеллах (гексадецил триметиламмоний бромид и цетил триметиламмоний бромид). Были определены размеры систем с помощью рассеяния света и сняты спектры поглощения и люминесценции.

В [30] была исследована эффективность взаимодействия катионного ПАВ (Кватамин КМ 10) с красителями (дихлортриазиновый 5СХ и винилсульфоновые 23Т и 4КТ). В спектрах поглощения всех красителей в воде и в мицеллах наблюдался сдвиг пика в красную область.

В статье [31] был определен размер обращенной мицеллы (от 2 нм до 16 нм) в системе АОТ/декан/родамин В методом динамического рассеяния света. Исследованы спектры люминесценции, поглощения при комнатной температуре при различных концентрациях родамина В. Наблюдалось смещение максимумов в длинноволновую область при изменении концентрации родамина В в мицеллярном растворе.

В работе [32] в мицеллярных системах АОТ/октан/рбж или метиленовый голубой с увеличением количества воды в полостях обращенных мицелл обнаружено увеличение внешнего радиуса мицеллы. Было обнаружено разрушение ассоциатов молекул красителей в растворе  $H_2O+D_2O$  при увеличении температуры.

В [33] был определен размер обращенной мицеллы (от 1,8 нм до 7 нм) в системе АОТ/п-гексан/родамин В и исследованы спектры люминесценции и поглощения при комнатной температуре при различных концентрациях родамина В. Наблюдалось смещение максимумов спектров поглощения в длинноволновую область, аналогично работе [31].

В статье [34, 35] были определены размеры водной обращенной мицеллы в системах АОТ/гептан/родамин В (от 4,6 нм до 22 нм) и АОТ/гептан/эозин К (от 3,7 нм до 21 нм) и исследованы спектры поглощения при комнатной температуре при различных концентрациях красителей. Также наблюдалось смещение максимумов спектров поглощения в длинноволновую область.

В [36] работе исследованы спектры флуоресценции системы АОТ/гептан/пропан (краситель). Определены гидродинамические радиусы при различных концентрациях АОТ и при варьировании  $\omega$ . Были обнаружены четыре основных микросреды для зонда: внутренний бассейн со «свободной» водой, область связанной воды, поверхность молекулы АОТ и окружающая фаза углеводородного растворителя.

В работе [37] были исследованы спектры поглощения системы анионный ПАВ (детергент натрий-лаурилсульфат) с катионными красителями (родамин 6Ж и тионин). Выявлено, что при маленьких концентрациях красителей  $5 \cdot 10^{-6}$  моль/л маркеры образуют только мономеры, а при высоких концентрациях красителей ( $6 \cdot 10^{-3}$  моль/л) образуются димеры внутри водного пула мицеллы.

В статье [38] изучалась система водных обратных мицелл (АОТ в алкане) с катионным красителем (гемицианиновый краситель). При изучении поглощения было установлено, что спектр в значительной степени смещен в синюю область и его пик приходится на длине волны 435 нм. Также наблюдалось уменьшение полосы поглощения в обратной мицелле по сравнению со спектрами поглощения красителя в воде. Было обнаружено увеличение интенсивности в спектрах поглощения при увеличении размера мицелл.

В [39] исследовалась эмиссия и анизотропия с постоянным и временным разрешением системы водных обратных мицелл (АОТ в гептане) с

катионными красителями (феносафранин, сафранин-Т и сафранин-О). Было обнаружено, что красители демонстрируют заметное уменьшение анизотропии флуоресценции с увеличением размера водного пула в ядре обратной мицеллы ( $w$ ), что означает, что общее ограничение движения, испытываемое молекулами красителя, уменьшается с увеличением степени гидратации ( $w$ ). Исследования флуоресценции показали, что при низких значениях  $w$  зонд не проникает в ядро обратной мицеллы, скорее он связывается в межфазной области. Динамические исследования показали, что и время жизни, и время релаксации вращения уменьшаются с увеличением  $w$  для всех трех зондов.

В [40] исследовалась система АОТ/изооктан или н-гептан/метиленовый синий краситель при концентрации зонда  $C = 1,3 \cdot 10^{-5}$  моль/л. Была обнаружена линейная зависимость размера капель воды в пуле мицеллы от степени гидратации  $w$ . При каждом растворителе (изооктан и н-гептан) были выявлены две формы красителя в мицеллах – димерная и мономерная, аналогичная структура зонда присутствует в буферном растворе. В спектрах поглощения и флуоресценции обратной мицеллярной системы при  $w = 0$  обнаружен сдвиг пика в синюю область (6 нм) по сравнению с спектрами зонда в воде. При увеличении степени гидратации  $w$  (от 0 до 15,74) пик спектра смещается в красную область.

В работе [41] изучалось взаимодействие трикарбоцианинового красителя (IR144) с АОТ. Путем сравнения формы спектра поглощения красителя в воде и водном пуле ( $w = 40$ ) обратных мицелл АОТ было обнаружено, что IR144 образует димерные агрегаты в воде даже при очень низкой концентрации ( $< 1,0 \cdot 10^{-7}$  моль/л).

В работе [42] были определены гидродинамические радиусы (от 1,85 до 9,38 нм) системы водных обратных мицелл (АОТ в н-гептане) с катионными красителями (пирониновые зонды РуВ и РуУ при концентрациях  $C = 5 \cdot 10^{-5}$  –

$5 \cdot 10^{-6}$  моль/л) при степени гидратации  $w = 2 - 45$ . По спектрам поглощения и флуоресценции было обнаружено увеличение интенсивности при увеличении  $w$  за счет увеличения количества мономеров в пуле обратной мицеллы. В спектрах поглощения с увеличением значения  $w$  от 2 до 8 был обнаружен сдвиг в синюю область (на 6 нм) для обоих зондов, а при значении степени гидратации  $w = 15$  наблюдалось смещение значения пика в красную область.

В [43] исследовалась система АОТ/н-гептане/2- (4- (диметиламино)стирил) -1-метилпиридиния йодид. При введении зонда в обратную мицеллу наблюдался сдвиг пика в синюю область по сравнению с красителем в н-гептане. При увеличении степени гидратации  $w$  (от 0 до 20) был обнаружен красный сдвиг в спектрах поглощения и люминесценции. Обнаружено изменение степени анизотропии с увеличением  $w$ , указывающее на то, что зонд испытывает свободу в движение с большим размером водного бассейна мицеллы.

В [44] исследовалось расположение аденина в системе АОТ/н-гептан и ЦТАБ/н-гептан. Обнаружено, что пик спектра поглощения аденина смещается в красную область. Выявлено, что аденин в обратной мицелле АОТ образует сложные конформеры на границе АОТ / вода. Однако, в обратных мицеллах ЦТАБа аденин находится в водном пуле без образования конформеров.

В [45] при маленьких степенях гидратации  $w = 2$  в системе АОТ/изооктан/ флуоресцентный зонд цианин-3 (Cy3) при концентрациях  $C_{Cy3} = 9,9 \cdot 10^{-5} - 3,6 \cdot 10^{-8}$  моль/л наблюдались изменения в спектрах поглощения и испускания, что указывает на агрегацию молекул красителя в димеры. Аналогичные изменения наблюдались и для значений  $w = 30$ , также при увеличении степени гидратации в спектрах поглощения и флуоресценции был обнаружен сдвиг в красную область.

В статье [46] исследовалась система АОТ/изооктан/7- (N, N<sub>0</sub>-диэтиламино) кумарин-3-карбоновая кислота при концентрации зонда  $C = 3 \cdot 10^{-6}$  моль/л. Было обнаружено, что при значении  $w = 0$  пики спектров поглощения и флуоресценции смещены в синюю область, а при увеличении степени гидратации  $w$  (от 0 до 30) пики смещаются в красную область.

В работе [47] был обнаружен сдвиг спектров поглощения в красную область системы обратных мицелл анионного ПАВ (АОТ в н-гептане) с катионным зондом (7-амино 4-метилкумарина C<sub>120</sub> при концентрации  $c = 10^{-5}$  -  $9 \cdot 10^{-7}$  моль/л) при значении степени гидратации  $w = 0$  - 45. Также в работе наблюдалось увеличение стоксовых сдвигов при увеличении гидродинамического радиуса системы.

В статье [48] было проведено детальное исследование процессов, происходящих при формировании мицеллярного раствора АОТ/вода/гексан с цианиновым (анионным) красителем. Показано, что до формирования стабильной микроэмульсии происходят процессы агрегации за счет проникновения в водную макрофазу ионов натрия и дезагрегации за счет взаимодействия красителя с анионом АОТ.

В [49] в системе водных обращенных мицелл катионных и анионных ПАВ в изооктане (додецилбензолсульфонат натрия, бис (2-этилгексил) сульфосукцинат натрия (АОТ), гексадецилтриметиламмоний бромид и хлорид цетилпиридиния) с анионными красителями (метиловый оранжевый, оранжевый G, эозиновый желтый, малахитовый зеленый и метиленовый синий) обнаружено удаление зонда из водной фазы ПАВ. С уменьшением концентрации красителя или увеличением концентрации ПАВ удаление молекул зонда из водной фазы мицеллы увеличивается.

В статье [50] в системе АОТ в изооктане с цианиновыми красителями (анионные) в спектрах поглощения наблюдается синий сдвиг (4-6 нм) при степени гидратации  $w = 10$ -20, а в спектрах флуоресценции наблюдается

незначительное смещение пика с ростом  $w$ . При высоких концентрациях красителей по спектрам поглощения обнаружено, что красители в водном пуле обратной мицеллы имеют димерную структуру.

В работе [51] исследовалась система водных обратных мицелл (АОТ в гептане) с анионными красителями (феноксазин-3-оновых красители резазурина и резорурфин). В спектрах поглощения и люминесценции было обнаружено увеличение интенсивности с увеличением содержания воды ( $w = 20$ ) в пуле мицеллы. Также было установлено, что при низком содержании воды ( $w = 12,8$ ) молекулы маркера встраиваются в отрицательную межфазную область обратной мицеллы, а при увеличении  $w$  перемещаются в водный бассейн. При более высоких значениях  $w = 20-30$  молекулы красителя движутся к центру водоема из-за электростатического отталкивания и обладают свойствами, аналогичными свойствам чистой воды.

В [52] изучалась система водных обратных мицелл (АОТ в н-гексане) с цианиновыми красителями ( $IR_{125}$  и  $C_{152}$  при концентрациях  $C = 10^{-5} - 10^{-6}$  моль/л). Было обнаружено, что зонд  $IR_{125}$  предпочитает находиться в водном бассейне обратной мицеллы АОТ, а  $C_{152}$  предпочитает находиться на внешней стороне межфазной области или в неполярной фазе н-гептана обратной мицеллы АОТ. Кроме того, анизотропия флуоресценции  $IR_{125}$  при меньших значениях степени гидратации ( $w = 10$ ) в первую очередь связана с переориентацией обратных мицелл, а анизотропия флуоресценции  $IR_{125}$  при больших значениях степени гидратации ( $w = 40$ ) связана с переориентацией  $IR_{125}$  в водном бассейне обратной мицеллы.

В статье [53] исследовалась система водных обратных мицелл (АОТ в изооктане) с флуоресцеином. Было обнаружено, что оптические свойства зонда в обратных мицеллах АОТ отличаются от оптических свойств красителя в воде: пик поглощения красителя смещен в красную область на 10 нм. Кроме того, интенсивность поглощения маркера в обратных мицеллах

увеличивается с увеличением степени гидратации  $w$ , а степень агрегации молекул красителя уменьшается.

В [54] исследовалось основание акридинового красителя (АОБ) в обращенных мицеллах АОТ в *n*-гептане. Было обнаружено, что время затухания флуоресценции АОБ при малых значениях  $w$  выше по сравнению красителя в воде. При увеличении степени гидратации  $w$  времена затухания флуоресценции в обратных мицеллах стремятся к значениям, полученным в воде.

#### **1.4 Ассоциация молекул красителей. Димеризация молекул флуороновых красителей.**

В статьях [55 - 57] рассматривались спектры поглощения флуоресцентных красителей (метиленовый синий, стирил-цианиновый и его производные, и производные скварилиевого маркера) благодаря которым проводился анализ их мономерных структур и ассоциатов. В работах была получена информация о влиянии окружающей среды (раствора) на образование ассоциатов, информация о геометрии димеров и угле поворота между диполями молекул красителей.

В работе [58] исследован ряд флуороновых красителей (флуоресцеин, эозин Y, эритрозин B) в водном растворе. Был обнаружен характер изменения спектров поглощения флуоронового красителя при изменении значений pH. В основном растворителе флуоресцеина димеры образуются с максимумом на длине волны 490 нм и изгибом кривой вблизи 475 нм. Относительная доля дианионов уменьшается с уменьшением pH и одновременным увеличением доли других частиц – анионов (с двумя максимумами вблизи 474 и 453 нм). Димерные формы эозина Y и эритрозина B также имеют интенсивные полосы поглощения с максимумами при длинах волн 517 нм для эозина Y и 526 нм для эритрозина B. Спектры эозина и эритрозина при снижении pH во многом схожи: амплитуда спектра уменьшается при уменьшении pH наблюдается батохромный сдвиг.

## 1.5 Спектрально-люминесцентные характеристики молекул красителей с белком, внедренных в обратные мицеллы.

В [59] изучалась система АОТ/н-гепанол/бычий сывороточный альбумин (БСА). Было обнаружено, что внедрение белка в водный пул обратной мицеллы приводит к увеличению гидродинамического радиуса обратной мицеллы от 9,7 нм до 11,2 нм.

В работе [60] исследована система обратных мицелл (бромид цетилтриметиламмония (ЦТАБ) в н-гексаноле и н-гексане) с внедрением белка (БСА) и красителем (цибакрон синий 3GA). Установлено внедрение БСА и зонда внутрь водного пула мицеллы. Также определено, что с увеличением концентрации белка (видно из спектров поглощения) увеличивается гидродинамический радиус мицеллы.

В статье [61] были определены размеры системы АОТ/изооктан/н-гексан/н-декан /рибонуклеаза с помощью динамического рассеяния света. Например, при степени гидратации  $w = 15$  размер системы составляет 23,1 нм. С увеличением значений  $w$  от 7 до 30 увеличивается размер обратной мицеллы с 6 нм до 100 нм. Это доказывается, что обратные мицеллы могут использоваться для производства белковых частиц.

В статье [62] было установлено, что гидродинамический радиус в водных обратных мицеллах (АОТ в гептане/ БСА) был намного больше, чем размер БСА водно-буферного раствора. Также было обнаружено увеличение значения энтальпии и поверхностной гидрофобности БСА в мицеллярном растворе по сравнению с белком в буферном растворе.

В [63] изучалось взаимодействие катионного ПАВ (ЦТАБ) в н-гексане с анионным красителем (цибакрон синий 3GA). Обнаружено, что спектры поглощения зонда сдвинуты в красную область с добавлением ЦТАБ в

буферный раствор из-за электростатического взаимодействия между зондом и ЦТАБ. Спектры поглощения красителя в обращенных мицеллах не имеют значительного сдвига. Также исследовалась система водных обратных мицелл (ЦТАБ/н-гексан/цибаркон синий 3GA) с добавлением белка (БСА). Максимум спектра поглощения зонда с БСА в обращенных мицеллах был смещен в синюю область по сравнению с максимумом в буферном растворе, что указывает на аффинное взаимодействие между зондом и белком.

В работе [64] исследована система АОТ /изооктан/ белок цитохром С и лизоцим. Было обнаружено, что в мицеллярной среде белок может изменять свою структуру, а именно, изменяется третичная структура (вторичная сохраняется), это зависит от растворителя (в данном случае, изооктан).

В статье [65] изучалась инкапсуляция белков (мутант лизоцима L99A, цитохром) в обратные мицеллы ПАВ (АОТ/ додецилтриметиламмонийбромид (ДТАБ) / лаурилдиметиламин оксид (ЛДАО) / децилмоноацилглицерин (10МАГ)). По спектрам флуоресценции производной лизоцима в ПАВ ДТАБ/ЛДАО/10МАГ было обнаружено, что при низком значении  $w$  много пиков в спектре, которые соответствуют водному спектру, что указывает на то, что инкапсулированный белок сложен. При увеличении  $w$  от 12 до 18 наблюдается заметное улучшение в спектрах флуоресценции, что указывает на переход белка к полной складке. В случае цитохрома в АОТ при  $w = 15$  также по спектрам флуоресценции было выявлено, что белок в водном пуле обратной мицеллы разворачивается.

В [66] была инкапсулирована Т-РНК в смесь обратных мицелл ЛДАО/10МАГ. Выявлено, что данная система ПАВ лучше подходит для инкапсуляции белка, по сравнению с АОТ. С помощью ЯМР-спектроскопии было обнаружено, что Т-РНК сворачивается в водном пуле мицеллы.

В работе [67] изучалась инкапсуляция белков (лизоцим и бычий сывороточный альбумин) в водную обратную мицеллярную систему (АОТ в

изооктане). Были определены размеры водной части мицеллы с лизоцимом при концентрации от 0 до 200 мкМ при степени гидратации  $w = 40$ . Например, при  $C_{\text{лизоцим}} = 5$  мкМ размер 4,4 нм, а при  $C_{\text{лизоцин}} = 200$  мкМ – 3,8 нм. Аналогичная ситуация и с БСА в обратных мицеллах, т.е. нелинейная зависимость размера водного бассейна от концентрации белка. Также обнаружен рост обратных мицелл от сферической формы (при значении  $w = 0-70$ ) до цилиндрической формы (при значении  $w = 80-90$ ) в присутствии белка в водном пуле.

В статье [68] обнаружено увеличение значения энтальпии и энтропии системы АОТ в н-гептане при увеличении степени гидратации ( $w = 10, 15, 20, 25$ ). Также обнаружена солюбилизация белков и нуклеиновых кислот в водных обратных мицеллах (АОТ в изооктане). Гидродинамический радиус мицеллы увеличивался с увеличением  $w$ .

В настоящей работе исследовались водные обращенные мицеллярные системы АОТ в гептане с флуоресцеиновыми красителями. Изучались процессы ассоциации молекул красителей семейства флуоресцеина в мицеллярных растворах. Были рассчитаны и проанализированы термодинамические характеристики процессов димеризации различных маркеров.

## ГЛАВА 2. Объекты и методы исследования

### Материалы

В данной работе в качестве ПАВ использовалась натриевая соль бис (2-этилгексил) сульфосукцинат натрия) (АОТ). Химическая формула  $C_{20}H_{37}NaO_7S$ , структурная формула представлена на рис. 2.1. Молярная масса  $M=444,55$  г/моль. ККМ:  $C=0,5-2,5 \cdot 10^{-3}$  моль/л при  $T=25C$  [69]. Размер молекулы  $r = 1,1$  нм [70].

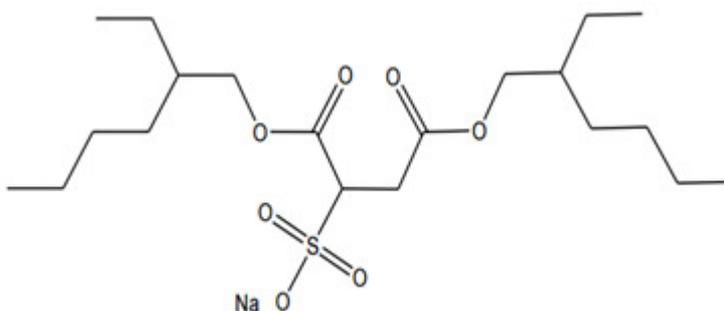


Рис. 2.1. Структурная формула молекулы АОТ.

В качестве неполярного растворителя (углеводород) для создания обратных мицеллярных систем в работе использовался **гептан**. Молярная масса  $M=100,21$  г/моль. Химическая формула:  $C_7H_{16}$ . Структурная формула представлена на рис. 2.2.

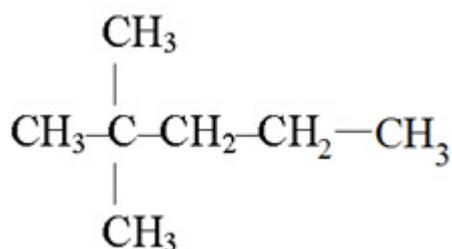


Рис. 2.2. Структурная формула гептана.

В работе исследовались следующие флуороновые красители: флуоресцеин (Ф), эозин (Э), эритрозин (ЭР) и бенгальский розовый (БР).

**Флуоресцеин** – анионный краситель, растворимый в воде, кристаллический порошок оранжево-красного цвета. Химическая формула:  $C_{20}H_{10}O_5$ . Структурная формула флуоресцеина представлена на рис. 2.3. Молярная масса:  $M=332,306$ г/моль. Размер молекулы  $r=1$ нм.

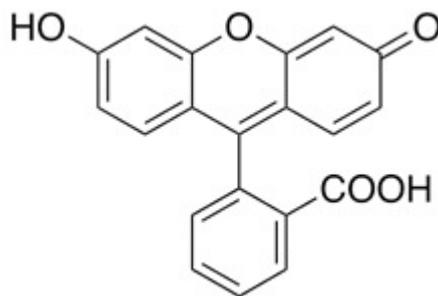


Рис.2.3. Структурная формула Флуоресцеина.

**Эозин** – анионный краситель, растворимый в воде, интенсивно-розового цвета. Химическая формула  $C_{20}H_6Br_4K_2O_5$ . Структурная формула представлена на рис. 2.4. Молярная масса  $M=470$ г/моль. Размер молекулы  $r=1,2$ нм.

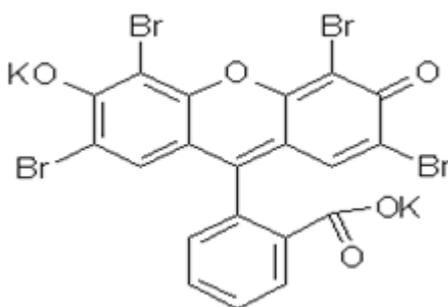


Рис. 2.4. Структурная формула Эозина К.

**Эритрозин** – анионный краситель, растворимый в воде, интенсивно оранжевого цвета. Химическая формула  $C_{20}H_6I_4Na_2O_5$ . Структурная

формула представлена на рис. 2.5. Молярная масса  $M = 879,86\text{г/моль}$ . Размер молекулы  $r = 1\text{нм}$ .

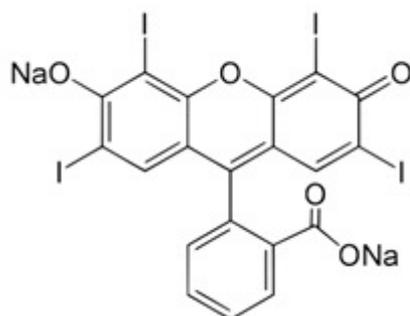


Рис. 2.5. Структурная формула Эритрозина.

**Бенгальский розовый** – анионный краситель, растворимый в воде, порошок темно-красного цвета. Химическая формула  $C_{20}H_2Cl_4I_4O_5$ . Структурная формула представлена на рис. 2.6. Молярная масса  $M = 1017,65\text{г/моль}$ . Размер молекулы  $r = 1\text{нм}$ .

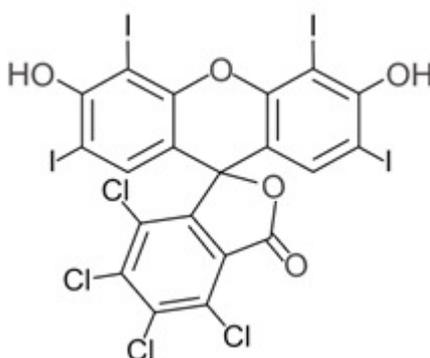


Рис. 2.6. Структурная формула Бенгальского розового.

Все растворы приготавливались из сухих реактивов АОТ, флуоресцентных красителей и гептана. Сначала создавался 10% по массе раствор АОТ в гептане: взвешивались 1г АОТ и 9г гептана. Затем в 2 мл АОТ в гептане добавлялись красители, разведенные в воде в количестве 100–500 мкл (число гидратации  $w$  варьировалось от 0 до 70). Флуоресцентные красители (флуоресцеин, эозин, эритрозин, бенгальский розовый) использовались при концентрациях  $C=10^{-5}$  моль/л,  $C=10^{-3}$  моль/л,  $C=2 \cdot 10^{-3}$  моль/л,  $C=3 \cdot 10^{-3}$  моль/л,  $C=5 \cdot 10^{-3}$  моль/л,  $C=10^{-2}$  моль/л,  $C=3 \cdot 10^{-2}$  моль/л. Для концентрации  $C=10^{-5}$  моль/л все измерения были проведены при температуре 295 К. Для высоких концентраций измерения были проведены, как при 295 К, так при варьировании температуры от 295 К до 323 К. Для приготовления растворов использовались электронные весы с точностью до 0,001г и дозаторы фирмы ВЮНИТ. Точность дозирования жидкостей дозаторами Biohit (1%).

Серия растворов АОТ/гептан/водный раствор красителя обрабатывались в ультразвуковой ванне с мощностью ультразвука 50 Вт в течение 5 минут и выстраивались при комнатной температуре более суток.

#### *Определение размеров мицелл.*

Для определения размеров мицелл использовался метод динамического рассеяния света. Методика определения  $R_h$  подробно описана в [71] и основана на определении временной корреляционной функции рассеянного света в мицеллярных растворах

$$G(\tau) = \frac{\langle I(t) \cdot I(t+\tau) \rangle}{\langle I^2(t) \rangle}, \quad (2.1)$$

где  $I(t)$  и  $I(t+\tau)$  – интенсивность рассеянного света при времени  $t$  и  $t+\tau$ , соответственно.

Для монодисперсного коллоидного раствора

$$G(\tau) = A \exp(-\Gamma\tau), \quad (2.2)$$

где  $A$  – постоянная прибора,  $\Gamma$  – скорость релаксации, связанная с временем корреляции функции корреляции  $\tau_k$  и коэффициентом диффузии  $D$  следующим соотношением

$$\Gamma = \frac{1}{\tau_k} = Dq^2, \quad (2.3)$$

$q$  – вектор рассеяния, равный  $q = 4\pi \frac{n}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right)$ , где  $\theta$  – угол рассеяния (в наших экспериментах  $\theta = 90^\circ$ ),  $\lambda$  – длина волны рассеянного света,  $n$  – показатель преломления раствора.

Таким образом, определив  $\tau_k$  ( $\tau_k$  равно времени, в течении которого корреляционная функция  $G(\tau)$  уменьшается в  $e$  раз) можно определить коэффициент диффузии  $D$ .

Зная коэффициент диффузии в рамках модели Стокса-Эйштейна-Дебая, в предположении сферической формы мицелл определялся их гидродинамический радиус

$$R_h = \frac{kT}{6\pi\eta D}, \quad (2.4)$$

где  $k$  – постоянная Больцмана,  $T$  – температура,  $\eta$  – вязкость растворителя.

Измерение динамического рассеяния света и анализ размеров частиц осуществлялся на приборе PhotocorCompact (использовался полупроводниковый лазер с  $\lambda = 638$  нм, мощность 25 мВт). Корреляционный спектрометр управляется программным обеспечением PhotocorSoftware, с его помощью можно наблюдать за ходом измерений и менять режимы его работы. Измеренные корреляционные функции рассеянного света обрабатывалась с помощью программного обеспечения DynaLS. Измерения проводились при различных температурах. Погрешность измерения гидродинамического радиуса мицелл  $\pm 0,3$  нм.

### *Измерение спектров поглощения*

Измерение спектральных характеристик растворов. Измерение спектров поглощения водно-мицеллярных растворов красителей были проведены на спектрофотометре Perkin Elmer Lambda 35 (спектральная ширина щели 0,5 nm). Температурные измерения спектров поглощения растворов проводилось с помощью специально изготовленной приставки-термостата. Точность поддержания температуры была  $\pm 0,3\text{K}$ .

*Измерения флуоресцентных характеристик.*

Спектрально-люминесцентные характеристики молекул красителей в мицеллярных растворах проводились на спектрофлуориметре Perkin Elmer LS 55. Ширины щелей монохроматоров возбуждения и излучения во всех измерениях были равны 3 нм. Температура при всех измерениях была 295 К. Флуоресценция красителей исследовалась в следующих условиях

- a) *Флуоресцеин* возбуждение длиной волны  $\lambda_{\text{возб}} = 420$  нм, флуоресценция регистрировалась в области 450 – 700 нм.
- b) *Эозин* возбуждение длиной волны  $\lambda_{\text{возб}} = 430$  нм, флуоресценция регистрировалась в области 530 – 700 нм.
- c) *Эритрозин* возбуждение длиной волны  $\lambda_{\text{возб}} = 490$  нм, флуоресценция регистрировалась в области 540 – 700 нм.
- d) *Бенгальский Розовый* возбуждение длиной волны  $\lambda_{\text{возб}} = 520$  нм, флуоресценция регистрировалась в области 550 – 700 нм.

*Степень анизотропии флуоресценции* определялась по формуле

$$r = \frac{I_{\text{VV}} - kI_{\text{VH}}}{I_{\text{VV}} + 2kI_{\text{VH}}} \quad (2.5)$$

где  $I_{\text{VV}}$ –интенсивность флуоресценции при вертикальной ориентации поляризаторов возбуждения и излучения;  $I_{\text{VH}}$ –интенсивность флуоресценции, полученная при вертикальной ориентации поляризатора возбуждения и горизонтальной ориентации поляризатора излучения;  $k = \frac{I_{\text{HV}}}{I_{\text{HH}}}$ ;

$I_{\text{HH}}$ –интенсивность флуоресценции при горизонтальной ориентации

поляризаторов возбуждения и излучения;  $I_{HV}$ —интенсивность флуоресценции, полученная при горизонтальной ориентации поляризатора возбуждения и вертикальной ориентации поляризатора излучения.

*Измерение время-разрешенной флуоресценции.*

Измерение времени жизни флуоресценции красителей проводилось с использованием прибора Simple Tau 140, работающего в режиме счета фотонов (Becker & Nickl, Германия). Флуоресценцию красителей возбуждали лазером BDS-SM510 (длина волны 510 нм, длительность импульса 40 пс). Флуоресценция регистрировалась 16-канальным фотоприемником K5900 (Hamamatsu, Япония), перед которым находился решетчатый полихроматор (600 штрихов / мм). Ширина спектра на выходе полихроматора составляла 200 нм, что соответствовало 12,5 нм на канал. Время интегрирования составляло 30с. Кинетические кривые флуоресценции были обработаны с использованием программы SPImage (Becker & Nickl, Германия). Погрешности определения времени жизни возбужденного состояния молекул красителей  $\pm 0,05$  нс.

Определение кинетики затухания анизотропии дает прямую информацию о диффузном движении люминесцирующих молекул. *Кривая затухания флуоресценции* аппроксимировалась несколькими экспонентами

$$F(t) = \sum_{i=1}^N A_i e^{-\left(\frac{t}{\tau_i}\right)} \quad (2.6)$$

где  $N$ —число экспонент,  $t$ —время,  $\tau_i$ —время жизни флуоресценции и  $A_i$ —амплитуда.

## **ГЛАВА 3. Исследования взаимодействия комплекса водных обратных мицелл с флуоресцеиновыми красителями.**

### **3.1. Результаты исследования динамического рассеяния света мицеллярных структур**

В данном параграфе представлены результаты измерения размеров обратных мицелл (гидродинамических радиусов  $R_h$ ) и их изменение при внедрении молекул красителей при их различных концентрациях и температурах. Эти характеристики обратных мицелл были измерены с помощью динамического рассеяния света. На рис. 3.1 представлены зависимости гидродинамического радиуса  $R_h$  мицеллы от степени гидратации  $\theta$ , определенные с помощью соотношения (4) (кривая 1). Видно, что зависимость  $R_h(\theta)$  является практически линейной.

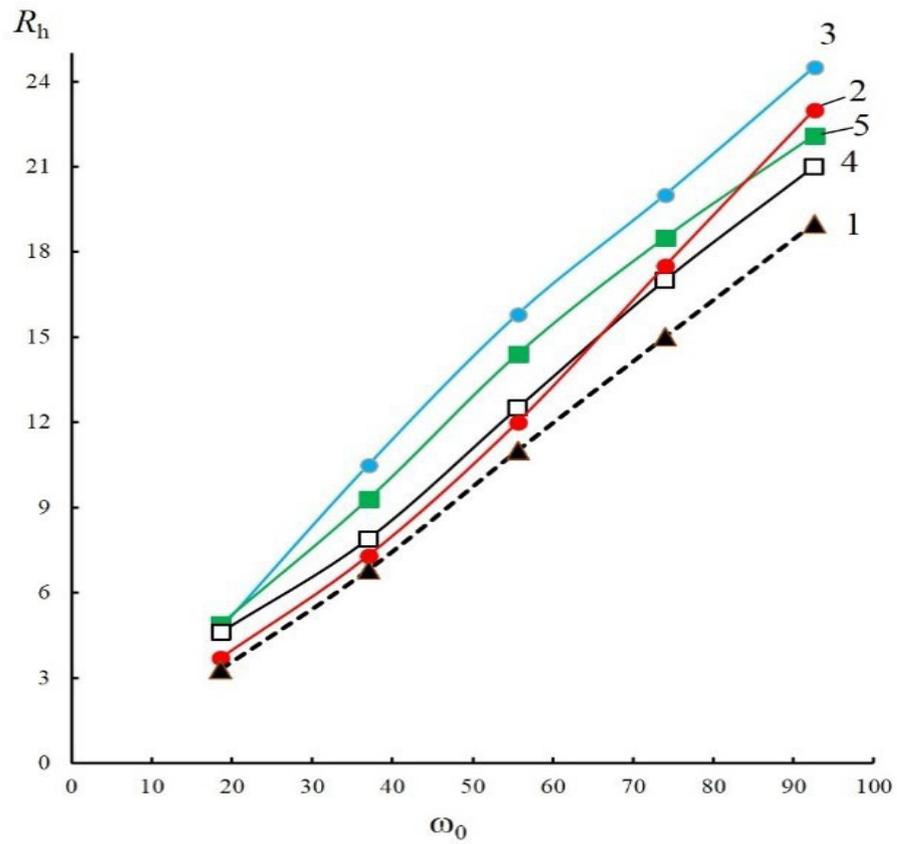


Рис. 3.1. Зависимости гидродинамического радиуса  $R_h$  от  $\omega_0$  для мицелл без молекул красителей (1) и содержащих молекулы Э(2), ЭР(3), БР(4) и Ф(5). Концентрация красителей  $C = 10^{-5}$  моль/л.

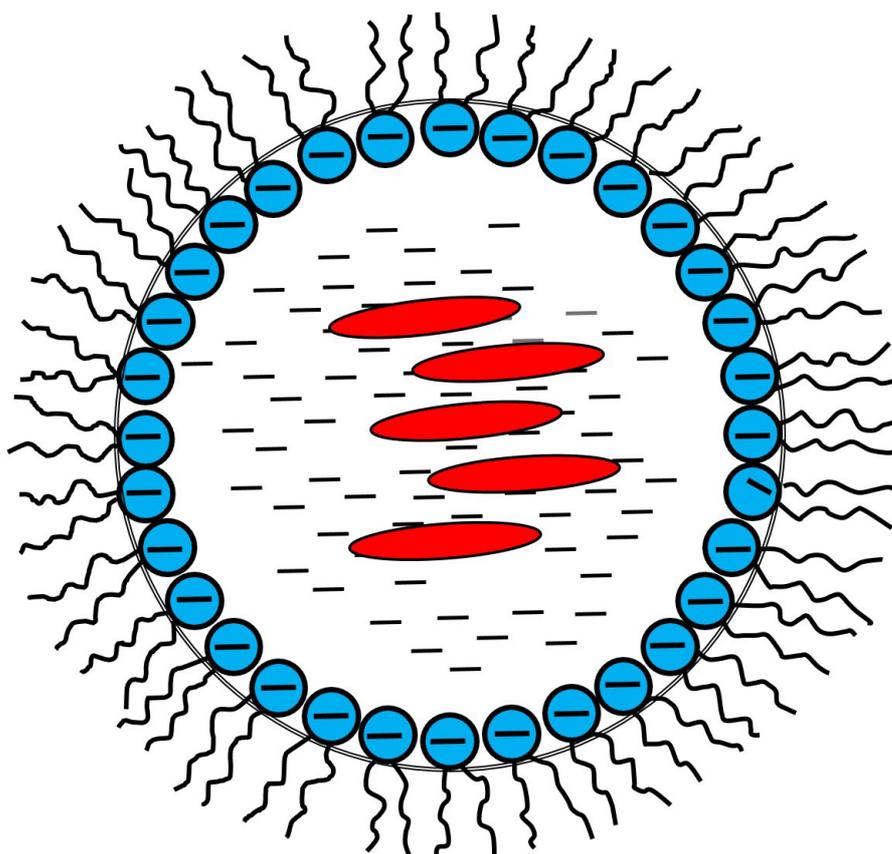


Рис. 3.2. Схематическое представление изменение мицеллы за счет электростатического взаимодействия молекул ПАВ и красителей.

На этом же рисунке представлены зависимости  $R_h$  от  $\phi$  для мицелл, содержащих молекулы красителей: Э (кривая 2), ЭР (кривая 3), БР (кривая 4) и Ф (кривая 5). Из Рис. 3.1 видно, что гидродинамический радиус мицелл с молекулами красителями больше, чем для водных мицелл для всех значений  $\phi$ . При этом рост радиуса мицелл для различных молекул красителей различен. Такое изменение размеров обратных мицелл при внедрении в них молекул красителей объясняется электростатическим взаимодействием молекул ПАВ и красителя. Действительно, исследуемые красители содержат ароматический ксантен скелет с карбоксильной группой, что делает их растворимыми в воде. Так как молекулы этих красителей являются анионными, то они за счет отталкивания от молекул ПАВ, локализуются внутри ядра мицелл, при этом отрицательные головки молекул ПАВ также

отталкиваются от анионных молекул красителей, вызывая увеличение гидродинамического радиуса мицелл (рис. 3.2).

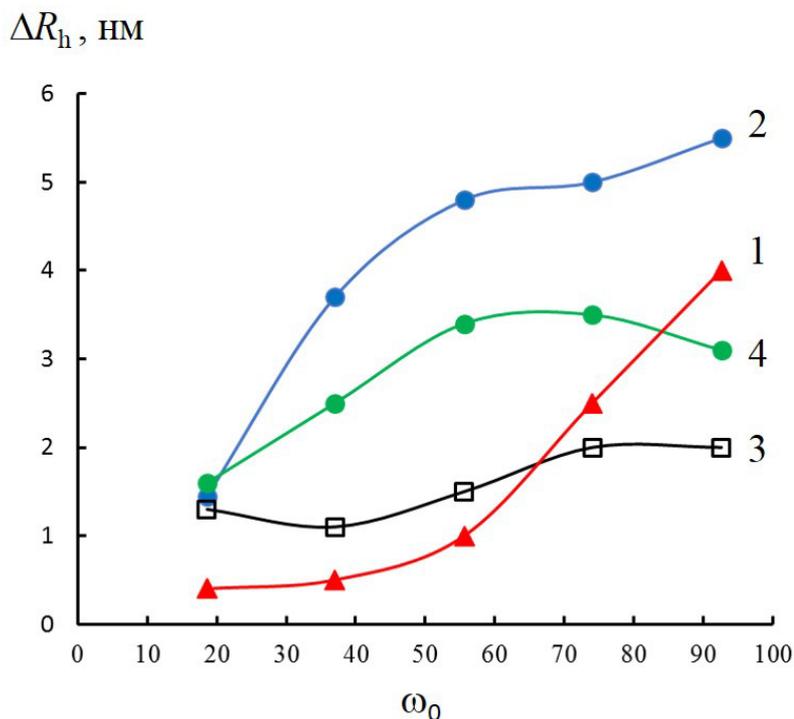


Рис. 3.3. Зависимости  $\Delta R_h$  от  $\omega_0$  для мицелл, содержащих молекулы E(1), ER(2), BR(3) и FL (4). Концентрация красителей  $C = 10^{-5}$  моль/л.

Из рис. 3.3 видно, что для всех исследованных красителей наблюдается немонотонная зависимость  $\Delta R_h$  от  $\omega_0$ . При этом при  $\omega_0 < 55$  для всех четырех красителей наблюдается увеличение разности  $\Delta R_h$  гидродинамических радиусов мицелл с молекулами красителей и без молекул красителей. При этом, если для E (кривая 1) и BR(кривая 3)  $\Delta R_h$  увеличивается незначительно, то для FL (кривая 4) и ER(кривая 2) это увеличение значительно – 3.5 и 5 нм, соответственно. При больших  $\omega_0 > 55$  для BR(кривая 3), FL(кривая 4) и ER(кривая 2)  $\Delta R_h$  с ростом  $\omega_0$  практически не изменяются. Для E(кривая 1) в этой области  $\omega_0$  наблюдается рост  $\Delta R_h$  достигая при  $\omega_0 \approx 90$  величины 4 нм.

В связи с тем, представленные флуороновые красители характеризуются последовательным замещением атомов водорода атомами галогенов (бром, йод и хлор), в молекулах красителей происходит перераспределение зарядов между атомами, изменение электронных и пространственных структур. В результате происходит изменение электростатического взаимодействия между анионами красителей и гидратированными группами ПАВ, вызывающее изменение гидродинамических радиусов мицелл.

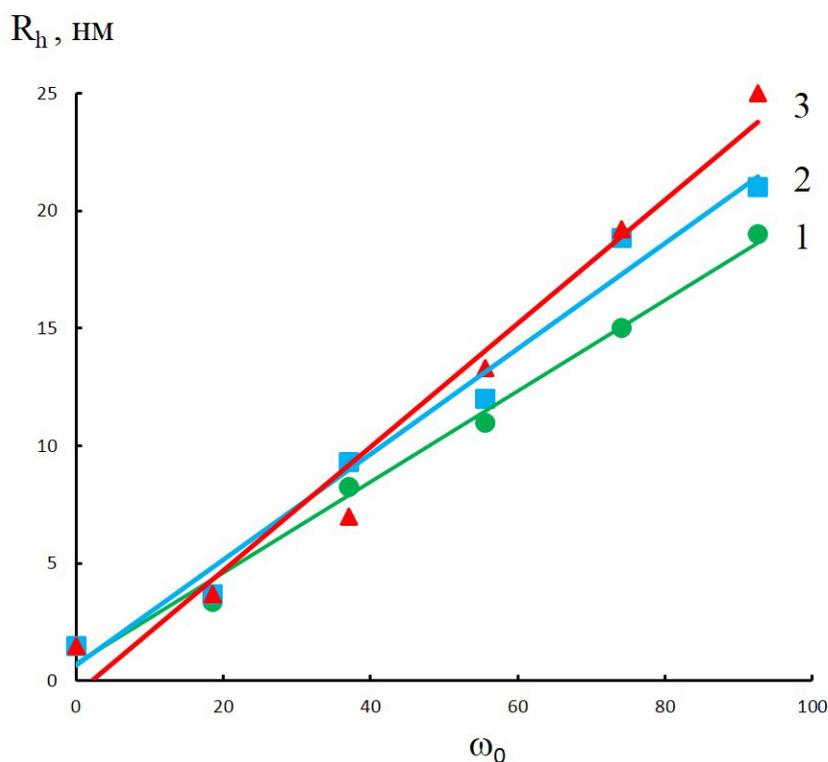


Рис. 3.4. Зависимости  $R_h$  от  $\omega_0$  водно-мицеллярных растворов E для концентраций красителя:  $5 \cdot 10^{-3}$  (1),  $10^{-2}$  (2) и  $3 \cdot 10^{-2}$  моль/л (3).

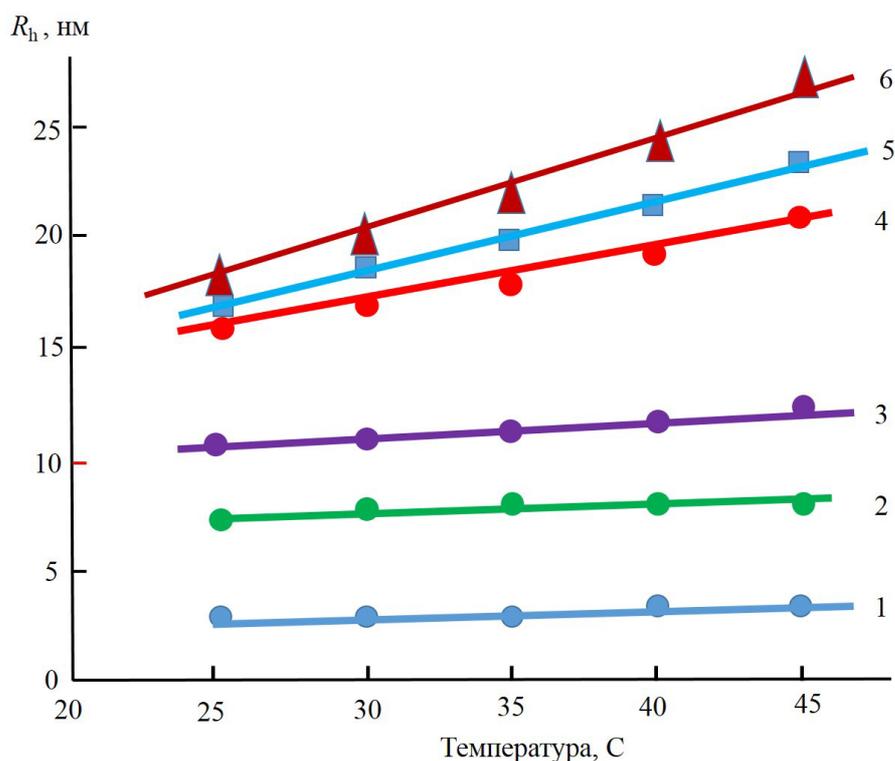


Рис. 3.5. Зависимости  $R_h$  от температуры водно-мицеллярных растворов Э для  $\omega_0 = 18,6$  (1),  $\omega_0 = 37$  (2),  $\omega_0 = 55$  (3) и  $\omega_0 = 70$  (4-6) и концентраций  $5 \cdot 10^{-3}$  моль/л (1-4),  $10^{-2}$  моль/л (5) и  $3 \cdot 10^{-2}$  моль/л (6).

При увеличении температуры растворов при значениях  $\omega_0 < 55$  изменение  $R_h$  практически не наблюдается (рис. 3.5, кривые 1–3). При  $\omega_0 > 55$   $R_h$  изменяется линейно с ростом температуры (рис. 3.5, кривые 4–6) с

$$\frac{dR_h}{dT} = 1 \text{ нм/К} \text{ для концентрации красителя } C = 5 \cdot 10^{-3} \text{ моль/л, } \frac{dR_h}{dT} = 1,2 \text{ нм/К}$$

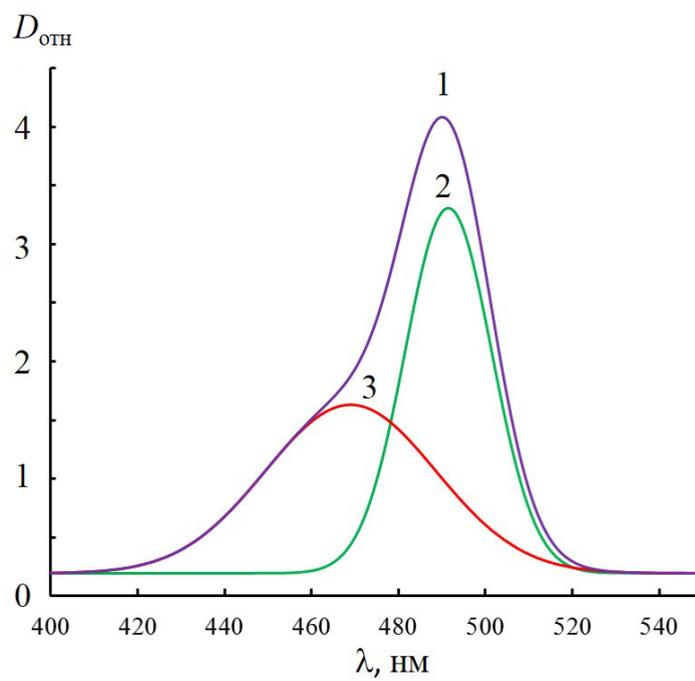
для  $C = 10^{-2}$  моль/л и  $\frac{dR_h}{dT} = 2,2 \text{ нм/К}$  для  $C = 3 \cdot 10^{-2}$  моль/л.

Таким образом внедрение молекул красителя в обратные мицеллы вызывает увеличение их гидродинамических радиусов  $R_h$  с линейной зависимостью роста  $\Delta R_h$  от степени гидратации  $\omega_0$ . В дальнейшем, для описания люминесцентных характеристик красителей в водных мицеллярных растворах использовались значения  $R_h$  для мицелл с внедренными молекулами красителей.

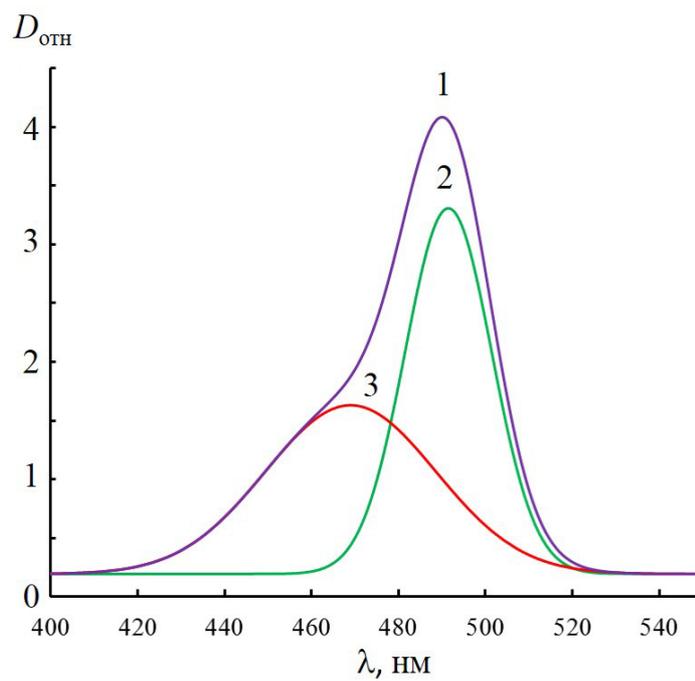
### 3.2. Фотофизические процессы в водно-мицеллярных растворах молекул флуоресцеина

Родоначальником красителей флуоронового ряда является флуоресцеин (Ф), имеющий наибольший квантовый выход флуоресценции из этой серии красителей, который используется в офтальмологической практике для определения поражений роговицы, исследования ретинального кровотока и др. Кроме практического применения Ф представляет интерес в связи со способностью его молекул находится в различных формах (дианионной, анионной, катионной и нейтральной), которые имеют различные спектральные характеристики поглощения и флуоресценции.

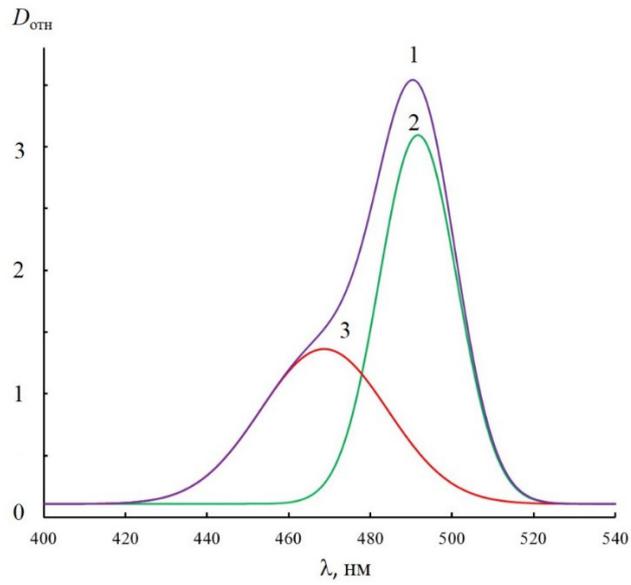
В данном параграфе представлены результаты исследования влияние наноразмерных обратных мицелл на фотофизические свойства молекул флуоресцеина. Были измерены спектры поглощения и флуоресценции красителей в мицеллярных растворах для различных значений их гидродинамического радиуса  $R_h$ . На рис. 3.6 спектры поглощения Ф в воде (а) и мицеллярных растворах с гидродинамическими радиусами  $R_h=4,9$  нм (б),  $R_h=4,9$  нм (в) и  $R_h=14,4$  нм (г). Из рис. 3,6 видно, что спектры поглощения Ф (кривые 1) имеют две полосы с длинами волн  $\lambda_1 \sim 495$  нм и  $\lambda_2 \sim 472$  нм. Полоса с  $\lambda_1$  относится к дианионной форме Ф, а  $\lambda_2$  – к анионной форме красителя [3.1]. На этом же рисунке представлено разделение спектров на две компоненты: полоса поглощения дианионной формы Ф (кривая 2) и полоса поглощения анионной формы Ф (кривая 3) [3.1].



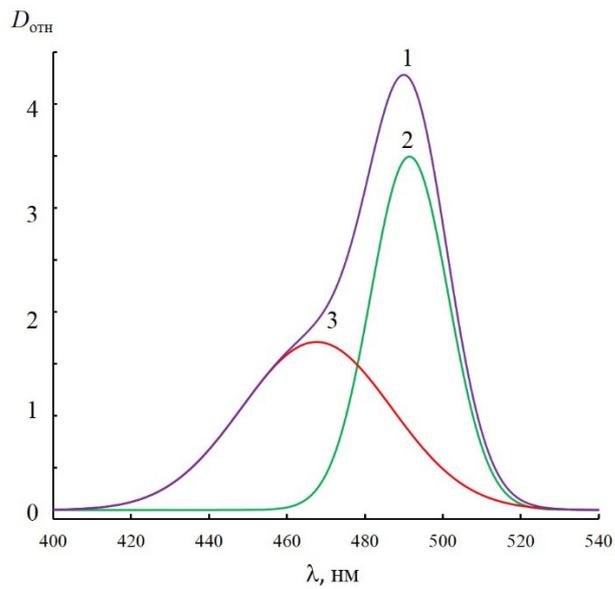
a)



b)



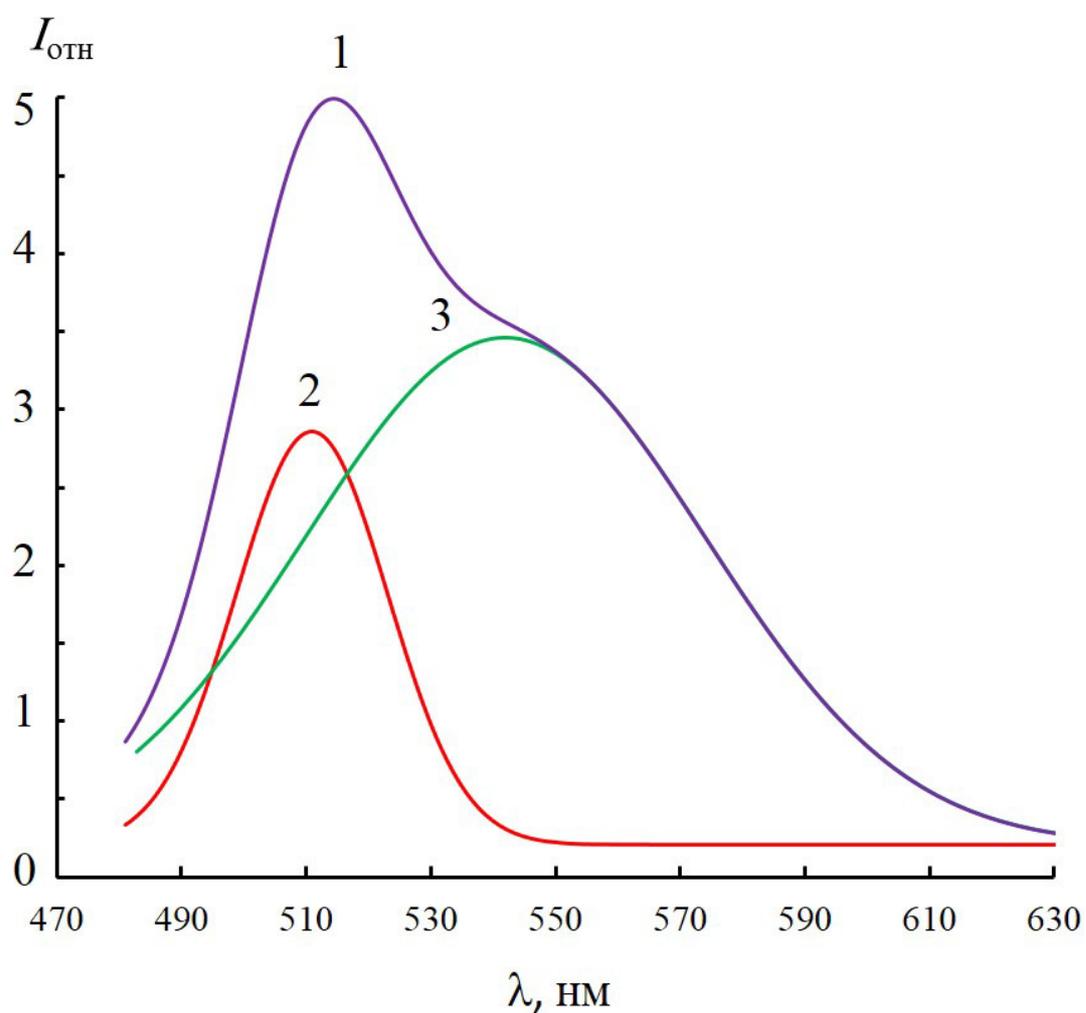
б)



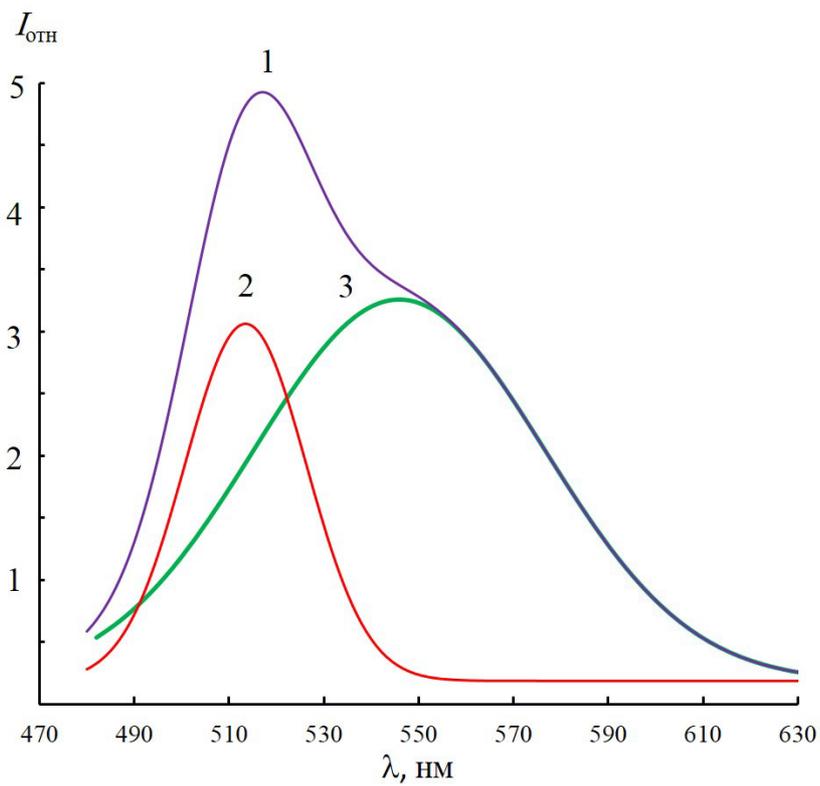
в)

Рис. 3.6. Спектры поглощения для водного раствора  $\Phi(a)$  водно-мицеллярных растворов  $\Phi$  с гидродинамическими радиусами: 4,9(б), 9,3(в) и 14,4 нм (г), 1-исходные спектры. 2,3 – выделенные компоненты. Концентрация красителя  $10^{-5}$  моль/л.

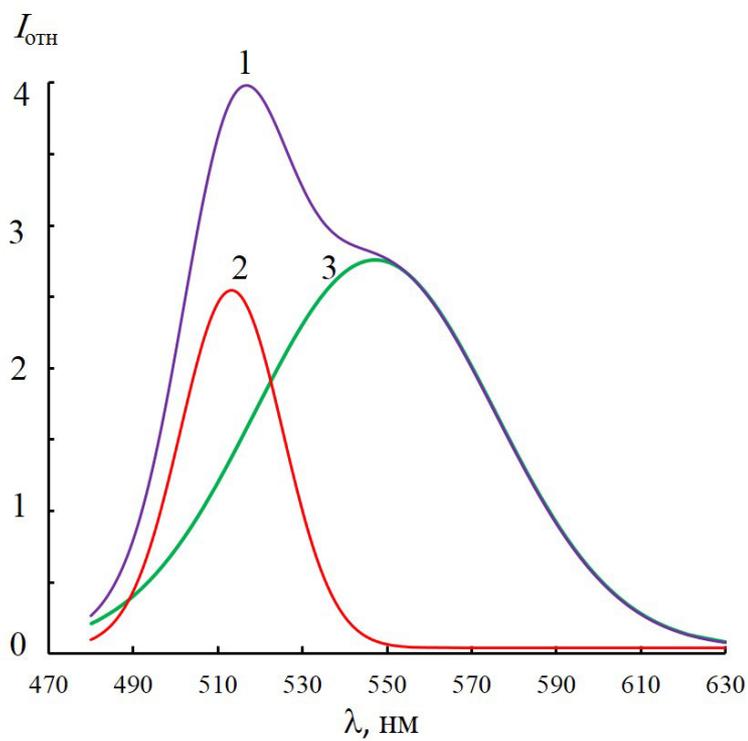
На рис. 3.7, (кривые 1) представлены спектры флуоресценции  $\Phi$  как водного раствора (а), так и мицеллярных растворов с гидродинамическими радиусами  $R_h=4,9$  нм (б),  $R_h=4,9$  нм (в) и  $R_h=14,4$  нм (г) при возбуждении 440 нм. При использовании этой длины волны возбуждаются молекулы  $\Phi$ , находящиеся в анионной (а также катионной и нейтральной) формах. На этих же рисунках представлено разделение спектров на две компоненты (кривые 2,3). Кривая 2 относится к флуоресценции дианионной формы  $\Phi$ , кривая 3 – к флуоресценции анионной форме  $\Phi$ .



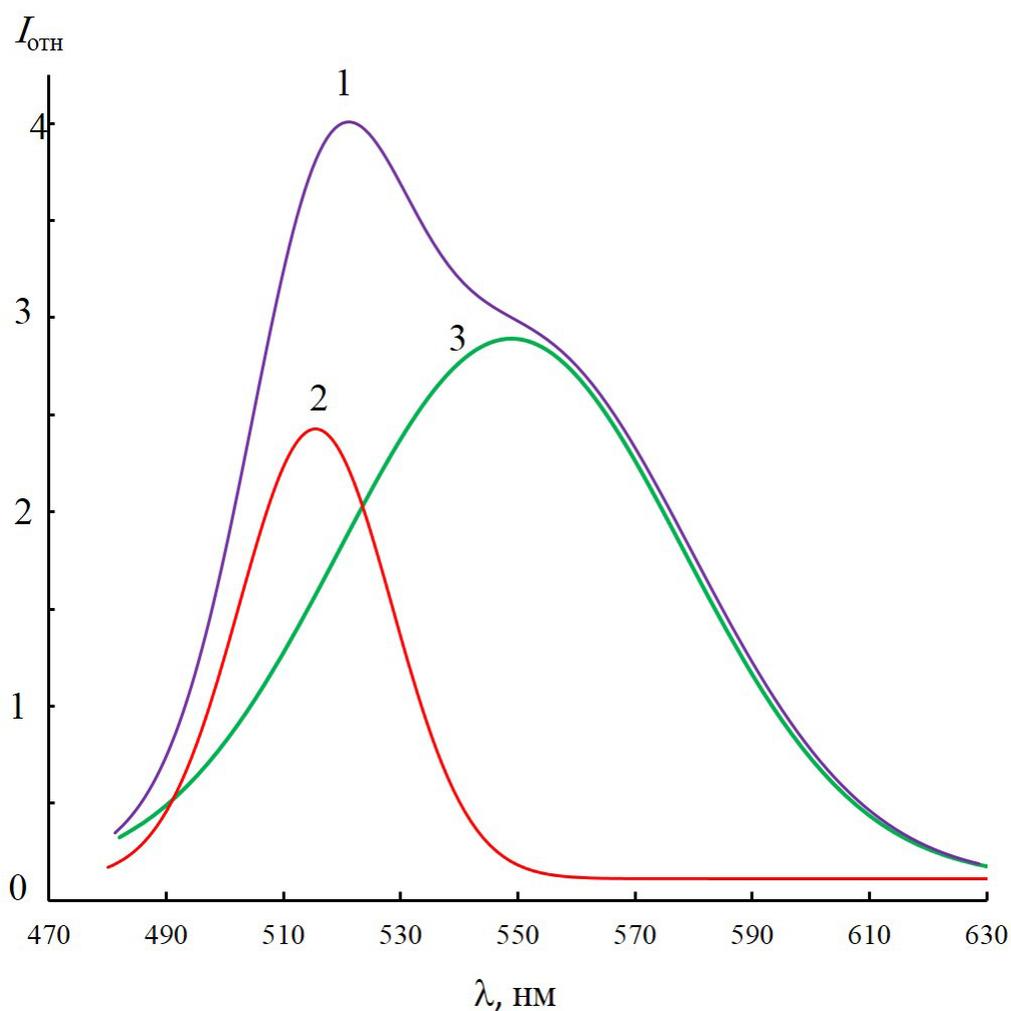
a)



б)



в)



з)

Рис. 3.7. Спектры флуоресценции водного раствора  $\Phi(a)$  водно-мицеллярных растворов  $\Phi$  с гидродинамическими радиусами: 4,9(б), 9,3(в) и 14,4 нм (г). 1- исходные спектры. 2, 3– выделенные компоненты. Концентрация красителя  $10^{-5}$  моль/л. Длина волны возбуждения флуоресценции 440 нм.

Были определены интенсивности выделенных полос в спектрах поглощения и флуоресценции, а затем вычислено отношение  $\frac{I_3}{I_2}$ . На рис. 3.8 представлены зависимости отношения  $\frac{I_3}{I_2}$  полученные как из спектров поглощения (кривая 1) так и из спектров флуоресценции (кривая 2) от

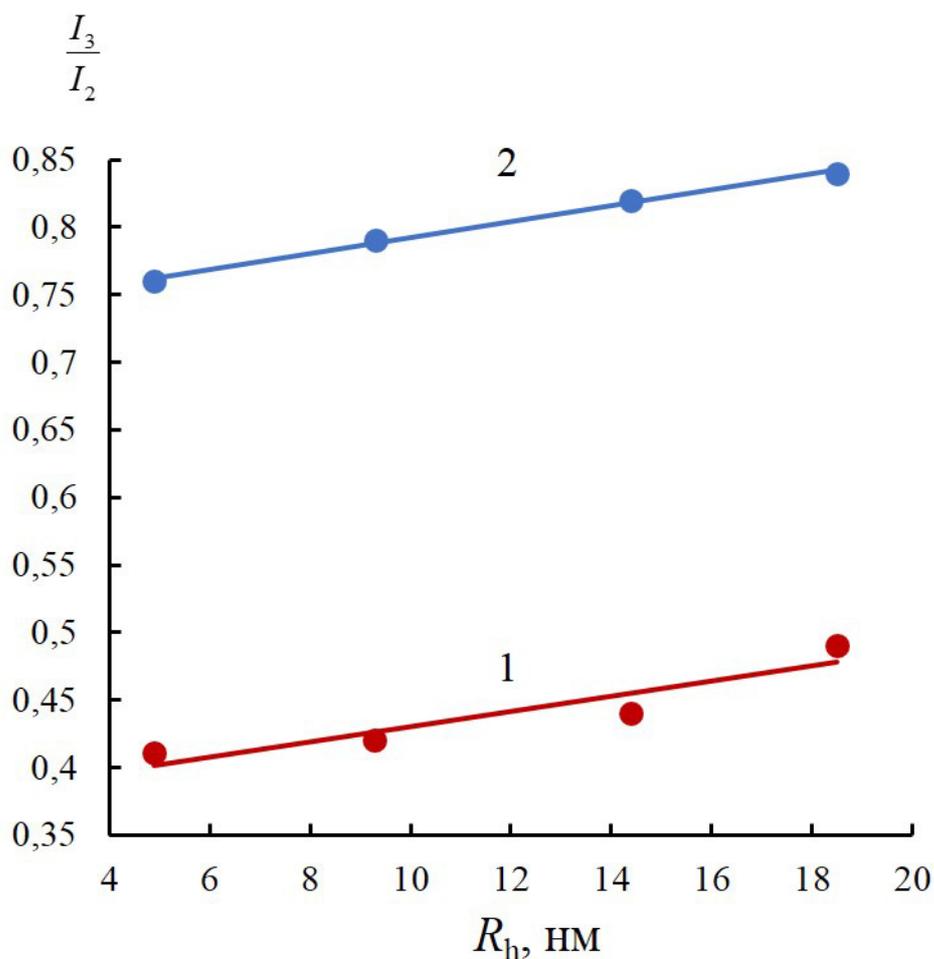


Рис. 3.8. Зависимости отношения интенсивностей  $\frac{I_3}{I_2}$  (1, 2), определенные из спектров поглощения (1) и флуоресценции (2)  $\Phi$  от гидродинамического радиуса мицелл  $R_h$ . Концентрация красителя  $10^{-5}$  моль/л.

гидродинамического радиуса мицелл  $R_h$ . Из рис. 3.8 видно, что с ростом

$R_h$  наблюдается увеличение отношения  $\frac{I_3}{I_2}$  полос, полученных как из спектров поглощения, так и спектров флуоресценции, при этом ход зависимостей

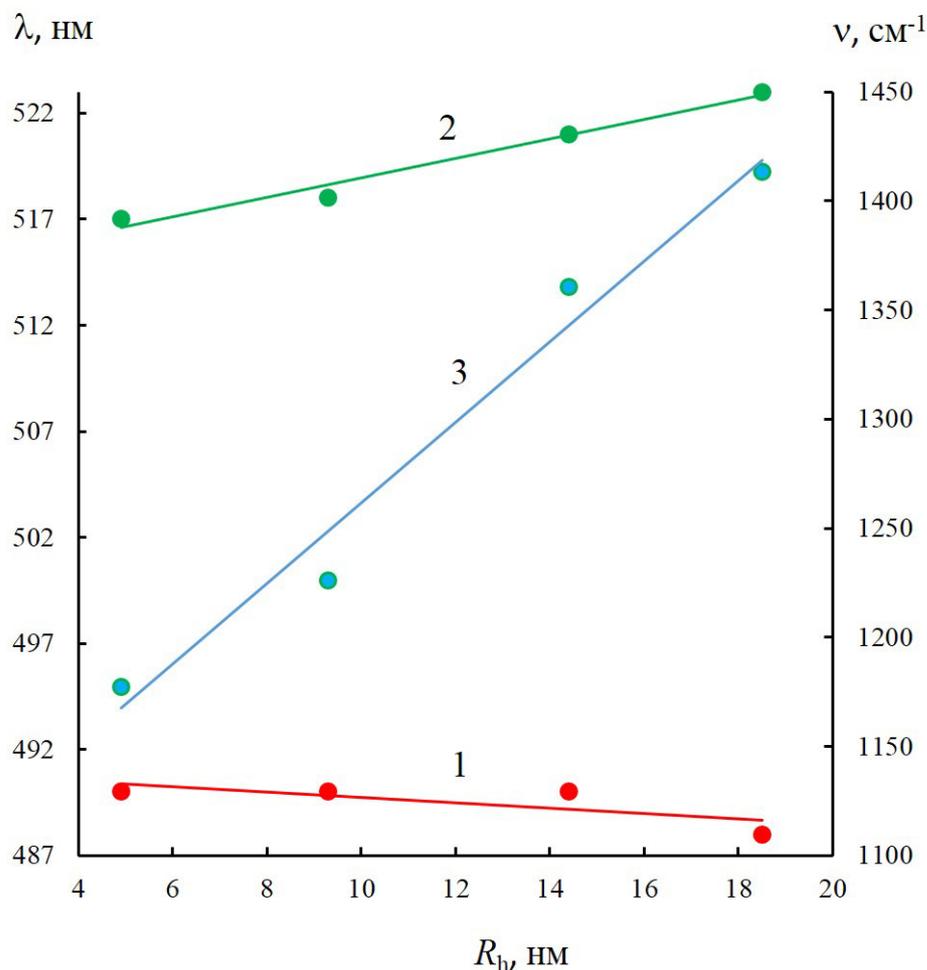


Рис.3.9. Зависимости длины волны максимумов спектров поглощения (1) и флуоресценции (2) и стоксовского сдвига  $\Delta\nu$  (3) флуоресцеина в водно-мицеллярных растворах от гидродинамического радиуса мицелл  $R_h$ . Концентрация красителя  $10^{-5}$  моль/л.

$\frac{I_3}{I_2}(R_h)$  для спектров поглощения и флуоресценции практически одинаков.

Результаты исследования спектральных характеристик  $\Phi$  представленные на рис. 3.8 указывают на то, что с ростом  $R_h$  увеличивается доля анионной формы красителя в формировании спектров поглощения и флуоресценции.

Как показали результаты измерения спектральных характеристик  $\Phi$  в мицеллярных растворах наблюдаются сдвиги спектров как поглощения, так и спектров флуоресценции при изменении гидродинамического радиуса  $R_h$  (рис. 3.9). При этом положение максимума спектра поглощения  $\Phi$  с ростом  $R_h$  сдвигается в коротковолновую область (рис. 3.9, кривая 1), в то время как максимум спектра флуоресценции сдвигается в длинноволновую область (рис. 3.9, кривая 2). Для анализа этих сдвигов были вычислены стоксовские сдвиги  $\Delta\nu = \nu_a - \nu_f$  ( $\nu_a, \nu_f$  - частоты максимумов спектров поглощения и флуоресценции, соответственно) для различных значений  $R_h$ . На рис. 3.9 (кривая 3) представлена зависимость  $\Delta\nu$  от  $R_h$  для растворов  $\Phi$ . Из рис. 3.9 видно, что с ростом  $R_h$  увеличивается стоксовский сдвиг спектров  $\Phi$ .

Изменение величин стоксовского сдвига спектров указывает на то, что геометрия молекул красителя в возбужденном состоянии отличается от основного состояния. Поэтому при исследовании поведения молекул красителей в мицелле важным является определение изменения дипольного момента молекулы при возбуждении.

Для получения информации изменения дипольного момента  $\Phi$  в возбужденном состоянии определим отношение  $\frac{\mu_e}{\mu_g}$ , где  $\mu_e$  и  $\mu_g$  дипольные моменты молекул красителей в возбужденном и основном состоянии, соответственно по формуле [72 - 74]

$$\frac{\mu_e}{\mu_g} = \frac{m_1 + m_2}{m_1 - m_2}, \quad (3.1)$$

где  $m_1 = \frac{\nu_a - \nu_f}{f(\epsilon, n)}$ ;  $m_2 = \frac{\nu_a + \nu_f}{f(\epsilon, n) + 2g(n)}$ ;

$f(\epsilon, n) = \frac{2n^2 + 1}{n^2 + 1} \left( \frac{\epsilon - 1}{\epsilon + 2} - \frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \right)$  - функция полярности растворителя;

$$g(n) = \frac{3}{2} \cdot \frac{n^4 - 1}{(n^2 + 2)^2}; \quad \varepsilon - \text{диэлектрическая проницаемость среды; } n - \text{показатель}$$

преломления среды.

Из экспериментальных значений  $v_a$  и  $v_f$  определяем  $m_1$  и  $m_2$ , а затем и  $\frac{\mu_e}{\mu_g}$ . На рис. 3.10 представлена зависимость  $\frac{\mu_e}{\mu_g}$  от  $R_h$  мицелл для  $\Phi$ . Из рис.

3.10 видно, что с увеличением  $R_h$  наблюдается рост отношения  $\frac{\mu_e}{\mu_g}$ .

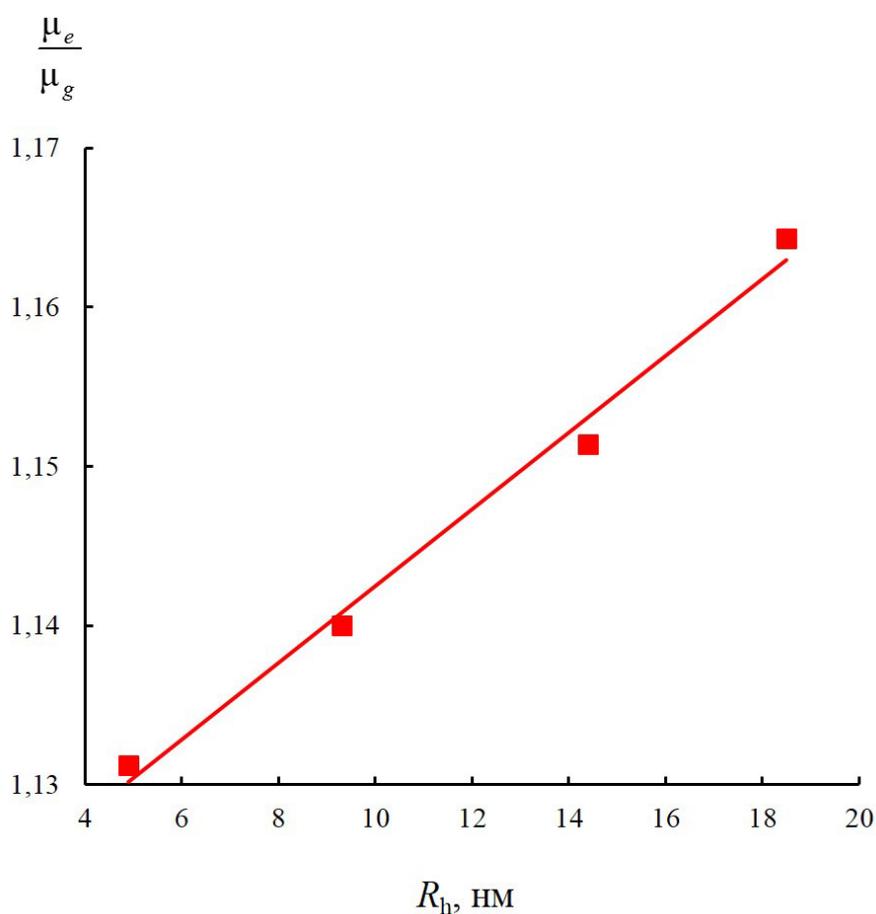


Рис. 3.10. Зависимость отношения дипольных моментов молекул  $\Phi$   $\frac{\mu_e}{\mu_g}$  от гидродинамического радиуса мицелл  $R_h$ .

Изменение размеров обратных мицелл влияет и на среднее время жизни  $\tau$  внедренных молекул  $\Phi$ . На рис. 3.11 (кривая 1) представлена

зависимость среднего времени флуоресценции  $\tau$  от  $R_h$ . Из рис. 4 видно, что с ростом  $R_h$  среднее время возбужденного состояния  $\Phi$  увеличивается.

Увеличение размера обратных мицелл приводит к уменьшению эффекта геометрического ограничения молекул  $\Phi$ , что должно сказываться на значениях степени анизотропии флуоресценции. Были определены значения анизотропии флуоресценции  $r$  для молекул  $\Phi$  в обратных мицеллах с различными их гидродинамическими радиусами  $R_h$ . На рис. 3.11 (кривая 2) представлена зависимость  $r(R_h)$ . Из рис. 3.11 видно, что анизотропия свечения уменьшается с ростом  $R_h$ . Но при всех исследованных значениях  $R_h$  степень анизотропии свечения в водно-мицеллярных растворах  $\Phi$  выше значений, полученных в водных растворах (значения степени анизотропии флуоресценции  $\Phi$  в воде равна 0,09). Это указывает на то, что движение молекул исследованных красителей имеет больше ограничений в обратном мицелле, чем в чистой воде. Кроме того, растущее значение анизотропии излучения при малых значениях  $R_h$  показывают, что микросреда внутри водного пула обратной мицеллы сильно отличается от объемной воды.

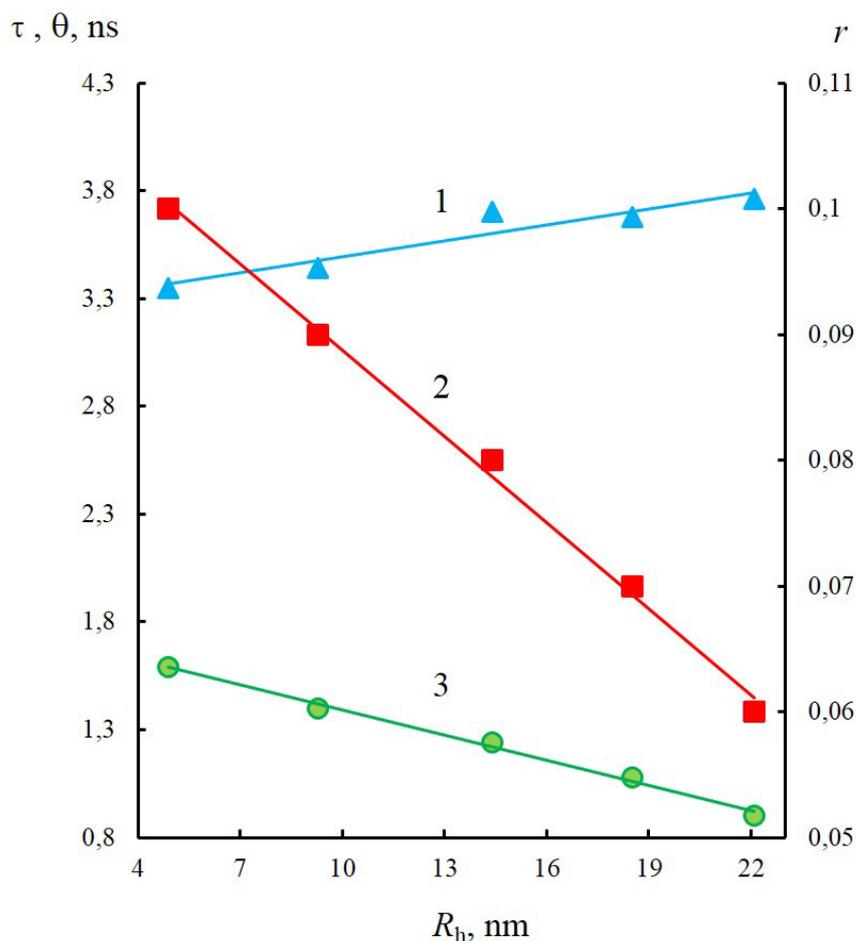


Рис. 3.11. Зависимости  $\tau$  (1)  $r$  (2) и  $\theta$ (3) от гидродинамического радиуса мицелл  $R_h$ .

Для установления расположения молекул  $\Phi$  внутри мицелл, оценим вращательную диффузию молекул красителя в зависимости от  $R_h$ . Для определения параметров вращательной диффузии люминесцирующих молекул воспользуемся модифицированной формулой Перрена

$$\frac{1}{r} = \frac{1}{r_0} \left( 1 + \frac{\tau}{\theta} \right), \quad (3.2)$$

где  $\theta = \frac{\eta V}{kT}$  – время вращательной корреляции,  $T$  – абсолютная температура,  $\eta$  – вязкость раствора,  $V$  – объем флуорофора,  $k$  – постоянная Больцмана,  $\tau$  – среднее время жизни возбужденных молекул,  $r_0$  – предельная анизотропия

излучения, которая была определена путем измерения анизотропии излучения водных растворах  $\Phi$  с добавлением сахарозы ( $r_0$  равна 0,31).

Используя экспериментальные значения  $r$ ,  $r_0$  и  $\tau$  для каждого из растворов с помощью (3.2) были вычислено время вращательной корреляции  $\theta$ . На рис. 3.11 (кривая 3) представлена зависимость времени вращательной корреляции  $\theta$  от  $R_h$ . В связи с тем, что  $\theta$  пропорционально вязкости  $\eta$ , наблюдаемое в эксперименте уменьшение  $\theta$  с ростом гидродинамического радиуса мицеллы связано с уменьшением микровязкости ограниченной водной среды внутри мицеллы. Это происходит при нахождении молекул  $\Phi$  в области поверхностной воды.

Таким образом, из анализа спектров поглощения и флуоресценции молекул флуоресцеина в обратных мицеллах, установлено, что с ростом  $R_h$  увеличивается доля анионной формы красителя в формировании этих спектров. При этом увеличение размеров мицелл сопровождается ростом отношения дипольных моментов  $\Phi$  в возбужденном и основном состояниях  $\frac{\mu_e}{\mu_g}$ , обусловленное структурной реорганизацией мицелл. Установлено, что время вращательной корреляции  $\theta$  уменьшается с ростом  $R_h$ , указывающее на увеличение микровязкости окружения молекул  $\Phi$ , что объясняется их локализацией в области поверхностной воды.

### **3.3. Спектральные характеристики галогенпроизводных флуоресцеина в водно-мицеллярных растворах.**

Были измерения спектры поглощения и флуоресценции красителей в мицеллярных растворах для различных значений их гидродинамического радиуса  $R_h$ . На рис. 3.12, представлены спектры поглощения исследованных

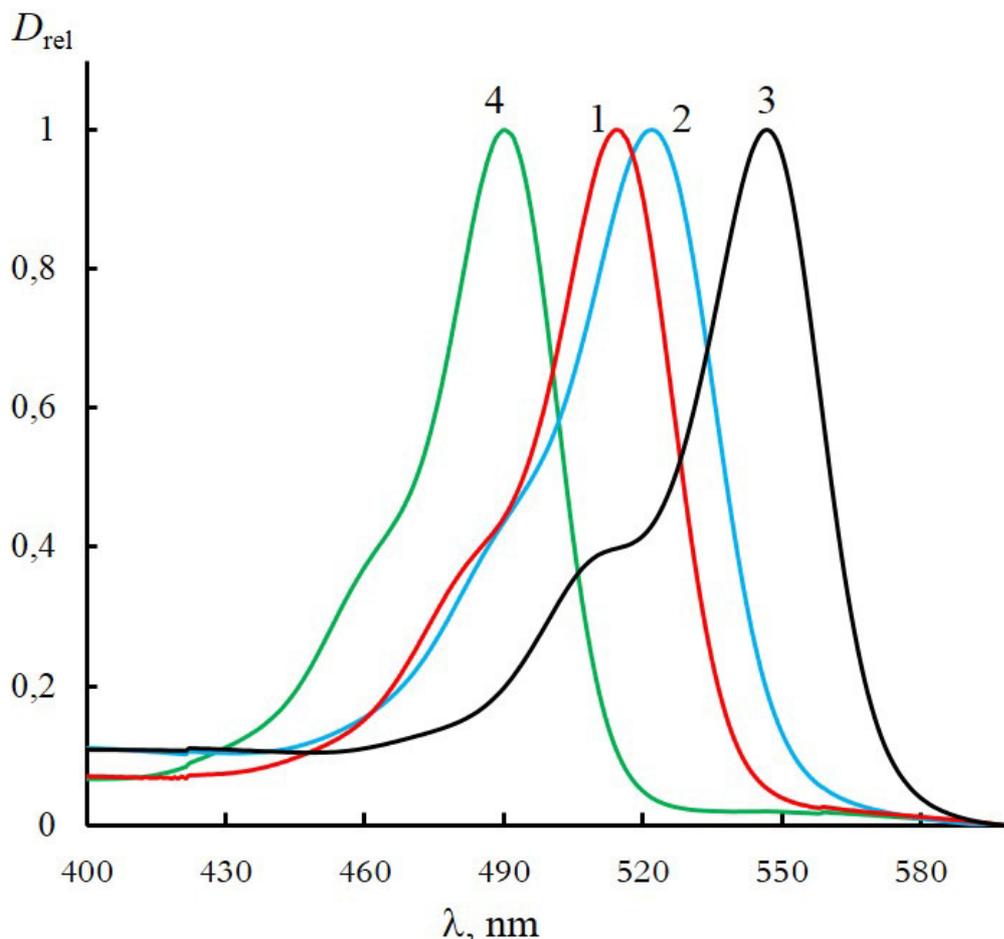


Рис. 3.12. Нормированные спектры поглощения в водных растворах Э(1), ЭР(2), БР(3) и Ф (4). Концентрация красителей равна  $10^{-5}$  моль/л.

красителей в водных растворах, а на рис. 3.13 спектры флуоресценции этих красителей в водных растворах. Из рис. 3.12 и 3.13 видно, что длины волн максимумов поглощения и флуоресценции для исследованных красителей отличаются. Так максимумы поглощения соответствуют для E – 530, ER – 523, BR – 547 и FL – 490 нм (рис. 3.12). Спектры флуоресценции этих

красителей имеют максимумы при  $\lambda = 549$ , ER – 536, BR – 572 и FL – 513 нм (рис. 3.13).

Были измерены спектры поглощения и флуоресценции молекул Э, Эр и

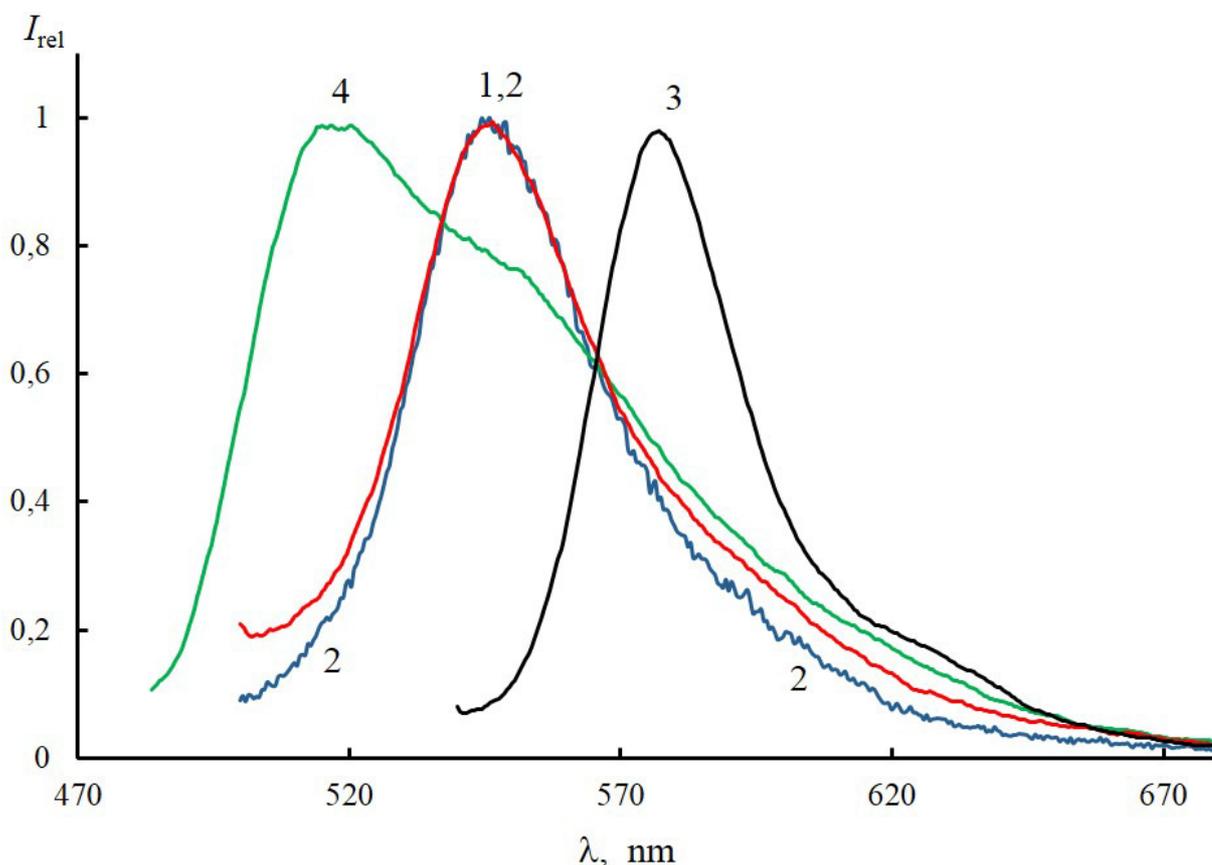


Рис. 3.13. Нормированные спектры и флуоресценции в водных растворах Э(1), Эр (2), BR(3) и ф (4). Концентрация красителей равна  $10^{-5}$  моль/л.

BR в водно-мицеллярных растворах. На рис. 3.14–3.16 представлены спектры поглощения красителей для различных значений  $R_h$ . Из рисунков видно, что наблюдается сдвиг спектра поглощения в коротковолновую область и увеличение оптической плотности  $D$  с ростом  $R_h$ .

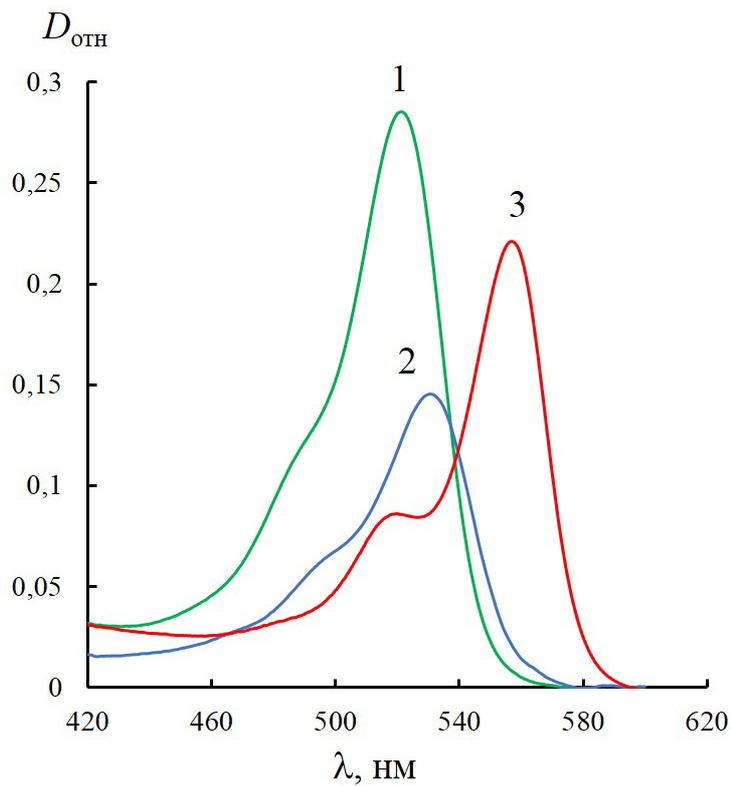


Рис. 3.14. Спектры поглощения Э(1), ЭР(2) и БР(3) в водномицеллярных растворах с  $R_h=4$ нм (1),  $R_h=4,8$  нм (2) и  $R_h=4,6$  нм (3).

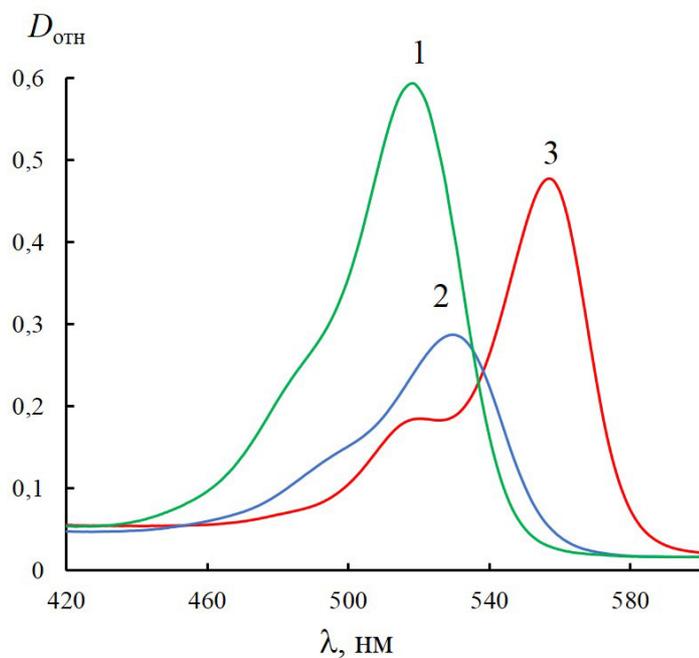


Рис. 3.15. Спектры поглощения Э(1), ЭР(2) и БР(3) в водномицеллярных растворах с  $R_h=7,4$ нм (1),  $R_h=10,5$  нм (2) и  $R_h=7,9$  нм (3).

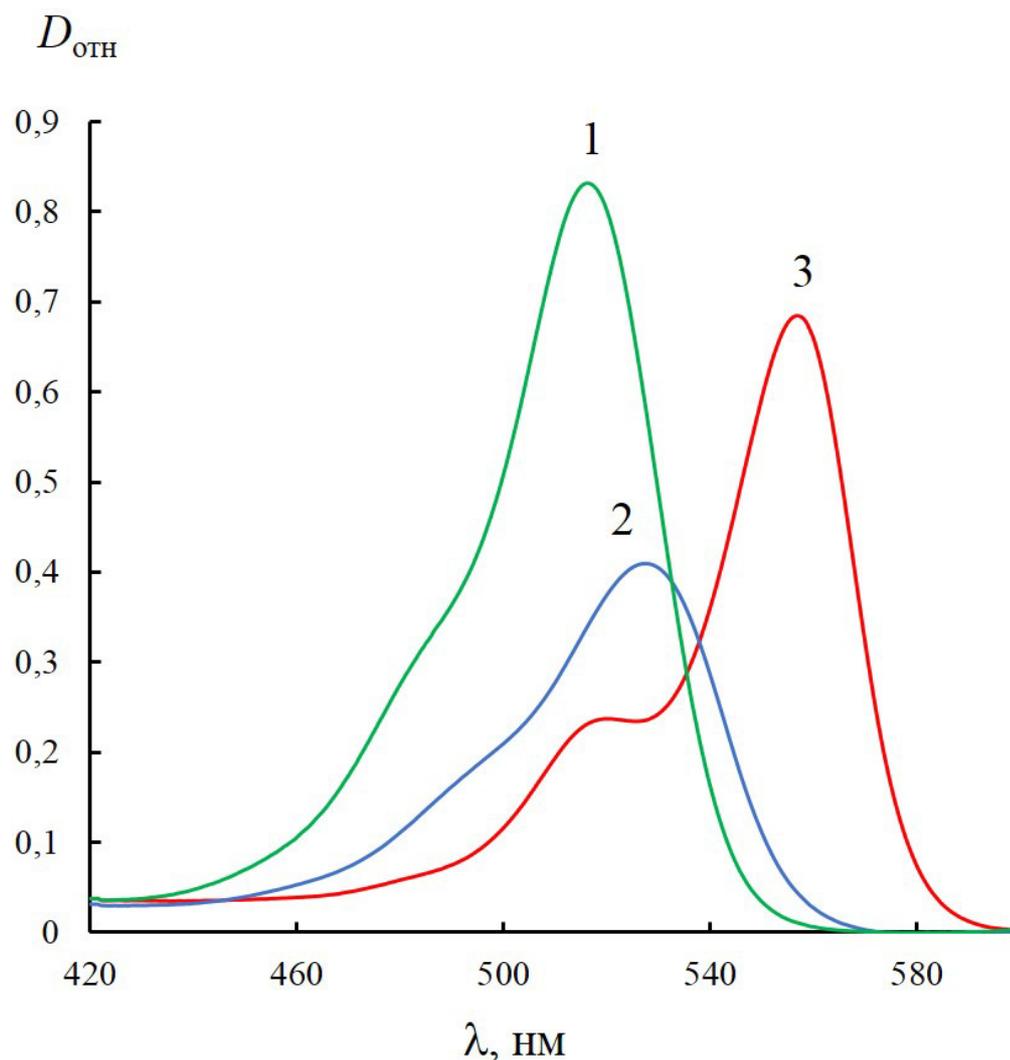


Рис. 3.16. Спектры поглощения Э(1), ЭР(2) и БР(3) в водномицеллярных растворах с  $R_h=14,8$  нм (1),  $R_h=15,8$  нм (2) и  $R_h=12,8$  нм (3).

На рис. 3.17 представлены зависимости положения максимумов спектров поглощения для исследованных красителей в водно-мицеллярных растворах. Из рис. 3.17 видно, что с ростом  $R_h$  наблюдается коротковолновый сдвиг спектров поглощения для Э (кривая 1) и ЭР (кривая 2). При этом сдвиг спектров поглощения для Э и ЭР при изменении  $R_h$  в интервале 4 – 20 нм одинаков (~ 6 нм). Для БР (рис. 3.17, кривая 3) сдвига спектра поглощения в исследованной области  $R_h$  не наблюдается.

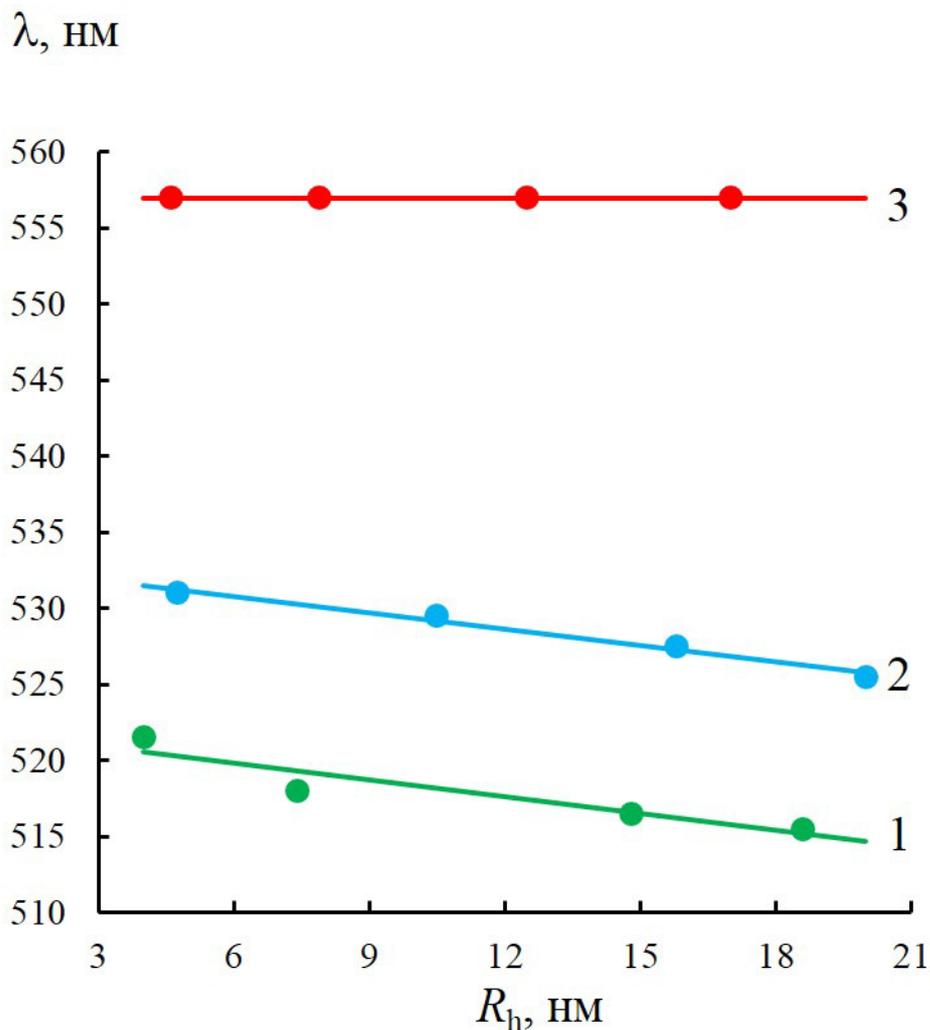


Рис. 3.17. Зависимости положения максимумов спектров поглощения в мицеллярных растворах для Э(1), ЭР(2) и БР(3).

При увеличении размеров мицелл наблюдается увеличение оптической плотности всех исследованных молекул красителей (рис. 3.18, кривые 1-3). При этом для Э и ЭР это увеличение значительное по сравнению с БР. Наблюдаемое красное смещение спектров поглощения может быть обусловлено двумя причинами: уменьшение полярности среды и процессами ассоциации молекул. Мы исследуем растворы малой концентрации, поэтому влияние процессов на спектры поглощения молекул можно не учитывать. Наблюдаемое поведение спектров поглощения (длинноволновый сдвиг

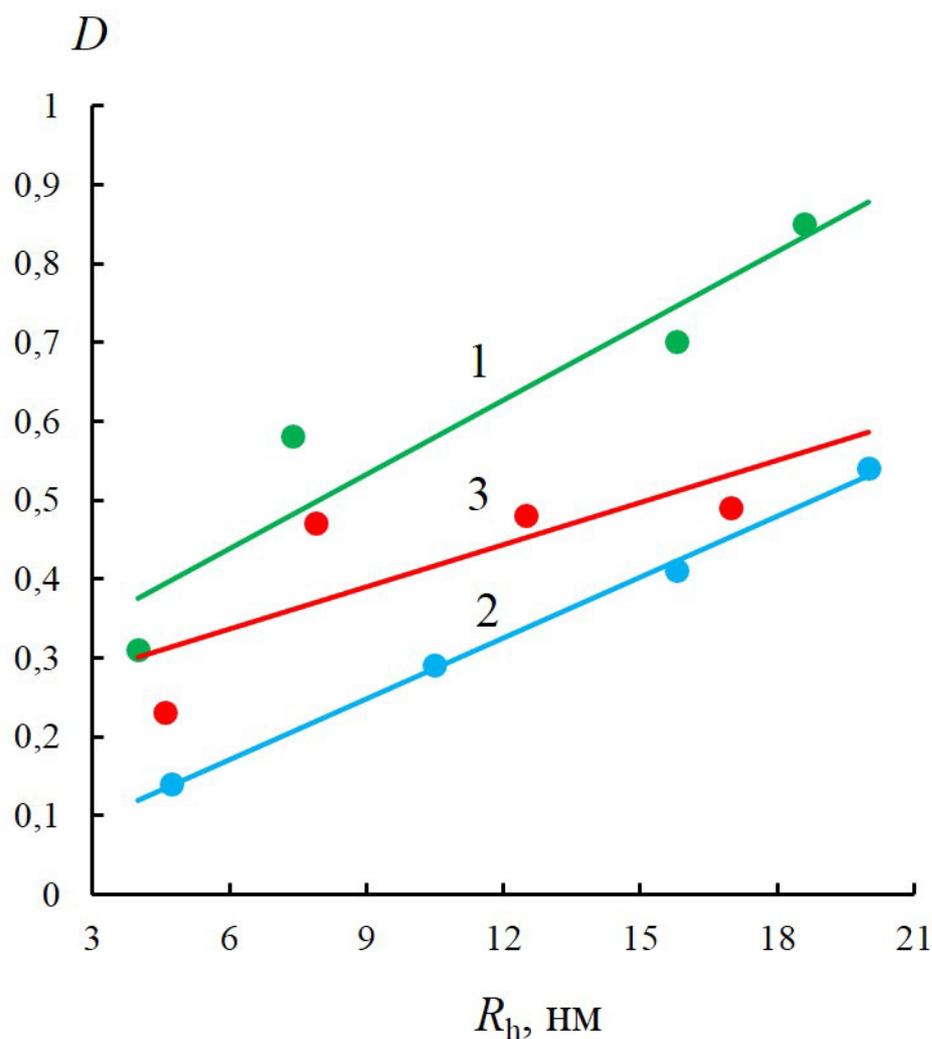


Рис. 3.18. Зависимости оптической плотности  $D$  в максимуме поглощения от  $R_h$  для Э(1), ЭР(2) и БР(3).

спектра) анионных красителей обусловлен уменьшением полярности среды, связанных с локализацией молекул красителей на границе мицелл. Молекулы красителей семейства флуоресцеина могут существовать в различных формах, основные являются анионные и дианионные, имеющие различные спектры поглощения, соответственно коротковолновый и длинноволновый. В связи с тем, что дианионная форма красителей Э, ЭР и БР имеют большее поглощение, поэтому в экспериментах наблюдается увеличение поглощения с ростом  $R_h$ , обусловленное переходом в структуре молекул от анионной к дианионной формы.

## Перестройка структуры молекул при изменении их микроокружения

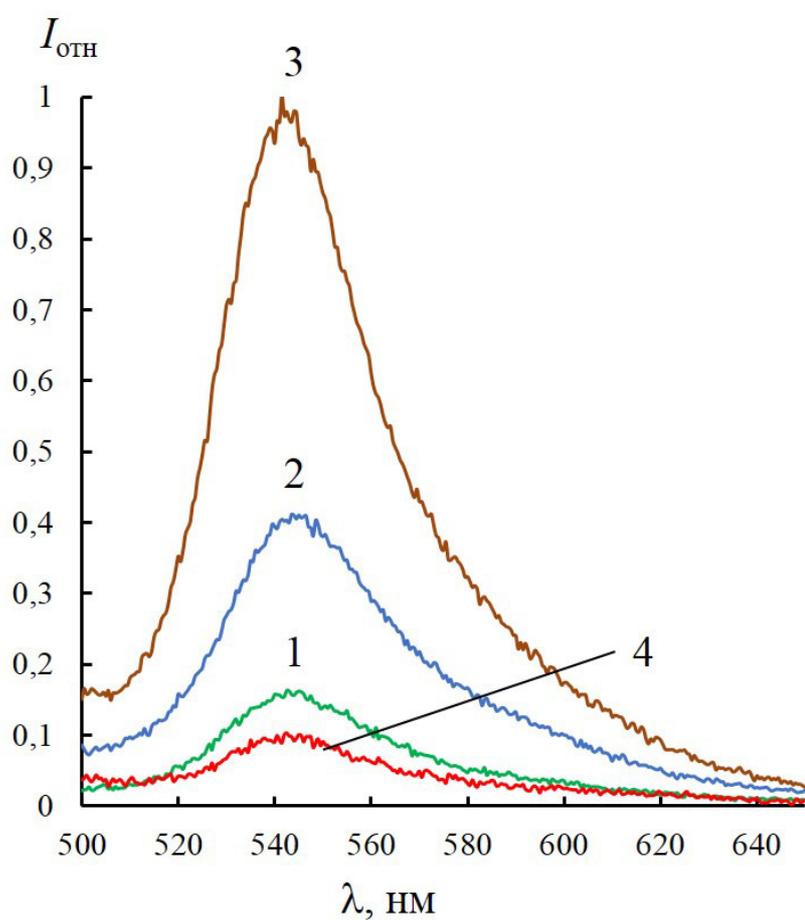


Рис. 3.19. Спектры флуоресценции Э в водно-мицеллярных растворах для различных  $R_h=4$  нм (1),  $R_h=7,4$  нм (2),  $R_h=14,8$  нм (3) и  $R_h=18,6$  нм (4).

должно приводит к изменению их дипольных молекул. Что должно

сказываться в изменение спектральных характеристик растворов красителей

и в первую очередь в стоксовских сдвигах  $\Delta\nu = \nu_a - \nu_f$  ( $\nu_a, \nu_f$  - частоты

максимумов спектров поглощения и флуоресценции, соответственно). Для

определения  $\Delta\nu$  были измерены спектры флуоресценции исследованных

красителей в мицеллярных системах с различным  $R_h$  и определены

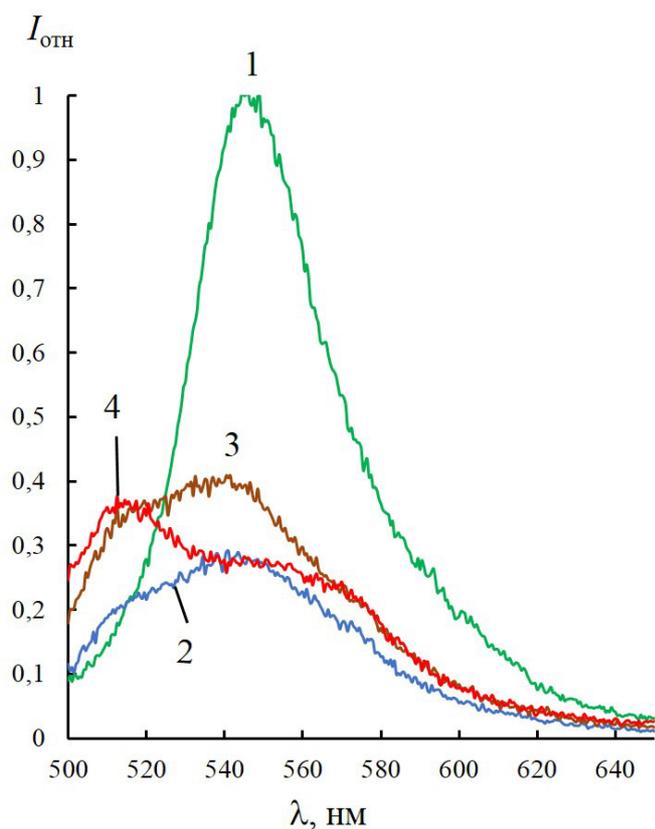


Рис. 3.20. Спектры флуоресценции ЭР в водно-мицеллярных растворах для различных  $R_h=4,8\text{нм}$  (1),  $R_h=10,5\text{нм}$  (2),  $R_h=15,8\text{нм}$  (3) и  $R_h=20\text{нм}$  (4).

положения их максимумов.

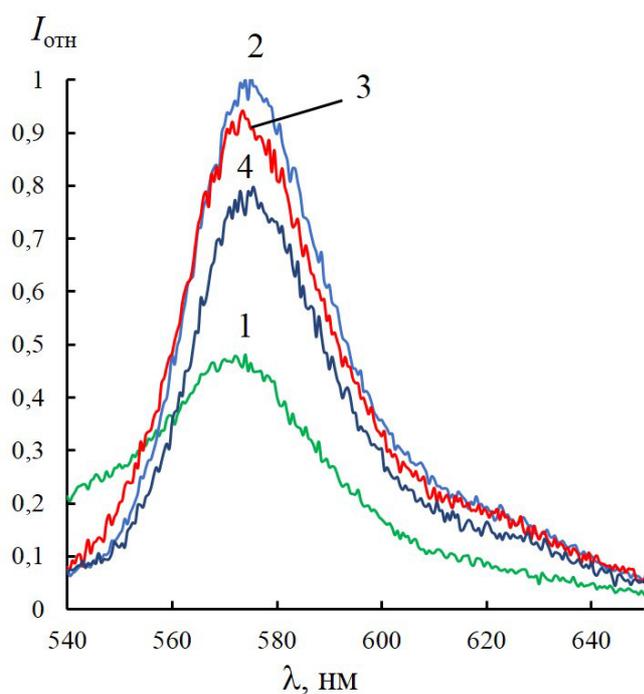


Рис. 3.21. Спектры флуоресценции БР в водно-мицеллярных растворах для различных  $R_h=4,6\text{нм}$  (1),  $R_h=7,9\text{нм}$  (2),  $R_h=12,5\text{нм}$  (3) и  $R_h=17\text{нм}$  (4).

На рис.3.19 –3.21 представлены спектры флуоресценции исследованных красителей, а рис. 3.22 представлены зависимости максимумов спектров флуоресценции красителей от  $R_h$ . Из рис.3.22 видно, что в мицеллярных растворах наблюдаются сдвиги спектров флуоресценции исследованных красителей в зависимости от гидродинамического радиуса  $R_h$ . Эти сдвиги различны для спектров поглощения и спектров флуоресценции и отличаются для различных молекул красителей. Так при увеличении  $R_h$  для Э сдвиг спектра поглощения равен 6 нм (рис. 3.17, кривая 1), при этом положение максимума спектра флуоресценции изменяется на 4 нм (рис. 3.22, кривая 1). Для БР наоборот сдвиг максимума спектра поглощения не наблюдается (рис. 3.17, кривая 3), в то время как максимум спектра флуоресценции сдвигается в длинноволновую область на 5 нм (рис. 3.22, кривая 3). Наибольшие для

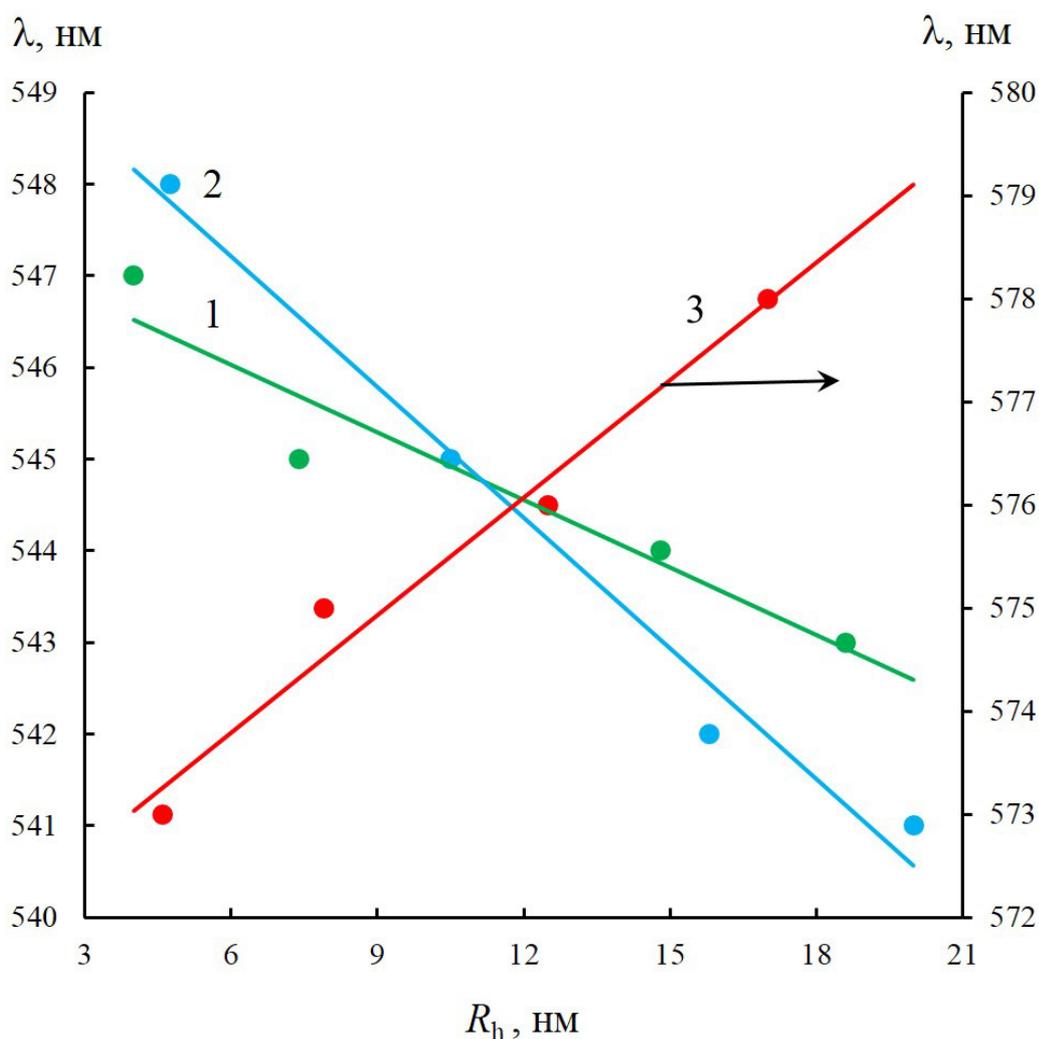


Рис. 3.22. Зависимости максимумов спектров флуоресценции Э(1), ЭР(2) и БР(3) от  $R_h$ .

исследованного ряда красителей сдвиги спектров поглощения и флуоресценции наблюдаются для ЭР: спектр поглощения сдвигается на 6 нм (рис. 3.17, кривая 2), а спектр флуоресценции на 7 нм (рис.3.22, кривая 2).

На основе измеренных спектров поглощения и флуоресценции молекул красителей в мицеллах были вычислены стоксовские сдвиги  $\Delta\nu = \nu_a - \nu_f$  ( $\nu_a, \nu_f$  - частоты максимумов спектров поглощения и флуоресценции, соответственно) для всех молекул красителей и различных значений  $R_h$ . На

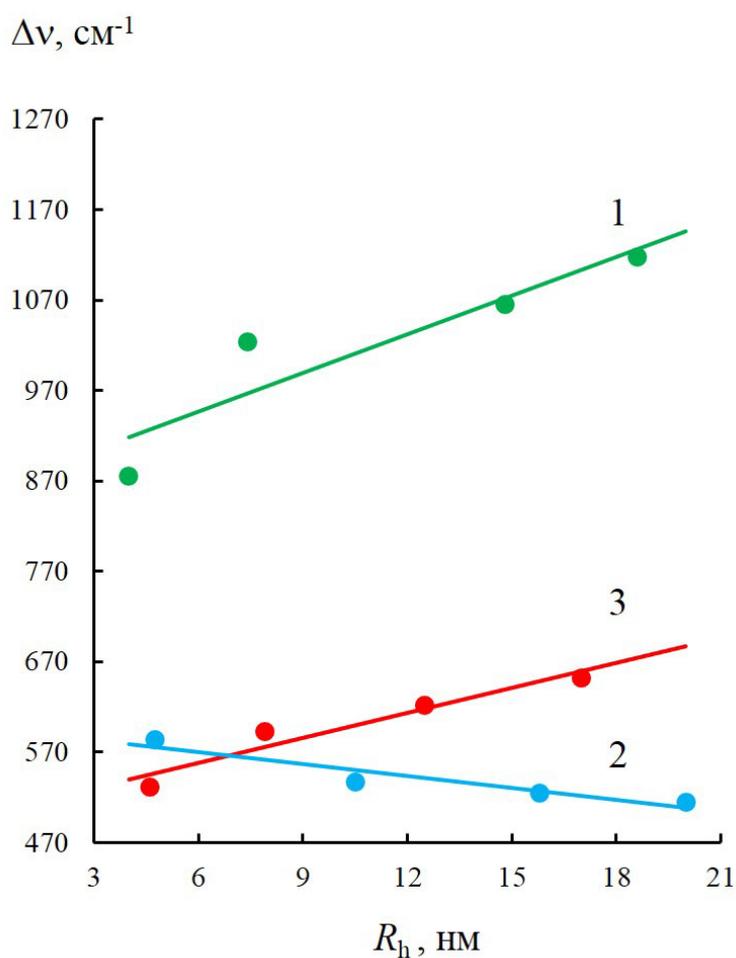


Рис.3.23. Зависимости стоксовых сдвигов  $\Delta\nu$  спектров флуоресценции Э(1), ЭР(2) и БР(3) от  $R_h$ .

рис. 3.23 представлены зависимости  $\Delta\nu$  от  $R_h$  для исследованных красителей.

Величины стоксовских сдвигов спектров отличаются для исследованных молекул красителей. Минимальные значения  $\Delta\nu$  (при  $R_h \sim 4$ ) при наблюдаются для БР  $\sim 540 \text{ cm}^{-1}$  и ЭР  $\sim 580 \text{ cm}^{-1}$ , наибольшее значение  $\Delta\nu$  имеет Э  $\Delta\nu \sim 900 \text{ cm}^{-1}$ . С ростом  $R_h$  для Э и ЭР наблюдается увеличение  $\Delta\nu$ . При этом для Э изменения стоксовского сдвига  $d(\Delta\nu) = \Delta\nu_{\omega_0=90} - \Delta\nu_{\omega_0=20} \sim 240 \text{ cm}^{-1}$ , в то время как для ЭР увеличение  $d(\Delta\nu) \approx 120 \text{ cm}^{-1}$ . Для БР наблюдается незначительное уменьшение стоксовского сдвига спектров

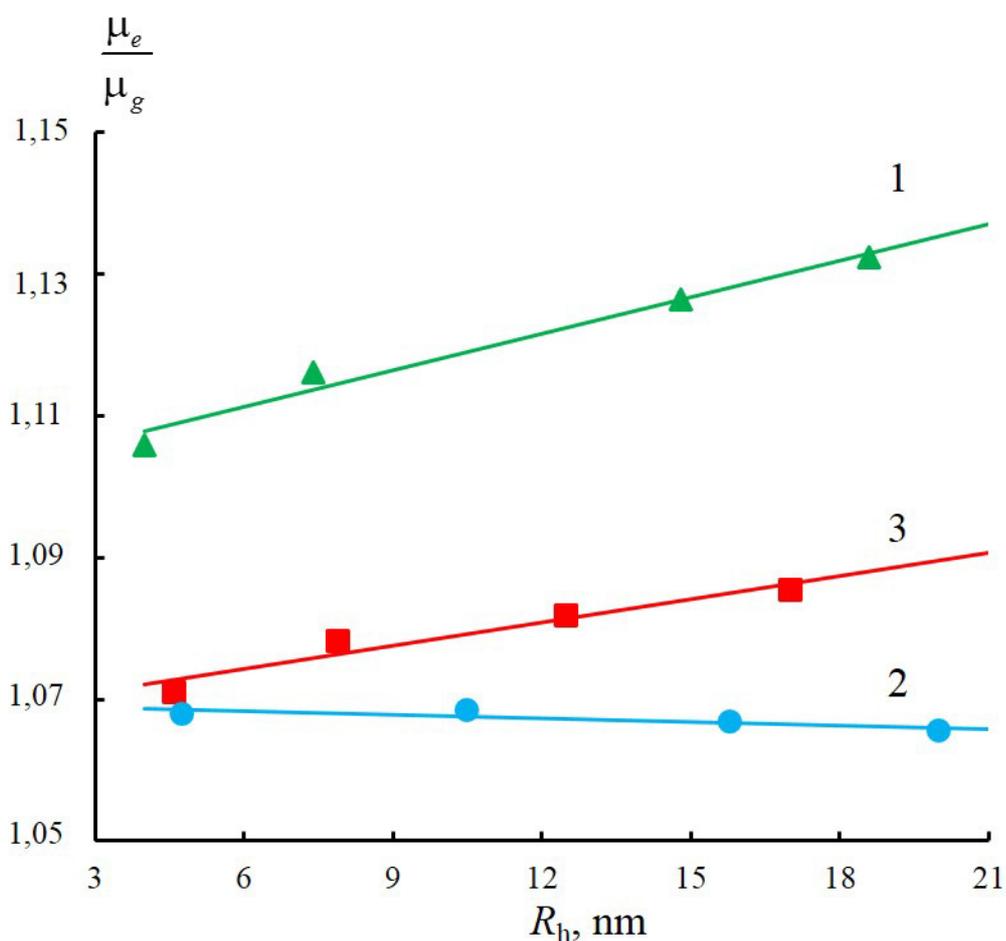


Рис. 3.24. Зависимости отношения  $\frac{\mu_e}{\mu_g}$  от  $R_h$  для Э (1), ЭР (2) и БР (3).

$d(\Delta\nu) \approx -70 \text{ cm}^{-1}$ .

Изменение величин стоксовского сдвига спектров указывает на то, что геометрия возбужденного состояния молекул красителей может отличаться

от основного состояния. Поэтому при исследовании поведения молекул красителей в мицелле важным является определение изменения дипольного момента молекулы при возбуждении. Для получения информации изменения дипольного момента в возбужденном состоянии определим отношение  $\frac{\mu_e}{\mu_g}$  по формуле (3.1).

На рис.3.24 представлены зависимости  $\frac{\mu_e}{\mu_g}$  от  $R_h$  мицелл для исследованных красителей. Из рис. 3.24 видно, что с увеличением  $R_h$  наблюдается рост отношения  $\frac{\mu_e}{\mu_g}$  для Э (кривая 1) и БР (кривая 3). Для ЭР (кривая 2) происходит незначительное уменьшение  $\frac{\mu_e}{\mu_g}$  с ростом  $R_h$ . Такое изменение отношения  $\frac{\mu_e}{\mu_g}$  с увеличением размера мицелл, связано в первую очередь с изменением локализацией молекул красителей в объеме обратной мицеллы: происходит увеличение количество молекул.

### Заключение

Таким образом, установлено изменение спектрально –флуоресцентных характеристик: сдвиг спектров поглощения и флуоресценции, увеличение стоксовского сдвига спектров при увеличении  $R_h$ . Величины стоксовских сдвигов спектров отличаются для исследованных молекул красителей. Минимальные значения  $\Delta\nu$  наблюдаются для БР  $\sim 540 \text{ cm}^{-1}$  и ЭР  $\sim 580 \text{ cm}^{-1}$ , наибольшее значение  $\Delta\nu$  имеет Э  $\Delta\nu \sim 900 \text{ cm}^{-1}$ . С ростом  $R_h$  для Э и БР наблюдается увеличение  $\Delta\nu$ , а для Э наблюдается незначительное уменьшение стоксовского сдвига спектров на  $\sim 70 \text{ cm}^{-1}$ . Изменение величин стоксовского сдвига связано с отличием отношения зависимости  $\frac{\mu_e}{\mu_g}$  для различных значений  $R_h$  мицелл для исследованных красителей. Показано, что

с ростом  $R_h$  наблюдается увеличение отношения дипольных моментов возбужденного и основного состояния  $\frac{\mu_e}{\mu_g}$ , обусловленное структурной реорганизации мицелл.

### 3.4. Фотофизические процессы в молекулах галогенпроизводных флуоресцеина в анионных обратных мицеллах

Были выделены эти полосы для всех красителей и всех значений  $R_h$ , а затем определены их интенсивности. На рис. 3.28 представлены зависимости

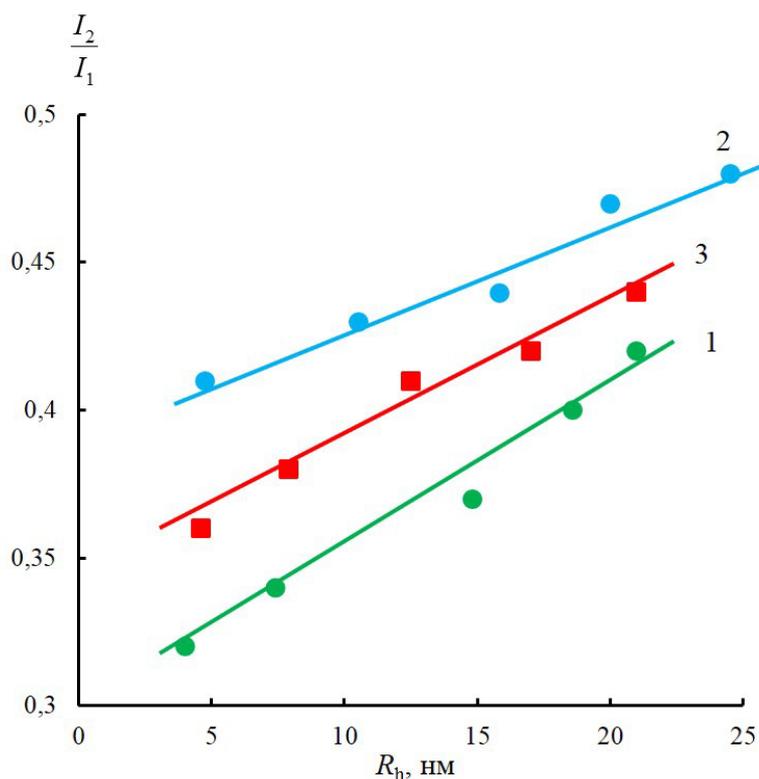


Рис. 3.25. Зависимости отношения интенсивностей поглощения анионной и дианионной полос  $\frac{I_2}{I_1}$  от гидродинамического радиуса  $R_h$  для Э(1), ЭР(2) и БР(3).

отношения  $\frac{I_2}{I_1}$  (где  $I_1$  — интенсивность дианионной полосы, а  $I_2$  — анионной) от гидродинамического радиуса мицелл  $R_h$  для всех красителей.

Из рис. 3.25 видно, что с ростом  $R_h$  наблюдается увеличение отношения  $\frac{I_2}{I_1}$  полос. Результаты исследования спектральных характеристик красителей, представленные на рис. 3.25 указывают на то, что с ростом  $R_h$  увеличивается вклад анионной формы красителя в формировании спектров поглощения. В связи с тем, что интенсивность поглощения пропорциональна концентрации молекул, представленные на рис. 3.25 данные указывают на то, что с ростом  $R_h$  происходит изменение соотношения концентраций дианионной и анионной формы красителей, что должно сказаться на флуоресцентных характеристиках исследованных растворов. В частности, среднего времени флуоресценции и степени анизотропии свечения.

Ниже приведено измерение время затухания флуоресценции исследованных систем. Удовлетворительное совпадение с экспериментальными кривыми дает аппроксимация затухания флуоресценции красителей в мицеллярных растворах двумя экспонентами

$$F(t) = A_1 e^{(-t/\tau_1)} + A_2 e^{(-t/\tau_2)}, \quad (3.3)$$

Здесь  $A_i$  – амплитуды экспонент,  $\tau_i$  – время затухания экспонент,  $t$  – время после возбуждения флуоресценции.

В табл. 3.1 представлены значения  $A_1$ ,  $\tau_1$ ,  $A_2$  и  $\tau_2$  для растворов красителей в мицеллах для различных значений  $R_h$ . В этой же таблице представлены значения времен жизни возбужденного состояния молекул красителей в водных растворах. Для водных растворов красителей наблюдается моноэкспоненциальное затухание свечения, в то время как для мицеллярных растворах затухание свечение описывается двумя экспонентами.

Таблица 3.1

**Параметры  $A_1$ ,  $\tau_1$ ,  $A_2$  и  $\tau_2$  для различных красителей и значений  $R_h$**

Краситель	$R_h$ , nm	$A_1$ , %	$\tau_1$ , ns	$A_2$ , %	$\tau_2$ , ns
Э	3,7	95,0	1,92	5,0	3,84
	7,3	99,0	1,84	1,0	3,62
	12,0	95,0	1,6	5,0	1,72
	17,5	97,0	1,39	3,0	5,25
	Водный раствор				
ЭР	4,8	98,0	0,38	2,0	1,21
	10,5	95,0	0,33	5,0	1,24
	15,8	96,0	0,3	4,0	1,63
	20,0	99,0	0,32	1,0	3,82
	Водный раствор				
БР	4,6	94,0	0,45	6,0	3,48
	7,9	96,0	0,51	4,0	3,9
	12,5	96,0	0,47	4,0	3,22
	17,0	91,0	0,24	9,0	2,94
	Водный раствор				

Наличие двух экспоненциальных зависимостей затухания свечения указывает на то, что внутри обратной мицеллы молекулы красителей находятся в различном окружении.

Для анализа влияния степени гидратации на кинетические характеристики флуоресценции молекул красителей удобно использовать среднее время жизни флуоресценции  $\langle \tau \rangle = \frac{A_1 \tau_1 + A_2 \tau_2}{A_1 + A_2}$ . На рис. 3.26 представлены зависимости  $\langle \tau \rangle$  от  $R_h$  для исследованных систем. В ряду красителей Э-ЭР-БР происходит увеличение энергии спин-орбитального

взаимодействия за счет эффекта внутреннего тяжелого атома. Замещающие тяжелые атомы усиливают спин-орбитальное взаимодействие в молекулах красителей, что приводит к уменьшению  $\langle \tau \rangle$ . При этом, с ростом  $R_h$  время  $\langle \tau \rangle$  уменьшается (см. рис. 3.26). Эти результаты указывают на то, что с ростом  $R_h$  ограничение движения, испытываемое флуорофором при связывании с обращенными мицеллами, уменьшается.

Таким образом, увеличение размера обратных мицелл приводит к

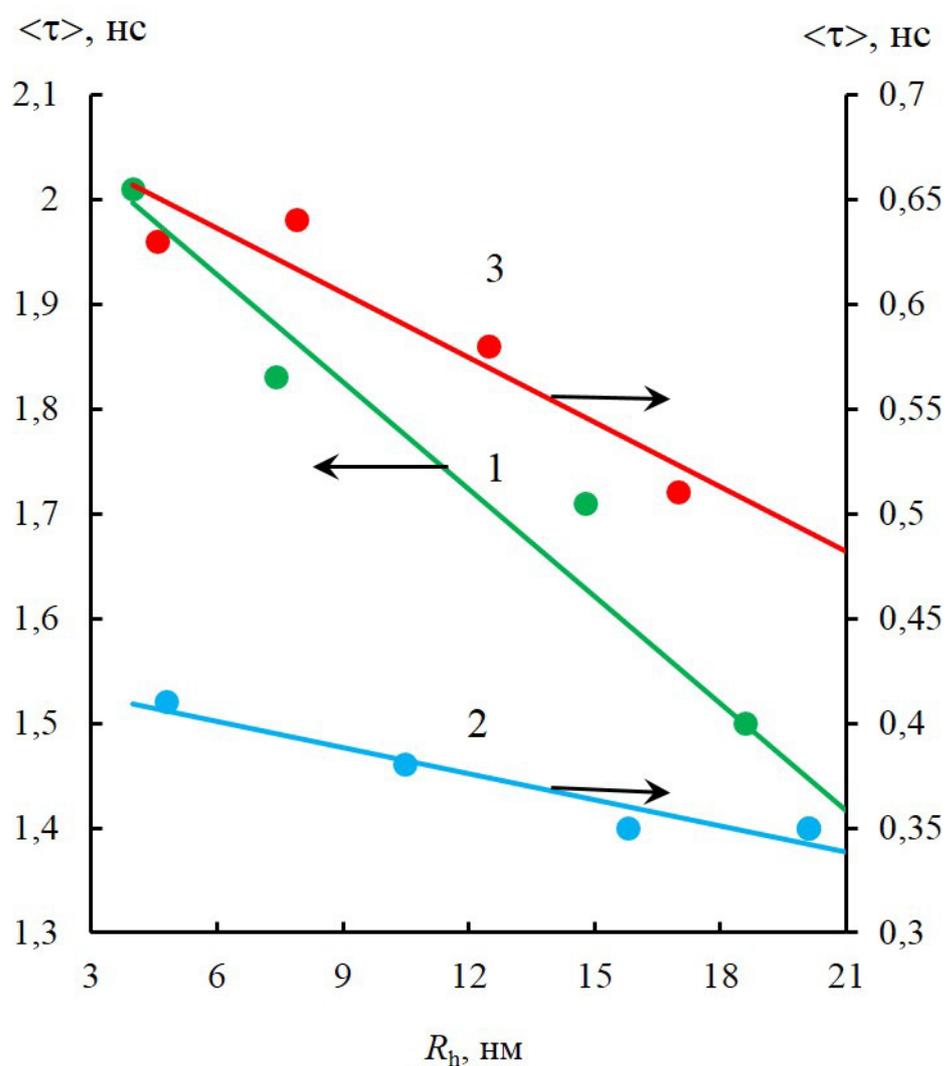


Рис. 3.26. Зависимости среднего времени жизни флуоресценции  $\langle \tau \rangle$  от гидродинамического радиуса мицелл  $R_h$  для Э(1) (основная шкала) и ЭР(2), БР(3) (дополнительная шкала).

уменьшению эффекта геометрического ограничения молекул исследованных красителей, что должно сказываться на значениях степени анизотропии флуоресценции. Были определены значения степени анизотропии

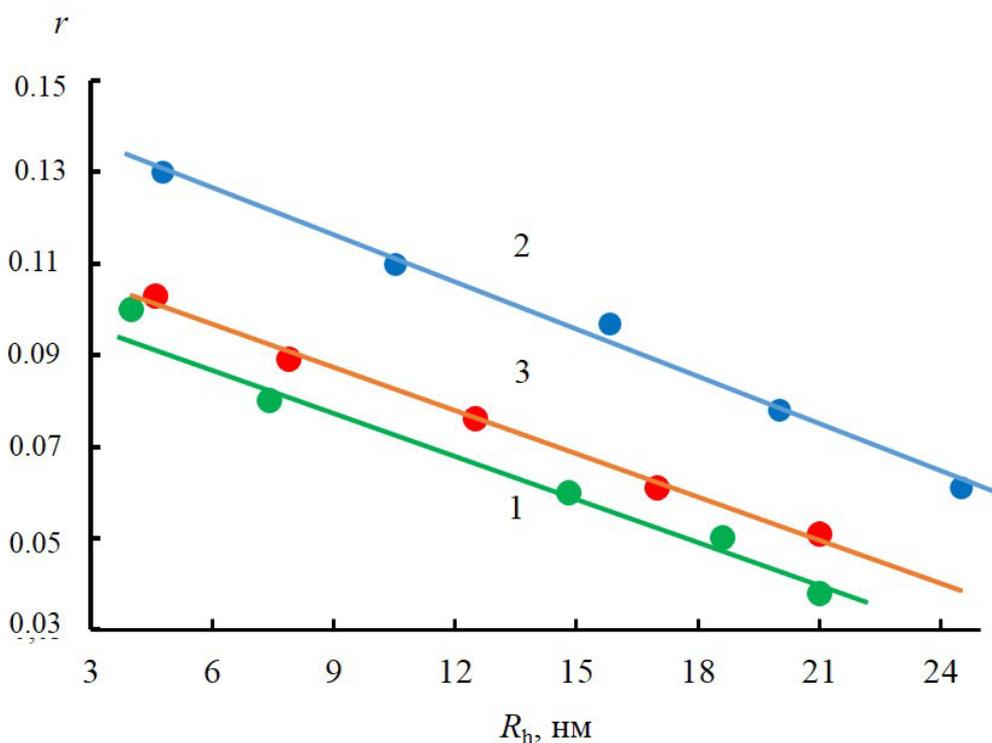


Рис. 3.27. Зависимости степени анизотропии флуоресценции  $r$  от гидродинамического радиуса  $R_h$  для Э(1), ЭР(2) и БР (3).

флуоресценции  $r$  для молекул красителей в обратных мицеллах с различными  $R_h$ . Степень анизотропии флуоресценции флуорофора зависит от вязкости окружения, а также от времени жизни возбужденного состояния молекул красителей. На рис. 3.27 представлены зависимости  $r(R_h)$  для исследованных красителей. Из рис. 3.27 видно, что для красителей с коротким временем жизни возбужденного состояния (ЭР и БР)  $r$  выше, чем для Э. При этом для всех исследованных мицеллярных систем с различными  $R_h$  степень анизотропии выше значений, полученных в водных растворах (значения степени анизотропии флуоресценции в воде равны  $r_{\text{Э}} = 0,04$ ,

$r_{ЭР}=0,04$ ,  $r_{БР} = 0,05$ ). Это указывает на то, что движение молекул исследованных красителей имеет больше ограничений в обратной мицелле, чем в чистой воде. Кроме того, большее значение  $r$  для малых  $R_h$  показывает, что микросреда внутри водного пула обратной мицеллы сильно отличается от объемной воды, при этом высокая вязкость наблюдается благодаря молекулам воды, которые прочно связаны с сульфонатной головной группой АОТ. Уменьшение степени анизотропии излучения с увеличением  $R_h$  (рис. 3.27) указывает на то, что молекулы красителей имеют больше свободного движения, которое достигается изменением расположения молекул красителей внутри мицеллы- они удаляются от головной группы сурфактанта к связанной воде в обратной мицелле.

Для установления расположения молекул красителей внутри мицелл, оценим вращательную диффузию молекул красителя в зависимости от  $R_h$ . Определим параметры вращательной диффузии люминесцирующих молекул с помощью формулы Перрена [75]

$$\frac{1}{r} = \frac{1}{r_0} \left( 1 + \frac{\langle \tau \rangle}{\theta} \right), \quad (3.4)$$

где  $\theta = \frac{\eta V}{kT}$  – время вращательной релаксации,  $T$  – абсолютная температура;  $\eta$  - вязкость раствора;  $V$  – объем молекул флуорофора;  $k$  – постоянная Больцмана;  $\langle \tau \rangle$  – среднее время жизни возбужденных молекул;  $r_0$  – предельная анизотропия излучения.

Уравнение (3.4) описывает линейную зависимость  $\frac{1}{r}$  от  $\frac{T}{\eta}$ , поэтому изменяя вязкость раствора и измеряя степень анизотропии, можно получить значение  $r_0$ . Для определения  $r_0$  мы провели измерения  $r$  при различных значениях вязкости водных растворов, которая изменялась путем добавления в растворы различных концентраций сахарозы. Для каждого из растворов методом наименьших квадратов были построены зависимости  $\frac{1}{r} \left( \frac{T}{\eta} \right)$  и

получены значения  $r_0$ . Были получены следующие значения  $r_0$ : Э - 0,34; ЭР - 0,27; БР - 0,32.

Используя измеренные значения  $r$ ,  $r_0$  и  $\langle \tau \rangle$  для каждого из растворов с помощью формулы (3.4) было вычислено времена вращательной релаксации  $\theta$ . На рис. 3.28 представлены зависимости времени вращательной релаксации  $\theta$  от  $R_h$  для Э (кривая 1), ЭР (кривая 2) и БР (кривая 3).

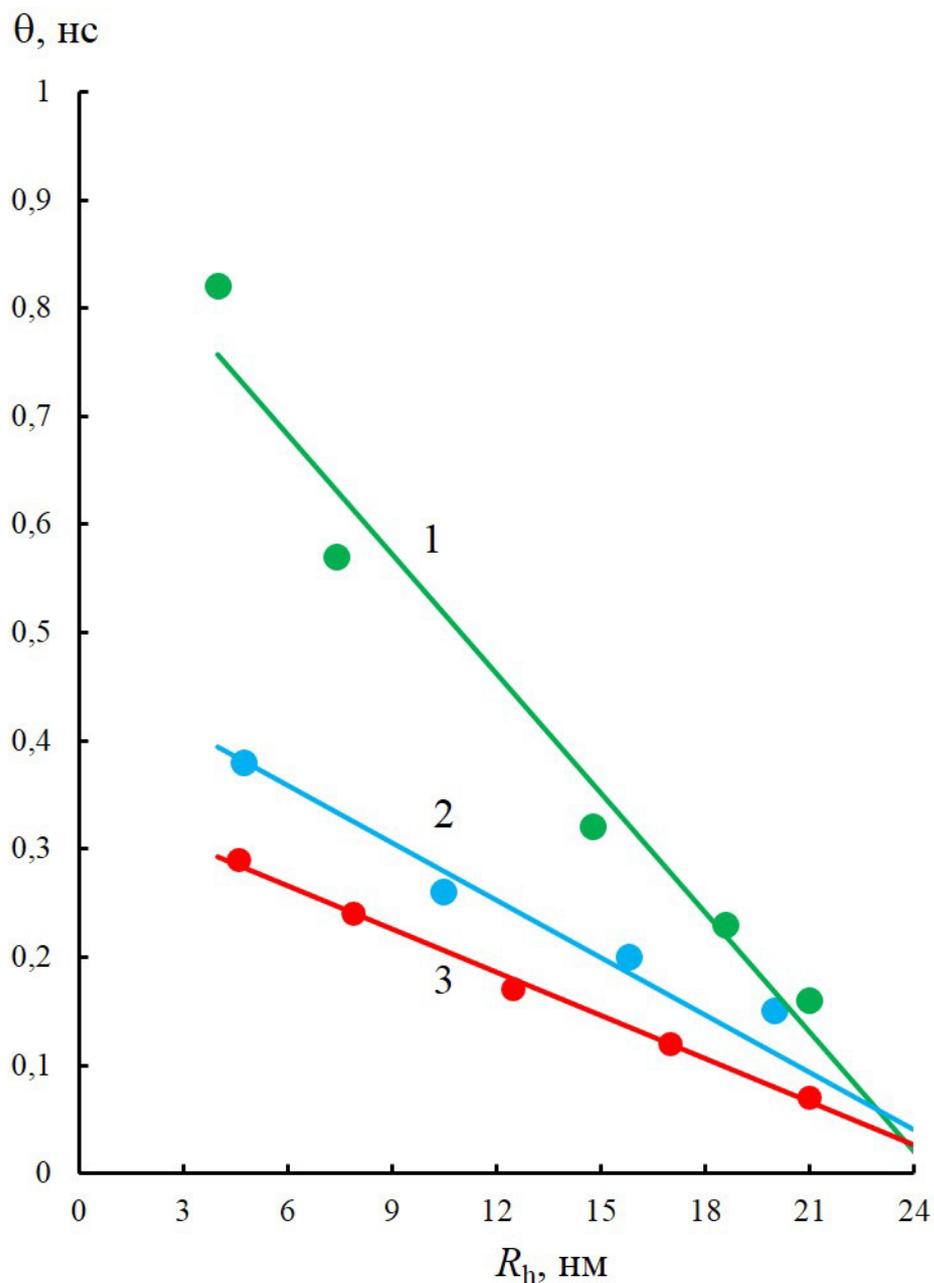


Рис. 3.28. Зависимости времени вращательной релаксации  $\theta$  от гидродинамического радиуса  $R_h$  для Э (1), ЭР (2) и БР (3).

Из рис. 3.28 видно, что  $\theta_E > \theta_{ER} > \theta_{BR}$ , т.е. в величине времени вращательной корреляции сказывается «эффект тяжелого атома». С ростом  $R_h$  происходит уменьшение  $\theta$  для всех трех исследованных красителей. При этом «скорость» уменьшения времени  $\theta$  от увеличения размера (радиуса) мицеллы  $d\theta = \frac{d\theta}{dR_h}$  имеет следующие значения:  $(d\theta)_E = 0,039$ ,  $(d\theta)_{ER} = 0,015$  и  $(d\theta)_{BR} = 0,013$ . В связи с тем, что  $\theta$  пропорционально вязкости  $\eta$ , наблюдаемое в эксперименте уменьшение  $\theta$  с ростом гидродинамического радиуса мицеллы связано с уменьшением микровязкости ограниченной водной среды внутри мицеллы. Это подтверждает, что молекулы красителей удаляются отгидратированных полярных групп ПАВ в мицелле.

Таким образом, установлено уменьшение среднего времени  $\langle \tau \rangle$  возбужденных состояний молекул исследованных красителей с ростом  $R_h$ , что объясняется ростом подвижности молекул воды и уменьшением эффекта их геометрического ограничения в обратных мицеллах.

Установлено, время вращательной релаксации  $\theta_E > \theta_{ER} > \theta_{BR}$ , т.е. в величине времени вращательной релаксации сказывается «эффект тяжелого атома». С ростом  $R_h$  происходит уменьшение  $\theta$  для всех трех исследованных красителей, что связано с увеличением микровязкости ограниченной водной среды внутри мицеллы.

### **3.5. Процессы димеризации молекул флуороновых красителей в мицеллярных структурах**

Исследование процессов димеризации молекул красителя, влияния локализации молекул в обратных мицеллах на эффективность димеризации и структуру димеров представляет интерес не только для применения флуоресцентных зондов, но и детали комплексообразования молекул в ограниченных условиях важны для фундаментальной фотохимии.

В данной параграфе представлены результаты исследования эффективности димеризации молекул, структуры димеров и термодинамических характеристик комплексообразования флуоресцеина (Ф) и его галогенпроизводных: эозина (Э), эритрозина (ЭР), бенгальского розового (БР) (анионных при физиологических значениях рН (7,4)) в обратных мицеллах.

Были измерены спектры поглощения красителей больших концентраций в мицеллярных растворах для различных значений их гидродинамического радиуса  $R_h$ . В качестве примера, на рис. 3.29 представлены спектры поглощения Э. для трех значений  $R_h$ .

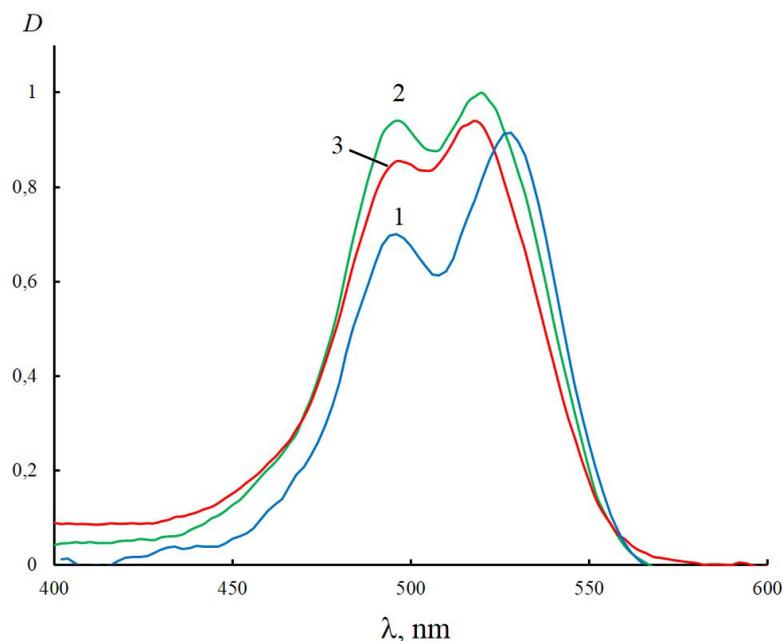


Рис. 3.29. Спектры поглощения Э ( $C = 10^{-2}$  моль/л) в обратных мицеллах с гидродинамическим радиусом: 5 (1), 12 (2) и 18(3) нм.

Из рис. 3.29 видно, что в случае водного раствора Э помещенного в мицеллы увеличивается интенсивность полосы поглощения с максимумом 490 нм, соответствующая димерам красителя [76]. Причем это изменение интенсивности полосы поглощения димеров красителей отличается для различных  $R_h$ . Аналогичные изменения наблюдались для других красителей.

Определим эффективности процессов ассоциации (димеризации) молекул красителей в мицеллах с различным  $R_h$ . Для этого рассмотрим деформации спектров поглощения исследуемых растворов красителей. Если раствор содержит смесь мономеров и димеров красителя, то его показатель поглощения  $\alpha$  на некоторой длине волны  $\lambda$  может быть записан в виде

$$\alpha(\lambda) = \alpha_M(\lambda) + \alpha_D(\lambda)(1 - X) = (\alpha_M(\lambda) - \alpha_D(\lambda))X + \alpha_D(\lambda), \quad (3.5)$$

где,  $\alpha_M(\lambda)$  и  $\alpha_D(\lambda)$  – показатели поглощения мономеров и димеров исследуемого раствора на длине волны  $\lambda$  соответственно,  $X$  – доля молекул красителя, находящихся в растворе в мономерном состоянии;  $(1-X)$  – доля его

димерных молекул или степень димеризации раствора. Описанные концентрационные деформации спектров поглощения позволяют определить величину степени ассоциации  $(1-X)$  исследуемых растворов. Для этого воспользуемся значением константы равновесия

$$K_D = \frac{1-X}{2CX^2}, \quad (3.6)$$

где  $C$  – общая концентрация раствора. Решая совместно уравнения (3.5) и (3.6), получаем

$$\frac{(\alpha(\lambda) - \alpha_D(\lambda))^2}{(\alpha_M(\lambda) - \alpha(\lambda))} = \frac{K_D(\alpha_M(\lambda) - \alpha_D(\lambda))}{C} \quad (3.7)$$

которое содержит два неизвестных:  $\alpha_A$ ,  $K_D$ . Для их определения мы использовали два спектра поглощения из семейства исследуемых растворов красителей с концентрациями  $C_1$  и  $C_2$ . Для этих спектров поглощения будут справедливы два уравнения типа:

$$\frac{(\alpha_n(\lambda) - \alpha_D(\lambda))^2}{(\alpha_M(\lambda) - \alpha_n(\lambda))} = \frac{K_D(\alpha_M(\lambda) - \alpha_D(\lambda))}{C_n}, \quad (3.8)$$

где  $n = 1, 2$ . Используя экспериментальные значения  $\alpha_{1,2}(\lambda)$ ,  $C_{1,2}$  и  $\alpha_M(\lambda)$  (в качестве спектра поглощения мономерных молекул  $\alpha_M(\lambda)$  использовался спектр поглощения разбавленных растворов красителей, в которых отсутствовал процесс димеризации) и решая систему уравнений (3.8) были получены спектры поглощения димеров  $\alpha_D(\lambda)$ . Доля мономеров  $X$  была определена с использованием значений  $\alpha_M$ ,  $\alpha_D$  и  $\alpha$  на длине волны, соответствующей максимуму поглощения мономеров  $\lambda_M$  для различных концентраций красителей и значений  $R_h$  по формуле

$$X = \frac{\alpha - \alpha_D}{\alpha_M - \alpha_D}. \quad (3.9)$$

А затем была определена величина степени ассоциации раствора  $(1 - X)$  [77].

На рис. 2 представлены зависимости  $(1-X)$  от гидродинамического радиуса мицелл  $R_h$  для исследованных растворов красителей.

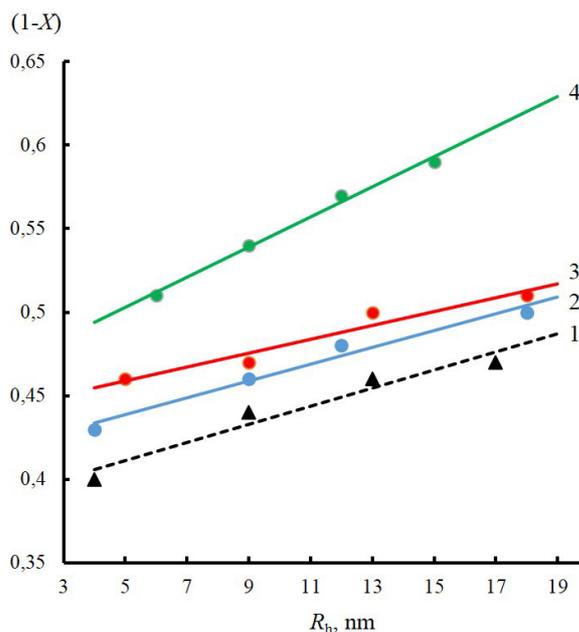


Рис. 3.30 Зависимости степени димеризации  $(1-X)$  от гидродинамического радиуса  $R_h$  для Ф(1), Э(2), ЭР(3) и БР (4). Концентрации красителей  $10^{-3}$  моль/л.

Из рис. 3.30 видно, что  $(1-X)$  для всех значений  $R_h$  увеличивается в ряду Ф-Э-ЭР-БР. Такое поведение связано с изменением вероятностей фотофизических процессов, обусловленных спин-орбитальным взаимодействием в многоатомных молекулах. Известно [78,79], что внутренние тяжелые атомы могут увеличивать спин-орбитальное взаимодействие между синглетным и триплетным состояниями. Вероятность таких процессов, сопряженных с влиянием спин-орбитальных взаимодействий, пропорционально значению сумм квадратов констант спин-орбитальной связи атомов в молекуле [79, 80]:

$$\sum \xi^2 = \sum_{i=1}^N \xi_i^2,$$

где  $\xi_i$ —константа спин-орбитальной связи атома в молекуле.

Проведем оценку вероятностей влияния внутренних тяжелых атомов исследованных красителей на процессы их димеризации, для этого определим  $\sum \xi^2$  для каждой молекулы. Значения  $\xi_i$  были взяты из [80]. Получены значения  $\sum \xi^2$  для F— $1.66 \cdot 10^5 \text{cm}^{-2}$ , для E— $2.43 \cdot 10^7 \text{cm}^{-2}$ , для ER— $1.02 \cdot 10^8 \text{cm}^{-2}$ , для BR— $1.04 \cdot 10^8 \text{cm}^{-2}$ .

Таким образом, рост спин-орбитального взаимодействия в молекулах исследованных красителей, вызванный тяжелым атомом, сопровождается увеличением степени димеризации (1-X) молекул в обратных мицеллах. Тенденция к димеризации молекул флуороновых красителей с увеличением галогенозамещения была отмечена в [81].

Кроме того, в ряду Э –ЭР – БР наблюдается увеличение электроотрицательности радикалов боковых группы молекул. С ростом  $R_h$ , как уже отмечалось выше, увеличивается доля анионных форм молекул красителей [81], что вызывает изменение электростатического взаимодействия между анионами красителей и гидратированными группами ПАВ. Такое изменение взаимодействия вызывает отличие степени димеризации молекул красителей для различных  $R_h$ . Как видно из рис. 3.30, наблюдается линейная зависимость  $(1-X)$  от  $R_h$ . На величину наклона этой зависимости влияет как величина массы внутреннего тяжелого атома, так и

величина заряда ионов красителей. Кроме того, увеличение доли димеров молекул приводит к увеличению размера мицелл (см. параграф 3.1).

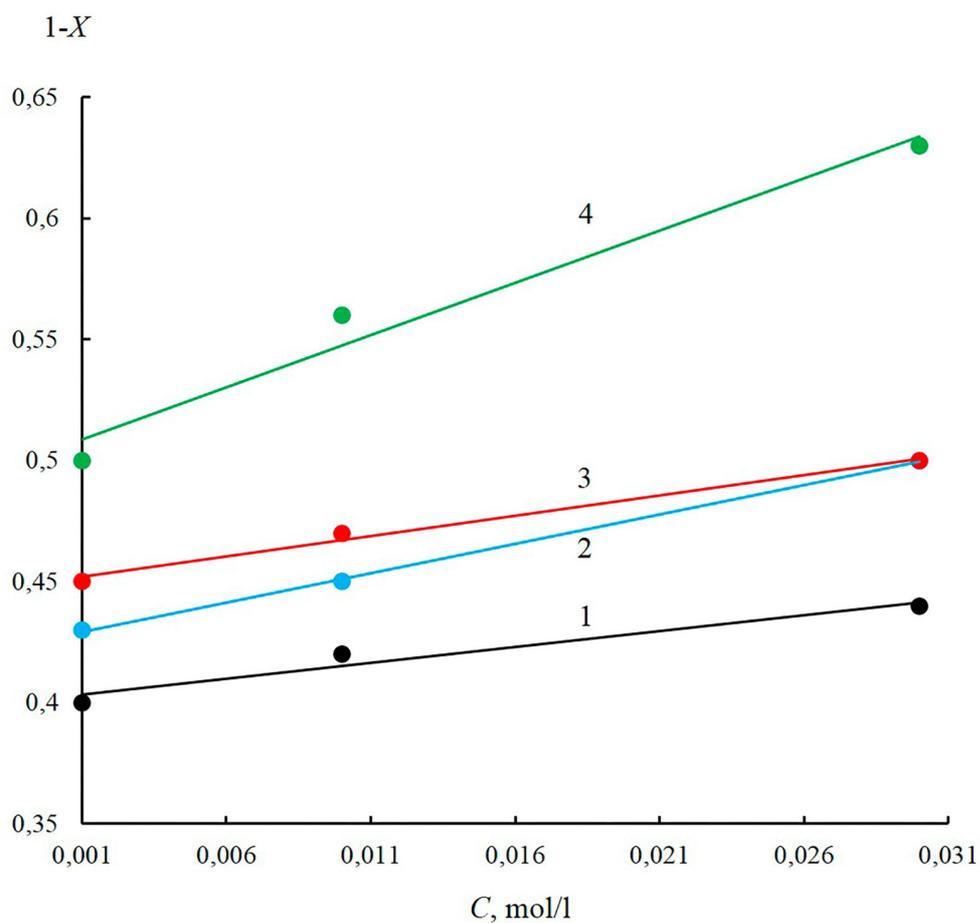


Рис. 3.31. Зависимости степени димеризации ( $1-X$ ) красителей F(1), E(2), ER(3), BR(4) от их концентрации для  $R_H=6$  нм.

Зависимости степени димеризации ( $1-X$ ) от концентрации для различных красителей в мицеллярных системах значительно отличаются. На рисунке 3.31 представлены зависимости ( $1-X$ ) от концентрации исследованных красителей для двух значений представлены на рис. 3.31 ( $R_h=6$  нм) рис. 3.32 ( $R_h=19$  нм). Из рис. 3.31, 3.32 видно, что в исследованной области концентраций  $10^{-3} - 3 \cdot 10^{-2}$  mol/l наименьшим значением ( $1-X$ ) обладает F (кривая 1), а наибольшим – BR (кривая 4). При этом, рост степени

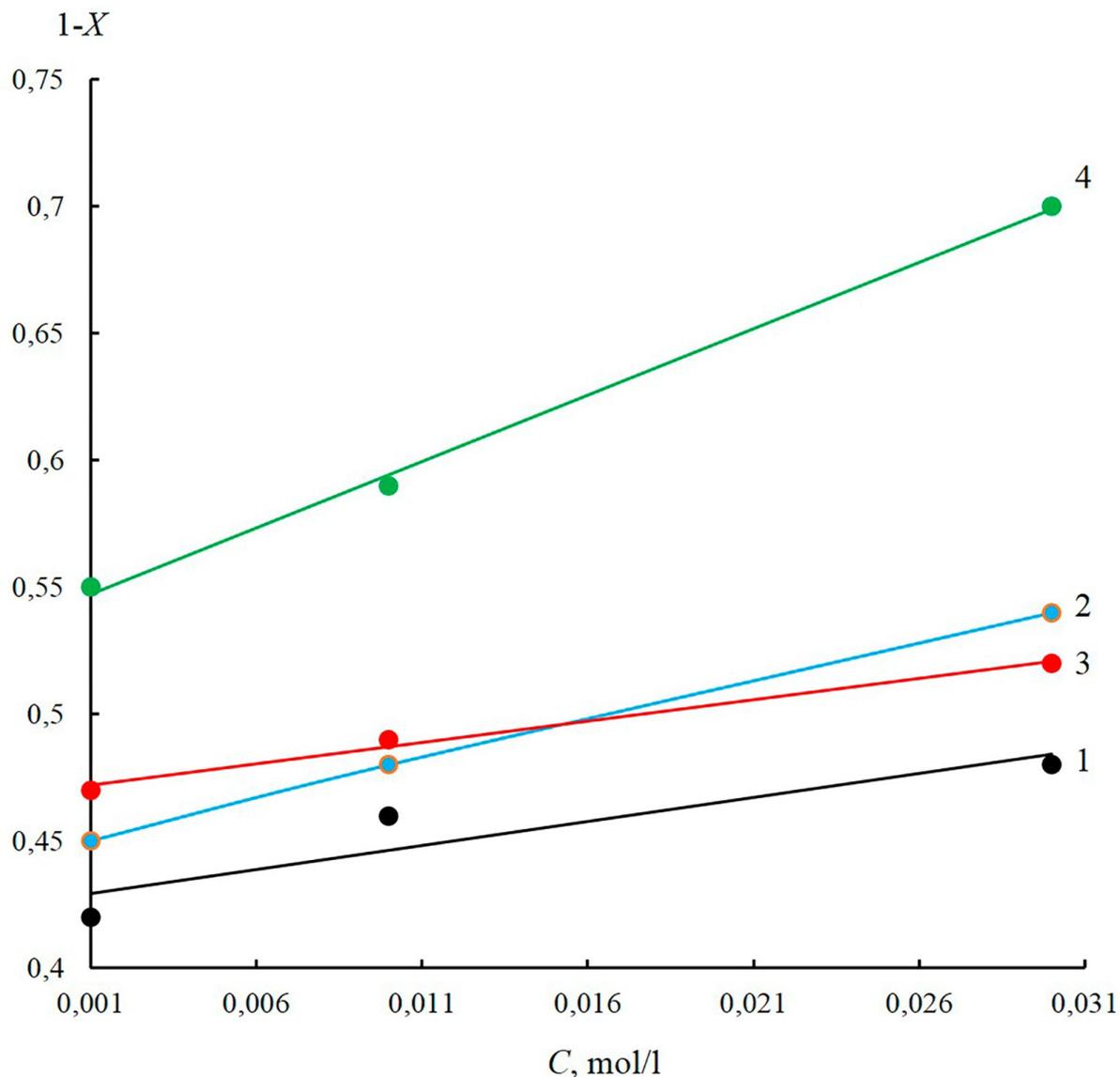


Рис. 3.32. Зависимости степени димеризации (1-X) красителей F(1), E(2), ER(3), BR(4) от их концентрации для  $R_h=19$  нм .

димеризации (1-X) с увеличением концентрации  $C$  различных красителей отличаются. Так для  $R_h=6$  нм изменение (1-X) с увеличением  $C$   $-\frac{d(1-X)}{dC}$  равно для F-0,04, E-0,06, ER-0,05, BR-0,13 (рисунок 3.31). При

больших  $R_h$  для всех красителей наблюдается увеличение  $\frac{d(1-X)}{dC}$ . Так для

$R_h=19$  нм  $\frac{d(1-X)}{dC}$  равно для F-0.06, E-0.09, ER-0.06, BR-0.15 (рисунок 3.32).

Таким образом, основное влияние на концентрационную зависимость степени димеризации молекул красителей оказывает эффект внутреннего тяжелого атома.

Используя уравнение (3.8) и экспериментальные данные были получены спектры поглощения димеров для всех исследованных растворов. На рис. 3.33 в качестве примера представлены нормированные спектры поглощения димеров исследованных молекул красителей для мицелл с  $R_h=12$  нм. Видно, что спектры димеров красителей сильно отличаются, что указывает на их различную структуру.

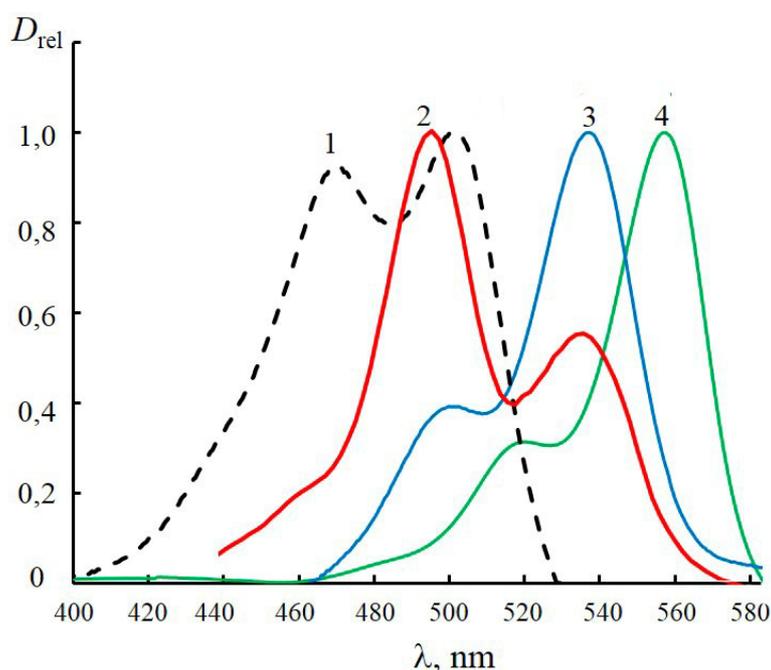


Рис. 3.33. Спектры поглощения димеров красителей: Ф(1), Э(2), ЭР(3) и БР(4) ( $C = 10^{-2}$  моль/л).  $R_h = 12$  нм.

Для анализа структуры димеров красителей воспользуемся экситонной моделью, согласно которой возбужденные состояния молекул димера будут расщепляться на два уровня с энергией ниже и выше энергии возбужденного состояния индивидуальных молекул. В рамках этой модели угол между молекулами в димере определялся по формуле [82]

$$\alpha = \arctan \sqrt{\frac{\nu_S f_L}{\nu_L f_S}},$$

(3.10)

где  $\nu_S, \nu_L$  – частоты максимумов спектров коротковолновой и длинноволновой полосы димера;  $f_S, f_L$  – силы осцилляторов, соответствующих переходов.

Силы осцилляторов определяются по формуле

$$f = 4,32 \times 10^{-9} \int \epsilon(\nu) d\nu,$$

(3.11)

где  $\epsilon_i(\nu)$  – коэффициент экстинкции ( $i=S, L$ ).

Для определения  $\nu_s$ ,  $\nu_L$  и  $f_s$ ,  $f_L$  было проведено разделение спектров димеров молекул красителей в исследованных системах. На рис. 3.34, в качестве примера, представлен спектр димера Э в мицеллярных растворах с  $R_h=15$  nm и разделения его на коротковолновую (кривая 2) и длинноволновую (кривая 3) полосы поглощения.

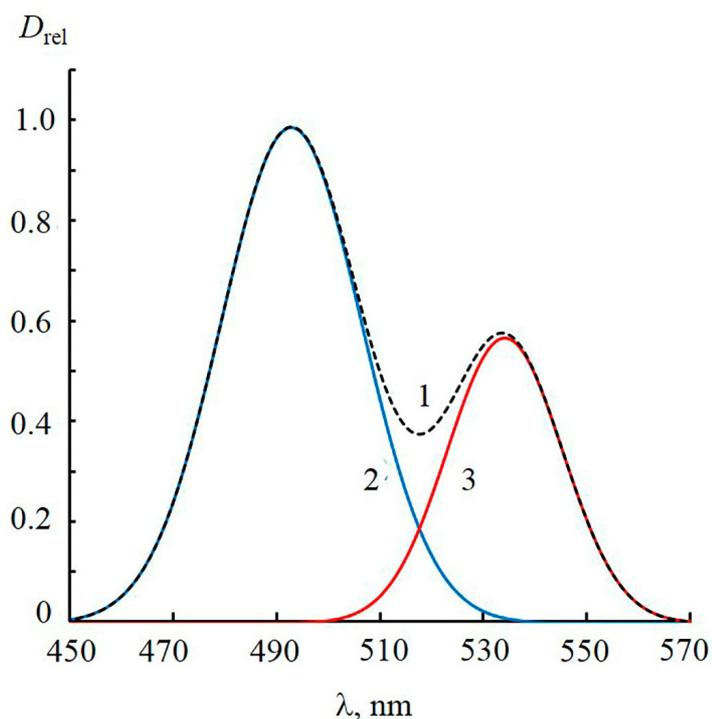


Рис. 3.34. Нормированный спектр поглощения димеров Э (1) ( $C = 5 \cdot 10^{-3}$  моль/л) в мицеллярных растворах с гидродинамическим радиусом мицелл  $R_h=15$  nm и разделение его на гауссовы компоненты (2, 3).

Используя измеренные экспериментально спектры поглощения

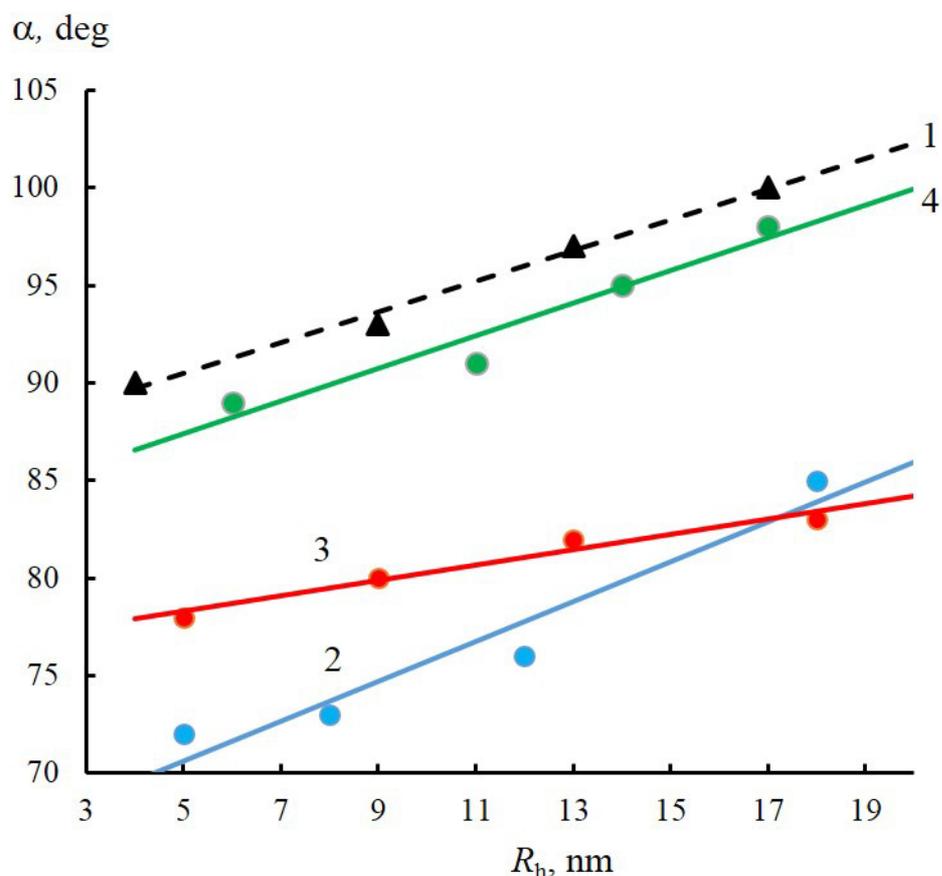


Рис. 3.35. Зависимости угла между мономерными молекулами в димере  $\alpha$  от гидродинамического радиуса мицелл  $R_h$  для: Ф(1), Э(2), ЭР(3) и БР(4). Концентрация красителей  $10^{-3}$  моль/л.

исследованных растворов красителей были определены углы  $\alpha$  между молекулами в димере. На рис. 3.35 представлена зависимость  $\alpha(R_h)$  для исследованных систем. Из рис. 6 видно, что угол  $\alpha$  наибольший для Ф и БР (кривые 1,4), а наименьший для Э и ЭР (кривые 2,3). Для всех исследованных систем наблюдается линейная зависимость  $\alpha(R_h)$ . При этом для Ф, Э и БР градиенты роста  $\alpha(R_h)$  практически не отличаются и имеют наибольшее значение для исследованных систем, для ЭР рост  $\alpha$  от  $R_h$  намного меньше (кривая 3).

Для установления природы связи между мономерами в димере, были определены термодинамические параметры димеризации. Свободные энергии формирования димеров (потенциалы Гиббса) в растворах определялись из соотношения:

$$\Delta G = -TR \ln K_D, \quad (3.12)$$

где  $\Delta G$  – потенциал Гиббса;  $R$  – универсальная газовая постоянная;  $K_D$  – константа равновесия.

С помощью (3.6) были определены значения  $K_D$  для исследованных систем, а затем по формуле (3.12) были вычислены значения  $\Delta G$ . На рис. 3.36 показаны зависимости  $\Delta G(R_h)$  для исследованных красителей.

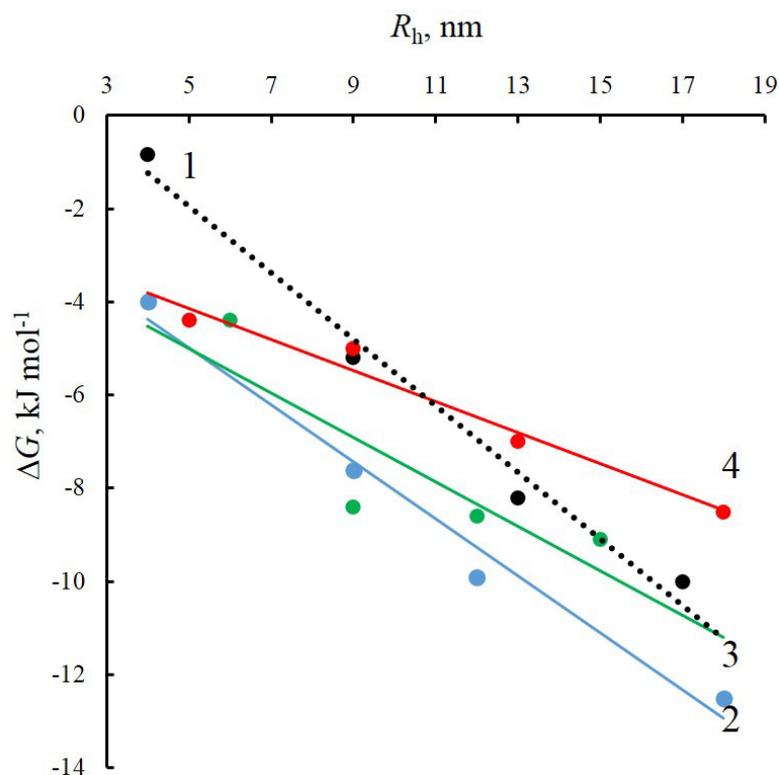


Рис. 3.36. Зависимости изменения свободной энергии  $\Delta G$  в димере от гидродинамического радиуса мицелл для  $\Phi$ (1),  $\mathcal{E}$ (2),  $\mathcal{E}\mathcal{P}$ (3) и  $\mathcal{B}\mathcal{P}$  (4).

Из рис. 3.36 видно, что наименьшее значение наблюдается для  $\Phi$  (кривая 1). Галогенозамещение в молекулах ФЛ вызывает увеличение  $\Delta G$  (рис. 3.36, кривые 2 - 4). При этом если для  $\Phi$   $\Delta G$  меняется в диапазоне от  $-0,85 \text{ kJmol}^{-1}$  до  $-10 \text{ kJmol}^{-1}$ , то для  $\mathcal{E}$  от  $-4,4 \text{ kJmol}^{-1}$  до  $-12,5 \text{ kJmol}^{-1}$ ; для  $\mathcal{E}\mathcal{P}$  от  $-4 \text{ kJmol}^{-1}$  до  $-8,5 \text{ kJmol}^{-1}$  и для  $\mathcal{B}\mathcal{P}$  от  $-4,3 \text{ kJmol}^{-1}$  до  $-9 \text{ kJmol}^{-1}$ . Наибольшее значение  $\Delta G$  наблюдается для  $\mathcal{E}$  (рис. 3.36, кривая 2). Увеличение размеров (гидродинамического радиуса  $R_h$ ) мицелл вызывает рост  $\Delta G$  с линейной зависимостью  $\Delta G(R_h) = aR_h + A$ . Коэффициенты наклона  $a$  этих прямых равны  $-(0,71 \pm 0,05)$  для  $\Phi$ ,  $-(0,61 \pm 0,05)$  для  $\mathcal{E}$ ,  $-(0,43 \pm 0,05)$  для  $\mathcal{E}\mathcal{P}$  и  $-(0,37 \pm 0,05)$  для  $\mathcal{B}\mathcal{P}$ , соответственно.

Энтальпия  $\Delta H$  формирования димеров красителей были определены с помощью уравнения Вант Хоффа:

$$\ln K_D = -\frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R}, \quad (3.13)$$

где  $T$ - температура,  $R$  – газовая постоянная, равная 8,314 Дж/кмоль.

$\Delta H$  определялась методом наименьших квадратов из линейного

уравнения (3.13). Для этого были измерены спектры поглощения растворов красителей, а затем определены значения  $K_D$  для разных  $T$ . На рис. 3.37, в качестве примера, представлены спектры поглощения Э в мицеллярном растворе  $cR_h=15$  нм для четырех температур, на этом же рисунке представлены зависимости доли мономеров  $X$  от температуры  $T$  (кривая 5). Видно, что с ростом температуры доля мономерных молекул в растворе увеличивается. Для установления влияния температуры на размер мицелл, был измерен их гидродинамический радиус для различных температур. На рис. 3.37 (кривая 6) представлена зависимость  $R_h(T)$  с внедренными молекулами Э. Из рис. 3.37 видно, что  $R_h$  практически не зависит от  $T$ . Поэтому, в дальнейшем будем считать, что гидродинамический радиус мицелл в исследованном диапазоне температур не изменяется. На этом же рисунке представлена зависимость угла между молекулами в димере  $\alpha$  от температуры  $T$  (кривая 7). Как видно из рис.3.37 с ростом температуры наблюдается увеличение  $\alpha$ , т. е. разрушение димеров сопровождается увеличением угла между его молекулами.

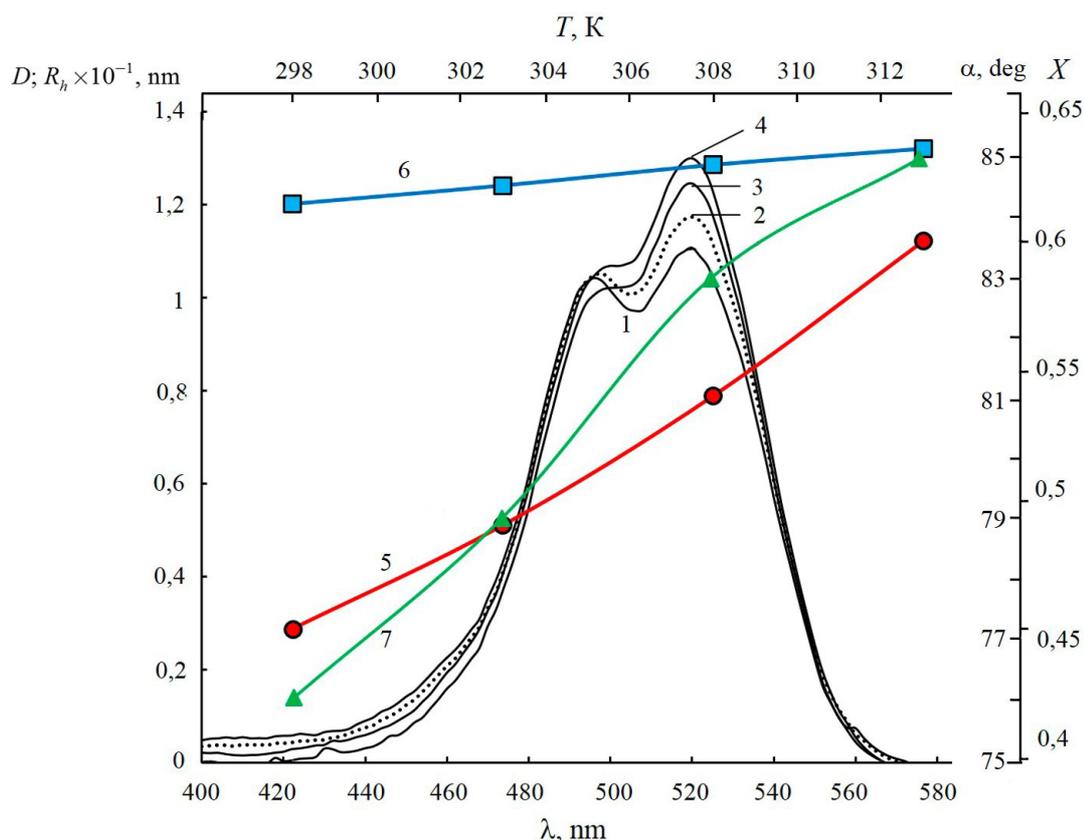


Рис.3.37. Спектры поглощения (1 - 4) Э в мицеллярных растворах с  $R_h=15$  нм для температур: 298 (1), 303(2), 308(3) и 313 (4) К; Зависимости доли мономеров  $X$  (5), гидродинамического радиуса мицеллы  $R_h$ (6) и угла  $\alpha$  (7) от температуры. Концентрация Э  $3 \cdot 10^{-3}$  моль/л.

Зависимости  $\Delta H$  от  $R_h$  для исследованных систем представлены на рис. 3.38. Наибольшее значение  $\Delta H$  наблюдается для димеризации молекул Ф (рис. 3.38, кривая 1), наименьшее для молекул ЭР (рис. 3.38, кривая 3). При этом  $\Delta H$  для Ф меняются в диапазоне от  $-35 \text{ kJmol}^{-1}$  до  $-64 \text{ kJmol}^{-1}$ ; для Э от  $-28 \text{ kJmol}^{-1}$  до  $-44 \text{ kJmol}^{-1}$ ; для ЭР от  $-24 \text{ kJmol}^{-1}$  до  $-34 \text{ kJmol}^{-1}$  и для БР от  $-29 \text{ kJmol}^{-1}$  до  $-46 \text{ kJmol}^{-1}$ . Увеличение размеров (гидродинамического радиуса  $R_h$ ) мицелл вызывает рост  $\Delta H$  с линейной

зависимостью  $\Delta H = bR_h + B$ . Коэффициенты наклона  $b$  этих прямых равны  $-(2,24 \pm 0,05)$  для Ф, для  $-(1,22 \pm 0,05)$  Э,  $-(1,02 \pm 0,05)$  для ЭР и

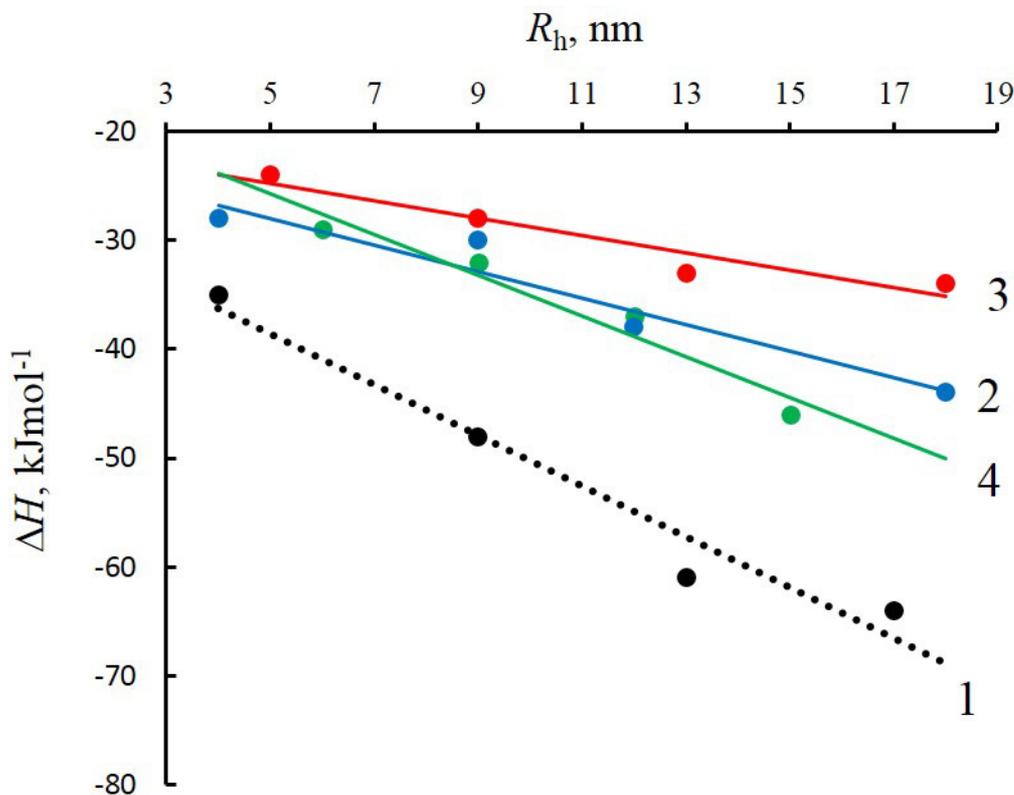


Рис. 3.38. Зависимости изменений энтальпии  $\Delta H$  при димеризации молекул от гидродинамического радиуса мицелл для ФЛ(1), Э(2), Эр(3) и БР (4).

$-(1,87 \pm 0,05)$  для БР, соответственно.

Энтропия  $\Delta S$  определялась по формуле

$$\Delta S = \frac{(\Delta H - \Delta G)}{T}.$$

На рис. 3.39 представлены зависимости  $\Delta S(R_h)$ . Наибольшее значение  $\Delta S$  наблюдается для димеризации молекул Ф (рис.3.39, кривая 1), наименьшее для молекул ЭР (рис. 3.39, кривая 3). При этом  $\Delta S$  для Ф меняются в диапазоне от  $-113 \text{ Jmol}^{-1}$  до  $-180 \text{ Jmol}^{-1}$ ; для Э от  $-80 \text{ Jmol}^{-1}$  до  $-105 \text{ Jmol}^{-1}$ ; для ЭР от  $-65$

$\text{Jmol}^{-1}$  до  $-85 \text{ Jmol}^{-1}$  и для БР от  $-82 \text{ Jmol}^{-1}$  до  $-112 \text{ Jmol}^{-1}$ . Увеличение размеров (гидродинамического радиуса  $R_h$ ) мицелл вызывает рост  $\Delta S$  с линейной зависимостью  $\Delta S = dR_h + D$ . Коэффициенты наклона  $d$  этих прямых равны  $-(5,42 \pm 0,05)$  для Ф, для  $-(1,80 \pm 0,05)$  Э,  $-(1,60 \pm 0,05)$  для ЭР и  $-(4,40 \pm 0,05)$  для БР.

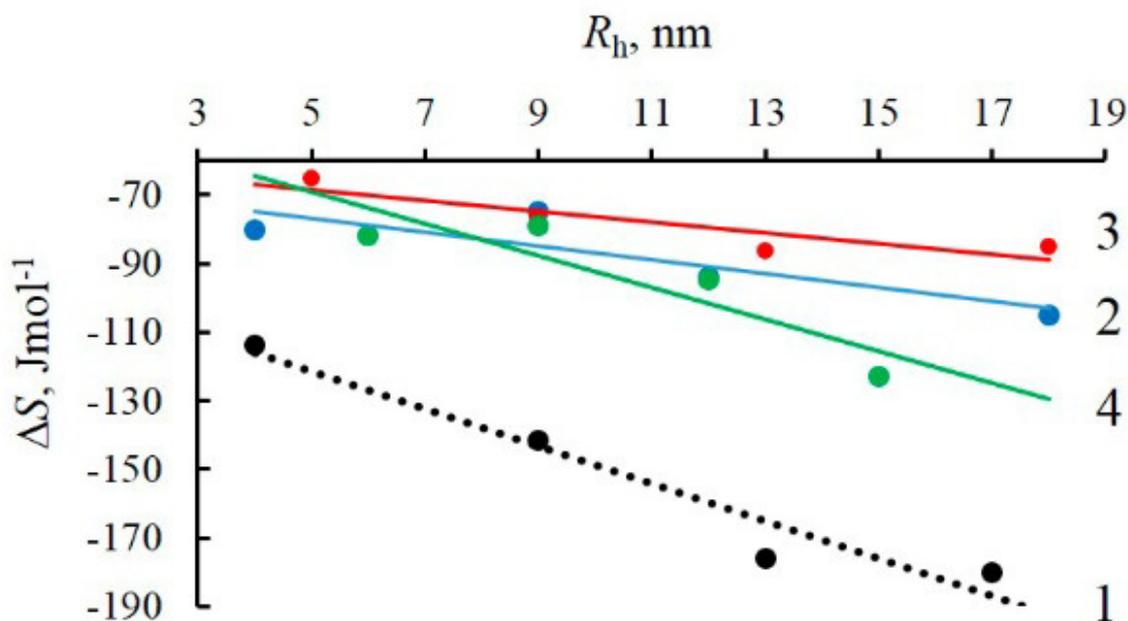


Рис. 3.39. Зависимости изменений энтропии при димеризации молекул от гидродинамического радиуса мицелл для Ф(1), Э(2), ЭР(3) и БР (4).

Известно, что экспериментальные данные при  $\Delta H > 0$  и  $\Delta S > 0$  указывают на энтропийные реакции димеризации молекул красителей, с другой стороны, данные в области  $\Delta H < 0$  и  $\Delta S < 0$  означают энтальпийные реакции димеризации молекул. Поэтому в мицеллярных растворах исследованных красителей при всех значениях  $R_h$  происходят энтальпийные реакции димеризации молекул.

Зависимости  $T\Delta S$  от  $\Delta H$  для димеризации флуороновых красителей (увеличение  $\Delta H$  соответствует уменьшению  $R_h$ ) для исследованных мицеллярных растворов показаны на рис. 3.40. Видно, что для всех исследованных красителей наблюдается линейная зависимость  $T\Delta S(\Delta H)$ , которая указывает на существование энтальпийно-энтропийной компенсации

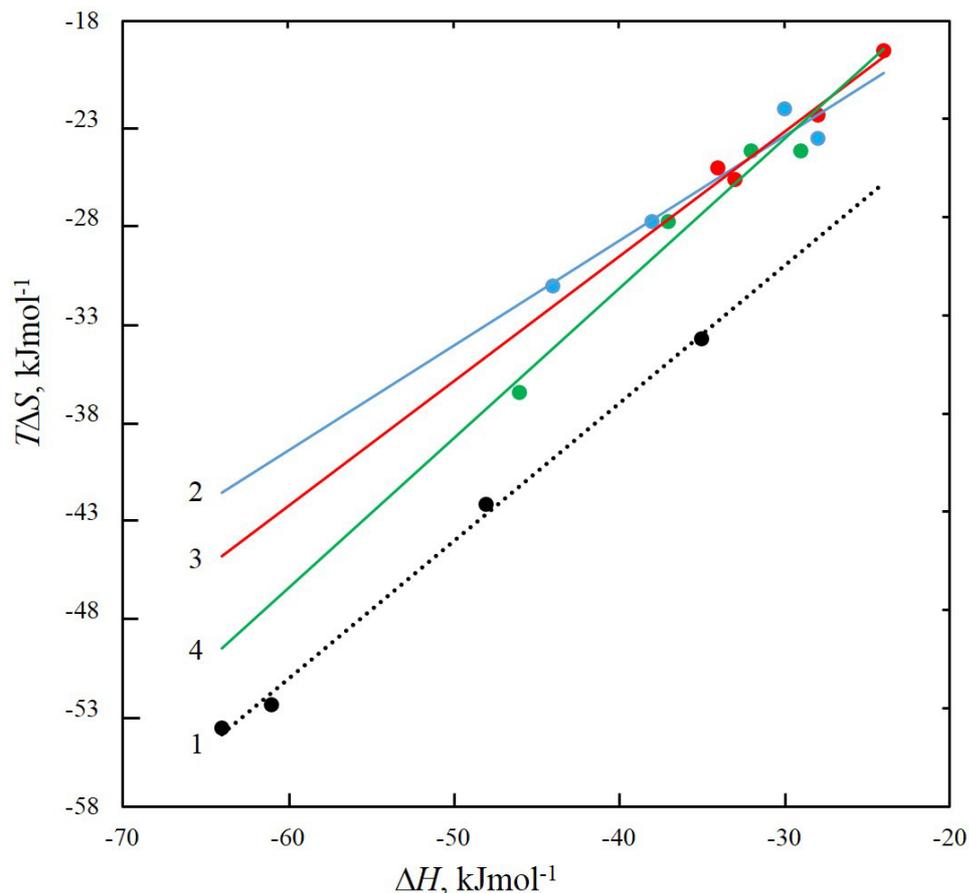


Рис. 3.40. Зависимости  $T\Delta S$  от  $\Delta H$  для Ф (1), Э (2), ЭР (3) и БР (4).

в димерных реакциях. Линейная корреляция, наблюдаемая между значениями  $T\Delta S$  и  $\Delta H$ , может быть выражена как  $T\Delta S = T\Delta S^0 + \beta\Delta H$  с  $\beta_1=0,7$  ( $R^2 = 0,999$ ) для Ф,  $\beta_2=0,534$  ( $R^2 = 0,966$ ) для Э,  $\beta_3=0,68$  ( $R^2 = 0,977$ ) для ЭР и  $\beta_4=0,762$  ( $R^2= 0,9775$ ) для БР.

Константу пропорциональности  $\beta$  можно рассматривать как количественную меру компенсации энтальпии-энтропии. Тогда для ФЛ

только около 30% увеличения  $\Delta H$  способствовало димерной стабильности, в то время как для Э это 36%, для ЭР - 32%, а для БР - 24%. Видно, что чем выше молекулярный вес галогена в молекуле красителя, тем эффективней увеличение  $\Delta H$  способствует димерной стабильности.

Для Ф и его галогенопроизводных значения  $\Delta H$ , так и  $\Delta S$  имеют тенденцию к увеличению от области, управляемой энтальпией, к области, управляемой энтропией, по мере увеличения массы галогена. При увеличении  $R_h$  мицелл наблюдается такая же тенденция. Это типичное поведение гидрофобного взаимодействия и может быть интерпретировано вкладом дегидратации гидрофобно-гидратированных молекул воды ядра мицеллы в димеризацию.

Таким образом, изменение структуры обратных мицелл приводит к изменению эффективности процессов димеризации молекул красителей. Установлена линейная зависимость степени димеризации молекул красителей от  $R_h$ . На величины наклонов этих зависимостей влияет как величина массы внутреннего тяжелого атома, так и величина заряда ионов красителей. При этом, для галогенпроизводных флуоресцеина наблюдается эффект «внутреннего тяжелого атома»  $-(1-X)$  растет в ряду Э – ЭР – БР (бром-йод-хлор). При этом эффект тяжелого атома сказывается на процессе димеризации красителей, для всех исследованных  $R_h$ .

Кроме того, в ряду Э – ЭР – БР увеличивается доля анионных форм молекул красителей, что вызывает изменение электростатического взаимодействия между анионами красителей и гидратированными группами поверхностно-активного вещества. Такое изменение взаимодействия вызывает отличие степени димеризации молекул красителей для различных  $R_h$ .

Из экспериментальных данных были получены спектры поглощения димеров для всех исследованных растворов красителей, которые сильно отличаются, что указывает на их различную структуру. Используя измеренные экспериментально спектры поглощения исследованных растворов красителей в рамках экситонной теории были определены углы  $\alpha$  между молекулами в димере. Установлено, что для всех исследованных систем наблюдается линейная зависимость  $\alpha(R_h)$ . При этом для Ф, Э и БР градиенты роста  $\alpha(R_h)$  практически не отличаются и имеют наибольшее значение для исследованных водно-мицеллярных растворов красителей, для ЭР рост  $\alpha$  от  $R_h$  намного меньше.

Из экспериментально измеренных зависимостей константы димеризации от температуры были установлены ее термодинамические параметры. Наименьшее значение свободной энергии  $\Delta G$  формирования димеров (потенциал Гиббса) в мицеллярных растворах наблюдается для Ф. Галогензамещение в молекулах Ф вызывает увеличение  $\Delta G$ . При этом наибольшее значение наблюдается для Э. Увеличение размеров (гидродинамического радиуса  $R_h$ ) мицелл вызывает линейный рост  $\Delta G$  с коэффициентами наклона уменьшающимися в ряду Э – ЭР – БР (бром-йод-хлор).

Для всех исследованных водно-мицеллярных растворов флуороновых красителей  $\Delta H < 0$ . Наибольшее значение  $\Delta H$  наблюдается для димеризации молекул Ф, наименьшее для молекул ЭР. Увеличение размеров (гидродинамического радиуса  $R_h$ ) мицелл вызывает линейный рост  $\Delta H$  с наибольшим коэффициентом наклона для Ф, и наименьшим для ЭР.

Для всех исследованных водно-мицеллярных растворов флуороновых красителей  $\Delta S < 0$ . Наибольшее значение  $\Delta S$  наблюдается для димеризации молекул, наименьшее для молекул ЭР. Увеличение гидродинамического радиуса  $R_h$  мицелл вызывает линейный рост  $\Delta S$  для всех красителей.

В мицеллярных растворах исследованных красителей при всех значениях  $R_h\Delta H < 0$  и  $\Delta S < 0$ , что означает, что реакции димеризации в исследованных системах управляется энтальпией. Видно, что реакции димеризации этих красителей являются экзотермическими и характеризуются относительно большими отрицательными значениями  $\Delta H$ . Полученная линейная зависимость между  $T\Delta S$  и  $\Delta H$  указывает на существование энтальпийно-энтропийной компенсации в димерных реакциях. Линейная корреляция, наблюдаемая между значениями  $T\Delta S$  и  $\Delta H$  позволила установить, что чем выше молекулярный вес галогена в молекуле красителя, тем эффективней увеличение  $\Delta H$  способствует димерной стабильности.

## Основные результаты и выводы

1. Исследовано динамическое рассеяние света водно- мицелярных растворов красителей флуоресцеинового ряда. Установлено, что внедрение молекул красителя в обратные мицеллы вызывает увеличение их гидродинамических радиусов  $R_h$  с линейной зависимостью роста  $\Delta R_h$  от степени гидратации  $\omega_0$ .
2. Показано, что увеличение размеров обратных мицелл при внедрении в них молекул флуороновых красителей обусловлено изменением электростатического взаимодействия между молекулами анионных красителей и гидратированными группами ПАВ. При этом влияние внутреннего «тяжелого атома» на размер обратных мицелл связан с перераспределением зарядов между атомами в молекулах, приводящее к изменению этих взаимодействий.
3. Измерены спектры поглощения и флуоресценции, значения среднего времени жизни возбужденного состояния  $\tau$  и степени анизотропии  $r$  для молекул флуоресцеина для различных значений гидродинамического радиуса мицелл  $R_h$ . Установлено, что с ростом  $R_h$  доля анионной формы красителя в формировании спектров поглощения и флуоресценции увеличивается, при этом наблюдается рост дипольных моментов флуоресцеина в возбужденном состоянии.
4. Экспериментально установлено, что время вращательной корреляции  $\theta$  молекул флуоресцеина уменьшается с ростом  $R_h$ , указывающее на увеличение микровязкости вокруг его молекул, что объясняется локализацией молекул красителя в области поверхностной воды мицеллы.
5. Измерены спектрально –флуоресцентные характеристики молекул галогенпроизводных флуоресцеина в мицеллах для различных  $R_h$ .

Установлено изменение этих характеристик: сдвиг спектров поглощения и флуоресценции, увеличение стоксовского сдвига спектров при увеличении  $R_h$ . Показано, что с ростом  $R_h$  наблюдается увеличение отношения дипольных моментов возбужденного и основного состояния.

6. Исследованы кинетики и степени анизотропии флуоресценции исследованных молекул красителей в обратных мицеллах. Установлено уменьшение среднего времени возбужденного состояния  $\langle \tau \rangle$  и степени анизотропии флуоресценции  $r$  с ростом  $R_h$  для Э, ЭР и БР, которое связано с ростом подвижности молекул воды и уменьшением эффекта геометрического ограничения молекул красителей.

7. Для исследованных молекул красителей в мицеллярных системах определено время вращательной корреляции  $\theta$ , которое уменьшается для всех исследованных красителей с ростом  $R_h$ , что указывает на уменьшение микровязкости ограниченной водной среды внутри мицеллы. При этом  $\theta_E > \theta_{ER} > \theta_{BR}$ , т.е. в величине времени вращательной корреляции сказывается «эффект внутреннего тяжелого атома».

8. Исследованы процессы димеризации и ее термодимические параметры флуороновых красителей в обратных мицеллах АОТ с различным гидродинамическим радиусом  $R_h$ . Из экспериментальных данных определены спектры поглощения димеров красителей и константы димеризации. Установлено, что увеличение интеркомбинационной конверсии из-за эффекта тяжелого атома приводит к увеличению степени димеризации для всех исследованных значений  $R_h$ .

9. Установлено, что для всех исследованных систем наблюдается различная структура димеров красителей для различных  $R_h$ - различные углы  $\alpha$  между молекулами красителей в димере. Наблюдается линейная зависимость  $\alpha$  от  $R_h$ . При этом для Ф, Э и БР градиенты роста

$\alpha(R_h)$  практически не отличаются и имеют наибольшее значение для исследованных водно-мицеллярных растворов красителей, для ЭР рост  $\alpha$  от  $R_h$  незначителен.

10. Из экспериментально измеренных зависимостей константы димеризации от температуры были установлены ее термодинамические параметры (потенциал Гиббса  $\Delta G$ , энтальпия  $\Delta H$  и энтропия  $\Delta S$ ) в мицеллярных растворах исследованных красителей для всех значениях  $R_h$   $\Delta H < 0$  и  $\Delta S < 0$ , указывающее на то, что реакции димеризации в исследованных системах управляется энтальпией. Установлено существование энтальпийно-энтропийной компенсации в димерных реакциях молекул исследованных красителей, при этом чем выше молекулярный вес галогена в молекуле красителя, тем эффективней увеличение  $\Delta H$  способствует димерной стабильности.

## Список литературы

1. Dhillonc S.K., Porter S. L., Rizk N., Sheng Y., McKaig Th., Burnett K., White B., Nesbitt H., Matin R. N., McHale A. P., Callan B., Callan J. F. Rose Bengal–Amphiphilic Peptide Conjugate for Enhanced Photodynamic Therapy of Malignant Melanoma // *J. Med. Chem.*, 2020, 63, 1328–1336.
2. Shitomi K., Miyaji H., Miyata S., Sugaya T., Ushijima N., Akasaka T., Kawasaki H. // Photodynamic inactivation of oral bacteria with silver nanoclusters/rose bengal nanocomposite Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, 2020, 30, p.101647.
3. Слюсарева Е.А. Фотоника флуороновых красителей в гомогенных и гетерогенных биомолекулярных средах. // Диссертация на соискание ученой степени доктора физико-математических наук, Красноярск, 2014, 230 с.
4. Vlasova I. M., Saletsky A. M. Raman spectroscopy in investigations of secondary structure of human serum albumin at binding of nanomarkers of fluorescein family// *Laser Physics*. 2010, 20 (9), 1844-1848.
5. Власова И.М., Власов А.А., Кулешова А.А., Гордеева Ю.А., Салецкий А.М. Константы комплексообразования наномаркеров семейства флуоресцеина с бычьим сывороточным альбумином в водных растворах // *Журнал физической химии*, 2020,94, № 1, 114-120.
6. Мельников А.Г., Салецкий А.М., Кочубей В.И., Правдин А.Б., Курчатov И.С., Мельников Г.В. Триплет-триплетный перенос энергии между люминесцентными зондами, связанными с альбуминами // *Оптика и спектроскопия.*, 2010, Т. 109, № 2, 1272-1277.
7. Кулешова А. А. Флуоресцентные характеристики наномаркеров семейства флуоресцеина в растворах сывороточных альбуминов. // Диссертация на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук. Москва, 2016, 121 с.

8. Lone H., Radwan N. R. E., Aslam J., Akhter A. Concept of Reverse Micelle Method For the Synthesis of Nano-Structured Materials // Current Nanoscience, 2019,15 , N2, 129 – 136.
9. Singh P., Verma N. A Review on Impact of Nanomicelle for Ocular Drug Delivery System//Journal of Pharmaceutical Sciences and Research, 2018; 9(4): 1397-1404.
10. Fleming G.R., Knight W.E., Morris J.M., Morrison R.J.S., Robinson G.W. Picosecond fluorescence studies of xanthene dyes// Journal of the American Chemical Society. – 1977. – T.99(13). – C. 4306 – 4311.
11. Kurtaliev E.N. Spectroscopic study of interaction of styrylcyanine dye Sbt and its derivatives with bovine serum albumin// Journal of Luminescence. – 2012. – T. 132. – C. 2281 – 2287.
12. Fleming G.R., Knight W.E., Morris J.M., Morrison R.J.S., Robinson G.W. Picosecond fluorescence studies of xanthene dyes// Journal of the American Chemical Society. – 1977. – T.99(13). – C. 4306 – 4311.
13. Martin M.M., Lindqvist L. The pH dependence of fluorescein fluorescence// Journal of Luminescence. – 1975. – T. 10. – C. 381 – 390.
14. Slyusareva E. A., Tomilina F. N., Sizykha A. G., Tankevicha E. Yu., Kuzubova A. A., Ovchinnikova S. G. The Effect of Halogen Substitution on the Structure and Electronic Spectra of Fluorone Dyes // Optics and Spectroscopy, 2012, Vol. 112, No. 5, pp. 671–678.
15. Slyusareva E. A., Gerasimova M. A. pH-dependence of the absorption and fluorescent properties of fluorone dyes in aqueous solutions. // Russian Physics Journal, Vol. 56, No. 12, April, 2014.
16. Mandal A. K., Thanigaivelan U., Pandey R. K., Asthana S., Khomane R. B., Kulkarni B. D. // Preparation of Spherical Particles of 1,1-Diamino-2,2-dinitroethene (FOX-7) Using a Micellar Nanoreactor. // American Chemical Society 2012, 16, 1711-1716.

17. Lal M., Kumar N. D., Joshi M. P., Prasad P. N. //Polymerization in a Reverse Micelle Nanoreactor: Preparation of Processable Poly (p-phenylenevinylene) with Controlled Conjugation Length // Chem. Mater. 1998, 10, 1065-1068.
18. Asgaria S., Saberib A. H., McClements D. J., Lin M. // Microemulsions as nanoreactors for synthesis of biopolymer nanoparticles. // Trends in Food Science & Technology 86 (2019) 118–130.
19. Junbo L., Linqi S., Yingli A., Yan L., Xi C., Huijun D.. Reverse micelles of star-block copolymer as nanoreactors for preparation of gold nanoparticles. // J. Li et al. // Polymer 47 (2006) 8480-8487.
20. Zielinska-Jurek, A.; Kowalska, E.; Sobczak, J.W.; Lisowski, W.; Ohtani, B.; Zaleska, A. Preparation and characterization of monometallic (Au) and bimetallic (Ag/Au) modified-titania photocatalysts activated by visible light. Appl. Catal. // B Environ. 2011, 101, 504–514.
21. Sanchez-Dominguez, M.; Boutonnet, M.; Solans, C. A novel approach to metal and metal oxide nanoparticle synthesis: The oil-in-water microemulsion reaction method. // J. Nanopart. Res. 2009, 11, 1823–1829.
22. Zhang, Y.; Li, T.; Jin, Z.; Wang, W.; Wang, S. Synthesis of nanoiron by microemulsion with Span/Tween as mixed surfactants for reduction of nitrate in water. // Front. Environ. Sci. Eng. China 2007, 1, 466–470.
23. Hada, R. A Novel Synthesis Process for Making Nickel Oxide Nanoparticles. // Int. Res. J. Pure Appl. Chem. 2013, 3, 111–117.
24. Porras, M.; Martínez, A.; Solans, C.; González, C.; Gutiérrez, J.M. Ceramic particles obtained using W/O nano-emulsions as reaction media. // Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp. 2005, 270–271, 189–194.
25. Pineda-Reyes, A.M.; De La Olvera-Amador, M.L. Nanoparticles of zinc oxide obtained by water in oil microemulsion system. In Proceedings of the 13th International Conference on Electrical Engineering, Computing Science

- and Automatic Control, Mexico City, Mexico, 26–30 September 2016; pp. 5–6.
26. Khiew, P.S.; Huang, N.M.; Radiman, S.; Ahmad, M.S. Synthesis of NiS nanoparticles using a sugar-ester nonionic water-in-oil microemulsion. *Mater. Lett.* 2004, 58, 762–767.
27. Багдасарян В.В., Саркисян Е.М., А.А. Шагинян А.А. Динамика измерения спектров поглощения водонерастворимого красителя в водной мицеллярной среде в зависимости от структуры мицелл. // *Химическая физика*, 1991, том 10 № 9.
28. Mitra R., Sinha S. S., KumarPal S. Interactions of Nile Blue with Micelles, Reverse Micelles and a Genomic DNA. // *J Fluoresc* (2008) 18:423–432.
29. Petcu A. R., Rogozea E. A., Lazar C. A., Olteanu N. L., Meghea A., Mihaly M. Specific interactions within micelle microenvironment in different charged dye/surfactant systems. // *Arabian Journal of Chemistry*, 2015.
30. Rashidi-Alavijeh M., Javadian S., Gharibi H., Moradi M., Tehrani-Bagha A. R., Shahir A. A. Intermolecular interactions between a dye and cationic surfactants: Effects of alkyl chain, head group, and counter ion. // *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2011.
31. Кротова М. Н., Одинцова О. И., Мельников Б. Н. // Исследование влияния катионных поверхностно-активных веществ на состояние активных красителей в растворе, журнал «Химия и Химическая технология», 2006 том 49. Вып. 7, стр. 63-65.
32. Rahdar A., Almasi-Kashi M. Dynamic and spectroscopic studies of nanomicelles comprising dye in water/ dioctyl sodium sulfosuccinate / decane droplet microemulsion at constant water content. // *Journal of Molecular Structure*, 2017.
33. Потапов А. В. Исследование фотофизических процессов в растворах молекул красителей в объемной и мицеллярной воде. // Диссертация физического факультета МГУ, 2005.

34. Rahdar A., Almasi-Kashi M. Photophysics of Rhodamine B in the nanosized water droplets: A concentration dependence study, 2017.
35. Волкова О. И. Исследование фотофизических процессов в системах люминофор - обратная мицелла // Магистерская диссертация физического факультета МГУ, 2017г.
36. Volkova O.I., Baranov A.N., Saletsky A.M. Molecular Association Processes of Eosin in Reverse Micelles // *Journal of Applied Spectroscopy* 85 № 3 (2018) 381-384.
37. Karukstis K. K., Frazier A. A., Martula D. S., Whiles J. A. Characterization of the Microenvironments in AOT Reverse Micelles Using Multidimensional Spectral Analysis. // *J. Phys. Chem.* 1996, 100, 11133-11138.
38. Лехоцки Э., Хевеши Я. Процессы агрегации красителей в растворах детергента// Кафедра биофизики университета им. Атилы Йожефа. 1971.
39. Kim J., Lee M. Excited-State Photophysics and Dynamics of a Hemicyanine Dye in AOT Reverse Micelles // *J. Phys. Chem. A* 1999, 103, 3378-3382.
40. Bose D., Sarkar D., Girigoswami A., Mahata A., Ghosh D., N. Chattopadhyay. Photophysics and rotational relaxation dynamics of cationic phenazinium dyes in anionic reverse micelles: Effect of methyl substitution // *The Journal of Chemical Physics* 131, 2009.
41. Maxim M. E., Stîngă G., Iovescu A., Băran A., Ilie C., Anghel D. F. Monitorizing methylene blue inclusion in reverse micellar nanostructures // *Rev. Roum. Chim.*, 2012, 57(3), 203-208.
42. Zhu R., Lü R., Yu A. Aggregation Behaviors of Tricarbocyanine Dye in Water and in AOT Reverse Micelles // *Chin. J. Chem.* 2011, 29, 405—410.
43. Bayraktutan T., Meral K., Onganer Y. Photophysical properties of pyronin dyes in reverse micelles of AOT // T. Bayraktutan et al. / *Journal of Luminescence* 145 (2014) 925–929.

44. Sahoo D., Chakravorti S. Spectra and dynamics of an ionic styryl dye in reverse micelles. // *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 205 (2009) 129–138.
45. Luo J., Liu Y., Yang S. Different locations of adenine in AOT and CTAB reverse micelles. // *Journal of Molecular Liquids* 232 (2017) 236–242.
46. McPhee J. T., Scott E., Levinger N. E., Orden A. V. Cy3 in AOT Reverse Micelles I. Dimer Formation Revealed through Steady-State and Time-Resolved Spectroscopy // *J. Phys. Chem. B* 2011, 115, 9576–9584.
47. Chatterjee A., Maity B., Seth D. The photophysics of 7 - (N, N0 - diethylamino) coumarin3-carboxylic acid in water/AOT/isooctane reverse micelles: an excitation wavelength dependent study // *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2013, 15, 1894.
48. Bozkurta E., Onganer Y. Photophysical features of coumarin 120 in reverse micelles // *Journal of Molecular Structure, Volume* 1173, 2018, 490-497.
49. Николенко Л. М., Иванчихина А. В. Особенности формирования j-агрегатов цианиновых красителей в растворах обратных мицелл АОТ/вода/гексан // *Химия высоких энергий*, 2010, том 44, № 6, с. 546-554.
50. Pandit P., Basu S. Removal of Ionic Dyes from Water by Solvent Extraction Using Reverse Micelles // *Environ. Sci. Technol.* 2004, 38, 2435-2442.
51. Tatikolov A. S., Costa S. B. Photophysics and photochemistry of hydrophilic cyanine dyes in normal and reverse micelles // *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2002, 1, 211–218.
52. Porcal G. V., Previtali C. M., Bertolotti S. G. Photophysics of the phenoxazine dyes resazurin and resorufin in direct and reverse micelles // *Dyes and Pigments* Volume 80, Issue 2, February 2009, Pages 206-211.
53. Zhu R., Lu R., Yu A. Photophysics and locations of IR125 and C152 in AOT reverse micelles // *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2011, 13, 20844–20854.

54. Wang C., Liu C., Wang Y., Shen T. Spectral Characteristics and Photosensitization Effect on TiO<sub>2</sub> of Fluorescein in AOT Reversed Micelles // Journal of Colloid and Interface Science 197, 126–132 (1998).
55. Gerasimova M.A., Tomilin F.N., Malyar E.Ya., Varganov S.A., Fedorov D.G., Ovchinnikov S. G., Slyusareva E.A. // Dyes and Pigments, 2020, 173, p.107851.
56. Patil K., Pawar R., Talap P. Self-aggregation of Methylene Blue in aqueous solutions of Bu<sub>4</sub>NBr and urea//Physical Chemistry Chemical Physics. - 2000. – T.2. – C. 4313 – 4317.
57. Wang B., Fan J., Sun S., Wang L., Song B., Peng X. 1-(Carbamoylmethyl)-3H-indolium squaraine dyes: Synthesis, spectra, photo-stability and association with BSA// Dyes and Pigments. – 2010. – T. 85. – C. 43 – 50.
58. Slyusareva E., Gerasimova M., Plotnikov A., Sizykha A. Spectral study of fluorone dyes adsorption on chitosan-based polyelectrolyte complexes // Journal of Colloid and Interface Science, Volume 417, 1 March 2014, Pages 80-87.
59. Falcone R. D., Correa N. M., Biasutti M. A., Silber J. J. Acid-Base and Aggregation Processes of Acridine Orange Base in *n*-Heptane/AOT/Water Reverse Micelles. // Langmuir, Vol. 18, No. 6, 2002 2041.
60. Pawar S. S., Regupathi I., Prasanna B.D. Reverse micellar partitioning of Bovine Serum Albumin with novel system. // Resource-Efficient Technologies 000 (2017) 1–4.
61. Zhang T., Liu H., Chen J. Affinity Extraction of BSA with Reversed Micellar System Composed of Unbound Cibacron Blue. // Biotechnol Prog. Nov-Dec 1999; 15 (6):1078-82.
62. Naoe K., Yoshimoto S., Naito N., Kawagoe M., Imai M. Preparation of protein nanoparticles using AOT reverse micelles. // Biochemical Engineering Journal 55 (2011) 140–143.

63. Zhao X., Zhu H., Chen J. Effects of sodium bis (2-ethylhexyl) sulfo succinate (AOT) reverse micelles on physicochemical properties of soy protein. // *Food and Bioprocess Technology* 94 (2015) 500–506.
64. Zhang T.-X., Liu H.-Z., Chen J.-Y. Investigation of affinity interaction between protein and triazine dye in reversed micelles with absorption spectra. // *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 196 (2002) 79–85.
65. Naoe K., Noda K., Kawagoe M., Imai M. Higher order structure of proteins solubilized in AOT reverse micelles. // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 38 (2004) 179–185.
66. Marques B. S., Nucci N. V., Dodevski I., Wang K. W. C., Athanasoula E. A., Jorge C., Wand A. J. Measurement and Control of pH in the Aqueous Interior of Reverse Micelles. // *J. Phys. Chem. B* 2014, 118, 2020–2031.
67. Dodevski I., Nucci N. V., Valentine K. G., Sidhu G. K., O'Brien E. S., Pardi A., Wand A. J. Optimized Reverse Micelle Surfactant System for High-Resolution NMR Spectroscopy of Encapsulated Proteins and Nucleic Acids Dissolved in Low Viscosity Fluids. // *J. Am. Chem. Soc.* 2014, 136, 3465–3474.
68. Gochman-Hecht H., Bianco-Peled H. Structure modifications of AOT reverse micelles due to protein incorporation. // *Journal of Colloid and Interface Science* 297 (2006) 276–283.
69. Водолазкая. Н. А. // Специфика протекания протолитических реакций в обращенных микрокаплях на основе аэрозоля ОТ. // *Вісник Харківського національного університету*. 2011. № 976. Хімія. Вип. 20(43).
70. Егорова Е. М., Ревина А. А., Ростовщикова Т. Н., Киселева О. И. Бактерицидные и каталитические свойства стабильных металлических наночастиц в обратных мицеллах. // *Вестн. моск. ун-та. сер. 2. химия*. 2001. Т. 42. № 5.

71. Potapov A. V., Alekseev D.B., Alekseeva I.G., A.M. Saletsky A.M. // Laser Physics Letters, 2007, V. 4, № 1, p.61. DOI: 10.1002/lapl.200610060.
72. E. Lippert. Z. Elektrochem. 61 (1957) 962–975
73. U.S. Raikar C.G. Renuka, Y.F. Nadaf, B.G. Mulimani, A.M. Karguppikar, M.K. Soudagar. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. 65 (2006) 673–677.
74. A. Rahdar, M. Aliahmad, A. Moradi Kor, D. Sahoo. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy 210 (2019) 165–170.
75. Левшин Л.В., Салецкий А.М., Люминесценция и ее измерения. Молекулярная люминесценция. М.: Изд-во МГУ, 1989, 272 с.
76. С. Мак-Глин, Т. Адзуми, М. Киносита. Молекулярная спектроскопия триплетного состояния. М: Мир, 1972, сс.293-304.
77. Klonis N., Sawyer W. H. // J. of Fluorescence. 1996. 6, N 3. P. 147.
78. К.Н. Соловьев, Е.А. Борисевич «Внутримолекулярный эффект тяжелого атома в фотофизике органических молекул» УФН, 2005, т.175 247–270.
79. D. S. McClure Triplet - Singlet Transitions in Organic Molecules. Lifetime Measurements of the Triplet State /J. Chem. Phys. 1949, 17, N10, 905-913.
80. O. Valdes-Aguilera, D. C. Neckers. Aggregation Phenomena in Xanthene Dyed /Acc. Chem. Res. 1989,22, N5, 171-177.
81. Акимов А. И. // Фотофизические свойства растворов сложных органических соединений, 2001г.
82. O.I. Volkova, A.N. Baranov, A.M. Saletsky Molecular Association Processes of Eosin in Reverse Micelles / Journal of Applied Spectroscopy 85 № 3 (2018) 381-384. <https://link.springer.com/article/10.1007/s10812-018-0661-1>.

Автор выражает глубокую благодарность научному руководителю доктору физико–математических наук, профессору Салецкому Александру Михайловичу, за предложенную актуальную и интересную тему для исследований, помощь, внимательное отношение и поддержку во время моей работы над диссертацией. Автор благодарит кандидата физико-математических наук, Кулешову Анну Александровну, за помощь в эксперименте, за ценные советы и обсуждение результатов.

**Приложение А –  
Технические характеристики и оптическая схема корреляционного спектрометра Photocor Compact.**

Диапазон измерения	Размер частиц: от 0.5 нм до 10 мкм <sup>1</sup> (диаметр) Коэффициент диффузии: 10 <sup>-5</sup> ... 10 <sup>-10</sup> см <sup>2</sup> /с
Объем образца	От 50 мкл до 4 мл
Углы рассеяния	90° (для измерения концентрированных дисперсий)
Анализ сигналов	Встроенный коррелятор PhotocorFC для авто- и кросс корреляционных измерений. Линейная и логарифмическая (мульти-тау) шкала времени. Минимальное время выборки 10 нс
Лазер	Термостабилизированный полупроводниковый лазер: 650 нм, 5В, 0.2А
Термостат	Диапазон температур: 10°С - 90°С, погрешность 0.1°С (термоэлектрический модуль)

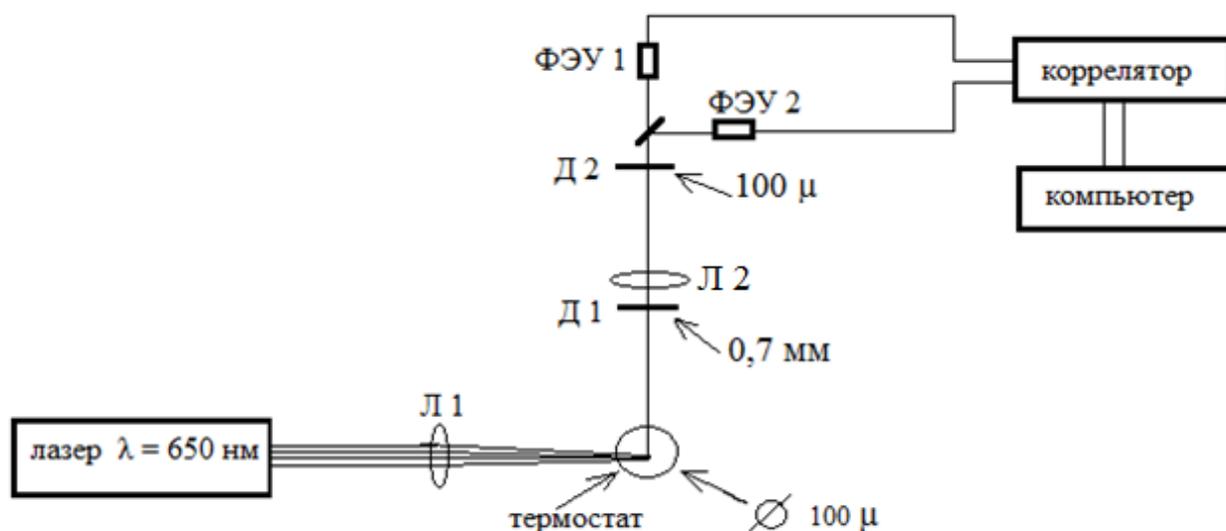


Рис. Оптическая схема спектрометра PhotocorCompact.

## Приложение Б – Технические характеристики и оптическая схема спектрофлуориметра Perkin Elmer LS 55.

Технические характеристики спектрофлуориметра Perkin Elmer LS 55:

- Принцип: однолучевой люминесцентный спектрометр, работающий в режимах флуоресценции, фосфоресценции, хеми- или биолюминесценции;
- Источник: 150 Вт ксеноновая лампа, работающая в пульсирующем режиме с частотой 50 Гц Монохроматоры: типа Монка-Джиллисона;
- Область длин волн: возбуждение: 200 – 800 нм эмиссия: 200 – 900 нм;
- Спектральная ширина щели: возбуждение: 2,5 – 15 нм эмиссия: 2,5 – 20 нм;
- Точность установки длины волны  $\pm 1,0$  нм;
- Скорость сканирования 10 – 1500 нм/мин;

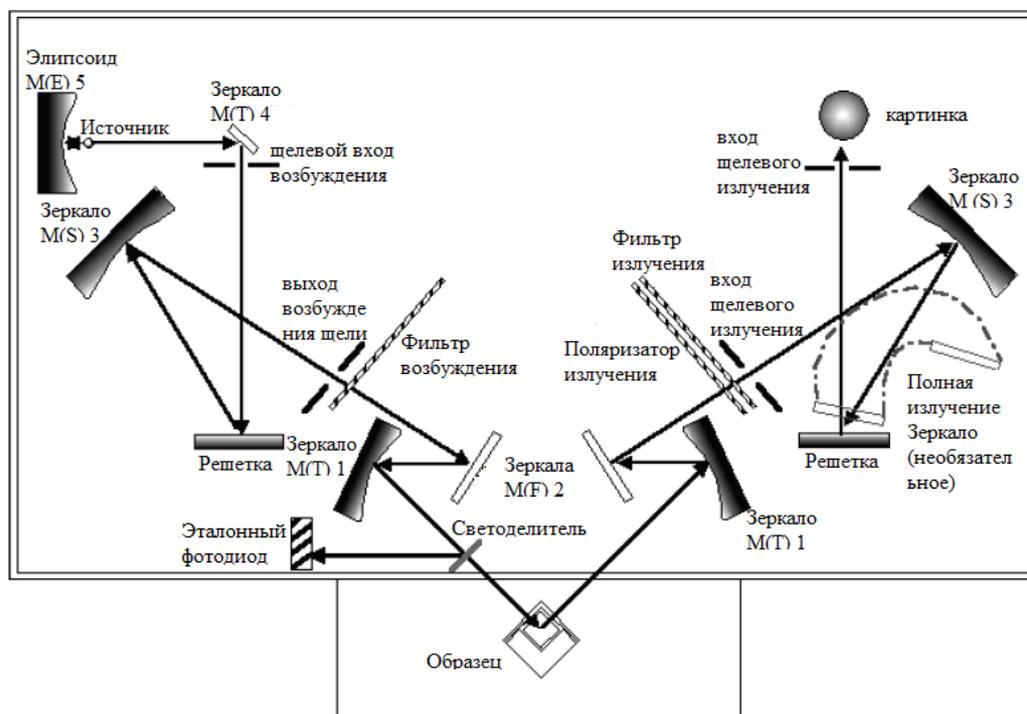


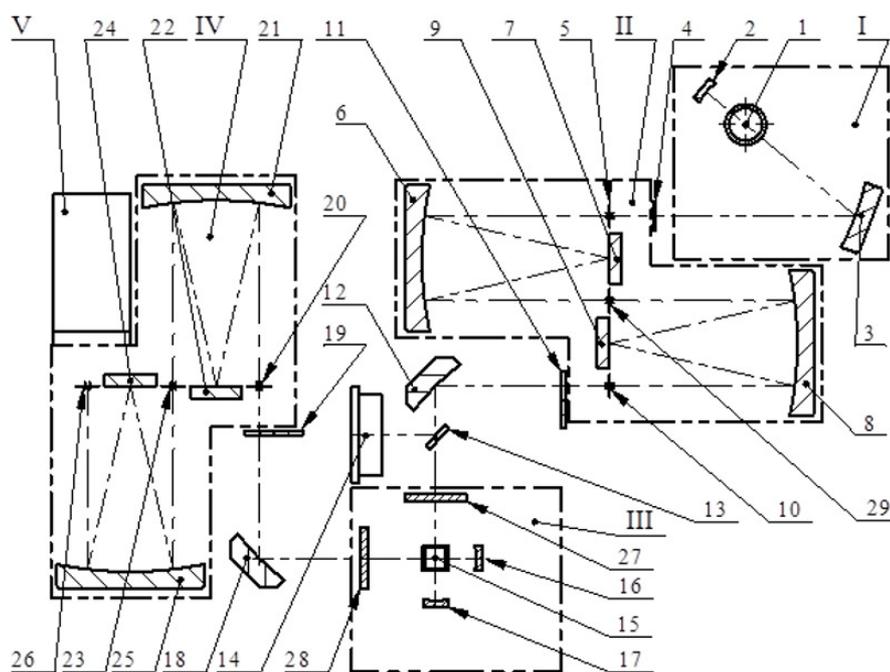
Рис. Оптическая схема спектрофлуориметра Perkin Elmer LS 55.



## Приложение В – Технические характеристики и оптическая схема спектрофлуориметра Solar CM 2203.

Технические характеристики спектрофлуориметра СОЛАР» CM2203:

- рабочая область спектра в режиме спектрофлуориметра – от 220 до 820 нм;
- тип монохроматора (возбуждения и регистрации) – двойной со сложением дисперсии;
- относительное отверстие монохроматора (возбуждения и регистрации) – 1/3,5;
- выделяемый спектральный интервал – от 1 до 15 нм;
- шаг спектрального сканирования, минимальный – 0,1 нм;



I – осветитель; II – монохроматор возбуждения  $E_x$ ; III – кюветное отделение; IV – монохроматор регистрации  $E_m$ ; V – фотоприемное устройство

Рис. Оптическая схема спектрофлуориметра СОЛАР CM2203.

## Приложение Г – Технические характеристики и оптическая схема спектрофотометра Perkin Elmer Lambda 35.

Технические характеристики спектрофотометра Perkin Elmer Lambda 35:

- диапазон длинны волны 190 – 1100 нм;
- воспроизводимость длины волны 0,1 нм;
- спектральная ширина щели 0,5 нм, 1 нм, 2 нм, 4 нм;
- скорость сканирования 7,5, 15, 30, 60, 120, 240, 480, 960, 1920 и 2880 нм/мин;
- смена ламп автоматическая на волне 326 нм (выбираемая программно на всем диапазоне длин волн);
- фотометрическая точность  $\pm 0,001$  А;
- стабильность базовой линии (200 - 900нм, 240нм/мин)  $\pm 0.001$  А (щель 1 нм),  $\pm 0.0005$  А (щель 2 нм);
- источник УФ – дейтериевая лампа, Вид – галогенная лампа накаливания.

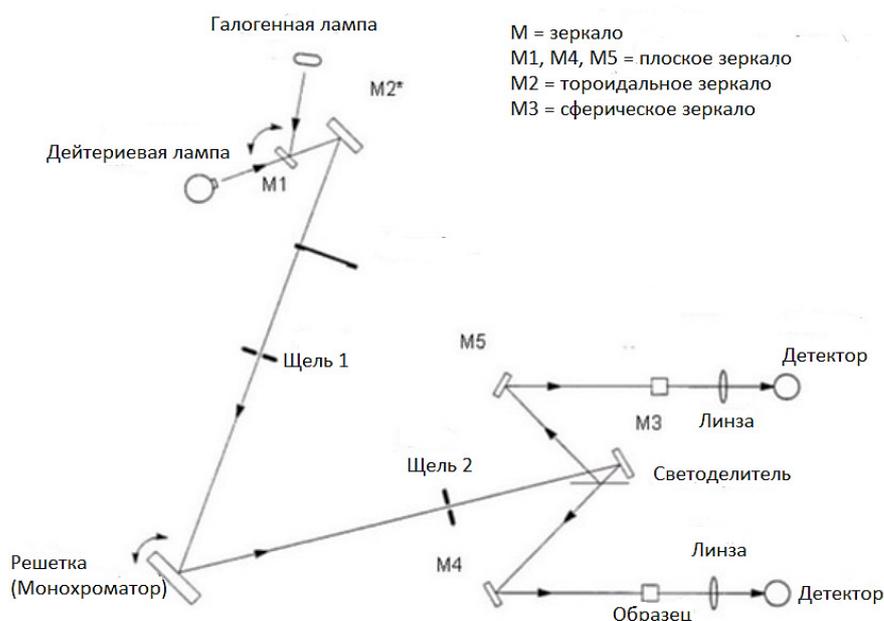


Рис. Оптическая схема спектрофотометра Perkin Elmer Lambda 35.