

ЯРКО ЛЮМИНЕСЦИРУЮЩИЕ МЕТКИ НА ОСНОВЕ НАНОЧАСТИЦ ИЗ КОМПЛЕКСОВ ИОНОВ МЕТАЛЛОВ С КУМАРИНОМ 30

© 2013 г. С. С. Дударь, канд. физ.-мат. наук; Л. Ю. Миронов, магистр

СПбНИУ ИТМО, Санкт-Петербург

E-mail: electr9@yandex.ru, lu.mironov@mail.ru

Исследована сенсibilизованная флуоресценция кумарина 30 в наночастицах, самоорганизующихся из комплексов фенилбензоилтрифторацетона и 1,10-фенантролина с ионами лантанидов, иттрия, алюминия и скандия в водно-спиртовых растворах. Показано, что при формировании наночастиц из комплексов ионов лантанидов и иттрия молекулы кумарина 30 полностью внедряются из раствора в наночастицы. Обнаружено отсутствие концентрационного тушения кофлуоресценции кумарина 30 в наночастицах во всей области исследованных концентраций красителя. Приведены факты, доказывающие внедрение кумарина 30 в комплексы лантанидов и иттрия в качестве синергического бидентантного лиганда. Продемонстрирована возможность создания ярко люминесцирующих меток, поглощающих не только в области 360–370 нм, но и в области 440–450 нм и обладающих узким спектром флуоресценции с максимумом на $\lambda = 520$ нм.

Ключевые слова: люминесцентные метки, флуоресценция наночастиц, кофлуоресценция, перенос энергии, миграция энергии, наночастицы, красители, кумарин 30, дикетонатные комплексы ионов металлов, лантаниды.

Коды OCIS: 260.2160, 260.5130, 260.3800, 300.6280.

Поступила в редакцию 05.07.2012.

Введение

Интерес к исследованию люминесцирующих наночастиц (НЧ) вызван их применением в качестве люминесцентных меток в области иммунофлуоресцентного анализа и в исследовании строения биологических объектов. Актуальной является задача детектирования малых концентраций люминесцентных меток и получение набора ярко люминесцирующих маркеров в различных областях спектра. Решение данной задачи может быть достигнуто благодаря использованию явления внедрения катионных, анионных или нейтральных молекул органических красителей в НЧ из органических комплексов ионов трехвалентных металлов и β -дикетонов в процессе самоорганизации этих НЧ в водных растворах, содержащих эти ионы и органические лиганды. Внедрение красителей в НЧ позволяет увеличить интенсивность их флуоресценции с помощью сенсibilизации красителей при возбуждении

в полосу поглощения комплексов НЧ в результате безызлучательного переноса энергии на молекулы красителя от всей совокупности тысяч возбуждаемых комплексов, составляющих наночастицу. Аккумуляция на молекуле красителя энергии электронного возбуждения от большого ансамбля комплексов внутри НЧ приводит к появлению сенсibilизованной флуоресценции (кофлуоресценции) красителя (рис. 1) с интенсивностью, превышающей от одного до двух порядков величины интенсивность флуоресценции свободного красителя в воде при его возбуждении в максимум собственной полосы поглощения. Данное явление, впервые обнаруженное и исследованное нами в 2008–2010 гг. [1–3], было использовано в представляемой работе для создания ярко люминесцирующих меток на основе НЧ из комплексов металлов с кумарином 30, которые могут повышать чувствительность иммунофлуоресцентного анализа, применяющего красители в качестве люминесцентных меток. Эти же

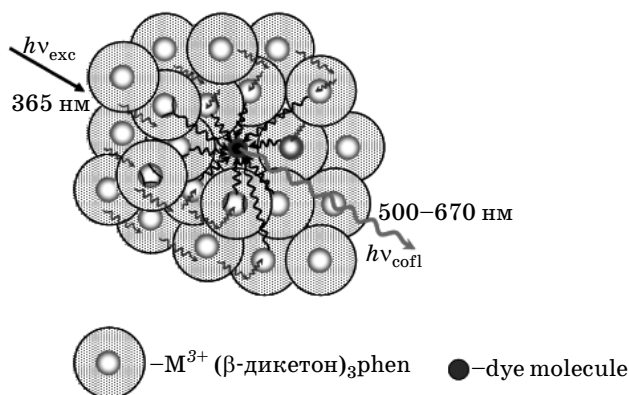


Рис. 1. Схема супрамолекулярной светособирающей наноструктуры, самоорганизующейся в водных растворах из комплексов ионов трехвалентных металлов (M^{3+}) с антенными лигандами: β -дикетоном и 1,10-фенантролином (phen), с внедренной молекулой красителя.

НЧ, а также НЧ из полимеров, допированные молекулами красителей, могут быть использованы как ярко флуоресцирующие метки в биологии [4].

В водных растворах, содержащих ионы одного из металлов (III), таких как Al, Sc, In, Y, Lu, Gd, Eu, Tb, в концентрации порядка 10 мкМ и β -дикетоны в концентрации порядка 30 мкМ, образуются НЧ из комплексов этих ионов, имеющие диаметр 10–40 нм [5–7] и состоящие из 1000–100 000 комплексов. Молекулы красителей могут внедряться во внутренний объем НЧ, который близок по свойствам к твердому телу, или адсорбироваться на поверхности НЧ, граничащей с раствором. Изначально неизвестно, какая доля растворенных молекул красителей внедрится внутрь НЧ и какая окажется на поверхности этих НЧ, как будет изменяться квантовый выход флуоресценции q_{fl} красителей при их внедрении в НЧ и росте их концентраций, как влияет присутствие спирта в водном растворе на все эти параметры. Для получения высокой яркости сенсibilизированной флуоресценции красителей в этих НЧ необходимо, чтобы энергия возбуждения большинства комплексов была передана молекулам красителя и чтобы q_{fl} самого красителя был высоким. Яркость красителей в исследованных ранее НЧ, допированных молекулами нильского синего (NB), нильского красного (NR) и родамина 6G (R6G), существенно возрастала по сравнению с водными растворами этих красителей. Но появление концентрационного тушения этих кра-

сителей в НЧ в условиях неполного переноса энергии от комплексов не позволяло достичь предельной возможной яркости их свечения. Рост сенсibilизированной флуоресценции красителей в НЧ по мере увеличения концентрации красителей в водном растворе прекращался уже при 50–100 нМ красителя. Структура молекул красителя кумарина 30 (С30) позволяет предполагать, что при больших концентрациях С30 в растворе его молекулы могут участвовать в формировании комплексов Ln(III) и Y(III) как бидентантные синергические агенты. Такое встраивание С30 в комплексы и НЧ из них должно вести к отличию закономерностей их кофлуоресценции в НЧ от ранее наблюдавшихся закономерностей для красителей, внедрившихся в структуры НЧ как примесь.

В представленной работе впервые была исследована кофлуоресценция красителя С30 наряду с тушением флуоресценции передающих ему свою энергию комплексов, на порядки различающихся величинами τ_{fl} , в НЧ из комплексов Al, Sc, Y, La, Gd, Lu с *n*-фенилбензоилтрифторацетоном (PhBTA) и 1,10-фенантролином (phen). β -дикетон PhBTA впервые был использован и изучен в этой работе в качестве органического лиганда комплекса для создания НЧ. Изучение процесса переноса энергии в этих НЧ позволило определить условия наилучшей сенсibilизации красителя С30 и показало возможность создания ярко люминесцирующих меток на основе НЧ из комплексов, допированных молекулами красителей.

Методика эксперимента

В нашей работе при синтезе НЧ из комплексов металлов M(III) использовался метод самосборки комплексов в НЧ. Самосборка комплексов в НЧ осуществлялась в процессе их формирования в водном растворе, содержащем органические лиганды, ионы металлов и примеси красителей, захватываемых в эти НЧ [1]. Из-за низкой растворимости лиганда PhBTA в воде формирование НЧ из комплексов ионов металлов с этим дикетоном осуществлялось в водно-спиртовом растворе после предварительного растворения этого дикетона в изопропанольном растворе. Для создания в водно-спиртовом растворе НЧ, имеющих размер 10–40 нм, используются концентрации дикетонов в области 30–100 мкМ. Размер образующихся НЧ убывает по мере роста концен-

трации спирта в растворе. Поэтому прежде чем формировать НЧ из комплексов М(III) были исследованы растворимость PhBTA в водно-изопропанольных растворах и способность его комплексов с ионами металлов и phen формировать НЧ, сенсibiliзующие захватываемые ими из раствора молекулы красителей. При концентрации PhBTA 30 мкМ его растворы оставались стабильными, начиная с концентрации 10 об.% изопропанола в воде. С ростом концентрации изопропанола в растворах 10 мкМ М(III) + 30 мкМ PhBTA + 10 мкМ phen с красителем интенсивность его кофлуоресценции (I_{cofl}) уменьшалась. Поскольку величина I_{cofl} красителей была наибольшей в 10%-ном растворе изопропанола, все дальнейшие измерения флуоресценции НЧ из комплексов этого дикетона проводились в растворах такого состава. Наличие кофлуоресценции и рост ее интенсивности во времени свидетельствуют о формировании НЧ и росте размера НЧ в растворе. Для приготовления растворов НЧ использовались хлориды Al(III), Y(III), La(III), Lu(III) и Gd(III), а также ацетат Sc(III) марки х.ч. Дикетон и phen фирмы Chemapol использовались без дополнительной очистки. В качестве растворителей использовалась дистиллированная вода и изопропанол марки осч. В НЧ из комплексов внедрялся нейтральный краситель С30 фирмы НИОПИК. Все компоненты раствора вводились путем интенсивного перемешивания раствора лигандов в изопропанол и водно-спиртового раствора солей металлов и красителей. Методика приготовления растворов влияла на количество молекул красителя, внедренных в НЧ, и на однородность состава НЧ. Поэтому способ приготовления раствора и время между моментом приготовления раствора и временем измерения его флуоресценции было строго регламентировано.

При исследовании кофлуоресценции С30 в НЧ из комплексов PhBTA с ионами легких металлов Al(III) и Sc(III) длинноволновая часть спектра интенсивной флуоресценции комплексов перекрывалась со спектром С30, что мешало измерению величин I_{cofl} С30 в области концентраций С30, меньших концентрации НЧ в растворе. Величина q_{fl} флуоресценции С30 в исследуемом растворе (90 об% воды + 10 об% изопропанола) была определена путем сравнения с его флуоресценцией в 50%-ном растворе этанола, в котором он равен 0,35 [8]. Величина q_{fl} С30 в 10%-ном

растворе изопропанола в воде оказалась равной 0,09. Квантовый выход флуоресценции НЧ, формирующихся из комплексов Al и Sc в водно-спиртовом 10%-ном растворе, содержащем 10 мкМ Al(III) или Sc(III) + 30 мкМ PhBTA + 10 мкМ phen, был определен путем сравнения их величин q_{fl} с величиной 9,10-пропилантрацена в этаноле $q_{\text{fl}} = 0,76$ [9]. Величина q_{fl} комплексов Sc в изучаемых растворах оказалась равной 0,015.

Соизмеримость величин q_{fl} и близость положения максимумов спектров флуоресценции С30 ($\lambda_{\text{max}} = 495$ нм) и комплексов Al(PhBTA) $_n$ ($\lambda_{\text{max}} = 440$ нм) или Sc(PhBTA) $_n$ ($\lambda_{\text{max}} = 460$ нм) приводят к тому, что при концентрациях С30 ≤ 50 нМ в растворах НЧ наблюдается суммарный спектр потушенной флуоресценции комплексов и кофлуоресценции красителя, который трудно разделить на компоненты (рис. 2а). При концентрации С30 от 200 нМ

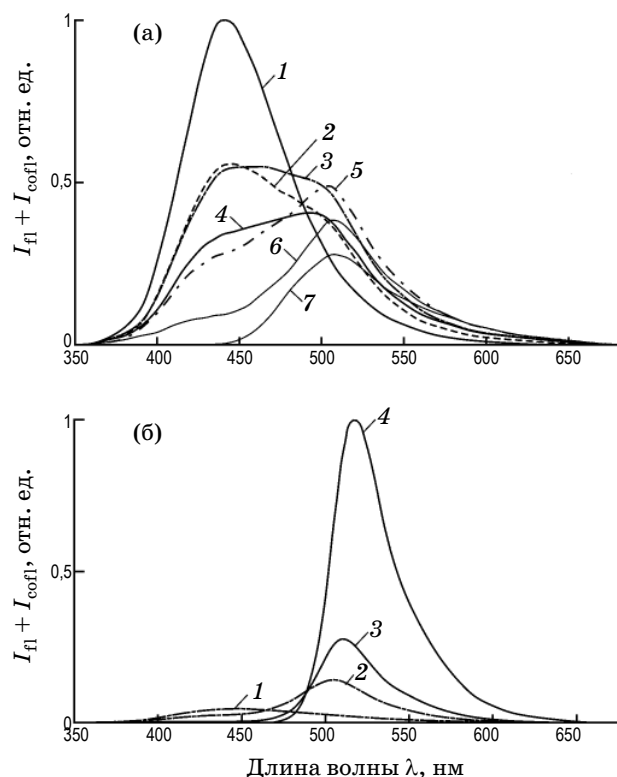


Рис. 2. Зависимость суммарного спектра флуоресценции комплексов и кофлуоресценции кумарина 30 (С30) в НЧ, формирующихся в водно-спиртовых (10% $\text{C}_3\text{H}_7\text{OH}$) растворах 10 мкМ М(III) + 3,75 мкМ PhBTA + 1,25 мкМ phen, от концентрации С30 в растворе. а – М(III) = Al(III), при [С30]: 1 – 0, 2 – 50, 3 – 200, 4 – 300, 5 – 500, 6 – 1000, 7 – 10 000 нМ; б – М(III) = La(III), при [С30]: 1 – 0 (I_{fl} увеличено в 5 раз), 2 – 5 ($I_{\text{fl}} + I_{\text{cofl}}$ увеличено в 5 раз), 3 – 50, 4 – 1000 нМ.

вклад спектра флуоресценции комплексов в суммарный спектр флуоресценции НЧ из комплексов Sc или Al незначителен. Учет вклада потушенной флуоресценции комплексов Al и Sc в области спектра кофлуоресценции С30 проводился путем линейной интерполяции данных о тушении флуоресценции комплексов Al и Sc при больших концентрациях С30 в область его концентраций 50 нМ. Интенсивность спектров флуоресценции комплексов ионов тяжелых металлов Y, La, Gd, Lu была на порядок ниже, что позволяло надежно исследовать кофлуоресценцию С30 в широкой области его концентраций в растворе (рис. 2б). Спектры поглощения измерялись на спектрофотометре Cary 500, спектры флуоресценции и спектры возбуждения флуоресценции – на спектрофлуориметре Hitachi 650-40.

Результаты и обсуждение

Влияние центрального иона комплексов на I_{cofl} красителя С30, внедренного в НЧ как примесь

В результате работы были измерены и сопоставлены спектры кофлуоресценции красителя С30 и спектры флуоресценции комплексов в растворах НЧ из дикетонатов с ионами легких (Al, Sc) и тяжелых (Y, La, Gd, Lu) металлов, на порядки различающихся величинами τ_{fl} . При возбуждении в полосу поглощения комплексов ($\lambda_{\text{exc}} = 365$ нм) в присутствии С30 ≤ 50 нМ в растворе наблюдается усиление

интенсивности флуоресценции С30 в 20–25 раз по сравнению с интенсивностью свободного красителя в растворе при его возбуждении в максимум собственной полосы поглощения ($\lambda_{\text{exc}} = 427$ нм). Это свидетельствует о внедрении С30 в НЧ.

В табл. 1 приведены значения I_{fl}^0 самого дикетона PhBTA и его комплексов с ионами в отсутствие С30 и I_{cofl} С30 в НЧ из комплексов шести ионов с PhBTA в присутствии 50 нМ С30 в растворе. Из табл. 1 видно, что так же, как ранее для НЧ из комплексов DBM с ионами металлов, допированных R6G и NR [10], в НЧ из комплексов PhBTA, допированных С30, при его концентрации в растворе 50 нМ величина I_{cofl} мало меняется под влиянием координации лигандов с более тяжелым ионом металла. При I_{fl} комплексов Y(III), в 30 раз меньшей I_{fl} комплексов Al(III), величины I_{cofl} С30 в НЧ из этих разных комплексов отличаются незначительно. Эти данные подтверждают вывод, что в условиях низких концентраций (не более 50 нМ) С30 в растворе величина I_{cofl} при его внедрении в НЧ из комплексов ионов с PhBTA почти не зависит от выбора центрального иона комплекса, а следовательно, мало зависит от τ_{fl} комплексов. Можно предполагать, что основным фактором, определяющим величину I_{cofl} красителя, является длина пробега синглетного экситона в НЧ, размер которой соизмерим с размером самих НЧ. Однако следует заметить, что при этом величины I_{cofl} могут отличаться в НЧ из комплексов разных ионов из-за ряда факторов: различия в раз-

Таблица 1. Зависимости собственной интенсивности (I_{fl}^0) флуоресценции комплексов и кофлуоресценции (I_{cofl}) красителя С30 и $\lambda_{\text{cofl}}^{\text{max}}$ от выбора центрального иона комплексов при двух концентрациях С30, внедренного в НЧ из комплексов, формирующиеся в растворе 10 мкМ М(III) + 3,75 мкМ PhBTA + 1,25 мкМ phen в H₂O + 10 об.% C₃H₇ OH при $T = 293$ К. Значения I_{fl}^0 приведены в отн. ед. для одинакового поглощения комплексов при $\lambda_{\text{exc}} = 365$ нм

| Ион, М(III) | M(PhBTA) ₃ phen | | M(PhBTA) ₃ phen + 50 нМ С30 | | M(PhBTA) ₃ phen + 1000 нМ С30 | | |
|----------------|----------------------------|------------------------------------|--|--------------------------------------|--|-----------------|--------------------------------------|
| | I_{fl}^0 | $\lambda_{\text{fl}}^{\text{max}}$ | I_{cofl} | $\lambda_{\text{cofl}}^{\text{max}}$ | I_{cofl} | I_{fl} | $\lambda_{\text{cofl}}^{\text{max}}$ |
| Нет | 12 | 460 | 0 | — | 0 | — | — |
| Al | 850 | 445 | 210 | — | 300 | 27 | 510 |
| Sc | 300 | 460 | 250 | — | 630 | 2,0 | 510 |
| Y | 30 | 435 | 360 | 508 | 3200 | <10 | 520 |
| La | 20 | 448 | 500 | 510 | 3100 | <10 | 520 |
| Lu | 25 | 430 | 230 | 507 | — | — | — |
| Gd | 15 | 430 | 160 | 510 | 1900 | — | 515 |

мере самих НЧ, разного влияния состава НЧ на собственный выход флуоресценции красителя в НЧ и вариации способности красителя внедряться в эти НЧ.

Закономерности изменения I_{cofl} красителя С30 в НЧ при росте концентрации красителя в растворе до концентраций комплексов

Ранее наблюдалось, что в растворах НЧ из комплексов ионов легких и тяжелых металлов рост I_{cofl} R6G и NB прекращался в области их концентраций 100–200 нМ, при этом полное тушение флуоресценции комплексов еще не наблюдалось. В данной работе исследовано тушение флуоресценции комплексов Y, Al, La, Lu, Gd, Sc с PhBTA с одновременным ростом кофлуоресценции С30 при внедрении в НЧ из этих комплексов по мере роста концентрации С30 в растворе. Обнаружено, что в НЧ из комплексов Al при 200 нМ С30 рост I_{cofl} прекращался, несмотря на то что тушение флуоресценции самих комплексов возрастало от трехкратного при 200 нМ С30 до двадцатикратного при 1000 нМ С30 (табл. 2 и рис. 3), и, следо-

вательно, внедрение С30 в НЧ продолжалось. В НЧ из комплексов Sc наблюдается полное тушение флуоресценции комплексов при 500–1000 нМ С30 в растворе, сопровождающееся замедлением роста I_{cofl} С30 (табл. 2 и рис. 3).

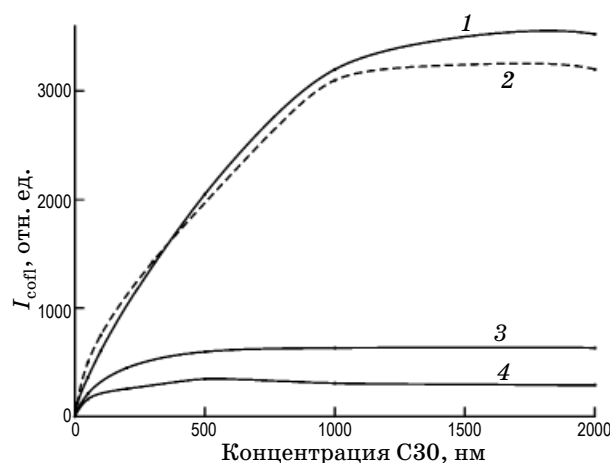


Рис. 3. Зависимость интенсивности кофлуоресценции С30 от его концентрации в водно-спиртовых (10% $\text{C}_3\text{H}_7\text{OH}$) растворах 10 мкМ М(III) + 3,75 мкМ PhBTA + 1,25 мкМ phen, где М(III): 1 – Y(III); 2 – La(III); 3 – Sc(III); 4 – Al(III).

Таблица 2. Сравнение зависимости величин I_{cofl} , $\lambda_{\text{cofl}}^{\text{max}}$ и $\Delta\nu_{1/2}$ спектра кофлуоресценции С30 и I_{fl} комплексов от концентрации красителя в условиях формирования НЧ из комплексов Y, Al и Sc со встроенным в них красителем в растворе 10 мкМ М(III) + 3,75 мкМ PhBTA + 1,25 мкМ phen при $T = 293$ К

| [С30], нМ | Y(PhBTA) ₃ phen | | | | Sc(PhBTA) _n ^{*)} | | | | Al(PhBTA) _n ^{**)} | | | |
|-----------|----------------------------|-------------------|---|--------------------------------------|--------------------------------------|-------------------|---|--------------------------------------|---------------------------------------|-------------------|---|--------------------------------------|
| | I_{fl} | I_{cofl} | $\lambda_{\text{cofl}}^{\text{max}}$, нМ | $\Delta\nu_{1/2}$, см ⁻¹ | I_{fl} | I_{cofl} | $\lambda_{\text{cofl}}^{\text{max}}$, нМ | $\Delta\nu_{1/2}$, см ⁻¹ | I_{fl} | I_{cofl} | $\lambda_{\text{cofl}}^{\text{max}}$, нМ | $\Delta\nu_{1/2}$, см ⁻¹ |
| 0 | 30 | | | | 300 | | | | 850 | | | |
| 5 | 30 | 74 | 500 | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 10 | 30 | 120 | 502 | 2050 | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 20 | 30 | 150 | 505 | 2030 | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 50 | — | 360 | 508 | 2000 | — | <320 | 480 ^{***)} | — | <470 | <210 | — | — |
| 100 | — | 610 | 510 | 1800 | — | — | — | — | <441 | 300 | — | — |
| 200 | ~24 | 900 | 512 | 1650 | <30 | 450 | 500 | 2500 | <290 | — | 500 | — |
| 500 | ~15 | 2000 | 515 | 1550 | <10 | 600 | 505 | 2320 | 120 | 350 | 505 | - |
| 1000 | ~10 | 3200 | 520 | 1500 | 0 | 630 | 510 | 2250 | 40 | 300 | 510 | 2300 |
| 2000 | — | 3200 | 520 | 1500 | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 10000 | — | 3200 | 520 | 1500 | 0 | 690 | 512 | 2000 | 0 | 240 | 510 | 2400 |

^{*)} Согласно [14] в растворах дикетонатов и phen возможно сосуществование комплексов Sc(III) не только с тремя бидентантными дикетонатами, но и с бидентантными и монодентантными дикетонатами + phen.

^{**)} В растворах Al(III) и PhBTA НЧ построены из набора комплексов разного состава [15].

^{***)} Приведен максимум суммарного спектра.

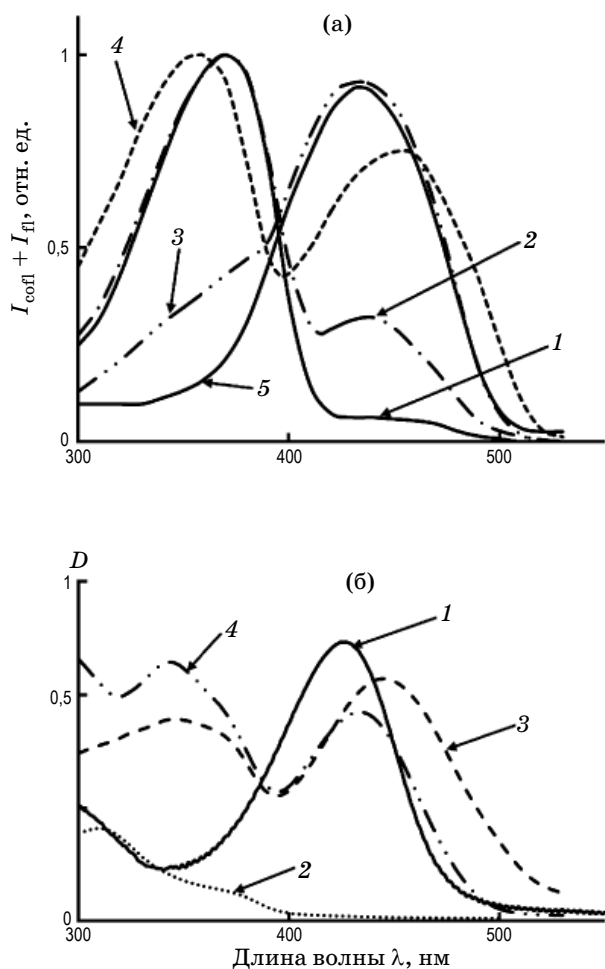


Рис. 4. Сопоставление спектров возбуждения кофлуоресценции и флуоресценции С30 в водно-спиртовых (10% $\text{C}_3\text{H}_7\text{OH}$) растворах НЧ разного состава с их спектрами поглощения. а – спектры возбуждения ($\lambda_{\text{рег}} = 560$ нм) кофлуоресценции и флуоресценции С30 в растворах НЧ из $\text{Sc}(\text{PhVTA})_n$ при $[\text{C30}]$: 1 – 0,05 мкМ, 2 – 1 мкМ, 3 – 10 мкМ, 4 – в растворах НЧ из $\text{Y}(\text{PhVTA})_3\text{phen}$ при $[\text{C30}] = 10$ мкМ, 5 – в растворах НЧ из $\text{Al}(\text{PhVTA})_n$ при $[\text{C30}] = 10$ мкМ; б – спектры поглощения в водно-спиртовом (10%) растворе: 1 – 2 мкМ С30 в кювете 1 см; 2 – 10 мкМ $\text{Y}(\text{III}) + 30$ мкМ PhVTA в кювете 1 мм; 3 – 10 мкМ $\text{Y}(\text{III}) + 30$ мкМ PhVTA + 10 мкМ С30 в кювете 1 мм; 4 – 10 мкМ $\text{Y}(\text{III}) + 30$ мкМ PhVTA + 10 мкМ phen в кювете 1 мм.

Было изучено изменение спектров возбуждения флуоресценции С30 с ростом его концентрации в растворе НЧ из комплексов Sc (рис. 4). Показано, что по мере роста концентрации С30 возбуждение через полосу поглощения самого красителя ($\lambda_{\text{max}} = 460$ нм) становится более интенсивным по сравнению с возбуждением в полосу поглощения комплексов

НЧ ($\lambda_{\text{max}} = 365$ нм). Спектр возбуждения становится похож на спектр поглощения свободного красителя в растворе, что свидетельствует о том, что значительная доля красителя не входит в НЧ, оставаясь в растворе.

Обнаружено, что в растворах НЧ из комплексов $\text{Me}(\text{PhVTA})_3\text{phen}$ (где $\text{Me} = \text{Y}, \text{La}, \text{Gd}$ и Lu) величина I_{cofl} С30 в максимуме его спектра кофлуоресценции продолжает расти с ростом его концентрации от 5 нМ до 500–1000 нМ (рис. 3 и табл. 2). Рост величины I_{cofl} остановился в области концентраций С30 от 1 до 10 мкМ, соизмеримых с концентрацией комплексов в растворе. В отличие от растворов и пористых стекол, активированных С30 [11], обнаружено отсутствие концентрационного тушения кофлуоресценции С30 в НЧ во всей исследуемой области его концентраций в растворе вплоть до 10 мкМ, несмотря на соизмеримость этой концентрации красителя с концентрацией комплексов. Величины I_{cofl} С30 и все закономерности его кофлуоресценции в НЧ одинаковы для НЧ из комплексов $\text{Me}(\text{PhVTA})_3\text{phen}$ со всеми исследованными ионами: $\text{Y}(\text{III}), \text{La}(\text{III}), \text{Lu}(\text{III})$ и $\text{Gd}(\text{III})$. Заметим, что при концентрациях С30 в растворе, соизмеримых с концентрациями комплексов, предельная величина I_{cofl} С30 в НЧ из $\text{Y}(\text{PhVTA})_3\text{phen}$ в 10 раз выше, чем в НЧ из $\text{Al}(\text{PhVTA})_n$, и в 5 раз выше, чем в НЧ из $\text{Sc}(\text{PhVTA})_n$, при одинаковом поглощении $\lambda_{\text{exc}} = 365$ нм.

Различия в закономерностях изменения I_{cofl} от концентрации С30 и вариация предельных величин I_{cofl} С30 в НЧ из комплексов с разными ионами были объяснены тем, что доля встраивающихся в НЧ нейтральных молекул С30 и их распределение по объему НЧ различаются для НЧ из гидроксодикетонатных комплексов Al и Sc и для НЧ из комплексов Y и Ln, имеющих координационные числа 7–9 и бидентантно связанных с четырьмя органическими лигандами. Это подтверждается сопоставлением спектров возбуждения флуоресценции С30 в растворах $\text{Y}(\text{PhVTA})_3\text{phen}$, $\text{Sc}(\text{PhVTA})_n$ и $\text{Al}(\text{PhVTA})_n$ при концентрации 10 мкМ С30 в растворе, равной концентрации phen и концентрации комплексов, формирующих НЧ (рис. 4а, кривые 3, 4, 5). Показано, что собственная полоса поглощения С30 является основной полосой возбуждения красителя в растворах НЧ из $\text{Sc}(\text{PhVTA})_n$ и $\text{Al}(\text{PhVTA})_n$. В то же время в растворах НЧ из комплексов Lu, La, Gd и Y в спектре возбуждения флуо-

ресценции С30 оказываются соизмеримыми интенсивности полос в области поглощения комплексов (360–370 нм) и в области поглощения самого красителя (440–460 нм) (рис. 4, кривая 4). Это свидетельствует о том, что при больших концентрациях С30 (более 200 нМ) в растворе только в НЧ из комплексов Lu, La, Gd и Y значительная доля молекул С30 из раствора переходит в НЧ, где возбуждается в полосе поглощения комплексов.

Было обнаружено, что интенсивность флуоресценции 300 нМ С30, сенсibilизованной комплексами Y(PhBTA)₃phen, в 3 раза выше, чем I_{fl} при прямом возбуждении красителя в его собственную полосу поглощения. Максимум собственной полосы возбуждения флуоресценции С30 совпадает с его спектром поглощения в растворах НЧ и сдвинут на 40 нм относительно поглощения С30 в воде с 10 об.% изопропанола. Такой процесс характерен именно для НЧ, допированных С30, а не другим красителем, например R6G [12]. Следовательно, доля молекул С30, внедряющихся в НЧ из растворов, существенно выше, чем в аналогичных растворах с R6G при той же концентрации красителя. Этим обстоятельством объяснен тот факт, что, несмотря на большую на порядок величину q_{fl} R6G по сравнению с q_{fl} С30, величина I_{cofl} С30 близка величине I_{cofl} R6G [12] в НЧ из Y(PhBTA)₃phen при одинаковых концентрациях (5–100 нМ) в растворах, в которых формируются НЧ. При больших концентрациях красителей в растворе величины I_{cofl} С30 становятся выше, чем для R6G.

Обнаруженная закономерность продемонстрировала возможность создания ярко люминесцирующих меток на основе НЧ из комплексов Y(PhBTA)₃phen и Ln(PhBTA)₃phen, допированных молекулами С30.

Сопоставление спектров кофлуоресценции и спектров флуоресценции красителей в растворах НЧ при высоких концентрациях С30

По мере роста концентрации С30 в растворах при внедрении красителя в НЧ его спектры кофлуоресценции (рис. 2 и табл. 2) сдвигаются в длинноволновую область в растворах НЧ из комплексов всех ионов. Наибольший сдвиг спектра С30 наблюдался в растворах НЧ из комплексов ионов Y(III) и Ln(III), имеющих координационное число 7–9. Путем сравнения спектра кофлуоресценции С30

и его спектра флуоресценции при возбуждении в собственную полосу поглощения красителя в растворах НЧ было показано, что в НЧ из комплексов La и Y при концентрации С30, лишь в 10 раз меньшей концентрации комплексов в растворе, все молекулы С30 находятся в НЧ. С ростом концентраций С30 от 5 до 1000 нМ в растворе НЧ из комплексов Y спектр его кофлуоресценции постепенно сужается от $\Delta\nu_{1/2} = 2050$ до 1500 см^{-1} , а максимум спектра кофлуоресценции С30 смещается от 500 до 520 нм (табл. 2). При этом максимум спектра возбуждения флуоресценции красителя в области его собственной полосы поглощения и максимум спектра его поглощения сдвигаются от 427 примерно до 450–460 нм (рис. 4). При 1 мкМ С30 в растворе 10 мкМ La(III) + 30 мкМ PhBTA + 10 мкМ phen наблюдалось совпадение спектра кофлуоресценции С30 ($\lambda_{exc} = 365 \text{ нм}$) и его спектра флуоресценции при прямом возбуждении в собственную полосу поглощения ($\lambda_{exc} = 450 \text{ нм}$) (рис. 5) и отличие этих спектров от спектра флуоресценции свободного С30 в 10%-ном водно-изопропанольном растворе ($\lambda_{cofl}^{max} = 495 \text{ нм}$). Полученный результат свидетельствует о 100%-ном внедрении С30 в НЧ при концентрации С30, лишь в 10 раз меньшей концентрации комплексов в растворе.

И только при дальнейшем увеличении концентрации С30 до концентрации, равной кон-

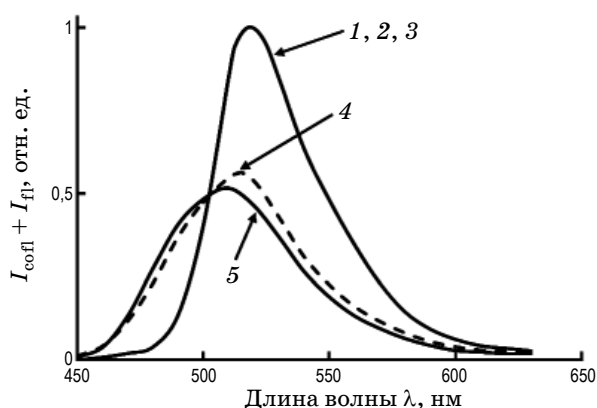


Рис. 5. Сравнение спектров кофлуоресценции С30 в НЧ из комплексов La(PhBTA)₃phen при $\lambda_{exc} = 365 \text{ нм}$ и [С30] (1 – 1 мкМ; 2 – 5 мкМ) со спектрами флуоресценции С30 в НЧ при прямом возбуждении в его полосу поглощения при концентрациях [С30]: 1 мкМ (3), 5 мкМ (4) при $\lambda_{exc} = 450 \text{ нм}$; 5 мкМ (5) при $\lambda_{exc} = 415 \text{ нм}$. Кривые 1, 2 и 3 нормированы и совпадают по форме и интенсивности в пределах погрешности опытов.

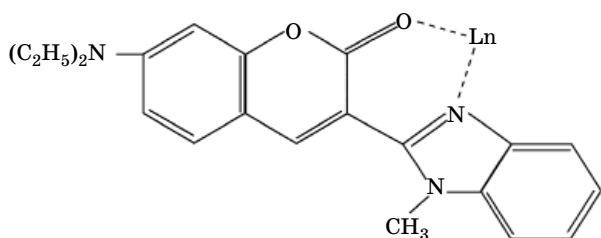
центрации комплексов в растворе 10 мкМ, спектр флуоресценции С30 при прямом возбуждении в собственную полосу поглощения начинает смещаться относительно его спектра кофлуоресценции ($\lambda_{\text{exc}} = 365$ нм). Причем различие этих спектров увеличивается при возбуждении в полосу поглощения свободного красителя в растворе ($\lambda_{\text{exc}} = 415$ нм) по сравнению с возбуждением в полосу поглощения внедренных молекул красителя ($\lambda_{\text{exc}} = 450$ нм). Полученный результат показывает неполное вхождение красителя в НЧ при 2–10 мкМ С30 в растворе. Часть молекул красителя остается в растворе.

Этим же методом установлено, что доля молекул С30, внедряющихся в НЧ из $\text{Sc}(\text{PhBTA})_n$ и $\text{Al}(\text{PhBTA})_n$, значительно ниже по сравнению с НЧ из $\text{Ln}(\text{PhBTA})_3\text{phen}$.

Обнаружено, что наблюдаемое с ростом концентрации С30 сужение в 1,5 раза до $\Delta\nu_{1/2} = 1400\text{--}1500$ см^{-1} его спектров кофлуоресценции и флуоресценции в НЧ при сдвиге в красную область (табл. 1) не сопровождается уменьшением полуширины спектра поглощения С30 в НЧ ($\Delta\nu_{1/2} = 3000\text{--}4000$ см^{-1}), также сдвинутого в длинноволновую область. Этот результат, наблюдаемый при концентрации С30 в растворе в области 0,2–1 мкМ (что соответствует 2–10 молекулам С30 на 100 комплексов в НЧ), был объяснен наличием в этой области концентраций спектральной миграции энергии возбуждения между молекулами С30 к тем его молекулам определенного однородного состава, которые имеют наиболее длинноволновый спектр флуоресценции.

Влияние С30 на состав комплексов и НЧ

Обнаруженное в данной работе отсутствие концентрационного тушения С30 вплоть до его концентраций, соизмеримых с концентрацией комплексов, формирующих НЧ, в отличие от других ранее изученных красителей R6G [3], NB [3] и NR [13], можно объяснить, предполагая, что С30 встраивается в комплексы этих ионов в качестве бидентантного синергического агента, конкурирующего с phen, –



С целью получения доказательств справедливости такого предположения были измерены и сопоставлены спектры поглощения водно-спиртового раствора 10 мкМ Y(III) + 30 мкМ PhBTA со спектрами растворов, в которые дополнительно в качестве синергического агента введены молекулы С30 (рис. 4б) или phen. В отсутствие phen или С30 для раствора Y(III) + PhBTA наблюдалось небольшое, нестабильное во времени поглощение в области 365 нм, характерное для комплексов дикетонатов с ионами (рис. 4б). В то же время спектр поглощения комплексов в этом растворе в присутствии 10 мкМ С30 был почти идентичен спектру раствора, в который в качестве синергического агента вводилось 10 мкМ phen (рис. 4б), а величина I_{cofl} С30 при его концентрации 10 мкМ была лишь немного ниже, чем в растворе, содержащем одновременно 10 мкМ phen и 10 мкМ С30. Полученный результат свидетельствует о том, что С30 так же, как phen, координируется с ионом Y и способствует упрочнению связи ионов Y и Ln с β -дикетонами, т. е. выступает в качестве синергического агента. Такая особенность встраивания именно С30 устраняет концентрационное тушение красителя при внедрении в НЧ из комплексов Y(PhBTA)₃phen и Ln(PhBTA)₃phen. При концентрации 1000 нМ С30 не обнаружено влияние phen на I_{cofl} С30 в НЧ из $\text{Sc}(\text{PhBTA})_n$ и $\text{Al}(\text{PhBTA})_n$ и на спектры поглощения комплексов этих ионов, т. е. присутствие синергического агента не влияет на устойчивость НЧ из комплексов Sc и Al. Отсутствием координации С30 с ионами Al и Sc как с синергическим агентом было объяснено наблюдавшееся прекращение роста I_{cofl} С30 уже при 200 нМ в растворе НЧ из $\text{Sc}(\text{PhBTA})_n$ и $\text{Al}(\text{PhBTA})_n$.

Связывание ионов с органическими молекулами и внедрение органических молекул в НЧ может существенно влиять на их q_{fl} .

Были получены и сопоставлены величины q_{fl} С30 при возбуждении в его собственную полосу поглощения ($\lambda_{\text{exc}} = 440$ нм) в водно-спиртовых растворах НЧ из комплексов различных ионов в растворах, содержащих 50 и 1000 нМ С30, с величиной q_{fl} свободных молекул С30 в 10%-ном водно-спиртовом растворе. При малых концентрациях (порядка 50 нМ) С30, встраиваясь в НЧ, слабо конкурирует с phen как синергический агент, а входит в НЧ как примесь. Величины q_{fl} С30 в растворах НЧ из комплексов всех изученных ионов не отличались от величины q_{fl} в водно-спиртовых рас-

твором самого красителя. Таким образом, взаимодействие СЗ0 с ионами Y и Ln и самосборка комплексов этих ионов в НЧ не влияет на q_{fl} исследуемого красителя. Следовательно, усиление в 20 раз флуоресценции СЗ0 с концентрацией 50 нМ при внедрении красителя из раствора в НЧ обусловлено исключительно увеличением интенсивности флуоресценции СЗ0 за счет его возбуждения через комплексы НЧ.

Поскольку НЧ содержит не менее 1000 комплексов [5–7], то в отсутствие тушения энергии возбуждения на примесях усиление флуоресценции 50 нМ СЗ0 при его внедрении в НЧ и миграции большей части энергии возбуждения к красителю должно быть менее 100. Все реагенты использовались без дополнительной очистки. Отличие ожидаемого и наблюдаемого усиления флуоресценции красителей при их внедрении в НЧ было объяснено конкуренцией посторонних примесей за энергию возбуждения комплексов в НЧ, и конкуренция этих двух процессов объясняет рост величины I_{conf} СЗ0 при концентрациях СЗ0, больших его концентрации, необходимой для полного переноса энергии от НЧ к красителю.

Выводы и заключение

Представленная работа расширила число красителей, для которых исследовано их внедрение в НЧ из комплексов, и еще раз доказала возможность усиления их флуоресценции при таком внедрении. Важным результатом этой работы является создание НЧ, внедрение молекул красителя в которые в концентрациях,

соизмеримых с концентрацией комплексов, не приводит к появлению концентрационного тушения красителя. Показано, что отсутствие концентрационного тушения вызвано взаимодействием СЗ0 непосредственно с ионами комплексов. Это позволило создать на основе НЧ из комплексов металлов с внедренным красителем СЗ0 ярко флуоресцирующую метку в области 520 нм, флуоресценция которой возбуждается не только в области 360–370 нм, но и в области 440–460 нм, что создает более щадящий режим для люминесцентных исследований биологических объектов. Синтезированные в данной работе НЧ на основе ароматических бета-дикетонатных комплексов ионов Y(III), Ln(III), Lu(III) и Gd(III) с внедренными в них высокими концентрациями молекул красителя СЗ0 имеют молярный коэффициент поглощения в области 340–450 нм при размере НЧ 10 нм больше $5 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ и высокую яркость флуоресценции. Такой объект, несомненно, должен заинтересовать биологов, использующих люминесцентные методы в своих исследованиях.

Авторы благодарят Российский фонд фундаментальных исследований за финансовую поддержку работы по гранту 10-03-00566а и Минобрнауки РФ за финансовую поддержку в рамках ФЦП “Научные и научно-педагогические кадры инновационной России” на 2009–2013 г. (контракт П412). Авторы выражают глубокую признательность профессору Е.Б. Свешниковой и профессору В.Л. Ермолаеву за поддержку, полезные обсуждения в ходе работы и ряд ценных замечаний по тексту статьи.

* * * * *

ЛИТЕРАТУРА

1. Дударь С.С., Свешникова Е.Б., Ермолаев В.Л. Перенос энергии от комплексов Eu(III) и Tb(III) к красителям в их смешанных наноструктурах. I // Опт. и спектр. 2008. Т. 104. № 2. С. 262–271.
2. Дударь С.С., Свешникова Е.Б., Ермолаев В.Л. Перенос энергии от комплексов Eu(III) и Tb(III) к красителям в их смешанных наноструктурах. II // Опт. и спектр. 2008. Т. 104. № 5. С. 801–808.
3. Дударь С.С., Свешникова Е.Б., Ермолаев В.Л., Мамончиков Е.В., Гуляев А.В. Колюминесценция молекул красителей в наноструктурах из комплексов ионов металлов // Опт. и спектр. 2009. Т. 107. № 2. С. 81–91.
4. Pecher J., Mecking St. Nanoparticles of conjugated polymers (invited contribution) // Chem. Rev. 2010. V. 110. P. 6260–6279.
5. Wu Ch., Peng H., Jiang Y., McNeil J. Energy transfer mediated fluorescence from blended conjugated polymer nanoparticles // J. Phys. Chem. B. 2006. V. 110. P. 14148–14154.
6. Peng H., Wu Ch., Jiang Y., Huang Sh., McNeil J. Highly Luminescent Eu³⁺ Chelate Nanoparticles Prepared by a Reprecipitation–Encapsulation Method // Langmuir. 2007. V. 23 № 4. P. 1591–1595.

7. Wen X., Li M., Wang Y., Zhang J., Fu L., Hao R., Ma Y., Ai X. Colloidal Nanoparticles of a europium complex with enhanced luminescent properties // *Langmuir*. 2008. V. 24. № 13 P.6932–6936.
 8. Jones I. G., Jackson W.R., Choi Ch., Bergmark W.R. Solvent effects on emission yield and lifetime for coumarin laser dyes. Requirements for a rotatory decay mechanism // *J. Phys Chem*. 1985. V. 89. № 2. P. 294–300.
 9. Черкасов А.С., Молчанов В.А., Вембер Т.М., Волдайкина К.Г. // *ДАН СССР*. 1956. Т. 109. № 2. С. 292.
 10. Свешникова Е.Б., Дударь С.С., Ермолаев В.Л. Особенности проявления миграции энергии к примеси в наночастицах из комплексов металлов // *Опт. и спектр.* 2011. Т. 111. № 2. С. 333–341.
 11. Бегер В.Н., Колесников Ю.Л., Сечкарев А.В. Особенности концентрационного тушения флуоресценции молекул красителей, адсорбированных неоднородной поверхностью диоксида кремния // *Опт. и спектр.* 1995. Т. 78. № 2. С. 249–253.
 12. Свешникова Е.Б., Дударь С.С., Миронов Л.Ю., Ермолаев В.Л. Особенности вхождения кумарина-30 в наночастицы из комплексов металлов и интенсивность его колюминесценции // *Опт. и спектр.* 2012. Т. 113. № 2. С. 137–146.
 13. Свешникова Е.Б., Дударь С.С., Ермолаев В.Л. Люминесценция нильского красного как индикатор состава наночастиц из дикетонатных комплексов трехвалентных металлов // *Опт. и спектр.* 2011. Т. 110. № 2. С. 286–295.
 14. Дударь С.С., Свешникова Е.Б., Ермолаев В.Л. Сенсibilизация флуоресценции молекул красителей в наночастицах из комплексов металлов // *Опт. и спектр.* 2010. Т. 109. № 4. С. 605–617.
 15. Пешкова В.М., Мельчакова Н.В. β-Дикетоны (Аналитические реагенты). М.: Наука, 1986. 200 с.
-