

ЭЛЕКТРОНИКА И ПРИБОРОСТРОЕНИЕ

УДК 535.37: 577.352

Г.В. Мельников, М.И. Лобачев, А.Г. Мельников

ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНЫЙ ИМПУЛЬСНЫЙ ФЛУОРИМЕТР ДЛЯ ЭКОЛОГИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Исследования кинетики излучательных процессов дезактивации триплетных состояний люминофоров с помощью автоматизированного лазерного флуориметра позволили установить изменение структуры белков при добавлении в исследуемые растворы молекул спирта и поверхностно-активных веществ. Применение сенсibilизированной фосфоресценции, полициклических ароматических углеводородов позволило повысить селективность определения этих соединений. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности разработанных методов и созданной экспериментальной установки для экологического мониторинга природных объектов.

G.V. Mel'nikov, M.I. Lobachev, A.G. Mel'nikov

HIGH SENSITIVE IMPULSE FLUORIMETRE FOR ENVIRONMENTAL ECOLOGICAL MONITORING

The kinetics studies of radiative processes of luminophors triplet states decontamination with the help of automated laser fluorimetre showed changes in protein structure when alcohol molecules and surface-interactive agents were added into the studied solutions. The usage of sensibilized phosphorescence and polycyclic aromatic hydrocarbons allowed to increase the selectiveness of these compounds definition. The obtained results prove prospective of the developed methods and the experimental equipment for ecological monitoring of environmental objects.

Во многих странах с развитой индустрией и интенсивным сельским хозяйством наблюдается деградация экологических систем, ставящая под угрозу существование человека. Все большее значение приобретают такие загрязняющие вещества, как нефтепродукты, тяжелые металлы, биогенные вещества, сложные органические соединения (детергенты на основе поверхностно-активных веществ, полициклические ароматические углеводороды и др.). Среди загрязнителей особое место занимают полициклические ароматические углеводороды (ПАУ), которые оказывают не только токсичное, но и главным образом, мутагенное и канцерогенное

действие на животных и человека. Это заставляет искать все новые способы контроля содержания этих веществ в объектах окружающей среды. Преимущество отдается экспрессным методам с большой чувствительностью и избирательностью [1]. Несмотря на большие достижения в области разработки методов контроля состояния окружающей среды, имеется много нерешенных проблем, связанных с применением люминесцентных методов экспрессного определения органических веществ [2] и состояния биологических объектов [3].

В осуществлении выполняемых белковыми макромолекулами функциональных нагрузок ключевую роль играет не только конформация (статичная структура), но и равновесные тепловые движения конструктивных элементов глобулы [4]. Из всех видов внутримолекулярной динамики белков наименее изучены медленные флуктуации структуры белка, с характерными миллисекундными временами. Уникальные возможности исследования медленной внутримолекулярной динамики белка представляет метод, основанный на изучении процессов дезактивации триплетных состояний молекул люминесцентных зондов, время жизни которых как раз укладывается в этот временной интервал. Разработке этих методов и посвящена данная работа. Цель проведенных исследований состояла в выяснении возможности применения методов люминесцентной спектроскопии для исследования структурной динамики белков, а также в поиске путей увеличения селективности аналитического определения ПАУ в объектах окружающей среды.

При выполнении работы применялся метод импульсного фотолиза [5,6], с помощью которого удалось получить спектры замедленной флуоресценции и фосфоресценции, а также определить времена жизни триплетных состояний люминофоров по затуханию люминесценции образцов. Метод импульсного фотолиза основан на создании высоких концентраций триплетных состояний люминофоров при фотооблучении образцов мощной вспышкой света малой длительности. Достигаемая при возбуждении высокая концентрация триплетных молекул позволяет осуществить измерения их спектров триплет-триплетного поглощения и люминесценции. Достоинством метода импульсного фотолиза является то, что его применение делает возможным прямое наблюдение промежуточных фотопродуктов с помощью сравнительно малочувствительных физических методов. Импульсный фотолиз является релаксационным методом, в котором применяется воздействие кратковременных световых импульсов на вещество для создания неравновесной концентрации метастабильных состояний. Релаксация системы в исходное или новое неравновесное состояние прослеживается по спектрам поглощения или люминесценции, регистрируемым во времени после импульсного фотооблучения на созданной установке импульсного флуориметра.

Главным достоинством импульсного флуориметра является высокая чувствительность, надёжность в работе и хорошая воспроизводимость получаемых результатов. С его помощью удаётся обнаружить молекулы в триплетном состоянии, когда их концентрация составляет $\sim 10^{-8} \div 10^{-10}$ М, и надёжно регистрировать фосфоресценцию люминофоров с квантовым выходом до 10^{-3} . Отличие данного импульсного флуориметра состоит еще и в том, что он позволяет осуществить контроль за изменением концентрации триплетных состояний люминофора по оптической плотности триплет-триплетного (Т–Т) поглощения при изменении условий эксперимента. На рис. 1 представлена блок-схема такой установки, которая позволяла исследовать спектры Т–Т поглощения, быстрой и замедленной флуоресценции, фосфоресценции, а также кинетику дезактивации триплетных молекул по данным Т–Т поглощения и затухания длительного послесвечения.

Люминесценция исследуемого раствора (1), возникающая при импульсном фотооблучении лазером (19), регистрировалась с помощью монохроматора (9), фотоэлектронного умножителя (8) и осциллографа (10). Обработка полученных сигналов осуществлялась с помощью компьютера (14). Регистрация оптической плотности триплет-триплетного поглощения осуществлялась с помощью зондирующего источника (4) и системы линз (3). Спектры

триплет-триплетного поглощения и люминесценции красителей и ПАУ строились «по точкам», путём установки монохроматора перед инициированием импульсного фотовозбуждения раствора на фиксированную длину волны.

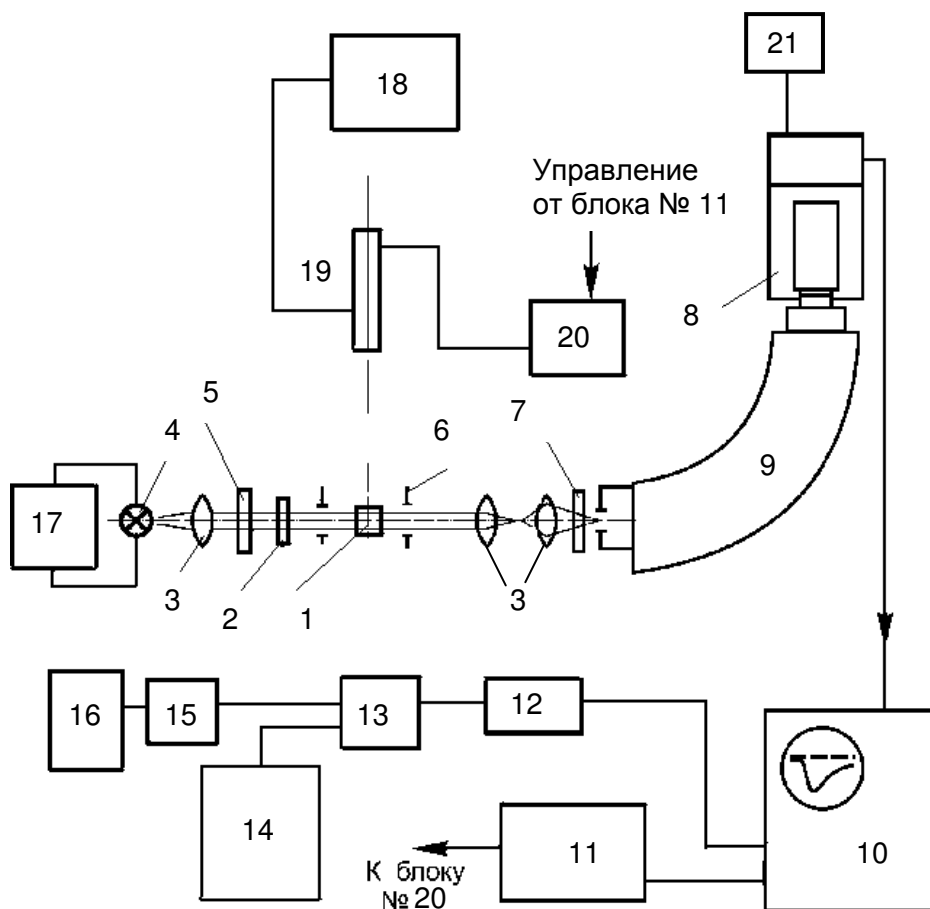


Рис. 1. Блок-схема установки импульсного флуориметра:
 1 – кювета с исследуемым раствором; 2 – тепловой фильтр; 3 – линза;
 4 – зондирующий источник света; 5 и 7 – светофильтры; 6 – диафрагма;
 8 – фотоэлектронный фотоумножитель; 9 – монохроматор; 10 – осциллограф;
 11 – генератор импульсов; 12 – АЦП; 13 – блок памяти; 14 – компьютер; 15 – ЦАП;
 16 – самописец; 17 – блок питания зондирующего источника; 18 – блок питания лазера;
 19 – импульсный лазер АИГ – Nd ($\lambda=532$ нм и $\lambda=273$ нм, $\tau_{1/2}=10$ нс, $E=70$ мДж);
 20 – блок управления лазером; 21 – блок питания ФЭУ

Из полученных осциллограмм (рис. 2) после обработки, рассмотренной ниже, были получены константы скоростей дезактивации триплетных состояний люминофоров. Осциллограмма процесса триплет-триплетного поглощения (рис. 2, кривая а) представляет собой зависимость отклонения луча осциллографа, вызванного изменением пропускания раствора на данной длине волны под действием световой вспышки, от времени.

Если обозначить I_0 – интенсивность света, прошедшего через кювету до вспышки (рис. 2, кривая а), а I_n – интенсивность света, прошедшего через неё к моменту времени t после вспышки, то разность оптических плотностей раствора до и после импульсного фотовозбуждения ΔD определяется по формуле:

$$\Delta D = \lg \frac{I_0}{I_n} . \quad (1)$$

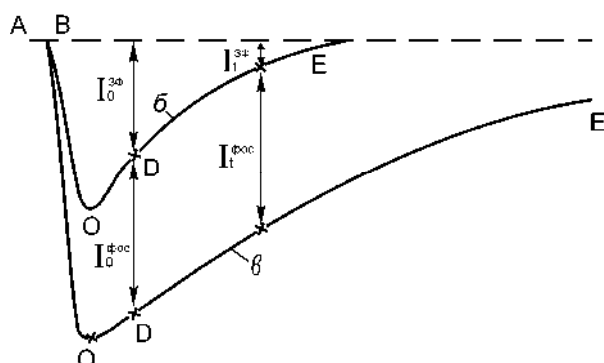
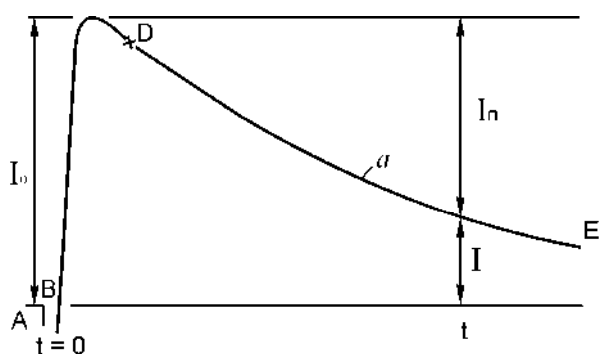


Рис. 2. Типичные осциллограммы дезактивации триплетных молекул люминофоров, зарегистрированные по Т–Т поглощению (а), по затуханию ЗФ (б) и фосфоресценции (в)

Отношение $\frac{I_0}{I_n}$ можно заменить отноше-

нием отклонений луча осциллографа, поскольку они пропорциональны интенсивности света. Интенсивность I света, поглощённого образовавшимися после вспышки молекулами люминофоров в триплетных состояниях, определяется соотношением: $I = I_0 - I_n$. Учитывая это, изменение оптической плотности раствора равно:

$$\Delta D = \lg \frac{I_0}{I_0 - I} . \quad (2)$$

Установка, блок-схема которой приведена на рис. 1, применялась также для исследования кинетики дезактивации триплетных состояний люминофоров по затуханию ЗФ и фосфоресценции исследуемых растворов. Типичная осциллограмма затухания длительного свечения приведена на рис. 2, кривые б и в. В случае ЗФ типа Е или фосфоресценции интенсивность регистрируемого свечения пропорциональна концентрации $[T]$ триплетных молекул. При незначительной концентрации люминофоров, когда концентрационным тушением триплетных молекул можно пренебречь, скорость их дезактивации определяется выражением:

$$\frac{d[T]}{dt} = -\beta[T] - \gamma[T] , \quad (3)$$

где β – суммарная константа скорости мономолекулярных и псевдомономолекулярных (тушение примесями) процессов гибели триплетных

молекул; γ – бимолекулярная константа скорости дезактивации триплетных молекул, обусловленная триплет-триплетной аннигиляцией молекул люминофоров. Если триплетные молекулы гибнут в основном в результате реакции первого порядка, то есть $\beta \gg \gamma [T]$, то уравнение, описывающее процесс дезактивации энергии триплетных молекул, упрощается:

$$\frac{d[T]}{dt} \cong -\beta[T] . \quad (4)$$

Решая уравнение (4) относительно $[T]$, получим:

$$[T] \cong [T]_0 e^{-\beta t} , \quad (5)$$

где $[T]_0$ – концентрация триплетных молекул в начальный момент времени.

Перейдем в выражении (5) от концентрации триплетных молекул к оптическим плотностям Т–Т поглощения $\Delta D = \epsilon_T [T] \ell$, где ϵ_T – коэффициент экстинкции Т–Т поглощения; $[T]$ – концентрация триплетных молекул; ℓ – длина поглощающего слоя. Тогда выражение (5) запишется следующим образом:

$$\Delta D = \Delta D_0 e^{-\beta t} . \quad (6)$$

Логарифмируя (6) с учетом (5), можно записать:

$$2,31g \frac{\Delta D_0}{\Delta D} = \beta t . \quad (7)$$

Следовательно, константа скорости дезактивации энергии триплетных состояний β определяется как угловой коэффициент зависимости (7).

Аналогичным образом обрабатываются осциллограммы затухания интенсивности фосфоресценции триплетных молекул и ЗФ типа *E*. Суммарная мономолекулярная константа дезактивации триплетных состояний определялась как угловой коэффициент зависимости $2,31g \frac{I_0}{I}$ от *t*, где I_0, I – интенсивности свечения в начальный и последующий моменты времени. Для интенсивности ЗФ типа *E* известно следующее выражение [7]:

$$I_{3\phi} \propto [S_1] \propto [T(t)] , \quad (8)$$

откуда

$$I_{3\phi} \cong A[T]_0 e^{-\beta t} , \quad (9)$$

где *A* – аппаратная функция; $[T]_0$ – концентрация триплетных молекул в начальный момент времени.

Таким образом, обработка осциллограммы, характеризующей изменение $I_{3\phi}$ во времени, в координатах $2,31g \frac{I_{3\phi}^0}{I_{3\phi}}$ от *t*, позволяет определить суммарную мономолекулярную кон-

станту скорости дезактивации триплетных молекул по кинетике затухания ЗФ. Аналогичным образом обрабатывались осциллограммы зависимости интенсивности фосфоресценции люминофоров от времени после импульсного фотооблучения.

В работе были проведены кинетические исследования особенностей процессов дезактивации энергии электронного возбуждения триплетных состояний молекул люминесцентных зондов, связанных с белками, по сравнению с водными растворами. Люминесцентными зондами служили красители акридинового (трипафлавин, акридин оранжевый), родаминового (родамин В) и ксантенового (эозин, эритрозин) ряда, связанные с белками, в качестве которых были выбраны бычий сывороточный альбумин и сывороточный альбумин человека. При изменении условий эксперимента концентрация триплетных состояний люминофоров, которая отслеживалась по оптической плотности триплет-триплетного поглощения, поддерживалась постоянной.

Установлено, что в качестве люминесцентного зонда для исследований изменений структуры белков наиболее целесообразно применить эозин, относящийся к ксантеновому ряду. Выбор этого красителя обусловлен тем, что он обладает высоким квантовым выходом замедленной флуоресценции и фосфоресценции, продолжительным временем жизни в триплетном состоянии и эффективно связывается с выбранными белками.

Определены константы скорости дезактивации энергии электронного возбуждения триплетных состояний эозина в воде (1340 с^{-1}) и в водных растворах сывороточного альбумина человека (192 с^{-1}) при комнатной температуре. Из приведенных значений констант скоростей затухания фосфоресценции эозина можно сделать вывод о значительном возрастании времени жизни триплетных состояний. Кроме того, обнаружено увеличение (на порядок) интенсивности замедленной флуоресценции и фосфоресценции эозина, связанного с белками. Это свидетельствует о жестком закреплении молекул эозина на белках.

Экспериментально установлено, что при добавлении в водный раствор белка поверхностно-активного вещества (ПАВ), в качестве которого были выбраны молекулы додецилсульфата натрия, происходит сокращение времени жизни триплетных состояний и уменьшение интенсивности фосфоресценции эозина. Полученные результаты объясняются изменени-

ем структуры белков под действием молекул ПАВ. Следовательно, кинетика люминесценции зозина позволяет контролировать структурные изменения белков.

В работе проведены исследования влияния тяжелых атомов (таллий, свинец) на излучательные процессы дезактивации триплетных состояний молекул антрацена и 1,2 бензантрацена при лазерном фотовозбуждении. Установлено, что применение эффекта тяжелого атома, для определения ПАУ в водных средах люминесцентными методами с соответствующей пробоподготовкой, позволило значительно (до 10^{-9} М) повысить чувствительность определения 1,2 бензантрацена. Проведенные эксперименты на импульсном флуориметре по определению ПАУ методом сенсibilизированной фосфоресценции, основанным на триплет-триплетном переносе энергии, позволили на два порядка повысить избирательность определения ПАУ по сравнению с регистрацией их фосфоресценции [8].

Таким образом, люминесцентные исследования на импульсном флуориметре с анализом кинетики фотопроцессов позволяют осуществить контроль за состоянием белковых молекул живых организмов, а также могут быть применены для повышения селективности аналитического определения ПАУ в объектах окружающей среды.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дмитриенко С.Г., Косырева О.А., Рунов В.К. Сорбционно-фотометрическое определение кобальта и железа с использованием неполиуретанов // Современные методы аналитического контроля на промышленных предприятиях: Сб. трудов. М., 1991. С.64-66.
2. Паркер С. Фотолюминесценция растворов. М.: Мир, 1972. 476 с.
3. Демченко А.П. Люминесценция и динамика структуры белков. Киев: Наукова думка, 1988. 276 с.
4. Мажуль В.М., Зайцева Е.М., Щербин Д.Г. Внутримолекулярная динамика и функциональная активность белков // Биофизика. 2000. Т.45, В.6. С.965-989.
5. Методы исследования быстрых реакций / Под общ. ред. Г. Хеммиса. М.: Мир, 1979. 716 с.
6. Чибисов А.К. Применение импульсного фотолиза для исследования триплетных состояний органических веществ // Успехи химии. 1970. Т.39. № 5. С.1886-1911.
7. Parker C.A., Hatchard C.G. Delayed Fluorescence from Solutions of Anthracene and Phenanthren // Proc. Roy. Soc. 1962. V.296 A. № 1339. P.574-584.
8. Мельников Г.В., Горячева И.Ю., Штыков С.Н. Фосфоресценция при комнатной температуре, сенсibilизированная триплет-триплетным переносом энергии в мицеллах додецилсульфата натрия // Доклады Российской Академии наук. 1998. Т.361. № 1. С.72-73.

Мельников Геннадий Васильевич –

доктор химических наук, профессор кафедры «Прикладная физика»
Саратовского государственного технического университета

Лобачев Михаил Игнатьевич –

кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник
научно-исследовательского института точной механики и управления, г. Саратов

Мельников Андрей Геннадиевич –

студент Саратовского государственного университета им. Н.Г. Чернышевского