

P48

Piotr CYWIŃSKI, Maja SADOWSKA i Barbara WANDELT

Katedra Fizyki Molekularnej, Łódź, ul. Żeromskiego 116

## Wygaszanie fluorescencji pirazolochinoliny wprowadzonej na powierzchnię filmu polimerowego

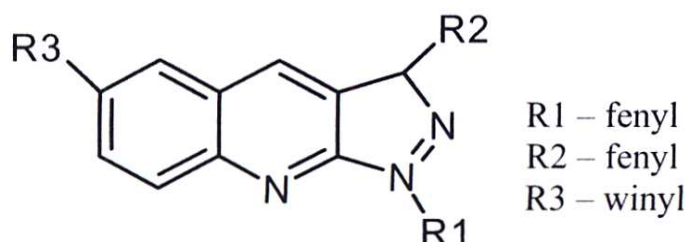
### Streszczenie

Badano wpływ obecności nukleotydów: guanozyno-3',5'-monofosforanu (cGMP), adenozy-3',5'-monofosforanu (cAMP) na wygaszanie fluorescencji swobodnej cząsteczki pirazolo-[3,4-b]-chinoliny (PAQ) w roztworze oraz gdy chromofor znajduje się na powierzchni filmu polimerowego (PMMA). Zjawisko wygaszania fluorescencji było analizowane z użyciem równania Sterna-Volmera. Stwierdzono, że mechanizm wygaszania fluorescencji PAQ w obecności nukleotydów jest związany z przeniesieniem elektronu.

### Wstęp

Istnieje wiele aromatycznych cząsteczek, których fluorescencja ulega zmianie, gdy oddziałują one ze środowiskiem. Wygaszenie lub wzmocnienie fluorescencji można obserwować w zależności od wielu czynników, łącznie ze strukturą fluorosensora, a także typem mechanizmu oddziaływań pomiędzy sensorem a środowiskiem. Wygaszanie fluorescencji aromatycznych cząsteczek przez aniony było przedmiotem wielu badań [1-3]. W literaturze zaproponowano kilka mechanizmów wygaszania fluorescencji podstawionych chinoliny przez małe aniony. Wśród nich należy wymienić mechanizm przeniesienia elektronu z anionu do stanu wzbudzonego fluoroforu [2-6], kiedy układ chinolinowy fluoroforu ulega dezaktywacji w obecności małych anionów takich jak  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{F}^-$ ,  $\text{SCN}^-$ . W układach takich wykres typu Sterna-Volmera jest zależnością

Schemat 1. Struktura pochodnych pirazolo-[3,4-b]-chinoliny





liniową z obu pomiarów fluorescencji: zmiany intensywności i czasów życia. Innym mechanizmem jest tworzenie się kompleksu z przeniesieniem ładunku [5], a także wygaszanie przez ciężki atom [1, 7]. Opisano także proces częściowego wygaszenia fluorescencji dla 6-metoksy-(N-3-sulfopropylo)-chinoliny rozpuszczonej w acetonitrylu [4]. Przedstawiono efektywność wygaszania fluorescencji chinoliny przez aniony o różnych właściwościach utleniających oraz energię aktywacji procesu wygaszania fluorescencji [6]. Fakt wysokiej intensywności fluorescencji i czułości fluorescencji chinolinowego fluoroforu na działanie anionów skłoniło nas do badania oddziaływań pochodnych pirazolo-chinoliny (przedstawionych na schemacie 1) jako sensora nukleotydów. Obecność grupy winylowej ułatwia przyłączenie fluoroforu na powierzchni filmu polimerowego, celem otrzymania sensora na podłożu stałym.

Praca zawiera analizę właściwości fotofizycznych 1,3-difenylo-6-winylo-1H-pirazolo-[3,4-b]-chinoliny w roztworze metanolu. Zbadano mechanizm wygaszania fluorescencji w obecności nukleotydów dla fluoroforu swobodnego oraz gdy jest związany na powierzchni filmu polimetakrylanu metylu (PMMA). Wstępne badania fluorescencji pirazolochinoliny w roztworze metanolu były przedstawione wcześniej [8].

## Część doświadczalna

Synteza 1,3-difenylo-6-winylo-1H-pirazolo-[3,4-b]-chinoliny opisana została wcześniej [9]. Spektralnie czysty metanol, nukleotydy i inne odczynniki zostały zakupione w firmie Sigma-Aldrich.

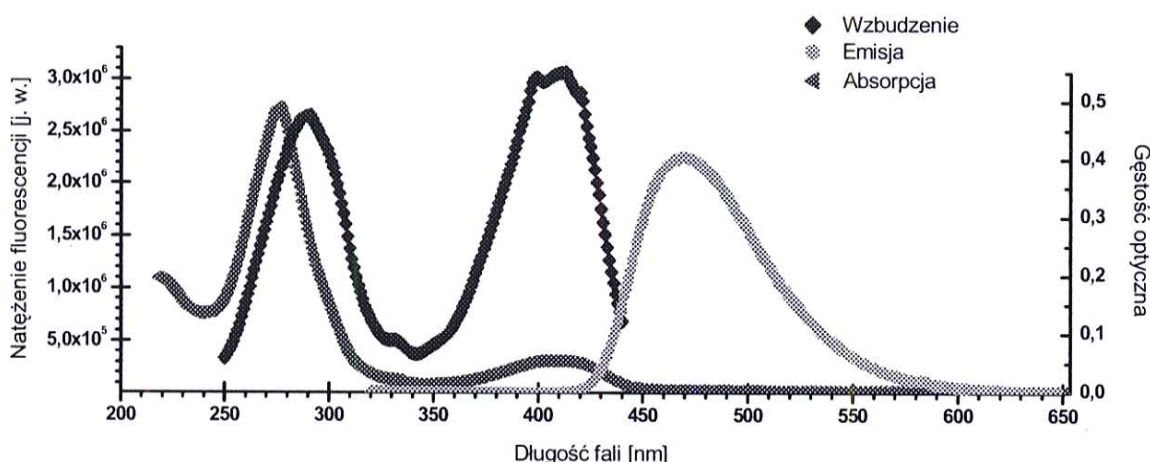
Cienką warstwę filmu PMMA o grubości około 20  $\mu\text{m}$  otrzymano na płytkach kwarcowych z użyciem metody „spin-coating”. Powierzchnia filmu naświetlana była przez około 15 min niskociśnieniową lampą rtęciową ( $\lambda_{\text{max}} = 254 \text{ nm}$ ), a następnie natychmiastowo pokrywana roztworem 1,3-difenylo-6-winylo-1H-pirazolo-[3,4-b]-chinoliny w metanolu o stężeniu  $10^{-3} \text{ M}$ . Następnie film przez 15 min przepłukiwano czystym metanolem, aby usunąć swobodne cząsteczki chromoforu, które nie związały się z powierzchnią polimeru.

Widmo absorpcji otrzymano przy użyciu spektrometru Spekord M 40, a widmo fluorescencji przy użyciu Fluorolog 3 firmy Jobin Yvon-Spex. Zaniki fluorescencji mierzono przy użyciu techniki zliczania pojedynczych fotonów na spektrometrze fluorescencyjnym Edinburgh Instruments Co. CD900, zaopatrzonej w lampę napełnioną wodorem. Próbkę ciekłą mierzono w standardowej kuwecie, a filmy polimerowe w triangularnej.

## Wyniki badań i dyskusja

Rysunek 1 przedstawia widmo absorpcji i widma fluorescencji: wzbudzenia i emisji. Widmo wzbudzenia zawiera dwa pasma, których maksima zlokalizowa-





**Rys. 1.** Widmo absorpcji, wzbudzenia i emisji 1,3-difenylo-6-winylo-1H-pirazolo-[3,4-b]-chinoliny w metanolu. Stężenie fluoroforu  $10^{-3}$  M

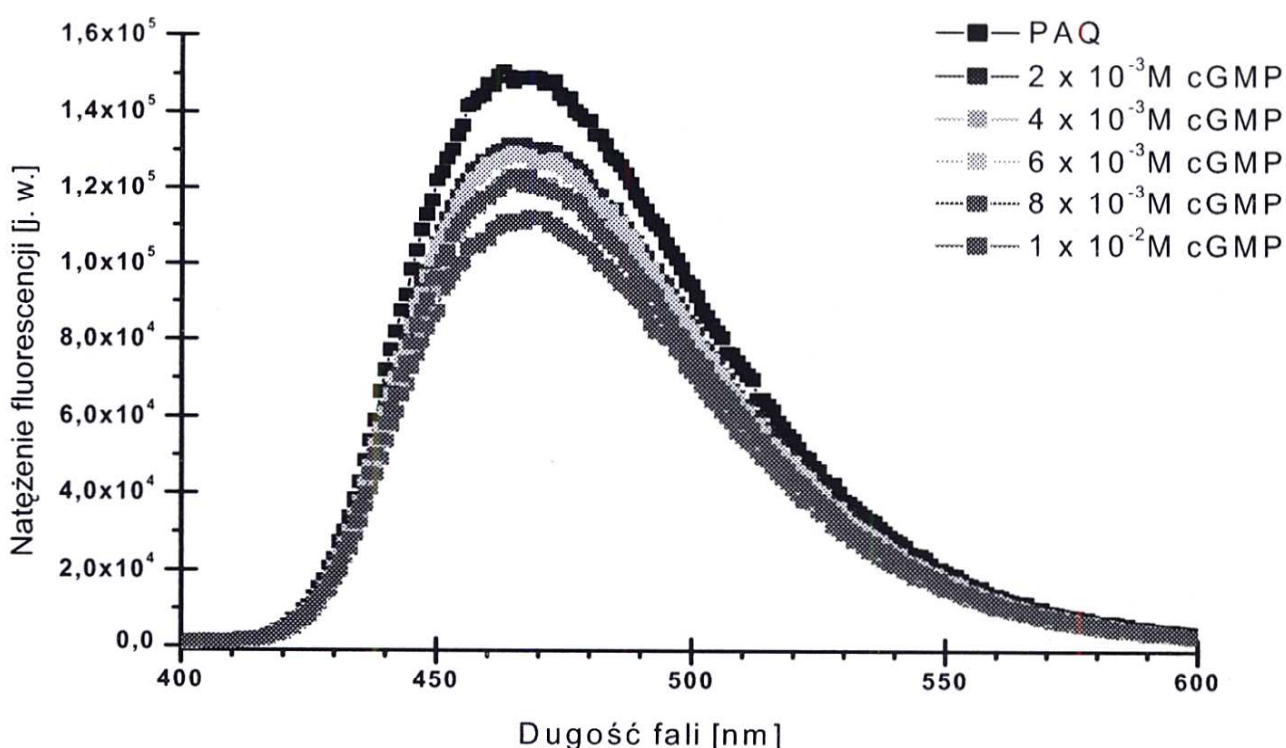
ne są odpowiednio 280 nm i 400 nm. Odpowiada to także pasmom pojawiającym się w widmie dla cząsteczki fluoroforu umieszczonej na filmie polimerowym. W badaniach PAQ w roztworze i na filmie polimerowym widmo emisji fluorescencji przedstawia jedno pasmo z maksimum przy 470 nm. Otrzymano je wzbudzając światłem o długości fali: 290 nm i 390 nm. Widmo absorpcji zawiera szerokie pasmo niskoenergetyczne przy 400 nm i silną absorpcję wysokoenergetyczną z maksimum około 277 nm. Charakterystyczny kształt widma emisji dla fluoroforu w roztworze jest również obserwowany dla sensora polimerowego. Obserwowane właściwości spektralne odpowiadają danym dla innej pochodnej pirazolo-[3,4-b]-chinoliny opisanej wcześniej w literaturze [10]. Szerokość i kształt pasma emisji z maksimum przy 490 nm nie zależy od długości fali, w której nastąpiło wzbudzenie. Fakt ten sugeruje, że pasmo powstaje na skutek przeniesienia ładunku podczas wzbudzania.

Pomiar wygaszania fluorescencji wykonano dla długości fali, która odpowiada maksimum obserwowanemu na widmie emisji dla roztworu PAQ wzbudzanego światłem o długości fali 290 nm. 1 ml soli sodowej cGMP o stężeniach 2, 4, 6, 8,  $10 \cdot 10^{-3}$  M dodano odpowiednio do 2 ml roztworu fluoroforu o stężeniu  $1 \cdot 10^{-3}$  M w metanolu. Rysunek 2 przedstawia widma fluorescencji 1,3-difenylo-6-winylo-1H-pirazolo-[3,4-b]-chinoliny w metanolu w obecności nukleotydu cGMP.

Nie obserwowano zmian kształtu widma i przesunięcia maksimum pasma, nie pojawiło się też nowe pasmo. Obserwowano jedynie zmniejszenie natężenia fluorescencji, której zależność od stężenia nukleotydu może być opisana równaniem Sterna-Volmera

$$\frac{I_0}{I} = 1 + k_{S-V} [N]$$





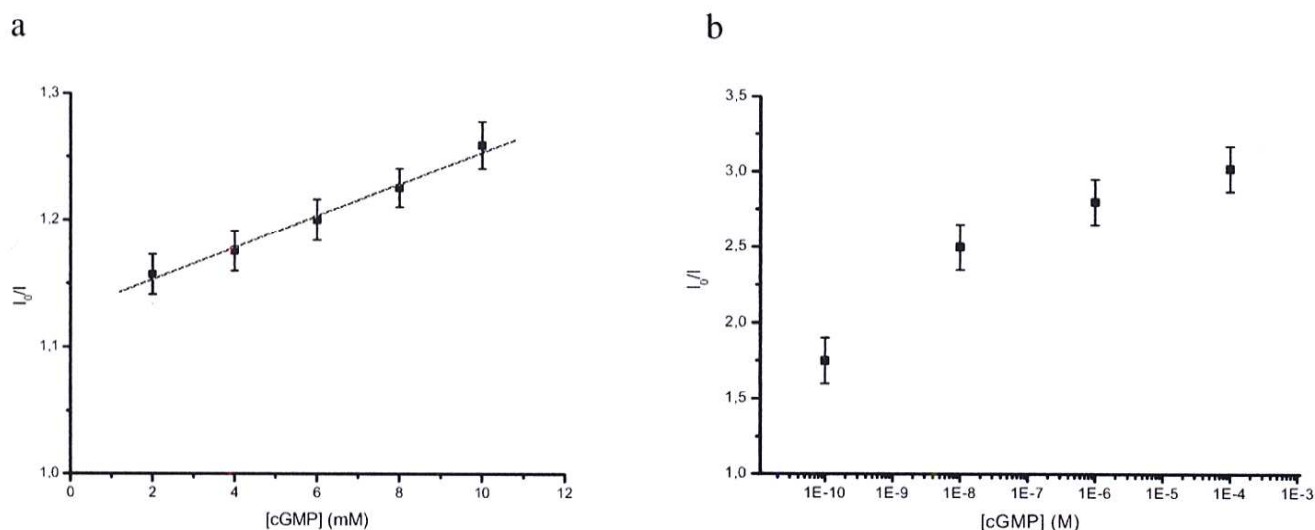
**Rys. 2.** Widmo fluorescencji czystego fluoroforu w metanolu i w obecności nukleotydu cGMP o różnych stężeniach

gdzie:  $I_0/I$  – wskaźnik wygaszania fluorescencji,  $I_0$  oraz  $I$  natężenie fluorescencji bez i w obecności nukleotydu. Rysunek 3a przedstawia liniową zależność wskaźnika wygaszania fluorescencji PAQ w niewielkim zakresie stężeń nukleotydu i sugeruje nieliniowy charakter dla mniejszych stężeń. Gdy fluorofor pirazolochinolinowy jest na powierzchni filmu polimerowego, związany z nią kowalencyjnie, zmiana natężenia fluorescencji ze stężeniem nukleotydu jest duża i nie jest liniowa (rysunek 3b), i może być opisana zmodyfikowanym równaniem Sterna-Volmera [11]

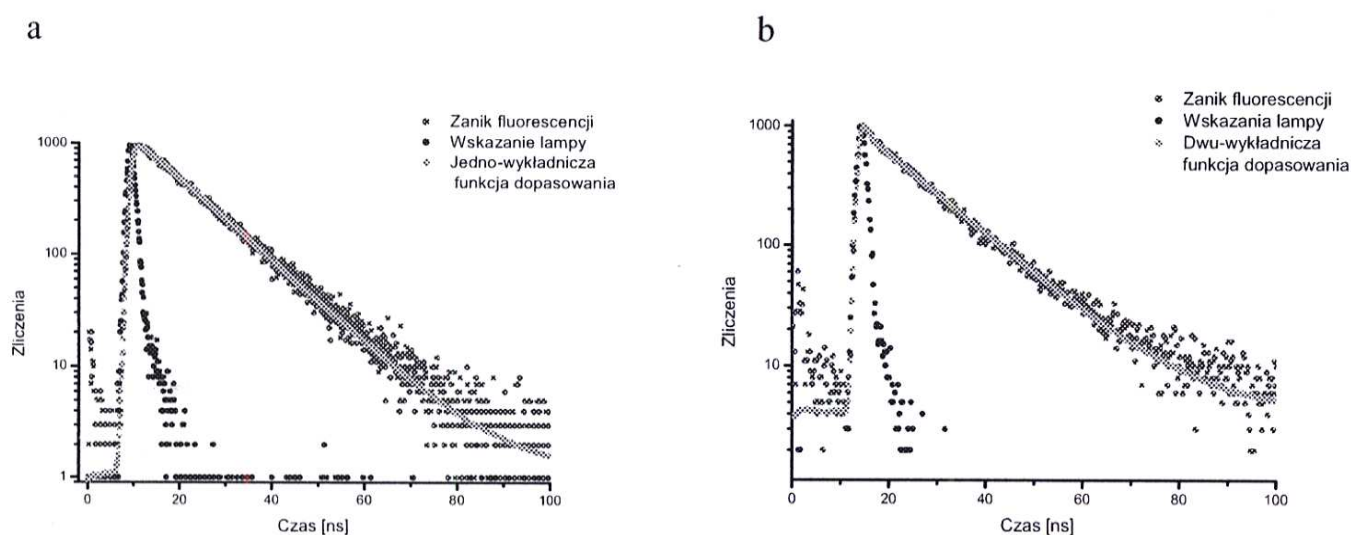
$$\frac{I_0}{I} = \frac{1 + K_a[N]}{1 + (k_{NF}/k_F)K_a[N]}$$

gdzie:  $k_{NF}/k_F$  – stosunek stałych szybkości proporcjonalnych odpowiednio do stężeń kompleksu cGMP-fluorosensor (NF) i fluorosensora (F),  $K_a$  – jest stałą asocjacji ( $K_a = [FN]/[F][N]$ ) dla utworzenia kompleksu (FN) nukleotydu (N) z fluorosensorem (F).

Nie obserwowano wpływu temperatury na proces wygaszania fluorescencji PAQ, zarówno w roztworze jak i na filmie polimerowym. Rysunek 4 pokazuje typowy zanik fluorescencji i funkcję dopasowania dla PAQ w roztworze metanolu (rysunek 4a) i fluoroforu związanego na filmie polimerowym (rysunek b).



**Rys. 3.** Zależność wskaźnika wygaszania dla PAQ od stężenia nukleotydu: (a) w roztworze metanolu, (b) na filmie polimerowym



**Rys. 4.** Zanik fluorescencji i funkcja dopasowania dla 1,3-difenylo-6-winylo-1H-pirazolo-[3,4-b]-chinoliny (a) roztwór, (b) polimer. Wzbudzenie – 390 nm, emisja – 470 nm. Badania wykonano w metanolu. Ogólny zapis funkcji dopasowania:

$$I(t) = \sum_i B_i \exp(t/\tau_i)$$

$B_i$  – względny udział (%),

$\tau_i$  – czas życia fluorescencji

Zanik fluorescencji dla sensora polimerowego odbiega od typowego dla sensora w roztworze jedno-wykładniczego zaniku. Wyniki analizy zaniku fluorescencji dla pochodnej pirazolochinoliny przedstawione są w tabeli 1. Różnice w kinetykach są spowodowane udziałem drugiego składnika fluorescencji w procesie zaniku. Kinetykę zaniku fluorescencji dla sensora polimerowego dopasowano funkcją dwu-wykładniczą z podobnym współczynnikiem dopasowania jak w przypadku roztworu. Obliczenia przy użyciu programu Distribution Analysis wykazały, że mamy jedynie poszerzenie rozkładu jednego składnika emisji. Dane czasów życia fluorescencji otrzymane z analizy rozkładów zawiera tabela 2.



**Tabela 1.** Średnie czasy życia fluorescencji PAQ wyznaczone przy użyciu funkcji dopasowania

Stężenie fluorofru	$\lambda_{exc.}$ (nm)	$\tau_1$ (ns)	$\tau_2$ (ns)	$B_1$ (%)	$B_2$ (%)	$\chi^2$
<b>Swobodna cząsteczka fluoroforu w roztworze</b>						
$10^{-3}$ M	290	$12.06 \pm 0.04$	-	100	-	0.992
	390	$12.11 \pm 0.04$	-	100	-	1.001
$10^{-3}$ M	290	$11.93 \pm 0.04$	-	100	-	1.068
	390	$12.13 \pm 0.04$	-	100	-	1.036
$10^{-3}$ M	290	$11.81 \pm 0.04$	-	100	-	1.036
	390	$11.99 \pm 0.04$	-	100	-	1.029
<b>Fluorofor wprowadzony na powierzchnię polimeru</b>						
$10^{-3}$ M	290	$13.50 \pm 0.30$	$7.4 \pm 1.3$	86.5	13.5	1.096
	390	$13.03 \pm 0.03$	$0.034 \pm 0.021$	85.6	14.4	1.173
$10^{-3}$ M	290	$12.37 \pm 0.04$	-	100	-	1.073
	390	$11.97 \pm 0.06$	$1.5 \pm 0.5$	98.5	1.5	1.094
$10^{-3}$ M	290	$14.50 \pm 0.04$	$7.7 \pm 0.8$	78.46	21.54	1.070
	390	$12.82 \pm 0.07$	$0.048 \pm 0.005$	92.0	7.9	1.181

**Tabela 2.** Wyniki analizy rozkładu czasów życia fluorescencji

Stężenie fluorofru	$\lambda_{exc.}$ (nm)	$\tau_1$ (ns)	$\chi^2$
<b>Swobodna cząsteczka fluoroforu w roztworze</b>			
$10^{-3}$ M	290	$11.9 \pm 1.5$	1.116
	390	$12.1 \pm 1.8$	1.050
$10^{-3}$ M	290	$11.8 \pm 1.1$	1.055
	390	$12.2 \pm 1.7$	1.070
$10^{-3}$ M	290	$11.9 \pm 0.9$	1.102
	390	$11.9 \pm 1.4$	1.083
<b>Fluorofor wprowadzony na powierzchnię polimeru</b>			
$10^{-3}$ M	290	$12.4 \pm 3.5$	1.239
	390	$12.2 \pm 2.3$	1.099
$10^{-3}$ M	290	$11.7 \pm 1.6$	1.147
	390	$11.7 \pm 2.1$	1.173
$10^{-3}$ M	290	$12.2 \pm 2.7$	1.188
	390	$12.1 \pm 3.2$	1.318

Czasy życia fluorescencji wyznaczone dla swobodnej cząsteczki w roztworze odpowiadają czasom życia składnika długo żyjącego pochodzącego od sensora polimerowego. Wnioskujemy, że zanik fluorescencji odbiegający od typu jedno-wykładniczego, obserwowany dla sensora polimerowego, jest prawdopodobnie generowany przez silne oddziaływania pomiędzy fluoroforem a matrycą poli-

merową. Nie obserwowano różnic pomiędzy parametrami czasów życia, kiedy fluorofor wzbudzany był światłem o długości fali 290 nm lub 390 nm.

Nie obserwowano istotnych zmian czasów życia fluorescencji, gdy polimer inkubowano w obecności nukleotydu. Zgodnie z tym można wnioskować, że wygaszanie jest typu statycznego. Jednakże typowe wygaszanie statyczne spowodowane jest tworzeniem się kompleksu w stanie podstawowym, który to kompleks może powodować zmiany widma absorpcji. Brak zmian w widmie absorpcji nie wskazuje na istnienie trwałego kompleksu.

Projekt finansowany z grantu KBN nr 7T09B01121

## Literatura

1. Ligler, F.S., Rowe Taitt, C.A., *Optical Biosensors: Present and Future*, Elsevier, Washington DC, 2002.
2. Shizuka, H., Nakamura, M., Merita, T., *J. Phys. Chem.*, **84** 989 (1980).
3. Najbar, J., Mac, M., *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, **88**, 3001 (1992).
4. Carrigan, S., Doucette, S., Jones, Ch., Marzzacco, Ch.J., Halpern, A.M., *J. Photochemistry And Photobiology*, **99**, 29 (1996).
5. Lanig, H., Engel, T., Kab, G., Schnaider, F.W., *Chem. Phys. Lett.*, **235**, 58 (1995).
6. Jayaraman, S., Verkman, A.S., *Biophysical Chemistry*, **85**, 49 (2000).
7. Bending, J., Helm, S., Kreysig, D., *Chem. Phys. Lett.*, **54**, 466 (1978).
8. Cywiński, P., Danel, A., Wandelt, B., *Annals of Polish Chemical Society*, **2**, 975 (2003).
9. Tomasik, D., Tomasik, P., Abramovich, R.A., *J. Heterocycl. Chem.*, **20**, 1539 (1983).
10. He, Z., Milburn, G.H. W., Baldwin, K.J., Smith, D.A., Danel, A., Tomasik, P., *J. of Lumin.*, **86**, 1 (2000).
11. Connors, K.A., *Binding Constants: The Measurement of Molecular Complex Stability*, John Wiley & Sons Inc., New York, 1987.