

его флуоресценции определяется главным образом вязкостью или жесткостью микроокружения. На основании квантово-химических расчетов [12,14,29,30] была предложена модель фотофизических свойств ThT, где предполагается, что при фотовозбуждении протекает внутримолекулярный перенос заряда (ПСТ), сопровождающийся изменением двугранного угла между ароматическими фрагментами молекулы от $\varphi \sim 37$ до 90° , приводящий к образованию нефлуоресцирующего ПСТ-состояния. Данная модель была подтверждена с использованием методов фемтосекундной абсорбционной спектроскопии [14,31]: получены экспериментальные доказательства протекания фотоиндуцированного внутримолекулярного переноса заряда с образованием промежуточного нефлуоресцирующего ПСТ-состояния, показано, что излучение флуоресценции молекулами ThT осуществляется из неравновесного локально возбужденного (LE) состояния. Скорость ПСТ-процесса, приводящего к безызлучательной дезактивации возбужденного состояния ThT, сильно зависит от температуры и вязкости микроокружения, что позволяет оценивать температуру среды, где находится молекулярный ротор, на основе измерений интенсивности или кинетики затухания флуоресценции.

С практической точки зрения, кроме чувствительности параметров флуоресценции к температуре, для сенсорной молекулы также важен выбор такого растворителя, вязкость которого обеспечивала бы высокий квантовый выход флуоресценции ФМР в требуемом температурном диапазоне. Для рассмотренных в данном исследовании ФМР на основе бензотиазол-анилиновых красителей (рис. 1) значительный квантовый выход флуоресценции наблюдается при вязкостях $\eta \sim 1000 \text{ mPa} \cdot \text{s}$, поэтому в качестве растворителя в данной работе был выбран глицерин.

Целью работы было исследование влияния температуры на квантовый выход и кинетику флуоресценции бензотиазол-анилиновых производных ThT и оценка возможности использования данных красителей в качестве флуоресцентных сенсоров для нанотермометрии.

Методика эксперимента

Образцы 2-[4'-(диметиламино)фенил]-6-метил-бензотиазола (6-Ме-ВТА-2) с чистотой 99% и тиофлавина Т (ThT) с чистотой $> 95\%$ были приобретены у фирмы Anaspec (USA) и использовались без дополнительной очистки (рис. 1). Для приготовления растворов использовался глицерин с чистотой $\geq 99.5\%$ (G9012, Сигма). Перевод нейтральных молекул 6-Ме-ВТА-2 в протонированную катионную форму 6-Ме-ВТА-2С осуществлялся добавлением небольшого количества концентрированной кислоты HCl (менее 1% по объему).

Электронные спектры поглощения были получены с помощью двухлучевого спектрофотометра SPECORD-200 PC (Analytik Jena, Германия). Регистрация ста-

онарных спектров флуоресценции осуществлялась с использованием спектрофлуориметра SM2203 (Солар, Беларусь). Измерения спектров и кинетики флуоресценции в зависимости от температуры проводились в термостатируемом кюветном отделении (диапазон 293–323 К) либо в сосуде Дьюара, снабженном нагревающим и охлаждающим элементами. Температура контролировалась электронным термометром HI 93530 (Hanna Instruments). Измерение квантовых выходов Φ флуоресценции ThT и 6-Ме-ВТА-2С в глицерине при 323 К производилось относительным методом [32] относительно стандарта — раствора ThT в 1-бутаноле при температуре 298 К с $\Phi = 0.0043$ [14,27]. Значения Φ для глицериновых растворов при температурах, отличных от 323 К, рассчитывались путем сравнения интегральных интенсивностей свечения красителя. При этом пренебрегалось изменениями коэффициента преломления среды и спектров поглощения ThT и 6-Ме-ВТА-2С от температуры.

Данные о коэффициенте преломления и вязкости глицерина для температур выше 293 К были взяты из справочника [33]. Для диапазона температур 193–293 К вязкость глицерина оценивалась по формуле

$$\eta = \eta^0 \exp\left(\frac{A}{T^3} + BT + \frac{C}{T}\right) \quad (1)$$

с параметрами $\ln(\eta^0/\text{mPa}\cdot\text{s})=25.8709$, $A=3.0942 \cdot 10^8 \text{ K}^3$, $B = -0.0327 \text{ K}^{-1}$ и $C = -6291.03 \text{ K}$ (см. уравнение (7) из работы [34]).

Измерение длительности затухания флуоресценции производили на импульсном флуориметре [35] с использованием метода время-коррелированного счета одиночных фотонов (time-correlated single photon counting, TCSPC) [36]. Для возбуждения флуоресценции использовали излучение импульсного лазерного диода LDH-405 (Picoquant, Германия) с длиной волны 407 nm, длительностью 70 ps и частотой следования импульсов 10 MHz. Система регистрации включала в себя фотоприемный блок PMA-182, а также устройство для время-коррелированного счета одиночных фотонов TimeHarp 200 (PicoQuant, Германия). Временное разрешение импульсного флуориметра составляет 60 ps [35]. Анализ кинетики затухания с учетом длительности аппаратной функции спектрометра *IRF* выполняли с помощью программного обеспечения, описанного ранее [35,37]. Функция затухания флуоресценции $F(t)$ представлялась набором экспонент

$$F(t) = \sum_j \alpha_j \exp(-t/\tau_j), \quad (2)$$

где α_j , τ_j — амплитуда и время жизни j -й компоненты. Вклад j -й компоненты кинетики в свечение оценивался как $S_j \sim \alpha_j \tau_j$. В качестве характеристики длительности мультиэкспоненциальной кинетики затухания использовалось среднее время жизни $\langle \tau \rangle$,

$$\langle \tau \rangle = \sum \alpha_j \tau_j^2 / \sum \alpha_j \tau_j. \quad (3)$$

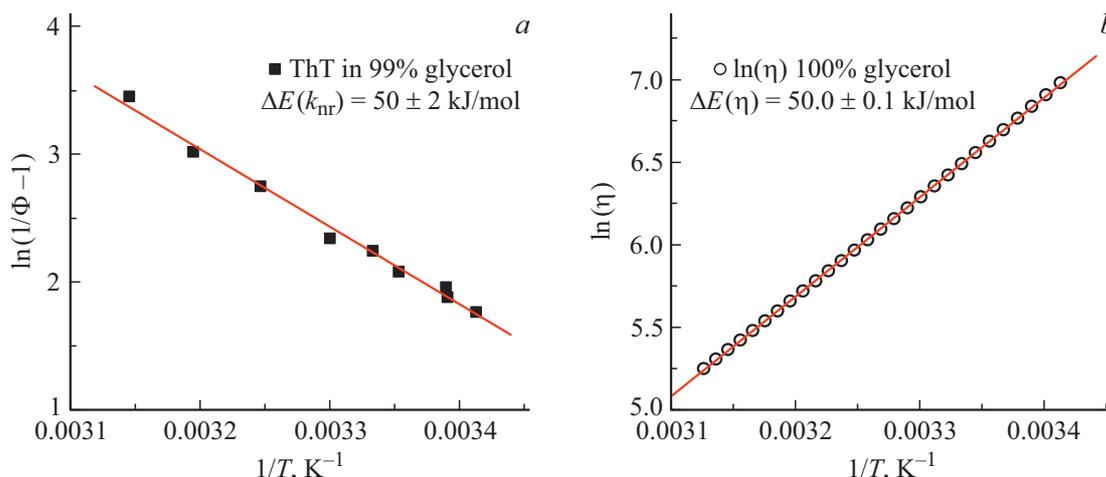


Рис. 2. Графики Аррениуса $\ln(1/\Phi - 1)$ для ThT в 99%-глицерине (a) и логарифма вязкости глицерина (b) от обратной температуры в диапазоне температур 293–320 К.

Результаты и обсуждение

Зависимость квантового выхода флуоресценции от температуры

Фотофизические свойства ФМР на основе ThT в маловязких растворителях определяются протеканием в возбужденном состоянии молекул красителей внутримолекулярного процесса переноса заряда с формированием нефлуоресцирующего ПИСТ-состояния, имеющего эффективную константу скорости $k_{\text{ПИСТ}}$, который конкурирует с процессом излучательного перехода из локально возбужденного LE-состояния с константой скорости k_r . При формировании ПИСТ-состояния происходит поворот бензотиазольного и анилинового фрагментов рассматриваемых ФМР друг относительно друга, вызывая движение близлежащих молекул растворителя и делая скорость поворота зависящей от вязкости микроокружения. Для случая малых вязкостей ПИСТ-процесс является основным безызлучательным процессом дезактивации возбужденного состояния [31], поэтому можно считать, что для этих условий суммарная константа скорости безызлучательных процессов будет равна

$$k_{nr} \approx k_{\text{ПИСТ}} = k_0 \exp(-\Delta E(k_{nr})/RT), \quad (4)$$

где R — универсальная газовая постоянная, T — температура. Здесь ПИСТ-процесс рассматривается как термоактивируемый с энергией активации $\Delta E(k_{nr})$, и на его скорость оказывает влияние как температура, так и вязкостные свойства микроокружения. В энергию активации ПИСТ-процесса будут давать вклад как энергетический барьер на пути реакции формирования состояния с переносом заряда ΔE_{int} в изолированной молекуле ФМР, так и энергия активации вязкого течения растворителя $\Delta E(\eta)$ (вследствие необходимости перемещения молекул растворителя при повороте фрагментов ФМР). На основании измерения квантового

выхода флуоресценции Φ можно определить отношение констант скоростей $k_{nr}/k_r = 1/\Phi - 1$ и получить энергию активации $\Delta E(k_{nr})$. Для ThT и 6-Me-BTA-2C значения квантовых выходов в 99% глицерине при 323 К были измерены относительным методом [32], полученные величины составили $\Phi = (26 \pm 3) \cdot 10^{-3}$ и $(20 \pm 2) \cdot 10^{-2}$ соответственно. Значения квантового выхода при иных температурах рассчитывались путем сравнения интегральных интенсивностей свечения красителя.

На рис. 2, a представлен график зависимости $\ln(k_{nr}/k_r)$ для ThT в 99%-глицерине от обратной температуры $1/T$ для диапазона $T = 293$ –320 К и определена энергия активации $\Delta E(k_{nr}) = 50 \pm 2$ кДж/моль. Величина $\Delta E(k_{nr})$ совпадает по значению с энергией активации вязкого течения глицерина $1/\eta = 1/\eta_0 \exp(-\Delta E(\eta)/RT)$ с $\Delta E(\eta) = (50.0 \pm 0.1)$ кДж/моль (рис. 2, b) в данном температурном диапазоне. Совпадение значений $\Delta E(k_{nr})$ и $\Delta E(\eta)$ свидетельствует о практическом отсутствии энергетического барьера ΔE_{int} на пути реакции переноса заряда для ThT (т.е. реализуется безбарьерный режим протекания реакции для „изолированной“ молекулы красителя), и энергия активации безызлучательного процесса определяется температурной зависимостью вязкостных свойств растворителя.

При температурах ниже 293 К раствор глицерина переходит в фазу аморфного стекла [34] (температура плавления глицерина $T_m \sim 291$ К, а стеклования $T_g \sim 193$ К), и его вязкость не подчиняется аррениусовской зависимости. Для расчета вязкостей глицерина при температурах $T < 293$ К использовалась формула (1), и на рис. 3, a приведена зависимость $1/\eta$ для чистого глицерина от обратной температуры.

Зависимость отношения констант скоростей k_{nr}/k_r от $1/T$ в полулогарифмическом масштабе для диапазона температур 261–353 К является нелинейной, что свидетельствует об изменении эффективной энергии активации $\Delta E(k_{nr})$ для безызлучательной кон-

станты скорости k_{nr} в зависимости от температуры (от $\Delta E(k_{nr}) \sim 25$ kJ/mol до 83 kJ/mol), причем с ростом температуры $\Delta E(k_{nr})$ снижается. Снижение температуры ведет к росту вязкости глицеринового раствора и значительному уменьшению константы скорости k_{TICT} , поэтому, начиная с некоторого момента, предположение о доминирующем вкладе k_{TICT} в суммарную константу скорости k_{nr} безызлучательной дезактивации (4) для ThT может перестать выполняться. Однако, как видно из рис. 3, а, наблюдается хорошая корреляция зависимостей k_{nr}/k_r и $1/\eta$ от обратной температуры, и нет указаний на проявление вклада дополнительных каналов безызлучательной дезактивации в области малых температур и высоких вязкостей. Более того, снижение отношения k_{nr}/k_r происходит быстрее, чем для величины $1/\eta$, что может свидетельствовать об увеличении константы скорости излучательного перехода k_r с ростом $1/T$ (величина k_r зависит от показателя преломления среды [38,39], значение которого возрастает при снижении температуры [40]). Таким образом, приближение (4) о доминирующем вкладе k_{TICT} в суммарную константу скорости безызлучательной дезактивации k_{nr} возбужденного состояния ThT выполняется для глицериновых растворов вплоть до температур $T \sim 260$ K, и наблюдается корреляция k_{nr} с обратной величиной вязкости среды $1/\eta$.

Важно разделить понятия вязкости η , которая является макроскопическим параметром, характеризующим усредненную по ансамблю величину межмолекулярных взаимодействий молекул растворителя друг с другом (в данном случае для глицерина), от микровязкости η_m , описывающей фрикционное воздействие сольватной оболочки на диффузионно контролируемый процесс взаимного поворота молекулярных фрагментов ThT при TICT-реакции. Интенсивность флуоресценции ThT дает информацию о микровязкости η_m непосредственного окружения красителя. В зависимости от энергии межмолекулярных взаимодействий молекул растворителя друг с другом и с молекулой красителя значение микровязкости может отличаться по величине от макроскопического параметра вязкости. Дополнительной сложностью является то, что размер молекулярных фрагментов ThT, испытывающих поворот, сравним с размером молекул растворителя. В связи с этим растворитель нельзя рассматривать как однородную среду, и конфигурация молекул, входящих в сольватную оболочку, будет формировать некоторую „полость“ с заключенной внутри молекулой ThT, причем форма и объем такой „полости“ будет флуктуировать во времени вследствие участия молекул сольватной оболочки в тепловом движении. Если характерное время, необходимое для изменения объема/формы такого рода „полости“ вследствие межмолекулярных столкновений, намного меньше времени жизни возбужденного LE-состояния ThT, то микроокружение различных молекул красителя можно считать приблизительно однородным вследствие динамического усреднения. В ином случае необходимо учитывать неод-

Таблица 1. Параметры кинетики затухания флуоресценции ThT в 99%-глицерине при 480 nm для различных температур, $\lambda_{exc} = 407$ nm

T, K	α_1	τ_1 , ns	S_1 , %	α_2	τ_2 , ns	S_2 , %	$\langle\tau\rangle$, ns	χ^2
248	1	2.24	100.0				2.24	1.24
	0.965	2.17	94.1	0.035	3.76	5.9	2.26	1.14
263	1	1.86	100.0				1.86	2.19
	0.312	1.09	19.3	0.688	2.06	80.7	1.87	1.11
278	1	1.04	100.0				1.04	8.52
	0.538	0.53	32.2	0.462	1.29	67.8	1.05	1.13
283	1	0.77	100.0				0.77	8.46
	0.635	0.42	41.3	0.365	1.04	58.7	0.79	1.23
288	1	0.58	100.0				0.58	9.21
	0.729	0.34	52.1	0.271	0.85	47.9	0.59	1.30
295	1	0.38	100.0				0.38	8.00
	0.878	0.27	72.2	0.122	0.73	27.8	0.40	1.11

нородность микроокружения ThT, связанную с различием в конфигурации молекул растворителя, окружающих сольват. Данная ситуация может реализовываться для растворов глицерина, который при температурах ниже 293 K переходит в фазу аморфного стекла, что сопровождается существенным возрастанием вязкости и затормаживанием меж- и внутримолекулярных движений. По мере снижения температуры гетерогенность параметров микроокружения в местах локализации молекул красителя будет возрастать, а подвижность сольватной оболочки — снижаться, как в случае внедрения молекул ThT в жесткие матрицы.

Можно ожидать, что гетерогенность микроокружения молекул ThT будет сказываться на изменениях в динамике TICT-процесса, приводя к немоноэкспоненциальной кинетике затухания флуоресценции (см. ниже). Тем не менее интересно отметить, что оцененное на основе квантового выхода флуоресценции значение k_{nr} , которое характеризует микровязкость окружения красителя η_m (точнее его значение, усредненное по ансамблю молекул ThT), хорошо коррелирует с обратной величиной макроскопического параметра вязкости η для глицерина (рис. 3, а).

Так, для области температур 261–285 K эффективная энергия активации безызлучательного перехода в 99%-глицерине составляет $\Delta E(k_{nr}) = 74 \pm 2$ kJ/mol, что практически соответствует величине $\Delta E(\eta) = 71.8 \pm 0.6$ kJ/mol, рассчитанной на основе данных о вязкости для 100%-глицерина.

Изменение температуры в диапазоне $T = 260$ – 350 K способно изменить значение константы скорости k_{nr} безызлучательного перехода (точнее отношения k_{nr}/k_r)

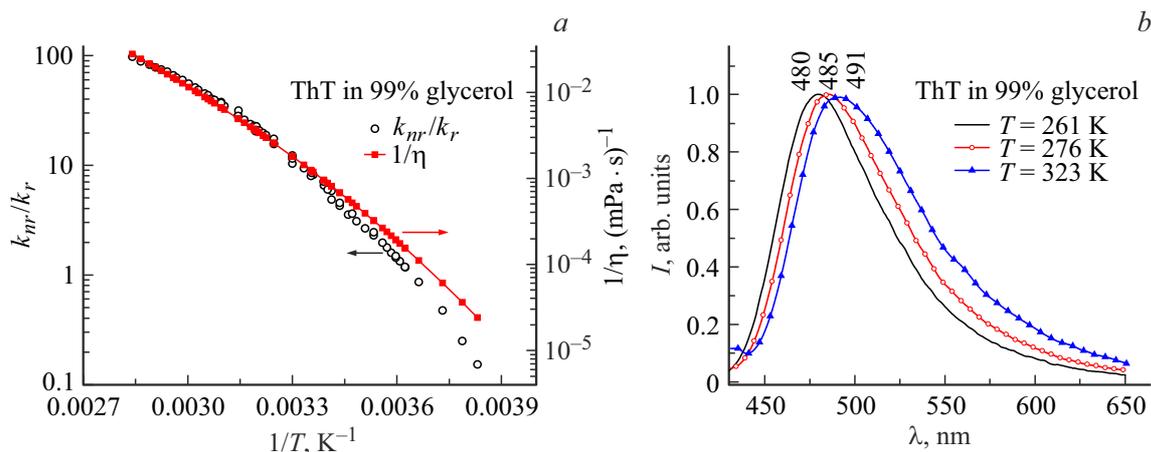


Рис. 3. (а) Зависимости $1/\Phi - 1 = k_{nr}/k_r$ для ThT в 99%-глицерине и $1/\eta$ для глицерина от обратной температуры в диапазоне 260–350 К. (б) Нормированные спектры флуоресценции ThT в 99%-глицерине при различных температурах. $\lambda_{exc} = 415$ nm.

для ThT в глицерине на 3 порядка величины. Квантовый выход флуоресценции ThT в 99%-глицерине при 276 К составляет $\Phi \sim 0.46$ и значительно падает с увеличением температуры.

Как и для большинства иных ФМР, время жизни возбужденного LE-состояния для ThT в глицерине сопоставимо с характерными временами колебательной и сольватной релаксаций. С изменением температуры их соотношение меняется, что проявляется в сдвиге и уширении стационарного спектра флуоресценции ThT в зависимости от температуры (рис. 3, б). Рост температуры от 260 до 323 К ведет к батохромному сдвигу спектра флуоресценции на ~ 10 nm.

На рис. 4 приведены спектры флуоресценции катиона 6-Ме-ВТА-2С в 99%-глицерине при различных температурах. Как и для случая ThT, изменение температуры сказывается как на интенсивности, так и на положении и форме спектров флуоресценции. Рост температуры сопровождается длинноволновым сдвигом спектров (от 474 до 481 nm) и небольшим увеличением полуширины полосы флуоресценции. В температурном диапазоне 275–343 К квантовый выход флуоресценции 6-Ме-ВТА-2С изменяется в ~ 12 раз.

Кинетика затухания флуоресценции в глицерине

Кривые затухания флуоресценции ThT в 99%-глицерине при различных температурах приведены на рис. 5. Экспериментальные кривые кинетики моделировались мультиэкспоненциальной функцией затухания (2). Оценка качества моделирования производилась на основе критерия редуцированного χ^2 , принимающего значения ~ 1 при хорошей подгонке, и графика взвешенных разностей (рис. 5, d) между экспериментальной и расчетной кривыми кинетики затухания.

Было обнаружено, что кинетика затухания ThT имеет немоноэкспоненциальный характер (рис. 5, c, d), зависит

от длины волны регистрации флуоресценции (рис. 6), и для ее описания необходимо использование не менее 2 или 3 экспоненциальных компонент. Параметры кинетики затухания флуоресценции ThT в глицерине для различных температур и длин волн флуоресценции приведены в табл. 1 и 2.

В качестве причин немоноэкспоненциальной кинетики затухания флуоресценции могут выступать как гетерогенность микроокружения молекул ThT в глицерине, так и протекание в возбужденном состоянии красителя процесса спектральной релаксации вследствие реполяризации растворителя. Важно отметить, что значения скоростей сольватной релаксации и дезактивации возбужденного LE-состояния для ThT в глицерине близки по величине. Например, время сольватной релаксации в глицерине при 298 К, составляющее $\tau_S \sim 0.5$ ns [41], практически совпадает с временем жизни флуоресценции ThT (τ) = 0.4 ns при этих же условиях.

Таким образом, смещение мгновенных спектров флуоресценции (time-resolved fluorescence spectra) красителя в длинноволновую область вследствие спектральной релаксации протекает в том же временном диапазоне, что и снижение населенности возбужденного LE-состояния, и это существенно усложняет кинетику затухания флуоресценции, которая регистрируется при определенных длинах волн. Построение физической модели динамики дезактивации возбужденного состояния ФМР для случая окружения высокой вязкости не является целью настоящей работы. В связи с этим описание кинетики затухания производилось с помощью мультиэкспоненциальной модели, не придавая параметрам α_j , τ_j определенного физического смысла. Приемлемость описания кинетики оценивалось на основе критерия редуцированного χ^2 (табл. 1, 2), и для характеристики длительности кинетики мультиэкспоненциального затухания использовалось среднее время жизни (τ).

В области положения максимума стационарного спектра флуоресценции ThT при ~ 480 nm кинетика может

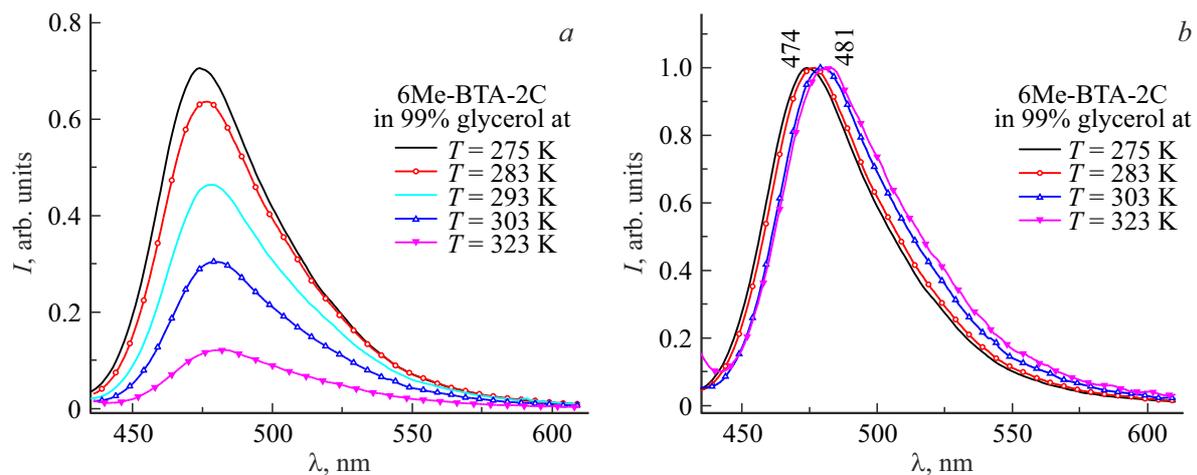


Рис. 4. Исходные (a) и нормированные (b) спектры флуоресценции 6-Ме-ВТА-2С в 99%-глицерине при различных температурах. $\lambda_{\text{exc}} = 415 \text{ nm}$.

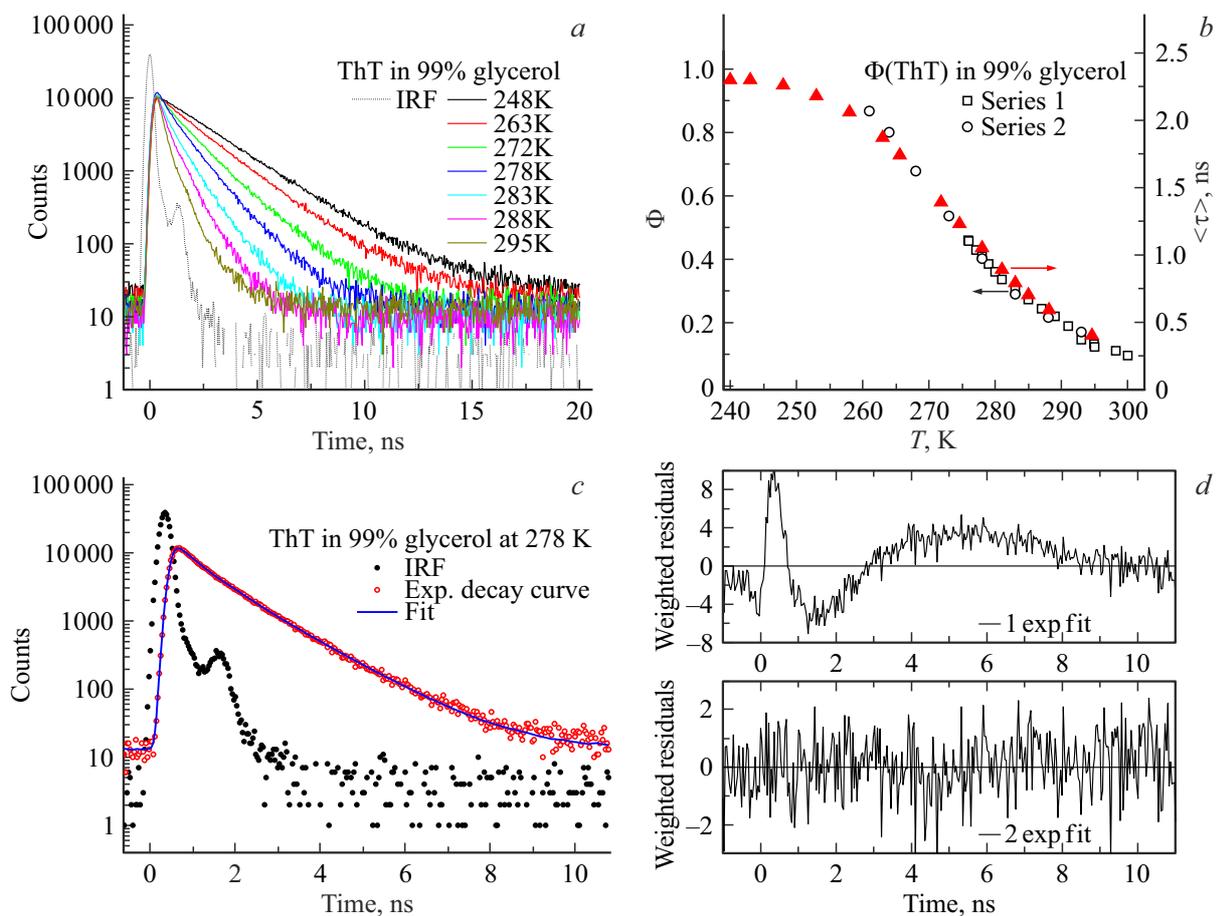


Рис. 5. (a) Кинетика затухания флуоресценции ThT в 99%-глицерине при различных температурах; $\lambda_{\text{exc}} = 407 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 480 \text{ nm}$; пунктирной кривой указана аппаратная функция IRF. (b) Температурные зависимости квантового выхода Φ и среднего времени жизни $\langle \tau \rangle$ флуоресценции ThT в глицерине. (c) Кинетика затухания флуоресценции ThT в 99%-глицерине при $T = 278 \text{ K}$; заполненные кружки — аппаратная функция IRF, полые — экспериментальная кривая кинетики, сплошная кривая — подгонка мультиэкспоненциальной моделью. (d) Кривые взвешенных разностей между экспериментальной и расчетной кривыми кинетики при моделировании моно- и биэкспоненциальной зависимостью для ThT в 99%-глицерине при $T = 278 \text{ K}$.

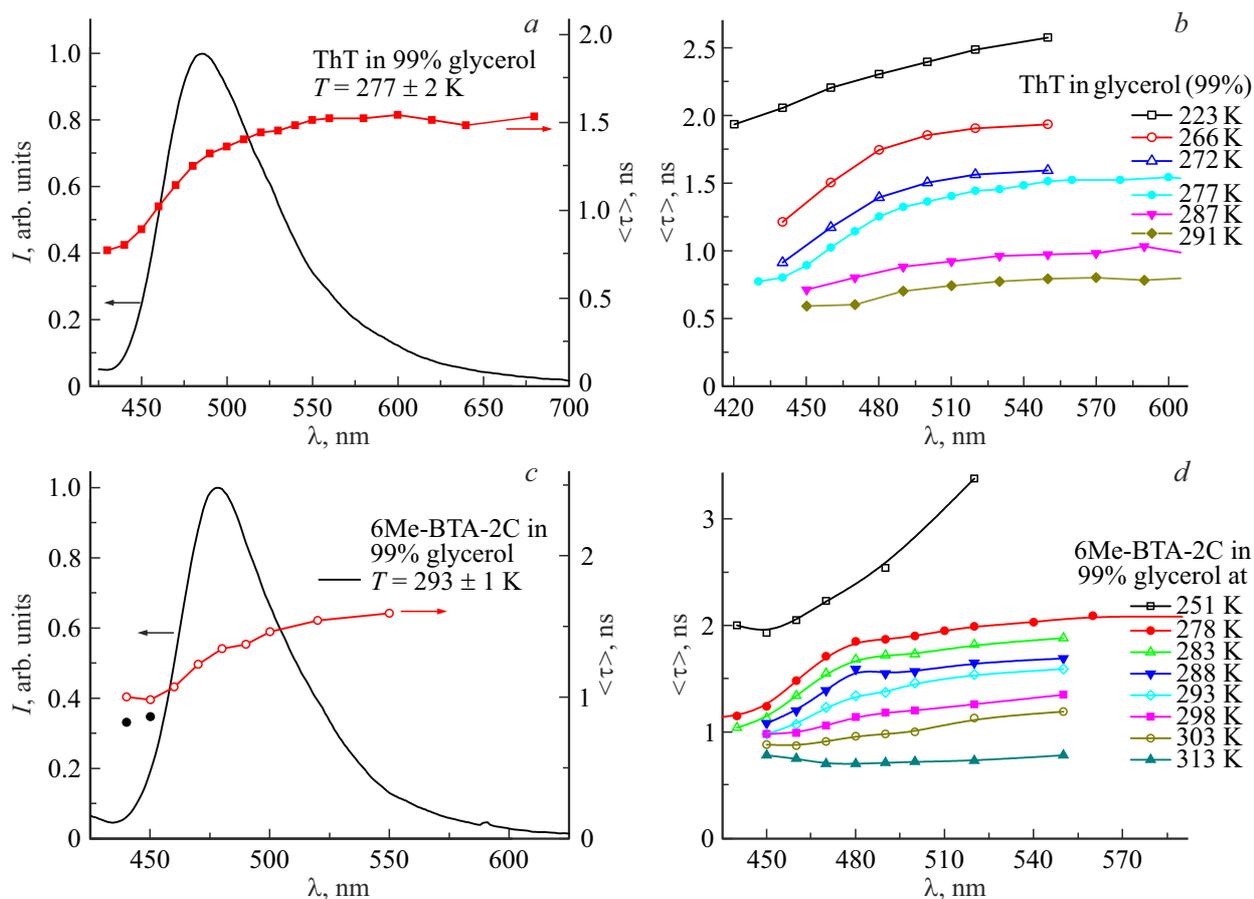


Рис. 6. Зависимость среднего времени затухания $\langle \tau \rangle$ от длины волны флуоресценции для ThT (*a, b*) и 6-Ме-ВТА-2С (*c, d*) в 99%-глицерине при различных температурах. (*a*) Спектр флуоресценции для ThT в глицерине и зависимость $\langle \tau \rangle$ от λ при 277 К. (*b*) Зависимость $\langle \tau \rangle$ от длины волны флуоресценции ThT для температур от 223 до 291 К. (*c*) Спектр флуоресценции 6-Ме-ВТА-2С в глицерине и зависимость $\langle \tau \rangle$ по спектру при 293 К. (*d*) Зависимость $\langle \tau \rangle$ от длины волны флуоресценции 6-Ме-ВТА-2С для температур от 251 до 313 К.

быть удовлетворительно описана с помощью двух экспоненциальных компонент (табл. 1), и среднее время жизни $\langle \tau \rangle$ проявляет зависимость от температуры, изменяясь от ~ 2.2 (при 248 К) до ~ 0.4 ns (при 295 К). Однако нужно отметить, что даже при неизменной температуре раствора длина волны регистрации флуоресценции оказывает важное влияние на вид кинетики затухания и величину $\langle \tau \rangle$. Для раствора ThT при $T \sim 277$ К (табл. 2, рис. 6, *a*) значение $\langle \tau \rangle$ увеличивается в ~ 2 раза с ростом длины волны регистрации от 430 до 680 nm, а для описания кинетики на коротковолновом и длинноволновом краях спектра требуется введение дополнительной короткоживущей компоненты. Причем на красном краю спектра данная короткоживущая компонента имеет отрицательную амплитуду (табл. 2), свидетельствуя, что при данных длинах волн на начальном этапе наблюдается некоторый рост сигнала флуоресценции и лишь затем затухание. Наличие дополнительной короткоживущей компоненты указывает на протекание процесса спектральной релаксации, ведущей к ускорению затухания

флуоресценции на коротковолновом краю и замедлению затухания на длинноволновом краю спектра.

Сопоставление данных по квантовому выходу и кинетике флуоресценции ThT в глицерине (рис. 5) позволяет определить константу излучательного перехода из возбужденного LE-состояния в 99%-глицерине $k_r \approx 0.4 \cdot 10^9$ s $^{-1}$ с относительной погрешностью 10% (в предположении, что время затухания флуоресценции при 480 nm соответствует времени жизни LE-состояния).

Длительность кинетики флуоресценции является чувствительной к температуре, что может быть использовано для температурных измерений. Для проведения измерений с использованием TCSPC-флуориметра с временным разрешением ~ 100 ps наиболее перспективной представляется область температур 260–290 К, где среднее время затухания флуоресценции ThT в глицерине меняется от 2.0 до 0.5 ns (рис. 5, *b*).

Подобные свойства наблюдаются и для кинетики флуоресценции катиона 6-Ме-ВТА-2С в 99%-глицерине: немнозоэкспоненциальность (табл. 3, 4), увеличение сред-

Таблица 2. Параметры кинетики затухания флуоресценции ThT в 99%-глицерине при различных длинах волн для $T = (277 \pm 1.5) \text{ K}$, $\lambda_{\text{exc}} = 407 \text{ nm}$

λ	α_1	$\tau_1, \text{ ns}$	$S_1, \%$	α_2	$\tau_2, \text{ ns}$	$S_2, \%$	α_3	$\tau_3, \text{ ns}$	$S_3, \%$	$\langle \tau \rangle, \text{ ns}^*$	χ^2
430	0.780	0.29	47.3	0.220	1.15	52.7				0.75 ± 0.06	1.32
	0.652	0.22	31.6	0.284	0.72	45.4	0.064	1.62	23.1	0.77 ± 0.07	1.07
440	0.761	0.36	49.4	0.239	1.18	50.6				0.78 ± 0.06	1.68
	0.636	0.29	34.4	0.330	0.87	53.1	0.035	1.94	12.6	0.80 ± 0.07	1.37
460	0.677	0.57	46.2	0.323	1.40	53.8				1.02 ± 0.06	1.16
	0.514	0.50	31.0	0.311	0.96	35.8	0.176	1.58	33.2	1.02 ± 0.06	1.16
480				0.606	0.80	43.9	0.394	1.58	56.1	1.24 ± 0.06	1.19
	-0.225	0.13	-2.8	0.542	0.68	35.9	0.458	1.50	66.9	1.25 ± 0.06	1.06
500				0.595	0.98	46.2	0.405	1.67	53.8	1.35 ± 0.06	1.27
	-0.335	0.11	-3.3	0.451	0.76	29.7	0.549	1.55	73.5	1.36 ± 0.06	1.01
520				0.883	1.24	81.0	0.117	2.20	19.0	1.42 ± 0.06	1.58
	-0.402	0.12	-3.9	0.608	1.00	49.1	0.392	1.73	54.9	1.44 ± 0.06	1.16
540	-0.393	0.16	-4.8	0.505	0.97	38.9	0.495	1.68	65.9	1.48 ± 0.06	1.06
560	-0.473	0.14	-5.0	0.811	1.20	75.0	0.189	2.07	30.0	1.52 ± 0.06	1.16
580	-0.445	0.16	-5.3	0.634	1.13	54.8	0.366	1.80	50.5	1.52 ± 0.06	1.02
600	-0.552	0.16	-6.8	0.637	1.10	55.1	0.363	1.82	51.7	1.54 ± 0.06	1.13
620	-0.583	0.18	-8.8	0.429	0.84	30.4	0.571	1.62	78.4	1.51 ± 0.06	0.97
640	-0.776	0.09	-5.5	1.000	1.41	105.5				1.48 ± 0.06	1.47
	-0.488	0.19	-8.1	0.380	0.79	25.4	0.620	1.57	82.7	1.48 ± 0.06	1.12
680	-1.217	0.09	-8.8	1.000	1.36	108.8				1.47 ± 0.06	1.20
	-1.217	0.13	-14.1	0.484	0.91	39.6	0.516	1.60	74.5	1.53 ± 0.07	1.06

Примечание. * Указано оцениваемое стандартное отклонение для $\langle \tau \rangle$.

него времени затухания $\langle \tau \rangle$ с ростом длины волны спектра эмиссии (рис. 6, *c, d*). Долгоживущая компонента с $\tau \sim 3.4 \text{ ns}$ на коротковолновом краю спектра флуоресценции 6-Ме-ВТА-2С при 440 и 450 nm (табл. 3) вероятнее всего обусловлена присутствием небольшого количества нейтральной формы молекулы 6-Ме-ВТА-2 [42] в образце. На рис. 6, *c* черными кружками отмечены значения среднего времени затухания $\langle \tau \rangle$ для 6-Ме-ВТА-2С, если исключить из расчета вклад долгоживущей компоненты с $\tau \sim 3.4 \text{ ns}$. Присутствием данной примеси вызван и аномальный подъем значения $\langle \tau \rangle$ на коротковолновом краю спектра флуоресценции (рис. 6, *d*), в особенности для красителя при более высоких температурах.

Несмотря на подобие молекул ThT и 6Ме-ВТА-2С (рис. 1), изменения в структуре ФМР, связанные с заменой заместителя при атоме азота бензотиазолового цикла с метильной группы на водород, приводят к существенному снижению эффективной константы ско-

рости ПСТ-реакции для 6-Ме-ВТА-2С. При этом термочувствительная область для флуоресценции данного красителя в глицерине смещается в сторону больших температур (рис. 7).

Таким образом, проведения температурных измерений на основе кинетики затухания флуоресценции ThT и 6-Ме-ВТА-2С в глицерине возможны начиная с 260 K (для ThT) и 280 K (для 6-Ме-ВТА-2С). Верхняя граница температурного диапазона определяется временным разрешением спектрометра, и при измерениях методом TCSPC с разрешением $\sim 100 \text{ ps}$ температурный диапазон, доступный для измерений, составляет 260–290 K (ThT в глицерине) и 280–320 K (6-Ме-ВТА-2С в глицерине).

Выводы

Квантовый выход и кинетика флуоресценции бензотиазол-анилиновых производных ThT, проявляющих свой-

Таблица 3. Параметры кинетики затухания флуоресценции 6Ме-ВТА-2С в 99%-глицерине при температуре (288 ± 1) К, $\lambda_{\text{exc}} = 407$ nm

λ	α_1	τ_1 , ns	S_1 , %	α_2	τ_2 , ns	S_2 , %	α_3	τ_3 , ns	S_3 , %	$\langle \tau \rangle$, ns*	χ^2
440	0.702	0.37	38.8	0.298	1.39	61.2				1.00 ± 0.06	1.55
	0.635	0.32	30.4	0.352	1.18	62.9	0.013	3.40	6.7	1.06 ± 0.10	1.16
450	0.719	0.56	48.7	0.281	1.51	51.3				1.05 ± 0.06	1.27
	0.650	0.51	40.8	0.341	1.34	55.7	0.009	3.40	3.6	1.08 ± 0.10	1.20
460				0.623	0.76	44.9	0.377	1.55	55.1	1.19 ± 0.06	1.48
	-0.381	0.16	-7.2	0.563	0.54	35.1	0.437	1.43	72.2	1.20 ± 0.07	1.12
470	-0.444	0.16	-6.1	0.551	0.94	44.4	0.449	1.60	61.7	1.39 ± 0.07	1.05
480	-1.152	0.12	-11.1	1.000	1.43	111.1				1.57 ± 0.06	1.36
	-1.164	0.13	-12.6	0.842	1.31	89.0	0.158	1.86	23.6	1.59 ± 0.07	1.19
490	-0.566	0.16	-6.7	1.000	1.45	106.7				1.54 ± 0.06	1.18
	-0.536	0.20	-8.1	0.569	1.22	53.1	0.431	1.66	55.0	1.55 ± 0.06	1.05
500	-0.593	0.16	-7.1	1.000	1.46	107.1				1.56 ± 0.06	1.24
	-0.563	0.18	-7.8	0.953	1.40	99.8	0.047	2.29	8.0	1.57 ± 0.07	1.15
520	-0.639	0.21	-9.9	1.000	1.50	109.9				1.63 ± 0.06	1.12
	-0.622	0.23	-10.8	0.987	1.46	107.5	0.013	3.24	3.3	1.65 ± 0.10	1.03
550	-0.666	0.22	-10.6	1.000	1.55	110.6				1.69 ± 0.06	1.07

Примечание. * Указано оцениваемое стандартное отклонение для $\langle \tau \rangle$.

Таблица 4. Параметры кинетики затухания флуоресценции 6Ме-ВТА-2С в 99%-глицерине при 470 nm при различных температурах, $\lambda_{\text{exc}} = 407$ nm

λ	α_1	τ_1 , ns	S_1 , %	α_2	τ_2 , ns	S_2 , %	α_3	τ_3 , ns	S_3 , %	$\langle \tau \rangle$, ns*	χ^2
283	-0.555	0.14	-5.6	0.803	1.35	77.0	0.197	2.05	28.7	1.62 ± 0.07	1.05
293	-0.412	0.14	-5.8	0.469	0.71	32.8	0.531	1.40	73.1	1.25 ± 0.07	1.13
303				0.884	0.77	79.0	0.116	1.57	21.0	0.94 ± 0.06	1.27
	-0.596	0.06	-4.8	0.813	0.71	72.3	0.187	1.39	32.5	0.96 ± 0.07	1.17
313				0.936	0.55	83.8	0.064	1.54	16.2	0.71 ± 0.06	1.50
	-0.400	0.04	-2.9	0.929	0.54	85.1	0.071	1.48	17.8	0.72 ± 0.08	1.49
323				0.949	0.37	83.7	0.051	1.35	16.3	0.53 ± 0.06	1.25
333				0.957	0.28	82.5	0.043	1.31	17.5	0.46 ± 0.06	1.21
343				0.968	0.20	83.8	0.032	1.18	16.2	0.36 ± 0.06	1.30

Примечание. * Указано оцениваемое стандартное отклонение для $\langle \tau \rangle$.

ства ФМР, чувствительны к температуре, что позволяет использовать данные соединения в качестве температурных сенсоров.

Экспериментально показано, что ПИСТ-реакция внутримолекулярного переноса заряда, сопровождаемого конформационными изменениями, является доминирующим процессом безызлучательной дезактивации воз-

бужденного состояния ThT в глицерине вплоть до температур $T \sim 260$ К. Эффективная константа скорости ПИСТ-реакции определяется вязкостными свойствами микроокружения, и изменение температуры глицеринового раствора от 261 до 353 К приводит к росту ее значения на ~ 3 порядка величины. На основании данных по квантовому выходу и кинетике флуоресцен-

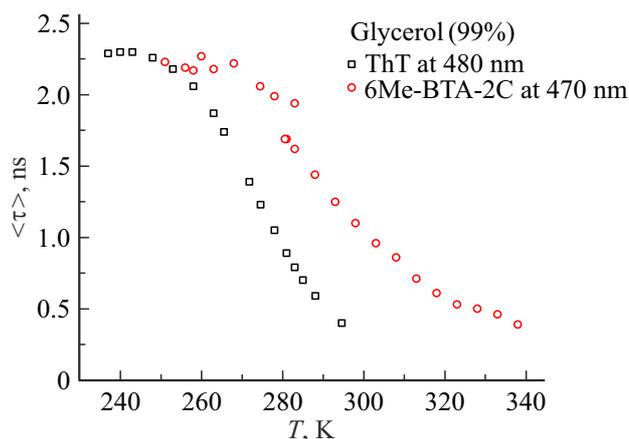


Рис. 7. Зависимость среднего времени затухания $\langle \tau \rangle$ флуоресценции для ThT и 6-Ме-ВТА-2С в 99%-глицерине от температуры. $\lambda_{\text{exc}} = 407 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 480 \text{ nm}$ (ThT) и 470 nm (6-Ме-ВТА-2С).

ции ThT в 99%-глицерине определена константа излучательного перехода из возбужденного LE-состояния $k_r \approx 0.4 \cdot 10^9 \text{ s}^{-1}$.

Кинетика флуоресценции рассмотренных красителей в глицерине имеет немоноэкспоненциальный характер, зависит от длины волны регистрации флуоресценции, и для ее описания необходимо использование не менее 2 экспоненциальных компонент. Немоноэкспоненциальность кинетики связана с гетерогенностью микроокружения молекул ФМР в глицерине, а также с протеканием в возбужденном состоянии красителей процесса спектральной релаксации, характерное время которого близко по значению к времени жизни возбужденного LE-состояния, ответственного за флуоресценцию ФМР. Процесс спектральной релаксации проявляется как в стационарных спектрах флуоресценции (сдвиг спектров в зависимости от температуры), так и в кинетике (монотонном увеличении среднего времени жизни $\langle \tau \rangle$ с ростом длины волны регистрации флуоресценции и появлении компонент с отрицательной амплитудой на красном краю спектра).

Обнаружено, что проведение температурных измерений на основе кинетики затухания флуоресценции для глицериновых растворов ThT возможно начиная с 260 К, а для 6-Ме-ВТА-2С в глицерине — начиная с 280 К. Верхняя граница доступного для измерений температурного диапазона определяется временным разрешением спектрометра, и при временном разрешении $\sim 100 \text{ ps}$ составляет 290 и 320 К для глицериновых растворов ThT и 6-Ме-ВТА-2С соответственно.

Полученные данные могут использоваться для разработки флуоресцентных сенсоров для нанотермометрии, для визуализации градиентов температуры с высоким пространственным разрешением с помощью флуоресцентной микроскопии.

Финансирование работы

Работа была поддержана Министерством образования Республики Беларусь (проект 3.04 программы „Конвергенция-2020“ и проект 3.01.3.3 программы „Конвергенция-2025“).

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Список литературы

- [1] J. Zhou, B. del Rosal, D. Jaque, S. Uchiyama, D. Jin. *Nature Methods*, **17** (10), 967 (2020). DOI: 10.1038/s41592-020-0957-y
- [2] D. Jaque, F. Vetrone. *Nanoscale*, **4** (15), 4301 (2012). DOI: 10.1039/C2NR30764B
- [3] B. del Rosal, E. Ximendes, U. Rocha, D. Jaque. *Advanced Optical Materials*, **5** (1), 1600508 (2017). DOI: 10.1002/adom.201600508
- [4] K. Grattan, A. Palmer. *Review of Scientific Instruments*, **56** (9), 1784 (1985). DOI: 10.1063/1.1138094
- [5] S. Collins, G. Baxter, S. Wade, T. Sun, K. Grattan, Z. Zhang, A. Palmer. *J. Appl. Phys.*, **84** (9), 4649 (1998). DOI: 10.1063/1.368705
- [6] J. Feng, K. Tian, D. Hu, S. Wang, S. Li, Y. Zeng, Y. Li, G. Yang. *Angewandte Chemie International Edition*, **50** (35), 8072 (2011). DOI: 10.1002/ange.201102390
- [7] X. Liu, S. Li, J. Feng, Y. Li, G. Yang. *Chem. Commun.*, **50** (21), 2778 (2014). DOI: 10.1039/C3CC49147A
- [8] A. Bednarkiewicz, L. Marciniak, L.D. Carlos, D. Jaque. *Nanoscale*, **12** (27), 14405 (2020). DOI: 10.1039/D0NR03568H
- [9] Б.М. Ужинов, В.Л. Иванов, М.Я. Мельников. *Успехи химии*, **80** (12), 1231 (2011).
- [10] M.A. Haidekker, E.A. Theodorakis. *Org. Biomol. Chem.*, **5** (11), 1669 (2007). DOI: 10.1039/b618415d
- [11] M.A. Haidekker, E.A. Theodorakis. *J. Biological Engineering*, **4** (1), 11 (2010). DOI: 10.1186/1754-1611-4-11
- [12] E. Voropai, M. Samtsov, K. Kaplevskii, A. Maskevich, V. Stepuro, O. Povarova, I. Kuznetsova, K. Turoverov, A. Fink, V. Uverskii. *J. Appl. Spectrosc.*, **70** (6), 868 (2003). DOI: 10.1023/B:JAPS.0000016303.37573.7e
- [13] V.I. Stsiapura, A.A. Maskevich, V.A. Kuzmitsky, V.N. Uversky, I.M. Kuznetsova, K.K. Turoverov. *J. Phys. Chem. B*, **112** (49), 15893 (2008). DOI: 10.1021/jp805822c
- [14] V.I. Stsiapura, S.A. Kurhuzenkau, V.A. Kuzmitsky, O.V. Bouganov, S.A. Tikhomirov. *J. Phys. Chem. A*, **120** (28), 5481 (2016). DOI: 10.1021/acs.jpca.6b02577
- [15] M.J. van der Meer, H. Zhang, M. Glasbeek. *J. Chem. Phys.*, **112** (6), 2878 (2000). DOI: 10.1063/1.480929
- [16] M. Glasbeek, H. Zhang, P. Changelnet, P. Plaza, M.M. Martin, W. Rettig. *Femtochemistry: With the Nobel Lecture of A Zewail*, 417 (2001). DOI: 10.1002/3527600183.ch26
- [17] Y. Erez, N. Amdursky, R. Gepshtein, D. Huppert. *J. Phys. Chem. A*, **116** (49), 12056 (2012). DOI: 10.1021/jp309471w
- [18] D. Ben-Amotz, C. Harris. *J. Chem. Phys.*, **86** (9), 4856 (1987). DOI: 10.1063/1.452656
- [19] A. Mokhtari, L. Fini, J. Chesnoy. *J. Chem. Phys.*, **87** (6), 3429 (1987). DOI: 10.1063/1.452987

- [20] R.O. Loutfy, B.A. Arnold. *J. Phys. Chem.*, **86** (21), 4205 (1982). DOI: 10.1021/j100218a023
- [21] R.O. Loutfy, K.Y. Law. *J. Phys. Chem.*, **84** (21), 2803 (1980). DOI: 10.1021/j100458a027
- [22] T.T. Vu, R. Méallet-Renault, G. Clavier, B.A. Trofimov, M.K. Kuimova. *J. Mater. Chem. C*, **4** (14), 2828 (2016). DOI: 10.1039/C5TC02954F
- [23] E. Bahaidarah, A. Harriman, P. Stachelek, S. Rihn, E. Heyer, R. Ziessel. *Photochemical & Photobiological Sciences*, **13** (10), 1397 (2014). DOI: 10.1039/C4PP00204K
- [24] A. Vyšniauskas, I. López-Duarte, N. Duchemin, T.-T. Vu, Y. Wu, E.M. Budynina, Y.A. Volkova, E.P. Cabrera, D.E. Ramírez-Ornelas, M.K. Kuimova. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **19** (37), 25252 (2017). DOI: 10.1039/C7CP03571C
- [25] A. Vyšniauskas, D. Ding, M. Qurashi, I. Boczarow, M. Balaz, H.L. Anderson, M.K. Kuimova. *Chemistry-A European J.*, **23** (46), 11001 (2017). DOI: 10.1002/chem.201700740
- [26] Y.-J. Jin, R. Dogra, I.W. Cheong, G. Kwak. *ACS Appl. Mater. & Interfaces*, **7** (26), 14485 (2015). DOI: 10.1021/acsami.5b03842
- [27] A.A. Maskevich, V.I. Stsiapura, V.A. Kuzmitsky, I.M. Kuznetsova, O.I. Povarova, V.N. Uversky, K.K. Turoverov. *J. Proteome Research*, **6** (4), 1392 (2007). DOI: 10.1021/pr0605567
- [28] N. Amdursky, Y. Erez, D. Huppert. *Accounts of Chemical Research*, **45** (9), 1548 (2012). DOI: 10.1021/ar300053p
- [29] V.I. Stsiapura, A.A. Maskevich, V.A. Kuzmitsky, K.K. Turoverov, I.M. Kuznetsova. *J. Phys. Chem. A*, **111** (22), 4829 (2007). DOI: 10.1021/jp070590o
- [30] V.I. Stsiapura. *J. Computational Chem.*, **41** (21), 1874 (2020). DOI: 10.1002/jcc.26358
- [31] V.I. Stsiapura, A.A. Maskevich, S.A. Tikhomirov, O.V. Buganov. *J. Phys. Chem. A*, **114** (32), 8345 (2010). DOI: 10.1021/jp105186z
- [32] A.T.R. Williams, S.A. Winfield, J.N. Miller. *Analyst*, **108** (1290), 1067 (1983). DOI: 10.1039/AN9830801067
- [33] C. Yaws. *Chemical Properties Handbook*. (McGraw-Hill Education, 1999).
- [34] J.A. Trejo González, M.P. Longinotti, H.R. Corti. *J. Chemical & Engineering Data*, **56** (4), 1397 (2011). DOI: 10.1021/jc101164q
- [35] А. Маскевич, В. Степуро, С. Кургузенков, А. Лавыш. *Вестник Гродзенскага дзяржаўнага ўніверсітэта імя Янкі Купалы Серыя 2 Матэматыка Фізіка Інфарматыка, вылічальная тэхніка і кіраванне*, **3** (159), 107 (2013).
- [36] D.V. O'Connor, D. Phillips. *Time-correlated Single Photon Counting*. (Academic Press, New York., 1984).
- [37] В. Степуро. *Вестник Гродзенскага дзяржаўнага ўніверсітэта імя Янкі Купалы Серыя 2*, **5** (1), 52 (2001).
- [38] R. Lampert, S. Meech, J. Metcalfe, D. Phillips, A. Schaap. *Chem. Phys. Lett.*, **94** (2), 137 (1983). DOI: 10.1016/0009-2614(83)87560-5
- [39] D. Toptygin. *J. Fluorescence*, **13** (3), 201 (2003). DOI: 10.1023/A:1025033731377
- [40] H. El-Kashef. *Physica B: Condensed Matter*, **311** (3–4), 376 (2002). DOI: 10.1016/S0921-4526(01)00642-1
- [41] A. Chakraborty, D. Seth, P. Setua, N. Sarkar. *J. Phys. Chem. B*, **110** (11), 5359 (2006). DOI: 10.1021/jp056650c
- [42] S.D. Gogoleva, E.V. Kalganova, A.A. Maskevich, A.A. Lugovskiy, V.A. Kuzmitsky, M. Goswami, O.V. Buganov, S.A. Tikhomirov, V.I. Stsiapura. *J. Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, **358**, 76 (2018). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2018.03.003>