



СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
SIBERIAN FEDERAL UNIVERSITY



Е. А. Слюсарева

РЕАКЦИИ С УЧАСТИЕМ  
ВОЗБУЖДЕННЫХ СОСТОЯНИЙ  
ФЛУОРЕСЦЕИНОВЫХ КРАСИТЕЛЕЙ

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации  
Сибирский федеральный университет

Е. А. Слюсарева

# **РЕАКЦИИ С УЧАСТИЕМ ВОЗБУЖДЕННЫХ СОСТОЯНИЙ ФЛУОРЕСЦЕИНОВЫХ КРАСИТЕЛЕЙ**

Монография

Красноярск  
СФУ  
2020

УДК 547.633.6  
ББК 24.235.213  
С498

**Рецензенты:**

*В. В. Салмин*, доктор физико-математических наук, доцент, заведующий кафедрой медицинской и биологической физики Красноярского государственного медицинского университета имени профессора В. Ф. Войно-Ясенецкого;

*В. А. Светличный*, кандидат физико-математических наук, доцент, заведующий лабораторией новых материалов и перспективных технологий Национального исследовательского Томского государственного университета

**Слюсарева, Е. А.**

С498 Реакции с участием возбужденных состояний флуоресцентных красителей : монография / Е. А. Слюсарева. – Красноярск : Сиб. федер. ун-т, 2020. – 170 с.

ISBN 978-5-7638-4314-9

Рассмотрены процессы с участием возбужденных состояний флуоресцентных красителей. Представлен экспериментальный и теоретический материал, позволяющий продемонстрировать многообразие возможных фотопроцессов и выявить связь молекулярной структуры с фотофизическими и фотохимическими свойствами молекул. Особое внимание уделено возможности использования реакций красителя в возбужденном состоянии в задачах сенсорики, записи оптической информации и других областях.

Предназначена для специалистов, чья научная или практическая деятельность связана с созданием и изучением оптических функциональных материалов, а также студентов и аспирантов физических и химических специальностей вузов.

**Электронный вариант издания см.:**

<http://catalog.sfu-kras.ru>

**УДК 547.633.6**

**ББК 24.235.213**

*Подготовлена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (FSRZ-2020-0008), при поддержке РФФИ (проект № 19-02-00450), Правительства Красноярского края, Красноярского краевого фонда науки (проект № 18-43-242003)*

ISBN 978-5-7638-4314-9

© Сибирский федеральный университет, 2020

# ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>Предисловие .....</b>	<b>5</b>
<b>Глава 1. Систематика фотопроцессов в красителях .....</b>	<b>9</b>
1.1. Общие понятия. Энергетическая схема красителя .....	9
1.2. Излучательные фотофизические процессы .....	15
1.3. Колебательная релаксация, внутренняя и интеркомбинационная конверсии .....	18
1.4. Тушение нижних возбужденных уровней .....	21
1.5. Безызлучательный перенос энергии электронного возбуждения....	23
1.6. Межмолекулярные взаимодействия .....	28
1.7. Фотоиндуцированный перенос протона .....	31
1.8. Фотоиндуцированные реакции, приводящие к изменению химической структуры красителя .....	36
Литература .....	37
<b>Глава 2. Флуоресцеиновые красители: обратимые процессы с участием возбужденных состояний.....</b>	<b>39</b>
2.1. Химическое строение и электронные спектры .....	39
2.2. Конформация дианионов флуоресцеиновых красителей в основном и возбужденном синглетном состояниях.....	43
2.3. Спектральные и фотофизические характеристики флуоресцеиновых красителей в метаноле и биополимерах.....	51
2.4. Фотопроцессы, определяемые спин-орбитальным внутримолекулярным взаимодействием .....	55
2.5. Безызлучательный перенос энергии электронного возбуждения.....	58
Литература .....	67
<b>Глава 3. Протолитические свойства красителей и перенос протона в возбужденном состоянии .....</b>	<b>70</b>
3.1. Ионные равновесия в основном состоянии.....	70
3.2. Спектры поглощения красителей при разных рН.....	78
3.3. Влияние рН на флуоресцентные свойства красителей.....	81
3.4. Ионные равновесия флуоресцеина в возбужденном состоянии....	84
3.5. Использование переноса протона в возбужденном состоянии в задачах биосенсорики .....	89
Литература .....	92

<b>Глава 4. Лазерное обесцвечивание красителей в полимерной матрице .....</b>	<b>95</b>
4.1. Экспериментальное исследование кинетики фотохимической реакции .....	96
4.2. Моделирование кинетики фотохимической реакции .....	103
4.3. Обсуждение механизма фотообесцвечивания красителя в полимере.....	108
4.4. Влияние акцептора энергии возбуждения на кинетику фотохимической реакции донора.....	114
4.5. Кинетика фотохимической реакции с участием высоковозбужденных состояний красителя.....	117
4.6. Использование полимерных растворов красителей для голографической записи информации.....	121
Литература .....	129
<b>Глава 5. Межмолекулярные взаимодействия красителей с биологическими структурами .....</b>	<b>132</b>
5.1. Биферментная биолюминесцентная реакция .....	132
5.2. Адсорбция красителей на частицах из полисахаридов .....	139
5.3. Измерение размера излучателя с помощью деполяризации люминесценции.....	154
5.4. Фосфоресценция при комнатной температуре.....	157
Литература .....	159
<b>Послесловие .....</b>	<b>162</b>
<b>Приложение.....</b>	<b>164</b>

## ПРЕДИСЛОВИЕ

Научный и практический интерес к фотофизике и фотохимии красителей в течение последнего полувека оставался неизменно высоким, лишь смещался фокус в зависимости от насущных потребностей и развития технологии. Революция в оптике и фотонике, вызванная изобретением и широким применением мощных источников когерентного излучения (лазеров) в 1960-х гг. привела к возникновению нового направления, связанного с использованием красителей с высоким выходом люминесценции в качестве активных сред для перестройки частоты лазерного излучения. Вслед за появлением лазерной голографии возникла идея применения полимерных растворов красителей для 3D-записи информации, не исчерпавшая свой потенциал вплоть до настоящего времени. Интенсивные полосы поглощения в видимой и УФ-области спектра позволили использовать красители в качестве фотоинициаторов химических процессов. Фотохимические свойства красителей лежат в основе метода фотодинамической терапии, применяемого для лечения онкологических заболеваний. Краситель выступает в роли фотосенсибилизатора, способного специфически накапливаться в опухолях и образовывать при облучении химически активные формы (свободные радикалы, синглетный кислород), приводящие к гибели клеток.

Но, пожалуй, наиболее практически важные применения красителей в последние десятилетия находят в биологии и медицине, в первую очередь – в качестве чувствительных компонент сенсоров и различных маркеров. Так, использование красителей в качестве флуоресцентных маркеров позволило осуществлять непрерывную детекцию продуктов полимеразной цепной реакции для секвенирования участков молекул ДНК, что существенно расширило возможности метода. По сути, эти усовершенствования произвели революцию в биологических исследованиях, что имело решающее значение для таких масштабных проектов, как «Геном человека». Другой важной областью применения красителей стала флуоресцентная микроскопия, которая в варианте флуоресцентной наноскопии позволяет получить изображения с более высоким разрешением (~10–25 нм), чем обычная оптическая микроскопия, ограниченная дифракционным пределом (~300 нм). Так, с помощью

флуоресцентной наноскопии стало возможным получение изображений клеточных органелл на новом уровне детализации, что резко увеличило информативность метода.

Во всех случаях речь идет о процессах с участием фотовозбужденных состояний красителей, обладающих избытком электронно-колебательной энергии, на два порядка превышающим эквивалент тепловой энергии (величиной порядка  $kT \sim 0,026$  эВ). В зависимости от природы молекулы красителя, обуславливающей характер перераспределения избытка энергии, можно наблюдать обратимые (например, излучение или перенос энергии), либо необратимые (фотохимические реакции) процессы. Широкий спектр возбужденных состояний с различной энергией и мультиплетностью приводит к большому разнообразию фотопроцессов с их участием. Изучение и оптимизация этих процессов требует междисциплинарного подхода, состоящего в сочетании широкого набора экспериментальных методов – как чисто физических, в том числе спектральных и хроноскопических, так и химических (в частности, химической кинетики) с квантово-химическими расчетами.

Отличие данной монографии от известных работ по физической химии органических соединений состоит в оригинальной подаче материала. Если классические работы стартуют от явления, а затем демонстрируют его проявление на разных классах органических соединений, то здесь во главу угла ставится ряд гомологичных соединений – флуоресцеиновых красителей, отличающихся полнотой и качеством заполнения галогенами их молекулярной структуры. Заместители воздействуют на хромофорную группу за счет индуктивного и других эффектов, существенно меняя картину излучательных и безызлучательных процессов. Изучение закономерностей в гомологичном ряду красителей позволяет не только продемонстрировать многообразие возможных фотопроцессов, но и понять связь молекулярной структуры с фотофизическими и фотохимическими свойствами. При этом красители выступают и как объекты для демонстрации многообразия свойств, и как яркие примеры, в которых реализуются оптимальные для конкретных приложений характеристики. Это дает возможность оптимизации практического применения красителей в новых системах/методах, появление которых возможно в ближайшем будущем.

Монография структурирована таким образом, чтобы облегчить читателю с начальным уровнем знакомства с предметом путь к пониманию специализированного материала.

В первой главе вводятся основные понятия, формулы и определения. Она имеет самостоятельное значение как достаточно компактно изложенный материал по фотофизике и фотохимии красителей, подготавливающий читателя к восприятию последующих оригинальных глав. В библиографию к данной главе включены в основном классические работы по спектроскопии и фотохимии красителей. С их помощью можно значительно расширить свой кругозор в данной области.

Вторая глава знакомит читателя со спецификой флуоресцеиновых красителей и их фотофизическими свойствами, включающими геометрические характеристики молекул в основном и возбужденном состоянии, спектральные и кинетические параметры основных фотопроцессов. Придание физическим свойствам строгих количественных характеристик необходимо для выявления корреляционных связей и более полного извлечения информации в специализированных исследованиях. В библиографию этой и последующих глав наряду с другими современными работами включены оригинальные работы автора.

Третья глава содержит результаты экспериментальных исследований ионных равновесий флуоресцеиновых красителей в основном и возбужденном состояниях. Многоступенчатая диссоциация красителей, затрагивающая структуру хромофорных групп, приводит к ярким зависимостям спектральных характеристик красителей от pH окружения. Разница между двумя поведением ионных равновесий в основном и возбужденном состояниях приводит к интересному с фундаментальной и прикладной точек зрения явлению фотоиндуцированного переноса протона в возбужденном состоянии.

В четвертой главе, в отличие от предыдущих, рассматривается необратимый химический процесс – лазерное фотообесцвечивание красителей в полимерной матрице. Комбинацией экспериментальных и теоретических методов изучается механизм реакции и обсуждается возможность практического применения системы «краситель в полимерной матрице» в качестве голографического светочувствительного материала.



Фокус пятой главы направлен на использование флуоресцеиновых красителей в качестве инструмента исследования межмолекулярных взаимодействий с биомолекулами в явлениях биолюминесценции и связывания (адсорбции). В этой главе показано, как использование ряда красителей с плавно меняющимися свойствами решает проблему выявления природы этих взаимодействий.

В монографию вошел большой пласт оригинального материала, представленного автором в период с 1998 по 2014 г. в виде двух диссертационных работ, а также многочисленных более поздних публикаций в российских и международных научных журналах. Опубликованные результаты были получены в рамках как инициативных, так и поддержанных российскими и зарубежными научными фондами проектов. Автор благодарит своих коллег: проф. А. Г. Сизых, проф. А. Пенцкофера, к.х.н. Ф. Н. Томила, М. А. Герасимову, к.ф. - м.н. Н. В. Слюсаренко в соавторстве с которыми были не только получены, но и, что гораздо более ценно, осмыслены экспериментальные и теоретические результаты. Незаменимыми помощниками стали студенты и аспиранты Л. Л. Татарина, А. Тиаги, Е. А. Макарова, А. А. Гайсин, А. А. Глушков, М. В. Атаманова, Д. П. Суржикова, В. И. Третьякова, которых автор искренне благодарит за энтузиазм и трудолюбие. Многие из них и сейчас продолжают успешно заниматься научной работой в России и за рубежом. Неоценимую помощь в подготовке монографии оказал соавтор ряда последних публикаций, коллега по работе в Гельмгольцевском научном центре (Берлин) и Техническом университете Дрездена, д-р А. Ю. Плотников, ставший научным и техническим консультантом, а также первым читателем этого труда.

## ГЛАВА 1

---

# СИСТЕМАТИКА ФОТОПРОЦЕССОВ В КРАСИТЕЛЯХ

В первой главе мы очертим круг интересов такой междисциплинарной области науки, как фотоника, и рассмотрим наиболее типичные фото-процессы в красителях. Спектр реакций с участием возбужденных состояний красителей гораздо более разнообразен, чем процессов с участием их основного состояния. Возбужденные состояния имеют разную природу (мультиплетность), уровни возбуждения (запас электронно-колебательной энергии), что обуславливает высокую реакционную способность и сложный баланс между излучательными и безызлучательными переходами между ними. Различная скорость процессов может приводить как к одновременному и конкурентному, так и последовательному протеканию событий во временном диапазоне, простирающемся от милли- до фемтосекунд. Тем не менее именно реакции красителя в возбужденном состоянии представляют наибольший интерес для таких областей, как сенсорика, оптоинформатика, фотовольтаика и др.

### 1.1. Общие понятия.

#### Энергетическая схема красителя

Красители – это органические соединения разных классов, способные интенсивно поглощать и преобразовывать световую энергию в видимом, а также близлежащих ультрафиолетовом и инфракрасном спектральных диапазонах, что воспринимается человеческим зрением как эффект окраски [1]. Молекулы большинства красителей содержат планарную (или близкую к планарной) систему сопряженных двойных связей, включающих как ароматические (замкнутые, «кольцевые»), так и полиеновые («цепочные») фрагменты. Принадлежность красителя к тому или иному классу соединений определяется структурой молекулы, а именно топологией системы сопряженных двойных связей и нали-

чием гетероатомов. Для обозначения научной области, занимающейся исследованием процессов преобразования оптических сигналов (потоков фотонов) веществами, академиком А. Н. Терениным (и независимо от него французским физиком П. Огренем) в 1967 г. был введен термин «фотоника», который обозначает совокупность взаимосвязанных фотофизических и фотохимических процессов [2].

Поглощение веществом электромагнитного излучения в УФ и видимой областях спектра связано с переходом внешних (валентных) электронов молекул на разрыхляющие орбитали. В сопряженных системах происходит делокализация  $\pi$ -электронов, что приводит к повышению их подвижности и появлению интенсивных полос поглощения в видимой области спектра. В отдельных случаях определенные полосы поглощения можно отнести к переходам, которые локализованы в некоторых частях молекулы, но в целом поглощение электромагнитного излучения есть свойство системы ее связей в целом [3].

Уже к середине прошлого века были сформулированы основные закономерности, связанные с фотовозбужденными состояниями органических красителей [4]. М. Каша, Г. Н. Льюис экспериментально установили:

1) независимо от первоначального уровня возбуждения молекулы испускание происходит преимущественно из первого синглетного и/или триплетного состояний;

2) величина квантового выхода флуоресценции из первого синглетного состояния не зависит от того, какое высшее синглетное состояние было возбуждено, поскольку из высших возбужденных синглетных состояний происходит быстрая внутренняя конверсия;

3) при увеличении разности энергий между уровнями рассматриваемых состояний скорость безызлучательного перехода резко снижается.

При этом характер спектров испускания и поглощения органических красителей имеет ряд закономерностей: спектры поглощения представляют собой несимметричный сплошной контур шириной около 100 нм; спектр испускания всегда сдвинут по отношению к спектру поглощения в сторону длинных волн (стоксов сдвиг); спектральные кривые поглощения и испускания подчиняются правилу зеркальной симметрии (правило В. Л. Левшина) [2]. Если первые две закономерности выполняются строго, то последняя носит качественный характер: при

ее выполнении можно судить о том, насколько близки структуры колебательных уровней основного и возбужденного электронных состояний и выявить положение чисто электронного 0–0 перехода как спектральное расположение точки пересечения контуров.

Утвердившиеся в настоящее время в литературе представления о происхождении сплошных спектров красителей отводят особую роль процессам внутримолекулярной колебательной релаксации. Спектр сложной молекулы рассматривается как суперпозиция непрерывных спектральных линий, соответствующих франк-кондоновским переходам некоторого обобщенного колебания, дискретность энергетических уровней которого нарушена вследствие внутримолекулярных взаимодействий [5]. Таким образом, возможность перераспределения колебательной энергии внутри молекулы играет важную роль в формировании спектров. Соотношение константы скорости перераспределения колебательной энергии с величиной, обратной времени жизни возбужденного состояния, определяет параметр сложности молекулы. Так, «сложными» принято называть молекулы, у которых это соотношение значительно больше единицы. «Простые» молекулы характеризуются обратным соотношением этих величин, а «полусложные» занимают промежуточное положение. При этом красители с их большим числом атомов и наличием системы сопряженных двойных связей относятся, как правило, к типу сложных молекул.

Наглядные представления о фотопроцессах в сложных молекулах можно получить, используя диаграмму Яблонского [4, 6, 7]. В ней обычно отображены нижние синглетные и триплетные электронные уровни молекулы, а также совокупность переходов между ними, приводящих к перераспределению населенностей. Открытие лазеров, включение многоступенчатых и многофотонных процессов, а также прогресс в измерительной, главным образом, хроноскопической технике, привели к тому, что в настоящее время стала распространена расширенная версия этой энергетической схемы. В ее рамках в рассмотрение включают большее число возбужденных уровней и более широкий спектр внутримолекулярных процессов (рис. 1.1).

Для учета различных способов фотовозбуждения примем в рассмотрение систему синглетных (основной  $S_0$ , первый  $S_1$  и высший возбужденный  $S_n$ ) и триплетных (первый  $T_1$  и высший возбужденный  $T_n$ ) уровней. Каждый из них имеет свою колебательную подсистему,

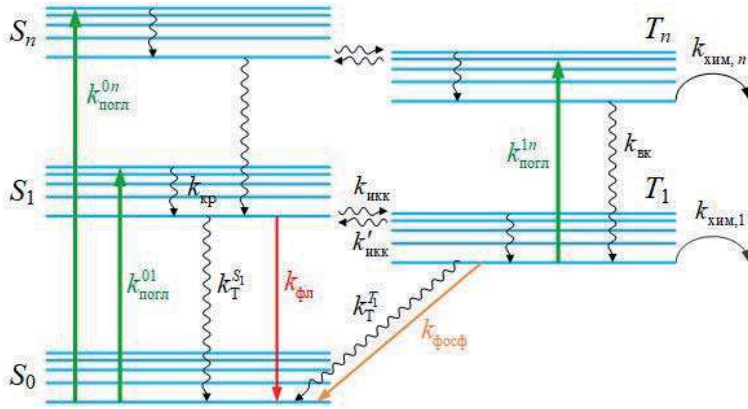


Рис. 1.1. Расширенная диаграмма Яблонского для сложной молекулы (см. пояснения в тексте)

поэтому в целом уровень характеризуется как электронно-колебательный (или вибронный). Подбирая условия возбуждения, можно реализовать один или сразу несколько режимов заселения энергетических уровней: однофотонное возбуждение в первое синглетное состояние (с константой скорости  $k_{\text{погл}}^{01}$ ), однофотонное возбуждение в высшее синглетное состояние ( $k_{\text{погл}}^{0n}$ ), двухступенчатое возбуждение, вторым этапом которого является переход из первого в высшее триплетное состояние ( $k_{\text{погл}}^{1n}$ ). Константа скорости таких переходов определяется произведением квантовой интенсивности света  $I_{\text{кв}}$  и сечения поглощения  $\sigma(\lambda)$  молекул вещества:

$$k_{\text{погл}}(\lambda) = I_{\text{кв}} \sigma(\lambda). \quad (1.1)$$

Это выражение содержит как характеристику возбуждающего света, так и поглощательную способность вещества на длине волны  $\lambda$ . Определить  $\sigma(\lambda)$ , зная пропускание  $T$  образца, его толщину  $l$  (в см), концентрацию  $N$  (в  $\text{см}^{-3}$ ) поглощающего вещества (если речь идет о растворе), можно, основываясь на законе Бугера – Ламберта – Бера:

$$T(\lambda) = e^{-\sigma(\lambda) N l}. \quad (1.2)$$

Сечение поглощения имеет размерность площади, которой в первом приближении можно придать определенный физический смысл.

Для ряда эффективно поглощающих красителей это величина порядка  $10^{-15}$  см<sup>2</sup>, что соответствует площади  $3 \times 3,5$  Å, близкой к размеру хромофора, состоящего из нескольких сопряженных ароматических колец.

Переходя к десятичному основанию в формуле (1.2), получаем зависимость пропускания от оптической плотности вещества  $D$ , которая в англоязычной литературе обозначается через  $A$  (*Absorbance*):

$$T(\lambda) = 10^{-D(\lambda)}. \quad (1.3)$$

Заселение возбужденных состояний красителя порождает множество процессов дезактивации (с соответствующими константами скоростей): внутренняя конверсия ( $k_{вк}$ ), флуоресценция ( $k_{фл}$ ) и фосфоресценция ( $k_{фосф}$ ), тушение нижнего возбужденного синглетного ( $k_T^{S_1}$ ) и триплетного ( $k_T^{T_1}$ ) состояний, прямая ( $k_{икк}$ ) и обратная ( $k'_{икк}$ ) интеркомбинационные конверсии, колебательная релаксация ( $k_{кр}$ ), фотохимические реакции с участием триплетных состояний различного уровня возбуждения ( $k_{хим 1}$ ,  $k_{хим n}$ ). В случае бимолекулярной химической реакции с избытком концентрации второго компонента процесс носит квазимономолекулярный характер и константа скорости процесса также имеет размерность с<sup>-1</sup>.

Межмолекулярные процессы с участием растворителя и возбужденных состояний красителя (перенос протона и электрона), резонансный безызлучательный перенос энергии электронного возбуждения на этой диаграмме не обозначены, однако они будут подробно рассмотрены в последующих главах. Различная природа и скорость протекания процессов формируют достаточно сложную картину динамики населенностей сложной молекулы, изучение которой требует сочетания экспериментальных методов и моделирования.

Экспериментально измеряемым параметром является *время жизни возбужденного (флуоресцентного) состояния*  $\tau$ . Измерение времени жизни флуоресцентного состояния происходит путем анализа временной зависимости интенсивности флуоресценции  $I$  после возбуждения коротким (в предельном случае имеющим вид  $\delta$ -функции) импульсом. Эта зависимость для случая одного хромофора имеет экспоненциальный от времени  $t$  характер:

$$I(t) = I(0) \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right). \quad (1.4)$$

Параметр  $\tau$  показывает характерное время, за которое интенсивность затухает в  $e$  раз. Измерение коротких времен жизни требует применения уникальных инструментов и учета функции возбуждения в регистрируемый сигнал испускания. Однако современный уровень техники позволяет измерять времена до нескольких пикосекунд. Время жизни флуоресцентного состояния имеет смысл величины, обратной константе скорости (или сумме констант), характеризующей вероятность дезактивации этого состояния. Например, время жизни флуоресцентного состояния  $S_1$  без учета обратной интеркомбинационной кон-версии

$$\tau = \frac{1}{k_{\text{фл}} + k_{\text{T}}^{S_1} + k_{\text{инк}}}. \quad (1.5)$$

Предельным значением времени жизни флуоресцентного состояния в отсутствие безызлучательных переходов является величина радиационного времени жизни  $\tau_{\text{рад}}$ . Радиационное время жизни можно рассчитать из уравнения Стриклера – Берга [8] на основании известного контура испускания  $I(\lambda)$  и сечения поглощения  $\sigma(\lambda)$ :

$$\tau_{\text{рад}} = \frac{n_{\text{погл}}}{8\pi c n_{\text{фл}}^3 \int_{S_0-S_1} \frac{\sigma(\lambda)}{\lambda} d\lambda} \frac{\int I(\lambda) \lambda^3 d\lambda}{\int I(\lambda) d\lambda}. \quad (1.6)$$

Здесь  $n_{\text{фл}}$  и  $n_{\text{погл}}$  – средние показатели преломления в полосе испускания и поглощения, соответственно,  $c$  – скорость света. Уравнение (1.6) – результат модификации классической теории дисперсии атомов для разрешенных молекулярных переходов типа  $S_1 \leftrightarrow S_0$ . Оно дает исключительно точное совпадение теоретически вычисленных и экспериментальных данных для интенсивных переходов [9].

Другим измеряемым параметром является *выход процесса* – безразмерная величина, равная отношению скорости данного процесса к скорости всех процессов дезактивации с участием этого состояния. Для излучательного процесса она называется *квантовым выходом*. Для прямого определения квантового выхода флуоресценции необходимо сравнить скорость поглощения возбуждающего света с полной интен-

сивностью флуоресценции при всех частотах и во всех направлениях. Для флуоресценции квантовый выход может быть определен как

$$\Phi_{\text{фл}} = \frac{k_{\text{фл}}}{k_{\text{фл}} + k_{\text{T}}^{S_1} + k_{\text{икк}}} \quad (1.7)$$

или

$$\Phi_{\text{фл}} = \frac{\tau}{\tau_{\text{рад}}}. \quad (1.8)$$

Легко видеть, что в отсутствие безызлучательной релаксации флуоресцентного уровня квантовый выход достигает своего максимального значения, равного единице. Прямой метод измерения  $\Phi_{\text{фл}}$  основан на сравнении интенсивности флуоресценции, испускаемой с передней поверхности образца, с интенсивностью возбуждающего света, рассеиваемого полностью рассеивающей матовой поверхностью. На практике часто используют относительный метод измерения  $\Phi_{\text{фл}}$ , в котором определяют квантовые выходы флуоресценции исследуемых соединений по отношению к известным [10].

Таким образом, совокупность констант скоростей процессов, время жизни и квантовый выход представляют собой взаимосвязанные величины, которые характеризуют любой (в том числе триплетный) уровень возбуждения.

Теперь рассмотрим более подробно внутримолекулярные процессы, не приводящие к изменению химической структуры красителя.

## 1.2. Излучательные фотофизические процессы

Основным излучательным процессом является *люминесценция*. По определению С. И. Вавилова, люминесценцией называют излучение, избыточное над тепловым, с длительностью, превышающей период световых колебаний [11]. В системах с эффективным заселением триплетных уровней в зависимости от времени послесвечения и спектрального диапазона люминесценция подразделяется на *флуоресценцию*, *фосфоресценцию* и *замедленную флуоресценцию*. В общем случае



*флуоресценцией* называют разрешенный по спину излучательный переход между двумя состояниями одинаковой мультиплетности. Константа скорости такого процесса достаточно высока и составляет  $10^7$ – $10^9$  с<sup>-1</sup>, а квантовый выход для ряда красителей может приближаться к единице.

*Фосфоресценция* соответствует электронному переходу с первого триплетного уровня, лежащего ниже соответствующего синглетного уровня, поэтому спектр фосфоресценции всегда сдвинут bathochromно относительно спектра флуоресценции. Вероятность такого перехода на 4–9 порядков ниже, чем флуоресценция, поэтому фосфоресцентный уровень называют метастабильным. Большое излучательное время жизни триплетных молекул делает весьма вероятным тушение фосфоресценции за счет межмолекулярных процессов. Это приводит к тому, что при комнатной температуре фосфоресценция растворов практически всегда отсутствует, в то время как флуоресценцию проявляют многие соединения. Только в очень вязких или замороженных растворах можно наблюдать фосфоресценцию [7, 11]. Но даже в этих случаях квантовый выход фосфоресценции, как правило, не превышает нескольких процентов.

*Замедленная флуоресценция* характеризуется спектром, совпадающим со спектром флуоресценции, и длительностью затухания, совпадающей с длительностью затухания фосфоресценции. Для испускания замедленной флуоресценции необходима тепловая активация триплетного состояния на один из более высоких колебательных уровней, после чего происходит обратная интеркомбинационная конверсия из триплетного в первое синглетное состояние. Наблюдение замедленной флуоресценции возможно при температурах, близких к комнатной, и ее интенсивность существенно увеличивается с ростом температуры. Одним из первых объектов, на которых была изучена термоактивированная замедленная флуоресценция, являлся краситель эозин (*Eosin*), поэтому такая замедленная флуоресценция получила название «Е-типа».

Важным параметром люминесценции является ее поляризация. Количественным критерием, определяющим эту характеристику, служит анизотропия  $r$ . В соответствии с обозначениями на рис. 1.2 она определяется следующей формулой:

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}}. \quad (1.9)$$

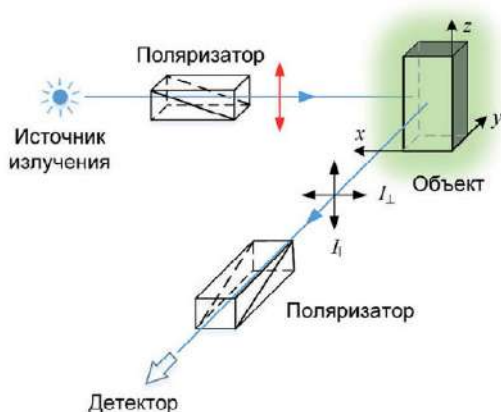


Рис. 1.2. Схема измерения поляризованной люминесценции

Для полностью поляризованного света ( $I_{\perp} = 0$ ) анизотропия приравнивается к единице, для естественного или неполяризованного излучения ( $I_{||} = I_{\perp}$ ) – нулю. Поляризационные измерения люминесценции могут быть использованы для оценки размеров флуорофора. Измерение анизотропии возможно произвести при стационарном и хроноскопическом режимах.

Соотношение между стационарной флуоресцентной анизотропией  $r$  и временем вращательной корреляции  $\phi$  дается уравнением Перрена:

$$\frac{r_0}{r} = 1 + \frac{\tau}{\phi}, \quad (1.10)$$

где  $r_0$  – предельное значение анизотропии без учета вращательной диффузии;  $\phi$  – время вращательной корреляции. Извлечение информации о гидродинамическом диаметре  $D$  (в приближении сферического ротатора) излучателя возможно, если известна вязкость раствора  $\eta$  и температура  $T$ :

$$\phi = \frac{\eta V}{kT} = \frac{\eta \pi D^3}{6kT}. \quad (1.11)$$

Время-разрешенные методы позволяют измерять затухание анизотропии  $r(t)$ . Для этого необходимо отдельно произвести измерение

затухания поляризованных компонент интенсивности с учетом чувствительности регистрирующей системы к вертикально и горизонтально поляризованному свету [10]. Проанализировать характер затухания анизотропии можно с помощью следующей формулы:

$$r(t) = \sum_i B_i \exp(-t/\tau_i), \quad (1.12)$$

где  $B_i$  – амплитуда  $i$ -го члена мультиэкспоненциального разложения  $r(t)$ , где каждый член суммы отвечает за отдельный флуорофор. Извлекаемая таким образом информация позволяет определить характеристики различных по размеру излучателей и соотношение их концентраций.

Таким образом, анизотропия люминесценции несет ценную информацию о вращательной диффузии молекул и внутримолекулярных процессах в возбужденном состоянии [7].

### 1.3. Колебательная релаксация, внутренняя и интеркомбинационная конверсии

Безызлучательные процессы, показанные на рис. 1.1 стрелками с волнистыми линиями, достаточно разнообразны. Если молекула оказалась в одном из возбужденных колебательных состояний, она стремительно (в течение  $10^{-12}$ – $10^{-13}$  с) сбросит эту избыточную колебательную энергию до термодинамически равновесного уровня через колебательную релаксацию («термализуется»), что приведет к повышению температуры системы.

Константа скорости интеркомбинационной или внутренней конверсии определяется следующим образом [4,12]:

$$k_{\text{икк}}, k_{\text{вк}} \sim \left| \langle \psi_1 | \hat{H} | \psi_2 \rangle \right|^2 \cdot \rho \cdot \sum_i \sum_j \left| \langle \theta_{1i} | \theta_{2j} \rangle \right|^2, \quad (1.13)$$

где первый множитель является электронным матричным элементом соответствующего безызлучательного перехода, построенном на операторе энергии возмущения  $\hat{H}$  и электронных волновых функциях ( $\psi_1, \psi_2$ ), комбинирующих в переходе состояний; второй множитель  $\rho$  – плотность конечных состояний 2, изоэнергетичных подуровням состояния 1.

Третий множитель – фактор Франка – Кондона. Суммирование проводится по всем населенным колебательным уровням  $i$  электронного состояния 1 и колебательным уровням  $j$  электронного состояния 2. Символы  $\theta_{1i}$ ,  $\theta_{2j}$  – колебательные волновые функции в состояниях 1 и 2. В качестве оператора возмущения может быть выбран оператор кинетической энергии ядер в случае внутренней конверсии или оператор спин-орбитального взаимодействия в случае интеркомбинационной конверсии. Величина электронного матричного элемента зависит от симметрии волновых функций ( $\psi_1$ ,  $\psi_2$ ). Типичная константа скорости процесса внутренней конверсии составляет  $10^{10}$ – $10^{12}$  с<sup>-1</sup>, интеркомбинационная конверсия имеет вероятность в  $10^2$ – $10^6$  раз меньше. Тем не менее именно этот процесс является основным каналом заселения *триплетных* уровней, поэтому рассмотрим теорию этого процесса более подробно.

Из всех релятивистских взаимодействий (спин-орбитального, спин-спинового, включая электрон-электронные и электронно-ядерные) наибольший интерес представляет спин-орбитальное. Оно обусловлено взаимодействием спинового магнитного момента с магнитным полем, возникающим при орбитальном движении электрона. Для многоэлектронного атома оператор энергии спин-орбитального взаимодействия записывается в виде [12]

$$\hat{H}_{\text{CO}} = \sum_{i=1}^n \zeta(r_i) (\mathbf{l}_i \mathbf{s}_i), \quad (1.14)$$

где  $\mathbf{l}_i$ ,  $\mathbf{s}_i$  – орбитальный и спиновый моменты электрона;  $\zeta(r_i) = (Ze^2/2m^2c^2)(1/r_i^3)$  – фактор спин-орбитального взаимодействия. Суммирование в (1.14) проводится по электронам рассматриваемой конфигурации ( $i = 1 \div n$ ). Фактор  $\zeta(r_i)$ , усредненный по радиальным волновым функциям  $R_{nl}(r)$  в состоянии  $nl$  ( $n$  – главное квантовое число,  $l$  – орбитальное квантовое число), называется *константой спин-орбитальной связи*:

$$\zeta_{nl} = \hbar^2 R'_{nl}(r) | \langle \xi \rangle | R_{nl}(r) \rangle = \frac{e\hbar^2}{2m^2c^2a_0^3} \frac{Z^4}{n^3(l+1)(l+1/2)l}. \quad (1.15)$$

Величина  $\zeta_{nl}$  сильно зависит от порядкового номера элемента  $Z$  и квантовых чисел  $n$  и  $l$ . В литературе зависимость эффективности спин-орбитального взаимодействия от  $Z$  получила название эффекта

тяжелого атома, хотя ее природа обусловлена исключительно кулоновской, а не гравитационной природой поля. Зависимость от  $n$  и  $l$  обусловлена эффектами экранирования и проникновения.

В сложных полях многоэлектронных атомов точная пропорциональность  $Z^4$  не выполняется [9]. При переходе к молекулам ситуация становится еще более сложной. Для упрощения учета влияния спин-орбитального взаимодействия на эффекты смешения состояний разной мультиплетности Мак-Клюром была предложена модель [13], в рамках которой движение электронов молекулы в поле центральных сил рассматривается в предположении, что все атомы молекулы пространственно совпадают, а угловые моменты электронов сохраняют свой атомный статус. В этом случае вклад каждого электрона в спин-орбитальное взаимодействие можно записать как

$$\hat{H}_{\text{CO}} = \frac{1}{2m^2c^2} \sum_{k=1}^N \sum_{i=1}^n r_{ik}^{-1} \frac{\partial V(r_{ik})}{\partial r_{ik}} (\mathbf{l}_i \cdot \mathbf{s}_i), \quad (1.16)$$

где суммирование выполняется по всем ядрам ( $k = 1 \div N$ ) и всем электронам ( $i = 1 \div n$ ). По сравнению с выражением (1.14) здесь добавлено суммирование по атомным ядрам в составе молекулы. Несмотря на предпринятые упрощения, модель Мак-Клора оказывается вполне применимой и для описания синглет-триплетного смешения состояний.

В многоатомных молекулах вероятности фотофизических процессов, связанных с влиянием спин-орбитального взаимодействия, пропорциональны значению суммы квадратов констант спин-орбитальной связи отдельных атомов в молекуле [9, 12]:

$$\sum \zeta^2 = \sum_{i=1}^N \zeta_i^2. \quad (1.17)$$

Энергия спин-орбитального взаимодействия в молекулах, содержащих тяжелые атомы, может быть высока. Это делает процесс интеркомбинационной конверсии весьма вероятным, более того, успешно конкурирующим с излучательным процессом.

## 1.4. Тушение нижних возбужденных уровней

В широком смысле под *тушением* понимают любые процессы дезактивации люминесцирующих состояний, являющиеся результатом взаимодействия возбужденных молекул с компонентами системы. Так, при увеличении температуры наступает *температурное тушение*, при увеличении концентрации – *концентрационное тушение*, при добавлении посторонних примесей – *тушение посторонними примесями*.

*Температурное тушение* характерно для всех люминесцирующих веществ. Однако у одних свечение прекращается уже при  $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$ , другие продолжают слабо светиться даже при  $+400\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Температурное тушение является внутримолекулярным процессом, связанным с изменением состояния самих исследуемых молекул. При увеличении температуры возрастают деформации молекулы, приводящие к росту безызлучательного размена энергии возбуждения. Вероятность таких деформаций во многом определяется жесткостью той среды, в которую помещены исследуемые молекулы. Поэтому в жидких средах температурное тушение выражено сильнее [7].

Тушение может быть связано также с образованием нефлуоресцирующих комплексов флуоресцирующих молекул с молекулами тушителя. Частным случаем является так называемое *концентрационное тушение*, которое связано с образованием нефлуоресцирующих димеров и более крупных ассоциатов молекул при высокой концентрации. В этом случае димеризация может сопровождаться деформацией электронного спектра поглощения молекул растворенного вещества. Концентрационное тушение является обратимым процессом – выход свечения полностью восстанавливается при разбавлении концентрированного раствора.

*Тушение посторонними примесями* определяется взаимной диффузией взаимодействующих молекул за время жизни их возбужденного состояния, происходящей вследствие броуновского движения. К числу наиболее активных тушителей люминесценции относятся тяжелые анионы и катионы  $\text{I}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{Cs}^+$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  (при этом облегчается  $S_1 \rightarrow T_1$ -переход); парамагнитные ионы и молекулы  $\text{O}_2$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ; нитроксильные радикалы; молекулы растворителя (наибольшим тушущим действием обладают полярные растворители, такие как вода) [11].

Величину диффузионно-контролируемой бимолекулярной константы тушения можно оценить, используя уравнение Смолуховского [7]:

$$k_T^{\text{диф}} = \frac{4\pi r_T N_A}{1000} (D_{\text{фл}} + D_T), \quad (1.18)$$

где  $r_T$  – сумма радиусов сталкивающихся молекул;  $N_A$  – число Авогадро;  $D_{\text{фл}}$  и  $D_T$  – коэффициенты диффузии флуорофора и тушителя соответственно. Уравнение описывает диффузионный поток молекул через поверхность сферы радиуса  $r_T$ .

Тушение люминесценции посторонними поглощающими веществами может осуществляется за счет резонансной передачи энергии возбуждения от люминесцирующего вещества (донора) к тушителю (акцептору). При этом перенос энергии будет тем значительнее, чем сильнее перекрываются между собой спектры люминесценции донора со спектрами поглощения акцептора и чем меньше донорно-акцепторное расстояние. Более подробно теория безызлучательного переноса энергии будет рассмотрена в следующем параграфе.

При всем многообразии процессов тушения их можно условно разделить на два типа: *статическое* и *динамическое тушение*. К первому типу относятся процессы, непосредственно воздействующие на основное состоянием молекулы (например образование нефлуоресцирующих комплексов). Другие способствуют дезактивации возбужденного состояния. Действие статического тушения никак не может сказаться на величине времени жизни возбужденного флуоресцентного состояния, поскольку в возбужденное состояние переходят лишь те молекулы, которые избежали этих воздействий. Напротив, в случае динамического тушения во всех взаимодействиях принимают участие возбужденные молекулы, поэтому при развитии тушения такого вида значение времени жизни должно существенно изменяться. Изменение времени жизни в условиях тушения являются надежным критерием, позволяющим однозначно установить природу тушения. В случае динамического тушения при экспоненциальном законе затухания свечения и экспоненциальном ходе тушения люминесценции выполняется важное соотношение между выходом флуоресценции и временем жизни флуоресцентного состояния:

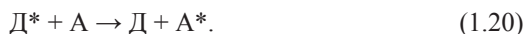
$$\frac{\Phi_{\text{фл}}^0}{\Phi_{\text{фл}}} = \frac{\tau^0}{\tau}, \quad (1.19)$$

где наличие индекса 0 указывает на отсутствии тушителя. В большинстве случаев это соотношение хорошо выполняется на практике. Еще одним методом разграничения динамического и статического тушения может служить тщательный анализ спектра поглощения флуорофора, поскольку образование комплекса в основном состоянии часто приводит к возмущению его спектра поглощения. Другой способ – это установление зависимости тушения флуоресценции от температуры и вязкости, поскольку оба этих фактора сильно влияют на коэффициенты диффузии молекул.

### 1.5. Безызлучательный перенос энергии электронного возбуждения

Молекула может релаксировать из фотовозбужденного в основное состояние путем безызлучательной передачи энергии другой (или точно такой же) молекуле, имеющей резонансные уровни энергии и расположенной на достаточном для реализации данного механизма расстоянии. Мы ограничимся рассмотрением переноса энергии по индуктивно-резонансному диполь-дипольному механизму. В англоязычной литературе для его обозначения используется аббревиатура FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*). Об обменных механизмах, играющих существенную роль при перекрывании электронных облаков молекул и приводящих, например, к триплет-триплетной аннигиляции и замедленной флуоресценции *T*-типа, можно более подробно прочитать в [7,11]. На рис. 1.3 представлена энергетическая схема с учетом переноса энергии от донора (Д) к акцептору (А), эффективность которого определяется бимолекулярной константой скорости  $k_{\text{н}}$ .

Безызлучательный перенос энергии электронного возбуждения между двумя молекулами можно представить в виде схемы:





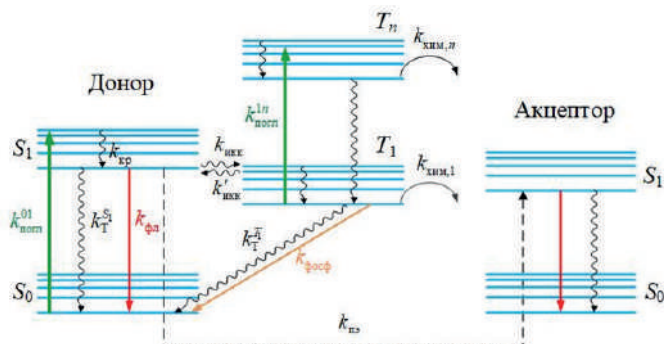


Рис. 1.3. Диаграмма Яблонского с учетом переноса энергии

В результате переноса энергии возбужденная молекула донора энергии  $D^*$  переходит в основное состояние  $D$ , а молекула акцептора переходит из невозбужденного состояния  $A$  в возбужденное  $A^*$ .

Весь процесс переноса энергии в конденсированной фазе можно разбить на ряд этапов: 1) поглощение молекулой донора энергии с переходом в возбужденное состояние; 2) колебательная релаксация в возбужденном состоянии до установления теплового равновесия со средой или внутренняя конверсия в устойчивое возбужденное электронное состояние; 3) передача возбуждения от донора к акцептору; 4а) колебательная релаксация донора до установления теплового равновесия с окружением; 4б) релаксация или внутренняя конверсия в молекуле акцептора; 5) излучение или безызлучательный переход в акцепторе.

Теорию безызлучательного переноса энергии разработал в 1947 г. Т. Фёрстер (Förster) [14, 15]. Полученное им выражение для константы скорости переноса энергии по диполь-дипольному механизму содержит экспериментально измеряемые величины:

$$k_{ПЭ} = \frac{9 \kappa^2 \Phi_{\text{фл}}^D}{128 \pi^2 n^4 \tau^D R^6} \int I_{\text{норм}}^D(\tilde{\nu}) \sigma^A(\tilde{\nu}) \tilde{\nu}^{-4} d\tilde{\nu}. \quad (1.21)$$

Здесь  $R$  – расстояние между молекулами донора и акцептора;  $\kappa$  – ориентационный фактор, для анизотропных сред обычно принимаемый  $2/3$ ;  $\sigma$  – сечение поглощения;  $I_{\text{норм}}$  – квантовая спектральная плотность из-

лучения люминесценции, нормированная на единичную площадь;  $n$  – показатель преломления;  $\tilde{\nu}$  – волновое число. Верхние индексы Д и А указывают на принадлежность параметров к донору и акцептору, соответственно. Формула (1.21) демонстрирует сильную зависимость вероятности переноса энергии от интеграла перекрытия спектров поглощения донора и люминесценции акцептора (резонансный фактор) и расстояния между донором и акцептором (концентрационный фактор). Вторая зависимость привела к широкому использованию этого метода для определения расстояния между донорами и акцепторами [7].

Для характеристики переноса энергии удобно ввести в рассмотрение критическое расстояние  $R_0$  (радиус Фёрстера), на котором константа скорости переноса энергии равна константе скорости спонтанной дезактивации донора в отсутствии акцептора:

$$k_{\text{ПЭ}}(R) = \frac{1}{\tau_{\text{Д}}} \left( \frac{R_0}{R} \right)^6. \quad (1.22)$$

Для типичных донорно-акцепторных пар значения  $R_0$  лежит в пределах 4–10 нм. Часто измеряют эффективность переноса  $E$ , которая определяется как отношение числа фотонов, переданных акцептору к общему числу фотонов, поглощенных донором (параметр, по смыслу близкий к квантовому выходу переноса энергии). Эффективность переноса может быть определена через отношение времени жизни затухания донора в присутствии акцептора ( $\tau^{\text{ДА}}$ ) и без него:

$$E = 1 - \frac{\tau}{\tau_{\text{Д}}}. \quad (1.23)$$

Эффективность переноса энергии можно непосредственно связать с расстоянием между донором и акцептором, что дает удобный выход на измерение расстояний, характерных для реализации переноса:

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + R^6}. \quad (1.24)$$

Таким образом, например, была сделана оценка толщины липидного бислоя, расстояния белок – холестерин, местоположения белковой

глобулы в мембране, конформационных изменений в мембранных белках и др. [11].

При достаточно большой вязкости растворителя можно считать, что за время жизни возбужденного состояния взаимные расстояния и ориентации не меняются. Теория затухания числа доноров  $n^D(t)$  для этого случая была разработана Аграновичем и Галаниным [16]:

$$n^D(t) \propto \exp\left(-\frac{t}{\tau^D} - 3,14R_0^3[A]\sqrt{\frac{t}{\tau^D}}\right). \quad (1.25)$$

Как видно из (1.25), при больших концентрациях акцептора  $[A]$  нарушается экспоненциальный от времени закон спада населенности флуоресцентного состояния. Экспериментальная проверка этой закономерности требует использования инструментов с высоким временным разрешением и необходимости учета вклада функции возбуждения в регистрируемый сигнал спада флуоресценции.

Наиболее распространенным методом исследования безызлучательного переноса энергии является метод тушения флуоресценции. В условиях постоянного облучения и отсутствия необратимых фотохимических реакций квантовый выход испускания молекулы в отсутствие молекул акцептора  $\Phi_{\text{фл}}$  дается выражением (1.7). В присутствии молекул акцептора с концентрацией  $[A]$  квантовый выход донора

$$\Phi_{\text{фл}} = \frac{k_{\text{фл}}}{k_{\text{фл}} + k_{\text{T}}^{S_1} + k_{\text{нкк}} + k_{\text{ПЭ}}[A]}. \quad (1.26)$$

Если рассмотреть долю возбужденных флуорофоров, дезактивирующихся путем излучения с учетом переноса энергии, по отношению к той же величине без его учета, то можно получить следующее соотношение:

$$\frac{\Phi_{\text{фл}}^0}{\Phi_{\text{фл}}} = 1 + k_{\text{ПЭ}}[A]. \quad (1.27)$$

В более общем случае, когда вместо константы переноса энергии подразумевается константа бимолекулярного тушения (например, диффузионно-контролируемая константа столкновительного туше-

ния (1.18)), это выражение носит название уравнение Штерна – Фольмера. График зависимости отношения квантовых выходов (или отношения интенсивностей флуоресценции) от концентрации акцептора представляет собой прямую линию с угловым коэффициентом  $\tau^D / k_{\text{пз}}$ . Величину  $\tau^D$  можно измерить в отсутствие молекул акцептора, а затем определить значение бимолекулярной константы тушения  $k_{\text{пз}}$ . Выполнение зависимости Штерна – Фольмера на опыте служит прямым доказательством существования конкуренции между процессами бимолекулярного тушения и мономолекулярной дезактивации молекулы Д. Линейность, наблюдаемая в координатах Штерна – Фольмера, еще не гарантирует наличие только динамического тушения: статическое концентрационное тушение, обусловленное образованием нефлуоресцирующих димеров, также дает прямую линию.

В случае если все же имеет место только динамическое тушение и выполняется (1.19), то имеет место еще одно важное соотношение между временем жизни донора в отсутствии и в присутствии акцептора:

$$\frac{\tau^D}{\tau^D_A} = 1 + k_{\text{пз}}[A]. \quad (1.28)$$

Весьма значимой проблемой, влияющей на регистрируемый сигнал интенсивности, является реабсорбция флуоресценции молекулами донора и акцептора. Этот процесс вызван перепоглощением веществом собственного излучения и не имеет прямого отношения к обсуждаемому явлению. Реабсорбция приводит к уменьшению амплитуды и искажению формы контура флуоресценции на его коротковолновом крыле, что особенно важно для анализа тушения донора. Это явление сопровождается регистрируемый сигнал интенсивности флуоресценции образцов с оптической плотностью на длине волны возбуждения более 0,1 и его влияние может быть уменьшено путем выбора геометрии измерения с передней стенки образца либо учтено математически [10].

Еще один способ изучения безызлучательного переноса энергии заключатся в исследовании разгорания сенсibilизированной люминесценции акцептора. Недостатком данного метода является необходимость наличия образца с известными характеристиками люминесценции для калибровки измерительной системы.

Известен фотохимический метод исследования безызлучательно-го переноса энергии, который заключается в определении уменьшения выхода фотореакции донора в присутствии акцептора [17]. Применение данного метода сопряжено с необходимостью моделирования физико-химической кинетики с целью получения количественных соотношений между вероятностью переноса энергии и выходом фотопродукта.

Таким образом, для изучения переноса энергии между разными молекулами используют несколько приемов, отличающихся по сложности применяемых инструментов, трудоемкости обработки результатов, наличию адекватных количественных моделей: 1) по снижению квантового выхода флуоресценции донора в присутствии акцептора; 2) по сокращению времени затухания флуоресценции донора; 3) по разгоранию сенсibilизированной флуоресценции акцептора; 4) по замедлению фотохимической реакции донора (по разгоранию сенсibilизированной фотохимической реакции акцептора).

## 1.6. Межмолекулярные взаимодействия

Молекулы красителя, находящиеся в окружении растворителя и других (в том числе точно таких же) молекул, попадают под влияние межмолекулярных сил. Сравнивая спектры веществ в газовой фазе и растворе, можно выявить ряд различий. Спектры испускания обычно сдвинуты bathochromно, поскольку электронно-возбужденное состояние сильнее стабилизируется растворителем, чем основное; происходит гиперхромный эффект от снятия запретов на некоторые переходы; наблюдается исчезновение тонкой колебательной структуры и изменение формы полос и т. д.

Помимо действия растворителя, изменения в энергетической структуре молекул могут быть вызваны взаимодействием растворенных молекул между собой. При высоких концентрациях красителей наблюдаются образование димеров и других ассоциатов. Закон Бугера – Ламберта – Беера выполняется только для разбавленных растворов, в которых такие взаимодействия исключены. Количественно охарактеризовать этот процесс можно, используя константу диссоциации димеров, которая соответствует концентрации молекул, при которой доли находящихся в равновесии димеров и мономеров уравниваются.

Красители (К) способны образовывать комплексы и с другими молекулами (К-Мол), присутствующими в растворе. В общем случае константа диссоциации такого комплекса определяется следующим образом:

$$K_{\text{дисс}} = \frac{[K] \cdot [ \quad ]}{[K\text{-Мол}]}. \quad (1.29)$$

В основе образования ассоциатов красителей, комплексов красителей с другими молекулами лежат различные механизмы. Классификация типов межмолекулярных взаимодействий будет дана в соответствии с работой [18].

Все взаимодействия удобно подразделить на универсальные и специфические. Первые действуют во всех случаях без исключения, определяются физическими параметрами молекул и после усреднения по конфигурациям и объему характеризуют коллективное влияние молекул окружения на свойства данной молекулы. Взаимодействия второго типа являются по своей природе индивидуальными, т. е. присущими данной паре частиц и носят уже квазихимический, обменный характер. Они отличаются высокой избирательностью по отношению к свойствам молекул и приводят фактически к образованию более или менее сильной связи между ними.

Подразделение межмолекулярных взаимодействий на физические, объемные, дальнodelствующие и универсальные, с одной стороны, и химические, локальные, короткодействующие и специфические, с другой, является произвольным, поскольку, строго говоря, в основе тех и других лежат одни и те же электрические силы взаимодействия электронов и ядер. К первой группе отнесем вандерваальсовы взаимодействия, отличительными особенностями которых является их приближенная аддитивность и отсутствие выраженной направленности. Это ориентационные, индукционные и дисперсионные силы притяжения, а также силы отталкивания, обусловленные взаимной непроницаемостью молекул. Ко второй группе – все виды парных взаимодействий, имеющие донорно-акцепторную природу и обладающие всеми основными атрибутами химической связи – насыщенностью и явной направленностью (комплексобразование, водородная связь).

Часто водородную связь рассматривают как электростатическое взаимодействие, усиленное небольшим размером водорода, которое разрешает близость взаимодействующих диполей. Тогда об этом говорят как о разновидности донорно-акцепторной связи, невалентном взаимодействии между атомом водорода H, ковалентно связанным с атомом A группы A-H молекулы RA-H и электроотрицательным атомом B другой молекулы (или функциональной группы той же молекулы) BR'. Результатом таких взаимодействий являются комплексы различной степени стабильности, в которых атом водорода выступает в роли «моста», связывающего фрагменты RA и BR'.

Особое место, особенно у органических соединений в водных растворах, могут играть гидрофобные взаимодействия между неполярными частицами (молекулами, фрагментами сложных молекул) в воде. Причина гидрофобного взаимодействия – большая энергия водородной связи между молекулами воды, превосходящая энергию их взаимодействия с неполярными частицами. Термодинамическая невыгодность контакта воды с неполярными веществами (рассматриваемая как гидрофобность) и предопределяет сильное притяжение молекул друг к другу. Мерой гидрофобности является так называемый коэффициент распределения, показывающий отношение концентраций в октанольной фазе (гидрофобной) к концентрации в водной фазе двухфазной системы.

Различные виды взаимодействий имеют величины энергий, существенно контрастирующие между собой: энергия химических связей (ковалентных) – 200–800 кДж/моль; энергия гидрофобных взаимодействий – 20–80 кДж/моль; энергия межмолекулярного переноса заряда – 4–40 кДж/моль; межмолекулярная водородная связь – 15–40 кДж/моль; вандерваальсовы взаимодействия (постоянный диполь-постоянный диполь, мгновенный диполь-наведенный диполь, постоянный диполь-наведенный диполь) – 8–20 кДж/моль.

Как правило, в изучаемой системе одновременно разворачивается сразу несколько типов взаимодействий, разграничение которых является весьма непростой задачей. Для этого систему целенаправленно возмущают путем изменения полярности растворителя (так называемый метод спектральных сдвигов [19]), концентрации ионов в растворе, экранирующих заряд. Важная информация для определения механизма межмолекулярного взаимодействия может быть получена

с помощью квантово-химических расчетов и методов молекулярной динамики, в рамках термодинамического подхода, с помощью методов ИК-спектроскопии и т. д.

## 1.7. Фотоиндуцированный перенос протона

В подходящих растворителях кислотные группы молекул красителей (например, карбоксильная или гидроксильная) подвергаются диссоциации. В результате образуется сольватированный ион водорода, а нейтральная молекула красителя превращается в анион. Обозначив через МН молекулу красителя, эту реакцию можно изобразить в следующем виде:



Константа диссоциации выражается следующей формулой:

$$K_a = \frac{[\text{М}^-][\text{H}^+]}{[\text{МН}]}. \quad (1.31)$$

Для многоосновных кислот, диссоциация которых проходит в несколько стадий, оперируют отдельными константами для каждой стадии диссоциации. Равновесные концентрации диссоциированных и исходных форм можно определить с помощью уравнения Хендерсона – Хассельбаха, описывающего соотношение между рН и  $pK_a$ :

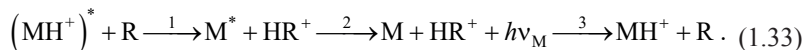
$$\text{pH} = pK_a + \log_{10} \left( \frac{[\text{М}]}{[\text{H}^+]} \right). \quad (1.32)$$

В возбужденном электронном состоянии молекула ( $\text{М}^*$ ) меняет свои свойства: геометрию и распределение электронной плотности. Это может привести, в частности, к изменению ее кислотно-основных свойств. В этом случае весьма вероятен фотоиндуцированный перенос протона с участием молекул ближайшего окружения (растворителя). Системы с переносом протона в возбужденном состоянии (в англоязычной литературе этот процесс известен как ESPT – *Excited State Proton*



*Transfer*) легко распознать по установившимся спектрам: оптическая плотность, как правило, соответствует исходному хромофору, а флуоресценция – продукту реакции диссоциации. Этот процесс протекает обычно гораздо быстрее, чем излучательный. Опубликованные значения времен лежат в диапазоне от долей пикосекунд до наносекунд [20, 21], и существенно зависят не только от самой молекулы, но и от ее окружения. Часто продукт диссоциации и исходная молекула имеют разное время жизни флуоресценции.

Фотоотдача возбужденной молекулой  $MH^+$  протона  $H^+$  основанию  $R$  (1), испускание флуоресценции молекулой  $M$  (2) и присоединение протона от кислоты  $HR$  невозбужденной молекулой (3) могут быть проиллюстрированы в рамках следующей схемы:



Фотоиндуцированное присоединение  $H^+$  (1), испускание молекулой  $MH^+$  кванта флуоресценции (2) и отдача протона молекулой  $MH^+$  (3) в аналогичных обозначениях выглядит следующим образом:



Если молекула поглощает при большей частоте, чем ее депротонированная форма, то при возбуждении она окажется на более высоком энергетическом уровне. После этого она будет стремиться перейти в более выгодное по энергии депротонированное состояние. Другими словами, вещество станет более сильной кислотой (1.33). Если молекула поглощает на большей частоте, чем ее протонированная форма, то при возбуждении она будет становиться более сильным основанием (1.34). Донором (акцептором) протона в этом процессе выступает молекула растворителя. Фотоиндуцированный перенос протона приводит к тому, что поглощает молекула одной протолитической формы, а испускает молекула другой. Примеры таких систем хорошо известны, одной из них является зеленый флуоресцирующий белок (GFP). По отношению к основному состоянию фотоиндуцированный перенос протона – это полностью обратимый процесс и при рассмотрении возбужденного состояния его необходимо учитывать в качестве конкурентного испуска-

нию процесса. Существует несколько основных взаимодополняющих способов изучения переноса протона в возбужденном состоянии: с помощью цикла Ферстера, флуоресцентного титрования, измерения времени жизни флуоресцентного состояния.

**Цикл Фёрстера.** Предложенная выше связь между сдвигом частоты 0–0 перехода, сопровождающем протонирование ( $\nu_{\text{MH}^+} - \nu_{\text{M}}$ ), и разницей показателей константы диссоциации  $\Delta pK_a$  между ее величиной в основном  $pK_a$  и возбужденном  $pK_a^*$  состояниях без учета незначительных энтропийных эффектов формализуется в цикл Фёрстера (рис. 1.4) [22]:

$$\Delta pK_a = pK_a - pK_a^* = h \frac{\nu_{\text{MH}^+} - \nu_{\text{M}}}{2,3kT}, \quad (1.35)$$

где  $h$  – постоянная Планка;  $k$  – постоянная Больцмана;  $T$  – абсолютная температура. Это выражение вытекает из соотношения между изменением энтальпии при протонировании (депротонировании) в основном ( $\Delta H$ ) и возбужденном состояниях ( $\Delta H^*$ ).

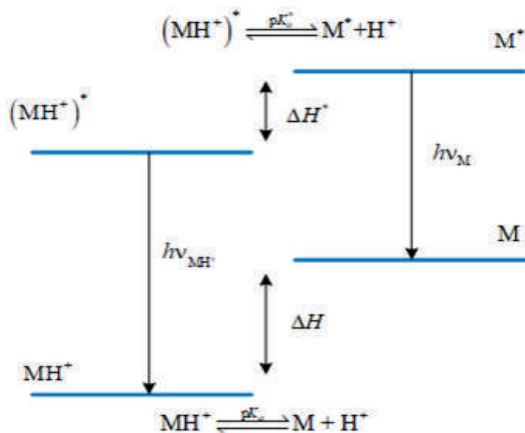


Рис. 1.4. Диаграмма, иллюстрирующая цикл Фёрстера для положительной разницы  $\Delta pK_a$

Как следует из (1.35), для того, чтобы выполнить расчет для конкретной молекулы, необходимо знать  $pK_a$  в основном состоянии и меру разности энергий между электронными уровнями основного и возбуж-

денного состояния протонированной и депротонированной форм. Для определения  $pK_a$  основного состояния используются стандартные методы потенциометрического титрования и/или методы абсорбционной спектроскопии.

Определить константу диссоциации в возбужденном состоянии несколько сложнее из-за проблемы нахождения энергии 0-0 переходов. К сожалению, для большинства замещенных ароматических соединений в растворе спектры поглощения и излучения характеризуются широкими, бесструктурными полосами, и лучшее, что можно сделать для нахождения частоты 0-0 перехода, это найти их точку пересечения в «зеркальных координатах» [23]. Даже если не получается определить точное значение  $pK_a^*$ , с помощью цикла Фёрстера удастся найти направление изменения показателя константы диссоциации при возбуждении, что является важной характеристикой. Ее величина может принимать как положительные, так и отрицательные значения в зависимости от типа молекулы и функциональных групп, участвующих в диссоциации [22]. Формулу (1.35) можно использовать для оценки константы диссоциации как возбужденных синглетных, так и триплетных уровней.

*Флуоресцентное титрование.* Значение  $pK_a^*$ , рассчитанное по циклу Фёрстера, позволяет оценить величину диапазона кислотности, в котором ожидается фотоиндуцированный перенос протона. Однако это еще не гарантирует, что фотоиндуцированный перенос протона кинетически реализуем (наиболее вероятен по сравнению с другими конкурирующими процессами в возбужденном состоянии). Стационарные спектры флуоресценции могут дать дополнительную информацию о возбужденном синглетном уровне. Для этого необходимо измерить спектры испускания протонированной и депротонированной форм при различных значениях pH. Точка перегиба кривых зависимости интенсивности флуоресценции от кислотности дает первое приближение к значению  $pK_a^*$ . Использование этого метода предполагает, что равновесие между протонированной и депротонированной формами успевает установиться за время жизни флуоресцентного состояния и что времена жизни флуоресценции M и  $MH^+$  равны. Последнее предположение далеко не всегда выполняется на практике, например, если только одна из форм является флуоресцентной. Кроме того, достаточно проблематичным является выявление индивидуальных контуров в ситуации

многоступенчатой диссоциации молекул и сильно перекрывающихся контуров.

*Измерения времени жизни флуоресцентного состояния.* С помощью прямого измерения флуоресцентного времени жизни протонированной  $\tau_{\text{МН}^+}$  и депротонированной  $\tau_{\text{М}}$  форм можно более точно рассчитать константу диссоциации в возбужденном состоянии. При условии, что за время жизни возбужденного состояния устанавливается равновесие, показатель константы диссоциации определяется как

$$\text{p}K_a^* = \text{pH} - \log_{10} \frac{\tau_{\text{М}}}{\tau_{\text{МН}^+}}, \quad (1.36)$$

где  $\text{pH}$  – кислотность, при которой наблюдается точка перегиба кривых интенсивности флуоресценции от кислотности (см. выше). Если значение флуоресцентного времени жизни неизвестно, но определен квантовый выход флуоресценции и радиационное время жизни, то недостающий параметр можно найти с помощью соотношения (1.8).

Перенос протона влияет на саму кинетику затухания флуоресценции. Об его протекании можно судить, в частности, по кинетике спада флуоресценции, которая носит более сложный характер, чем описанная уравнением (1.5). Так, для случая обратимой диссоциации молекул было получено следующее выражение кинетики спада интенсивности флуоресценции [24]:

$$I^{\text{МН}^+}(t) \sim t^{-3/2} \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau_{\text{МН}^+}}\right). \quad (1.37)$$

Оно отличается от простой экспоненциальной временной зависимости с характерным временем затухания флуоресценции на множитель  $t^{-3/2}$ , учитывающий диффузионную природу процесса фотоиндуцированного переноса протона и играющий существенную роль при анализе «длинновременного хвоста» этой зависимости.

Фотоиндуцированный перенос протона среди рассмотренных процессов в возбужденном состоянии занимает особое место. Химический по своей природе, он тем не менее вызывает обратимые изменения в структуре молекулы и представляет собой дополнительный канал эффективной дезактивации возбужденного состояния.

## 1.8. Фотоиндуцированные реакции, приводящие к изменению химической структуры красителя

Перейдем к рассмотрению фотопроцессов, приводящих к необратимому изменению химической структуры молекулы. В случае красителей такие изменения часто приводят к обесцвечиванию. Спектр фотохимических реакций достаточно широк [2]. Фотоокисление и фотовосстановление красителя с участием молекул X, Y протекает по следующей схеме:



Образовавшийся молекулярный остаток обычно неустойчив, довольно быстро вступает в другие реакции, носящие темновой характер [2] и протекающие необратимо.

Другие реакции – это фотолиз с образованием органических радикалов, *цис/транс*-фотоизомеризация, фотоприсоединение, фотосенсибирированная диссоциация и т. д. Все они достаточно специфичны по отношению к различным классам красителей, их окружению и внешним условиям. Выделим несколько положений, носящих общий характер [2, 3]:

- Длительность сохранения в молекуле электронно-колебательного возбуждения в триплетном состоянии и состояние валентной насыщенности увеличивает вероятность протекания фотохимической реакции. Это приводит к чрезвычайной реакционной способности триплетных состояний, что обуславливает необходимость учета последних в химических реакциях, в том числе связанных с переносом протона.

- Важными характеристиками реакций служат выход и константа скорости этой реакции. В зависимости от механизма реакции ее кинетика может иметь мономолекулярный, бимолекулярный и т. д. характер. Рассмотрение кинетических параметров позволяет описать динамику заселенности уровней молекул красителя и определить роль возбужденных состояний красителя в реакциях с их участием.

- Спектральные методы исследования (как абсорбционные, так и эмиссионные) являются важным инструментом исследования ста-

бильных и короткоживущих продуктов фотохимической реакции и ее кинетики.

Практический интерес к изучению фотообесцвечивания красителей сосредоточен в области физики лазеров, в конфокальной микроскопии, иммунологическом анализе, в технологии создания регистрирующих сред для оптической записи информации, аккумуляирования солнечной энергии.

## Литература

1. Степанов Б. И. Введение в химию и технологию органических красителей. – М.: Химия, 1984. – 592 с.
2. Теренин А. Н. Фотоника молекул красителей. – Л.: Наука, 1976. – 616 с.
3. Введение в фотохимию органических соединений / под ред. проф. Г.О. Беккера. – Л.: Химия, 1976. – 384 с.
4. Барлтроп Д., Койл. Д. Возбужденные состояния в органической химии. – М.: Мир, 1978. – 448 с.
5. Непорент Б.С., Степанов Б.И. Колебательная энергия и люминесценция сложных молекул // УФН. – 1951. – Т. 43. – С. 380–425.
6. Valeur B., Berberan-Santos M.N. Molecular fluorescence: principles and applications. – Weinheim: Wiley-VCH Verlag, 2012. – 569 p.
7. Лакович Дж. Основы флуоресцентной спектроскопии. – М.: Мир, 1986. – 496 с.
8. Strickler S.J., Berg R.A. Relationship between absorption intensity and fluorescence lifetime of molecules // The Journal of Chemical Physics. – 1962. – Vol. 37, № 4. – P. 814–822.
9. Мак-Глинн С., Адзуми Т., Киносита. М. Молекулярная спектроскопия триплетного состояния. – М.: Мир, 1972. – 448 с.
10. Слюсарева Е. А., Герасимова М. А., Слюсаренко. Н. В. Оптическая спектроскопия: сложные молекулы: учеб. пособие. – Красноярск: Сиб. федер. ун-т, 2018. – 116 с.
11. Владимиров Ю. А., Потапенко А. Я. Физико-химические основы фотобиологических процессов. – М.: Высш. шк., 1989. – 199 с.

12. Медведев Э. С., Ошеров. В. И. Теория безызлучательных переходов в многоатомных молекулах. – М.: Наука, 1983. – 280 с
13. McClure D. S. Triplet-singlet transitions in organic molecules. Lifetime measurements of the triplet state // *Journal of Chemical Physics*. – 1949. – Vol. 17, № 10. – P. 905–913.
14. Förster Th. Zwischenmolekulare energiewanderung und fluoreszenz // *Ann.Phys.* – 1948. – Vol. 2. – P. 55–75.
15. Безызлучательный перенос энергии электронного возбуждения / В. Л. Ермолаев, Е. Н. Бодунов, Е. Б. Свешникова, Т. А. Шахвердов. – Л.: Наука, 1977. – 312 с.
16. Агранович В. М., Галанин. М. Д. Перенос энергии электронного возбуждения в конденсированных средах. – М.: Наука, 1978. – 384 с.
17. Кронгауз В. А., Васильев И. Н. Исследование процессов передачи энергии методами люминесценции и радиационной химии // *Кинетика и катализ*. – 1964. – Т. 4, № 1. – С. 67–70.
18. Бахшиев Н. Г. Спектроскопия межмолекулярных взаимодействий. – Л.: Наука, 1972. – 265 с.
19. Solvent effect on the ground and excited state dipole moments of fluorescein / B. Acemioğlu, M. Aric, H. Efeoglu [et al.] // *J. of Molec. Struct.* – 2001. – Vol. 548. – P. 165–171.
20. Excited-state proton transfer and formation of the excited tautomer of 3-hydroxypyridine-dipicolinium cyanine dye / O. Green, R. Simkovitch, LP da Silva [et al.] // *J. of Phys. Chem. A*. – 2016. – Vol. 120. – P. 6184 – 6199.
21. Proton-transfer reaction dynamics within the human serum albumin protein / B. Cohen, CM. Alvarez, NA. Carmona [et al.] // *J. of Phys. Chem. B*. – 2011. – Vol. 115. – P. 7637–7647.
22. Acid-base properties of electronically excited states of organic molecules, in *Advances in Physical Organic Chemistry* / J. F. Ireland, P.A.H. Wyatt; eds. by V. Gold. – Academic Press, 1976. – P. 131–221.
23. Мейстер Т. Г. Электронные спектры многоатомных молекул. – Л.: Изд-во ЛГУ, 1969. – 208 с.
24. Pines E., Huppert D., Agmon N. Geminate recombination in excited state proton transfer reaction – numerical solution of the debye-smoluchowski equation with backreaction and comparison with experimental results // *J. of Chemical Physics*. – 1988. – Vol. 88. – P. 5620–5630.

## ГЛАВА 2

---

### **ФЛУОРЕСЦЕИНОВЫЕ КРАСИТЕЛИ: ОБРАТИМЫЕ ПРОЦЕССЫ С УЧАСТИЕМ ВОЗБУЖДЕННЫХ СОСТОЯНИЙ**

Во второй главе флуоресцеиновые красители будут охарактеризованы с точки зрения конформационных особенностей их химического строения и спектральных свойств (положения и формы спектров поглощения и испускания, времена жизни возбужденных состояний разной мультиплетности, константы скоростей излучательных и безызлучательных процессов, их квантовые выходы) в метаноле и двух биополимерных матрицах. Рассматриваемые процессы включают события, не связанные с необратимой химической модификацией красителей. Среди эффектов, влияющих на изучаемые свойства красителей, можно выделить следующие: межмолекулярные взаимодействия с растворителем, концентрационные эффекты, связанные с агрегацией и безызлучательным переносом энергии, внутримолекулярное спин-орбитальное взаимодействие. В целом спектральные свойства изменяются постепенно по мере галогензамещения в ряду флуоресцеин – бенгальский розовый. Галогензамещение вызывает изменение пространственной и зарядовой структуры молекул, изменение эффективности смешивания состояний разной мультиплетности. Совокупное рассмотрение ряда красителей с похожей химической структурой, но с разными заместителями-галогенами позволяет наиболее детально рассмотреть механизмы происходящих фотоиндуцированных процессов.

#### **2.1. Химическое строение и электронные спектры**

Флуоресцеиновые красители (наряду с родаминовыми) входят в широкий класс ксантеновых красителей, получивших свое название от основного структурного элемента – ксантенового трицикла. Основатель красителей этого ряда – флуоресцеин – был синтезирован около 150 лет



назад [1]. Несколько позже были синтезированы его галогензамещенные гомологи (рис. 2.1) – эозин (2', 4', 5', 7'-тетрабромфлуоресцеин), эритрозин (2', 4', 5', 7'-тетрайодфлуоресцеин), бенгальский розовый (4, 5, 6, 7-тетрахлор-2', 4', 5', 7'-тетрайодфлуоресцеин), которые так же, как и флуоресцеин, имеют водорастворимые солевые формы. За некоторыми солями красителей в зависимости от типа противоиона закрепились устоявшиеся названия. Так, динатриевая соль флуоресцеина известна как уранин, динатриевая соль эозина – как эозин Y, дикалиевая соль эозина – эозин K и т. д. Кроме перечисленных галогензамещенных флуоресцеинов, существует ряд других синтезированных красителей (2', 7'-дихлорфлуоресцеин, 4', 5'-дибромфлуоресцеин, тетрабромдихлор-флуоресцеин и др.) с еще более плавным изменением числа замещающих галогенов, однако не все из них растворяются в воде. Кроме того, существует (и продолжает расти) список красителей, синтезированных на основе флуоресцеина и не имеющих в своем составе галогенов. Они отличаются наличием функциональных групп, позволяющих либо специфически связываться с биомолекулами (например флуоресцеин изотиоцианат), сохраняя спектральные свойства

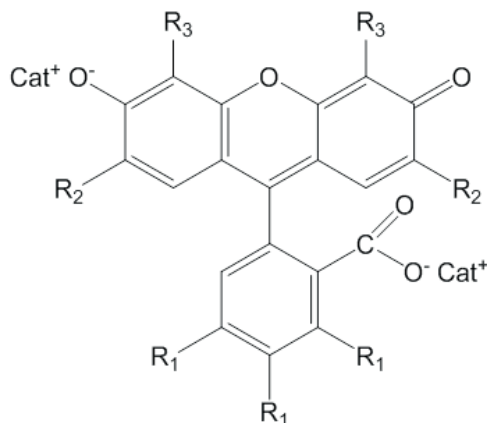


Рис. 2.1. Схема молекулярной структуры флуоресцеиновых красителей: флуоресцеин ( $R_1 = R_2 = R_3 = \text{H}$ ; Cat = Na); 4,5-дибромфлуоресцеин ( $R_1 = R_2 = \text{H}$ ;  $R_3 = \text{Br}$ ; Cat = H); эозин ( $R_1 = \text{H}$ ;  $R_2 = R_3 = \text{Br}$ ; Cat = Na, K); эритрозин ( $R_1 = \text{H}$ ;  $R_2 = R_3 = \text{I}$ ; Cat = Na); бенгальский розовый ( $R_1 = \text{Cl}$ ;  $R_2 = R_3 = \text{I}$ ; Cat = Na)

флуоресцеина, либо иметь физико-химические свойства, отличные от исходного красителя. Наше внимание в большей степени будет направлено на изучение процессов с участием возбужденных состояний галогензамещенных флуоресцеинов.

Флуоресцеиновые красители имеют яркую и довольно самобытную историю своего применения в физике, химии и биологии благодаря низкой токсичности, достаточно выраженным оптико-спектральным свойствам и способности растворяться в воде. Флуоресцеин еще более ста лет назад был успешно использован в качестве трейсера для доказательства существования общей водной системы рек Рейн и Дунай [1]. Более позднее применение красителей связано с созданием активных сред перестраиваемых лазеров [2]. В последние годы интерес сместился в область флуоресцентного маркирования и зондирования благодаря высоким значениям сечения поглощения, квантового выхода флуоресценции и возможности химической конъюгации флуоресцеина с биомолекулами [3]. Кроме того, флуоресцеин находит применение как стандарт в методике измерения квантового выхода флуоресцирующих соединений [4]. Гомологи флуоресцеина также используются в качестве внешних флуоресцентных и фосфоресцентных меток для детектирования растворенного кислорода, изучения функциональных свойств белков и т. д. [5,6]. Известно применение флуоресцеиновых красителей в полимерной матрице в качестве регистрирующих сред для оптической записи информации [7].

Дианионны флуоресцеиновых красителей, получаемые из солевых форм в нейтральных и щелочных растворителях, имеют интенсивные несимметричные полосы поглощения в видимой области спектра, которые относятся к первому синглет-синглетному переходу. Ряд менее интенсивных полос в УФ-области обусловлены переходом в более высоковозбужденные разрешенные по спине состояния (рис. 2.2). Галогензамещение в структуре красителей вызывает красное смещение длинноволновой полосы поглощения.

Рассматриваемые красители в жидких растворителях проявляют способность к агрегации с образованием димеров, тримеров и т. д. Тенденция к повышению эффективности агрегации увеличивается по мере галогензамещения. Величины констант димеризации в воде составляют около  $5 \text{ M}^{-1}$  для флуоресцеина,  $110 \text{ M}^{-1}$  для эозина,  $140 \text{ M}^{-1}$  для эритрозина,

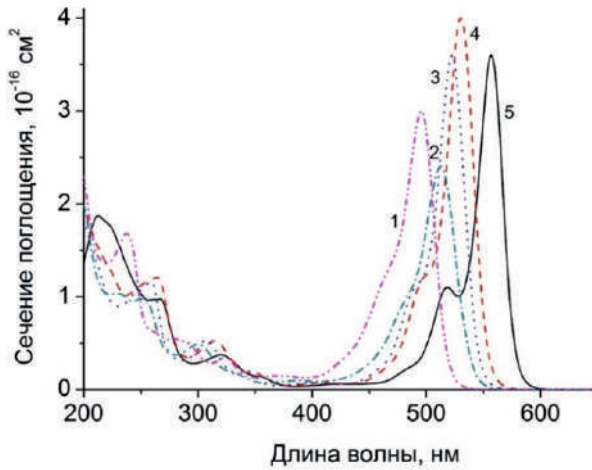


Рис. 2.2. Спектры поглощения красителей в основном метаноле: 1 – флуоресцеин; 2 – дибромфлуоресцеин; 3 – эозин Y; 4 – эритрозин В; 5 – бенгальский розовый

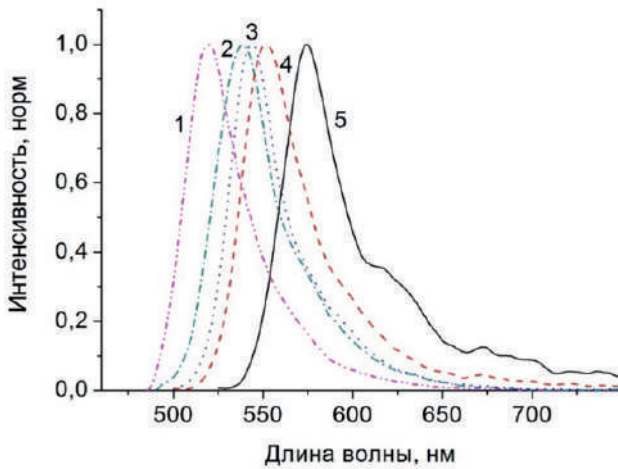


Рис. 2.3. Спектры флуоресценции красителей в основном метаноле: 1 – флуоресцеин; 2 – дибромфлуоресцеин; 3 – эозин Y; 4 – эритрозин В; 5 – бенгальский розовый

250 М<sup>-1</sup> для бенгальского розового [8]. В большинстве случаев механизм агрегации имеет сложную природу, включающую как образование водородных связей (например у флуоресцеина), так и гидрофобные взаимодействия, обусловленные наличием сильно поляризованных галогенов. Наличие агрегатов приводит к существенному изменению всей картины фотопроцессов: изменяются спектры поглощения и вероятности безызлучательных переходов, происходит тушение флуоресценции. Чтобы избежать эффектов, осложняющих картину фотопроцессов в водных и спиртовых растворах красителей, будем рассматривать результаты, полученные с использованием разбавленных растворов, в которых подобные процессы пренебрежимо малы.

Спектры испускания флуоресцеиновых красителей так же, как и спектры поглощения, представляют собой несимметричные контуры, рис. 2.3. Галогензамещение в составе структуры красителей существенно влияет на спектры испускания, приводя к красному смещению, уменьшению интенсивности и стоксова сдвига, изменению формы контуров. Разберем более подробно эти эффекты с точки зрения конформации молекул и развития спин-орбитального взаимодействия.

## **2.2. Конформация дианионов флуоресцеиновых красителей в основном и возбужденном синглетном состояниях**

Экспериментальное определение конформации сложных органических молекул в растворе чрезвычайно сложно, поэтому для таких задач привлекают расчетные методы молекулярной механики и квантовой химии. Особенности структуры дианионов флуоресцеиновых красителей (перераспределение зарядов, изменение длин связей, валентных углов), связанные с галогензамещением, переходом из основного состояния в возбужденное и влиянием растворителя (метанола) были выполнены методом функционала плотности B3LYP с использованием модели поляризованного континуума PCM [9]. Результаты расчетов показали, что молекулы красителей в основном состоянии могут быть представлены в виде двух пространственных конформеров. Наиболее выгодна по энергии геометрия для первого конформера (рис. 2.4) – расположе-

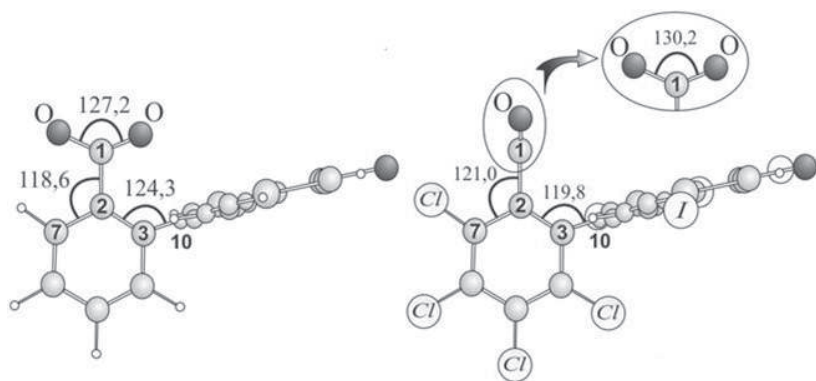


Рис. 2.4. Взаимное расположение плоскостей трицикла, моноцикла и группы  $\text{COO}^-$  (слева – конформер 1, справа – конформер 2)

ние группы  $\text{COO}^-$  в плоскости моноцикла для всех красителей, кроме бенгальского розового, для которого наиболее выгодной оказалась конформация 2 (плоскость группы  $\text{COO}^-$  перпендикулярна плоскости моноцикла). Разность энергии двух конформеров для разных красителей составляет 8–20 кДж/моль, что сравнимо с энергией диполь-дипольных взаимодействий. Оба конформера принадлежат группе симметрии  $C_s$ .

Замещение галогенами приводит к перераспределению зарядов на большинстве атомов. Обозначения атомов и молекулярная система координат приведены на рис. 2.5. Частичные заряды на атомах кислорода в положении O(24) уменьшаются при переходе от флуоресцеина к бенгальскому розовому от  $-0,5$  до  $-0,41 e^-$  ( $e^-$  – абсолютное значение заряда электрона). Значение заряда на гетероатоме O(17) ( $0,35$ – $0,38 e^-$ ) близко для всех замещенных красителей. Влияние растворителя (метанола) на частичные заряды атомов кислорода заключается в увеличении отрицательного заряда на  $0,04$ – $0,06 e^-$  на атомах O(8), O(9), O(24), в то время как у гетероатома O(17) заряд остается постоянным.

Сравнение частичных зарядов на атомах углерода молекул дибромфлуоресцеина и эозина (одинаковый заместитель – Br), а также эритрозина и бенгальского розового (одинаковый заместитель – I) показало следующее. Для атомов C(18), C(19), C(20), C(21) молекул эритрозина и бенгальского розового частичные электронные заряды рав-

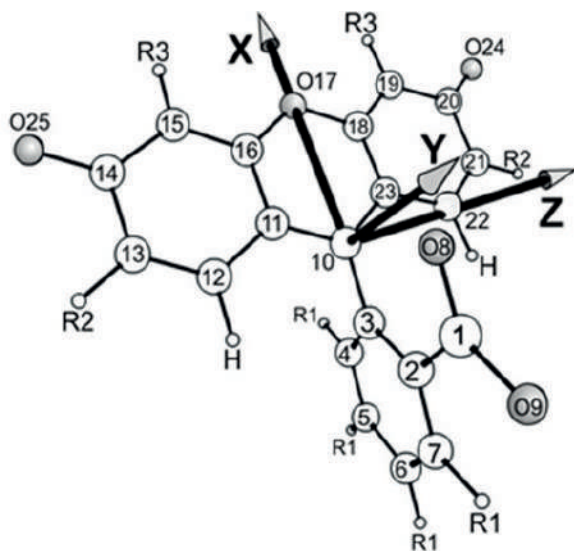


Рис. 2.5. Молекулярная система координат (x, y, z) и пространственная структура флуоресцеиновых красителей

ны. В связи с индуктивным эффектом при замещении атомами брома, частичные заряды для молекул дибромфлуоресцеина и эозина близки только для C(18) и C(19) атомов. Частичные заряды на атомах C(1), C(2), C(3), C(4), C(5), C(6), C(7), C(10), C(23), для молекул флуоресцеина, дибромфлуоресцеина, эозина, эритрозина имеют близкие значения для каждого атома углерода в ряду красителей. Отличие зарядов на тех же атомах углерода молекулы бенгальского розового обусловлено индуктивным эффектом атомов хлора в моноцикле. Частичные заряды на атоме C(22) различаются для всех красителей (диапазон изменения от  $-0,01$  до  $0,17 e^-$ ), поскольку этот атом испытывает влияние заместителя R2 и пространственно близок к группе  $\text{COO}^-$ . Значения частичных зарядов в вакууме и метаноле имеют близкие значения (различие не более  $0,02 e^-$ ) для всех атомов углерода, кроме C(1). На нем для всех красителей заряд оказался меньше на  $0,04\text{--}0,05 e^-$ .

Заряды на атомах водорода, связанных с C(19) и C(21), у флуоресцеина равны  $0,04$  и  $0,03 e^-$  соответственно. Атомы галогенов имеют

заряды, отличающиеся от зарядов на атомах водорода флуоресцеина, которые они замещают. Так, частичные заряды на атомах R3 составляют величину  $-0,1 e^-$  для дибромфлуоресцеина и  $-0,07 e^-$  для эозина, заряд на заместителе R2 молекулы эозина равен  $-0,12 e^-$ . Заряды атомов R3 и R2 молекулы эритрозина ( $-0,02 e^-$  и  $-0,08 e^-$ ) больше, чем у молекулы бенгальского розового ( $0,01 e^-$  и  $-0,05 e^-$  соответственно). Величины зарядов на атомах хлора лежат в пределах  $(-0,02) - (-0,04) e^-$ . Для молекул в метаноле заряды на атомах заместителей увеличиваются примерно на  $0,02 - 0,06 e^-$ .

Пространственная структура красителей при переходе от флуоресцеина к бенгальскому розовому претерпевает значительные изменения (табл. 2.1). В то время как длины большинства связей в структуре колец и боковых групп меняются незначительно, связь C–галоген увеличивается от C–H в ряду C–Cl, C–Br, C–I значительно (1,09; 1,74; 1,93; 2,14 Å соответственно). Вместе с этим меняется размер самих молекул. Размер молекулы, рассчитанный как расстояние между самыми удаленными атомами, составляет для флуоресцеина 9,7 Å, эозина – 10,8 Å, эритрозина – 11,2 Å.

Таблица 2.1

Длины связей в молекулах флуоресцеиновых красителей  
в метаноле, Å

Связь	Флуоресцеин	Дибром- флуоресцеин	Эозин	Эритрозин	Бенгальский розовый
C(15)–R3	1,09	1,92	1,91	2,13	2,12
C(14)–O(25)	1,26	1,25	1,24	1,24	1,24
C(13)–R2	1,09	1,08	1,93	2,14	2,13
C(16)–O(17)	1,37	1,36	1,36	1,37	1,37
C(2)–C(1)	1,54	1,54	1,53	1,53	1,55
C(1)–O(8)	1,26	1,25	1,26	1,26	1,25

Галогензамещение приводит к изменению валентных углов. Наибольшие изменения в ряду красителей наблюдаются для углов C(2)–C(3)–C(10), O(8)–C(1)–O(9), C(1)–C(2)–C(7) (см. рис. 2.4).

Рассмотрим различия в геометрии молекул флуоресцеиновых красителей в метаноле для основного и возбужденного состояний. Расчет показывает, что атомы трицикла не лежат в одной плоскости, а два его приблизительно плоских фрагмента образуют двухгранный угол с ребром C(10)–O(17). Поэтому для анализа изменения пространственной структуры красителей удобно ввести углы  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , смысл которых показан на рис. 2.6. В табл. 2.2 приведено изменение углов ( $\Delta\alpha$ ,  $\Delta\beta$ ,  $\Delta\gamma$ ), вызванное переходом молекул в возбужденное состояние. Угол  $\alpha$ , отвечающий за «планарность» хромофорного трицикла, претерпевает значительные изменения у всех красителей, кроме бенгальского розового. Угол  $\beta$  испытывает меньшие изменения у галогензамещенных флуоресцеинов. В целом можно сказать, что гомологи флуоресцеина подвержены меньшим конформационным изменениям при переходе в возбужденное состояние, чем незамещенный флуоресцеин, т. е. имеют более жесткую структуру. При возбуждении все молекулы переходят в группу симметрии  $C_1$ . Изменения распределения зарядов и пространственной структуры красителей являются причиной изменения их энергетической структуры и спектральных характеристик.

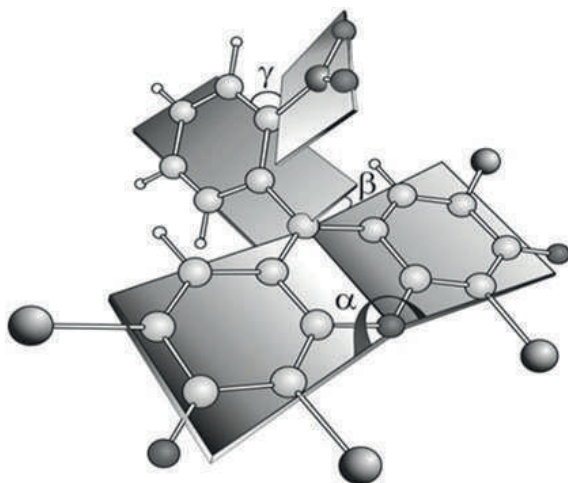


Рис. 2.6. Взаимное расположение плоскостей трицикла, моноцикла и группы  $\text{COO}^-$



Таблица 2.2

Изменение углов ( $\Delta\alpha$ ,  $\Delta\beta$ ,  $\Delta\gamma$ ), вызванное переходом молекул  
в возбужденное состояние

Краситель	Изменение углов		
	$\Delta\alpha$ , град	$\Delta\beta$ , град	$\Delta\gamma$ , град
Флуоресцеин	16	25	0
Дибромфлуоресцеин	15	18	3
Эозин	10	11	5
Эритрозин	12	8	3
Бенгальский розовый	4	8	11

Таблица 2.3

Характеристики дианионов флуоресцеиновых красителей в метаноле

Параметр	Краситель				
	Флуоресцеин	Дибром- флуоресцеин	Эозин	Эритрозин	Бенгальский розовый
( $\mu_x; \mu_y; \mu_z$ ); $\mu^0$ , Д	(6,6; 11,6; 0,0) 13,3	(2,3; 11,4; 0,06) 11,6	(1,1; 11,9; 0,02) 12,0	(3,2; 11,3; 0,06) 11,8	(0,7; 11,3; 0,06) 11,3
( $\mu_x^*; \mu_y^*; \mu_z^*$ ); $\mu^*$ , Д	(5,8; 14,2; 0,0) 15,4	(2,2; 13,8; 0,04) 14,0	(2,5; 13,2; 4,9) 14,3	(8,2; 12,7; 0,3) 15,2	(1,0; 13,0; 0,07) 13,0
( $d_x^{\text{полг}}; d_y^{\text{полг}};$ $d_z^{\text{полг}}$ ), Д	(0,0; 0,0; 3,3)	(0,0; 0,0; 3,1)	(0,0; 0,0; 3,4)	(0,0; 0,0; 3,5)	(0,0; 0,0; 3,5)
( $d_x; d_y;$ $d_z$ ), Д	(0,0; 0,0; 2,6)	(0,0; 0,0; 2,5)	(0,0; 0,3; 3,4)	(0,1; 0,0; 3,5)	(0,0; 0,0; 3,2)
$\lambda_{\text{полг}}$ , нм	468	470	478	482	514
$f$	0,75	0,68	0,78	0,81	0,78
$\Delta\tilde{\nu}_{\text{стокс}}$ , см <sup>-1</sup>	1682	1669	1312	1253	833

Постоянные дипольные моменты красителей основного  $\mu^0$  и возбужденного  $\mu^*$  состояний представлены в табл. 2.3. Наибольшей компонентой является у-компонента. Значения постоянных дипольных

моментов в основном и возбужденном электронных состояниях близки друг к другу. Исключением является бенгальский розовый, у которого постоянные дипольные моменты ниже моментов остальных красителей примерно на 1–2 Д за счет меньшей величины  $x$ -составляющей. Характерно, что в процессе электронного возбуждения дипольные моменты увеличиваются. Экспериментально соотношение  $\mu^0 < \mu^*$  было проверено Гугенхеймом и Смитом [10].

В отличие от постоянных дипольных моментов, дипольные моменты электронных переходов в поглощении ( $d^{\text{полг}}$ ) и флуоресценции ( $d^{\text{фл}}$ ) направлены вдоль оси  $z$ , лежащей приблизительно в плоскости трицикла красителя. Этот результат согласуется с данными вычислений для уранина и эозина [11], а также дианиона и моноаниона флуоресцеина [12], свидетельствующими о принадлежности высшей занятой и низшей вакантной молекулярных орбиталей к атомам трицикла рассматриваемых красителей. Ориентация дипольных моментов перехода в поглощении и флуоресценции в плоскости трицикла эозина и эритрозина подтверждена также экспериментами по деполяризации флуоресценции с угловым разрешением [13].

Вычисленные силы осцилляторов переходов в поглощении ( $f$ ) подтвердили существование интенсивных полос. Значения сил осцилляторов для длинноволновых переходов в спектрах поглощения красителей лежат в пределах 0,7–0,8. Длины волн ( $\lambda_{\text{полг}}$ ) переходов с поглощением света испытывают красный сдвиг, величина которого в ряду флуоресцеин – бенгальский розовый составляет 1910  $\text{см}^{-1}$ .

При смене окружения красителя (вакуум – метанол) наблюдается увеличение постоянного дипольного момента, моментов перехода, сил осцилляторов. Для возбужденного состояния растет постоянный дипольный момент, в меньшей мере изменяются дипольные моменты переходов и силы осцилляторов. Сольватохромный красный сдвиг при переходе к метанолу в спектрах поглощения и флуоресценции в ряду красителей изменяется немонотонно. Направление сдвига характерно для  $\pi$ - $\pi^*$ -переходов при увеличении полярности растворителя [14].

Электронный переход в спектре флуоресценции в метаноле для красителей флуоресцеин – эритрозин испытывает небольшой красный сдвиг в интервале 19 690–19 490  $\text{см}^{-1}$ . Для бенгальского розового этот сдвиг достигает более существенной величины (18 620  $\text{см}^{-1}$ ).

Стоксов сдвиг  $\Delta\tilde{\nu}_{\text{стокс}}$ , представленный в виде разности волновых чисел переходов в поглощении и флуоресценции, уменьшается при галогенировании молекул и достигает минимального значения для бенгальского розового. Стоксов сдвиг, наблюдаемый экспериментально – это результат протекания нескольких динамических процессов. Сюда относятся потери энергии вследствие внутримолекулярной колебательной релаксации, поляризации молекул растворителя, окружающих молекулу флуорофора, вызванной изменением (чаще всего увеличением) дипольного момента флуорофора при возбуждении, переориентации молекул растворителя вокруг возбужденного диполя, а также изменением характера специфических взаимодействий между флуорофором и растворителем в основном и возбужденном состояниях. Стоксов сдвиг, полученный из квантово-химических расчётов, обусловлен только изменением формы потенциальной поверхности в возбужденном состоянии молекулы вследствие перераспределения частичных зарядов, изменения длин связей и величин углов между связями (рис. 2.7). Уменьшение стоксова сдвига при последовательном замещении атомов водорода более тяжёлыми галогенами связано с постепенным затуханием конформационных

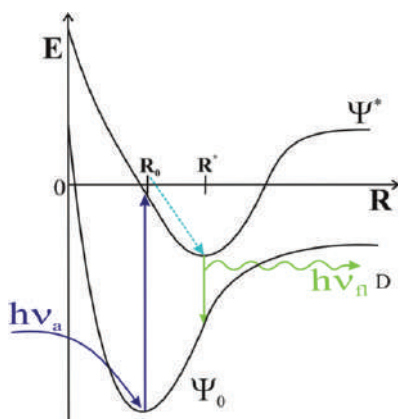


Рис. 2.7. К обсуждению стоксова сдвига. Схематическое изображение сечения потенциальной поверхности молекулы: 0 – основное; \* – возбужденное состояния

изменений молекул при электронном возбуждении, что увеличивает подобие потенциальных кривых в основном и возбужденном состояниях.

Моделирования структуры красителей дает наглядное представление о причинах изменения абсорбционных и флуоресцентных характеристик в гомологичном ряду красителей.

### 2.3. Спектральные и фотофизические характеристики флуоресцеиновых красителей в метаноле и биополимерах

По мере увеличения в структуре красителя зарядового числа и количества галогенов самым существенным образом происходит изменение положения спектров и баланса между излучательными и безызлучательными процессами. В работах [15–17] методами стационарной и время-разрешенной спектроскопии были определены фотофизические параметры флуоресцеиновых красителей в нескольких жидких и полимерных средах. Приведем данные для дианионов красителей в метаноле и в двух практически значимых полимерных матрицах: желатина и хитозан. Свойства красителей в полимерной матрице представляют большой интерес при обсуждении фосфоресценции и триплетного фотохроизма, а также аспектов, связанных с практическим применением этих явлений. Лазерное обесцвечивание красителей в пленках желатины и хитозана будет подробно рассмотрено в гл. 4.

На основании измеренных спектров и время-разрешенных спадов интенсивности, а также расчетов, использующих прямые измерения, были получены следующие данные: положение максимума спектра поглощения ( $\lambda_{\text{погл}}$ ) и его ширина на полувывоте ( $\tilde{\nu}_{\text{погл}}$ ), сечение поглощения в максимуме длинноволнового спектра ( $\sigma^{\text{макс}}$ ), положение максимума спектра флуоресценции ( $\lambda_{\text{фл}}^{\text{макс}}$ ) и его ширина на полувывоте ( $\tilde{\nu}_{\text{фл}}$ ), положение максимума спектра фосфоресценции ( $\lambda_{\text{фосф}}^{\text{макс}}$ ), волновое число чисто электронного перехода ( $\tilde{\nu}_{0-0}$ ), стоков сдвиг ( $\Delta\tilde{\nu}_{\text{стокс}}$ ), квантовый выход флуоресценции ( $\Phi_{\text{фл}}$ ), фосфоресценции ( $\Phi_{\text{фосф}}$ ), замедленной флуоресценции ( $\Phi_{\text{зфл}}$ ), интеркомбинационной конверсии ( $\Phi_{\text{икк}}$ ) и тушения нижнего синглетного уровня ( $\Phi_{\text{Г}}^{\text{S}}$ ), радиационное время жизни ( $\tau_{\text{рад}}$ ), время жизни флуоресцентного ( $\tau$ ) и фосфоресцентного состояний ( $\tau_{\text{фосф}}$ ), константа скорости интеркомбинационной конверсии ( $k_{\text{икк}}$ ), анизотро-

пия флуоресценции ( $r$ ). Кинетические константы фотопроцессов даны в соответствии с обозначениями на диаграмме Яблонского (см. рис. 1.1). Полученные характеристики для флуоресцеиновых красителей в основном метаноле и двух биополимерных матрицах приведены в прил.

Уменьшение стокова сдвига в ряду флуоресцеиновых красителей, полученное квантово-химическими расчетами и подтвержденное экспериментально, приводит к все большему перекрытию спектров поглощения и флуоресценции. Это, в свою очередь, является причиной реабсорбции флуоресценции. Она заключается в перепоглощении собственного излучения в антистоксовой спектральной области, где перекрываются контуры испускания и поглощения. Кроме того, из-за поглощения образцом возбуждающего излучения происходит уменьшение его интенсивности в средней части кюветы, где обычно измеряется флуоресценция (при использовании геометрии возбуждения под прямым углом). Совместные действия этих факторов приводит как к искажению контура флуоресценции на его коротковолновом крыле, так и уменьшению его подынтегральной площади. На рис. 2.8 приведены спектры поглощения и испускания дианиона флуоресцеина и показано наблюдаемое в оптически плотных образцах искажение спектров флу-

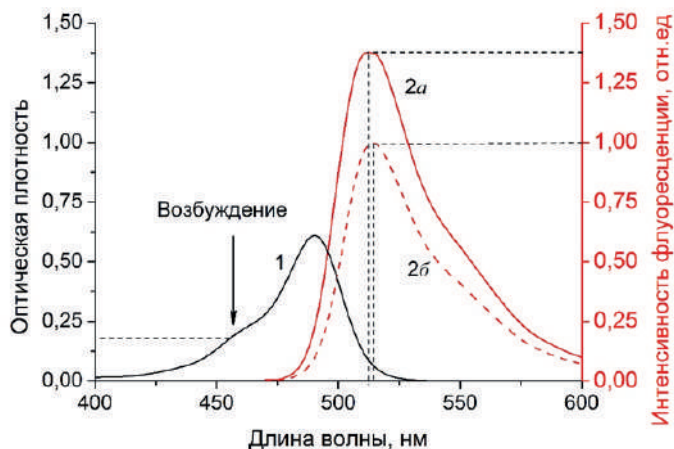


Рис. 2.8. Спектры поглощения (1) и флуоресценции:  
2а – невозмущенный и 2б – возмущенный реарбсорбцией

оресценции, связанное с реарбсорбцией. При выбранной длине волны возбуждения (455 нм) это привело к уменьшению интенсивности флуоресценции примерно на 35 % и сдвигу максимума в красную область. Для остальных красителей из-за большего стока сдвига этот эффект будет еще более выраженным.

Отношение константы скорости реарбсорбции флуоресценции ( $k_{\text{реарб}}$ ) к константе скорости поглощения возбуждающего излучения ( $k_{\text{погл}}$ ) можно расценивать как эффективный параметр, характеризующий вероятность реарбсорбции. Его величина с учетом высокой степени перекрытия контуров и значительного квантового выхода флуоресценции может быть весьма ощутимой (рис. 2.9) [18]. Поскольку перекрытие контуров увеличивается от флуоресцеина к бенгальскому розовому (в соответствии с уменьшением стока сдвига), а кванто-

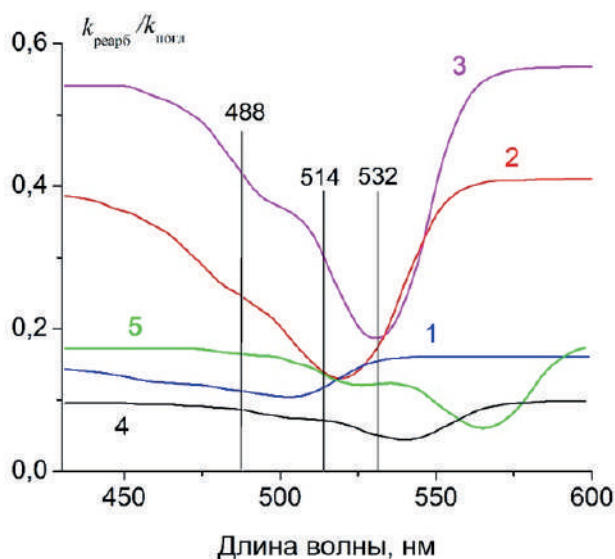


Рис. 2.9. Зависимость отношения констант скоростей реарбсорбции флуоресценции и поглощения возбуждения от длины волны возбуждения: флуоресцеин (1); дибромфлуоресцеин (2); эозин (3); эритрозина (4); бенгальский розовый (5). Для расчетов использованы данные прил. для красителей в желатине, показаны длины волн испускания часто используемых лазеров

вый выход флуоресценции растет в обратном порядке, то вероятность перепоглощения оказывается максимальной для эозина, занимающего в этом ряду среднее положение. Расчетные результаты, показанные на рис. 2.9, получены в предположении независимости сечения поглощения вещества от пространственной ориентации молекул и их следует считать оценкой эффекта сверху. Тем не менее они дают представление о спектральной зависимости вероятности поглощения собственной флуоресценции по отношению к вероятности поглощения возбуждающего излучения и необходимости количественного учета этого эффекта.

Данные, характеризующие триплетное состояние, приведены в прил. только для красителей в полимерах [16]. Это обусловлено тем, что квантовый выход фосфоресценции и замедленной флуоресценции в жидких растворах весьма низок. Величина времени жизни фосфоресцентного состояния оказалась на шесть-семь порядков выше, чем флуоресцентного в соответствии с представлениями о метастабильной природе триплетного состояния. Квантовый выход тушения первого синглетного состояния достигает для некоторых красителей величины, близкой к 0,4, что характеризует этот процесс как эффективный канал дезактивации возбуждения наряду с излучательным и интеркомбинационным переходом.

Низкий квантовый выход фосфоресценции в жидких растворах при комнатной температуре связан с эффективным тушением долгоживущих триплетных уровней. Это тушение может быть уменьшено двумя способами: значительным понижением температуры или путем иммобилизации красителя, например в полимере. С помощью первого способа понижается вероятность внутренней конверсии. Второй способ приводит не только к уменьшению конформационной подвижности молекул, но и ограждает их от внешних тушителей, таких как кислород. Но даже для иммобилизованного в полимерных матрицах флуоресцеина нельзя считать квантовый выход фосфоресценции и замедленной флуоресценции надежно определенными в силу их малой величины (см. прил.). Для остальных флуоресцеиновых красителей значения квантовых выходов фосфоресценции и константы интеркомбинационной конверсии существенно зависят от степени галогензамещения красителя. Этот эффект целесообразно обсудить с точки зрения развития внутримолекулярного спин-орбитального взаимодействия.

## 2.4. Фотопроцессы, определяемые спин-орбитальным внутримолекулярным взаимодействием

В ряду красителей флуоресцеин – бенгальский розовый происходит увеличение энергии внутримолекулярного спин-орбитального взаимодействия. Замещающие тяжелые атомы возмущают систему  $\pi$ -электронов молекул красителя, что приводит к смешиванию синглетных и триплетных состояний. В приближении центрально-симметричного поля константа спин-орбитальной связи  $\zeta$  сильно зависит от порядкового номера элемента  $Z$  (1.15). Для флуоресцеиновых красителей была выявлена зависимость суммарной константы спин-орбитальной связи от суммарного заряда ядер, входящих в состав молекул. В сложных полях многоэлектронных атомов, а также многоатомных молекул точная пропорциональность  $Z^4$  не реализуется. В случае флуоресцеиновых красителей наблюдается степенная зависимость с показателем степени, равным трем (см. рис. 2.10).

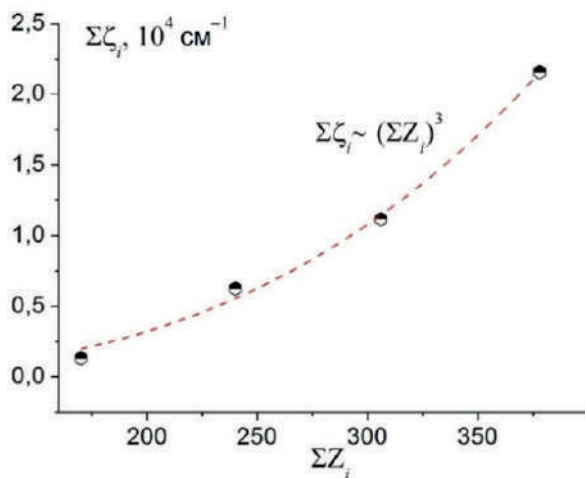


Рис. 2.10. Зависимость суммарной константы спин-орбитальной связи молекул флуоресцеиновых красителей от суммарного заряда атомов (увеличение  $\Sigma Z_i$  происходит в ряду флуоресцеин – дибромфлуоресцеин – эозин – эритрозин)



При увеличении спин-орбитального взаимодействия следует ожидать изменения параметров, характеризующих процессы с участием различающихся по спину состояний. В первую очередь это увеличение константы скорости интеркомбинационной конверсии и квантового выхода фосфоресценции. Одновременно с увеличением скорости интеркомбинационного перехода уменьшается и время жизни флуоресцентного состояния. Мерой эффективности спин-орбитального взаимодействия можно считать сумму квадратов констант спин-орбитальной связи атомов в молекуле  $\sum \zeta^2$  (1.17). Учитывая, что в составе красителей находятся атомы с существенно различающимися значениями констант ( $\zeta_{Cl} = 590 \text{ см}^{-1}$ ;  $\zeta_{Br} = 2460 \text{ см}^{-1}$ ;  $\zeta_I = 5060 \text{ см}^{-1}$  [14]), то для рассматриваемого ряда красителей величина  $\sum \zeta^2$  варьируется в пределах трех порядков.

На рис. 2.11–2.13 показана связь фотофизических параметров и  $\sum \zeta^2$ . Для времени жизни флуоресцентного состояния эта связь обратная, для остальных – прямая.

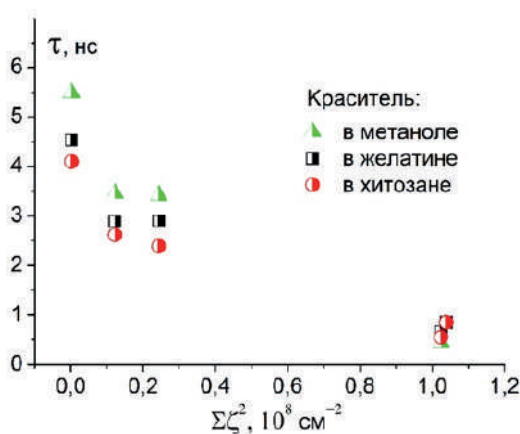


Рис. 2.11. Зависимость флуоресцентного времени жизни от  $\sum \zeta^2$  флуоресцеиновых красителей

Несмотря на самое полное из всех красителей галогензамещение в бенгальском розовом, его квантовый выход фосфоресценции (рис. 2.13) оказался ниже, чем у эритрозина. Наблюдаемое несоответствие говорит о том, что наряду с параметром  $\sum \zeta^2$ , примерно равным

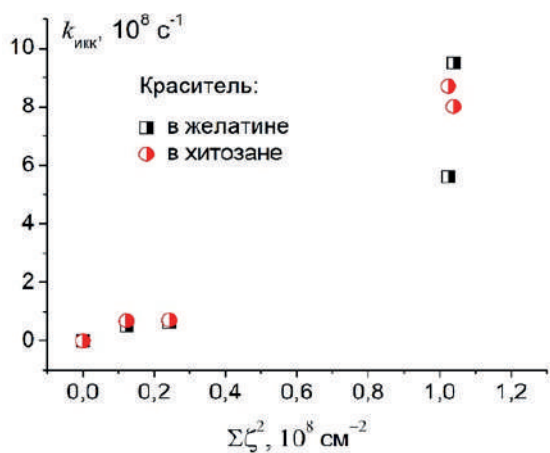


Рис. 2.12. Зависимость константы скорости интерконверсии от  $\Sigma \zeta^2$  флуоресцеиновых красителей

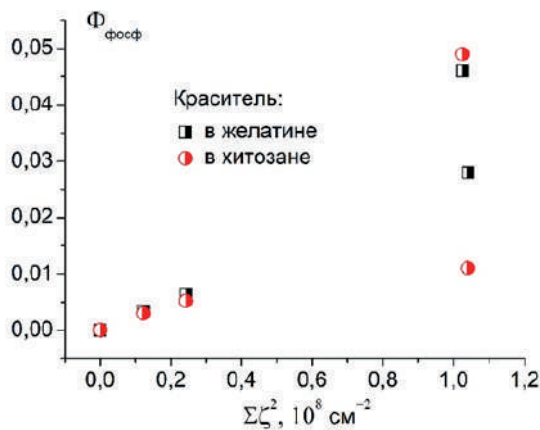


Рис. 2.13. Зависимость квантового выхода фосфоресценции от  $\Sigma \zeta^2$  флуоресцеиновых красителей

для обоих красителей, значимым также является такой фактор, как позиция галогена по отношению к хромофору. Более глубокое расположение фосфоресцентного уровня в бенгальском розовом ( $\lambda_{фосф}^{макс} \approx 740 \text{ nm}$ )

по сравнению с эритразином ( $\lambda_{\text{фосф}}^{\text{макс}} \approx 690$  нм) существенно изменяет соотношение вероятностей процессов с участием фосфоресцентного уровня: уменьшает обратную интеркомбинационную конверсию и увеличивает скорость безызлучательного перехода в основное состояние. Оценка влияния больцмановского фактора  $\exp(-\Delta E / kT)$  дает усиление тушения триплетного состояния бенгальского розового примерно на порядок по сравнению с эритразином.

Низкотемпературные (при 12 К) измерения люминесценции флуоресциновых красителей в желатине и хитозане показали, что в целом квантовый выход флуоресценции увеличивается за счет уменьшения эффективности тушения. Фосфоресценция при этом слабо зависит от температуры, так как одновременно уменьшается вероятность термоактивированной обратной интерконверсии и  $T_1-S_0$  интеркомбинационного перехода [15].

## 2.5. Безызлучательный перенос энергии электронного возбуждения

Безызлучательный перенос энергии электронного возбуждения может реализовываться как в случае переноса между молекулами разных типов, так и в случае переноса между одинаковыми молекулами.

*Случай переноса между молекулами разных типов.* Для того, чтобы реализовался безызлучательный перенос энергии по диполь-дипольному механизму, необходимо выполнение двух основных условий (см. п. 1.5). Первое условие – это перекрытие спектра испускания донора и спектра поглощения акцептора (резонансный фактор). Это влияет на величину радиуса Фёрстера  $R_0$  (1.22), который определяет характерное для этой системы расстояние эффективного переноса. Второе важное условие – это сближение донора и акцептора на расстояние, сопоставимое с  $R_0$  (концентрационный фактор). Существует также третье условие – ориентационный фактор, подразумевающий зависимость эффективности переноса энергии от взаимной ориентации диполей и обращающий в ноль эту эффективность при их ортогональной ориентации. Но в условиях случайного распределения молекул по направлениям в неупорядоченной жидкой фазе ненулевая средняя эффективность хорошо реализуется.

Флуоресцеиновые красители, имеющие интенсивные полосы поглощения и испускания, могут составить эффективную донорно-акцепторную пару для реализации переноса энергии. Условие резонансного соответствия выполняется за счет выбора красителей с соответствующими спектральными характеристиками. На рис. 2.14 приведены спектры эозина Y (донор) и еще одного ксантенового красителя – родамина B (акцептор), составляющих такую пару с величиной радиуса Фёрстера около 5,5 нм.

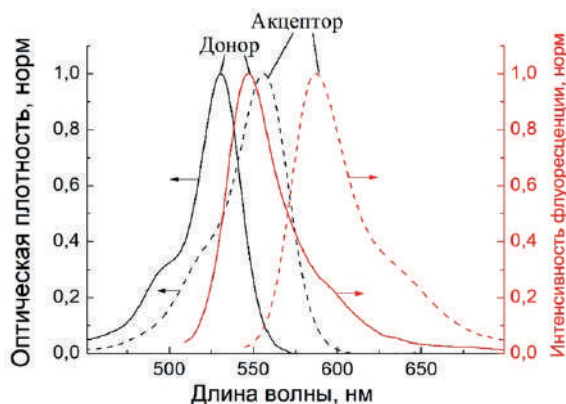


Рис. 2.14. Спектры поглощения эозина Y (донор) и родамина B (акцептор) в желатиновых пленках

Для сближения донора и акцептора на расстояния, сопоставимые с радиусом Фёрстера, необходимы концентрации около  $10^{-3}$  М, что на 2–3 порядка превышает значения, обычно используемые при спектральных измерениях растворов в кюветах сечением  $10 \times 10$  мм. Простое увеличение концентраций до требуемых значений приведет к превышению предела растворимости и эффектам агрегации красителя. Чтобы избежать этого, нужно использовать растворитель (матрицу), иммобилизация красителя в которой позволит значительно уменьшить его агрегацию при достаточно высоких концентрациях в образцах оптимальной оптической толщины.

В работе [19] эти задачи были решены использованием тонких (около 10 мкм) желатиновых пленок с красителем на стеклянной под-

ложке. Желатина является достаточно технологичным биополимером, который используют в качестве химически инертной пластичной матрицы. Пленки были получены высушиванием 1 % полимерного раствора в воде и содержали различные концентрации донора и акцептора. Были приготовлены образцы с концентрацией эозина 4,90 мМ, соотношение молярных концентраций донора и акцептора в образцах составляло 1:0, 1:0,2, 1:0,4, 1:0,6, 1:0,8, 1:1, 0:1 (рис. 2.15). Максимальная концентрация красителей обеспечивала необходимое для реализации переноса энергии среднее расстояние в донорно-акцепторной паре.

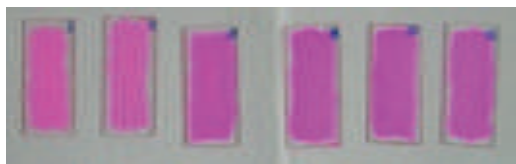


Рис. 2.15. Фотографии образцов желатиновых пленок на стеклянной подложке с различным концентрационным соотношением донора и акцептора (концентрация родамина В увеличивается слева направо)

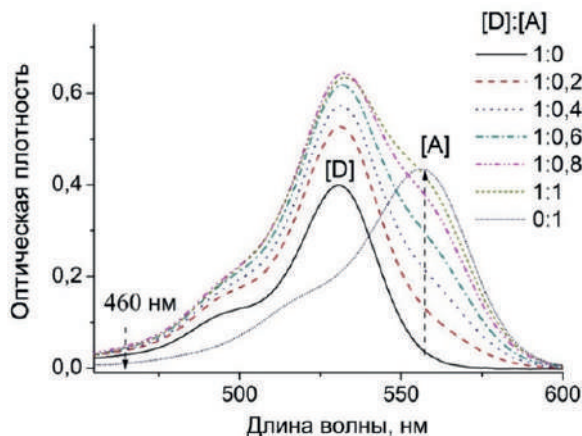


Рис. 2.16. Спектры поглощения пленок с донорно-акцепторной парой красителей (обозначена длина волны возбуждения)

Спектры поглощения пленок с фиксированной концентрацией донора и переменной концентрацией акцептора приведены на рис. 2.16. По мере роста концентрации акцептора происходит уширение общего контура, связанное с увеличением вклада контура акцептора.

Для того, чтобы охарактеризовать эффективность переноса энергии, существует два спектрально-флуоресцентных метода: по тушению интенсивности флуоресценции и уменьшению времени жизни донора.

Для анализа тушения флуоресценции донора необходимо использовать спектральную область, где преимущественно флуоресцирует донор, и охарактеризовать тушение флуоресценции в координатах Штерна – Фольмера (рис. 2.17). Из трех выбранных для анализа длин волн (520, 530, 540 нм) только самая короткая дала ожидаемую линейную зависимость отношения относительной интенсивности флуоресценции донора от концентрации акцептора (1.27). Очевидной причиной этого является вклад флуоресценции акцептора, растущий по мере продвижения

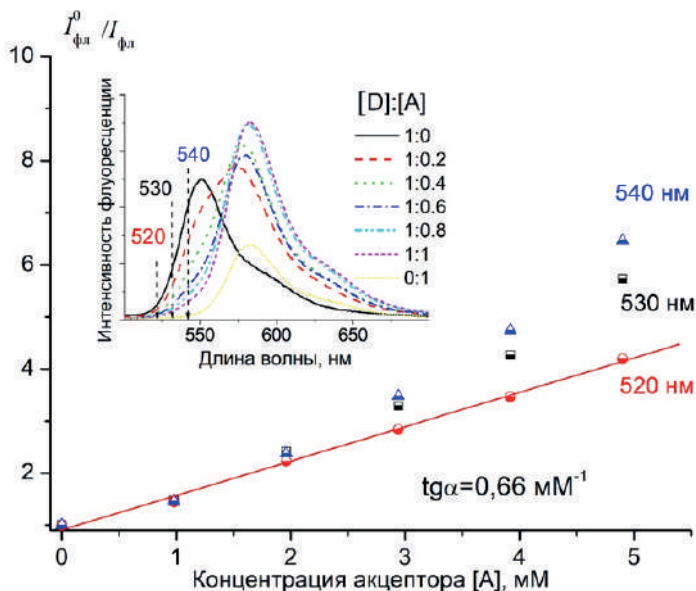


Рис. 2.17. Тушение флуоресценции донора в координатах Штерна – Фольмера (указаны длины волн спектра испускания, вставка – спектры испускания)

в красную область спектра. Для оценки величины константы скорости переноса энергии воспользуемся тангенсом угла наклона полученной линейной зависимости ( $0,66 \text{ мМ}^{-1}$ ). С учетом времени жизни флуоресцентного состояния эозина (см. прил.) по формуле (1.27) была вычислена константа скорости переноса энергии ( $2,3 \pm 0,1 \cdot 10^{11} \text{ М}^{-1}\text{с}^{-1}$ ).

На вставке рис. 2.18 приведены кривые затухания флуоресценции донора, на которой видно уменьшение его времени жизни в образцах с повышенным содержанием акцептора. Аппроксимация спадов экспоненциальной зависимостью (1.4) позволила получить среднее время жизни возбужденного состояния донора в присутствии акцептора. Уменьшение времени жизни флуоресцентного состояния с увеличением концентрации акцептора является свидетельством динамического тушения флуоресцентных состояний. Зависимость отношения времени жизни в отсутствие акцептора к времени жизни в его присутствии от концентрации акцептора дала линейную зависимость с тангенсом угла наклона  $0,29 \text{ мМ}^{-1}$ . С помощью (1.28) была найдена константа скорости переноса энергий, равная  $(1,0 \pm 0,1) \cdot 10^{11} \text{ М}^{-1}\text{с}^{-1}$ .

Сравнивая результаты, полученные двумя методами, нужно отметить их близкое значение по порядку величины. Их численное равенство было бы ожидаемо лишь в том случае, если перенос энергии является единственным механизмом тушения флуоресценции и в системе нет дополнительного статического тушения. В реальной ситуации численное значение константы скорости переноса энергии, полученное по тушению интенсивности флуоресценции, следует расценивать как оценку сверху. Результат, полученный хроноскопическим методом, также требует специальных пояснений. Во-первых, аппроксимация временных спадов интенсивностей при переносе энергии описывается более сложной функцией, чем экспоненциальная (1.25), во-вторых, результат оказывается чувствительным к влиянию засветки от испускания акцептора. Оба этих фактора способствуют тому, что численные значения найденной хроноскопическим методом константы скорости переноса является оценкой снизу.

Произведем оценку расстояния между донором и акцептором на основании полученных данных. По формулам (1.23), (1.24) и данным рис. 2.18 оценим  $R$  для максимальной концентрации акцептора. Оно составляет около 5 нм, что соответствует среднему расстоянию между донором и акцептором при выбранной концентрации красителей.

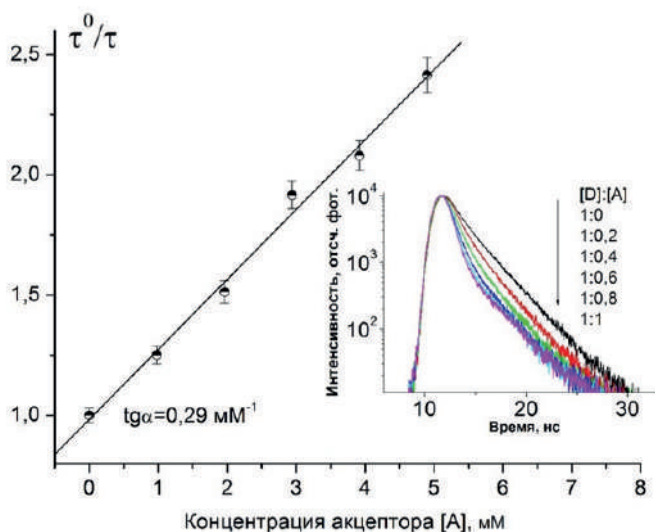


Рис. 2.18. Зависимость отношения времени жизни донора к времени жизни донора в присутствии акцептора от его концентрации (вставка – спады флуоресценции донора)

В качестве альтернативного механизма тушения можно рассмотреть столкновительное тушение, если тушителем считать второй краситель. Оценка бимолекулярной константы тушения по формуле (1.18) с учетом низких коэффициентов диффузии красителей в желатине (около  $5 \cdot 10^{-9} \text{ см}^2/\text{с}$  [20]) показала его пренебрежимо малое (на 10 порядков меньше) значение по сравнению с найденной константой скорости переноса энергии. Очевидно, что этот вид тушения эффективно проявляет себя лишь в случае низкомолекулярных диффузионно-подвижных тушителей в жидкости или газе и в рассматриваемой системе не может конкурировать с переносом энергии.

При анализе эффективности переноса энергии в системах с хорошим заселением триплетных уровней донора встает вопрос об эффективности триплет-триплетного переноса энергии между молекулами донора и акцептора. Действительно, в твердых полимерных растворах эозина происходит существенное заселение долгоживущих триплетных состояний, одним из каналов релаксации которого может выступать



безызлучательный перенос энергии к родамину В. Доказательством существования такого переноса энергии могло бы служить уменьшение времени жизни фосфоресцентного состояния донора в присутствии акцептора. Однако прямые измерения времени жизни фосфоресцентного состояния не выявили корреляции с концентрацией акцептора.

*Случай переноса между одинаковыми молекулами.* Перенос энергии возбуждения может осуществляться и в системах, содержащих только один тип флуорофора. Ненулевое значение интеграла перекрытия спектров флуоресценции и поглощения в этом случае имеет место из-за антистоксовой области флуоресценции. Для флуоресцеина и эритрозина в хитозане критический радиус переноса энергии  $R_0$  составляет 3,8 нм, дибромфлуоресцеина – 4,15 нм, эозина – 4,3 нм, бенгальского розового – 3,6 нм. Это на 1–1,5 нм меньше, чем для случая специально подобранных донорно-акцепторных пар, состоящих из разных красителей. Покажем, как перенос энергии по донорам влияет на величину анизотропии флуоресценции.

В иммобилизованных в полимерах красителях практически отсутствует влияние такого деполаризующего фактора, как броуновский поворот частиц за время жизни флуоресцентного состояния. Тем не менее величина анизотропии флуоресценции  $r$  (см. прил.) не достигает ожидаемого максимального значения. Это происходит из-за переноса энергии за время жизни возбужденного состояния в пределах ансамбля молекул, ориентированных, вообще говоря, случайно. Теория деполаризации для этого случая была развита Фёрстером и Оре [21]. Относительная анизотропия флуоресценции, которая в приближении разбавленного раствора стремится к единице, определяется следующим образом:

$$\frac{r}{r_0} = 4 \int_0^\infty dR \frac{R^2 \left\{ 1 + \left( \frac{R_0}{R} \right)^6 \right\} \exp \left( -\frac{4\pi}{3} R^3 C_0 \right)}{\left\{ 1 + \left( \frac{R_0}{R} \right)^6 \right\}^2 - \left( \frac{R_0}{R} \right)^{12} \exp \left( -\frac{11\pi}{12} R^3 C_0 \right)}, \quad (2.1)$$

где  $C_0$  – концентрация раствора. По этой формуле был проведен расчет зависимости относительной величины анизотропии от концентрации красителя (рис. 2.19). При использованных концентрациях красителей

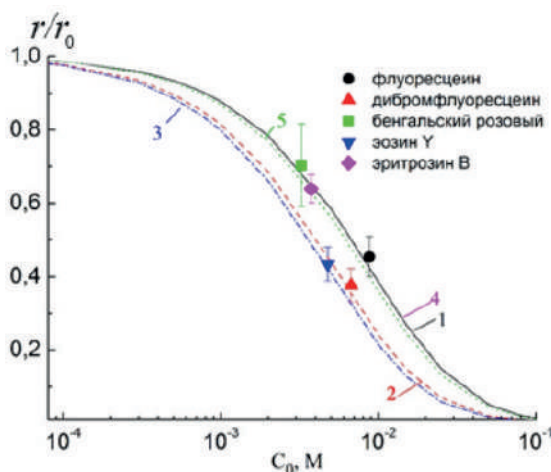


Рис. 2.19. Зависимость относительного значения анизотропии флуоресценции от концентрации красителей в хитозане, рассчитанная по (2.1) (символы – экспериментальные результаты)

порядка  $10^{-2}$ – $10^{-3}$  М наблюдается существенная деполаризация флуоресценции.

Экспериментальные значения стационарной анизотропии флуоресценции для каждого красителя в пределах погрешности измерения совпадают с результатом расчета по теории Фёрстера – Оре. Полученные зависимости говорят о том, флуоресценция красителя в концентрированных растворах может быть сильно деполаризована за счет переноса энергии. В нашем случае измеряемая величина анизотропии уменьшена в 1,5–4 раза по сравнению со случаем разбавленных растворов.

Отметим, что анизотропия флуоресценции оказывается гораздо более чувствительной к переносу энергии по донорам, чем сама флуоресценция. При концентрациях порядка  $10^{-3}$  М не происходит тушения самой флуоресценции [21], в то время как ее деполаризация значима вплоть до концентраций флуорофора порядка  $10^{-4}$  М.

Уникальная чувствительность аналитического сигнала переноса энергии к наличию резонансного фактора и сближению флуорофоров легла в основу создания сенсоров. Типичный сенсор состоит из пары флуорофоров с таким спектральным и конформационным дизайном,

чтобы наличие аналита влияло на эффективность переноса энергии. Аналитическим сигналом в таких датчиках является тушение флуоресценции донора и/или разгорание флуоресценции акцептора. Типичные расстояния, на которых эффективно работают сенсоры, определяются расстояниями реализации диполь-дипольного механизма переноса, т. е. примерно 4–10 нм.

Практическая значимость сенсорных систем на основе FRET может быть проиллюстрирована на примере секвенсоров полимеразной цепной реакции (ПЦР), без которых немислима современная геномика. В этом методе в качестве флуоресцентных красителей используются преимущественно флуорохромы ксантенового, родаминового и цианинового рядов, а в качестве тушителей – соединения, содержащие азогруппу [22]. Применяемые красители способны специфически встраиваться в структуру ДНК, обладая при этом способностью к интенсивной флуоресценции. Перенос энергии происходит лишь в том случае, если красители находятся в составе единой структуры (здесь в составе двуцепочечной молекулы ДНК). При этом эмиссия акцептора увеличивается до 20 раз по отношению к ситуации, когда FRET не реализуется. Традиционные системы FRET с использованием красителей в качестве доноров и акцепторов продолжают играть важную роль. Замена донора и акцептора другими классами флуорофоров касается возможности устранения недостатков органических красителей, таких как фотохимическая нестойкость.

Приведем еще несколько примеров FRET-сенсоров, основанных на использовании флуоресцеиновых красителей. Так, в работе [23] были введены два фенильных линкера между донорным (кумарин) и акцепторным (флуоресцеин) фрагментами. Это обеспечивало сильное тушение флуоресценции кумарина за счет переноса энергии к флуоресцеину. Аналитом являлся фермент (фосфодиэстераза), который расщеплял линкеры, в результате чего наблюдалась интенсивная флуоресценция донора вместо флуоресценции акцептора. Разница длин волн испускания (450 нм против 515 нм) являлась тестом на наличие фермента. Метод, описанный в этой статье, применим и к другим гидролитическим ферментам.

В работе [24] представлен рН чувствительный FRET-сенсор. Флуоресцеин использовался в качестве акцептора энергии, при этом наблю-

дался рН-зависимый сдвиг спектров поглощения. В результате этого сильно изменялся интеграл перекрытия спектров стабильного донора и рН-чувствительного акцептора и, как следствие, эффективность переноса энергии. Авторами утверждается, что такой датчик имеет линейный участок связи рН и интеграла перекрытия спектров в диапазоне рН от 5,0 до 8,0, что обуславливает применимость такого сенсора для различных биологических исследований.

В заключение отметим, что расстояние между донором и акцептором при реализации переноса энергии примерно на два порядка меньше, чем длина волны излучения, выполняющая роль аналитического сигнала, а определяемые с помощью FRET размеры в несколько нанометров лежат далеко за границами дифракционного предела пространственно-го разрешения видимой области спектра.

## Литература

1. Neckers D. C., Valdes-Aguilera O. M. Photochemistry of the Xanthine Dyes // *Advances in Photochemistry* / eds. by D. H. Holman, G. S. Hammond, D. C. Neckers. – New York: Wiley Interscience, 1993. – P. 315–394.
2. Лазеры на красителях / под ред. Ф. П. Шефера. – М.: Мир, 1976. – 329 с.
3. Confocal microscopy of living cells / M. E. Dailey, E. Manders, D.R. Soll, M. Terasaki // *Handbook of Biological Confocal Microscopy*. – New York: Springer Science + Business Media, 2006. – P. 381–403.
4. Magde D., Wong R., Seybold P. G. Fluorescence quantum yields and their relation to lifetimes of rhodamine 6G and fluorescein in nine solvents. Improved absolute standards for quantum yields // *Photochemistry and Photobiology*. – 2002. – Vol. 75. – P. 327–334.
5. A rapid method for the determination of molar ratio of fluorophore to protein by fluorescence anisotropy detection / D.-H. Li, Q.-Z. Zhu, D. Ye, [et al.] // *Analytica Chimica Acta*. – 1999. – Vol. 389, № 1-3. – P. 85–88.
6. Birla L., Cristian A.-M., Hillebrand M. Absorption and steady state fluorescence study of interaction between eosin and bovine serum albumin // *Spectrochimica Acta Part A*. – 2004. – Vol. 60. – P. 551–556.

7. 3D-лазерные информационные технологии / под ред. П.Е. Твердохлеба. – Новосибирск: Институт автоматики и электрометрии СО РАН, 2003. – 550 с.

8. Valdes-Aguilera O., Neckers D. C. Aggregation phenomena in xanthene dyes // *Accounts of Chemical Research*. – 1989. – Vol. 22, № 5. – P. 171–177.

9. Влияние галогензамещения на структуру и электронные спектры флуороновых красителей / Е. А. Слюсарева, Ф. Н. Томилин, А. Г. Сизых [и др.] // *Оптика и спектроскопия*. – 2012. – Т. 112, № 4. – С. 555–563.

10. Solvent effect on the ground and excited state dipole moments of fluorescein / B. Acemioğlu, M. Arik, H. Efeoglu, Y. Onganer // *Journal of Molecular Structure (Theochem)*. – 2001. – Vol. 548, № 1–3. – P. 165–171.

11. Hirano K. Electronic structure and spectra of organic dye anions of uranine and eosin Y // *Bulletin of the Chemical Society of Japan*. – 1983. – Vol. 56, № 3. – P. 850–854.

12. Quantum mechanical studies of intensity in electronic spectra of fluorescein dianion and monoanion forms / A. Tamulis, J. Tamuliene, M. L. Balevicius [et al.] // *Structural Chemistry*. – 2003. – Vol. 14. – P. 643–648.

13. Lettinga M. P., Zuilhof H., van Zandvoort M.A.M.J. Phosphorescence and fluorescence characterization of fluorescein derivatives immobilized in various polymer matrices // *Physical Chemistry. Chemical Physics*. – 2000. – Vol. 2. – P. 3697–3707.

14. Турро Н. Молекулярная фотохимия. – М.: Мир, 1967. – 328 с.

15. Photoluminescence properties of fluorone dyes in bio-related films at low temperatures / T. Tsuboi, A. Penzkofer, E. Slyusareva, A. Sizykh // *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. – 2011. – Vol. 222. – P. 336–342.

16. Phosphorescence and delayed fluorescence properties of fluorone dyes in bio-related films / A. Penzkofer, A. Tyagi, E. Slyusareva, A. Sizykh // *Chemical Physics*. – 2010. – Vol. 378. – P. 58–65.

17. Spectral and photophysical properties of fluorone dyes in bio-related films and methanol / E. Slyusareva, A. Sizykh, A. Tyagi, A. Penzkofer // *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. – 2009. – Vol. 208. – P. 131–140.

18. Глушков А. А., Слюсарева Е. А., Сизых А. Г. Влияние эффекта реабсорбции флуоресценции на кинетику фотопроцессов в ксантеновых красителях // Изв. высш. учеб. заведений. Физика. – 2011. – Т. 54, № 2/2. – С. 121–125.

19. Фотофизические процессы в бинарных растворах ксантеновых красителей в биополимере / А. Г. Сизых, А. Д. Цыганов, Е. А. Макарова, Е.А. Слюсарева // Изв. высш. учеб. заведений. Физика. – 2009. – Т. 52, № 12/3. – С. 299–305.

20. Процессы релаксации дифракционной эффективности светоиндуцированных решеток в твердых растворах красителя в полимерах / Е. А. Дьячук, Р. А. Макаров, А. Г. Сизых, Е. А. Слюсарева // Труды IX Междунар. школы-семинара по люминесценции и лазерной физике. – Иркутск, 2004. – С. 124–132.

21. Ore A. Intermolecular energy transfer and concentration depolarization of fluorescent light // The Journal of Chemical Physics. – 1959. – Vol. 31. – P. 442–443.

22. Способы детекции результатов полимеразной цепной реакции в режиме реального времени / С. М. Бикбулатова, Д. А. Чемерис, Ю. М. Никоноров, О. И. Машков, Р. Р. Гарафутдинов, А. В. Чемерис, В. А. Вахитов // Вестн. Башкир. ун-та. – 2012. – Т. 17, №1. – С. 59–67.

23. Design and synthesis of an enzyme-cleavable sensor molecule for phosphodiesterase activity based on fluorescence resonance energy transfer / H. Takakusa, K. Kikuchi, Ya. Urano, Sh. Sakamoto, K. Yamaguchi, T. Naga-no // J. Am. Chem. Soc. – 2002. – Vol. 124. – № 8. – С. 1653–1657.

24. Development of ultrabright semiconducting polymer dots for ratiometric pH sensing / Y. H. Chan, C. Wu, F. Ye, Y. Jin, P.B. Smith, D. T. Chiu // Anal. Chem. – 2011. – Vol. 83. – С. 1448–1455.

# ПРОТОЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КРАСИТЕЛЕЙ И ПЕРЕНОС ПРОТОНА В ВОЗБУЖДЕННОМ СОСТОЯНИИ

Электронно-возбужденное состояние молекул может значительно отличаться по своим химическим свойствам от основного состояния вследствие существенных изменений в электронной структуре (перераспределение электронной плотности, изменение длин связей и частот колебаний). В частности, это выражается в изменении кислотно-основных свойств. Эта разница приводит к термодинамической выгоде реализации переноса протона в возбужденном состоянии. Однако окончательный вердикт о возможности протекания переноса определяет окружение (среда): природа растворителя, pH и ионно-солевой состав. При благоприятном сочетании вероятности излучения и переноса протона, зависящего от свойств окружения, возможно создание чувствительных оптических сенсоров в актуальном для биологии диапазоне pH. Флуоресцеин является примером соединения, в котором реализуется перенос протона в возбужденном состоянии в обоих направлениях (протонирование/депротонирование), однако интерпретация всей картины ионных равновесий в возбужденном состоянии флуоресцеина и его гомологов еще далека от завершения.

### 3.1. Ионные равновесия в основном состоянии

Благодаря протеканию многоступенчатой диссоциации в водных растворах флуоресцеиновые красители могут пребывать в нескольких ионных формах (от дианиона до катиона), которые в свою очередь могут существовать в виде ряда таутомеров (рис 3.1). Так, у моноаниона может быть два таутомера, один из которых диссоциирован по карбоксильной группе, а другой – по гидроксильной. Нейтральная форма представлена тремя прототропными формами: хиноидной, лактонной

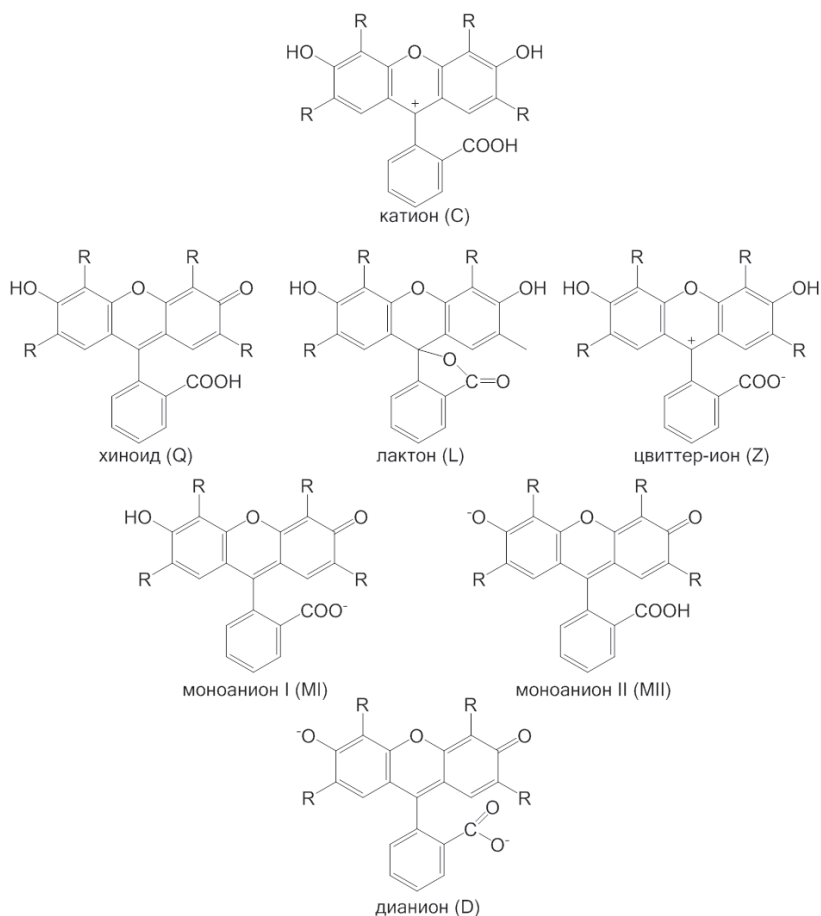
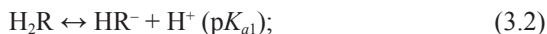
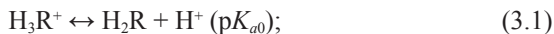


Рис. 3.1. Ионные и таутомерные формы флуоресцеиновых красителей: флуоресцеин (R = H); эозин (R = Br); эритрозин (R = I)

и цвиттер-ионной. Из-за того, что протонирование/депротонирование зачастую происходит в хромофорной группе, подобные изменения могут самым радикальным образом сказываться на спектрах поглощения и испускания. Например, лактон флуоресцеина оказывается полностью бесцветным, в то время как остальные таутомеры нейтральной формы и другие ионные формы довольно хорошо окрашены. Среди всего по-



тенциального многообразия ионных форм не все оказываются реализуемыми по тем или иным причинам (например кинетическим), что отчасти упрощает наблюдаемую картину реакций. Кислотно-основная диссоциация в растворах обычно являются обратимыми процессом, поэтому каждую из возможных реакций диссоциации характеризует константа равновесия  $K_a$ , равная отношению констант скоростей прямой и обратной реакций. Совокупность констант определяет равновесные концентрации ионных форм при различном значении pH. Флуоресцеиновые красители диссоциируют в три стадии:



В скобках обозначены показатели смешанных констант диссоциации без учета таутомеризации ионных и молекулярных форм (их называют *брутто-константами*). Ионные и прототропные равновесия флуоресцеина и его производных в растворах подробно изучены Н. О. Мчедловым-Петросяном с сотрудниками [1].

Значения констант диссоциации получают методом спектрофотометрического титрования – обычно в широком диапазоне значений pH для больших участков спектра. При этом, как правило, измерения производят при низких концентрациях красителя, чтобы не выйти за пределы растворимости, а также избежать агрегации. Наиболее подробно из всего ряда рассматриваемых красителей изучен флуоресцеин, не содержащий заместителей-галогенов в хромофорной группе. Установленные значения  $\text{p}K_{a2}$ ,  $\text{p}K_{a1}$ ,  $\text{p}K_{a0}$  приведены в табл. 3.1. Полученный разброс значений можно считать несущественным, принимая во внимание разные условия измерения, например, ионную силу раствора.

Ионные равновесия галогензамещенных флуоресцеинов исследованы меньше. Опубликованные значения показателей констант диссоциации варьируются в широких пределах (см. табл. 3.1). Различия значений, приведенных для одного красителя, по-видимому, можно отнести к ограниченности использованных методик для анализа плохо растворимых веществ, спектральной неразрешимостью контуров поглощения дианионов и моноанионов и близостью значений  $\text{p}K_{a1}$  и  $\text{p}K_{a2}$ .

Таблица 3.1

 Показатели константы диссоциации  
флуоресцеиновых красителей

Краситель	$pK_{a0}$	$pK_{a1}$	$pK_{a2}$
Флуоресцеин [2–4]	2,08–2,2	4,31–4,4	6,36–6,7
Эозин [1]	–	2,48–2,77	3,31–3,64
Эритрозин [1]	–	3,79–3,92	4,0–5,16
Бенгальский розовый [1]	–	3,51–4,46	4,05–5,72

Как было сказано выше, таутомеры одного и того же ионного состояния имеют разную структуру и спектральные свойства, поэтому наиболее ценными для понимания полной картины ионного равновесия являются микроконстанты диссоциации, характеризующие частные равновесия для отдельных таутомерных форм. В отличие от брутто-констант диссоциации, они обозначаются через  $pK_a$ . Значения микроконстант диссоциации флуоресцеина были получены Клонисом с соавторами [4] в рамках наиболее детальной, на наш взгляд, модели ионного равновесия в основном состоянии (рис. 3.2).

В этой же работе установлены спектры поглощения отдельных форм флуоресцеина (рис. 3.3) и доли последних в зависимости от pH (рис. 3.4).

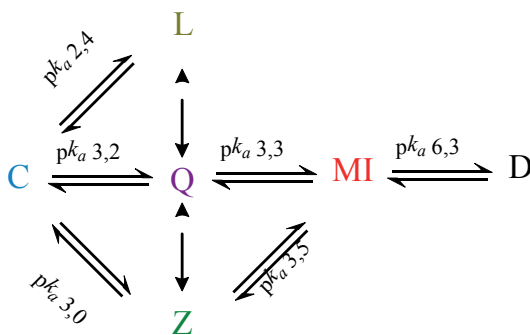


Рис. 3.2. Схема таутомерных и ионных равновесий флуоресцеина с указанием  $pK_a$  соответствующей реакции (обозначения ионных и молекулярных форм приведены на рис. 3.1)

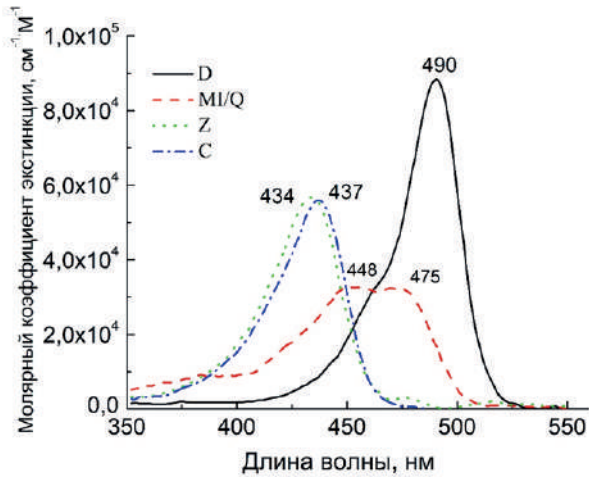


Рис. 3.3. Спектры экстинкции ионных и молекулярных форм флуоресцеина в воде с обозначением максимумов (воспроизведено по [4])

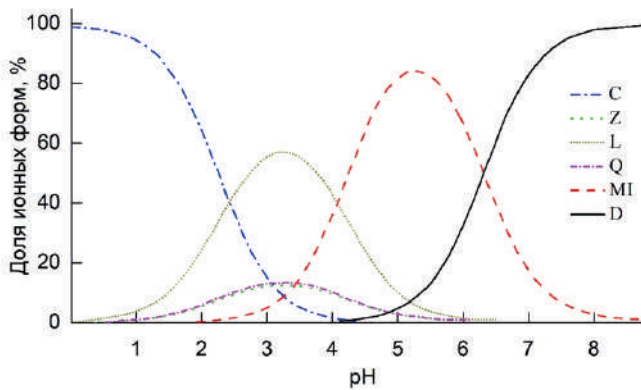


Рис. 3.4. pH зависимость доли ионных и молекулярных форм флуоресцеина в воде (воспроизведено по [4] с учетом данных рис. 3.2)

На рис. 3.3, 3.4 видно, что в чистом виде могут быть получены только дианион и катион при обеспечении щелочной ( $\text{pH} \geq 9$ ) или сильно кислой ( $\text{pH} \leq 0,5$ ) среды соответственно. Во всех остальных случаях

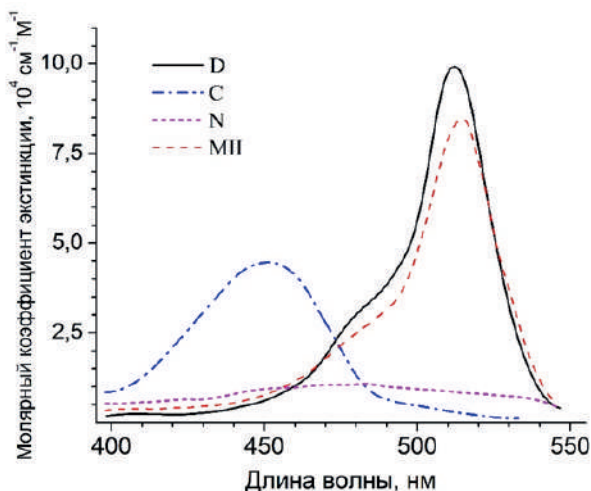


Рис. 3.5. Спектры ионных и молекулярной форм эозина в водных растворах (воспроизведено по [1])

в растворе одновременно присутствуют две или более (до пяти) форм. Спектры моноаниона I и хиноида, а также цвиттер-иона и катиона подобны, что легко объяснить близостью структур хромофора-трицикла (см. рис. 3.1). В умеренно-кислых средах высока доля лактонной формы, но, как уже было сказано выше, она не поглощает в видимой области.

Опубликованные результаты для спектров ионных форм эозина приведены на рис. 3.5. Следует отметить существенное различие в таутомерии эозина и других гомологов флуоресцеина с моноанионом последнего, продемонстрированное в ходе многочисленных экспериментов. Так, моноанион флуоресцеина в растворе диссоциирован по карбоксильной группе (MI, рис. 3.1), в то время как моноанионы галогензамещенных диссоциированы по гидроксильной группе трицикла (МП, рис. 3.1). В результате спектральные свойства этих таутомеров существенно различаются: спектр МП подобен спектру дианиона, но сдвинут батохромно (рис. 3.5), спектр же MI сдвинут гипсохромно и значительно уступает спектру дианиона по амплитуде (см. рис. 3.3).

Формирование моноанионов разных типов хорошо согласуется с данными квантово-химических расчетов (см. п. 2.2). Большой ион-

ный радиус заместителей-галогенов R2 и R3 по сравнению с водородом способствует экранированию кислорода в положении O(24). Поэтому присоединение протонов у эозина и эритрозина в реакции (3.3) будет происходить преимущественно по O(9), а не O(24). На формирование таутомеров также может оказывать влияние распределение частичных зарядов на атомах кислорода в разном положении: у флуоресцеина отрицательный заряд на O(24) большее, чем на O(9), тогда как у остальных галогенпроизводных соотношение обратное.

На рис. 3.6–3.8 приведены доли ионных форм галогензамещенных флуоресцеинов в зависимости от pH, рассчитанные с учетом среднего значения в интервале констант диссоциации, приведенных в табл. 3.1.

Сравнивая доли ионных форм галогензамещенных флуоресцеинов, можно выделить диапазон около полутора единиц pH, а котором возможно одновременное существования дианионной, моноанионной и нейтральных форм. Этот диапазон лежит в области 2,5–4 единиц pH для эозина, 3,5–5 для эритрозина и 3,8–5,3 для эритрозина. Для флуоресцеина подобный диапазон значительно шире (около 3 единиц pH), что обусловлено более существенным различием значений констант разных ступеней диссоциации, чем у его галогензамещенных произ-

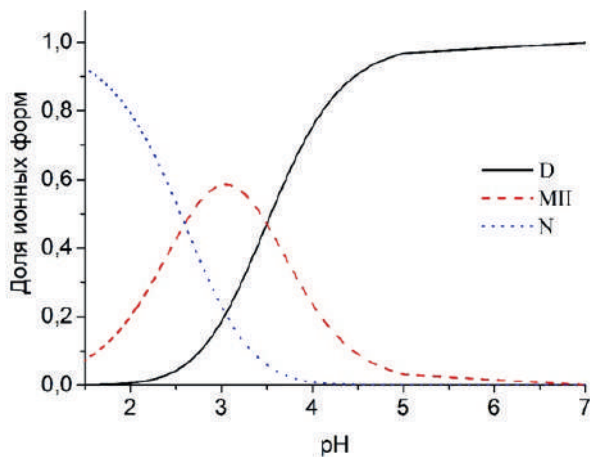


Рис. 3.6. Доли ионных (D, MII) и молекулярной (N) форм эозина в водных растворах без уточнения таутомерного состояния

водных. Этот факт, а также спектральная близость контуров дианиона и моноаниона и меньшее разнообразие таутомеров нейтральной формы формируют основные отличия характера протолитических равновесий галогензамещенных флуоресцеинов по сравнению с флуоресцеином.

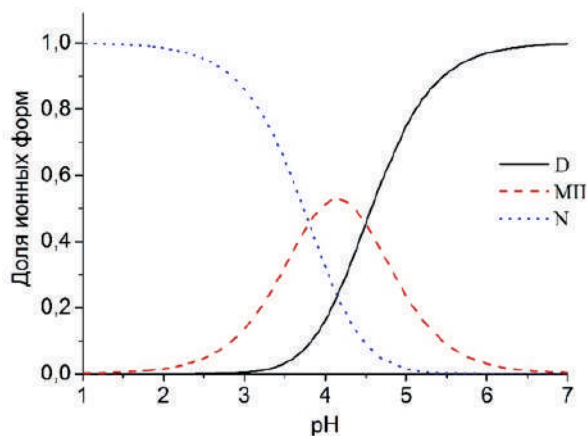


Рис. 3.7. Доли ионных (D, MII) и молекулярной (N) форм эритрозина в водных растворах без уточнения таутомерного состояния

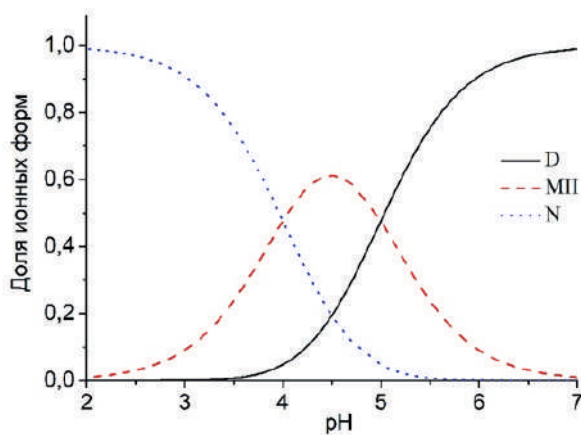


Рис. 3.8. Доли ионных (D, MII) и молекулярной (N) форм бенгальского розового в водных растворах без уточнения таутомерного состояния

В заключение отметим, что зависимость спектральных свойств от pH для ряда органических соединений хорошо известна – эти вещества широко используются в химии в качестве индикаторов кислотности среды. Так, фенолфталеин, лакмус, метиловый оранжевый, меняющие свой цвет при изменении кислотности среды, позволяют производить определение pH с точностью до 1–2 единиц, что, к примеру, вполне достаточно для детектирования точки равновесия в кислотно-основной титриметрии. На основе набора подобных соединений созданы универсальные индикаторы, перекрывающие большой диапазон значений pH [5].

### 3.2. Спектры поглощения красителей при разных pH

Спектры поглощения флуоресцеиновых красителей при изменении pH в широком диапазоне были подробно представлены ранее [6]. В этой работе использовались безбуферные растворы флуоресцеина, эозина, эритрозина. В щелочном растворителе у флуоресцеина (рис. 3.9, *а*) образуется дианионная форма с максимумом на длине волны 490 нм и перегибом около 475 нм. В соответствии с графиками на рис. 3.4 при уменьшении pH доля дианионов уменьшается за счет увеличения доли других протолитических форм – моноанионной, нейтральной (в виде трех таутомеров) и катионной.

Дианионные формы эозина и эритрозина имеют интенсивную полосу поглощения с максимумами на длинах волн 517 нм и 526 нм соответственно (рис. 3.9, *б, в*). Характер изменения спектров галогензамещенных флуоресцеинов с уменьшением pH во многом сходен: по мере уменьшения pH уменьшается амплитуда спектра, происходит его батохромный сдвиг. Это связано с увеличением доли моноанионов, преимущественно находящихся в таутомерной форме МП со смещенным в красную область спектром. При низких значениях pH эозин и эритрозин переходят в нейтральную форму с широким и малоинтенсивным контуром поглощения. Считается, что нейтральная форма флуоресцеина представлена преимущественно лактоном (64 %) и хиноидом (31 %), имеющим интенсивную окраску [1]. Таким образом, характер измене-

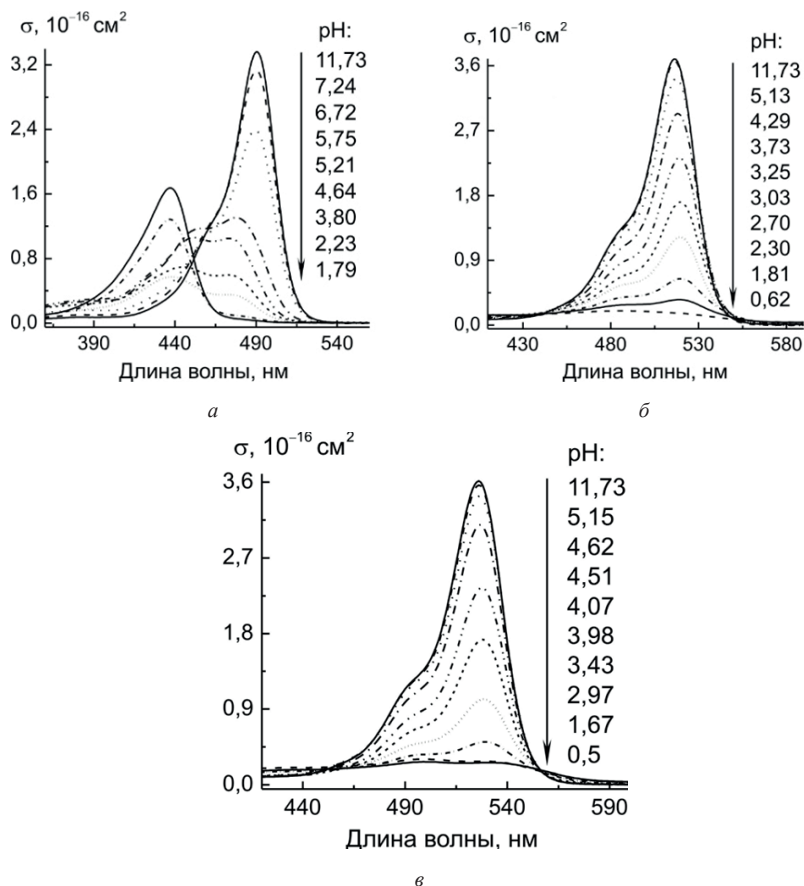


Рис. 3.9. Сечения поглощения флуоресцеиновых красителей в водных растворах с различным значением pH: а – флуоресцеин; б – эозин; в – эритрозин (воспроизведено по [6])

ния спектров поглощения при вариации pH у флуоресцеина и его гомологов качественно различаются: флуоресцеин остается окрашенным даже в экстремально кислых средах, в то время как эозин и эритрозин при уменьшении pH обесцвечиваются.

Количественно мерой изменения доли дианионов при уменьшении pH может служить изменение амплитуды спектра поглощения



на длине волны, соответствующей максимуму поглощения дианиона. На рис. 3.10 видно, что для всех исследованных красителей эта зависимость имеет вид сигмоидальной кривой. Форма кривой вытекает из уравнения Хендерсона – Хассельбаха (1.32), определяющего изменения концентрации кислотных и основных форм. Полученные кривые можно использовать в качестве калибровочных зависимостей для оценки локального значения pH в том случае, если его невозможно определить стандартными методами.

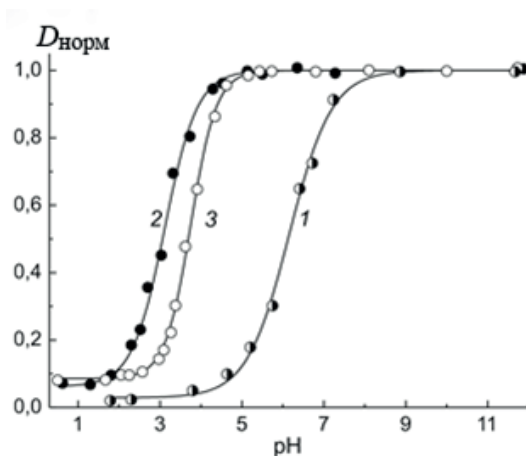


Рис. 3.10. pH-зависимость относительного изменения оптической плотности на длине волны максимума поглощения дианионов флуоресцеиновых красителей: 1 – флуоресцеин; 2 – эозин; 3 – эритрозин (воспроизведено по [6])

Так, в работе [7] по изменению спектров поглощения были определены pH 1%-х водных растворов хитозана, крахмала, желатины. Они составили 5,4; 6,3 и 6,4 соответственно, что в ряде случаев на несколько единиц отличалось от значений, полученных потенциометрическим методом. Найденное значение соответствует микроокружению флуоресцеина, испытывающего эффективное электростатическое взаимодействие в области ближнего ориентационного порядка заряженных фрагментов биополимеров.

### 3.3. Влияние pH на флуоресцентные свойства красителей

Спектры флуоресценции красителей так же, как и их спектры поглощения очень чувствительны к изменению pH. При уменьшении pH спектральный контур флуоресцеина уширяется, и дополнительно к максимуму на длине волны 515 нм появляется перегиб в области 545–555 нм (рис. 3.11, *а*). У эозина сохраняется подобие контура с максимумом в районе 536 нм примерно до pH 5, после чего появляется плечо в области 585 нм и батохромное смещение максимума (рис. 3.11, *б*). У эритрозина в области pH > 5 форма контура испускания с максимумом на 547 нм сохраняется, но при дальнейшем уменьшении pH также наблюдается дополнительное плечо вблизи 600 нм и красный сдвиг (рис. 3.11, *в*).

С уменьшением pH среды у всех исследованных красителей существенно падает интенсивность флуоресценции вследствие увеличения доли энергии, поглощенной молекулярными формами с низкими выходами флуоресценции. Относительный квантовый выход флуоресценции красителей представлен на рис. 3.12.

Следует отметить, что абсолютное значение квантового выхода в ряду красителей флуоресцеин – эозин – эритрозин значительно уменьшается из-за усиления спин-орбитального взаимодействия, обусловленного наличием тяжелых атомов. Этот эффект был подробно обсужден в п. 2.4. С учетом [8] диапазон изменения абсолютного квантового выхода флуоресцеина в широком интервале pH составляет 0,23–0,92, для эозина – 0,004–0,2, для эритрозина – 0,0005–0,02.

Среднее время жизни флуоресцентного состояния красителей в зависимости от pH показано на рис. 3.13. Максимальное время жизни как у флуоресцеина (4,1 нс), так и эозина (1,28 нс) принадлежит дианионной форме. При уменьшении pH время жизни снижается до 2,7 нс у флуоресцеина и 1,11 нс у эозина. Для эритрозина величина времени жизни в широком интервале pH варьируется в пределах от 0,14 нс до 0,11 нс, что существенно меньше, чем времена жизни его гомологов. Как и в случае pH-зависимой характеристики поглощения, оптический отклик на рис. 3.13 представляет собой сигмоидальную функцию с динамическим диапазоном около двух единиц pH.

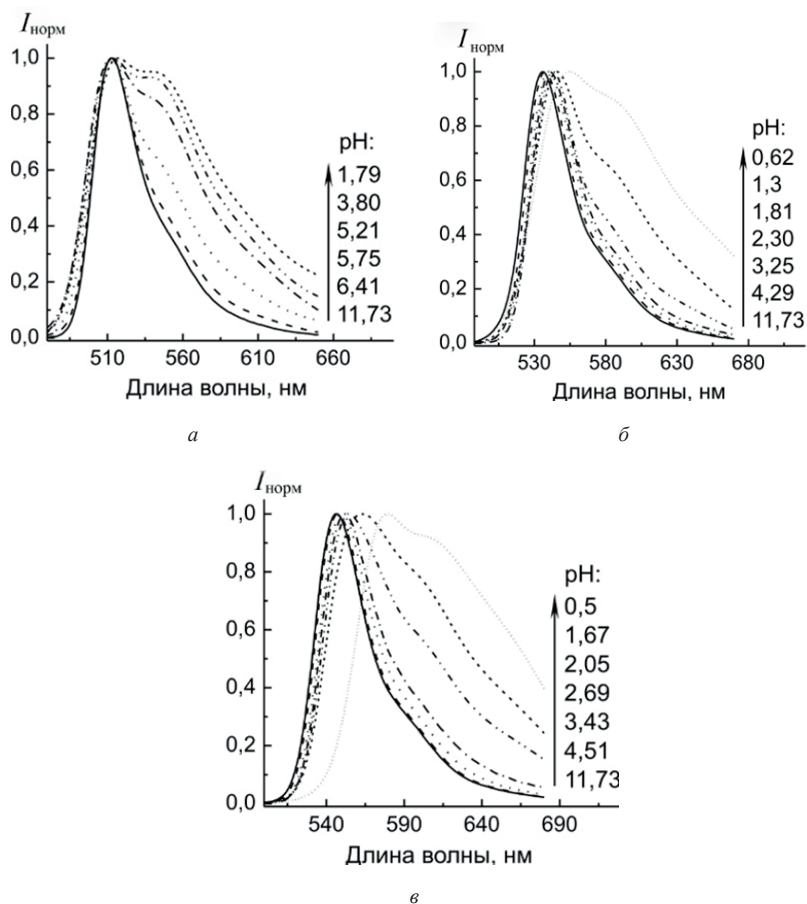


Рис. 3.11. Спектры флуоресценции флуоресцеиновых красителей в водных растворах с различным значением pH: *а* – флуоресцеин; *б* – эозин; *в* – эритрозин. Длины волн возбуждения флуоресцеина и эозина – 470 нм, эритрозина – 480 нм (воспроизведено по [6])

Расширить диапазон и увеличить чувствительность индикации pH можно с помощью *ратиометрического* флуоресцентного метода. В качестве аналитического сигнала в данном методе выступает соотношение интенсивностей флуоресценции при возбуждении излучением с разными длинами волн. Очевидно, что основным требованием

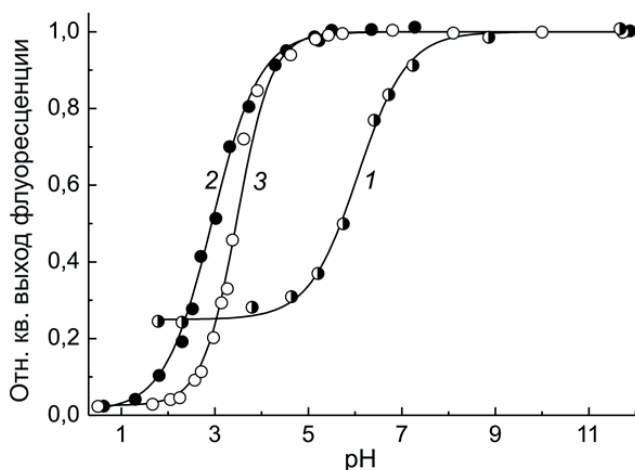


Рис. 3.12. Относительное изменение квантового выхода флуоресценции флуоресцеиновых красителей от pH раствора: 1 – флуоресцеин; 2 – эозин; 3 – эритрозин. (воспроизведено по [6])

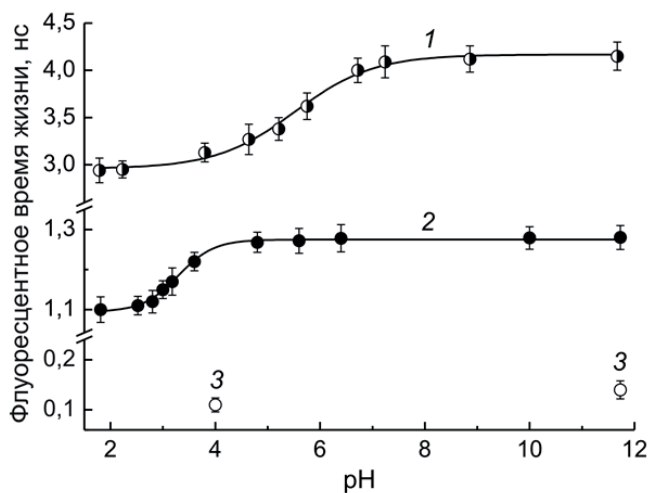


Рис. 3.13. Зависимость флуоресцентного времени жизни флуоресцеиновых красителей в зависимости от pH: 1 – флуоресцеин; 2 – эозин; 3 – эритрозин (воспроизведено по [6])

метода является дифференциальная чувствительность интенсивности флуоресценции к длине волны возбуждения. Например, для флуоресцеина это условие хорошо выполняется при длинах волн возбуждения 435 и 488 нм. Отношение интенсивностей флуоресценции может быть использовано для пересчета в значения рН с помощью калибровочной кривой. Существенным преимуществом ратиометрического метода является независимость параметров калибровочной зависимости от концентрации флуорофоров, которую зачастую крайне сложно контролировать – например, в биологических исследованиях. Так, флуоресцеин и его производные (такие, как флуоресцеин изотиоцианат) хорошо зарекомендовали себя как зонды для внутриклеточной кислотности в области физиологических значений рН [9].

Аномальные значения рН зачастую связаны с биологической дисфункцией. Отклонение кислотно-щелочного равновесия в крови человека (7,35–7,45 в норме) говорит о развитии ацидоза или алкалоза, вызванных протеканием патологических процессов. Отклонения кислотности от нормы внутри клетки наблюдаются при некоторых распространенных типах заболеваний – таких, как злокачественные опухоли [10] и болезнь Альцгеймера [11]. Таким образом, активность ионов водорода является важным показателем в биомедицинских исследованиях и других приложениях. Оптические рН-сенсоры обладают рядом преимуществ перед традиционным потенциометрическим детектированием, а именно более высокой чувствительностью, простой процедурой калибровки, возможностью дистанционного зондирования.

### **3.4. Ионные равновесия флуоресцеина в возбужденном состоянии**

Как было сказано выше, флуоресцеин является сложным флуорофором в том смысле, что он может находиться в четырех ионных формах (катион, нейтральная молекула, моноанион и дианион), а кроме того и в виде нескольких таутомеров ряда ионных форм в диапазоне рН 1–9. Методом спектрофотометрического титрования успешно изучены ионные равновесия только основного состояния (см. п. 3.1).

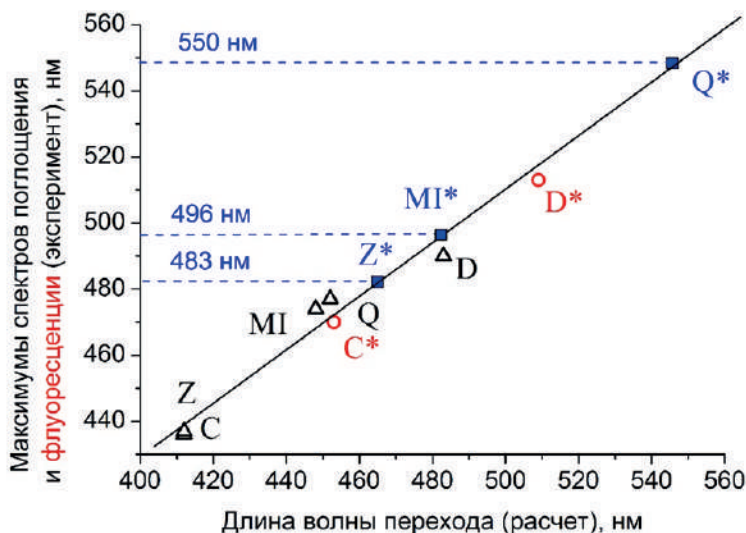


Рис. 3.14. Линейная корреляция между расчетными и экспериментальными данными: черные символы – поглощение, красные – флуоресценция. Закрашенными символами показаны предсказанные положения пиков флуоресценции цвиттер-ионной, моноанионной и хиноидной форм флуоресцеина (обозначения ионных/таутомерных форм приведены на рис. 3.1)

Ионные равновесия в возбужденном состоянии можно определить, используя цикл Фёрстера (см. п. 1.7). Для этого необходимо найти разницу частот электронных переходов исходной молекулы и ее продукта диссоциации/ассоциации. Нахождение частот 0–0 переходов – это вопрос одновременного рассмотрения спектров поглощения и флуоресценции и определение их точки пересечения в энергетической шкале. Эта задача может быть решена при условии, что спектры поглощения и флуоресценции известны для каждой из форм в отдельности. Для флуоресцеина и его гомологов отсутствуют надежные спектральные данные об индивидуальных контурах испускания ряда ионных форм из-за переноса протона в возбужденном состоянии. Один из способов ее решения – это вычисление энергии электронных переходов в различных формах исходя из их химического строения с помощью квантово-химических расчетов. Результаты квантово-химических расчетов с исполь-

зованием нестационарной теории функционала плотности (TD-DFT) были сопоставлены с экспериментальными данными, полученными методом абсорбционной и стационарной флуоресцентной спектроскопии в широком диапазоне pH [12]. Анализ параметров регрессии между расчетными и экспериментальными значениями в рамках линейной модели позволил впервые предсказать значения пиков флуоресценции моноанионной (496 нм), хиноидной (550 нм) и цвиттер-ионной (483 нм) форм (рис. 3.14).

По графикам спектров флуоресценции флуоресцеиновых красителей в водных растворах (см. рис. 3.11, *a*) легко установить, что черты предсказанных пиков хорошо проявляют себя в составном контуре испускания в широком интервале pH. Положения чисто электронных переходов ионных/таутомерных форм флуоресцеина и изменения показателей константы равновесия при фотовозбуждении приведены в табл. 3.2. Таутомерные и ионные равновесия флуоресцеина в возбужденном состоянии с указанием  $pK_a^*$  соответствующей реакции изображены на рис. 3.15.

Таблица 3.2

Положение 0–0 перехода для ионных/таутомерных форм флуоресцеина и изменение констант диссоциации равновесий при фотовозбуждении

Ионная/таутомерная форма	Положение 0–0 перехода*, см <sup>-1</sup>	Равновесие	$\Delta pK_a^{**}$
Катион (C)	21 970	Катион-хиноид	4,8
Хиноид (Q)	19 670	Хиноид-моноанион	–2,1
Цвиттер-ион (Z)	21 900	Катион-цвиттер-ион	0,1
Моноанион I (MI)	20 660	Цвиттер-ион-моноанион	2,7
Дианион (D)	19 950	Моноанион-дианион	1,5

\* Рассчитано как полусумма частот пиков поглощения и испускания;

\*\* рассчитано по формуле (1.35).

В отличие от основного состояния в схеме ионных равновесий возбужденного состояния отсутствует лактонная форма, поскольку ее полосы поглощения лежат в среднем УФ-диапазоне, а фотовозбуждение и испускание реализуется в видимой области. Сравнивая величины  $\Delta pK_a$  (табл. 3.2), можно увидеть варианты положительного, отрицательного

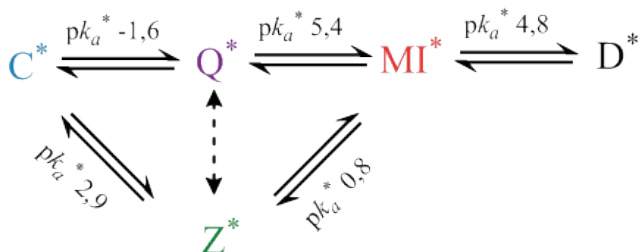


Рис. 3.15. Схема таутомерных и ионных равновесий флуоресцеина в возбужденном состоянии с указанием  $pK_a^*$  соответствующей реакции

и близкого к нулю значений. Различные ситуации соответствуют отсутствию переноса протона в возбужденном состоянии и двум разным направлениям этого переноса. Например, в случае моноанион-дианионного равновесия  $pK_a$  в основном состоянии равно 6,3. При pH 6,3 равновесные концентрации этих форм состояния будут равными. После фотовозбуждения смесь двух ионных форм перейдет в новое равновесное состояние, соответствующее  $pK_a^* 4,8$  со значительным преобладанием концентрации дианиона над моноанионом при том же значении pH. Это произойдет путем фотодиссоциации части моноанионов. В случае  $Q^*-MI^*$ -равновесия, где имеет место другой знак  $\Delta pK_a$ , наоборот, произойдет фотоиндуцированная ассоциация моноаниона с протоном, находящимся в окружении растворителя и его переходом в одну из нейтральных форм. Сложное ионное и таутомерное равновесие с показателями констант диссоциации, приведенными на рис. 3.15, формирует распределение концентраций возбужденных состояний разных форм флуоресцеина (рис. 3.16).

Для концентраций двух таутомеров одного и того же ионного состояния (в нашем случае  $Q^*$  и  $Z^*$ ) характерно синхронное поведение при изменении pH, несмотря на то, что соотношение этих концентраций отличается на несколько порядков (рис. 3.16, на вставке). Различие двух картин распределения концентраций в основном (см. рис. 3.4) и возбужденном (рис. 3.16) состояниях указывает на области pH с эффективным переносом протона в возбужденном состоянии. В этих диапазонах перенос весьма вероятен с энергетической точки зрения, но кинетически реализуем только в том случае, если окружение обеспечивает достаточное количество протонсодержащих добавок.



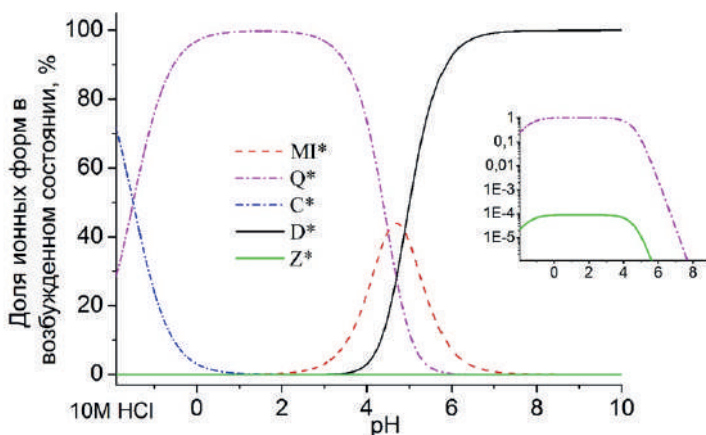


Рис. 3.16. pH зависимость доли ионных/таутомерных форм флуоресцеина в возбужденном состоянии (вставка – Q' и Z' – формы)

Так, в работе [13], где рассматривалось моноанион-дианионное равновесие флуоресцеина, варьировалась концентрация фосфатного буфера, выполняющего роль донора/акцептора протонов. Было показано, что спектр поглощения флуоресцеина не меняется сколь-нибудь существенно с увеличением концентрации буфера. При достижении значения pH 5,9 в буферном растворе флуоресцеина становится возможным протекание реакции переноса протона с преимущественным возбуждением моноаниона. Реакция в возбужденном состоянии может быть детектирована при концентрациях фосфатного буфера, превышающих 20 мМ. В этих условиях моноанион успевает перейти в дианион за время жизни возбужденного состояния. Конверсия обнаруживается экспериментально, как увеличение интенсивности флуоресценции для дианиона и уменьшение для моноаниона. Перенос протона при высоких ионных силах буфера (1 М) происходит настолько быстро, что практически достигается новое ионное равновесие. Таким образом, в физиологической области pH (около 6 единиц), в которой флуоресцеин достаточно часто используется в качестве флуоресцентной метки, перенос протона может играть важную роль. В работе [2] было экспериментально оценено значение  $pK_a^*$  моноанион-дианионного равновесия (около 6,0), которое

так же, как и рассчитанное с помощью цикла Фёрстера (см. рис 3.11), оказалось меньше, чем для основного состояния.

Формализм цикла Фёрстера оказывается весьма чувствительным с математической точки зрения к точности определения величин 0–0 переходов. Даже если предсказанные квантово-химическими расчетами пики вибронных переходов оказываются верными, то величина 0–0 перехода, найденная как полусумма частот пиков поглощения и флуоресценции, может быть определена лишь достаточно грубо из-за отсутствия зеркальной симметрии спектров. Так, ошибка в измерении этой величины на 5 нм в интересующей нас спектральной области приводит к погрешности примерно в 0,5 единиц  $\rho K$ , что является существенным. Кроме того, использованный формализм не позволяет определить направление и эффективность внутримолекулярного переноса протона (в англоязычной литературе для обозначения этого процесса используется термин ESIPT – *Excited State Intramolecular Proton Transfer*), который не приводит к изменению ионного состояния, но влияет на соотношение концентраций таутомеров. Этот процесс для флуоресцеина показан пунктиром на рис. 3.15. Его высокая эффективность может сказываться на картине всего ионного равновесия. Тем не менее с помощью цикла Фёрстера удастся определить направление переноса протона, тогда как более информативные хроноскопические методы зачастую не могут преодолеть предела своей чувствительности обнаружения разных ионных форм флуоресцеина [14].

### 3.5. Использование переноса протона в возбужденном состоянии в задачах биосенсорики

Зависимость эффективности переноса протона от его протондонорного окружения открывает возможности создания сенсоров, использующих перенос протона в возбужденном состоянии. Преимуществами таких устройств является высокая чувствительность, присущая флуоресцентным методам, и возможность проведения измерений в реальном времени.

Так, в работе [15] с помощью флуоресцентных меток наблюдалась ренатурация нуклеиновой кислоты, для чего использовалась ДНК

*E. coli* с N-4-аминоэтил-модифицированными остатками цитозина, способными образовывать связь с молекулами флуоресцеина (доля конъюгатов порядка 4 % от общего числа цитозиновых остатков). Было обнаружено, что интенсивность испускания флуоресцеина, прикрепленного к одноцепочечной ДНК, уменьшается при ренатурировании последней до двухцепочечной. Наблюдаемое снижение интенсивности флуоресценции связано с изменением соотношения между моно- и дианионными формами флуоресцеина вследствие сдвига равновесия из-за изменений pH в окружении флуоресцентной метки.

Продолжаются успешные попытки химического дизайна флуоресцеина в целях изменения его протолитических свойств: числа ионных состояний и констант диссоциации. Так, в качестве нового перспективного флуорофора был предложен 2', 7'-дифторфлуоресцеин (*Oregon Green 488*, *OG488*, рис. 3.17, а) – фторпроизводное флуоресцеина, проявляющее особое многообразие ионных форм. Было установлено, что реакции переноса протонов в возбужденном состоянии между нейтральной, моно- и дианионной формами *OG488* стимулируются ацетатным буфером. В то же время катион ведет себя как «супер-фотокислота», демонстрируя очень высокую скорость депротонирования (константа скорости порядка  $10^{11} \text{ с}^{-1}$ ) в отсутствии дополнительных акцепторов протонов [16]. Такие свойства *OG488* могут оказаться весьма востребованными для его применения в различных флуориметрических методах для задач биомедицинских и биохимических наук.

Фосфат-ионы играют важную роль в передаче сигнала и накоплении энергии в биологических системах, однако их пространственно-разрешенное определение во внутриклеточной среде представляет собой сложную биоаналитическую проблему. Для ее решения было использовано производное флуоресцеина – краситель серии *Tokyo Green*, *TG* (рис. 3.17, б). Этот краситель демонстрирует характерные признаки переноса протона в возбужденном состоянии при физиологических значениях pH и при этом проявляет выраженную зависимость времени жизни флуоресценции от концентрации фосфатного буфера. Объясняется эта зависимость тем, что в возбужденном состоянии краситель подвергается реакции фосфат-опосредованного переноса протонов, приводящей к изменению интенсивности флуоресценции, которое в итоге зависит как от концентрации фосфата, так и от pH среды. В совокупности такие

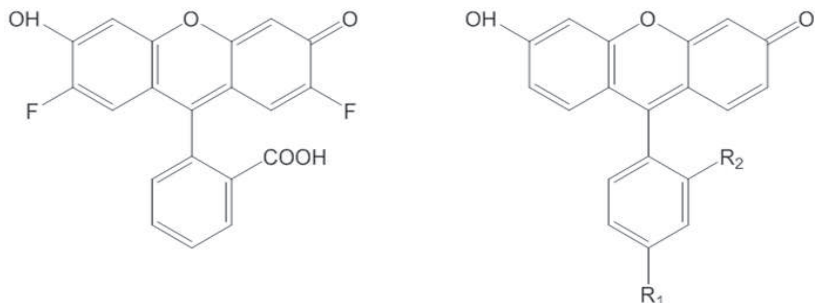


Рис. 3.17. Перспективные флуоресцеиновые красители для флуоресцентных методов исследования в биоаналитике: *а* – Oregon Green 488, OG488; *б* – Granada Green, GG ( $R_1 = -C(CH_3)_3$ ,  $R_2 = -OCH_3$ ) и Tokyo Green, TG ( $R_1 = -OCH_3$ ,  $R_2 = -CH_3$ )

свойства *Tokyo Green* позволяют использовать его в качестве внутриклеточного фосфатного датчика в культивируемых клетках в варианте микроскопической визуализации времени жизни флуоресценции. Так, вышеуказанная методика позволила установить временной ход клеточной дифференцировки клеток мышинных преosteобластов MC3T3-E1 [17].

Для аналогичных целей на основе квантово-химических предсказаний свойств было синтезировано новое производное флуоресцеина – краситель серии *Granada Green*, GG (рис. 3.17, б) с «переключаемой» характеристикой спада флуоресценции *on/off*-типа. Особенностью данного красителя является более высокое значение  $pK_a$  для анион-нейтрального равновесия, чем у флуоресцеина, при этом нейтральная форма GG не флуоресцирует. Использование GG для выявления изменений концентрации фосфатов в живых преosteобластах MC3T3-E1 при pH 7,35 продемонстрировало преимущества данного красителя по сравнению с его предшественниками [18].

В данное время ведутся активные исследования в области создания высокочувствительных сенсоров на основе фотоиндуцированного переноса протона. Существует ряд общих требований к химическим и спектральным свойствам чувствительного элемента таких сенсоров (в данном случае – флуорофора), оптимизация которых является насущной задачей современной науки о красителях. Во-первых, флуорофору должна быть присуща либо одноступенчатая, либо многоступенчатая,

но не перекрывающаяся в шкале рН диссоциация. Во-вторых, соседние протонированные/депротонированные формы должны характеризоваться флуоресценцией, максимально разнесенной в спектральной шкале и/или по временным параметрам, что необходимо для однозначной интерпретации аналитического сигнала флуоресценции. И, наконец, в актуальном диапазоне рН эффективность переноса протона должна регулироваться наличием ионной добавки, в роли которой в данном случае выступает сам аналит. При этом изменение эффективности переноса протона должно способствовать конкуренции с излучательным процессом.

## Литература

1. Мchedlov-Петросян Н.О. Флуоресцентные красители в растворах – хорошо изученные системы? // Вестн. Харьков. нац. ун-та. – 2004. – № 626. Химия. – Вып. 11, № 34. – С. 221–313.
2. Sjöback R., Nygren J., Kubista M. Absorption and fluorescence properties of fluorescein // *Spectrochimica Acta Part A*. – 1995. – Vol. 51. – P. L7–L21.
3. Martin M. M., Lindqvist L. The pH dependence of fluorescein fluorescence // *Journal of Luminescence*. – 1975. – Vol. 10. – № 6. – P. 381–390.
4. Klonis N., Sawyer W.H. Spectral properties of the prototropic forms of fluorescein in aqueous solution // *Journal of Fluorescence*. – 1996. – Vol. 6, № 3. – P. 147–157.
5. Optical pH sensor covering the range from pH 0–14 compatible with mobile-device readout and based on a set of rationally designed indicator dyes / R. Gotor, P. Ashokkumar, M. Hecht, K. Keil, K. Rurack // *Anal. Chem.* – 2017. – Vol. 89. – P. 8437–8444.
6. Слюсарева Е. А., Герасимова М. А. Зависимость от рН абсорбционных и флуоресцентных свойств водных растворов флуороновых красителей // Изв. высш. учеб. заведений. Физика. – 2013. – Т. 56, № 12. – С. 48–54.
7. Спектрально-флуоресцентная индикация кислотно-основных свойств биополимеров / Е. А. Слюсарева, М. А. Герасимова, А. Г. Си-

zych, Л. М. Горностаев // Изв. высш. учеб. заведений. Физика. – 2011. – Т. 54, № 4. – С. 81–87.

8. Picosecond fluorescence studies of xanthene dyes / G. R. Fleming, A.W.E. Knight, J. M. Morris [et al.] // Journal of the American Chemical Society. – 1976. – Vol. 99. – P. 4306–4311.

9. Chunbai He., Kuangda Lu., Wenbin Lin. Nanoscale Metal – Organic Frameworks for Real-Time Intracellular pH Sensing in Live Cells // J. Am. Chem. Soc. – 2014. – Vol. 136. – 12253–12256.

10. Defective pH regulation of acidic compartments in human breast cancer cells (MCF-7) is normalized in adriamycin-resistant cells (MCF-7adr) / M. Schindler, S. Grabski, E. Hoff, S. Simon // M. Biochemistry. – 1996. – Vol. 35(9). – P. 2811–2817.

11. Non-age related differences in thrombin responses by platelets from male patients with advanced alzheimer' s disease / T. A. Davies, R. E. Fine, R. J. Johnson, C. A. Levesque, W. H. Rathbun, K. F. Seetoo, E. R. Simons // Biochem Biophys Res Commun. – 1993. – Vol. 194(1). – P. 537–543.

12. Fluorescence and photoinduced proton transfer in the protolytic forms of fluorescein: Experimental and computational study / M. A. Gerasimova, F. N. Tomilin, E. Yu. Malyar, S. A. Varganov, D. G. Fedorov, S. G. Ovchinnikov, E. A. Slyusareva // Dyes and Pigm. – 2020. – Vol. 173. – P. 107851

13. Steady-state fluorescence method for evaluating excited-state proton reactions – application to fluorescein / J. Yguerabide, E. Talavera, J. M. Alvarez, B. Quintero // Photochem. Photobiol. – 1994. – Vol. 60, № 5. – P. 435 – 441.

14. Лашук О. О., Герасимова М. А., Слюсарева Е. А. Время-разрешенная спектроскопия для разделения сложных составных спектров флуоресценции // Материалы юбилейной Междунар. молодежной конференции по люминесценции и лазерной физике. – Иркутск: Изд-во Иркут. гос. ун-та, 2019. – С. 49–50.

15. Fluorescein-labeled DNA probes for homogeneous hybridization assays: Application to DNA E-coli renaturation / E. M. Talavera, J. M. Alvarez-Pez, L. Ballesteros, R. Bermejo // Appl. Spectrosc. – 1997. – Vol. 51 – P. 401–406.

16. Three-state 2',7'-difluorofluorescein excited-state proton transfer reactions in moderately acidic and very acidic media / A. Orte, E. M. Talavera,

A. L. Macanita, J. C. Orte, J. M. Alvarez-Pez // J. Phys. Chem. A. – 2005. – Vol. 109, №39 – P. 8705–8718.

17. Real-Time phosphate sensing in living cells using fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM) / J. M. Parades, M. D. Giron, M. J. Ruedas-Rama, A. Orte, L. Crovetto, E. M. Talavera, R. Salto, J. M. Alvarez-Pez // J. Phys. Chem. B. – 2013. – Vol. 117, №27 – P. 8143–8149.

18. Rational design of a new fluorescent 'ON/OFF' xanthene dye for phosphate detection in live cells / A. Martinez-Peragon, D. Miguel, A. Orte, A. J. Mota, M. J. Ruedas-Rama, J. Justicia, J. M. Alvarez-Pez, J. M. Cuerva, L. Crovetto // Org. Biomol. Chem. – 2014. – Vol. 12, № 33. – P. 6432–6439.

### ЛАЗЕРНОЕ ОБЕСЦВЕЧИВАНИЕ КРАСИТЕЛЕЙ В ПОЛИМЕРНОЙ МАТРИЦЕ

Фотохимическое обесцвечивание красителей в полимерной матрице имеет сходный характер для всех применявшихся для этой цели флуоресцеиновых красителей – как по экспоненциальной кинетике, так и по абсолютной величине констант скоростей. Наиболее вероятным механизмом является фотовосстановление красителя, находящегося в триплетном состоянии, через радикальную реакцию переноса протона с полимерной матрицы. Специфика красителя выражается в величине энергии, эффективности заселения и релаксации нижнего триплетного состояния, которые напрямую зависят от степени галогенирования молекулы. Важным параметром, влияющим на эффективность фотореакции, является интенсивность излучения, перераспределяющая роли первых и высших триплетных уровней возбуждения.

Предыстория заселения триплетных уровней включает одновременное протекание многих фотофизических процессов с существенно разными вероятностями протекания. Так, наличие долгоживущего триплетного состояния позволило «разглядеть» в системе квазистационарную стадию распределения населенностей и получить аналитическое выражение для эффективной константы скорости фотохимической реакции. Будучи легко измеряемой в режиме реального времени (десятки и сотни секунд), она представляет собой отношение констант много более быстрых процессов, таких как внутренняя и интеркомбинационная конверсия, безызлучательный перенос энергии, флуоресценции и т. д. Это позволяет получать информацию о быстрых процессах без применения уникальной хроноскопической техники. Возможное практическое применение полимерных пленок красителей в качестве нереверсивной регистрирующей среды будет показано на примере записи голограммы плоской волны. Желатиновые пленки эозина просты в изготовлении, обладают светочувствительностью в спектральном диапазоне поглощения красителя, не имеют зерна и не требуют проявления скрытого изображения.



### 4.1. Экспериментальное исследование кинетики фотохимической реакции

Лазер как источник излучения характеризуется рядом замечательных свойств, отличающих его других источников света (тепловых или люминесцентных). Лазерное излучение монохроматично, когерентно, обладает малой расходимостью и обладает высокой интенсивностью. Когда говорят о лазерной фотохимии, подразумевают прежде всего возможность реализации многофотонных и многоступенчатых процессов, а также возможность исследования быстрых стадий фотохимических реакций с временным разрешением вплоть до фемтосекунд. Монохроматичность и малая расходимость пучка существенно облегчает дозиметрию и делает возможным эксперименты в многопроходовом варианте.

В предыдущих главах мы рассмотрели обратимые превращения молекул красителя (преимущественно в растворах) при фотовозбуждении нелазерными источниками. В данной главе речь пойдет о необратимых фотохимических процессах с участием молекул красителя, иммобилизованных в полимерной матрице. В конечном итоге эти процессы приводят к утрате окраски (обесцвечиванию). Фотохимические реакции в таких системах многостадийны, что сильно усложняет их изучение, так как возможно одновременное протекание нескольких конкурирующих процессов с образованием различных продуктов. Использование гомологичного ряда красителей позволяет выявить дополнительные зависимости между молекулярной структурой и кинетическими параметрами реакции.

Для изучения фотохимических реакций используют как экспериментальные, так и расчетные методы, включающие моделирование химической кинетики. Рассмотрим вначале экспериментальные результаты по обесцвечиванию флуоресцеиновых красителей в полимерной матрице.

Первые полосы поглощения флуоресцеиновых красителей лежат в видимой области спектра, но сдвинуты друг относительно друга. Тем не менее существует спектральный диапазон (примерно 480–540 нм), в который попадают полосы поглощения всех исследованных красителей. В него также входит излучение второй гармоники твердотельного Nd:YAG лазера (532 нм) (рис. 4.1). Кроме подходящей длины волны этот лазер обеспечивает интенсивность, достаточную для реализации

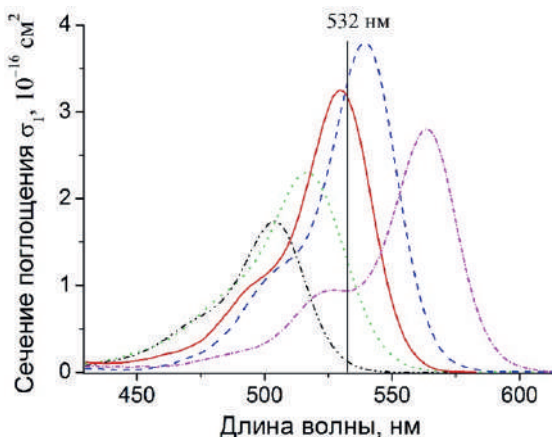


Рис. 4.1. Спектры поглощения флуоресцеиновых красителей (слева направо: флуоресцеин, дибромфлуоресцеин, эозин, эритрозин, бенгальский розовый) в хитозановой пленке

многоступенчатого возбуждения через триплетные состояния при непрерывном режиме облучения.

Количественный подход к фотохимической реакции требует измерения как количества поглощенного света, так и превратившегося вещества. Обе характеристики могут быть измерены напрямую по изменению пропускания образца, содержащего краситель. При этом необходимо соблюсти условие пространственной однородности интенсивности, что особенно важно в случае изучения химической реакции в реакторе, где нет перемешивания. Для того, чтобы приблизить использованные в эксперименте интенсивности к критерию однородности в сечении пучка, были использованы диафрагма, выделяющая центральную часть  $\text{TEM}_{00}$  лазерной моды. Оптимальный размер диафрагмы определялся путем моделирования кинетики фотохимической реакции с учетом гауссова профиля интенсивности лазерного пучка [1].

Особенностью фотохимических реакций, протекающих в твердой фазе, является различная вероятность поглощения света молекулами с разной ориентацией вектора дипольного момента перехода. Кинетике химических реакций в конденсированной фазе посвящен обзор [2]. Кинетическая неэквивалентность частиц в твердой фазе проявляется

в различиях конформационных состояний частиц, в структуре их окружения, в пространственном расположении реагирующих частиц. Для того, чтобы уменьшить влияние этих факторов, было использовано преобразование линейно поляризованного излучения в излучение с круговой поляризацией. Как было показано в работе [3], при моделировании кинетики фотохимической реакции, применение такого типа поляризации наиболее близко по своему фотохимическому эффекту к действию деполаризованного излучения.

Эксперимент заключался в записи кинетики сигнала пропускания образца при непрерывном лазерном облучении разной мощности с контролем падающей интенсивности (рис. 4.2) [4]. Образцы представляли собой тонкие (порядка 10 мкм) хитозановые пленки, содержавшие пять разных флуоресцеиновых красителей. Для того, чтобы уменьшить влияние неоднородности излучения по толщине образца, использовались образцы с оптической плотностью не более единицы. У всех красителей под действием непрерывного лазерного излучения наблюдается необратимое обесцвечивание.

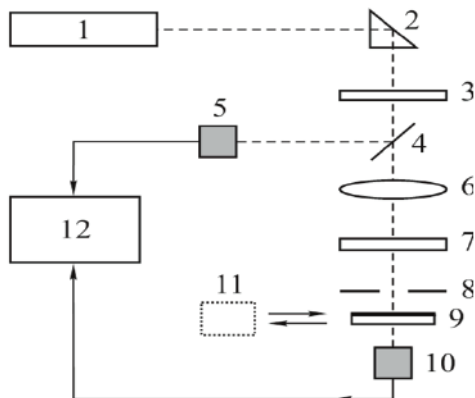


Рис. 4.2. Схема экспериментальной установки. 1 – Nd:YAG лазер Millennium; 2 – призма полного внутреннего отражения; 3 – светофильтр; 4 – полупрозрачное зеркало; 5 – фотодиод ФД-24К; 6 – линза; 7 – пластинка  $\lambda/4$ ; 8 – диафрагма; 9 – образец; 10 – фотодиод ФД-24К; 11 – тепловой фотоприемник 407A Spectra-Physics; 12 – осциллограф NI PXI 5122

На рис. 4.3 приведена фотография образца эозина Y в хитозане после облучения. На фотографии видны ряды обесцвеченных пятен размером с ограничивающую диафрагму. Пятна имеют различную интенсивность окраски, вызванную вариацией времен экспозиции и интенсивностей излучения. Единичное пятно в верхнем ряду получено без использования диафрагмы.

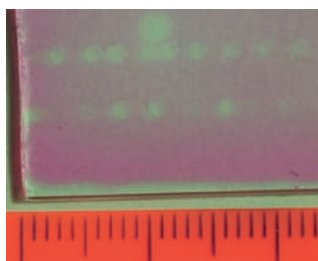


Рис. 4.3. Фотография образца эозина Y в хитозане, подверженного лазерному фотолизу (одно деление – 1 мм)

Изменение оптической плотности  $D$  пленок хитозана с флуоресцеиновыми красителями под действием лазерного излучения различной интенсивности от времени экспозиции показана на рис. 4.4–4.8. Из значений оптической плотности образцов вычтено ее фоновое значение при  $t \rightarrow \infty$ .

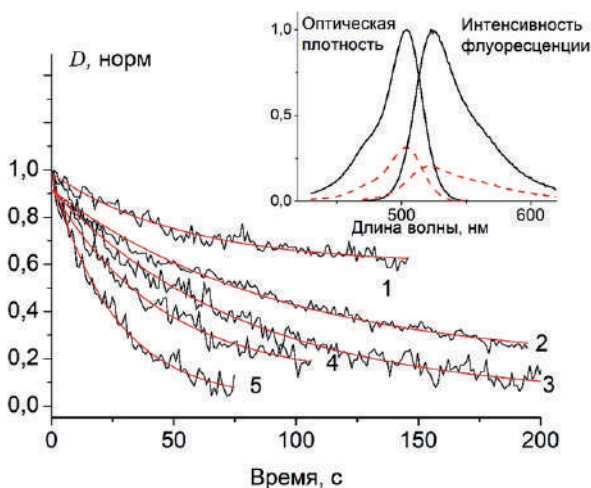


Рис. 4.4. Зависимость оптической плотности флуоресцеина в хитозановой пленке от времени облучения при интенсивностях лазерного излучения: 1 – 0,7; 2 – 1,9; 3 – 4,5; 4 – 7,9; 5 – 11,9 Вт/см<sup>2</sup> (плавные линии – аппроксимация экспоненциальной функцией, вставка: спектры поглощения и флуоресценции до (сплошные линии) и после (пунктир) 11 мин облучения)

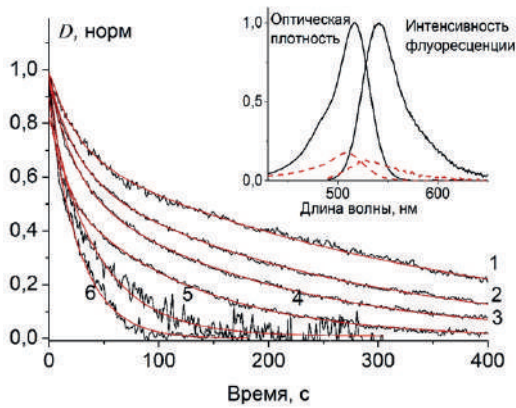


Рис. 4.5. Зависимость оптической плотности дибромфлуоресцеина в хитозановой пленке от времени облучения при интенсивностях лазерного излучения: 1 – 0,7; 2 – 1,1; 3 – 1,9; 4 – 4,5; 5 – 7,9; 6 – 9,2  $\text{Вт/см}^2$  (плавные линии – аппроксимация экспоненциальной функцией, вставка: спектры поглощения и флуоресценции до (сплошные линии) и после (пунктир) 11 мин облучения)

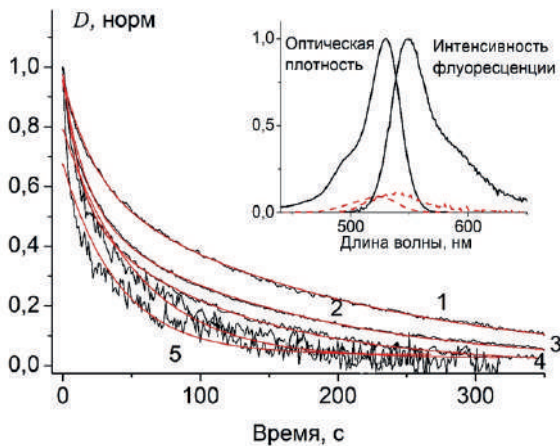


Рис. 4.6. Зависимость оптической плотности эозина в хитозановой пленке от времени облучения при интенсивностях лазерного излучения: 1 – 0,7; 2 – 1,9; 3 – 4,5; 4 – 7,9; 5 – 11,9  $\text{Вт/см}^2$  (плавные линии – аппроксимация экспоненциальной функцией, вставка: спектры поглощения и флуоресценции до (сплошные линии) и после (пунктир) 11 мин облучения)

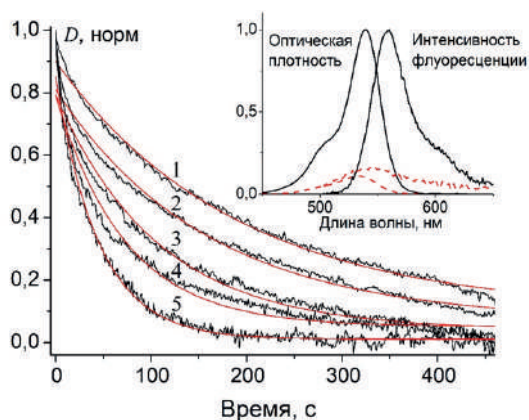


Рис. 4.7. Зависимость оптической плотности эритрозина в хитозановой пленке от времени облучения при интенсивностях лазерного излучения: 1 – 0,7; 2 – 1,9; 3 – 4,5; 4 – 7,9; 5 – 11,9 Вт/см<sup>2</sup> (плавные линии – аппроксимация экспоненциальной функцией, вставка: спектры поглощения и флуоресценции до (сплошные линии) и после (пунктир) 11 мин облучения)

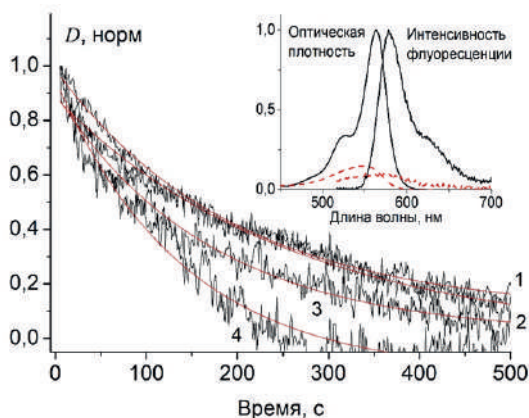


Рис. 4.8. Зависимость оптической плотности бенгальского розового в хитозановой пленке от времени облучения при интенсивностях лазерного излучения 1 – 1,9; 2 – 4,5; 3 – 7,9; 4 – 11,9 Вт/см<sup>2</sup> (сплошные линии – аппроксимация экспоненциальной функцией, вставка: спектры поглощения и флуоресценции до (сплошные линии) и после (пунктир) 11 мин облучения)

Для всех красителей характерен рост скорости обесцвечивания с увеличением интенсивности. На вставках к рис. 4.4–4.8 приведены нормированные на максимум спектры поглощения и флуоресценции флуоресцеиновых красителей до облучения и спустя продолжительное время, после которого изменение пропускания не происходит, а также соблюдено отношение амплитуд спектров образцов до и после облучения. Судя по положению спектров, основной формой красителей до их облучения является дианионная форма. Остаточная оптическая плотность отражает специфику фотохимических реакций, протекающих в отсутствие перемешивания в реакторе (в нашем случае в твердой матрице).

Временные зависимости оптической плотности для образцов всех флуоресцеиновых красителей удовлетворительно ( $R^2 > 0,94$ ) описываются экспоненциальной зависимостью

$$\frac{D(t)}{D_{t=0}} = \exp(-kt) \quad (4.1)$$

с показателем  $k$  ( $\text{с}^{-1}$ ), имеющим смысл эффективной константы скорости обесцвечивания. Константа  $k$  для каждого красителя существенно зависит от интенсивности лазерного излучения. Эта зависимость представлена на рис. 4.9. В рассмотренном интервале интенсивностей для всех исследо-

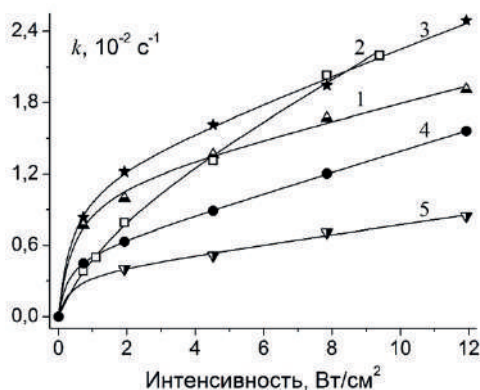


Рис. 4.9. Зависимость эффективной константы скорости обесцвечивания  $k$  от интенсивности лазерного излучения: 1 – флуоресцеин; 2 – дибромфлуоресцеин; 3 – эозин; 4 – эритрозин; 5 – бенгальский розовый (воспроизведено по [4])

ванных красителей зависимость имеет две линейные области: при малой (начальный участок) и большой интенсивности. Полученные результаты будут обсуждены с привлечением модели кинетики фотореакции.

## 4.2. Моделирование кинетики фотохимической реакции

Теперь, когда мы экспериментально получили зависимости изменения концентрации исходной формы пяти флуоресцеиновых красителей от времени, обратимся к кинетической модели лазерного обесцвечивания [5]. Эта модель формализует динамику населенностей уровней, изображенных на рис. 1.1, в систему кинетических уравнений. Эта система является универсальной для всего набора красителей, а индивидуальность каждого красителя задается кинетическими константами. Большинство констант рассчитано либо с помощью прямых спектральных и хроноскопических измерений (см. п. 2.3), либо определяется условиями эксперимента (например интенсивностью лазерного излучения).

При резонансном поглощении непрерывного лазерного излучения в длинноволновой полосе способны эффективно заселяться не только синглетные, но и триплетные уровни. Вероятный интеркомбинационный переход и последующее триплет-триплетное поглощение заселяют одно из высших триплетных состояний красителя, которое, как и первое триплетное состояние, рассматривается как потенциально реакционно-способное. Система уравнений материального баланса для населенностей  $[S_0]$ ,  $[S_1]$ ,  $[T_1]$ ,  $[T_n]$  уровней с учетом обозначений, принятых на рис 1.1, имеет следующий вид:

$$\begin{aligned}\frac{d[S_0]}{dt} &= k_{\text{кв}1} [S_0] - (k_{\text{рад}1} + k_{\text{T}}^{\text{S}_1}) [S_1] - (k_{\text{рад}1} + k_{\text{qT}_1}) [T_1], \\ \frac{d[S_1]}{dt} &= I_{\text{кв}1} [S_0] - (k_{\text{рад}, \text{S}_1} + k_{\text{икк}} + k_{\text{T}}^{\text{S}_1}) [S_1], \\ \frac{d[T_1]}{dt} &= k_{\text{икк}} [S_1] - (k_{\text{рад}, \text{T}_1} + k_{\text{T}}^{\text{T}_1} + k_{\text{кв}2} + k_{\text{хим1}}) [T_1] - k_{\text{вк}} [T_n], \\ \frac{d[T_n]}{dt} &= (k_{\text{вк}} + k_{\text{хим}n}) [T_n] - k_{\text{кв}2} [T_1].\end{aligned}\quad (4.2)$$



В связи с малой эффективностью обратной интеркомбинационной конверсии и замедленной флуоресценции (квантовый выход не более 0,6 %, см. прил.) данные процессы не учитывались. Вынужденные процессы выбранном режиме накачки также не учитывались из-за их низкой вероятности по сравнению со спонтанными. Начальные условия для системы (4.2) выглядят следующим образом:

$$[S_0]_{t=0} = 1, [S_1]_{t=0} = [T_1]_{t=0} = [T_n]_{t=0} = 0. \quad (4.3)$$

Аналитическое решение системы (4.2) с учетом начальных условий можно получить методом собственных значений. Пример такого решения для эозина в желатине представлен на рис. 4.10. Можно выделить три характерных временных стадии фотохимического процесса:

1.  $0-10^{-3}$  с – эффективно работают быстрые фотофизические процессы, верхняя граница этого интервала определяется характерным временем жизни фосфоресцентного состояния;

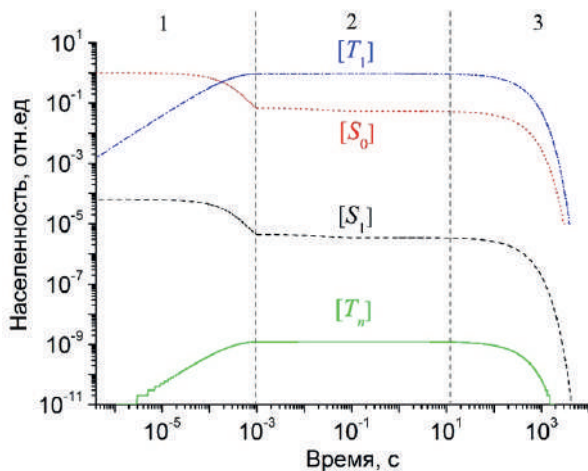


Рис. 4.10. Динамика населенностей энергетических уровней эозина при непрерывном фотовозбуждении, использованы константы  $k\sigma_1 = 4 \cdot 10^3 \text{ с}^{-1}$ ,  $k_{\text{хим},1} = 10^{-3} \text{ с}^{-1}$ ,  $k_{\text{хим},n} = 10^6 \text{ с}^{-1}$ ,  $k_{\text{вк}} = 10^{12} \text{ с}^{-1}$ , остальные заимствованы из прил., цифрами показаны три стадии фотохимического процесса

2.  $10^{-3}$ – $1$  с – установилось квазистационарное распределение населенностей;

3.  $1$ – $10^3$  с – происходит накопления фотопродукта.

Интенсивность фотовозбуждения существенно влияет на соотношение населенностей основного и первого триплетного уровней в квазистационарной стадии. При выбранных константах скоростей населенность первого триплетного уровня оказалось выше, чем синглетного. При ненулевой интенсивности населенности  $S_0$  и  $T_1$  уровней будут на несколько порядков выше населенности уровня  $S_1$ , который эффективно релаксирует за счет флуоресценции, тушения и интеркомбинационной конверсии. Населенность высшего триплетного состояния представляет собой наименьшую величину (на 8–9 порядков меньше, чем первого триплетного уровня) из-за рекордной в данной системе скорости внутренней конверсии триплетного состояния. Расчет показывает, что влияние бесцветного фотопродукта на оптико-спектральные свойства красителя проявляются на временах от 1 с и достигает существенно-го значения на  $10^3$  с. Наибольший практический интерес представляет последняя, «медленная» стадия фото процессов, поскольку именно она является предметом кинетических измерений (4.1). Дальнейшее изложение посвящено нахождению аналитического выражения для  $k$ .

Основываясь на законе Бугера – Ламберта – Бера, можно показать, что величина  $B$ , имеющая смысл суммарной концентрации всех состояний исходной формы красителя

$$B = [S_0] + [S_1] + [T_1] + [T_n], \quad (4.4)$$

убывает в системе с той же скоростью  $k$ , что и измеряемая в эксперименте оптическая плотность на длине волны возбуждения. С одной стороны, изменение этой величины характеризуется уравнением

$$\frac{dB}{dt} = - [k], \quad (4.5)$$

с другой, определяется путем суммирования левых и правых частей уравнений (4.2):

$$-\frac{dB}{dt} = k_{\text{хим1}}[T_1] + k_{\text{химn}}[T_n]. \quad (4.6)$$

Для того, чтобы последнее уравнение содержало только одну переменную  $B$ , найдем соотношение между ней и населенностями отдельных уровней. Воспользуемся системой уравнений, которая устанавливает баланс населенностей в квазистационарной стадии фотохимической реакции:

$$\begin{aligned} -I_{\text{кв}}\sigma_1[S_0] + (k_{\text{рад } S_1} + k_{\text{T}}^{S_1})[S_1] + (k_{\text{рад } T_1} + k_{qT_1})[T_1] &= 0, \\ I_{\text{кв}}\sigma_1[S_0] - (k_{\text{рад } S_1} + k_{\text{инк}} + k_{\text{T}}^{S_1})[S_1] &= 0, \\ k_{\text{инк}}[S_1] - (k_{\text{рад } T_1} + k_{\text{T}}^{T_1} + I_{\text{кв}}\sigma_2 + k_{\text{хим } 1})[T_1] + k_{\text{вк}}[T_n] &= 0, \\ -(k_{\text{вк}} + k_{\text{хим } n})[T_n] + I_{\text{кв}}\sigma_2[T_1] &= 0. \end{aligned} \quad (4.7)$$

Уравнения (4.4) и (4.7) позволяют связать переменные  $[S_0]$ ,  $[S_1]$ ,  $[T_1]$ ,  $[T_n]$  и  $B$ :

$$[S_0] = \frac{\tau_{\text{фосф}}^{-1} k_{\text{вк}} \tau^{-1}}{(\tau_{\text{фосф}}^{-1} + k_{\text{инк}}) k_{\text{вк}} I_{\text{кв}} \sigma_1 + k_{\text{вк}} \tau_{\text{фосф}}^{-1} \tau^{-1} + I_{\text{кв}}^2 \sigma_1 \sigma_2 k_{\text{инк}}} B, \quad (4.8)$$

$$[S_1] = \frac{\tau_{\text{фосф}}^{-1} k_{\text{вк}} I_{\text{кв}} \sigma_1}{(\tau_{\text{фосф}}^{-1} + k_{\text{инк}}) k_{\text{вк}} I_{\text{кв}} \sigma_1 + k_{\text{вк}} \tau_{\text{фосф}}^{-1} \tau^{-1} + I_{\text{кв}}^2 \sigma_1 \sigma_2 k_{\text{инк}}} B, \quad (4.9)$$

$$[T_1] = \frac{k_{\text{инк}} k_{\text{вк}} I_{\text{кв}} \sigma_1}{(\tau_{\text{фосф}}^{-1} + k_{\text{инк}}) k_{\text{вк}} I_{\text{кв}} \sigma_1 + k_{\text{вк}} \tau_{\text{фосф}}^{-1} \tau^{-1} + I_{\text{кв}}^2 \sigma_1 \sigma_2 k_{\text{инк}}} B, \quad (4.10)$$

$$[T_n] = \frac{k_{\text{инк}} I_{\text{кв}}^2 \sigma_1 \sigma_2}{(\tau_{\text{фосф}}^{-1} + k_{\text{инк}}) k_{\text{вк}} I_{\text{кв}} \sigma_1 + k_{\text{вк}} \tau_{\text{фосф}}^{-1} \tau^{-1} + I_{\text{кв}}^2 \sigma_1 \sigma_2 k_{\text{инк}}} B. \quad (4.11)$$

Для упрощения записи было учтено, что

$$\begin{aligned} (k_{\text{рад } T_1} + k_{\text{T}}^{T_1}) &= 1 \tau_{\text{фосф}}^{-1}, \quad (k_{\text{рад } S_1} + k_{\text{T}}^{S_1} + k_{\text{инк}}) = 1 \tau^{-1}, \\ k_{\text{хим } n} &\ll k_{\text{вк}}, \quad k_{\text{хим } 1} \ll I \sigma_2 + \tau_{\text{фосф}}^{-1}. \end{aligned}$$

Легко показать, что при суммировании левых и правых частей уравнений (4.8)–(4.11) получается выражение (4.4).

С помощью уравнений (4.10), (4.11) преобразуем выражение (4.6) в уравнение одной переменной  $B$ . Приравняем правую часть полученного уравнения к правой части уравнения (4.5). Полученное соотношение содержит только константы фотопроцессов, а выражение для  $k$  после удобной перегруппировки выглядит следующим образом:

$$\alpha k = \left( k_{\text{хим1}} \frac{k_{\text{химл}} \sigma_2}{k_{\text{вк}}} I_{\text{кв}} \right), \quad (4.12)$$

где

$$\alpha = \left( 1 + \frac{1}{\tau_{\text{фосф}} \tau k_{\text{икк}} I_{\text{кв}} \sigma_1} \right)^{-1}. \quad (4.13)$$

Полученное выражение для эффективной константы скорости фотохимической реакции имеет простой вид и учитывает общий случай реакционной способности первых и высших триплетных состояний. Параметр  $\alpha$  содержит экспериментально измеряемые константы скоростей фотопроцессов и изменяется в пределах от нуля до единицы, достигая максимального значения при интенсивностях лазерного излучения,

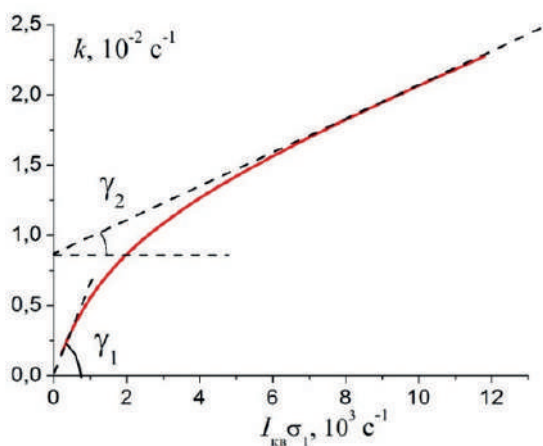


Рис. 4.11. Зависимость эффективной константы скорости фотохимической реакции от константы скорости поглощения (использованы данные для эозина в желатине)

насыщающих первое триплетное состояние. В этом случае зависимость  $k$  от интенсивности имеет наиболее простой вид, а именно линейную зависимость, из которой легко найти значения  $k_{\text{хим } 1}$ ,  $k_{\text{хим } n}$ .

В общем случае при  $\alpha \neq 1$  зависимость эффективной константы скорости фотохимической реакции от константы скорости поглощения, полученная с использованием данных для эозина в желатине (см. прил.) приведена на рис. 4.11. Зависимость имеет две линейных области:

- малой интенсивности (с тангенсом угла наклона  $\gamma_1$ , равным  $\tau_{\text{фосф}} \tau k_{\text{инк}} k_{\text{хим } 1}$ );
- большой интенсивности (с тангенсом угла наклона  $\gamma_2$ , равным  $\frac{k_{\text{хим } n}}{k_{\text{вк}}} \frac{2}{\sigma_1}$ ).

Эта зависимость имеет характер, аналогичный полученной в экспериментальной части работы (см. рис. 4.9). Сравнивая экспериментальные результаты и результаты моделирования, можно при любом значении  $\alpha$  определить коэффициенты  $\gamma_1$  и  $\gamma_2$ , которые, в свою очередь, пропорциональны константам скоростей химической реакции с разных уровней возбуждения.

### 4.3. Обсуждение механизма фотообесцвечивания красителя в полимере

Проанализируем экспериментальные результаты с помощью формулы (4.12), используя известные значения констант скоростей процессов. Сечения поглощения на первых синглет-синглетных и триплет-триплетных переходах, константа  $k_{\text{вк}}$ , значения  $\alpha$ , рассчитанные с использованием данных прил. по формуле (4.13), приведены в табл. 4.1. Параметр  $\alpha$  принимает значения меньше единицы во всем исследованном интервале интенсивностей. Для эозина и эритрозина этот параметр достигает максимального значения среди всех красителей благодаря большому значению сечения поглощения на выбранной длине волны возбуждения (см. рис. 4.1). Описание зависимости эффективной константы скорости фотообесцвечивания  $k$  от интенсивности с помощью формул (4.12) позволило определить константы скоростей химической реакции с первого и высоковозбужденного триплетных состояний красителя.

Таблица 4.1

Константы фотопроцессов, необходимые для расчета констант скоростей химической реакции и значения  $k_{\text{хим } 1}$ ,  $k_{\text{хим } л}$

Параметр	Флуоресцеин	Дибром-флуоресцин	Эозин	Эритрозин	Бенгальский розовый
$\sigma_1$ (532 нм), $10^{-16}$ см <sup>2</sup>	0,14	1,33	3,19	3,28	0,93
$\sigma_2$ (532 нм), $10^{-17}$ см <sup>2</sup>	2,6 [6]	3,5*	3,5 [7]	3,6 [7]	3,9 [7]
$k_{\text{вк}}$ , $10^{12}$ с <sup>-1</sup>	1*	1*	1 [8]	2 [8]	1 [8]
$\alpha^{***}$ (0,7 ÷ 11,9) Вт/см <sup>2</sup>	0,07 ÷ 0,58	0,15 ÷ 0,77	0,25 ÷ 0,86	0,14 ÷ 0,75	0,02 ÷ 0,26
$k_{\text{хим } 1}$ , $10^{-3}$ с <sup>-1****</sup>	11,7 ± 1,6	11,6 ± 2,0	13,8 ± 1,4	5,4 ± 0,9	3,9 ± 1,1
$k_{\text{хим } л}$ , $10^6$ с <sup>-1****</sup>	10,5	16,9	10,3	18,6	3,9

\* Взято равным для эозина;

\*\* рассчитано по формуле (4.13) с использованием данных прил.;

\*\*\* получено путем аппроксимации экспериментальных результатов с помощью формулы (4.12).

В табл. 4.1. показан существенный (примерно девять порядков) контраст в значениях констант скоростей химической реакции первого  $k_{\text{хим } 1}$  и высоковозбужденного  $k_{\text{хим } л}$  триплетного состояний для всех флуоресцеиновых красителей. В то же время эти величины для одного уровня возбуждения варьируются не значительно в пределах всего флуоресцеинового ряда. Это говорит о том, что наличие галогена в структуре красителя не определяет механизм самой фотохимической реакции.

Особого обсуждения заслуживает флуоресцеин с высоким квантовым выходом флуоресценции и, соответственно, низким выходом интеркомбинационной конверсии. Низкая эффективность заселения первых триплетных уровней компенсируется большим временем жизни его фосфоресцентного состояния, что создает предпосылку для протекания фотохимической реакции со скоростью, сравнимой со скоростями химической реакции галогензамещенных флуоресцеинов.

Оценим вклад триплетных состояний разного уровня возбуждения в кинетику химической реакции. Воспользуемся формулами (4.10) и (4.11) и рассчитаем отношение населенностей первого и высшего триплетных состояний:

$$\frac{[T_1]}{[T_n]} = \frac{k}{I_{\text{кв}} \sigma_2}. \quad (4.14)$$

В исследованном интервале эта величина составляет  $10^{10}$ – $10^{11}$ . Скорость реакции первых триплетных состояний  $[T_1] \cdot k_{\text{хим } 1}$  оказывается на один–два порядка выше, чем высших триплетных состояний  $[T_n] \cdot k_{\text{хим } n}$ . Таким образом, несмотря на высокую константу скорости химической реакции молекул с высших триплетных состояниях, из-за их низкой концентрации ощутимый вклад в химическую реакцию вносят первые триплетные состояния. Рост интенсивности более чем на порядок по сравнению с использованной (около  $100 \text{ Вт/см}^2$ ) существенно увеличит вклад высших триплетных состояний.

Подобный результат был получен при лазероиндуцированном обесцвечиванию эозина К (калиевой соли эозина) в другой биополимерной матрице – желатине [5]. Был обнаружен линейный характер зависимости  $k(I)$ , наблюдаемый при интенсивностях, обеспечивающих условие  $\alpha \approx 1$ . Согласно полученным результатам величина  $k_{\text{хим } n}$  составила  $(1,3 \pm 0,1) \cdot 10^{-6} \text{ с}^{-1}$ , что говорит о сходимости результатов в пределах порядка с одной стороны и наличии специфики биополимерной матрицы в кинетике фотохимической реакции с другой.

Среди возможных механизмов лазероиндуцированного обесцвечивания красителей в полимерных матрицах в отсутствии добавок, корректирующих фотохимические процессы, обычно обсуждаются следующие [9]: фотообесцвечивание красителя с участием протонодонорных и электронодонорных групп; фотообесцвечивание в результате бимолекулярного взаимодействия красителя в триплетном состоянии; дегалогенирование.

На основании полученных результатов можно утверждать, что обесцвечивание флуоресцеиновых красителей происходит в результате следующей последовательности событий: поглощения лазерного излучения на синглет-синглетном переходе, интеркомбинационной конверсии в первое триплетное состояние  $T_1$  и последующего триплет-триплетного поглощения в состояния  $T_n$ . Фотообесцвечивание красителей состоит в реакции красителя, находящегося в одном из триплетных состояний с полимерной матрицей. В результате происходит модификация структуры красителя в форму, не имеющую интенсивного спектра

поглощения в видимой области. Установление структуры фотопродукта может быть произведено, например методом ИК-спектроскопии. Неоспоримым фактом является то, что цветная и бесцветная формы красителя разделены энергетическим барьером, на преодоление которого расходуется энергия кванта света.

Непротиворечивой версией механизма фотообесцвечивания в нашем случае можно считать сенсibilизированный возбужденным красителем отрыв водорода от полимерной матрицы. Реакцию фотовосстановления молекулы (К) органическим восстановителем  $H_2R$  можно представить схемой (рис. 4.12).

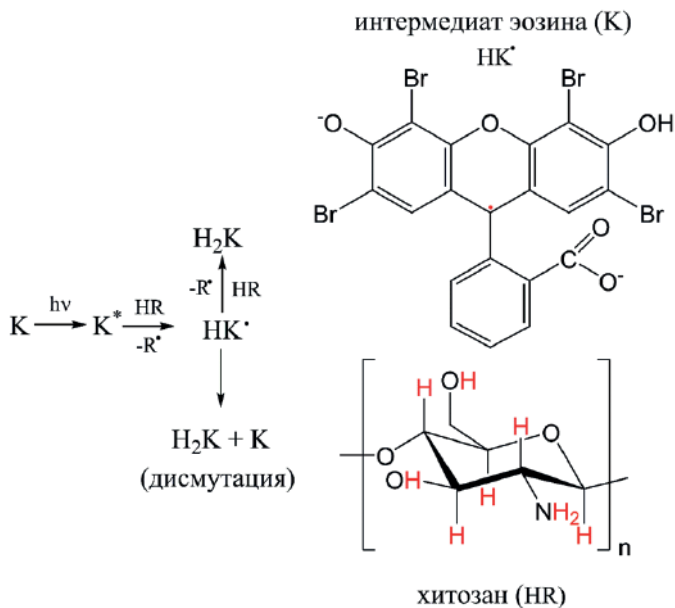


Рис. 4.12. Схема восстановления красителя (слева) и расположение реакционных групп (справа)

Эта схема предполагает наличие двух механизмов фотовосстановления, приводящих к одному и тому же результату – переносу атомов водорода с восстановителя на молекулу красителя. При этом восстановитель может претерпевать различные химические превращения,



приводящие к широкому спектру продуктов реакции. Промежуточные этапы реакции в нормальных условиях протекают достаточно быстро, поэтому итог окислительно-восстановительной реакции внешне представляется как реакция присоединения водорода [10]. В отсутствие кислорода фотовосстановление является необратимым, если окисленный восстановитель не способен к обратному присоединению водорода. Обсудим эти механизмы с точки зрения кинетики реакции, энергетического баланса и роли полимерной матрицы.

*Кинетика обесцвечивания.* Реакция дисмутации носит бимолекулярный характер и имеет кинетку, отличную от экспоненциальной. Кроме того, для эффективного протекания такой реакции требуется сближение молекул красителя на достаточно близкое расстояние, обеспечивающее перекрывание электронных облаков (1,0–1,5 нм). Оценка среднего расстояния между молекулами при концентрации красителя  $\sim 10^{-3}$  М дает значение около 14 нм. Локализация молекул красителя на соседних мономерных группах хитозана маловероятна. Можно считать, что бимолекулярный механизм при указанных условиях не реализуется.

В нашем случае фотохимическая кинетика описывается экспоненциальной зависимостью, характерной для квазимономолекулярных механизмов реакции, когда один из компонентов реакции находится в избытке. Таким избыточным компонентом можно считать восстановитель от полимерного окружения.

*Энергетический баланс.* Двухступенчатое возбуждение позволяет молекуле накопить избыток энергии, достаточный для активации реакции обесцвечивания через высшее триплетное состояние. Энергия кванта лазерного излучения на длине волны 532 нм составляет  $226 \text{ кДж} \cdot \text{моль}^{-1}$ , поглощение второго кванта из нижнего колебательного уровня первого триплетного состояния ряда флуоресцеиновых красителей позволяет достичь состояния возбуждения с энергией в интервале  $387\text{--}415 \text{ кДж} \cdot \text{моль}^{-1}$ . Известно, что энергия отрыва водорода от молекулярных групп хитозана лежит в пределах  $357\text{--}433 \text{ кДж} \cdot \text{моль}^{-1}$  [11], что примерно соответствует интервалу энергии возбуждения высших триплетных состояний красителей. Самая низкая константа скорости фотообесцвечивания была получена для бенгальского розового, что также согласуется с экспериментальными результатами работы [9]. Причиной этого является низкое значение энергии триплетного состояния,

в результате чего максимум спектра флуоресценции сдвинут примерно на 50 нм в красную область по сравнению с остальными красителями (см. п. 2.3). Это не позволяет молекуле красителя запасти энергию, необходимую для эффективного протекания фотохимической реакции. О прямой связи величины энергии, поглощенной в двухступенчатом процессе возбуждения, с эффективностью фотохимической реакции говорит и достаточно высокий коэффициент корреляции (0,84) энергии первых триплетных уровней ( $1/\lambda_{\text{фосф}}$ , см. прил.) флуоресцеиновых красителей и констант скоростей  $k_{\text{хим,л}}$ .

Для объяснения механизма фотохимической реакции с участием первого триплетного состояния следует предположить существование в полимере слабо связанных атомов водорода с пороговой энергией отрыва, близкой к энергии вышеуказанного состояния.

*Роль матрицы в процессе обесцвечивания.* Для выяснения роли полимерной матрицы в кинетике фотохимической реакции в работе [12] было проведено исследование фотообесцвечивания эозина К в трех существенно различных по химической природе матрицах (поливинилбутираль, желатина и хитозан), которое показано, что величины констант скоростей фотохимической реакции  $k$  расположились в следующем порядке по убыванию: поливинилбутираль –  $(1,3 \pm 0,2) \cdot 10^{-2} \text{ с}^{-1}$ , желатина –  $(8,5 \pm 0,8) \cdot 10^{-3} \text{ с}^{-1}$ , хитозан –  $(2,3 \pm 0,4) \cdot 10^{-3} \text{ с}^{-1}$ . В аналогичном порядке располагается ряд полимеров по нахождению их длинноволновых краев спектров поглощения. Возможное объяснение этому факту можно дать, сопоставляя энергетические схемы красителя и полимеров. Действительно, энергия отрыва атома водорода от разных функциональных групп в ряде полимеров лежит в пределах 37 000–60 000  $\text{см}^{-1}$  [11]. Значение энергии перехода  $S_0 \rightarrow S_1$  в эозине составляет около 20 000  $\text{см}^{-1}$ . Для протекания реакции необходимо достичь перекрытия полосы энергии электронно-колебательного возбуждения красителя с краем полосы поглощения полимера, что и реализуется при двухступенчатом поглощении в состояние  $T_n$ . Выдвинутая гипотеза о роли полимерной матрицы хорошо согласуется с экспериментальными данными.

Поскольку аминокислотосодержащие соединения являются тушителями возбужденных состояний разной мультиплетности [9], то аминокислоты хитозана предположительно могут способствовать снижению скорости фотообесцвечивания красителей. Поливинилбутираль, не имеющий

в своей структуре аминогрупп, демонстрирует максимальную из трех биополимеров скорость фотообесцвечивания, желатина с меньшим содержанием аминогрупп, чем хитозан, занимает промежуточное положение. Таким образом, энергия отрыва атома водорода от разных функциональных групп в ряде полимеров и тушение аминогруппами являются факторами, влияющими на скорость фотообесцвечивания красителя в биополимерах.

Определенную роль в процессе протекания фотохимической реакции могут играть водородные связи. Известно, что более прочная водородная связь приводит к усилению тенденции переноса протона [13]. Следовательно, образование межмолекулярных водородных связей краситель – хитозан может уменьшать энергию отрыва водорода в реакции фотообесцвечивания.

#### 4.4. Влияние акцептора энергии возбуждения на кинетику фотохимической реакции донора

В растворах, содержащих донорно-акцепторную пару красителей, межмолекулярный перенос энергии уменьшает населенность возбужденных состояний донора, замедляя тем самым скорость его фотообесцвечивания (см. рис. 1.2). При наличии дополнительного канала дезактивации первого синглетного состояния донора время жизни его флуоресцентного состояния

$$\tau^D = \frac{1}{k_{\text{фл}} + k_T^{S_1} + k_{\text{икк}} + k_{\text{ПЭ}}[A]}. \quad (4.15)$$

Отношение эффективных констант скоростей фотообесцвечивания красителя в отсутствие ( $k$ ) и присутствии ( $k'$ ) акцептора от его концентрации  $[A]$  согласно (4.12), (4.13) будет определяться выражением

$$\frac{k}{k'} = 1 + \frac{\tau^D}{1 + \tau_{\text{Фосф}} \tau^D k_{\text{икк}} I_{\text{кв}} \sigma_1} k_{\text{ПЭ}}[A]. \quad (4.16)$$

Полученное отношение линейно зависит от концентрации акцептора. В предельных случаях  $\tau_{\text{Фосф}} \tau^D k_{\text{икк}} I_{\text{кв}} \sigma_1 \gg 1$  (большая интенсив-

ность) и  $\tau_{\text{фосф}}^{\text{Л}} k_{\text{нкк}} I \sigma_1 \ll 1$  (малая интенсивность) выражение (4.16) упрощается. В первом случае

$$\frac{k}{k'} = 1 - (\tau_{\text{фосф}}^{\text{Л}} k_{\text{нкк}} I_{\text{кв}} \sigma_1)^{-1} k_{\text{ПЭ}} [A], \quad (4.17)$$

при слабой интенсивности получаем

$$\frac{k}{k'} = 1 - \tau_{\text{ПЭ}}^{\text{Л}} k_{\text{ПЭ}} [A]. \quad (4.18)$$

Правая часть последнего выражения полностью аналогична правой части соотношения Штерна – Фольмера для отношения квантовых выходов (интенсивностей флуоресценции) молекулы в отсутствие и присутствии тушителя (1.27). Использование выражения (4.16) является оригинальным способом нахождения константы скорости переноса энергии, альтернативным традиционному методу по тушению флуоресценции.

Экспериментальную проверку фотохимического метода изучения переноса энергии осуществим, используя растворы двух ксантовых красителей (эозин Y и родамин В) в желатиновых пленках [14, 15]. Эти красители являются эффективной донорно-акцепторной парой с радиусом Фёрстера около 5,5 нм (см. п. 2.5). Немаловажно, что родамин В, выполняющий роль акцептора, фотохимически стабилен при лазерном облучении на использованной длине волны 488 нм. Было приготовлено несколько образцов – пленок с фиксированной концентрацией красителя эозина ( $2,16 \cdot 10^{-2}$  М), родамина В и различным соотношением концентраций донора и акцептора. Интенсивность излучения обеспечивала величину константы скорости поглощения  $I_{\text{кв}} \sigma_1$  около  $2 \cdot 10^4 \text{ с}^{-1}$ .

Изменения оптической плотности образцов в процессе фотолиза представлены на рис. 4.13. При увеличении концентрации акцептора скорость изменения оптической плотности образцов уменьшается, и это изменение связано преимущественно с обесцвечиванием донора. Эффективная константа скорости фотохимической реакции донора определялась путем аппроксимации экспериментальных данных экспоненциальной зависимостью:

$$\Delta D = \Delta D_{\infty} + \text{const} \cdot \exp(-kt). \quad (4.19)$$

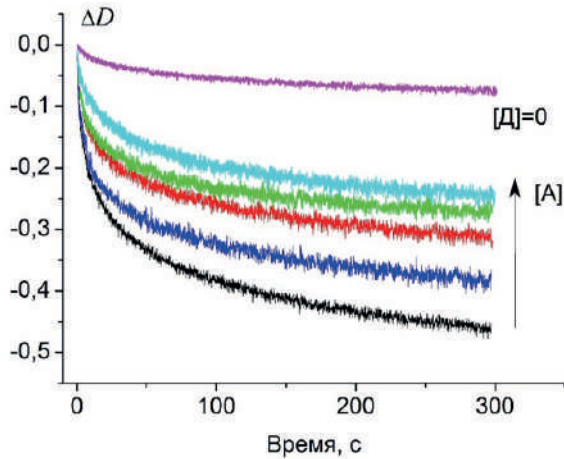


Рис. 4.13. Изменение оптической плотности от времени в процессе лазерного фотолиза. Верхняя зависимость: образец содержит только акцептор ( $2,16 \cdot 10^{-2}$  М), нижняя зависимость: образец содержит только донор ( $2,16 \cdot 10^{-2}$  М), остальные кривые соответствуют разному соотношению донора и акцептора (50:1, 10:1, 5:1, 1:1)

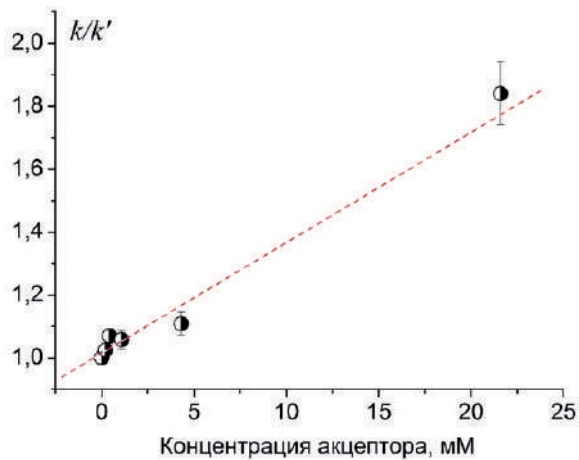


Рис. 4.14. Отношение эффективной константы скорости фотообесцвечивания красителя в присутствии ( $k'$ ) и отсутствии ( $k$ ) акцептора от концентрации акцептора

На рис. 4.14 представлены экспериментальные зависимости в координатах отношения эффективных констант скорости фотообесцвечивания красителя в отсутствии ( $k$ ) и присутствии ( $k'$ ) акцептора от его концентрации  $[A]$ . Зависимость имеет линейный характер с тангенсом угла наклона  $35 \pm 4 \text{ M}^{-1}$ . Поскольку при использованном значении интенсивности  $\tau_{\text{фосф}} \tau^{\Delta} k_{\text{нкк}} I\sigma_1 \gg 1$ , то для расчета константы переноса энергии воспользуемся формулой (4.17). С учетом известных констант скоростей фотопроцессов (см. прил.) значение бимолекулярной константы скорости переноса энергии составило  $(1,8 \pm 0,3) \cdot 10^{11} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ .

Полученное значение константы скорости в пределах погрешности совпадает с найденным традиционным способом – по тушению флуоресценции (см. п. 2.5). Фотохимически стабильный акцептор можно использовать в качестве ловушки энергии возбуждения, повышая тем самым фотостабильность донора: при одинаковом соотношении донора и акцептора эффективная скорость фотообесцвечивания уменьшается приблизительно в два раза.

#### 4.5. Кинетика фотохимической реакции с участием высоковозбужденных состояний красителя

В п. 4.1 был рассмотрен случай двухступенчатого заселения реакционноспособных высших триплетных состояний под действием непрерывного лазерного излучения. В этой схеме возбуждение первой ступени осуществляется на переходе  $S_0 \rightarrow S_1$ . Далее следовал интеркомбинационный переход в состояние  $T_1$ , где вследствие большого времени жизни достигалась ощутимая населенность. Заселение  $T_n$  уровней становилось возможным благодаря второй ступени возбуждения (переход  $T_1 \rightarrow T_n$ ) с соответствующей этому переходу константой скорости (рис. 4.15, а).

Рассмотрим альтернативный способ, при котором возбуждение высших триплетных состояний осуществляется через прямое заселение одного из высших синглетных состояний (рис. 4.15, б) [16]. В этой схеме первичное возбуждение осуществляется на переходе  $S_0 \rightarrow S_n$ . Высшие синглетные состояния могут релаксировать несколькими путями, среди которых интеркомбинационная конверсия  $S_n \rightarrow T_n$  и внутренняя конверсия

с последующей флуоресценцией. Канал фотохимической реакции имеет место в обеих схемах.

Для экспериментальной проверки эффективности разных способов возбуждения использовались желатиновые пленки, содержащие эозин К. В качестве источников излучения использовались азотный импульсный лазер ( $\lambda = 337$  нм, длительность импульса 2 нс, частота повторения 100 Гц) и непрерывный аргонный лазер, генерирующий интенсивную линию с длиной волны 488 нм. Более коротковолновое излучение азотного лазера заселяет одно из высших синглетных состо-

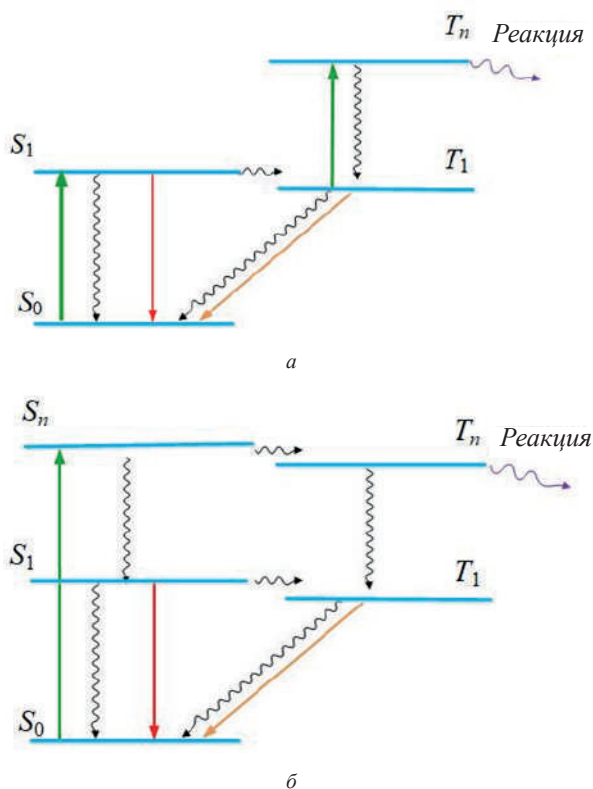


Рис. 4.15. Двухступенчатый (а) и прямой (б) способ возбуждения молекулы красителя в высшие триплетные и синглетные состояния

яний, излучение аргонового лазера резонансно первому синглет-синглетному переходу. Двухступенчатое поглощение красителем излучения аргонового лазера обеспечивает достижение энергий, сравнимых с энергией излучения азотного лазера ( $30\,000\text{--}35\,000\text{ см}^{-1}$ ). Начальная оптическая плотность образцов на длине волны 488 нм не превышала единицы.

Было проведен фотолиз пленок в трех режимах облучения: с применением аргонового, азотного лазера и комбинированного действия излучения обоих лазеров. Во всех случаях в качестве зондирующего излучения использовалось излучение аргонового лазера, позволяющего контролировать изменение пропускания образцов на первом синглет-синглетном переходе. Изменение оптической плотности пленочных образцов со временем экспозиции показано на рис. 4.16. С увеличением мощности излучения скорость фотообесцвечивания красителя растет. Для пар кривых с одинаковым значением мощности аргонового лазера большей скоростью убыли концентрации красителя характеризуется

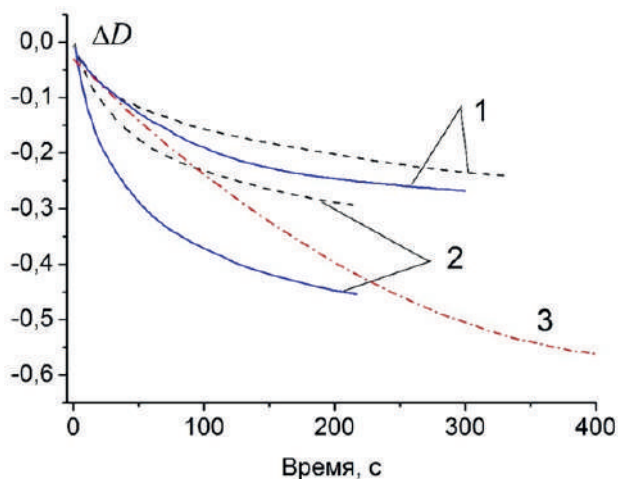


Рис. 4.16. Изменения оптической плотности пленки эозина в желатине от времени экспозиции при облучении в первой полосе поглощения (488 нм) с мощностью 6,5 (1), 12 (2) мВт (пунктир), при совместном облучении лазерами на длинах волн 488 и 337 нм (сплошная линия), излучением на длине волны 337 нм (3)



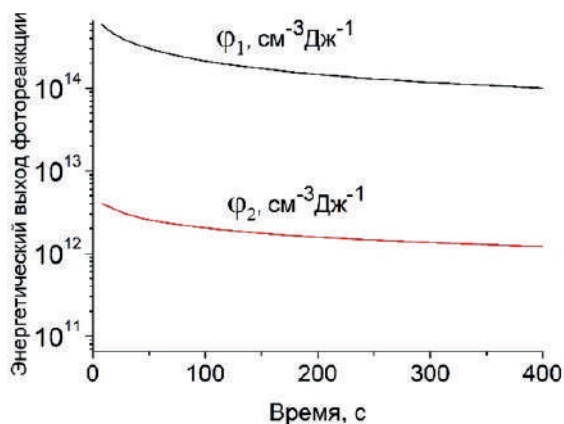


Рис. 4.17. Энергетический выход фотореакции от времени облучения при прямом ( $\Phi_1$ ) и двухступенчатом заселении высоковозбужденных состояний ( $\Phi_2$ )

случай комбинированного облучения аргоновым и азотным лазерами. Полученные зависимости иллюстрируют зависимость скорости обесцвечивания красителя от интенсивности облучения, однако для сравнения эффективности того или иного вида накачки необходимо произвести расчет энергетического выхода фотореакции.

Проанализируем эффективность разных типов возбуждения. По данным изменения оптической плотности вычислим выходы фотохимической реакции на единицу поглощенной энергии. Величина поглощенной за время  $\Delta t$  энергии излучения с длиной волны  $\lambda$  определяется следующей формулой:

$$\Delta E_\lambda = P_\lambda \Delta t \cdot (1 - 10^{-D_\lambda}), \quad (4.19)$$

где  $P_\lambda$  – мощность лазерного излучения, которая в случае импульсного излучения вычислялась как среднее по импульсу значение;  $D_\lambda$  – оптическая плотность образца на длине волны лазерного излучения в момент времени  $t$ . Если поглощается энергия излучения двух лазеров, то в этом случае необходимо просуммировать вклад от каждой длины волны. Выход фотохимической реакции ( $\Phi$ ) вычислялся как отношение числа про-

реагировавших молекул красителя к величине поглощенной энергии (отражением от образца пренебрежем):

$$\varphi = \frac{|\Delta D| \ln 10}{\Delta t \cdot \sigma_{488} \cdot I \cdot P_{\lambda} \cdot (1 - 10^{-D_{\lambda}})} \quad (4.20)$$

Число прореагировавших молекул вычислялось исходя из изменения оптической плотности образцов на длине волны 488 нм. На рис. 4.17 представлена зависимость энергетического выхода фотореакции от времени облучения при прямом ( $\varphi_1$ ) и двухступенчатом ( $\varphi_2$ ) заселении высоковозбужденных триплетных состояний. Отношение  $\varphi_1/\varphi_2$ , показывающее контраст эффективностей указанных способов возбуждения, составляет около двух порядков.

Таким образом получено экспериментальное доказательство повышения эффективности фотореакции обесцвечивания эозина в желатиновой пленке в случае прямого заселения высших триплетных состояний красителя по сравнению их с двухступенчатым заселением через первое синглетное состояние.

#### 4.6. Использование полимерных растворов красителей для голографической записи информации

Чувствительность, разрешение, размер зерна являются важными параметрами массово выпускаемых голографических светочувствительных материалов. Среди них галоидосеребряные эмульсии, фотополимеры, фототермопластические и фоторезистивные материалы (табл. 4.2). Органические красители (например, метиленовый голубой или бактериородопсин) также используются в качестве светочувствительного материала. Материалы, не использующие серебро, привлекательны, поскольку условно не имеют зерна, а бихромированная желатина к тому же очень доступна. Недостатком таких материалов считается их низкая энергетическая чувствительность. Краситель эозин в желатине также можно использовать в качестве системы для голографической записи информации. Продемонстрируем эту возможность на примере записи голограммы плоской волны – амплитудной фотохимической решетке [18–20].

Таблица 4.2

Характеристики коммерческих голографических эмульсий [17]

Материал	Толщина, мкм	Диапазон спектральной чувствитель- ности, нм	Чувстви- тельность, мДж/см <sup>2</sup> (514 нм)	Разрешение, штр./мм	Размер зерна, нм
<i>Галлодосеребряные эмульсии</i>					
Red PFG-01 (Slavich)	7	<700	–	>3000	35–40
Red PFG-03M (Slavich)	7	<700	–	>500	10–20
Green VRP-M (Slavich)	7	<550	80	>3000	35–40
Pan PFG-03C (Slavich)	9	400–700	2000	>5000	10–20
Red BB-700 (Colourholographic)	7	<700	–	>2500	50–60
Red BB-640 (Colourholographic)	7	<650	–	>4000	20–25
Green BB-520 (Colourholographic)	7	<540	150	>4000	20–25
Blue BB-450 (Colourholographic)	7	<470	–	>4000	20–25
Red 131PX (Kodak)	9	<650	–	>1250	70
Red 131PX (Kodak)	9	<650	–	>1250	70
Red 131PX (Kodak)	9	<750	–	>2500	58
Red 131PX (Kodak)	9	<750	–	>2500	50
Red HF65 (FilmoTec – ORWO)	10	<650	–	5000	30
Green HF53 (FilmoTec – ORWO)	10	<550	700	5000	30
Ultimate 15 (Ultimate)	7	<700	150	>5000	15
Ultimate 08 (Ultimate)	7	<650	200	>7000	8
<i>Бихромированная желатиновая эмульсия</i>					
Blue PFG-04 (Slavich)	16	<515	2,5·10 <sup>5</sup>	10000	
<i>Фототермопластические материалы</i>					
Pan TCC-2 (Tavex America)	–	<800	1	1500	
<i>Фоторезистивные материалы</i>					
UV-Blue Shipley 1800 (Towne Technologies)	1,5–2,4	<450		1000	

На рис. 4.18 приведена схема экспериментальной установки для записи фотохимической решетки. Излучение аргонного лазера ( $\lambda = 488$  нм) (1), генерирующего в нашем случае поперечную моду  $TEM_{10}$ , направлялось на бипризму Френеля (2), которая делила волновой фронт на две равные по интенсивности части, каждая из которых проходила через двойную диафрагму (3). Равенство интенсивностей лучей контролировалась измерителем мощности. Диафрагма пропускала небольшую центральную часть волнового фронта каждого из лучей. Линза (4) сводила лучи под углом  $\theta = 0,5^\circ$  в объеме образца (5), где записывался профиль интерференционного поля в виде решетки с периодом  $\Lambda$ . Образец со светочувствительным материалом (пленкой) позиционировался с помощью предметного столика (6). Интенсивность излучения после диафрагмы обеспечивала величину константы скорости поглощения  $I_{\text{кв}} \sigma_1 \geq 10^4 \text{ с}^{-1}$ .

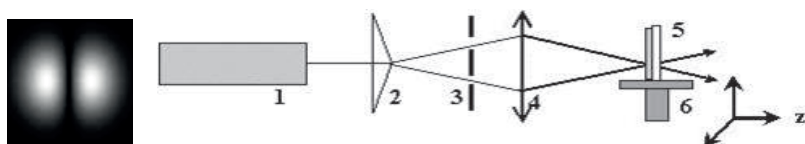


Рис. 4.18. Распределение интенсивности в  $TEM_{10}$  лазерной моде (слева) и схема экспериментальной установки для записи фотохимической решетки (справа)

Схема, иллюстрирующая взаимное расположение лазерных пучков и положение пленки, показана на рис. 4.19. В образце были записаны 15 амплитудных (основанных на вариации оптической плотности) решеток при разном положении предметного столика на оптической оси установки с шагом 1 мм. Полученное распределение оптической плотности является следствием протекания фотохимической реакции. Количество бесцветного фотопродукта в освещенных местах зависит от экспозиции.

По мере перемещения предметного столика регистрируется постепенный переход от частичного пересечения пучков к полному. Характерные результаты фотометрирования приведены на рис. 4.20.

Контраст (видность,  $V$ ) записанных решеток несет важную информацию о когерентности лазерного излучения. Этот параметр во

многое определяет возможность использования лазерного излучения в системах связи, интерферометрии и записи информации. Профиль интерференционного поля от пучков с интенсивностями  $I_1$  и  $I_2$  описывается следующей формулой:

$$I(x) = (I_1 + I_2) \left[ 1 + V \cos\left(\frac{2\pi x}{\Lambda}\right) \right]. \quad (4.21)$$

В то же время видность полос, наблюдаемых в зоне интерференции двух пучков, связана со степенью пространственной когерентности  $|\gamma_{12}(\tau)|$ :

$$V = \frac{2\sqrt{I_1 \cdot I_2}}{I_1 + I_2} |\gamma_{12}(\tau)|. \quad (4.22)$$

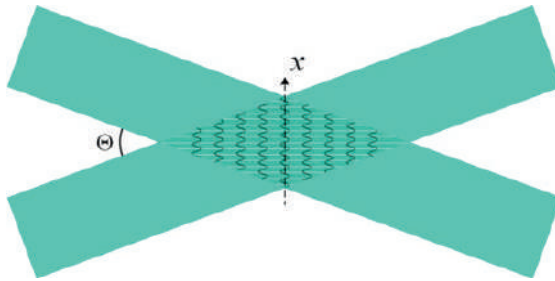


Рис. 4.19. Расположение светочувствительной пленки в схеме пересекающихся лазерных лучей



Рис. 4.20. Микрофотограммы решеток при различном положении предметного столика на оптической оси установки (период решетки около 30 мкм)

Если учесть также, что интенсивности обоих пучков равны, то видность интерференционной картины однозначно определяет  $|\gamma_{12}(\tau)|$ :

$$V = |\gamma_{12}(\tau)|. \quad (4.23)$$

Согласно (4.12), (4.13) связь оптической плотности образцов с интенсивностью и временем экспозиции для интенсивностей излучения, удовлетворяющих условию  $I_{\text{кв}} \sigma_1 \gg (\tau_{\text{фосф}} \tau k_{\text{нкк}})^{-1}$ , имеет простой функциональный вид:

$$\frac{D(x)}{D_0} = \exp(-I(x)k^*t), \quad (4.24)$$

где  $D(x)$  – распределение оптической плотности вдоль оси  $x$ ;  $D_0$  – оптическая плотность необлученной части образца;  $k^*$  представляет собой произведение ряда фотофизических и фотохимических констант и может быть легко получена с использованием данных табл. 3 прил. Перепишем формулу (4.24) для значений оптической плотности в минимуме ( $D_{\text{мин}}$ ) и максимуме ( $D_{\text{макс}}$ ) интерференционной картины, а затем прологарифмируем:

$$\ln \frac{D_{\text{мин}}}{D_0} = -I_0 k^* t, \quad (4.25)$$

$$\ln \frac{D_{\text{макс}}}{D_0} = -k I_0 t, \quad (4.26)$$

где  $I_0 = I_1 + I_2$ . Из формул (4.25)–(4.26) следует выражение для распределений интенсивности излучения вдоль оси  $x$ :

$$I_0 = \frac{\ln \left( \frac{D_{\text{макс}} D_{\text{мин}}}{D_0^2} \right)}{2k^* t} \quad (4.27)$$

и видности  $V$  интерференционной картины:

$$V = \frac{-\ln \left( \frac{D_{\text{макс}}}{D_{\text{мин}}} \right)}{\ln \left( \frac{D_{\text{макс}} D_{\text{мин}}}{D_0^2} \right)}. \quad (4.28)$$

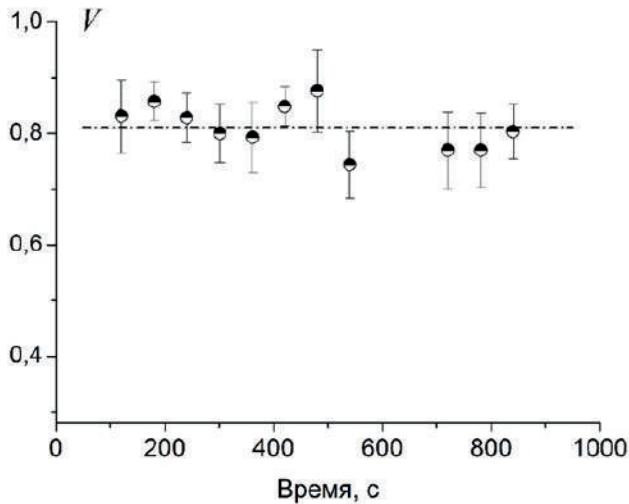


Рис. 4.21. Зависимость видности интерференционного поля в центральной его части от времени (погрешность: 7–12 % – усреднение по восьми измерениям)

Формулы (4.27), (4.28) связывают значение интенсивности и видности интерференционной картины с тремя экспериментально измеряемыми оптическими плотностями: минимальной, максимальной и необлученной части образца. Характерно, что выражение (4.28) не содержит зависимости от экспозиции. Действительно, рис. 4.21. показывает, что значения видности для одного из пиков в центральной части решеток сохраняется в пределах времени облучения до 1000 с.

Используя для расчетов по формулам (4.27), (4.28) значения оптических плотностей соседних минимумов и максимумов, можно определить  $x$  – распределение видности и интенсивности лазерного пучка, (рис. 4.22). Распределение интенсивности передает профиль лазерной моды, разделенной с помощью бипризмы Френеля на два пучка, а распределение видности (степени пространственной когерентности) соответствует представлениям об ее уменьшения на периферии лазерного луча [21]. Максимальная величина  $|\gamma_{12}(\tau)|$  составила около  $0,8 \pm 0,1$ . Предсказываемое теорией максимальное значение степени простран-

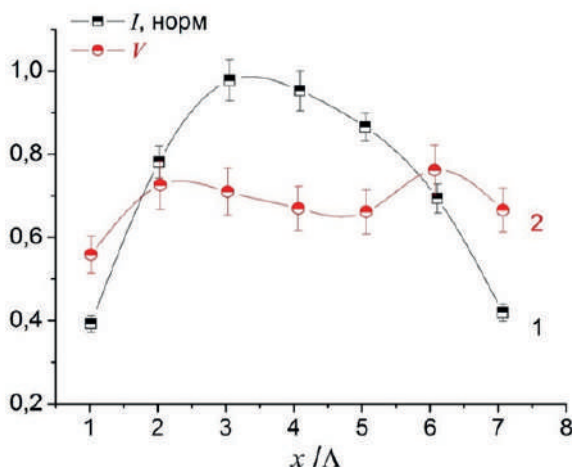


Рис. 4.22. Распределения интенсивности в сечении лазерного пучка (1) и видности интерференционного поля вдоль волнового вектора решетки (2)

ственной когерентности для гауссовой моды, равное единице в центре пучка, не реализуется для мод более высоких порядков.

Предложенный метод определения параметров лазерного излучения обладает рядом технических преимуществ. К ним можно отнести возможность проведения измерений в функционально значимом месте экспериментальной установки, возможность использования достаточно высоких интенсивностей светового поля, простота экспериментальной техники и методики выполнения измерений, возможность архивирования данных.

Обсудим технические характеристики использованной регистрирующей системы, сопоставив их с параметрами материалов на основе галогенидов серебра (см. табл. 4.2).

Традиционно используемые фотографические материалы на основе галогенида серебра обладают линейным участком зависимости оптической плотности (или почернения) от логарифма экспозиции (т.н. область линейной экспозиции). Предложенная система «краситель в полимере» имеет специфическую кинетику фотохимической реакции, которая обеспечивает линейность в другой шкале: логарифм оптической



плотности от экспозиции (формулы (4.25), (4.26)). Эта линейность имеет место при двух режимах облучения: область малой интенсивности (примерно до  $1 \text{ Вт/см}^2$ ) и область высокой интенсивности ( $>2 \text{ Вт/см}^2$ ), (см. рис. 4.9). Использование слишком высоких значений интенсивности чревато разогревом образца и выходом за пределы температурной прочности полимера.

Спектральная чувствительность использованных пленок определяется спектром поглощения красителя и лежит в диапазоне 470–550 нм. В эту полосу попадает излучение промышленно выпускаемых твердотельных (532 нм) и газовых лазеров (488, 514 нм). Наиболее близкими характеристиками спектральной чувствительности обладает эмульсия Pan PFG–03C. Порог ее энергетической чувствительности составляет  $2 \text{ Дж/см}^2$ . Для времени экспозиции 50 с, когда уверенно регистрируется обесцвечивание эозина К в желатиновой пленке, эта величина для составляет  $200 \text{ Дж/см}^2$ , т. е. величину на два порядка большую. Однако преимуществом использованного материала является отсутствие необходимости проявления скрытого изображения.

Важной характеристикой материалов на основе галогенидов серебра является зерно размером от 10 до  $\sim 70$  нм, которое лимитирует разрешение эмульсии. В нашем светочувствительном материале отсутствует это ограничение так же, как и в фотополимерных материалах. При определении видности интерференционной картины мы использовали шаг пространственной дискретизации, равный периоду решетки (30 мкм). Из формулы

$$\Lambda = \frac{\lambda}{2n \sin \theta}, \quad (4.29)$$

где  $n$  – показатель преломления материала пленки, следует, что период может быть уменьшен измерением геометрии сходящихся лучей при сохранении длины волны записывающего излучения.

В заключение следует отметить, что материал обеспечивает запись не только амплитудной, основанной на вариации оптической плотности красителя, но и фазовой решетки. Протекание химической реакции в облученных областях приводит также к изменению показателя преломления полимера, что легко детектируется с помощью излучения гелий-неонового лазера, длина волны которого (628 нм) лежит за пределами полосы поглощения красителя [22]. Поскольку эти решетки

пространственно совпадают, то эффективность восстановленной голограммы может быть повышена за счет оптимизации их вклада в эффективность восстановления опорной волны.

## Литература

1. Влияние пространственного распределения интенсивности лазерного излучения на кинетику фотообесцвечивания красителя в полимерной матрице / А. А. Глушков, А. С. Простакишин, Е. А. Слюсарева, А. Г. Сизых // Журнал Сиб. федер. ун-та. Математика и физика. – 2012. – Т. 5, № 1. – С. 57–62.
2. Базилевский М. В., Фаустов В. И. Современные теории химических реакций в конденсированной фазе // Успехи химии. – 1992. – Т. 61. – С. 1186–1219.
3. Глушков А. А., Слюсарева, Е. А., Сизых А. Г. Роль поляризации лазерного излучения при анализе кинетики фотообесцвечивания красителей // Изв. высш. учеб. заведений. Физика. – 2013. – Т. 56, № 2/2. – С. 102–106.
4. Лазерный фотолиз флуороновых красителей в хитозановой матрице / Е. А. Слюсарева, А. Г. Сизых, М. А. Герасимова [и др.] // Квантовая электроника. – 2012. – Т. 42, № 8. – С. 687–692.
5. Сизых А. А., Тараканова (Слюсарева) Е. А., Татаринова Л. Л. Лазерно-индуцированное восстановление растворенного в полимере красителя с высоким выходом в триплетное состояние // Квантовая электроника. – 2000. – Т. 30. – С. 40–44.
6. Study of triplet quantum yields using a tunable dye laser / B. Soep, A. Kellmann, M. Martin, L. Lindqvist // Chemical Physics Letters. – 1972. – Vol. 13. – P. 241–244.
7. Gratz H., Penzkofer A. Triplet–triplet absorption of some organic molecules determined by picosecond laser excitation and time-delayed picosecond light continuum probing // Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry. – 1999. – Vol. 127. – P. 21–30.
8. Gratz H., Penzkofer A. Saturable absorption dynamics in the triplet system and triplet excitation induced singlet fluorescence of some organic molecules // Chemical Physics. – 2001. – Vol. 263. – P. 471–477.

9. Talhavini M., Atvars T.D.Z. Photostability of xanthene molecules trapped in poly(vinyl alcohol) (PVA) matrices // *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. – 1999. – Vol. 120. – P. 141–149.

10. Leaver I. H. An E.S.R. study of radical intermediates in the photoreduction of xanthene dyes // *Aust. J. Chem.* – 1971. – Vol. 24. – P. 753–763.

11. Гордон А., Форд Р. Спутник химика. – М.: Мир, 1976. – 541 с.

12. Каплан И. Г. Введение в теорию межмолекулярных взаимодействий. – М.: Наука. Главная редакция физико-математической литературы, 1982. – 312 с.

13. Процессы релаксации дифракционной эффективности светоиндуцированных решеток в твердых растворах красителя в полимерах / Е. А. Дьячук, Р. А. Макаров, А. Г. Сизых, Е. А. Слюсарева // *Труды IX Междунар. школы-семинара по люминесценции и лазерной физике*. – Иркутск. – 2004. – С. 124–132.

14. Фотофизические процессы в бинарных растворах ксантеновых красителей в биополимере / А. Г. Сизых, А. Д. Цыганов, Е. А. Макарова, Е. А. Слюсарева // *Изв. высш. учеб. заведений. Физика*. – 2009. – Т. 52, № 12/3. – С. 299–305.

15. Influence of excitation energy transfer in binary solid solution of dyes on formation kinetics of photochemical light-induced gratings / E. A. Djachuk, R. A. Makarov, A. G. Sizykh, E. A. Slyusareva // *SPIE Proceedings*. – 2006. – V. 6263. – P. 62630F–1–6.

16. Sizykh A. G., Slyusareva E. A. "Dichromatic" laser photolysis of eosin in solid gelatinous matrix // *SPIE Proceedings*. – 2004. – V. 5483. – P. 147–151.

17. Saxby G. *Practical holography*. – IOP Publishing, 2003. – 482 p.

18. Способ измерения степени пространственной когерентности лазерного излучения: пат. 2234064 Рос. Федерация. № 2003109596/28 / А. Г. Сизых, Е. А. Слюсарева ; заявл. 04.04.03, опубл. 10.08.2004, Бюл. № 22. 4 с. Заявитель и патентообладатель Красноярский гос. ун-т.

19. Сизых А. Г., Слюсарева Е. А. Использование светоиндуцированных решеток для измерения параметров лазерного излучения // *Материалы лекций и докладов X школы-семинара по люминесценции и лазерной физике*. – Иркутск, 2007. – С. 199–306.

20. Сизых А. Г., Слюсарева Е. А. Исследование лазеро-индуцированных процессов в твердых растворах красителей: кинетический аспект и приложения // Теория и эксперимент в современной физике: юбилейный сборник научных статей. – Красноярск, 2000. – С. 176–182.

21. Назарова Л. Г. Измерение степени когерентности лазера методом Юнга // Оптика и спектроскопия. – 1970. – Т. 29. – С. 757–760.

22. Процессы релаксации дифракционной эффективности светоиндуцированных решеток в твердых растворах красителя в полимерах / Е. А. Дьячук, Р. А. Макаров, А. Г. Сизых, Е. А. Слюсарева // Труды IX Междунар. школы-семинара по люминесценции и лазерной физике. – Иркутск, 2004. – С. 124–132.

## ГЛАВА 5

---

### МЕЖМОЛЕКУЛЯРНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ КРАСИТЕЛЕЙ С БИОЛОГИЧЕСКИМИ СТРУКТУРАМИ

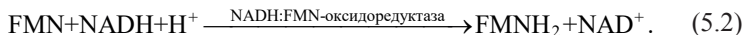
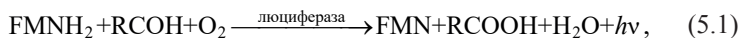
В пятой главе будет показано, что ряд флуоресцеиновых красителей с широким перечнем постепенно изменяющихся физико-химических свойств, обусловленных галогензамещением в структуре хромофора, является весьма эффективным инструментом исследования межмолекулярных взаимодействий в явлениях биolumинесценции и связывания с биологическими структурами. Красители хорошо зарекомендовали себя в качестве акцепторов энергии электронного возбуждения, флуоресцентных меток для измерения размера излучателя, фосфоресцентных индикаторов на наличие связывания с биомолекулами. Удачный выбор ряда заключается в возможности проведения однотипных исследований для нескольких гомологичных красителей, имеющих градации в распределении зарядов на атомах, вероятности излучательных и безызлучательных процессов, кислотно-основных, гидрофильно-гидрофобных и других свойствах. Применение ряда флуоресцеиновых красителей как инструмента для изучения процессов взаимодействия с биополимерами, различающихся химической природой, обеспечивает качественно новый уровень, недостижимый при использовании структурно разрозненных соединений.

#### 5.1. Биферментная биolumинесцентная реакция

Биolumинесцентная реакция является примером сложного физико-химического процесса, протекающего в живых организмах. В ходе химической реакции с участием ферментов-люцифераз формируется возбужденное состояние эмиттера, которое высвечивает квант люминесценции в отсутствие первичного фотовозбуждения [1]. Изменение интенсивности биolumинесценции определяется расходом субстрата

в соответствии с кинетикой реакции. Из-за сложности такие реакции чаще всего изучают *in vitro*, прибегая к эмпирическим методам.

Рассматриваемый тип биолюминесценции – бактериальная – основывается на двух ферментативных реакциях [2]:



Бактериальная люцифераза катализирует окисление восстановленного флавинмононуклеотида  $\text{FMNH}_2$  и длинноцепочечного алифатического альдегида  $\text{RCHO}$ . В результате такой реакции образуется  $\text{FMN}$ , жирная кислота  $\text{RCOOH}$ , вода и высвечивается квант света  $h\nu$  (5.1). Спектр бактериальной биолюминесценции имеет максимум распределения  $495 \pm 10$  нм в зависимости от вида люциферазы. Требуемый для реакции (5.1) субстрат  $\text{FMNH}_2$  поставляется оксидоредуктазой, которая катализирует восстановление  $\text{FMN}$  с участием  $\text{NADH}$  (5.2). Долгое время вопрос о свойствах химически сформированного возбужденного состояния эмиттера бактериальной биолюминесценции был открытым. Для его исследования было предложено использовать внешние акцепторы энергии электронного возбуждения с различными спектрально-люминесцентными характеристиками. Поскольку спектр биолюминесценции близок к полосе поглощения красителей флуоресцеинового ряда, то возникла идея применения последних в качестве таких акцепторов [3]. Эти красители имеют близкие значения радиуса Фёрстера (см. табл. 5.1) и довольно сильно различаются по своим фотофизическим свойствам, что позволяет получить дополнительную информацию о специфике межмолекулярных взаимодействий с эмиттером биолюминесценции. Диаграмма уровней энергии для биолюминесцентного излучателя и красителя, выступающих в роли донорно-акцепторной пары, приведена на рис. 5.1.

Для создания модели процессов с участием эмиттера биолюминесценции и красителя будем использовать полуэмпирический подход. В этом подходе заселение возбужденных состояний эмиттера описывается некоторой эмпирической функцией химической накачки  $F(t)$ , а динамика населенностей в целом задается в явном виде с помощью констант



Рис. 5.1. Диаграмма уровней энергии донорно-акцепторной пары, состоящей из биолюминесцентного излучателя и красителя

скоростей биолюминесценции ( $k_{\text{бл}}$ ) и тушения ( $k_{\text{T}}^{\text{S}_1}$ ) возбужденного состояния эмиттера, флуоресценции красителя ( $k_{\text{фл}}$ ), фосфоресценции ( $k_{\text{фосф}}$ ) и тушения триплетного уровня ( $k_{\text{T}}^{\text{T}_1}$ ) красителя, интеркомбинационной конверсии ( $k_{\text{инк}}$ ), поглощения биолюминесценции красителем ( $k_{\text{погл}}$ ), переноса энергии от излучателя (эмиттера) к красителю ( $k_{\text{пз}}$ ). Два последних процесса могут играть весьма существенную роль из-за значительного спектрального перекрытия биолюминесценции и поглощения красителя. В частности, это приводит к тушению биолюминесценции и разгоранию сенсibilизированной люминесценции красителей при увеличении их концентраций в биолюминесцентной смеси (рис. 5.2).

Изменение интенсивности биолюминесценции во времени отражает характер временного спада населенности эмиттера. При аналогичных начальных условиях  $F(t)$  описывается биэкспоненциальной зависимостью:

$$F(t) = A_1 \exp(-k_1 t) + A_2 \exp(-k_2 t), \quad (5.3)$$

где  $A_1, A_2, k_1, k_2$  – эмпирические параметры. Значения экспоненциальных коэффициентов  $k_1$  и  $k_2$  лежат в пределах  $10^{-2}$ – $10^{-4} \text{ с}^{-1}$ . С другой стороны, изменение населенности эмиттера определяется конкуренцией химической накачки и релаксационными процессами:

$$\frac{d[E]}{dt} = F(t) - (k_{\text{бл}} + k_{\text{T}}^{\text{S}_1})[E]. \quad (5.4)$$

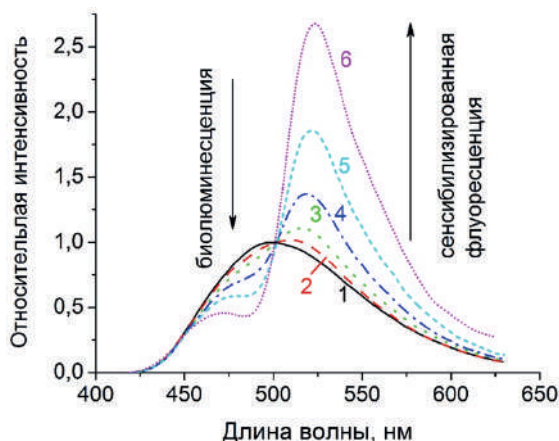


Рис. 5.2. Спектр биолюминесценции в отсутствии флуоресцеина (1) и спектры люминесценции при добавлении флуоресцеина с концентрацией 3,6 мкМ (2); 9,0 мкМ (3); 26,5 мкМ (4); 59,8 мкМ (5); 134 мкМ (6) (воспроизведено по [3])

Теперь с учетом (5.3), (5.4) запишем уравнения материального баланса для возбужденных уровней обоих компонент донорно-акцепторной пары:

$$\begin{aligned} \frac{d[E]}{dt} &= A'_1(k_{\text{бл}} - k_T^S - k_1) \exp(-k_1 t) - A'_2(k_{\text{бл}} - k_T^S - k_2) \\ &\quad \times \exp(-k_2 t) - (k_{\text{бл}} + k_T^S)[E] - k_{\text{пз}}[E]([N_0] - [S_1] - [T_1]), \\ \frac{d[S_1]}{dt} &= [E]([N_0] - [S_1] - [T_1]) (k_{\text{фл}} - k_{\text{инк}})[S_1] - k_{\text{пз}}[E]([N_0] - [S_1] - [T_1]), \\ \frac{d[T_1]}{dt} &= k_{\text{инк}}[S_1] - (k_{\text{фосф}} - k_T^T)[T_1]. \end{aligned} \quad (5.5)$$

Здесь учтено, что

$$[N_0] = [S_0] + [S_1] + [T_1], \quad (5.6)$$

где  $[N_0]$  – концентрация красителя (в нормированных единицах);  $A'_1$ ,  $A'_2$  – коэффициенты, не зависящие от времени, а  $k_{\text{погл}}$  пропорциональна



населенности эмиттера с коэффициентом  $\gamma$ . Учитывая, что изменение населенности эмиттера происходит медленно по сравнению с другими излучательными и безизлучательными процессами ( $k_1, k_2 \ll k_{\text{иикк}}, k_{\text{погл}}, k_{\text{бл}}, k_{\text{фл}}, k_{\text{T}}^S, k_{\text{T}}^T$ ), можно рассмотреть систему уравнений (5.5) в рамках квазистационарного подхода. Будем полагать, что за счет быстрых фотофизических процессов равновесие населенностей успевает полностью установиться за время, когда химическую накачку можно считать постоянной. Найдем стационарное распределение населенностей уровней системе, а затем учтем временную зависимость заселения эмиттера с учетом химической накачки аналогично подходу при моделировании кинетики фотообесцвечивания красителя (см. п. 4.2). В таком случае решение для населенностей возбужденных уровней донора и акцептора будет выглядеть следующим образом:

$$[E] = \frac{A_1 \exp(-k_1 t) + A_2 \exp(-k_2 t)}{1 + \frac{k_{\text{пз}}}{k_{\text{бл}} + k_{\text{T}}^S} [N_0]}, \quad (5.7)$$

$$[S_1] = \frac{(A_1 \exp(-k_1 t) + A_2 \exp(-k_2 t)) (\gamma + k_{\text{пз}})}{\left(1 + \frac{k_{\text{пз}}}{(k_{\text{бл}} + k_{\text{T}}^S)} [N_0]\right) (k_{\text{фл}} + k_{\text{иикк}})} [N_0]. \quad (5.8)$$

Уравнение (5.7) описывает кинетику тушения биолюминесценции в присутствии красителя, в то время как уравнение (5.8) отображает кинетику сенсibilизированной флуоресценции красителя. Пусть  $[E_0]$  – населенность эмиттера в момент времени  $t = 0$ . Тогда

$$\frac{[S_1]}{[E_0]} = \frac{(\gamma + k_{\text{пз}})}{(k_{\text{фл}} + k_{\text{иикк}})} [N_0] \left(1 + \frac{k_{\text{пз}}}{(k_{\text{бл}} + k_{\text{T}}^S)} [N_0]\right)^{-1}. \quad (5.9)$$

Полученное отношение не имеет зависимости от времени и его анализ в зависимости от концентрации акцептора позволяет извлечь информацию как о константе скорости переноса энергии, так и о фотофизических характеристиках донора и акцептора. Зависимости относительной интенсивности сенсibilизированной флуоресценции от концентрации красителей представлены на рис. 5.3. Кривые характеризуются линейным

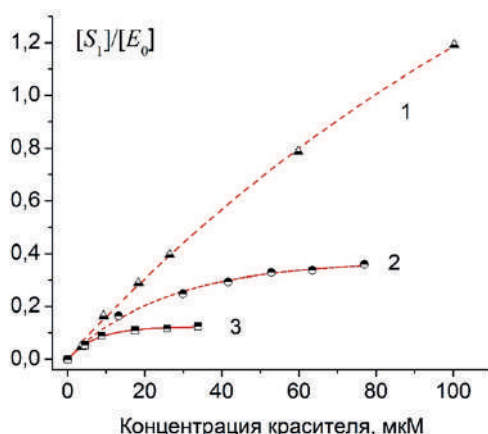


Рис. 5.3. Относительная интенсивность сенсibilизированной флуоресценции красителей в зависимости от их концентрации: 1 – флуоресцеин; 2 – эозин; 3 – эритрозин (сплошные линии – результат аппроксимации по формуле (5.9), воспроизведено по [3])

ростом при малых концентрациях акцептора и имеют тенденцию к насыщению. Эффект разгорания сенсibilизированной люминесценции усиливается при переходе от эритрозина к флуоресцеину. Путем аппроксимации экспериментальных данных с помощью (5.9) были получены численные значения ряда важных параметров, характеризующих изучаемую систему (табл. 5.1). При этом было учтено, что  $k_{\text{нз}} \gg \gamma$ .

Таблица 5.1  
Фотофизические параметры биолюминесцентной системы  
в присутствии красителей

Параметры	Флуоресцеин	Эозин	Эритрозин
$k_{\text{фл}}, \text{с}^{-1}$ [4]	$1,61 \cdot 10^8$	$1,4 \cdot 10^8$	$1,74 \cdot 10^8$
$k_{\text{нзкз}}, \text{с}^{-1}$ [5]	$8,3 \cdot 10^6$	$6,0 \cdot 10^8$	$2,8 \cdot 10^9$
$k_{\text{нз}}, 10^{12} \text{М}^{-1} \text{с}^{-1}$	$(2,9 \pm 0,2) \cdot 10^{12}$	$(1,4 \pm 0,2) \cdot 10^{13}$	$(6,5 \pm 0,9) \cdot 10^{13}$
$k_{\text{бл}} + k_T^1, \text{с}^{-1}$	$(8,4 \pm 1,6) \cdot 10^8$	$(3,7 \pm 0,8) \cdot 10^8$	$(4,8 \pm 1,1) \cdot 10^8$
Время жизни эмиттера (нс)	$1,2 \pm 0,2$	$2,7 \pm 0,6$	$2,1 \pm 0,5$
$R_0$ , нм	4,4	4,9	4,9

Полученные константы скорости переноса энергии оказались достаточно высокими. Оценка расстояния между донором и акцептором по эффективности переноса (1.24) показала, что оно много меньше среднего расстояния между молекулами в растворе. Это может возникать из-за сближения донора и акцептора, индуцированного диполь-дипольным взаимодействием. Действительно, дипольные моменты флуоресцеиновых красителей (см. п. 2.2) в основном состоянии довольно велики и возрастают при переходе в синглетное состояние. По оценкам, энергия диполь-дипольного взаимодействия донора с акцептором в основном состоянии не превышает  $0,5 \text{ кДж} \cdot \text{моль}^{-1}$  при условии, что расстояние между диполями ограничено величиной  $20 \text{ \AA}$ . Энергия взаимодействия может достигать  $4 \text{ кДж} \cdot \text{моль}^{-1}$  с повышенными дипольными моментами в возбужденном состоянии для оптимальной ориентации диполя. Это значение сопоставимо с энергией слабой водородной связи. Кроме диполь-дипольных взаимодействий в системе «краситель – эмиттер» возможно гидрофобное взаимодействие (см. п. 1.6). Причина гидрофобного взаимодействия – термодинамическая невыгодность контакта воды с неполярными веществами. Коэффициент распределения октанол – вода, количественно характеризующий степень гидрофобности молекул вещества, увеличивается в ряду флуоресцеин (4,05), эозин (7,48) и эритрозин (8,42) [6] и коррелирует с полученными константами переноса энергии.

Тесное сближение эмиттера и красителя кроме усиления переноса энергии способно ингибировать ферментативную реакцию и этот эффект наиболее ярко выражен в случае эритрозина. Таким образом, значительное снижение интенсивности биолюминесценции, наблюдаемое при увеличении концентрации красителя, обусловлено как безызлучательным переносом энергии, так и ингибированием реакции красителями.

Время жизни эмиттера, рассчитанное как  $(k_{\text{гл}} + k_{\text{T}}^{\text{S}})^{-1}$ , составляет 1,2–2,7 нс, что близко к величине 2,3 нс для среднего времени жизни интермедиата – соединения флавина и люциферазы, измеренной время-разрешенным методом [7]. Следует отметить, что примененный в данной работе способ изучения временных характеристик использует метод стационарной флуоресцентной спектроскопии, который является более доступным, чем время-разрешенные техники.

В табл. 5.1 представлены величины радиуса Фёрстера для переноса энергии в биолюминесцентной системе в присутствии красителя. Для их расчета использовался интеграл перекрытия между спектром биолюминесценции в отсутствие акцептора и спектром поглощения акцептора в буферном растворе в присутствии люциферазы. Рассчитанные значения  $R_0$  для всех красителей близки и соответствуют диполь-дипольному механизму переноса энергии (см. п. 1.5).

## **5.2. Адсорбция красителей на частицах из полисахаридов**

Рассмотренные в предыдущем параграфе явления затрагивают взаимодействие красителей с биологическими структурами природного происхождения – ферментами и флавинами. Здесь речь пойдет об искусственно синтезированных структурах на основе природных или модифицированных полисахаридов и их связывании с ксантоновыми красителями. Структурирование полимеров в виде частиц или комплексов, способных диспергироваться в воде, позволяет значительно повысить их функциональные свойства. Они становятся более компактными по размеру и подвижными. Такие полимеры обладают специфической поверхностью, способной удерживать низкомолекулярные вещества и легко удаляются из раствора фильтрацией и/или осаждением. При этом частицы сохраняют присущие полимеру химические свойства, что делает их весьма привлекательными для использования в биомедицинских приложениях.

Одним из самых известных и распространенных биосовместимых катионных полисахаридов является хитозан – продукт деацетилирования хитина. Свойства хитозана интенсивно изучались, некоторые из них, например, антибактериальные, биоадгезивные и заживляющие – могут быть отнесены к уникальным [8]. Химическая структура хитозана позволяет формировать коллоидные частицы без применения сшивающих агентов методом «самосборки». Для этого используются анионные полисахариды: гепарин, каррагинан, хондроитин сульфат, гиалуронат, сульфат арабиногалактана и др. Второй – анионный компонент – не только выступает в роли линкера полимерных цепей, но и способен усиливать биологическая активность таких комплексов.

Так, например, хондроитин сульфат, гиалуронат широко применяются в медицине в качестве стимуляторов процессов регенерации ткани, гепарин и сульфатированный арабиногалактан известны благодаря своим гипополидемическим и антикоагулянтным свойствам [9].

Схема самосборки полимеров в полиэлектролитный комплекс представлена на рис. 5.4. Размер и заряд поверхности таких комплексов зависят от степени диссоциации полиэлектролитов при выбранном pH и пропорции составляющих его компонент. Оценку заряда комплексов можно осуществить, зная молекулярные массы полимеров на основе уравнения Хендерсона – Хассельбаха (1.32). В случае нескомпенсированных зарядов разных знаков такие частицы (они носят название нестехиометрических) имеют избыточный заряд поверхности и диспергируются в воде, образуя коллоидные растворы.

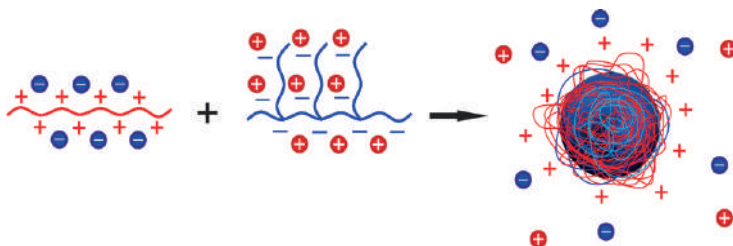


Рис. 5.4. Схема образования полиэлектролитных комплексов на основе разнозаряженных полимеров (воспроизведено по [10])

В работах [10–12] описан синтез полиэлектролитных комплексов на основе поликатионного хитозана (рис. 5.5, *а*) и трех различных анионных полисахаридов (рис. 5.5, *б–г*). Полианионы отличаются структурой (два являются линейными и один разветвленным) и спецификой анионных групп (карбоксильные и/или сульфогруппы). Полученные коллоидно-стабильные нестехиометрические комплексы обладали положительным зарядом поверхности, ( $\zeta$ -потенциал более +30 мВ) и средним размером около 0,4 мкм. Положительный заряд комплексов обусловлен избытком поликатиона при синтезе. Подбирая другое соотношение полимерных компонент, можно получить комплексы с отрицательно заряженной поверхностью [13].

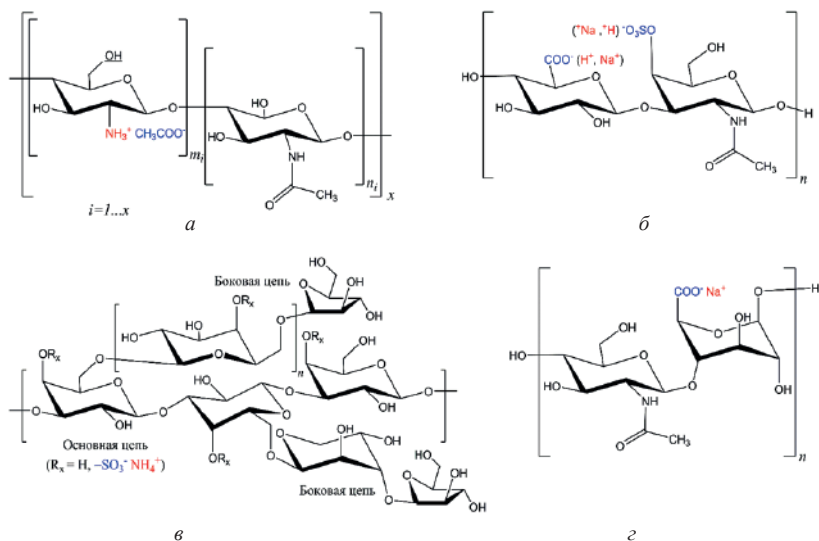


Рис. 5.5. Структурные формулы хитозана (а) и анионных полисахаридов: хондроитин сульфата (б), сульфата арабиногалактана (в) гиалуроната (г)

Морфология частиц полиэлектролитных комплексов из хитозана и сульфата арабиногалактана показана на рис. 5.6, а, представляющего собой снимок высушенной капли раствора, полученный с помощью сканирующего электронного микроскопа. Частицы имеют неправильную форму, но при этом близки по размерам. Более детально распределение по размерам определялось методом фотонно-корреляционной спектроскопии непосредственно в растворе (рис. 5.6, б). Факт комплексообразования за счет связывания аминогрупп хитозана с сульфогруппами арабиногалактана подтверждался методом ИК-спектроскопии [10].

Изучение связывания таких комплексов с красителями преследует несколько целей. В первую очередь – это моделирование систем доставки лекарственных средств, где краситель выступает прототипом функционально значимого соединения и/или флуоресцентной метки. Второе – это создание биосорбентов для решения задачи извлечения ароматических соединений – токсикантов – из воды или биологических жидкостей. В обоих случаях важно знать не только количественные ха-

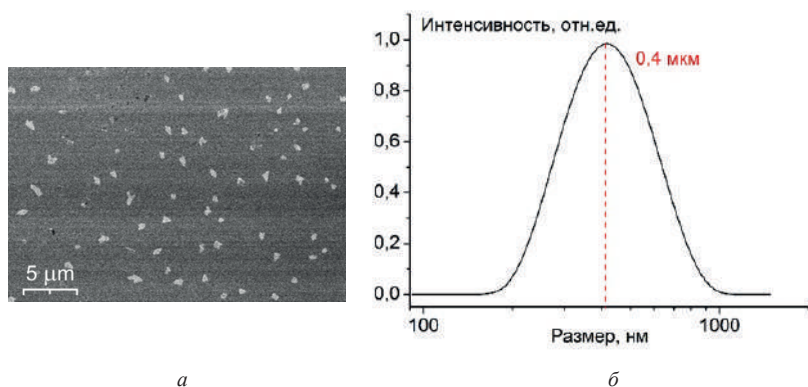


Рис. 5.6. К определению морфологии полиэлектролитных комплексов из хитозана и сульфата арабиногалактана. Снимок со сканирующего электронного микроскопа (а), распределение по размерам, полученное методом фотонно-корреляционной спектроскопии (воспроизведено по [10])

рактеристики адсорбции красителя на частицах, но и механизм взаимодействия «адсорбат – адсорбент».

Межмолекулярные взаимодействия между красителем и биополимером в процессах адсорбции (или связывания) проявляются в спектрах красителей самым различным образом, как правило, приводя к сдвигу полос поглощения, изменению их интенсивности и формы. На рис. 5.7. приведены спектры поглощения флуоресцеиновых красителей при добавлении полиэлектролитных комплексов из хитозана и хондроитин сульфата при различных значениях pH. По мере увеличения количества адсорбента все большее число молекул эозина и эритрозина переходит в связанное состояние, спектр которого отличается от исходного меньшей амплитудой и сдвигом в красную область. Спектральная разница между свободным и связанным красителем максимальна для эритрозина, что может быть обусловлено его более эффективной адсорбцией. Наиболее выраженные спектральные изменения происходят при низком значении pH (3,8), что свидетельствует о важности зарядового состояния адсорбента и/или адсорбата для процесса связывания. Однако даже при отсутствии спектральных изменений (например у флуоресцеина) нельзя однозначно утверждать, что связывания красителя с биомолекулой не произошло: весьма распространена ситуация, когда хромоформная груп-

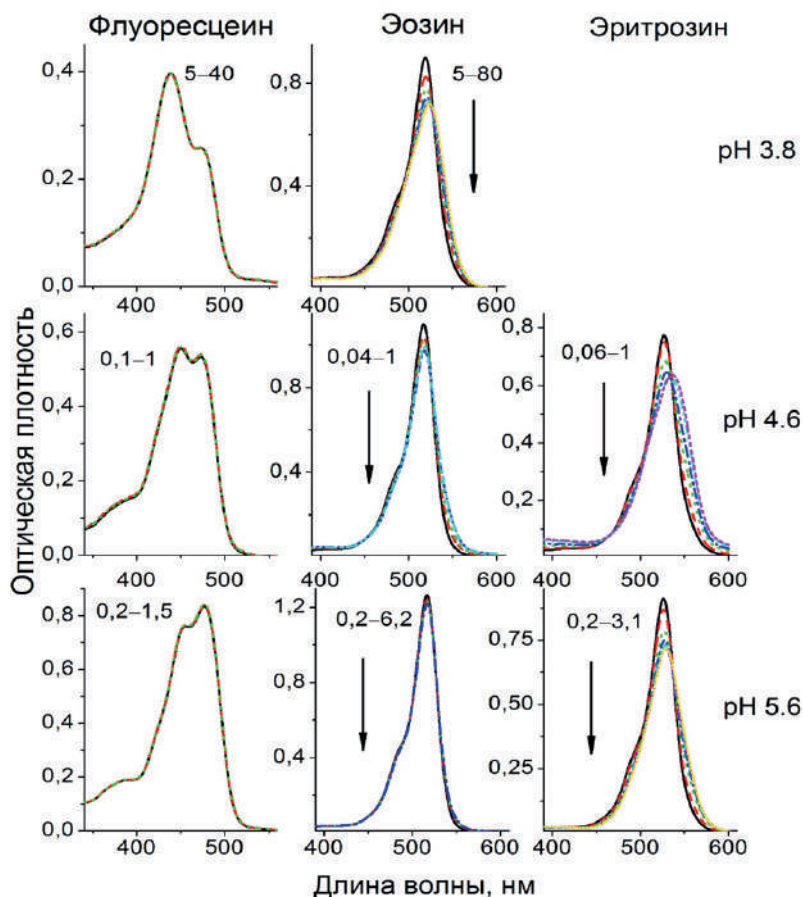


Рис. 5.7. Спектры поглощения флуоресцеиновых красителей при добавлении полиэлектролитных комплексов хитозан/хондроитин сульфат при различных значениях pH (указана величина массового отношения адсорбат/адсорбент $\times 100$  и направление изменения максимума спектра с увеличением этого соотношения, воспроизведено по [10])

па при связывании не испытывает возмущения своей структуры. Для однозначного вывода необходимо физическое разделение свободного и связанного состояния, например, методами хроматографии, фильтрации или осаждения адсорбента.



В общем случае изучение адсорбции включает как исследования равновесий (обусловленных термодинамическими характеристиками), так и кинетики процесса с использованием стандартных процедур, состоящих в смешивании фиксированного объема раствора адсорбата (в нашем случае красителя) с известным количеством адсорбента (полиэлектролитных комплексов на основе хитозана) с контролем температуры, времени контакта, pH. Для разделения свободного и связанного состояния в равновесных исследованиях мы применяли методику, включающую осаждение адсорбента центрифугированием с последующим измерением концентрации свободного красителя в надосадочном слое абсорбционным методом (рис. 5.8).

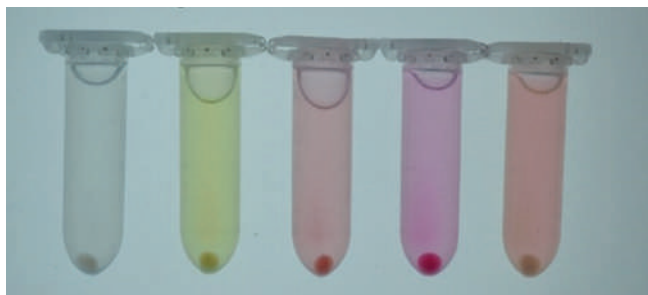


Рис. 5.8. Коллоидные растворы полиэлектролитных комплексов из хитозана и хондроитин сульфата после осаждения: раствор без красителя, с флуоресцеином, эозином, эритрозином, родамином 6G (слева направо) (окрашенный осадок свидетельствует о связывания красителя с бесцветным адсорбентом)

Взаимодействие между адсорбатом и адсорбентом может быть описано в терминах равновесной *изотермы адсорбции*. Уравнение, устанавливающее количественное соотношение между удельной концентрацией адсорбированного вещества ( $q_e$ ) и равновесной концентрацией свободного (неадсорбированного),  $C_e$ , представляет собой *модель адсорбции*. Величина  $q_e$  может быть вычислена следующим образом:

$$q_e = \frac{(C_0 - C_e)V}{m}, \quad (5.11)$$

где  $C_0$  – начальная концентрация адсорбата;  $V$  – объем раствора;  $m$  – масса адсорбента. Одна из наиболее распространенных моделей, описывающих изотерму адсорбции – это модель Ленгмюра [14]. Модель Ленгмюра была изначально предназначена для описания газофазной адсорбции, но также используется для количественной оценки и сопоставления адсорбционной способности других адсорбатов. Предполагается, что эффективность адсорбции пропорциональна доле открытой поверхности адсорбента, а десорбция пропорциональна доле закрытой поверхности. Уравнение для такой модели выглядит следующим образом:

$$q_e = q_m \frac{K_L C_e}{1 + K_L C_e}, \quad (5.12)$$

где  $q_m$  – адсорбционная емкость монослоя и  $K_L$  – константа аффинности адсорбции. Первая константа (в г/г) показывает максимально достижимую удельную концентрацию адсорбированного вещества. Вторая константа, по сути, является величиной, обратной константе диссоциации комплекса. Хорошее соответствие теоретических расчетов экспериментальным данным в рамках данной модели предполагает *однослойную* адсорбцию и структурную однородность адсорбента.

Другая модель изотермы адсорбции, которая описывает *многослойную* адсорбцию на гетерогенной поверхности адсорбента, была предложена Фрейндлихом [15]:

$$q_e = K_F C_e^{n_F}, \quad (5.13)$$

где  $K_F$  – константа адсорбции Фрейндлиха. Величина  $n_F$  варьируется между нулем и единицей и показывает степень неоднородности поверхности адсорбента (стремление к нулю означает повышение неоднородности). Оба параметра в уравнении (5.13) являются эмпирическими.

Более сложная трехпараметрическая модель известна как модель Ленгмюра – Фрейндлиха изотермы адсорбции. Она предполагает наличие гетерогенности (неоднородности) поверхности адсорбата и может быть описана следующим выражением [16]:

$$q_e = \frac{q_m (K_{LF} C_e)^n}{1 + (K_{LF} C_e)^{n_{LF}}}, \quad (5.14)$$

где  $q_m$  и  $K_{\text{ЛФ}}$  обозначают максимальную адсорбционную емкость и константу аффинности по аналогии с соответствующими параметрами для модели Ленгмюра;  $n_{\text{ЛФ}}$  – фактор гетерогенности. Величина  $n_{\text{ЛФ}} < 1$  соответствует так называемому нормальному процессу адсорбции, для  $n_{\text{ЛФ}} > 1$  модель Ленгмюра – Фрейндлиха предполагает, что адсорбция – это кооперативный процесс, находящийся под влиянием первичных и вторичных адсорбат – адсорбент и адсорбат – адсорбат взаимодействий.

Общий вид зависимостей (5.12), (5.13), (5.14) приведен на рис. 5.9. Основное отличие в характере поведения изотерм в модели Ленгмюра и Ленгмюра – Фрейндлиха при использовании одинаковых значений максимальной адсорбционной емкости и константы аффинности заключается в изменении концентрационного значения выхода зависимости на максимум и наличие «прогиба» кривой при малых концентрациях. Точка пересечения кривых на рис. 5.9 соответствует значению  $C_e$ , равному 2,5 мг/л, при котором достигается половина от максимально возможной адсорбционной емкости. Обратная величина (0,4 л/мг) была использована в качестве параметра, моделирующего константу аффин-

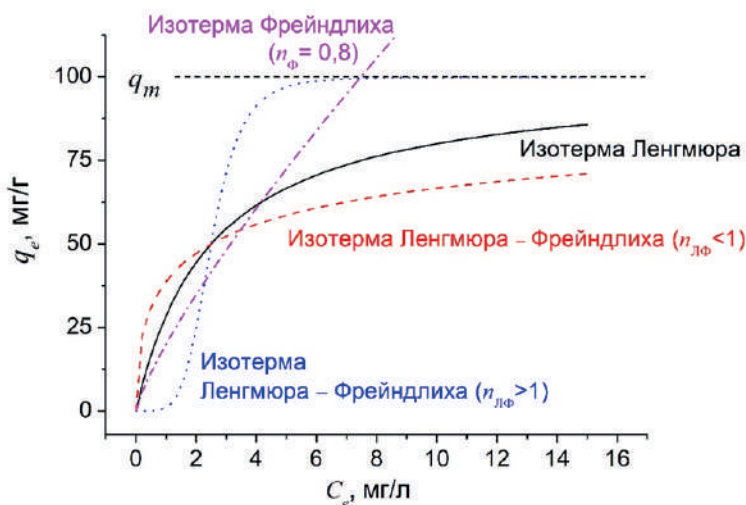


Рис. 5.9. Вид зависимостей, описывающих разные модели адсорбции

ности. Изотерма Фрейндлиха характеризуется монотонным ростом, при  $n_{\text{ф}}$  равном единице зависимость принимает характер линейной.

Рассмотренные примеры изотерм различаются количеством входящих в них параметром и их физическим смыслом. Кроме модели Ленгмюра и Фрейндлиха существуют и другие двухпараметрические изотермы. Так, изотерма Радужкевича – Дубинина описывает адсорбцию на гетерогенных поверхностях с гауссовым распределением по энергии, модель Хилла – Дебойера описывает случай, когда есть боковое взаимодействие между адсорбированными молекулами, изотерма Хилла предполагает, что адсорбция обусловлена кооперативным действием адсорбатов на одном участке адсорбента и т. д. В основе этих и других моделей лежат различные предположения о характере взаимодействия адсорбат – адсорбент. Существуют также примеры одно-, трех-, четырех-, пятипараметрических изотерм [17].

Имея один и тот же набор адсорбатов (красителей) и меняя лишь анионный компонент комплексов, а также варьируя ионную силу раствора, получили изотермы, описываемые разными моделями. Часто для повышения достоверности определения принадлежности к той или иной модели адсорбции производят такое преобразование координат, чтобы зависимость принимала вид прямой (т. н. линейный анализ). Применимость модели определяется по наилучшему коэффициенту корреляции. В табл. 5.2 приведены результаты нелинейного анализа экспериментальных зависимостей с помощью различных моделей.

На рис. 5.10 приведены изотермы адсорбции флуоресцеиновых красителей на полиэлектролитных комплексах из хитозана и сульфата арабиногалактана в безбуферном растворе при pH 5,6. Эти результаты удовлетворительно описываются с помощью модели Ленгмюра и Фрейндлиха для эозина, эритрозина и родамина 6G и с помощью модели Фрейндлиха для флуоресцеина. Изотермы адсорбции флуоресцеиновых красителей на полиэлектролитных комплексах из хитозана и хондроитин сульфата и хитозана и гиалуроната в ацетатном буфере с ионной силой около 0,1 и том же значении pH приведены на рис. 5.11. Полученные зависимости на меньшем интервале концентраций для эозина и эритрозина описываются моделью Ленгмюра – Фрейндлиха, а адсорбции флуоресцеина и родамина 6G в исследованном диапазоне концентраций зарегистрировать не удалось.

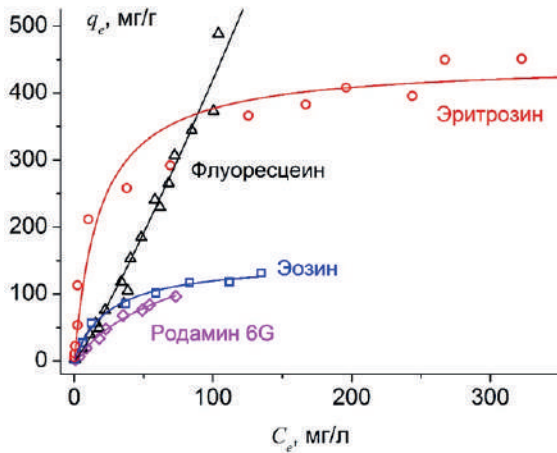


Рис. 5.10. Изотермы адсорбции ксантеновых красителей на полиэлектролитных комплексах из хитозана и сульфата арабиногалактана при pH 5,6 (безбуферный раствор)

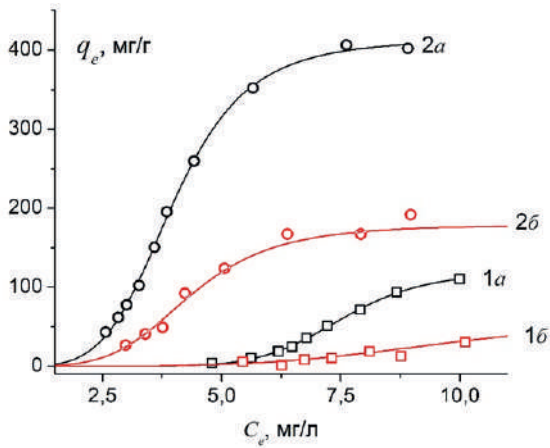


Рис. 5.11. Изотермы адсорбции эозина (1) и эритрозина (2) на полиэлектролитных комплексах из хитозана и хондроитин сульфата (а), хитозана и гиалуроната (б) при pH 5,6 (буферный раствор, ионная сила около 0,1 М)

Таблица 5.2

Результаты описания экспериментальных зависимостей  
с помощью различных моделей адсорбции

Адсорбат	Флуоресцеин	Эозин	Эритрозин	Родамин 6G
Безбуферный раствор, pH 5,6, адсорбент: комплексы из хитозана и сульфата арабиногалактана, <i>изотерма Ленгмюра</i>				
$q_m$ , мг/г	Не описывается	148 ± 12	446 ± 42	197 ± 45
$K_L$ , л/мг		0,040 ± 0,013	0,054 ± 0,030	0,013 ± 0,005
$R^2$		0,993	0,959	0,994
Безбуферный раствор, pH 5,6, адсорбент: комплексы из хитозана и сульфата арабиногалактана, <i>изотерма Фрейндлиха</i>				
$n_\Phi$	1,14 ± 0,08	0,44 ± 0,04	0,32 ± 0,03	0,72 ± 0,10
$K_\Phi$	2,23 ± 0,94	15,50 ± 2,80	73,51 ± 10,50	4,60 ± 1,83
$R^2$	0,985	0,977	0,971	0,986
Буфер pH 5,6, ионная сила 0,1 М, адсорбент: комплексы из хитозана и хондроитин сульфата, <i>изотерма Ленгмюра – Фрейндлиха</i>				
$q_m$ , мг/г	Адсорбция не выявлена	115 ± 58	416 ± 21	Адсорбция не выявлена
$K_{ЛФ}$ , л/мг		0,14 ± 0,02	0,25 ± 0,08	
$n$		9,3 ± 3,0	5,0 ± 0,4	
$R^2$		0,997	0,996	
Буфер pH 5,6, ионная сила 0,1 М, адсорбент: комплексы из хитозана и гиалуроната, <i>изотерма Ленгмюра – Фрейндлиха</i>				
$q_m$ , мг/г	Адсорбция не выявлена	63 ± 28	179 ± 6	Адсорбция не выявлена
$K_{ЛФ}$ , л/мг		0,10 ± 0,02	0,23 ± 0,01	
$n$		4,6 ± 0,8	4,9 ± 0,3	
$R^2$		0,972	0,998	

Различная эффективность связывания флуоресцеиновых красителей и родамина 6G с полисахаридами может быть продемонстрирована экспериментами, в которых связывание красителей с хитозаном происходит перед этапом сборки хитозана и полианиона в полиэлектролитный комплекс [12] (рис. 5.12). С помощью такого синтеза получают флуоресцентно-маркированные во всем объеме биополимерные частицы. При соблюдении одинаковых молярных соотношений красителя и хитозана и идентичного последующего протокола синтеза полиэлек-

тролитных комплексов содержание красителя оказалось различным. Максимальное содержание достигнуто для эритрозина, что коррелирует с его максимальной адсорбционной емкостью  $q_m$  среди красителей (табл. 5.2). Связь красителя с полимером оказывается достаточно прочной для того, чтобы не наблюдалось выхода красителя из полимерных частиц в течение недели.

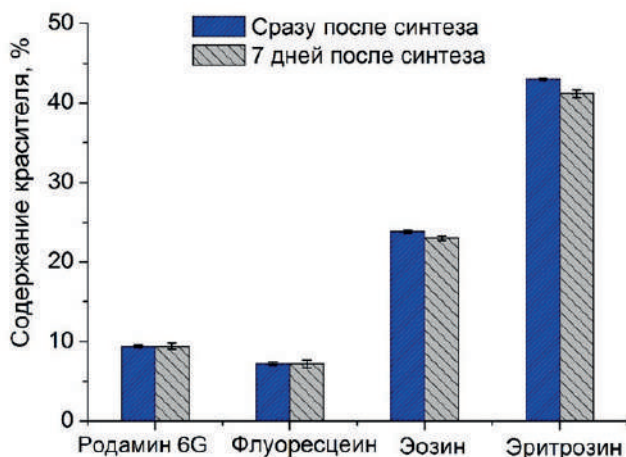


Рис. 5.12. Содержание красителя в полиэлектrolитных комплексах по отношению к добавленному к хитозану перед этапом самосборки (воспроизведено по [12])

Механизмы адсорбции красителей на хитозане и материалах на основе хитозана широко обсуждаются в литературе. При этом принимаются во внимание химическое, электростатическое (ионное) связывание, гидрофобное взаимодействие, вандерваальсовы (например диполь-дипольные) взаимодействия, водородная связь. Для первичной оценки можно полагать, что величины энергий взаимодействий располагаются в указанном порядке (см. п. 1.6). При интерпретации полученных результатов необходимо учитывать три фактора: химическую структуру самого адсорбента (красителя), наличие или отсутствие ионов соли в растворе и различный химический состав анионного компонента комплексов. Обсудим возможное влияние наиболее значимых нехимиче-

ских механизмов взаимодействия красителя с поверхностью комплексов подробнее.

*Электростатическое взаимодействие.* Два противоположно заряженных молекулярных фрагмента эффективно взаимодействуют с энергией, уступающей по величине только энергии химической связи. Образование заряженных групп хитозана и натриевой соли красителя (на примере рассмотрения его карбоксильной группы), а также образование комплекса можно продемонстрировать в виде следующей схемы:



Приведенный механизм реализуется при оптимальном соотношении pH и констант диссоциации электролитов. В нашем случае pH раствора, равное 5,6, находится в интервале между величиной показателя константы катион-нейтрального равновесия аминогрупп хитозана (около 6,3–6,6) и дианион-анионного равновесия флуоресцеиновых красителей (около 3,7 для эозина; 5,0 для эритрозина и 6,3 для флуоресцеина, подробнее см. п. 3.1). Такой выбор pH среды обеспечивает достаточную степень как протонирования деацетилированных функциональных групп хитозана (катионный компонент), так и ионизации карбоксильных групп красителей (анионные формы). При этом pH эозин практически полностью находится в дианионном состоянии, эритрозин преимущественно в дианионном состоянии, флуоресцеин только на 20 % в дианионном, а в остальном состоит из однозарядных анионов (см. рис. 3.4). Родамин 6G единственный из красителей имеет при исследованном pH катионную природу, т. е. содержит только положительно заряженную аминогруппу (карбоксильная группа этерифицирована и не участвует в кислотно-основных равновесиях).

Предполагая, что электростатическое взаимодействие определяет механизм связывания, ожидалось, что изотермы адсорбции анионных



красителей на комплексах из хитозана и сульфата арабиногалактана будут описываться в рамках одной модели. Тем не менее изотерма адсорбции флуоресцеина описывается только в рамках гетерогенной модели Фрейндлиха, а остальных красителей с помощью моделей Фрейндлиха и Ленгмюра (с различающимися коэффициентами корреляции). При этом максимальная адсорбционная емкость была получена для эритрозина, не находящегося, в отличие от эозина, полностью в дианионном состоянии. Особого внимания заслуживает тот факт, что катионный краситель эффективно связывается с положительно заряженным полиэлектролитным комплексом. Это означает, что электростатическое связывание является важным, но не единственным механизмом межмолекулярного взаимодействия.

При переходе от безбуферных растворов к буферным происходит изменение характера изотермы адсорбции (табл. 5.2). Наличие соли способствует эффективному включению механизма связывания, имеющего другую природу. Таким механизмом может быть *гидрофобный* механизм, усиливающийся в буферных растворах с большой ионной силой при экранировании зарядов.

*Гидрофобные взаимодействия.* О гидрофобных взаимодействиях мы говорили в предыдущем параграфе, когда обсуждали механизм связывания флуоресцеиновых красителей с эмиттером биolumинесценции. В целом, они могут быть достаточно эффективными и иметь энергию, значительно превышающую энергию вандерваальсовых взаимодействий.

Гидрофобность глюкозаминовых звеньев хитозана достаточно высока в условиях неполного деацетилирования хитина [18]. Галоген в молекулярной структуре красителей также способствует повышению гидрофобности соединения. Коэффициенты распределения, характеризующие гидрофобность красителей, располагаются в следующем порядке по убыванию: 8,52, 7,48, 5,8 и 4,05 для эритрозина, эозина, родамина 6G и флуоресцеина, соответственно. Эти параметры объясняют высокую адсорбционную емкость красителей, содержащих атомы галогенов и лидирующее место эритрозина по отношению к величине достигаемой им адсорбционной емкости на частицах из полисахаридов (см. табл. 5.2).

Помимо разных условий проведения эксперимента (наличие/отсутствие буфера), результаты, полученные на рис. 5.10 и 5.11 харак-

теризуются разным концентрационным диапазоном адсорбата. Для построения изотерм на рис. 5.10 использованы растворы красителей с концентрацией до  $10^{-3}$ – $10^{-4}$  М. При таких концентрациях необходимо учитывать димеризацию красителей. Константы диссоциации димеров существенно различаются: 0,2 М для флуоресцеина, 0,01 М для эозина, 0,007 М эритрозина, 0,0004 М для родамина 6G (см. п. 2.1.). Это может приводить, в частности, к образованию второго слоя на адсорбенте, образованного димерами красителей.

*Диполь-дипольное взаимодействие.* Диполь-дипольные взаимодействия считаются одними из самых слабых, сравнимых или меньших, чем энергия водородной связи. Тем не менее, их роль может быть весьма существенной в случае высоких дипольных моментов взаимодействующих фрагментов молекул, их оптимальной ориентации и достаточного сближения. Молекулы хитозана содержат полярные аминогруппы, тогда как молекулы красителя могут содержать галогеновые заместители с сильно поляризованными связями. Дипольный момент связи С-галоген достигает значений 1,5 Д и 1,3 Д для С-Br и С-I соответственно. В противоположность эозину и эритрозину, флуоресцеин имеет неполярную связь С–Н, дипольный момент которой составляет около 0,3 Д. Таким образом, эффективность этого типа взаимодействия также, как величина адсорбционной емкости убывает от эритрозина к флуоресцеину.

Наличие основного механизма не исключает участие в межмолекулярных взаимодействиях и других (вторичных) механизмов, проявляющих себя при достаточном сближении молекул, однако определение вкладов этих взаимодействий является достаточно сложной задачей.

Опубликованные данные по адсорбции эозина на частицах хитозана [19–21] и флуоресцеина на хитозане [22] были получены при различных рН. Значения адсорбционной емкости для эозина при рН 3,8 высоки и варьируются от 2 до 6 г/г. Высокая адсорбционная емкость при рН 3,8 связана с большей эффективностью протонирования аминогрупп хитозана. Следует отметить повышенную величину адсорбционной емкости для наночастиц хитозан-триполифосфат по сравнению с молекулярным хитозаном [20]. Качество поверхности адсорбента влияет на эффективность связывания. Как будет показано в п. 5.4, полиэлектролитные комплексы на основе хитозана имеют специфическую поверхность, обеспечивающую изоляцию красителя от внешних тушителей.

### 5.3. Измерение размера излучателя с помощью деполяризации люминесценции

Поляризационные измерения люминесценции могут быть использованы для оценки размеров флуорофора или, в случае, когда он связан с биомолекулой, целого комплекса (см. п. 1.2). Для этого необходимо измерить анизотропию флуоресценции  $r$  и связать ее с гидродинамическим диаметром через уравнения (1.10), (1.11). Результаты для молекул флуоресцеиновых красителей в водных растворах с различным pH приведены в табл. 5.3.

Таблица 5.3

Анизотропия флуоресценции и гидродинамический диаметр  
флуоресцеиновых красителей в воде при различных pH

Краситель	pH 2,3		pH 5,1		pH 11,7	
	$R$	$D$ , нм	$r$	$D$ , нм	$R$	$D$ , нм
Флуоресцеин	$0,011 \pm 0,001$	$0,74 \pm 0,03$	$0,006 \pm 0,001$	$0,73 \pm 0,04$	$0,005 \pm 0,001$	$0,86 \pm 0,04$
Эозин	$0,049 \pm 0,003$	$0,91 \pm 0,05$	$0,030 \pm 0,001$	$0,92 \pm 0,05$	$0,028 \pm 0,001$	$1,06 \pm 0,07$
Эритрозин	$0,226 \pm 0,002$	$1,0 \pm 0,3$	$0,219 \pm 0,001$	$1,0 \pm 0,3$	$0,218 \pm 0,001$	$1,1 \pm 0,2$

Из приведенных в табл. 5.3 данных [23] следует, что анизотропия увеличивается в ряду флуоресцеин – эозин – эритрозин, а также имеет зависимость от величины pH у флуоресцеина и эозина. Согласно уравнению (1.10) эти изменения могут быть обусловлены как различием флуоресцентных времен жизни, так и разницей размеров молекул, которая влияет на время вращательной корреляции при фиксированных свойствах растворителя. Гидродинамический диаметр  $D$  молекул растет от флуоресцеина к эритрозину, что обусловлено увеличением длин связей С-галоген (Cl, Br, I) при галогензамещении (см. п. 2.2). Зависимость размера от pH свидетельствует о том, что дианионы красителей, образующиеся в щелочной среде, удерживают большую сольватную оболочку, чем другие ионные состояния. У эритрозина эта тенденция, по-видимому, также имеет место, однако слишком короткое время жиз-

ни флуоресцентного состояния не позволяет определить время вращательной корреляции с необходимой точностью. Здесь можно сформулировать требования к излучателю для проведения поляризационных измерений, позволяющих оценить его размеры: время жизни флуоресцентного состояния должно быть достаточным для броуновского поворота молекулы и при этом быть не слишком коротким, чтобы его можно было измерить с достаточной точностью.

Время-разрешенные методы позволяют измерять затухание анизотропии  $r(t)$  и путем анализа временной функции выявлять характеристики различных по размеру флуорофоров (1.12). Чаще всего в явлениях межмолекулярных взаимодействий рассматривают два типа флуорофоров – находящихся в свободном и связанном состояниях.

Для сравнения информативности методов стационарной и время-разрешенной анизотропии рассмотрим пример свободных молекул красителей и молекул, связанных с полиэлектролитными комплексами из хитозана и хондроитин сульфата (см. п. 5.2) [12]. Зависимости  $r(t)$  для красителей, связанных с полиэлектролитными комплексами из полисахаридов приведены на рис. 5.13.

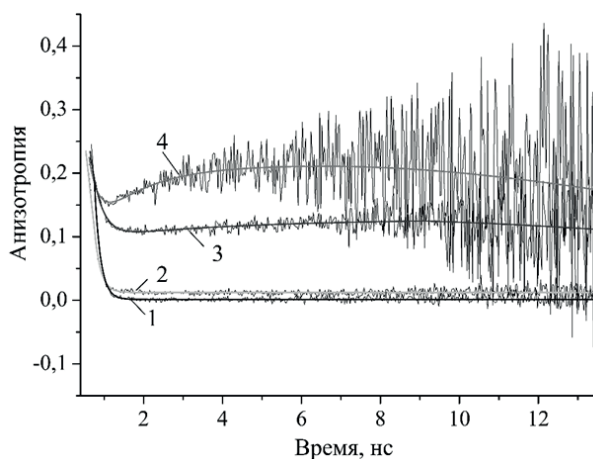


Рис. 5.13. Время-разрешенная анизотропия флуоресценции красителей, связанных с полиэлектролитными комплексами из хитозана и хондроитин сульфата; 1 – родамин 6G; 2 – флуоресцеин; 3 – эозин; 4 – эритрозин (воспроизведено по [12])

Таблица 5.4

Параметры излучателя, получаемые при использовании стационарной и время-разрешенной флуоресцентной анизотропии

Краситель	Стационарная анизотропия			Времяразрешенная анизотропия			
	$r$	$\phi^*$ , нс	$D$ , нм	$\phi_1$ , нс	$D$ , нм	$\phi_2$ , нс	$D$ , нм
Родамин 6G	$0,032 \pm 0,003$	$0,37 \pm 0,04$	$1,43 \pm 0,15$	$0,20 \pm 0,1$	$1,17 \pm 0,06$	$1,4 \pm 0,4$	$2,2 \pm 0,6$
Флуоресцеин	$0,017 \pm 0,003$	$0,16 \pm 0,03$	$1,08 \pm 0,20$	$0,14 \pm 0,1$	$1,03 \pm 0,07$	$1,2 \pm 0,3$	$2,12 \pm 0,5$
Эозин	$0,154 \pm 0,005$	$0,35 \pm 0,05$	$1,40 \pm 0,20$	$0,21 \pm 0,1$		—	—
Эритрозин	$0,244 \pm 0,006$	$0,81 \pm 0,02$	$1,86 \pm 0,05$	$0,20 \pm 0,2$		—	—

\* Рассчитано по уравнению (1.10).

Параметры, полученные из измерений стационарной и время-разрешенной анизотропии, представлены в табл. 5.4. Гидродинамический диаметр молекул флуоресцеина, эозина и эритрозина в присутствии полимерных комплексов, рассчитанный из анализа стационарной анизотропии оказывается выше (причем для эритрозина почти в два раза), чем указанные в табл. 5.3 для обычных водных растворов. Для корректной интерпретации полученных результатов необходимо принять во внимание, что в растворе связывание красителями с полиэлектролитными комплексами носит равновесный характер, поэтому часть красителя находится в свободном, а часть — в связанном состоянии. Усредненные значения  $\phi$  и  $D$ , определяемые методом стационарной анизотропии для таких систем, являются завышенными по сравнению со значениями для свободных молекул. Кроме того, следует учитывать изменения вязкости раствора при добавлении макромолекул.

В то же время при использовании времяразрешенных экспериментальных методов для красителей с большим временем жизни флуоресцентного состояния удастся выявить две компоненты с  $\phi_1$  и  $\phi_2$ , соответствующие свободному и связанному состояниям красителя. Значение  $\phi_2$  почти на порядок превышает значение  $\phi_1$ , однако рассчитанный с его помощью размер излучателя оказывается значительно меньше ожидаемого размера комплекса (около 0,4 мкм) с красителем в приближении

жесткой связи. Таким образом, логично предположить гибкую связь флуорофора с биополимером, допускающую определенную подвижность первого в пределах локальной области связывания.

В работе [24] с помощью метода стационарной анизотропии были успешно оценены размеры белка, связанного с эозином. При увеличении концентрации белка в растворе анизотропия изменялась от своего минимального значения, соответствующего характеристике свободного хромофора, до величины около 0,15, что указывает на размер излучателя, близкий к размеру молекулы бычьего сывороточного альбумина.

## 5.4 Фосфоресценция при комнатной температуре

Фосфоресценция может наблюдаться только у красителей с высоким выходом интеркомбинационной конверсии. Однако интенсивное тушение триплетных состояний растворенным кислородом обычно затрудняет наблюдение фосфоресценции в растворе даже для таких красителей. Кроме эффективного кислородного тушения триплетные состояния красителей дезактивируются в результате непланарной деформации структуры хромофора при соударениях с молекулами окружения. Поэтому фосфоресценцию обычно наблюдают при низкой температуре. Для наблюдения фосфоресценции можно применять органические растворители, кристаллизующиеся при комнатных температурах. Это позволяет получить растворы иммобилизованных в полимере красителей, не прибегая к фактическому замораживанию. В п. 2.3 и табл. 3–5 прил. обсуждались и приводились данные, связанные с наблюдением фосфоресценции при комнатной температуре у эозина, эритрозина и бенгальского розового в полимерных пленках хитозана и желатины и отсутствие таковой для спиртовых растворов красителей.

Кислородно-зависимое тушение триплетных состояний красителями их конформационная подвижность могут быть уменьшены добавлением в раствор макромолекул, например, белков [25] или специально структурированных полисахаридов [11], «защищающих» хромофор от действия тушителя. При связывании красителя и их иммобилизации в биополимерных структурах возможно разгорание фосфоресценции при комнатной температуре.

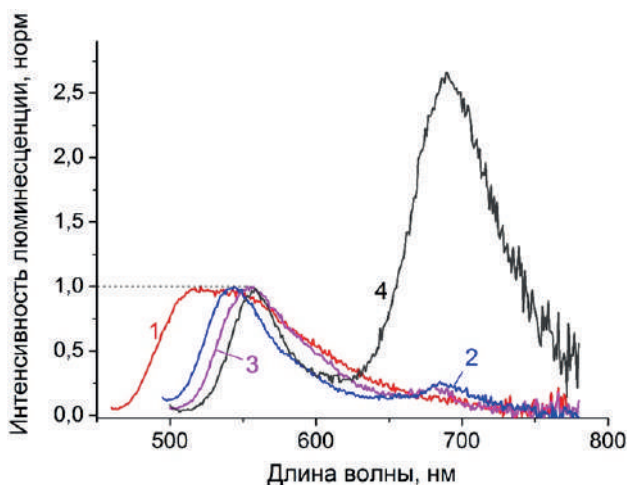


Рис. 5.14. Спектры замедленной флуоресценции и фосфоресценции красителей, связанных с полиэлектролитными комплексами из хитозана и хондроитин сульфата при комнатной температуре: 1 – флуоресцеин; 2 – родамин 6G; 3 – эозин; 4 – эритрозин (воспроизведено по [12])

Такое исследование было проведено для ряда флуоресцеиновых красителей при использовании частиц полиэлектролитных комплексов на основе хитозана и хондроитин сульфата [12]. В рамках исследования измерялись спектры люминесценции коллоидных растворов полиэлектролитных комплексов, содержащих красители, с такой задержкой во времени после возбуждения, которая исключает регистрацию флуоресценции красителя – самого быстрого из излучательных процессов. Регистрируемое в таких условиях излучение представляет собой замедленную флуоресценцию в коротковолновой части спектра и фосфоресценцию в его более длинноволновой части.

Нормированные на максимальную интенсивность замедленной флуоресценции спектры люминесценции красителей, связанных с полиэлектролитными комплексами, показаны на рис. 5.14. Контур спектра замедленной флуоресценции аналогичен контуру обычной флуоресценции. Ярко выраженный пик, связанный с фосфоресценцией эритрозина, появляется в красной области спектра при 691 нм. Он совпадает с пиком в спектре фосфоресценции эритрозина в пленках хитозана (см. табл. 4

прил.). Спектры эозина и родамина 6G выявили малоинтенсивный пик фосфоресценции при 688 и 681 нм соответственно. Эти значения также близки к значениям для фосфоресценции эозина в пленках хитозана (см. табл. 3 прил.) и родамина 6G в низкотемпературных вязких растворах [26]. Фосфоресценцию флуоресцеина зарегистрировать не удалось. Эффективность фосфоресценции красителя может быть охарактеризована отношением подынтегральных площадей фосфоресценции и замедленной флуоресценции. Для эритрозина, эозина, родамина 6G и флуоресцеина эта величина убывает по мере уменьшения количества атомов галогенов и/или их электроотрицательности в структуре флуорофора и составляет 4,1, 0,24, 0,17, и ~0 соответственно.

В то же время исследование [11] продемонстрировало отсутствие разгорания фосфоресценции у эритрозина, связанного с молекулярным хитозаном. Это говорит о том, что специфика укладки полимерной структуры играет принципиальную роль для наблюдения фосфоресценции при комнатной температуре. Конформация полиэлектrolитных комплексов так же, как и конформация белка, имеет сложный характер, допускающий образование полостей. Тушение флуорофора, попавшего в такие полости, затруднено. Таким образом, наблюдение фосфоресценции при комнатной температуре у красителей с эффективным спин-орбитальным взаимодействием может служить индикатором наличия пространственных неоднородностей на поверхности адсорбента.

## Литература

1. Hastings J.W. Chemistries and colors of bioluminescent reactions: a review // *Gene*. – 1996. – Vol. 173. – P. 5–11.
2. Duane W., Hastings J.W. Flavin mononucleotide reductase of luminous bacteria // *Mol. Cell. Biochem.* – 1975. – Vol. 6. – P. 53–64.
3. Gerasimova M.A., Sizykh A.G., Slyusareva E.A. The role of energy transfer in bioluminescence quenching by xanthene dyes // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. – 2009. – Vol. 97. – P. 117–122.
4. Picosecond fluorescence studies of xanthene dyes / R. Fleming, A.W.E. Knight, J. M. Morris, R.J.S. Morrison, G. W. Robinson // *J. Am. Chem. Soc.* – 1977. – Vol. 99. – P. 4306–4311.



5. Герасимова М. А., Сизых А. Г., Кудряшева Н. С. Хроноскопическое исследование взаимодействия ксантеновых красителей с ферментами: бактериальной люцеферазой и надн: фмн-оксидоредуктазой // Вестник КГУ. Физико-математические науки 1. – 2005. – С. 58–70.
6. Egbaria K., Friedman M. Adsorption of fluorescein dyes on albumin microspheres // *Pharm. Res.* – 1992. – Vol. 9. – P. 629–635.
7. Lee J. Lumazine protein and the excitation mechanism in bacterial bioluminescence // *Biophys. Chem.* – 1993. – Vol. 48. – P. 149–158.
8. Structure and interaction in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications / J. Berger, M. Reist, J.M. Mayer [et al.] // *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.* – 2004. – Vol. 57. – P. 35–52.
9. Костыро Я.А., Ковальская Г.Н. Сульфатированный арабиногалактан-перспективный отечественный аналог сулодексида // *Acta Biomedica Scientifica.* – 2008. – Т. 60, № 2. – С. 117.
10. Синтез и свойства интерполимерных комплексов на основе хитозана и сульфатированного арабиногалактана / Н. В. Слюсаренко, Н. Ю. Васильева, А. С. Казаченко, М. А. Герасимова, А. С. Романченко, Е. А. Слюсарева // *Высокомолекулярные соединения. Сер. Б.* – 2020. – Т. 62, № 3. – С. 203–209.
11. Spectral study of fluorone dyes adsorption on chitosan-based polyelectrolyte complexes / E. Slyusareva, M. Gerasimova, A. Plotnikov, A. Sizykh // *Journal of Colloid and Interface Science.* – 2014. – Vol. 417. – P. 80–87.
12. Synthesis and characterization of chitosan-based polyelectrolyte complexes doped with xanthene dyes / E. Slyusareva, M. Gerasimova, V. Slabko, N. Abuzova, A. Plotnikov, A. Eychmueller // *ChemPhysChem.* – 2015. – Vol. 16. – P. 3997–4003.
13. Polysaccharide-based polyelectrolyte complex nanoparticles from chitosan, heparin, and hyaluronan / S. Boddohi, N. Moore, P.A. Johnson, M.J. Kipper // *Biomacromolecules.* – 2009. – Vol. 10. – P. 1402–1409.
14. Langmuir I. The constitution and fundamental properties of solids and liquids. Part I. Solids // *Journal of the American Chemical Society.* – 1916. – Vol. 38, № 11. – P. 2221–2295.
15. Freundlich H.M.F. Über die adsorption in losungen // *Zeitschrift für Physikalische Chemie.* – 1906. – Vol. 57A. – P. 385–470.

16. Sips R. On the structure of a catalyst surface // *The Journal of Chemical Physics*. – 1948. – Vol. 16. – P. 490–495.
17. Ayawei N., Ebelegi A. N., Wankasi D. Modelling and Interpretation of Adsorption Isotherms // *Journal of Chemistry*. – 2017. – № 3039817.
18. Amiji M.M. Pyrene fluorescence study of chitosan self-association in aqueous-solution // *Carbohydr. Polym.* – 1995. – Vol. 26. – P. 211–213.
19. Chemical modification of chitosan by tetraethylenepentamine and adsorption study for anionic dye removal / X.-Y. Huang, X.-Y. Mao, H.-T. Bu, X.-Y. Yu, G.-B. Jiang, M.-H. Zeng // *Carbohydr. Res.* – 2011. – Vol. 346. – P. 1232–1240.
20. Preparation, characterization and adsorption properties of chitosan nanoparticles for eosin Y as a model anionic dye / W. L. Du, Z. R. Xu, X. Y. Han, Y. L. Xu, Z. G. Miao // *J. Hazard. Mater.* – 2008. – Vol. 153. – P. 152–156.
21. Elimination of dyes from aqueous solutions using iron oxides and chitosan as adsorbents. A comparative study / S. Pirillo, V. Pedroni, E. Rueda, M. L. Ferreira // *Quim. Nova*. – 2009. – Vol. 32. – P. 1239–U176.
22. Adsorption of a model anionic dye, eosin Y, from aqueous solution by chitosan hydrobeads / S. Chatterjee, S. Chatterjee, B. P. Chatterjee, A. R. Das, A. K. Guha // *J. Colloid Interface Sci.* – 2005. – Vol. 288. – P. 30–35.
23. Слюсарева Е. А., Герасимова М. А. Зависимость от pH абсорбционных и флуоресцентных свойств водных растворов флуореновых красителей // *Известия высших учебных заведений. Физика*. – 2013. – Т. 56, № 12. – С. 48–54.
24. Effect of halogenated fluorescent compounds on bioluminescent reactions. / T. N. Kirillova, M. A. Gerasimova, E. V. Nemtseva, N. S. Kudryasheva // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2011. – Vol. 400 – P. 343–351.
25. Garland P. B., Moore C. H. Phosphorescence of protein-bound eosin and erythrosin – possible probe for measurements of slow rotational mobility // *Biochem. J.* – 1979. – Vol. 183. – P. 561–572.
26. Kuznetsov V. A., Kunavin N. I., Shamraev V. N. Spectra and quantum yield of phosphorescence of rhodamine 6G solutions at 77°K // *J. Appl. Spectrosc.* – 1974. – Vol. 20. – P. 604–607.

## ПОСЛЕСЛОВИЕ

Публикуя данную монографию, автор надеялся не только ознакомить читателя с теорией и практикой физхимии люминесцентных красителей, но и продемонстрировать потенциал развития данной области науки, в которой, казалось бы, за десятилетия интенсивных исследований уже не должно было остаться «белых пятен». Тем не менее несмотря на долгий путь развития спектроскопии (а истоками можно считать работы И. Фраунгофера по измерению длин волн в спектре испускания Солнца) и совершенствование измерительной техники и методологии, доскональное изучение процессов поглощения и испускания света в сложных системах взаимодействующих молекул, он еще очень далек от завершения. В настоящее время исследования возбужденных состояний нередко сталкиваются с фундаментальными ограничениями измерительных техник. В таких случаях решение часто находят путем комбинирования различных методик из смежных областей, что ведет к «синергетическому» эффекту увеличения информативности экспериментальных исследований. Кроме того, развитие квантово-химических методов расчетов вместе со все возрастающей вычислительной мощностью позволяет достичь лучшего понимания механизмов межмолекулярных взаимодействий при сопоставлении расчетных и экспериментальных данных.

Но особо следует отметить бурное развитие практического использования люминесцентных красителей в последние десятилетия, связанное с биологическими исследованиями. Широкому применению люминесцентных красителей способствуют такие свойства, как гибкость при конъюгации с биополимерами, фотостабильность, низкая токсичность. Несмотря на появление новых классов флуорофоров – в первую очередь полупроводниковых нанокристаллов (квантовых точек), флуоресцентных биополимеров (например зеленый флуоресцирующий белок GFP) и нанокластеров металлов – красители не утрачивают своей значимости и нередко дополняют возможности других флуорофоров/эмитеров света, выступая в роли сенсibilизаторов.

Все вышесказанное не оставляет сомнений, что понимание природы возбужденных состояний люминесцентных красителей и разноо-

бразных фотофизических и фотохимических процессов с их участием будет полезным для нынешних студентов-старшекурсников и аспирантов физических и химических специальностей, а также тех, чья научная или практическая деятельность связана с созданием и изучением оптических функциональных материалов и устройств.

# ПРИЛОЖЕНИЕ

Таблица 1

Спектральные и фотофизические параметры флуоресцеина  
в различных растворителях\*

Параметры	Основной метанол	Желатин	Хитозан
$\lambda_{\text{погл}}$ , нм	$496 \pm 1$	$502 \pm 1$	$502 \pm 1$
$\sigma^{\text{макс}}$ , $10^{-16}$ см <sup>2</sup>		$1,0 \pm 0,1$	$1,8 \pm 0,2$
$\tilde{\nu}_{\text{погл}}$ , см <sup>-1</sup>	$1450 \pm 70$	$2670 \pm 80$	$1770 \pm 80$
$\lambda_{\text{фл}}$ , нм	$520 \pm 1$	$522 \pm 1$	$524 \pm 1$
$\tilde{\nu}_{\text{фл}}$ , см <sup>-1</sup>	$1570 \pm 70$	$1730 \pm 70$	$1690 \pm 70$
$\tilde{\nu}_{0-0}$ , см <sup>-1</sup>	$19700 \pm 40$	$19540 \pm 50$	$19500 \pm 40$
$\Delta\tilde{\nu}_{\text{стокс}}$ , см <sup>-1</sup>	$930 \pm 80$	$760 \pm 80$	$840 \pm 80$
$\Phi_{\text{фл}}$	$0,97 \pm 0,04$	$0,64 \pm 0,03$	$0,85 \pm 0,04$
$r$	$0,03 \pm 0,01$	$0,20 \pm 0,02$	$0,17 \pm 0,02$
$\tau$ , нс	$5,49 \pm 0,04$	$4,53 \pm 0,03$	$4,10 \pm 0,04$
$\tau_{\text{ралд}}$ , нс	$5,6 \pm 0,3$	$7,1 \pm 0,4$	$4,8 \pm 0,3$
$\Phi_{\text{фосф}}$	—	$< 1 \times 10^{-4}$	$< 1 \times 10^{-4}$
$\Phi_{\text{зфл}}$	—	$< 5 \times 10^{-5}$	$< 5 \times 10^{-5}$

\* Обозначения параметров приведены в п. 2.3.

Таблица 2

Спектральные и фотофизические параметры дибром-флуоресцеина  
в различных растворителях

Параметры	Основной метанол	Желатин	Хитозан
$\lambda_{\text{погл}}$ , нм	$513 \pm 1$	$519 \pm 1$	$518 \pm 1$
$\sigma^{\text{макс}}$ , $10^{-16}$ см <sup>2</sup>		$2,1 \pm 0,2$	$2,3 \pm 0,2$
$\tilde{\nu}_{\text{погл}}$ , см <sup>-1</sup>	$1420 \pm 80$	$1420 \pm 80$	$1520 \pm 80$
$\lambda_{\text{фл}}$ , нм	$539 \pm 1$	$544 \pm 1$	$543 \pm 1$
$\tilde{\nu}_{\text{фл}}$ , см <sup>-1</sup>	$1610 \pm 70$	$1570 \pm 70$	$1640 \pm 70$
$\tilde{\nu}_{0-0}$ , см <sup>-1</sup>	$19020 \pm 40$	$18830 \pm 30$	$18860 \pm 40$
$\Delta\tilde{\nu}_{\text{стокс}}$ , см <sup>-1</sup>	$940 \pm 70$		$890 \pm 70$
$\Phi_{\text{фл}}$	$0,62 \pm 0,03$	$0,55 \pm 0,03$	$0,57 \pm 0,03$
$r$	$0,04 \pm 0,01$	$0,14 \pm 0,02$	$0,15 \pm 0,02$
$\tau$ , нс	$3,46 \pm 0,04$	$2,89 \pm 0,02$	$2,62 \pm 0,03$
$\tau_{\text{рады}}$ нс	$5,6 \pm 0,3$	$5,3 \pm 0,3$	$4,6 \pm 0,3$
$\Phi_{\text{фосф}}$	—		$0,0030$
$\Phi_{3\text{фл}}$	—	$9,4 \times 10^{-4}$	$7,4 \times 10^{-4}$
$\tau_{\text{фосф}}$ , мс	—	$5,4 \pm 0,3$	$4,4 \pm 0,3$
$\lambda_{\text{фосф}}$ , нм	—	$680 \pm 1$	$684 \pm 1$
$\Phi_{\text{нкк}}$	—	$0,15$	$0,18$
$\Phi_{\text{T}}^{\text{S}}$	—	$0,29$	$0,24$
$k_{\text{нкк}}$ , с <sup>-1</sup>	—	$5,1 \times 10^7$	$6,7 \times 10^7$

\* Обозначения параметров приведены в п. 2.3.

Таблица 3

Спектральные и фотофизические параметры золина Y  
в различных растворителях

Параметры	Основной метанол	Желатин	Хитозан
$\lambda_{\text{погл}}$ , нм	$523 \pm 1$	$531 \pm 1$	$530 \pm 1$
$\sigma^{\text{макс}}$ , $10^{-16}$ см <sup>2</sup>		$2,9 \pm 0,3$	$3,3 \pm 0,3$
$\tilde{\nu}_{\text{погл}}$ , см <sup>-1</sup>	$1060 \pm 70$	$1140 \pm 75$	$1140 \pm 70$
$\lambda_{\text{фл}}$ , нм	$544 \pm 1$	$546 \pm 1$	$548 \pm 1$
$\tilde{\nu}_{\text{фл}}$ , см <sup>-1</sup>	$1360 \pm 70$	$1470 \pm 70$	$1540 \pm 70$
$\tilde{\nu}_{0-0}$ , см <sup>-1</sup>	$18750 \pm 40$	$18570 \pm 40$	$18560 \pm 30$
$\Delta\tilde{\nu}_{\text{стокс}}$ , см <sup>-1</sup>	$740 \pm 70$		$620 \pm 70$
$\Phi_{\text{фл}}$	$0,67 \pm 0,03$	$0,60 \pm 0,03$	$0,61 \pm 0,03$
$r$	$0,05 \pm 0,01$	$0,21 \pm 0,02$	$0,17 \pm 0,02$
$\tau$ , нс	$3,42 \pm 0,04$	$2,91 \pm 0,03$	$2,39 \pm 0,03$
$\tau_{\text{рады}}$ , нс	$5,1 \pm 0,3$	$4,9 \pm 0,3$	$3,9 \pm 0,2$
$\Phi_{\text{фосф}}$	—		$0,0052$
$\Phi_{\text{эфл}}$	—	$0,0014$	$0,0010$
$\tau_{\text{фосф}}$ , мс	—	$4,5 \pm 0,2$	$3,6 \pm 0,2$
$\lambda_{\text{фосф}}$ , нм	—	$688 \pm 1$	$691 \pm 1$
$\Phi_{\text{нкк}}$	—	$0,18$	$0,17$
$\Phi_{\text{T}}^{\text{S}}$	—	$0,21$	$0,22$
$k_{\text{нкк}}$ , с <sup>-1</sup>	—	$6,1 \times 10^7$	$7,0 \times 10^7$

\* Обозначения параметров приведены в п. 2.3.

Таблица 4

Спектральные и фотофизические параметры эритрозина В  
в различных растворителях

Параметры	Основной метанол	Желатин	Хитозан
$\lambda_{\text{погл}}$ , нм	$530 \pm 1$	$539 \pm 1$	$539 \pm 1$
$\sigma^{\text{макс}}$ , $10^{-16}$ см <sup>2</sup>		$4,7 \pm 0,5$	$3,8 \pm 0,4$
$\tilde{\nu}_{\text{погл}}$ , см <sup>-1</sup>	$1020 \pm 70$	$1070 \pm 70$	$1140 \pm 70$
$\lambda_{\text{фл}}$ , нм	$551 \pm 2$	$554 \pm 2$	$558 \pm 2$
$\tilde{\nu}_{\text{фл}}$ , см <sup>-1</sup>	$1470 \pm 90$	$1350 \pm 90$	$1310 \pm 90$
$\tilde{\nu}_{0-0}$ , см <sup>-1</sup>	$18510 \pm 50$	$18300 \pm 50$	$18240 \pm 50$
$\Delta\tilde{\nu}_{\text{стокс}}$ , см <sup>-1</sup>	$720 \pm 100$		$630 \pm 100$
$\Phi_{\text{фл}}$	$0,13 \pm 0,02$	$0,22 \pm 0,02$	$0,16 \pm 0,01$
$r$	$0,13 \pm 0,02$	$0,28 \pm 0,03$	$0,26 \pm 0,03$
$\tau$ , нс	$0,45 \pm 0,05$	$0,65 \pm 0,05$	$0,55 \pm 0,05$
$\tau_{\text{рады}}$ , нс	$3,5 \pm 0,9$	$3,0 \pm 0,5$	$3,4 \pm 0,5$
$\Phi_{\text{фосф}}$	—		$0,049$
$\Phi_{\text{эфл}}$	—	$0,0054$	$0,0046$
$\tau_{\text{фосф}}$ , мс	—	$0,78 \pm 0,03$	$0,60 \pm 0,03$
$\lambda_{\text{фосф}}$ , нм	—	$688 \pm 1$	$694 \pm 1$
$\Phi_{\text{нкк}}$	—	$0,37$	$0,46$
$\Phi_{\text{T}}^{\text{S}}$	—	$0,39$	$0,38$
$k_{\text{нкк}}$ , с <sup>-1</sup>	—	$5,6 \times 10^8$	$8,7 \times 10^8$

\* Обозначения параметров приведены в п. 2.3.



Таблица 5

Спектральные и фотофизические параметры бенгальского розового  
в различных растворителях

Параметры	Основной метанол	Желатин	Хитозан
$\lambda_{\text{погл}}$ , нм	$557 \pm 1$	$565 \pm 1$	$565 \pm 1$
$\sigma^{\text{макс}}$ , $10^{-16}$ см <sup>2</sup>		$3,5 \pm 0,4$	$2,8 \pm 0,3$
$\tilde{\nu}_{\text{погл}}$ , см <sup>-1</sup>	$870 \pm 64$	$902 \pm 65$	$1060 \pm 63$
$\lambda_{\text{фл}}$ , нм	$575 \pm 3$	$578 \pm 2$	$576 \pm 2$
$\tilde{\nu}_{\text{фл}}$ , см <sup>-1</sup>	$1210 \pm 100$	$1170 \pm 90$	$1360 \pm 90$
$\tilde{\nu}_{0-0}$ , см <sup>-1</sup>	$17670 \pm 60$	$17500 \pm 50$	$17530 \pm 50$
$\Delta\tilde{\nu}_{\text{стокс}}$ , см <sup>-1</sup>	$560 \pm 120$		$340 \pm 90$
$\Phi_{\text{фл}}$	$0,09 \pm 0,01$	$0,18 \pm 0,02$	$0,16 \pm 0,01$
$r$	$0,16 \pm 0,02$	$0,30 \pm 0,03$	$0,28 \pm 0,03$
$\tau$ , нс	$0,55 \pm 0,05$	$0,85 \pm 0,05$	$0,85 \pm 0,05$
$\tau_{\text{рады}}$ , нс	$6,1 \pm 1,2$	$4,7 \pm 0,5$	$5,3 \pm 0,6$
$\Phi_{\text{фосф}}$		$0,028$	$0,011$
$\Phi_{\text{эфл}}$	—	$0,0013$	$4,27 \times 10^{-4}$
$\tau_{\text{фосф}}$ , мс	—	$0,41 \pm 0,01$	$0,28 \pm 0,01$
$\lambda_{\text{фосф}}$ , нм	—	$737 \pm 1$	$741 \pm 1$
$\Phi_{\text{нкк}}$	—	$0,81$	$0,68$
$\Phi_{\text{T}}^{\text{S}}$	—	$0,033$	$0,23$
$k_{\text{нкк}}$ , с <sup>-1</sup>	—	$9,5 \times 10^8$	$8,0 \times 10^8$

\* Обозначения параметров приведены в п. 2.3.

## СЛЮСАРЕВА ЕВГЕНИЯ АЛЕКСЕЕВНА

Доктор физ.-мат. наук, профессор базовой кафедры фотоники и лазерных технологий Сибирского федерального университета. Является специалистом в области оптики и спектроскопии, физической химии, материаловедения. Научные интересы включают создание новых функциональных материалов из структурированных биополимеров и сенсоров на основе полупроводниковых и органических люминофоров. С 2007 по 2015 г. работала в качестве приглашенного исследователя в ун-те г. Регенсбург (ФРГ), Гельмгольц-центре г. Берлин (ФРГ), техническом ун-те г. Дрезден (ФРГ), неоднократно руководила грантами РФФИ, Министерства образования РФ, а также грантами зарубежных фондов и программ (CRDF, DAAD, Erasmus). Лауреат государственной премии Красноярского края в области профессионального образования, 2011 г. Для студентов и аспирантов СФУ читает курсы «Оптика», «Спектроскопия атомов и молекул», «Электронная спектроскопия молекулярных и квантово-размерных систем» и др., является автором более 120 научных публикаций.



Научное издание

**Слюсарева** Евгения Алексеевна

**РЕАКЦИИ С УЧАСТИЕМ  
ВОЗБУЖДЕННЫХ СОСТОЯНИЙ  
ФЛУОРЕСЦЕИНОВЫХ КРАСИТЕЛЕЙ**

Монография

Редактор *И. Н. Байкина*

Компьютерная верстка *О. А. Кравченко*

Подписано в печать 04.09.2020. Печать плоская. Формат 60×84/16  
Бумага офсетная. Усл. печ. л. 10,6. Тираж 500 экз. Заказ № 11167

Библиотечно-издательский комплекс  
Сибирского федерального университета  
660041, Красноярск, пр. Свободный, 82а  
Тел. (391) 206-26-16; <http://bik.sfu-kras.ru>  
E-mail: [publishing\\_house@sfu-kras.ru](mailto:publishing_house@sfu-kras.ru)