

Индукцированная синглетным кислородом замедленная флуоресценция водных растворов красителей при лазерном возбуждении

А.А.Красновский мл.^{*/**}, М.Е.Баштанов^{*}, Н.Н.Дроздова^{*}, О.А.Южакова^{***}, Е.А.Лукьянец^{***}

Установлено, что водорастворимые производные фталоцианина – поли(диэтоксифосфинилметил)замещенные фталоцианина алюминия – излучают интенсивную индуцированную синглетным кислородом замедленную флуоресценцию при лазерном образовании синглетного кислорода в насыщенных воздухом водных (D_2O) растворах. Свечение испускается молекулами красителей вследствие акцептирования ими энергии двух молекул синглетного кислорода. Показано, что в азрированных растворах хлоралюминиевого комплекса окта(диэтоксифосфинилметил)фталоцианина в D_2O квантовая эффективность свечения фталоцианина соответствует константе скорости заселения возбужденных молекул красителя, равной $(5.5 \pm 3) \times 10^{12}$ моль⁻²·д²·с⁻¹, что только на порядок меньше, чем в азрированных растворах исследованного ранее тетра(4-трет.-бутил)фталоцианина в органических растворителях. Показано, что изученные производные фталоцианина можно использовать в качестве исключительно чувствительных люминесцентных индикаторов образования синглетного кислорода в водных растворах различных соединений при лазерном возбуждении. Работа поддержана РФФИ (гранты № 98-03-32071 и 01-03-32871а).

Ключевые слова: синглетный молекулярный кислород, замедленная флуоресценция, фосфоресценция, фталоцианин, водные растворы фотосенсибилизаторов

1. Введение

Ранее мы сообщали, что фотовозбуждение молекул красителей в насыщенных воздухом растворах в органических растворителях приводит к образованию синглетного 1D_g -состояния молекулярного кислорода (1O_2), дезактивация которого сопровождается ИК фосфоресценцией на $\lambda = 1270$ нм и коротковолновым свечением в области $\lambda = 600 - 800$ нм [1–4]. Кинетика затухания коротковолнового свечения и зависимость его интенсивности от интенсивности возбуждающего света соответствуют представлению о том, что за излучение одного фотона ответственны две молекулы 1O_2 [3–5].

Спектральные исследования показали, что природа свечения сильно зависит от фотофизических свойств красителей. В растворах тех красителей, главный максимум флуоресценции которых лежит в области $\lambda \leq 600$ нм, свечение испускалось, главным образом, димерами (димолями) (1O_2)₂ [3, 4, 6]. В растворах красителей, главный максимум флуоресценции которых лежит в области $\lambda \geq 685$ нм, спектр свечения совпадал со спектром флуоресценции красителей, т.е. наблюдалась индуцированная синглетным кислородом замедленная флуоресценция (ЗФ) красителей [3–10]. Наиболее интенсивная ЗФ была обнаружена в растворах фталоцианинов и нафталоцианинов. При лазерном возбуждении квантовый выход ЗФ в растворах тетра(4-трет.-бутил)фталоцианина достигал 0.2–0.4, что превышает квантовый выход ИК фосфо-

ресценции 1O_2 на 2–4 порядка [10, 11]. В связи с этим использование ЗФ фталоцианинов для люминесцентной регистрации 1O_2 при его лазерном возбуждении в химических системах представляет большой интерес. До недавнего времени ЗФ наблюдалась только в органических средах. В настоящей работе мы обнаружили это явление в водных растворах поли(диэтоксифосфинилметил)замещенных фталоцианина алюминия.

2. Материалы и методы

Измерение ЗФ осуществлялось на лазерном спектрофлуориметре с временным разрешением [12], модифицированном в работах [7, 8]. Источником возбуждения служил азотный лазер ЛГИ-505 ($\lambda = 337$ нм, длительность, энергия и частота вспышек 10 нс, 7 мкДж и 700 Гц соответственно). При таких параметрах распределение энергии по сечению лазерного пучка было практически равномерным. Диаметр освещенной лазером поверхности составлял 2 мм, т.е. площадь поверхности была равна примерно 0.03 см², а соответствующая ей плотность энергии возбуждения – примерно 0.23 мДж/см².

Исследованные растворы помещали в прямоугольную кювету размером 2 × 10 мм. Лазерный пучок направлялся горизонтально со стороны широкой грани кюветы (шириной 10 мм). С целью уменьшения рефлексии ЗФ раствором красителя лазерный пучок смещался таким образом, что расстояние от его центра до края кюветы составляло 2.5 мм. Люминесценция измерялась под углом 90° к пучку со стороны узкой грани кюветы шириной 2 мм.

Излучение люминесценции фокусировалось кварцевой линзой на входную щель монохроматора МС-80 (относительное отверстие 1:3) через красный светофильтр КС-11 при измерении ЗФ красителя и через ИК светофильтр ИКС-7 при измерении фосфоресценции 1O_2 .

^{*}Институт биохимии им. А.Н.Баха РАН, Россия, 117071 Москва, Ленинский просп., 33

^{**}Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, биологический факультет, Россия, 119899 Москва, Воробьевы горы

^{***}ГНЦ РФ – НИИ органических полупродуктов и красителей, Россия, 101999 Москва, Садовая ул., 1/4

Щель монохроматора при кинетических и спектральных измерениях имела ширину 4 мм, что соответствовало спектральному интервалу 16 нм. Монохроматическое излучение фокусировалось на фотокатод фотоумножителя ФЭУ-83, охлажденного до -60°C .

Однофотонные импульсы ФЭУ через предусилитель, дискриминатор и генератор задержки поступали на вход многоканального (256 или 512 каналов) счетчика импульсов НТА-1024. Длительность одного канала составляла 5 мкс. Запуск счетчика осуществлялся рассеянным светом лазерной вспышки с помощью второго ФЭУ. Счетчик суммировал импульсы ФЭУ в каждом канале после большого числа вспышек лазера, формируя кинетическую кривую люминесценции. Интенсивность люминесценции определялась как отношение числа импульсов в каналах к числу лазерных вспышек.

При записи спектра люминесценции производилась запись кинетических кривых для набора длин волн. Для записи кинетических кривых было достаточно 10^4 лазерных вспышек, для записи спектров – 500 вспышек на точку спектра. Обработка данных велась на соединенном со счетчиком персональном компьютере с помощью программ Graph и Excel. Спектральная чувствительность регистрирующей системы определялась с помощью стандартной лампы накаливания из комплекта спектрофлуориметра Perkin – Elmer MPF-44В (США).

Спектры поглощения растворов измерялись на спектрофотометре Hitachi U-3400 (Япония), спектры флуоресценции – на спектрофлуориметре Perkin – Elmer MPF-44В и на сконструированном в нашей лаборатории спектрофлуориметре с повышенной чувствительностью в ближней ИК области.

Водорастворимые алюминиевые комплексы поли(диэтоксифосфинилметил)фталоцианина, содержащие от 4 до 8 фосфитных групп, были синтезированы из соответствующего поли(хлорметил)фталоцианина и триэтилфосфита по реакции Арбузова [13, 14]. Строение полученных комплексов определялось по данным элементного анализа и спектрам протонного магнитного резонанса. В качестве растворителя использовался оксид дейтерия D_2O (фирма «Изотоп», Санкт-Петербург, Россия).

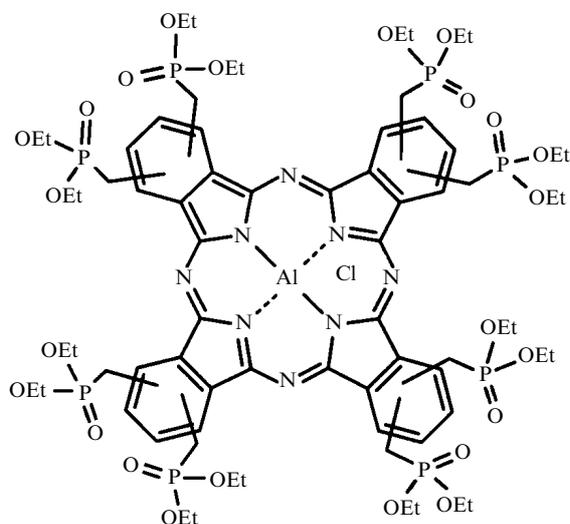


Рис.1. Формула окта(диэтоксифосфинилметил)замещенного хлоралюминиевого комплекса фталоцианина ($\text{Pc}^{\text{P}}\text{AlCl}$).

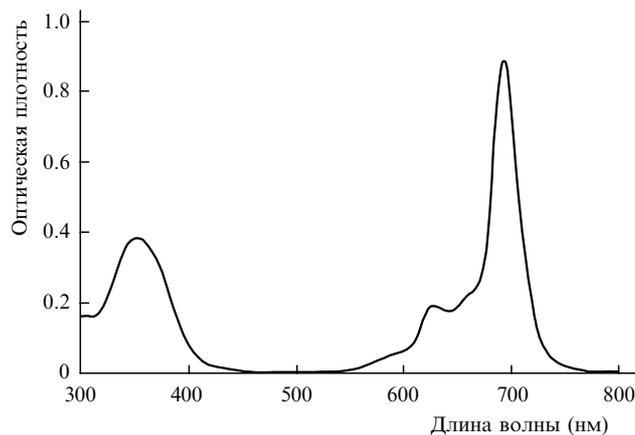


Рис.2. Спектр поглощения $\text{Pc}^{\text{P}}\text{AlCl}$ в D_2O при комнатной температуре.

3. Результаты и обсуждение

Для наблюдения индуцированной синглетным кислородом 3Ф фталоцианинов в водных растворах в качестве фотосенсибилизатора образования синглетного кислорода использовался феналенон, который генерирует синглетный кислород с квантовым выходом, равным 0.95 [15]. В качестве акцепторов энергии синглетного кислорода служили указанные выше производные фталоцианина. Наиболее активным в излучении индуцированной синглетным кислородом 3Ф при лазерном возбуждении оказался хлоралюминиевый комплекс окта(диэтоксифосфинилметил)фталоцианина ($\text{Pc}^{\text{P}}\text{AlCl}$) (рис.1), поэтому именно это соединение использовалось для дальнейших исследований.

Спектр поглощения $\text{Pc}^{\text{P}}\text{AlCl}$ в D_2O (pD 7.4) показан на рис.2. В спектрах поглощения наиболее интенсивны длинноволновая полоса на $\lambda = 693$ нм и УФ полоса на $\lambda = 353$ нм. Судя по спектрам поглощения, $\text{Pc}^{\text{P}}\text{AlCl}$ оставался мономерным в интервале pD 7–10. Молярный коэффициент поглощения в максимуме длинноволновой полосы составлял 1.3×10^5 моль $^{-1}$ ·л·см $^{-1}$. Концентрация $\text{Pc}^{\text{P}}\text{AlCl}$ в этих экспериментах была равна 0.18–1.8 мкмоль/л. При максимальной концентрации $\text{Pc}^{\text{P}}\text{AlCl}$ его оптическая плотность в области лазерного возбуждения ($\lambda = 337$ нм) составляла 0.02, при прочих концентрациях $\text{Pc}^{\text{P}}\text{AlCl}$ она была пропорционально меньше. Оптическая плотность феналенона в области лазерного возбуждения во всех экспериментах равнялась 0.12–0.24, поэтому лазерное излучение поглощалось в основном феналеноном. После облучения лазерными импульсами растворов, содержащих феналенон и $\text{Pc}^{\text{P}}\text{AlCl}$, мы наблюдали фотосенсибилизированную феналеноном фосфоресценцию синглетного кислорода в области $\lambda = 1270$ нм, время жизни которой составляло 50 ± 5 мкс (рис.3). В растворах $\text{Pc}^{\text{P}}\text{AlCl}$ без феналенона это свечение практически отсутствовало.

Одновременно возникало индуцированное синглетным кислородом замедленное свечение в коротковолновой области спектра. Как видно из рис.4, спектр этого свечения совпадает со спектром флуоресценции $\text{Pc}^{\text{P}}\text{AlCl}$ в том же растворе. Главный максимум флуоресценции и 3Ф расположен на $\lambda = 701$ нм. В длинноволновой области виден дополнительный максимум на $\lambda = 770$ нм. Кинетика 3Ф при импульсном лазерном возбуждении показана на рис.3. При регистрации 3Ф с задержкой 10

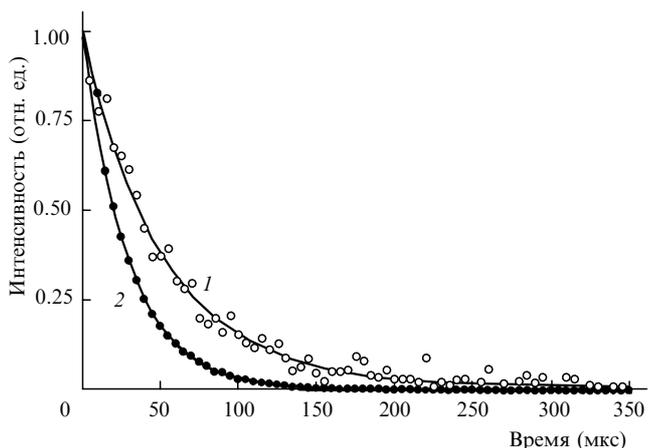


Рис.3. Кинетика затухания фотосенсибилизированной феноленом фосфоресценции синглетного кислорода (1) и индуцированной синглетным кислородом замедленной флуоресценции PcPA1Cl (2) в D₂O после лазерной вспышки. Кривые нормированы на начальную интенсивность свечения и получены в результате усреднения сигнала от 200000 (1) и 20000 (2) лазерных вспышек.

мкс после лазерной вспышки ее затухание удовлетворительно описывалось экспонентой с временем жизни, примерно в 2 раза меньшим, чем у фосфоресценции. Интенсивность ЗФ возрастала прямо пропорционально концентрации PcPA1Cl при ее изменении в указанных выше пределах. Как было показано ранее, это отражает тот факт, что ЗФ возникает в результате серии последовательных процессов, приводящих к тому, что одна молекула красителя аккумулирует энергию двух молекул синглетного кислорода [3–10].

Так же как и индуцированная синглетным кислородом ЗФ красителей в органических растворителях [16–18], ЗФ соединения PcPA1Cl в D₂O уменьшалась примерно в 5 раз после барботирования через раствор чистого кислорода, т.е. прямо пропорционально парциальному давлению кислорода в растворе, что рассматривается как следствие участия в свечении триплетного состояния PcPA1Cl или его комплекса с кислородом.

Для определения квантовой эффективности индуцированного синглетным кислородом образования возбужденных молекул PcPA1Cl мы использовали предложенный нами ранее коэффициент [18]

$$\alpha = \frac{(I_{df}^0/I_{ph}^0)k_r}{\gamma_f[{}^1O_2]_0 D}, \tag{1}$$

где I_{df}^0 и I_{ph}^0 – начальные интенсивности соответственно ЗФ красителя и фосфоресценции кислорода, полученные путем экстраполяции кривых затухания люминесценции к моменту времени $t = 0$; k_r – константа скорости излучательной дезактивации 1O_2 ; γ_f – квантовый выход флуоресценции красителя; $[{}^1O_2]_0$ – концентрация синглетного кислорода сразу после лазерной вспышки; D – концентрация PcPA1Cl. Коэффициент α соответствует эффективной константе скорости генерации возбужденных молекул PcPA1Cl при взаимодействии двух молекул 1O_2 и одной молекулы PcPA1Cl.

Необходимые для определения коэффициента α параметры указаны ниже. Согласно расчету, выполненному в работе [19] по данным работ [12, 20, 21], в D₂O константа $k_r \approx 0.12 \text{ с}^{-1}$. Молярная концентрация $[{}^1O_2]_0$ была рассчитана по формуле

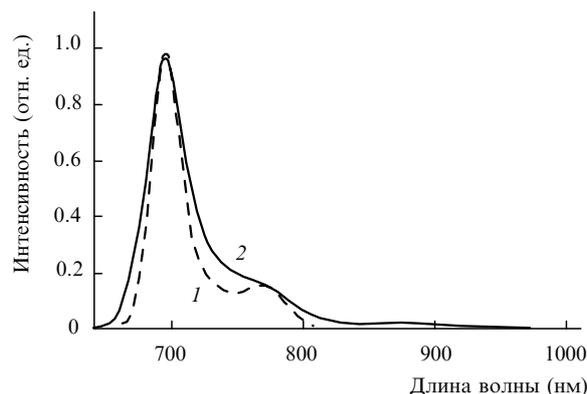


Рис.4. Спектры флуоресценции (1) и индуцированной синглетным кислородом ЗФ (2) красителя PcPA1Cl в D₂O при комнатной температуре, оптической плотности растворов в длинноволновом максимуме поглощения PcPA1Cl, не превышавшей 0.05 (1) и 0.1 (2), и спектральной ширине щелей монохроматора 2 (1) и 16 нм (2).

$$[{}^1O_2]_0 = \frac{1000W_{las}(1-T)\gamma_A}{hvNI} \tag{2}$$

и составила 0.7–1.3 мкмоль/л. Здесь W_{las} – плотность энергии лазерного излучения в мДж/см²; $h\nu = 5.8 \times 10^{-16}$ мДж – энергия фотона на $\lambda = 337$ нм; $N = 6.023 \times 10^{23}$ моль⁻¹ (число Авогадро); $1 - T$ – коэффициент поглощения лазерного излучения феноленом; $\gamma_A = 0.95$ – квантовый выход генерации 1O_2 феноленом при лазерном возбуждении; $l = 2$ мм – толщина кюветы. Интенсивности I_{df}^0 и I_{ph}^0 определялись путем экстраполяции экспоненциальных кривых затухания свечения к моменту времени $t = 0$. Отношение I_{df}^0/I_{ph}^0 определялось при измерении интенсивности свечения в максимумах спектров ЗФ и фосфоресценции 1O_2 (на $\lambda = 700$ и 1270 нм соответственно) через монохроматор со спектральной шириной щели 16 нм. По этим данным с помощью компьютерного моделирования рассчитывались отношения абсолютных интенсивностей свечения. При расчете учитывались площадь под спектрами испускания ЗФ и фосфоресценции и спектральная чувствительность ФЭУ.

Необходимый для определения коэффициента α квантовый выход флуоресценции (γ_f) PcPA1Cl ранее не был известен. Измерение γ_f было выполнено путем сравнения интенсивности флуоресценции растворов PcPA1Cl и тетра(*p*-сульфофенил)порфирина (ТСФП) в кювете размером 10 × 10 мм при возбуждении на $\lambda = 370$ нм. Оптическая плотность растворов красителей на этой длине волны составляла 0.08. Интенсивность флуоресценции рассчитывалась с помощью программы Excel как площадь под спектром флуоресценции с учетом спектральной чувствительности флуоресцентной установки. Полученные результаты показали, что квантовый выход флуоресценции PcPA1Cl в 3.9 раза выше, чем у ТСФП. Известно, что у ТСФП $\gamma_f = 0.1$ (см. [22] и указанные там ссылки), следовательно, PcPA1Cl имеет $\gamma_f \approx 0.4$.

Рассчитанное по результатам экспериментов $\alpha = (5.5 \pm 3) \times 10^{12}$ моль⁻²·л²·с⁻¹. Видно, что погрешность определения α достаточно велика. Это связано с необходимостью количественного учета в эксперименте большого числа технических параметров. Сравнение рассчитанного α с коэффициентом α , полученным нами ранее [18] в насыщенном воздухом растворе тетра(4-*трет.*-бутил) фталоцианина ($\alpha = (4 \pm 2) \times 10^{13}$ моль⁻²·л²·с⁻¹), показывает, что квантовая эффективность водного раствора PcPA1Cl как излучателя ЗФ достаточна высока.

4. Заключение

Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что $\text{Rc}^{\text{P}}\text{AlCl}$ является эффективным излучателем индуцированной синглетным кислородом ЗФ и поэтому может использоваться в качестве люминесцентного индикатора синглетного кислорода при его образовании лазерными импульсами в водных растворах. Поскольку при лазерном возбуждении сигнал ЗФ на несколько порядков сильнее, чем сигнал фосфоресценции $^1\text{O}_2$, доза лазерного облучения, необходимая для надежной регистрации $^1\text{O}_2$ по ЗФ, на несколько порядков меньше, чем для регистрации $^1\text{O}_2$ по фосфоресценции. Это весьма важно при исследовании водных растворов биологически важных соединений, которые обычно быстро разрушаются при освещении.

Работа поддержана РФФИ (гранты № 98-03-32071 и 01-03-32871а).

1. Красновский А.А. м.л. *Изв. АН СССР. Сер. физич.*, **41**, 343 (1978).
2. Krasnovsky A.A. Jr. *Photochem. Photobiol.*, **29**, 29 (1979).
3. Krasnovsky A.A. Jr., Neverov K.V. *Chem. Phys. Lett.*, **167**, 591 (1990).
4. Неверов К.В., Красновский А.А. м.л. *Оптика и спектроскопия*, **71**, 105 (1991).
5. Krasnovsky A.A. Jr., Foote C.S. *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 6013 (1993).
6. Chou P.-T., Chen Y.-C., Wei C.-Y., Chen S.-J., Lu H.-L., Wei T.-W. *J. Phys. Chem. A.*, **101**, 8581 (1997).
7. Баштанов М.Е., Красновский А.А. м.л. *Химия высоких энергий*, **31**, 375 (1997).
8. Баштанов М.Е., Дроздова Н.Н., Красновский А.А. м.л. *Квантовая электроника*, **29**, 230 (1999).
9. Красновский А.А. м.л., Швайцер К., Лайсманн Х., Танелиан Ч., Лукьянец Е.А. *Квантовая электроника*, **30**, 445 (2000).
10. Красновский А.А. м.л., Фу Ю., Баштанов М.Е., Мерфи С., Фут К.С. *Оптика и спектроскопия*, **83**, 616 (1997).
11. Krasnovsky A.A. Jr., Fu Y., Bashtanov M.E., Murphy S., Foote C.S. *Photochem. Photobiol.*, **67S**, 77S (1998).
12. Krasnovsky A.A. Jr., Egorov S.Yu., Nasarova O.V., Yartsev E.I., Ponomarev G.V. *Studia Biophys.*, **124**, 123 (1988).
13. Ворожцов Г.Н., Коган Е.А. и др. Патент РФ № 2146144 (2000); *Бюллетень изобретений: полезные модели*, № 7, 117 (2000).
14. Meerovich G.A., Lukyanetz E.A. et al. *Proc. SPIE Int. Soc. Opt. Eng.*, **2924**, 86 (1996).
15. Schmidt R., Tanielian C., Dunsbach R., Wolf C. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, **79**, 11 (1994).
16. Baigel D.M., Gorman A.A., Hamblett I., Hill T.J. *J. Photochem. Photobiol. B: Biology*, **43**, 229 (1998).
17. Murphy S., Kondo K., Foote C.S. *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 3751 (1999).
18. Баштанов М.Е., Красновский А.А. м.л. *Квантовая электроника*, **26**, 163 (1999).
19. Krasnovsky A.A. Jr. *Membr. Cell Biol.*, **12**, 665 (1998).
20. Красновский А.А. м.л., Егоров С.Ю., Назарова О.В., Ярцев Е.И., Пономарев Г.В. *Биофизика*, **32**, 982 (1987).
21. Scurlock R.D., Nonell S., Braslavsky S.E., Ogilby P.R. *J. Phys. Chem.*, **99**, 3521 (1995).
22. Kalyanasundaram K., Neumann-Spallart M. *J. Phys. Chem.*, **86**, 5163 (1982).