

ЧИСТО ЭЛЕКТРОННЫЙ ПЕРЕХОД И ОДНОРОДНОСТЬ ЛЮМИНОФОРА ИЗ СПЕКТРОВ ХЕМИ- И БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ

В. А. Толкачёв

УДК 535.34;535.37

<https://doi.org/10.47612/0514-7506-2023-90-1-97-101>

Институт физики НАН Беларуси, Минск, Беларусь;
e-mail: tolkachev@ifanbel.bas-net.by

(Поступила 8 ноября 2022)

Показано, что спектры хеми- и биолюминесценции, как и обычные диффузные спектры флуоресценции, несмотря на сложный механизм формирования возбужденного состояния, содержат информацию о частоте чисто электронного (вертикального) перехода испускающих молекул и степени однородности их ансамбля. Частота чисто электронного перехода, как и для обычных диффузных спектров люминесценции, существенно сдвинута в коротковолновую сторону (почти на полуширину полосы) от максимума спектра флуоресценции. Показан пример разделения перекрывающихся спектров с использованием положения коротковолнового чисто электронного перехода.

Ключевые слова: биолюминесценция, хемилюминесценция, чисто электронный переход, возбужденное состояние, однородность люминофора.

It is shown that, despite the complex mechanism of formation of the excited state, the chemi- and bioluminescence spectra, like ordinary diffuse fluorescence spectra, contain information about the magnitude of the purely electronic (vertical) transition of emitting molecules and the degree of homogeneity of their ensemble. The purely electronic transition, as in the case of ordinary diffuse luminescence spectra, is located significantly, almost a half-width of the band, shorter than the maximum of the fluorescence spectrum. An example of the separation of overlapping spectra using the position of the short-wavelength pure-electronic transition is given.

Keywords: bioluminescence, chemiluminescence, purely electronic transition, excited state, lumiphore homogeneity.

Введение. Как известно, в случае зеркальности молекулярных спектров сечений поглощения и испускания в том же электронно-колебательном переходе ось их симметрии соответствует частоте чисто электронного перехода, разности энергий комбинирующих электронных состояний. Из-за обязательной релаксации структуры после вибронного перехода и различия структур исходных в переходе состояний зеркальная симметрия спектров лишь приближенна. Кроме того, возможность получения обоих спектров одного того же электронного перехода обычно отсутствует. В то же время расстояние между оптически комбинирующими в электронно-колебательном переходе электронными состояниями молекул, т. е. положение чисто электронного перехода, при широких диффузных электронно-колебательных спектрах представляет фундаментальный интерес. В связи с этим возможность определения чисто электронного перехода в диффузном электронно-колебательном спектре поглощения или испускания актуальна. Процессы возбуждения испускающих хеми- и биолюминесценцию хромофоров в отличие от оптического возбуждения существенно опосредствованы переходными процессами и не всегда ясны, поэтому актуально рассмотрение закономерностей их спектров. Тем более, что хемилюминесцентная индикация широко применяется в настоящее время в анализе биомолекулярных структур и процессов из-за их чувствительности и относительной дешевизны.

PURE ELECTRONIC TRANSITION AND HOMOGENEOUSITY OF LUMINOPHORE FROM CHEMI- AND BIOLUMINESCENCE SPECTRA

V. A. Tolkachev (B. I. Stepanov Institute of Physics of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus; e-mail: tolkachev@ifanbel.bas-net.by)

У многоатомных молекул, как и квазимолекулярных структур, вырождение электронно-колебательных комбинирующих в оптическом переходе состояний из-за сложной системы возмущений трудно допустимо. Вероятность перехода между элементарными, невырожденными состояниями под влиянием внешнего возмущения в соответствии с законами квантовой механики не зависит от направления перехода. Это условие при равновесной (по Больцману) заселенности исходных, стартовых электронно-колебательных состояний приводит к соотношениям для определения частоты чисто электронного перехода [1] из спектра люминесценции

$$\frac{I(\nu)}{\nu^4} \exp\left(\frac{h\nu}{2kT}\right) = \varphi^e(|\nu - \nu_0|) \quad (1)$$

и поглощения

$$\frac{\varepsilon_a(\nu)}{\nu} \exp\left(\frac{h\nu}{2kT}\right) = \varphi^a(|\nu - \nu_0|). \quad (2)$$

Здесь $I(\nu)$ — интенсивность в спектре испускания на частоте ν (спектр квантового выхода пропорционален $I(\nu)/\nu$); $\varepsilon_a(\nu)$ — коэффициент поглощения; h — постоянная Планка; k — постоянная Больцмана; T — абсолютная температура; ν_0 — частота чисто электронного перехода. Правая часть соотношений (1) и (2) указывает на симметричный экстремум при $\nu = \nu_0$.

Метод определения чисто электронного перехода по отдельному спектру тестировался на молекулярных структурах и системах, агрегатных состояниях, структурных образованиях, примесных кристаллах [1—11] и даже полупроводниковых структурах [12, 13]. Из выражений (1) и (2) следует, что если ансамбль исходных хромофоров неоднороден, то его спектр представляется суммой парциальных спектров однородных ансамблей с несовпадающими ν_0 . В этом случае вместо симметричного экстремума соотношения дадут сумму смещенных по частоте и интенсивности парциальных экстремумов, как правило, размытую полосу [3].

Особенность хемилюминесценции в том, что в отличие от оптического формирования исходного в оптическом переходе ансамбля хромофоров, механизм его образования сложный, многоступенчатый и не всегда понятный. Рассматриваемый метод, насколько нам известно, к спектрам био- и хемилюминесценции не применялся. Область экстремума ν_0 для комнатных температур обычно расположена на коротковолновом крыле спектров люминесценции, измерение которого, как правило, не привлекает внимания и сопровождается погрешностью. В настоящей работе рассмотрены пригодные для анализа спектры био- и хемилюминесценции из различных литературных источников.

Результаты и их обсуждение. На рис. 1 приведены спектры поглощения, флуоресценции и хемилюминесценции люминола из [14, 15], а также соответствующие им функции $\varphi(\nu)$ и их логарифмические формы $\ln(\varphi(\nu))$. Видно, что $\varphi(\nu)$ (соотношения (1) и (2)) позволяют точнее локализовать ν_0 , но их логарифмическая форма визуализирует более широкую область спектра, что и обуславливает ее использование в цитируемых работах.

На рис. 1, а индицируются частоты 0-0-перехода по поглощению (26300 см^{-1}) и флуоресценции (27000 см^{-1}). Числа округлены из-за погрешностей и оцифровки спектров. Из (1) и (2) следует, что предельная точность локализации ν_0 — величина порядка измерительного разрешения спектра. Различие частот обусловлено, вероятно, разными растворителями и обычным различием комбинирующих состояний. Из рис. 1, б видно, что спектры поглощения и хемилюминесценции люминола с активатором 1,5,7-триаза-бицикло-[4.4.0]дец-5-еном (ТБД) дают локализацию чисто электронного перехода в области $26200 \pm 200 \text{ см}^{-1}$, совпадающую в пределах вышеназванных погрешностей. (Здесь и далее значения ν_0 округлены условно ввиду погрешностей, которые вносятся не только возможной погрешностью измерений, но и дополнительно при оцифровке спектров, приведенных в литературе.) В частности, сравнение данных рис. 1 показывает, что люминол связывается с ТБД не только в возбужденном, но и в основном состоянии, т. е. образуется стационарный комплекс.

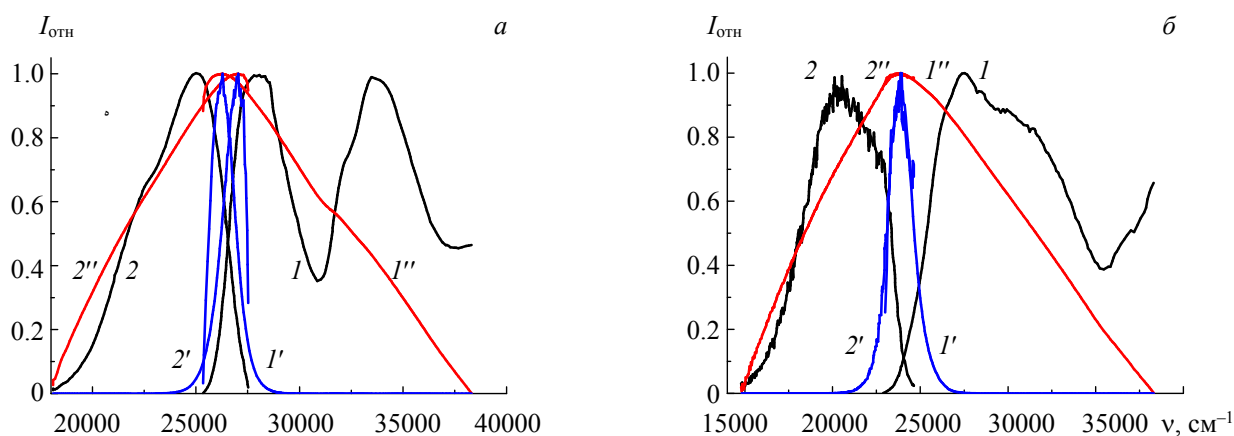


Рис. 1. Чисто электронные переходы из вибронных спектров люминола: *a* — спектры поглощения в диметилсульфоксиде (ДМСО) (*I*) [10] и флуоресценции в CH_2Cl_2 (*2*) [11]; *б* — спектры поглощения (*I*) и хемилюминесценции (*2*) активированного ТБД люминола в ДМСО [10]; *I'*, *2'* и *I''*, *2''* — соответствующие функции $\varphi(\nu)$ и $\ln(\varphi(\nu))$

На рис. 2 приведены спектры поглощения, хемилюминесценции и структуры ковалентно связанного комплекса люминола с молекулярным фрагментом BODIPY [16]. В испускании, как это наблюдалось у люминофора Alexa-Fluor-680-пикоцианина [3], индицируются испускающие центры двух видов — при $\nu_0 = 19800$ и 22500 см^{-1} , в то время как в поглощении только при $\nu_0 = 19800 \text{ см}^{-1}$. Использование логарифмической зависимости характеристической φ -функции обнаруживает в спектре хемилюминесценции два экстремума, люминесцентные центры двух видов — локализованные на фрагментах люминола (22500 см^{-1}) и BODIPY (19800 см^{-1}) [16].

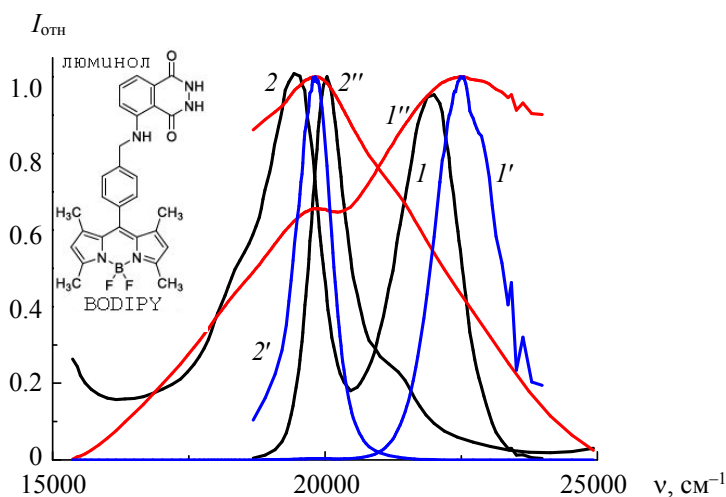


Рис. 2. Спектры поглощения (*I*) и хемилюминесценции (*2*) комплекса люминола с молекулярным фрагментом BODIPY [12]; *I'*, *2'* и *I''*, *2''* — соответствующие им функции $\varphi(\nu)$ и $\ln(\varphi(\nu))$

Методы определения чисто электронных переходов при перекрывающихся диффузных электронно-колебательных спектрах рассматривались ранее в [4]. Однако для разделения перекрывающихся спектров, относящихся к разным люминесцентным центрам, их электронным переходам, может быть использована и локальность положения чисто электронного перехода. Пример такой процедуры показан на рис. 3.

На рис. 3, *а* приведены спектры биолюминесценции североамериканского светлячка *Photinus pyralis* при pH среды 7.8, 7.0 и 6.0 [17]. Спектр существенно смещается в длинноволновую область с ростом кислотности среды, тем не менее его коротковолновая часть обусловлена, как видно из спектров $\ln(\varphi(\nu))$, одним и тем же типом хромофоров, однако с более слабым вкладом в более кислой среде. При pH 7.0 и 7.8 спектры при ν_0 обусловлены одним типом хромофоров и идентичны, что используем для исключения коротковолнового спектра из составного, суммарного при более высокой кислотности. Совмещаем спектры при pH 7.0 и 7.8 областью чисто электронного перехода, обусловленной только одним типом хромофоров, и получаем “кислотный” спектр как разность спектров в области их несовпадения. Предполагаем, что спектр коротковолнового хромофора не зависит от pH и однороден, что подтверждается полным совпадением спектров при pH 6.0 и рассчитанного.

На рис. 3, *б* показан пример спектров для другого типа биолюминофора [18]. Из характерной кривой видно, что коротковолновые чисто электронные переходы совпадают при всех pH. Для определения “кислотного” спектра используем спектры при pH 6.1 и 6.8, каждый из которых представляет собой сумму почти равных вкладов обоих типов хромофоров, однако коротковолновый чисто электронный переход один и тот же. Совмещая спектры при ν_0 коротковолнового перехода, находим разностный спектр как спектр “кислотного” типа хромофоров. Как видно, он совпадает со спектром при pH 5.6. Приведенные данные указывают на существование в использованных средах одновременно двух форм сольватации люминофоров — коротковолновой и длинноволновой, достаточно однородных, допускающих приведенное разделение.

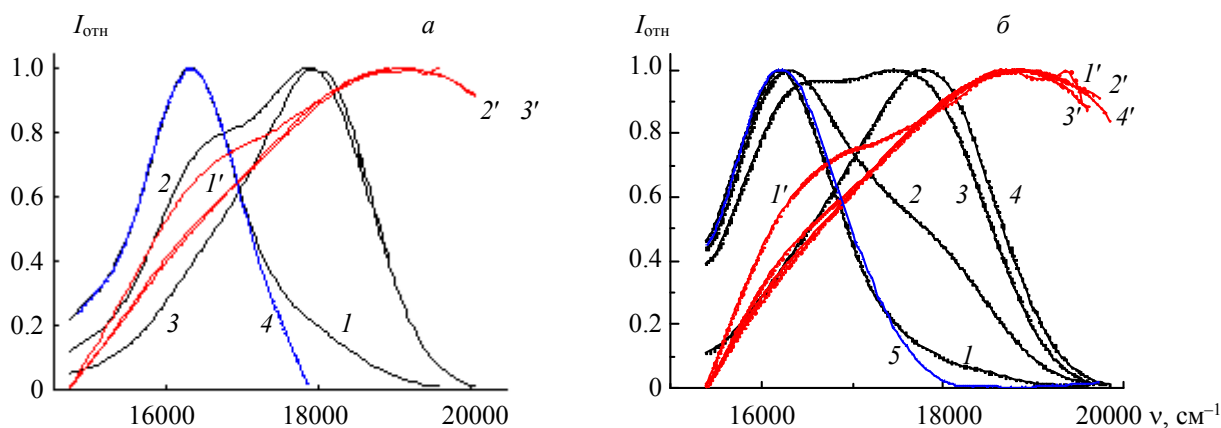


Рис. 3. Спектры биолюминесценции при различной pH среды: *а* — *Photinus pyralis* при pH 6.0 (1), 7.0 (2) и 7.8 (3) [10], 4 — “кислотный” спектр, 1'—3' — $\ln(\varphi(\nu))$ -функции, $\nu_0 = 19100 \text{ см}^{-1}$; *б* — *Luciola mingrelica* при pH 5.6 (1), 6.1 (2), 6.8 (3) и 8.5 (4) [11], 5 — “кислотный” спектр, 1'—4' — $\ln(\varphi(\nu))$ -функции, $\nu_0 = 18860 \text{ см}^{-1}$

Проявление полиморфизма люминесцентных центров при тестировании данного метода рассматривалось практически во всех цитированных в [2] работах. Поскольку подход не обнаруживает расхождений в рассматриваемых характеристиках спектров био- и хемилюминесценции с обычными, представляется излишним детальное рассмотрение спектрального проявления полиморфизма их люминесцентных центров.

Закключение. Приведенные данные подтверждают природу хеми- и биолюминесцентных центров, аналогичную обычной, и гипотезу обратимости молекулярных квантовых переходов на элементарном уровне. Несмотря на сложный механизм формирования возбуждения, испускающие центры находятся в тепловом равновесии. С использованием тестируемого метода определения чисто электронного перехода, а также методов, рассмотренных в [1—11], можно разделять перекрывающиеся электронно-колебательные спектры неоднородных центров.

-
- [1] **В. А. Толкачёв.** Журн. прикл. спектр., **84**, № 4 (2017) 648—654 [**V. A. Tolkachev.** J. Appl. Spectr., **84** (2017) 668—673]
- [2] **В. А. Толкачёв.** Докл. НАН Беларуси, **61**, № 50 (2017) 50—55
- [3] **В. А. Толкачёв.** Журн. прикл. спектр., **85**, № 2 (2018) 199—204 [**V. A. Tolkachev.** J. Appl. Spectr., **85** (2018) 220—224]
- [4] **В. А. Толкачёв.** Журн. прикл. спектр., **85**, № 5 (2018) 740—744 [**V. A. Tolkachev.** J. Appl. Spectr., **85** (2018) 845—849]
- [5] **В. А. Толкачёв.** Журн. прикл. спектр., **86**, № 3 (2019) 464—467 [**V. A. Tolkachev.** J. Appl. Spectr., **86** (2019) 504—507]
- [6] **В. А. Толкачёв.** Журн. прикл. спектр., **87** (2020) 499—504, 1005—1009 [**V. A. Tolkachev.** J. Appl. Spectr., **87** (2020) 525—530, 1131—1134]
- [7] **В. А. Толкачёв.** Журн. прикл. спектр., **88**, № 3 (2021) 471—477 [**V. A. Tolkachev.** J. Appl. Spectr., **88** (2021) 589—595]
- [8] **V. A. Tolkachev.** SCIREA J. Phys., **5**, N 4 (2020) 69—79
- [9] **V. A. Tolkachev.** Am. J. Appl. Chem., **8**, N 5 (2020) 121—125
- [10] **V. A. Tolkachev.** IJISSET, **6**, N 5 (2020) 6—9
- [11] **V. A. Tolkachev, A. P. Blokhin.** Sci. J. Anal. Chem., **7** (2019) 76—82
- [12] **В. А. Толкачёв.** Журн. прикл. спектр., **89**, № 1 (2022) 43—50
- [13] **В. А. Толкачёв.** Журн. прикл. спектр., **89**, № 3 (2022) 405—409
- [14] **Ch. M. Geiselhart, Ch. W. Schmitt, P. Joeckle, H. Mutlu, Ch. Barner-Kowollik.** Sci. Rep. (2019) 9.14519, doi: 10.1038/s41598-019-51105-z
- [15] **C.-C. Tseng, C.-Yen Chung, Sh.-En Tsai, H. Takayama, N. Uramaru, C.-Yu Lin, F. F. Wong.** Molecules, **25** (2020) 2409, doi: 10.3390/molecules25102409
- [16] **S. Bag, J.-C. Tseng.** J. Rochford, Royal Soc. Chem., Org. Biomol. Chem. (2013), doi: 10.1039/c4OB02413C
- [17] **H. Fraga.** Photochem. Photobiol. Sci., **7** (2008) 146—158
- [18] **N. N. Ugarova.** Photochem. Photobiol. Sci., **7** (2008) 218—227