

ФОТОФИЗИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ В МОЛЕКУЛАХ ИНДОЛА В ЭТАНОЛЕ ПРИ 77 К ПРИ ВОЗБУЖДЕНИИ НА ДЛИННОВОЛНОВОМ КРАЕ СПЕКТРА ПОГЛОЩЕНИЯ

А. А. Суходола

УДК 535.34+535.372

Белорусский национальный технический университет,
Минск, Беларусь; e-mail: a.sukhodola@bntu.by

(Поступила 20 июня 2023)

Исследована зависимость спектров люминесценции раствора индола в этаноле при 77 К от длины волны возбуждающего излучения. Обнаружено уменьшение отношения интенсивностей фосфоресценции и флуоресценции при возбуждении молекул индола на длинноволновом крае спектра поглощения. Установлено, что этот эффект связан с уменьшением отношения квантовых выходов интеркомбинационной конверсии и флуоресценции. Сделан вывод об увеличении вклада уровня 1L_a в процессы релаксации возбужденного синглетного состояния. Время жизни триплетных состояний не зависит от длины волны возбуждающего излучения.

Ключевые слова: индол, спектры поглощения, флуоресценция, фосфоресценция, интеркомбинационная конверсия, триплетные состояния.

The dependence of the luminescence spectra of an indole solution in ethanol at 77 K on the excitation wavelength has been studied. A decrease in the ratio of the intensities of phosphorescence and fluorescence has been found upon excitation of indole molecules at the long-wavelength edge of the absorption spectrum. It has been found that this effect is associated with a decrease in the ratio of the quantum yields of the intercombination conversion and fluorescence. It is concluded that the contribution of 1L_a level to the processes of relaxation of the excited singlet state increases. The lifetime of triplet states does not depend on the wavelength of the exciting radiation.

Keywords: indole, absorption spectra, fluorescence, phosphorescence, intercombination conversion, triplet states.

Введение. Индол является хромофором триптофана, который широко используется как внутренний зонд локальной структуры и динамики белков [1, 2]. Фотофизические свойства индола во многом определяются двумя близко расположенными нижними возбужденными синглетными состояниями 1L_a и 1L_b [3, 4]. Дипольный момент состояния 1L_a (6 Д) значительно больше, чем дипольный момент основного и 1L_b -состояний [5]. Энергия состояния 1L_a сильно зависит от полярности микроокружения молекул. Вследствие высокой полярности возбужденных состояний фотофизические характеристики индола зависят от растворителя. Например, максимум спектра флуоресценции в жидких растворах изменяется от 28200 см^{-1} в неполярном растворителе гексане до 32800 см^{-1} в воде [6]. Исследование зависимости фотофизических характеристик молекул индола от энергии их взаимодействия с микроокружением является важной задачей спектроскопии и люминесценции белков.

Ранее в работах Н. А. Борисевича с сотрудниками [7—10] люминесцентными методами были исследованы фотофизические характеристики индола и его производных в газовой фазе и жидких растворах. Установлены механизмы длительной люминесценции и определены пути релаксации триплетных состояний молекул в этих средах.

Полярные взаимодействия между хромофором и его молекулярным окружением в жидких растворах в силу неоднородности структуры растворителя приводят к широкому распределению

PHOTOPHYSICAL PROCESSES IN INDOLE MOLECULES IN ETHANOL AT 77 K UPON EXCITATION AT THE LONG WAVELENGTH EDGE OF THE ABSORPTION SPECTRUM

A. A. Sukhodola (Belarusian National Technical University, Minsk, Belarus; e-mail: a.sukhodola@bntu.by)

по энергии взаимодействия и, следовательно, к распределению по энергии 0–0-перехода в спектрах поглощения молекул. На длинноволновом крае спектра поглощения селективно возбуждается та часть хромофорных молекул, которая сильнее взаимодействует с локальным окружением и имеет наиболее низкую энергию электронного перехода. Если время дипольной релаксации больше, чем время жизни возбужденных синглетных состояний, то наблюдается зависимость фотофизических характеристик молекул от длины волны возбуждающего излучения [11]. Ранее [12] для индола в смеси вода–этиленгликоль при 77 К наблюдалось длинноволновое смещение спектров флуоресценции и фосфоресценции при возбуждении молекул излучением с $\lambda_{\text{в}} = 295$ нм. В работе [13] обнаружено уменьшение времени жизни флуоресценции индола в смеси вода–глицерин также при $\lambda_{\text{в}} = 295$ нм.

В настоящей работе исследованы свойства триплетных состояний и процессы интеркомбинационной конверсии индола в замороженных растворах в этаноле при 77 К при возбуждении молекул на длинноволновом крае спектра поглощения. С этой целью измерены зависимости спектрально-кинетических характеристик фосфоресценции и флуоресценции от длины волны возбуждающего излучения.

Методика эксперимента. В качестве возбуждающего излучения использованы импульсы четвертой гармоники YAG:Nd³⁺-лазера длительностью 10 нс и длиной волны генерируемого излучения $\lambda_{\text{в}} = 266$ нм, импульсы третьей гармоники титан-сапфирового (Sa:Ti) лазера длительностью 30 нс, перестраиваемого в области 250–300 нм, а также импульсы второй гармоники лазера на красителе (родамин 6Ж в этаноле), перестраиваемого в области 275–305 нм. Накачка Sa:Ti-лазера и лазера на красителе осуществлялась импульсами второй гармоники YAG:Nd³⁺-лазера. Энергия возбуждающего импульса изменялась от 10 до 100 мкДж.

Спектры люминесценции измерены с помощью CCD-камеры на основе матрицы Hamamatsu S-7031. Измерения свечения проводились за один импульс возбуждающего излучения. Время регистрации сигнала люминесценции 30 с. За это время полностью затухала как быстрая флуоресценция, так и долгоживущая фосфоресценция, что позволяло корректно определить отношение интенсивностей в максимумах спектров фосфоресценции и флуоресценции $I_{\text{фосф}}/I_{\text{фл}}$. Погрешность измерений $\leq 10\%$.

Регистрация кинетики люминесценции в узком спектральном диапазоне, выделяемом интерференционным фильтром, проводилась фотоэлектрическим методом с помощью ФЭУ Hamamatsu-1828 и осциллографа Tektronics TDS 2022B.

Индол ($\geq 99\%$) и этанол ($\geq 99\%$) фирмы Sigma-Aldrich использовались без дополнительной очистки. Кювета с раствором исследуемого вещества помещалась в кварцевый сосуд Дьюара с жидким азотом так, чтобы образец находился над поверхностью азота. Это обеспечивало охлаждение образца до температуры 77 К и в то же время исключало поглощение азотом света возбуждения и люминесценции. Удаление кислорода до концентрации 10^{-5} М осуществлялось вакуумированием по стандартной методике: 5–6 циклов замораживание–откачка. Концентрация раствора индола в этаноле $\sim 10^{-5}$ М.

Результаты и их обсуждение. На рис. 1 показаны спектры люминесценции индола в этаноле при 77 К для разных длин волн возбуждающего излучения $\lambda_{\text{в}}$. Спектры состоят из двух полос: флуоресценции в диапазоне 300–380 нм и фосфоресценции в диапазоне 400–480 нм. Спектры флуоресценции при $\lambda_{\text{в}} = 280$ и 285 нм являются бесструктурными и практически совпадают. Для $\lambda_{\text{в}} = 291$ и 295 нм в спектрах флуоресценции появляется структура и с увеличением $\lambda_{\text{в}}$ спектры смещаются в длинноволновую сторону. Зависимость положения максимума спектра флуоресценции от длины волны возбуждающего излучения показана на рис. 2, а. Видно, что в области $\lambda_{\text{в}} = 255$ –285 нм положение максимума не зависит от $\lambda_{\text{в}}$. В области $\lambda_{\text{в}} = 285$ –295 нм длина волны максимума спектра флуоресценции увеличивается с увеличением $\lambda_{\text{в}}$. Это означает, что в области $\lambda_{\text{в}} = 285$ –295 нм селективно возбуждается подансамбль молекул, которые имеют более низкую энергию 0–0-перехода. В области $\lambda_{\text{в}} = 255$ –285 нм возбуждается полный ансамбль молекул, в результате чего спектр флуоресценции размывается, и положение максимума не зависит от $\lambda_{\text{в}}$.

Спектры фосфоресценции являются структурными при всех длинах волн возбуждающего излучения и имеют типичную для индола форму с тремя максимумами при $\lambda = 403$, 430 и 455 нм. Для этих спектров наблюдается аналогичный эффект. При возбуждении излучением с $\lambda_{\text{в}} = 291$ и 295 нм максимумы спектра фосфоресценции слегка смещаются в длинноволновую сторону.

Анализ зависимостей на рис. 1 показывает, что отношение интенсивностей фосфоресценции и флуоресценции зависит от длины волны возбуждающего излучения. При $\lambda_{\text{в}} = 280$ и 285 нм отношения $I_{\text{фосф}}/I_{\text{фл}}$ имеют близкие значения. При возбуждении молекул в длинноволновой области ($\lambda_{\text{в}} = 291$ и 295 нм) $I_{\text{фосф}}/I_{\text{фл}}$ уменьшается. Зависимость $I_{\text{фосф}}/I_{\text{фл}}$ от длины волны возбуждающего излучения при-

ведена на рис. 2, б. В области $\lambda_{\text{в}} = 255\text{—}285$ нм в пределах погрешности $I_{\text{фосф}}/I_{\text{фл}}$ не зависит от $\lambda_{\text{в}}$. При возбуждении молекул в длинноволновой области ($\lambda_{\text{в}} = 285\text{—}295$ нм) $I_{\text{фосф}}/I_{\text{фл}}$ уменьшается. Отметим, что при возбуждении молекул в диапазоне $\lambda_{\text{в}} = 255\text{—}285$ нм отношение $I_{\text{фосф}}/I_{\text{фл}} \sim 0.33$ близко к значению $I_{\text{фосф}}/I_{\text{фл}} = 0.36$, полученному в [14] для индола в смеси этилового спирта с диэтиловым эфиром при 77 К при возбуждении молекул излучением с $\lambda_{\text{в}} = 280$ нм.

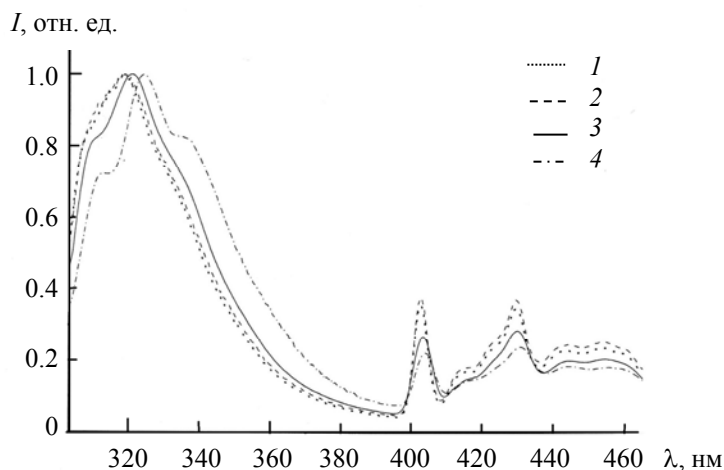


Рис. 1. Спектры люминесценции раствора индола в этаноле при 77 К при $\lambda_{\text{в}} = 280$ (1), 285 (2), 291 (3) и 295 нм (4)

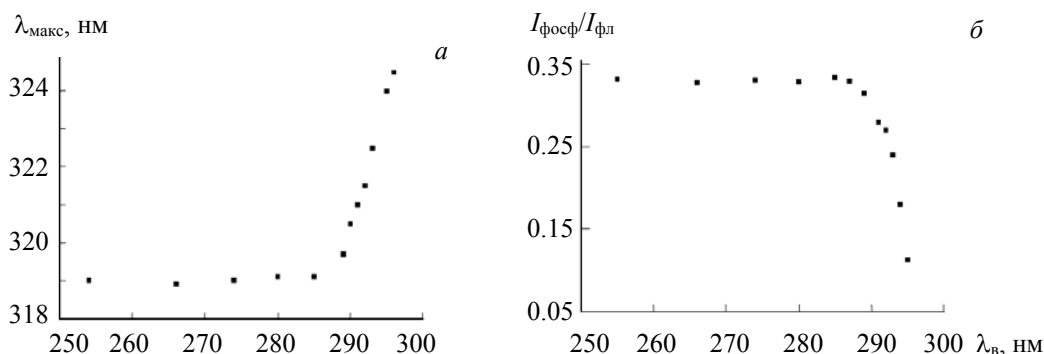


Рис. 2. Зависимости положения максимума спектра флуоресценции (а) и отношения интенсивностей фосфоресценции и флуоресценции (б) от длины волны возбуждающего излучения раствора индола в этаноле при 77 К

Отношение $I_{\text{фосф}}/I_{\text{фл}}$ характеризует квантовый выход интеркомбинационного перехода из возбужденного синглетного состояния в триплетное-флик. Чтобы связать $I_{\text{фосф}}/I_{\text{фл}}$ с фотофизическими характеристиками индола, запишем выражения для интенсивности флуоресценции в условиях импульсного возбуждения молекул:

$$I_{\text{фл}} = \Phi_{\text{фл}} I_{\text{п}}, \quad (1)$$

где $\Phi_{\text{фл}}$ — квантовый выход флуоресценции; $I_{\text{п}}$ — количество поглощенных квантов за возбуждающий импульс, и для интенсивности фосфоресценции:

$$I_{\text{фосф}} = I_{\text{п}} \Phi_{\text{ИК}} k_{\text{фосф}} / (k_{\text{фосф}} + k_{\text{д}}), \quad (2)$$

где $k_{\text{фосф}}$ и $k_{\text{д}}$ — константы скорости излучательной и безызлучательной дезактивации триплетного состояния. Из формул (1) и (2) следует

$$I_{\text{фосф}}/I_{\text{фл}} = (\Phi_{\text{ИК}}/\Phi_{\text{фл}})(k_{\text{фосф}}/(k_{\text{фосф}} + k_{\text{д}})). \quad (3)$$

Из выражения (3) видно, что величина $I_{\text{фосф}}/I_{\text{фл}}$ зависит от отношения квантовых выходов интеркомбинационной конверсии и флуоресценции $\Phi_{\text{ИК}}/\Phi_{\text{фл}}$, которое характеризует возбужденное синглетное состояние, и от констант скоростей $k_{\text{фосф}}$ и $k_{\text{д}}$ дезактивации триплетного состояния.

Для установления изменения констант $k_{\text{фосф}}$ и $k_{\text{д}}$ при возбуждении молекул на длинноволновом крае спектра поглощения измерены кинетики затухания фосфоресценции при $\lambda_{\text{в.}} = 280$ и 295 нм. На основании этих кинетик можно определить время жизни триплетных состояний τ_T , связанное с константами $k_{\text{фосф}}$ и $k_{\text{д}}$ выражением

$$\tau_T = 1/(k_{\text{фосф}} + k_{\text{д}}). \quad (4)$$

Результаты измерения представлены на рис. 3. Видно, что при $\lambda_{\text{в.}} = 280$ нм затухание является экспоненциальным. При $\lambda_{\text{в.}} = 295$ нм наблюдается отклонение от экспоненты на начальном участке кривой затухания. На основании измерения разрешенных во времени спектров фосфоресценции установлено, что свечение на начальном участке кривой при $\lambda_{\text{в.}} = 295$ нм связано с фосфоресценцией примеси. Из рис. 3 также видно, что вклад этого свечения в фосфоресценцию индола при $\lambda_{\text{в.}} = 295$ нм незначителен. Свечение на экспоненциальном участке при $\lambda_{\text{в.}} = 280$ и 295 нм связано с фосфоресценцией индола. Расчеты показывают, что на экспоненциальном участке обе кривые имеют одинаковое время затухания. Это означает, что время жизни триплетных состояний τ_T индола в этаноле при 77 К не изменяется при возбуждении молекул на красном крае спектра поглощения. Отметим, что вычисленное из этих кривых значение $\tau_T = 5.7$ с близко к $\tau_T = 6.3$ с, полученному в [14] для индола в смеси этилового спирта с диэтиловым эфиром при 77 К.

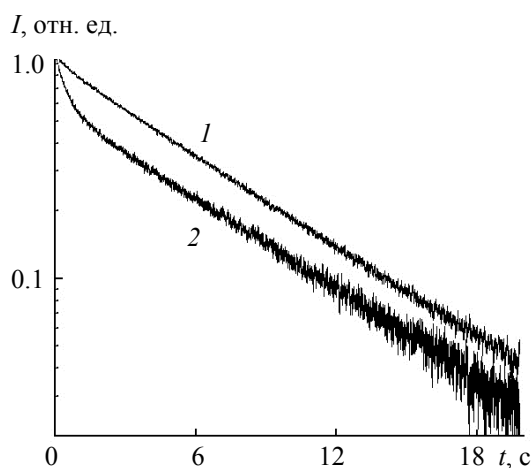


Рис. 3. Кинетика затухания фосфоресценции раствора индола в этаноле при 77 К при $\lambda_{\text{в.}} = 280$ (1) и 295 нм (2)

На основании выражения (4) можно предположить, что обе константы $k_{\text{фосф}}$ и $k_{\text{д}}$ не зависят от длины волны возбуждающего излучения, поскольку маловероятно их одновременное изменение на одну и ту же величину. Косвенным признаком независимости констант скоростей релаксации триплетного состояния от энергии взаимодействия хромофора с молекулами окружения является экспоненциальность затухания фосфоресценции при $\lambda_{\text{в.}} = 280$ нм, когда возбуждаются молекулы индола, различающиеся по энергии взаимодействия с молекулами растворителя. Поскольку константы скорости $k_{\text{фосф}}$ и $k_{\text{д}}$ не изменяются при возбуждении молекул на длинноволновом крае спектра поглощения, на основании (3) можно сделать вывод, что уменьшение $I_{\text{фосф}}/I_{\text{фл}}$ связано с уменьшением отношения квантовых выходов интеркомбинационной конверсии и флуоресценции $\Phi_{\text{ИК}}/\Phi_{\text{фл}}$.

Отношение $\Phi_{\text{ИК}}/\Phi_{\text{фл}}$ зависит от констант скоростей различных каналов релаксации возбужденного синглетного состояния. Для индола в этаноле при 77 К вследствие ограниченной диффузии молекул бимолекулярными процессами затухания можно пренебречь, тогда релаксация возбужденного синглетного состояния определяется мономолекулярными процессами флуоресценции, интеркомбинационной конверсии и внутренней конверсии с константами скоростей $k_{\text{фл}}$, $k_{\text{ИК}}$ и $k_{\text{ВК}}$ соответственно.

Известно [15], что для органических молекул в жестких средах при разнице энергии между возбужденным синглетным и основным состояниями $\Delta E \sim 30000 \text{ см}^{-1}$ константа скорости $k_{\text{ВК}}$ значительно меньше, чем $k_{\text{фл}}$ и $k_{\text{ИК}}$. Измерение квантового выхода интеркомбинационной конверсии для индола в этаноле не проводилось. Однако сумма квантовых выходов $\phi_{\text{фл}}$ и $\phi_{\text{ИК}}$ индола в циклогексане известна — 0.92 [16]. Авторы [16] установили, что для индола в циклогексане существует три канала релаксации возбужденных синглетных состояний: флуоресценция, интеркомбинационная конверсия и диссоциация связи N–H, квантовый выход которой 0.08. При возбуждении во второй полосе электронного поглощения с $\lambda_{\text{в}} < 240 \text{ нм}$ квантовый выход N–H-диссоциации увеличивается, а флуоресценции уменьшается [17]. Для индола в этаноле диссоциация связи N–H не происходит, поскольку квантовый выход флуоресценции не изменяется при возбуждении молекул излучением с $\lambda_{\text{в}} < 240 \text{ нм}$ [17]. Отсутствие внутренней конверсии подтверждается результатами работы [18], в которой установлено, что квантовый выход интеркомбинационной конверсии индола в метилциклогексане не зависит от температуры в диапазоне 180—300 К. Как правило, константа скорости внутренней конверсии увеличивается с ростом температуры [14]. Это означает, что для раствора индола в этаноле при 77 К существенный вклад в релаксацию возбужденного синглетного состояния вносят два конкурирующих процесса: флуоресценция и интеркомбинационная конверсия, и сумма квантовых выходов этих процессов

$$\phi_{\text{фл}} + \phi_{\text{ИК}} = 1. \quad (6)$$

С учетом (6) из выражения (3) следует, что уменьшение $I_{\text{фосф}}/I_{\text{фл}}$ при возбуждении молекул на длинноволновом крае спектра поглощения связано с уменьшением квантового выхода интеркомбинационной конверсии и одновременным увеличением квантового выхода флуоресценции.

Для объяснения полученных результатов рассмотрим фотофизические процессы, происходящие при возбуждении молекул индола в области 250—300 нм. Спектры поглощения в этой области определяются двумя электронными переходами в возбужденные синглетные $\pi\pi^*$ -состояния 1L_a и 1L_b , которые имеют близкие значения электронной энергии [19]. Состояние 1L_a имеет значительно больший дипольный момент, чем 1L_b , и сильнее взаимодействует с молекулами полярного растворителя. Вследствие большой разницы в дипольных моментах взаимное расположение этих уровней зависит от полярности микроокружения. Для индола в нейтральных растворителях 1L_b является нижним возбужденным синглетным состоянием [20]. При переходе к полярным растворителям энергия 1L_a уменьшается значительно больше, чем 1L_b , и нижним возбужденным синглетным состоянием становится 1L_a [20]. Данное расположение возбужденных уровней приводит к зависимости фотофизических свойств индола от энергии взаимодействия с молекулами микроокружения.

На основании измерения поляризации флуоресценции и фосфоресценции установлено, что для индола в этаноле при 77 К флуоресцирующими являются оба синглетных $\pi\pi^*$ -состояния 1L_a и 1L_b [21]. Фосфоресценция обусловлена одним электронным переходом из нижнего триплетного $\pi\pi^*$ -состояния 3L_a в основное [22]. Независимость спектров флуоресценции и отношения $I_{\text{фосф}}/I_{\text{фл}}$ от длины волны возбуждающего излучения $\lambda_{\text{в}} = 255\text{—}285 \text{ нм}$ означает, что верхние электронно-колебательные синглетные состояния релаксируют путем внутренней конверсии, а излучательные переходы и процессы интеркомбинационной конверсии происходят из нижних возбужденных 1L_a - и 1L_b -состояний, которые находятся в термическом равновесии. Доля участия этих состояний в указанных выше фотофизических процессах зависит от взаимного расположения 1L_a - и 1L_b -уровней. Вследствие неоднородности структуры растворителя молекулы индола имеют разную энергию взаимодействия с молекулами микроокружения и, следовательно, отличаются расположением уровней 1L_a и 1L_b . С увеличением энергии взаимодействия уровень 1L_a снижается больше, чем 1L_b , и вклад состояния 1L_a в излучение и интеркомбинационную конверсию увеличивается.

В работе [20] показано, что для молекул индола константа скорости излучательного перехода из состояния 1L_a на порядок больше, чем из 1L_b . В то же время из измерений поляризации фосфоресценции установлено [22], что дипольный момент синглет-триплетного перехода из состояния 1L_b больше, чем из 1L_a . На основании этих данных можно предположить, что отношение квантовых выходов интеркомбинационной конверсии и флуоресценции ($\phi_{\text{ИК}}/\phi_{\text{фл}}$) для состояния 1L_b больше, чем для 1L_a . Уменьшение $I_{\text{фосф}}/I_{\text{фл}}$ при возбуждении молекул на длинноволновом крае спектра поглощения может быть связано с тем, что в этой спектральной области возбуждаются молекулы хромофора, которые сильнее взаимодействуют с молекулами растворителя и, следовательно, имеют более низкую энергию состояния 1L_a . С увеличением длины волны возбуждения увеличивается вклад во флуоресцен-

цию состояния 1L_a , что приводит к уменьшению отношения интенсивностей фосфоресценции и флуоресценции.

Заключение. Исследована зависимость спектров люминесценции раствора индола в этаноле при 77 К от длины волны возбуждающего излучения. Обнаружено уменьшение отношения интенсивностей фосфоресценции и флуоресценции при возбуждении молекул индола на длинноволновом крае спектра поглощения. Установлено, что этот эффект связан с уменьшением отношения квантовых выходов интеркомбинационной конверсии и флуоресценции. Поскольку для раствора индола в этаноле при 77 К оба синглетных $\pi\pi^*$ -состояния 1L_a и 1L_b являются флуоресцирующими, сделан вывод об увеличении вклада состояния 1L_a в процессы релаксации возбужденного синглетного состояния. Время жизни триплетных состояний не зависит от длины волны возбуждающего излучения.

- [1] **A. P. Demchenko.** Ultraviolet Spectroscopy of Proteins, Springer, Berlin (1986)
- [2] **S. V. Konev.** Fluorescence and Phosphorescence of Proteins and Nucleic Acids, Plenum Press, New York (1967)
- [3] **B. Valeur, G. Weber.** Photochem. Photobiol., **25** (1977) 441—444
- [4] **P. R. Callis.** J. Chem. Phys., **95** (1991) 4230—4240
- [5] **D. W. Pierce, S. G. Boxer.** Biophys. J., **68** (1995) 1583—1591
- [6] **M. Vincent, J. Gallay, A. P. Demchenko.** J. Phys. Chem., **99** (1995) 14931—14941
- [7] **Н. А. Борисевич, А. А. Суходола, Г. Б. Толсторожев.** Журн. прикл. спектр., **74** (2007) 341—345
- [8] **N. A. Borisevich, A. A. Sukhodola, G. B. Tolstorozhev.** J. Appl. Spectr., **74** (2007) 379—384
- [9] **N. A. Borisevich, A. A. Sukhodola, G. B. Tolstorozhev.** Chem. Phys., **354** (2008) 44—49
- [9] **А. А. Суходола.** Журн. прикл. спектр., **84** (2017) 870—876 [**A. Sukhodola.** J. Appl. Spectr., **84** (2007) 954—959]
- [10] **А. А. Суходола.** Опт. и спектр., **126** (2019) 141—146
- [11] **A. P. Demchenko.** J. Lumin., **17** (2002) 19—42
- [12] **W. C. Gallay, R. M. Purkey.** Proc. Natl. Acad. Sci., **67** (1970) 1116—1121
- [13] **A. S. Ladokhin,** J. Fluoresc., **9** (1999) 1—9
- [14] **V. L. Ermolaev.** Opt. Spectr., **11** (1961) 492—497
- [15] **W. Siebrand.** J. Chem. Phys., **46** (1967) 2411—2415
- [16] **R. Klein, I. Tatisheff, M. Bazin, R. Santus.** J. Phys. Chem., **85** (1981) 670—677
- [17] **I. Tatisheff, R. Klein.** Photochem. Photobiol., **22** (1975) 221—229
- [18] **C. Pernot, L. Lindqvist.** J. Photochem., **6** (1976/1977) 215—220
- [19] **E. H. Strickland, J. Horwitz, C. Billups.** Biochemistry, **9** (1970) 4914—4920
- [20] **L. J. Andrews, L. S. Forster.** Photochem. Photobiol., **19** (1974) 353—360
- [21] **H. U. Schut, H. Zimmerman,** Z. Elektrochem., **67** (1963) 54—59
- [22] **P.-S. Song, W. E. Kurtin.** J. Am. Chem. Soc., **91** (1969) 4892—4906