

УДК 535.34+535.372

А. А. СУХОДОЛА

**ВЛИЯНИЕ ЭФФЕКТОВ КРАСНОГО КРАЯ НА ИНТЕРКОМБИНАЦИОННУЮ  
КОНВЕРСИЮ ИНДОЛА В ЭТАНОЛЕ ПРИ 77 К***(Представлено академиком Н. А. Борисевичем)**Институт физики им. Б. И. Степанова НАН Беларуси, Минск, Беларусь  
sukhodola@imaph.bas-net.by*

Изучены спектрально-кинетические характеристики фосфоресценции и флуоресценции раствора индола в этаноле при 77 К в зависимости от длины волны возбуждающего излучения. Обнаружено уменьшение отношения квантовых выходов интерконверсии и флуоресценции при возбуждении молекул индола на красном крае спектра поглощения.

*Ключевые слова:* индол, флуоресценция, фосфоресценция, интеркомбинационная конверсия.

А. А. SUKHODOLA

**RED – EDGE EXCITATION EFFECT ON THE INTERSYSTEM CROSSING  
OF THE INDOLE SOLUTION IN ETHANOL AT 77 K***B. I. Stepanov Institute of Physics of National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus  
sukhodola@imaph.bas-net.by*

Spectral and kinetic characteristics of phosphorescence and fluorescence of the indole solution in ethanol at 77 K have been studied. The decrease of phosphorescence quantum yield at red – edge excitation has been observed.

*Keywords:* Indole, fluorescence, phosphorescence, intersystem crossing.

**Введение.** Индол является хромофором триптофана, который широко используется как внутренний зонд локальной структуры и динамики белков. Вследствие высокой полярности возбужденных состояний индола спектры поглощения и флуоресценции этих молекул сильно зависят от полярности микроокружения. Максимум спектра флуоресценции в жидких растворах изменяется от 28200 см<sup>-1</sup> в нейтральном растворителе гексане до 32800 см<sup>-1</sup> в воде [1]. Исследование зависимости фотофизических характеристик молекул индола от энергии их взаимодействия с микроокружением является важной задачей спектроскопии и люминесценции белков.

Полярные взаимодействия между хромофором и его молекулярным окружением в жидких растворах, в силу неоднородности структуры растворителя, приводят к широкому распределению 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. В твердых растворах это распределение остается неизменным за время жизни возбужденного состояния, в результате чего в этих средах наблюдается эффект красного края [2], который приводит к зависимости фотофизических характеристик молекулы от длины волны возбуждающего излучения.

Ранее [3] для индола в смеси вода–этиленгликоль при 77 К наблюдалось длинноволновое смещение спектров флуоресценции и фосфоресценции при возбуждении молекул излучением с длиной волны  $\lambda_{\text{в}} = 295$  нм. В [4] обнаружено уменьшение времени жизни флуоресценции индола в смеси вода–глицероль также при  $\lambda_{\text{в}} = 295$  нм. В данной работе исследована роль интерком-

бинационной конверсии в релаксации возбужденных синглетных состояний индола в этаноле при 77 К при возбуждении молекул на красном крае спектра поглощения. С этой целью было проведено измерение зависимости спектрально-кинетических характеристик фосфоресценции и флуоресценции от длины волны возбуждающего излучения.

**Материалы и методы исследования.** Спектры люминесценции измерялись с помощью CCD-камеры на основе матрицы Hamamatsu S-7031. Измерения свечения производились за один импульс возбуждающего излучения. Время регистрации сигнала люминесценции составляло 30 с. За это время полностью затухала как быстрая флуоресценция, так и долгоживущая фосфоресценция, что позволяло корректно определить отношение интенсивностей фосфоресценции и флуоресценции  $I_{\text{фосф}} / I_{\text{фл}}$ . Величина  $I_{\text{фосф}} / I_{\text{фл}}$  определялась из отношения значений интенсивности в максимумах спектров фосфоресценции и флуоресценции. Погрешность измерений не превышала 10 %.

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

В качестве возбуждающего излучения использовались импульсы четвертой гармоники лазера на неодимовом гранате YAG : Nd<sup>3+</sup> длительностью 10 нс и длиной волны генерируемого излучения  $\lambda_{\text{в}} = 266$  нм, импульсы третьей гармоники лазера на сапфире с титаном Sa : Ti длительностью 30 нс, перестраиваемого в спектральной области 250–300 нм, а также импульсы второй гармоники лазера на красителе (родамин 6Ж в этаноле), перестраиваемого в спектральной области 275–305 нм. Накачка титан-сапфирового лазера и лазера на красителе осуществлялась импульсами второй гармоники лазера на YAG : Nd<sup>3+</sup>. Энергия возбуждающего импульса изменялась в области от 10 до 100 мкДж.

Использовался индол фирмы Sigma (США) 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<sup>-5</sup> М осуществлялось вакуумированием по стандартной методике: 5–6 циклов замораживание–откачка. Концентрация раствора индола в этаноле составляла около 10<sup>-5</sup> М/л.

**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 друг с другом. 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 значение максимума не зависит от длины волны возбуждающего излучения. В области  $\lambda_{\text{в}} = 285$ –295 нм наблюдается эффект красного края, и длина волны максимума спектра флуоресценции увеличивается с увеличением  $\lambda_{\text{в}}$ . Это означает, что в спектральной области  $\lambda_{\text{в}} = 285$ –295 нм селективно возбуждается подансамбль молекул, которые имеют более низкую энергию 0-0 перехода. В области длин волн  $\lambda_{\text{в}} = 255$ –285 нм возбуждается полный ансамбль молекул, в результате

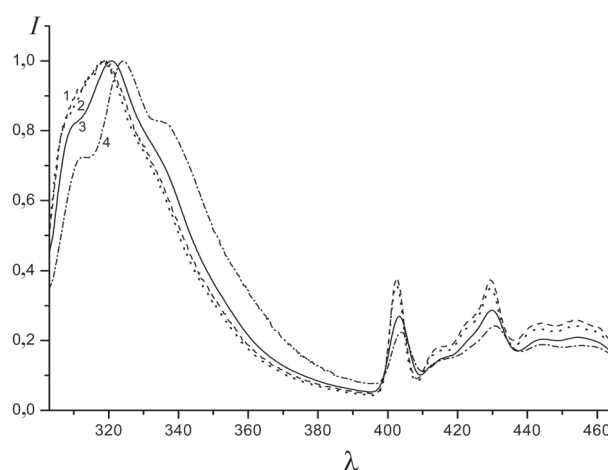


Рис. 1. Спектр люминесценции раствора индола в этаноле при 77 К в зависимости от длины волны возбуждающего излучения  $\lambda_{\text{в}}$ : 1 –  $\lambda_{\text{в}} = 280$  нм, 2 –  $\lambda_{\text{в}} = 285$  нм, 3 –  $\lambda_{\text{в}} = 291$  нм, 4 –  $\lambda_{\text{в}} = 295$  нм

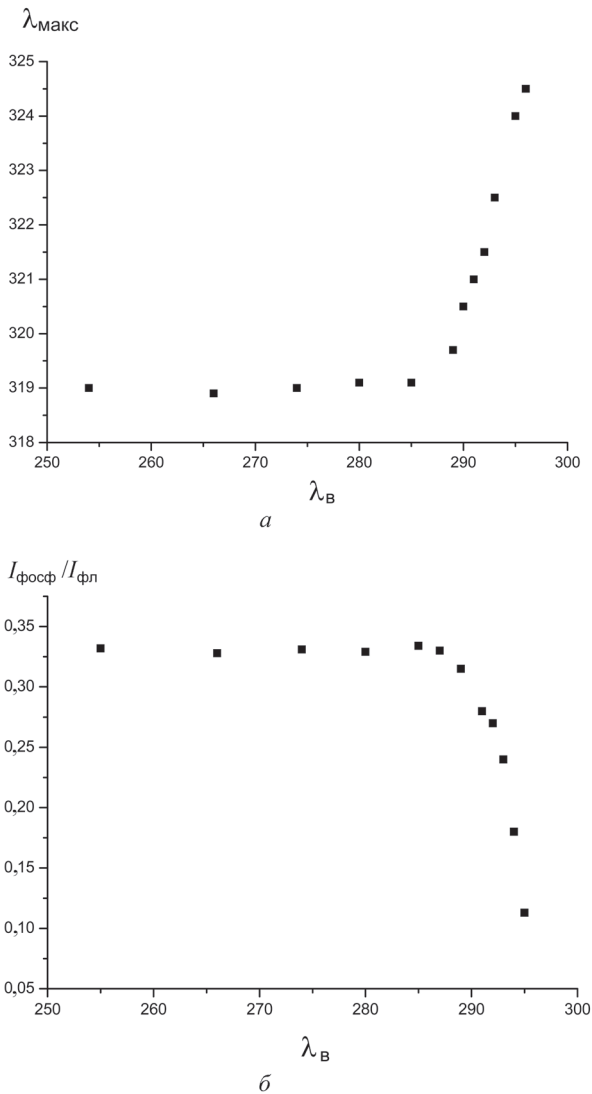


Рис. 2. Зависимость положения максимума спектра флуоресценции (а) и отношения интенсивностей фосфоресценции и флуоресценции (б) от длины волны возбуждающего излучения раствора индола в этаноле при 77 К

вый выход интеркомбинационного перехода из возбужденного синглетного состояния в триплетное  $\Phi_{ик}$ . Чтобы связать величину  $I_{фосф} / I_{фл}$  с фотофизическими характеристиками индола запишем выражение для интенсивности флуоресценции и фосфоресценции. В условиях импульсного возбуждения молекул интенсивность флуоресценции  $I_{фл}$  запишется в виде

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

где  $\Phi_{фл}$  – квантовый выход флуоресценции;  $I_{п}$  – количество поглощенных квантов за возбуждающий импульс. Интенсивность фосфоресценции  $I_{фосф}$  запишется в виде

$$I_{фосф} = I_{п} \Phi_{ик} k_{фосф} / (k_{фосф} + k_d), \quad (2)$$

где  $\Phi_{ик}$  – квантовый выход интеркомбинационной конверсии;  $k_{фосф}$  и  $k_d$  – константы скорости излучательной и безызлучательной дезактивации триплетного состояния соответственно. Из (1) и (2) следует, что

$$I_{фосф} / I_{фл} = (\Phi_{ик} / \Phi_{фл}) (k_{фосф} / (k_{фосф} + k_d)). \quad (3)$$

чего спектр флуоресценции размывается, и положение максимума не зависит от  $\lambda_{в}$ .

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 также наблюдается эффект красного края. При возбуждении излучением с  $\lambda_{в} = 291$  и  $295$  нм максимумы спектра фосфоресценции слегка смещаются в длинноволновую сторону.

Из рис. 1 видно также, что отношение интенсивностей фосфоресценции и флуоресценции зависит от длины волны возбуждающего излучения. При  $\lambda_{в} = 280$  и  $285$  нм отношение  $I_{фосф} / I_{фл}$  имеет близкие значения. При возбуждении молекул в длинноволновой области ( $\lambda_{в} = 291$  и  $295$  нм)  $I_{фосф} / I_{фл}$  уменьшается. Зависимость  $I_{фосф} / I_{фл}$  от длины волны возбуждающего излучения приведена на рис. 2, б. Видно, что для величины  $I_{фосф} / I_{фл}$  также наблюдается эффект красного края. В области  $\lambda_{в} = 255-285$  нм в пределах погрешности  $I_{фосф} / I_{фл}$  не зависит от длины волны возбуждающего излучения. При возбуждении молекул в длинноволновой области ( $\lambda_{в} = 285-295$  нм)  $I_{фосф} / I_{фл}$  уменьшается. Отметим, что при возбуждении молекул в спектральном диапазоне  $\lambda_{в} = 255-285$  нм отношение интенсивностей фосфоресценции и флуоресценции равно  $\sim 0,33$  и близко к значению  $I_{фосф} / I_{фл} = 0,36$ , полученному в работе [5] для индола в смеси этилового спирта с диэтиловым эфиром при 77 К при возбуждении молекул излучением с 280 нм.

Отношение интенсивностей фосфоресценции и флуоресценции характеризует квантовый

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

Чтобы выяснить изменение констант  $k_{\text{фосф}}$  и  $k_d$  при возбуждении молекул на красном крае спектра поглощения были измерены кинетики затухания фосфоресценции при  $\lambda_{\text{в}} = 280$  и  $295$  нм. На основании этих кинетик можно определить время жизни триплетных состояний  $\tau_T$ , связанное с константами  $k_{\text{фосф}}$  и  $k_d$  выражением

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

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. Свечение на экспоненциальном участке при  $\lambda_{\text{в}} = 280$  нм и  $\lambda_{\text{в}} = 295$  нм связано с фосфоресценцией индола. Расчеты показывают, что на экспоненциальном участке обе кривые имеют одинаковое время затухания. Это означает, что время жизни триплетных состояний  $\tau_T$  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 работе [5] для индола в смеси этилового спирта с диэтиловым эфиром при  $77$  К.

На основании выражения (4) можно предположить, что обе константы  $k_{\text{фосф}}$  и  $k_d$  не зависят от длины волны возбуждающего излучения, поскольку маловероятно одновременное изменение значений этих констант 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  $k_d$  не изменяются при возбуждении молекул на красном крае спектра поглощения, то на основании выражения (3) можно сделать вывод, что уменьшение  $I_{\text{фосф}} / I_{\text{фл}}$  связано с уменьшением отношения квантовых выходов интерконверсии и флуоресценции  $\varphi_{\text{ик}} / \varphi_{\text{фл}}$ .

Отношение  $\varphi_{\text{ик}} / \varphi_{\text{фл}}$  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, и релаксация возбужденного синглетного состояния определяется мономолекулярными процессами флуоресценции, интеркомбинационной конверсии и внутренней конверсии с константами скоростей соответственно  $k_{\text{фл}}$ ,  $k_{\text{ик}}$  и  $k_{\text{вк}}$ . Известно [6], 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  $k_{\text{вк}}$  близка к нулю. 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

$$\varphi_{\text{фл}} + \varphi_{\text{ик}} = 1. \quad (5)$$

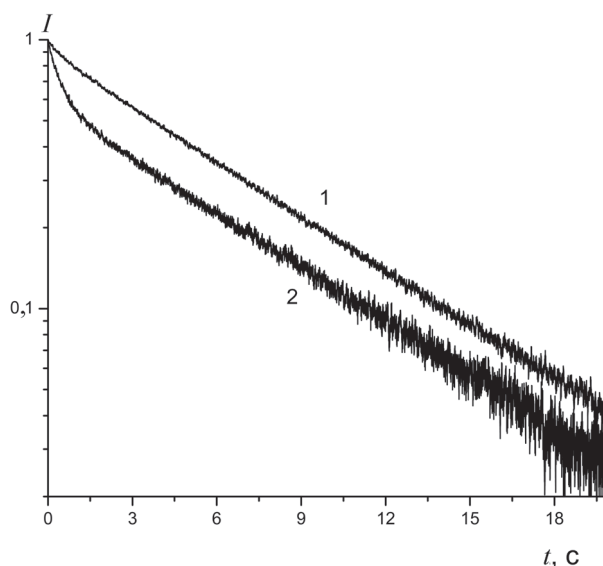


Рис. 3. Кинетика затухания фосфоресценции раствора индола в этаноле при  $77$  К для разных длин волн возбуждающего излучения  $\lambda_{\text{в}}$ : 1 –  $\lambda_{\text{в}} = 280$  нм, 2 –  $\lambda_{\text{в}} = 295$  нм

С учетом (5) из выражения (3) следует, что уменьшение  $I_{\text{фосф}} / I_{\text{фл}}$  при возбуждении молекул на красном 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 спектральной 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 [7].  ${}^1L_a$  состояние 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 [8]. При переходе к полярным растворителям энергия  ${}^1L_a$  уменьшается значительно больше, чем  ${}^1L_b$  и нижним возбужденным синглетным состоянием становится  ${}^1L_a$  [8]. 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  ${}^1L_b$  [9]. Фосфоресценция обусловлена одним электронным переходом из нижнего триплетного  $\pi\pi^*$ -состояния  ${}^3L_a$  в основное [10]. Независимость спектров флуоресценции и величины  $I_{\text{фосф}} / I_{\text{фл}}$  от длины волны возбуждающего излучения в области  $\lambda_b = 255\text{--}285$  нм означает, что верхние электронно-колебательные синглетные состояния релаксируют путем внутренней конверсии, а излучательные переходы и процессы интерконверсии 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 [8] показано, что для молекул индола константа скорости излучательного перехода из  ${}^1L_a$ -состояния на порядок больше, чем из состояния  ${}^1L_b$ . С другой стороны, из измерений поляризации фосфоресценции установлено [10], что дипольный момент синглет-триплетного перехода из  ${}^1L_b$ -состояния больше, чем из  ${}^1L_a$ . На основании этих данных можно предположить, что величина  $\phi_{\text{ик}} / \phi_{\text{фл}}$  отношения квантовых выходов интерконверсии и флуоресценции для  ${}^1L_b$ -состояния больше, чем для  ${}^1L_a$ . Уменьшение величины  $I_{\text{фосф}} / I_{\text{фл}}$  на красном 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  ${}^1L_a$ -состояния. С увеличением длины волны возбуждения на красном крае увеличивается вклад во флуоресценцию  ${}^1L_a$ -состояния, что приводит к уменьшению отношения интенсивностей фосфоресценции и флуоресценции.

**Заключение.** Изучены спектрально-кинетические характеристики фосфоресценции и флуоресценции раствора индола в этаноле при 77 К в зависимости от длины волны возбуждающего излучения. Обнаружено уменьшение отношения квантовых выходов интерконверсии и флуоресценции при возбуждении молекул индола на красном крае спектра поглощения.

Работа выполнена при поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (проект Ф13А3-023)

### Список использованной литературы

1. Vincent, M. Solvent relaxation around the excited state of indole: analysis of fluorescence lifetime distributions and time-dependence spectral shifts / M. Vincent, J. Gally, A. P. Demchenko // J. Phys. Chem. – 1995. – Vol. 99. – P. 14931–14941.
2. Демченко, А. П. Люминесценция и динамика структуры белков / А. П. Демченко. – Киев, 1989.

3. *Gallay, W. C.* Role of heterogeneity of the solvation site in electronic spectra in solution / W. C. Gallay, R. M. Purkey // Proc. Natl. Acad. Sci. – 1970. – Vol. 67. – P. 1116–1121.
4. *Ladokhin, A. S.* Red-edge excitation study of nonexponential fluorescence decay of indole in solution and in a protein / A. S. Ladokhin // J. Fluorescence. – 1999. – Vol. 9. – P. 1–9.
5. *Ермолаев, В. Л.* Люминесценция простых производных бензола / В. Л. Ермолаев // Опт. и спектр. – 1961. – Т. 11, № 4. – С. 492–497.
6. *Siebrand, W.* Radiationless transitions in polyatomic molecules. II. Triplet-ground states transition in aromatic hydrocarbons / W. Siebrand // J. Chem. Phys. – 1967. – Vol. 46. – P. 2411–2415.
7. Near-ultraviolet absorption band of tryptophan. Studies using indole and 3-methylindole as models / E. H. Strickland [et al.] // Biochemistry. – 1970. – Vol. 9, N 25. – P. 4914–4920.
8. *Andrews, L. J.* Fluorescence characteristics of indoles in non-polar solvents: lifetime, quantum yields and polarization spectra / L. J. Andrews, L. S. Forster // Photochem. Photobiol. – 1974. – Vol. 19, N 3. – P. 353–360.
9. *Schut, H. U.* Polarisierung der elektronenbanden von aromaten 7. Mitteilung: indol, indazol, benzimidazol, benzotriazol, carbazol / H. U. Schut, H. Zimmerman // Z. Elektrochem. – 1963. – Vol. 67. – P. 54–59.
10. *Song, P.-S.* A spectroscopic study of the polarized luminescence of indoles / P.-S. Song, W. E. Kurtin // J. Am. Chem. Soc. – 1969. – Vol. 91, N 17. – P. 4892–4906.

Поступило в редакцию 22.04.2015