



СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
SIBERIAN FEDERAL UNIVERSITY



Е. А. Слюсарева

РЕАКЦИИ С УЧАСТИЕМ
ВОЗБУЖДЕННЫХ СОСТОЯНИЙ
ФЛУОРЕСЦЕИНОВЫХ КРАСИТЕЛЕЙ

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

Предисловие	5
Глава 1. Систематика фотопроцессов в красителях	9
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
Глава 2. Флуоресцеиновые красители: обратимые процессы с участием возбужденных состояний	39
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
Глава 3. Протолитические свойства красителей и перенос протона в возбужденном состоянии	70
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

Глава 4. Лазерное обесцвечивание красителей в полимерной матрице	95
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
Глава 5. Межмолекулярные взаимодействия красителей с биологическими структурами	132
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
Послесловие	162
Приложение.....	164

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 опухоли 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 фотопроецессов. 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 рН 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. Томилина, 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 межпредметной 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 разные 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-

чем 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. Огреном) 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 π -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,

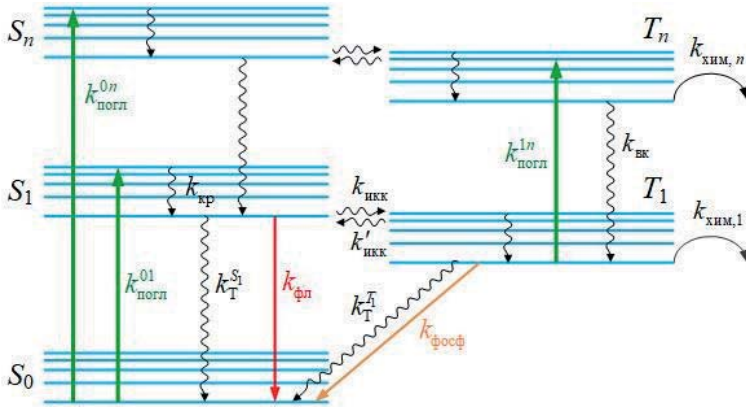


Рис. 1.1. Расширенная диаграмма Яблонского для сложной молекулы (см. пояснения в тексте)

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 λ . Определить $\sigma(\lambda)$, зная пропускание T образца, его толщину l (в см), концентрацию N (в 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} см², 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 ($k_1^{S_1}$) и триплетного ($k_1^{T_1}$) состояний, прямая ($k_{инк}$) и обратная ($k'_{инк}$) 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⁻¹.

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* τ . Измерение времени жизни флуоресцентного состояния происходит путем анализа временной зависимости интенсивности флуоресценции I после возбуждения коротким (в предельном случае имеющим вид δ -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 τ 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 конвенсии

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

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 $10^7\text{--}10^9\text{ с}^{-1}$, 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:

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

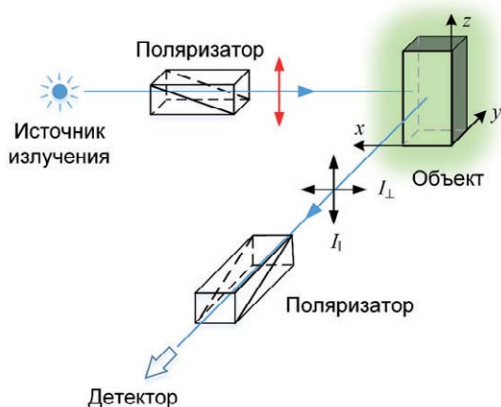


Рис. 1.2. Схема измерения поляризованной люминесценции

Для полностью поляризованного света ($I_{\perp} = 0$) анизотропия приравнивается к единице, для естественного или неполяризованного излучения ($I_{\parallel} = I_{\perp}$) – 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 ϕ дается уравнением Перрена:

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

где r_0 – предельное значение анизотропии без учета вращательной диффузии; ϕ – время вращательной корреляции. Извлечение информации о гидродинамическом диаметре D (в приближении сферического ротатора) излучателя возможно, если известна вязкость раствора η 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