

## ВЛИЯНИЕ НИЖНЕГО ТРИПЛЕТНОГО СОСТОЯНИЯ НА КИНЕТИКУ УМЕНЬШЕНИЯ И ВОССТАНОВЛЕНИЯ ИНТЕНСИВНОСТИ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ФОТОСТОЙКИХ ОРГАНИЧЕСКИХ ФЛУОРОФОРОВ

И. В. Станишевский<sup>а\*</sup>, К. Н. Соловьев<sup>б</sup>,  
С. М. Арабей<sup>а</sup>, В. А. Чернявский<sup>а</sup>

УДК 535.37

<sup>а</sup> Белорусский государственный аграрный технический университет,  
220023, Минск, просп. Независимости, 99; e-mail: ivanstanisheuski@mail.ru

<sup>б</sup> Институт физики им. Б. И. Степанова НАН Беларуси, Минск

(Поступила 12 февраля 2013)

Кинетика процессов быстрого уменьшения интенсивности молекулярной флуоресценции фотостойких органических флуорофоров (фейдинг) и ее восстановления (антифейдинг) при двухступенчатом прямоугольно-модулированном фотовозбуждении изучена с использованием методов компьютерного моделирования в рамках трехуровневой энергетической диаграммы. Процессы возникают вследствие резкого изменения скорости заселения метастабильного состояния  $T_1$ . Расчеты выявили наличие процесса антифейдинга. Результаты моделирования подтверждены экспериментальными измерениями флуоресценции цинкового комплекса замещенного тетрабензопорфирина в органическом полимере. Получены точные аналитические выражения, устанавливающие связь между константами скоростей внутримолекулярных фотофизических процессов и измеряемыми параметрами флуоресценции.

**Ключевые слова:** компьютерное моделирование, органические флуорофоры, уменьшение и восстановление флуоресценции, фейдинг и антифейдинг флуоресценции, нижнее триплетное состояние, прямоугольно-модулированное фотовозбуждение, цинковый комплекс замещенного тетрабензопорфирина.

*The kinetics of rapid fluorescence fading and recovery (anti-fading) of photostable organic fluorophores under the two-stage rectangular modulated photoexcitation has been studied in the framework of the three-level energy diagram using computer modeling. The fading and recovery are due to the abrupt change in the population rate of the metastable  $T_1$  state. The calculations have revealed the anti-fading process. The modeling results have been confirmed by experimental measurements of fluorescence of the zinc complex of a substituted tetrabenzoporphyrin in an organic polymer. Precise analytical expressions establishing relations between intramolecular rate constants of photophysical processes and experimentally measured fluorescence parameters have been derived.*

**Keywords:** computer modeling, organic fluorophores, decay and recovery of fluorescence, fading and anti-fading of fluorescence, metastable triplet state, rectangular modulated photoexcitation, zinc complex of substituted tetrabenzoporphyrin.

**Введение.** Для изучения кинетики молекулярной фосфоресценции широко используют два метода: импульсный и фазово-модуляционный [1]. В первом фосфоресценция возбуждается импульсами света длительностью более короткой, чем время жизни излучающего возбужденного электронного триплетного (метастабильного) состояния  $T_1$ . Во втором сравниваются амплитудно-фазовые параметры модулированного по гармоническому закону непрерывного источника и фосфоресцентного свечения. Методы применимы к фотостойким молекулярным системам с отличным от нуля квантовым выходом фосфоресценции, например, к таким, которые описываются трехуровневыми схемами ( $S_0$ -,  $S_1$ -,  $T_1$ -уровни диаграммы Яблоньского [1]). Очевидно, что при крайне малом вкладе или в отсутствие фосфоресценции (излучательных переходов  $S_0 \leftarrow T_1$ ) эти методы неприменимы. В таком случае для характеристики состояния  $T_1$  может быть использован метод, основанный на эффекте кинетического уменьшения интенсивности флуоресценции —

## INFLUENCE OF THE LIFETIME OF THE LOWEST TRIPLET STATE OF PHOTOSTABLE ORGANIC FLUOROPHORES ON THE KINETICS OF FLUORESCENCE FADING AND RECOVERY

I. V. Stanishevsky<sup>а\*</sup>, K. N. Solovyov<sup>б</sup>, S. M. Arabei<sup>а</sup>, and V. A. Chernyavsky<sup>а</sup> (<sup>а</sup> Belarusian State Agrarian and Technical University, 99 Nezavisimosti Prosp., Minsk, 220023, Belarus; e-mail: ivanstanisheuski@mail.ru;

<sup>б</sup> B. I. Stepanov Institute of Physics, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk)

после включения фотовозбуждения с крутым фронтом нарастания интенсивности, экспериментально наблюдался относительно быстрый спад ( $\sim 10^{-4}$ — $10^{-2}$  с) интенсивности флуоресценции (излучательные переходы  $S_0 \leftarrow S_1$ ) от начального пикового к меньшему стационарному значению. Эффект получил название “фейдинга флуоресценции” (fluorescence fading) и может быть назван также спадом флуоресценции [2—4]. Для хлорофиллоподобных и ароматических молекул такое поведение флуоресценции интерпретировано накоплением молекул в долгоживущем состоянии  $T_1$ . Для несложной кинетической модели показано, что экспериментальные данные о кинетике спада могут быть использованы в качестве параметров и позволяют определить суммарную константу скорости дезактивации  $T_1$ -состояния.

Отличаясь по длительности, эффект фейдинга по своему спектроскопическому проявлению принципиально не отличается от другого, более известного эффекта, связанного с уменьшением концентрации молекул пигментов в системе вследствие их вовлечения в фотохимические обратимые и/или необратимые процессы. В последнем случае в литературе принято говорить о фотообесцвечивании, или фотовыжигании флуоресценции (fluorescence photobleaching) [5—7]. При обратимости фотопроцессов возможно проявление комплементарного эффекта — восстановление флуоресценции после фотообесцвечивания (fluorescence recovery after photobleaching, FRAP) [8—10]. В общем случае кинетика таких фотопроцессов, как правило, сложна и описывается в рамках моделей, имеющих более трех энергетических уровней.

В настоящей работе описан эффект кинетического восстановления флуоресценции, комплементарный эффекту фейдинга, который может быть использован для идентификации и характеристики метастабильных состояний. Эффект выявлен с привлечением методов численного и аналитического моделирования кинетики флуоресценции молекулярной системы как отклика на воздействие фотоимпульса специальной формы.

**Теоретические основы метода и описание расчетной модели.** При интерпретации эффекта спада интенсивности флуоресценции флуорофоров (фейдинга) предполагается, что имеется молекулярный ансамбль фотостойких не взаимодействующих мономеров флуорофоров, в котором отсутствуют межмолекулярные переносы энергии. После включения фотовозбуждения происходит перераспределение молекул между основным  $S_0$  и возбужденными электронными состояниями  $S_1$  и  $T_1$ . Поскольку время жизни триплетного состояния  $T_1$  существенно больше, чем синглетного  $S_1$ , то молекулы в  $T_1$  будут накапливаться, а их количество в состояниях  $S_0$  и  $S_1$  будет убывать. Вследствие этого наблюдается падение интенсивности флуоресценции до тех пор, пока происходит накопление молекул в состоянии  $T_1$ , являющемся резервуаром (буфером, инерционным накопителем).

В отличие от упрощенных теоретических моделей [2—4] современные методы компьютерного моделирования позволяют максимально полно и глубоко изучить динамику населенностей электронных состояний, а следовательно, и изменение интенсивности флуоресценции, ее зависимость от констант скоростей внутримолекулярных процессов в исследуемых флуорофорах и параметров фотовозбуждения [11—13]. Используемая нами модель включает в себя  $S_0$ ,  $S_1$  и  $T_1$ -уровни, при этом последний заселялся путем интеркомбинационной конверсии  $S_1 \rightsquigarrow T_1$ . Эффекты, обусловленные вынужденным испусканием, не учитывались. Фронты импульсов фотовозбуждения задавались значительно более короткими, а их длительность значительно большей, чем время жизни состояния  $T_1$ . Точное аналитическое решение жесткой системы трех обыкновенных дифференциальных (балансных) уравнений первого порядка, описывающей населенности уровней как функции времени ( $[S_0(t)]$ ,  $[S_1(t)]$ ,  $[T_1(t)]$ ) с условием нормировки  $[S_0(t)] + [S_1(t)] + [T_1(t)] = 1$ , найдено методами компьютерной математики [14], подобно тому, как это сделано в [11—13].

Данные расчетов можно кратко сформулировать следующим образом. Поскольку интенсивность флуоресценции пропорциональна населенности  $S_1$ -уровня ( $I(t) \sim [S_1(t)]$ ), то в соответствующем решенном уравнении  $[S_1(t)]$  системы вместо населенностей можно использовать интенсивности. Тогда (опуская громоздкие преобразования) спад интенсивности флуоресценции представляется выражением:

$$I(t) = I + \Delta I \exp(-t/\tau), \quad (1)$$

где  $I$  — интенсивность флуоресценции при стационарном фотовозбуждении (при  $t \rightarrow \infty$ );  $\Delta I$  — превышение интенсивности флуоресценции над значением  $I$  в начальный момент фотовозбуждения (при  $t \rightarrow 0$ );  $\tau$  — время спада интенсивности флуоресценции к стационарному значению. Величины  $I$ ,  $\Delta I$  и  $\tau$  выражаются через суммарные константы флуоресценции  $f = k_F + k_{SS}$  (где  $k_F$  и  $k_{SS}$  — константы скорости переходов  $S_0 \leftarrow S_1$  и  $S_0 \leftarrow S_1$ ), фосфоресценции  $p = k_P + k_{TS}$  (где  $k_P$  и  $k_{TS}$  — константы скорости переходов  $S_0 \leftarrow T_1$  и  $S_0 \leftarrow T_1$ ), константу скорости интеркомбинационной конверсии  $T_1 \leftarrow S_1 - k_{ST}$ , а также константу скорости фотовозбуждения  $k_{exc}$  и населенности уровней.

Вводя параметр  $\delta = \Delta I/I$ , можно нормировать (1). Кроме того, пренебрегая вкладом некоторых членов, выражения для  $\delta$  и  $\tau$  можно привести к виду (2) и (3). После упрощений относительная погрешность вычисления  $\delta$  и  $\tau$  фактически определяется отношениями  $p/k_{ST}$  и/или  $p/f$ , последнее из которых по существ-

ву определяет условие метастабильности состояния  $T_1$  (из общих соображений метастабильным можно назвать возбужденное состояние с временем жизни, превышающим время жизни флуоресцентного состояния в  $N$  раз, например, в 100 раз — это соответствует  $p/f < 10^{-2}$ ):

$$\delta = (k_{\text{exc}} Q_{ST}/p)[S_0(0)] - [T_1(0)], \quad (2)$$

$$\tau = (p + k_{\text{exc}} Q_{ST})^{-1}, \quad (3)$$

где  $Q_{ST}$  — параметр, очень близкий по значению к квантовому выходу образования триплетного  $T_1$ -состояния  $\varphi_{ST} = k_{ST}/(k_F + k_{SS} + k_{ST})$ ;  $[S_0(0)]$  и  $[T_1(0)]$  — населенности уровней в момент включения фотоисточника или изменения его интенсивности. Из (3) следует, что при  $k_{\text{exc}} Q_{ST} \ll p$  (например, при малоинтенсивном фотовозбуждении) время спада интенсивности флуоресценции определяется величиной, обратной константе  $p$ , т. е. фактически является временем жизни  $T_1$ .

Численное моделирование выполнялось с помощью программы Scilab [15], и именно оно позволило выявить новый эффект, противоположный (комплементарный) эффекту фейдинга, — кинетическое восстановление флуоресценции — антифейдинг. Так, если модулировать интенсивность фотовозбуждения прямоугольными импульсами, то отклик флуоресценции будет иметь типичный вид, подобный приведенному на рис. 1. Очевидно, что восстановление флуоресценции связано с частичным опустошением состояния  $T_1$ , вначале заселенного более интенсивным фотовозбуждением, и, соответственно, заселением состояния  $S_0$  (и в весьма незначительной степени состояния  $S_1$ ). Кроме того, из численных расчетов следует, что при установившемся процессе двухступенчатого фотовозбуждения для фейдинга и последующего антифейдинга выполняется соотношение для интенсивностей (см. рис. 1):

$$(I_1 + \Delta I_1)/I_1 = I_2/(I_2 - \Delta I_2). \quad (4)$$

Погрешность выполнения соотношения (4) определяется величинами  $p/k_{ST}$  и  $p/f$ : для условий рис. 1 она составляет  $10^{-5}$ . Из равенства (4) следует  $\Delta I_1/(I_1 + \Delta I_1) = \Delta I_2/I_2$ . При этом  $\delta$  и  $\tau$  антифейдинга также определяются выражениями (2) и (3) с условием, что началом процесса ( $t = 0$ ) является момент уменьшения (переключения) интенсивности фотоисточника.

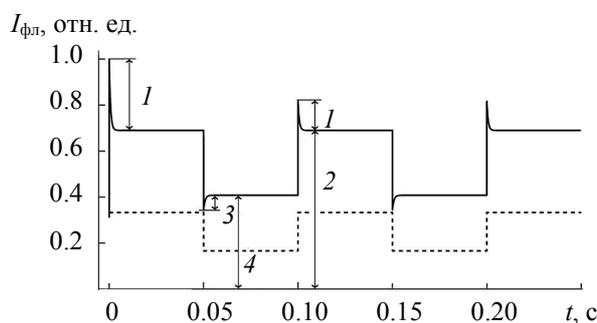


Рис. 1. Численное моделирование интенсивности флуоресценции флуорофора (сплошная линия) при прямоугольно-модулированном фотовозбуждении (штриховая); константы скоростей  $k_{\text{exc}} = 500$  и  $250 \text{ с}^{-1}$ ,  $f = 10^8 \text{ с}^{-1}$ ,  $k_{ST} = 9 \cdot 10^8 \text{ с}^{-1}$ ,  $p = 10^3 \text{ с}^{-1}$ , длительность периода прямоугольной модуляции  $t = 0.05 \text{ с}$ ; 1 — амплитуда фейдинга ( $\Delta I_1$ ); 2 — интенсивность флуоресценции после фейдинга ( $I_1$ ); 3 — амплитуда антифейдинга ( $\Delta I_2$ ); 4 — интенсивность флуоресценции после антифейдинга ( $I_2$ )

Хотя эффект восстановления флуоресценции хорошо известен для обратимых фотохимических процессов, сообщения об аналогичном эффекте применительно к моделям, подобным рассматриваемой, в литературе отсутствуют. Отметим, что параметры фейдинга и антифейдинга определяются внутримолекулярными константами, а сами процессы наблюдаются при фотовозбуждении во всей полосе спектра поглощения и проявляются при наличии в молекулярной системе метастабильного состояния.

**Экспериментальные результаты и их обсуждение.** Модельные расчеты проверены экспериментально на цинковом комплексе трет-бутилзамещенного тетрабензопорфирина —  $\text{Zn}(t\text{Bu})_4\text{ТБП}$  ( $C \approx 10^{-5}$  моль/л), внедренного в полимерную матрицу поливинилбутираля (ПВБ) при  $T = 295 \text{ К}$ . Выбор металлокомплекса порфирина исключал фотохимический процесс NH-таутомерии, наблюдаемый для свободных оснований [16]. Отсутствие необратимых деструктивных фотопроцессов в образце контролировалось по спектрам поглощения. Спектры поглощения и флуоресценции  $\text{Zn}(t\text{Bu})_4\text{ТБП}$  в ПВБ при комнатной температуре описаны в [12]: максимум  $Q(0,0)$ -полосы расположен при 630 нм,  $B(0,0)$ -полосы — при 428 нм и  $B(0,1)$ -полосы — при 406 нм; максимум 0–0-полосы флуоресценции расположен при 631 нм.

В качестве источника фотовозбуждения использован лазерный диод (аналог SANYO DL4146-101S (Shenzhen, China);  $\lambda_{\text{exc}} \approx 405$  нм) мощностью излучения единицы милливатт, питаемый генератором токовых импульсов прямоугольной двухступенчатой формы с фронтами нарастания и спада  $\approx 50$  нс. Длительности каждой ступени и темновой паузы между импульсами могли регулироваться независимо. Дрейфовое уменьшение интенсивности излучения диода из-за температурных и иных факторов составляло единицы процентов и не компенсировалось. Детектирование флуоресценции проводилось в 0–0-полосе с использованием ФЭУ PM943-02 (Hamamatsu, Japan), соединенного с монохроматором МДР-23, при спектральной ширине щелей  $< 2$  нм. Типично сигнал ФЭУ преобразовывался в напряжение операционным усилителем AD711, обрабатывался 12-битным АЦП ADC40M-12-2 (“Спецприбор”, Минск) и синхронно накапливался программно.

На рис. 2 приведен результат измерения кинетики интенсивности флуоресценции  $\text{Zn}-(t\text{Bu})_4\text{TBP}$  в ПВБ при возбуждении последовательностью двухступенчатых импульсов суммарной длительностью 0.026 с, разделенных темновой паузой. В такой постановке эксперимент реализует модельный расчет кинетики интенсивности флуоресценции только для первых двух ступеней фотовозбуждения (интервал 0–0.1 с на рис. 1).

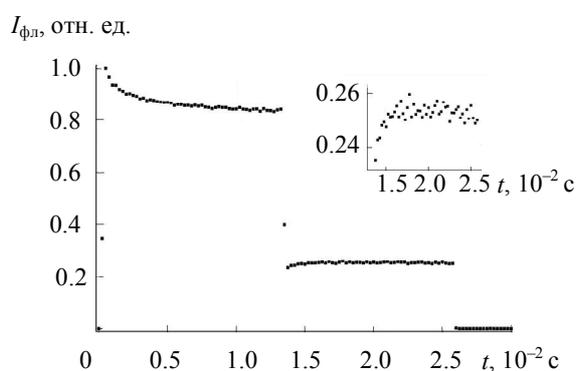


Рис. 2. Временная зависимость интенсивности флуоресценции  $\text{Zn}-(t\text{Bu})_4\text{TBP}$  в ПВБ при возбуждении лазерными импульсами прямоугольной двухступенчатой формы ( $\lambda_{\text{exc}} = 405$  нм,  $\lambda_{\text{рег}} = 635$  нм) и  $T = 295$  К; число циклов накопления 400; на вставке — кинетика антифейдинга в увеличенном масштабе

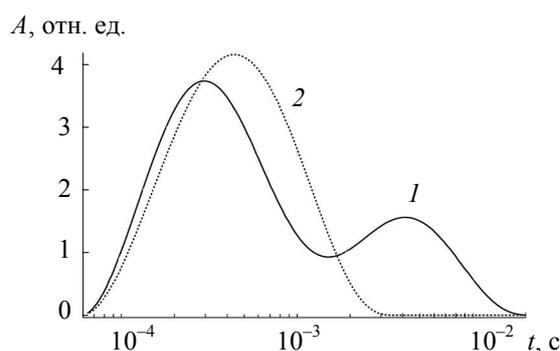


Рис. 3. Распределение амплитуд характеристических времен  $\tau$  спада (1) и восстановления (2) флуоресценции  $\text{Zn}-(t\text{Bu})_4\text{TBP}$  в ПВБ для временной зависимости интенсивности флуоресценции

В кинетике флуоресценции отчетливо наблюдаются спад и восстановление — фейдинг и предсказанный антифейдинг. Распределения характеристических времен  $\tau$  обеих кривых, рассчитанные с помощью программы *CONTIN* [17, 18], имеют длительности порядка сотен микросекунд-миллисекунд и, хотя уширены вследствие шумов и дрейфа интенсивности фотоисточника, хорошо коррелируют друг с другом (см. рис. 3). Более короткие по сравнению с литературными данными по  $\tau_p$  [16] времена спада и восстановления можно объяснить доминированием процесса тушения состояния  $T_1$  кислородом, что приводит к укорочению  $\tau$  и уменьшению  $\delta$ . Последнее обстоятельство ухудшает наблюдение эфффектов.

**Заключение.** Эффекты кинетического уменьшения и восстановления интенсивности флуоресценции имеют общее научное и методическое значение и могут найти практическое применение, например, для обнаружения долгоживущих (метастабильных) неизлучающих молекулярных состояний и исследования их свойств.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (проект № Ф13-024).

- [1] Дж. Лакович. Основы флуоресцентной спектроскопии, Москва, Мир (1986) 10—119
- [2] R. Avarmaa. *Mol. Phys.*, **37** (1979) 441—454
- [3] L. Benthem, R. B. M. Koehorst, T. J. Schaafsma. *J. Mol. Struct.*, **79** (1982) 455—460
- [4] K. Mauring, I. Renge, P. Sarv, R. Avarmaa. *Spectrochim. Acta A*, **43** (1987) 507—514
- [5] S. S. West, J. F. Golden, J. M. Menter, L. D. Love. *J. Histochem. Cytochem.*, **24** (1976) 59—63
- [6] C. Eggeling, J. Widengren, L. Brand, J. Schaffer, S. Felekyan, C. A. M. Seidel. *J. Phys. Chem. A*, **110** (2006) 2979—2995
- [7] L. Song, E. J. Hennink, T. Young, H. J. Tanke. *Biophys. J.*, **68** (1995) 2588—2600
- [8] D. Axelrod, D. E. Koppel, J. Schlessinger, E. Elson, W. W. Webb. *Biophys. J.*, **16** (1976) 1055—1069
- [9] D. M. Soumpasis. *Biophys. J.*, **41** (1983) 95—97
- [10] T. K. Meyvis, S. C. De Smedt, P. Van Oostveldt, J. Demeester. *Pharm. Res.*, **16** (1999) 1153—1162
- [11] И. В. Станишевский, К. Н. Соловьев. *Журн. прикл. спектр.*, **65**, № 4 (1998) 532—538
- [12] S. M. Arabei, I. V. Stanishevsky, K. N. Solovyov. *Opt. Memory Neural Networks*, **10** (2001) 157—164
- [13] И. В. Станишевский, К. Н. Соловьев. *Опт. и спектр.*, **96** (2004) 255—263
- [14] <http://maxima.sourceforge.net/>
- [15] <http://www.scilab.org/>
- [16] В. А. Кузьмицкий, К. Н. Соловьев, М. П. Цвирко. В кн. “Порфирины: спектроскопия, электрохимия, применение”, под ред. Н. С. Ениколопяна, Москва, Наука (1987) 7—126
- [17] S. W. Provencher. *Comp. Phys. Commun.*, **27** (1982) 213—242
- [18] <http://s-provencher.com/pages/contin.shtml>