

Экспериментальные методы химической кинетики

**под редакцией
Н.М. Эмануэля, М.Г. Кузьмина**

Глава Люминесценция

(<http://www.chemnet.ru/rus/teaching/kinetics-exp/>)

**Электронная версия подготовлена
на основе издания:**

**Экспериментальные методы химической кинетики:
Учебн. пособие/ Под. ред. Н.М. Эмануэля и М.Г. Кузьмина.
Москва: Изд-во Московского университета, 1985 г.**

ЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ

Люминесцентные методы включают в себя исследования с использованием флуоресценции (флуориметрия) и фосфоресценции (фосфориметрия). Наиболее широко люминесцентные измерения используются как методы анализа и контроля за протеканием химических и биохимических реакций, а также для кинетических исследований быстрых реакций электронно-возбужденных молекул.

Применение люминесценции для аналитических целей включает широкую область использования ее для идентификации веществ, для обнаружения малых концентраций веществ, для контроля изменений, претерпеваемых веществом, для определения степени чистоты веществ. Широко применяются измерения люминесценции при изучении кинетики обычных химических реакций. Высокая чувствительность метода позволяет фиксировать малую степень превращения веществ, а иногда по люминесценции промежуточных соединений становится возможным установить механизм химической реакции. Люминесцентные методы используются в биологии, в частности для исследования структуры белков методом флуоресцентных зондов и меток.

Успешно применяются люминесцентные измерения при изучении быстрых реакций электронно-возбужденных молекул. В результате протекания таких реакций интенсивность флуоресценции исходного соединения уменьшается, происходит «тушение» флуоресценции. Реакции тушения конкурируют с дезактивацией возбужденных молекул по другим механизмам. Так как время затухания флуоресценции порядка 10^{-8} с, флуоресцентные методы обычно применяют для изучения кинетики быстрых реакций возбужденных молекул, протекающих за время 10^{-7} — 10^{-10} с.

Свечение нагретых до высокой температуры тел называется испусканием накаливаемых тел. Это равновесное излучение. Все другие типы испускания света называются люминесценцией и представляют собой неравновесное излучение. При люминесценции система излучает энергию, и для возбуждения излучения нужно подводить энергию извне. Разновидности люминесценции отличаются друг от друга по типу источника энергии возбуждения. Различают электролюминесценцию, возбуждаемую электрическим током, проходящим через ионизированный газ или полупроводник; радиолюминесценцию, возникающую под действием частиц высоких энергий; хемилюминесценцию, возникшую в результате химических реакций; триболюминесценцию, наблюдаемую при разрушении некоторых кристаллов; сонолюминесценцию, возникающую при воздействии интенсивных звуковых волн на жидкость. Фотолюминесценция — это люминесценция, возникающая при поглощении инфракрасного, видимого или ультрафиолетового света.

Поглощение света

Для объяснения взаимодействия света с веществом используют две модели: волновую и корпускулярную. С помощью волновой модели можно объяснить явления, при которых не происходит поглощения света, — отражение, преломление, дифракция. По теории Максвелла, электромагнитные колебания представляют собой изменяющиеся электрическое и магнитное поля, которые колеблются во взаимно перпендикулярных направлениях и перпендикулярно направлению распространения волны. Согласно этой теории взаимодействие света с веществом — это взаимодействие электрического поля волны с электронами атомов. Каждая волна имеет определенную частоту ν и длину волны λ . Эти величины связаны соотношением:

$$\lambda\nu = c/n,$$

где c — скорость света в вакууме ($\sim 3 \cdot 10^{10}$ см/с).

Поглощение и испускание света описываются корпускулярной теорией, согласно которой лучистая энер-

гия может поглощаться только определенными порциями, или квантами. Энергия E , переносимая одним квантом (фотоном), равна

$$E = h\nu = hc/\lambda,$$

где h — постоянная Планка ($6,62 \cdot 10^{-34}$ Дж.с). Поэтому монохроматический пучок света характеризуется не только длиной волны, но также и энергией фотона. В фотохимии и фотолюминесценции очень важно знать количество света, поглощенное системой. Для характеристики количества света используют единицу, равную $6,023 \cdot 10^{23}$ квантам. Эта единица называется эйнштейн. Если система поглощает 1 эйнштейн света, то происходит превращение 1 моля вещества при условии, что на 1 поглощенный квант реагирует 1 молекула. Величина эйнштейн различна для разных участков спектра электромагнитных волн (табл. 3.1). В фотохимии и люминесценции наиболее часто используются единицы: c^{-1} — для частоты; нм или Å — для длины волны ($\lambda = c/\nu$, где c — скорость распространения излучения); cm^{-1} — для волнового числа ($\nu = \lambda^{-1}$); кДж/моль и эВ — для энергии. В табл. 3.2 показана связь между этими величинами.

Таблица 3.1

Виды электромагнитного излучения

Тип излучения	λ , см	$\tilde{\nu}$, cm^{-1}	Энергия кванта, эВ	Энергия Эйнштейна, кДж	Природа поглощения или испускания излучения
Гамма-лучи	10^{-10}	10^6	$1,2 \cdot 10^6$	$1,2 \cdot 10^8$	ядерные реакции переходы внутренних электронов в атоме
Рентгеновские лучи	10^{-8}	10^4	$1,2 \cdot 10^4$	$1,2 \cdot 10^6$	
Ультрафиолетовые лучи	10^{-5}	10^1	$1,2 \cdot 10^1$	$1,2 \cdot 10^3$	переходы внешних электронов в атоме
Видимый свет	$4 \cdot 10^{-5}$	2,5	3,1	$2,9 \cdot 10^2$	
Инфракрасное	$8 \cdot 10^{-5}$	1,25	1,6	$1,5 \cdot 10^2$	колебания молекул вращение молекул
Инфракрасное, далекая область	10^{-3}	10^{-1}	$1,2 \cdot 10^{-1}$	$1,2 \cdot 10^1$	
Ультракороткие радиоволны	10^{-2}	10^{-2}	$1,2 \cdot 10^{-2}$	1,2	колебания подвижных или свободных электронов
Длинные радиоволны	10^1	10^{-5}	$1,2 \cdot 10^{-5}$	$1,2 \cdot 10^{-3}$	
	10^5	10^{-9}	$1,2 \cdot 10^{-9}$	$1,2 \cdot 10^{-7}$	

Таблица 3.2

Соотношения между единицами, используемыми в фотохимии

	Энергия		Длина волны, нм	Волновое число, см ⁻¹
	кДж/моль	эВ		
100 кДж/моль	100	1,04	1200	8 360
1 эВ	96,5	1,00	1240	8 070
100 нм	1200	12,4	100	100 000
10 000 см ⁻¹	120	1,24	1000	10 000

В фотохимии используют преимущественно свет ультрафиолетовой и видимой областей спектра. При поглощении в этом диапазоне возбуждаются внешние электроны молекулы, которые осуществляют химическую связь и возбуждение которых приводит к химическому превращению. Эти области наиболее существенны и в фотолуминесценции.

Поглощение монохроматического пучка света гомогенной поглощающей средой подчиняется закону Ламберта—Бера:

$$I/I_0 = 10^{-\epsilon cl}, \quad (3.1)$$

где I_0 — энергия (или число квантов) монохроматического света, падающего за единицу времени на переднюю поверхность слоя вещества; I — энергия, прошедшая через слой вещества за единицу времени; l — толщина слоя, см; c — концентрация вещества, моль/л; ϵ — молярный коэффициент поглощения (экстинкции), л/(моль·см). Коэффициент поглощения зависит от вещества, длины волны света и температуры. Величина $\lg(I_0/I)$ называется оптической плотностью раствора. Она пропорциональна концентрации поглощающих частиц и обладает свойством аддитивности. Зависимость величины ϵ или ее логарифма от длины волны или частоты поглощаемого света представляет собой спектр поглощения данного вещества.

Закон Ламберта—Бера выведен в предположении, что вероятность поглощения пропорциональна числу бимолекулярных столкновений квантов света и поглощающих молекул, причем принимается, что при всех концентрациях взаимодействие между молекулами

пренебрежимо мало. Для большинства систем в растворе этот закон удовлетворительно выполняется. Наблюдаемые иногда отклонения обусловлены ассоциацией молекул и другими, более тонкими эффектами. Например, если вещество, спектр поглощения которого состоит из очень узких линий или полос, освещают светом с довольно широкой полосой, то при этом не выполняется одно из главных условий — постоянство коэффициента поглощения в полосе длин волн используемого света. Закон Ламберта—Бера не выполняется и в тех случаях, когда интенсивность падающего света очень велика. При этом значительная часть молекул будет находиться в возбужденном состоянии. При измерениях поглощения в жестких средах и низкой температуре могут накапливаться триплетные молекулы в больших концентрациях, поскольку они имеют большое время жизни. В этом случае отклонения от закона Ламберта—Бера будут наблюдаться и при умеренных интенсивностях падающего света.

Для характеристики интенсивности поглощения часто используется сила осциллятора:

$$f = 4,3 \cdot 10^{-9} \int \epsilon d\nu \quad (3.2)$$

(f — безразмерная величина).

Сила осциллятора характеризует интегральную интенсивность поглощения по всей полосе в отличие от коэффициента поглощения, который характеризует интенсивность поглощения лишь на одной длине волны.

Возбужденные электронные состояния

Спектральная область, обычно используемая для абсорбционных и люминесцентных измерений (200—800 нм), соответствует электронным переходам в молекуле. Поглощение молекулой кванта света в этой области спектра приводит к переходу электрона на более высокий энергетический уровень. Процессы, происходящие при взаимодействии излучения с молекулой, можно иллюстрировать с помощью кривых потенциальной энергии, соответствующих основному и возбужденному состояниям.

На рис. 3.1 представлены различные уровни потенциальной энергии двухатомной молекулы. Потенци-

альная энергия низшего энергетического уровня, или основного состояния, изображается кривой S_0 ; энергетические уровни, соответствующие разным колебательным состояниям молекулы в этом электронном состоянии, обозначены цифрами 0, 1, 2, 3, 4. Поглощение

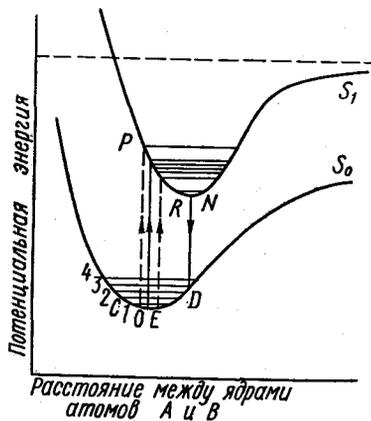


Рис. 3.1. Кривые потенциальной энергии основного S_0 и возбужденного S_1 состояний двухатомной молекулы АВ

света происходит за 10^{-15} с, это время соответствует периоду колебаний световой волны. За время поглощения света молекулой заметно не изменяются ни положение, ни импульсы ядер атомов молекулы. Таким образом, взаимное расположение ядер до акта поглощения света и сразу после него одинаково.

Изменение потенциальной энергии электронно-возбужденного состояния в зависимости от расстояния между ядрами атомов представлено кривой S_1 . Энергия связи в возбужденном состоянии уменьшается по сравнению с основным состоянием, поэтому положение равновесия в возбужденном состоянии отвечает большему межъядерному расстоянию, нежели в основном состоянии. Наиболее вероятное межъядерное расстояние для молекулы на нулевом колебательном подуровне соответствует средней точке CD или RS . Для более высоких колебательных подуровней наиболее вероятные межъядерные расстояния соответствуют точкам пересечения потенциальных кривых с горизонтальными линиями, соответствующими энергии колебательных подуровней. Вероятность переходов при поглощении и испускании определяется принципом Франка—Кондона. Этот принцип гласит, что наиболее вероятен такой переход, при котором не изменяются ни положение ядер, ни их кинетическая энергия. Такой переход можно представить вертикальной линией EP на рис. 3.1.

Другие переходы, как более длинноволновые, так и более коротковолновые, имеют меньшую вероятность.

Молекула в основном состоянии S_0 , описываемом волновой функцией ψ_0 , может поглотить свет с частотой ν , если существует состояние S_n , описываемое волновой функцией ψ_n и имеющее более высокую энергию, чем состояние S_0 , так что

$$E_n - E_0 = h\nu, \quad (3.3)$$

и момент перехода

$$R_{0n} = \int \psi_0 |R| \psi_n d\tau \quad (3.4)$$

не равен нулю. В этом случае вероятность поглощения пропорциональна величине $|R_{0n}|^2$.

Для фотохимии и спектроскопии наиболее важны следующие три типа электронных переходов: 1) спонтанное испускание; 2) вынужденное испускание; 3) вынужденное поглощение.

Последние два процесса происходят при наличии внешнего электромагнитного поля. Спонтанное поглощение, соответствующее самопроизвольному переходу системы с более низкого уровня энергии на более высокий, в отсутствие внешнего поля не имеет места.

Интенсивность вынужденного поглощения характеризуется энергией, поглощаемой молекулой за единицу времени:

$$I_a = \rho (N_1 - N_2) B_{12} h\nu, \quad (3.5)$$

где ρ — плотность излучения частоты ν , действующего на поглощающее вещество; $N_1 - N_2$ — разность между числом молекул в единице объема в начальном (S_1) и конечном состояниях (S_2); B_{12} — вероятность перехода из состояния S_1 в состояние S_2 при поглощении фотона $h\nu$. Для электронных переходов при обычных условиях $N_2 \ll N_1$. Из возбужденного состояния S_2 молекула может перейти в состояние S_1 путем спонтанного либо вынужденного испускания. Интенсивность испускания определяется выражением:

$$I_e = N_2 h\nu (A_{21} + \rho B_{21}), \quad (3.6)$$

где N_2 — число возбужденных молекул в поле излучения, плотность которого равна ρ ; A_{21} — вероятность спонтанного испускания из состояния S_2 в S_1 , т. е. число переходов в единицу времени из состояния S_2 в

S_1 ; B_{21} — вероятность вынужденного испускания. При обычных условиях вынужденным испусканием можно пренебречь, т. е.

$$I_e = N_2 h \nu A_{21}. \quad (3.7)$$

Вероятности A_{21} , B_{12} , B_{21} и момент перехода R_{12} связаны следующими соотношениями:

$$B_{12} = g_2 \left(\frac{8\pi^3}{3h^2 c} \right) |R_{12}|^2; \quad B_{12} g_1 = B_{21} g_2 \quad (3.8)$$

и

$$A_{21} = \left(\frac{64\pi^4}{3hc^3} \right) \nu^3 |R_{21}|^2, \quad (3.9)$$

где g_1 и g_2 — величины, характеризующие вырождение состояний S_1 и S_2 соответственно. Из уравнений (3.8) и (3.9) видно, что вероятность излучательных электронных переходов между двумя состояниями зависит от величины момента перехода. Величина момента перехода определяет также силу осциллятора:

$$f_{12} = \left(\frac{8\pi^2 c \nu m}{3he^2} \right) |R_{12}|^2 g_2. \quad (3.10)$$

В классической физике ее трактуют как эффективное число электронов, колебания которых приводят к данным полосам поглощения или испускания.

Для излучательных переходов существуют правила отбора, определяемые также величиной момента перехода. В приближении Борна—Оппенгеймера полную энергию молекулы можно выразить в виде суммы электронной, колебательной и спиновой энергий:

$$E = E_e + E_v + E_s, \quad (3.11)$$

а полную волновую функцию можно представить в виде произведения ядерной, электронной и спиновой волновых функций. Тогда момент перехода выражается следующим образом:

$$R = \int \theta_0 \theta_n d\tau_n \int S_0 S_n d\tau_s \int \varphi_0 r \varphi_n d\tau_e. \quad (3.12)$$

Первый член — это интеграл перекрывания волновых функций колебаний ядер. Второй член — спиновый интеграл перекрывания. Его величина зависит от начального и конечного спиновых состояний электрона. Третий член называется электронным моментом перехода,

Его величина зависит от симметрии и величины перекрывания начальной и конечной пространственных орбиталей. Таким образом, момент перехода является произведением трех отдельных интегралов и равен нулю, если равен нулю хотя бы один из этих интегралов. При этом вероятность перехода также равна нулю. Такой переход называется запрещенным в противоположность разрешенным переходам, для которых момент перехода отличается от нуля. Правила запрета имеют приближенный характер. Запрещенные переходы все же можно наблюдать, хотя их интенсивность много меньше интенсивностей разрешенных переходов. Факторы запрета составляют: для запрета по спину — 10^{-6} ($\pi - \pi^*$), для запрета по координате (колебания ядер) — 10^{-2} — 10^{-3} ($n - \pi^*$), для запрета по симметрии (перекрывание пространственных орбиталей) — 10^{-1} — 10^{-3} ($n - \pi^*$).

При поглощении света молекула переходит на один из колебательных подуровней возбужденного электронного состояния (см. рис. 3.2). Молекула, имеющая энергию, соответствующую верхним колебательным подуровням любого возбужденного состояния, быстро теряет избыток колебательной энергии при столкновениях с окружающими молекулами. Это процесс колебательной релаксации. Безызлучательный переход между электронными состояниями одинаковой мультиплетности называется внутренней конверсией. Внутренняя конверсия из нижнего колебательного подуровня первого электронно-возбужденного состояния в основное — сравнительно медленный процесс ($k \approx 10^8$ — 10^9 с $^{-1}$). Поэтому в первом возбужденном состоянии наблюдаются процессы испускания и фотохимического превращения, даже если их скорость не очень велика. Другим безызлучательным процессом, конкурирующим с испусканием света, является интеркомбинационная конверсия: $S_1 \rightarrow T_1$ — безызлучательный переход между состояниями разной мультиплетности. Нижний колебательный подуровень нижнего триплетного состояния несколько опущен по отношению к нижнему колебательному подуровню первого электронно-возбужденного синглетного состояния, некоторые же из более высоких находятся на одном уровне с ним. Переход на один из этих высоких колебательных подуровней нижнего триплетного состояния и представляет собой ин-

теркомбинационную конверсию. Наиболее важны два вида интеркомбинационной конверсии: переходы $S_1 \rightarrow T_1$ и $T_1 \rightarrow S_0$. Константа скорости интеркомбинационной конверсии из нижнего электронно-возбужденного синглетного состояния в триплетное — один из важнейших параметров $k_{ST} \approx 10^6 - 10^{11} \text{ с}^{-1}$. Процесс $T_1 \rightarrow S_0$ в $10^6 - 10^9$ раз медленнее, чем первый.

Флуоресценция и фосфоресценция

Флуоресценция — это излучательный переход между двумя состояниями одинаковой мультиплетности. Флуоресценция наблюдается в жидкой, твердой и газовой фазах. При комнатной температуре практически все молекулы находятся на нулевом колебательном подуровне основного состояния, поэтому поглощение происходит с этого уровня.

Испускание флуоресценции происходит с нулевого колебательного подуровня первого возбужденного состояния. Поэтому общим переходом в поглощении и испускании является переход между нулевыми колебательными подуровнями основного и возбужденного состояний — так называемый $O-O$ -переход. Энергия $O-O$ -перехода наименьшая в поглощении и наибольшая в испускании. Частоту $O-O$ -перехода нетрудно найти по частоте, соответствующей пересечению спектров поглощения и испускания. Для сложных молекул $O-O$ -переход в спектре флуоресценции находится при несколько меньшей частоте, чем $O-O$ -переход в спектре поглощения. Это становится понятным, если учесть сольватацию молекулы флуорофора в основном и электронно-возбужденном состояниях молекулами растворителя в результате диполь-дипольного взаимодействия. При возбуждении изменяются постоянный дипольный момент и по-

ляризуемость, поэтому изменяется и степень сольватации. При поглощении света молекулой в жидкости при комнатной температуре ориентация молекул растворителя не изменяется, и сразу после возбуждения молекула оказывается в неравновесном состоянии сольватации, имеющем большую энергию, чем равновесное (переход ab , рис. 3.2). В растворителях с обычной вязкостью при комнатной температуре происходит быстрая релаксация возбужденной молекулы в равновесное состояние (c) с меньшей энергией до акта испускания света. При излучательном переходе возбужденной молекулы в основное состояние она попадает в состояние сольватации, соответствующее равновесной конфигурации электронно-возбужденного состояния (d), имеющей большую энергию, чем неравновесная конфигурация основного состояния (a). При релаксации из d в a возникает равновесная конфигурация основного состояния. Нетрудно видеть, что $O-O$ -переход в поглощении имеет большую частоту, чем $O-O$ -переход в испускании. При достаточно низкой температуре и высокой вязкости процесс $b \rightarrow c$ протекает медленно, испускание происходит из состояния b или же из какого-либо состояния, промежуточного между b и c . Разность энергий $O-O$ -переходов при этом уменьшается.

Спектры поглощения и флуоресценции определяются распределением колебательных подуровней состояний S_0 и S_1 по энергиям. Это распределение часто одинаково для обоих состояний, поэтому спектр испускания близок к зеркальному отражению спектра поглощения, если оба спектра изображены в шкале частот (правило зеркальной симметрии Левшина). Согласно закону Стокса, длина волны флуоресценции всегда больше длины волны возбуждающего света. Однако имеются примеры антистоксовой флуоресценции, когда длина волны флуоресценции меньше длины волны возбуждающего света.

Возбуждение молекулы соответствует переходу электрона с основного уровня на возбужденный. Поскольку молекулярные орбитали молекул с четным числом электронов заполнены парами электронов, имеющих противоположно направленные спины, то при переходе электрона на верхнюю орбиталь его спин может оказаться ориентированным в том же или в про-

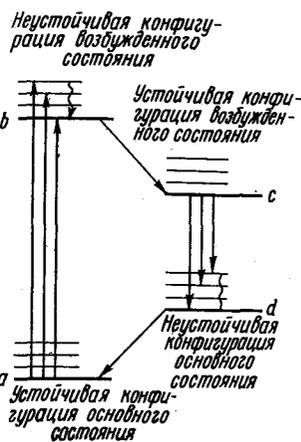


Рис. 3.2. Изменение энергии возбужденного состояния в результате сольватации молекулы после возбуждения или испускания

При возбуждении изменяются постоянный дипольный момент и по-

ти противоположном направлении, что и у оставшегося на нижней орбитали электрона. Если ориентация спина сохраняется, возбужденное состояние будет иметь тот же результирующий спиновый момент, что и основное. При этом мультиплетность сохраняется. Мультиплетность состояния равна $n+1$, где n — число неспаренных электронов. Если же ориентация спина изменится на противоположную, изменится и мультиплетность. Мультиплетность основного состояния большинства молекул с четным числом электронов равна 1, т. е. это синглетные состояния. При сохранении мультиплетности возбужденное состояние тоже будет синглетным.

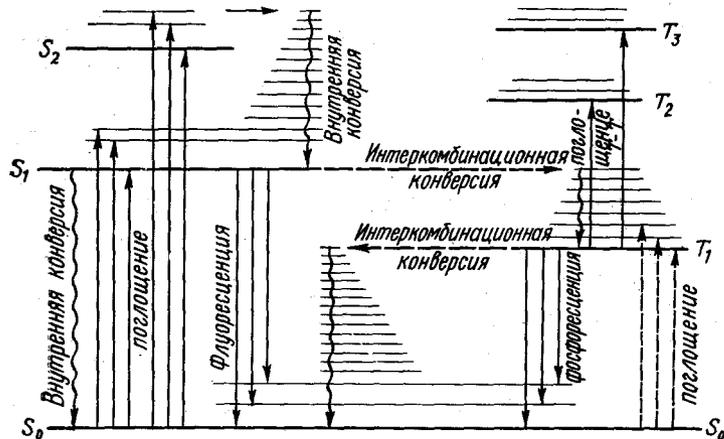


Рис. 3.3. Уровни энергии синглетных и триплетных состояний и процессы их дезактивации

Если же возбуждаемый электрон меняет направление спина, возбужденное состояние будет триплетным. Таким образом, одному основному состоянию соответствует набор разных возбужденных состояний — синглетных и триплетных (рис. 3.3).

Согласно правилу Гунда, триплетные уровни лежат ниже, чем соответствующие им синглетные уровни. Излучательный переход между состояниями разной мультиплетности называется фосфоресценцией. Переходы между состояниями разной мультиплетности теоретически запрещены. В действительности такие переходы наблюдаются вследствие спин-орбитального взаимо-

действия. Электрон обладает спиновым угловым и магнитным моментами. При синглет-триплетном переходе изменяется направление магнитного момента, поскольку спин электрона меняется на противоположный. Изменение магнитного момента вызывает взаимодействие с магнитным полем, возникающим при орбитальном движении заряженного электрона. Можно сказать, что магнитный момент электрона связан с орбитальным магнитным полем (отсюда термин «спин-орбитальное взаимодействие»). В результате спин-орбитального взаимодействия спиновый момент переходит в орбитальный и обратно, несмотря на то, что суммарный угловой момент остается постоянным. Поэтому в этом случае нельзя говорить о чистых синглетном и триплетном состояниях, а следует рассматривать синглетное состояние с некоторой долей триплетного и наоборот. Таким образом, в результате спин-орбитального взаимодействия небольшое количество состояний синглетного характера примешивается к триплетным состояниям и наоборот, так что перестают существовать «чисто» синглетные и триплетные состояния. И тогда синглет-триплетные переходы можно представить как переходы между чистыми синглетными и триплетными состояниями каждого смешанного состояния. Если ψ_S^0 и ψ_T^0 — волновые функции «чистых» синглетного и триплетного состояний соответственно, то волновая функция триплетного состояния, образующегося с учетом спин-орбитального взаимодействия, записывается в виде

$$\psi_T = \psi_T^0 + \sum \frac{\int \psi_{S_k}^0 |H_{SO}| \psi_T^0 d\tau}{(E_T - E_{S_k})} \psi_{S_k}^0, \quad (3.13)$$

где S_k — r -е синглетное состояние; E_T и E_S — энергии триплетного и возмущающего синглетного состояний соответственно. Аналогичное выражение можно написать для синглетного состояния. Оператор спин-орбитального взаимодействия выражается так:

$$H_{SO} = k \xi (L \cdot S),$$

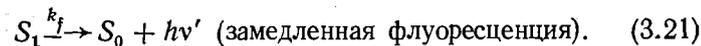
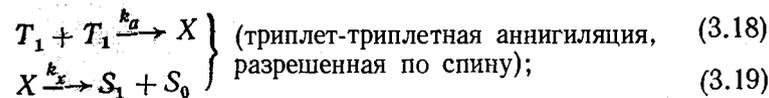
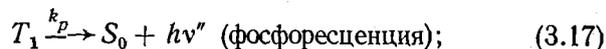
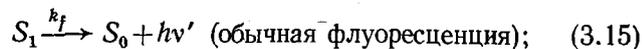
где L — оператор орбитального углового момента; S — оператор спинового углового момента; ξ — коэффициент, зависящий от поля ядер.

Молекулы в триплетном состоянии легко теряют свою энергию в различных безызлучательных процессах. Они могут дезактивироваться молекулами с неспаренными электронами, например кислородом, или в столкновениях с другими окружающими молекулами. Поэтому фосфоресценция в жидких растворах при комнатной температуре наблюдается чрезвычайно редко. Как правило, фосфоресценцию наблюдают в жестких средах или при пониженных температурах. Синглет-триплетное поглощение очень слабо. Поэтому заселение триплетного уровня производится не прямым поглощением света в полосе синглето-триплетного перехода, а путем интеркомбинационной конверсии через синглетное состояние.

Замедленная флуоресценция

Два излучательных процесса — флуоресценция и фосфоресценция — отличаются друг от друга, во-первых, длительностью испускания и, во-вторых, энергией уровня, с которого происходит испускание. Однако существует еще один вид испускания, который спектрально расположен в области флуоресценции, но имеет длительность, характерную для фосфоресценции. В отличие от обычной, быстрой флуоресценции ее называют замедленной флуоресценцией, поскольку, перед тем как испустить квант света, молекула некоторое время находится в триплетном состоянии. Механизм перехода из состояния T_1 в состояние S_1 может быть различным, и в зависимости от этого различают замедленную флуоресценцию типа Р и типа Е.

Замедленная флуоресценция типа Р возникает в результате взаимодействия между триплетными молекулами, одна из которых попадает в возбужденное состояние:



Существенными являются стадии (3.18) и (3.19), где при взаимодействии возбужденных триплетов одна молекула образуется в возбужденном состоянии S_1 , а другая переходит в основное состояние. Излучательный переход из состояния S_1 и приводит к возникновению замедленной флуоресценции. Хотя флуоресценция из S_1 (стадия 3.21) имеет ту же константу скорости k_f , что и быстрая флуоресценция, общая скорость затухания в этом случае меньше, так как процесс идет через реакции (3.18) и (3.19).

При низкой интенсивности возбуждающего света, когда $[T_1]$, а следовательно, и $[T_1]^2$ малы, использование метода стационарных концентраций позволяет получить для интенсивности замедленной флуоресценции (I_{df}) следующее выражение:

$$I_{df} = \frac{k_a k_x}{k_x + k_1} \left[\frac{k_{isc} I}{k_p (k_f + k_{isc})} \right]^2. \quad (3.22)$$

Кроме того,

$$k_{df} = \frac{-d(\ln I_{df})}{dt} = \frac{-d(\ln [T_1]^2)}{dt} = -2 \frac{d(\ln [T_1])}{dt}, \quad (3.23)$$

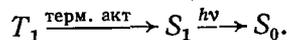
так что

$$k_{df} = 2k_p \text{ и } \tau_{df} = \frac{1}{2} \tau_p.$$

Интенсивность замедленного испускания пропорциональна квадрату интенсивности падающего света, а время жизни замедленной флуоресценции равно половине времени затухания фосфоресценции. Замедленная флуоресценция наблюдается для нафталина, антрацена, фенантрена. Кинетика затухания флуоресценции этих углеводородов состоит из двух компонент с одинаковыми спектрами испускания. Одна компонента имеет время жизни обычной флуоресценции, а время жизни второй компоненты равно примерно половине

времени жизни флуоресценции. Участие триплетных состояний в замедленной флуоресценции доказывается тем, что замедленную флуоресценцию можно индуцировать триплетными сенсибилизаторами. Механизм замедленной флуоресценции этого типа был установлен сначала для раствора пирена, поэтому ее называют замедленной флуоресценцией типа Р. Замедленная флуоресценция такого типа наблюдается в газах, растворах, твердых стеклах и даже кристаллах. В твердых стеклах и кристаллах диффузия триплетов затруднена или невозможна и в этом случае испускание, вероятно, обусловлено миграцией экситонов. При такой форме переноса энергии возбуждения «прыгает» от молекулы к молекуле. В конце концов взаимодействие двух соседних триплетов приводит к замедленному испусканию.

Замедленная флуоресценция типа Е возникает за счет термической активации триплетных молекул:



Поскольку замедленную флуоресценцию такого типа впервые наблюдали у эозина, ее называют замедленной флуоресценцией типа Е. Для замедленной флуоресценции этого типа характерны следующие особенности:

- 1) спектры испускания быстрой и замедленной флуоресценций совпадают;
- 2) $\tau_{df} = \tau_p$;
- 3) $I_{df} \approx I$ (интенсивность флуоресценции пропорциональна первой степени интенсивности поглощенного света);
- 4) отношение интенсивностей замедленной флуоресценции и фосфоресценции уменьшается экспоненциально с увеличением синглет-триплетного расщепления и понижения температуры.

При низких температурах замедленная флуоресценция этого типа отсутствует. Эти факты можно объяснить с помощью рис. 3.4. Триплетные молекулы образуются на нулевом колебательном подуровне в результате поглощения света молекулой в основном состоянии, последующей интеркомбинационной конверсии и колебательной релаксации. Термическая активация и последующая обратная интеркомбинационная конверсия ($T_1 \rightarrow S_1$) приводят к образованию возбуж-

денных синглетов, которые затем претерпевают излучательный переход в основное состояние:

$$I_p = k_p [T_1] \text{ и } I_{df} = \Phi_f k'_{isc} [T_1] e^{-\Delta E/RT},$$

где Φ_f — квантовая эффективность флуоресценции. Отсюда.

$$I_{df}/I_p = \frac{\Phi_f k'_{isc}}{k_p} e^{-\Delta E/RT}. \quad (3.24)$$

Экспериментально измеренная энергия активации ΔE соответствует синглет-триплетному расщеплению, получаемому из спектроскопических данных, а $k_{isc} \approx k'_{isc}$.

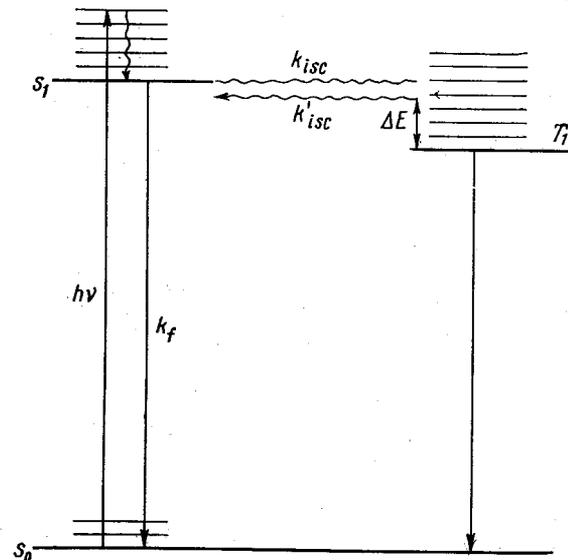


Рис. 3.4. Уровни энергии для случая термически активированной замедленной флуоресценции

Термически активированная замедленная флуоресценция в основном характерна для соединений (эозина, флуоресцеина, акрифлавина и профлавина), у которых синглет-триплетное расщепление мало (20—40 кДж/моль). Для ароматических углеводородов такой механизм замедленной флуоресценции не характерен вследствие большой величины $S-T$ -расщепления.

Явление замедленной флуоресценции служит мощным средством для исследования свойств триплетов, концентрация которых в растворах мала. Кроме того, с помощью измерения замедленной флуоресценции можно получать информацию о скоростях всех трех процессов интеркомбинационной конверсии, а также непосредственно наблюдать триплет-триплетное тушение.

Перенос энергии. Сенсибилизированная флуоресценция

Одной из разновидностей испускания является сенсибилизированная флуоресценция, которая наблюдается при переносе энергии между синглетными состояниями. Явление переноса энергии заключается в том, что молекула донора D^* переходит из возбужденного состояния в основное, одновременно передавая свою энергию молекуле акцептора A , которая при этом переходит в возбужденное состояние:



При переносе энергии наблюдается тушение флуоресценции донора D^* и появляется испускание акцептора A^* или происходят фотохимические реакции A^* . Хотя возбуждающий свет поглощается донором D , в возбужденном состоянии оказывается акцептор A . Процессы, в которых возбужденные молекулы образуются за счет переноса энергии, называются сенсибилизированными. Перенос энергии происходит эффективно, если энергия возбужденного состояния A^* меньше энергии D^* .

Перенос энергии может происходить по двум механизмам: 1) излучательному (реабсорбция) и 2) безизлучательному. Между обоими механизмами имеются два существенных различия. Безизлучательный перенос происходит перед процессом испускания молекулы донора и эффективен на ограниченном расстоянии. в то время как реабсорбция может происходить на больших расстояниях. Условия, благоприятствующие переносу энергии: а) большое перекрытие первой полосы поглощения акцептора с полосой испускания донора; б) высокий выход флуоресценции донора; в) большая эффективность поглощения света акцептором в полосе испускания донора. Роль донора и акцептора

могут играть молекулы одного и того же вещества при условии хорошего перекрытия его спектров поглощения и флуоресценции. В этом случае используется термин «миграция энергии».

Излучательный перенос энергии происходит при поглощении акцептором фотонов, испущенных донором:



Излучательный и безизлучательный механизмы переноса различают по зависимости времени жизни флуоресценции донора от концентрации акцептора. При излучательном переносе время жизни флуоресценции донора не изменяется или слегка возрастает, при безизлучательном переносе — уменьшается. Из-за кажущейся простоты излучательного переноса энергии его иногда называют «тривиальным». Скорость излучательного переноса v_{ri} в растворе можно представить следующим образом:

$$v_{ri} \simeq \frac{[A]l}{\Phi_D} \int_0^\infty F_D(\tilde{\nu}) \varepsilon_A(\tilde{\nu}) d\tilde{\nu}, \quad (3.26)$$

где l — расстояние, на котором происходит перенос энергии; $F_D(\tilde{\nu})$ — спектр испускания донора D ; $\varepsilon_A(\tilde{\nu})$ — спектр поглощения акцептора A , изображенные в шкале волновых чисел.

Рассмотрим более подробно механизм безизлучательного переноса. Возможны два типа переноса: 1) перенос между молекулами происходит на расстоянии, значительно превышающем их диаметры столкновения; 2) перенос происходит только при непосредственном контакте молекул, т. е. расстояние между центрами молекул равно сумме их молекулярных радиусов.

Скорость переноса энергии по первому механизму не лимитируется диффузией и не зависит от вязкости даже при переходе от жидких растворов к твердым. Для тушения по этому механизму не требуется диффузии или непосредственной встречи молекул за время жизни возбужденного состояния (рис. 3.5). Этот тип переноса называют резонансным.

Скорость переноса по второму механизму определяется диффузией молекул в растворе и должна умень-

шаться при уменьшении скорости диффузии, например при увеличении вязкости среды.

При объяснении резонансного механизма безызлучательного переноса энергии используют два подхода. При классическом подходе электронные системы молекул D^* и A рассматривают как осцилляторы, спо-

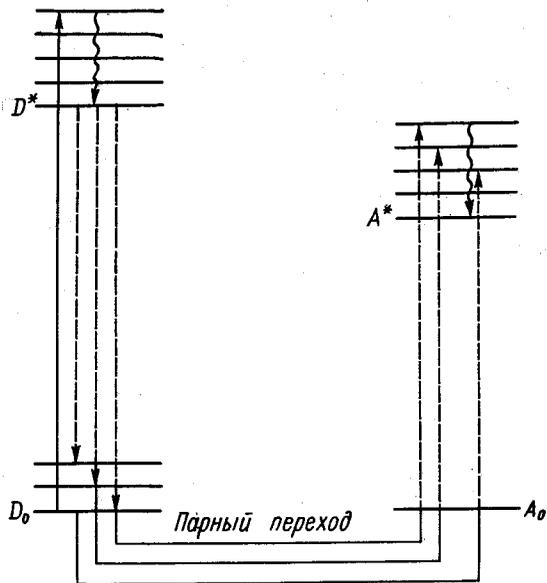


Рис. 3.5. Схема электронных уровней молекул, иллюстрирующая перенос энергии между возбужденным донором (D^*) и акцептором (A)

собные колебаться с общей частотой ν . Осциллирующие электрические заряды молекул D^* и A взаимодействуют друг с другом как два диполя. Энергия взаимодействия двух диполей обратно пропорциональна третьей степени расстояния между их центрами. При сближении молекул A и D^* существует определенная вероятность того, что до испускания фотона молекула D^* передаст свою энергию возбуждения молекуле A . Происходит своего рода индукция, отсюда такой механизм переноса иногда называют индуктивно-резонансным. С квантовомеханической точки зрения резонансный механизм переноса энергии — это слабое межмолекулярное диполь-дипольное взаимодействие на

больших расстояниях между молекулами D^* и A . Вероятность переноса в этом случае выражается так:

$$P_{D^* \rightarrow A^*} = \rho \left| \int \Psi_{D^*} \Psi_A \mathcal{H}' \Psi_D \Psi_{A^*} d\tau \right|^2, \quad (3.27)$$

где $\Psi_{D^*} \Psi_A$ и $\Psi_D \Psi_{A^*}$ — волновые функции соответственно начального и конечного состояний системы; ρ — плотность взаимодействующих состояний; \mathcal{H}' — гамильтониан диполь-дипольного взаимодействия между начальным и конечным состояниями. Если энергии возбужденных состояний молекул A и D одинаковы, то два состояния, описываемые волновыми функциями $\Psi_{D^*} \Psi_A$ и $\Psi_D \Psi_{A^*}$, являются вырожденными. Имеется определенная вероятность того, что энергия от одного из вырожденных состояний перейдет к другому. Подобное взаимодействие происходит между моментами перехода, которые также определяют свойства поглощения и испускания индивидуальных молекул. Это взаимодействие является наибольшим, если соответствующие дипольные переходы в молекуле D^* при испускании и в молекуле A при поглощении разрешены, т. е. в случае синглет-синглетных переходов. Константа скорости переноса энергии по диполь-дипольному механизму выражается следующим уравнением:

$$k_{D^* \rightarrow A^*} = 1,25 \cdot 10^{17} \frac{\Phi_D}{n^4 \tau_D R^6} \int_0^\infty F_D(\tilde{\nu}) \epsilon_A(\tilde{\nu}) \frac{d\tilde{\nu}}{\tilde{\nu}^4}, \quad (3.28)$$

где $\tilde{\nu}$ — волновое число; ϵ_A — молярный коэффициент экстинкции акцептора; $F_D(\tilde{\nu})$ — спектр испускания донора в шкале волновых чисел, нормированный на единицу (т. е. $\int_0^\infty F_D(\tilde{\nu}) d\tilde{\nu} = 1$); Φ_D — квантовый выход флуоресценции донора; τ_D — время затухания флуоресценции; n — показатель преломления растворителя; R — расстояние между D и A , выраженное в нанометрах.

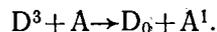
Эффективность межмолекулярного диполь-дипольного переноса характеризуют критическим расстоянием — расстоянием между донором и акцептором, на котором вероятность переноса равна вероятности спонтанной дезактивации. Это расстояние рассчитывают по

формуле Ферстера:

$$R_0^6 = 1,25 \cdot 10^{17} \frac{\varphi_D}{n^4} \int_0^{\infty} F_D(\tilde{\nu}) \varepsilon_A(\tilde{\nu}) \frac{d\tilde{\nu}}{\tilde{\nu}^4}. \quad (3.29)$$

Все обозначения аналогичны обозначениям формулы (3.28).

Расчетные расстояния находятся в пределах 50—100 Å, что значительно превышает диаметр соударения. Это свидетельствует о том, что перенос энергии не является диффузионным процессом. Процессы переноса энергии необходимо учитывать при изучении тушения флуоресценции. Если эффективность флуоресценции донора высока, а положение полосы поглощения тушителя благоприятствует переносу энергии, то, чтобы можно было пренебречь его влиянием на интенсивность флуоресценции, необходимо снизить концентрацию тушителя до 10^{-4} моль/л или меньше. По резонансному механизму осуществляется синглет-синглетный перенос энергии. Для некоторых систем обнаружен резонансный перенос энергии между триплетным состоянием донора и синглетным состоянием акцептора:



Хотя скорость триплет-синглетного переноса энергии незначительна (поскольку он запрещен по спину), при определенных условиях процесс переноса возбуждения от долгоживущего триплетного донора на синглетный уровень акцептора может конкурировать с другими процессами дезактивации триплетного состояния донора. Этот запрещенный процесс начинает играть существенную роль только тогда, когда остальные конкурирующие процессы дезактивации возбужденного состояния также запрещены. Из уравнения (3.28) видно, что если разрешен переход в молекуле А, то, несмотря на запрещение перехода в молекуле D*, резонансный перенос энергии может происходить с большой вероятностью, поскольку большее время жизни компенсирует малую скорость переноса. Другая ситуация получается, если запрещен поглощательный переход в молекуле А, но разрешен излучательный переход в молекуле D* (синглет-триплетный перенос). В этом случае перенос энергии по резонанс-

ному механизму невозможен из-за малого времени жизни молекулы D* и малой скорости переноса возбуждения.

Второй тип безызлучательного переноса энергии осуществляется при непосредственном контакте взаимодействующих молекул, когда электронные оболочки находящихся рядом молекул D* и А перекрываются. При перекрывании электронных оболочек электроны становятся неразличимыми, и «возбужденный» электрон молекулы D* может оказаться в молекуле А, а «невозбужденный» электрон переходит от А к D. Происходит своего рода обмен электронами, поэтому этот тип переноса возбуждения называется обменным. При описании обменного переноса энергии в уравнении (3.27) оператор возмущения H включает члены, характеризующие электронное обменное взаимодействие. Константа скорости переноса энергии по обменному механизму выражается соотношением:

$$k_{D^* \rightarrow A^*} \sim e^{-2k/L} \int_0^{\infty} F_D(\tilde{\nu}) \varepsilon_A(\tilde{\nu}) d\tilde{\nu}, \quad (3.30)$$

где R — расстояние между донором D* и акцептором А; L — величина, пропорциональная обменному интегралу (уравнение (3.27)); $F_D(\tilde{\nu})$ и $\varepsilon_A(\tilde{\nu})$ — нормированные на единицу спектры испускания донора и поглощения акцептора. Величина $k_{D^* \rightarrow A^*}$ не зависит от силы осцилляторов обоих переходов (в противоположность диполь-дипольному взаимодействию). Поскольку в уравнение (3.30) входит экспоненциальный член, можно сделать вывод, что перенос энергии по обменному механизму происходит на небольших расстояниях — 10—15 Å. Перенос энергии по обменному механизму можно представить схемой:



Если предположить образование бимолекулярного промежуточного продукта, который может быть либо эксиплексом, либо комплексом столкновения, перенос энергии должен подчиняться правилу сохранения спина Вигнера, которое гласит: если при столкновении двух реагирующих частиц А и В со спинами S_A и S_B образуются продукты X и Y со спинами S_X и S_Y , то спин переходного состояния или комплекса столкновения может принимать только одно из следующих зна-

чений:

$$(S_A + S_B), (S_A + S_B - 1), (S_A + S_B - 2) \dots |S_A - S_B|,$$

а переходное состояние, приводящее к образованию продуктов, должно иметь только одно из следующих значений спина:

$$(S_X + S_Y), (S_X + S_Y - 1), (S_X + S_Y - 2) \dots |S_X - S_Y|.$$

Поэтому, чтобы данный процесс был разрешен по спину, эти две последовательности должны иметь общий член. По обменному механизму могут происходить синглет-синглетный и триплет-триплетный переносы энергии. Как и синглет-синглетный перенос энергии, триплет-триплетный перенос широко распространен. При переносе энергии от триплета к триплету наблюдается сенсibilизированная фосфоресценция. Этот вид переноса используют для заселения триплетных уровней акцепторов, которые трудно заселить другим путем, а также для обнаружения триплетных состояний некоторых соединений, имеющих малый выход фосфоресценции.

Исходя из спинового запрета возможны следующие типы переноса энергии по индуктивно-резонансному и обменному механизмам:

Тип переноса	Вид переноса	Разрешение по спину	
		индуктивно-резонансный	обменный
$S^* \rightarrow S$	синглет-синглетный	+	+
$S \rightarrow S^*$	синглет-триплетный	+	-
$T \rightarrow S$	триплет-синглетный	-	+
$T \rightarrow T$	триплет-триплетный	-	-

Поляризация флуоресценции

Важной характеристикой фотолюминесценции является поляризация люминесценции. Каждую молекулу можно рассматривать как колебательный контур — элементарный осциллятор, который способен поглощать и испускать излучение не только вполне определенной частоты, но и с определенной плоскостью ко-

лебания. Если на вещество действует поляризованный свет, он преимущественно возбуждает молекулы, в которых направление колебания осциллирующих дипола совпадает с направлением электрического вектора возбуждающего светового пучка. Поэтому, несмотря на то что молекулы в растворе ориентированы хаотично, возбуждению подвергаются лишь те из них, которые обладают соответствующей ориентацией. Если время жизни возбужденного состояния велико по сравнению со временем, необходимым для дезориентации молекул вследствие вращения, этот процесс дезориентации происходит еще до появления заметной флуоресценции. Если же скорость вращательного движения мала по сравнению со скоростью излучательного процесса, свет флуоресценции испускается до завершения дезориентации. При этом осцилляторы, ответственные за флуоресцентное излучение, ориентированы в той же плоскости, в которой они были ориентированы в момент поглощения, так что флуоресцентное излучение оказывается частично поляризованным. В очень вязких растворителях даже малые молекулы могут сохранять ориентацию за время испускания флуоресценции. Крупные молекулы, такие, как белки, сохраняют свою ориентацию в течение периода времени, достаточно большого по сравнению со временем испускания флуоресценции, поэтому их флуоресценция частично поляризована. Степень поляризации флуоресценции определяется по формуле:

$$P = \frac{(F_{\parallel} - F_{\perp})}{(F_{\parallel} + F_{\perp})}, \quad (3.32)$$

где F_{\parallel} — интенсивность флуоресценции, измеренная при помощи двух поляризующих устройств (одно в пучке возбуждающего, другое в пучке испускаемого света) с параллельной ориентацией плоскости поляризации; F_{\perp} — интенсивность флуоресценции, измеренная при помощи этих устройств с перпендикулярной ориентацией плоскости поляризации.

Поляризационные измерения используются для определения времени вращательной релаксации, размеров больших молекул, времени флуоресценции и переноса энергии синглетного возбуждения между молекулами в растворе.

Скорости переходов

При изучении фотолюминесценции необходимо знать временные характеристики излучательных и конкурирующих с ними безызлучательных процессов дезактивации возбужденных состояний. Для излучательных процессов характерны следующие временные интервалы. Поглощение и испускание фотонов происходит за время порядка одного колебания световой волны, т. е. около 10^{-15} с. Значения времени жизни нижнего возбужденного синглетного состояния лежат в пределах от 10^{-11} с (для π^* - π -переходов) до 10^{-6} с (для π^* - n -переходов). Время фосфоресцентных состояний находится в пределах от 10^{-3} до 10^2 с. Безызлучательные переходы из верхних возбужденных состояний происходят за время порядка 10^{-12} с. Скорость внутренней конверсии с нижнего возбужденного синглета в основное состояние часто сравнима со скоростью флуоресценции. Интеркомбинационная конверсия из нижнего синглетного состояния протекает за время порядка излучательного времени флуоресценции. Интеркомбинационные переходы из триплета в основной синглет происходят сравнительно медленно (10^{-4} — 10^2 с в зависимости от условий).

Процессы испускания света и внутримолекулярные безызлучательные процессы являются процессами первого порядка с константами скорости, обратными времени жизни. Значения времени жизни нижнего возбужденного синглетного состояния и нижнего триплетного состояния достаточно велики, чтобы при встрече с другими молекулами произошла химическая реакция или дезактивация (тушение люминесценции). Эти процессы имеют второй порядок, однако поскольку концентрация тушащего вещества во много раз выше концентрации возбужденных молекул, их характеризуют константой скорости первого порядка $k_q[Q]$, где k_q — бимолекулярная константа скорости, а $[Q]$ — концентрация тушащих молекул. С внутренней конверсией из верхних состояний конкурируют лишь очень быстрые химические превращения этих состояний.

В энергию люминесценции превращается не вся поглощенная энергия возбуждающего света. Эффективность процесса преобразования возбуждающей энергии в энергию люминесценции характеризуется выходом люминесценции. Энергетическим выходом люминесценции называется отношение энергии, испускаемой в виде люминесценции, к поглощенной энергии $\xi = E/A$, где ξ — энергетический выход; E — энергия люминесценции; A — поглощенная энергия возбуждения. Квантовым выходом люминесценции называется отношение числа испускаемых при люминесценции квантов к числу поглощенных квантов возбуждающего света: $\varphi = n_l/n_a$. Выход флуоресценции или ее эффективность иногда определяют как отношение скорости испускания флуоресценции к скорости поглощения света.

Рассмотрим следующую схему (3.33):

Процесс	Скорость
1. Возбуждение $A + hv \rightarrow A^*$	I_a
2. Испускание флуоресценции $A^* \xrightarrow{k_f} A + hv'$	$k_f [A^*]$
3. Внутренняя конверсия $A^* \xrightarrow{k_{ic}} A$	$k_{ic} [A^*]$
4. Интеркомбинационная конверсия $A^* \xrightarrow{k_{isc}} A^T$	$k_{isc} [A^*]$
5. Тушение флуоресценции $A^* + Q \xrightarrow{k_q} B + Q'$	$k_q [A^*] [Q]$
6. $A^* + Q \xrightarrow{k_q} B^* + Q'$	
7. $A^* + A \rightarrow A_2$ или	AA^*

Тушение по уравнению (5) в этой схеме — это так называемое неадиабатическое тушение, поскольку в результате взаимодействия возбужденной молекулы A^* с молекулой тушителя образуется невозбужденная молекула В. Уравнение (6) описывает адиабатическое тушение, поскольку в результате взаимодействия возбужденной молекулы A^* с тушителем Q образуется возбужденная молекула B^* . Если в качестве тушителя выступает невозбужденная молекула А, то говорят

о концентрационном тушении флуоресценции, в результате которого получается либо невозбужденный димер A_2 , либо возбужденный димер AA^* — эксимер. Вообще процессы тушения довольно разнообразны. Сюда относятся процессы тушения при фотохимических реакциях, концентрационное тушение, тушение тяжелыми атомами, тушение за счет переноса энергии и т. д.

Предположим, что жидкий раствор облучается пучком света постоянной интенсивности. Если оптическая плотность достаточно мала, скорость поглощения света I_a будет постоянной по всему объему. За время, существенно большее времени жизни флуоресценции, устанавливается стационарное состояние, в котором скорость образования синглетных возбужденных молекул уравнивается скоростью их исчезновения. Если в высших синглетных возбужденных состояниях не происходит ни фотохимических реакций, ни интеркомбинационной конверсии, скорость образования A^* равна скорости поглощения света и можно записать:

$$I_a = (k_f + k_{ic} + k_{isc} + k_q [Q]) [A^*]. \quad (3.34)$$

Полная скорость испускания флуоресценции равна $k_f [A^*]$:

$$k_f [A^*] = I_a \Phi_f = (k_f + k_{ic} + k_{isc} + k_q [Q]) [A^*] \Phi_f. \quad (3.35)$$

Следовательно, эффективность флуоресценции Φ_f равна:

$$\Phi_f = k_f / (k_f + k_{ic} + k_{isc} + k_q [Q]). \quad (3.36)$$

Если выключить возбуждающий свет, флуоресценция затухает по экспоненциальному закону со временем жизни τ . Время жизни возбужденного состояния определяется как время, за которое первоначальное количество возбужденных состояний уменьшается в e раз. Поскольку

$$I = I_0 e^{-kt} = I_0 e^{-t/\tau}, \quad (3.37)$$

где I — интенсивность флуоресценции через время t ; I_0 — первоначальная интенсивность флуоресценции; $k = 1/\tau$, при $t = \tau$

$$I = \frac{I_0}{e} = 0,37 I_0. \quad (3.38)$$

Время жизни τ выражается также уравнением:

$$\tau = 1 / (k_f + k_{ic} + k_{isc} + k_q [Q]). \quad (3.39)$$

Это так называемое истинное время жизни, $\Phi_f = k_f \tau$. Радиационное время жизни τ_r возбужденного состояния — время жизни этого состояния в отсутствие любых безызлучательных процессов дезактивации:

$$\tau_r = \frac{1}{k_f}; \quad \Phi_f = \frac{\tau}{\tau_r}. \quad (3.40)$$

Тушение флуоресценции

Установим связь между квантовым выходом флуоресценции и концентрацией тушителя. В отсутствие тушителя

$$\Phi_f^0 = k_f / (k_f + k_{ic} + k_{isc}). \quad (3.41)$$

Учитывая (3.36), получим

$$\frac{\Phi_f^0}{\Phi_f} = 1 + \frac{k_q [Q]}{(k_f + k_{ic} + k_{isc})} = 1 + K_q [Q]. \quad (3.42)$$

Если τ_0 — истинное время жизни в отсутствие тушителя

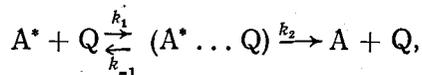
$$1/\tau_0 = k_f + k_{ic} + k_{isc}; \quad (\Phi_f^0 / \Phi_f) - 1 = k_q \tau_0 [Q] = K_q [Q]. \quad (3.43)$$

Интенсивность флуоресценции I пропорциональна квантовому выходу флуоресценции. Следовательно, отношение интенсивности флуоресценции в отсутствие добавленного тушителя I_0 к интенсивности флуоресценции I при данной концентрации тушителя равно отношению квантовых выходов флуоресценции, если форма спектра флуоресценции при тушении сохраняется:

$$I_0 / I = \Phi_0 / \Phi = 1 + K_q [Q] = 1 + k_q \tau_0 [Q]. \quad (3.44)$$

Соотношение (3.44) называется уравнением Штерна — Фольмера. Оно позволяет определить константу скорости реакции тушения k_q по изменению относительной интенсивности флуоресценции I/I_0 в зависимости от концентрации тушителя. Абсолютные значения интенсивности флуоресценции не требуются, что значительно упрощает измерения.

При выводе уравнения Штерна—Фольмера предполагалось, что каждое столкновение приводит к тушению флуоресценции. Однако образование возбужденного комплекса столкновения может происходить обратимым путем. Тогда схема выглядит следующим образом:

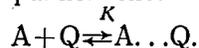


где k_1 — константа скорости контролируемого диффузией образования возбужденного комплекса $A^* \dots Q$; k_{-1} — константа скорости обратной реакции; k_2 — константа скорости реакции образования продукта. Уравнение Штерна—Фольмера в этом случае имеет вид:

$$\frac{\Phi_0}{\Phi} = 1 + \frac{k_1 k_2}{k_2 + k_{-1}} \tau_0 [Q]. \quad (3.45)$$

Рассмотренное тушение происходит в результате реакции в возбужденном состоянии и называется поэтому динамическим тушением.

Тушение флуоресценции может происходить также в результате образования в основном состоянии нефлуоресцирующего комплекса $A \dots Q$ (статическое тушение). При статическом тушении в основном состоянии устанавливается равновесие:



Тогда концентрация свободных молекул A будет равна:

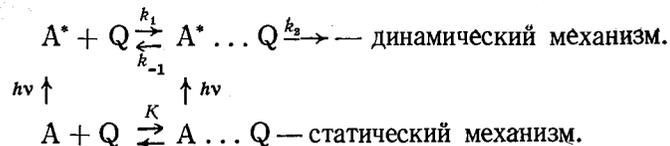
$$[A] = [A_0] / (1 + K[Q]), \quad (3.46)$$

где $[A_0]$ — исходная концентрация A ; K — константа равновесия. Если комплексы $A \dots Q$ не флуоресцируют, а их спектр поглощения близок к спектру поглощения A , возбуждающий свет будет поглощаться как свободными, так и связанными в комплекс молекулами A , а флуоресцировать будут лишь свободные молекулы A . Для квантового выхода флуоресценции в этом случае нетрудно получить выражение:

$$\Phi_0 / \Phi = 1 + K[Q]. \quad (3.47)$$

При тушении флуоресценции по динамическому и статическому пути общая схема выглядит следующим

образом:



Уравнение для этой схемы имеет вид:

$$\frac{\Phi_0}{\Phi} = (1 + K[Q]) \left(1 + \frac{k_1 k_2}{k_2 + k_{-1}} \tau_0 [Q] \right). \quad (3.48)$$

Иногда необходимо отделить динамический механизм тушения от статического. Для этого исследуют зависимость времени жизни возбужденных молекул от концентрации тушителя. Уменьшение времени жизни возбужденных молекул при увеличении концентрации тушителя свидетельствует о динамическом механизме тушения, а независимость времени жизни от концентрации тушителя указывает на преобладание статического механизма тушения. Количественно статический и динамический механизмы разделяют, сопоставляя зависимость относительного квантового выхода флуоресценции Φ_0/Φ и относительного значения времени жизни возбужденных молекул τ_0/τ от концентрации тушителя:

$$\tau_0/\tau = 1 + k\tau_0[Q]; \quad \Phi_0\tau/\Phi\tau_0 = 1 + K[Q]. \quad (3.49)$$

Используя зависимости (3.49), можно определить константы тушения флуоресценции по статическому и динамическому механизмам. Для статического механизма константа тушения представляет собой константу равновесия образования комплекса в основном состоянии.

В твердых растворах тушение флуоресценции в ряде случаев описывается уравнением Перрена:

$$\frac{\Phi_0}{\Phi} = e^{NV[Q]}, \quad (3.50)$$

где Φ_0 и Φ — квантовый выход флуоресценции флуорофора в отсутствие и в присутствии тушителя Q соответственно; $V = \frac{4}{3} \pi R^3$ (R — радиус сферы тушения, который зависит от размеров взаимодействующих молекул, но не от их концентрации в растворе). Этот ме-

ханизм предполагает, что тушение возбужденной молекулы происходит в объеме V . Как только молекула Q попадает в этот объем, происходит мгновенное тушение возбужденной молекулы. Из приведенного уравнения видно, что вероятность такого тушения очень быстро уменьшается с увеличением расстояния между взаимодействующими молекулами. Молекулы Q , находящиеся вне объема V , не взаимодействуют с возбужденными молекулами.

Если возбужденные состояния системы первоначально заселяются при случайном распределении взаимодействующих молекул, некоторые пары молекул окажутся расположенными близко друг к другу и быстро прореагируют. Следовательно, вначале измеряемая константа скорости тушения будет высокой, а затем станет снижаться по мере того, как будут расходоваться такие тесно расположенные пары. Наконец, установится стационарное состояние, в котором скорость реакции будет уравниваться скоростью диффузии реагирующих частиц друг к другу. Диффузионная константа скорости соответствует именно такому стационарному состоянию. Уравнение для тушения в этом случае имеет вид:

$$\varphi_0/\varphi = (1 + \gamma k_1 \tau_0 [Q]) / W, \quad (3.51)$$

где γ — вероятность реакции тушения за время жизни возбужденного комплекса; k_1 — константа скорости образования возбужденного комплекса столкновения; τ_0 — истинное время жизни возбужденных молекул флуорофора в отсутствие тушителя; $[Q]$ — концентрация тушителя; W — доля возбужденных молекул, не прореагировавших непосредственно после возбуждения.

Поскольку диффузия оказывает влияние на бимолекулярные процессы тушения в растворах, важно иметь надежный метод оценки величины k_{dif} . В ряде случаев скорость процессов тушения определяется исключительно скоростью, с которой реагенты могут диффундировать друг к другу. Бимолекулярная константа скорости такого процесса, контролируемого диффузией, зависит только от температуры и вязкости растворителя и определяется по уравнению:

$$k_{dif} = \frac{8RT}{3000\eta}. \quad (3.52)$$

где R — универсальная газовая постоянная, равная $8,31 \cdot 10^7$, эрг/град моль; T — температура; η — вязкость в пуазах.

Зависимость флуоресценции от температуры

Эффективность флуоресценции φ_f определяется конкуренцией излучательного процесса k_f и безызлучательных процессов интеркомбинационной k_{isc} и внутрениней k_{ic} конверсии. Скорость излучательного процесса не зависит от температуры, поэтому изменения φ_f с температурой связаны с изменением k_{isc} и k_{ic} . Поскольку с увеличением температуры на верхние колебательные подуровни состояния S_1 попадает все большая часть молекул и вероятность перехода через области пересечения потенциальных поверхностей возбужденного синглетного, триплетного и основного состояний возрастает, то k_{isc} и k_{ic} увеличиваются с ростом температуры. При понижении температуры обе константы скорости стремятся к предельным значениям, соответствующим интеркомбинационной или внутрениней конверсии с самого нижнего колебательного подуровня S_1 . Если при комнатной температуре вещество флуоресцирует слабо, при низкой температуре оно может стать сильно флуоресцирующим. Ввиду большого разнообразия безызлучательных процессов трактовка зависимости квантового выхода флуоресценции от температуры обычно затруднена. Наряду с вышеуказанными процессами это могут быть взаимодействия типа переноса заряда с растворителем, заселение высоколежащих триплетных состояний, специфическое электронно-колебательное взаимодействие и т. д. Зависимость квантового выхода флуоресценции от температуры можно представить уравнением:

$$(1/\varphi_f) - 1 = k_1 \exp(-E/RT) + k_2, \quad (3.53)$$

где k_1 — предэкспоненциальный множитель; k_2 — независимая от температуры константа.

В присутствии тушителя становится существенным влияние температуры на вязкость растворителя, а следовательно, и на скорость встреч флуоресцирующих молекул с молекулами тушителя. В результате этого влияния эффективность флуоресценции уменьшается с ростом температуры; с другой стороны, при понижении

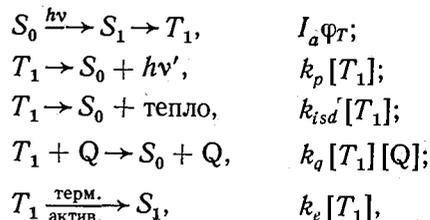
температуры увеличивается образование комплексов в основном состоянии, что ведет к тушению флуоресценции по статическому механизму. Все эти эффекты необходимо учитывать при изучении влияния температуры на флуоресценцию конкретной системы.

Эффективность и время затухания фосфоресценции

Фосфоресценция — это излучательный переход с триплетного уровня T_1 на синглетный S_0 . Фосфоресценция наблюдается в основном в твердой фазе, когда процессы диффузионного тушения триплетов замедленны. Эффективность фосфоресценции в первую очередь определяется концентрацией триплетных молекул. Эффективность образования триплетов Φ_f — это число триплетных молекул, образующихся на один поглощенный квант возбуждающего света. Если пренебречь фотохимическими реакциями и интеркомбинационной конверсией из высших синглетных состояний, скорость заселения нижнего возбужденного синглетного состояния S_1 равна скорости поглощения света I_a , а скорость образования триплетных молекул равна $I_a \Phi_T$. По методу стационарных концентраций нетрудно определить выход триплетов:

$$\Phi_T = k_{isc} / (k_f + k_{ic} + k_{isc} + k_q [Q]). \quad (3.54)$$

При низких интенсивностях возбуждающего света происходят следующие процессы с участием триплетных молекул:



где $[Q]$ — концентрация всех тушащих примесей; $k_e [T_1]$ — скорость термической активации триплетных молекул обратно в возбужденное синглетное состояние. В стационарном состоянии

$$I_a \Phi_T = (k_p + k_{isd} + k_q [Q] + k_e) [T_1]. \quad (3.55)$$

Скорость испускания фосфоресценции равна $k_p [T_1]$. Эффективность фосфоресценции определяется выражением:

$$\Phi_p = \frac{k_p [T_1]}{I_a} = \frac{k_p \Phi_T}{(k_p + k_{isd} + k_q [Q] + k_e)}. \quad (3.56)$$

Излучательное время жизни триплетной молекулы равно:

$$\tau_p = \frac{1}{k_p}.$$

Истинное время жизни триплетной молекулы τ определяется уравнением:

$$\frac{1}{\tau} = k_p + k_{isd} + k_q [Q] + k_e.$$

Поэтому

$$\frac{\Phi_p}{\Phi_T} = \frac{\tau}{\tau_p}. \quad (3.57)$$

При низкой температуре в жесткой среде константой k_e и членом $k_q [Q]$ можно пренебречь, поэтому для низкой температуры и жесткой среды справедливо уравнение:

$$\Phi_p / \Phi_T = k_p / (k_p + k_{isd}). \quad (3.58)$$

Время жизни τ_p (или константа скорости k_p) не зависит от температуры. В противоположность флуоресценции эффективность фосфоресценции уменьшается на несколько порядков в интервале от 77 К до комнатной температуры и чрезвычайно сильно зависит от вязкости растворителя. Причиной резкого падения эффективности и времени жизни фосфоресценции может быть увеличение скорости безызлучательной конверсии k_{isd} и скорости тушения триплетного состояния примесями $k_q [Q]$, но пока не ясно, которая из этих причин является главной.

§ 3. ИЗМЕРЕНИЕ ЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ

Общая схема спектрофлуориметра

Люминесцентные исследования основаны на измерении спектров люминесценции. На рис. 3.6 приведена принципиальная схема установки для измерения лю-

минесценции. В качестве источника возбуждения целесообразно использовать источник света с непрерывным спектром испускания (например, ксеноновую лампу ДКСШ-200). Однако в сочетании со светофильтрами могут применяться также источники света с ли-

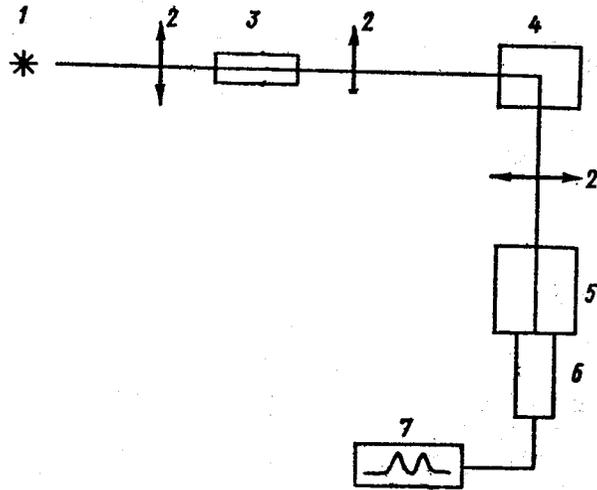


Рис. 3.6. Схема установки для измерения люминесценции: 1 — источник облучения; 2 — линзы; 3 — монохроматор возбуждения; 4 — кювета с исследуемым веществом; 5 — монохроматор испускаемого света; 6 — фотоумножитель, 7 — записывающее устройство

нейчатыми спектрами испускания (например, ртутные лампы ДРШ).

Люминесценцию можно измерять при различных геометрическом расположении пучка возбуждающего света и направлении наблюдения флуоресценции по отношению к образцу. В настоящее время используют в основном три типа освещения и регистрации (рис. 3.7). Расположение освещения и регистрации зависит от типа изучаемого образца и целей исследования. Грубо все образцы можно разделить на три типа: а) разбавленные растворы или газы, для которых поглощение возбуждающего света мало для всех исследуемых длин волн; стеклообразные замороженные растворы; б) концентрированные растворы; в) непрозрачные твердые тела и кристаллические или заморо-

женные при низкой температуре растрескавшиеся растворы, непрозрачные жидкие растворы.

Для образцов типа «в» лучше всего использовать фронтальное облучение. Для слабопоглощающих жидких растворов и стеклообразных твердых растворов наиболее удобно освещение под прямым углом для

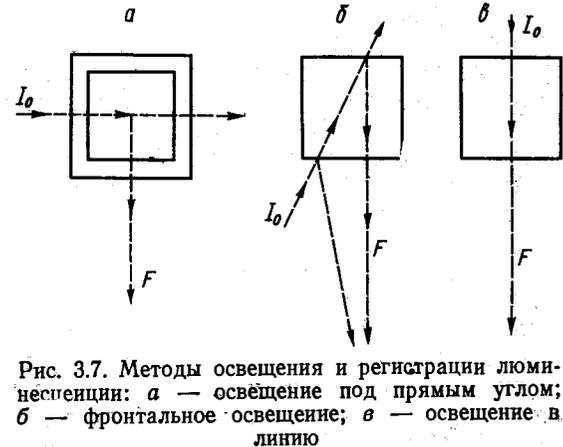


Рис. 3.7. Методы освещения и регистрации люминесценции: а — освещение под прямым углом; б — фронтальное освещение; в — освещение в линию

уменьшения доли рассеянного возбуждающего света. Выбор расположения для умеренно поглощающих растворов определяется целью исследования и величиной эффектов самопоглощения. При измерении сильно поглощающих растворов используют фронтальное расположение и расположение в линию, во всех опытах с сильнопоглощающими растворами необходимо учитывать искажение и ошибки за счет самопоглощения, следует измерять и принимать во внимание спектр поглощения раствора при выборе длины волны возбуждения и при интерпретации наблюдаемой флуоресценции.

Фильтры и монохроматоры

Светофильтры, используемые для выделения необходимой спектральной области источника света, так называемые первичные фильтры, не должны пропускать свет в области, где измеряется люминесценция, и, наоборот, пропускать как можно больше света в области поглощения объекта. Длинноволновая грани-

ца пропускания светофильтров должна быть несколько смещена в коротковолновую сторону по сравнению с самым длинноволновым максимумом поглощения. Светофильтры, используемые для выделения флуоресценции, так называемые вторичные фильтры, должны отсекают весь рассеянный возбуждающий свет и пропускать весь свет флуоресценции. В качестве первичных и вторичных светофильтров используются стеклянные светофильтры из цветного стекла. В качестве вторичных светофильтров могут использоваться клееные стеклянные и интерференционные светофильтры.

В современных спектральных приборах для выделения соответствующих полос возбуждающего света флуоресценции используются монохроматоры. В этих спектральных приборах требуемый спектральный интервал выделяется при помощи щелей, линз и зеркал, а диспергирующими элементами служат призмы или дифракционные решетки. Большую роль при измерении спектра люминесценции играют размеры щелей для возбуждающего света и света люминесценции. Щель для возбуждающего света подбирается достаточно большой (1—2 мм), чтобы получить существенную интенсивность люминесценции. При подборе щели для света люминесценции используют соотношение между геометрической (S , мм) и спектральной шириной щели ($\Delta\lambda$, нм):

$$\Delta\lambda = S/D_l,$$

где D_l — линейная дисперсия прибора, постоянная для данного прибора. При определении формы полосы люминесценции спектральная ширина щели должна быть в 5—7 раз меньше полуширины измеряемой спектральной полосы. Обычно $\Delta\lambda$ достигает 5—10 нм. Для исследования структуры спектра и определения точного положения максимума $\Delta\lambda$ должна быть уменьшена до 1—2 нм (а иногда и до нескольких десятых нанометра).

Регистрация света люминесценции

После прохождения через монохроматор слабый свет люминесценции должен быть преобразован в электрический сигнал. Для этого в современных приборах используют фотоумножители. При измерении

спектра люминесценции на записывающем устройстве получают кривые зависимости тока фотоумножителя от длины волны света люминесценции, попадающего на фотоумножитель. Величина тока, получаемого в фотоумножителе, пропорциональна интенсивности люминесценции. Поэтому показания регистрирующего устройства воспринимаются как интенсивность люминесценции для данной длины волны. График зависимости интенсивности флуоресценции от длины волны и представляет собой спектр флуоресценции данного вещества. При строгих количественных измерениях спектры флуоресценции изображают одним из трех способов: 1) по оси ординат откладывают число квантов, испускаемых за секунду в расчете на единичный интервал длин волн при данной длине волны ($dQ/d\lambda$), а по оси абсцисс — длину волны; 2) по оси ординат откладывают число квантов, испускаемых за секунду в расчете на единичный интервал частот при данной частоте ($dQ/d\nu$), а по оси абсцисс — частоту; 3) по оси ординат откладывают энергию, испускаемую за секунду в единичном интервале длин волн ($dE/d\lambda$), а по оси абсцисс — длину волны. При первых двух способах площадь под кривой пропорциональна полной скорости испускания флуоресценции всех длин волн, измеряемой в единицах, пропорциональных числу квантов за единицу времени. При третьем способе площадь под кривой дает полную энергию, испускаемую за единицу времени.

Форма спектра флуоресценции не зависит от длины волны возбуждающего света, поскольку испускание практически всегда происходит с нижнего колебательного подуровня возбужденного состояния. Если вид спектра флуоресценции меняется с изменением длины волны возбуждающего света, это может быть следствием того, что в смеси содержится несколько флуоресцирующих компонентов. Для слабопоглощающих растворов ($D \leq 0,1$) скорость испускания флуоресценции $Q = I_0 \cdot 2,3 \epsilon c l \phi_f$, т. е. для разбавленных растворов интенсивность флуоресценции пропорциональна произведению концентрации вещества на интенсивность возбуждающего света. Используя очень высокие интенсивности возбуждающего света (I_0), можно определить достаточно низкие концентрации флуоресцирующего вещества (до 10^{-10} М).

Интенсивность флуоресценции однокомпонентного раствора постоянной концентрации пропорциональна величине $I_0\epsilon_f$. Поэтому, если интенсивность возбуждающего света (I_0) остается постоянной при изменении длины волны возбуждения, интенсивность флуоресценции будет пропорциональна произведению ϵ_f . График зависимости ϵ_f от длины волны или частоты возбуждающего света называется истинным спектром возбуждения флуоресценции. Для большинства веществ в растворах квантовый выход флуоресценции (ϕ_f) не зависит от частоты возбуждающего света (закон Вавилова). Таким образом, истинный спектр возбуждения флуоресценции разбавленного раствора, содержащего одно поглощающее вещество, будет пропорционален коэффициенту поглощения, т. е. он является просто спектром поглощения этого вещества. Следовательно, с помощью спектрофлуориметрии можно измерять спектры поглощения флуоресцирующих веществ при концентрациях, гораздо ниже тех, которые требуются для измерения спектров поглощения с помощью спектрофотометра. Очень важным преимуществом спектрофлуориметрии является то, что возбуждая смесь веществ, одно из которых флуоресцирует, можно получить спектр его поглощения, регистрируя флуоресценцию.

При измерении спектров люминесценции сканируется длина волны испускаемого света. При измерении спектров возбуждения, наоборот, монохроматор испускаемого света устанавливается на определенной длине волны (например, в максимуме спектра флуоресценции), а сканируется длина волны возбуждения. Щели монохроматора возбуждения должны быть достаточно малы, чтобы получить хорошо разрешенный спектр. Получаемая при этом зависимость интенсивности флуоресценции от длины волны возбуждающего света, прокалиброванная с учетом интенсивности возбуждающего света, и является спектром возбуждения данной люминесценции. После исправления полученного спектра с учетом спектрального распределения источника возбуждения он должен совпадать со спектром поглощения люминесцирующего вещества.

Для получения истинных спектров флуоресценции необходима дополнительная обработка спектров, получаемых на приборе: пересчет спектров с учетом спек-

тральной чувствительности, поскольку чувствительность применяемых фотоумножителей неодинакова для разных длин волн. Предварительно надо прокалибровать прибор по чувствительности на разных длинах волн или частот. Для калибровки прибора используются истинные спектры флуоресценции ряда ве-

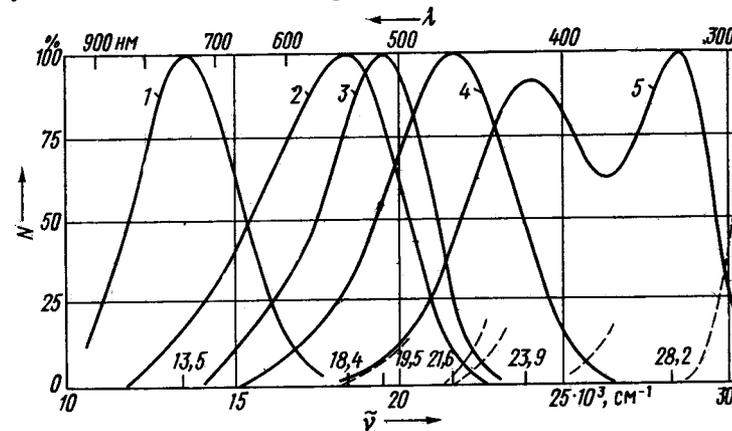


Рис. 3.8. Спектры флуоресценции стандартных растворов

ществ. Полученный на приборе спектр флуоресценции стандартного вещества в шкале частот сравнивается с его истинным спектром флуоресценции и определяется пересчетный коэффициент для различных частот. Измеряемый образец не должен содержать других флуоресцирующих веществ, а флуоресценцию стандартных веществ необходимо измерять при тех же самых условиях (температура, концентрация, растворитель, pH и т. п.), для которых известны истинные спектры флуоресценции стандартных веществ. На рис. 3.8 приведены истинные спектры флуоресценции растворов стандартных веществ для различных спектральных диапазонов, а в табл. 3.3 — относительные значения ординат этих истинных спектров флуоресценции для разных частот.

При измерении интенсивности люминесценции существенным является подбор концентрации исследуемого вещества. Чтобы поглощение света, а следовательно, и люминесценция происходили равномерно по всей толщине раствора, при измерении люминесценции

велико по сравнению со временем светового и темного периодов, поскольку уменьшение интенсивности за время темного периода будет пренебрежимо мало и интенсивность в течение полного цикла будет практически постоянной. Если время затухания долгоживущей люминесценции имеет тот же порядок, что и время темного и светового периодов, коэффициент фосфориметра будет меньшей величиной, чем было определено ранее.

Часто при изучении процессов в возбужденном состоянии исследуют поляризацию люминесценции. При этих измерениях практически всегда люминесценцию измеряют под прямым углом к направлению распространения возбуждающего света. Схема установки для измерения поляризации люминесценции аналогична схеме для измерения спектра люминесценции. Различие заключается в том, что при измерениях поляризации перед объектом на пути возбуждающего света помещается неподвижный поляроид — устройство для поляризации света. Следовательно, люминесценция возбуждается поляризованным излучением. На пути измеряемого света после объекта помещают вращающийся вокруг своей оси поляроид. Определяют разность интенсивности люминесценции при параллельном расположении плоскостей поляризации поляроидов I_{\parallel} и перпендикулярном расположении плоскостей поляризации поляроидов I_{\perp} (скрещенные поляроиды). Затем рассчитывают коэффициент поляризации люминесценции как отношение:

$$P = \frac{(I_{\parallel} - I'_{\perp})}{(I_{\parallel} + I'_{\perp})}$$

Измерение квантового выхода флуоресценции

Определение абсолютных квантовых выходов флуоресценции представляет собой трудную задачу. Оно требует измерения поглощенных и испускаемых квантов во всей области частот с поправками на рассеянный свет, повторное поглощение и на эффекты преломления. На практике часто используют растворы веществ с известным квантовым выходом флуоресценции и определяют квантовые выходы флуоресценции исследуемых соединений по отношению к известным со-

единениям. Необходимо работать с очень разбавленными растворами, тогда реабсорбцией флуоресценции можно пренебречь. В этом случае полная скорость испускания флуоресценции Q пропорциональна $I_0 \epsilon c l \Phi_f$. Площадь под исправленным спектром флуоресценции пропорциональна Q . Поэтому, если измерять спектры флуоресценции двух растворов при одинаковом геометрическом расположении (в одном и том же растворителе) и одинаковой интенсивности возбуждающего света, отношение интенсивностей флуоресценции равно:

$$\frac{F_2}{F_1} = \frac{Q_2}{Q_1} = \frac{\text{площадь 2}}{\text{площадь 1}} = \frac{I_0 \epsilon_2 c_2 l \Phi_2}{I_0 \epsilon_1 c_1 l \Phi_1} = \left(\frac{\Phi_2}{\Phi_1} \right) \frac{D_2}{D_1} \quad (3.59)$$

Зная абсолютный квантовый выход флуоресценции стандартного вещества Φ_1 , можно вычислить квантовый выход флуоресценции другого вещества. Квантовый выход флуоресценции вещества определяют следующим образом.

1. Приготавливают разбавленный раствор ($D \leq 0,1$) исследуемого вещества в соответствующем растворителе. Определяют оптическую плотность его на длине волны возбуждения.
2. Измеряют спектр флуоресценции приготовленного раствора и исправляют его на чувствительность фотоумножителя в шкале частот или волновых чисел.
3. Подбирают стандартное флуоресцирующее вещество, поглощающее свет в области поглощения исследуемого вещества.
4. Приготавливают разбавленный раствор ($D \leq 0,1$) стандартного вещества в том же самом растворителе определяют оптическую плотность его на длине волны возбуждения флуоресценции исследуемого вещества.
5. Измеряют спектр флуоресценции раствора стандартного вещества при таком же геометрическом расположении (как и для исследуемого вещества), одинаковых интенсивности и длине волны возбуждающего света. Исправляют полученный спектр с учетом чувствительности фотоумножителя в шкале частот или волновых чисел.
6. Измеряют площади под исправленными спектрами флуоресценции исследуемого и стандартного вещества.
7. Определяют отношение квантовых выходов флуоресценции двух веществ, используя уравнение (3.59).

8. Определяют квантовый выход флуоресценции исследуемого вещества, зная квантовый выход флуоресценции стандартного вещества.

При измерении квантовых выходов флуоресценции относительно стандартного вещества возможны ошибки за счет эффектов внутреннего фильтра (реабсорбция), немонохроматичности возбуждающего света, флуоресценции кювет, тушения кислородом и фоторазложения. Ошибку, обусловленную первым фактором, легко устранить, используя достаточно разбавленные растворы. Для предотвращения немонохроматичности следует проверять чистоту возбуждающего света. Во избежание ошибки при измерении оптической плотности следует по возможности измерять оптическую плотность раствора пучком света того же спектрального состава, что и при возбуждении флуоресценции. Необходимо проводить дополнительные измерения для учета флуоресценции растворителя, стенок кюветы. Для этого при исследовании растворов необходимо измерить в тех же условиях спектр флуоресценции растворителя. Спектр, полученный при измерении флуоресценции растворителя, вычитается из спектра, полученного при измерении раствора, до его исправления.

Выходы долгоживущей флуоресценции и фосфоресценции определяются тем же методом, что и выходы быстрой флуоресценции, т. е. сравнением площади под исправленным спектром испускания с площадью под спектром быстрой флуоресценции стандартного соединения. Для получения соответствующей величины площади интенсивность долгоживущей люминесценции нужно разделить на коэффициент фосфориметра. Иногда соединение имеет и долгоживущую люминесценцию, и быструю флуоресценцию. Если квантовый выход последней уже определен обычным способом, отношение выхода замедленной флуоресценции к выходу быстрой флуоресценции можно вычислить по сравнению интенсивности одного из максимумов в спектрах, которые идентичны по форме. Измеряемый спектр испускания не надо исправлять по чувствительности фотоумножителя, но необходимо сделать поправки на коэффициент фосфориметра и чувствительности прибора, при которых измеряются оба спектра.

Чувствительность метода флуоресценции

Люминесцентный метод характеризуется исключительно высокой чувствительностью и специфичностью. Для веществ с высоким коэффициентом экстинкции ($\epsilon \sim 10^5$) и большим квантовым выходом флуоресценции (около 1) можно обнаружить до 10^{-10} М этих веществ. Поскольку часто спектры флуоресценции растворов органических веществ представляют собой размытые широкие полосы, то для увеличения информации, получаемой из спектров флуоресценции, проводят измерения в парах. В этом случае спектры имеют определенную структуру, т. е. содержат узкие характерные полосы.

Для выяснения тонкой структуры спектров флуоресценции их исследуют при низких температурах (например, при температуре жидкого азота 77 К). При этом подбирают растворители, в которых наиболее отчетливо проявляется структура спектров. Этот метод измерения квазилинейчатых спектров в твердой матрице при низких температурах был предложен Э. В. Шпольским. Особенно успешно он был применен к исследованию полициклических ароматических углеводородов. Получаемые квазилинейчатые спектры флуоресценции ароматических углеводородов в растворах алифатических углеводородов являются очень характерными и позволяют получать информацию о колебательной структуре основного электронного состояния ароматических углеводородов. Квазилинейчатые спектры флуоресценции обладают рядом важнейших свойств. Прежде всего квазилинейчатые спектры в каждом случае носят ярко выраженный индивидуальный характер (специфичность). В отличие от обычных размытых спектров поглощения и флуоресценции они существенно различаются даже у близких по строению молекул. Это отличие оказывается значительным и для изомерных молекул. Другая важная особенность квазилинейчатых спектров заключается в очень высокой селективности таких измерений. Благодаря малой ширине и высокой интенсивности линий квазилинейчатые спектры позволяют определять индивидуальные соединения в сложной смеси даже тогда, когда они входят в многокомпонентную смесь в ничтожно малых концентрациях. Третьей характерной

особенностью квазилинейчатых спектров флуоресценции является чрезвычайно высокая чувствительность методов, основанных на их применении. Измерение квазилинейчатых спектров позволяет при прочих равных условиях увеличить чувствительность люминесцентных измерений примерно в 100 раз.

Интенсивность люминесценции, испускаемой раствором, прямо пропорциональна интенсивности возбуждающего света и общей чувствительности регистрирующей системы. Однако увеличивая мощность или эффективность источника возбуждения, нельзя неограниченно улучшать метод, т. е. уменьшать предельно обнаружимую концентрацию раствора. Ниже определенной концентрации повышается роль других факторов, которые ограничивают возможность метода, и увеличение чувствительности прибора при этих условиях не дает результатов. Лимитирующим фактором могут быть фотохимические реакции или свет, попадающий на фотоумножитель не от исследуемого люминесцирующего раствора, а от посторонних источников, т. е. величина суммарного фона. Возникновению люминесцентного фона может способствовать ряд следующих факторов, связанных как с прибором, так и с анализируемым образцом: рассеянный свет, рамановское испускание растворителя, люминесценция кюветы и окружающего пространства, люминесцирующие примеси, содержащиеся в растворителе или реагентах.

Рассеянный свет. Различают три вида рассеянного света, длина волны которого совпадает с длиной волны возбуждающего света: релеевское рассеяние, тиндалевское рассеяние и рассеяние на крупных частицах. Как правило, рассеянный свет первых двух типов сильно поляризован. Помехи, вызванные рассеянным светом, будут наименьшими при освещении под прямым углом. Для освобождения от рассеянного света чаще всего используют отсекающие светофильтры с резкой коротковолновой границей, разделяющей возбуждающий свет и свет флуоресценции. Поскольку рассеянный свет поляризован, для понижения его интенсивности помещают между флуоресцирующим раствором и анализирующим монохроматором поляризатор, ориентированный так, что он пропускает лишь горизонтально поляризованный свет. При этом интен-

сивность рассеянного света снижается значительно сильнее, чем свет флуоресценции.

Рамановское испускание растворителя (комбинационное рассеяние). При комбинационном рассеянии света длина волны отличается от длины волны возбуждающего света. Это происходит потому, что при рассеянии света часть энергии пучка может перейти в энергию колебаний или, если облучаемая молекула находится в колебательно-возбужденном состоянии, она может отдать колебательную энергию фотону. Идентифицировать полосы комбинационного рассеяния нетрудно, поскольку при изменении длины волны возбуждающего света они всегда сдвинуты на одно и то же расстояние (в шкале волновых чисел) от линии возбуждения. Для уменьшения рамановского рассеяния используют отсекающие светофильтры или на пути пучка флуоресценции помещают поляризатор, что уменьшает интенсивность рамановских полос, поскольку рамановское испускание достаточно поляризовано.

Люминесценция кюветы и окружающего пространства. Часто наблюдается люминесценция кюветы, в которой находится исследуемое вещество. Флуоресценция кюветы рассеивается растворителем, что приводит к возникновению сильного фона. Трудности особенно велики, когда для возбуждения используется свет коротких длин волн. Плавленный кварц сильно флуоресцирует, синтетический кварц флуоресцирует незначительно. При измерении образцов при температуре жидкого азота необходима особая осторожность, чтобы избежать люминесцентного фона. Если измерения проводятся в сосуде Дьюара из плавленного кварца, люминесценция последнего может давать очень большой фон. Фосфоресценция кюветы при измерении замедленной флуоресценции может также вызывать помехи. В этом случае фон имеет вид истинного сигнала — спектр идентичен быстрой флуоресценции исследуемого вещества. Однако это не истинная замедленная флуоресценция, а быстрая флуоресценция, возбужденная поглощением фосфоресценции кюветы.

Люминесценция примесей, присутствующих в растворителе и реагентах. Для борьбы с этим источником фона следует тщательно очищать используемые растворители и реагенты. Очистку растворителя следует проводить до такой степени, когда две следующие

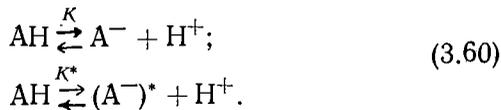
друг за другом одинаковые стадии очистки не дадут понижения люминесцентного фона. Для контроля чистоты растворителей часто используют измерение времени затухания флуоресценции вещества в этом образце растворителя и сравнивают найденное значение со значением времени затухания флуоресценции этого вещества в чистом растворителе. Совпадение времени затухания флуоресценции указывает на высокую степень чистоты образца растворителя. Так же тщательно следует очищать и используемые реагенты. Желательно проверять чистоту измерением спектра флуоресценции исследуемого вещества при нескольких длинах волн возбуждения. Если при этом наблюдается изменение формы спектра флуоресценции, можно предполагать присутствие второго флуоресцирующего вещества. Нужно осторожно относиться к вновь появляющимся полосам флуоресценции. Измерение флуоресценции образца при 77 К увеличивает чувствительность и позволяет обнаружить присутствие малых количеств примеси.

§ 4. ПРАКТИЧЕСКИЕ РАБОТЫ

Флуоресцентный метод применяют для изучения быстрых реакций возбужденных молекул, кислотно-основных реакций возбужденных молекул и комплексобразования в возбужденном электронном состоянии, определения концентрации люминесцирующих веществ в смеси, изучения кинетики и механизма ферментативных реакций, изучения межмолекулярного переноса энергии.

1. Кислотно-основные реакции возбужденных молекул

В результате изменения распределения электронной плотности в молекулах органических соединений при фотовозбуждении сильно изменяются их кислотно-основные свойства. Одни соединения в возбужденном состоянии становятся более сильными кислотами, другие — более сильными основаниями:



Обычно принято характеризовать силу кислоты величиной pK :

$$pK = -\lg K; \quad pK^* = -\lg K^*.$$

Молярная энтальпия реакций в возбужденном состоянии ΔH^* (рис. 3.9) отличается от молярной энтальпии реакции в основном состоянии ΔH на величину, определяемую сдвигом частот длинноволновых полос спектров поглощения АН и А^- :

$$\Delta H - \Delta H^* = \Delta E - \Delta E'. \quad (3.61)$$

Если предположить равенство изменений энтропии реакции в основном и возбужденном состояниях, можно записать

$$\ln \frac{K^*}{K} = \frac{\Delta E - \Delta E'}{RT} = \frac{hc}{kT} \Delta \tilde{\nu}, \quad (3.62)$$

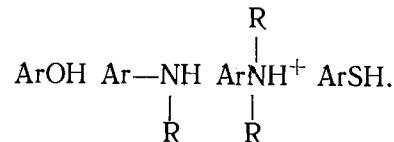
где R — газовая постоянная; h — постоянная Планка; c — скорость света; T — абсолютная температура; K и K^* — константы равновесия реакции в основном и возбужденном состояниях; $\Delta \tilde{\nu}$ — спектральный сдвиг, происходящий при кислотной диссоциации ароматических соединений, см^{-1} . Тогда

$$pK^* = pK - \frac{0,625}{T} \Delta \tilde{\nu}. \quad (3.63)$$

Уравнение (3.62) лежит в основе метода Фёрстера.

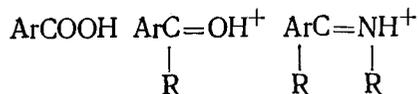
Согласно спектральным сдвигам, которые обычно наблюдаются при кислотной диссоциации ароматических соединений в возбужденном состоянии, последние делятся на две группы.

Первая группа:



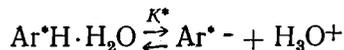
Для этой группы соединений $pK^* < pK$, т. е. в возбужденном состоянии соединения указанных типов являются более сильными кислотами, чем в основном состоянии.

Вторая группа:



Для этой группы $pK^* > pK$, т. е. в возбужденном состоянии они становятся менее сильными кислотами, чем в основном.

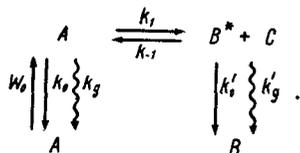
Различия в силе кислот в основном и возбужденном состояниях могут достигать шести и более порядков, поэтому возбужденные молекулы могут претерпевать реакции, которые в основном состоянии или вовсе не идут или протекают в очень малой степени. В результате возрастания кислотных свойств соединений первой группы кислотно-основное равновесие в возбужденном состоянии



устанавливается при pH, существенно меньших, чем pK равновесия в основном состоянии. Для соединений второй группы кислотность растворителя, необходимая для появления флуоресценции протонированной формы, меньше кислотности, необходимой для получения спектров поглощения соответствующей протонированной формы. Это проявляется в том, что флуоресценция протонированной формы появляется тогда, когда по спектрам поглощения протонированная форма еще не обнаруживается. Это указывает на установление в возбужденном состоянии следующего равновесия:



Значения pK^* возбужденных состояний и константу скорости ионизации (метод Веллера) можно вычислить, зная относительные квантовые выходы флуоресценции нейтральной молекулы и соответствующего иона. Рассмотрим для примера кинетическую схему:



Для возбужденных молекул можно написать уравнение стационарных концентраций:

$$W_0 + k_{-1}[B^*][C] = [A^*](k_0 + k_{ic} + k_1); \quad (3.64)$$

$$[A^*]k_1 = [B^*](k'_0 + k'_{ic} + k_{-1}[C]). \quad (3.65)$$

Квантовые выходы флуоресценции соединений А и В, находящихся в индивидуальном состоянии, определяются так:

$$\Phi_0 = \frac{k_0}{(k_0 + k_{ic})}; \quad \Phi'_0 = \frac{k'_0}{(k'_0 + k'_{ic})}.$$

При установлении стационарного состояния квантовые выходы флуоресценции А и В равны:

$$\Phi = \frac{k_0[A^*]}{W_0} = \frac{k_0}{k_0 + k_{ic} + k_1 - k_{-1}[C][B^*]/[A^*]}; \quad (3.66)$$

$$\Phi' = \frac{k'_0[B^*]}{W_0} = \frac{k'_0[B^*]/[A^*]}{k_0 + k_{ic} + k_1 - k_{-1}[C][B^*]/[A^*]}. \quad (3.67)$$

Принимая, что

$$\tau_0 = \frac{1}{(k_0 + k_{ic})}; \quad \tau'_0 = \frac{1}{(k'_0 + k'_{ic})},$$

где τ_0 — истинное время жизни возбужденной молекулы A^* ; τ'_0 — истинное время жизни возбужденной молекулы B^* ; получаем относительный квантовый выход флуоресценции А:

$$\frac{\Phi}{\Phi_0} = \frac{1 + k_{-1}\tau'_0[C]}{1 + k_1\tau_0 + k_{-1}\tau'_0[C]} \quad (3.68)$$

и относительный квантовый выход флуоресценции В:

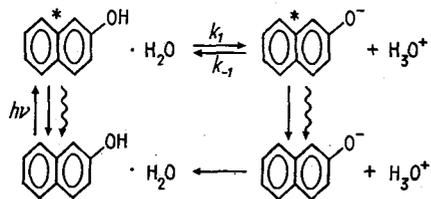
$$\frac{\Phi'}{\Phi'_0} = \frac{k_1\tau_0}{1 + k_1\tau_0 + k_{-1}\tau'_0[C]}. \quad (3.69)$$

Поделив (3.68) на (3.69), получим

$$\frac{\Phi\Phi'_0}{\Phi_0\Phi'} = \frac{1}{k_1\tau_0} + \frac{1}{K^*} \frac{\tau'_0}{\tau} [C], \quad (3.70)$$

где $K^* = k_1/k_{-1}$

В качестве примера рассмотрим определение константы диссоциации и констант ионизации 2-нафтола (в общем случае ароматических соединений типа $ArXH$, где $X=O, N, S$):



Возбужденная молекула 2-нафтола является более сильной кислотой, чем невозбужденная, поэтому диссоциация возбужденной молекулы успешно конкурирует с флуоресценцией и безызлучательными процессами деградации энергии электронного возбуждения. Это приводит к тому, что в спектре флуоресценции 2-нафтола даже в кислых растворах отчетливо видны две полосы. Более коротковолновая полоса соответствует флуоресценции недиссоциированного 2-нафтола, более длинноволновая — флуоресценции 2-нафтолят-аниона, образовавшегося при диссоциации возбужденной молекулы 2-нафтола. Увеличение концентрации ионов водорода в растворе подавляет диссоциацию возбужденного 2-нафтола. В спектрах флуоресценции это проявляется как увеличение интенсивности недиссоциированного 2-нафтола и уменьшение интенсивности флуоресценции 2-нафтолят-аниона. Количественная обработка таких спектров при различных концентрациях иона водорода в растворе позволяет вычислить константу равновесия протолитической диссоциации возбужденного 2-нафтола, а также константы скорости прямой и обратной реакций.

Расчеты k_1 , k_{-1} и K^* проводятся по формуле:

$$\frac{I'_0}{I_0 I'} = \frac{1}{k_1 \tau_0} + \frac{1}{K^*} \cdot \frac{\tau'_0}{\tau_0} [H_3O^+], \quad (3.71)$$

где I и I' — интенсивности флуоресценции 2-нафтола и 2-нафтолят-иона (в относительных единицах) в растворах с различными концентрациями иона водорода соответственно; I_0 — интенсивность флуоресценции

2-нафтола в отсутствие диссоциации 2-нафтола в возбужденном состоянии, т. е. при избытке кислоты; I'_0 — интенсивность флуоресценции 2-нафтолят-иона в щелочном растворе, когда отсутствуют недиссоциированные молекулы 2-нафтола; τ_0 и τ'_0 — истинные времена жизни возбужденных 2-нафтола и 2-нафтолят-иона; $\tau_0 = 8,4 \cdot 10^{-9}$ с и $\tau'_0 = 9,1 \cdot 10^{-9}$ с.

Приготовление растворов. Для выполнения измерений требуется приготовить пять растворов 2-нафтола в воде. Первые три раствора — с различной концентрацией трифторуксусной кислоты (в этих растворах наблюдается флуоресценция обеих форм), щелочной раствор 2-нафтола (№ 5 — в нем флуоресцирует только 2-нафтолят-ион). В растворе № 4 флуоресцирует только нейтральная форма 2-нафтола. Для приготовления растворов в каждую из пяти пронумерованных мерных колб вместимостью 25 мл набирают по 2 мл заранее приготовленного раствора 2-нафтола в воде.

В колбы добавляют следующие растворы:

- № 1 — 0,2 мл исходного раствора кислоты ($c = 5,24 \times 10^{-4}$ М);
- № 2 — 1,0 мл исходного раствора кислоты ($c = 2,62 \times 10^{-3}$ М);
- № 3 — 2,0 мл исходного раствора кислоты ($c = 5,23 \times 10^{-3}$ М);
- № 4 — заполнить приблизительно наполовину 0,07 М исходным раствором кислоты;
- № 5 — заполнить раствором щелочи.

Затем доводят объемы растворов в колбах дистиллированной водой до метки. Далее измеряют спектры флуоресценции приготовленных растворов.

Обработка экспериментальных данных. Значения интенсивностей I и I' флуоресценции (355 и 430 нм), соответствующие максимумам в спектрах флуоресценции, подставить в формулу (3.71).

Величина I_0 рассчитывается по измерению интенсивности флуоресценции раствора № 4 при длине волны 355 нм, I'_0 — по измерению интенсивности флуоресценции раствора № 5 при длине волны 430 нм. Так как недиссоциированная форма нафтола имеет довольно значительную интенсивность флуоресценции при 430 нм, то при измерении I' следует вводить поправку: $I' = I'_{\text{изм}} - A(I/I_0)$, где I' — действительная интенсив-

ность флуоресценции 2-нафтолят-иона при 430 нм; $I_{изм}$ — интенсивность флуоресценции нафтолят-иона, найденная экспериментально; A — интенсивность флуоресценции 2-нафтола в растворе № 4 при длине волны 430 нм.

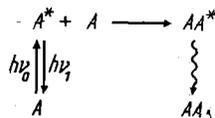
Результаты представить в виде таблицы по образцу:

H_2O^+ , моль/л	I	$I'_{изм}$	I''	$I I'_0 / I_0 I'$

Затем построить график зависимости $I I'_0 / I_0 I'$ от $[H_2O^+]$ и определить k_1 , k_{-1} и K^* (значения привести вместе с размерностями).

2. Комплексообразование в возбужденном электронном состоянии

В возбужденном состоянии возрастает способность молекул к комплексообразованию. Иногда возбужденные комплексы переходят в устойчивые в основном состоянии продукты, и весь процесс выглядит как процесс присоединения. Так, образование димеров при облучении вакуумированных растворов антрацена в бензоле протекает через промежуточный комплекс между возбужденной и невозбужденной молекулами антрацена:



Возбужденный димер не флуоресцирует из-за сильного внутримолекулярного тушения в комплексе.

В других случаях возбужденные комплексы при переходе в основное состояние мгновенно распадаются на исходные компоненты. Известны два типа связей в таких комплексах. Первый тип — это «резонансная» связь, обусловленная делокализацией возбуждения

между двумя одинаковыми или немного различными молекулами, образующими комплекс. Такие комплексы называют эксимерами. Волновая функция комплекса является линейной комбинацией волновых функций состояний с локализованным возбуждением:

$$\Psi_{AA^*} = a\Psi_A \Psi_A + b\Psi_{AA^*}$$

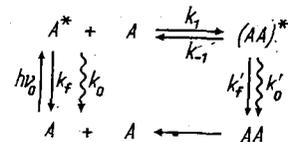
Примером может служить образование эксимера пирена. Флуоресценция пирена претерпевает спектральный сдвиг с увеличением концентрации пирена. Характерная для пирена в разбавленных растворах полоса флуоресценции (максимум около 25700 см^{-1}) исчезает, и появляется новая длинноволновая полоса (максимум около 20900 см^{-1}). В спектрах поглощения никаких изменений не обнаружено.

Второй тип связи в возбужденных комплексах — донорно-акцепторная связь, обусловленная переносом заряда между компонентами комплекса. Волновая функция такого комплекса, который называется эксиплексом, является комбинацией волновых функций состояния с локализованным возбуждением и с переносом заряда:

$$\Psi_{AB^*} = a\Psi_A \Psi_B + b\Psi_A - \Psi_{B^+} + c\Psi_A \Psi_{B^*}$$

Образование эксиплексов проявляется в том, что в спектрах флуоресценции ароматических соединений в присутствии тушителей, доноров или акцепторов электрона появляется новая полоса, смещенная в длинноволновую сторону. Никаких изменений в спектре поглощения не обнаруживается.

В качестве примера рассмотрим определение константы скорости реакции образования эксимеров пирена в гексане:



где A^* — молекула возбужденного ароматического соединения. Зависимость квантовых выходов флуоресценции ароматического соединения Φ_0 , Φ и эксимера

φ' от концентрации ароматического соединения описывается уравнениями:

$$\frac{\varphi'}{\varphi} = \frac{k'_j}{k_f} k_1 \tau'_0 [A] \quad (3.72)$$

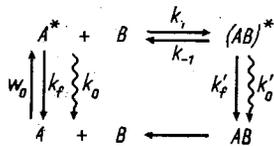
и

$$\frac{\varphi_0}{\varphi} = 1 + k_1 \tau_0 (1 - k_{-1} \tau'_0) [A], \quad (3.73)$$

где $\tau_0 = 1/(k_f + k_0)$; $\tau'_0 = 1/(k'_j + k'_0 + k_{-1})$. Изменяя зависимость φ'/φ и φ_0/φ от $[A]$ и принимая $k'_j/k_f = 7,7$, $\tau_0 = 9,2$ нс, $\tau'_0 = 9,5$ нс, можно определить k_1 и k_{-1} .

Для выполнения измерений требуется приготовить четыре раствора пирена в гексане с концентрацией 10^{-5} , 10^{-3} , 10^{-2} и $5 \cdot 10^{-2}$ М. Затем измеряют спектры флуоресценции приготовленных растворов. Приняв, что $\varphi'/\varphi \approx I'/I$, а $\varphi_0/\varphi = I_0/I$, значения интенсивностей I_0 , I и I' , соответствующие максимумам полос флуоресценции пирена и его эксимера (I_0 — интенсивность флуоресценции 10^{-5} М раствора пирена), подставляют в формулы (3.72) и (3.73), построив в координатах (I'/I — $[A]$) и (I_0/I — $[A]$) графики и, зная значения k'_j/k_f , τ'_0 , τ , вычисляют k_1 и k_{-1} .

Рассмотрим определение константы скорости образования эксиплексов антрацена с диэтиланилином в гексане:



где A — молекула возбужденного ароматического соединения.

Зависимость квантовых выходов флуоресценции ароматического соединения (φ_0 , φ) и эксиплекса (φ') от концентрации тушителя описывается уравнениями:

$$\frac{\varphi_0}{\varphi} = 1 + \kappa [B] \quad (3.74)$$

и

$$\frac{\varphi'}{\varphi} = \xi [B], \quad (3.75)$$

$$\text{где } \kappa + \frac{k_1 \tau_0}{1 + \tau'_0 k_{-1}}; \quad \xi = \frac{k'_f}{k_f} \frac{k_1 \tau_0}{1 + k_{-1} \tau'_0}. \quad (3.76)$$

Приготовление растворов. Для выполнения измерений требуется приготовить три раствора антрацена в гексане с различными концентрациями диэтиланилина.

В колбы добавляют:

- № 1 — 8 мл раствора антрацена в гексане ($c_{\text{дэа}} = 0$);
- № 2 — 6 мл раствора антрацена в гексане и 2 мл раствора антрацена в гексане с диэтиланилином ($c_{\text{дэа}} = 0,025$ М);
- № 3 — 8 мл раствора антрацена в гексане с диэтиланилином ($c_{\text{дэа}} = 0,1$ М).

Далее измеряют спектры флуоресценции приготовленных растворов.

Обработка экспериментальных данных. Значения интенсивностей I_0 и I , соответствующие максимумам флуоресценции антрацена в отсутствие диэтиланилина и при определенной концентрации последнего, подставляют в формулу (3.74). При условии $k_{-1} \tau'_0 \ll 1$ построить в координатах (I_0/I — $[B]$) графики, вычислить значение κ . Зная $\tau_0 = 3,7$ нс, вычислить k_1 .

3. Определение концентрации люминесцирующих веществ в смеси

Люминесцентный метод может применяться для определения концентрации люминесцирующих веществ. Интенсивность люминесценции I пропорциональна интенсивности возбуждающего света I_0 , поглощению α и квантовому выходу люминесценции φ :

$$I = k I_0 \alpha \varphi, \quad (3.77)$$

где k — коэффициент пропорциональности.

Концентрацию вещества по люминесценции определяют сравнением интенсивности люминесценции данного вещества с люминесценцией стандартного раствора при одинаковых условиях. При малых концентрациях поглощение раствора пропорционально концентрации люминесцирующего вещества:

$$\alpha \approx D \approx c; \quad I \approx c; \quad c_x = c_{\text{ст}} (I_x / I_{\text{ст}}),$$

где c_x и $c_{\text{ст}}$ — концентрации исследуемого и стандарт-

ного веществ; I_x и $I_{ст}$ — интенсивности люминесценции исследуемого и стандартного веществ.

Данный метод применим только при малых концентрациях вещества. Чтобы проверить, при достаточно ли малых концентрациях проводятся измерения, можно разбавить исследуемый раствор вдвое и убедиться в том, что интенсивность люминесценции уменьшилась также в два раза. Для более концентрированных растворов необходимо применять метод разбавлений или производить измерения в тонких слоях.

На практике часто приходится измерять люминесценцию вещества в присутствии другого поглощающего свет компонента. Второй компонент может поглощать возбуждающий свет (экранирующий эффект) и свет люминесценции (реабсорбция) и таким образом уменьшать интенсивность люминесценции и искажать ее спектр. Кроме того, существенную роль играют процессы безызлучательного переноса энергии, которые могут приводить к тушению флуоресценции исследуемого вещества.

Интенсивность люминесценции веществ в смеси пропорциональна количеству света, поглощенного этим веществом. Доля поглощения, приходящаяся на каждый компонент системы А—В, равна $D_A/(D_A+D_B)$ и $D_B/(D_A+D_B)$, где D_A и D_B — оптические плотности веществ А и В. Если поглощение всей системы равно α , то интенсивность люминесценции А будет

$$I_A = kI_0\alpha D_A/(D_A + D_B). \quad (3.78)$$

Рассмотрим люминесценцию системы при различном поглощении.

1. При малом поглощении, когда $D_{AB} < 0,1-0,2$, тогда

$$\alpha \sim (D_A + D_B); I_A = kI_0 D_A. \quad (3.79)$$

Следовательно, при малом поглощении смеси интенсивность люминесценции исследуемого вещества не зависит от присутствия других веществ и пропорциональна его концентрации. При этом люминесцентный анализ проводится так же, как и для чистых растворов, т. е. сравнением со стандартным веществом.

2. При полном поглощении света $\alpha = 1$ (при $D_{AB} >$

$> 1,8-2$)

$$I_A = kI_0 D_A/(D_A + D_B). \quad (3.80)$$

Формулу (3.80) можно использовать для определения малых количеств люминесцирующего вещества на фоне общего большого поглощения смеси.

При люминесцентных исследованиях часто спектры люминесценции компонентов в смеси двух веществ перекрываются между собой, и поэтому для количественного анализа необходимо разложить суммарный спектр на составляющие. Для этого необходимо измерить три спектра: спектр исследуемой смеси и спектр каждого вещества в отдельности (спектры стандартных растворов). Введем следующие обозначения:

	λ_1	λ_2
Интенсивность люминесценции компонента А в стандартном растворе	I'_A	I''_A
То же для компонента В	I'_B	I''_B
Интенсивность люминесценции смеси	I'	I''
Интенсивность люминесценции компонента А в смеси	$K_A I'_A$	$K_A I''_A$
То же для компонента В	$K_B I'_B$	$K_B I''_B$

Величины K_A и K_B выражают соотношение интенсивности люминесценции данного компонента в смеси и в стандартном растворе при любой длине волны. Интенсивность люминесценции смеси двух люминесцирующих веществ при каждой длине волны является суммой интенсивности ее компонентов, т. е.

$$I' = K_A I'_A + K_B I'_B; \quad I'' = K_A I''_A + K_B I''_B. \quad (3.81)$$

Отсюда

$$K_A = \frac{I' I''_B - I'' I'_B}{I'_A I''_B - I''_A I'_B}; \quad K_B = \frac{I' I''_A - I'' I'_A}{I'_A I''_B - I''_A I'_B}. \quad (3.82)$$

Умножив интенсивность люминесценции А в стандартном растворе на коэффициент K_A , получают интенсивность люминесценции А в смеси. Аналогичным образом получают интенсивность люминесценции В в смеси.

Иногда вместо разложения спектра флуоресценции смеси на составляющие целесообразно измерять флуо-

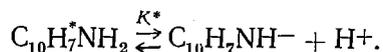
ресценцию смеси двух веществ в таких условиях, когда спектры флуоресценции компонентов хорошо разделяются. Рассмотрим определение концентрации 2-нафтола и 2-нафтиламина в водном растворе. Поскольку в возбужденном состоянии 2-нафтол становится более сильной кислотой, в спектре флуоресценции его в водном растворе имеются две полосы:

- 1) $\lambda_{\max} = 360$ нм соответствует неионизированной форме 2-нафтола;
- 2) $\lambda_{\max} = 425$ нм соответствует ионизированной форме 2-нафтола;

2-нафтиламин в возбужденном состоянии является очень слабой кислотой, поэтому в спектре флуоресценции присутствует только поло-

са с $\lambda_{\max} = 415$ нм, принадлежащая неионизированной форме. Определить концентрацию отдельно 2-нафтола и 2-нафтиламина в смеси трудно. Иное получается в щелочном растворе. В 2 н. NaOH все молекулы 2-нафтола уже в основном электронном состоянии существуют в ионизированной форме. Поэтому спектр флуоресценции содержит полосу с $\lambda_{\max} = 425$ нм. В основном состоянии 2-нафтиламин присут-

ствует в щелочном растворе в виде неионизированной формы. В возбужденном состоянии благодаря усилению кислотных свойств все молекулы 2-нафтиламина существуют в ионизированной форме:



Это соответствует новой полосе в спектре флуоресценции ($\lambda_{\max} = 550$ нм), которая хорошо отделена от полосы флуоресценции ионизированной формы 2-нафтола (рис. 3.10).

Методика измерения. Измеряют спектры и интенсивность флуоресценции исследуемого раствора и стандартных 10^{-4} М растворов 2-нафтола и 2-нафтиламина, содержащих 2 моль/л NaOH при $\lambda_{\text{возб}} = 350$ нм. Концентрацию 2-нафтола и 2-нафтиламина рассчиты-

вают по формулам:

$$c_{\text{нафтола}} = c_1 (I'_x / I'_{\text{ст}}); \quad c_{\text{нафтиламина}} = c_2 (I''_x / I''_{\text{ст}}),$$

где $I'_{\text{ст}}$ — интенсивность флуоресценции при $\lambda = 425$ нм в стандартном растворе 2-нафтола; $I''_{\text{ст}}$ — интенсивность флуоресценции при $\lambda = 550$ нм в стандартном растворе 2-нафтиламина; I'_x — интенсивность флуоресценции при $\lambda = 425$ нм; I''_x — интенсивность флуоресценции при $\lambda = 550$ нм в исследуемой смеси. При проведении измерений необходимо помнить, что оптическая плотность щелочного раствора смеси не должна превышать 0,2.

4. Изучение кинетики и механизма ферментативных реакций

Чрезвычайно высокая чувствительность флуоресцентного метода позволяет применять его для изучения свойств самих ферментов и их комплексов с субстратом и коферментом. При измерении, например, констант диссоциации и констант Михаэлиса для комплексов фермент — субстрат или фермент — кофермент спектрофотометрия и другие методы оказываются часто недостаточно чувствительными. Когда субстрат флуоресцирует, можно определять константы Михаэлиса на несколько порядков меньше, чем спектрофотометрическим методом.

Значительная чувствительность флуоресценции к внутримолекулярным и межмолекулярным изменениям позволяет выявить взаимодействия молекул, не обнаруживаемые другими методами. Так, ионизация и взаимодействие между молекулами, которые трудно обнаружить спектрофотометрическими методами, могут изменить квантовый выход флуоресценции. Флуорофоры, взаимодействуя со специфическим ферментом, могут увеличить или уменьшить интенсивность его флуоресценции, и по степени изменения интенсивности можно судить о типе связи. Межмолекулярные и внутримолекулярные взаимодействия могут вызвать также изменения в спектрах возбуждения и флуоресценции. По изменению спектров можно также судить об изменениях в структуре флуорофора, сопровождающих молекулярное взаимодействие.

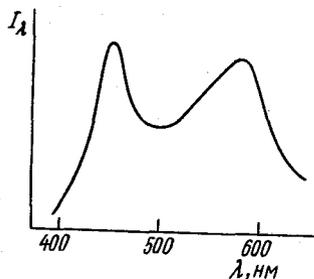
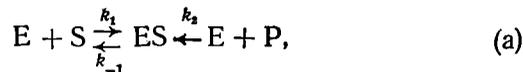


Рис. 3.10. Спектр флуоресценции смеси 2-нафтола и 2-нафтиламина в 2 н. NaOH

Если две различные молекулы расположены достаточно близко, они могут влиять на флуоресценцию друг друга. Одна из них, например, может поглощать излучение флуоресценции другой, свидетельствуя о довольно эффективной миграции энергии от одной молекулы к другой при облучении молекулярного комплекса. Такое взаимодействие может происходить между ароматическими аминокислотами, в ферментах и флуоресцирующих коферментах. Следовательно, можно определять и расстояние между этими молекулами. Кроме того, излучаемый отдельными молекулами данного вещества поток энергии определенным образом ориентирован по отношению к излучающей молекуле. Поэтому флуоресценция твердых тел сильно поляризована. В жидких вязких растворителях поляризация флуоресценции небольших молекул обычно мала, так как вследствие броуновского движения молекулы быстро меняют свое положение. Однако у больших молекул, таких, как белки, даже в жидких растворителях наблюдается менее интенсивное броуновское движение: за время жизни возбужденного состояния они мало меняют свое положение, и поэтому их флуоресценция сильно поляризована. У флуоресцирующих групп, находящихся внутри белковой молекулы или соединенных с белком в виде комплексов фермент — кофермент или фермент — субстрат, также обнаруживается поляризация флуоресценции. Степень поляризации флуоресценции таких комплексов и влияние на нее различных факторов дают информацию о механизме действия фермента. Все это представляет ценность для анализа не только собственно ферментов, но и вообще всех белков.

Рассмотрим определение константы диссоциации фермент-субстратного комплекса флуоресцентным методом. Взаимодействие фермента с субстратом описывается общей схемой:



где E — фермент; S — субстрат; ES — фермент-субстратный комплекс. Скорость процесса

$$v = \frac{v_{gT} [S_0]}{K_{gT} + [S_0]}, \quad (3.83)$$

где $v_{gT} = k_2 [E]$; S_0 — начальная концентрация субстрата;

$$K_{gT} = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1}; \quad K_S = \frac{k_{-1}}{k}.$$

Если $k_2 = 0$, схема (a) принимает вид:



Если фермент-субстратный комплекс флуоресцирует в другой спектральной области, нежели исходные компоненты, можно, измеряя флуоресценцию этого комплекса, определить константу его диссоциации. В условиях избытка субстрата по сравнению с ферментом ($[E_0] \ll [S_0]$) система описывается следующими уравнениями:

$$K_S = \frac{[E][S]}{[ES]}; \quad [ES] = \frac{[E][S]}{K_S} = \frac{([E_0] - [ES])[S_0]}{K_S}; \quad (3.84)$$

$$[E_0][S_0] - [ES][S_0] = K_S [ES];$$

$$[ES] = \frac{[E_0][S_0]}{K_S + [S_0]}. \quad (3.85)$$

Интенсивность флуоресценции фермент-субстратного комплекса пропорциональна его концентрации:

$$I = \alpha [ES]; \quad I = \alpha \frac{[E_0][S_0]}{K_S + [S_0]};$$

$$\frac{1}{I} = \frac{K_S}{\alpha [E_0][S_0]} + \frac{1}{\alpha [E_0]}; \quad (3.86)$$

$$\frac{\alpha}{I} = \frac{1}{\alpha [E_0]} + \frac{K_S}{[E_0][S_0]}.$$

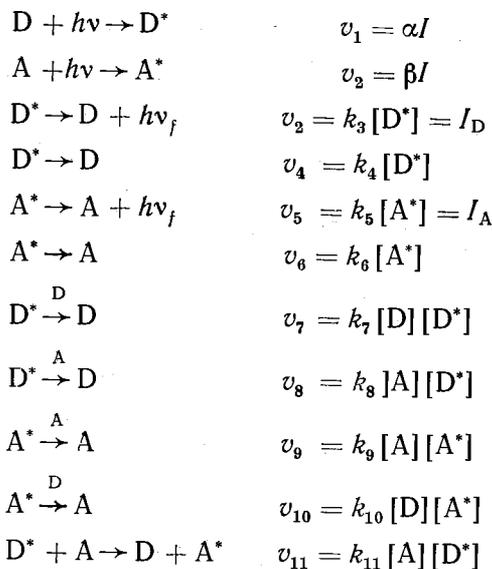
Следовательно, построив зависимость α/I от $1/[S_0]$, можно определить константу диссоциации фермент-субстратного комплекса K_S .

Для проведения измерения готовят раствор субстрата и фермента (в качестве субстрата используют 1-диметиламинонафталинсульфонилпептид, в качестве фермента — пепсин) в 0,1 М формиатном буферном растворе (рН 3,1). Концентрация субстрата (моль/л): $0,02 \cdot 10^{-3}$; $0,06 \cdot 10^{-3}$; $0,1 \cdot 10^{-3}$; $0,15 \cdot 10^{-3}$; $0,2 \cdot 10^{-3}$. Концентрация фермента постоянна: $7,14 \cdot 10^{-6}$ моль/л. Изме-

ряют флуоресценцию образовавшегося фермент-субстратного комплекса ($\lambda_{\text{возб}}=285$ нм, $\lambda_f=500$ нм) в каждом из растворов и строят график зависимости α/I от $1/[S_0]$. По тангенсу угла наклона определяют константу диссоциации комплекса K_S .

5. Изучение межмолекулярного переноса энергии

Рассмотрим определение константы скорости синглет-синглетного переноса энергии между 1-хлорантраценом (D) и периленом (A). При облучении раствора, содержащего 1-хлорантрацен и перилен, светом, поглощаемым обоими веществами, происходят следующие процессы по схемам:



Как видно из схем, при определении константы скорости переноса энергии (k_{11}) необходимо учитывать процессы самогашения молекул A^* и D^* . Для проведения работы необходимо приготовить следующие растворы: а) растворы 1-хлорантрацена в бензоле, имеющие концентраций (моль/л): 1) $5 \cdot 10^{-3}$; 2) $1 \cdot 10^{-2}$; 3) $2 \cdot 10^{-2}$; 4) $4 \cdot 10^{-2}$; б) растворы перилена в бензоле, концентрации (моль/л): 5) $2 \cdot 10^{-3}$; 6) $4 \cdot 10^{-3}$; 7) $8 \cdot 10^{-3}$. Для определения константы скорости самогашения 1-хлор-

антрацена измеряют спектры флуоресценции растворов 1—4. Строят зависимость в координатах ($I_D^0/I_D - [D]$) и по уравнению ($I_D^0/I_D = 1 + K_D [D]$) из тангенса угла наклона прямой определяют константу самогашения K_D . Здесь I_D^0 — интенсивность флуоресценции раствора № 1; I_D — интенсивность флуоресценции растворов 2—4. Смешивают одинаковые объемы растворов 2 и 5, 3 и 6, 4 и 7. Измеряют спектры флуоресценции полученных смесей. Строят график в координатах ($I_{DA}^0/I_{DA} - [D]$) и по уравнению

$$I_{DA}^0/I_{DA} = 1 + rK_D [D] + [k_8 + k_{11}] \tau_D^0 \Phi_D^0 [D] \quad (3.87)$$

определяют ($k_8 + k_{11}$) при условии $\tau_D^0 = 12$ нс; $\Phi_D^0 = 0,085$; $r=5$. Константа скорости k_8 связана с реабсорбцией флуоресценции А молекулами D Она мала по сравнению с константой скорости переноса энергии. Поэтому ($k_8 + k_{11}$) $\approx k_{11}$. По формуле

$$R_0 = 7,35 \cdot 10^{-8} \sqrt[3]{\tau_D^0 k_{11}} \quad (3.88)$$

определяют критическое расстояние $R_0(A)$ между донором и акцептором, на котором вероятности переноса энергии от D^* к А и испускания D^* равны.

ЛИТЕРАТУРА

1. Барлтроп Дж., Койл Дж. Возбужденные состояния в органической химии. М., 1978.
2. Калверт Д., Питтс Д. Фотохимия. М., 1968.
3. Колдин Е. Быстрые реакции в растворе. М., 1966.
4. Паркер С. Фотолуминесценция растворов. М., 1972.
5. Теренин А. Н. Фотоника молекул красителей. М., 1967.
6. Турро Н. Молекулярная фотохимия. М., 1967.