

УДК 577.32

КИНЕТИЧЕСКИЕ ИЗМЕРЕНИЯ ФОСФОРЕСЦЕНЦИИ СИНГЛЕТНОГО КИСЛОРОДА МЕТОДОМ РАЗРЕШЕННОГО ВО ВРЕМЕНИ СЧЕТА ФОТОНОВ В РАСТВОРИТЕЛЯХ, НЕ СОДЕРЖАЩИХ ВОДОРОДНЫХ АТОМОВ*

© 2019 А.А. Красновский^{1,2**}, А.С. Бендикис¹, А.С. Козлов¹

¹ ФИЦ Биотехнологии РАН, Институт биохимии им. А.Н. Баха, 119071 Москва, Россия; электронная почта: phoal@mail.ru

² Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119234 Москва, Россия

Поступила в редакцию 02.09.18

После доработки 29.10.18

Принята к публикации 29.10.18

Растворители, не содержащие водородных атомов, в которых время жизни синглетного кислорода достигает несколько десятков миллисекунд – исключительно удобная модель для изучения свойств синглетного кислорода, а измерение собственной ИК фосфоресценции синглетного кислорода при 1270 нм является наиболее надежным методом его детектирования. Однако для эффективного применения фосфоресценции к этой модели необходимо располагать оборудованием для стационарных и кинетических измерений фосфоресценции при малой скорости генерации синглетного кислорода, что связано с серьезными техническими трудностями. В данной работе описан сконструированный в лаборатории новый высоко чувствительный светодиодный (лазерный) спектрометр для стационарных и кинетических исследований миллисекундной фосфоресценции кислорода. В стационарном режиме этот спектрометр позволил наблюдать фосфоресценцию синглетного кислорода при прямом беспигментном возбуждении молекул кислорода в области его темно-красных абсорбционных полос (690 и 765 нм). Для кинетических измерений применен метод разрешенного во времени счета фотонов при фотовозбуждении фотосенсибилизатора фенолалена микросекундными светодиодными импульсами 405 нм средней мощностью <math>< 50 \text{ мВт/см}^2</math>. С помощью нового спектрометра измерено время жизни синглетного кислорода в насыщенных воздухом CCl_4 , C_6F_6 и фреоне 113, а также тушение синглетного кислорода фенолаленом и растворенными триплетными молекулами кислорода. Определены относительные значения константы скорости излучательной дезактивации синглетного кислорода в исследованных средах. Результаты сопоставлены с абсорбционными коэффициентами кислорода, полученными методом лазерной фотохимии. Приводится обсуждение полученных результатов в сравнении с данными других исследовательских групп.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: синглетный кислород, фосфоресценция, светодиодный (лазерный) спектрометр, счет фотонов, время жизни, тушение кислородом, абсорбционные коэффициенты, растворители, не имеющие водородных атомов.

DOI: 10.1134/S0320972519020076

Фотосенсибилизированная ИК фосфоресценция синглетного ($^1\Delta_g$) кислорода ($^1\text{O}_2$) (рис. 1) широко применяется в лабораторной практике для исследования свойств синглетного кислорода и фотодинамических фотосенсибилизаторов в связи с многочисленными теоретическими и прикладными задачами фотофизики, фотохимии, фотобиологии и фотомедицины [1, 2].

Первые измерения фосфоресценции синглетного кислорода в растворах пигментов были выполнены одним из авторов этой статьи в

1976–1977 гг. в растворителях, не содержащих водородных атомов – CCl_4 , фреоне 113 и CS_2 ([3] и указанные там ссылки). Первоначально фосфоресценцию регистрировали с помощью спектрометров с механическими фосфороскопами и фотодетекторной системой на базе охлаждаемых фотоумножителей со спектральной характеристикой С-1 (ФЭУ-83). Конструкция этих приборов подробно описана ранее [3, 4] и в последующих публикациях ([1] и указанные там ссылки). Они позволяли измерять спектры возбуждения, спектры излучения и время жизни фосфоресценции при величине времени жизни $\geq 0,7$ мс. Было установлено, что время жизни синглетного кислорода (τ_Δ) в этих средах > 20 мс [3], а не ≈ 1 мс, как следовало из измерений с по-

* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya>, в рубрике «Papers in Press», ВМ 18-244, 24.12.2018.

** Адресат для корреспонденции.

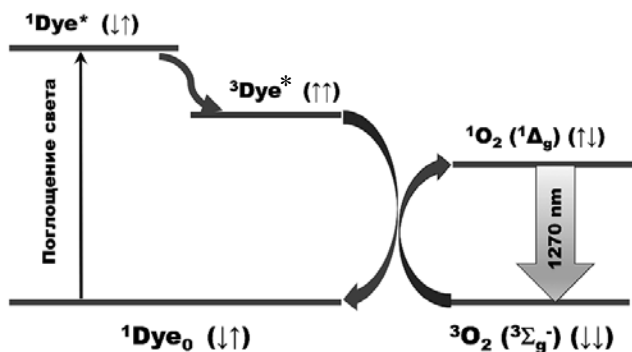


Рис. 1. Схема механизма фотосенсибилизированной ИК флуоресценции синглетного кислорода. ${}^1\text{Dye}_0$, ${}^1\text{Dye}^*$ и ${}^3\text{Dye}^*$ – молекулы пигментов-фотосенсибилизаторов в основном и возбужденных синглетном и триплетном состояниях; ${}^3\text{O}_2$ и ${}^1\text{O}_2$ – молекулы кислорода в основном и синглетном состояниях

мощью ловушек синглетного кислорода [5]. Подробные исследования, выполненные в CCl_4 , привели к заключению, что время жизни синглетного кислорода в этом растворителе уменьшается с увеличением концентрации пигментов-сенсибилизаторов из-за физического тушения молекул ${}^1\text{O}_2$ невозбужденными пигментными молекулами. Максимальное $\tau_\Delta \approx 30$ мс было получено в растворе феофитина *a* (1 мкМ) при плотности мощности возбуждающего света 300–700 мкВт/см² в CCl_4 , очищенном двукратной перегонкой. Близкое время жизни достигалось в коммерческих образцах этого растворителя высокой степени очистки с содержанием растворителя более 99,5% без дополнительной перегонки ([3] и указанные там ссылки). При этих условиях фотосенсибилизатор практически не разрушался за время облучения. Тушение ${}^1\text{O}_2$ кислородом воздуха в этих экспериментах не рассматривали.

Таким образом, было показано, что растворители, не имеющие водородных атомов – исключительно удобная модель для изучения свойств и реакционной способности синглетного кислорода флуоресцентным методом. С помощью этой модели и указанного выше τ_Δ были измерены константы скорости тушения ${}^1\text{O}_2$ многими биологически важными соединениями: порфиринами, хлорофиллами, каротиноидами, водой, 1,4-диазобикакло (2,2,2) октаном, α -токоферолом и другими соединениями, причем полученные константы совпали по величине с аналогичными константами, измеренными другими методами, что косвенно подтверждает правильность значения τ_Δ , полученного из измерения флуоресценции [1, 3].

В 1979 г. Минская группа разработала спектрометр для разрешенных во времени измерений флуоресценции после короткой вспышки ла-

зера или импульсной лампы, используя в качестве фотодетектора такой же фотоумножитель ФЭУ-83 и запоминающий осциллограф [6–8]. В частности, ими было обнаружено, что при высокой мощности возбуждающих вспышек кинетика затухания флуоресценции кислорода в CCl_4 является двухфазной и не описывается экспонентой. Авторы предположили, что это связано с рекомбинацией молекул ${}^1\text{O}_2$ при их высокой концентрации. В результате снижения энергии вспышки до минимальной величины (7 мДж) затухание флуоресценции кислорода становилось экспоненциальным с временем жизни 30 мс [6]. Таким образом, авторы этих работ пришли к тому же значению τ_Δ , которое было получено в наших исследованиях. В растворителях, молекулы которых содержали водородные атомы, время жизни флуоресценции снижалось до 10–100 мкс [6–8].

В 1987 г. Шмидт и Брауер сконструировали достаточно сложный прибор, в котором источником возбуждения служила ртутная лампа, детектором – германиевый фотодиод. Прерывистый свет получали с помощью механического прерывателя с частотой 2,5 Гц, длительность импульса – 10 мс. Постоянная времени фотодиода и его усилительной системы составляла 5,1 мс. Для устранения искажения кинетических кривых аппаратной функцией прибора, полученный сигнал обрабатывали на компьютере, который с помощью специальной программы вносил исправления, учитывающие постоянную времени фотодетектора. Таким образом, результирующая кинетическая кривая зависела от эффективности примененной программы. С помощью этого прибора авторы получили следующие значения $\tau_\Delta = 87$ мс в CCl_4 , 99 мс во фреоне 113 и 24 мс в гексафторбензоле [9, 10].

Параллельно Лосев и соавт. выполнили разрешенные во времени и стационарные измерения τ_Δ в CCl_4 и CS_2 [11, 12]. Авторы пришли к выводу, что при минимальной энергии возбуждения и минимальной концентрации фотосенсибилизатора (Pd-мезопорфирина) в обоих растворителях $\tau_\Delta \approx 30$ мс при комнатной температуре. При понижении температуры до 193 К время жизни увеличивалось примерно на 30%. Расхождение с данными группы Шмидта было объяснено более высокой степенью очистки растворителя в опытах группы Шмидта. Интересно, что рядом авторов [6, 9–12] поднимался вопрос о роли кислорода воздуха в тушении флуоресценции синглетного кислорода. Однако все они пришли к мнению, что этот процесс не эффективен.

В 1991 г. группа Шмидта, используя несколько улучшенную процедуру анализа данных, ус-

тановила, что при откачке воздуха время жизни фосфоресценции возрастает в 1,5–2 раза [13]. При увеличении концентрации кислорода до его парциального давления 1 бар время жизни, наоборот, уменьшалось до 10–20 мс. Отсюда сделан вывод, что кислород воздуха уменьшает время жизни синглетного кислорода в аэрированных растворах, причем в аэрированном CCl_4 было получено время жизни 59 ± 5 мс, что в 1,5 раза меньше величины 87 мс, ранее опубликованной той же группой [9, 10]. Более низкие значения времени жизни были получены также во фреоне 113 (72 мс) и гексафторбензоле (21 мс) [13]. Эти же значения были приведены в известном обзоре Schweitzer и Schmidt [14]. Ясного объяснения причин расхождения с более ранними данными [9, 10] не было представлено. До настоящего времени эти эксперименты никем не повторены, хотя, очевидно, что их проверка имеет принципиальное значение.

В последнее время кинетические параметры фосфоресценции синглетного кислорода в CCl_4 исследовались в работах Багрова и соавт., которые использовали импульсную лампу, германиевый фотодетектор и фуллерены C_{70} и C_{60} в качестве фотосенсибилизатора. При комнатной температуре и плотности мощности возбуждения 10 мДж/см^2 ими получено время жизни 22–55 мс [15, 16]. В согласии с данными работы Салохиддинова и соавт. [6], они наблюдали, что время жизни фосфоресценции в CCl_4 падает с увеличением мощности возбуждения и, аналогично работам Лосева и соавт. [11, 12], получили, что при нагревании раствора τ_Δ уменьшается.

Недавно, группа Wang et al. повторила эти наблюдения, используя инфракрасный фотоумножитель Хамаматсу. При минимальной мощности лазерных вспышек (10 мДж) время жизни $^1\text{O}_2$ составляло 16–17 мс в CCl_4 при концентрации C_{60} 200 мкМ [17]. Одновременно, по данным этой группы наблюдалось окисление C_{60} и тушение синглетного кислорода продуктом окисления. Hasebe et al. [18], используя Pt (II)-мезотетра (пентафторфенил) порфин (7,4 мкМ) и импульсы Nd: YAG лазера (8 нс, 10 Гц) получили $\tau_\Delta = 5,04$ мс. Экстраполяция, по данным этих авторов, к нулевой концентрации порфирина приводит к величине $\tau_\Delta \approx 14$ мс. Однако информация об энергии вспышек не указана.

Таким образом, из-за неопределенности времени жизни создавалось впечатление некоторой ненадежности этих систем, что позволяло некоторым исследователям подвергать сомнению данные, полученные в этих растворителях, или отказываться от их применения. Для получения достоверной информации нужны приборы, которые могут измерять стационарную интенсив-

ность и временные параметры фосфоресценции при очень малой энергии возбуждения, при которой описанные выше нелинейные и деструктивные эффекты невозможны. Первые спектрометры нашей лаборатории [3] решали эту задачу, однако, позволяя определять среднее время жизни фосфоресценции, они не давали возможности анализировать кинетику ее затухания.

В настоящее время техника регистрации фосфоресценции синглетного кислорода существенно усовершенствована. Для кинетических измерений наиболее эффективны установки с разрешенным во времени счетом фотонов. Первая установка такого типа, предназначенная для измерения фосфоресценции синглетного кислорода с микросекундным разрешением, была сделана в нашей лаборатории [19, 20]. Позже на ее основе был сконструирован наносекундный фосфоресцентный спектрометр, работающий в режиме коррелированного во времени счета одиночных фотонов [21]. В настоящее время такие приборы широко применяются многими исследователями ([1, 2] и указанные там ссылки). Однако, как указано, все они были предназначены для быстро затухающих микросекундных и наносекундных измерений.

Сконструированный нами новый прибор, краткое представление которого приведено в наших недавних публикациях [22, 23], предназначен для исследования медленно затухающих свечений с использованием техники разрешенного во времени счета фотонов. Технически этот прибор полностью решает поставленную задачу. В настоящей работе этот прибор впервые применен к измерению кинетики фотосенсибилизированной фосфоресценции синглетного кислорода в растворителях, слабо дезактивирующих $^1\text{O}_2$, при возбуждении светодиодными вспышками, энергия которых на 3–4 порядка ниже, чем во всех описанных выше работах, в которых была применена импульсная техника. Показана также возможность использования прибора для регистрации фосфоресценции синглетного кислорода, возникающей при прямом беспигментном возбуждении кислорода темно красным светом, соответствующим абсорбционным полосам кислорода 690 и 765 нм.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Блок-схема нового спектрометра показана на рис. 2. Для стационарных измерений люминесценции использовался светодиод с максимумом полосы испускания 399 нм и полушириной полосы 14 нм («Полироник», Россия). Излучение светодиода фокусировали в пятно диамет-

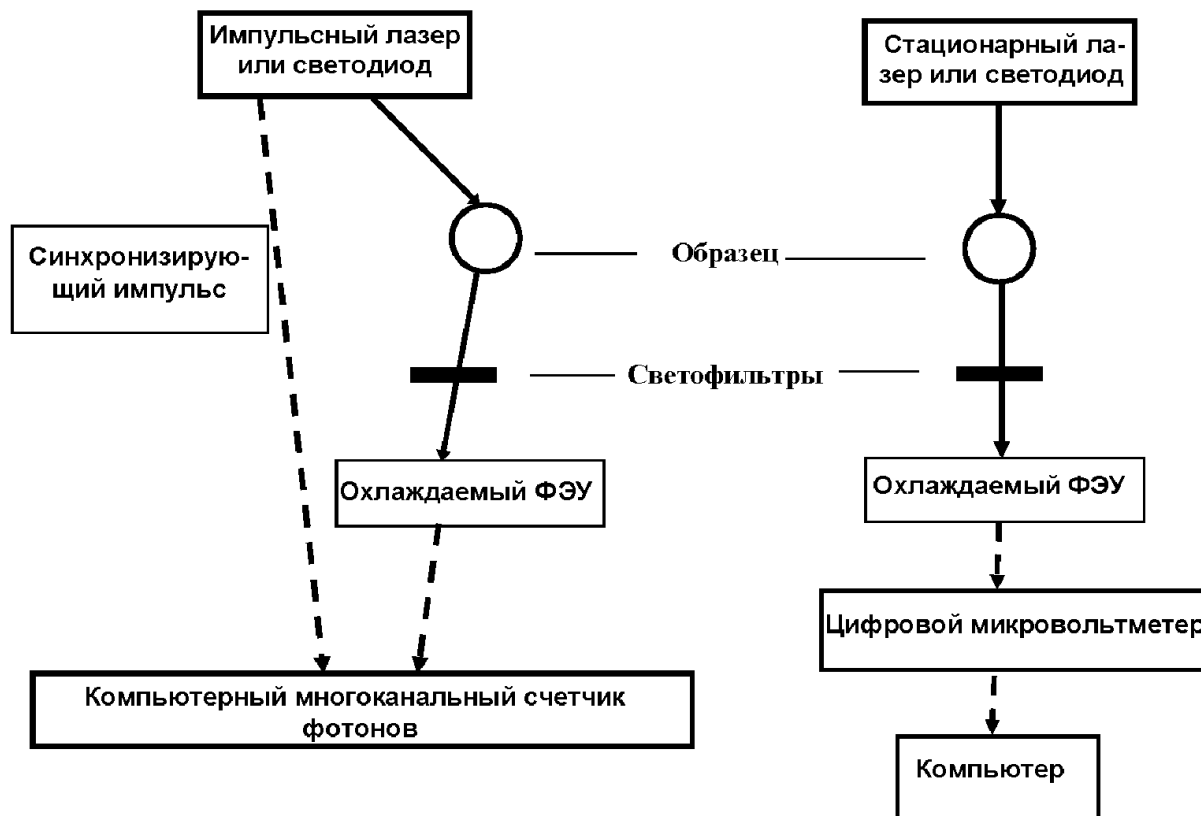


Рис. 2. Блок-схемы лазерных (светодиодных) спектрометров для стационарных и разрешенных во времени измерений ИК (1270 нм) долгоживущей фосфоресценции синглетного кислорода в растворителях, слабо дезактивирующих синглетный кислород

ром 5 мм на поверхности кварцевой кюветы с исследуемым раствором. Интенсивность возбуждающего света контролировали измерителем мощности ThorLabs PM-100D с сенсорной головкой S120VC («Thorlabs», США). В отдельных опытах использовали также диодные лазеры с максимумом испускания 765 нм (полуширина 2 нм, мощность до 1 Вт) («ЛАМИ Гелиос», Россия) и 690 нм (полуширина 3 нм, мощность до 5 Вт) («Милон Лахта», Россия). Мощность излучения измеряли с помощью прибора Ophir ORION-TN с сенсорной головкой 20C-SH («Ophir», Израиль). Фосфоресценцию синглетного кислорода измеряли под углом 90° охлаждаемым фотоумножителем ФЭУ-112 («Экран», Новосибирск, Россия) со спектральной характеристикой С-1 через светофильтры пропускающие ИК свет в области ≥ 950 нм и один из трех сменных интерференционных светофильтров с максимумами пропускания при 1230, 1270 и 1310 нм и полушириной 10 нм. Стационарную интенсивность фосфоресценции измеряли цифровым высокоомным милливольтметром («Эконикс-Эксперт», Россия) и анализировали на персональном компьютере.

Для кинетических измерений использовали импульсный светодиод («Полироник», Россия) с управляющим блоком («Альком Медика», Россия), который позволял облучать образцы монохроматическим светом 405 нм (полуширина полосы – 14 нм). Длительность вспышки – 10 мкс, частота повторения вспышек – 5 или 10 Гц. Средняя мощность возбуждающего света составляла 15–30 мкВт, соответственно энергия одной вспышки равна 3 мкДж. Сигнал фотоумножителя через предусилитель попадал на компьютерную плату, которая работала в двух режимах – разрешенного во времени многоканального счета фотонов или время-разрешенного счета одиночных фотонов («Парсек», Россия). Постоянная времени регистрирующей системы составляла ~10 нс. Запуск счетной платы производится от дополнительного импульса управляющего блока, синхронизированного с импульсом светодиода. Счетная плата разделяла интервал времени между вспышками на 1024 канала. Кинетические кривые получены методом накопления фотоимпульсов в каждом канале. Метод коррелированного во времени счета одиночных фотонов в данной работе не использовался.

Исследуемые растворы помещали в 1 см кварцевую кювету, объем раствора – 1,5 мл. В качестве фотосенсибилизаторов применяли, главным образом, феналенон (другие названия: перинафтенон, 1Н-фенален-1-он), а также в отдельных опытах тетрафенилпорфирин («Aldrich Chemical», Бельгия). Концентрацию феналенона рассчитывали, используя молярный коэффициент в максимуме его поглощения, равный $9700 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ [24]. В некоторых экспериментах, использовали ловушку синглетного кислорода 1,3-дифенилизобензофуран (ДФИБФ) («Acros Organics», Бельгия). Растворителями служили четыреххлористый углерод («Лабтех», Россия), гексафлуоробензол («Пиминвест», Россия) и хладон 113 (1,1,2-Трифтор-1,2,2-трихлорэтан) («Русхимпром», Россия), которые, согласно паспорту, содержали не менее 99,5–99,8% основного вещества. Спектры поглощения измеряли на спектрофотометре СФ-56 («ЛОМО Спектр», Россия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Стационарные измерения. При регистрации сигнала фотоумножителя в режиме измерения постоянного тока мы наблюдали, что освещение насыщенных воздухом растворов феналенона или тетрафенилпорфирина в CCl_4 , C_6F_6 или $\text{C}_2\text{F}_3\text{Cl}_3$, непрерывным или импульсным излучением светодиодов в области $\approx 400 \text{ нм}$ приводит к появлению фосфоресценции $^1\text{O}_2$ со спектральным максимумом 1270 нм (рис. 3). Добавление 50% ацетона, приводящее к резкому уменьшению времени жизни $^1\text{O}_2$, ослабляло фотосенсибилизированную фосфоресценцию примерно в

500 раз (рис. 3). Такое же свечение возникало в этих растворителях без фотосенсибилизаторов при облучении в присутствии воздуха светодиодами в области 400 нм [16, 25, 26]. Однако квантовая эффективность беспигментного свечения на несколько порядков слабее, чем в растворах фотосенсибилизаторов, поэтому оно практически не влияло на суммарную интенсивность фотосенсибилизированной фосфоресценции.

В стационарном режиме собранный спектрометр позволяет регистрировать фосфоресценцию кислорода при облучении беспигментных растворов лазерными диодами 765 и 690 нм (1–3 Вт), длина волны которых соответствовала полосам поглощения кислорода. Способность лазера 765 нм возбуждать фосфоресценцию кислорода уже была описана ранее в работах лаборатории Огилби [27] и наших предшествующих публикациях [22, 23]. В настоящей работе мы сообщаем о возбуждении кислорода также излучением 690 нм (1–3 Вт) (рис. 3) (предварительные данные были представлены ранее [23]). Ацетон ослаблял эту фосфоресценцию (рис. 3), причем интенсивность регистрируемого в присутствии ацетона свечения соответствовала уровню собственной люминесценции кварцевой кюветы. Следует отметить, что на рис. 3 показаны кривые, нормированные по интенсивности к 1.

В реальности квантовая эффективность фотосенсибилизированной фосфоресценции примерно на 5 порядков выше, чем квантовая эффективность фосфоресценции, вызванной темнокрасным светом без фотосенсибилизатора. Анализ механизма свечения, индуцированного темнокрасными лазерами, выходит за рамки настоящей работы и будет представлен в отдельной публикации.

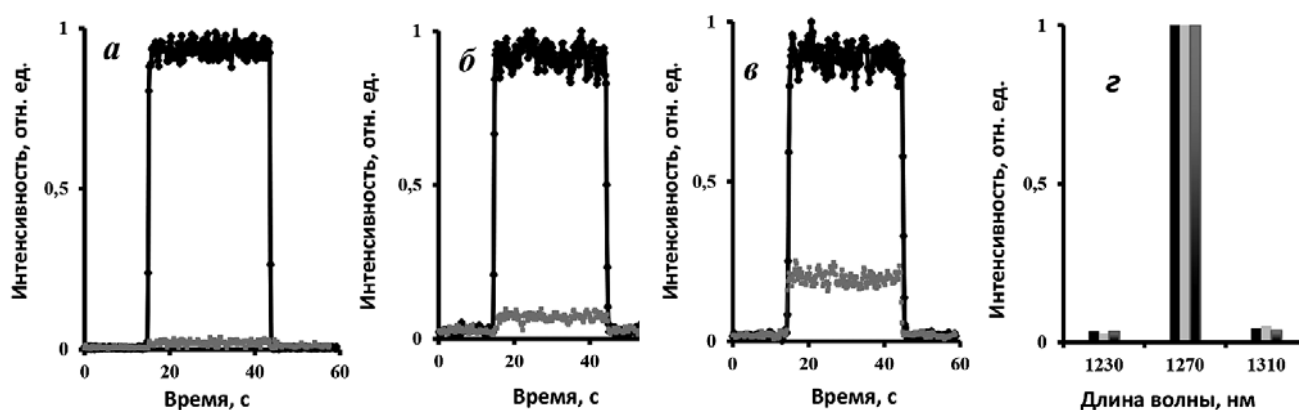


Рис. 3. Интенсивность и спектр фосфоресценции $^1\text{O}_2$ при фотосенсибилизированном (а и г) и прямом (б–в) возбуждении кислорода в насыщенном воздухом четыреххлористом углероде. а – Раствор феналенона при возбуждении светодиодом 399 нм (4 мВт), верхняя кривая без ацетона, нижняя – после добавления 50% ацетона; б – без феналенона при возбуждении кислорода диодным лазером 765 нм (900 мВт); в – без феналенона при возбуждении диодным лазером 690 нм (1–3 Вт). г – Спектры фосфоресценции а–в после вычета свечения, наблюдаемого в присутствии ацетона (слева направо)

Во всех растворителях при стационарном возбуждении 399 нм интенсивность фотосенсибилизированной феноленом фосфоресценции линейно зависела от интенсивности возбуждающего света (I_{ex}) при ее изменении 0,05–4 мВт (данные не показаны). При более высоких интенсивностях наблюдалось некоторое отклонение от линейности, относительно слабое в C_6F_6 , но отчетливо заметное в CCl_4 и фреоне. Например, при максимальной мощности фотодиода (200 мВт) интенсивность фосфоресценции в CCl_4 вдвое меньше, чем следовало бы ожидать при

линейной зависимости от интенсивности возбуждающего света, наблюдаемой при $I_{ex} \leq 4$ мВт.

Кинетические измерения. Кинетические кривые затухания фосфоресценции после возбуждения 10 мкс вспышками светодиода (405 нм), измеренные на установке с разрешенным во времени счетом фотонов, показаны на рис. 4–6. Постоянную времени затухания определяли из тангенса угла наклона кинетических кривых в полулогарифмическом масштабе. Для определения этого параметра из исходной кинетической кривой вычитали усредненный контрольный

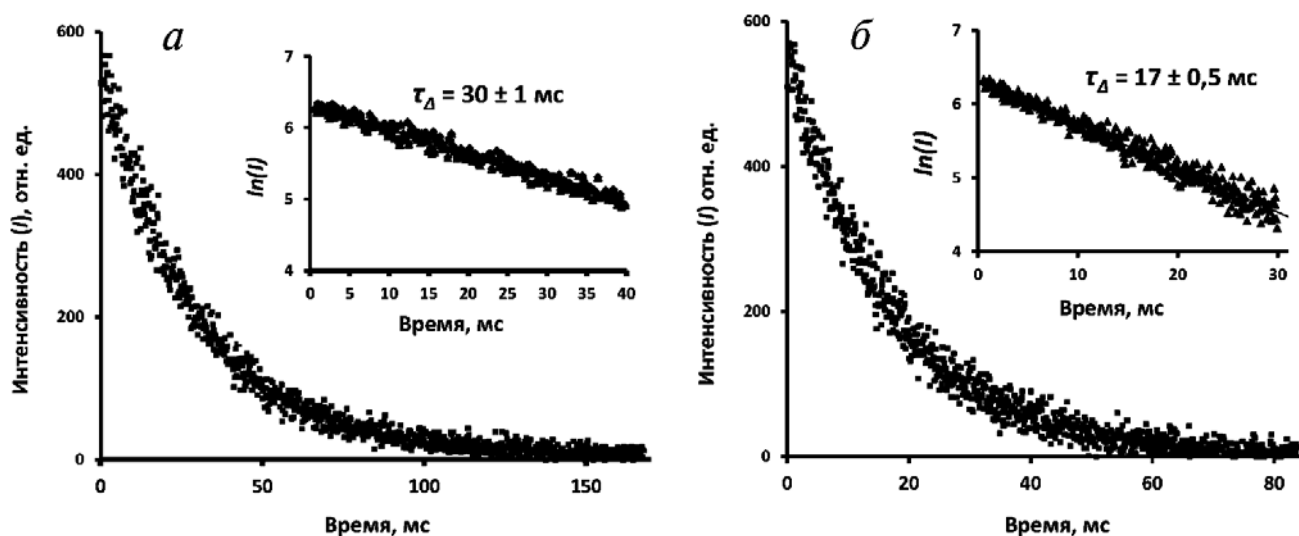


Рис. 4. Кривые затухания фосфоресценции 1O_2 в растворах фенолена (35 мкМ) в CCl_4 после облучения 10 мкс вспышками светодиода (405 нм) в присутствии воздуха (а) и после насыщения кислородом (б). Кривые получены при частоте повторения вспышек 5 Гц в результате 30 мин накопления сигнала. Длительность одного канала 164 мкс. Средняя мощность возбуждающего света 15 мкВт. Во врезке показана кривая затухания в полулогарифмическом масштабе

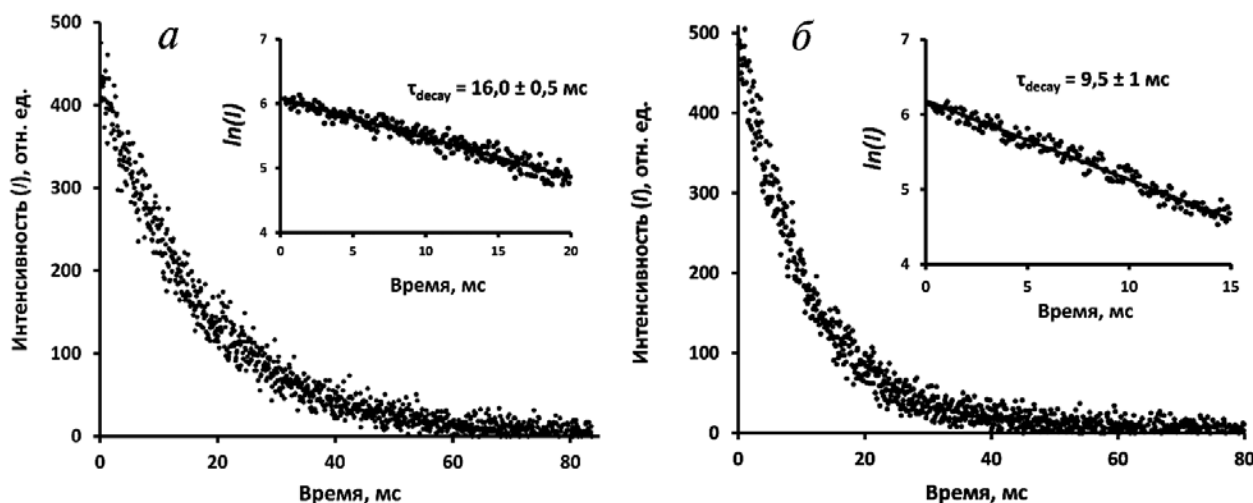


Рис. 5. Кривые затухания фосфоресценции 1O_2 в растворах фенолена (35 мкМ) в гексафторбензоле после облучения 10 мкс вспышками светодиода (405 нм) в присутствии воздуха (а) и после насыщения кислородом (б). Кривые получены при частоте повторения вспышек 10 Гц в результате 20 мин накопления сигнала. Длительность одного канала 82 мкс. Средняя мощность возбуждающего света 30 мкВт. Во врезке показана кривая затухания в полулогарифмическом масштабе

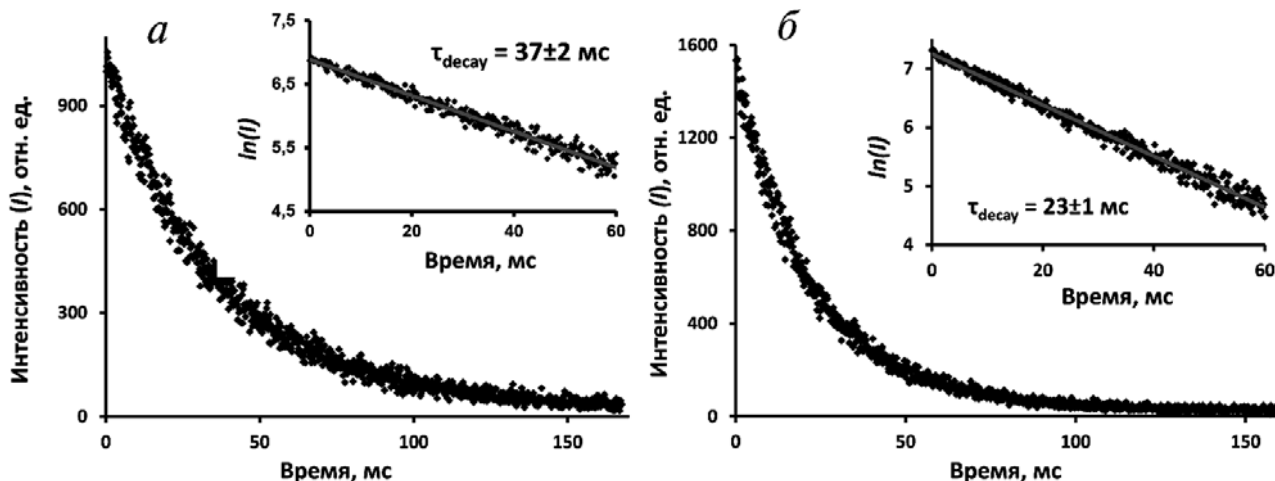


Рис. 6. Кривые затухания фосфоресценции $^1\text{O}_2$ в растворах феналенона (35 мкМ) во фреоне 113 после облучения 10 мкс вспышками светодиода (405 нм) в присутствии воздуха (а) и после насыщения кислородом (б). Кривые получены при частоте повторения вспышек 5 Гц в результате 30 мин накопления сигнала. Длительность одного канала 164 мкс. Средняя мощность возбуждающего света 15 мВт. Во врезке показана кривая затухания в полулогарифмическом масштабе

сигнал люминесценции от кюветы с чистым растворителем при тех же условиях освещения. Первые 10 мкс кинетической кривой не учитывали, так как в этом временном интервале возможен вклад нарастания сигнала из-за дезактивации триплетного состояния фотосенсибилизатора. Отбрасывали также конечный участок кривых, в котором в полулогарифмическом масштабе шумы начинали вносить существенные искажения. Из рисунков видно, что затухание фосфоресценции является экспоненциальным. При концентрации феналенона ~ 30 мкМ в насыщенном воздухе CCl_4 время затухания фосфоресценции равно 30 ± 1 мс (рис. 4). Следовательно, оно совпадает с данными, полученным в наших первоначальных работах [3] и последующих работах Минской группы исследователей [6–8, 11, 12] и вдвое меньше, чем в работах группы Шмидта (59 мс) [13, 14].

В насыщенном воздухе гексафторбензоле (рис. 5) время жизни составило 16 мс. Эта величина совпадает с результатом наших предшествующих измерений, выполненных на установке с фосфороскопом [3, 28] и достаточно близка к последним данным группы Шмидта (21 мс) [13, 14]. В насыщенном воздухе фреоне 113 мы получили время жизни ≈ 37 мс (рис. 6), что вдвое меньше, чем в работе Шмидта (72 ± 5 мс) [13, 14].

Последующие эксперименты посвящены выяснению того, в какой мере полученные значения зависят от концентрации фотосенсибилизатора и кислорода. Из рисунков видно, что насыщение растворов чистым кислородом (путем его барботирования в течение 20 мин), которое приводит к увеличению концентрации кис-

лорода в 4,8 раза, сопровождалось ускорением затухания фосфоресценции в 1,5–1,7 раза. Снижение времени жизни наблюдали также при увеличении концентрации фотосенсибилизатора – феналенона. Как указывалось, аналогичный эффект наблюдали ранее в растворах других фотосенсибилизаторов разной природы [1, 3]. Отсюда можно предположить, что $^1\text{O}_2$ подвергается физическому тушению феналеноном и триплетным кислородом. Процесс тушения можно описать следующим вариантом уравнения Штерна–Фольмера:

$$k_{obs} = k_0 + k_{ox}[\text{O}_2] + k_{ph}[\text{Ph}], \quad (1)$$

где k_{obs} – скорость затухания фосфоресценции ($k_{obs} = 1/\tau_{decay}$) в растворах, содержащих феналенон и кислород; k_0 – скорость затухания в чистом растворителе; k_{ox} и k_{ph} – константы скорости тушения $^1\text{O}_2$ триплетным кислородом или феналеноном. Отсюда получаем:

$$(k_{obs})_{\text{oxygen}} - (k_{obs})_{\text{air}} = k_{ox}([\text{O}_2]_{\text{oxygen}} - [\text{O}_2]_{\text{air}}), \quad (2)$$

значения k_{ox} , рассчитанные с помощью этого уравнения, по данным рис. 5–7 и литературным данным о концентрации кислорода в растворах [29, 30], приведены в табл. 1.

Полученные в наших экспериментах значения k_{ox} в CCl_4 и C_6F_6 разумно коррелируют с данными группы Шмидта и других групп исследователей [13, 14, 31]. Несколько меньшее значение этой константы получено во фреоне. Однако следует отметить, что точные сведения о растворимости кислорода во фреоне, насколько

Таблица 1. Константы скорости тушения $^1\text{O}_2$ триплетным кислородом (k_{ox}) и феналеном (k_{ph}) и константы скорости дезактивации (k_{obs}) и время жизни (τ_Δ) синглетного кислорода в исследованных растворах

Растворитель	$[\text{O}_2]$, М [29, 30]	k_{obs} , c^{-1} * ($\tau_\Delta = 1/k_{obs}$, мс)	k_{ox} , $\text{M}^{-1} \text{c}^{-1}$	$k_0 + k_{ph}[\text{Ph}]$, c^{-1} ** ($\tau = 1/k_0 + k_{ph}[\text{Ph}]$, мс)	$k_{ph} \times 10^{-5}$, $\text{M}^{-1} \text{c}^{-1}$	k_0 , c^{-1} *** ($\tau_0 = 1/k_0$, мс)
CCl_4	2,6; воздух 12,4; кислород	33 (30 мс) 59 (17 мс)	2600	27 (38 мс)	$1,7 \pm 0,3$	~20 (50 мс)
C_6F_6	4,4; воздух 21; кислород	62,5 (16 мс) 105 (9,5 мс)	2600	51 (20 мс)	$1,0 \pm 0,1$	~48 (21 мс)
$\text{C}_2\text{F}_3\text{Cl}_3$	3,2****; воздух 15,4; кислород	27 (37 мс) 44 (23 мс)	1400	22 (45 мс)	$1,0 \pm 0,1$	~19 (53 мс)

* Измерено при концентрации феналенена 35 мкМ.

** Результаты расчета констант затухания и времени жизни $^1\text{O}_2$ в отсутствии кислорода.

*** Результаты расчета констант затухания и времени жизни $^1\text{O}_2$ в отсутствии кислорода и феналенена.

**** Концентрация кислорода получена из данных табл. 2 (см. ниже).

нам известно, отсутствуют. Поэтому для оценки константы k_{ox} мы использовали значения $[\text{O}_2]$, полученные из данных настоящей работы, путем сравнения квантовых выходов фосфоресценции и абсорбционных коэффициентов кислорода. Детали этого расчета описаны ниже (табл. 2). Полученная таким образом константа k_{ox} во фреоне имеет разумную величину, хотя, безусловно, ее значение является оценочным.

Зависимость константы скорости дезактивации фосфоресценции $^1\text{O}_2$ от концентрации феналенена в гексафторбензоле и фреоне 113 хорошо соответствует прямой в координатах Штерна–Фольмера (рис. 7). В четыреххлористом углероде разброс точек оказался существенно более высоким (не показано). Значения k_{ph} , полученные в наших экспериментах, указаны в табл. 1. Эти значения несколько ниже величины, измеренной в нашей лаборатории ранее ($3 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ в CCl_4) [28], и несколько больше величины, приведенной в работах группы Шмидта ($3,5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$) [13, 14].

Радиационные и абсорбционные коэффициенты.

Как известно, измеренное время жизни синглетного кислорода (τ_Δ) характеризуется, главным образом, его безызлучательной дезактивацией, тогда как интенсивность фосфоресценции $^1\text{O}_2$ определяется радиационной константой (k_r), а ее квантовый выход (Φ_r) соответствует уравнению:

$$\Phi_r = k_r \tau_\Delta. \tag{3}$$

Радиационная константа характеризует электронную структуру и состояние молекулы кислорода и, согласно общеизвестному соотношению Эйнштейна, прямо пропорциональна молярному коэффициенту поглощения:

$$\epsilon_{1270} \sim k_r / n^2. \tag{4}$$

Сконструированный нами спектрометр позволил сравнить константы скорости излучательной дезактивации синглетного кислорода в изученных растворителях.

Таблица 2. Относительные значения k_r для ИК полосы излучения $^1\text{O}_2$ и рассчитанные из них относительные значения молярных коэффициентов поглощения в максимуме поглощения кислорода в области 1270 нм (ϵ_{1270}). Сравнение с абсолютными значениями A_{1270} и ϵ_{1270} , полученными методом лазерной фотохимии [22, 34, 35]

Растворитель	n^2	I_Δ/I_{399} , отн. ед. ($\pm 10\%$)	τ_Δ , мс ($\pm 2\%$)	k_r , отн. ед. ($\pm 15\%$)	ϵ_{1270} , отн. ед. ($\pm 15\%$)	$A_{1270} \times 10^5$, (1 см)	$\epsilon_{1270} \times 10^3$, $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$
CCl_4	2,13	1	29,5	1,0	1,0	1,33	5,1
C_6F_6	1,9	0,57	16	0,94	1,05	2,2	5,0
$\text{C}_2\text{F}_3\text{Cl}_3$	1,85	0,92	35	0,68	0,78	1,3	4,0*

* Получено умножением относительной величины ϵ_{1270} во фреоне (нижняя строка в третьем столбце справа) на абсолютную величину ϵ_{1270} в $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ в CCl_4 (верхняя строка в крайнем правом столбце).

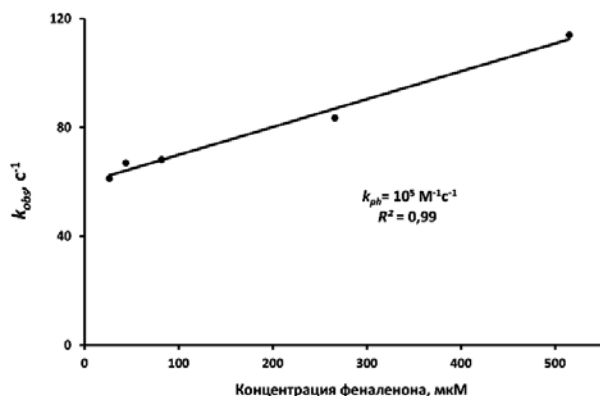


Рис. 7. Тушение фосфоресценции синглетного кислорода феналеном в насыщенном воздухе гексафторбензоле. k_{obs} — константа скорости дезактивации фосфоресценции синглетного кислорода; R^2 — коэффициент детерминации (достоверности)

Для измерений использовали растворы феналена с одинаковой оптической плотностью $0,12 \pm 0,005$ при 399 нм. Константы k_r рассчитывали по следующей формуле для стационарной интенсивности фотосенсибилизированной люминесценции:

$$I_{\Delta} = (K/n^2) \Phi_{\Delta} I_{399} \alpha (1 - 10^{-A_{ph}}) k_r \tau_{\Delta}, \quad (5)$$

где K — коэффициент пропорциональности, учитывающий конструкцию прибора; I_{Δ} и I_{399} — интенсивности (в фотонах в секунду) фотосенсибилизированной фосфоресценции кислорода и возбуждающего света, n — показатель преломления растворителя, Φ_{Δ} — квантовый выход генерации синглетного кислорода феналеном, равный ≈ 1 [24, 32], A_{ph} — оптическая плотность феналена в области возбуждения (399 нм); α — коэффициент показывающий степень перекрытия полосы излучения светодиода и абсорбционной полосы феналена. Отсюда:

$$k_r = (n^2 I_{\Delta} / I_{399}) / \tau_{\Delta} K \Phi_{\Delta} \alpha (1 - 10^{-A_{ph}}), \quad (6)$$

где параметр $K \Phi_{\Delta} \alpha (1 - 10^{-A_{ph}})$ одинаков для всех растворов, поэтому при расчете относительных значений k_r , этот параметр не учитывался. Относительные значения молярного коэффициента поглощения для той же полосы рассчитывали из относительных значений k_r по соотношению Эйнштейна (4).

Полученные значения суммированы в табл. 2. Отношение I_{Δ} / I_{399} и значения k_r и ϵ_{1270} в CCl_4 были приняты за 1. Из таблицы видно, что во всех (изученных в настоящей работе) растворителях константы k_r и ϵ_{1270} имеют близкие значения, лежащие в пределах указанного доверительного

интервала. Есть тенденция к некоторому уменьшению k_r и ϵ_{1270} во фреоне, что отмечалось также ранее [33].

В течение последних 15 лет наша лаборатория разработала фотохимический метод определения оптической плотности (A_{1270} и A_{765}) и молярных коэффициентов поглощения (ϵ_{1270} и ϵ_{765}) в максимумах поглощения кислорода, основанный на кинетическом анализе скорости фотокисления ловушек синглетного кислорода при прямом лазерном возбуждении кислородных молекул [1, 22, 33–35]. Принцип метода иллюстрируется рис. 8.

В последние годы методики измерения и расчетов были нами существенно улучшены за счет разработки метода сравнения скоростей окисления ловушек при прямом (V_{dir} , М/с) и фотосенсибилизированном (V_{psr} , М/с) возбуждении кислорода. Этим методом удалось определить коэффициенты поглощения кислорода, растворенного во многих органических растворителях и в воде [22, 33–35].

Оптическую плотность кислорода A_{1270} (A_{765} в настоящей работе не рассматривается) определяли по следующей формуле:

$$A_{1270} = (V_{dir} / I_{1270}) / (V_{psr} / I_{511}) \Phi_{\Delta} (1 - 10^{-A_{ps}}) / (\alpha_{las} 2,3), \quad (7)$$

в которой I_{1270} и I_{511} — интенсивность прямого лазерного возбуждения кислорода при 1270 нм и

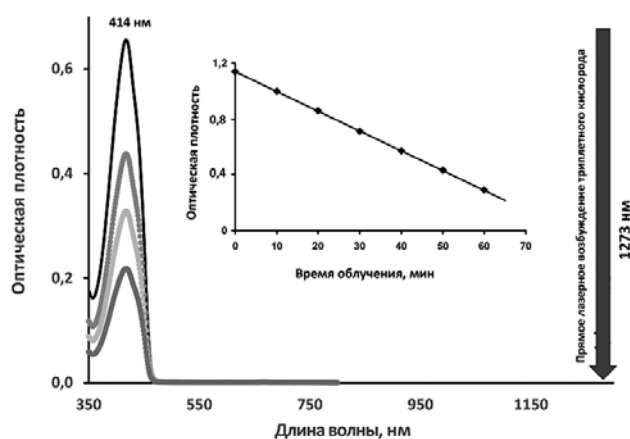


Рис. 8. Принципы регистрации синглетного кислорода методом лазерной фотохимии. Слева показан спектр поглощения ловушки синглетного кислорода 1,3-дифенилизобензофурана (максимум 414 нм), которая выцветает под действием лазерного излучения 1273 нм, соответствующего максимуму поглощения растворенного кислорода. Оптическая плотность кислорода в этом максимуме $\approx 10^{-5}$ [22, 33–35], поэтому в масштабе данного рисунка максимум кислорода не виден

интенсивность возбуждения фотосенсибилизатора (тетрафенилпорфина, ТФП) в фотонах в секунду, Φ_{Δ} – квантовый выход генерации синглетного кислорода порфирином ($\Phi_{\Delta} = 0,73$), A_{ps} – оптическая плотность ТФП на длине волны возбуждения (511 нм), α_{las} – степень перекрытия полосы излучения диодного лазера и спектра поглощения кислорода [22, 34, 35]. Полученные таким образом значения A_{1270} показаны в табл. 2. Поскольку:

$$A_{1270} = \varepsilon_{1270} [O_2]l, \quad (8)$$

где $l = 1$ см, а значения $[O_2]$ указаны в табл. 2, из формулы (8) легко получить ε_{1270} (см. табл. 2).

Растворимость кислорода во фреоне 113 точно не известна (различные оценки были описаны ранее [13,31]). Наши данные (табл. 2) позволяют определить эту величину. Для этой цели использовали значение ε_{1270} в CCl_4 , полученное методом лазерной фотохимии [22, 34, 35]. Величина ε_{1270} во фреоне была получена путем умножения ε_{1270} в CCl_4 на относительное значение ε_{1270} , рассчитанное по фотосенсибилизированной фосфоресценции кислорода. Отсюда, используя A_{1270} во фреоне, измеренную методом лазерной фотохимии и уравнению (8), получаем, что $[O_2] = 3,2$ мМ. В табл. 1 эта величина была использована для расчета константы скорости тушения 1O_2 триплетным кислородом во фреоне. Интересно, что аналогичная процедура после некоторого усовершенствования может быть применена к определению растворимости кислорода в любых средах, допускающих спектральные измерения.

Таким образом, из изложенного следует, что разработанные нами спектрометры позволяют надежно исследовать кинетические параметры фосфоресценции синглетного кислорода в растворителях, в которых время жизни 1O_2 достигает десятков миллисекунд. С технической точки зрения сконструированные спектрометры более совершенны и информативны по сравнению со всеми приборами, использованными ранее для изучения кинетических параметров фосфоресценции кислорода в таких системах. Как указано, кинетические кривые измерены под действием очень низкой интенсивности возбуждающего света (15–30 мкВт), которая на порядки ниже той, которая использовалась ранее. Это исключает вклад нелинейных эффектов, обнаруженных ранее [6]. Временное разрешение фотодетекторной системы (наносекунды) не могло вносить искажений в кинетику затухания. Кинетические измерения, выполненные с помощью этих приборов, привели к тем же значениям

времени жизни синглетного кислорода в CCl_4 (30 мс), которые были получены в наших первых работах [3] и последующих работах Минской школы [6–8, 11–12]. Однако эта величина вдвое меньше значения, полученного группой Шмидта [13, 14]. Во фреоне 113 наши измерения привели к значению времени жизни (37 мс), которое также вдвое меньше величины, полученной группой Шмидта [13, 14]. В гексафторбензоле наши данные и данные группы Шмидта [13, 14] достаточно близки (табл. 1, рис. 5 и 6). В последующих работах других групп были получены значения τ_{Δ} в CCl_4 , лежащие в пределах 14–55 мс [15–18], причем условия их измерения описаны недостаточно подробно для детального анализа. Ранее многие предполагали, что высокие значения τ_{Δ} , полученные группой Шмидта, обусловлены более высокой степенью очистки использованных им растворителей. Действительно, в работах этой группы указано, что «все растворители были очищены многократной хроматографией на колонках с Al_2O_3 ». В наших опытах и в экспериментах других групп были использованы высокоочищенные коммерческие растворители без дополнительной обработки или после перегонки. Однако очевидно, что разработанная группой Шмидта система регистрации и обработки данных несовершенна (см. введение), поэтому нельзя исключить, что затягивание самых медленно затухающих кривых происходило из-за технических проблем. Тем не менее, наши измерения подтверждают наблюдение Шмидта и др. о том, что 1O_2 подвергается тушению триплетным кислородом воздуха и феналеноном. Полученные нами константы скорости тушения, находясь в разумном соответствии с данными Шмидта.

Сравнение квантовых выходов фосфоресценции 1O_2 в растворах феналенона позволили определить относительные значения констант скоростей излучательной дезактивации 1O_2 в исследованных растворителях. Показано, что относительные значения излучательных констант и абсорбционных коэффициентов, измеренных методом лазерной фотохимии, близки. Обоснование этого представления на более широком круге растворителей дано в наших предшествующих работах [1, 22, 33–35]. Кроме того, сконструированные приборы предоставляют новые возможности для исследования генерации и тушения 1O_2 различными соединениями. Как показывает рис. 3, открываются также новые перспективы для исследования генерации синглетного кислорода темно красным светом в аэрированных беспигментных системах.

Финансирование

Работа частично поддержана Программой РАН «Фундаментальные науки – медицине» и грантам и РФФИ (проекты № 15-04-05500 и 19-04-00331).

Благодарности

Авторы благодарят фирму «Инновационные хирургические технологии Ltd», Москва и «Ми-

лон-Лахта, Ltd», С. Петербург за диодные лазеры и техническую помощь.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Красновский А.А., мл. (2015) Синглетный кислород и первичные механизмы фотодинамической и лазерной медицины, *Фундаментальные науки – медицине. Биофизические медицинские технологии* (под ред. А.И. Григорьева и Ю.А. Владимирова), ООО «Макс Пресс», Москва, с. 173–217.
2. Nonell, S., and Flors, C. (Eds.) (2016) *Singlet Oxygen Applications in Biosciences and Nanosciences*, in *Comprehensive series in photochemistry and photobiology*, Vol. 13.
3. Krasnovsky, A.A., Jr. (1979) Photoluminescence of singlet oxygen in pigment solutions, *Photochem. Photobiol.*, **29**, 29–36.
4. Krasnovsky, A.A., Jr. (1993) Detection of photosensitized singlet oxygen luminescence in systems of biomedical importance. Steady-state and time-resolved spectral measurements based on application of S-1 photomultiplier tubes, *SPIE Proceedings*, **1887**, 177–186.
5. Merkel, P.V., and Kearns, D.R. (1972) Radiationless decay of singlet molecular oxygen in solution. An experimental and theoretical study of electronic-to-vibrational energy transfer, *J. Am. Chem. Soc.*, **94**, 7244–7253.
6. Салохиудинов К.И., Бытева И.М., Джагаров Б.М. (1979) Длительность люминесценции синглетного кислорода в растворах при импульсном лазерном возбуждении, *Опт. спектр.*, **47**, 881–886.
7. Byteva, I.M., and Gurinovich, G.P. (1979) Sensitized luminescence of oxygen in solutions, *J. Luminescence*, **21**, 17–20.
8. Бытева И.М. (1979) Исследование люминесценции кислорода в растворах методом импульсной спектроскопии, *Журн. прикл. спектр.*, **31**, 333–335.
9. Schmidt, R., and Brauer, H.-D. (1987) Radiationless deactivation of singlet oxygen ($^1\Delta_g$) by solvent molecules, *J. Am. Chem. Soc.*, **109**, 6976–6981.
10. Schmidt, R. (1989) Influence of heavy atoms on the deactivation of singlet oxygen ($^1\Delta_g$) in Solution, *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 6983–6987.
11. Losev, A.P., Byteva, I.M., and Gurinovich, G.P. (1988) Singlet oxygen luminescence yield in organic solvents and water, *Chem. Phys. Lett.*, **143**, 127–129.
12. Лосев А.П., Бытева И.М., Гуринович Г.П. (1989) Деактивация синглетного кислорода в CCl_4 и CS_2 , *Хим. физика*, **8**, 732–739.
13. Afshari, E., and Schmidt, R. (1991) Isotope-dependent quenching of singlet molecular oxygen ($^1\Delta_g$) by ground-state oxygen in several perhalogenated solvents, *Chem. Phys. Lett.*, **184**, 128–132.
14. Schweitzer, C., and Schmidt, R. (2003) Physical mechanisms of generation and deactivation of singlet oxygen, *Chem. Rev.*, **103**, 1685–1757.
15. Багров И.В., Белоусова И.М., Данилов В.М., Киселев В.М., Муравьева Т.Д., Соснов Е.Н. (2007) Фотоиндуцированное тушение люминесценции синглетного кислорода в растворах фуллеренов, *Опт. спектр.*, **102**, 58–65.
16. Багров И.В., Киселев В.М., Кисляков И.М., Соснов Е.Н. (2014) Прямое оптическое возбуждение синглетного кислорода в органических растворителях, *Опт. спектр.*, **116**, 609–618.
17. Wang, J., Leng, J., Yang, H., Sha, G., and Zhang, C. (2014) Luminescence properties and kinetic analysis of singlet oxygen from fullerene solutions, *J. Luminescence*, **149**, 267–271.
18. Hasebe, N., Suzuki K., Horiuchi, H., Suzuki, H., Yoshihara, T., Okutsu, T., and Tobita, S. (2015) Absolute phosphorescence quantum yields of singlet molecular oxygen in solution determined using an integrating sphere instrument, *Anal. Chem.*, **87**, 2360–2366.
19. Егоров С.Ю., Красновский А.А., мл. (1983) Фотосенсибилизированная люминесценция кислорода при импульсном лазерном возбуждении. Кинетика затухания в водных растворах, *Биофизика*, **28**, 497–498.
20. Krasnovsky, A.A., Jr., Egorov, S.Yu., Nasarova, O.V., Yartsev E.I., and Ponomarev, G.V. (1988) Photosensitized formation of singlet molecular oxygen in solutions of water-soluble porphyrins. Direct luminescence measurements, *Studia biophys.*, **124**, 123–142.
21. Egorov, S.Yu., Kamalov, V.F., Koroteev, N.I., Krasnovsky, A.A., Jr., Toleutaev, B.N., and Zinukov, S.V. (1989) Rise and decay kinetics of photosensitized singlet oxygen luminescence in water. Measurements with nanosecond time-correlated photon counting technique, *Chem. Phys. Lett.*, **163**, 421–424.
22. Krasnovsky, A.A., and Kozlov, A.S. (2017) Laser photochemistry of oxygen. Application to studies of the absorption spectra of dissolved oxygen molecules, *J. Biomed. Photon. Engin.*, **3**, 1–10.
23. Benditkis, A.S., Kozlov, A.S., Goncharov, S.E., and Krasnovsky, A.A., Jr. (2018) Absorption of dark red laser light by oxygen molecules in organic media. Results of photochemical and luminescence measurements, in *Proc. International Conference on laser optics, IEEE Xplor Digital library*, p. 598, doi: org/10.1109/LO.2018.8435689.
24. Oliveros, E., Suardi-Murasecco, P., Aminian-Saghafi, T., and Braun, A.M. (1991) 1H-Phenalen-1-one: photophysical properties and singlet oxygen production, *Helv. Chim. Acta*, **74**, 79–90.
25. Krasnovsky, A.A., Jr., Sukhorukov, V.L., Egorov, S.Yu., and Potapenko, A.Ya. (1986) Generation and quenching of singlet molecular oxygen by furocoumarins. Direct luminescence measurements, *Studia Biophys.*, **114**, 149–158.
26. Scurlock, R.D., and Ogilby, P.R. (1989) Singlet molecular oxygen ($^1\Delta_g O_2$) formation upon irradiation of an oxygen ($^3\Sigma_g^- O_2$) organic molecule charge-transfer absorption band, *J. Phys. Chem.*, **93**, 5493–5500.
27. Bregnhøj, M., Kræghøj, M.V., Serensen, R. J., Westberg, M., and Ogilby, P.R. (2016) Solvent and heavy-atom effects on the $O_2(X^3\Sigma_g^-) \rightarrow O_2(b^1\Sigma_g^+)$ absorption transition, *J. Phys. Chem. A*, **120**, 8285–8296.

28. Красновский А.А., мл., Неверов К.В. (2010) О механизме фотосенсибилизированной люминесценции димолей синглетного кислорода в насыщенных растворах пигментов, *Биофизика*, **55**, 389–393.
29. Batino, R., Rettich, T.R., and Tominaga, T. (1983) The solubility of oxygen and ozone in liquids, *J. Phys. Chem. Ref. Data*, **12**, 163–178.
30. Murov, S.L., Chermichael, I., and Hug, G.L. (1993) *Handbook of Photochemistry*, Marcel Dekker Inc., New York, Basel, Hong Kong.
31. Matheson, I.B.C., Lee, J., Yamanashi, B.S., and Wolbarsht, M.L. (1974) Measurement of the Absolute Rate Constants for Singlet Molecular Oxygen ($^1\Delta_g$) Reaction with 1,3-diphenylisobenzofuran and physical quenching by ground state molecular oxygen, *J. Am. Chem. Soc.*, **96**, 3343–3358.
32. Schmidt, R., Tanelian, C., Dunsbach, R., and Wolff, C.J. (1994) Phenalenone, a universal reference compound for the determination of yields of singlet oxygen $O_2(^1\Delta_g)$ sensitization, *J. Photochem. Photobiol. A Chem.*, **79**, 11–17.
33. Krasnovsky, A.A., Jr. Roumbal, Ya.V., Ivanov, A.V., and Ambartzumian, R.V. (2006) Solvent dependence of the steady-state rate of 1O_2 generation upon excitation of dissolved oxygen by cw 1267 nm laser radiation in air-saturated solutions. Estimates of the absorbance and molar absorption coefficients of oxygen at the excitation wavelength, *Chem. Phys. Lett.*, **430**, 260–264.
34. Krasnovsky, A.A., Jr., and Kozlov, A.S. (2014) New approach to measurement of IR absorption spectra of dissolved oxygen molecules based on photochemical activity of oxygen upon direct laser excitation, *Biofizika*, **59**, 199–205.
35. Krasnovsky, A.A., Jr., and Kozlov, A.S. (2016) Photonics of dissolved oxygen molecules. Comparison of the rates of direct and photosensitized excitation of oxygen and reevaluation of the oxygen absorption coefficients, *J. Photochem. Photobiol., A Chemistry*, **329**, 167–174.

KINETIC MEASUREMENTS OF SINGLET OXYGEN PHOSPHORESCENCE IN SOLVENTS LACKING HYDROGEN ATOMS USING THE METHOD OF TIME-RESOLVED PHOTON COUNTING

A. A. Krasnovsky^{1,2*}, A. S. Benditkis¹, and A. S. Kozlov¹

¹ Federal Research Center of Biotechnology, Bach Institute of Biochemistry, Russian Academy of Sciences, 119071 Moscow, Russia;
E-mail: phoal@mail.ru

² Lomonosov Moscow State University, Department of Biology, 119234 Moscow, Russia

Received September 2, 2018

Revision received October 29, 2018

Accepted October 29, 2018

Solvents lacking hydrogen atoms, in which the lifetime of singlet oxygen reaches tens milliseconds, are very convenient model for elucidation of properties of singlet oxygen. Measurement of intrinsic IR phosphorescence of singlet oxygen at 1270 nm is the most reliable method of singlet oxygen detection. However, for efficient application of the phosphorescence method to this model, an equipment for reliable measurements of the phosphorescence kinetic parameters in millisecond range under low rates of singlet oxygen generation is required. The present paper describes recently designed in our laboratory highly sensitive LED (laser) spectrometer for steady-state and time-resolved measurements of the millisecond phosphorescence of singlet oxygen. In the steady-state mode, this spectrometer enables detection of singlet oxygen phosphorescence under direct excitation of oxygen molecules in the region of its dark red absorption bands at 690 and 765 nm. For kinetic measurements, the method of time-resolved photon counting was applied using phenalenone as a photosensitizer and LED microsecond pulses of mean energy $\leq 50 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ for excitation. Using this spectrometer, the lifetime of singlet oxygen and quenching of singlet oxygen by dissolved molecules of oxygen and phenalenone were measured in air-saturated CCl_4 , C_6F_6 and Freon 113. The relative values of the radiative rate constants of singlet oxygen in these media were obtained. The results were compared with the values of the absorption coefficients of oxygen, determined by our group using methods of laser photochemistry. Critical discussion of the obtained results and the data of other researchers is presented.

Keywords: singlet oxygen, phosphorescence, LED (laser) spectrometer, time-resolved photon counting, lifetime, quenching by oxygen, absorption coefficients of oxygen molecules, solvents lacking hydrogen atoms