

/ ———.

УДК 535.37:541.14

К.Н. КАПЛЕВСКИЙ, М.П. САМЦОВ, А.С. СТАШЕВСКИЙ, В.А. ГАЛИЕВСКИЙ, Д.С. ТАРАСОВ, Е.С. ВОРОПАЙ

ГЕНЕРАЦИЯ СИНГЛЕТНОГО КИСЛОРОДА ИНДОТРИКАРБОЦИАНИНОВЫМ КРАСИТЕЛЕМ НІТСІ

Quantum yields of the singlet oxygen generation by the indotricarbocyanine dye НІТСІ in ethanol and chloroform were specified. It was found that, when the dye molecules are present in solution only in the form of contact ion pairs, the quantum yield of the singlet oxygen generation is significantly higher for the compounds having a heavy atom (I) in the anion.

Исследования последних лет показали перспективность использования индотрикарбоцианиновых красителей в качестве фотосенсибилизаторов для фотохимиотерапии онкологических заболеваний [1]. Одним из основных механизмов повреждения опухолей при фотохимиотерапии является образование высокоактивных форм молекулярного кислорода посредством переноса энергии электронного возбуждения от фотосенсибилизатора на молекулу кислорода, в результате чего кислород из основного триплетного состояния переходит в возбужденное синглетное. Полученный таким образом синглетный кислород $^1\text{O}_2$ при взаимодействии с биологическими объектами приводит к их гибели.

В отечественной и зарубежной литературе имеется ряд научных публикаций, посвященных исследованию эффективности генерации синглетного кислорода индотрикарбоцианиновыми красителями [2, 3]. Однако зачастую приведенные в них значения квантового выхода генерации синглетного кислорода различаются на порядки. Среди факторов, которые искажают значение выхода, можно выделить использование света неоптимального спектрального диапазона для возбуждения фотосенсибилизаторов и отсутствие эталонных соединений, способных к генерации $^1\text{O}_2$ при возбуждении светом в ближнем

ИК-диапазоне. В некоторых работах квантовый выход генерации синглетного кислорода при фотосенсибилизации индотрикарбозианиновыми красителями определялся с помощью химических методов [3]. Однако надежность такой информации существенно ограничивается тем, что химические ловушки, тушители и активаторы $^1\text{O}_2$ взаимодействуют не только с синглетным кислородом, но также со свободными радикалами, перекисями, возбужденными молекулами фотосенсибилизаторов. В связи с этим химические методы обнаружения $^1\text{O}_2$ не всегда дают ясное представление об образовании синглетного кислорода в исследуемых процессах.

В данной работе на основании анализа параметров фосфоресценции синглетного кислорода проведены исследования фотосенсибилизирующей способности хорошо известного индотрикарбозианинового красителя НТСИ [4] с целью уточнения величины квантового выхода генерации им $^1\text{O}_2$. Полученные результаты представляют практический интерес для изучения фотосенсибилизирующей активности новых, синтезированных для фототерапевтических применений, индотрикарбозианиновых красителей.

Материал и методика

Объектом исследования выступил известный индотрикарбозианиновый краситель 1,3,3;1',3',3'-гексаметил-2,2'-индотрикарбозин иодид (НТСИ) и его катионный аналог с противоионом ClO_4^- . Оба соединения синтезированы в лаборатории спектроскопии НИИПФП им. А.Н. Севченко БГУ. Чистота красителей контролировалась путем хроматомасс – ВЖХ.

Использовавшиеся в качестве растворителей этанол и хлороформ предварительно очищали по стандартным методикам.

Спектры поглощения исследуемых веществ измеряли на спектрофотометрах PV 1251A (SOLAR), Cary 500 Scan (Varian) и MC 122 (Proscan). Основным прибором для спектрально-люминесцентных измерений являлся модернизированный спектрофлуориметр Fluorolog. Люминесценцию синглетного кислорода регистрировали на уникальных установках, созданных в лаборатории фотоники молекул Института физики НАН Беларуси [5, 6].

Квантовый выход образования синглетного кислорода Φ_Δ определяли относительным методом путем регистрации кинетик его фосфоресценции в спектральной области 1,27 мкм:

$$\Phi_\Delta = \Phi_{\Delta \text{ст}} \cdot I(0) / I(0)_{\text{ст}} \cdot (1 - 10^{-D})_{\text{ст}} / (1 - 10^{-D}),$$

где $I(0)$ и $I(0)_{\text{ст}}$ – интенсивности, которые определялись подбором по методу наименьших квадратов к полученным кинетикам затухания фосфоресценции кислорода функции вида $I(0) \cdot \exp(-t/\tau)$; D – оптическая плотность раствора на длине волны возбуждения λ .

5, 10, 15, 20-Тетраakis(4-N-метилпиридил)порфирина (TMPyP) служил стандартом в этанольных растворах ($\Phi_\Delta = 77 \pm 4\%$) [7], в хлороформе использовался тетрафенилпорфин (ТФП), для которого $\Phi_\Delta = 74 \pm 5\%$.

Индотрикарбозианиновые соединения обладают типичной интенсивной полосой поглощения с максимумом около 750 нм. В кинетических экспериментах довольно распространенным источником возбуждения является Nd:YAG лазер с длиной волны 532 нм. Однако для исследуемых соединений поглощение на указанной длине волны пренебрежимо мало. В поисках оптимальных условий возбуждения апробировались импульсный Ti:сапфировый лазер [5] и полупроводниковый лазерный диод [6].

Длина волны генерации твердотельного Ti:сапфирового лазера LT-2211 (LOTIS TII Ltd.), накачиваемого 2-й гармоникой излучения Nd:YAG лазера LS-2134 (LOTIS TII Ltd.), составляла 750 нм.

Вероятность того, что синглетный кислород перейдет в основное состояние с испусканием кванта света, очень мала. Поэтому для получения удовлетворительного соотношения сигнал/шум необходимо обеспечить достаточно большое число импульсов, что при частоте повторения 15 Гц требует значительного (~10 мин) времени на одно измерение. В качестве альтернативного варианта можно повышать энергию лазерных импульсов, что является приемлемым лишь для фотостабильных образцов. Для оценки оптимальных условий регистрации были проведены три последовательных измерения одного и того же образца. Испытания свидетельствуют, что в случае минимальной энергии накачки, при которой Ti:сапфировый лазер генерирует стабильные импульсы (~5 мДж), и регистрации сигнала $^1\text{O}_2$ от 1000 импульсов для раствора НТСИ в хлороформе при каждом последующем измерении амплитуда сигнала уменьшалась примерно в два раза. Последующая проверка поглощения показала, что концентрация молекул сенсibilизаторов уменьшилась примерно в два раза. Следовательно, используемая энергия импульсов Ti:сапфирового лазера была большой и это приводило к фоторазрушению исследованных красителей.

Длина волны генерации полупроводникового лазера 667 нм также подходит для возбуждения индотрикарбонацианиновых сенсibilизаторов. Питание лазера осуществляется прямоугольными импульсами тока с плавно регулируемой длительностью от 1 до 100 мкс. Частота повторения импульсов могла варьироваться в диапазоне 0–100 кГц. Крутизна фронтов нарастания и затухания оптического импульса не превышает 100 нс. Поскольку характерные времена жизни синглетного кислорода составляют единицы – сотни микросекунд, то импульсы с такой длительностью фронта затухания можно использовать для возбуждения образцов при измерениях кинетик люминесценции синглетного кислорода.

В применяемом диодном лазере существует два способа повышения энергии импульсов возбуждения: увеличение тока через переход, где происходит генерация излучения, либо длительности возбуждающего прямоугольного импульса.

Подбор оптимальных условий осуществлялся сначала путем увеличения тока накачки диода при постоянной длительности импульса 1 мкс. При максимальном токе сигнал $^1\text{O}_2$ для раствора НТСИ в хлороформе оказался очень слабым даже при большом количестве накоплений. Затем изменялась длительность прямоугольных импульсов при постоянном (среднем) токе накачки (результаты приведены на рис. 1). Количество импульсов для получения каждой кинетической кривой равнялось $20 \cdot 10^3$.

Видно, что с увеличением длительности импульсов накачки амплитуда сигнала существенно возрастает. Однако при достаточно большой длительности и, следовательно, при большой энергии возбуждения искажается форма кинетики синглетного кислорода: затухание сигнала в значительной мере отклоняется от моноэкспоненциальной функции. Оценки показали, что заметных искажений при возбуждении импульсами с длительностью, не превышающей 20 мкс, не наблюдается.

Для корректной регистрации кинетики свечения $^1\text{O}_2$ необходимо, чтобы период следования возбуждающих импульсов в 10 раз превышал время жизни синглетного кислорода. В частности, в хлороформе время жизни составляет 248 ± 6 мкс, поэтому частота следования лазерных импульсов устанавливалась равной 400 Гц.

И наконец, определялась фотостабильность образцов при данном режиме возбуждения (средний ток, частота 400 Гц, длительность импульсов 20 мкс). Три последовательно зарегистрированных сигнала от тестового образца практически совпали между собой. При этом произошло лишь незначительное (менее 3 %) уменьшение поглощения.

Таким образом, проведенными исследованиями было установлено, что для получения качественных сигналов синглетного кислорода и последующего надежного определения эффективности образования $^1\text{O}_2$ индотрикарбонацианиновыми красителями в хлороформе предпочтительнее использовать диодный лазер со следующими параметрами: ток 1А, частота 400 Гц, длительность импульсов 20 мкс, количество повторений $25 \cdot 10^3$. В указанных условиях энергия импульса составляет около 5 мкДж, что на три порядка меньше, чем в экспериментах с Ti:сапфировым лазером.

В результате аналогичного подбора условий возбуждения/регистрации для этанольных растворов установлены следующие параметры: ток 1А, частота 5 кГц, длительность импульсов 8 мкс, количество повторений $50 \cdot 10^4$. Соответственно энергия возбуждения равнялась 2 мкДж.

Полученные кинетики люминесценции $^1\text{O}_2$ аппроксимировались одноэкспоненциальной функцией для определения амплитуды и длительности затухания сигнала. Дополнительно строилась зависимость амплитуды от силы тока питания диода, чтобы, во-первых, удостовериться в отсутствии нелинейных процессов при используемых условиях проведения эксперимента, во-вторых, сравнить между собой получаемые коэффициенты при первой степени аргумента для более точного определения квантовых выходов образования синглетного кислорода.

Экспериментальные результаты

Спектры поглощения пары исследованных соединений в малополярном хлороформе и в высокополярном этаноле практически не отличаются по форме и положению (рис. 2). Спектры флуоресценции и

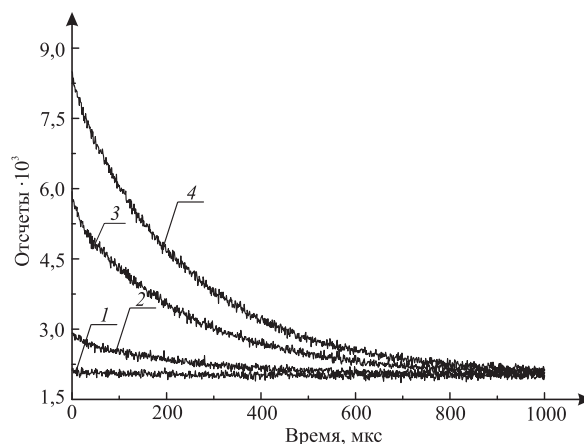


Рис. 1. Зависимость амплитуды сигнала синглетного кислорода в хлороформе от длительности прямоугольного возбуждающего импульса: 1 – 1 мкс; 2 – 10; 3 – 50; 4 – 100 мкс

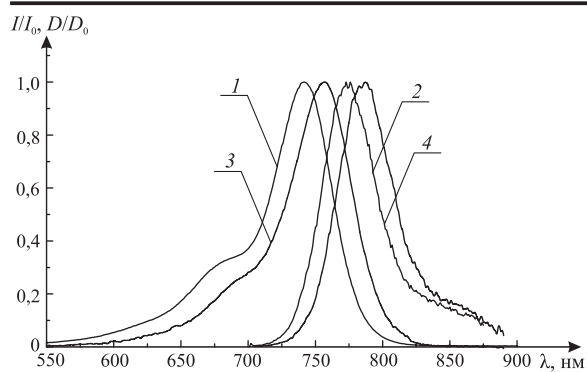


Рис. 2. Спектры поглощения (1, 3) и флуоресценции (2, 4) НИТСИ в этаноле (1, 2) и в хлороформе (3, 4)

возбуждения флуоресценции этих красителей не зависят от длины волны возбуждения и регистрации. Квантовые выходы и время жизни флуоресценции для обоих соединений в одном и том же растворителе имеют одинаковые значения (табл. 1). Относительно небольшая величина полуширины спектра поглощения красителей в хлороформе и этаноле, моноэкспоненциальность кинетики затухания флуоресценции свидетельствуют об одном поглощающем и испускающем центре. При совпадении спектрально-флуоресцентных характеристик катионных аналогов квантовый выход генерации синглетного кислорода для НИТСИ в хлороформе в 19 раз выше, чем для его катионного аналога с анионом ClO_4^- (табл. 2). Вместе с тем в этаноле величина Φ_Δ одинакова для обоих красителей и более чем в 16 раз меньше, чем для красителя с анионом Γ^- в хлороформе. Несмотря на меньшую вероятность и длительность люминесценции синглетного кислорода в этаноле по сравнению с хлороформом, сигнал, соответствующий квантовому выходу образования $^1\text{O}_2$ менее 1 %, надежно регистрировался (рис. 3). Как было показано в [8], основной механизм сенсibilизации полиметиновыми красителями кислорода – безызлучательный перенос энергии от молекул красителей в триплетном состоянии. В связи с этим Φ_Δ является параметром, значение которого определяется выходом молекул красителя в триплетное состояние. При наличии в анионе красителя тяжелого атома и при условии, что его молекулы в растворе находятся в виде контактных ионных пар, можно ожидать увеличения вероятности интеркомбинационной конверсии вследствие эффекта внешнего тяжелого атома [8]. В связи с близким расположением катиона и аниона в контактных парах такой эффект должен проявляться и при малых концентрациях красителя. В то же время для этого же соединения, но для условий, при которых произошла диссоциация молекул на ионы, наличие тяжелых атомов в анионе не должно сказываться на вероятности интеркомбинационной конверсии при тех же концентрациях.

Таблица 1

Спектральные характеристики исследованного красителя в растворах

Анион	Растворитель	$\lambda_{\text{max}}^{\text{abs}}$, нм	$\Delta\lambda_{1/2}^{\text{abs}}$, нм	$\lambda_{\text{max}}^{\text{f}}$, нм	$\Delta\lambda_{1/2}^{\text{f}}$, нм	τ , нс	Φ_f
ClO_4^-	Хлороформ	755	60	785	49	1,8	0,36
	Этанол	742	53	773	48	1,3	0,28
Γ^-	Хлороформ	755	63	785	49	1,8	0,36
	Этанол	742	53	773	48	1,3	0,28

Таблица 2

Квантовые выходы образования синглетного кислорода исследуемыми соединениями

Соединение	Φ_Δ , % в этаноле	Φ_Δ , % в хлороформе
ТМРур	77±4	–
ТФП	–	74±5
НИТСИ	0,6±0,1	9,5±1,0
Аналог НИТСИ с анионом ClO_4^-	0,6±0,1	0,5±0,1

Следует отметить, что, по данным [8], заметное увеличение населенности триплетного состояния для красителя НИТСИ в этаноле наблюдалось при введении в раствор дополнительного вещества – иодистого калия, но только при его концентрации, превышающей 10^{-2} М. Полученные в настоящей работе результаты с учетом концентрации растворов 10^{-6} М свидетельствуют о том, что в неполярных растворителях для содержащего иод красителя эффективность интеркомбинационной конверсии выше по сравнению с катионным аналогом с анионом ClO_4^- и больше выход генерации $^1\text{O}_2$. Следовательно, в таких растворителях проявляется влияние противоиона иода, что возможно только при достаточно близком расположении аниона к полиметиновой цепи катиона красителя. Последнее утверждение обосновано приведенными в [9] данными для симметричных полиметиновых красителей, где показано, что значительное увеличение (более чем в 30 раз) выхода молекул в триплетное состояние наблюдается при замещении водорода атомом иода в мезоположении полиметиновой цепи. А при

замещении в концевых группах катиона красителя атома фтора иодом – к увеличению населенности триплетного состояния только примерно в 3 раза. В этом плане совпадение выхода генерации $^1\text{O}_2$ для обоих красителей в этаноле при той же концентрации (10^{-6} М) свидетельствует об отсутствии влияния тяжелого атома аниона и полной диссоциации молекул красителя на свободные ионы в полярном растворителе. Следовательно, для обоих исследованных красителей, у которых проявляется один поглощающий и флуоресцирующий центр, различия в значениях квантового выхода генерации синглетного кислорода в хлороформе также обусловлены присутствием красителя в растворе в виде контактных ионных пар. Следует отметить, что в этаноле величина Φ_{Δ} для обоих красителей более чем в 16 раз меньше, чем для красителя НІТСІ в хлороформе. Такое соотношение значений этого параметра согласуется с представлениями о более высоком квантовом выходе образования синглетного кислорода для молекул индотрикарбоцианиновых красителей в форме контактных ионных пар (в малополярных растворителях) по сравнению с красителями в форме свободных ионов (в высокополярных растворителях).

* * *

Таким образом, были уточнены квантовые выходы генерации синглетного кислорода известными полиметиновыми красителями в органических растворителях разной полярности. В дальнейшем эти соединения могут быть использованы в качестве стандартов для исследования фотосенсибилизирующей активности новых соединений, поглощающих в ближнем ИК-диапазоне. В случае присутствия в растворах НІТСІ только контактных ионных пар значение квантового выхода генерации красителем синглетного кислорода выше вследствие проявления эффекта внешнего тяжелого атома, в качестве которого выступает собственный анион молекул красителя.

Авторы благодарят заведующего лабораторией фотоники молекул Института физики НАН Беларуси Б.М. Джагарова за возможность использования разработанного под его руководством оборудования по регистрации люминесценции синглетного кислорода.

Исследование выполнено в рамках проекта БРФФИ Ф11-049 и ГПНИ Республики Беларусь «Фотоника» (задание 2.3.01).

1. Воропай Е.С., Самцов М.П., Каплевский К.Н. и др. // Изв. РАН. Сер. физ. 2007. Т. 71. № 1. С. 145.
2. Воропай Е.С., Самцов М.П., Каплевский К.Н., Мельников Д.Г. // ЖПС. 2008. Т. 75. № 5. С. 684.
3. Delaey E., Laar F., Vos D. et al. // J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 2000. Vol. 55. № 1. P. 27.
4. Земский В.И., Колесников Ю.Л., Мешковский И.К. Физика и техника импульсных лазеров на красителях. СПб., 2005. С. 13.
5. Галиевский В.А., Шашевский А.С., Киселев В.В. и др. // Приборы и техника эксперимента. 2010. № 4. С. 109.
6. Шашевский А.С., Галиевский В.А., Джагаров Б.М. // Приборы и методы измерений. 2011. № 1 (2). С. 25.
7. Frederiksen P.K., McIlroy S.P., Nielsen C.B. et al. // J. Am. Chem. Soc. 2005. Vol. 127. P. 255.
8. Воропай Е.С., Самцов М.П. // Оптика и спектроскопия. 1987. Т. 62. С. 64.
9. Кузьмин В.А., Дарманян А.П., Широкова Н.И. и др. // Изв. АН СССР. Сер. хим. 1978. Т. 3. С. 581.

Поступила в редакцию 02.03.12.

Кирилл Николаевич Каплевский – кандидат физико-математических наук, доцент кафедры лазерной физики и спектроскопии.

Михаил Петрович Самцов – доктор физико-математических наук, доцент, заведующий лабораторией спектроскопии НИИПФП им. А.Н. Севченко БГУ.

Александр Сергеевич Шашевский – аспирант Института физики НАН Беларуси. Научный руководитель – доктор физико-математических наук, профессор, заведующий лабораторией фотоники молекул Института физики НАН Беларуси Б.М. Джагаров.

Виктор Антонович Галиевский – кандидат физико-математических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории фотоники молекул Института физики НАН Беларуси.

Дмитрий Сергеевич Тарасов – аспирант кафедры лазерной физики и спектроскопии. Научный руководитель – М.П. Самцов.

Евгений Семенович Воропай – доктор физико-математических наук, профессор, заведующий кафедрой лазерной физики и спектроскопии.

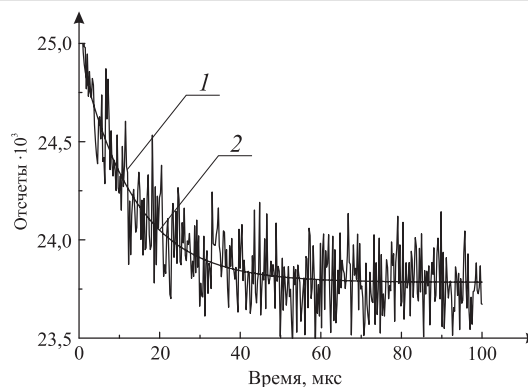


Рис. 3. Кинетика затухания люминесценции синглетного кислорода на длине волны 1270 нм в растворе НІТСІ в этаноле.

Эксперимент (1), аппроксимация (2). Длительность 12 ± 1 мкс