

# ФОТОХИМИЧЕСКИЙ МЕТОД РЕГИСТРАЦИИ СИНГЛЕТНОГО КИСЛОРОДА В ВОДНОЙ СРЕДЕ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ФОТОСЕНСИБИЛИЗИРУЮЩЕЙ СПОСОБНОСТИ ТВЕРДОФАЗНЫХ КОМПОЗИЦИЙ

© 2009 г. Т. К. Крисько; И. М. Кисляков, канд. физ.-мат. наук

Институт лазерной физики НПК “Государственный оптический институт им. С.И. Вавилова”,  
Санкт-Петербург

E-mail: Krisko\_tata@mail.ru

Разработана высокочувствительная фотохимическая методика измерения  $^1\text{O}_2$  для качественного и количественного изучения сенсибилизирующей способности различных твердофазных композиций, содержащих агрегированные и неагрегированные молекулы фотосенсибилизатора, в водной среде. Минимальная погрешность измерения концентрации синглетного кислорода в воде составляет  $1 \times 10^8 \text{ см}^{-3}$ . Работа методики продемонстрирована на примере твердофазного фотосенсибилизатора, содержащего агрегаты фуллерена  $\text{C}_{60}$ .

**Ключевые слова:** синглетный кислород, твердофазный фотосенсибилизатор, фуллерен  $\text{C}_{60}$ , фотохимия.

Коды OCIS: 350.5130, 300.1030, 300.6490, 300.6550

Поступила в редакцию: 25.11.2008

## Введение

Одним из актуальных направлений современной фотохимии является разработка фотосенсибилизаторов для возбуждения синглетного кислорода (СК), который находит широкое практическое применение, в первую очередь в биологии и медицине. Широкий круг задач, связанных с фотосенсибилизированной генерацией СК, определяет разнообразие веществ и композиций, составляющих основу разрабатываемых фотосенсибилизаторов. В ряде случаев оказывается целесообразным использовать фотосенсибилизаторы в твердофазном состоянии (например, не растворимые в данной среде композиции).

Интересно отметить, что такие твердофазные композиции, наряду с использованием в процессах резонансной передачи энергии (например, молекулярному кислороду с образованием синглетного кислорода), также могут применяться [1] в процессах передачи электрона (например, для генерации анион-радикала кислорода) и обратного насыщенного поглощения, являющегося одним из основных механизмов нелинейного оптического ограничения. Все эти три процесса (передача энергии, передача электрона, обратное насыщенное поглощение) имеют единую первооснову и связаны с особенностями строения электронных уровней молекулы фотосенсибилизатора [2, 3]. Таким образом, эффективность образования СК при облучении твердофазных фотосенсибилизаторов является опосредованным свидетельством эффективности

протекания двух других упомянутых выше процессов, также имеющих большую практическую значимость.

Однако получение твердофазной композиции, содержащей неагрегированные молекулы фотосенсибилизатора, представляется достаточно сложной задачей, требующей специфического подхода и использования специальных матриц [4–6]. В свою очередь агрегация молекул фотосенсибилизатора в процессе создания твердофазной композиции оказывает существенное влияние на энергетическую систему уровней исходной молекулы, что приводит к одновременному ухудшению эффективности всех трех упомянутых процессов [1, 7–9].

Известно большое количество методов регистрации СК, которые условно можно подразделить на физические, химические и биохимические [3, 10]. Однако чувствительности многих из них, и в первую очередь наиболее распространенного и надежного физического метода обнаружения СК по измерению его фотосенсибилизированной люминесценции, не всегда оказывается достаточно для изучения потенциально невысокой фотосенсибилизирующей способности агрегированных молекул [8, 10]. Дополнительные трудности вызывает изучение генерации СК в водной среде, необходимое, например, для биологических и медицинских применений СК. Это связано с небольшим временем жизни СК в воде (2–3 мкс [11]). Таким образом, задачи, связанные с исследованием твердофазных фотосенсибилизаторов в водной среде, требуют разработки

очень чувствительной методики регистрации СК, применимой для твердофазных композиций.

В основе такой методики, по нашему мнению, может лежать один из химических методов качественной и количественной регистрации СК, обладающих высокой чувствительностью благодаря накоплению регистрируемых продуктов реакции “химической ловушки” с СК.

Таким образом, настоящая статья посвящена разработке высокочувствительной фотохимической методики качественной и количественной регистрации синглетного кислорода, образованного при облучении молекул фотосенсибилизатора в составе твердофазных композиций в водной среде. Возможности методики продемонстрированы на примере водной суспензии фуллеренсодержащего твердофазного фотосенсибилизатора, содержащего молекулы фуллерена в агрегированном состоянии.

### **Химические методы регистрации синглетного кислорода**

В настоящее время существуют химические методы регистрации СК, основанные на применении “химических ловушек”, т. е. соединений, селективно взаимодействующих с СК. Высокая химическая активность СК к электронодонорным соединениям (олефинам, диенам, полициклическим, ароматическим соединениям, фенолам) обуславливает разнообразие реакций, лежащих в основе химических методов определения  $^1\text{O}_2$ . Эти методы отличаются высокой чувствительностью обнаружения  $^1\Delta_g$ -состояния  $\text{O}_2$ . Об образовании СК обычно судят по расходованию соединения—“ловушки”, по накоплению характерных продуктов окисления или по потреблению кислорода в содержащих “ловушки” системах [3]. Часто соответствующий анализ проводят, опираясь на изменение характеристической полосы поглощения того или иного соединения. Однако регистрация накопления продуктов окисления может осуществляться и другими способами, например, методом ЭПР<sup>1</sup>-спектроскопии [10].

Для увеличения достоверности результатов химические “ловушки” часто используют в сочетании с веществами, продлевающими или сокращающими время жизни СК. В качестве “тушителей”  $^1\text{O}_2$  используют каротиноиды, токоферолы, азид натрия, амины и др. Для увеличения времени жизни  $^1\text{O}_2$  используют замену растворителя его аналогом, в котором атомы водорода заменены атомамидейтерия.

<sup>1</sup> ЭПР – электронный парамагнитный резонанс.

Первоначально химические методы регистрации СК разрабатывались прежде всего в органических средах, в которых время жизни СК на несколько порядков больше, чем в воде. В этом случае традиционно использовались гидрофобные полициклические ароматические соединения. Они активно реагируют с СК по реакции (4 + 2) циклоприсоединения с образованием эндоперекисей [12].

Первыми химическими ловушками для количественного определения СК в водных средах явились синтезированные гидрофильные производные полициклических ароматических соединений. Однако многостадийность синтеза и низкий выход целевых соединений значительно осложняют их использование. В связи с этим более целесообразно в качестве ловушек применять исходные водорастворимые соединения.

Из многообразия современных химических методов количественного определения СК в водных средах большой интерес представляет фотохимический метод, предложенный Kraljic I. и Mohsni S.Et. [13, 14] для изучения эффективности протекания сенсибилизированной фотохимической реакции окисления, происходящей при облучении водорастворимого фотосенсибилизатора.

В качестве “ловушки” СК в этом методе выступает аминокислота (гистидин), растворенная в буферном растворе с концентрацией 0,01 М. В результате реакции с синглетным кислородом, нарабатываемым в присутствии фотосенсибилизатора, образуется эндоперекись гистидина. Являясь очень реакционно-способным соединением, эндоперекись взаимодействует с индикатором п-нитрозодиметиланилином (ПНДА) с концентрацией 50 мкМ, убыль которого проявляется в просветлении раствора. Раствор ПНДА имеет характерный желтый цвет, вызванный наличием в его спектре интенсивной полосы поглощения с максимумом  $\lambda_m = 440$  нм и полушириной  $\Delta\lambda_{1/2}(\text{FWHM}) = 75$  нм [15].

При реакциях, протекающих по такой схеме, падение оптической плотности раствора, регистрируемой на длине волн 440 нм,  $\Delta D(440) < 0$ , должно быть прямо пропорционально увеличению концентрации СК, наработанного за время наблюдения. Константа скорости тушения СК гистидином  $k_{\text{гист}} = 5 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$  [13] позволяет вычислить характерное время этой реакции, которое в нашем растворе составляет 2 мкс. Это время чуть меньше времени тушения СК водой. Таким образом, гистидин и ПНДА в нашем растворе выступают в качестве интегратора концен-

трации СК, показывая концентрацию, которая могла бы установиться в растворе при отсутствии тушения.

На наш взгляд, вышеупомянутый фотохимический метод может явиться хорошей основой для разработки методики регистрации СК, образованного твердофазными фотосенсибилизаторами в водной среде.

## Модификация фотохимического метода определения синглетного кислорода. Экспериментальная установка

В настоящей работе методика регистрации СК рассматривается применительно к твердофазному фотосенсибилизатору на основе фуллеренов C<sub>60</sub>, в частности, представляющему собой микрочастицы силикагеля, покрытые фуллереном. Средний размер микрочастиц 20 мкм, диаметр пор 100 Å. Процентное содержание фуллерена к весу всей композиции составляет 3–4 вес %. Молекулы фуллерена на поверхности силикагеля находятся в агрегированном состоянии, о чем свидетельствует их спектр поглощения [16, 17]. Исследование твердофазного фотосенсибилизатора на основе фуллерена проводится в водных суспензиях.

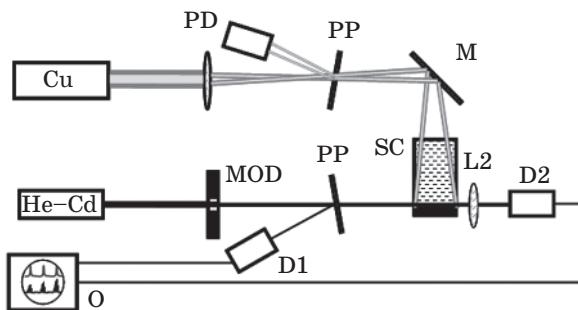
Спектральный диапазон облучения исследуемого по фотохимической методике твердофазного фотосенсибилизатора должен выбираться исходя из максимума его поглощения [14]. Так, для возбуждения твердофазного фотосенсибилизатора на основе агрегированных фуллеренов в видимой части спектра поглощения наиболее оптимальной для возбуждения является область 450 нм. Однако в эту же область попадает и полоса ПНДА, поэтому для оптического возбуждения наших сенсибилизаторов с целью наблюдения генерации СК данным методом были выбраны источники излучения на длинах волн  $\lambda > 500$  нм. Для этой цели мы использовали импульсно-периодический лазер на парах меди, генерирующий излучение на двух длинах волн (510 и 578 нм с соотношением интенсивностей 3:2) с частотой следования импульсов  $f_r = 15$  кГц. Плотность средней мощности при облучении образцов медным лазером составляла 1 Вт/см<sup>2</sup>. Хотя период повторения импульсов медного лазера (70 мкс) на порядок превосходит время жизни СК в воде, химические ловушки обеспечивают накопление продуктов периодически образующегося синглетного кислорода и, таким образом, допускают применение импульсно-периодического источника возбуждения, который в данной ситуации

эквивалентен режиму стационарного облучения [18].

Случай использования фотохимического метода регистрации СК в системах с твердофазными фотосенсибилизаторами довольно редки. Так, например, в работе [5] похожий метод применен для качественного выявления фотосенсибилизации СК красителем, внедренным в поры керамических наночастиц.

Поскольку выбранный нами метод был разработан для растворов, то при применении его к твердофазным сенсибилизаторам возникают дополнительные трудности. Наиболее существенными среди них являются возможная сорбция молекул ПНДА на твердофазном образце, его нагрев в процессе облучения и связанная с ним термодесорбция ПНДА обратно в раствор. Кроме того, оседание образца в процессе облучения приводит к изменению рассеяния, вклад которого в оптическую плотность раствора следует учитывать при измерении  $\Delta D$ . Для преодоления этих трудностей была создана установка непрерывного измерения изменения оптической плотности раствора.

Принципиальная схема установки изображена на рис. 1. Открытая кювета с исследуемой суспензией облучается сверху медным лазером. Сбоку через суспензию проходит пробный луч малой мощности (менее 1 Вт) Не–Cd-лазера с длиной волны 441,5 нм. Пробный луч модулируется по частоте прерывателем. Два приемника (германниевые фотодиоды) регистрируют переменный



**Рис. 1.** Экспериментальная установка для наблюдения наработки синглетного кислорода в водном растворе фотохимическим методом. Cu – источник возбуждающего излучения, L1, L2 – линзы, PP – плоско-параллельные пластины, M – зеркало, Не–Cd – источник зондирующего излучения, MOD – частотный модулятор, SC – образец, D1 – детектор опорного излучения, D2 – детектор прошедшего излучения, PD – измеритель мощности.

сигнал на входе  $I_0(t)$  и выходе  $I(t)$  из кюветы. Запись сигналов ведется на компьютере с использованием двухканальной осциллографической приставки в режиме самописца. Изменение отношения амплитуд  $I_{\max}/I_{0\max}$  этих двух сигналов выражает собой зависимость пропускания системы от времени  $T(t)$ . На рис. 2 показан характерный вид этой зависимости. Большое число точек (порядка  $10^5$ ), регистрируемое за время эксперимента, обеспечивает надежность результата. Начальный участок (первые 1–3 мин) аппроксимации этой зависимости позволяет рассчитать скорость уменьшения оптической плотности раствора, связанного с наработкой СК,

$$\Delta D/\Delta t = -\lg[T(t + \Delta t)/T(t)]/\Delta t. \quad (1)$$

Для устранения влияния сорбции ПНДА на твердофазном фотосенсибилизаторе проводились темновые измерения: исследуемая система выдерживалась в темноте 20–60 мин, в зависимости от интенсивности сорбции, с периодическим контролем ее спектра на спектрофотометре. Кроме того, перед началом облучения, записывалась динамика пропускания системы в темноте, а в отдельных случаях проводилось исследование изменения спектров системы при ее нагреве без облучения до 340 К. Сравнение записей  $T(t)$  без облучения и с облучением, а также контроль температуры раствора при облучении, позволяют судить об интенсивности процессов оседания супензии и термодесорбции ПНДА.

В исследуемых системах твердофазный фотосенсибилизатор не всегда был распределен рав-

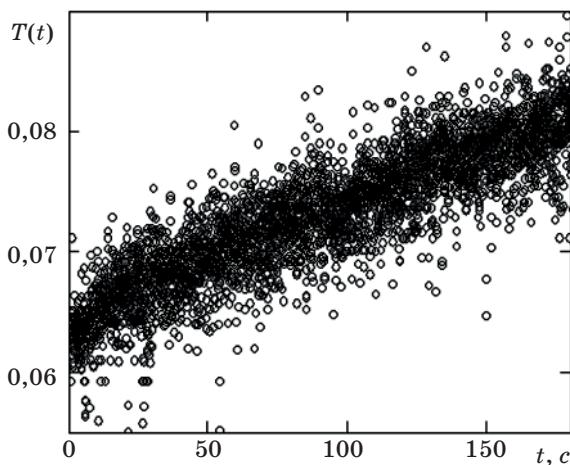
номерно по объему жидкости. Однако можно ввести понятие приведенной концентрации фотосенсибилизатора, разделив его массу в системе на объем жидкости. Это даст возможность учитывать количество фотосенсибилизатора и оценивать его корреляцию с концентрацией образуемого СК [19].

Большая оптическая плотность супензий на длине волны 440 нм не позволяет использовать кюветы с длиной оптического пути  $L > 2$  см. Таким образом, при исследовании супензий с приведенной концентрацией фуллерена менее 0,3 мг/мл обычно применялись стандартные сантиметровые кюветы для спектрофотометра, с приведенной концентрацией фуллерена более 0,3 мг/мл – тонкие кюветы с толщиной слоя 1 и 3 мм.

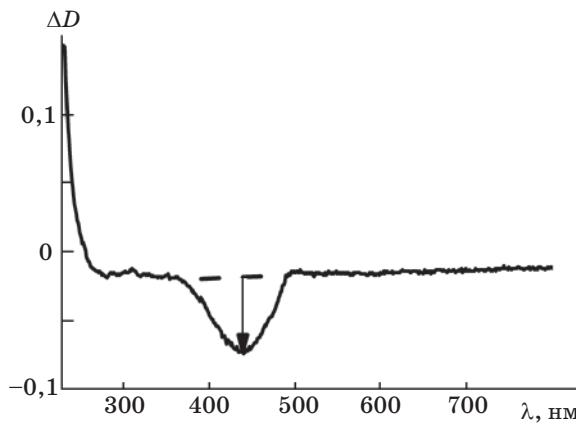
Следует отметить также, что регистрируемый эффект просветления раствора вследствие наработки СК проходил на фоне фотолизной убыли ПНДА, имеющей место, предположительно, за счет высокой пиковой мощности импульсов. Этот эффект был постоянным, зависел только от средней мощности облучения и составлял относительно малую, легко учитываемую величину:  $\Delta D_{\text{ph}}/\Delta t = 10^{-4} \text{ с}^{-1}$  при интенсивности 1 Вт/см<sup>2</sup> и практически равен нулю при интенсивности 0,1 Вт/см<sup>2</sup>. В то же время проведенное исследование на термический распад ПНДА не обнаружило изменений в его спектре в диапазоне температур 285–340 К.

Измерение пропускания системы в реальном времени с помощью пробного луча дает возможность прецизионного изучения динамики процесса, но требует проверки (своего рода калибровки), независимым методом. Для этого измерялись спектры оптической плотности раствора на спектрофотометре до и после облучения. Непосредственно перед этими измерениями система выдерживалась в темноте в течение времени, достаточного для оседания супензии. В случае медленно оседающей супензии измерения спектров проводились, не дожидаясь ее полного оседания, в достаточно прозрачном слое жидкости.

Разность спектров оптической плотности после облучения и до облучения позволяет определить изменение полосы ПНДА на фоне оптической плотности, обусловленной рассеянием света на частицах супензии. Рисунок 3 показывает разность конечного и начального спектров оптической плотности для супензии покрытых  $C_{60}$  микрочастиц силикагеля. Изменения в спектре, связанные с изменением рассеяния, представляют собой плавную, “базовую” линию,



**Рис. 2.** Зависимость от времени пропускания раствора ПНДА с гистидином на  $\lambda = 441,5$  нм в присутствии твердофазного фотосенсибилизатора при облучении.



**Рис. 3.** Разность спектров поглощения раствора ПНДА с гистидином в присутствии твердофазного фотосенсибилизатора, записанных после и до облучения.

проходящую во всем диапазоне длин волн, а “яма”, выделяющаяся на ее фоне, с минимумом на 440 нм связана с изменением концентрации ПНДА в растворе.

#### Расчет стационарной концентрации синглетного кислорода с помощью эталонного фотосенсибилизатора

Количественное определение абсолютного значения концентрации СК для исследуемых фотосенсибилизаторов можно выполнить путем сравнения получаемых значений  $\Delta D/\Delta t$  с величиной этого эффекта в растворе эталонного сенсибилизатора, для которого квантовый выход СК хорошо известен. В наших опытах в качестве эталонного сенсибилизатора использовался краситель метиленовый синий (МС). На рис. 4 показан спектр оптической плотности водного раствора 20 мкМ метиленового синего с ПНДА и гистидином и его изменение спустя три минуты облучения. Спектры записаны на спектрофотометре в кварцевой кювете с длиной оптического пути  $L = 1$  см. Для осуществления оптимального выхода СК облучение осуществляется источником со спектральными характеристиками, соответствующими максимуму поглощения сенсибилизатора. В то же время источник не должен возбуждать молекулы ПНДА, чтобы не вызвать их убыль за счет возможных фотолитических реакций. Для облучения метиленового синего применялся светодиод с полосой излучения  $\lambda_{\max} = 640$  нм,  $\Delta\lambda_{1/2}(\text{FWHM}) = 19$  нм и интенсивностью 35 мВт/см<sup>2</sup>.

Изменения в спектре поглощения при облучении, показанные на рис. 4, связаны как с уменьшением концентрации ПНДА в растворе (уменьшение полосы поглощения 440 нм), так и с образованием побочных продуктов (последние проявляются в росте оптической плотности в дальней УФ области). Для уменьшения влияния этих факторов на результаты измерений наблюдение принято проводить на длине волны 440 нм в диапазоне относительных изменений оптической плотности раствора ПНДА  $\Delta D(440)/D(440)$ , не превышающем 10–15% [14]. На практике при исследовании различных сенсибилизаторов длительность облучения, по нашему мнению, не должна быть больше 10–15 мин.

Расчет абсолютного значения стационарной концентрации синглетного кислорода  $n(^1\text{O}_2)$  был выполнен для раствора МС по формуле

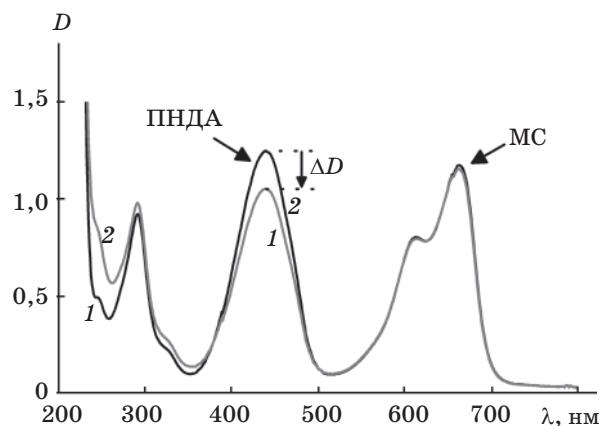
$$n(^1\text{O}_2) = n_a(hv) \cdot \varphi(^1\text{O}_2) \tau(^1\text{O}_2), \quad (2)$$

где  $n_a(hv)$  – количество квантов возбуждающего излучения, поглощенных единицей объема вещества в единицу времени;  $\varphi(^1\text{O}_2)$  – интегральный квантовый выход генерации СК, образованного исследуемым фотосенсибилизатором;  $\tau(^1\text{O}_2)$  – время жизни СК в среде.

Концентрация поглощенных квантов с учетом поглощения в толстом слое вещества определялась по формуле

$$n_a(hv) = \frac{1}{hcH} \int I(\lambda) \left(1 - e^{-D(\lambda)H}\right) \lambda d\lambda. \quad (3)$$

Здесь  $I(\lambda)$  – распределение интенсивности в спектре возбуждающего светодиода,  $D(\lambda)$  – спектр оптической плотности сантиметрового



**Рис. 4.** Спектр поглощения раствора метиленового синего (МС, 20 мкМ) в водном растворе ПНДА (50 мкМ) и гистидина (10 мМ) после (1) и до (2) облучения

слоя раствора,  $H$  – толщина слоя облучаемой жидкости.

Для расчета было принято, что эффективное время жизни СК в воде с учетом присутствия в растворе гистидина  $\tau = (k_{H_2O}n(H_2O) + k_{\text{гист}}n(\text{His}))^{-1} \approx \approx 1,2 \text{ мкс}$ . Здесь  $k_{H_2O}n(H_2O) = 1/\tau_{H_2O}$ , где  $\tau_{H_2O} = 2-3 \text{ мкс}$  – время жизни СК в воде в отсутствие гистидина [19],  $k_{\text{гист}} = 5 \times 10^7 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$  [13], концентрация гистидина  $n[\text{Гист}] = 0,01 \text{ М}$ . Интегральный квантовый выход генерации СК метиленовым синим в воде в диапазоне длин волн 550–700 нм составляет 0,52 [20].

Рассчитанное значение  $n(^1\Delta O_2)$  соответствует полученной из опыта величине скорости изменения оптической плотности  $\Delta D(440)/\Delta t$  раствора метиленового синего. Концентрации СК в других образцах определены по измеренным скоростям  $\Delta D(440)/\Delta t$  пропорционально этому соответствуанию. Поскольку измерения для метиленового синего и для твердофазной структуры проводились при разных источниках облучения и толщинах кювет, эти результаты приведены к одному значению интенсивности облучения, принятому в фотодинамической терапии стандарту,  $-100 \text{ мВт}/\text{см}^2$ , и толщине прорабатываемого слоя жидкости 1 см.

### Демонстрация возможностей фотохимической методики регистрации синглетного кислорода на примере твердофазного фотосенсибилизатора на основе фуллеренов

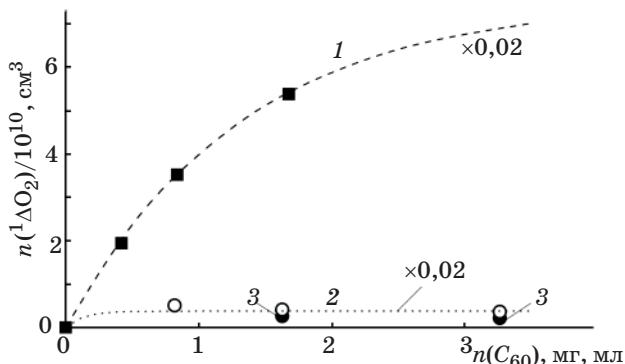
Погрешность измерений  $\Delta D(440)/\Delta t$  для твердофазного фотосенсибилизатора, представляющего собой микрочастицы силикагеля с нанесенным на них фуллереном, в водной среде составляет  $2,2 \times 10^{-6} \text{ с}^{-1}$ , что соответствует погрешности в определении концентрации СК  $1 \times 10^8 \text{ см}^{-3}$ . Ранее [19] нами было показано, что такая погрешность измерений характерна для твердофазных фотосенсибилизаторов, содержащих агрегированный фуллерен, при условии, что толщина фуллеренового покрытия (или размер агрегата) не превышает 1 мкм.

В противном случае в процессе облучения происходит существенный (на 20–30 К) нагрев фотосенсибилизатора. В процессе нагрева имеют место сразу два эффекта: образование пузырьков газа на поверхности, которое мешает вести корректную запись динамики пропускания раствора, и десорбция ПНДА, нивелирующая просветление раствора, регистрируемое спектрофотометром. При этом просветление определяется

только по первым 30–60 с облучения, когда эти эффекты еще малы. Ограничение времени эксперимента заметно увеличивает погрешность измерений (до 50%).

Разработанный метод измерения наработки СК впервые позволил количественно оценить концентрацию СК, образованного в водной среде при облучении агрегированных молекул фотосенсибилизатора (на примере фуллерена), сенсибилизирующая способность которых приблизительно на 2 порядка ниже, чем у мономеров [19]. Измерения проводились при приведенной концентрации фуллерена, не превышающей 0,3 мг/мл, облучение кюветы осуществлялось с применением источника зондирующего излучения.

В настоящей работе приведены результаты изучения твердофазного фотосенсибилизатора, аналогичного одному из исследованных ранее [19], но при больших приведенных концентрациях фуллерена в суспензии (до 3,5 мг/мл) и различной эффективности облучения. Так, было показано, что при облучении кюветы с образцом по схеме, представленной на рис. 1, стационарная концентрация СК (см. таблицу) практически не зависит от приведенной концентрации фуллерена в диапазоне изменения последней 0,8–3,5 мг/мл (рис. 5). Это объясняется тем, что рост концентрации фотосенсибилизатора, приводящий к увеличению концентрации СК, ведет также к уменьшению толщины просвечен-



**Рис. 5.** Зависимость стационарной концентрации синглетного кислорода, нарабатываемого при облучении водных суспензий микрочастиц силикагеля, от приведенной концентрации фуллерена в суспензии при различной толщине слоя. 1 – D<sub>2</sub>O, слой 0,3 см; 2 – D<sub>2</sub>O, слой 3 см; 3 – H<sub>2</sub>O, слой 3 см. Линии соответствуют расчету для псевдораствора фуллерена в D<sub>2</sub>O, точки – экспериментальные данные.

ваемого слоя суспензии, что нивелирует рост концентрации СК. При облучении суспензий в тонком слое (3 мм) еще можно наблюдать пропорциональность между приведенной концентрацией фуллерена и стационарной концентрацией образуемого СК, что связано с более эффективным просвечиванием суспензии (рис. 5). На рисунке также видно, что теоретический расчет концентрации СК по формуле (3) для неагрегированного фуллерена в водной среде (псевдораствор  $C_{60}$  в воде) дает значение, в 50 раз большее, чем измеренное значение концентрации, получаемое в суспензии твердофазной фуллереновой композиции, что согласуется с предыдущими исследованиями [19].

Следует напомнить, что время облучения образцов при необходимости должно варьироваться в зависимости от концентрации фотосенсибилизатора и эффективности его облучения таким образом, чтобы результирующее значение относительного изменения оптической плотности ПНДА на  $\lambda = 440$  нм не превышало порогового значения  $\Delta D(440)/D(440)$ , равного 10–15%.

Ранее упоминалось, что время жизни СК и, следовательно, его химическая активность в дейтерированных средах резко возрастают. Таким образом, сравнение стационарных концентраций СК, полученных в  $D_2O$  и  $H_2O$ , увеличивает достоверность результатов обнаружения синглетного кислорода.

Опыты, проведенные нами в этих средах при прочих равных условиях с использованием зондирующего излучения, подтвердили факт образования СК в реакционной смеси. Для этого было оценено эффективное время жизни СК в  $D_2O$  и  $H_2O$  с учетом присутствия в растворе гистидина. Так, было показано, что в  $H_2O$  это время составляет  $\tau_1 \approx 1,2$  мкс (см. выше), а в  $D_2O$  –  $\tau_2 = (1/\tau_{D_2O} + k_{\text{гист}}n[\text{гист}])^{-1} \approx 1,9$  мкс. Для расчета последней было принято, что время жизни СК в  $D_2O$  в отсутствие гистидина, определенное по сигналу люминесценции (длина волны 1268 нм) СК, образованного при облучении водного раствора эталонного фотосенсибилизатора (бенгальского розового)  $\tau_{D_2O} = 43$  мкс (описание люминесцентной установки см. [19]);  $k_{\text{гист}} = 5 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$  [13], концентрация гистидина  $n[\text{гист}] = 0,01 \text{ M}$ . Таким образом, использование  $D_2O$  вместо  $H_2O$  за счет продления времени жизни СК должно привести к увеличению стационарной концентрации  $^1O_2$  в  $\tau_2/\tau_1 = 1,58$  раза, что хорошо согласуется с полученными экспериментальными данными (см. таблицу). Действительно, наблюдаемый

Изменение стационарной концентрации синглетного кислорода при замене растворителя ( $D_2O$  и  $H_2O$ ) при условии облучения суспензий медным лазером с интенсивностью 100 мВт/см<sup>2</sup> и толщине кюветы 1 см

Приведенная концентрация $C_{60}$ , мг/мл	Стационарная концентрация		
	$n(^1O_2)_{D_2O}, 10^9 \times \text{см}^{-3}$	$n(^1O_2)_{H_2O}, 10^9 \times \text{см}^{-3}$	$\frac{n(^1O_2)_{D_2O}}{n(^1O_2)_{H_2O}}$
3,27	3,6	2,2	1,64
1,63	4,1	2,6	1,58

рост величины стационарной концентрации СК примерно в 1,6 раза не связан с изменением концентрации фуллерена в суспензии, а определяется увеличением времени жизни СК.

## Заключение

Высокая чувствительность разработанного фотохимического метода регистрации синглетного кислорода в водной среде впервые позволила количественно оценить сенсибилизирующую способность высокоагрегированного фуллерена  $C_{60}$  в составе твердофазных фотосенсибилизаторов. Минимальная погрешность измерения концентрации синглетного кислорода при этом составила  $1 \times 10^8 \text{ см}^{-3}$ . Метод применим при различных схемах облучения и концентрациях твердофазного фотосенсибилизатора. Кроме того, для увеличения достоверности результатов обнаружения синглетного кислорода измерения могут проводиться как в обычной, так и в дейтерированной воде.

Результаты применения метода показывают, что концентрация синглетного кислорода, вырабатываемого при облучении твердофазных композиций, на два порядка меньше, чем то количество, которое могло быть произведено неагрегированным фотосенсибилизатором в той же среде.

Разработанный высокочувствительный фотохимический метод измерения  $^1O_2$  может быть рекомендован для качественного и количественного изучения сенсибилизирующей способности различных твердофазных композиций, содержащих агрегированные и неагрегированные молекулы фотосенсибилизатора в водной среде.

Авторы благодарят сотрудника СПбГУ Шурухину А.В. за синтез п-нитрозодиметиланилина, а также сотрудников ГОИ: доктора физ.-мат. наук, профессора Белоусову И.М., доктора физ.-мат. наук, профессора Данилова О.Б., доктора физ.-мат. наук Киселева В.М., канд. хим. наук

Муравьеву Т.Д. и Виденичева Д.А. за плодотворную дискуссию и содействие в проведении работы.

Работа выполнена при поддержке Комитета экономического развития, промышленной политики и торговли Правительства Санкт-Петербурга (ГОСК № 251-07/ОГЗ) и РФФИ (грант № 08-03-00496-а).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Fujitsuka M., Kasai H., Masuhara A., Okada S., Oikawa H., Nakanishi H., Ito O., Yase K. Laser Flash Photolysis Study on Photophysical and Photochemical Properties of C<sub>60</sub> Fine Particles // J. of Photochem. and Photobiol. A: Chemistry. 2000. V. 133. P. 45–50.
2. Белоусов В.П., Белоусова И.М., Будтов В.П., Данилов В.В., Данилов О.Б., Калинцев А.Г., Мак А.А. Фуллерены: структурные, физико-химические и нелинейно-оптические свойства // Оптический журнал. 1997. Т. 64. № 12. С. 3–37.
3. Красновский А.А., мл. Синглетный молекулярный кислород и первичные механизмы фотодинамического действия оптического излучения // Итоги науки и техники. Современные проблемы лазерной физики. М.: ВИНИТИ. 1990. Т. 3. С. 63–135.
4. Schulz-Ekloff G., Wöhrle D., van Duffel B., Schonheydt R.A. Chromophores in porous silicas and minerals: preparation and optical properties // Microporous and Mesoporous Materials. 2002. V. 51. P. 91–138.
5. Roy I., Ohulchanskyy T.Y., Pudavar H.E., Bergey E.J., Oseroff A.R., Morgan J., Dougherty T.J., Prasad P.N. Ceramic-based Nanoparticules Entrapping Water-insoluble Photosensitizing Anticancer Drugs: a Novel Drug-carrier System for Photodynamic Therapy // J. of the Amer. Chem. Soc. 2003. V. 125. P. 7860–7865.
6. Subbiah S., Mokaya R. Transparent thin films and monoliths synthesized from fullerene doped mesoporous silica: evidence for embedded monodispersed C<sub>60</sub> // Chem. commun. 2003. V. 1. P. 92–93.
7. Konstantaki M., Koudoumas E., Couris S., Janot J.M., Eddaoudi H., Deratani A., Seta P., Leach S. Optical Limiting Behavior of the Water-Soluble C<sub>60</sub>/γ-cyclodextrin Complex // Chem. Phys. Lett. 2000. V. 318. P. 488–495.
8. Beeby A., Eastoe J., Heenan R. K. Solubilisation of C<sub>60</sub> in Aqueous Micellar Solution // J. of the Chem. Soc., Chem. Commun. 1994. V. 10. P. 173–175.
9. Schell J., Felder D., Nierengarten J.-F., Rehspringer J.-L., Levy R., Hönerlage B. Induced Absorption of C<sub>60</sub> and a Water-soluble C<sub>60</sub>-derivative in SiO<sub>2</sub> Sol-gel Matrices // J. of Sol-Gel Sci. and Technol. 2001. V. 22. P. 225–236.
10. Yamakoshi Y., Umezawa N., Ryu A., Arakane K., Miyata N., Goda Y., Masumizu T., Nagano T. Active Oxygen Species Generated from Photoexcited Fullerene (C<sub>60</sub>) as Potential Medicines: O<sup>•-</sup> versus <sup>1</sup>O<sub>2</sub> // J. of the Amer. Chem. Soc. 2003. V. 125. P. 12803–12809.
11. Krasnovsky A.A., Jr. Singlet molecular oxygen in photobiochemical systems: IR phosphorescence studies // Membrane Cellular Biology. 1998. V. 12. № 5. P. 665–690.
12. Nardello V., Aubry J.-M. Measurement of Photo-generated Singlet Oxygen in Aqueous Media // Methods of Enzymology. 2000. V. 319. P. 50–58.
13. Kraljic I., Mohsni S.Et., Arvis M. A General Method for the Identification of Primary Reactions in Sensitized Photooxidations // Photochemistry and Photobiology. 1978. V. 27. P. 531–537.
14. Kraljic I., Mohsni S.Et. A New Method for the Detection of Singlet Oxygen in Aqueous Solutions // Photochemistry and Photobiology. 1978. V. 28. P. 577–581.
15. Kraljic I., Trumbore C.N. p-Nitrosodimethylaniline as an OH Radical Scavenger in Radiation Chemistry // J. of the Amer. Chem. Soc. 1965. V. 87. P. 2547–2550.
16. Багров И.В., Белоусова И.М., Ермаков А.В., Киселев В.М., Кисляков И.М., Крисько Т.К., Муравьева Т.Д. Фотостабильность покрытия фуллерена C<sub>60</sub> как твердофазного фотосенсибилизатора синглетного кислорода // Опт. и спектр. 2008. Т. 105. № 5. С. 787–793.
17. Bensasson R.V., Bienvielle E., Dellinger M., Leach S., Seta P. C<sub>60</sub> in Model Biological Systems. A visible-UV Absorption Study of Solvent-dependent Parameters and Solute Aggregation // J. of Phys. Chem. 1994. V. 98. P. 3492–3500.
18. Belousova I.M., Mironova N.G., Yur'ev M.S. Fullerene-Oxygen Action on Biological Tissues: Numerical Modeling // Proc. SPIE. 2006. V. 6257. P. 6257OT.
19. Belousova I.M., Danilov O.B., Kiselev V.M., Kislyakov I.M., Kris'ko T.K., Murav'eva T.D., Videnichev D.A. Solid-phase Fullerene-like Nanostructures as Singlet Oxygen Photosensitizers in Liquid Media // Proc. SPIE. 2007. V. 6613. P. 66130C-1–66130C-12.
20. Koshevar I.E., Redmond R.W. Photosensitized Production of Singlet Oxygen // Methods in Enzymology. 2000. V. 319. P. 20–28.