

Р. А. АВАРМАА

ТОНКОСТРУКТУРНЫЕ СПЕКТРЫ И КИНЕТИКА ЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ ХЛОРОФИЛЛА И ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ

Дается обзор исследований по тонкоструктурным спектрам хлорофиллоподобных молекул при селективном лазерном возбуждении, а также по кинетическим измерениям, относящимся к этой проблеме.

Введение

Десяток лет назад были сделаны первые попытки получить тонкоструктурные электронно-колебательные (вибронные) спектры важнейшего фотосинтезирующего соединения — хлорофилла *a* (Хл *a*). Метод Шпольского (т. е. внедрение молекул в *n*-алкановые матрицы), использованный для получения квазилинейчатых спектров порфиринов при 77 К [1], дал обещающие результаты в случае Хл *a* при 4,2 К [2, 3], однако спектры оказались плохо воспроизводимыми. Цель этих работ можно сформулировать как доведение спектроскопии хлорофиллоподобных молекул до уровня, достигнутого к этому времени для менее сложных органических молекул. Следует отметить, что незадолго до этого решались некоторые принципиальные вопросы спектроскопии твердого тела — наличие фононных крыльев в спектрах растворенных в твердой матрице молекул и природа мультиплетов в спектрах Шпольского [4].

Новый этап в изучении спектров хлорофилла начался благодаря применению лазерных источников возбуждения. Природа бесструктурных полос флуоресценции молекул в аморфных системах была разъяснена Р. И. Персоновым с сотрудниками, которые обнаружили яркое проявление узколинейчатой структуры при резонансном лазерном возбуждении на примере молекулы перилена [5].

Мы наблюдали возникновение тонкой структуры при селективном лазерном возбуждении спектра флуоресценции Хл *a* при 4,2 К в различных неалкановых растворителях [6]. Однако в данном случае интерпретация спектров превращалась сама по себе в трудную задачу из-за сложности изучаемых систем. С целью четкого различения характеристик, присущих самим изучаемым молекулам, и эффектов, возникающих в связи со спецификой способа получения спектров, нами было проведено соответствующее теоретическое рассмотрение [7].

Как известно, вибронные спектры молекулярной примеси в кристалле состоят из узкой чисто электронной 0—0-линии, сопровождаемой широким фононным крылом, а также ее повторений по внутримолекулярным колебаниям [8]. Для сложных молекул в органических матрицах эта информация часто теряется из-за большого неоднородного уширения. Селективное возбуждение монохроматическим светом частично снимает это уширение [5], но наблюдаемые параметры по сравнению с установленными теорией однородных спектров значительно изменяются [7]. Так, ширина бесфононной линии (БФЛ) складывается из однородных ширины линий поглощения и флуоресценции. Фононное крыло в спектре излучения содержит три компонента: 1) истинное крыло,

2) огибающую большого числа возбуждаемых через фононное крыло БФЛ и 3) сумму их фононных крыльев. В результате относительная интенсивность БФЛ значительно ослабляется.

При возбуждении в области вибронных переходов наиболее ярким эффектом является возникновение 0—0-мультиплета «псевдолиний». Эти БФЛ отстоят от возбуждающей линии на расстояниях, равных частотам колебаний молекулы в возбужденном электронном состоянии.

Знания этих основных положений теории достаточно для расшифровки структуры спектров флуоресценции и возбуждения. Более детальные теоретические трактовки даны в последующих публикациях, например, в [9].

В настоящей работе приводится сводка результатов наших исследований по тонкоструктурным спектрам Хл *a* и его ближайших аналогов, а также по кинетическим измерениям в условиях спектрально селективной регистрации.

Результаты и обсуждение

При комнатной и азотной температурах спектры поглощения и люминесценции хлорофиллоподобных молекул состоят из сравнительно широких ($\approx 300 \text{ см}^{-1}$) полос. Возбуждение на вибронном спутнике т. н. $Q(0, 0)$ -полосы поглощения приводит при гелиевой температуре к воз-

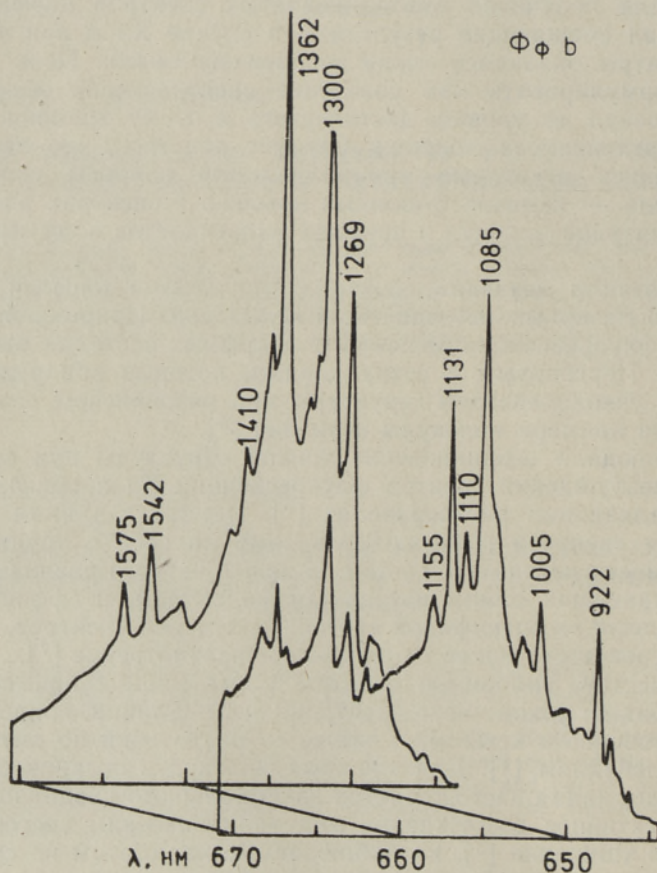


Рис. 1. Спектры флуоресценции феофитина *b* в эфире при возбуждении лазером на красителе на длинах волн $\lambda_e = 601$ (слева) и 612 нм (справа), $T = 5 \text{ К}$.

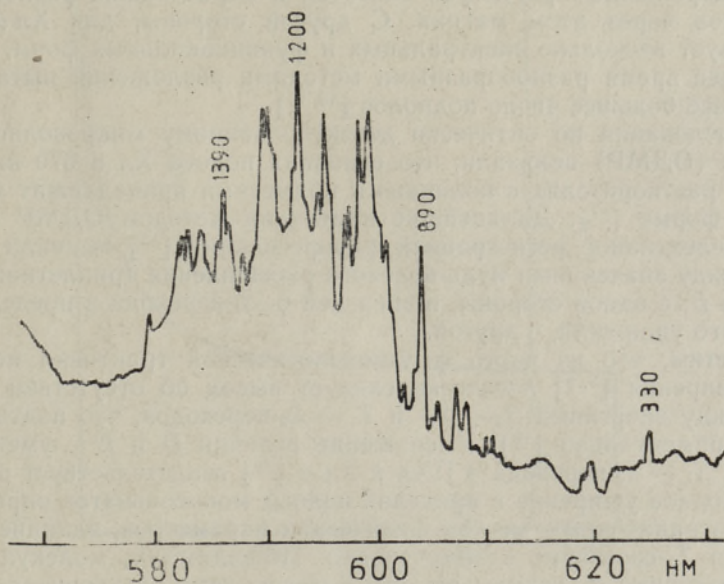


Рис. 2. Спектр возбуждения протофеофитина в эфире при монохроматической регистрации $\lambda_f = 638$ нм. Выходная мощность лазера поддерживалась постоянной по спектру.

никновению богатой линейчатой структуры в 0—0-полосе флуоресценции. Такие многолинейчатые спектры наблюдались как для Хл *a*, так и для его производных — феофитина *a* (Фф *a*), Хл *b*, Фф *b*, протохлорофилла (ПХл) и других [10–12]. В качестве матрицы можно использовать практически любой органический растворитель, но из соображений устойчивости пигментов для большинства измерений выбирался диэтиловый эфир. На рис. 1 для примера показаны спектры флуоресценции Фф *b* в случае двух длин волн возбуждения. Около линий указаны частоты (см^{-1}), определенные из спектра как расстояния до возбуждающей линии. Согласно реферируемым выше соображениям, они представляют собой колебательные частоты в возбужденном электронном состоянии S_1 . Для ряда хлорофиллоподобных соединений мы получили таким путем наборы около 30 активных в вибронном переходе колебательных частот. Эти колебания проявляются непосредственно в спектрах возбуждения при монохроматической регистрации (рис. 2), которые весьма удобны для извлечения данных об относительных интенсивностях. Анализ колебательной структуры будет посвящена отдельная статья (предварительную интерпретацию см. в [12]).

В принципе, во всех спектрах флуоресценции (таких, как на рис. 1) присутствуют повторения 0—0-линий по частотам колебаний в основном электронном состоянии S_0 . Но из-за наложения огромного числа слабых линий и их фононных крыльев эта область крайне неудобна для анализа. Более чистый спектр получается при резонансном 0—0-возбуждении, однако оказалось, что в этом случае происходит быстрое убывание линий по механизму фотохимического выжигания [13]. Частоты основного состояния хлорофиллов определялись также методами ИК-поглощения и комбинационного рассеяния [14]. Большинство частот S_1 - и S_0 -состояния хорошо согласуются между собой.

Обсуждая вопросы, связанные с неоднородным уширением спектров

такого соединения, как Хл *a* и его аналогов, нельзя пренебрегать возможностью комплексообразования. Давно известно, что Хл *a* в жидких или замороженных растворах способен к образованию разной степени сольватов через атом магния. С другой стороны, для Хл *a* *in vivo* существует несколько спектральных и функциональных форм, причем в последнее время разнообразными методами разложения пытаются выделить все большее число подполос [15, 16].

Исследования по оптически детектированному микроволновому резонансу (ОДМР) показали, что основная полоса Хл *a* 670 нм в неполярных растворителях с полярными примесями принадлежит моносольватной форме [17]. Дальнейшие измерения методом ОДМР в сочетании с селективной регистрацией флуоресценции [18] выявили корреляцию между значениями нуль-полевого расщепления триплетного состояния *D* и *E*, с одной стороны, и энергией 0—0-перехода в пределах неоднородного уширения, с другой.

Отметим, что из чисто феноменологической трактовки неоднородного уширения [7, 9] логически следует вывод об отсутствии корреляции между энергиями $S_1 - S_0$ - и $T_1 - S_0$ -переходов, что подтвердилось и экспериментально [19]. Уменьшение величин *D* и *E* с уменьшением частоты $S_1 - S_0$ -перехода в ПХл и Хл *a* [18] свидетельствует о том, что неоднородное уширение в пределах полосы моносольватов определяется весьма ограниченным числом физических параметров, влияние которых на S_1 - и T_1 -состояние взаимосвязано. По-видимому, молекулы хлорофилла вступают во взаимодействие с молекулами растворителя преимущественно через определенные боковые группы.

Было изучено также влияние неоднородного уширения на некоторые кинетические свойства. Такой важный параметр, как время жизни τ_1 возбужденного электронного состояния Хл *a*, оказался зависящим от длины волны регистрации λ_f в пределах неоднородной полосы [20]. При увеличении концентрации в значениях τ_f проявлялся перенос энергии вниз по контуру неоднородного уширения (см. также [21]).

Триплетные состояния ранее изучались такими методами, как флеш-фотолиз, ЭПР и др. Сравнительно недавно была обнаружена фосфоресценция хлорофиллов [22], однако из-за ее слабости приходилось для исследования их T_1 -состояния привлекать все новые методы. Выше уже упоминался один из них — ОДМР с регистрацией по флуоресценции. Нами разработана еще одна чисто оптическая методика — измерение временной зависимости интенсивности флуоресценции после включения прямоугольного возбуждающего импульса (т. н. метод флуоресцентного детектирования триплетного состояния) [23]. Лазерное возбуждение мощностью ~ 10 мВт достаточно для создания высокой стационарной заселенности T_1 -состояния хлорофиллов. Приближение к стационарному состоянию отражается в падении интенсивности флуоресценции с заселением триплета (рис. 3). Этот метод имеет ряд достоинств — можно ограничиться оптическими измерениями, исследовать микроколичества веществ, непосредственно определять заселенность триплетного состояния, а также другие параметры. Кроме того, этим способом обнаружена связь между λ_f в неоднородной полосе флуоресценции и параметрами триплетного состояния [23] — на коротковолновом краю спектра флуоресценции τ_T растет.

Таким образом, прослеживается весьма четкая зависимость ряда спектрально-кинетических параметров молекулы от энергии $S_1 - S_0$ -перехода для Хл *a* и его аналогов в системах с неоднородным уширением. Эта зависимость гладкая, и нет необходимости вводить конечное число различных подмножеств молекул (т. н. спектральных форм). Этот вывод нельзя, конечно, непосредственно переносить на *in vivo* системы.

В результате сложения однородных ширин БФЛ как при возбужде-

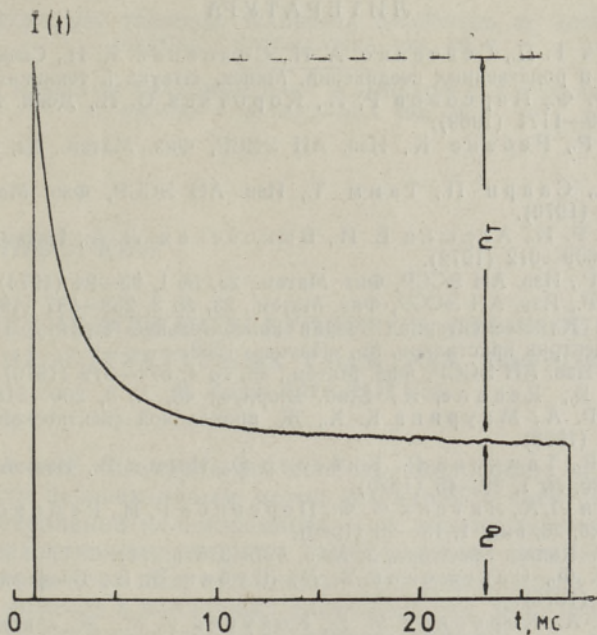


Рис. 3. Кривая спада интенсивности флуоресценции протоклорофилла в эфире при $T = 77$ К. Возбуждение прямоугольными импульсами мощностью 200 мВт/см^2 на длине волны $441,6 \text{ нм}$, регистрация 625 нм . Показаны относительные заселенности триплетного n_T и основного синглетного n_0 состояний.

нии в вибронной области, так и в 0—0-полосе (с регистрацией на вибронных повторениях) наблюдаемая ширина определяется уширением колебательных подуровней, составляющим несколько см^{-1} . Регистрации же строго резонансной флуоресценции препятствует наличие рассеянного света. Эта трудность была преодолена применением метода фотохимического выжигания провала, с помощью которого для Хл *a* было достигнуто спектральное разрешение $\Delta\nu/\nu = 1,5 \cdot 10^6$ (более подробно см. [24]).

Не потеряли своей актуальности и стремления к получению тонкоструктурных спектров путем выбора специальных матриц-растворителей. Удалось показать, что вполне отчетливые спектры Шпольского можно получить для растворенных в *n*-алканах феофорбидов, т. е. хлорофиллов без магния и фитола [25]. Такие спектры имеют преимущество с аналитической точки зрения — данной молекуле в данном растворителе всегда соответствует определенный мультиплет, не зависящий от частоты неселективного возбуждения. Добавим, что избавление от примесей в количестве ниже 10^{-3} по отношению к основному пигменту — трудновыполнимая в случае хлорофиллоподобных молекул задача [26].

В итоге можно констатировать, что за последние годы в спектроскопии хлорофиллоподобных молекул достигнуты определенные успехи — повышено спектральное разрешение и внедрены новые методы определения кинетических параметров.

В заключение выражаю глубокую благодарность К. К. Ребане за поддержку выбранного направления и за многократные обсуждения результатов. Я также благодарен К. Х. Маурингу, А. П. Суйсалу и Р. П. Тамкиви за участие в совместных исследованиях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гуринович Г. П., Севченко А. Н., Соловьев К. Н., Спектроскопия хлорофилла и родственных соединений, Минск, «Наука и техника», 1968.
2. Литвин Ф. Ф., Персонов Р. И., Коротаев О. Н., Докл. АН СССР, 188, № 5, 1169—1171 (1969).
3. Авармаа Р., Ребане К., Изв. АН ЭССР, Физ. Матем., 22, № 1, 108—110 (1973).
4. Ребане К., Саари П., Тамм Т., Изв. АН ЭССР, Физ. Матем., 19, № 2, 251—254 (1970).
5. Персонов Р. И., Альшиц Е. И., Быковская Л. А., Письма в ЖЭТФ, 15, вып. 10, 609—612 (1972).
6. Авармаа Р., Изв. АН ЭССР, Физ. Матем., 23, № 1, 93—94 (1974).
7. Авармаа Р., Изв. АН ЭССР, Физ. Матем., 23, № 3, 238—247 (1974).
8. Ребане К. К., Элементарная теория колебательной структуры спектров примесных центров кристаллов, М., «Наука», 1968.
9. Кикас Я., Изв. АН ЭССР, Физ. Матем., 25, № 4, 374—379 (1976).
10. Авармаа Р., Rebane, K., Stud. Biophys., 48, № 3, 209—218 (1975).
11. Авармаа Р. А., Мауринг К. Х., Ж. прикладной спектроскопии, 28, вып. 4, 658—662 (1978).
12. Авармаа Р., Тамкиви Р., Кийслер С., Нымм В., Изв. АН ЭССР, Физ. Матем., 29, № 1, 39—45 (1980).
13. Быковская Л. А., Литвин Ф. Ф., Персонов Р. И., Романовский Ю. В., Биофизика, 25, вып. 1, 13—20 (1980).
14. Lutz, M., J. Raman Spectrosc., 2, № 5, 497—516 (1974).
15. Литвин Ф. Ф., Сннещекоев В. А., Шубин В. В., Биофизика, 21, вып. 4, 669—675 (1976).
16. Гулиев Ф. А., Коробков М. Е., Кочубей С. М., Ж. прикладной спектроскопии, 29, вып. 4, 646—651 (1978).
17. Кооуман, Р. Р. Н., Schaafsma, T. J., Kleibeuker, J. F., Photochem. Photobiol., 26, № 3, 235—240 (1977).
18. Авармаа, R., Schaafsma, T. J., Chem. Phys. Lett., 71, № 2, 339—344 (1980).
19. Саари П. М., Тамм Т. Б., Изв. АН СССР, сер. физ., 39, № 11, 2321—2325 (1975).
20. Тамкиви Р. П., Авармаа Р. А., Изв. АН СССР, сер. физ., 42, № 3, 568—572 (1978).
21. Тамкиви Р. П. (см. настоящий номер).
22. Красновский А. А., Литвин Ф. Ф., Изв. АН СССР, сер. физ., 39, № 9, 1968—1971 (1975).
23. Авармаа, R., Chem. Phys. Lett., 46, № 2, 279—282 (1977); Mol. Phys., 37, № 2, 441—454 (1979).
24. Мауринг К. Х., Авармаа Р. А. (см. настоящий номер).
25. Авармаа Р., Тамкиви Р., Изв. АН ЭССР, Физ. Матем., 29, № 4, 442—444 (1980).
26. Тыниссоо В., Тамкиви Р., Изв. АН ЭССР, Хим., 27, № 4, 219—223 (1978).

*Институт физики
Академии наук Эстонской ССР*

R. A. AVARMAA

KLOROFOLLI JA TA DERIVAATIDE LUMINESTSENTSII PEENSTRUKTUURSED SPEKTRID JA KINEETIKA

On antud ülevaade klorofüllisarnaste molekulide peenstruktuursetest spektritest selektiivsel laserergastusel ja sellega seotud kineetilistest mõõtmistest.

R. A. AVARMAA

FINE-STRUCTURE SPECTRA AND KINETICS OF LUMINESCENCE OF CHLOROPHYLL AND ITS DERIVATIVES

A review is given on the fine-structure spectra of chlorophyll-like molecules under selective laser excitation, as well as on the related kinetic measurements.