

А. П. СУЙСАЛУ

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА ФДМР ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ХЛОРОФИЛЛОПОДОБНЫХ МОЛЕКУЛ

1. Магнитные свойства нижнего возбужденного триплетного состояния в последние годы успешно изучаются методом оптически детектированного микроволнового резонанса (ОДМР) в нулевом поле. Хлорофиллоподобные молекулы исследовались этим методом по регистрации флуоресценции или $T-T$ -поглощения [1]. Детектирование микроволнового резонанса непосредственно по изменению интенсивности фосфоресценции у данного класса соединений затруднено из-за малого выхода фосфоресценции и расположения ее в далекой красной области. Применяв светосильный монохроматор и фосфороскопическую регистрацию сигнала, нам удалось получить спектры ОДМР для хлорофилла (Хл) и близких ему соединений [2]. Эти измерения дали дополнительную информацию об относительных излучательных способностях подуровней триплета. Например, для Хл a z -уровень (z — внеплоскостная ось) заметного вклада в излучение не дает, а излучательная способность x -уровня заметно больше, чем y -уровня.

Преимущество метода ОДМР перед известной техникой ЭПР состоит в сочетании магнитных резонансов с оптической селективностью детектируемых молекул. Как известно, спектры фосфоресценции хлорофиллоподобных молекул бесструктурны, а в спектрах флуоресценции обнаруживаются квазилинии из-за устранения неоднородного уширения при селективном лазерном возбуждении. В [3] рассматривается зависимость частоты микроволнового резонанса от длины волны регистрации флуоресценции при селективном возбуждении хлорофиллоподобных молекул.

2. В настоящем сообщении мы обращаем внимание на методику флуоресцентного детектирования микроволнового резонанса (ФДМР) и рассматриваем возможности ФДМР-спектрометра на примере некоторых хлорофиллоподобных молекул. Известно, что вызванные поглощением СВЧ-излучения изменения интенсивности флуоресценции лежат в пределах 0,1—1%. Для достижения достаточного отношения сигнал/шум необходимо усреднение по большому числу циклов измерения. С целью уменьшения общего времени накопления сигнала выгодно регистрировать сильные фототоки. Обычно это делается многократным усреднением аналогового фотосигнала [1]. Мы предпочли метод счета фотонов, освобождаясь тем самым от интегрирующего влияния RC-фильтров при измерении кинетики микроволнового резонанса. Благодаря применению быстродействующей электроники (с полосой пропускания до 100 Мгц) нелинейность счета фотонов не превышала 1% при фотосигнале 10^6 имп/с и 10% при 10^7 имп/с.

Принимались меры для уменьшения уровня шумов от всевозможных источников. Лазерная накачка флуоресценции стабилизировалась по интенсивности генерации света. Для устранения флуктуаций от пузырьков кипения жидкого гелия в оптическом криостате эксперименты проводились при температуре ниже λ -точки или в парах жидкого гелия

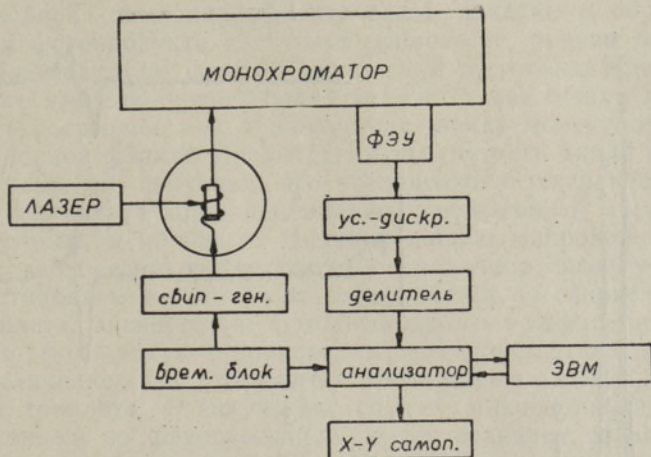


Рис. 1. Блок-схема ФДМР-спектрометра (сокращения приведены в тексте).

при 5 К. Темновой ток ФЭУ уменьшался охлаждением парами жидкого азота.

ФДМР-спектрометр (рис. 1) построен на базе оптического спектрометра, к которому прибавляется источник СВЧ-поля. Оптическая селективность получается с помощью источников лазерного возбуждения непрерывного действия и избирательной регистрации флуоресценции через монохроматор ДФС-24. Выходящее из монохроматора излучение детектируется фотоумножителем ЕМ1 9816В, дающим одноэлектронный фотоимпульс длительностью не более 10 нс. Быстродействующая система регистрации сигнала состоит из усилителя-дискриминатора в счетчике фотонов 5С1 (Brookdeal), стократного делителя частоты на базе частотомера ЧЗ-54 и многоканального анализатора импульсов LP 4840 (Nokia) в режиме многократного накопления сигнала.

Источником СВЧ-поля является свип-генератор HP 8620С/86222А (Hewlett-Packard), выходная мощность которого достигает 40 мВт. Держатель объекта в криостате заменен коаксиальной линией, нагрузкой которой служит объект в спиральной замедляющей системе. Временной блок синхронизирует свип микроволнового генератора с разверткой многоканального анализатора в режиме усреднения. ФДМР-спектрометр снабжен двухсторонним каналом обмена информации между анализатором и ЭВМ ЕС 1010, что позволяет разлагать кинетические кривые резонанса на многоэкспоненциальную зависимость в ходе эксперимента. Установка может работать без присмотра в течение нескольких часов.

3. Нижнее возбужденное триплетное состояние порфиринов изучалось методом магнитных резонансов начиная с пионерских работ З. П. Грибовой, Л. П. Каюшиным [4] и другими [5]. Нами исследовались методом ФДМР мезопорфирин-IX, копропорфирин-I и протопорфирин-IX (ППФ) в замороженных растворах *n*-октана. На рис. 2 слева приведен 0,0-мультиплет Шпольского, полученный при неселективном лазерном возбуждении (4965 Å) для ППФ. Справа показаны спектры ФДМР, зарегистрированные на разных линиях в мультиплете. В спектрах ФДМР наблюдаются два близко расположенных резонанса в области 1,4 Гц, причем при переходе с одной линии флуоресценции на другую в пределах всего мультиплета изменяется знак одного резонанса. Более того, низкочастотный резонанс в спектре 3 становится высокочастотным в

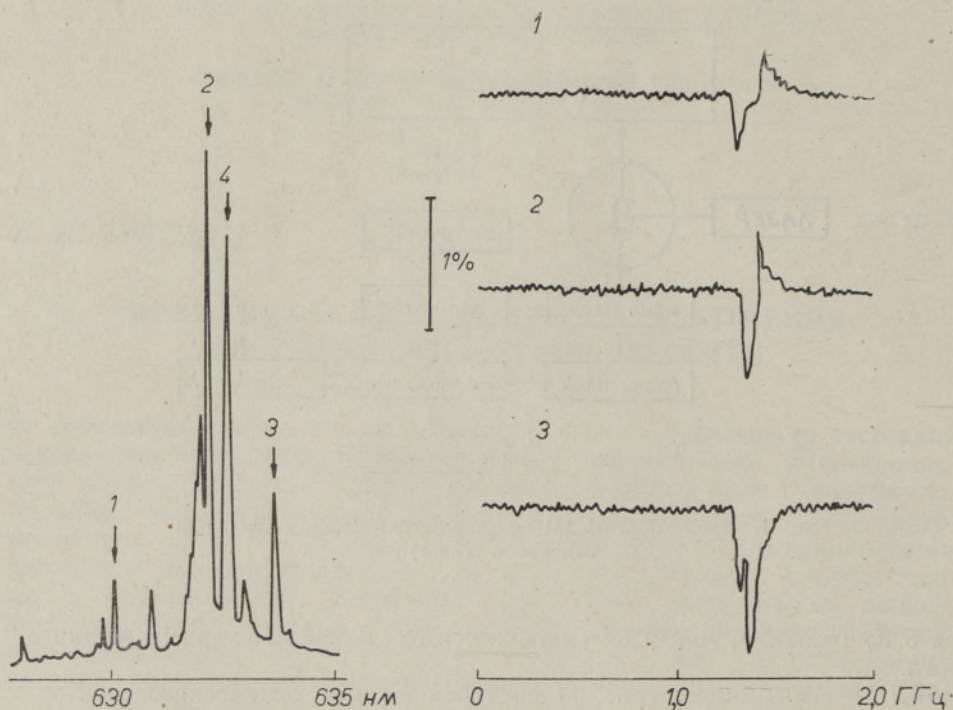


Рис. 2. (0,0)-Мультиплет Шпольского (слева) в спектре флуоресценции и спектры ФДМР (справа) для протопорфирина-IX в *n*-октано.

спектре 2, и наоборот. В спектре 1 расстояние между резонансами увеличено. Объяснение такого поведения резонансов основывается на изменении кинетики для каждого из них. Двухэкспоненциальная аппроксимация пары кинетических кривых дала времена жизни подуровней триплета для ППФ $\tau_x = 4$ мс, $\tau_y = 15$ мс, $\tau_z = 150$ мс при регистрации сигнала флуоресценции на линии 2 (x, y — плоскостные оси). При переходе на другие линии флуоресценции τ_z относительно постоянно, а τ_x и τ_y изменяются в пределах 50%.

Используя величины нуль-полевого расщепления D и E , мы наблюдали переходы $D-E$ и $D+E$, причем оказалось, что величина $|D| = 1,38$ Гц относительно мало меняется при переходе от одной компоненты Шпольского к другой, а величина E варьирует в пределах $0 - \pm 0,07$ Гц и меняет знак. Магнитная неэквивалентность компонент Шпольского говорит в пользу того, что они принадлежат примесным центрам, где молекула по-разному ориентирована в кристаллической матрице *n*-октана. Надо отметить, что при регистрации флуоресценции на линии 4 микроволновых резонансов вообще не наблюдалось. Вероятно, для соответствующих центров величина $E \approx 0$, а заселенности подуровней таковы, что резонансы с почти равными частотами компенсируют друг друга.

Аналогичные результаты были получены для мезопорфирина и копропорфирина, у которых, однако, мультиплеты линий флуоресценции еще сложнее.

4. При изучении выжигания провала на коротковолновом крае спектра флуоресценции феофитина *a* (Фф *a*) обнаруживался слабый максимум при 650 нм, который был приписан фотопродукту Фф *a* [6]. Нас интересовала роль триплетного состояния при его образовании.

При двойной стационарной оптической накачке в образовании и разложении фотопродукта наступает равновесие, причем определенное количество молекул находится в триплетном состоянии. При наложении резонансного микроволнового поля изменяется как общая заселенность триплетного состояния, так и равновесие между молекулами фотопродукта и основной формы. Предполагая замкнутость цикла фотохимического превращения, получаем, что увеличение интенсивности флуоресценции фотопродукта пропорционально уменьшению числа молекул основной формы, и наоборот. Индуцированное микроволновым полем нарушение равновесия соответствует по величине сигналу ФДМР, но время восстановления равновесия определяется не скоростью дезактивации триплета, а скоростью фотохимического превращения. Если же образование фотопродукта происходит через триплетное состояние, то эффект увеличивается — становится пропорциональным изменению заселенности триплета. В последнем случае микроволновой резонанс, детектируемый по флуоресценции, имеет величину сигнала порядка получаемой при регистрации ОДМР непосредственно по фосфоресценции.

Для Фф *a* в эфире при одновременном возбуждении линиями 6471 и 6764 Å Кг⁺-лазера и регистрации флуоресценции на длине волны 650 нм нарушения фотохимического равновесия, индуцированного микроволновым полем, не наблюдалось. Отсутствие заметного эффекта говорит в пользу того, что образование фотопродукта происходит не через триплетное состояние. Наблюдению эффекта, аналогичного ФДМР, препятствовала низкочастотная флуктуация флуоресценции при двойном оптическом возбуждении и спектрально-селективной регистрации ($\Delta\lambda = 5 \text{ \AA}$). Удалось зарегистрировать спектры ФДМР для Фф *a* и его фотопродукта в эфире при возбуждении люминесценции только одной линией 6471 Å, когда существовало стационарное количество фотопродукта. На длине волны флуоресценции 670 нм наблюдался один резонанс при 0,96 Гц, а на 650 нм — два резонанса при 0,90 и 1,10 Гц. На основе изменения спектров ФДМР можно заключить, что ответственные за флуоресценцию 650 и 670 нм примесные центры различаются не только влиянием матрицы растворителя (неоднородное уширение спектра люминесценции), но и химическим строением примесного центра молекулы Фф *a*, что подтверждает вывод [6] о ее фотохимическом превращении.

Автор благодарен Р. А. Авармаа за постоянное внимание к работе и К. Х. Маурингу за участие в экспериментах.

ЛИТЕРАТУРА

1. Clarke, R. H., Connors, R. E., Schaafsma, T. J., Kleibecker, J. F., Platenkamp, R. J., J. Amer. Chem. Soc., **98**, № 12, 3674—3677 (1976).
2. Авармаа Р. А., Суйсалу А. П., Изв. АН СССР, сер. физ., **44**, № 4, 843—847 (1979).
3. Авармаа, R., Schaafsma, T. J., Chem. Phys. Lett., **71**, № 2, 339—344 (1980).
4. Грибова З. П., Каюшин Л. П., Успехи химии, **41**, № 2, 287—320 (1972).
5. Van Dorp, W. G., Schaafsma, T. J., Soma, M., van der Waals, J. H., Chem. Phys. Lett., **21**, № 2, 221—225 (1973).
6. Mauring, K., Avarmaa, R., Chem. Phys. Lett., **81**, № 3, 446—449 (1981).

Институт физики
Академии наук Эстонской ССР

**FDMR-MEETODI RAKENDAMINE KLOROFÜLLISARNASTE
MOLEKULIDE UURIMISEKS**

On kirjeldatud fluorestsentsi järgi detekteeritud mikrolaine resonantsi (FDMR) katseaset, milles kasutatakse spektraalselt selektiivset laserergastust ja footoniloendust, ning toodud mõõtmistulemused *n*-oktaanis lahustatud protoporfüriin-IX kohta. Viimase resonantssagedused ja FDMR-signaali märgid osutusid sõltuvaiks fluorestsentsi lainepikkusest. On vaadeldud FDMR-meetodi sobivust feofütiini *a* molekulide fotomuundumise jälgimiseks.

A. P. SUIŠALU

**APPLICATION OF FDMR TECHNIQUE FOR STUDYING CHLOROPHYLL-LIKE
MOLECULES**

An experimental set-up of the fluorescence detection of microwave resonance (FDMR) by a site-selective laser excitation and photon-counting system is described. The results of the measurements of protoporphyrin-IX in *n*-octane are presented, where the resonance frequencies as well as the signs of the FDMR signal depend on the fluorescence wavelength. A possibility of using the FDMR method for detecting the phototransformation of pheophytin *a* molecules is considered.