

P. TAMKIVI

ГОРЯЧАЯ ЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ ФЕОФИТИНА

R. TAMKIVI. FEOFITIINI KUUMLUMINESTSENTS

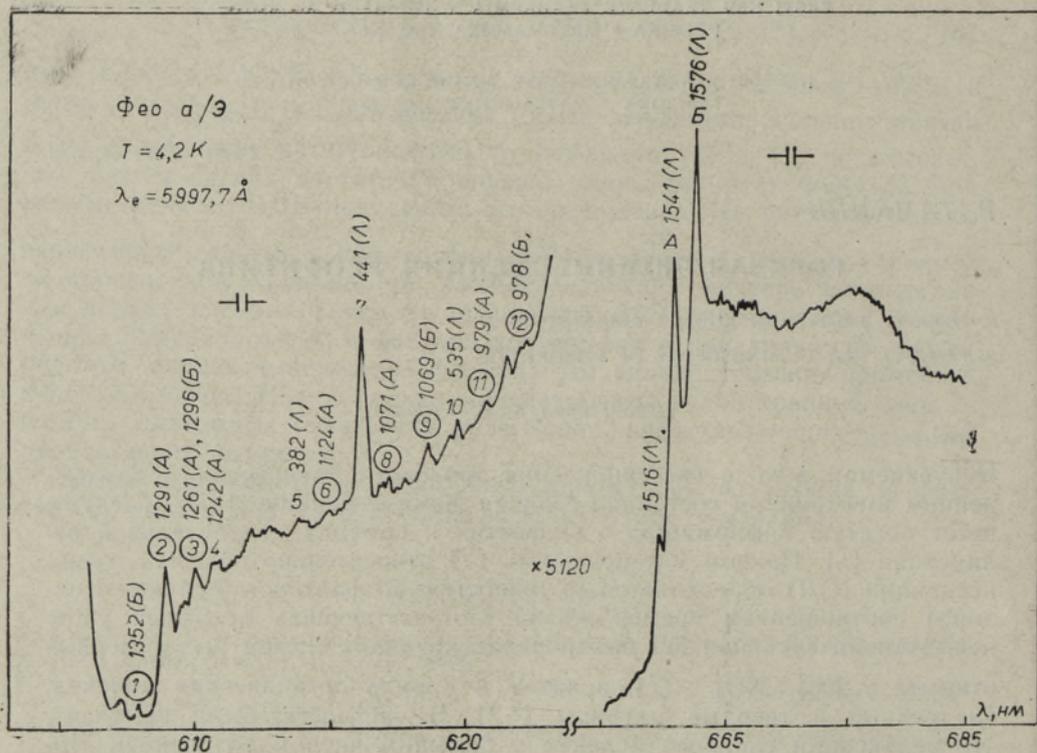
R. TAMKIVI. HOT LUMINESCENCE OF PHEOPHYTIN

(Представил К. К. Ребане)

Испускаемая в ходе восстановления теплового равновесия в возбужденном электронном состоянии горячая люминесценция (ГЛ) молекулы несет богатую информацию о скоростях и каналах колебательной релаксации [1]. Притом интенсивность ГЛ относительно обычной люминесценции (ОЛ) определяется (с точностью до факторов Франка—Кондона) соотношением времен жизни соответствующих исходных уровней. Малоинтенсивная ГЛ быстрорелаксирующих систем была впервые открыта у $KCl-NO_2^-$ [2], а затем и у ряда органических молекул, внедренных в твердые матрицы [3, 4]. В частности, было выявлено, что релаксации сложных молекул с большим числом внутренних степеней свободы, связанной с отдачей энергии окружающей матрице, сопутствует перераспределение возбуждения по внутримолекулярным колебаниям [4].

Обнаружение ГЛ у хлорофилла (Хл) — важнейшего фотосинтетического пигмента — могло бы иметь большое значение с точки зрения фотофизики процессов превращения энергии в этих молекулах, включая и системы *in vivo*. Однако из-за огромного количества колебаний у данного типа сложных молекул следует ожидать крайне малой интенсивности их ГЛ. В [5, 6] сообщалось о наблюдении дополнительных полос в антистоксовой от 0—0-полосы области спектра флуоресценции замороженных растворов Хл *a*. Предложенная авторами интерпретация этого свечения как ГЛ вызывает сомнения уже из-за его относительной интенсивности, приводящей к оценке времен колебательной релаксации ~ 1 нс. В [7] была показана несостоятельность данной трактовки, причем полоса свечения при 624 нм — наиболее подходящий в спектре кандидат ГЛ — была идентифицирована как ОЛ посторонней примеси протохлорофилла. Дальнейшая работа по повышению качества хроматографической очистки препаратов позволила довести отношение интенсивности паразитной полосы к ОЛ Хл *a* до 0,05% [8]. Несмотря на это, истинная ГЛ Хл *a* все же не обнаруживалась, что указывает на значение ~ 50 пс в качестве верхнего предела для времен колебательной релаксации данной молекулы. Далее мы обратились к поискам ГЛ у ближайшего безметалльного аналога Хл *a* — феофитина *a* (Фео *a*), который оказался более обнадеживающим объектом с точки зрения свечения посторонних примесей. Результаты этого поиска и будут изложены в настоящем сообщении.

Фео *a* получен из Хл *a*, выделенного из проростков ржи [8], путем обработки $HC1$ и последующего многократного хроматографирования. Возбуждение люминесценции охлажденных до 4,2 К эфирных растворов Фео *a* ($C \sim 10^{-5}$ моль/л) осуществлялось сканируемым лазером на красителе родамине 6Ж (CR-490), накачиваемым аргоновым лазером



Спектр излучения замороженного (4,2 К) раствора Фео *a* в эфире при возбуждении $5997,7 \text{ \AA} = 16673 \text{ см}^{-1}$. Возле максимумов отмечены их расстояния (в см^{-1}) либо от 0—0-линии (А или Б), либо от частоты лазерного возбуждения (Л). Номера компонентов, наиболее уверенно отождествляемых как ГЛ, обведены кружками. По левой части спектра высчитана постоянная — истинное отношение, например, линии 7 к фону $\approx 1:4$.

CR-3 (фирма «Когерент»). Регистрация проводилась через спектрометр ДФС-24 ($\delta\lambda \leq 3 \text{ \AA}$) с помощью ФЭУ-79 в режиме счета фотонов. Необходимое для детектирования слабых сигналов повторяющееся накопление спектров обеспечивал многоканальный анализатор LP 4840 (фирма «Нокиа»), присоединенный к ЭВМ ЕС 1010 для дальнейшей обработки данных. Шумы в спектрах были подавлены стабилизацией выходной мощности лазера на красителе с помощью системы автоматического светового контроля. Интенсивность возбуждения поддерживалась низкой ($\leq 0,5 \text{ мВт/см}^2$), чтобы уменьшить выжигание спектральных линий за счет индуцированного лазерным излучением таутомерного поворота центральных протонов безметаллических порфиринов [9].

Измеренный спектр флуоресценции Фео *a* показан на рисунке, где справа изображена неоднородно уширенная полоса ОЛ ($S_1 \rightarrow S_0$). Видно типичное для хлорофиллоподобных молекул «размножение» 0—0-линий [10], колебательные повторения которых попадают в резонанс с лазерным возбуждением. В настоящей работе мы пользовались насколько возможно коротковолновым возбуждением, приводящим к появлению в спектре лишь двух сильных 0—0-линий (А и Б на рисунке), соответствующих самым высокочастотным колебаниям (1540 и 1575 см^{-1}) состояния S_1 Фео *a* [11]. Поскольку в ожидаемом спектре ГЛ должны присутствовать более низкочастотные колебательные повторения возбуждаемых 0—0-линий, то малочисленность последних облегчает интерпретацию. С длинноволновой стороны благоприятная для поиска ГЛ область ограничивалась свечением продукта фотохи-

мического превращения Фео *a* [12]. В результате перспективным оказался лишь отрезок спектра от 605 до 625 нм.

В данной области действительно обнаруживался ряд слабых линий излучения (см. рисунок). Если эти линии представляют собой спектр ГЛ Фео *a*, то они должны смещаться вместе со сдвигом частоты лазерного возбуждения. При этом расстояние линий ГЛ до возбужденных 0—0-линий (в шкале волновых чисел) должно сохраняться и быть равным, относительно одной из последних (либо А, либо Б), частоте какого-нибудь внутримолекулярного колебания Фео *a* в S_1 -состоянии. Хотя наблюдение указанного смещения в данном случае затруднено из-за слабости и большого числа линий, удалось зарегистрировать сдвиг большинства из них (обозначены на рисунке цифрами 1—12). Природа остальных особенностей в спектре остается неясной.

Частоты колебаний Фео *a* в состоянии S_1 при 4,2 К неоднократно определялись по тонкоструктурным спектрам флуоресценции и возбуждения [11, 13, 14]. Мы повторно сняли спектр возбуждения линии А. Полученные частоты хорошо совпадали с найденными в более позднем и систематическом исследовании [11]. При интерпретации обнаруженной структуры надо учитывать возможный вклад комбинационного рассеяния (КР) как Фео *a*, так и растворителя — диэтилового эфира. Спектр КР последнего давно известен [15], для Фео *a* он получен при 300 К в [16]. Частоты колебаний Фео *a* в основном состоянии, проявляющиеся в спектрах КР как расстояния от линий КР до линии возбуждения, при 4,2 К определялись из лазерно-возбужденных в 0—0-области спектров флуоресценции [17].

Для интерпретации обнаруженной нами структуры обратимся к рисунку. Самая интенсивная линия (7) без сомнения принадлежит КР эфира. Это подтвердило и контрольное измерение спектра растворителя при том же возбуждении. Другие попадающие в данную область частоты эфира, 374 и 498 $см^{-1}$ [15], в спектре четко не наблюдались, хотя первая из них может давать вклад в полосу 5, которую, очевидно, можно связать с наиболее интенсивной линией КР Фео *a* в изучаемой области — 390 $см^{-1}$ [16], обнаруженной также в [17] (388 $см^{-1}$). Линия 10, по-видимому, соответствует колебанию 540 $см^{-1}$ в S_0 -состоянии Фео *a* [16, 17]. Остальные компоненты спектра хорошо совпадают с ожидаемой ГЛ $v'_n \rightarrow 0$ — наиболее сильно проявляющиеся в спектре возбуждения колебания S_1 -состояния Фео *a* имеют частоты 1360, 1295, 1265, 1120, 1075 и 982 $см^{-1}$ [11, 14] (ср. с рисунком). У Фео *a* имеется и частота 1240 $см^{-1}$, которая соответствует положению максимума 4 относительно 0—0-линии А, но здесь может иметь место наложение (хотя и очень слабой) линии КР Фео *a* 300 $см^{-1}$ [16]. Следует добавить, что слабые линии КР 255 [16] и 562 $см^{-1}$ [16, 17], в принципе, могут присутствовать у максимумов 2 и 11 соответственно. Все же это маловероятно из-за слабости даже сильнейшей линии КР 390 $см^{-1}$ в наших спектрах (см. рисунок). Таким образом, по меньшей мере восемь компонентов спектра, номера которых на рисунке обведены кружками, имеют все признаки ГЛ и не могут быть интерпретированы иначе.

При определении времен колебательной релаксации из спектра ГЛ необходимо знать времена затухания ОЛ и факторы Франка—Кондона соответствующих переходов [1, 4]. Для времени жизни электронного состояния S_1 Фео *a* при 4,2 К получено значение 7 нс [18]. Оценка отношения факторов Франка—Кондона вибранных переходов к такому для чисто электронного перехода ($\approx 0,1$) может быть получена из спектров флуоресценции при лазерном возбуждении в 0—0-области [11, 17]. Линиями в спектре ГЛ, в которых заведомо нет вклада от КР, являются, например, 3 и 9. Тогда использование приведенных величин

дает для времен релаксации соответствующих колебательных уровней оценки 1—3 пс. Они хорошо совпадают с полученными методом выжигания провала временами жизни 2,2, 2,4 и 2,1 пс для колебаний 1295, 1265 и 1075 см^{-1} соответственно [10] и тем самым подтверждают правильность трактовки обнаруженного свечения как ГЛ. С другой стороны, такое согласие между результатами двух подходов говорит в пользу вывода [11] о медленности фазовой релаксации в хлорофиллоподобных молекулах.

Из-за большого числа колебаний Фео *a* можно предположить, что релаксация по ним проходит равномерно без пропуска отдельных колебательных уровней. Информацию об этом дает сравнение распределения интенсивностей в спектре ГЛ и в спектре поглощения. Последнее определено из спектров возбуждения флуоресценции Фео *a* с постоянной мощностью [11]. Сравнение затрудняют слабость линий и сильный фон в спектре ГЛ. Все же можно заключить, что в спектре ГЛ проявляются именно те колебания, которые дают наиболее интенсивные линии в спектре возбуждения — 982, 1075, 1120, 1265 и 1295 см^{-1} (ср. с рисунком). Исключение здесь, по-видимому, составляет колебание 1360 см^{-1} , которое в ГЛ проявляется гораздо слабее, чем в поглощении. Это свидетельствует о том, что часть релаксации, возможно, проходит минуя данный уровень.

Таким образом, можно считать доказанным существование ГЛ у Фео *a* — ближайшего аналога главного фотосинтетического пигмента растений. Как уже отмечено в [7, 8], обнаружение ГЛ у самого Хл *a* сдерживают возможности методов его выделения и очистки.

Автор выражает благодарность Р. Авармаа за предложение темы данной работы и полезное обсуждение, К. К. Ребане за ценные замечания, а также С. Куузик и В. Нымм за приготовление объектов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Rebane, K., Saari, P., J. Luminescence, **16**, № 3, 223—243 (1978).
2. Ребане К., Саари П., Изв. АН ЭССР, Физ. Матем., **17**, № 2, 241—244 (1968).
3. Тамм Т. Б., Оптика и спектроскопия, **32**, вып. 4, 623—624 (1972).
4. Тамм Т., Саари П., Chem. Phys., **40**, № 2, 311—319 (1979).
5. Kawabe, K., Naemura, M., Matsukawa, Y., Techn. Rep. Osaka Univ., **20**, № 958, 665—672 (1970).
6. Menzel, E. R., Polles, J. S., Chem. Phys. Lett., **24**, № 4, 545—548 (1974).
7. Авармаа Р. А., Тамкиви Р. П., Ж. прикладной спектроскопии, **27**, № 2, 259—262 (1977).
8. Тыниссоо В., Тамкиви Р., Изв. АН ЭССР, Хим., **27**, № 4, 219—223 (1978).
9. Соловьев К. Н., Залесский Н. Е., Котло В. Н., Шкирман С. Ф., Письма в ЖЭТФ, **17**, № 9, 463—466 (1973).
10. Авармаа Р., Ребане К., Stud. Biophys., **48**, № 3, 209—218 (1975).
11. Rebane, K., Avarmaa, R., Chem. Phys., **68**, № 2, 191—200 (1982).
12. Mauring, K., Avarmaa, R., Chem. Phys. Lett., **81**, № 3, 446—449 (1981).
13. Авармаа Р. А., Мауринг К. Х., Ж. прикладной спектроскопии, **28**, № 4, 658—662 (1978).
14. Авармаа Р., Тамкиви Р., Кийслер С., Нымм В., Изв. АН ЭССР, Физ. Матем., **29**, № 1, 39—45 (1980).
15. Loader, J., Basic Laser Raman Spectroscopy, Belfast, Heyden & Son Ltd., Universities Press, 1970, p. 76—77.
16. Lutz, M., J. Raman Spectrosc., **2**, № 5, 497—516 (1974).
17. Быковская Л. А., Литвин Ф. Ф., Персонов Р. И., Романовский Ю. В., Биофизика, **25**, № 1, 13—20 (1980).
18. Тамкиви Р. П., Авармаа Р. А., Изв. АН СССР, сер. физ., **42**, № 3, 568—572 (1978).
19. Мауринг К. Х., В кн.: Тезисы докладов Всесоюзного совещания по молекулярной люминесценции, Харьков, 1982, с. 158.

Институт физики
Академии наук Эстонской ССР

Поступила в редакцию
6/V 1982