

535,37

**БЕСФОНОННЫЕ ЛИНИИ В СПЕКТРАХ МОЛЕКУЛ
ТИПА ХЛОРОФИЛЛА
В НИЗКОТЕМПЕРАТУРНЫХ ТВЕРДОТЕЛЬНЫХ МАТРИЦАХ**

Р. А. Авармаа, К. К. Ребане

СОДЕРЖАНИЕ

1. Введение	433
2. Теория	435
2.1. Бесфононные линии в спектре селективно возбуждаемой неоднородной системы. 2.2. Влияние переноса энергии на селективность возбуждения.	
3. Тонкоструктурные спектры хлорофиллоподобных молекул	439
3.1. Техника эксперимента. 3.2. Селективные спектры флуоресценции и возбуждения. 3.3. Анализ структуры спектров.	
4. Фотовыжигание спектральных провалов	445
4.1. Фотохимические процессы. 4.2. Выжигание путем насыщения переходов. 4.3. Нефотохимическое превращение центров.	
5. Спектры высокого разрешения нативных и модельных систем	451
6. Заключение	455
Список литературы	455

1. ВВЕДЕНИЕ

Сложные органические молекулы играют ключевую роль в весьма разнообразных биофизических и биохимических процессах. В случае таких молекул, как хлорофилл, родопсин, фитохром и др., их функционирование непосредственно основано на взаимодействии электронной системы со светом. Спектры поглощения и флуоресценции хлорофиллоподобных молекул в растворах состоят из широких бесструктурных полос, возникающих при переходах между электронно-колебательными (вибронными) уровнями. Поскольку большие молекулы имеют очень много колебательных степеней свободы, то соответствующие уровни энергии расположены густо, отчасти квазинепрерывно. Поэтому существовало даже мнение, будто такие молекулы и в принципе не могут иметь узких линий в своих спектрах.

После того как для ряда ароматических молекул в замороженных н-алкановых матрицах были получены квазилинейчатые электронно-колебательные спектры (был обнаружен эффект Шпольского¹), удалось получить тонкоструктурные спектры *) и для некоторых порфиринов в матрицах Шпольского². В дальнейшем был проведен цикл исследований по тонкоструктурным спектрам родоначальника данного класса соединений — порфина и ряда его производных (см. гл. 4 в³). В случае хлорофилла и его аналогов надежды получения квазилинейчатых электронных спектров сначала также основывались на эффекте Шпольского, но применимость этого способа к столь большим молекулам оказалась весьма ограниченной^{4, 5}.

*) Ширина линий в таких спектрах обычно 1–10 см⁻¹ при температурах от 4,2 до 77 К.

Следует подчеркнуть, что возникновение тонкоструктурных спектров примесных молекул обязано наличию в спектрах твердых тел бесфононных линий (БФЛ), а интерпретация спектров Шпольского служила определенным пробным камнем для теории БФЛ⁶. Все же лишь спустя несколько лет после разработки теории^{6–10} появились новые весомые доказательства в пользу ее применимости к таким системам — было проведено селективное возбуждение компонентов мультиплета и обнаружены предсказываемые теорией фононные крылья в спектрах возбуждения¹¹ и флуоресценции²¹. Были также проведены исследования по температурному уширению и сдвигу БФЛ в спектрах Шпольского (см., например^{13, 14}), подтвердившие все основные выводы теории¹⁰.

Параллельно развивались и исследования БФЛ примесных центров в неорганических кристаллах (см. например,^{15–17}). Существенный вклад в понимание процессов электронно-колебательного взаимодействия дало исследование малых молекулярных ионов как примесей в щелочно-галоидных кристаллах¹⁸.

К концу 60-х годов установилась точка зрения, что основным фактором, препятствующим получению и изучению более узких чисто электронных БФЛ в кристаллических матрицах, является неоднородное уширение (см. § 30 в¹⁰). В спектре одного центра или совокупности совершенно идентичных примесных центров (т. е. в однородном спектре) ширина чисто электронной линии (ЧЭЛ) в пределе $T \rightarrow 0$ приближается к радиационной ($\Gamma_0 \ll \ll 10^{-3} \text{ см}^{-1}$). В реальных кристаллах, тем более в стеклах, каждый примесный центр подвержен влиянию различных локальных полей за счет дефектов, дислокаций, других примесей или просто разупорядоченной структуры матрицы. Эти локальные различия приводят к стохастическим сдвигам энергий переходов, что проявляется как неоднородное уширение спектров — у хороших монокристаллов оно меньше 1 см^{-1} , а у стекол составляет сотни см^{-1} .

Возможность частичного устранения неоднородного уширения спектра путем узкополосного возбуждения флуоресценции была показана в ранней работе¹⁹ на примере растворов молекул коронена при 77 К. Некоторое сужение линий редкоземельных примесей было достигнуто путем монохроматизированного лампового²⁰ или нерезонансного лазерного²¹ возбуждения люминесценции. Почти полное устранение неоднородного уширения удалось осуществить путем резонансного лазерного возбуждения кристаллов рубина, где чисто электронная R_1 -линия была сужена до $0,007 \text{ см}^{-1}$ ²².

Что же касается органических молекул в специально не подобранных матрицах, то там ситуация была сложнее — спектры большинства замороженных растворов оставались практически бесструктурными даже при гелиевых температурах, и природа их уширения не была ясна. При селективном лазерном возбуждении таких систем был обнаружен яркий эффект превращения сплошных спектров в квазилинейчатые и тем самым окончательно доказана решающая роль неоднородного уширения²³.

Исследования по селективной спектроскопии хлорофилла и его производных были начаты в^{5, 24}. Вскоре был проведен необходимый для интерпретации наблюдаемой сложной структуры теоретический анализ ширин и интенсивностей линий для случая селективно возбуждаемых спектров^{25, 26}. В частности, было показано, что наблюдаемая при нерезонансном монохроматическом возбуждении ЧЭЛ спектра флуоресценции приобретает ширину соответствующей вибронной линии поглощения, т. е. остается еще существенно уширенной по сравнению с естественной шириной ЧЭЛ, предсказываемой теорией. С целью выявления однородного контура более узких ЧЭЛ был предложен метод фотовыжигания спектральных провалов^{27, 28}, который в дальнейшем нашел широкое применение²⁹. Метод выжигания провалов был использован также для существенного повышения разрешения в спектроскопии хлорофиллоподобных молекул.

2. ТЕОРИЯ

2.1. Бесфононные линии в спектре селективно возбуждаемой неоднородной системы

В простейшей модели примесного центра кристалла, где учитывается только сдвиг адиабатических потенциалов при электронном переходе (линейное электронно-колебательное взаимодействие), ЧЭЛ имеет радиационную ширину, являясь оптическим аналогом линии Мёссбауэра^{8, 17}. С учетом изменения системы нормальных координат (квадратичного электронно-колебательного взаимодействия) и ангармонизма колебаний ЧЭЛ уширяется с повышением температуры^{9, 10, 15}. Вибронные линии — повторения ЧЭЛ по локальным колебаниям (в качестве которых в случае молекулярных примесей выступают внутримолекулярные) — уширены уже при нулевой температуре за счет ангармонического распада соответствующих уровней. Все БФЛ сопровождаются фоннными крыльями, проявляющимися с учетом разности адиабатических потенциалов по кристаллическим колебаниям. Относительную интенсивность линии к интегральной интенсивности крыла плюс линии принято называть фактором Дебая — Валлера (ФДВ). Вопросы проявления электронно-колебательных взаимодействий в тонкоструктурных спектрах рассматривались, например, в обзоре³⁰.

Такие «идеальные» спектры в реальных системах усредняются по неоднородному ансамблю примесных центров, что выражается как неоднородное уширение. В основательной работе³¹ показано, что в кристаллах неоднородное уширение может иметь разные распределения, в частности дать как гауссов, так и лоренцов контур линии. Применимость теории³¹ была удачно продемонстрирована на примере O_2^- -центров³².

Эффект селективного возбуждения БФЛ в неоднородных системах основывается на ее уникальной узости и вытекающей отсюда огромной пиковой интенсивности³³. Если взять для примера ЧЭЛ при $T \rightarrow 0$ с радиационной ширины 10^{-4} см^{-1} ($\tau_1 \approx 50 \text{ пс}$), с крылом шириной 10^2 см^{-1} , то при величине ФДВ $\beta = 0,1$ отношение пиковых интенсивностей линии и крыла составило бы 10^5 . Тогда и в монохроматически возбуждаемом спектре излучения пиковая интенсивность линии на несколько порядков превышала бы интенсивность крыла. В реальном же эксперименте температура ненулевая, а в поглощении участвуют и фоннные крылья, и вибронные БФЛ, поэтому необходим последовательный учет всех компонент спектра. Полезным для трактовки селективно возбуждаемых спектров оказалось введение понятия функции неоднородного распределения (ФНР), выражающей распределение числа примесных центров (молекул) по смещениям $\Delta\nu$ частоты чисто электронного перехода^{25, 34}. Монохроматически возбуждаемый спектр флуоресценции при этом выражается в виде свертки

$$F(\nu_e, \nu_f) = \eta_0 \int \rho(\Delta\nu) \varphi(\nu_f - \Delta\nu) \chi(\nu_e - \Delta\nu) d\Delta\nu, \quad (1)$$

где $\rho(\Delta\nu)$ — ФНР, $\varphi(\nu)$ и $\chi(\nu)$ — однородные спектры флуоресценции и поглощения, ν_f и ν_e — частоты регистрации и возбуждения соответственно (рис. 1). Коэффициент η_0 выражает не зависящий от частоты выход флуоресценции. При $\nu_f = \text{const}$ формула (1) описывает спектр возбуждения (или «селективный спектр поглощения»).

Путем разделения однородных спектров на БФЛ и их фоннных крыльев с помощью формулы (1) получены следующие выводы^{25, 26}. Во-первых, наблюдаемая ширина линии Γ_{se} складывается из однородных ширин линий излучения и поглощения:

$$\Gamma_{se} \approx \Gamma_e + \Gamma_0. \quad (2)$$

Во-вторых, возбуждение в области вибронных переходов приводит к возникновению многолинейчатой структуры в чисто электронной полосе. Расстояния этих «псевдолиний» от линии возбуждения $\nu_e - \nu_f$ равны частотам локальных колебаний ω_i в возбужденном электронном состоянии. Следовательно, последние могут быть определены непосредственно из спектров флуоресценции. Такая многолинейчатая структура была обнаружена как

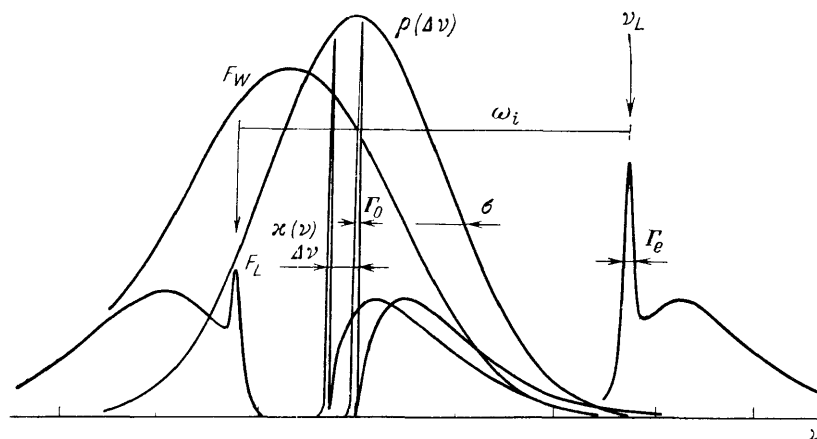


Рис. 1. Функция неоднородного распределения $\rho(\Delta\nu)$ гауссовой формы с полушириной σ и два однородных спектра поглощения $\kappa(\nu)$ с ЧЭЛ шириной Γ_0 , сдвинутые на частоту $\Delta\nu$. F_W — неоднородный спектр флуоресценции при белом возбуждении, F_L — при монохроматическом возбуждении в резонансе с вибронной БФЛ шириной Γ_e , соответствующей локальной моде ω_i

для систем Шпольского²⁶, так и для молекул в стеклообразных матрицах³⁵. Ее проявление характерно для систем с большим неоднородным уширением (см. п. 3.2).

В третьих, относительная интенсивность линии и крыла существенно зависит от смещения $\Delta\nu$ частоты возбуждения в пределах ФНР: БФЛ предпочтительнее участвуют в поглощении на низкочастотном краю, нежели на высокочастотном, где главным образом суммируются фоновые крылья (получается так называемая псевдокрыло). Этот вывод был более детально подтвержден модельными расчетами³⁶. В последнее время подобные численные расчеты проводились для разных спектральных контуров и соотношений параметров модели³⁷. При этом рассматривались ФНР возбужденных молекул и функция селективности, вычислялся эффективный ФДВ.

В этой связи отметим, что из-за неоднородного уширения в селективных спектрах зеркальная симметрия между спектрами флуоресценции и поглощения теряется. Как показано в³⁸, если $\rho(\Delta\nu)$ — симметричная кривая и однородные спектры $\kappa(\nu)$ и $\phi(\nu)$ взаимно зеркально симметричны, то из (1) получается двумерная симметрия между спектрами флуоресценции и возбуждения:

$$\mathcal{E}(\nu, \nu^*) = F(\nu_e = -\nu^*, \nu_f = -\nu), \quad (3)$$

где $\mathcal{E}(\nu, \nu^*)$ — спектр возбуждения для регистрации на частоте $\nu_f = \nu^*$, причем частоты отсчитываются от несмещенной ($\Delta\nu = 0$) ЧЭЛ. Отсюда следует и простое соотношение между значениями ФДВ в этих двух спектрах:

$$\beta_e(\nu_f = \nu^*) = \beta_f(\nu_e = -\nu^*), \quad (4)$$

отражающее то обстоятельство, что интенсивность линии в спектре излучения растет при возбуждении на «красном» краю ФНР ($\nu^* < 0$), а в спектре возбуждения — при регистрации на «синем» краю ($\nu^* > 0$).

В рассмотренной простой модели ФНР определена для одного конкретного электронного перехода. Было показано³⁹, что неоднородные распре-

деления разных электронных переходов могут быть практически некоррелированы между собой, и поэтому, например, сущение спектров фосфоресценции стало возможным только при прямом $T_1 \leftarrow S_0$ -возбуждении⁴⁰. Дополнительное небольшое неоднородное уширение претерпевают и колебательные подуровни состояния с фиксированной частотой чисто электронного перехода⁴¹.

Решению прямой задачи вычисления наблюдаемых спектральных кривых и параметров на основе модельных представлений посвящен ряд работ, в которых разрабатывались методы определения самой ФНР и однородных спектров по экспериментальным данным⁴²⁻⁴⁴. Рассматривались также вопросы единой теории резонансного вторичного свечения в условиях неоднородного уширения⁴⁵.

2.2. Влияние переноса энергии на селективность возбуждения

Предыдущие расчеты были проведены для случая малой концентрации, когда переносом энергии возбуждения между примесными молекулами можно пренебречь. В связи с изучением спектров хлорофилла в модельных и нативных системах актуальным стало и рассмотрение селективных спектров при быстром переносе энергии. Трактовка такой ситуации дана в³⁸.

Исходим из модели п. 2.1, вычисляя вероятность переноса энергии между примесями неоднородного ансамбля в диполь-дипольном приближении по Ферстеру и Галанину⁴⁶:

$$W(\nu_d, \nu_a, R) \sim R_0^6(\nu_d, \nu_a) R^{-6}, \quad (5)$$

где ν_d, ν_a — смещения частот О — О-перехода донора и акцептора соответственно, R — их расстояние. Радиус переноса определяется интегралом перекрытия

$$R_0^6 \sim S(\nu_d - \nu_a) = \int \varphi(\nu_t - \nu_d) \kappa(\nu_t - \nu_a) d\nu_t. \quad (6)$$

Нерезонансный перенос, возникающий за счет перекрытия фононных крыльев спектра излучения донора и спектра поглощения акцептора, в случае широкой ФНР приводит к исчезновению БФЛ (рис. 2).

Целесообразно рассмотреть функцию переноса энергии $p(\nu_d)$, выражающую среднюю вероятность переноса от данного донора к всевозможным акцепторам в пределах неоднородной совокупности. В предположении независимости усреднения по расстояниям от частотного распределения, получим

$$p(\nu_d) = p_0 \int \rho(\nu_a) S(\nu_d - \nu_a) d\nu_a. \quad (7)$$

Если провести строгое усреднение по расстояниям и частотам, то функция переноса несколько видоизменяется:

$$q(\nu_d) = q_0 \int \rho(\nu_a) [S(\nu_d - \nu_a)]^{1/2} d\nu_a. \quad (8)$$

На рис. 2 представлены результаты модельного расчета функций $p(\nu_d)$ и $q(\nu_d)$, которые отражают общую тенденцию уменьшения скорости переноса на низкочастотном спаде неоднородной полосы. Это связано с сокращением числа подходящих (в смысле величины интеграла перекрытия (6)) акцепторов при уменьшении ν_d . Функции p и q мало различаются, так что на практике вполне можно пользоваться более простым выражением (7). Падение относительной интенсивности БФЛ при этом выражается в частотной зависимости выхода флуоресценции доноров

$$T(\nu_d) = [1 + p_t \tau_0 p(\nu_d)]^{-1}; \quad (9)$$

здесь параметр ρ_i отражает максимальную скорость переноса (для данной концентрации) в единицах обратного времени затухания возбужденного состояния τ_0^{-1} .

Конкретный вид спектра флуоресценции вычислялся на основе решения интегрального уравнения относительно $f(v_e, \Delta v)$ — неоднородного спектрального распределения населенности возбужденного состояния, в предположении монохроматического возбуждения. Теперь спектр флуоресценции выражается в виде

$$F_f(v_e, v_f) = \int (v_e, \Delta v) \varphi(v_f - \Delta v) d\Delta v. \quad (10)$$

Результаты модельных расчетов (рис. 3) показали, что хотя около максимума неоднородной полосы убывание БФЛ значительно, на низкочастотном

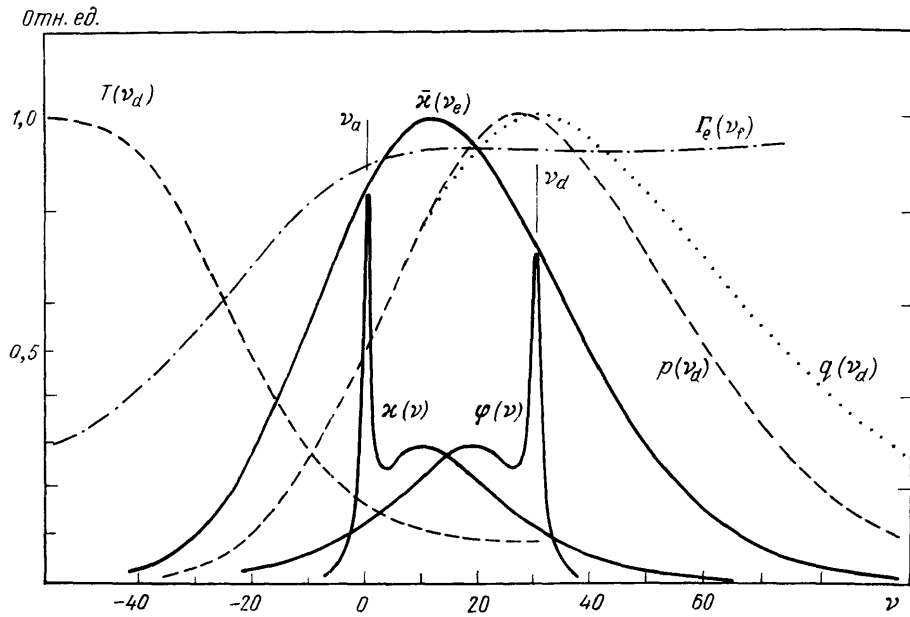


Рис. 2. Схема переноса энергии в неоднородной полосе ($\sigma = 42$) от возбуждаемых резонансно на частоте v_d центров к акцепторам с частотой БФЛ v_a за счет перекрытия соответствующих спектров излучения $\varphi(v)$ и поглощения $x(v)$.

Фононное крыло в $x(v)$ моделировано контуром $Q(\alpha, v) = v\alpha^{-2} \exp(-v/\alpha)$, $v \geq 0$; $Q = 0$ при $v < 0$ БФЛ - лоренцианом ($\alpha = 10$, $\beta = 0,2$). Результаты расчета: неоднородный спектр поглощения $x(v_e)$, функции переноса $p(v_d)$ и $q(v_d)$, факторы ослабления БФЛ для спектров флуоресценции $T(v_d)$ и возбуждения $r_e(v_f)$ (обозначено как $\Gamma_e(v_f)$)

крае можно получить вполне четкие линии даже в районе критической концентрации $C \approx (R_0)^{-3}$. Из рассмотрения сопряженных спектров возбуждения следует, что соотношения (3) и (4) нарушаются в результате переноса. При этом для спектров флуоресценции частотная зависимость ФДВ усиливается, а для спектров возбуждения, наоборот, сглаживается. В этом смысле БФЛ в спектрах возбуждения менее чувствительны к переносу энергии, чем в спектрах испускания, где линии на высокочастотной области ФНР быстро исчезают. Эти тенденции выражаются в частотной зависимости относительного падения эффективных ФДВ в результате переноса. Для спектра флуоресценции это отношение равно просто выходу свечения первоначально возбужденных доноров $T(v_e)$, а для спектра возбуждения

$$r_e(v_f) = \frac{T(v_f)}{F_f^{(w)}(v_f)}. \quad (11)$$

где $F_t^{(w)}(\nu_f)$ — спектр флуоресценции при белом возбуждении. Как видно из рис. 2, частотные зависимости кривых $T(\nu_e)$ и $r_e(\nu_f)$ действительно существенно отличаются.

Поскольку эти расчеты проведены для резонансной О — О-группы, то в реальном эксперименте при возбуждении и вибронной области поглощения

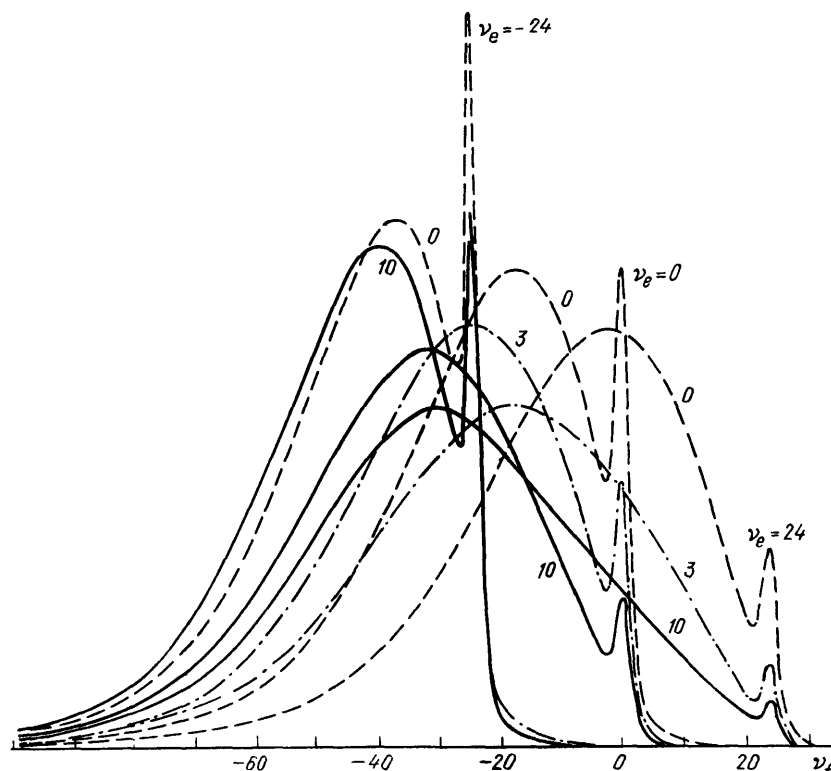


Рис. 3. Селективно возбужденные спектры флуоресценции, рассчитанные³⁸ с учетом переноса энергии в модели рис. 2 для $\nu_e = 24$; 0 и -24 при значениях параметра переноса $p_t \tau_0 = 0$; 3 и 10, указанных около кривых.

Спектры приведены к одинаковой площади

надо учитывать наложение нескольких (псевдо)линий и их крыльев в чисто электронной области. Отсюда вытекает общий вывод, что наиболее подходящим для получения БФЛ является измерение спектра возбуждения с регистрацией на коротковолновом краю О — О-полосы.

3. ТОНКОСТРУКТУРНЫЕ СПЕКТРЫ ХЛОРОФИЛЛОПОДОБНЫХ МОЛЕКУЛ

3.1. Техника эксперимента

Современные спектроскопические измерения, как правило, проводятся с помощью лазерных источников излучения. Первые эксперименты по устранению неоднородного уширения выполнялись путем возбуждения флуоресценции отдельными линиями непрерывных газовых лазеров^{23, 24, 26}. Чтобы не ограничиться выбором нескольких фиксированных частот возбуждения, стали использовать перестраиваемые лазеры на красителях⁴⁷⁻⁴⁹. С точки зрения отношения сигнала к шуму предпочтительнее непрерывные лазеры, а на импульсных легче достигается перестройка в широкой области спектра. Еще более высокие требования предъявляет измерение спектров возбуждения.

Для таких экспериментов является подходящим лазер на красителе, накачиваемый аргоновым или криптоновым лазером. При возбуждении в области вибронных переходов можно использовать мощности 1–10 мВт при ширине линии $\sim 1 \text{ см}^{-1}$. Выходную мощность желательно поддерживать постоянной по спектру и стабилизировать во времени, что можно осуществлять, например, с помощью обратной связи на ток накачивающего лазера. Использовалась также стабилизация мощности электрооптической системой подавления шумов⁵⁰. Для обеспечения точной калибровки шкалы длин волн применяется методика записи реперных линий неона параллельно со спектром возбуждения при помощи оптогальванического эффекта⁵¹.

В случае измерения спектров флуоресценции при возбуждении в О — О-полосе, учитывая интенсивность и узость ЧЭЛ, часто приходится сталкиваться с быстрым выжиганием резонансных центров и с соответствующим убыванием интенсивности линий в ходе измерения. Для восстановления их интенсивности использовалось периодическое широкополосное освещение образца⁴⁷. Уменьшение плотности возбуждения до 100 мкВт/см^2 также оказалось достаточным для подобных измерений⁴⁹. При необратимом выжигании прибегали также к сканированию частоты возбуждения в небольшом участке неоднородной полосы. Так, при ширине линии $0,5 \text{ см}^{-1}$ сканирование ν_e в пределах 10 см^{-1} уменьшает процент выжигания до 20 раз. В предположении гладкой кривой ФНР такая перестройка мало влияет на вид спектра, но в шкалу частот надо ввести соответствующие поправки.

При экспериментах по выжиганию спектральных провалов используемая мощность в значительной степени зависит от механизма выжигания, конкретной системы, ширины линии и т. п. Существенно при этом ограничить как интенсивности, так и дозу облучения таким образом, чтобы избежать эффектов насыщения. Все эти вопросы подробно рассмотрены в²⁹.

Измерения селективно возбуждаемых спектров обычно проводятся при температуре жидкого гелия (4,2 К) или в парах гелия ($\approx 5 \text{ К}$). Для большинства органических систем, включая хлорофиллоподобные молекулы, БФЛ в таких спектрах исчезают при температурах выше 40 К^{23, 49}. При использовании метода выжигания провалов, позволяющего измерять чрезвычайно узкие ЧЭЛ, требуются и более низкие температуры.

Типичные измерения спектров хлорофиллоподобных молекул проводились при концентрации молекул в растворе $\sim 10^{-5} \text{ М}$. В случае хлорофиллов, имеющих ион магния в центре молекулы, для получения моносолюватов по магнию подходят такие растворители, как диэтиловый эфир, триэтиламин, диметилформамид; дисольватов — пиридин, тетрагидрофуран и другие сильные доноры электронов. В спиртовых растворах могут образоваться водородные связи с С=О-группами молекул пигментов.

3.2. Селективные спектры флуоресценции и возбуждения

Основная полоса флуоресценции главного фотосинтетического пигмента хлорофилла-а (Хл-а) в замороженном растворе при температуре жидкого гелия в условиях монохроматического возбуждения превращается в квазилинейчатую^{5, 24} (рис. 4). Согласно п. 2.1 все наблюдаемые БФЛ являются О—О-псевдолиниями, и по частотному интервалу до возбуждающей линии можно определить частоты внутримолекулярных колебаний ω_1 в возбужденном состоянии S_1 . Фон под линиями возникает в результате суммирования фоновых крыльев всех возбуждаемых центров (как через БФЛ, так и через крыло). Все же не исключено, что часть фона обусловлена «плохими» центрами, в которых электрон-фононное взаимодействие по каким-то причинам (из-за ассоциации или комплексации) увеличено. Наблюдалось также уширение линий и убывание их интенсивности с температурой до пропадания структуры при $T \gtrsim 40 \text{ К}$ ⁴⁹.

Для ряда родственных соединений и производных хлорофилла (рис. 5) получены аналогичные результаты, определены наборы колебательных частот^{48, 49, 52, 53}. Подобные измерения проводились в других лабораториях с использованием как аморфных, так и поликристаллических матриц^{54–56}.

Поскольку для большинства порфиринов можно найти подходящую матрицу Шпольского, то к ним селективную спектроскопию стали применять несколько позже. В⁶⁷ методом селективного лазерного возбуждения порфина и его производных в полимерных пленках измерялись поляризационные характеристики вибранных $S_1 \leftarrow S_0$ -переходов и определялись их типы симметрии. Селективное возбуждение позволило получить квазилинейчатые

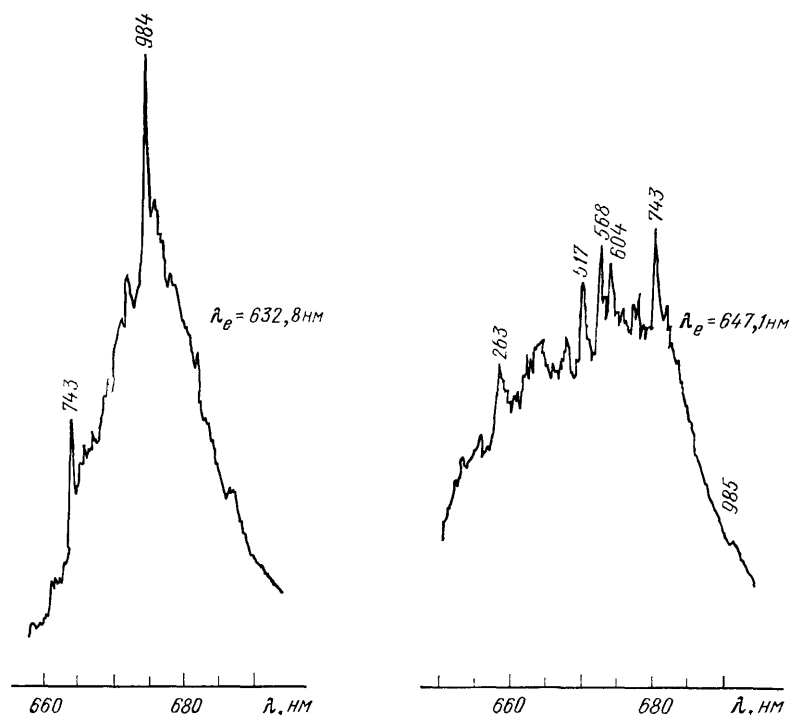


Рис. 4. Спектры флуоресценции хлорофилла-а в толуоле ($C = 10^{-5}$ М) при возбуждении лазерными линиями 632,8 и 647,1 нм; $T = 4,2$ К³³.
Около линий указаны частоты колебаний S_1 -состояния $\omega_1 = \nu_e - \nu_f$

спектры флуоресценции для ионных форм некоторых биогенных порфиринов^{58,59}. Исследовались особенности спектров металлопорфиринов при монохроматическом возбуждении в области перекрытия вибранных переходов $S_1 \leftarrow S_0$ и $S_2 \leftarrow S_0$ ⁶⁰. На примере протопорфирина детально изучался вопрос о зависимости структуры спектра от частоты возбуждения в пределах ФНР⁶¹.

В случае не очень сложных порфиринов применима и методика получения тонкоструктурных спектров путем охлаждения молекул в сверхзвуковых струях⁶².

Колебательная структура квазилинейчатых спектров порфиринов подробно рассматривается в монографии⁶³.

С целью извлечения информации о колебательных подуровнях основного электронного состояния молекул широко применяется спектроскопия комбинационного рассеяния света. В частности, она использовалась для изучения порфиринов⁶³ и хлорофиллов⁶⁴. Следует отметить тесную связь резонансного комбинационного рассеяния с вибранными спектрами поглощения и флуоресценции; в частности, профили возбуждения резонансного

рассеяния, получаются из спектров поглощения методом трансформационного анализа^{65, 66}.

Колебательные частоты основного электронного состояния проявляются и в спектрах флуоресценции при селективном возбуждении в О—О-полосе. Однако в этом случае возникают серьезные трудности из-за выжигания провала на частоте возбуждения. Используя разные способы восстановления

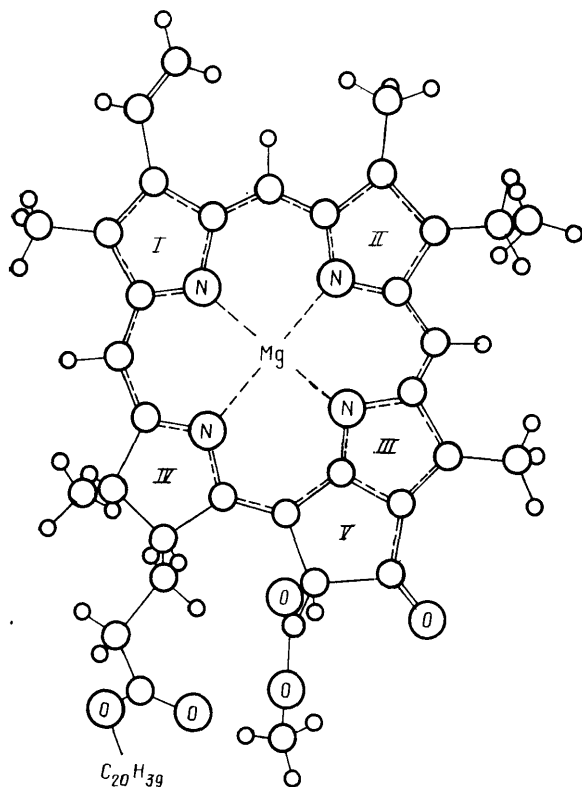


Рис. 5. Молекулярная структура хлорофилла-а.

Средние кружки изображают атомы углерода, маленькие — водорода. У протохлорофилла (ПХл) π -электронная система (штриховая линия) охватывает и кольцо IV из-за отсутствия на нем протонов. В феофитинах (Фф) атом Mg заменен двумя протонами, координированными с N_I и N_{II}. В бактериальном хлорофилле восстановлено протонами и кольцо II. Свободный порфин представляет собой тетрапиррольный скелет без боковых групп

исходного неоднородного контура, такие спектры получены для Хл-а, его нескольких производных, а также порфиринов^{47, 49, 57, 58}.

Что же касается частот возбужденного электронного состояния S_1 , то их полный набор можно получить, используя ряд фиксированных частот возбуждения во всей области вибронного $S_1 \leftarrow S_0$ -поглощения. Таким путем были получены точные значения ω_1 для Хл-а и шести его ближайших аналогов⁴⁹. Достоинствами таких спектров являются относительная простота измерений, высокая чувствительность (можно изучать растворенное вещество в количестве $\sim 10^{-12}$ М, используя среднюю мощность лазера 10 мВт) и возможность идентификации молекул по характерному мультиплету псевдолиний. С другой стороны, относительные интенсивности вибронных переходов, а также их частоты и поляризации для центров с заданной частотой чисто электронного перехода наиболее непосредственно определяются из спектров возбуждения (рис. 6). Узколинейчатые селективные спектры возбуждения также измерены для ряда хлорофиллоподобных молекул^{48, 49}.

Вышеуказанные работы касались хлорофилла высших растений и его производных. С другой стороны, по сравнению с двухсистемным фотосинтезом растений, первичные процессы бактериального фотосинтеза изучены и поняты значительно лучше (см.⁶⁷ и ссылки там). В связи с этим возрос интерес к спектроскопическому исследованию бактериохлорофилла (БХл). Недавно получены первые результаты по спектрам высокого разрешения для БХл⁵⁰.

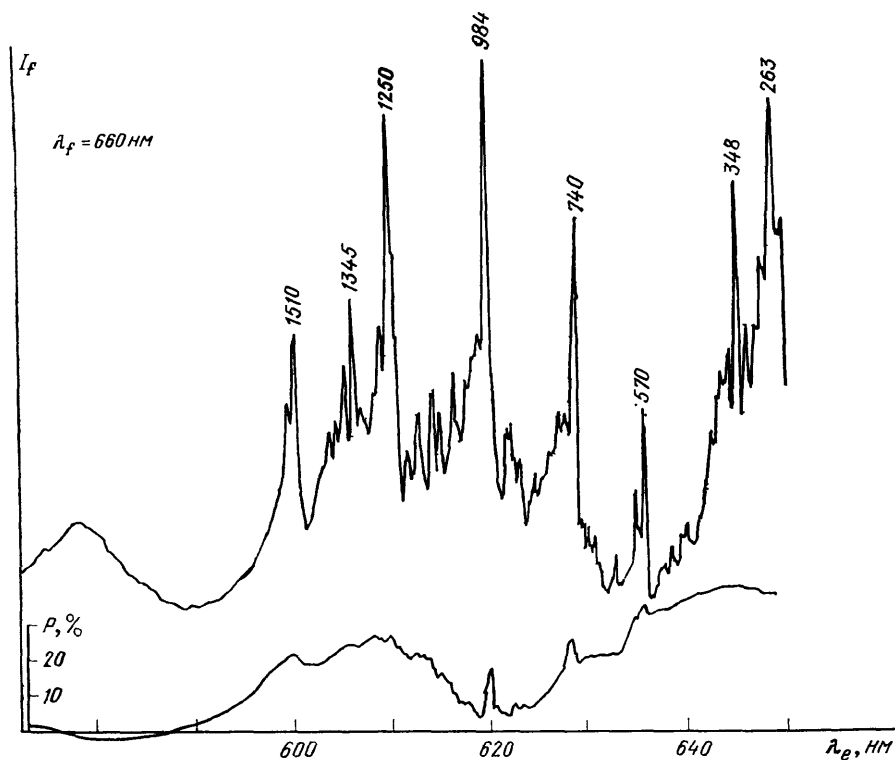


Рис. 6. Спектр возбуждения флуоресценции хлорофилла-а в эфире при селективной регистрации 660 нм с указанием колебательных частот.
Внизу — поляризационный спектр в растворителе метанол : этанол; $T = 5$ К

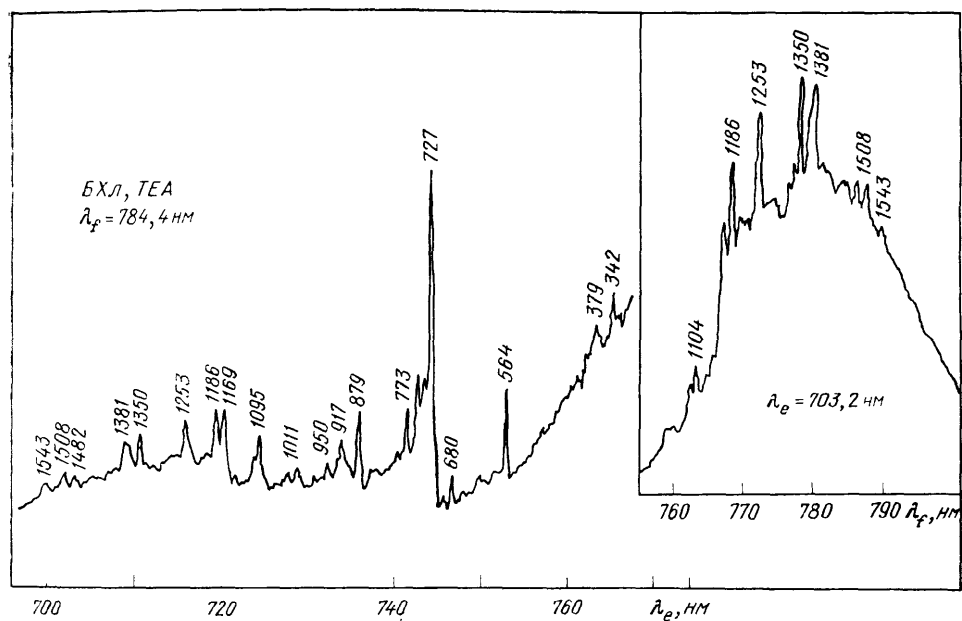


Рис. 7. Селективные спектры возбуждения (слева) и флуоресценции (справа на вставке) бактериохлорофилла в триэтиламинe, $T = 5$ К

На рис. 7 представлены селективные спектры флуоресценции и возбуждения моносолевой формы БХл. Как видно, спектры отличаются хорошим контрастом линий к фону — отсюда первый вывод, что протонирование второго пиррольного кольца не привело к увеличению электрон-фононного взаимодействия по сравнению с Хл-а.

3.3. Анализ структуры спектров

Начиная с первой удовлетворительной теоретической интерпретации колебательных спектров металлокомплексов порфина⁶⁸ достигнут значительный успех по полуэмпирическим расчетам колебаний порфиринов на основе экспериментальных спектров⁶³. Эти результаты показывают, что в такой большой π -электронной системе колебания, как правило, слабо связаны с отдельными структурными элементами молекулы. В то время как для ряда несложных порфиринов проведено определение формы нормальных колебаний, для хлорофилла и его аналогов эта проблема на количественном уровне еще не решена. Колебательный анализ основывается главным образом на сравнении близких производных между собой и с подходящими порфиринами.

Общее число нормальных колебаний хлорофилловой молекулы превышает 400, но большинство периферийных групп не взаимодействуют с оптическими π -электронными переходами, локализованными на тетрапиррольном кольце. Поэтому качественное подобие с вибронной структурой спектров порфиринов вполне понятно. Из-за низкой симметрии нет строгих правил отбора на проявление колебаний в спектрах — все колебания полносимметричны (никакие движения атомов не могут нарушить симметрию, так как ее просто нет). Но разумно исходить из приближенной симметрии — в частности, поляризация вибронных переходов может отличаться от таковой для ЧЭЛ, если по приближенной симметрии соответствующие колебания являются неполносимметричными. Точнее, различие поляризаций отдельных линий свидетельствует об отличии от нуля угла между моментами наблюдаемых переходов.

Действительно, в спектре $S_1 \leftarrow S_0$ -возбуждения Хл-а все линии вместе с фоном поляризованы параллельно с чисто электронным переходом (см. рис. 6). В спектрах ПХл и Фф-а были найдены некоторые отрицательно поляризованные линии⁶⁹, в согласии с наличием более выраженных элементов симметрии в этих молекулах. Четко видны в спектрах возбуждения Хл-а и ПХл широкие поляризационные минимумы. Контраст с налагающимися положительно поляризованными линиями позволил однозначно отнести их за счет второго электронного перехода $S_2 \leftarrow S_0$. Тем самым подтверждены малые значения расщепления $S_2 - S_1 \Delta E_{21} \approx 800 \text{ см}^{-1}$ для Хл-а и $\approx 400 \text{ см}^{-1}$ для ПХл, ранее вызывавшие неоднократные обсуждения^{70, 71}. Степень поляризации в минимумах показывает, что угол между моментами электронных переходов в состоянии S_1 и S_2 составляет около 60° для Хл-а и несколько больше для ПХл, в соответствии с более высокой приближенной симметрией последнего.

В спектрах вибронных переходов $S_1 \leftarrow S_0$ наблюдается ряд интенсивных линий, характерных для того или иного типа молекул. Так, у всех хлорофиллов и феофитинов наблюдается интенсивная линия около $560\text{--}570 \text{ см}^{-1}$, которую можно связать с наличием цикlopentanового кольца, так как она отсутствует в случае порфиринов. Весьма характерны для всех тетрапиррольных соединений вибронные линии около 750 см^{-1} , сопоставимые с колебаниями типа C—C—N и C—N—C ⁶³. Линия при частоте 980 см^{-1} чувствительна к малым изменениям структуры молекулы — она весьма интенсивна в спектре Хл-а, значительно ослаблена в случае Фф-а и сдвинута по частоте у других соединений. По-видимому, эта частота соответствует пиррольным C—C -колебаниям, активность которых меняется из-за перераспределения π -электронной плотности при комплексации с металлом.

Около 1250 см^{-1} проявляется несколько колебаний с разной приближенной симметрией, которые соотносимы с C—N—H-колебаниями в порфиринах. При более высоких частотах ($1320\text{—}1360$ и $1510\text{—}1550\text{ см}^{-1}$) наблюдаются в основном скелетные колебания, малочувствительные к небольшим изменениям строения молекулы.

Особый интерес представляют колебания, чувствительные к сольватации, так как в фотосинтетических единицах хлорофилл вступает в специфические взаимодействия с липопротеидным окружением через координационные и водородные связи. Для сольватов с одним или двумя экстра-лигандами у центрального атома магния найдены следующие характерные особенности: в случае ПХл активность колебания $\omega_1 = 1208\text{ см}^{-1}$ у дисольватов и сдвиг частоты 330 см^{-1} , а в случае Хл-а проявление характерных частот 570 , 600 , 880 , 910 и 1005 см^{-1} в спектре моносольватов, 590 и 615 см^{-1} у дисольватов, ослабление пика 984 см^{-1} при переходе к дисольватам. Все эти колебания должны касаться центральной части молекулы и носить информацию о взаимосвязи ее с окружающей матрицей.

4 ФОТОВЫЖИГАНИЕ СПЕКТРАЛЬНЫХ ПРОВАЛОВ

4.1. Фотохимические процессы

В селективной люминесцентной спектроскопии возбужденные молекулы либо испускают свет, либо возвращаются безызлучательно в исходное состояние, так что стационарная ФНР не меняется. Однако некоторая доля возбужденных центров может претерпеть изменения структуры молекулы или ее окружения, и не оказаться в точно таком же невозбужденном состоянии. После прекращения процесса возбуждения эта доля молекул поглощает на смещенной частоте электронного перехода, и на частоте возбуждающей лазерной линии в ФНР остается провал — долгоживущий (как правило) след селективного возбуждения. При монохроматическом облучении неоднородной системы поглощение через резонансную ЧЭЛ приводит к образованию весьма узкого провала (с минимальной шириной $2\Gamma_0$) на частоте возбуждения.

Один из основных классов процессов, ответственных за выжигание, составляют низкотемпературные фотохимические превращения^{27, 29}. В случае порфиринов были обнаружены взаимопревращения компонент спектра Шпольского, интерпретированные как результат таутомерной фотохимии⁷². Тот же механизм был использован в первой работе по фотохимическому выжиганию провала на примере молекул фталоцианина²⁷, а также в случае порфина в *n*-алкановых матрицах⁷³. У этих молекул таутомеры почти эквивалентны, и сдвиги частот ЧЭЛ малы ($\sim 100\text{ см}^{-1}$). В случае H_2 -хлорина, где одно пиррольное кольцо протонировано, частота $S_1 \rightarrow S_0$ -перехода при повороте центральных NH-связей оказалась сдвинутой на 1500 см^{-1} ⁷⁴. Появления неэквивалентных NH-изомеров можно было ожидать и в случае феофитинов. Действительно, выжигание провала в основной полосе Фф-а около 670 нм привело к образованию новой полосы флуоресценции 650 нм ⁷⁵. Умеренный сдвиг $\Delta\nu_{00} \approx 500\text{ см}^{-1}$ объясняется частично компенсированным влиянием колец IV и V (рис. 8). Изомерная форма Фф-а оказалась стабильной в темноте при $4,2\text{ К}$, но весьма фотолabileй: эффективность его фоторазложения на два порядка выше, чем квантовый выход образования, составляющий 10^{-3} . На рис. 8 изображены потенциальные кривые конфигурационной координаты таутомерного NH-вращения. Высоту потенциального барьера ΔE в основном электронном состоянии оценили по температурной зависимости темнового разложения фотопродукта. По начальным участкам кривых распада получили значение $\Delta E = 50\text{ см}^{-1}$. Неэкспоненциальность распада свидетельствовала о том, что величины барьеров ΔE имеют значительный разброс из-за неоднородного взаимодействия с молекулами растворителя. Аналогичная фототаутомеризация наблюдалась в случае Фф-б. Недавно NH-тау-

томеры были идентифицированы также для некоторых порфиринов с изоциклом и их димеров⁷⁶.

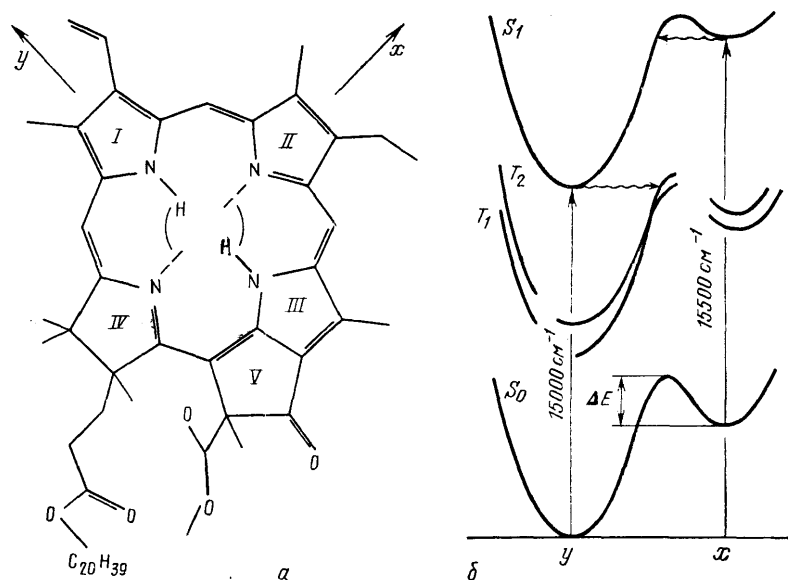


Рис. 8. Структурная формула феофитина-а с изображением поворота NH-связей (а) и схема соответствующих потенциальных кривых (б)

О деталях механизма фототрансформации пока известно мало. Методом оптического детектирования магнитных резонансов установлено, что пере-скок протонов не происходит, по меньшей мере, с нулевого колебательного

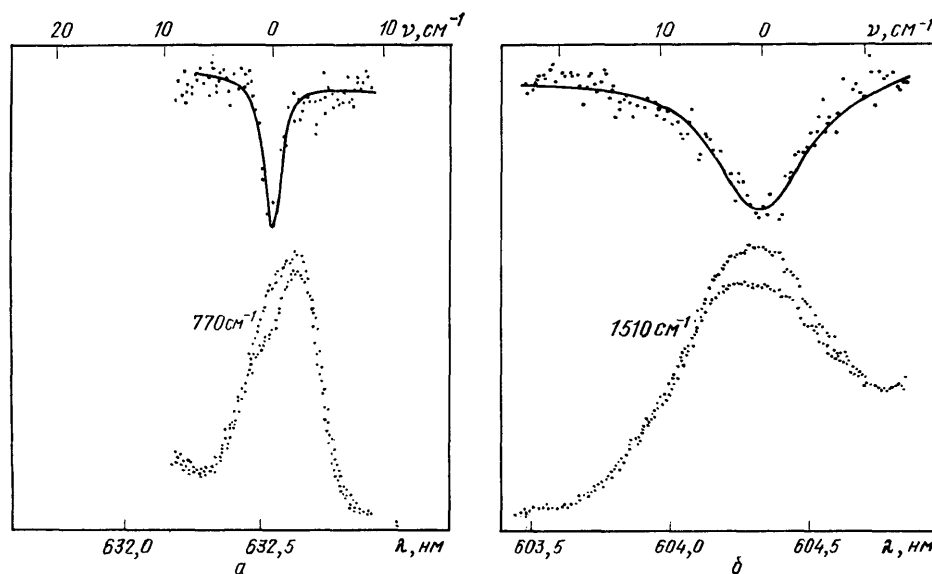


Рис. 9. Фотохимические провалы в вибронных линиях спектра возбуждения феофитина-а в эфире при 5 К, $\lambda_f = 665$ нм⁸⁰. Разностные контуры аппроксимированы лоренцианами (сплошная линия) с шириной 1,6 см⁻¹ (а) и 9,8 см⁻¹ (б)

подуровня триплетного состояния T_1 как в случае порфина⁷⁷, так и некоторых биопорфиринов⁷⁸. Наиболее естественно представить, что процесс совершается в ходе колебательной релаксации, т. е. из «горячего» состояния

при содействии вибронного смешивания синглетных и триплетных состояний.

Фотохимическое выжигание провалов было использовано для определения скоростей колебательной релаксации в возбужденном электронном состоянии. Обусловленная электрон-фононной связью фазовая релаксация замедляется при понижении температуры, так что соответствующее модуляционное уширение не превышает 1 см^{-1} при $T < 5 \text{ К}$. Поэтому однородная ширина Γ_c вибронных уровней главным образом определяется скоростью энергетической релаксации, и они связаны через соотношение неопределенностей.

Значения Γ_c определялись методом выжигания провала для фталоцианина⁷⁹ и порфина⁷⁹ в матрицах Шпольского. В системах с большим неоднородным уширением для получения однородных ширин отдельных вибронных уровней необходимо сначала измерить селективный спектр возбуждения, а затем провести выжигание на вибронной линии⁸⁰. Разность двух спектров дает искомый однородный контур (рис. 9). Таким способом были определены значения Γ_c и соответствующие времена релаксации для большинства вибронно-активных колебаний молекулы ФФ-а в S_1 -состоянии⁸⁰. Времена колебательной релаксации оказались в пределах 1—7 пс, т. е. в среднем одного порядка с наблюдаемыми для порфина⁷⁹. Имеется общая тенденция к увеличению скорости релаксации с ростом частоты колебания, что объясняется добавлением возможных каналов распада в другие колебательные состояния.

4.2. Выжигание путем насыщения переходов

Эффект образования провалов насыщения хорошо известен из спектроскопии свободных атомов и молекул⁸¹. В случае твердых тел прямое насыщение оптических переходов затруднено различными конкурирующими процессами релаксации. Однако намного легче насыщение достигается в трехуровневой системе. Простая оценка показывает, что даже маломощное ($\sim 10 \text{ мВт}$) лазерное возбуждение через сильный синглет-синглетный переход способно создать ощутимую заселенность триплетного состояния ($\tau_T \sim 10^{-3} \text{—} 10^{-2} \text{ с}$) сложных молекул. Поглощение через узкую БФЛ ведет к образованию в неоднородной полосе метастабильного провала за счет заполнения такого триплетного резервуара.

В первой попытке наблюдения провала с насыщением триплетного уровня было установлено наличие эффекта, но провалы оставались широкими, так как молекулы Хл-а возбуждались через вибронные уровни $S_1 \rightarrow S_0$ -перехода⁸². В дальнейшем усовершенствование методики позволило наблюдать резонансные провалы начисто электронном переходе для ПХл, Хл-а и др.⁸³

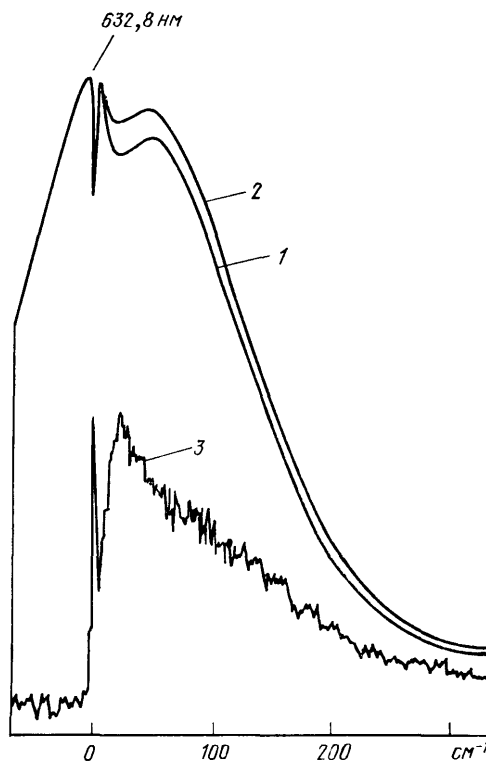


Рис. 10. Резонансный метастабильный провал вместе с фоновым крылом в спектре флуоресценции протохлорофилла в матрице эфир: бутанол при $T = 5 \text{ К}$ ⁹⁰. Кривые 1 и 2 сняты с временной задержкой 15 мс между моментами регистрации, 3 — их разность в увеличенном масштабе

В разностном спектре четко видны ЧЭЛ с аппаратной шириной $0,3 \text{ см}^{-1}$ и ее псевдокрыло (рис. 10). Кинетика выжигания и заплывания провала оказалась в хорошем согласии с параметрами затухания T_1 -состояния ($\tau_T \approx \approx 5 \text{ мс}$). Подобным же образом наблюдались метастабильные провалы в спектрах Zn-порфина в н-октане⁸⁴ и Zn-тетрабензопорфина в полимерной матрице⁸⁵.

Следует отметить, что эффект насыщения триплетного резервуара необходимо четко учитывать при фотохимическом провалообразовании в качестве возможной причины уширения, ограничивающей применимую при выжигании плотность возбуждения^{80, 85, 86}.

Несмотря на отмеченные выше трудности, благодаря использованию мощного импульсного лазера на красителе удалось получить и провалы прямого $S_1 \rightarrow S_0$ -насыщения для примесных молекул перилена в бензофеноне и н-гексане⁸⁷.

4.3. Не фотохимическое превращение центров

В стеклообразных матрицах обнаруживалось выжигание провалов для таких молекул, которые считаются фотохимически устойчивыми^{28, 88}. Поэтому был предложен механизм так называемого нефотохимического выжигания⁸⁹, заключающийся в фотостимулированном превращении центров в метастабильной системе двyamных потенциалов. Фотореакция, по-видимому, приводит к изменению локальных сил взаимодействия примеси с матрицей, но на микроскопическом уровне детальные представления о ее механизме отсутствуют. Признаком нефотохимического выжигания является то, что сдвиг частоты O—O-перехода $\Delta\nu_{00}$ фотопродукта не выходит за пределы исходной ФНР.

В случае хлорофиллов (в которых нет центральных протонов, ответственных за фотохимию у феофитинов) наряду с выжиганием за счет триплетного резервуара были также обнаружены более медленные процессы нефотохимического выжигания⁸³. Стабильность выжигаемых провалов в темноте позволила измерить однородную ширину ЧЭЛ для Хл-а при $T = 1,8 \text{ К}$ — получено значение $\Gamma_0 \leq 0,005 \text{ см}^{-1}$ ⁹⁰. Эта величина, всего на один порядок превышающая определяемую радиационным распадом, содержит вклад от электрон-фононного уширения, вымораживание которого требует еще более низких температур.

Удалось пролить свет и на сущность механизма выжигания — восстановления⁹¹. Во-первых, оказалось, что частоты выжженных центров распределяются равномерно по всему неоднородному контуру пропорционально исходной ФНР (рис. 11). Во-вторых, необратимость термического зарастания провала при циклическом изменении температуры показала, что у каждого центра имеется много различных конфигураций матрица — молекула, в энергетической шкале перекрывающих интервал свыше 100 см^{-1} . Очевидно, модель двyamных потенциалов не применима к этим системам — каждая молекула здесь обладает большим числом доступных ей потенциальных ям. Недавно было проведено выжигание по нефотохимическому механизму для Хл-а в полистироле⁹², но поскольку провалы явно уширены за счет насыщения или недостаточного разрешения, полученные температурные зависимости не вызывают полного доверия.

Явление фотовыжигания стали использовать и для определения однородных спектральных контуров, включая фононное крыло. В⁸⁷ воспользовались тем, что насыщение $S_1 \rightarrow S_0$ -перехода для ЧЭЛ наступает по интенсивности на несколько порядков величины раньше, чем для фононного крыла. Были получены однородные контуры и ФНР для перилена в двух матрицах.

Комбинирование методов селективного возбуждения и выжигания провалов позволило разработать тонкий, экспериментально несложный способ

определения однородных спектров и ФНР⁴⁴. Здесь также используется отмеченное выше огромное различие в пиковых интенсивностях ЧЭЛ и фоонного крыла, которое оправдывает пренебрежение выжиганием через крылья в стадии отсутствия насыщения резонансного провала. Строго говоря, возникающее при этом псевдокрыло в спектре поглощения имеет сравнимую с действительным крылом интенсивность, но оно исключается последующим селективным возбуждением. Вся процедура выглядит следующим образом: запись спектров флуоресценции производится дважды при монохроматическом возбуждении столь слабым, что выжиганием в ходе измерений можно пренебречь, а между двумя измерениями осуществляется выжигание провала на той же частоте ν_c . Разность двух спектров дает однородный спектр излучения для

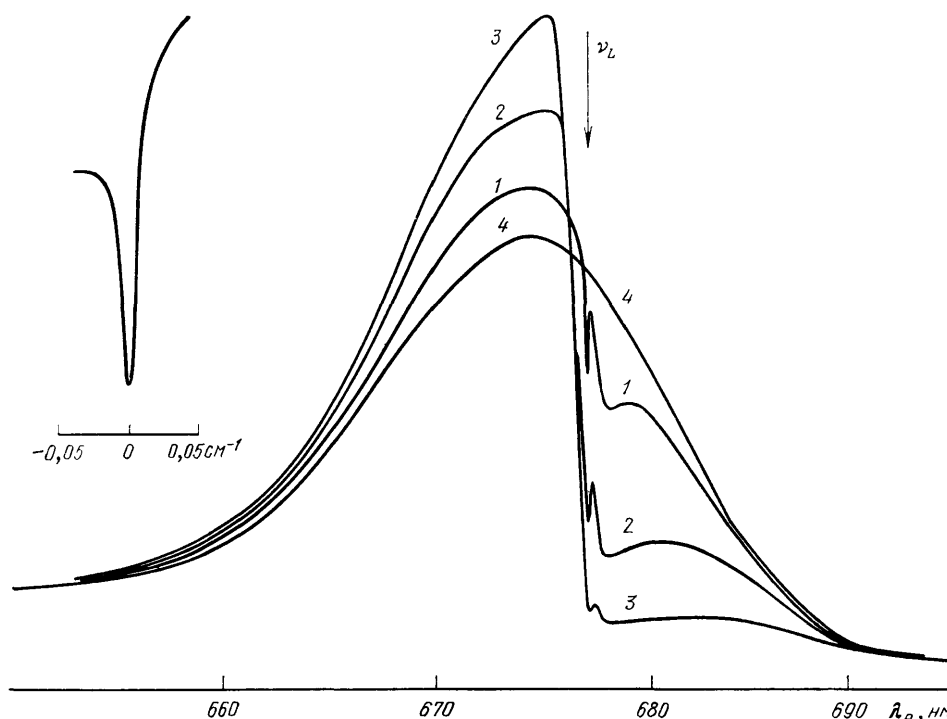


Рис. 11. Превращение спектра возбуждения флуоресценции хлорофилла-а в матрице этил-бутанол в результате облучения лазерной линией 676,4 нм⁹¹ (200 мВт/см²) в течение 30 с (1), 5 мин (2) и 30 мин (3) (исходный спектр — 4).

Отдельно показан контур провала с высоким разрешением

примесей с ЧЭЛ на частоте ν_c , за исключением контура самой резонансной линии. Аналогично можно получить однородный спектр поглощения, используя разность селективных спектров возбуждения, снятых с промежуточным выжиганием на частоте регистрации. Для вычисления ФНР необходимо дополнительно измерить неоднородный спектр (либо флуоресценции, либо поглощения), который математически является сверткой соответствующего однородного спектра и ФНР. В⁴⁴ указан удобный алгоритм для деконволюции этой свертки для нахождения ФНР.

Таким методом были определены искомые характеристики примесных молекул ПХЛ для десяти значений ν_c ⁹³. На рис. 12 показан пример однородных спектров для одной из выбранных частот. Видно, что при сопряженных переходах $S_1 \leftrightarrow S_0$ не соблюдается зеркальная симметрия спектров поглощения и излучения*), вытекающая из основной модели примесного центра¹⁰. Можно указать несколько механизмов, способных вызывать такую

*) Кажущаяся асимметрия селективных спектров (см. п. 2.1) здесь уже устранена.

асимметрию: отклонение от приближения Кондона, перепутывание нормальных координат (в локальной картине эквивалентное изменению силовых постоянных) при электронном переходе и неадиабатическое взаимодействие. В данном случае актуален вклад неадиабатичности из-за малого $S_2 - S_1$ расщепления, что может сопровождаться и нарушением кондоновского приближения. О возмущающей роли S_2 -состояния говорит и найденная⁹³ зависимость контура крыла поглощения от частоты ν_e (например, для значений 1 и 2 на рис. 12, б) поскольку от $\Delta\nu$ зависит также $S_2 - S_1$ -расщепление⁶⁹.

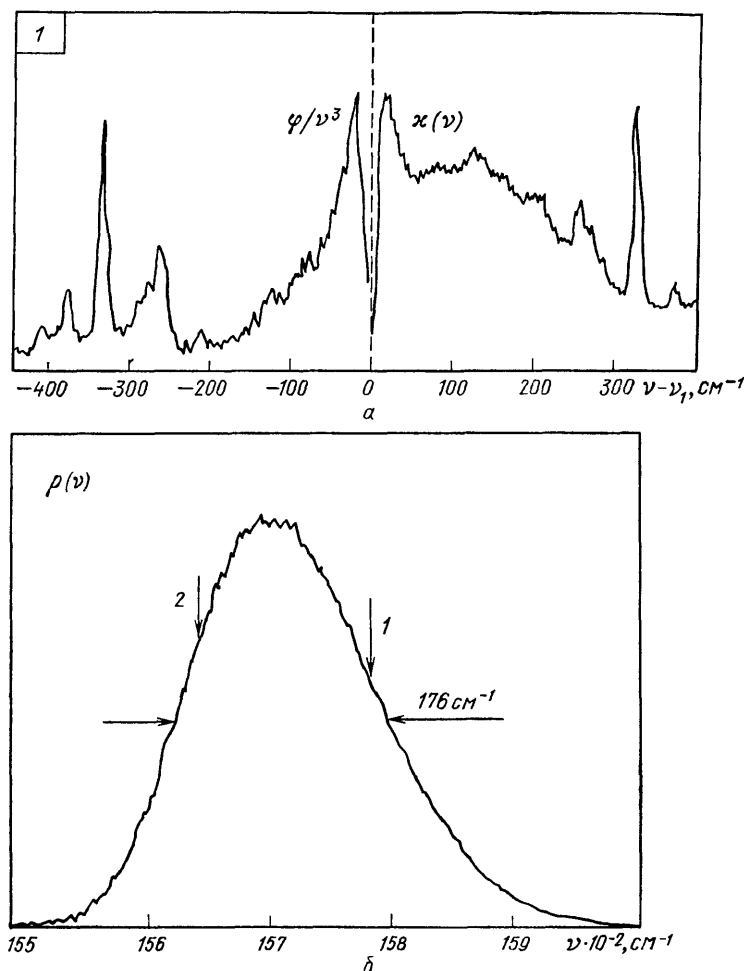


Рис. 12. Однородные фоновые крылья вместе с низкочастотными колебательными повторениями (а) для $\nu_0 = 15782 \text{ см}^{-1}$ в спектрах флуоресценции (ϕ/ν^3) и поглощения (κ) примесных молекул ПХл в стекле эфир: бутанол ($T = 5 \text{ K}$) и рассчитанная функция неоднородного распределения (б)⁹³

Полученная для этой системы ФНР представляет собой гладкую слегка асимметричную кривую с шириной на полувысоте 176 см^{-1} .

Отметим еще, что если неоднородность включает в себя, кроме смещения частоты электронного перехода, и вариации электронно-колебательного взаимодействия, то получаемые спектры являются усредненными по таким характеристикам, как ФДВ и структура крыла для центров с данной частотой ЧЭЛ. Действительно, путем повторного выжигания на разных частотах удалось выявить скрытую структуру подобных усредненных фоновых крыльев в спектре Zn-тетрафенилпорфина⁹⁴.

5. СПЕКТРЫ ВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ
НАТИВНЫХ И МОДЕЛЬНЫХ СИСТЕМ

В связи с важностью исследования первичных процессов фотосинтеза большой интерес представляет применение методов селективной спектроскопии ко все более сложным, в том числе природным объектам. Много внимания в последнее время уделяется модельным системам — димерам, пигмент-белковым комплексам и др.

Изучались селективные спектры синтетического изобактериохлорина⁹⁵, который используется для выяснения путей биосинтеза витамина B₁₂. Из спектров возбуждения и флуоресценции были определены частоты колебаний в S₁-состоянии для интервала 400—820 см⁻¹.

Путем селективного лазерного возбуждения были получены тонко-структурные спектры флуоресценции безметального цитохрома C⁹⁶, представляющего собой комплекс порфирина с полипептидной цепью. В стеклообразной матрице при 4,2 К зарегистрировались многолинейчатые спектры, подобные наблюдаемым в случае хлорофилла (ср. рис. 4). Дана также аналогичная интерпретация структуры спектра на основе модели неоднородного уширения ($\sigma \approx 200$ см⁻¹). В случае Хл-*b*, введенного в мембраны лецитиновых везикул, структура селективно возбуждаемых спектров оказалась менее выразительной⁹⁷.

Недавно было начато исследование селективных спектров модельных пигмент-белковых комплексов тетрафенилпорфина с фенилаланином в орто- и параформе и феофорбида с политрипептидной цепью⁹⁸. В частности, показано, что ширина ФНР, а также положение ее максимума весьма чувствительны к типу заместителя — у полипептидного комплекса феофорбида ФНР смещена в длинноволновую область на 150 см⁻¹ и уширена на 200 см⁻¹ по сравнению со свободным пигментом.

Обещающие результаты получены по применению метода фотовыжигания к нативным системам. В случае клеток хлореллы (при 4,2 К) наблюдалось образование провалов^{99, 100}, которое приписывается фотопревращениям реакционных центров фотосистемы I (P700). По ширине провала (с учетом аппаратной функции) получена оценка для времени релаксации возбужденного состояния реакционного центра $\tau \approx 50$ пс. Аналогичным образом найдена длительность первичных фото процессов $\tau \sim 4$ пс для фотосистемы II¹⁰¹.

Методом выжигания провала изучены также нативные пигмент-белковые комплексы сине-зеленых и красных водорослей — фикобилины¹⁰², хромофоры которых состоят из нециклических (линейных) тетрапиррольных молекул. Провалообразование отнесено за счет обратимого переноса протонов. Большая ширина провалов (>1 см⁻¹ при 1,8 К) не нашла должного объяснения.

В случае же зеленых растений, в которых основная масса хлорофилла содержится в виде так называемой светособирающей антенны, попытки применения методов селективной спектроскопии не увенчались успехом. Предлагались несколько возможных объяснений для отсутствия линейчатой структуры в спектрах флуоресценции зеленых листьев при монохроматическом возбуждении, в том числе пропадание селективности из-за быстрой миграции энергии¹⁰³. Поскольку в свете цитированных выше работ^{99–102} пигмент-белковые и пигмент-пигментные взаимодействия не должны обязательно приводить к исчезновению БФЛ в низкотемпературных спектрах хромофоров, то перенос энергии стал наиболее вероятной причиной стирания селективности в таких системах. Теоретическая трактовка селективной спектроскопии в условиях переноса энергии дана в п. 2.2. Вывод о падении относительной интенсивности БФЛ в спектрах неоднородных систем за счет переноса электронных возбуждений проиллюстрируем спектрами возбуждения флуоресценции Хл-*a* при двух концентрациях, различающихся на более чем на два порядка³⁸ (рис. 13). Для концентрации $C = 6 \cdot 10^{-3}$ М величина

параметра переноса составляет $p_t = 23 \tau_0^{-1}$, и в центре неоднородной полосы линейчатая структура при этом полностью отсутствует, но для регистрации на коротковолновом краю полосы (чему и соответствует выбранная длина волны 659,9 нм) наблюдается лишь умеренное падение интенсивности вибронных линий по отношению к фону в хорошем согласии с выводами п. 2.2.

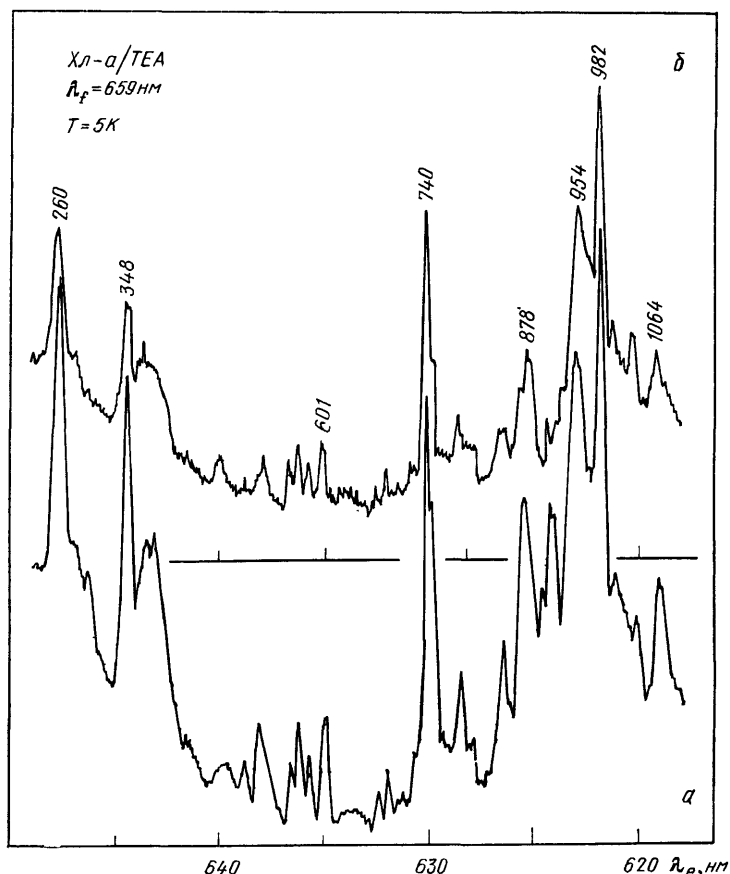


Рис. 13. Спектры возбуждения флуоресценции хлорофилла-а в триэтиламинe для концентраций $C = 2 \cdot 10^{-5}$ М (а) и $6 \cdot 10^{-3}$ М (б) при регистрации на коротковолновом крае О— О-полосы³⁸

В реальных фотосинтезирующих системах концентрация хлорофилла доходит до 10^{-1} М, так что отсутствие линий в их спектрах вполне понятно. Это не исключает, конечно, возможности, что в отдельных частях (например, реакционных центрах) хлоропластов реализуются условия, более благоприятные для наблюдения БФЛ.

Предположение о решающей роли скорости переноса энергии в исчезновении селективности возбуждения для фотосинтезирующих систем было подтверждено опытами на этиолированных (выращенных в темноте) и зеленеющих листьях¹⁰⁴. Концентрация пигментов в них столь низка, что переносом энергии можно в определенной мере пренебречь. В этиолированных листьях сначала имеются две формы протохлорофиллида П630 (неактивная) и П650 (фотоактивная). В спектре флуоресценции неактивной формы, которая представляет собой неоднородную совокупность мономерных молекул протохлорофиллида, при селективном лазерном возбуждении и $T = 5$ К наблюдалась типичная псевдолинейчатая структура, причем определяемые отсюда колебательные частоты S_1 -состояния близки к наблюдаемым для ПХл в растворах. Аналогичная структура была зарегистрирована в селективном спек-

тре возбуждения. Однако для полосы фотоактивной формы П650 линейчатая структура при возбуждении в области ее вибронных переходов не проявлялась, что можно связать с сильным обменным взаимодействием в этом агрегированном пигмент-белковом комплексе. Но при возбуждении в О—О-полосе, когда влияние взаимодействий типа вибронных экситонов подавлено, удалось получить линейчатую структуру в спектре флуоресценции П650 по колебательным повторениям $S_1 - S_0$ -перехода¹⁰⁵.

В начальной стадии освещения при физиологических температурах фотоактивная форма П650 превращается в хлорофиллид, который через ряд промежуточных форм преобразуется в хлорофилл. В спектре возбуждения полосы вновь образовавшегося хлорофиллида также была обнаружена¹⁰⁴

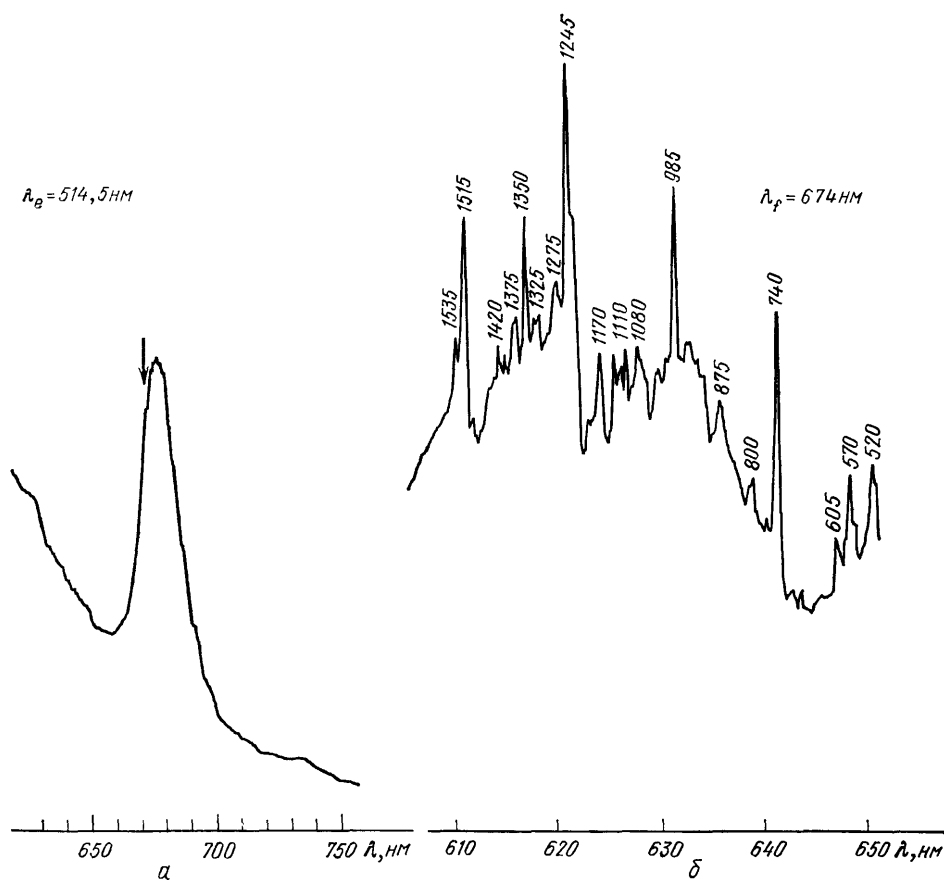


Рис. 14. Спектры зеленеющего листа ячменя при $T = 5 \text{ K}$ ¹⁰⁴. Флуоресценция при возбуждении 514,5 нм (а) и спектр ее возбуждения (б) при регистрации $\lambda_f = 674 \text{ нм}$

линейчатая вибронная структура, если регистрация велась на коротковолновом краю полосы излучения (рис. 14). При смещении частоты регистрации ν_f в длинноволновую сторону или же при накоплении пигмента после длительного освещения структурность спектра пропадала, в хорошем согласии с выводами о влиянии переноса энергии на интенсивность БФЛ в неоднородных системах (п. 2.2).

В О—О-полосе фотоактивной формы этиолированных листьев было осуществлено выжигание узких провалов (ширина $\delta\nu \leq 0,3 \text{ см}^{-1}$ при 5 K)¹⁰⁵. Повторное выжигание на близких частотах (рис. 15) показывает, что нет заметного зарастания «старых» провалов при выжигании новых. Это говорит о фотохимическом механизме провалообразования, вероятно, связанном с накоплением нефлуоресцирующего промежуточного продукта хлорофиллида

из-за прекращения дальнейших темновых реакций при столь низкой температуре, в согласии с неселективными измерениями¹⁰⁶. Образовались довольно глубокие провалы (рис. 15), что указывает на слабую электрон-фононную связь (сравнимую с таковой в твердых растворах хлорофилловых молекул) у этого комплекса, представляющего собой димер или тетрамер протохлорофиллида, привязанного к большим белковым частицам. Значительная интенсивность ЧЭЛ (проявляющейся в виде резонансного провала)

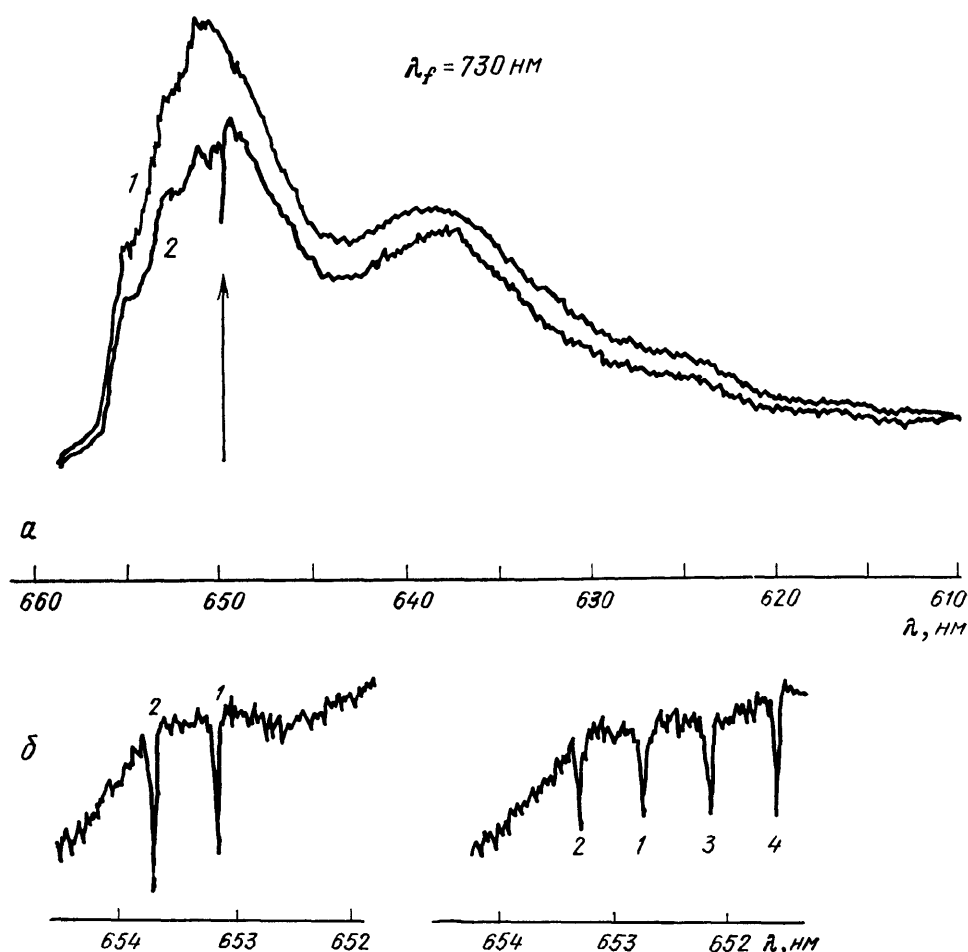


Рис. 15. Спектры возбуждения этиолированного листа до (1) и после (2) выжигания лазером на длине волны 649,05 нм (а) и повторного выжигания провалов в очередности от 1 до 4 (б)¹⁰⁵

указывает на жесткость окружения хромофора. Изучение температурной зависимости ширины провала может дать ценную информацию о природе окружающей хлорофилловые молекулы полипептидной матрицы — в стеклообразных средах эта зависимость имеет яркую специфику по сравнению с кристаллическими²⁹.

В самое последнее время сделаны попытки выжигания провала в полосе поглощения реакционных центров бактериального фотосинтеза. В двух работах^{107, 108} при лазерном возбуждении в полосе реакционных центров П870 пурпурных бактерий *R. Sphaeroides* ($T = 1,5 \text{ K}$) наблюдалось обратимое ослабление всей полосы без образования узких провалов. Авторы обсуждают возможные причины такой большой ширины «провалов» ($200\text{--}400 \text{ cm}^{-1}$), не исключая, что это однородная ширина, обусловленная сверхбыстрыми процессами ($\tau < 10^{-13} \text{ s}$) разделения зарядов в реакционном центре. Недавно

все же сообщалось¹⁰⁹ о выжигании узкого провала ($\delta\nu \approx 5 \text{ см}^{-1}$) для той же системы при $T = 4,2 \text{ К}$. По его ширине получена более разумная оценка для времени переноса электрона $\tau = 1,4 \pm 0,7 \text{ пс}$ (ср.⁶⁷). Явные противоречия разных работ указывают на необходимость продолжения экспериментов с применением методов селективной спектроскопии, а также тщательного анализа результатов.

6. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Методы селективной лазерной спектроскопии в течение десятка лет используются для исследования электронно-колебательных спектров фотосинтетических пигментов. В итоге решены проблемы интерпретации структуры и накоплено большое количество спектроскопической информации. Теперь имеются хорошие перспективы дальнейшего применения этих методов в биофизике, фотохимии и т. п. Первые примеры селективных спектров и выжигания провалов в случае пигмент-белковых комплексов и хлорофилла *in situ* здесь уже рассматривались.

Укажем еще на некоторые обзоры по близкой тематике: по селективной спектроскопии¹¹⁰, по выжиганию провалов^{29, 111–113}, по спектроскопии хлорофилла¹¹⁴, по бесфононным линиям^{33, 115}.

Институт физики АН ЭССР

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Шпольский Э. В., Ильина А. А., Климова Л. А. // ДАН СССР. 1952. Т. 87. С. 935.
2. Литвин Ф. Ф., Персонов Р. И. // Ibidem. 1961. Т. 136. С. 798.
3. Гуринович Г. П., Севченко А. Н., Соловьев К. Н. Спектроскопия хлорофилла и родственных соединений. — Минск: Наука и техника. 1968.
4. Литвин Ф. Ф., Персонов Р. И., Коротаяев О. Н. // ДАН СССР. 1969. Т. 188. С. 1169.
5. Авармаа Р., Ребане К. // Изв. АН ЭССР. Сер. «Физика. Математика». 1973. Т. 22. С. 108.
6. Ребане К. К., Хижняков В. В. // Опт. и спектр. 1963. Т. 14. С. 362, 491.
7. Кривоглаз М. А., Пекар С. И. // Тр. ИФ АН УССР. 1953. Вып. 4. С. 37.
8. Трифонов Е. Д. // ДАН СССР. 1962. Т. 147. С. 826.
9. Кривоглаз М. А. // ФТТ. 1964. Т. 6. С. 1707.
10. Ребане К. К. Элементарная теория колебательной структуры спектров примесных центров кристаллов. — М.: Наука, 1968.
11. Ребане К., Саари П., Тамм Т. // Изв. АН ЭССР. Сер. «Физика. Математика». 1970. Т. 19. С. 251.
12. Персонов Р. И., Осадько И. С., Годяев Э. Д., Альшиц Е. И. // ФТТ. 1971. Т. 13. С. 2653.
13. Альшиц Е. И., Годяев Э. Д., Персонов Р. И. // Изв. АН СССР. Сер. физ. 1972. Т. 36. С. 1117; ФТТ. 1972. Т. 14. С. 1605.
14. Сапожников М. Н. // ФТТ. 1973. Т. 15. С. 3160.
15. McCumber D. E., Sturge M. D. // J. Appl. Phys. 1963. V. 34. P. 1682.
16. Fitchen D. B., Silsbee R. H., Fulton T. A., Wolf E. I. // Phys. Rev. Lett. 1963. V. 11. P. 275.
17. Гросс Е. Ф., Пермогоров С. А., Разбирин Б. С. // ДАН СССР. 1964. Т. 154. С. 1306.
18. Молекулярные центры свечения O_2^- и S_2^- в щелочногалоидных кристаллах // Тр. ИФА АН ЭССР. 1968. Т. 37.
19. Свищев Г. М. // Опт. и спектр. 1964. Т. 16. С. 174.
20. Денисов Ю. В., Кизель В. А. // Ibidem. 1967. Т. 23. С. 472.
21. Riseberg L. A. // Phys. Rev. Lett. 1972. V. 28. P. 786.
22. Szabo A. // Ibidem. 1970. V. 25. P. 924.
23. Персонов Р. И., Альшиц Е. И., Быковская Л. А., Харламов Б. М. // ЖЭТФ. 1973. Т. 65. С. 1985; Письма ЖЭТФ. 1972. Т. 15. С. 609.
24. Авармаа Р. // Изв. АН ЭССР. Сер. «Физика. Математика». 1974. Т. 23. С. 93.
25. Авармаа Р. // Ibidem. С. 238.

26. Ребане К. К., Авармаа Р. А., Гороховский А. А. // Изв. АН СССР. Сер. физ. 1975. Т. 39. С. 1973.
27. Гороховский А. А., Каарли Р. К., Ребане Л. А. // Письма ЖЭТФ. 1974. Т. 20. С. 474.
28. Kharlamov B. M., Personov R. I., Bykovskaya L. A. // Opt. Commun. 1974. V. 12. P. 191.
29. Rebane L. A., Gorokhovskii A. A., Kikas J. V. // Appl. Phys. Ser. B. 1982. V. 29. P. 235.
30. Осадько И. С. // УФН. 1979. Т. 128. С. 31.
31. Stoneham A. M. // Rev. Mod. Phys. 1969. V. 41. P. 82.
32. Фрейберг А. М., Ребане Л. А. // ФТТ. 1974. Т. 16. С. 2626.
33. Ребане К. К. // ЖПС. 1982. Т. 37. С. 906.
34. Kushida T., Takushi E. // Phys. Rev. Ser. B. 1975. V. 12. P. 824.
35. Альшиц Е. И., Персонов Р. И., Стогов В. И. // Изв. АН СССР. Сер. физ. 1975. Т. 39. С. 1918.
36. Kikas J. // Chem. Phys. Lett. 1978. V. 57. P. 511.
37. Сапожников М. Н. // ДАН СССР. 1986. Т. 287. С. 839.
38. Avarmaa R., Jaanisoo R., Mauring K., Renge I., Tamkivi R. // Molec. Phys. 1986. V. 57. P. 605.
39. Саари П. М., Тамм Т. Б. // Изв. АН СССР. Сер. физ. 1975. Т. 39. С. 2321.
40. Альшиц Е. И., Персонов Р. И., Харламов Б. М. // Опт. и спектр. 1976. Т. 41. С. 803.
41. Gorokhovskii A. A., Kikas J. // Opt. Commun. 1977. V. 21. P. 272.
42. Тамм Т. Б., Кикас Я. В., Сирк А. Э. // ЖПС. 1976. Т. 24. С. 315.
43. Кикас Я. // Изв. АН ЭССР. Сер. «Физика. Математика». 1976. Т. 25. С. 374; 1979. Т. 28. С. 73.
44. Яанисо Р. // Ibidem. 1985. Т. 34. С. 277.
45. Техвер И. Ю. // Препринт АН ЭССР F-5. — Тарту, 1977.
46. Агранович В. М., Галанин М. Д. // Перенос энергии электронного возбуждения в конденсированных средах. — М.: Наука, 1978.
47. Быковская Л. А., Литвин Ф. Ф., Персонов Р. И., Романовский Ю. В. // Биофизика. 1980. Т. 25. С. 13.
48. Авармаа Р., Тамкиви Р., Кийслер С., Нымм В. // Изв. АН ЭССР. Сер. «Физика. Математика». 1980. Т. 29. С. 39.
49. Ребане К. К., Авармаа Р. А. // Chem. Phys. 1982. V. 68. P. 191.
50. Авармаа Р., Ренге И. // Изв. АН ЭССР. Сер. «Физика. Математика». 1986. Т. 35. С. 432.
51. Авармаа Р., Суйсалу А. // Ibidem. 1984. Т. 33. С. 333.
52. Avarmaa R., Rebane K. // Studia Biophys. 1975. V. 48. P. 209.
53. Авармаа Р. А., Мауринг К. Х. // ЖПС. 1978. Т. 28. С. 658.
54. Fünfschilling J., Williams D. F. // Photochem. and Photobiol. 1975. V. 22. P. 151; 1977. V. 26. P. 109.
55. Platenkamp R. J., Den Blanken M. J., Hoff A. J. // Chem. Phys. Lett. 1980. V. 76. P. 35.
56. Hála J., Pelant I., Ragma L., Vašek K. // J. Lumin. 1981. V. 24/25. P. 803; V. 26. P. 117.
57. Быковская Л. А., Градюшко А. Т., Первонов Р. И., Романовский Ю. В., Соловьев К. Н., Старухин А. С., Шульга А. М. // ЖПС. 1978. Т. 29. С. 1088.
58. Романовский Ю. В., Быковская Л. А., Персонов Р. И. // Биофизика. 1981. Т. 26. С. 621.
59. Романовский Ю. В. // Изв. АН ЭССР. Сер. «Физика. Математика». 1982. Т. 31. С. 139.
60. Соловьев К. Н., Станишевский И. В., Старухин А. С., Шульга А. М. // Изв. АН СССР. Сер. физ. 1983. Т. 47. С. 1399.
61. Сапожников М. Н., Шубин А. Л., Раховский В. П. // Хим. физ. 1983. Т. 3. С. 351.
62. Even U., Jortner J. et al. // J. Chem. Phys. 1982. V. 77. P. 4374, 4384, 4391.
63. Соловьев К. Н., Гладков Л. Л., Старухин А. С., Шкирман С. Ф. // Спектроскопия порфиринов: Колебательные состояния. — Минск: Наука и техника, 1985.
64. Lutz M. // Infrared and Raman Spectroscopy. — Chichester: Wiley-Heyden, 1984. — V. 11. Ch. 5.
65. Hizhnyakov V., Tehver I. // Phys. Stat. Sol. 1967. V. 21. P. 755; 1970. V. 39. P. 67.
66. Champion P. M., Albrecht A. C. // Ann. Rev. Phys. Chem. 1982. V. 33. P. 353.

67. Borisov A. Yu., Freiberg A. M., Godik V. I., Rebane K. K., Timpmann K. F. // *Biochim. and Biophys. Acta.* 1985. V. 807. P. 221.
68. Ogoshi H., Saito Y., Nakamoto K. // *J. Chem. Phys.* 1972. V. 57. P. 4194.
69. Авармаа Р. А., Суйсалу А. П. // *Опт. и спектр.* 1984. Т. 56. С. 53.
70. Севченко А. Н., Соловьев К. Н., Машенков В. А., Шкирман С. Ф., Лосев А. П. // *ДАН СССР.* 1967. Т. 175. С. 797.
71. Belkov M. V., Losev A. P. // *Spectr. Lett.* 1978. V. 11. P. 653.
72. Соловьев К. Н., Залесский И. Е., Котло В. Н., Шкирман С. Ф. // *Письма ЖЭТФ.* 1973. Т. 17. С. 463.
73. Völker S., Van der Waals J. H. // *Molec. Phys.* 1976. V. 32. P. 1703.
74. Völker S., Macfarlane R. M. // *J. Chem. Phys.* 1980. V. 73. P. 4476.
75. Mauring K., Avarmaa R. // *Chem. Phys. Lett.* 1981. V. 81. P. 446.
76. Zenkevich E. I., Shulga A. M., Chernook A. V., Gurinovich G. P. // *Ibidem.* 1984. V. 109. P. 306.
77. Van Dorp W. G., Shoemaker W. H., Soma M., van der Waals J. H. // *Molec. Phys.* 1975. V. 30. P. 1701.
78. Авармаа Р. А., Суйсалу А. П. // *Изв. АН СССР. Сер. физ.* 1983. Т. 47. С. 2364.
79. Völker S., Macfarlane R. M. // *Chem. Phys. Lett.* 1979. V. 61. P. 421.
80. Ребане К. К., Авармаа Р. А., Мауринг К. Х., Яанисо Р. В. // *Современные аспекты тонкоструктурной и селективной спектроскопии.* — М.: МГПИ, 1984. — С. 63.
81. Летохов В. С., Чеботаев В. П. *Принципы нелинейной лазерной спектроскопии.* — М.: Наука, 1975.
82. Авармаа Р. А., Мауринг К. Х. // *Опт. и спектр.* 1976. Т. 41. С. 670.
83. Мауринг К., Суйсалу А., Авармаа Р. // *Изв. АН ЭССР. Сер. «Физика. Математика».* 1980. Т. 29. С. 426; *Chem. Phys. Lett.* 1981. V. 77. P. 88.
84. Shelby R. M., Macfarlane R. M. // *Ibidem.* 1979. V. 64. P. 545.
85. Коротаев О. Н., Донской Е. И., Глядкоцкий В. И., Копраненков В. Н. // *Опт. и спектр.* 1984. Т. 57. С. 145.
86. Jalmukhambetov A. I., Osadko I. S. // *Chem. Phys.* 1983. V. 77. P. 247.
87. Kikas J. V., Treshchalov A. B. // *Chem. Phys. Lett.* 1983. V. 98. P. 295.
88. Харламов Б. М., Персонов Р. И., Быковская Л. А. // *Опт. и спектр.* 1975. Т. 39. С. 240.
89. Hayes J. M., Small G. M. // *Chem. Phys. Lett.* 1978. V. 54. P. 435; *Chem. Phys.* 1978. V. 27. P. 151.
90. Мауринг К. Х., Авармаа Р. А. // *Изв. АН ЭССР. Сер. «Физика. Математика».* 1982. Т. 31. С. 155.
91. Яанисо Р. В. // *Ibidem.* С. 161.
92. Carter T. P., Small G. J. // *Chem. Phys. Lett.* 1985. V. 120. P. 178.
93. Яанисо Р. В., Авармаа Р. А. // *ЖПС.* 1986. Т. 44. С. 601.
94. Кикас Я. В., Яанисо Р. В. // *ФТТ.* 1984. Т. 26. С. 1861.
95. Burkhalter F. A., Wild U. P. // *Chem. Phys.* 1982. V. 66. P. 327.
96. Angiolillo P. J., Leigh J. S., Vanderkooi J. M. // *Photochem. and Photobiol.* 1982. V. 36. P. 133.
97. Fünfschilling J., Walz D. // *Ibidem.* 1983. V. 38. P. 389.
98. Hala J., Pelant I., Ambroz M., Panscova P., Vacek K. // *Ibidem.* 1985. V. 41. P. 643.
99. Маслов В. Г. // *ДАН СССР.* 1979. Т. 246. С. 1511.
100. Маслов В. Г., Чунаев А. С., Тугаринов В. В. // *Биофизика.* 1980. Т. 25. С. 925.
101. Маслов В. Г., Чунаев А. С., Тугаринов В. В. // *Молек. биол.* 1982. Т. 16. С. 604.
102. Friedrich J., Scheer H., Zickendraht-Wendelstadt B., Haager D. // *J. Am. Chem. Soc.* 1981. V. 103. P. 1030; *J. Chem. Phys.* 1981. V. 74. P. 2260.
103. Rebane K. K., Avarmaa R. A. // *Molecular Spectroscopy of Dense Phases: Proc. of the 12th ECMS.* — Amsterdam: Elsevier, 1976. — P. 459.
104. Авармаа Р. А., Ренге И., Мауринг К. // *FEBS Lett.* 1984. V. 167. P. 186; *Изв. АН ЭССР. Сер. «Физика. Математика».* 1984. Т. 33. С. 250.
105. Ренге И., Мауринг К., Авармаа Р. // *Biochim. and Biophys. Acta.* 1984. V. 766. P. 501; *Тезисы докладов V Всесоюзного совещания по фотохимии.* — Суздаль, 1985. — С. 124.
106. Belyaeva O. B., Personova E. R., Litvin F. F. // *Photosyn. Res.* 1983. V. 4. P. 81.

107. Meech S. R., Hoff A. J., Wiersma D. A.//Chem. Phys. Lett. 1985. V. 121. P. 287.
108. Boxer S. G., Lockhart D. J., Middelndorf T. R.//Ibidem. 1986. V. 123. P. 476.
109. Ганаго А. О., Мелкозернов А. Н., Шувалов В. А.//Биофизика. 1986. Т. 31. С. 440.
110. Personov R. I.//Spectroscopy and Excitation Dynamics of Condensed Systems. — Amsterdam: North-Holland, 1983.— P. 555; Spectrochim. Acta. Ser. B. 1983. V. 38. P. 1533.
111. Small G.//Ibidem. P. 515.
112. Friedrich J., Haarer D.//Angew. Chem. Intern. Ed. 1984. V. 23. P. 113.
113. Rebane K. K.//J. Lumin. 1984. V. 31/32. P. 744.
114. Авармаа R. A., Rebane K. K.//Spectrochim. Acta. Ser. A. 1985. V. 41. P. 1365.
115. Бесфоновные линии в спектроскопии и фотохимии//Тр. ИФ АН ЭССР. 1986. Т. 59.