

ЭНЕРГЕТИКА И СОСТОЯНИЕ МОЛЕКУЛ ПИГМЕНТОВ В РАСТВОРАХ И БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ

Г. П. ГУРИНОВИЧ

Институт физики АН БССР г. Минск

В работе исследуется энергетика молекул порфиринов с разными ионами металлов в растворах и при взаимодействии пигмент-пигмента, далее исследуется миграция энергии гомогенной и гетерогенной ассоциации пигментных молекул. Полученные результаты показывают, что в комплексах порфиринов с ионами металлов в процессе дезактивации энергии возбуждения, существенную роль играют те d — электронные уровни, которые отличаются от свободных комплексов и ранее исследованных металло-порфиринов. Оказалось, что возникает агрегация различных смешанных пигментов и наблюдается в этих агрегатах миграция энергии с коротковолнового компонента на длинноволновый компонент; кроме того миграция энергии возникает и тогда, когда уровни энергии взаимодействующих молекул весьма различны. Наблюдается миграция энергии в агрегатах с нефлуоресцирующих на флуоресцирующие пигменты.

Среди многообразия вопросов, входящих в круг научных интересов лаборатории фотохимии Института физики Академии Наук Белоруссии проблемы спектроскопии и фотохимии пигментов занимают главенствующее положение. Это обусловлено прежде всего фундаментальностью и важностью познания важнейшего процесса живой природы — процесса фотосинтеза. Познание его, очевидно, не может быть полным без знания основных свойств пигментов, ответственных за поглощение света, их физико-химического состояния и механизма первичных элементарных процессов, следующих за поглощением световой энергии.

В настоящем докладе подвергнуты обсуждению следующие вопросы:

а) Энергетика молекул порфиринов в растворах и в условиях существенных пигмент-пигментных взаимодействий, роль центрального атома металла в формировании основных энергетических свойств молекул пигмента; причина отсутствия флуоресцентной способности у ряда пигментов.

б) Состояние пигмента в гомогенных и гетерогенных средах, миграция энергии, гомогенная и гетерогенная ассоциация молекул, роль ассоциации в миграционных явлениях. Особое внимание уделено обнаруженному переносу энергии в гетерогенных системах с нелюминесцирующих молекул-доноров энергии, а также миграции энергии в слабых смешанных ассоциатах пигментов.

Эти вопросы получили в последнее время существенное развитие и представляют, по нашему мнению, интерес не только для специалистов в области фотобиологии, но и представителей спектроскопической и люминесцентной науки.

1. Энергетика молекул порфиринов в растворах

Детальный механизм элементарных фотопроцессов в молекулах не может быть познан без знания количественных соотношений между вероятностями внутри и межмолекулярных переходов. Это в равной степени относится как к спектрально-люминесцентным свойствам молекул, так и фотохимическим. В последние годы найдено несколько способов нахождения этих вероятностей. Не останавливаясь на методиках эксперимента, резюмируем основные сведения. Все тетрапиррольные пигменты с этой точки зрения целесообразно разбить на следующие группы: а) собственно порфирины и хлорины; металлопорфирины, обладающие флуоресцентной способностью; б) металлопорфирины с ионами металлов в центре молекулы не флуоресцирующие и в) металлопорфирины с ионами металла с незаполненными — d — оболочками.

а) Собственно порфирины, хлорины и ряд их металлокомплексов обычно хорошо флуоресцируют и обладают, как правило, слабой фосфоресценцией. Основные данные по вероятностям переходов, рассчитанные по формулам:

$$f = \frac{B}{\tau}; \quad r = \frac{\gamma}{\tau}; \quad d = \frac{1}{\tau} - f - r$$

где B и τ — квантовый выход и длительность флуоресценции, γ — квантовый выход интерконверсии, f , r и d — вероятности флуоресценции, интерконверсии и безызлучательной дезактивации синглетного возбужденного состояния, приведены в таблице 1. Эти данные обсуждались ранее [1—6] и здесь подробно не рассматриваются.

б) Комплексы порфиринов с ионами металлов, необладающие флуоресцентной способностью представляют специальный интерес. Экспериментальное исследование этих комплексов существенно затруднено следующими обстоятельствами. В обсуждаемых комплексах отсутствует флуоресценция. За немногочисленными исключениями, отсутствует и заметная фосфоресценция. В данной ситуации, данные по триплет-триплетному ($T-T$) поглощению приобретают особую ценность, но все попытки зарегистрировать это поглощение с помощью импульсного фотолиза с временным разрешением 10^{-4} — 10^{-5} сек были безуспешными. Предполагая, что это объясняется коротким временем жизни молекул в триплетном состоянии в силу «возмущающего»

Таблица № 1

Пигмент	Растворитель	B_1	$\tau \cdot 10^9$ сек	γ	$f \cdot 10^{-6}$ сек $^{-1}$	$r \cdot 10^{-6}$ сек $^{-1}$	d сек $^{-1}$
Мезопорфирин	Толуол	0,12	19	0,8	6,3	41	$< 10^6$
ТФП	Толуол	0,13	13,6	0,82	9,5	60	$< 10^6$
ТАП	Толуол	0,16	6,4	0,84	25	131	$< 10^6$
Mg-мезопорфирин	Толуол	0,20	10	0,62	18	56	$< 10^6$
Zn-мезопорфирин	Толуол	0,05	2	0,86	25	480	$< 10^6$
Хлорофилл "а"	Эфир	0,35	6,1	0,6	58	98	$< 10^6$
Хлорофилл "б"	Эфир	0,12	3,9	0,8	31	200	$< 10^6$
Феофитин	Эфир	0,25	7,3	0,81	34	110	$< 10^6$

действия центрального иона металла, нами был применен метод лазерного фотоллиза со значительно улучшенным временным разрешением [7]. В результате в медном комплексе порфирина удалось зарегистрировать поглощение с метастабильного фосфоресцентного состояния. В дальнейшем было показано [6, 8], что в медном комплексе безызлучательная дезактивация низшего возбужденного синглетного состояния осуществляется интеркомбинационным переходом и квантовый выход интеркомбинационной конверсии (перехода в метастабильное фосфоресцентное состояние) близок к 1. В общем случае, вопрос о природе (мультиплетности) электронных состояний в металлопорфинах значительно сложнее. В частности, как полагают авторы [9] у комплексов порфиринов с металлами, содержащими один неспаренный d -электрон, например, Cu(II) и Co(II) , в результате взаимодействия этого электрона с порфириновой молекулой в синглетном либо триплетном состоянии, возникают соответственно дублетные и квартетные состояния. В ряде высокоспиновых комплексов могут реализовываться и другие сложные случаи. Поэтому, следует подчеркнуть, что мы не будем в каждом конкретном случае обсуждать мультиплетность электронных метастабильных состояний, а по аналогии с большинством порфиринов и их комплексов с ионами, с заполненными либо содержащими четное число спаренных d -электронов, будем называть такие состояния метастабильными.

Для комплексов Cu -мезо и Pd -мезо было зарегистрировано просветление синглет-синглетных полос Q и B (полоса Core), вызванное обеднением основного состояния, а также поглощение с метастабильного уровня в спектральной области между этими полосами. Полученные после соответствующей фотометрической обработки спектрограмм спектры приведены на рис. 1. Продвижение в красную область спектра было ограничено главным образом очень слабым поглощением, а также чувствительностью пленки. Обращает на себя внимание тот факт, что спектр поглощения с метастабильного уровня и в этом случае типичен для всех металлопорфиринов. Этот существенный факт свидетельствует о том, что за поглощение ответственна π -электронная система молекул, а центральный атом металла является возмущающим фак-

тором. Мультиплетность молекулы в целом так же играет лишь второстепенную роль. Следует отметить диффузионный характер спектров с неявно выраженным максимумом, истинное положение которого маскируется сильным перекрыванием с синглет-синглетной полосой Core . Аналогичный вид имеют спектры поглощения с метастабильного состояния и для других исследованных порфиринов, что до сих пор не имеет теоретического объяснения. Времена жизни τ_T молекул Cu -мезо и Pd -мезопорфирина в метастабильном состоянии составлял в необескислороженных растворах, соответственно 150 ± 50 нсек и 250 ± 50 нсек. Удаление кислорода не влияло в пределах экспериментальной точнос-

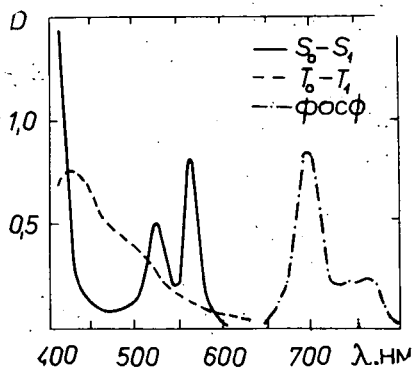


Рис. 1. Спектры фосфоресценции и S_0-S_1 и T_0-T_1 поглощения Cu -мезопорфирина.

ти на τ_T в случае медного комплекса порфирина. Для Pd-мезо $\tau_T = 80-90$ мсек в необескислороженных растворах.

в) Совершенно иная картина наблюдается при изучении комплексов с ионами Co (III), Ni (II), Ag (II). Для этих соединений не было зарегистрировано поглощение с метастабильного уровня, в то же время наблюдалось просветление всего S_0-S_n спектра, даже в сине-зеленой области спектра, где синглет-синглетное поглощение слабо и обычно располагается поглощение с метастабильного уровня порфиринов. Такое поведение невозможно объяснить резким смещением уровней либо «катастрофическим» падением силы осциллятора соответствующих полос, т.к. влияние центрального иона на π -электронную систему порфиринового макроцикла не очень велико. Во всяком случае S_0-S_n спектры металлокомплексов порфиринов отличаются лишь небольшими смещениями спектральных полос и изменением интенсивностей (главным образом $Q(0, 1)$ [1]). Длительность просветления не удалось измерить. Это указывает на то, что длительность этого процесса короче 80—90 нсек и представляет, по-видимому, величину порядка длительности моноимпульса ($\sim 5 \cdot 10^{-8}$ сек).

Все обсуждаемые комплексы с 5 различными металлами объединяет один общий экспериментальный факт — отсутствие флуоресценции, что непосредственно указывает на наличие эффективной безызлучательной дезактивации энергии низшего синглетного состояния S_1 . В случае Cu и Pd — комплексов безызлучательная дезактивация S_1 -состояния осуществляется интеркомбинационной конверсией в фосфоресцентное состояние. В пользу такого канала дезактивации говорят высокие квантовые выходы интерконверсии [8] и фосфоресценции [10—11]. Необходимо подчеркнуть, что физическая причина возмущения интеркомбинационного безызлучательного перехода различна, т.к. центральные ионы Cu (II) и Pd (II) существенно различаются своими магнитными свойствами, внешней незаполненной оболочкой и атомными номерами. Ион меди ($Z=29$) содержит незаполненную d -оболочку (электронная конфигурация d^9) и образует парамагнитный комплекс (один d -электрон неспарен). Ион палладия ($Z=46$) содержит также незаполненную d -оболочку (d^8) со спаренными электронами и образует диамагнитный комплекс. Нам представляется, что в случае Cu-мезопорфирина за резкое увеличение интеркомбинационной конверсии, ответственен именно неспаренный d -электрон, т.к. только эффект «внутреннего тяжелого атома» не может объяснить полное отсутствие флуоресценции в этом соединении, в то время, как например, Z_n -комплексы порфиринов обладают ($Z=30$) значительной флуоресценцией [1]. Для медных комплексов, по-видимому, существенно взаимодействие неспаренного d -электрона с молекулой лиганда в синглетном и метастабильном состоянии, приводящей к образованию дублетных состояний для переходов между которыми нет спинового запрета, что резко увеличивает вероятность интеркомбинационной конверсии. Возможно, такое возмущение вызвано неоднородным магнитным полем. Отсутствие данных по $T-T$ поглощению для других парамагнитных комплексов (например для Ag-мезо) не позволяет сделать более определенное заключение.

В случае Pd-комплекса к резкому увеличению вероятности безызлучательной конверсии приводит взаимодействие d -электронов с π -электронами кольца ($d-\pi$ связь), т.к. в этом случае эффект «внутреннего тяжелого атома»

не может объяснить отсутствие флуоресценции у Pd-комплекса и наличие таковой у комплекса с Cd ($Z=48$).

Для комплексов с парамагнитным ионом Ag (электронная конфигурация d^9 , $Z=47$) и диамагнитными ионами Ni (d^8 , $Z=28$), Co (d^6 , $Z=27$) помимо отсутствия поглощения с метастабильного уровня, характерно также отсутствие фосфоресценции. Очевидно, что ни эффект «тяжелого атома», ни магнитные свойства, ни электронная конфигурация не могут объяснить этого факта. Действительно, достаточно сравнить следующие пары комплексов: диамагнитные Ni (d^8) и Pd (d^8), парамагнитные Cu (d^9) и Ag (d^9) а также близкие по значению Z комплексы с Cu, Co, Ni, Z_n . Отсутствие фосфоресценции и поглощения с метастабильного уровня при регистрируемом просветлении синглет-синглетных полос, прямо указывает, что в комплексах с ионами кобальта, никеля и серебра безызлучательная дезактивация энергии S_1 , а также метастабильного состояния осуществляется путем отличным, чем в свободных основаниях порфиринов и ряде других обсуждавшихся ранее комплексах.

Нам представляется, что в указанных соединениях возможны следующие дезактивационные пути: либо происходит безызлучательная внутримолекулярная миграция энергии на низколежащие d -уровни энергии ионов, либо на уровни внутримолекулярного переноса заряда от центрального иона к лиганду ($d-\pi$ уровни) также с дальнейшим переносом энергии на d -уровни.

Дальнейшая дезактивация, независимо от того, какой из двух путей реализован, по-видимому осуществляется безызлучательным путем, т. к. d -электроны слабо экранированы и кроме того d -уровни расположены низко (10000—15000 см^{-1}). Во всяком случае до сих пор в указанных комплексах не обнаружено свечение в инфракрасной области. Не исключено, что поиск этого свечения надо распространить в более далекую область спектра. Дальнейшее исследование затруднено тем обстоятельством, что в настоящее время отсутствует общая теория влияния поля лигандов-порфиринов, а также экспериментальные по обнаружению $d-d$ и $d-\pi$ полос поглощения, что является, по-видимому, результатом перекрытия с $\pi-\pi^*$ полосами лиганда, что затрудняет определение расположения таких состояний по отношению к π -состоянию. Имеются лишь отдельные разрозненные данные по обнаружению слабых полос, приписываемых $d-d$ поглощению в спектральной области, примыкающей с красной стороны спектра к $\pi-\pi^*$ полосе M_n -комплекса [12], а также для некоторых пиррольных красителей как дипиррометаны [13] и корины [14]. Только в том случае, если удастся обнаружить взаимосогласование спектров поглощения и испускания можно будет окончательно установить какой механизм дезактивации действует в обсуждаемых комплексах. Может оказаться, что к дополнительным эффектам приводят различие в геометрии молекул, электроотрицательность и т. д.

Несмотря на указанные трудности, можно считать, что в комплексах порфиринов с ионами металлов, существенную роль в дезактивации электронной энергии возбуждения, играют уровни, связанные с d -электронами, в отличие от свободных комплексов и ранее обсуждавшихся металлопорфиринов.

2. Концентрационные эффекты и энергетика молекул

По современным представлениям во многих биологических объектах использующих световую энергию для своей жизнедеятельности, акцепторами энергии являются не сами фотохимические активные молекулы, а сложные образования, состоящие из многих поглощающих молекул, улавливающих свет и эффективно передающих ее в реакционные центры [15—16]. Нормальное функционирование такого рода «антенных» поглощающих образований возможно в том случае, когда энергетические уровни молекул реакционных центров расположены ниже уровней «антенных» молекул. Действительно, в фотосинтезирующих зеленых растениях удается установить несколько типов образований с различным расположением энергетических уровней [17]. Предполагается, что многие из этих образований являются агрегированными формами пигментов. Очевидно, использование широкого спектрального интервала солнечного спектра может быть осуществлено лишь в случае ассоциации молекул с отличающимися оптическими свойствами, каковыми в случае фотосинтезирующих объектов являются бактериохлорофилл, хлорофилл «а», хлорофилл «б», протохлорофилл, каротиноиды и другие. При этом необходимо предположить более эффективную смешанную агрегацию, чем самоагрегация. Изучение смешанной ассоциации пигментов представляет, таким образом, наряду с большим самостоятельным физическим интересом и несомненную ценность для познания жизнедеятельности живых организмов. Очевидно, ассоциация может привести к изменению внутримолекулярных характеристик молекул, что существенно для выяснения механизма переноса энергии.

Прежде всего, количественное исследование концентрационных эффектов в изотропных растворах хлорофилла и его аналогов, проведенное в лаборатории, позволило сделать вывод о том, что миграция энергии электронного возбуждения в таких системах вплоть до $C = 1 \cdot 10^{-1}$ м/л обусловлена индуктивно-резонансными взаимодействиями между молекулами [18—21].

В живых растительных объектах, однако, широко распространена миграция энергии в гетерогенных условиях, когда средняя концентрация взаимодействующих молекул мала, а локальная высока. Количественное исследование особенностей миграции фотовозбуждения в таких условиях было проведено в гетерогенных мицеллярных комплексах поверхностно-активных веществ, содержащих молекулы хлорофилла и его производных [22—24]. Измерение спектрально-люминесцентных характеристик хлорофиллов «а» и «б» и феофитина «а» в мицеллах детергентов в широкой области концентраций показывает, что падение степени поляризации люминесценции в таких системах обусловлено гомогенным типом миграции между мономерными молекулами пигментов. Падение квантового выхода свечения и электронные спектры свидетельствуют о развитии миграции энергии от мономеров на образующиеся агрегированные формы пигментов. Систематическое изучение таких систем позволило установить, что несмотря на гетерогенный характер мицеллярных растворов, обусловленный локальным распределением молекул, миграция энергии в таких условиях хорошо описывается теорией индуктивного резонанса, развитой для изотропных гомогенных систем.

Перенос поглощенной энергии может происходить как по синглетным, так и по триплетным уровням взаимодействующих молекул. Более того, близ-

кое расположение взаимодействующих центров может привести к ряду особенностей миграции энергии, не имеющих места в изотропных растворах.

Перенос энергии возбуждения с участием триплетных состояний ($T \rightarrow T$ перенос) в этих условиях может осуществляться с большой эффективностью, поскольку концентрация хлорофилла в гранах листьев составляет $5 \cdot 10^{-2} - 2 \cdot 10^{-1}$ м/л [20, 25].

Наиболее простой путь в выяснении механизма миграции — постановка экспериментов по обнаружению молекул хлорофилла в триплетном состоянии и $T \rightarrow T$ переноса энергии электронного возбуждения в растворах пигментов при концентрациях, реализующихся *in vivo*. Первоначальные исследования такого рода были выполнены в работах Портера с сотрудниками [26, 27], в которых обнаружено быстрое убывание $T \rightarrow T$ поглощения хлорофилла «а» и его ближайших аналогов в жесткой лецитиновой матрице с ростом концентрации пигментов. В последнее время нами были проведены такие эксперименты в вязких растворах хлорофилла «а» в касторовом масле при изменении концентрации пигмента в широких пределах вплоть до $1 \cdot 10^{-1}$ м/л [28]. Изучение концентрационной зависимости относительных квантовых выходов люминесценции и образования триплетных состояний хлорофилла «а» свидетельствуют о том, что перенос энергии в центры тушения возбуждения конкурирует с флуоресценцией и интеркомбинационным переходом в триплетное состояние, что приводит к одинаковой зависимости выхода свечения и образования триплетов от концентрации пигмента (рис. 2А). Эти данные позволяют сделать заключение о том, что миграция энергии осуществляется без заметного изменения внутримолекулярных характеристик взаимодействующих молекул. Вместе с тем время жизни триплетного состояния хлорофилла уменьшается с ростом концентрации (рис. 2В). Дальнейшие исследования показали, что наблюдаемый эффект сокращения τ_T зависит от температуры. При повышении температуры до 100°C начало падения τ_T сдвигается в область более высоких концентраций, а в растворах, замороженных до -196°C , время жизни триплетного состояния вообще остается неизменным при всех исследованных концентрациях. Как показывают произведенные оценки, температурная зависимость τ_T связана с диффузионной дезактивацией триплетно-возбужденных молекул хлорофилла. Таким образом, постоянство τ_T при и низкой температуре указывает на то, что в концентрированных растворах хлорофилла ($C \sim 0.1$ м/к) перенос энергии по триплетным уровням малоэффективен, либо не происходит вообще.

Более неопределенен этот вывод в применении к биологическим объектам, поскольку неясно, сохраняются ли вероятности внутримолекулярных переходов в молекулах хлорофилла *in vivo* по сравнению с молекулярным раствором. Сходная ситуация возникает при рассмотрении работы реакционных центров. В данном случае остается неясным, какое из состояний реакционного центра — триплетное или синглетное — активно в первичном фотохимическом процессе. Проблему фактически можно сформулировать по-иному, а именно: может ли состояние агрегации хлорофилла и ближайшее окружение молекулы резко изменить внутримолекулярные вероятности переходов? В такой форме задача может быть в значительной степени выяснена путем изучения энергетики хлорофилла и его аналогов, а также ассоциатов пигментов в растворах.

Обратимся к результатам экспериментального исследования молекуляр-

ных растворов хлорофилла и порфиринов. Как было показано выше, для молекул свободных порфиринов и комплексов с ионами металлов деградация электронной энергии возбуждения осуществляется, главным образом, через триплетное состояние пигмента. При этом для комплексов порфиринов с ионами переходных металлов, наблюдается увеличение интеркомбинационной конверсии, обусловленное наличием неспаренных электронов в системе. Так, например, у свободных порфиринов вероятность интерконверсии составляет 10^7 — 10^8 сек $^{-1}$, тогда как для комплексов с медью эта вероятность, согласно оценке авторов работы [29], составляет 10^{13} сек $^{-1}$.

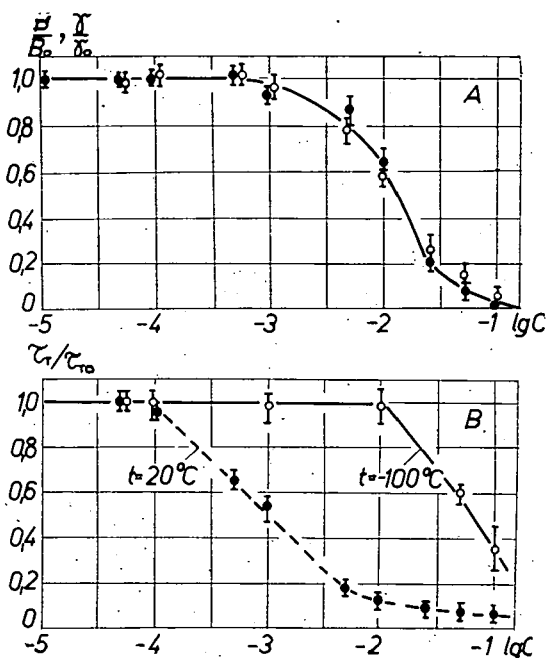


Рис. 2. Относительный квантовый выход люминесценции и образования триплетов (А) и относительное время жизни триплетных состояний (В) хлорофилла «а» с ростом концентрации в касторовом масле.

А: \bullet — \bullet — концентрационное тушение синглетов;
 \circ — \circ — концентрационное тушение триплетов;
 В: — — — $t = 20^\circ\text{C}$; — — — $t = -100^\circ\text{C}$.

Возможно ли такое значительное увеличение вероятности интеркомбинационной конверсии и, соответственно, уменьшение квантового выхода люминесценции, например, в молекулах хлорофилла, входящих в состав реакционного центра или принадлежащих фотосистеме I зеленых растений? По современным представлениям, хлорофилл реакционного центра находится в комплексе с цитохромом и связан электронно-транспортной цепью с ферредоксином. Цитохром представляет собой белок, содержащий молекулы Fe-порфирина. Ион Fe в центре молекулы порфирина способствует значительному уве-

личению вероятности интерконверсии в триплетное состояние из-за наличия неспаренных электронов. Кроме того, результаты исследований по фрагментированию хлоропластов растений свидетельствуют о том, что легкие фрагменты богаты железом и медью [30]. Поэтому можно предполагать, что молекулы хлорофилла, находящиеся достаточно близко к ионам Cu и Fe , также характеризуются более высокой вероятностью интерконверсии в триплетное состояние по отношению к изолированным молекулам пигмента.

Другим фактором, способным увеличить скорость интерконверсии, является агрегация молекул в реакционном центре. Подтверждением этому могут служить следующие эксперименты [28, 31]. Хлорофилл «а», растворенный в водно-диоксановых смесях, способен давать две различные агрегированные формы с длинноволновыми максимумами поглощения 686 нм (Хл. 636) и 689 нм (хл. 698). Полуширина и интенсивность полос поглощения у этих агрегированных форм такие же, как и соответствующие характеристики полосы поглощения хлорофилла в эфире и других органических растворителях. Форма с максимумом поглощения 686 нм обладает флуоресценцией с квантовым выходом $B_0 \lesssim 0.01$. Люминесценция агрегата с максимумом поглощения 698 нм лежит за пределами чувствительности использованной установки и ее квантовый выход может быть оценен как $< 10^{-3}$. Интеграл Кравца для полос поглощения указанных агрегированных форм пигмента почти не отличается от интеграла для полосы поглощения мономерного хлорофилла. Отсюда естественное время жизни агрегатов хлорофилла $\tau_e \approx 15 \cdot 10^{-9}$ сек. Поэтому суммарная вероятность дезактивации возбуждения в агрегате хлорофилла с максимумом поглощения 686 нм будет равна

$$\frac{1}{\tau} = \frac{1}{\tau_e \cdot B_0} = \frac{1}{15 \cdot 10^{-9} \cdot 10^{-2}} = 6 \cdot 10^{11} \text{ сек}^{-1},$$

а для формы с максимумом поглощения 698 нм она оказывается не менее $6 \cdot 10^{12} \text{ сек}^{-1}$. Эти величины $6 \cdot 10^{11} - 6 \cdot 10^{12} \text{ сек}^{-1}$ определяют скорости интерконверсии, если предположить, что в агрегированном хлорофилле дезактивация электронной энергии возбуждения идет через триплетное состояние.

Таким образом, в фотосинтетическом аппарате имеются условия, которые допускают возможность сильного возрастания константы скорости интеркомбинационной конверсии, что может обеспечивать эффективный переход молекул в триплетное состояние, несмотря на большую величину константы скорости первичной химической реакции. Это означает, что первичная фотохимическая реакция может осуществляться с участием триплетного состояния реакционного центра. Время жизни триплетов хлорофилла реакционного центра, по видимому, сильно сокращено по сравнению с обычным временем жизни триплетов хлорофилла в растворе ($\tau_T^{\text{РАКТИВ}} \sim 10^{-3}$ сек), поскольку выше рассмотренные факторы способствуют и возрастанию вероятности интеркомбинационного перехода из триплетного состояния в основное синглетное. Возможно, все эти причины затрудняют экспериментальное обнаружение триплетов *in vivo* [32]. Аналогичная картина наблюдается в модельных экспериментах. Измерения показали, что длительность жизни агрегированного хлорофилла с максимумом поглощения 686 нм лежит за пределами временного разрешения использованной импульсной установки ($1 - 2 \cdot 10^{-6}$ сек).

Остановимся, наконец, на исследовании смешанной агрегации хлорофилла с другими пигментами. Проведенные нами эксперименты показали, что смешанную агрегацию сравнительно легко удается наблюдать и исследовать в бинарной смеси растворителей [31, 33]. Для установления совместной агрегации были выбраны пигменты с заметно отличающимся расположением нижних возбужденных энергетических уровней. Этому условию удовлетворяют следующие пары пигментов:

Донор	Акцептор
4-Винил-протохлорофилл	Хлорофилл
протохлорофилл	хлорофилл
хлорофилл	бактериохлорофилл
неоксантин	протохлорофилл

Донор и акцептор, взятые раздельно, либо совместно, растворялись в органическом растворителе (диоксан или ацетон). Раствор разбавляли водой так, что соотношение диоксана и воды было равным 1:4, а ацетона и воды 1:49. При малых концентрациях пигмента ($1 \cdot 10^{-6}$ м/л) в первые секунды приготовления водно-диоксанового или водно-ацетонового раствора пигмент сохраняет все свойства мономерных молекул, но с течением времени максимум поглощения

(664 нм), например, хлорофилла «а» в водно-диоксановом растворе, смещается в длинноволновую сторону (до 686 нм).

Следует отметить, что переход от мономерной формы к новой спектральной форме ускоряется при увеличении концентрации исходного пигмента. Так, при $C > 1 \cdot 10^5$ м/л превращение осуществляется практически мгновенно. Полученные результаты находят естественное объяснение с точки зрения агрегации пигмента, управляемой диффузией молекул.

Спектральное подтверждение наличия ассоциации неодинаковых молекул следует из рис. 3. Феофитин, растворенный в водно-ацетоновой смеси, имеет максимум поглощения 695 нм. Хлорофилл «а» в таких же условиях обладает полосой поглощения 673 нм.

В двухкомпонентном растворе с эквимолярным соотношением пигментов феофитин не образует своей агрегированной формы с максимумом 695 нм. Этот факт можно объяснить, тем, что феофитин и хлорофилл образуют смешанный ассоциат, в котором молекулы связаны не таким способом, как в случае самоассоциации феофитина.

В этом же плане интересны эксперименты с использованием Си-феофитина в качестве партнера по агрегации с хлорофиллом. Как известно, Си-феофитин не обладает флуоресценцией, тогда как агрегированный хлорофилл сам по

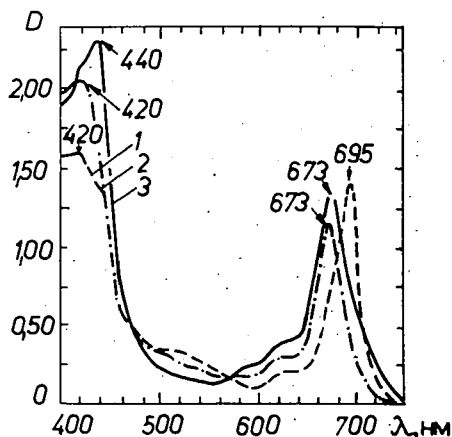


Рис. 3. Спектры поглощения агрегированных феофитина (кр. 1), хлорофилла (кр. 2) и смешанного ассоциата (кр. 3) в водном ацетоне (49:1). $C_{\text{феоф.}} = 1 \cdot 10^{-6}$ м/л; $C_{\text{хл.}} = 1 \cdot 10^{-6}$ м/л; $C_{\Sigma} = 1 \cdot 10^{-6}$ м/л (1:1).

себе сравнительно хорошо флуоресцирует. Когда оба компонента находятся в растворе совместно, интенсивность флуоресценции хлорофилла почти в 30 раз меньше, чем интенсивность агрегированного хлорофилла в однокомпонентном растворе при той же концентрации. Если бы тушение флуоресценции носило диффузионный характер, то, как показывает расчет по формуле Штерна-Фольмера, следовало бы ожидать максимальное уменьшение выхода флуоресценции хлорофилла не более, чем на 1—2%. Более высокое расположение нижнего возбужденного энергетического уровня Си-феофитина по сравнению с уровнем хлорофилла не позволяет предположить перенос энергии от Си-феофитина к хлорофиллу. Очевидно, что процесс тушения флуоресценции хлорофилла в данном случае осуществляется иным способом, предполагающим образование комплекса между молекулами Си-феофитина и хлорофилла.

В ряде случаев агрегированные пигменты обладают флуоресценцией. Рассмотрим в качестве примера ассоциацию 4-винилпротохлорофилла и хлорофилла. Сравнение спектров поглощения агрегированных пигментов в двухкомпонентном растворе (рис. 4)

со спектрами агрегированных компонентов в отдельных растворах позволяет обнаружить ряд существенных различий между ними. В двухкомпонентном растворе пигментов максимумы поглощения расположены в более коротковолновой области спектра. Для этого случая весьма характерно наличие максимума при 465 нм. Максимум поглощения 4-винилпротохлорофилла 634 нм имеет меньшую полуширину по сравнению с аналогичным максимумом поглощения 637 нм 4-винилпротохлорофилла в однокомпонентном растворе. Следовательно, раствор эквимолярной смеси 4-винилпротохлорофилла и хлорофилла имеет спектр поглощения, который нельзя получить сложением спектров поглощения пигментов в однокомпонентных растворах. Таким образом, имеются основания предположить смешанную агрегацию хлорофилла и 4-винилпротохлорофилла.

Поскольку агрегированные пигменты обладают заметной флуоресценцией (квантовый выход флуоресценции $\leq 1\%$), представляется интересным использовать это явление для доказательства совместной агрегации. На рис. 5 приведены спектры люминесценции в одно- и двухкомпонентных растворах. В растворе, содержащем хлорофилл «а», максимум полосы флуоресценции расположен при 697 нм и форма полосы флуоресценции очень слабо зависит от длины волны возбуждения. Наличие плеча в спектре люминесценции хлорофилла при

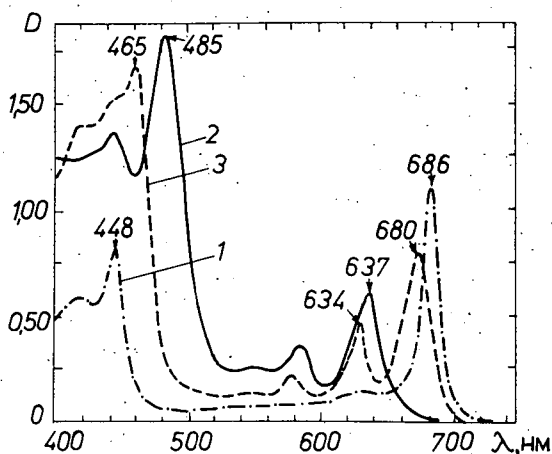


Рис. 4. Спектры поглощения агрегированных хлорофилла (кр. 1), 4-винилпротохлорофилла (кр. 2) и смешанного ассоциата (кр. 3) в водном диоксане (4:1). $C_{\text{ВПХ}} = 1 \cdot 10^{-5}$ м/л. $C_{\text{Хл.}} = 1 \cdot 10^{-5}$ м/л; $C_{\Sigma} = 1 \cdot 10^{-5}$ м/л (1:1).

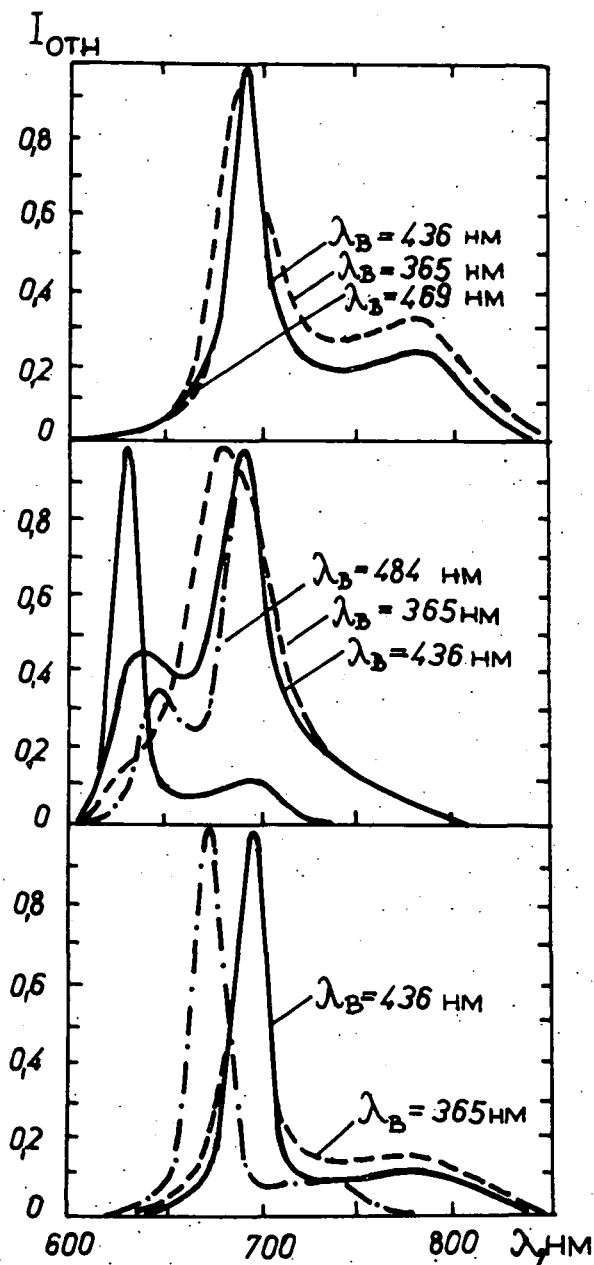


Рис. 5. Спектры люминесценции агрегированных хлорофилла (нижний рис.), 4-винил-протохлорофилла (средний рис.) и смешанного агрегата (верхний рис.) в водном диоксане (4:1).
 $C_{\text{хл}} = 1 \cdot 10^{-5}$ м/л; $C_{\text{ВПХ}} = 1 \cdot 10^{-5}$ м/л; $C_{\Sigma} = 1 \cdot 10^{-5}$ м/л (1:1).

Спектры люминесценции пигментов в чистом диоксане не помечены.

680 нм при возбуждении $\lambda_B = 365$ нм указывает на присутствие в растворе наряду с подавляющим количеством агрегированного хлорофилла малого количества остаточного мономерного пигмента. В растворе, содержащем 4-винил-протохлорофилл, форма полосы люминесценции зависит от длины волны возбуждения значительно сильнее. Это свидетельствует о присутствии в растворе наряду с основным компонентом агрегированного ($\lambda_m = 692$ нм) протохлорофилла и других форм пигмента. Коротковолновый компонент с максимумом 625 нм, вероятно, принадлежит остаточному мономерному 4-винил-протохлорофиллу. Максимумы 650 нм и 680 нм обусловлены, возможно, присутствием различных агрегированных форм 4-винил-протохлорофилла. В двухкомпонентном растворе при концентрации $1 \cdot 10^{-5}$ м/л наблюдается полоса люминесценции 692 нм с сателлитом при 786 нм, форма которой слабо зависит от длины волны возбуждения. Этот результат свидетельствует о том, что в растворе присутствует, главным образом, смешанный агрегат пигмента.

Таким образом, один из интересных результатов измерения люминесценции состоит в слабой зависимости спектра люминесценции двухкомпонентного раствора пигментов от длины волны возбуждения, в то время как один из пигментов (4-винил-протохлорофилл) в однокомпонентном растворе обнаруживает сильную зависимость спектра флуоресценции от длины волны возбуждения. Это означает, что смешанная агрегация двух пигментов 4-винил-протохлорофилла и хлорофилла «а» приводит к образованию преимущественно одной формы. Почти полное отсутствие флуоресценции мономерных молекул в смешанном растворе пигментов свидетельствует о том, что агрегация охватывает практически все молекулы пигмента.

Спектры возбуждения флуоресценции, зарегистрированные для длины волны флуоресценции 793 нм, подтверждают эти заключения (рис. 6). Спектр возбуждения смешанного раствора хорошо согласуется со спектром поглощения смеси. В частности, в спектре возбуждения смешанного ассоциата четко проявляются полосы с максимумами 465 нм, 634 и 680 нм, характерные для спектра поглощения смешанного раствора пигментов.

Наличие в спектре возбуждения совместного раствора пигментов полосы 4-винил-протохлорофилла с максимумом 634 нм указывает, что энергия возбуждения 4-винил-протохлорофилла передается на хлорофилл «а» внутри комплекса пигментов.

Таким образом, полученные по спектрам возбуждения результаты показывают, что в смешанном растворе пигменты ведут себя как единая молекулярная система, подтверждая образование смешанного агрегата.

Перенос энергии обнаружен также в паре протохлорофилл (донор) — хлорофилл (акцептор). В этом случае спектры поглощения компонентов в смешанном растворе слабо отличаются от спектров поглощения в отдельных растворах. Однако, в смешанном растворе донор практически не флуоресцирует, что указывает на практически полный перенос энергии на хлорофилл «а». Непосредственное подтверждение этому следует из спектра возбуждения флуоресценции хлорофилла «а» в смешанном растворе (рис. 6). Спектр возбуждения флуоресценции хлорофилла «а» содержит полосы, принадлежащие протохлорофиллу.

Высокая скорость переноса энергии в ассоциате пигментов обеспечивает значительный перенос энергии даже в том случае, когда полоса флуоресценции

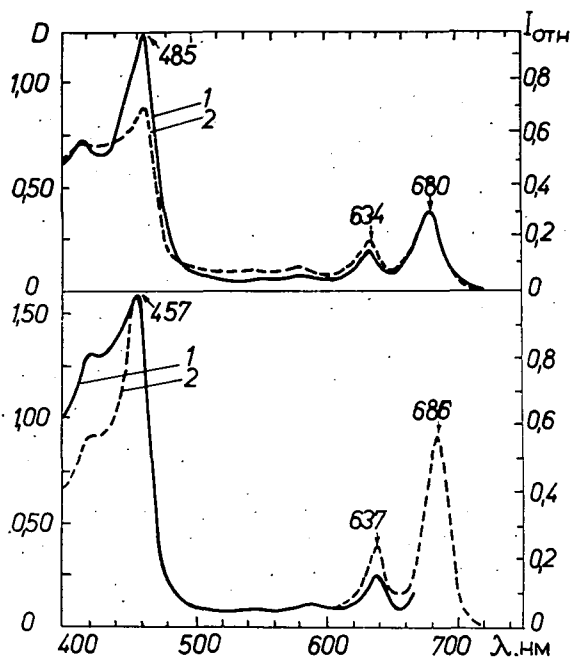


Рис. 6. Спектры возбуждения люминесценции смешанных агрегатов пигментов в водном диоксане (4:1). Верхний рисунок — хлорофилл+4-винил-протохлорофилл (1:1), $C_x = 1 \cdot 10^{-5}$ м/л. Нижний рисунок — хлорофилл+протохлорофилл (1:1), $C_x = 1 \cdot 10^{-5}$ м/л. Сплошная кривая (1) — спектры возбуждения, пунктирная кривая — (2) — спектры поглощения.

донора и поглощение акцептора почти не перекрываются. Например, в паре хлорофилл-бактериохлорофилл нижние возбужденные электронные состояния разнесены на ~ 150 нм. Тем не менее, в совместном ассоциате флуоресценция хлорофилла «а» сильно потушена (в несколько раз) (рис. 7). Интересно отметить, что флуоресценцию агрегированного бактериохлорофилла не удается

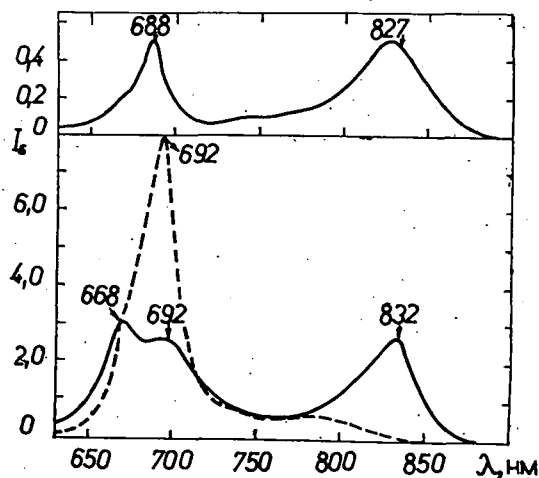


Рис. 7. Спектры поглощения и люминесценции смеси хлорофилла «а» и бактериохлорофилла в водном диоксане (4:1). Верхний рисунок — спектр поглощения смеси хлорофилл+бактериохлорофилл (1:1), $C_x = 1 \cdot 10^{-5}$ м/л. Нижний рисунок — спектры люминесценции: пунктирная кривая — люминесценция агрегированного хлорофилла; сплошная кривая — люминесценция смешанного комплекса в тех же условиях ($\lambda_{\text{в}} = 405$ нм).

обнаружить из-за ее очень малого квантового выхода, а в составе смешанного агрегата флуоресценция бактериохлорофилла проявляется и сравнительно легко регистрируется.

Даже в том случае, когда молекула донора не обладает флуоресценцией, в составе смешанного агрегата удастся обнаружить перенос энергии возбуждения от нее на соответствующий акцептор. В качестве примера служит пара неоксантин-протохлорофилл (рис. 8). Неоксантин — является представителем класса нефлуоресцирующих пигментов — каротиноидов. Действительно, как показывают измерения, в смешанном ассоциате флуоресценция принадлежит только протохлорофиллу. Тем не менее, спектр возбуждения флуоресценции совместного комплекса свидетельствует о том, что в условиях данного эксперимента около 20–30% энергии, поглощенной каротиноидом, передается на протохлорофилл. При этом спектры поглощения пигментов в двух- и однокомпонентных растворах одинаковы.

Полученные результаты позволяют установить возможный механизм миграции энергии возбуждения в таких системах. Как известно, в случае разрешенных дипольных переходов возможны три типа переноса энергии, отличающиеся силой межмолекулярного взаимодействия. Различают случай очень слабой связи, при которой энергия взаимодействия U_{vv} составляет $0,1 - 10 \text{ см}^{-1}$ и константа переноса $F_{\text{пер}} = 10^8 - 10^{12} \text{ сек}^{-1}$; промежуточной силы связи ($U_{vv} = 10 - 1000 \text{ см}^{-1}$, $F_{\text{пер}} \approx 10^{12} - 10^{14} \text{ сек}^{-1}$) и случай сильной связи, при которой возбуждение делокализовано ($U_{vv} > 1000 \text{ см}^{-1}$, $F_{\text{пер}} \approx 3 \cdot 10^{14} \text{ сек}^{-1}$).

В рассмотренных нами экспериментах можно оценить нижний предел константы скорости переноса энергии, основываясь на том, что перенос энергии от донора к акцептору конкурирует с излучательным переходом в доноре. Таким образом, можно оценить нижний предел вероятности переноса в паре протохлорофилл-хлорофилл. Естественное время жизни возбужденного состояния τ_e самоассоциата протохлорофилла составляет $\sim 5 \cdot 10^8 \text{ сек}$. Квантовый выход флуоресценции этого ассоциата $B_0 \approx 0,01 - 0,001$. Следовательно, $\tau_{\phi 1} = B_0 \tau_e \approx 5 \cdot 10^{-10} - 10^{-11} \text{ сек}$. Поскольку перенос энергии полностью подавляет флуоресценцию протохлорофилла в смешанном агрегате с хлорофиллом, то константа переноса должна быть 10^{12} сек^{-1} (не менее).

В случае пары каротиноид-протохлорофилл соответствующие величины для неоксантина можно оценить следующим образом $\tau_e \approx 10^{-8} \text{ сек}$, $B_0 \approx 10^{-4}$; $\tau_{\phi 1} = 10^{-12}$. Поскольку перенос энергии тем не менее осуществляется со значи-

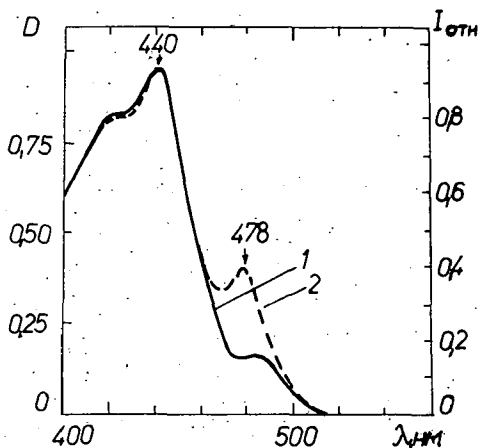


Рис. 8. Спектры поглощения (пунктирная кривая) и возбуждения люминесценции (сплошная кривая) смешанного агрегата протохлорофилла с неоксантином ($C_{\text{Хл.}} = 2 \cdot 10^{-6} \text{ м/л}$); $C_{\text{Неокс.}} = 3 \cdot 10^{-6} \text{ м/л}$) в водном диоксане (4:1).

тельной эффективностью, то $F_{\text{пер}} \approx 10^{12} - 10^{13} \text{ сек}^{-1}$ и энергия взаимодействия $100 - 200 \text{ см}^{-1}$.

Эта величина соответствует случаю взаимодействия промежуточной силы-случаю локализованного экситона.

Таким образом, приведенные данные, по нашему мнению доказывают, во-первых, существование смешанной агрегации различных пигментов; во-вторых, переноса энергии от коротковолнового компонента агрегата к длинноволновому; перенос энергии наблюдается и в том случае, когда энергетические уровни взаимодействующих молекул сильно разнесены; в-третьих, переноса энергии в составе агрегатов от нефлуоресцирующего пигмента к флуоресцирующему.

Проведенные эксперименты и оценки представляют очевидный интерес в связи с проблемой состояния пигментов в фотосинтетическом аппарате растений и механизма переноса энергии, а также молекулярной энергетики биологически активных молекул.

Литература

- [1] Гуринович, Г. П., А. Н. Севченко, К. Н. Соловьев: Спектроскопия хлорофилла и родственных соединений, Изд. „Наука и техника”, Минск, 1968.
- [2] Гуринович Г. П., А. И. Пацко, А. П. Севченко: ДАН ССР 174, 873 (1967).
- [3] Джагаров Б. М.: Опт. и спектр. 28, 66 (1970).
- [4] Джагаров Б. М., Г. П. Гуринович: Опт. и спектр. 30, 425 (1971).
- [5] Гуринович, Г. П., О. М. Пецольд, И. М. Бытёва: ДАН БССР 16, 370 (1972).
- [6] Джагаров Б. М.: Изв. АН СССР, сер. физ. 36, 1094 (1972).
- [7] Джагаров Б. М., Ю. И. Козлов, А. П. Симонов, Г. П. Гуринович: Опт. и спектр. 32, 838 (1972).
- [8] Гуринович Г. П., Б. М. Джагаров: Изв. АН СССР, сер. физ. 37, 383 (1973).
- [9] Ake R. Y., M. Gouterman: Theoret. chim. Acta (Berl.), 15, 20 (1969); *Ibid.*, 17, 408 (1970).
- [10] Eastwood, D., M. Gouterman: Y. Mol. Spectr. 35, 359 (1970).
- [11] Callis, Y. B., M. Gouterman, Y. M. Yones, B. H. Henderson: I. Mol. Spectr. 39, 410 (1971).
- [12] Baker, E. W., Y. R. Perumareddi: Z. Naturforsch. 25b, 911 (1970).
- [13] Murakami, Y., Y. Matsuda, K. Sacato: Inorg. Chem. 10, 1728 (1971).
- [14] Hush, N. S., H. S. Woolsey: J. Amer. Chem. Soc. 94, N 12 (1972).
- [15] Красновский А. А., В сб.: „Функциональная биохимия клеточных структур”, М., „Наука”, 1970, стр. 15.
- [16] Butler, W. L.: In „The Chlorophylls”, ed. by L. P. Vernon and G. R. Seely, Acad. Press, N-Y-L, 1966, p. 343.
- [17] Литвин Ф. Ф.: Тезисы секционных докладов IV. МБК, т. 1, М., 1972, стр. 14.
- [18] Лосев А. П., Э. И. Зенькевич: Журн. прикл. спектр. 9, 144 (1968).
- [19] Зенькевич Э. И.: Материалы I. Республиканской конференции молодых ученых. Минск, 1970, стр. 29.
- [20] Зенькевич Э. И., А. П. Лосев, Г. П. Гуринович: Миграция энергии между пигментами фотосинтетического аппарата растений. Препринт ИФ АН БССР, Минск, 1971.
- [21] Зенькевич Э. И., А. П. Лосев: Материалы II. Республиканской конференции молодых ученых по физике. Минск, 1973, стр. 24.
- [22] Зенькевич Э. И., А. П. Лосев, Г. П. Гуринович: Молекулярная биология 6, 824 (1972).
- [23] Зенькевич Э. И., А. П. Лосев, Г. П. Гуринович: Изв. АН СССР, сер. физ. 36, 979 (1972).
- [24] Зенькевич Э. И., А. П. Лосев, Г. П. Гуринович: Тезисы секционных докладов IV. МБК. Москва, 1972, т. 1, стр. 333.
- [25] Рабинович Е.: Фотосинтез, т. I, М., ИЛ, 1951, стр. 414.
- [26] Porter, G., G. Strauss: Proc. Roy. Soc. 1, 295 (1966).
- [27] Kelly, A. R., G. Porter: Proc. Roy. Soc. A 315, 149 (1970).
- [28] Зенькевич, Э. И.: Канд. дисс., Минск, 1973.

- [29] Соловьев К. Н., А. Т. Градюшко, М. П. Цвирко: Изв. АН СССР, сер. физ. 36, 1107 (1972).
[30] Boardman, N. K.: Ann. Rev. Plant. Physiol. 21, 115 (1970).
[31] Лосев А. П., Э. И. Зенькевич, Г. П. Гуринович: Журн. прикл. спектр. 19, 262 (1973).
[32] Stacy, W. T., T. Mar., C. E. Swenberg, Govindjee: Photochem. Photobiol. 14, 197 (1971).
[33] Гуринович Г. П., Э. И. Зенькевич, А. П. Лосев: Тезисы докладов XI. ЕКМС. Таллин, 1973, 22. (В1).

ENERGETICS AND STATES OF PIGMENT MOLECULES IN SOLUTIONS AND IN BIOLOGICAL SYSTEMS

G. P. Gurinovich

The energetics of porphyrine molecules formed with different metal ions in solutions and pigment—pigment interactions, as well as the energy transfer in heterogeneous and homogeneous associations of pigment molecules were investigated. The results showed that in the porphyrine complexes formed with metal ions an important role in deactivation of the exciting energy is to be attributed to levels due to *d*-electrons which are different from those in free complexes and metal-porphyrines investigated earlier. It was stated that mixed aggregations of different pigments are formed, and in these energy transfer from the short-wave to the long-wave components can be observed. Energy transfer occurs also if the energy levels of the interacting molecules are rather distant; energy transfer from non-fluorescent to fluorescent pigments can be observed in the aggregates, too.