

ПРОЯВЛЕНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА МОЛЕКУЛЯРНЫХ ХРОМОФОРОВ В ДИФФУЗНОМ ЭЛЕКТРОННО-КОЛЕБАТЕЛЬНОМ СПЕКТРЕ

В. А. Толкачёв

УДК 535.37

Институт физики НАН Беларуси,
220072, Минск, просп. Независимости, 68-2, Беларусь; e-mail: tolkachev@imaph.bas-net.by

(Поступила 10 января 2018)

Локализация чисто электронного перехода ν_0 в случае гомоморфных хромофоров при сечении перехода $\sigma(\nu)$ определяется экстремумом ($\partial\sigma/\partial\nu = 0$) на этой частоте функции $[\sigma(\nu)/\nu]\exp(\hbar\nu/2kT) = \varphi(|\nu - \nu_0|)$ ($\nu > \nu_0$ и “–” в поглощении, $\nu < \nu_0$ и “+” в испускании) для дипольного франк-кондоновского перехода при условии термического распределения по подуровням исходного в переходе состояния. При полиморфизме наблюдаемое эффективное сечение и спектр формируются из парциальных вкладов электронных переходов отдельных форм с разными ν_{i0} . В этом случае гомоморфный экстремум искажается — уширяется, размывается или даже отсутствует, что и является индикатором полиморфизма хромофора. Приведены примеры выявления этих неоднородностей по такой зависимости, рассчитанной из экспериментальных спектров.

Ключевые слова: полиморфизм хромофора, уширение спектра, диффузный спектр, чисто электронный переход, проявление таутомерии, неоднородность уширения.

For the case of homomorphic chromophores, the localization of the 0–0-transition ν_0 is defined in a separate electronic transition cross-section spectrum $\sigma(\nu)$ by the extremum ($\partial\sigma/\partial\nu = 0$) of the relation $[\sigma(\nu)/\nu]\exp(\hbar\nu/2kT) = \varphi(|\nu - \nu_0|)$ (“–” and $\nu > \nu_0$ for absorption, “+” and $\nu < \nu_0$ for emission). It holds for the dipole Frank-Condon transition under conditions of thermal distribution on state sublevels. If the spectrum is formed by polymorphic chromophores, it constitutes of the sum of partial inputs of the separate chromophores with different ν_{i0} . So, the area of the extremum is distorted, the extremum can even disappear and the distortions indicate chromophore polymorphism. Examples are given for the distortion from absorption, fluorescence, and phosphorescence spectra

Keywords: chromophore polymorphism, spectrum broadening, diffuse spectrum, vibronic 0–0-transition, tautomerism manifestation, unhomogeneous broadening.

Введение. Недавно [1, 2] доказана возможность определения частоты чисто электронного перехода для сплошных диффузных спектров только поглощения или только флуоресценции. Она базируется на однородности электронного перехода — моногенности хромофора (молекулы, молекулярного комплекса и т. д.), дипольном характере франк-кондоновского электронно-колебательного перехода и тепловом распределении по подуровням исходного в переходе электронного состояния. Выводы [1, 2] подтверждены многочисленными данными эксперимента. Вместе с тем наблюдаемые спектральные полосы зачастую являются суперпозицией спектров таутомеров, конформеров и даже суперпозицией со спектрами примесей. Поэтому там же указано на возможность применения развитого подхода для оценки степени неоднородности хромофоров по их спектру. Рассмотрим это шире.

MANIFESTATION OF MOLECULAR CHROMOPHOR POLYMORPHISM IN DIFFUSE VIBRONIC SPECTRA

V. A. Tolkachev (B. I. Stepanov Institute of Physics of the National Academy of Sciences of Belarus, 68-2 Nezavisimosti Prosp., Minsk, 220072, Belarus; e-mail: tolkachev@imaph.bas-net.by)

Теория. В [1, 2] показано, что при гомоморфности хромофора и упомянутых базовых условиях сечение оптического перехода $\sigma(\nu)$ с поглощением или испусканием на частоте ν следует закономерности, имеющей экстремум ($\partial\sigma/\partial\nu = 0$) на частоте чисто электронного перехода ν_0 :

$$[\sigma(\nu)/\nu]\exp(\mp h\nu/2kT) = \phi(|\nu - \nu_0|). \quad (1)$$

Эта закономерность ограничена областью $\nu \geq \nu_0$ и “–” в поглощении и $\nu \leq \nu_0$ и “+” в испускании, т. е. справедлива в стоксовых областях, где энергетические ограничения на участие в переходе исходных подуровней отсутствуют. В антистоксовых областях исходные состояния с энергией подуровней меньше $|\nu - \nu_0|$ запрещены для переходов. Формально соотношение (1) задает функцию, симметричную относительно частоты чисто электронного перехода, которая при $\nu = \nu_0$ имеет экстремум ($\partial\sigma/\partial\nu = 0$), используемый для установления ν_0 . Однако можно легко показать, что и в антистоксовой области вблизи ν_0 , где потери из-за запрета на вклад в сечение перехода молекул с энергией, меньшей $|\nu - \nu_0|$, пренебрежимо малы, соотношение (1) также практически выполнимо и область экстремума еще симметрична относительно ν_0 . Если относительный вклад низкоэнергетических молекул в интенсивность сечения на заданной, прилегающей к ν_0 антистоксовой частоте упадет, например, с ростом температуры, то и соотношение (1) станет выполняться в некоторой более широкой окрестности $|\nu - \nu_0|$. Это подтверждается приведенными в [1, 2] данными.

Когда коэффициент поглощения среды на заданной частоте $k(\nu)$ представляется суммой коэффициентов поглощения хромофоров $k_i(\nu)$, входящих в среду, соотношение (1) принимает вид:

$$[\sum_i k_i(\nu)]\exp(\mp h\nu/2kT)/\nu = \sum_i \phi_i^a(|\nu - \nu_{i0}|), \quad (2)$$

для которого может не быть симметрии, как у (1), или даже экстремума из-за различия ν_{i0} . Аналогично в испускании для интенсивности $I(\nu)$

$$[\sum_i I_i(\nu)]\exp(\mp h\nu/2kT)/\nu^4 = \sum_i \phi_i^e(|\nu - \nu_{i0}|). \quad (3)$$

В (1) $\sigma(\nu)$ пропорционально $k(\nu)$ или $I(\nu)/\nu^3$. На практике удобнее строить зависимости

$$\ln[k(\nu)/\nu] - h\nu/2kT = \phi^a(\nu) \quad (4)$$

или

$$\ln[I(\nu)/\nu^4] + h\nu/2kT = \phi^e(\nu) \quad (5)$$

и анализировать экстремум (максимум) $\phi(\nu)$, как это сделано в данной работе.

Нарушение существования экстремума или его симметрии, предсказываемой (1), будет указывать, согласно (2) или (3), на хромофорную негомогенность измеряемой среды. Пример этого приведен, например, в [2] сравнением спектров поглощения урацила и 1,3-диметилурацила, где (1) хорошо выполняется, и подтвержден как определением ν_0 при струйном охлаждении, так и теоретическим расчетом. Для урацила экстремум по соотношению (1) вообще отсутствует. Это объяснимо, поскольку хорошо известна высокая степень таутомеризации этой молекулы (до семи таутомеров), активная для температуры приведенного спектра (211 °C). (При температуре струйного охлаждения до единиц градусов абсолютной температуры таутомеры “вымораживаются” и наблюдается ν_0 самого низкоэнергетического). У паров 1,3-диметилурацила метильные заместители препятствуют таутомеризации и ν_0 , определенные данным методом и при струйном охлаждении, практически совпадают. Подобным образом метильные заместители препятствуют таутомеризации 1,9-диметилгипоксантина в газовой фазе (200 °C), и в его УФ спектре поглощения наблюдается хорошо выраженный 0—0-экстремум около 32900 см⁻¹ [3]. В то же время в спектре поглощения паров 9-метилгипоксантина (273 °C) отсутствует 0—0-экстремум, поскольку молекула допускает таутомеризацию, активируемую еще и высокой температурой [4]. Соединения, допускающие таутомеризацию, по нашим наблюдениям не обнаруживают в газовой фазе 0—0-экстремумов, чему в большой мере способствует ее термическая активация. Это наблюдается, например, для таутомеризующихся производных урацила, аденина, гипоксантина и др.

Как отмечено выше, для выполнения соотношений (1)—(3) колебательные подуровни исходного в электронно-колебательном переходе состояния должны находиться в условиях термического равновесия. Это важно для оптического перехода с испусканием, поскольку после возбуждения термализация в твердых средах, например, замороженных при цепочечной структуре хромофора, требует времени, которое может превышать время жизни возбужденного состояния, и проявится в спектре неоднородным уширением.

Обсуждение результатов. Такой способ диагностики гомогенности хромофора может быть полезен, например, при разработке флуоресцентных меток для исследования динамики или фотофизики полимеров, особенно биологических, когда затруднен анализ однородности мест прививки метки комплексов метка-полимер. Рассмотрим ряд примеров. На рис. 1, *а* приведены спектры олигонуклеотида, меченного четырьмя различными производными тетраметилендо(ди)карбоцианина, когда место их связи с олигонуклеотидом определено однозначно [5]. Соответственно, частота чисто электронного перехода определяется однозначно и совпадает с определенной как по спектрам испускания, так и флуоресценции и с известной “частотой зеркальности”. На рис. 1, *б* приведены результаты определения данным методом ν_0 основного и возбужденного состояний метки — стирил-гамма-пиранбутирата — на сывороточном альбумине человека, и для сравнения — свободной метки в тех же условиях [6]. Во всех спектрах четко проявляется экстремум, подтверждающий гомоморфность хромофора как метки, так и ее комплекса с белком и в основном, и в возбужденном состояниях. Интересно, что при этом чисто электронный переход возбужденного состояния свободной метки смещен в длинноволновую сторону сильнее, чем комплекса метка-белок. По-видимому, белок экранирует метку от взаимодействий с буфером.

На рис. 2 приведены два других примера. В то время как конъюгат хромофора флуоресцеин изотиоцианата с белком дает достаточно узкие 0—0-экстремумы, для конъюгата бычьего сывороточного альбумина (БСА) с N-(дихлортриазинил)-6-аминофеналеном (ДТАФ) они не наблюдаются ни для основного, ни для возбужденного состояния. Это, как и необычно большая полуширина спектров ДТАФ, свидетельствует о полиморфизме структуры белок—метка.

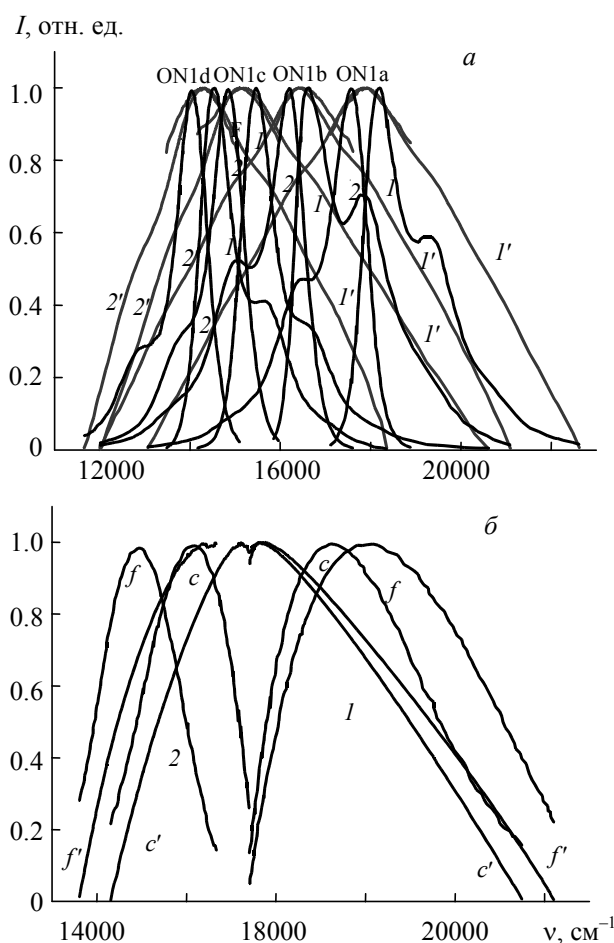


Рис. 1. Спектры поглощения (I), флуоресценции (2) и кривые $f(\nu)$ (n'): *а* — олигонуклеотида конъюгированного с метками — производными тетраэтилендо(ди)карбоцианина, различающимися длиной молекулярной цепи [5]; *б* — сывороточного альбумина человека, конъюгированного с меткой — стирил-гамма-пиранбутиратом (c), и свободной метки (f) в 0.5 М фосфатном буфере [4]

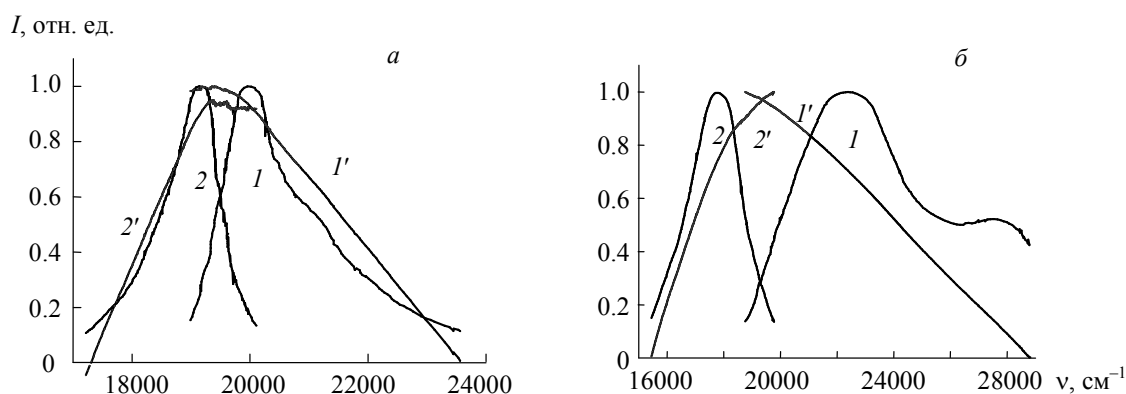


Рис. 2. Спектры поглощения (I), флуоресценции (2) и кривые $\phi(\nu)$ (I' , $2'$) глобулина с меткой флуоресцеин-5-изотиоцианата (a) и бычьего сывороточного альбумина с метками ДТАФ (b) [5]

В отдельных случаях, когда спектр представляет собой суперпозицию небольшого числа отдельных различающихся структур хромофоров, 0—0-экстремумы могут проявляться на характеристической кривой индивидуально, как, например, на рис. 3, a для стандартного хромофора Alexa-Fluor-680-phycosyanine в соответствии с (3). Из спектра поглощения следует наличие электронного перехода с $\nu_0 \sim 14230 \text{ cm}^{-1}$. В то же время спектр флуоресценции указывает на существование в возбужденном состоянии двух форм хромофора с $\nu_0 = 14430$ и 15200 cm^{-1} . На рис. 3, b в спектре поглощения конъюгата наблюдается лишь слабо выраженный экстремум, свидетельствующий о наличии и других более длинноволновых форм конъюгатов (или примесей) с низким выходом флуоресценции, вследствие чего во флуоресценции превалирует одна форма.

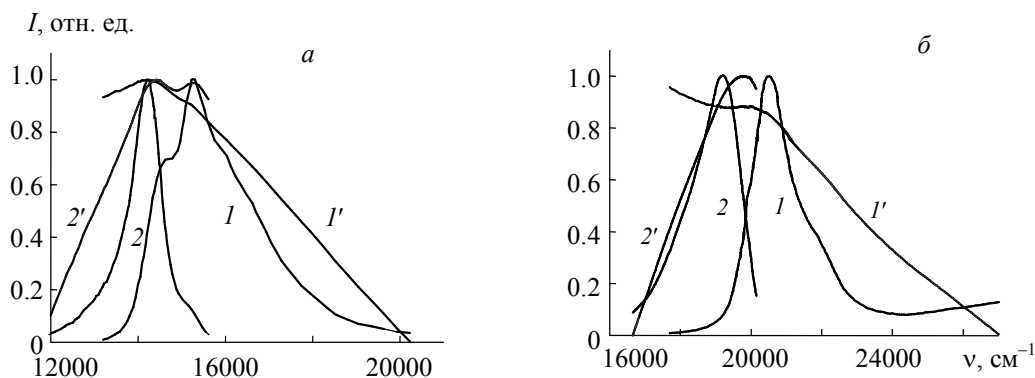


Рис. 3. Проявление неоднородности хромофоров в спектрах поглощения (I), испускания (2) и кривых $\phi(\nu)$ (I' , $2'$): a — спектры Alexa-Fluor-680-phycosyanine, b — спектры конъюгата ДТАФ и поливинилового спирта в буферном растворе 0.1 н. КОН [5]

На рис. 4 приведены спектры поглощения и флуоресценции водного раствора родамина 6Ж с добавлением графена и без него. Видно, что графен не влияет на положение частоты электронного перехода у возбужденного состояния флуоресцирующих молекул. Однако спектр поглощения изменяется радикально. Это объясняется тем, что в поглощении принимают участие адсорбированные на графене молекулы красителя, которые тушатся с высокой эффективностью [8]. Поэтому при высокой концентрации графена почти весь краситель адсорбирован, он и определяет поглощение. Флуоресцируют лишь непотушенные, неадсорбированные молекулы красителя. В работе [8] действительно наблюдалась трансформация спектра поглощения раствора родамина 6Ж по мере добавления графена. Деформация экстремума, рассчитанного из спектра поглощения, указывает на неоднородность обуславливающих его хромофоров.

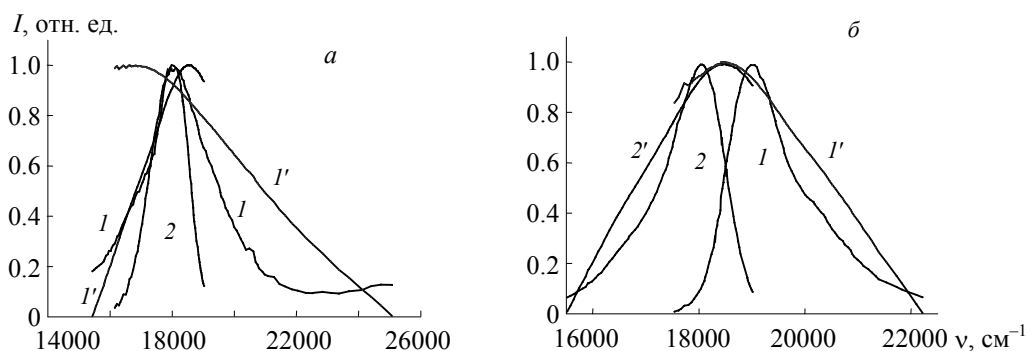


Рис. 4. Влияние добавления графена на поглощение (I), флуоресценцию (2) и кривые $\phi(\nu)$ (I' , $2'$) водного раствора родамина 6Ж: a — поглощение с добавлением 18.5 мг/л, флуоресценция с 22 мг/л графена; b — без графена [6]

На рис. 5 из данных работы [9] о влиянии оксида графена на спектры родамина 101 можно сделать несколько иные, но подобные следующим из рис. 4 выводы. Введение оксида графена также увеличивает неоднородность структур основного состояния хромофора в растворе, однако наблюдается и усиливается неоднородность хромофоров и в возбужденном состоянии. Очевидно, что тушение оксидом графена в этом случае не столь эффективно, как графеном, и часть молекул, претерпевающих воздействие оксида графена, флуоресцируют.

Здесь не приведены примеры низкотемпературных спектров и обсуждение возможности их использования для диагностики однородности хромофоров. Однако при рассмотрении, например, спектров фосфоресценции молекул в растворах, полученных при 77 К, установлено, что у достаточно компактных молекул имеется экстремум 0—0-перехода, в то время как для протяженных молекул, несмотря на большое время жизни возбужденного состояния, он не обнаружен. Обработка предлагаемым методом спектров поглощения, флуоресценции и фосфоресценции, полученных в [10], показала, что большая часть соединений, демонстрирующих при комнатных температурах монохромность, по фосфоресценции при 77 К не дают 0—0-экстремума (1), что свидетельствует скорее всего о неполной термализации возбужденного состояния, несмотря на длительное время жизни.

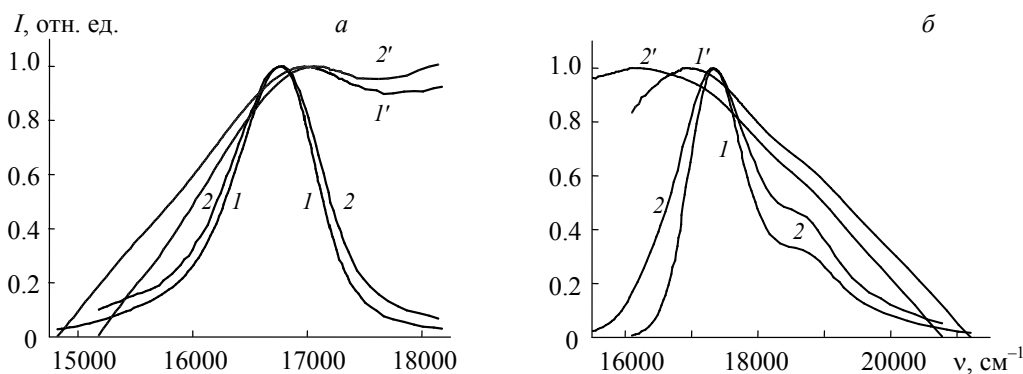


Рис. 5. Влияние на спектры флуоресценции (a), поглощения (b) и кривые $\phi(\nu)$ (I' , $2'$) водного раствора родамина 101 добавления оксида графена (ГО): a — $C_{\text{ГО}} = 0$ (I) и 15 мг/л (2); b — $C_{\text{ГО}} = 0$ (I) и 50 мг/л (2)

Анализ значительного объема обработанных предлагаемым методом спектров, существенно превышающего приведенный в данной работе, подтверждает правильность этого подхода. Например, спектры тщательно очищенных соединений чаще всего дают симметричные, гомохромоформные 0—0-экстремумы и для основного, и для возбужденного состояний, хотя частоты 0—0-переходов для них могут различаться. Неоднородность обнаруживается чаще всего в продуктах сложных реакций, например при флуоресцентном мечении белков, а также в растворах, когда возможны различные формы сайтов сольватирования растворенного хромофора.

Заключение. Предложенный метод прост в применении, доступен, позволяет использовать отдельно спектры поглощения или флуоресценции, т. е. рассматривать отдельно полиморфизм основного и возбужденного (испускающего) состояний. Он представляется особенно важным при флуоресцентном мечении, так как позволяет оценивать уровень информативности метки, падающий при полиморфизме связи образованного комплекса метка—субстрат. При низких температурах из-за возможности неполного установления равновесного распределения по подуровням возбужденного состояния предлагаемая диагностика по спектрам испускания должна использоваться с осторожностью, как и в случае загрязненного материала или некорректных измерений спектра.

Работа выполнена при поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (проекты № Ф16-103 и № Ф16К-051).

- [1] **В. А. Толкачев.** Журн. прикл. спектр., **84** (2017) 648—654 [**V. A. Tolkachev.** J. Appl. Spectr., **84** (2017) 668—673]
- [2] **В. А. Толкачев.** Докл. НАН Беларуси, **61**, № 5 (2017) 50—55
- [3] **M. J. Novak, K. Szczepaniak, A. Barski, D. Shugar.** Z. Naturforsch., **33c** (1978) 876—883
- [4] **L. B. Clark, G. G. Peschel, I. Tinoco, Jr.** J. Phys. Chem., **69**, N 10 (1965) 3615—3618
- [5] **M. V. Kvach, A. V. Ustinov, I. A. Stepanova, A. D. Malakhov, M. V. Skorobogaty, V. V. Shmanai, V. A. Korshun.** Eur. J. Org. Chem. (2008) 2107—2117
- [6] **В. Б. Гаврилов, С. В. Конев, И. И. Калоша.** Журн. прикл. спектр., **66**, № 3 (1999) 369—374 [**V. B. Gavrilov, S. V. Konev, I. I. Kalosha.** J. Appl. Spectr., **66** (1999) 394—399]
- [7] **А. А. Ахрем, М. А. Кисель, И. С. Цыбовский, А. Я. Гореленко, С. П. Плиски, Т. Ф. Райченко, В. А. Толкачев.** Весці АН БССР, сер. хім. навук, № 4 (1990) 66—70
- [8] **Xian-Fu Zhang, Fongfang Li.** J. Photochem. Photobiol. A: Chem., **246** (2012) 8—15
- [9] **E. Bozkurt, M. Acar, Y. Onganer, K. Meral.** Phys. Chem. Chem. Phys., **16** (2014) 18276—18281
- [10] **S. A. Bagnich, S. Athanasopoulos, A. Rudnick, P. Schroegel, I. Bauer, N. C. Greencham, P. Stroehriegl, A. Köhler.** J. Chem. Phys. C, **119**, N 5 (2015) 2380—2387