

УДК 535.34.083.2 : 538.56

**ЭЛЕКТРОННЫЙ ПАРАМАГНИТНЫЙ РЕЗОНАНС  
ТРИПЛЕТНОГО ВОЗБУЖДЕННОГО СОСТОЯНИЯ  
БИОЛОГИЧЕСКИ ВАЖНЫХ МОЛЕКУЛ**

**З. П. Грибова и Л. П. Каюшин**

Возбужденное триплетное состояние молекул играет важную роль в механизме многочисленных фотохимических реакций. Эти состояния обусловливают протекание двухквантовых реакций фотосенсибилизации, ионизации, фотовосстановления. В обзоре собраны и систематизированы основные результаты по применению ЭПР к изучению возбужденного триплетного состояния биологически важных молекул.

Библиография — 91 наименование.

**ОГЛАВЛЕНИЕ**

<b>I. Введение</b>	287
<b>II. ЭПР триплетного состояния биологически важных молекул</b>	293
<b>III. Триплетное состояние в фотохимии биологически важных молекул. Двухквантовые реакции</b>	313

**I. ВВЕДЕНИЕ**

Применение метода электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) для исследования триплетного возбужденного состояния молекул было начато пионерскими работами Хатчисона и Мэнгама<sup>1, 2</sup> более десяти лет назад и позволило получить широкую информацию о его свойствах и роли в фотохимии органических молекул. Методом ЭПР обнаружено расщепление низшего триплетного уровня в отсутствие внешнего магнитного поля и влияние размеров сопряженной системы, заместителей в молекуле и свойств растворителя на значения энергии нулевого расщепления. Получены сведения о направлении момента перехода, симметрии молекул и распределении спиновой плотности в низшем триплетном возбужденном состоянии. Ценную информацию дал метод ЭПР о временах жизни, вероятностях перехода в триплетное состояние, процессах тушения и переноса энергии.

Успешное применение метода ЭПР для исследования механизма фотопререкций в твердых растворах несколькими годами позже привело к открытию двухквантовых реакций фотосенсибилизации, ионизации, фотовосстановления<sup>2-8</sup>, протекающих через триплетное состояние ароматических молекул, в том числе таких биологически важных, как порфирины и хлорофилл<sup>8-11</sup>, ароматические аминокислоты<sup>9, 11-14</sup>, основания нуклеиновых кислот<sup>15</sup>, феноксазин, фенотиазин и флавины<sup>16</sup>. Приблизительно в то же время впервые наблюдали явление триплет-триплетной аннигиляции, приводящее к образованию из двух молекул в фосфоресцентном триплетном состоянии одной молекулы в высоковозбужденном синглетном, триплетном или квинкетном состояниях. Последнее привлекло внимание исследователей возможностью использовать низкие кванты энергии в реакциях, требующих значительных энергий<sup>17</sup>. Высказано предпо-

ложение о возможной роли этого явления в фотобиологических реакциях.

Известен также ряд биологических процессов, первичной стадией которых является переход в электронное возбужденное состояние специфических молекул. Это — фотодинамический эффект, радиационная инактивация белков, фотодимеризация оснований нуклеиновых кислот, зрение, биолюминесценция. Фотосинтез, обеспечивающий энергией практически все живое на Земле, осуществляется благодаря поглощению, передаче и хранению энергии солнечного света фотосинтетическим аппаратом растительных и бактериальных клеток, а на молекулярном уровне — тетрапиррольными пигментами: хлорофиллом и бактериохлорофиллом в возбужденном состоянии.

Все это в целом: широкие возможности нового метода исследований, открытие реакций, протекающих через триплетное состояние и, наконец, предполагаемая роль его в биологических процессах, стимулировали в последние годы глубокий интерес фотобиологов к исследованию биологически важных молекул в триплетном возбужденном состоянии. Из-за чрезвычайной сложности наблюдения явления на электронном уровне в реальных биологических структурах, до настоящего времени остается невыясненным на каком — синглетном или триплетном электронном уровне протекают первичные фотопреакции *in vivo*. Однако такая информация несомненно важна для понимания механизма явлений.

К настоящему времени опубликовано более сотни работ по исследованию методом ЭПР молекул в триплетном возбужденном состоянии как экспериментальных, так и теоретических. Систематика и критический обзор их необходимы для дальнейшей работы. В настоящем обзоре невозможно дать полного анализа всех работ, поэтому мы лишь кратко охарактеризуем успехи в этой области исследований и более подробно остановимся на данных, касающихся биологически важных молекул.

Свойства молекул в синглетном и триплетном возбужденных состояниях существенно различны. Эти различия касаются прежде всего их электронной структуры: распределение зарядов, спиновой плотности, симметрии π-электронного облака, а отсюда донорно-акцепторных свойств молекул, их реакционной способности, времени жизни и других характеристик, определяющих скорость фотохимического процесса. Существенное значение триплетного возбужденного состояния в начальной стадии фотопроцесса обусловлено тем, что это долгоживущее по сравнению с синглетным возбуждением состояние.

На рис. 1, A представлена типичная схема энергетических уровней молекулы, впервые в упрощенном виде предложенная Яблонским<sup>18</sup> для объяснения длительного послесвечения органических молекул в жестких матрицах. Излучательный переход  $T_1 \rightarrow S_0$  является интеркомбинационным и запрещен правилами отбора по спину. Время жизни молекулы в низшем триплетном состоянии увеличивается, поэтому, по сравнению с временем жизни синглетного возбужденного состояния ( $\sim 10^{-9}$  сек.) до  $10^{-4}$  — нескольких секунд, особенно при низких температурах, когда вероятности безызлучательного перехода  $T_1 \rightarrow S_0$ , теплового перехода  $T_1 \rightarrow S_1$  и различного рода процессов тушения уменьшаются. Поскольку переход в триплетное состояние  $T_1$  сопровождается конверсией спина возбужденного электрона, полный спин системы равен единице, мультиплетность уровня — трем. Отсюда название системы энергетических уровней — триплетная.

Механизм перехода в фосфоресцентное состояние рассматривался в работах<sup>19-21</sup>. Теренин предложил идентифицировать метастабильный уровень  $T_1$  как триплетный и развил представление о том, что триплетное

состояние, характеризующееся распаренными спинами должно играть существенную роль в фотореакциях<sup>22, 23</sup>. Возникновение индуцированного светом парамагнетизма впервые статическим магнитным методом демонстрировали Льюис и Калвин<sup>24</sup>.

Отметим здесь и другие особенности тринкетного возбужденного состояния. Во-первых, в результате кулоновского отталкивания неспарен-

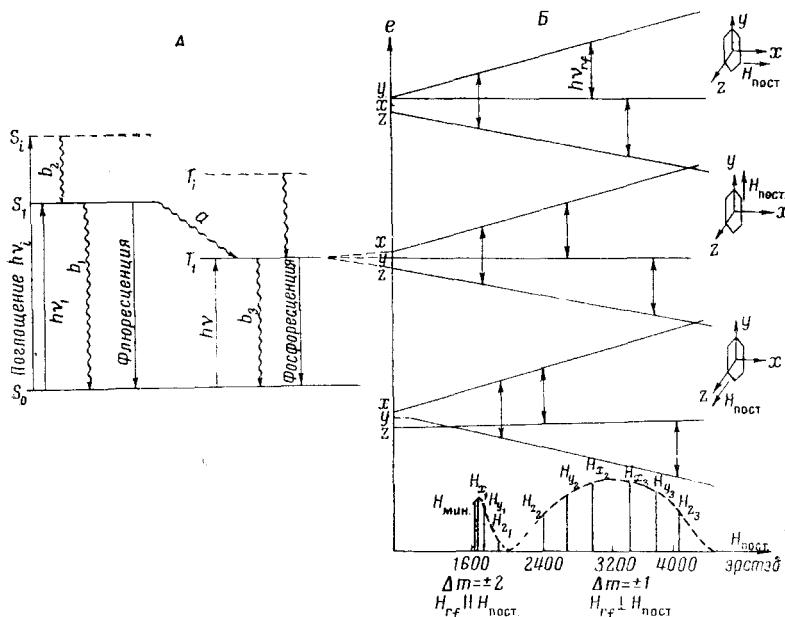


Рис. 1. Схема энергетических уровней и переходов в ароматической молекуле. *A* — оптические переходы, *B* — радиочастотные ( $h\nu_{rf}$ ) в присутствии постоянного магнитного поля,  $H_{\text{пост}}$  и радиочастотного  $H_{rf}$ .  $S_0$ ,  $S_1$ ,  $S_2$  — синглетная система уровней молекулы,  $T_1$ ,  $T_2$  — триплетная; *a* — интеркомбинационный безызлучательный переход в триплетное состояние,  $b_1$ ,  $b_2$ ,  $b_3$  — безызлучательные переходы в соответствующее низшее состояние

ных электронов, принадлежащих одному орбитальному уровню, уровень  $T_1$  всегда энергетически ниже первого синглетного возбужденного уровня и требует, следовательно, более низкой энергии активации. Во-вторых, поскольку время жизни в триплетном состоянии в  $10^6$ — $10^9$  раз больше времени жизни в синглетном состоянии, создается благоприятная возможность для участия молекулы в фотопрекращениях, скорости которых ограничиваются диффузионными процессами при низкой концентрации реагирующих веществ. Кроме того, энергия триплетного возбуждения может быть легко передана другой, невозбужденной молекуле. Сечение триплет-триплетного переноса меньше, чем синглет-синглетного, однако энергия долгоживущего триплетного состояния успевает мигрировать на большее расстояние и, таким образом, с большей вероятностью достигает реакционного центра.

Мы уже отметили, что полный спин молекулы в тройном состоянии,  $S$  равен 1, и в постоянном магнитном поле происходит расщепление уровня на три подуровня с проекциями спина на направление постоянного магнитного поля  $\Delta m = \pm 1,0$ . Для молекул, симметрия которых ниже сферической, вырождение снимается уже в отсутствие внешнего поля. Источником нулевого расщепления является дипольное спин-спиновое

взаимодействие электронов в триплетном состоянии, которое достаточно хорошо описывается двухэлектронным спиновым гамильтонианом<sup>1, 2</sup>:

$$\hat{\mathcal{H}} = g\beta \mathbf{H} \hat{S} + DS_z^2 + E(S_x^2 - S_y^2) \quad (1)$$

Первый член определяет зеемановскую энергию взаимодействия полного спина  $\mathbf{S}$  с постоянным магнитным полем  $\mathbf{H}$ , а второй — дипольное спин-спиновое взаимодействие.  $S_x, S_y, S_z$  — компоненты суммарного спина  $\mathbf{S}$  в молекулярной системе координат,  $g$  — фактор спектроскопического расщепления,  $\beta$  — магнетон Бора. Константа нулевого расщепления  $D$  определяет среднее дипольное взаимодействие между спинами вдоль молекулярной оси  $z$ , а  $E$  учитывает отклонение тензора спин-спинового взаимодействия от аксиальной симметрии<sup>25, 26</sup>. Константы  $D$  и  $E$  легко определяются из спектров ЭПР (соответствующие уравнения даны ниже).

Преобразованный относительно главных молекулярных осей гамильтониан 1 будет иметь вид<sup>26</sup>:

$$\tilde{\mathcal{H}} = g\beta \mathbf{H} \mathbf{S} - (XS_x^2 + YS_y^2 + ZS_z^2) \quad (2)$$

здесь  $X, Y, Z$  — главные значения тензора спин-спинового взаимодействия, диагонализованного в молекулярной системе координат. С константами  $D$  и  $E$  они связаны следующим образом:

$$X = \frac{1}{3}D + E, \quad Y = \frac{1}{3}D - E, \quad Z = -\frac{2}{3}D \quad (3)$$

Если постоянное магнитное поле направлено вдоль одной из молекулярных осей, например  $x$ , собственные энергии триплетных уровней будут равны<sup>28</sup>:

$$e_1 = X, \quad e_2 = e_3 = \frac{Y+Z}{2} \pm \sqrt{\frac{(Y-Z)^2}{4} - (g\beta H)^2} \quad (4)$$

Аналогичные выражения находят для случая, когда поле направлено вдоль осей  $y$  и  $z$ . Магнитные дипольные переходы разрешены между двумя соседними подуровнями триплетного уровня с изменением магнитного квантового числа  $\Delta m = \pm 1$ . Момент перехода, например  $x \rightarrow y$  перпендикулярен плоскости  $xy$  (см. рис. 1, Б). При наложении перпендикулярно постоянному переменному магнитному полю такой частоты  $v$ , чтобы выполнялось условие:

$$\hbar v = g\beta H \Delta m \quad (5)$$

возникает резонансное поглощение электромагнитной энергии, которое регистрируется методом ЭПР. Наличие нулевого расщепления приводит к тому, что резонансное поглощение для различных ориентаций постоянного магнитного поля  $H_{\text{пост.}}$  относительно трех молекулярных осей будет наблюдаться при различных значениях  $H_{\text{пост.}}$  (рис. 1, Б). Если поместить в резонатор и возбуждать монокристалл, ориентируя его последовательно так, чтобы оси  $x, y, z$  были параллельны  $H_{\text{пост.}}$ , в спектре ЭПР можно наблюдать три пары линий, соответственно  $H_{x_1}, H_{x_2}$  ( $H_{\text{пост.}} \parallel x$ ),  $H_{y_1}, H_{y_2}$  ( $H_{\text{пост.}} \parallel y$ ),  $H_{z_1}, H_{z_2}$  ( $H_{\text{пост.}} \parallel z$ ), как дано на рис. 1, Б внизу. Однако правила отбора  $\Delta m = \pm 1$  строго выполняются в том случае, когда взаимодействие спинов с внешним магнитным полем будет намного больше величины собственного взаимодействия спинов и компонента спинового углового момента электронов  $m(h/2\pi)$  в направлении поля сохраняется постоянной величиной. Такие переходы на разбавленном монокристалле нафталина в дуроле наблюдали Хатчисон и Мэнгам<sup>1, 2</sup>. Однако возможности выращивания разбавленных монокристаллов ограничены. Ван-дер-

Ваальс и де Гроот<sup>27, 28</sup> теоретически обосновали и впервые экспериментально наблюдали запрещенные переходы между наимизшим и наивысшим подуровнями триплетного уровня с изменением магнитного квантового числа,  $\Delta m = \pm 2$ . Последние регистрируются при значительно более слабых полях, когда собственное взаимодействие электронов сравнимо с

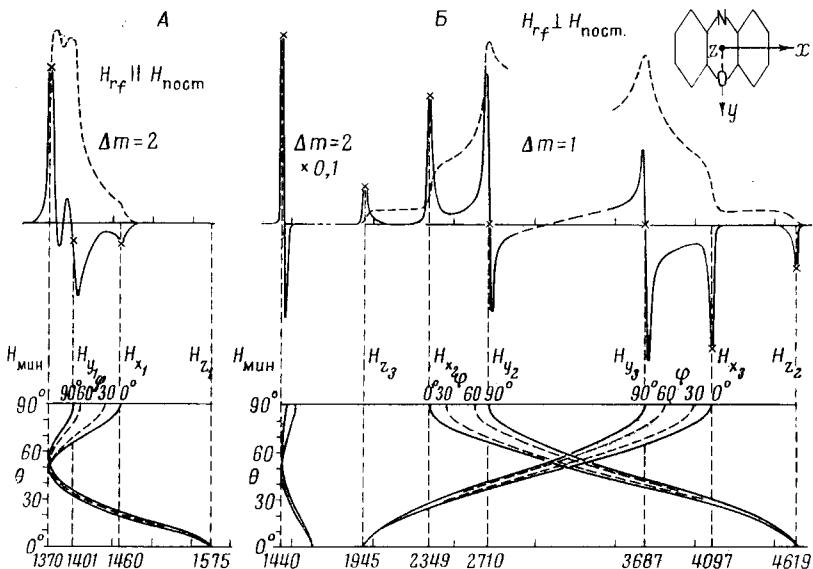


Рис. 2. Спектр ЭПР триплетного состояния феноксазина (симметрия молекулы ниже третьего порядка оси  $x \neq y \neq z$ ). Внизу: распределение резонансных полей  $F(\delta, H)$  как функция  $f(\theta, \varphi)$  для заданного  $v = \text{const}$ .

их взаимодействием с внешним магнитным полем. Компонента спинового углового момента  $m(h/2\pi)$  не будет интегралом движения, правила отбора нарушаются. Переходы  $\Delta m = \pm 2$  поляризованы параллельно постоянному магнитному полю и наблюдаются в параллельных полях (рис. 1, Б). Из уравнения (4), в частности, следует, что переходы между подуровнями осуществляются при значениях  $H_{\text{пост.}}$ , определяемых из уравнения:

$$(e_2 - e_3)^2 = (hv)^2 = \frac{1}{4} (Y - Z)^2 + (g\beta H)^2 \quad (6)$$

В качестве примера используем данные Хатчисона<sup>2</sup> для нафталина:

$$\frac{X - Z}{hc} = 0,0863 \text{ см}^{-1}, \frac{Y - Z}{hc} = 0,1143 \text{ см}^{-1}, \frac{hv}{hc} = 0,3221 \text{ см}^{-1} = 2,0033.$$

Подставив значения в (6) находим, что резонансное поглощение для нафталина при  $\Delta m = \pm 2$  будет наблюдаться при  $H_{x_1} = 1602$ ,  $H_{y_1} = 1650$  э,  $H_{z_1} = 1707$  э. Таким образом, если переходы  $\Delta m = \pm 1$  регистрируются в области значений  $H_{\text{пост.}}$  от 2354 до 4490 э и общая ширина линии равна 2196 э, то для переходов  $\Delta m = \pm 2$  последняя величина равна 105 э, т. е. анизотропия переходов в 20 раз меньше<sup>27, 28</sup>. Поэтому, несмотря на то что интенсивность этих переходов на два порядка ниже интенсивности первых, сигнал ЭПР можно наблюдать в хаотически ориентированных образцах — твердых растворах<sup>28</sup>.

Для случая произвольной ориентации  $H_{\text{пост.}}$  относительно молекулярных осей Котти и Лефевр<sup>29, 30</sup> при помощи оператора (2) нашли функ-

цию распределения резонансных полей в зависимости от пространственной ориентации осей  $x$ ,  $y$ ,  $z$  относительно постоянного магнитного поля (углы  $\varphi$  и  $\theta$ , рис. 2,  $B$ ). При фиксированном значении радиочастотного кванта ( $h\nu$ ) такая функция позволяет определить значения резонансных полей при заданных параметрах  $X$ ,  $Y$ ,  $Z$ . Из рис. 1 и 2,  $B$  видно, что при  $h\nu > D$  каждой ориентации молекулы соответствуют три резонансных значения поля. Из них два соответствуют переходам  $\Delta m = \pm 1$  ( $H_{\text{пост}} \perp H_{rf}$ ), третий —  $\Delta m = \pm 2$  ( $H_{\text{пост}} \parallel H_{rf}$ ). Наконец, имеет место резонансное поглощение при минимальном значении  $H_{\text{пост}}$  для заданной частоты,  $H_{\text{мин}}$  (рис. 2,  $B$ ). Интенсивность ЭПР поглощения в этом случае не зависит от относительной ориентации  $H_{\text{пост}}$  и  $H_{rf}$ :

$$H_{\text{мин}} = (2g\beta)^{-1} [(h\nu)^2 + 4(XY + XZ + YZ)]^{1/2} = \\ = (2g\beta)^{-1} \left\{ (h\nu)^2 - 4 \left[ \frac{D^2}{3} + E^2 \right] \right\}^{1/2} \quad (7)$$

Ниже приводятся выражения для вычисления значений резонансных полей или, если значения их известны (определяются из спектров ЭПР), констант и энергий нулевого расщепления:

$$H_{x_1} = (2g\beta)^{-1} [(h\nu)^2 - (D - E)^2] = (2g\beta)^{-1} [(h\nu)^2 - (Y - Z)^2]^{1/2} = \\ H_{x_2} = (2g\beta)^{-1} [(2h\nu - D - 3E)^2 - (D - E)]^{1/2} = \\ = (2g\beta)^{-1} [(2h\nu - 3|X|)^2 - (Y - Z)^2]^{1/2} \\ H_{x_3} = (2g\beta)^{-1} [(2h\nu + D + 3E)^2 - (D - E)^2]^{1/2} = \\ = (2g\beta)^{-1} [(2h\nu + 3|X|)^2 - (Y - Z)^2]^{1/2} \quad (8)$$

$H_{x_1}$  соответствует переходу  $\Delta m = \pm 2$ ,  $H_{x_2}$ ,  $H_{x_3}$  — переходу  $\Delta m = \pm 1$ . Выражения для резонансных полей  $H_{y_1}$ ,  $H_{y_2}$ ,  $H_{y_3}$ ,  $H_{z_1}$ ,  $H_{z_2}$ ,  $H_{z_3}$  аналогичны (8) и их находят путем циклической перестановки  $X$ ,  $Y$ ,  $Z$ .

В дальнейшем оказалось, что переходы  $\Delta m = \pm 1$  можно наблюдать не только на монокристаллах, но и в хаотически ориентированных образцах. В твердом растворе молекулы фиксированы друг относительно друга и имеет место магнитоселекция. Вклад в интенсивность канонических пиков дают те молекулы, соответствующие осям которых ориентированы вдоль постоянного магнитного поля в пределах  $\pm 5^\circ$ <sup>27</sup>. Экспериментально это впервые наблюдали Ягер и др.<sup>31</sup> для нафталина, коронена, трифенилена. Аналогичные спектры регистрировали для биологически важных молекул: Mg этиопорфирина<sup>32</sup> и позже для других порфиринов<sup>33, 34</sup>, хлорофилла<sup>34</sup>, оротовой и полиадениловой кислот, аденоzin и гуанозинмонофосфатов<sup>35-37</sup>, ароматических аминокислот и некоторых белков<sup>38</sup>.

Для некоторых ароматических молекул наблюдалось ЭПР поглощение в поле, соответствующем  $g$ -фактору 2,0023<sup>33, 34, 39</sup>. Это так называемый двухквантовый переход  $H_{\text{д.к.}}$ , вызываемый одновременным поглощением двух радиочастотных квантов. Для наблюдения двухквантового перехода должно выполняться соотношение:

$$(g\beta H_{\text{д.к.}})^2 = (h\nu)^2 - \frac{1}{3} D^2 \quad (D^* = \sqrt{D^2 + 3E^2}) \quad (9)$$

В линию поглощения  $H_{\text{д.к.}}$  доминирующий вклад дают те ориентации молекул, для которых разности энергий между двумя парами соседних подуровней близки или совпадают.

Таким образом, для молекул симметрии ниже третьего порядка спектр ЭПР в перпендикулярных полях состоит из 8 пиков. Такая форма

линии соответствует статическому случаю, когда за время радиочастотного перехода ядра атомов, входящих в молекулу, не претерпевают существенных смещений, будь то конформационные, вращательные или другие. Однако, как показали де Гроот и Ван-дер-Ваальс<sup>40</sup>, форма линии спектров ЭПР триплетного состояния некоторых ароматических соединений, например бензола, триптицена, ароматических ионов может существенно изменяться с температурой в связи с различными динамическими эффектами. Подобным образом изменяется форма линии спектров ЭПР для молекул, триплетное состояние которых орбитально вырождено<sup>40</sup>. В этом случае эффект Яна — Теллера приводит к нестабильности полносимметричных, нелинейных молекул и снятию орбитального вырождения за счет ядерных смещений. Высокая симметрия молекул нарушается, что приводит к изменению формы линии спектра ЭПР и значений констант нулевого расщепления. Теоретическая обработка динамических эффектов была дана Котти<sup>30</sup>.

Рассмотрев основные, общие для всех ароматических молекул, особенности формы линии спектров ЭПР, перейдем к рассмотрению характеристик ЭПР и свойств триплетного возбужденного состояния биологически важных молекул.

## II. ЭПР ТРИПЛЕТНОГО СОСТОЯНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ ВАЖНЫХ МОЛЕКУЛ

### 1. Порфирины

Первые сведения о наблюдении триплетного возбужденного состояния порфиринов методом ЭПР были опубликованы в 1963 г.<sup>32</sup>. Исследовали откаченные замороженные при 77° К растворы этио-, мезо-, протопорфиринов и их магниевых комплексов, Zn-этиопорфирина, гематопорфирина и его ртутного комплекса, тетрафенилпорфина (ТПФ) и его цинкового комплекса<sup>42-46</sup>. В полях  $\sim 1600$  э (рабочая частота клистрона  $\nu = 9260$  Мгц) наблюдалось ЭПР поглощение, соответствующее переходу  $\Delta m = \pm 2$ . Сигнал ЭПР — одиночная, слегка асимметричная линия, с полушириной между точками максимального наклона  $\Delta H = 10-12$  э. Интенсивность сигнала ЭПР не изменяется со временем при освещении видимым светом ( $\lambda \geq 400$  нм).

Среди исследовавшихся порфиринов наибольшей концентрацией парамагнитных центров обладал Mg-этиопорфирин ( $\sim 10^{16}$  частиц в образце объемом 0,03 см<sup>3</sup> при концентрации порфирина  $2 \cdot 10^{-3}$  М). Для других порфиринов число парамагнитных центров в образце с концентрацией  $10^{-3}$  М составляло  $5 \cdot 10^{14}-7 \cdot 10^{15}$  спинов, что согласуется с меньшим временем жизни  $\tau_{\text{фосф.}} = 5 \cdot 10^{-2}-10^{-2}$  сек. по сравнению с  $\tau_{\text{фосф.}}$  Mg-этиопорфирина ( $2 \cdot 10^{-1}$  сек.)<sup>41</sup>. Для медных комплексов этио- и гематопорфиринов не удалось обнаружить ЭПР поглощение триплетного состояния, хотя известно, что интенсивность фосфоресценции медных комплексов порфиринов значительно превышает интенсивность фосфоресценции магниевых комплексов и оснований. Поскольку  $\tau_{\text{фосф.}}$  медных комплексов  $10^{-4}-5 \cdot 10^{-5}$  сек., стационарная концентрация триплетно-возбужденных молекул ожидается на 2—3 порядка ниже относительно оснований и магниевых комплексов. В пределах исследовавшихся концентраций  $5 \cdot 10^{-5}-10^{-3}$  М амплитуда сигнала ЭПР прямо пропорциональна концентрации пигмента<sup>42</sup>. Концентрационное тушение для различных порфиринов начинается при достижении концентрации  $10^{-3}$  М. Амплитуда сигнала ЭПР при этом падает<sup>42, 46</sup>.

Для реакций, протекающих через триплетное возбужденное состояние существенно знать такие характеристики молекул в триплетном состоянии, как  $\tau$  и стационарную концентрацию  $n_{\text{ст.}}$ . Действительно, в ряду

порфиринов: магниевые комплексы, основания и цинковые комплексы — наиболее активны первые. Наименее активны медные комплексы<sup>32, 42</sup>. Это, в частности, относится к двухквантовым реакциям, поскольку при больших  $\tau$  создается значительная заселенность триплетного уровня и отсюда большая вероятность поглотить второй квант энергии.

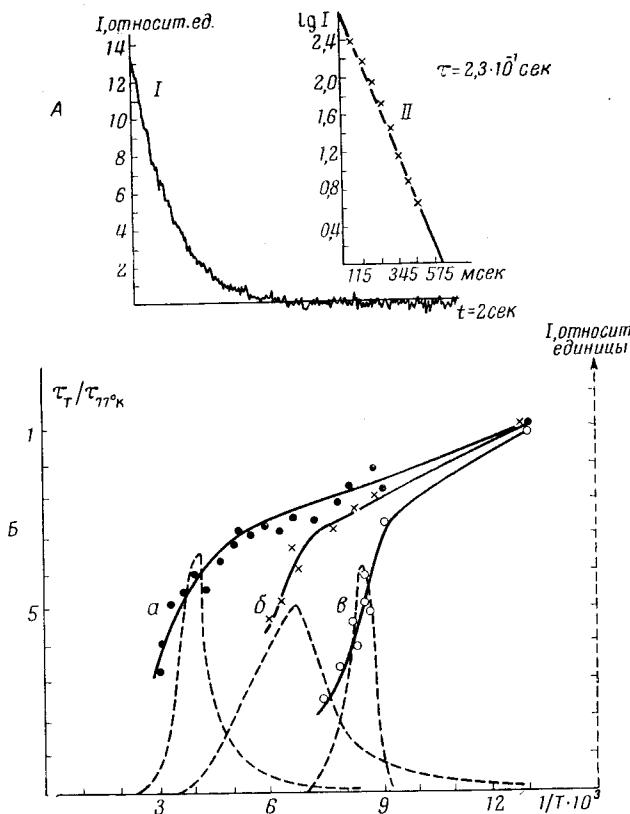


Рис. 3. А — Кинетика затухания сигнала ЭПР триплетного состояния ( $\Delta m = \pm 2$ ) Mg-етиопорфирина в этаноле при 77° К (I), то же в логарифмическом масштабе (II). Б — кривые зависимости  $\tau_r / \tau_{770} \text{ К} = f(1/T)$  для Mg-етиопорфирина, в ПМТ (a), сильновязком метилметакрилате (начальная стадия полимеризации) (b) и этаноле (c). Нижние кривые — зависимость выхода радикалов, как функция температуры

Авторами обзора была разработана методика измерения  $\tau$  при помощи метода ЭПР с использованием накопителя и механического затвора<sup>47</sup>. Исследовалось изменение  $\tau$  и  $n_{\text{ст}}$  в зависимости от концентрации пигмента, кислорода, свойств матрицы, температуры<sup>47-49</sup>. Значение  $\tau$  определялось по времени уменьшения амплитуды сигнала ЭПР  $\Delta m = \pm 2$  в  $e$  раз после прекращения освещения. На рис. 3, А показана типичная кривая затухания сигнала ЭПР Mg-етиопорфирина при 77° К. Для всех исследованных порфиринов кривые затухания носят экспоненциальный характер<sup>47</sup>. Значения  $\tau$  триплетного состояния даны в табл. 1. Отметим, что изменение концентрации пигмента в интервале  $5 \cdot 10^{-5}$ — $10^{-3} M$ , природа растворителя — этанол, циклогексанол, полиметилметакрилат (ПМТ), наличие кислорода в образце при 77° К не влияют на  $\tau$  триплетного состояния.

ТАБЛИЦА 1

Константы нулевого расщепления и  $\tau$  триплетного состояния порфирина при 77 и 320° К

Соединения	$D/hc, \text{ см}^{-1}$ $\Delta m = \pm 1$ 77° К	$D^*/hc, \text{ см}^{-1}$ $\Delta m = \pm 2$ 77° К	$D^*/hc, \text{ см}^{-1}$ $\Delta m = \pm 2$ 320° К	$\tau \cdot 10^{-2},$ сек. 77° К	Растворитель
Металлокомплексы					
Mg-Этиопорфирина	0,036	0,036	0,033	23,5	Этанол, ПМТ
Zn-Этиопорфирина	0,036	0,038	—	—	Этанол, этанол + пиридин
Mg-Протопорфирина	—	0,036	—	—	Изобутиловый спирт
Zn-Протопорфирина	—	0,036	—	—	Этанол + изобутиловый спирт
Mg-Мезопорфирина	0,036	—	—	—	Этанол + пиридин
Zn-Тетрафенилпорфирина	—	0,031	0,025	6,2	Этанол, ПМТ
Mg-Фталоцианина	—	0,027	—	—	Этанол + пиридин
Дикатионы					
2H <sup>+</sup> -Этиопорфирина	0,033*	0,036	—	—	Этанол + HCl
2H <sup>+</sup> -Мезопорфирина	0,033	0,036	—	3,0	Этанол + HCl
2H <sup>+</sup> -Гематопорфирина	0,033	0,033	—	—	Этанол + HCl
Основания					
Этиопорфирина	0,048	0,047	0,042	3,2	Этанол + пиридин, ПМТ
Мезопорфирина	0,048	0,047	0,041	2,5	Этанол + пиридин, ПМТ
Протопорфирина	—	0,046	—	—	Этанол + пиридин
Гематопорфирина	—	0,047	—	—	Этанол

\* Для свежеприготовленных образцов  $D^*/hc = 0,033 \text{ см}^{-1}$ , для образцов, продолжительное хранение в растворах с HCl  $D^*/hc = 0,036 \text{ см}^{-1}$ .

ТАБЛИЦА 2

Изменение  $\tau$  Mg-этиопорфирина в интервале температур 77—335° К

Этанол						
Температура °К	77	108	120	127	131	135
$\tau \cdot 10 \text{ сек.}$	3,35 $\pm 0,03$	1,75 $\pm 0,06$	0,95 $\pm 0,1$	0,8 $\pm 0,1$	0,6 $\pm 0,1$	0,55 $\pm 0,1$
Полиметилметакрилат						
Температура °К	77	120	180	250	320	333
$\tau \cdot 10 \text{ сек.}$	2,35 $\pm 0,03$	1,85 $\pm 0,06$	1,55 $\pm 0,06$	1,4 $\pm 0,06$	1,0 $\pm 0,1$	0,75 $\pm 0,1$

С повышением температуры время жизни уменьшается. В табл. 2 приведены значения  $\tau$  для Mg-этиопорфирина, растворенного в этаноле и ПМГ при различных температурах.

Аналогично изменению  $\tau$  изменяется стационарная концентрация триплетных молекул. Симметричность изменения этих величин с изменением температуры свидетельствует о том, что факторы, вызывающие температурное тушение, одинаковы. Некоторое отклонение от симметрии наблюдается в этанольном растворе. Во всех случаях кривые зависимости

$\tau_{T^{\circ} \text{ К}} / \tau_{77^{\circ} \text{ К}} = f\left(\frac{1}{T}\right)$  сложные и содержат два участка. Характер изменения медленного участка близок экспоненциальному<sup>47, 48</sup>, что соответствует процессу чисто температурного тушения<sup>51</sup> (рис. 3, Б). Помимо этого эффективность тушения зависит от вязкости матрицы и оказывает-

ся наибольшей в этанольной и наименьшей в ПМТ. Присутствие кислорода также резко увеличивает эффективность тушения в этаноле и циклогексаноле, но не влияет на тушение в полимерной матрице в условиях отсутствия диффузии кислорода. Следует обратить внимание на резкий перегиб кривых изменения  $\tau$  (и  $n_{ct}$  также) (рис. 3, *B*). Температура, при которой происходит перегиб, связана с началом образования свободных радикалов порфирина. Как было показано в работах<sup>48-50</sup>, процесс образования свободных радикалов двухквантовый. Полимерная матрица наряду с радикалами пигментов стабилизирует радикалы метилметакрилата. Следует отметить, что для фотохимически менее активного Zn-ТФП температурное тушение триплетных молекул за счет образования свободных радикалов менее эффективно, чем для Mg-этиопорфирина. Таким образом, температурное тушение  $\tau$  и  $n_{ct}$  аналогично температурному тушению фосфоресценции ароматических соединений<sup>51</sup> и определяется помимо чисто температурного эффекта, связанного с перераспределением колебательной энергии молекулы, структурными свойствами матрицы, кислородным эффектом и тушением за счет фотохимических реакций.

*Спектры ЭПР переходов  $\Delta m = \pm 1$ .* Спектры ЭПР в высоких магнитных полях 2900—3800 Гц, обусловленные переходами  $\Delta m = \pm 1$ , впервые наблюдались для Mg-этиопорфирина<sup>8, 43</sup> (как уже отмечалось, для него наблюдается наибольший сигнал ЭПР в низких полях). Позже те же авторы<sup>33</sup>, а также Лхост<sup>52</sup> (для гематопорфирина) регистрировали переходы  $\Delta m = \pm 1$  для оснований, дикатионов и других металлокомплексов порфиринов, растворенных в этаноле, пиридине, циклогексаноле и их смесях, а также в ПМТ. Спектры ЭПР при комнатной температуре снимали исключительно в ПМТ. Катионные формы порфиринов исследовались в кислых этанольных растворах. Для регистрации спектров молекул с низким значением  $n_{ct}$ , в частности при комнатной температуре, использовали методику синхронного накопления<sup>47, 48</sup>.

На рис. 4 представлены спектры ЭПР триплетного возбужденного состояния порфиринов в высоких полях. Для металлокомплексов порфиринов симметрии  $D_{4h}$  — Mg-этио-, Zn-этиопорфиринов и Zn-тетрафенилпорфирина (ТФП) — спектр ЭПР имеет ожидаемую форму линии, т. е. четыре канонических пика:  $H_{x, y}$ ,  $H_{x, z}$  для направления молекулярных осей  $x, y$  вдоль постоянного магнитного поля и  $H_z$ ,  $H_z$  для  $z \parallel H_{\text{пост}}$ . Соотношение интенсивностей соответствует ожидаемому  $I_{H_{x, y}} > I_{H_z}$ . Действительно, триплетный уровень в отсутствие внешнего магнитного поля расщепляется на два подуровня с расстоянием между ними, равным  $D$ , поскольку симметрия молекул  $D_{4h}$ , один из подуровней остается дважды вырожденным (молекулярные оси  $x, y$  в плоскости молекулы физически эквивалентны). Отметим, что при комнатной температуре в ПМТ линии  $H_{x, y}$  сильно сужаются (рис. 4, *b*, *2*). Два тетрапиррольных пигмента — Zn-этиопорфирин и хлорофилл (подробнее будет обсуждаться ниже) обнаруживают двухквантовые переходы в области  $m = \pm 1$  (рис. 4, *b*).

Для оснований порфиринов симметрии  $D_{2h}$  (согласно спектральным данным<sup>53</sup>) следовало ожидать появления шестилинейчатого спектра с каноническими пиками  $H_x$ ,  $H_y$ ,  $H_z$ . Однако экспериментально наблюдаемый спектр ЭПР состоит из четырех линий, что соответствует цилиндрической симметрии молекулы в триплетном состоянии. В свете последних теоретических представлений и данных рентгеноструктурного анализа<sup>54</sup>, основания порфиринов можно представить наложением структур *A*, *B*, *B* (рис. 4, *e*) со статистическими весами 19, 32, 49% соответственно. Но тогда основаниям порфиринов на 80% соответствуют структуры *B* и *B* симметрии  $D_{4h}$ . Это хорошо согласуется с данными ЭПР.

Спектры ЭПР переходов  $\Delta m = \pm 1$ ,  $\Delta m = \pm 2$  регистрировались также при более высоких температурах, вплоть до 350° К<sup>38, 45, 55</sup>. Подчеркнем, что с повышением температуры спектр в целом сдвигается в сторону более высоких полей (уменьшается значение константы  $D^*/hc$ ), число пиков не изменяется, однако сами линии сильно сужаются и изменяется соотношение их интенсивностей. (рис. 4, б, 2).

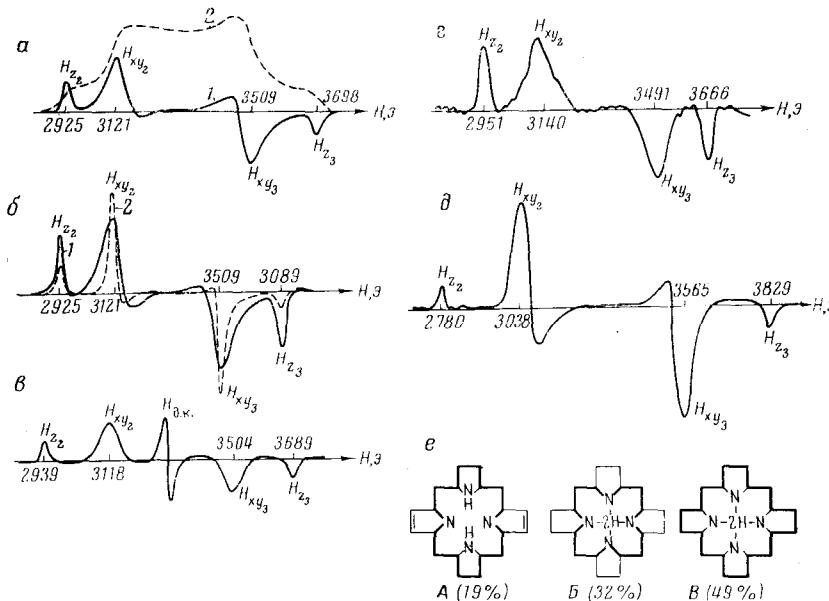


Рис. 4. Спектры ЭПР ( $\Delta m = \pm 1$ ) триплетного возбужденного состояния этиопорфирина. *а* — Mg-этиопорфирин в этаноле, 77° К (1 — спектр ЭПР в форме первой производной, 2 — то же в интегральной форме); *б* — Mg-этиопорфирин в ПМТ (1 — при 77° К, 2 — 330° К); *в* — Zn-этиопорфирин в этаноле, 77° К; *г* — 2H<sup>+</sup>-этиопорфирин в этаноле с HCl, 77° К; *д* — этиопорфирин в смеси пиридин — этанол, 77° К; *е* —  $\pi$ -электронная структура порфирина

Из спектров ЭПР подсчитаны константы нулевого расщепления, суммированные в табл. 1. Средние значения  $D^*/hc$ , определенные из спектра  $\Delta m = \pm 1$ , хорошо согласуются со значениями  $D^*/hc$ , подсчитанными из спектров  $\Delta m = \pm 2$ . Анализируя данные табл. 1, отметим следующее: 1) боковые заместители порфиринного кольца типа  $\text{CH}_3$ ,  $\text{CHO}$ ,  $\text{C}_2\text{H}_5$ ,  $\text{CH}_2\text{COOH}$  не влияют в пределах ошибки на величину константы, т. е. не нарушают существенно размеров и симметрии  $\pi$ -электронного облака молекулы, 2) все металлокомплексы с алифатическими заместителями также имеют одинаковые значения констант нулевого расщепления. Напротив, фенильные заместители в Zn-ТФП и Mg-фталоцианине, увеличивая размеры  $\pi$ -системы, уменьшают константу  $D/hc$ , 3) значения  $D/hc$  металлокомплексов несколько выше значений  $D/hc$  дикатионов; последнее связано, вероятно, с некоторым стягиванием  $\pi$ -электронного облака атомом металла к центру молекулы, 4) при переходе к основаниям порфирина значения констант существенно увеличиваются. Этот аномальный эффект может быть связан либо с орбитальным расщеплением низшего триплетного уровня, либо с тем, что в триплетно-возбужденной молекуле порфирина электроны большую часть времени проводят на 18-членном, малом кольце молекулы (рис. 4, *е*). Последнее приводит к сильному уменьше-

нию  $D/hc$ , поскольку в динамическом равновесии имеет место преобладание данной структуры над остальными.

Значения  $D^*/hc$  практически не чувствительны к природе растворителя (этанол, циклогексанол, ПМТ, изопентан, пиридин). Однако пиридин, известный своими комплексообразующими свойствами, заметно уширяет линию ЭПР. Введение Mg в центр молекулы порфирина приводит к сужению линии ЭПР по сравнению со спектрами оснований и дикатионов. При повышении температуры от 77 до 320° К значения  $D^*/hc$  уменьшаются на 7—19% для различных порфиринов (табл. 3), что, по-видимому, связано с увеличением размеров π-электронного облака за счет заселения высоколежащих колебательных подуровней триплетного состояния или с динамическими эффектами, приводящими к преобладанию более симметричных структур порфиринов<sup>40</sup>.

ТАБЛИЦА 3

Характеристики спектров ЭПР триплетного состояния порфиринов при 77 и 320° К,  $\nu=9260$  Мгц

Порфирин	$H_{\min.}, \text{ э}$	$H_{\min.}, \text{ э}$	$\Delta H, 77^\circ \text{ К}$	$\Delta H, 320^\circ \text{ К}$	$D/hc, \text{ см}^{-1} 77^\circ \text{ К}$	$D/hc, \text{ см}^{-1} 320^\circ \text{ К}$	Симметрия
Этио-	1626	1631	11,5	11,0	0,047	0,042	$D_{2h}$
Mg-этио-	1637	1639	9,5	10,5	0,036	0,033	$D_{4h}$
Мезо-	1627	1632	11,5	10,0	0,046	0,041	$D_{2h}$
Прото-	1626	1629	11,0	11,0	0,047	0,044	$D_{2h}$
Zn-ТФП	1640	1644	11,0	12,5	0,031	0,025	$D_{2h}$

Как уже отмечалось во вводной части обзора, основной вклад в канонические пики спектра ЭПР переходов  $\Delta m = \pm 1$  в системе хаотически ориентированных молекул дают те молекулы, главные оси тензора спин-спинового взаимодействия которых ориентированы вдоль направления внешнего магнитного поля  $H_{\text{пост.}}$  или близко к нему ( $\pm 5^\circ$ )<sup>27, 28</sup>; другие ориентации создают почти постоянный фон в поглощении. Таким образом, имеет место отбор молекул по каноническим ориентациям — магнитоселекция. При возбуждении такой системы поляризованным светом (магнитофотоселекция) в спектре будут появляться только те канонические пики, для которых направления момента перехода  $S_0 \rightarrow S_1$  электрического вектора падающей световой волны  $\mathbf{E}$  и  $\mathbf{H}_{\text{пост.}}$  совпадают<sup>56, 57</sup>. В работе<sup>58</sup> авторы обзора исследовали изменение формы линий спектров ЭПР (переходы  $\Delta m = \pm 1$ ) в зависимости от поляризации возбуждающего света относительно направления внешнего магнитного поля. На рис. 5, А даны спектры ЭПР триплетного состояния Mg-этио- и Zn-этио-порфиринов, возбуждавшихся поляризованным светом. Справа на том же рисунке представлены зависимости амплитуд канонических пиков  $H_z$  и  $H_{xy}$  от угла между направлением вектора  $\mathbf{E}$  поляризованного света и направлением  $\mathbf{H}_{\text{пост.}}$ . Как видно, экстремумы различных канонических пиков наблюдаются для параллельной и перпендикулярной ориентаций. Для параллельной ориентации ( $\mathbf{E} \parallel \mathbf{H}_{\text{пост.}}$ ) пик  $H_{xy}$  имеет максимальную величину, а пик  $H_z$  — минимальную; при перпендикулярной ориентации картина обратная. Для промежуточных ориентаций  $\mathbf{E}$  и  $\mathbf{H}_{\text{пост.}}$  амплитуда пика  $H_z$  изменяется как  $\sin^2 \alpha$ , а амплитуда пика  $H_{xy}$  как  $(1 + \cos^2 \alpha)$ . Амплитуда пика  $H_{d. k.}$  не зависит от поляризации.

Такое поведение канонических пиков хорошо объясняется, если принять, что за триплетное возбужденное состояние ответствен осциллятор.

лежащий в плоскости молекулы. Этот вывод находится также в согласии с оптическими данными<sup>53, 59</sup>. Форма линии дикатионов порфирина при возбуждении поляризованным светом изменяется аналогичным образом (см. табл. 4). В табл. 4 указаны отношения амплитуд пиков 1 ( $H_i$ ) при

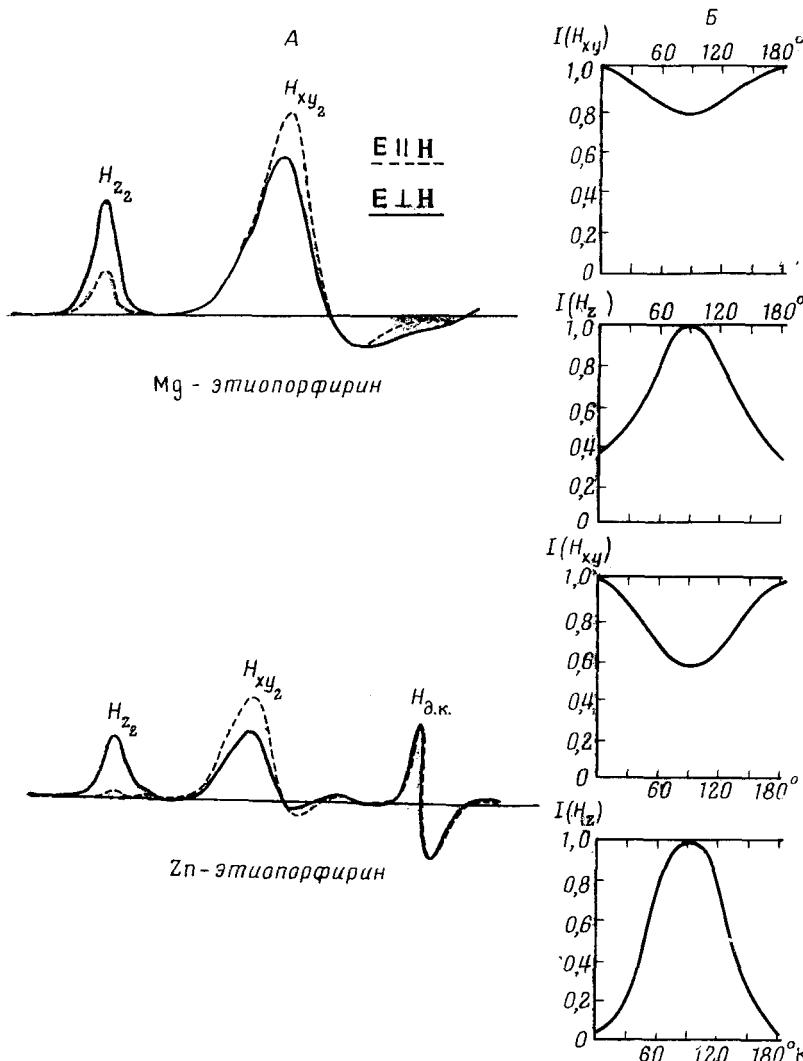


Рис. 5. А — спектры ЭПР Mg- и Zn-этиопорфиринов при различной поляризации возбуждающего света. Б — изменение высоты канонических пиков, как функция угла между  $\mathbf{H}_{\text{пост.}}$  и  $\mathbf{E}$

параллельной ориентации  $\mathbf{E}$  и  $\mathbf{H}_{\text{пост.}}$  к амплитуде при перпендикулярной ориентации. Теоретически эти отношения должны быть равны

$$\frac{I(H_z)_{\parallel}}{I(H_z)_{\perp}} = 0; \quad \frac{I(H_{xy})_{\parallel}}{I(H_{xy})_{\perp}} = 2^{57}$$

Однако, как видно из табл. 4, для порфиринов, как впрочем и для других исследованных соединений<sup>56</sup>, они точно не выполняются. Такое от-

ТАБЛИЦА 4

Влияние поляризованного света на интенсивность канонических пиков при переходах  $\Delta m = \pm 1$

Порфирины	$\frac{I(H_z) \parallel}{I(H_z) \perp}$	$\frac{I(H_{xy}) \parallel}{I(H_{xy}) \perp}$
Mg-этио-	$0,23 \pm 0,05$	$1,44 \pm 0,1$
Zn-этио-	$0,15 \pm 0,05$	$1,7 \pm 0,1$
2H <sup>+</sup> этио-	$0,42 \pm 0,05$	$1,2 \pm 0,1$
2H <sup>+</sup> мезо-	$0,7 \pm 0,1$	$1,5 \pm 0,2$

клонение от теоретических значений связано с деполяризационными эффектами различного характера, которые подробно обсуждаются в работе<sup>57</sup>.

## 2. Фотосинтезирующие пигменты

Впервые сигнал ЭПР триплетного состояния хлорофилла в наблюдал в замороженном этанольном растворе<sup>60</sup>. Тем же авторам<sup>61</sup> удалось наблюдать ЭПР поглощение триплетного возбужденного состояния при использовании накопителя в спиртовых и пиридиновых растворах хлорофилла *a*, хлорофилла *a+b*, феофитина *a+b* при концентрациях пигментов  $\sim 10^{-3} M$ . Переходы наблюдались в области 1636—1640 э ( $\nu = 9260$  Мгц) между наименшим и наивысшим подуровнями триплета ( $\Delta m = \pm 2$ ). Амплитуда сигнала ЭПР триплетного состояния хлорофилла *a* пропорциональна концентрации, но, начиная с концентрации пигмента  $10^{-3} M$  амплитуда сигнала ЭПР падает из-за концентрационного тушения<sup>46, 60</sup>. При исследовании пленок хлорофилла *a+b*, в которых пигмент находится в высокоагрегированном состоянии, ЭПР поглощения нет, что также связано с концентрационным тушением<sup>61</sup>. Интенсивность сигнала ЭПР триплетного состояния хлорофилла *b* в два с половиной раза больше интенсивности сигнала ЭПР хлорофилла *a*. Последнее следовало ожидать, поскольку  $\tau_{\text{фосф.}} \text{ хлорофилла } b$  почти в три раза больше  $\tau_{\text{фосф.}} \text{ хлорофилла } a$ <sup>59</sup>.

ТАБЛИЦА 5

Характеристики спектров ЭПР триплетного состояния хлорофиллов *a* и *b*,  $\nu = 9260$  Мгц

Пигмент	$H_{\text{мин.}}, \text{ э}$	$\Delta H, \text{ э}$	$D^*/hc, \text{ см}^{-1}$	Растворитель
Хлорофилл <i>a</i>	1640	13	0,032	Этанол
Хлорофилл <i>b</i>	1636	13	0,037	Этанол
	1638	13	0,035	Пиридин

Спектры ЭПР переходов  $\Delta m = \pm 2$  представляют синглетные, слегка асимметричные линии (рис. 6, *A*). При температуре жидкого азота кислород не влияет на интенсивность сигнала. В табл. 5 даны параметры спектров ЭПР триплетного состояния исследованных пигментов.

Лхост<sup>34</sup> с помощью накопителя наблюдал спектр ЭПР триплетного состояния хлорофилла *a* в высоких полях (переходы  $\Delta m = \pm 1$ ). Сигнал ЭПР состоит из семи пиков (рис. 6, *Г*);  $H_{x_1}$ ,  $H_{x_3}$ ,  $H_{y_1}$ ,  $H_{y_3}$ ,  $H_{z_1}$ ,  $H_{z_3}$  и пика, соответствующего двухквантовому переходу  $H_{\text{д. к.}}$ . Такой спектр соответ-

ствует симметрии молекулы  $C_{2v}$ . Из спектров были оценены константы нулевого расщепления:  $D/hc = 0,0306 - 0,0010 \text{ см}^{-1}$ ,  $E/hc = 0,0034 \pm \pm 0,0006 \text{ см}^{-1}$ . Дополнительные пики — IV, V — не отнесены авторами (рис. 6, Г) и, возможно, наличие их обязано примеси хлорофилла *a* или феофитина.

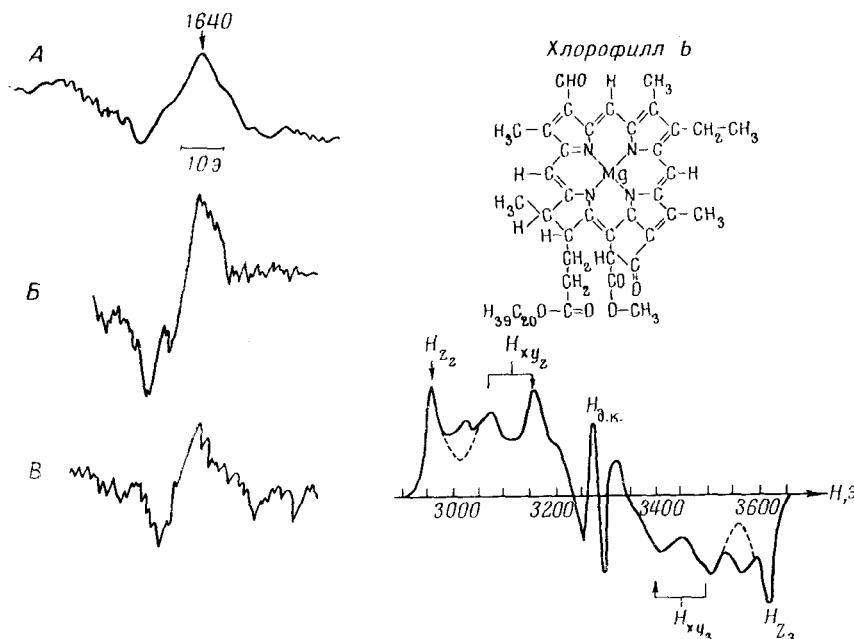


Рис. 6. Структура и сигналы ЭПР триплетного возбужденного состояния хлорофилла *a* (*A*), феофитина *a+b* (*B*) в этаноле, в хлоропластах, обработанных пиридином (*B*) (переходы  $\Delta m = \pm 2$ ,  $\nu = 9260 \text{ МГц}$ ), хлорофилла *b* (*Г*) в этаноле (переход  $\Delta m = \pm 1$ ,  $\nu = 9210 \text{ МГц}$ ). *B* — спектр, по-видимому, представляет собой сумму двух сигналов: феофитина *a* и феофитина *b*, о чем свидетельствует воспроизведенное расщепление линии

Наибольший интерес с точки зрения понимания роли триплетного возбужденного состояния хлорофилла в процессе фотосинтеза *in vivo* представляет исследование его непосредственно в фотосинтезирующих системах: хлоропластах, хроматофорах, зеленеющих листьях. Была сделана попытка <sup>61</sup> наблюдать сигнал ЭПР от фотосинтезирующих пигментов в препаратах хлоропластов и зеленеющих листьев. Исследовались хлоропласти гороха. В нативных препаратах ЭПР поглощение от триплетного состояния не обнаружено. Фотоиндуцированные сигналы ЭПР от триплетного состояния хлорофилла наблюдали в препаратах хлоропластов, содержащих от 10 до 50% пиридина по объему (рис. 6, *B*). Пиридин известен своим дезагрегирующим действием на пигментный аппарат хлоропластов, и в данном случае была возможна экстракция хлорофилла в пиридин. Как указывалось ранее, при исследовании пленок пигментов также не было обнаружено сигнала ЭПР триплетного состояния. Поэтому можно предположить, что при высоких концентрациях пигмента имеет место эффективная передача энергии возбуждения по триплетным уровням, приводящая к резкому сокращению  $\tau$ , а следовательно,  $n_{\text{ст}}$  хлорофилла. В связи с этим можно было ожидать появления сигнала ЭПР в зеленеющих листьях, в процессе образования и формирования мономерных компонентов пигментной системы. Исследовали <sup>61</sup> ЭПР поглощение

этиолированных листьев кукурузы, подвергнутых различным срокам освещения (от 1 до 30 часов). Однако и в этих системах сигналов ЭПР триплетного состояния обнаружено не было. Экстракция пигментов из листьев в раствор пиридина позволяет зарегистрировать ЭПР поглощение. По-видимому, уже на первых стадиях зеленения листьев процессы дезактивации триплетных молекул достаточно эффективны. Такая дезактивация может быть следствием эффективного переноса и использования энергии триплетного возбуждения в реакционном центре, так что в нативных хлоропластах не образуется измеримых стационарных концентраций триплетно-возбужденных молекул хлорофилла.

### 3. Ароматические аминокислоты, ди- и полипептиды, белки

О наблюдении методом ЭПР триплетного возбужденного состояния ароматических аминокислот сообщал ряд авторов, начиная с 1963 г.<sup>9, 11, 13, 32, 38, 62-68</sup>. Этанольные и водно-этанольные растворы ароматических аминокислот: тирозина, триптофана и фенилаланина возбуждались УФ-светом при 77°К. Регистрировались переходы  $\Delta m = \pm 2$ . Сигналы ЭПР представляют собой одиночные асимметричные линии ЭПР (рис. 7, А, Б) с параметрами, данными в табл. 6. По прекращении освещения

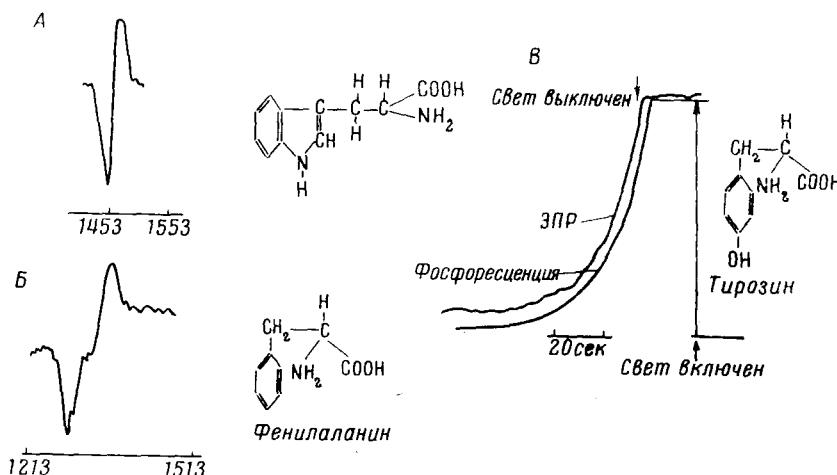


Рис. 7. Спектр ЭПР триплетного состояния триптофана (А) и фенилаланина (Б) в этаноловом растворе, 77°К (переходы  $\Delta m = \pm 2$ ). Затухание сигнала ЭПР и фосфоресценции L-тирофина в тех же условиях (В)

сигнал ЭПР триптофана в этаноле затухал со временем  $\tau = 2,4$  сек. (уменьшение первоначальной амплитуды сигнала ЭПР в  $e$  раз), что согласуется с оптическими данными<sup>69</sup>. При добавлении в этанольный раствор триптофана уксусной кислоты интенсивность сигнала падала приблизительно на порядок<sup>32, 42</sup>. Птак и Дузу наблюдали<sup>65</sup> сигнал ЭПР триплетного возбужденного состояния ароматических аминокислот в метанольном растворе, их результаты аналогичны данным работ<sup>32, 42</sup>, в частности они показали, что затухание сигнала ЭПР строго параллельно затуханию фосфоресценции (рис. 7, Б). Времена уменьшения сигнала ЭПР в два раза ( $\tau_{\frac{1}{2}}$ ) в фосфатном буфере равны соответственно 6, 7 сек. для триптофана, 6 сек. для фенилаланина и 3 сек. для тирозина. Следует отметить, что ЭПР и люминесцентные характеристики триплетного состояния ароматических аминокислот зависят от природы матрицы, температуры,

pH раствора<sup>70</sup>. В частности, Шига и Пиетт<sup>66</sup> отмечают, что природа растворителя (вода — метанол, фосфатный буфер) не влияют на форму линии сигнала ЭПР, но существенно изменяют время затухания сигнала.

Из трех ароматических аминокислот наибольший сигнал ЭПР ( $\Delta m = \pm 2$ ) регистрировался для триптофана, наименьший для фенилаланина в растворе той же концентрации. Шига и Пиетт<sup>66</sup> отказали, что выход триплетно-возбужденных молекул тирозина составляет  $1/3$  по сравнению с триптофаном. Цуклих<sup>38</sup> нашел, что отношение интенсивностей сигналов ЭПР ( $\Delta m = \pm 2$ ) триптофана, тирозинового иона, тирозина и фенилаланина равно соответственно 8 : 2 : 1 : 1. Характеристики спектров ЭПР, определенных из спектров  $\Delta m = \pm 2$  даны в табл. 6.

Элен и др.<sup>70</sup> исследовали изменение параметров спектров ЭПР при агрегации аминокислот из раствора. Аналогично изменению интенсивности фосфоресценции авторы наблюдали увеличение сигнала ЭПР при дезагрегации, когда в водный раствор аминокислот перед замораживанием добавляли дезагрегирующие добавки — этанол и NaCl. Этот эффект авторы объясняют изменением вероятности интеркомбинационного перехода и вероятности переноса энергии в микрокристаллах.

Мэлинг с сотр.<sup>67</sup> подробно исследовали влияние pH среды на свойства сигнала ЭПР триплетного состояния L-тирофина. Авторы наблюдали два сигнала ЭПР и соответственно две полосы поглощения двух форм тирозина: неионизированной и ионизированной. Параметры спектров приведены в табл. 6. Интенсивность сигнала зависит от pH среды. При pH 6,9 ионная форма отсутствует, в спектре поглощения наблюдается пик 280 нм неионной формы и соответственно сигнал ЭПР при 1287 э ( $\nu = 9138$  Мгц). При pH 10 — только сигнал ЭПР при 1390 э и соответственно максимум поглощения ионной формы 295 нм (рис. 8). При повышении температуры от 77 до 295° К равновесие сдвигается в сторону образования неионизированной формы;  $\tau_{1/2}$  затухания сигнала ЭПР для ионной формы  $\sim 2$  сек., для неионной  $\sim 3$  сек.

Аналогичные исследования выполнили Шига и др.<sup>68</sup> для L-триптофана, глицил-L-триптофана и поли-L-триптофана. Кривые затухания сигнала ЭПР и фосфоресценции идентичны. При концентрации L-триптофана выше  $2 \cdot 10^{-4}$  М наблюдается концентрационное тушение, при этом  $\tau = 4,4$  сек. не зависит от концентрации. Интенсивность сигнала ЭПР от интенсивности света зависит нелинейно и при достаточно большой интенсивности достигается насыщение.

Сигнал ЭПР триплетного состояния поли-L-триптофана тот же, что и L-триптофана с  $\tau_{1/2} = 4,2$  сек., однако число парамагнитных центров на единицу оптической плотности в два раза меньше. Уменьшение выхода авторы объясняют концентрационным тушением.

Переходы  $\Delta m = \pm 1$ . Впервые переходы  $\Delta m = \pm 1$  в тирозине наблюдались в работе<sup>35</sup>. Недавно Цуклих<sup>38</sup> сообщил о наблюдении спектров ЭПР  $\Delta m = \pm 1$  для трех ароматических аминокислот. Триптофан возбуждался в чистом этаноле, тирозин — в этаноле с 0,1 N HCl, а фенилаланин — в водном растворе с 0,1 N HCl.

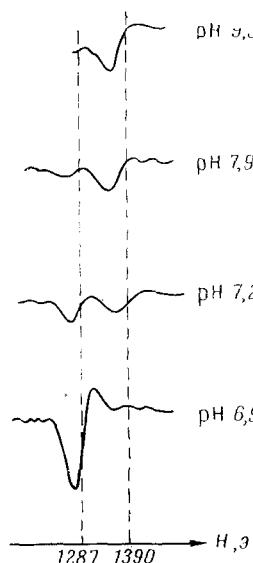


Рис. 8. Спектр ЭПР триплетного состояния L-тирофина как функция значения pH (pH устанавливалось с трис-буфером и HCl при 295° К)

ТАБЛИЦА 6

Параметры спектров ЭПР триплетного состояния ароматических аминокислот, переходы  $\Delta m = \pm 2$ , 77°К

Соединение	$D^*/\text{hc}$ , см $^{-1}$	$\Delta H, \text{ э}$	$\tau_1/\text{сек.}$	Растворитель
Триптофан	0,126 0,119	15 22	2,4 4,1	Этанол <sup>32</sup> Метанол + 6 N HCl фосфатный буфер <sup>66</sup>
Тирозин	0,112	32	1,9	То же
Неионизованный <i>L</i> -тироzin	0,161	32	3	$\text{H}_2\text{O}$ + пропиленгликоль
Ионизованный <i>L</i> -тироzin	0,141	47	2	$\text{H}_2\text{O}$ + пропиленгликоль + HCl
Фенилаланин	0,161	63	6,4	Метанол + HCl фосфатный буфер

нин и тирозинат — в этаноле с 0,25 N NaOH. Энергии нулевого расщепления:  $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_3$  и константы нулевого расщепления ( $D = -\frac{3}{2} Z = -\frac{3}{2} X_\perp$ ) даны в табл. 7. Автор<sup>38</sup> принимает обозначение энергий нулевого расщепления  $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_3$  (вместо  $X$ ,  $Y$ ,  $Z$ ), поскольку в хаотически ориентированном образце их нельзя отнести к конкретным молекулярным осям.  $X_\perp$  — энергия нулевого расщепления, связанная с направлением, перпендикулярным плоскости молекулы.  $X_\perp$  были определены из исследования формы линии спектра ЭПР в поляризованном свете.

Исследование переноса энергии триплетного возбуждения в смесях ароматических аминокислот позволило идентифицировать сигнал ЭПР триплетного состояния в белках и понять механизм взаимодействия фотовозбужденных молекул в условиях *in vivo*. Перенос энергии триплетного возбуждения в смеси тирозина и триптофана в 6 N HCl исследован в работах<sup>96, 68</sup>. В первые секунды освещения регистрируются два сигнала ЭПР тирозина и триптофана (переход  $\Delta m = \pm 2$ ). Со временем интенсивность триптофанового сигнала увеличивалась, а тирозинового падала по сравнению с однокомпонентной системой при непрерывном освещении. Аналогично поведение ароматических дипептидов с триптофаном<sup>68</sup>. Согласно табл. 6 и 7, константы нулевого расщепления различных арома-

ТАБЛИЦА 7

Параметры нулевого расщепления ароматических аминокислот, см $^{-1}$

Соединение	$\Delta m = \pm 1$						$\Delta m = \pm 2$
	$X_1/\text{hc}$	$X_2/\text{hc}$	$X_3/\text{hc}$	$D/\text{hc}$	$E/\text{hc}$	$D^*/\text{hc}$	$D^*/\text{hc}$
Триптофан	0,0082	0,0656	0,0738	0,0984	0,0410	0,1213	0,1210
Тирозин	0,0124	0,0867	0,0991	0,1301	0,0558	0,1621	0,1635
Тирозинат-ион	0,0180	0,0720	0,0900	0,1080	0,0540	0,1429	0,1432
Фенилаланин	0,0053	0,0930	0,0983	0,1475	0,0439	0,1659	0,1652

тических аминокислот сильно различаются, поэтому сигналы ЭПР идентифицируются легко и однозначно. Данные ЭПР о триплетном состоянии индивидуальных ароматических аминокислот и особенно ди- и полипептидов позволили идентифицировать триплетное состояние белков.

Впервые триплетное возбужденное состояние белков методом ЭПР исследовали Шига и др.<sup>66, 68</sup>, перенос энергии в белках обсуждали Лхост<sup>52</sup> и Цуклих<sup>38</sup>. Исследовались: бычий сывороточный альбумин, яичный альбумин,  $\beta$ -лактоглобулин, оксидаза *D*-аминокислот (апо- и холоферменты), нативные окси- и дезоксигемоцианины. Для регистрации сигналов

ЭПР слабой интенсивности использовали накопитель. Во всех случаях<sup>66, 68</sup> наблюдались переходы  $\Delta m = \pm 2$ . В названных белках ЭПР поглощение по значению  $H_{\min}$ , и форме линии совпадало с сигналом ЭПР L-триптофана. Таким образом, авторы нашли, что источником триплетного сигнала являются триптофановые остатки. Несколько отличным было поведение оксидазы D-аминокислот. Предполагается<sup>68</sup>, что в этом белке, содержащем флавинаденидинуклеотид (ФАД) сигнал ЭПР обусловлен не только триплетным возбуждением ароматической аминокислоты, но имеет место значительное взаимодействие между триплетно-возбужденными ароматическими аминокислотами и ФАД. Холофермент обнаруживает два различных сигнала при  $H_{\min} = 1450$  и  $1560$  э, которые принадлежат соответственно триптофану и ФАД. Белки оказывают существенное влияние на триплетное состояние ФАД, тогда как обратное влияние не проявляется. При сходстве характеристик спектров ЭПР белков время затухания  $\tau_{1/2}$  зависит от природы белка и от состава растворителя. Значения  $\tau_{1/2}$  приведены в табл. 8 по данным<sup>68</sup>.

ТАБЛИЦА 8

 $\tau_{1/2}$  триплетного состояния белков при 77° К

Белок	$\tau_{1/2}$ , сек.					
	I	II	III	IV	V	VI
Яичный альбумин	3,3	4,1	4,3	4,4	—	—
Бычий сывороточный альбумин	3,7	4,6	4,0	4,7	—	—
$\beta$ -Лактоглобулин	3,9	4,0	4,7	4,8	—	—
Оксидаза D-аминокислот						
апофермент	2,4	—	—	—	—	—
холофермент	2,8	—	—	—	—	—
Нативный гемоцианин						
окси-	—	—	—	—	1,7	3,4
дезокси-	—	—	—	—	4,8	4,4
Апогемоцианин						
дезокси-	—	—	—	—	4,8	3,8

В таблице: растворитель I — буфер (pH 7; 0,1 M), II — 1:1 глицерин-буфер, III — буфер + 8 M мочевина, IV — 1:1 глицерин-буфер + 8 M мочевина, V — *tris*-буфер (0,05 M, pH 6,8, содержащий 0,01 M  $\text{Ca}^{2+}$ ), VI — 1:1 глицерин-*tris*-буфер.

Как видно из табл. 8, значение  $\tau_{1/2}$  увеличивается в присутствии мочевины. При добавлении глицерина  $\tau_{1/2}$  также растет. Авторы полагают, что на значение  $\tau_{1/2}$  существенно влияет специфичность окружения триптофановых остатков в белке. При денатурации окружение меняется и часть триптофановых остатков может оказаться в растворе. Спектры действия и интенсивности сигналов ЭПР разных белков также различны. Полагают<sup>68</sup>, что эти различия обусловлены следующими причинами: а) различием расстояний и ориентаций триптофановых остатков в различных белках, б) различным расположением тирозиновых и фенилаланиновых остатков между триптофановыми, в) различной степенью диссоциации протона в пептидной цепочке относительно триптофановых остатков и г) различием окружения триптофановых остатков.

Однако последние измерения Цуклиха<sup>38</sup> показали, что в человеческом и бычьем сывороточном альбумине (в этиленгликоль — фосфатном буфере, pH 7) наблюдается два сигнала ЭПР триплетного состояния (переходы  $\Delta m = \pm 2$ ). При этом сигналы не обнаруживаются ни уширения, ни сдвиги, ни изменения констант нулевого расщепления. Интенсивности триптофанового сигнала в трех исследованных белках: человеческом, бычьем сывороточном альбумине и овальбумине были соответственно

1 : 1 : 2. Тирозиновый сигнал был в четыре раза интенсивнее в человеческом сывороточном альбумине по сравнению с бычьим и полностью отсутствовал в овальбумине. Это согласуется с фактом увеличения миграции энергии тирозин  $\rightarrow$  триптофан при увеличении относительной концентрации триптофана. Поскольку содержание тирозина в альбуминах одинаковое, разницу в интенсивности автор относит за счет отличия в содержании триптофановых остатков (на 1 молекулу человеческого сывороточного альбумина приходится 1 молекула триптофана, бычьего — 2 молекулы). В этом случае по крайней мере 75% тирозиновых остатков в бычьем альбумине тушится двумя триптофанами. Автор<sup>38</sup> подсчитал минимальный радиус  $R_0$  переноса энергии от тирозина к триптофану в бычьем сывороточном альбумине и получил значение  $R_0 = 20 \text{ \AA}$ . Спектр ЭПР  $\Delta m = \pm 1$  наблюдался только для овальбумина<sup>38</sup> и был целиком обусловлен триптофановыми остатками.

#### 4. Флавины и их производные

Флавосемихиноны известны в качестве промежуточных переносчиков электронов в дыхательной цепи митохондрий и хлоропластов. Исследование триплетного состояния методом ЭПР в твердых растворах, определение констант нулевого расщепления позволило качественно описать свойства и распределение электронной плотности в триплетном состоянии этих сложных молекул<sup>16, 52, 71</sup>.

Спектры ЭПР триплетного возбужденного состояния переходов  $\Delta m = \pm 1$  и  $\Delta m = \pm 2$  регистрировались в замещенных, таутомерных и восстановленных формах флавинов и птеридинов, в том числе флавинмононуклеотиде (ФМН), ФАД, рибофлавине. Наиболее полные данные о характеристиках спектров ЭПР триплетного состояния флавинов и птеридинов получил Лхост и др.<sup>52</sup>. В табл. 9 даны характеристики спектров ЭПР переходов  $\Delta m = \pm 2$ . Типичный спектр ЭПР триплетного состояния ( $\Delta m = \pm 2$ ) при  $H_{\text{пост.}} \perp H_{rj}$  представлен на рис. 9, А. Внизу (рис. 9, Б) дано распределение резонансных полей в области 1500—1700 э (ν = 9210 Мгц).

При 77° К в жестком растворе этанола или смеси: пропиленгликоль— $\text{H}_2\text{O}$  и  $\text{HCl}$  наблюдались переходы  $\Delta m = \pm 1$ . Спектр катиона ФМН дан на рис. 9, А. Параметры спектров ЭПР даны в табл. 10. Форма линии триплетного поглощения в области  $\Delta m = \pm 1$  необычна и соответствует равенству энергий двух подуровней триплетного уровня, сравнимых по абсолютным значениям, но противоположного знака. Поэтому соответствующие линии ЭПР сливаются. Узкая линия  $H_{\text{д.к.}}$  на спектре соответствует двухквантовому переходу.

Спектр  $\Delta m = \pm 1$  катиона обнаруживает низкую симметрию триплетного состояния, обусловленную влиянием заряда.

Существенно, что триплетное состояние аниона ФМН не отличается от триплетного состояния нейтральной формы ни по свойствам фосфоресцентного излучения, ни по параметрам спектров ЭПР. Триплетное состояние катионной формы существенно отлично от двух предыдущих. В частности,  $H_{\text{мин.}}$  сдвинуто на 20 э в сторону высоких полей и энергия спин-спинового взаимодействия выше (табл. 9, 10).

По сравнению с другими бициклическими (нафталин,  $D^* = 1,0030 \text{ см}^{-1}$ ) и полициклическими ароматическими соединениями<sup>28</sup> значения констант нулевого расщепления птеридинов и флавинов ниже, что указывает на большую делокализацию триплетно-возбужденных электронов в молекуле. Из низких значений констант вытекает также, что триплетное состояние обусловлено  $\pi - \pi^*$ , а не  $n - \pi^*$  переходом. Для

ТАБЛИЦА 9

Характеристики спектров ЭПР триплетного состояния флавинов и птеридинов при 77° К, переходы  $\Delta m = \pm 2$ ,  $\nu = 9210$  Гц

Соединение	$H_{\text{мин.}}, \text{ э}$	$D^*/hc, \text{ см}^{-1}$	Растворитель
Изоаллоксазиновые соединения			
Рибофлавин	1602	0,062	Этанол
Люмифлавин	1602	0,062	То же
Тетраацетилрибофлавин	1603	0,061	» »
3-Бензиллюмифлавин	1602	0,062	» »
o-(2)-Метиллюмифлавин	1596	0,066	» »
2-Тиолюмифлавин	1596	0,066	» »
4-Фенилиминиллюмифлавин	1599	0,064	Этанол + диметилформамид
8-Морфолино-8-иорлюмифлавин	1585	0,072	То же
ФМН нейтральная	1602	0,062	Пропилгаллол $\text{H}_2\text{O}$
ФМН анион	1602	0,062	Пропилгаллол + $\text{NaOH}$
ФМН катион	1582	0,074	Пропилгаллол + $\text{HCl}$
Аллоксазиновые соединения			
Люмихром	1578	0,077	Этанол
1, 3-Диметиллюмихром	1581	0,075	То же
1, 3-Диметилаллоксазин	1575	0,078	» »
Птеридиновые производные			
Люмазин	1564	0,086	» »
1, 3-Диметиллюмазин	1569	0,083	» »
8-Метиллюмазин	1578	0,079	» »
6, 7-Диметил-4-оксоптеридин	1535	0,098	Этанол + диметилформамид
2-Амин-6, 7-диметил-4-оксиптеридин	1559	0,088	То же
2-Этилмеркапто-4-оксиптеридин	1557	0,089	» »
2, 4-Диамино-6, 7-диметилптеридин	1537	0,097	» »
2, 4, 7-Триамино-6-фенилптеридин	1538	0,097	» »

ТАБЛИЦА 10

Характеристики спектров ЭПР триплетного состояния флавинов и аллоксазиновых соединений в жестком растворе при 77° К, переходы  $\Delta m = \pm 1$   $\nu = 9210$  Гц

Соединение	$X/hc$	$Y/hc$	$Z/hc$	$D/hc$	$E/hc$	$D^*/hc$
	$\text{см}^{-1}$					
3-Бензиллюмифлавин	$\pm 0,0034$	$\pm 0,0336$	$\pm 0,0369$	$\pm 0,0553$	$\mp 0,0150$	0,0611
ФМН катион	$\pm 0,0034$	$\pm 0,0404$	$\pm 0,0440$	$\pm 0,0660$	$\mp 0,0185$	0,0733
Тетраацетилрибофлавин	$\pm 0,067$	$\pm 0,0309$	$\pm 0,0376$	$\pm 0,0564$	$\mp 0,0121$	0,0602
Люмихром	$\pm 0,0035$	$\pm 0,0424$	$\pm 0,0460$	$\pm 0,0690$	$\mp 0,0194$	0,0768
1, 3-Диметиллюмихром	$\pm 0,0026$	$\pm 0,0415$	$\pm 0,0440$	$\pm 0,0660$	$\mp 0,0194$	0,0741
1, 3-Диметилаллоксазин	$\pm 0,075$	$\pm 0,0406$	$\pm 0,0481$	$\pm 0,0721$	$\mp 0,0165$	0,0776

$\pi - \pi^*$  триплетного состояния энергия молекулы, связанная с осью, перпендикулярной плоскости молекулы, является отрицательной. Это наивысшее значение энергии определяет  $D/hc$  (см. табл. 10). Два других значения энергии расщепления триплетного уровня в отсутствие поля, связанные с осями в плоскости молекулы, определяют  $E/hc$ . Значение  $E/hc$  мало для птеридинов и флавинов.

Из анализа данных табл. 9, 10 следует, что: а) природа заместителей в положении 10 флавинов не влияет на константы нулевого расщепления. Единственным исключением является тетраацетилрибофлавин, б) алкилирование (3-бензиллюмифлавин) или ионизация в положении  $N_3$  (ани-

онная форма ФМН) не изменяют значений констант, однако алкилирование в положении 2, соответствующее флавохинонной форме, увеличивает  $D^*/hc$ . Введение серы в положение 2 (2-тиолюмифлавин) не влияет на  $D^*/hc$ , но уменьшает время жизни триплетного состояния, в) таутометрия — аллоксазин — изоаллоксазин — приводит к уменьшению значений  $D^*/hc$ . Аналогичный эффект имеет место с птеридиновыми производными при сравнении, например, 1,3-диметиллюмазина и 8-метиллюмази-

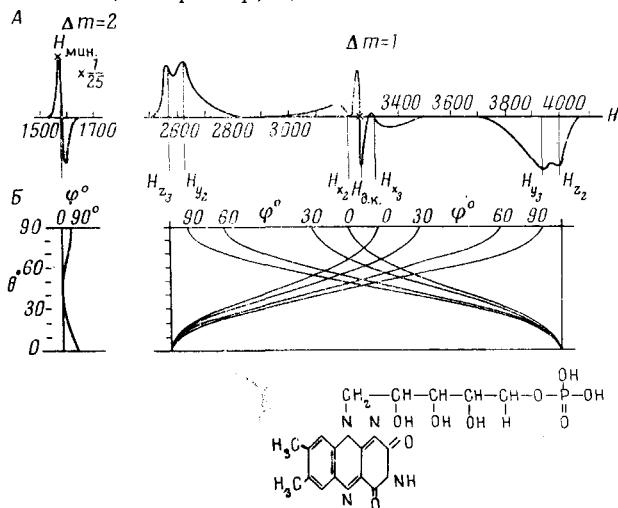


Рис. 9. А — спектр ЭПР триплетного состояния (переходы  $\Delta m = \pm 2, \pm 1$ ;  $\nu = 9210$  МГц) катионной формы ФМН в растворе:  $\text{H}_2\text{O}$  — пропиленгликоль — 6N  $\text{HCl}$  при 77°К. Б — распределение резонансных полей

на, г) определенную роль в делокализации электронов играет бензенOIDное кольцо.  $D^*/hc$  флавинов приблизительно на  $0,2 \text{ см}^{-1}$  меньше, чем  $D^*/hc$  птеридинов. Это показывает, что электроны в триплетном состоянии делокализованы по бензенOIDному кольцу. Заместители в положениях 6, 7 птеридинового кольца не влияют на величину  $D^*/hc$ . Сильное влияние различных заместителей в положениях 7, 8 флавинового кольца (1,3-диметиллюмазин) имеет меньшее  $D^*/hc$ , чем 1,3-диметилаллоксазин) свидетельствует о заметной спиновой плотности в этих положениях. Введение в положения 7, 8 радикалов  $\text{CH}_3$  или  $\text{Cl}$  существенно влияет на фотохимическое поведение флавинов. Различные заместители в положении  $N_5$  приводят к тушению триплетного состояния (5-ацетилкофлавин, 5-изопропилкофлавин). Аналогичный эффект наблюдается для 10-производных. Лейкофлавины фосфоресцируют, но не обнаруживают ЭПР поглощения. Не дает ЭПР поглощение и восстановленный ФМН. По мнению Лхоста<sup>52</sup> скелет молекул этих форм в наименшем триплетном состоянии не плоский. Это приводит к изменению гибридизации  $N_5$  орбиталей. Триплетное состояние будет более низкой симметрии, что увеличивает спин-орбитальную связь, уменьшает  $\tau$ , и одновременно увеличивает  $D^*/hc$ , приводя к невозможности наблюдать триплетное поглощение в 3 сантиметровом диапазоне.

Таким образом, спиновая плотность в триплетном состоянии флавинов локализована главным образом в хиноксалиновой части молекулы. Для них характерны низкая спиновая плотность на  $N_3$  атоме, высокая — на  $N_5$ ,  $N_1$ ,  $N_{10}$  и неэквивалентность метильных групп в положениях 7, 8. Эти данные существенны при рассмотрении фотохимических свойств и биологических функций флавинов.

## 5. Нуклеиновые кислоты, основания, нуклеотиды

Нуклеиновые кислоты — высокомолекулярные соединения, состоящие из пуриновых и пиримидиновых оснований, углеводных остатков и фосфатных групп. Пуриновые и пиримидиновые основания входят не только в состав нуклеиновых кислот, но и ряда низкомолекулярных соединений, играющих важную роль в различных процессах жизнедеятельности, от дыхания до мышечного сокращения. Особую роль в биологии играют соединения аденина. В частности, они являются составной частью адено-зинтрифосфата (АТФ), своеобразного аккумулятора энергии в живой системе.

ЭПР триплетного состояния нуклеиновых кислот и составляющих их пуриновых и пиримидиновых оснований, нуклеотидов и нуклеозидов исследовали Ран, Шульман, Айзингер и др.<sup>35, 36, 72-77</sup>, а также Элен и др.<sup>15, 78, 79</sup>. При нейтральном pH в растворе этиленгликоль — H<sub>2</sub>O сильный сигнал ЭПР (переходы  $\Delta m = \pm 2$ ) обусловлен аденином, аденоzinом, гуанином, гуанозином и их монофосфатами<sup>72</sup>. Цитозинмонофосфат в этих условиях дает лишь слабую фосфоресценцию, тиминмонофосфат не обнаруживает ни фосфоресценции, ни сигнала ЭПР. Константы нулевого расщепления и значения  $\tau$  приведены в табл. 11.

ТАБЛИЦА 11

Характеристики ЭПР триплетного состояния некоторых производных нуклеиновых кислот

Соединение	$D/hc, \text{ см}^{-1}$ $\Delta m = \pm 1$	$E/hc, \text{ см}^{-1}$ $\Delta m = \pm 1$	$D^*/hc, \text{ см}^{-1}$ $\Delta m = \pm 2$	$\tau_{1/2}, \text{ сек.}$
Аденин			0,126	2,6
Аденозин			0,126	2,6
Аденозинмонофосфат, pH 7	0,121	0,027	0,126	2,5
Гуанин			0,145	1,26
Гуанозин			0,145	1,26
Гуанинмонофосфат pH 7	0,141	0,0127	0,145	1,25
pH 1			0,126	0,37
Тимин-ион, pH 12			0,198	0,50
Тиминмонофосфат			0,198	0,45
Уридин-ион, pH 11			0,163	0,40
Оротовая кислота pH 7	0,176	0,016	0,184	0,30
pH 12			0,175	
Поли-d-АТ pH 7			0,201	0,032
ДНК			0,200	0,29

В нативной ДНК при pH 7 не было обнаружено сигнала ЭПР триплетного состояния, хотя в денатурированной и деградированной ДНК регистрировались небольшие сигналы триплетного состояния гуанина и аденина<sup>37, 76</sup>. При pH 12 (тиминмонофосфат при этом ионизуется с потерей протона от N<sub>3</sub> атома) наблюдается сигнал ЭПР ионизированного тиминмонофосфата (T<sup>-</sup>) при  $H_{\min.} = 1067 \text{ э}$  со временем затухания 0,45 сек., что близко к  $\tau_{\text{фосф. ДНК}}$ , равном 0,3 сек. Сигнал T<sup>-</sup> отстоит от сигнала аденина приблизительно на 300 э и может быть легко идентифицирован. В поли-d+АТ наблюдается сигнал, аналогичный тиминовому при  $H_{\min.} = 1046 \text{ э}$  ( $\nu = 9104 \text{ МГц}$ ),  $\tau = 0,32 \text{ сек}$ <sup>73</sup> (см. табл. 11).

Разбавленная смесь гуанин и цитозинмонофосфатов обнаруживает сигнал ЭПР триплетного состояния первого, а смесь аденин- и тиминмонофосфатов дает триплетный сигнал только аденинмонофосфата. Однако

в ДНК сигнал триплетного состояния пуриновых оснований отсутствует. Триплетное состояние этих оснований или не заселяется, или заселяется и тушится. Возможно также, что энергия триплетного состояния эффективно переносится к тимину. Для нативной ДНК из тимуса быка был обнаружен сигнал ЭПР при УФ-возбуждении в тех же полях ( $H_{\min} = 1054$  э,  $\Delta H = 50$  э,  $\tau = 0,29$  сек.<sup>37, 72, 73</sup>, что и для ионизованной формы тимина и поли-*d* АТ).

Наряду с переходами  $\Delta m = \pm 2$  в замороженных растворах оротовой кислоты, гуанозин и аденоцинофосфатов наблюдались переходы  $\Delta m = \pm 1$ . Подсчитанные константы приведены в табл. 11. Как следует из анализа данных табл. 11, константы нулевого расщепления пуриновых и пиримидиновых производных существенно различны. С другой стороны, константы различаются для ионных и неионных форм оснований. Ран и др.<sup>75, 76</sup> предположили, что триплет ДНК локализован на тиминовом остатке, который ионизуется при переносе его лабильного протона через водородную связь к аденину. Аргументом в пользу этого предположения служило равенство полей ЭПР поглощения. Небольшое различие в значениях  $\tau$  объясняется, скорее, незначительным различием в окружении. Подтверждением тиминового происхождения триплета ДНК явилось также подробное изучение различных синтетических нуклеиновых кислот и модельных полимеров<sup>72, 73</sup> — во всех случаях триплетное поглощение обнаруживали полимеры, содержащие тимин. По спектральным данным такой однозначной идентификации провести было нельзя, т. к. фосфоресценция ДНК отлична как от фосфоресценции индивидуальных нуклеотидов, так и их суммы в растворе.

## 6. Феноксазин, фенотиазин

Феноксазин и фенотиазин относятся к классу фотосенсибилизирующих красителей, а также находят широкое применение в фармакологии. Они представляют собой трициклические ароматические молекулы симметрии  $C_{2v}$ . Феноксазин и фенотиазин легко образуют смешанные моноокристаллы с дифенилом, они исследованы не только в растворах, но и в моноокристаллах.

Исследование триплетного состояния феноксазина и фенотиазина методом ЭПР выполнили сравнительно недавно Лхост, Хог и Птак<sup>52, 80</sup>. Спектр ЭПР переходов  $\Delta m = \pm 1$  и  $\Delta m = \pm 2$  приведен на рис. 2. Как и следовало ожидать, для молекулы симметрии  $C_{2v}$  в области  $\Delta m = \pm 1$  имеется шесть канонических пиков и линия  $H_{\text{д.к.}}$ . Ширина линий канонических пиков  $H_x$  и  $H_y \sim 25-30$  э, тогда как ширина линии  $H_y \sim 15$  э (измерено между точками максимального наклона). Исследование моноокристалла феноксазина в дифениле позволило однозначно отнести пики к молекулярной системе осей, как это показано на рис. 2. В параллельных полях помимо  $H_{\text{мин}}$  наблюдались также канонические пики  $H_x$ ,  $H_y$  (рис. 2, A). Пик  $H_z$  из-за слабой интенсивности не регистрировался. Параметры спектров ЭПР даны в табл. 12. Знаки констант здесь произвольны, однако, согласно Мак-Лахлану<sup>81</sup>, значение  $D/hc$  триплетного  $\pi-\pi^*$ -состояния положительно.

Следует отметить удивительное различие в энергии нулевого расщепления феноксазина в дифениловой и этанольной матрицах. Последнее может быть обусловлено различной полярностью растворителей, способностью его образовывать водородные связи и, наконец, небольшими изменениями геометрии этих молекул в твердых растворах. В частности, в дифениловом кристалле эти молекулы могут оставаться плоскими, тогда как в этаноле — слегка изгибаются. Последнее приводит к изменению

геометрии  $\pi$ -электронного облака и соответственно значений констант  $D^*/hc$ . Фенотиазин имеет большую тенденцию сгибаться и поэтому энергия его нулевого расщепления мало изменяется при переходе от одной матрицы к другой (в монокристалле она также изогнута)<sup>52</sup>. Некоторая изогнутость бензольных колец молекулы вытекает, в частности, из расчетов дипольного момента и электронной структуры свободных радикалов фенотиазина<sup>80</sup>.

ТАБЛИЦА 12

Параметры спектров ЭПР триплетного состояния феноксазина и фенотиазина

Константы ЭПР	Феноксазин		Фенотиазин	
	дифениловый кристалл	этанол стекло	дифениловый кристалл	этанол стекло
$D/hc$	$\pm 0,0990$	0,1249	$\pm 0,1230$	0,1237
$E/hc$	$\pm 0,0154$	0,0119	$\pm 0,0142$	0,0135
$X/hc$	$\pm 0,0482$	0,0535	$\pm 0,0270$	0,0278
$I/hc$	$\pm 0,0175$	0,0297	$\pm 0,0553$	0,0547
$Z/hc$	$\pm 0,0659$	0,0833	$\pm 0,0820$	0,0825
$g_{xx}$	2,0037	—	2,0042	—
$g_{yy}$	2,0037	—	2,0045	—
$g_{zz}$	2,0020	—	2,0014	—

Исследование СТС спектра ЭПР триплетного состояния монокристалла феноксазина и фенотиазина позволило отнести пик  $H_x$  к длинной оси молекул. Из двух других пиков пик с меньшей энергией ( $H_y$  на рис. 2) отнесен к короткой оси молекулы —  $y$ , проходящей через атомы O—N, а пик с наибольшей энергией —  $H_z$  к оси  $z$ , перпендикулярной плоскости молекулы. Дополнительные исследования в поляризованном свете показали<sup>80</sup>, что в жестком растворе наименее триплетное состояние феноксазина заселяется через  $S_0—S_1^*$  возбуждение, момент перехода которого параллелен оси  $y$ . Однако, поскольку в растворе молекула может быть изогнута, магнитная ось  $y$  может не совпадать точно с направлением связи N—O. Это подтверждается также исследованиями СТС свободных радикалов феноксазина<sup>52</sup>, поскольку предположение об  $sp^3$ -гибридизации атома азота лучше объясняет экспериментальные результаты, чем предположение  $sp^2$ -гибридизации, соответствующее плоской молекуле.

## 7. Кумарин и его производные

Кумарин и родственные соединения известны в биологии как разобщители митохондриального окислительного фосфорилирования и антикоагулянтов (дикумарол). Триплетное состояние кумарина и его производных впервые наблюдали Грабер и др.<sup>82</sup>. Спектр кумарина в этаноле при 77° К представлен на рис. 10 (переходы  $\Delta m = \pm 1$ ). Положение пика  $H_x$ , вычислено, т. к. регистрация его затруднена наложением спектра радикала этанола. Узкая линия при 3201 э соответствует  $H_{d, k}$ . Значения энергий нулевого расщепления, констант и  $\tau$  даны в табл. 13. Кроме 6-замещенных кумаринов значения энергий нулевого расщепления лежат между значениями энергий бензола и нафталина<sup>2</sup>. Это, а также большое  $\tau$  показывает, что триплетное состояние кумарина и его производных  $\pi-\pi^*$ -характера. Для кумарина авторы<sup>82</sup> выбрали те же обозначения

осей (рис. 10), что и для нафтилина<sup>1, 2</sup>. Качественно это оправдывается тем фактом, что для плоских  $\pi-\pi^*$  молекул энергия нулевого расщепления триплетного уровня, связанная с  $z$  осью, отрицательна<sup>81</sup>. Две другие энергии характеризуют распределение спиновой плотности в плоскости молекулы. Как видно из табл. 13, для кумарина и его монозамещенных значения  $D^*/hc$  выше, чем для полизамещенных. Это свидетельствует о большей делокализации спиновой плотности у последних. С другой стороны, хроманон и хроманол, содержащие одно ненасыщенное кольцо, имеют еще большее  $D^*/hc$ , сравнимое по значению с  $D^*/hc$  бензола (0, 193  $\text{см}^{-1}$ ).

Триплетное возбужденное состояние дикумарола в низких и высоких полях наблюдали Гал и др.<sup>83</sup> в смеси: этанол—диметилформамид — при 77° К. Спектр ЭПР  $\Delta m = \pm 1$  состоит из шести канонических пиков (молекулярные оси  $x \neq y \neq z$ ). В области  $\Delta m = \pm 2$  наблюдался более интенсивный пик  $H_{\min}$ . 1468 э ( $\nu = 9239 \text{ МГц}$ ). Время затухания  $\tau$  сигнала ЭПР при  $H_{\min}$  после выключения света равнялось 1,3 сек. (табл. 10), что совпадает с временем затухания фосфоресценции. Энергии нулевого расщепления, подсчитанные из спектров, приведены в табл. 13.

Таким образом, мы попытались дать здесь по возможности полную информацию о характеристиках различных классов биологически активных молекул в триплетном возбужденном состоянии. Резюмируя, еще раз подчеркнем, что метод ЭПР является наиболее информативным

Рис. 10. А — Спектр ЭПР триплетного состояния кумарина (переход  $\Delta m = \pm 1$ ) в этаноле при 77° К,  $\nu = 9239 \text{ МГц}$ . Б — распределение резонансных полей

методом особенно при исследовании больших биологических молекул, таких как ДНК, белки, триплетное состояние которых трудно идентифицировать, а также соединений, фосфоресцентное излучение которых малоинтенсивно. Далее мы обсудим роль триплетного возбужденного состояния в фотохимии этих молекул.

ТАБЛИЦА 13  
Значения параметров спектров ЭПР триплетного состояния кумарина и его производных

Соединение	$X/hc$	$Y/hc$	$Z/hc$	$D^*/hc$	$\tau, \text{сек.}$
Кумарин	0,0094	0,0680	-0,0774	0,1244	0,54
4-Гидроксикумарин	0,0137	0,0680	-0,0817	0,1301	1,5
7-Гидроксикумарин	0,0147	0,0642	-0,0788	0,1177	1,1
6-Метилкумарин	0,0026	0,0681	-0,0636	0,1124	0,6
Эскулин (6 $\beta$ -глюкозидо-7-гидроксикумарин)	0,076	0,0600	-0,0524	0,0980	1,5
7-Нитро-3:4-бензокумарин	—	—	—	0,0870	2,3
4-Хроманон	—	—	—	0,1584	1,8
4-Хроманол	—	—	—	0,1354	0,9
Дикумарол	0,0172	0,0680	-0,0807	—	1,3

### III. ТРИПЛЕТНОЕ СОСТОЯНИЕ В ФОТОХИМИИ БИОЛОГИЧЕСКИ ВАЖНЫХ МОЛЕКУЛ. ДВУХКВАНТОВЫЕ РЕАКЦИИ

#### 1. Фотохимия порфиринов в твердых растворах

При освещении этанольных растворов порфиринов при 77° К светом, соответствующим длинноволновым максимумам поглощения пигментов, возникает сигнал ЭПР триплетного состояния, интенсивность которого сохраняется во время облучения. При этом не наблюдается образования<sup>1</sup> свободно-радикальных продуктов. Однако при облучении растворов порфиринов нефильтрованным светом ртутной лампы интенсивность сигнала ЭПР триплетного состояния падает, и одновременно накапливаются свободно-радикальные продукты<sup>8, 9, 32</sup>, которые в работе<sup>11</sup> были идентифицированы как радикальные продукты распада этанола ( $\text{CH}_3\dot{\text{C}}\text{HOH}$ ,  $\dot{\text{C}}\text{H}_3$ ,  $\dot{\text{C}}\text{HO}$ ) и радикала порфирина. С увеличением концентрации пигмента выход радикалов увеличивался. При использовании калиброванных фотометрических сеток показано, что концентрация этильных<sup>8, 32, 42</sup> и радикалов пигмента<sup>48, 50</sup> изменяется пропорционально квадрату интенсивности падающего света. Поэтому было высказано предположение<sup>32</sup>, что процесс двухквантовый и образование свободных радикалов идет через триплетное состояние, причем величина второго кванта для порфиринов больше возбуждающего.

Одновременно с накоплением свободных радикалов существенные изменения претерпевает спектр поглощения пигмента. В частности, в Mg-этиопорфирине<sup>8, 42, 84, 85</sup> исходные полосы поглощения 542, 578 нм и полоса Соре падают по интенсивности (в разбавленном растворе, при продолжительном освещении практически до нуля) и возникает новое поглощение 450, 605 и 686 нм. При постепенном повышении температуры предварительно облученного образца поглощение 686 нм исчезает, уменьшается пик 450 нм и при —150—125° возникают новые полосы с максимумами 660 и 750 нм, которые при дальнейшем нагревании также падают по интенсивности до нуля и спектр регенерирует. Для доказательства того, что фотопреакция идет через триплетное состояние, авторы обзора исследовали влияние прерывистого освещения (со световыми импульсами, меньшими времени возгорания фосфоресценции) на выход свободных радикалов в этанольном растворе Mg-этиопорфирина, Mg-мезопорфирина и Zn-тетрафенилпорфирина<sup>19</sup>. Темновые промежутки составляли 1—2 сек., что при экспоненциальном законе затухания фосфоресценции соответствует практически полному затуханию свечения. Показано, что при освещении прерывистым светом выход радикалов (сравнивались площади под интегральными кривыми) в 15—25 раз меньше (в зависимости от продолжительности светового импульса), чем при непрерывном освещении той же интегральной интенсивности (рис. 11). Последнее хорошо согласуется с рассчитанными значениями<sup>19</sup>.

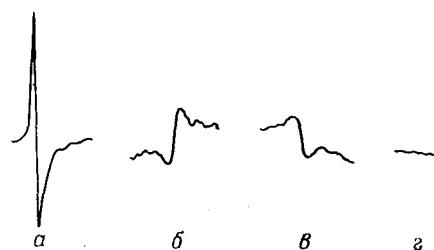


Рис. 11. Выход свободных радикалов в спиртовом растворе Mg-этиопорфирина как функция освещения: *а*—непрерывным светом в стационарном режиме возбуждения в течение 30 сек., *б*, *в*, *г*—при прерывистом освещении в течение 55 мин. с периодами засветки соответственно  $1.8 \cdot 10^{-2}$  сек.,  $9 \cdot 10^{-3}$  сек.,  $6 \cdot 10^{-3}$  сек.

Для непосредственного доказательства двухквантовости процесса применили методику освещения растворов двумя независимыми источниками света<sup>7</sup>. Как уже сказано, освещение растворов желтым светом не приводило к накоплению радикальных продуктов при 77° К. Облучение образцов УФ-светом (от 365 до 248 нм) также не вызывало образования свободных радикалов в заметной концентрации<sup>16</sup>. При одновременном освещении двумя независимыми источниками, один из которых возбуждает молекулу в триплетное состояние, а второй с  $\lambda \leq 320$  нм поглощается триплетно-возбужденной молекулой пигмента, накапливаются свободные радикалы порфирина и матрицы (рис. 12, А). Выход радикалов растет с увеличением энергии второго кванта. Показано также, что в этом случае выход радикалов растет прямо пропорционально интенсивности как возбуждающего, так и дополнительного света, 578 и 302, 248 нм соответственно. Аналогично доказательство двухквантовости процесса было продемонстрировано при исследовании изменения спектра поглощения Mg-этиопорфирина<sup>86</sup>. Предварительно авторы показали, что при освещении этанольного раствора Mg-этиопорфирина при 77° К светом с  $\lambda = 578$  нм спектр поглощения его не изменяется. Точно также не наблюдается регистрируемых изменений в спектре поглощения Mg-этиопорфирина при освещении только УФ-светом ( $\lambda_2 = 365, 320, 313$  нм). При одновременном освещении суммой квантов ( $h\nu_1 + h\nu_2$ ) в течение того же промежутка времени исходные полосы поглощения Mg-этиопорфирина 542 и 578 нм падают по интенсивности и возникает новое поглощение 686 нм (рис. 12, Б). Последнее подтверждает, что как радикальные продукты, так и новое поглощение 686 нм возникает по двухквантовому механизму через триплетное состояние и что продукт 686 нм радикальной природы. Аналогичные результаты получены для дикатионов гемато- и протопорфиринов. При повышении температуры до —165° и выше для образования радикалов Mg-этиопорфирина достаточно желтого света. Регистрируемый свободный радикал представляет собой только одиночную линию хромофора<sup>11, 42</sup>, причем выход радикалов снова пропорционален квадрату интенсивности падающего света.

Авторы<sup>48–50, 93</sup> исследовали кинетику образования этильных и радикалов пигмента. Логарифмические анаморфозы кинетических кривых гибели триплетных молекул и накопления этильных радикалов и радикалов порфирина достаточно хорошо аппроксимируются двумя пересекающимися прямыми. Наблюдаемый фотопроцесс кинетически может быть рассмотрен как сумма двух реакций первого порядка с константами скорости  $k_1$  и  $k_2$  соответственно, причем  $k_1 = 10k_2$ . Показано, что на образование одного этоксильного радикала приходится один радикал порфирина<sup>49, 50</sup> в области слабых интенсивностей света. Для доказательства восстановительного характера реакции исследовалось влияние акцепторных добавок ( $O_2$ , рибофлавин) на кинетику процесса. Оказалось, что акцепторные примеси уменьшают скорость гибели триплетно-возбужденных молекул и образования радикальных продуктов, причем константа  $k_1$  значительно сильнее зависит от присутствия  $O_2$  и рибофлавина, чем  $k_2$ .

Следует отметить, что при освещении видимым светом при 77° К не наблюдалось заметного изменения выхода  $n_{st}$  триплетных молекул в зависимости от содержания кислорода в образце. Кроме того,  $\tau$  также не зависит от содержания кислорода в образце при 77° К<sup>47</sup>. Следовательно, механизм действия кислорода не включает непосредственное тушение триплетного состояния порфиринов при 77° К. Наблюдаемое торможение реакции образования радикалов этанола и порфирина в присутствии кислорода согласуется с известными данными о торможении кислородом реакций фотовосстановления тетрапиррольных пигментов<sup>59</sup>. Все в целом

данные позволяют сделать вывод, что механизм фотопрекции порфиринов в твердых растворах при 77° К заключается в переносе электрона с молекулы спирта на молекулу порфирина в триплетно-возбужденном состоянии. При этом образуется анион-радикал порфирина, который может затем присоединить протон, образуя радикал порфирина — полуводстановленную форму. Форма «686 нм» Mg-этопорфирина принадлежит радикальному иону порфирина.

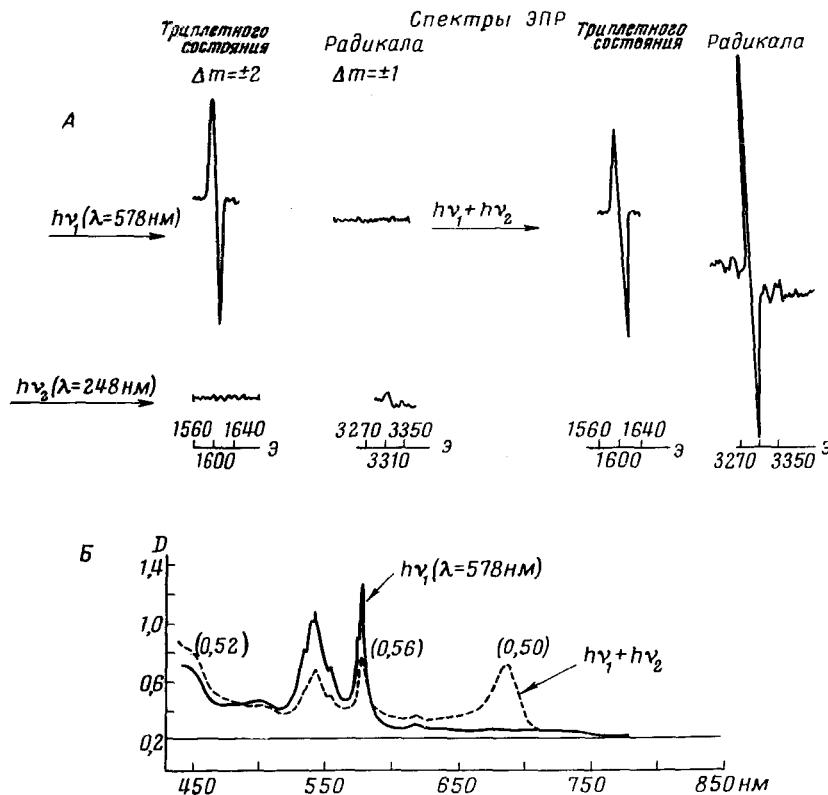


Рис. 12. Эффект двухквантовости. Образование свободных радикалов в этанол-водном растворе Mg-этопорфирина при освещении одним ( $h\nu_1$ ) и двумя ( $h\nu_1 + h\nu_2$ ) источниками света. Б — образование продукта 686 нм при тех же условиях

Таким образом, реакции фотовосстановления порфиринов при 77° К в твердых растворах протекают через триплетное состояние по двухквантовому механизму. Хотя данные получены для модельных систем и низких температур (двукиквантовая реакция в ПМТ протекает при комнатной температуре<sup>48, 49</sup>), такого рода процессы следует принимать во внимание при рассмотрении механизма реальных фотобиологических процессов, в частности фотосинтеза.

## 2. Фотохимические свойства триплетного состояния флавинов

При УФ-облучении ( $\lambda > 310 \text{ нм}$ ) этанольных растворов флавинов (рибофлавин, люмихром, люмазин) и итеридинов при 77° К обнаруживается сложный сигнал ЭПР свободных радикалов, увеличивающийся со временем освещения<sup>16</sup>. Анализ формы сигнала, образующегося в этанольном растворе флавина, показал, что он обусловлен этильным радика-

лом,  $\text{CH}_3\text{CHON}$  и одиночной линией со смешанным  $g$ -фактором. Одиночная линия по форме и  $g$ -фактору аналогична спектру ЭПР радикала, образующегося в водном растворе флавиномононуклеотида. Относительная интенсивность линий ЭПР этильного и радикала флавина остается постоянной независимо от времени облучения и интенсивности света. Скорости образования радикалов совпадают.

Для выяснения механизма реакции исследовалось влияние интенсивности света на кинетику накопления свободных радикалов и гибели триплетно-возбужденных молекул флавинов. Оказалось, что концентрация свободных радикалов в любое время пропорциональна концентрации триплетно-возбужденных молекул для различных интенсивностей света. Показано, что реакция двухквантовая и идет через высшее триплетное состояние флавинов и птеридинов.

Аналогичное поведение рибофлавина исследовали авторы работы<sup>87</sup> в фотопреакции сенсибилизированного разрушения этанола и алифатических аминокислот при 77° К. При освещении видимым светом, возбуждавшим рибофлавин в триплетное состояние, наблюдалось сенсибилизированное дезаминирование алифатических аминокислот, спектр поглощения которых лежит в области 180—220 нм. Методом прерывистого освещения доказано, что реакция протекает через триплетное состояние рибофлавина.

### 3. Триплетное возбужденное состояние в фотохимии нуклеиновых кислот и их оснований

В 1964 г. Першен, Шульман и др.<sup>88</sup> исследовали механизм образования под УФ-радиацией тиминовых свободных радикалов. В частности, показано, что концентрация свободных радикалов, образующихся в ДНК при УФ-облучении, падает при добавлении ионов двухвалентного кобальта. Из работы Берсона и Эзенберга<sup>89</sup>, с другой стороны, было известно, что ионы двухвалентных парамагнитных металлов сильно тушат фосфоресценцию нуклеотидов и нуклеозидов. Позже Ран и др.<sup>75</sup> показали, что двухвалентные металлы сильно тушат триплетное состояние ДНК. В частности, при достаточно большой концентрации ионов марганца сигнал ЭПР триплетного состояния падает практически до нуля. Флюоресценция ДНК в тех же условиях не тушится. Было показано также, что количество образующихся свободных радикалов ДНК сравнимо с концентрацией триплетно-возбужденных молекул. Поскольку при тушении триплетного состояния ДНК уменьшается выход радикалов тимила в той же пропорции, можно считать триплетное состояние тимила предшественником образования свободных радикалов. Таким образом, образование свободно-радикальных продуктов тимила в ДНК идет через триплетное возбужденное состояние.

Ламола и Миттел<sup>90</sup> при исследовании процессов тушения триплетного состояния тимила и урацила в растворе ацетонитрила показали, что фотодимеризация тимила протекает всецело через триплетное состояние тимила. Фотодимеризация урацила происходит по двум механизмам, один из которых также включает триплетное состояние.

Наконец, несколько подробнее остановимся на бифотонных реакциях производных нуклеиновых кислот: цурина, аденоцина, гуанозина в щелочных, водных и этанольных растворах при 77° К. Впервые эти реакции исследовал Элен с сотр.<sup>15, 79</sup>. Авторы показали, что при УФ-облучении ( $\lambda > 250$  нм) спиртовых и водных растворов перечисленных соединений интенсивность фосфоресценции и сигнала ЭПР триплетного состояния падает. Интенсивность флюоресценции при этом не изменяется. Скорость

тушения фосфоресценции пропорциональна квадрату интенсивности падающего света. Это соотношение не меняется в пределах концентраций  $10^{-4}$ — $10^{-3}$  М. После размораживания и последующего замораживания образца интенсивность фосфоресценции его восстанавливается на 90 %. Почти при полном тушении фосфоресценции оптические спектры поглощения, однако, не изменяются. При очень больших дозах облучения появляется новое поглощение в области 300—350 нм. Оно особенно четко проявляется в пурине.

Вместе с тем при облучении УФ-светом водных растворов пуриновых оснований обнаруживается одиночный сигнал ЭПР с *g*-фактором, близким к 2. При последующем облучении видимым светом амплитуда сигнала падает на 15—20 %. В 2 %-ном этанольном растворе наряду с синглетным спектром ЭПР появляется спектр ЭПР этильных радикалов. При этом скорость образования их по сравнению с чистым этанолом увеличивается в 30 раз. Последующее освещение видимым светом приводит к уменьшению синглетного сигнала ЭПР. Авторы показали, что скорость образования этильных радикалов в любое время после начала освещения пропорциональна мгновенной концентрации триплетно-возбужденных молекул и, с другой стороны, квадрату интенсивности падающего света.

Таким образом, в водных растворах пуриновые основания ионизуются с образованием катиона пурина и электрона. Под действием видимого света происходит отбеливание сольватированного электрона, высвобождение его из ловушек и вторичное его взаимодействие с катионами, нейтральными молекулами пурина и растворителя. В этанольных растворах развиваются две конкурирующие реакции — фотосенсибилизация и фототрив электрона, причем преобладает первая. Фотосенсибилизация, по мнению авторов, протекает с высокого возбужденного триплетного уровня и не включает в себя разложение пурина, так как спектры поглощения и флюоресценция не изменяются. Ионизация основания протекает по двухквантовому механизму. Поскольку сумма энергий триплетного уровня 3,4 эв (пурин, аденоzin, гуанозин) и второго кванта  $\lambda = 250$  нм  $\approx 5$  эв дает энергию в 8,4 эв, этого достаточно для ионизации молекулы в твердой фазе (известно, что в газовой фазе потенциал ионизации  $\sim 9$  эв)<sup>79</sup>. Поведение пиримидиновых оснований и их нуклеозидов (цитозин, цитидин, тимин) аналогично, однако скорость накопления радикалов в 5—6 раз меньше, чем для пуриновых оснований. Видимый свет не влияет на сигнал ЭПР. В присутствии этанола образуются только радикалы пиримидиновых оснований и отсутствуют этильные радикалы даже после продолжительного облучения. Очевидно, пиримидиновые основания менее чувствительны к коротковолновой радиации, а при учете явления переноса энергии от пуриновых к пиримидиновым основаниям, этот факт может быть существенным для понимания особенностей фотохимии нуклеиновых кислот и их метаболизма.

#### 4. Двухквантовые реакции ароматических аминокислот

Первое сообщение о фотосенсибилизируемом ароматическими аминокислотами разрушении алифатических соединений появилось в 1963 г.<sup>32</sup>. Механизм фотопреакции затем подробно исследован теми же авторами<sup>11, 42, 85</sup>. При освещении этанольных растворов ароматических аминокислот при 77° К нефильтрованным светом ртутной лампы сигнал ЭПР триплетного возбужденного состояния падал и наблюдалось быстрое накопление свободно-радикальных продуктов. Скорость накопления пропорциональна концентрации аминокислот в растворе, квадрату интенсивности падающего света и интенсивности триплетного ЭПР поглощения.

В аналогичных условиях образование свободно-радикальных продуктов регистрировали Птак и Дузу<sup>14, 15</sup>.

Анализ спектров ЭПР<sup>11, 42</sup> показал, что образующиеся радикалы являются продуктами разрушения этанола —  $\dot{\text{C}}\text{HO}$ ,  $\dot{\text{C}}\text{H}_3$ ,  $\text{CH}_3\dot{\text{C}}\text{HOH}$  и ароматической аминокислоты (одиночная линия с  $g$ -фактором, близким к  $g$ -фактору свободного электрона). Последний по своим характеристикам (радикал стабилен до  $-143^\circ$ ) аналогичен радикалу, образующемуся при УФ-облучении водных растворов ароматических аминокислот<sup>91</sup>. Поскольку наблюдалась корреляция кинетических кривых гибели триплетно-возбужденных молекул аминокислот и образования радикалов  $\text{CH}_3\dot{\text{C}}\text{HOH}$  и аминокислоты (наклоны кривых в логарифмическом масштабе совпадают, но при продолжительном облучении концентрация этильных радикалов растет быстрее из-за вторичных процессов) авторы<sup>32</sup> предположили участие триплетного состояния аминокислоты в фотопреакции (аналогичный процесс идет в метаноле и ЭПА). Однозначно это было доказано методом прерывистого освещения<sup>8, 9</sup>. Сэнтус и др.<sup>15, 79</sup> наблюдали двухквантовую ионизацию ароматических аминокислот в борной кислоте. Двухквантовая ионизация и двухквантовое фотосенсибилизированное разрушение алифатических аминокислот в присутствии ароматических демонстрировал в ряде работ Фесенко методом флеш-фотолиза<sup>12</sup>. Здесь важно подчеркнуть, что в присутствии ароматических аминокислот или красителей, возбуждаемых энергией много меньшей энергии ионизации алифатических аминокислот, происходит разрушение последних при суммировании квантов на триплетном уровне сенсибилизатора.

Из изложенного, таким образом, очевидны успехи метода ЭПР в исследовании сложных биологически важных молекул в триплетном возбужденном состоянии. Ясно также, что триплетное состояние существенно в химических превращениях, аккумулировании и переносе энергии в модельных системах *in vitro*. Сделать прямой вывод об участии триплетного возбужденного состояния в фотопроцессах *in vivo* на основании данных, полученных для модельных систем, трудно из-за чрезвычайной сложности реальных биологических структур и процессов. Однако структурная организация молекул, подобная двойной спирали ДНК, плотной упаковке белковых молекул или структуре хлоропластов имеет сходство с молекулярным устройством в твердых растворах. Поэтому исследование механизма реакций на молекулярном уровне в упрощенных модельных системах — растворах биологически важных молекул — на наш взгляд позволяет глубже понять физические и химические процессы, происходящие в реальных биологических системах.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. C. A. Hutchison, W. B. Mangum, *J. Chem. Phys.*, **29**, 952 (1958).
2. C. A. Hutchison, W. B. Mangum, *Tam же*, **34**, 908 (1961).
3. B. Smaller, *Nature*, **195**, 593 (1962).
4. В. Е. Холмогоров, Э. В. Баранов, А. Н. Теренин, *ДАН*, **149**, 142 (1963).
5. Х. С. Багдасарьян, В. И. Муромцев, З. А. Синицына, *Tam же*, **152**, 349 (1963).
6. S. Siegel, H. Judeikis, *J. Chem. Phys.*, **43**, 343 (1965).
7. З. П. Грибова, Л. П. Каюшин, *Биофизика*, **9**, 627 (1964).
8. Z. P. Grivova, *Electrochemische methoden und prinzipien in der Molecular-Biologie*, Jene, 1966, стр. 331.
9. O. A. Azizova, Z. P. Grivova, L. P. Kayushin, M. K. Pulatova, *Photochem. Photobiol.*, **5**, 763 (1966).
10. З. П. Грибова, В. А. Умрихин, Л. П. Каюшин, *Биофизика*, **11**, 353 (1966).
11. З. П. Грибова, Сб. Ультрафиолетовые излучение, «Наука», М., 1966, стр. 141.

12. Е. Е. Фесенко, Э. А. Бурштейн, Ю. А. Владимиров, Биофизика, 12, 616 (1967).
13. P. Douzou, M. Ptak, J. Chim. Phys., 61, 1681 (1964).
14. R. Santus, R. Guermoprez, M. Ptak, C. r., 261, 117 (1968).
15. C. Helene, R. Santus, P. Douzou, Photochem. Photobiol., 5, 127 (1966).
16. J. M. Lhoste, A. Haug, P. Hämmerich, Biochemistry, 5, 3290 (1966).
17. S. P. McGlynn, F. J. Smith, G. Cilento, Photochem. Photobiol., 3, 269 (1964).
18. A. Jablonski, Ztschr. Phys., 94, 338 (1935).
19. G. N. Lewis, D. Lipkin, T. Magel, J. Am. Chem. Soc., 63, 3005 (1941).
20. G. N. Lewis, M. Kasha, Там же, 66, 2100 (1944).
21. G. N. Lewis, M. Kasha, Там же, 67, 944 (1945).
22. А. Н. Терепин, Acta phys.-chim. USSR, 18, 210 (1943).
23. А. Н. Терепин, ЖФХ, 18, 1 (1944).
24. G. N. Lewis, M. Calvin, M. Kasha, J. Chem. Phys., 17, 804 (1949).
25. H. F. Hamerka, L. J. Oesterhoff, Mol. Phys., 1, 358 (1958).
26. M. Weisbluth, Progress in Molecular Biophysics, 17, 205 (1966).
27. J. H. van der Waals, M. S. de Groot, Mol. Phys., 2, 333 (1959).
28. M. S. de Groot, J. H. van der Waals, Там же, 3, 190 (1960).
29. Ph. Kottis, R. Lefevre, Там же, 41, 379 (1964).
31. W. A. Yager, E. Wasserman, R. M. Slatger, Там же, 37, 1148 (1962).
32. З. П. Грибова, Р. П. Евстигнеева, А. Ф. Миронов, Л. П. Каюшин, В. Н. Лузгина, А. К. Пискунов, Биофизика, 8, 550 (1963).
33. З. П. Грибова, Л. П. Каюшин, А. П. Костиков, Л. А. Сибельдина, ДАН, 193, 926 (1970).
34. M. J.-M. Lhoste, C. r., 266d, 1059 (1968).
35. J. J. Bosch, R. O. Rahn, J. W. Longworth, R. G. Shulman, Proc. Natl. Acad. Sci. US, 59, 1003 (1968).
36. R. O. Rahn, R. G. Shulman, J. W. Longworth, Там же, 53, 893 (1965).
37. R. G. Shulman, R. O. Rahn, J. Chem. Phys., 45, 2940 (1966).
38. J. Zuchlich, Там же, 52, 3586 (1969).
39. M. S. de Groot, J. A. M. Hesselman, J. H. van der Waals, Mol. Phys., 10, 241 (1965).
40. M. S. de Groot, J. H. van der Waals, Там же, 6, 545 (1963).
41. U. W. Glascock, G. P. Gourinowitch, A. I. Patsko, см. §, стр. 339.
42. З. П. Грибова, Кандид. диссерт., Ин-т биофизики АН СССР, М., 1964.
43. З. П. Грибова, Сб. Радиоспектроскопия твердого тела, Атомиздат, М., 1967, стр. 439.
44. З. П. Грибова, Л. П. Каюшин, В. А. Умрихин, ДАН, 175, 378 (1967).
45. З. П. Грибова, Л. П. Каюшин, А. А. Сибельдина, Там же, 181, 1266 (1968).
46. Г. Т. Рихирева, Сб. Свободно-радикальные процессы в биологических системах, «Наука», М., 1966, стр. 285.
47. Л. А. Сибельдина, З. П. Грибова, Л. П. Каюшин, Б. С. Маринов, ДАН, 181, 482 (1968).
48. Л. А. Сибельдина, Кандид. диссерт. Ин-т биофизики АН СССР, М., 1969.
49. Л. А. Сибельдина, З. П. Грибова, Л. П. Каюшин, Биофизика, 15, 816 (1970).
50. Л. А. Сибельдина, З. П. Грибова, Там же, 15, 1002 (1971).
51. В. Л. Левшин, Фотолюминесценция жидких и твердых веществ, Изд. тех. теорет. лит., М.—Л., 1951.
52. J. M. Lhoste, C. Helene, M. Ptak, The Triplet State, Cambridge Acad. Press, 1967, стр. 479.
53. К. Н. Соловьев, Оптика и спектроск., 10, 737 (1961).
54. К. Н. Соловьев, О строении молекул порфирина и его производных, Препринт, Минск, 1969.
55. З. П. Грибова, В. И. Токмаков, Тезисы докл. Всес. конф. Молекулярная биофизика, Пущино, 1966, стр. 162.
56. J. M. Lhoste, A. Haug, M. Ptak, J. Chem. Phys., 44, 648 (1966).
57. Ph. Kottis, R. Lefevre, J. Chem. Phys., 41, 3660 (1964).
58. А. П. Костиков, З. П. Грибова, Л. П. Каюшин, ДАН, 193, 469 (1970).
59. Г. П. Гурилович, А. Н. Севченко, К. Н. Соловьев, Спектроскопия хлорофилла и родственных соединений, Изд. Наука и техника, Минск, 1968.
60. Г. Т. Рихирева, З. П. Грибова, Л. П. Каюшин, А. В. Умрихина, А. А. Красновский, ДАН, 159, 196 (1964).
61. Г. Т. Рихирева, Л. А. Сибельдина, З. П. Грибова, Б. С. Маринов, Л. П. Каюшин, А. А. Красновский, Там же, 181, 1485 (1968).
62. B. Smaller, Rad. Research suppl., 3, 153 (1963).
63. B. Smaller, Biol. Med. Phys., 9, 225 (1963).
64. M. Ptak, P. Douzou, C. r., 257, 438 (1963).

65. M. Ptak, P. Douzou, *Nature*, **199**, 1092 (1963).
66. T. Shiga, L. H. Piette, *Photochem. Photobiol.*, **3**, 223 (1964).
67. J. E. Malig, R. Rosenheck, M. Weisbluth, *Там же*, **4**, 241 (1965).
68. T. Shiga, H. C. Mason, C. Simo, *Biochem.*, **5**, 1877 (1966).
69. Э. А. Бурштейн, *Биофизика*, **6**, 735 (1961).
70. C. Helene, R. Santus, M. Ptak, *C. r.*, **262C**, 1349 (1966).
71. T. Shiga, L. H. Piette, *Photochem. Photobiol.*, **3**, 213 (1964).
72. R. O. Rahn, J. W. Longworth, J. Eisinger, R. G. Shulman, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **51**, 1299 (1964).
73. R. O. Rahn, R. G. Shulman, J. W. Longworth, *Там же*, **53**, 893 (1965).
74. R. O. Rahn, T. Yamane, J. Eisinger, J. W. Longworth, R. G. Shulman, *J. Chem. Phys.*, **45**, 2947 (1966).
75. R. O. Rahn, R. G. Shulman, J. W. Longworth, *Там же*, **45**, 2955 (1966).
76. M. Cueron, R. G. Shulman, J. Eisinger, *The Triplet State*, Cambridge Acad. Press, 1967, стр. 505.
77. R. O. Rahn, *Photochem. Photobiol.*, **9**, 527 (1969).
78. C. Helene, P. Douzou, A. M. Michelson, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **55**, 376 (1966).
79. C. Helene, R. Santus, *Report at the Meeting on Photobiology*, Yugoslavia, sept. 1967.
80. J. M. Lhoste, A. Haug, M. Ptak, *J. Chem. Phys.*, **44**, 654 (1966).
81. A. D. McLachlan, *J. Mol. Phys.*, **5**, 51 (1962).
82. D. R. Gruber, M. W. Crimes, A. Haug, *J. Chem. Phys.*, **50**, 1623 (1969).
83. S. J. Gull, D. R. Gruber, A. Haug, *Photochem. Photobiol.*, **10**, 139 (1969).
84. З. П. Грибова, Л. П. Каюшин, Р. П. Евстигнеева, Сб. Биоэнергетика и биологическая спектрофотометрия, «Наука», М., 1967, стр. 119.
85. З. П. Грибова, Сб. Свободнорадикальные процессы в биологических системах, «Наука», М., 1966, стр. 236.
86. В. А. Умрихиин, З. П. Грибова, Тезисы докладов Совещ. по фотохимии растворов, Киев, октябрь 1969, стр. 16; *Биофизика* **17**, 156 (1972).
87. О. А. Азизова, Л. П. Каюшин, М. К. Пулатова, *Биофизика*, **11**, 970 (1966).
88. P. S. Pershan, R. G. Shulman, B. J. Wyluda, J. Eisinger, *Physics*, **1**, 163 (1964).
89. R. Bersohn, J. Esenberg, *J. Chem. Phys.*, **40**, 3175 (1964).
90. A. A. Lamola, J. P. Mittel, *Science*, **154**, 1560 (1966).
91. О. А. Азизова, *Биофизика*, **9**, 247 (1964).

Институт биологической физики  
АН СССР  
Пущино, Моск. обл.