

В.А. Помогаев, В.Я. Артюхов

Квантово-химическое исследование спектрально-люминесцентных свойств индола

Сибирский физико-технический институт им. В.Д. Кузнецова при ТГУ, г. Томск

Поступила в редакцию 8.10.2001 г.

Проведено квантово-химическое исследование спектральных и фотофизических свойств молекулы индола методом ЧПДП. Были рассчитаны константы скоростей радиационного распада k_r , внутренней $k_{вк}$ и интеркомбинационной конверсии k_{ST} . Рассматривались различные модели молекулы в нейтральном и водном растворах при низкой температуре. Полученные результаты хорошо согласуются с экспериментальными данными. В водных растворах полосы поглощения и флуоресценции индола смещены относительно нейтральных растворов в длинноволновую часть спектра.

Анализ спектрально-люминесцентных характеристик белков является одним из эффективных методов изучения их структуры и конформационных изменений. Только три аминокислотных остатка имеют спектры поглощения и флуоресценции в ближней ультрафиолетовой области (триптофан, тирозин и фенилаланин). Триптофан в этом ряду представляет особый интерес: он активнее участвует в разнообразных фотофизических и фотохимических реакциях и его вклад в спектры флуоресценции белков является доминирующим (при условии включения триптофана в белковую цепь), а положение и интенсивность его спектра флуоресценции могут значительно изменяться в зависимости от характеристик среды.

Формы спектров поглощения и люминесценции триптофана и положение максимумов определяются преимущественно хромофорным центром молекулы, индольным кольцом, без заметного вклада со стороны боковых группировок, что и определяет актуальность изучения индола. Детальное изучение различных характеристик индола, в идеальном случае, должно приводить к установлению «топографии» излучающего центра белка, его молекулярного окружения, вида полипептидной цепи. Знание абсорбционных свойств белка необходимо для выявления молекулярной структуры, установления положения энергетических уровней молекулы, правильного выбора спектральной области возбуждения люминесценции белка и оценки истинных квантовых выходов. Спектры флуоресценции дают представление об изменениях в структуре и молекулярном окружении белка.

Фотофизическим свойствам индола посвящено множество экспериментальных работ [1–4]. В частности, установлено, что в неполярных растворителях индол имеет две основные полосы поглощения: коротковолновую с $\nu \approx 46500 \text{ см}^{-1}$ с молярным коэффициентом экстинкции $\epsilon \approx 25200 \text{ М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ и длинноволновую, распадающуюся на две перекрывающиеся поло-

сы 1L_a и 1L_b в областях 37600 и 35700 см^{-1} с $\epsilon \approx 6300$ и $4100 \text{ М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ соответственно. В полярных растворителях все полосы поглощения претерпевают небольшой красный сдвиг. При комнатной температуре максимум спектра флуоресценции индола локализован при $\nu = 32470 + 32260 \text{ см}^{-1}$ в неполярных растворителях и сильно (на $3000 - 4000 \text{ см}^{-1}$) смещается в длинноволновую область при добавлении полярных компонентов (в воде наблюдали сдвиг ν до 4600 см^{-1}). В замороженном состоянии спектры флуоресценции индола в различных средах близки к спектру флуоресценции молекулы в нейтральном растворителе, а спиртовые и кислые растворы имеют высокий квантовый выход флуоресценции. Фосфоресценцию аминокислот можно наблюдать при низких температурах в области $20000 - 25000 \text{ см}^{-1}$, в зависимости от рН среды. Нерешенным остается ряд вопросов: из какого состояния происходит флуоресценция индола в различных средах; какие межмолекулярные и внутренние механизмы способствуют изменению уровней энергии и какие факторы влияют на изменения квантового выхода люминесценции индола и триптофана.

Противоречия, возникающие при интерпретации различных экспериментальных данных, могут в некоторых случаях быть разрешимы на основе детальных и всесторонних теоретических расчетов. Но, к сожалению, работ, посвященных изучению спектральных и люминесцентных характеристик молекулы индола, крайне мало, и предложенное исследование призвано частично восполнить этот пробел. Исследование проводилось в рамках стандартного квантово-химического метода частичного пренебрежения дифференциальным перекрытием (ЧПДП) со спектроскопической параметризацией [5]. Параметры подбирались для молекулы, находящейся в основном состоянии в неполярном апротонном растворителе типа циклогексана при низких температурах [6]. Абсорбционным спектрам индола в нейтральной среде соответствуют следующие переходы: два

близколежащих длинноволновых слабозапрещенных перехода в полосы S_1 ($\nu = 34630 \text{ см}^{-1}$, $\epsilon = 1160 \text{ М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$) и S_2 ($\nu = 37203 \text{ см}^{-1}$, $\epsilon = 8570 \text{ М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$); далее в диапазоне $43300\text{--}48800 \text{ см}^{-1}$ четыре разрешенных перехода – S_4 ($\nu = 43309 \text{ см}^{-1}$, $\epsilon = 25465 \text{ М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$), S_7 ($\nu = 45137 \text{ см}^{-1}$, $\epsilon = 27440 \text{ М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$), S_9 ($\nu = 46887 \text{ см}^{-1}$, $\epsilon = 13250 \text{ М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$) и S_{12} ($\nu = 48456 \text{ см}^{-1}$, $\epsilon = 14450 \text{ М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$). Молярный коэффициент экстинкции рассчитывался по оценочной формуле $\epsilon_{\text{max}} = 4,63 \cdot 10^4 f$ [7]. Дипольный момент равен 2,2 D, что полностью совпадает с экспериментальными данными и связано с наличием неподеленной электронной пары, локализованной на атоме азота. Значение расчетного потенциала ионизации 7,9 эВ также очень близко к экспериментальным величинам 7,8 эВ.

Общая схема фотофизических процессов в молекуле индола изображена на рис. 1. Согласно принятой классификации электронных состояний в нейтральных растворителях уровню S_1 (α -полоса) должен

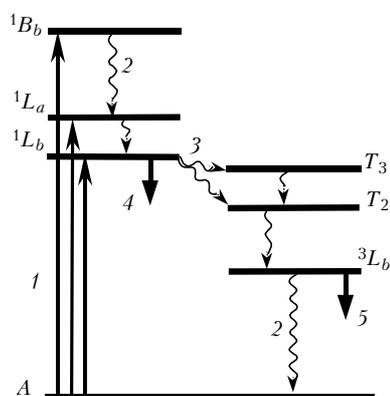


Рис. 1. Общая схема нижних возбужденных электронных состояний молекулы индола и происходящих в ней фотофизических процессов: 1 – поглощение; 2 – внутренняя конверсия; 3 – интеркомбинационная конверсия; 4 – флуоресценция; 5 – фосфоресценция. Процессы колебательной релаксации не отражены на схеме

соответствовать переход ${}^1L_b \leftarrow A$, а S_2 (p -полоса) – переход ${}^1L_a \leftarrow A$. Сведения о поляризации таких переходов разноречивы [1]. Предполагается, что направление поляризации перехода в α -полосу составляет угол с длинной осью молекулы от нуля до нескольких десятков градусов, а переход в p -полосу более ориентирован по короткой оси. Анализ результатов расчетов показал, что угол между направлением обоих переходов составляет лишь $11,8^\circ$ (относительно длинной оси молекулы ${}^1L_b \leftarrow A$ имеет $11,6^\circ$, а ${}^1L_a \leftarrow A$ – $23,4^\circ$).

Более интенсивны коротковолновые переходы, попадающие в диапазон рассматриваемых, имеют $|\epsilon| > 4,5$ и соответствуют β -полосам. Из четырех электронных состояний только переход на S_{12} -уровень явно поляризован вдоль длинной оси молекулы ($1,6^\circ$) и идентифицируется как ${}^1B_b \leftarrow A$. Классифицировать остальные уровни возможно только относительно друг друга. Переход в S_4 происходит под углом $21,5^\circ$ к длинной оси молекулы и идентифицируется как

${}^1B_b \leftarrow A$, а в S_9 ($71,0^\circ$) – как ${}^1B_a \leftarrow A$. Самый интенсивный переход в S_7 ($40,1^\circ$) нами отнесен к ${}^1B_b \leftarrow A$ типу, поскольку составляет с длинной осью угол меньше 45° . Полоса поглощения, соответствующая этому переходу, частично перекрывает другие коротковолновые полосы поглощения, влияние которых сводится только к удлинению плеча спектра. Именно этот переход (см. рис. 1) сопоставлен с экспериментально фиксируемой полосой 1B_b . На схеме отсутствуют энергетические уровни, на которые переход запрещен.

В водных растворах изменение спектра поглощения индола связывают с влиянием водородной связи. Для определения места образования водородной связи использовался метод молекулярного электростатического потенциала (МЭСП). Предполагается, что молекула воды ориентирована к молекуле индола таким образом, что одна O–H-связь направлена через точку минимума к атому или связи, а другая O–H-связь составляет угол с первой 106° . Расстояние между молекулами ограничено ван-дер-ваальсовскими сферами атомов C и O (его значение принято равным $2,85 \text{ \AA}$ [8]). В этом случае ближайший атом водорода молекулы воды не может находиться на расстоянии менее $1,9 \text{ \AA}$ от атома углерода.

Для основного состояния индола на таком расстоянии перпендикулярно плоскости молекулы обнаруживаются два глубоких минимума (крестики на рис. 2) в районе атома C_3 ($-58,8 \text{ кДж/моль}$) и связи $C_5\text{--}C_6$ ($-46,8 \text{ кДж/моль}$).

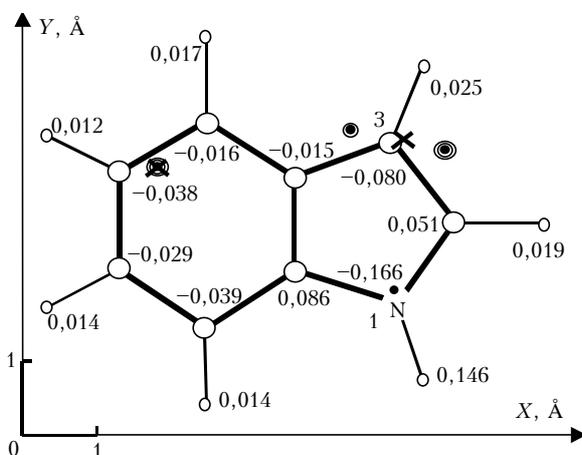


Рис. 2. Геометрия, минимумы МЭСП ($Z = 1,9 \text{ \AA}$ – отмечены крестиком, $Z = 1,5 \text{ \AA}$ – концентрическими кольцами, каждое кольцо 20 кДж/моль) и эффективные заряды на атомах для молекулы индола в основном состоянии

Ближе к плоскости индола ($1,5 \text{ \AA}$) расположены два минимума атома C_3 ($-47,8$ и $-55,4 \text{ кДж/моль}$) и один минимум связи $C_5\text{--}C_6$ ($-63,4 \text{ кДж/моль}$). Таким образом, в районе $C_5\text{--}C_6$ -связи связь O–H направлена перпендикулярно плоскости индола через точку минимума, а в районе атома C_3 связь O–H направлена через точку минимума (расположенного на расстоянии $1,9 \text{ \AA}$ от молекулы) к атому. Две другие H-связи расположены симметрично относительно плоскости молекулы. Весьма интересным фактом является отсутствие около атома азота глубокого минимума

($-29,4$ кДж/моль), который должен обуславливаться наличием неподеленной пары электронов. Но большую отрицательную плотность заряда на азоте ($-0,166$ e) компенсирует большая положительная заряженность его водорода ($0,146$ e), в то время как минимум МЭСП около атома C_3 обусловлен разницей в плотностях заряда углерода ($-0,080$ e) и его водорода ($0,025$ e) (см. рис. 2). С учетом четырех Н-связей получены следующие абсорбционные переходы: ${}^1B_b \leftarrow A$ (44520 см $^{-1}$), ${}^1L_a \leftarrow A$ (36305 см $^{-1}$), ${}^1L_b \leftarrow A$ (34090 см $^{-1}$). При сравнении результатов, полученных в нейтральном растворителе и в воде, видно, что для всех полос произошел красный сдвиг спектра, а взаимное расположение уровней осталось прежним. В молекуле нет центров с большой локализованной плотностью заряда, что обуславливает небольшие значения минимумов МЭСП, а следовательно, и очень слабые водородные связи. Предложенная модель есть крайний случай взаимодействия с водой и поэтому дает в спектре наибольший красный сдвиг. В реальных условиях, видимо, невозможно установление всех четырех Н-связей из-за высокой подверженности их разрушению за счет других межмолекулярных процессов.

Известно, что после процесса поглощения (франк-кондоновский переход) происходит колебательная релаксация с переходом молекулы в равновесное возбужденное состояние. При этом возможно изменение геометрической структуры молекулы. Поскольку молекула индола плоская, то изменение в ее геометрии связано только с изменением длин связей, которые рассчитываются согласно выражению $\Delta R_{AB} \approx -0,46 \Delta R_{AB}$ [5], где ΔR – изменение расстояния между атомами, а ΔP – изменение заселенности (порядков) связей при переходе из одного состояния в другое. Рассчитанный дипольный момент в 1L_b -состоянии составляет $3,1$ D (в [3] встречаются значения $2,9$ – $3,3$ D и даже $5,0$ D, но последняя величина, видимо, завышена). Как показали расчеты, изменение геометрии в возбужденном состоянии приводит к изменению поляризации излучения. Направление поляризации радиационного распада уровня 1L_b с $\nu = 32445$ см $^{-1}$ почти совпадает с длиной осью молекулы, имея с ней небольшой угол ($\alpha = 4,8^\circ$), а константа скорости этого процесса $k_r = 2,5 \cdot 10^7$ см $^{-1}$ (см. рис. 1). Радиационный переход с 1L_a направлен под углом ($\alpha = 28,9^\circ$) к длинной оси молекулы, но он мало вероятен, поскольку константа скорости внутренней конверсии ($k_{вк} = 3,5 \cdot 10^{11}$) на 1L_b более чем на три порядка превышает $k_r = 1,6 \cdot 10^8$ см $^{-1}$. Заселенность триплетных уровней обеспечивается хорошей спин-орбитальной связью (константы скорости интеркомбинационной конверсии $k_{ST3} = 2,5 \cdot 10^8$ и $k_{ST2} = 1,8 \cdot 10^8$), что обеспечивает возможность фосфоресценции из нижней триплетной полосы 3L_b с $\nu \approx 21000$ см $^{-1}$.

При возбуждении в первую полосу поглощения происходит перераспределение электронной плотности с пятичленного цикла на бензольное кольцо (рис. 3). При этом уменьшается на плотность заряда на C_3 ($\Delta Q = 0,031$ e) и атоме азота ($\Delta Q = 0,059$ e). Такое

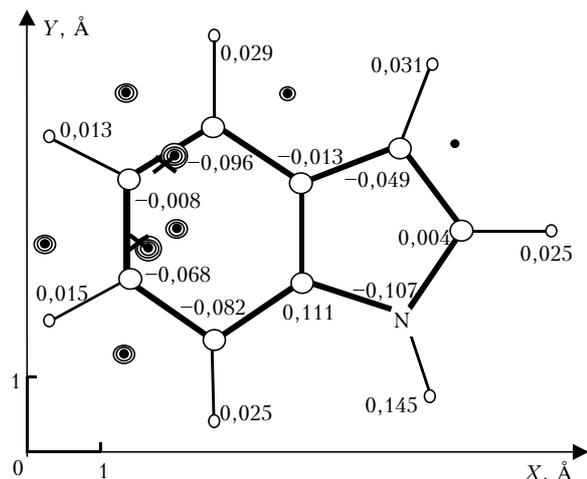


Рис. 3. Геометрия, минимумы МЭСП ($Z = 1,9$ Å – отмечены крестиком, $Z = 1,5$ Å – концентрическими кольцами, каждое кольцо 20 кДж/моль) и эффективные заряды на атомах для молекулы индола в первом возбужденном состоянии

перераспределение плотности ведет к сильному росту заряда на атоме C_5 ($\Delta Q = -0,080$ e), а также увеличивает заряд на атомах C_7 ($\Delta Q = -0,039$ e) и C_8 ($\Delta Q = -0,043$ e). Также происходит перенос заряда внутри пятичленного кольца с азота на C_2 ($\Delta Q = -0,047$ e) и внутри шестичленного цикла с C_6 ($\Delta Q = 0,030$ e) на другие атомы. В результате таких процессов исчезает совершенно минимум МЭСП вблизи этого атома, происходит углубление минимумов МЭСП ($-78,2$ кДж/моль) в районе связи C_5 – C_6 и появление минимума в районе локализации атома C_7 ($-79,3$ кДж/моль) на высоте $1,6$ Å над плоскостью молекулы. Через эти точки минимумов МЭСП предполагалось установление водородной связи в первом возбужденном состоянии. Наличие минимумов МЭСП, находящихся на расстоянии $1,2$ Å над плоскостью молекулы, не рассматривалось в качестве реакционных центров: во-первых, их значения меньше, чем у ранее рассмотренных, и взаимодействие по ним менее вероятно, во-вторых, они лежат близко к поверхности молекулы, что сильно затрудняет взаимодействие с водой.

Расстояние между величинами минимумов МЭСП составляет примерно 1 Å, что, естественно, не позволяет одновременно подвести две молекулы воды с одной стороны плоскости из-за стерического сопротивления сближению между атомами кислорода. Создаются три возможные ситуации установления водородных связей: 1-я, 2-я – две молекулы воды подходят к одной из точек минимумов над и под плоскостью, 3-я – две молекулы воды подходят к разным точкам минимумов, но одна над, другая под плоскостью. Расчеты всех трех вариантов показали, что происходит смещение частоты излучения до 100 см $^{-1}$. Сам факт существования двух близкорасположенных минимумов МЭСП создает ситуацию, когда могут возникать различные конфигурации молекулы индола с сольватной оболочкой. Под влиянием различных

растворителей и изменения температуры смещение частоты излучения может оказаться и больше чем 100 см^{-1} . Может также возникнуть ситуация с наличием двойной флуоресценции, но излучение будет происходить из одного состояния в разном молекулярном окружении. Следует отметить, что реакционная способность молекулы индола в возбужденном состоянии возрастает с увеличением значений минимумов МЭСП, что определяет возможность установления более сильной связи с растворителем.

Хорошая согласованность экспериментальных и расчетных результатов позволяет сделать ряд заключений. В полярном растворителе действительно происходит небольшой красный сдвиг спектра, в возбужденном состоянии молекула проявляет более реакционные способности, спектр флуоресценции в водной среде не сильно сдвигается в красную сторону, что соответствует замороженному состоянию раствора, а двойная флуоресценция может возникать вследствие излучения различных конфигураций комплексов молекул индола и растворителя.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 00-03-81139-а).

V.A. Pomogaev, V.Ya. Artukhov. Quantum-chemical study of spectral-luminescent properties of indole.

The quantum-chemical research of spectral and photophysical properties of the indole by the INDO method is carried out. The constants of radiative degradation rate k_r , internal transition k_{BK} , and intercombination conversion k_{ST} were designed. Various models of molecules in neutral and water solutions at low temperature were considered. The received results are well agreed to experimental data. In water solutions the indole absorption and fluorescence band are displaced to the longwave spectral range relative to neutral solutions.

1. Демченко А.П. Люминесцентная динамика структуры белков. Киев: Наукова думка, 1988. 276 с.
2. Бурштейн Э. А. Люминесценция белковых хромофоров: модельные исследования // Итоги науки и техники. Сер. Биофизика. Т. 6. М., 1976. 214 с.
3. Черницкий Е.А. Люминесцентная и структурная лабильность белков в растворе и клетке. Минск: Наука и техника, 1972. 280 с.
4. Short K.W. and Callis P.R. Evidence of pure 1L_b fluorescence from redshifted indole-polar solvent complexes in a supersonic jet // J. Chem. Phys. 1998. V. 108. № 24. P. 10189–10196.
5. Майер Г.В., Артюхов В.Я., Базыль О.К., Копылова Т.Н., Кузнецова Р.Т., Риб Н.Р., Соколова И.И. Электронно-возбужденные состояния и фотохимия органических соединений. Новосибирск: Наука, 1997. 232 с.
6. Артюхов В.Я., Галеева А.И. Спектроскопическая параметризация метода ЧПДП // Изв. вузов. Физ. 1986. № 11. С. 96–100.
7. Нурмухаметов Р.Н. Поглощение и люминесценция ароматических соединений. М.: Химия, 1971. 216 с.
8. Зефиоров Ю.В., Зоркий П.М. О сокращении межмолекулярных контактов атомов в кристаллах // Ж. структ. химии. 1976. Т. 17. № 6. С. 994–998.