

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА КВАНТОВО–ХІМІЧНІ РОЗРАХУНКИ СПЕКТРАЛЬНО–ЛЮМІНЕСЦЕНТНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ МОЛЕКУЛИ ПРОЛІНУ

М. І. Мигович, В. А. Кельман
Інститут електронної фізики НАН України,
вул. Університетська, 21, Ужгород, 88017, Україна
e-mail: marmigovich@gmail.com

(Отримано 20 квітня 2017 р.; в остаточному вигляді — 22 червня 2017 р.)

Досліджено спектри фотолюмінесценції молекули проліну в порошокподібному стані та водному розчині, збуджені дією лазерного опромінення. Визначено спектральні області та максимуми інтенсивності люмінесценції. Виміряно спектральну залежність коефіцієнта молярної екстинкції водного розчину проліну. З використанням квантово-хімічних методів розраховано електронний спектр поглинання, дипольний момент, по-атомний розподіл зарядів молекули проліну. Порівняно експериментальні дані з теоретичними.

Ключові слова: пролін, фотолюмінесценція, спектри поглинання, квантові переходи, верхня зайнята та нижня вакантна молекулярні орбіталі, розподіл зарядів.

PACS number(s): 87.15.mq

ВСТУП

Важливе місце в живих організмах займають амінокислоти — гетерофункціональні сполуки, у структуру яких входить карбоксильна COOH та аміно NH_2 групи. У водних розчинах амінокислоти перебувають у вигляді цвіттер-йонів. Синтез колагену — основного білка сполучної тканини — визначається вмістом α -амінокислот (проліну та лізину) і їх гідроксипохідних. Загалом, властивості білків визначаються характеристиками амінокислот [1]. Наприклад, флуоресцентні властивості колагену зумовлені такими амінокислотами, як фенілаланін, пролін, глутамін, гістидин, гліцин, метіонін [2]. Отримано флуоресцентні білки різного спектрального складу, які використовують як маркери в дослідженні клітин живих організмів [3]. До таких належить зелений флуоресцентний білок, що складається з 238 амінокислотних залишків [4].

У багатьох фотофізичних процесах у складних органічних молекул (СОМ) беруть участь основний та перший збуджений синглетні стани, відомості про які можна отримати вивченням спектрів поглинання та люмінесценції [5]. Також важливе місце займають дослідження СОМ у високозбуджених станах. При цьому можна спостерігати флуоресценцію типу $S_2 \rightarrow S_0$ [6–9]. Спектрально-люмінесцентні властивості амінокислот є предметом уваги багатьох дослідників. Зокрема, спектри поглинання та люмінесценції деяких амінокислот досліджено в [10–12]. Уперше показано, що спектри поглинання та збудження не збігаються в [11]. Серед найбільш досліджених є ароматичні амінокислоти [13–15], а індольне кільце триптофану найбільш чутливий флуорофор. Вплив рН на люмінесцентні властивості амінокислот вивчено у працях [12, 13]. Установлено, що за низького рівня рН квантовий вихід люмінесценції зменшується, а за високого — зростає.

Спектроскопічні властивості СОМ можна досліджувати теоретично з використанням значної кількості програмних продуктів. Сучасні методи комп'ютерної хімії реалізовані в програмному комплексі HyperChem [16]. Такі квантово-хімічні розрахунки ґрунтуються на наближеному розв'язку рівняння Шредингера.

Структурні характеристики молекул є також предметом інтенсивного вивчення. Геометричні параметри, розподіл зарядів, дипольні моменти, електронні спектри поглинання з використанням напівемпіричних та неемпіричних методів досліджено в [17–22]. З використанням теорії функціонала густини в [23] розраховано електронні переходи для перших двох збуджених станів індолу в газовій фазі й середовищі білка. Виявлено зсув у червону ділянку спектра електронних переходів індолу в середовищі білка порівняно з газовою фазою. Довжини хвиль першого синглет-синглетного переходу амінокислотних залишків молекули колагену у водному середовищі з використанням квантово-хімічних методів розраховано у [21]. Помічено відмінності між ізольованими й сольватованими молекулярними структурами. Вплив розчинника на спектри поглинання вивчено в працях [24, 25]. За наявності полярного розчинника спостерігається розширення першого синглет-синглетного переходу, а також у розчинниках різної полярності по-різному змінюється інтенсивність і форма смуг поглинання. Зі збільшенням полярності розчинника відбувається батохромне зміщення $\pi \rightarrow \pi^*$ переходів.

Не менш важливу зацікавленість для дослідників становлять також інші амінокислоти, які входять у структуру живих організмів, тобто складають полімерний ланцюг білкових макромолекул. У цій роботі вивчаються спектроскопічні властивості іміноаமிнокислоти проліну ($\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_2$) — гетерофункціональної сполуки, у структуру якої входить іміногрупа NH та карбоксильна група COOH . Вона відрізняється від інших амі-

нокислот наявністю піролідинового кільця. Структура молекули проліну показана на рис. 1.

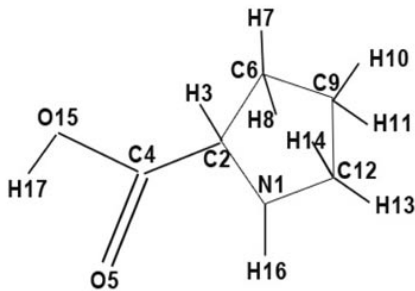


Рис. 1. Структура молекули проліну.

МЕТОДИКА ДОСЛІДЖЕННЯ

Експериментальна частина. Для експериментальних досліджень використано порошок проліну виробництва Sigma Aldrich чистотою 99.4%. У роботі застосовано селективне збудження флуоресценції порошку проліну та його водного розчину лазерним опроміненням. Для збудження фотолюмінесценції використано твердотільний переналаштовуваний за довжиною хвилі титан-сапфіровий лазер CF 131A ($\lambda = 253$ нм). Тривалість лазерних імпульсів становила 10 нс, частота повторення 10 Гц, енергія імпульсів — 20 мкДж. Збудження спектрів рідинних зразків здійснювали з використанням кювет 4 см. Збуджувальне неспроможне випромінювання наводили кювету зверху. Приготування концентрації розчину здійснювалося так, щоб поглинання збуджувального лазерного випромінювання на довжині 4 см було незначним, а зона фотолюмінесценції у вигляді люмінесцентної нитки, орієнтованої вертикально, була однорідною за яскравістю. Крім того, сама зона фотолюмінесценції прилягала до вихідного вікна кювети, щоб усунути ефект перепоглинання. Реєстрацію спектрів фотолюмінесценції порошкових зразків здійснювали на відбиванні. Зображення люмінесцентної зони кварцовою лінзою $f = 75$ мм з масштабуванням 1:1 проектували на вхідну щілину монохроматора MS 7504 з дифракційною ґраткою 150 штр/мм та зворотною дисперсією 8.78 нм/мм. Інтегровані в часі спектри люмінесценції реєстрували CCD — камерою та ПК. Вимірювали спектри поглинання водного розчину в ближній УФ-ділянці дейтерієвою лампою DDC-30.

КВАНТОВО-ХІМІЧНІ РОЗРАХУНКИ

Квантово-хімічні розрахунки проводили з використанням програмного пакета HyperChem, який містить різні методи й наближення для моделювання молекули, оптимізації геометрії, електронної будови, спектроскопічних та енергетичних параметрів. Оптимізували молекулярну геометрію молекули проліну напі-

вемпіричним методом РМЗ. Для цього використано алгоритм Флетчера-Рівеса зі значенням норми градієнта 0.01 ккал/моль ($\text{Å}\cdot\text{моль}$). Точність результату тим вища, чим менше значення норми градієнта. При значенні 0.01 отримуємо дані, які за подальшого зменшення градієнта залишаються незмінними [26]. Метод РМЗ забезпечує достатню точність отриманих результатів [27].

В основі напівемпіричних обчислювальних методів лежить метод наближення лінійної комбінації атомних орбіталей для розрахунку молекулярних орбіталей (валентне наближення), тобто враховуються тільки валентні електрони, а внутрішні електрони вважаються локалізованими на атомних орбіталях. Усі напівемпіричні методи є методами нехтування диференціальним перекриттям, тобто при розрахунку оптимальним геометрії не враховуються кулонівські інтеграли відштовхування. Електронні спектри розраховані в межах спектрального наближення ZINDO/S. Це параметризований метод для відтворення УФ і видимих оптичних переходів за врахування конфігураційних взаємодій. У розрахунках електронних переходів враховано конфігураційну взаємодію між 10 зайнятими та 10 вакантними молекулярними орбіталями.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Утворення електронно-збуджених станів відбувається завдяки поглинанню світла хромофорною групою молекули, що супроводжується електронними переходами з верхньої зайнятої на нижню вакантну молекулярну орбіталь. За дії УФ-опромінення збуджуються електронні оболонки молекул, що зумовлено переходами валентних σ та π електронів, а також неспарених n електронів (не беруть участі в утворенні зв'язку) з основного стану в збуджений.

Спектральну залежність коефіцієнта молярної екстинкції водного розчину проліну зображено на рис. 2.

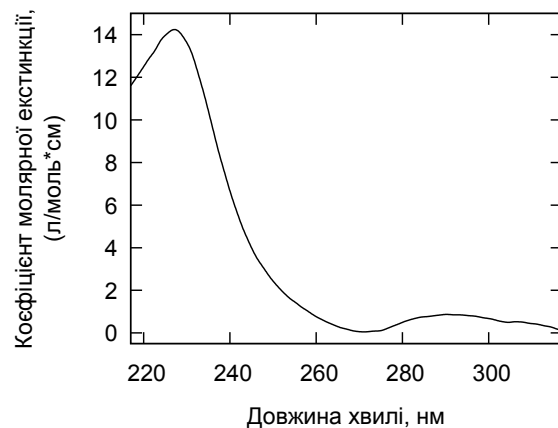


Рис. 2. Залежність коефіцієнта молярної екстинкції водного розчину проліну від довжини хвилі.

Значення коефіцієнта молярної екстинкції розраховано зі співвідношення $\zeta = -1/(lc) \cdot \ln \tau$ де $\tau = I/I_0$ — коефіцієнт пропускання, c — концентрація зразка в розчині (моль/л), l — товщина кювети в см, I , I_0 — інтенсивності випромінювання, що пройшло крізь кювету з розчином і без нього відповідно. У поглинання амінокислот в УФ-ділянці роблять свій внесок не тільки $\pi \rightarrow \pi^*$, але й $n \rightarrow \pi^*$ переходи. Вони пов'язані з тим, що хромофором амінокислот є карбонільна група $C=O$ і на p орбіталі кисню (n рівень) розташована неподілена пара електронів, яка не бере участі в утворенні зв'язку з вуглецем, і електрон від неподіленої пари кисню попадає на розрихлювальну

π^* орбіталь.

Головний максимум поглинання розчину проліну спостерігається при 227 нм. Також на спектрі поглинання бачимо незначний пік при 290 нм. Довгохвильові піки на спектрах поглинання зазвичай характерні для ароматичних амінокислот, які містять у своїй структурі спряжені $C=C$ зв'язки [15]. Цей пік може бути пов'язаний з відсутністю в молекули проліну первинної аміногрупи та наявністю піролідинового кільця. Особливості спектра поглинання — довжина хвилі максимуму поглинання λ_{\max} (погл.) та відповідне їй значення коефіцієнта молярної екстинкції наведені в таблиці 1.

λ_{\max} (погл.), нм	ξ_{\max} , л/(моль·см)	λ_{\max} (люм.), нм		$E(S_1)$, eV
		Порошок	Розчин	
227	14.2	393	448	4.1
290	1.12			

Таблиця 1. Особливості спектрів фотопоглинання та фотолюмінесценції молекули проліну.

Отримані спектри фотолюмінесценції проліну показано на рис. 3:

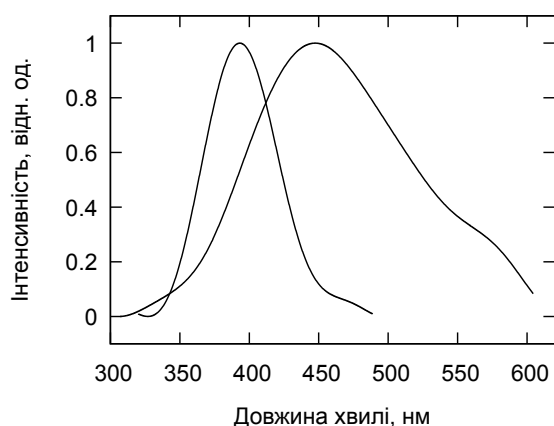


Рис. 3. Нормовані спектри фотолюмінесценції молекули проліну: 1 — порошок, 2 — водний розчин.

Спостережувані смуги фотолюмінесценції є результатом переходів зі збудженого синглетного π^* -стану на коливні рівні основного π -стану. Спостерігаються відмінності отриманих спектрів у водному розчині та порошковому зразку. Головний максимум та довгохвильовий край спектра фотолюмінесценції водного розчину зсунуто у довгохвильову область. Також для рідинних зразків спостерігається ширша смуга випромінювання. Це, можливо, пояснюється тим, що в розчинах кожна молекула оточена кількома молекулами розчинника, дипольні моменти якого створюють локальні електричні поля, а також спостерігається збільшення значення дипольного моменту збудженого стану порівняно з основним станом. Енергія електронних переходів за наявності зовнішнього електричного поля змінюється, і відповідне зміщення рівнів приводить до зміщення частот оптичних переходів із випромінюванням у довгохвильову область. Особливості спектрів фотолюмінесценції — довжина

хвилі максимуму випромінювання λ_{\max} , а також значення енергії першого збудженого синглетного стану $E(S_1)$ наведені в таблиці 1. Енергії $E(S_1)$ визначені знаходженням абсциси точки перетину довгохвильового краю кривої поглинання та короткохвильового краю кривої фотолюмінесценції.

Як бачимо, не спостерігається дзеркальної симетрії спектрів поглинання та фотолюмінесценції як наслідку неплоскої будови основного S_0 та синглетного збудженого електронного стану S_1 . Про відсутність дзеркальної симетрії молекул неплоскої будови згадується у [28]. Розрахована тут величина квантового виходу молекули проліну з урахуванням багатьох факторів визначених під час експерименту, становить $2.55 \cdot 10^{-7}$.

Розрахований електронний спектр поглинання зображено на рис. 4.

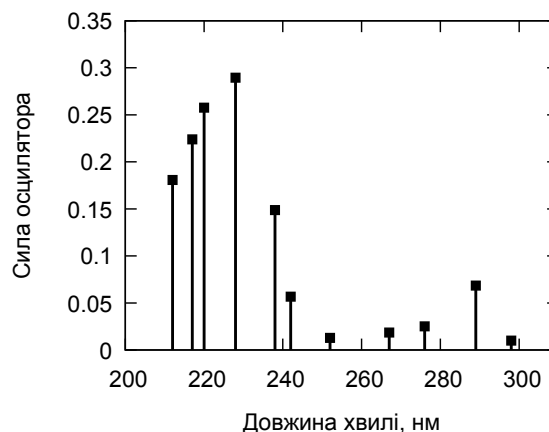


Рис. 4. Електронний спектр поглинання проліну.

На спектрі поглинання спостерігається смуга, зумовлена переходами при 267 нм, 276 нм, 289 нм, 298 нм, з інтенсивним максимумом при 289 нм (перехід ВЗМО→НВМО, табл. 2).

Довжина хвилі, нм	Сила осцилятора	Квантові переходи
298	0.0099	ВЗМО→НВМО
289	0.0685	ВЗМО→НВМО
276	0.0251	ВЗМО-1→НВМО
267	0.0185	ВЗМО-2→НВМО
252	0.0128	ВЗМО-1→НВМО
242	0.0567	ВЗМО→НВМО+1
238	0.1488	ВЗМО→НВМО+2
228	0.2895	ВЗМО-1→НВМО+2
220	0.2576	ВЗМО-2→НВМО+1
217	0.2240	ВЗМО-3→НВМО

Таблиця 2. Розрахований електронний спектр поглинання проліну.

Основний внесок у цю смугу поглинання дає перехід з верхньої зайнятої молекулярної орбіталі (ВЗМО) на нижню вакантну молекулярну орбіталь (НВМО). Верхня зайнята молекулярна орбіталь локалізована практично по всій молекулі, крім карбоксильної групи, і має зв'язувальний характер. Нижня вакантна молекулярна орбіталь локалізована на карбоксильній групі COOH. Найбільш інтенсивна смуга поглинання спостерігається в короткохвильовій області, у яку дають внесок переходи при 217 нм, 220 нм, 228 нм, 238 нм, 242 нм, 252 нм з головним максимумом при 228 нм (ВЗМО-1→НВМО+2). ВЗМО-1 локалізована на атомі азоту та карбоксильній групі, НВМО+2 — на атомах піролідинового кільця і має розпушувальний характер. Сили осциляторів відповідних переходів наведені в таблиці 2. Оскільки енергія НВМО додатна, то молекула проліну має нуклеофільні властивості та негативну спорідненість з електроном. Порівнявши розраховані спектри поглинання з експериментальними, можна зробити висновок про те, що вони досить добре узгоджуються між собою як у спектральному розміщенні довгохвильових і короткохвильових смуг поглинання, так й у співвідношенні їх інтенсивностей. Розраховані значення ширини енергетичної щільності (табл. 3) непогано співпадають зі значеннями $E(S_1)$ (табл. 1).

Параметр	Числове значення
μ , Д	2.506
$E(\text{ВЗМО})$, eV	-3.1
$E(\text{НВМО})$, eV	0.8
ΔE , eV	3.9

Таблиця 3. Фізико-хімічні параметри молекули проліну.

Значення ефективних зарядів на атомах та електронна густина наведені в табл. 4.

Аналіз розрахованого поатомного розподілу зарядів показує, що сумарний заряд молекули дорівнює нулеві. Це свідчить про високу якість розрахунків у межах використаних наближень. Сумарний заряд карбоксильної та іміногрупи незначний (-0.32 e), при тому на окремих атомах значення зарядів становить -0.54 e. Отже, тут відбувається перерозподіл зарядів усередині кожної із груп. Значний від'ємний заряд на атомі азоту іміногрупи NH свідчить про її електроноакцепторні властивості. На всіх атомах водню зосереджений позитивний заряд, як результат великої електронегативності атомів кисню та азоту. Також велику

активність мають атоми кисню карбоксильної групи, про що свідчать значення їх часткових зарядів.

На основі отриманих зарядових розподілів був розрахований дипольний момент молекули проліну (табл. 3). Дипольний момент як векторна величина чутливий до зміни структури молекули. В амінокислот, у яких наявні ароматичні фрагменти, а також заряджені групи на кінцях бокових радикалів, спостерігаються набагато більші значення дипольних моментів [17].

Атом	Заряд, e	Електронна густина, Q
N1	-0.348778	5.348779
C3	0.135349	3.864651
C4	0.491493	3.508508
O5	-0.543914	6.543914
C6	0.008045	3.991955
C9	-0.002965	4.002965
C12	0.074196	3.925804
O15	-0.320947	6.320946
H3	0.032436	0.967564
H10	0.006194	0.993806
H11	0.012119	0.987881
H7	0.010477	0.989523
H13	0.016380	0.983620
H14	0.014364	0.985636
H8	0.017480	0.982520
H16	0.156769	0.843231
H17	0.241303	0.758697

Таблиця 4. Розраховані ефективні заряди на атомах та електронна густина молекули проліну.

ВИСНОВКИ

Досліджено та проаналізовано спектри фотолюмінесценції та фотопоглинання молекули проліну. На спектрі фотолюмінесценції водного розчину виявлено більшу ширину спектрів та довгохвильовий зсув головного максимуму випромінювання порівняно зі спектрами фотолюмінесценції порошку, що пов'язано з впливом розчинника на молекулу проліну. Знаходженням абсциси точки перетину довгохвильового краю кривої поглинання та короткохвильового краю кривої фотопоглинання визначено енергію першого збудженого синглетного стану молекули проліну — 3.9 eV.

Із використанням методів квантової хімії розраховано електронні спектри поглинання молекули проліну, які непогано узгоджуються з експериментальними даними. Установлено, що довгохвильова смуга поглинання, яка відповідає за перший збуджений синглетний стан, в основному, зумовлена переходами з верхньої зайнятої молекулярної орбіталі на нижню вакантну молекулярну орбіталь. Сукупно ці дані визначають детальний склад смуг поглинання та їх походження.

- [1] Т. А. Романова, П. В. Аврамов, *Биомедицин. хим.* **50**(1), 56 (2004).
- [2] Р. Ш. Затрудина, Е. П. Конькова, *Хим. физ. мезоскопия* **13**, 3 (2011).
- [3] О. П. Демченко, *Біотехнологія* **2**, 3 (2009).
- [4] Н. Н. Зубова, А. Ю. Булавина, А. П. Савицький, *Усп. биол. хим.* **43**, 163 (2003).
- [5] С. Левченко *та ін.*, *Вісн. Київ. нац. ун-ту ім. Т. Шевченка, сер. "Фізика"* **12**, 19 (2011)
- [6] Ю. М. Лопаткін, *Вісник Сум. держ. ун-ту, сер. "Фізика, математика, механіка"* **2**, 5 (2008).
- [7] T. N. Sakun, *Sensor Electron. Microsyst. Technol.* **11**(2), 23 (2014).
- [8] P. O. Kondratenko, Yu. M. Lopatkin, T. N. Sakun, *J. Nano Electron. Phys.* **3**(3), 116 (2011).
- [9] P. O. Kondratenko, Yu. M. Lopatkin, T. N. Sakun, *J. Nano Electron. Phys.* **4**, 02017 (2012).
- [10] F. W. Teale, G. Weber, *J. Biochem.* **65**, 3 (1957)
- [11] J. R. Albani, *J. Fluoresc.* **17**, 406 (2007).
- [12] Paul Held, *BioTek. Application note. Rev. 4/18/03.*
- [13] A. P. Osysko, P. L. Muiño, *J. Biophys. Chem.* **2**, 316 (2011).
- [14] Dirk Nolting *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 12 (2007).
- [15] М. І. Мигович, В. А. Кельман, *Укр. фіз. журн.* **59**, 581 (2014).
- [16] М. Е. Соловьев, М. М. Соловьев, *Компьютерная химия* (СОЛОН-Пресс, Москва, 2005).
- [17] М. С. Кондратьев, А. А. Самченко, В. М. Комаров, А. В. Кабанов, *Математика. Компьютер. Образование. Сб. трудов XII международной конференции* (Научно-издательский центр "Регулярная и хаотическая динамика", Ижевск, 2005).
- [18] Н. Годжаев, И. Алиева, С. Демухамедова, *J. Qafqaz Univ.* **17**, 99 (2006).
- [19] J. T. López Navarrete, J. Casado, V. Hernández, F. J. Ramírez, *Theor. Chem. Acc.* **98**, 5 (1997).
- [20] Е. П. Конькова, Р. Ш. Затрудина, *Вестн. Волгоград. гос. ун-та, сер. 1. Матем. Физ.* **13**, 98 (2010).
- [21] Е. П. Конькова, Р.Ш. Затрудина, *Вестн. Санкт-Петербург. гос. ун-та, сер. 4. Физ. Хим.* **4**, 139 (2011).
- [22] N. Galikova, M. Kelminskas, A. Gruodis, L. M. Balevichius, *Quantum Chem.* **15**, 1 (2011).
- [23] D. M. Rogers, N. A. Besley, P. O'Shea, J. D. Hirst, *J. Phys. Chem. B.* **109**, 48 (2005).
- [24] Е. П. Конькова, М. Б. Белоненко, *Наносист.: физ., хим., матем.* **3**(3), 69 (2012).
- [25] M. Homocianu, A. Airinei, D. Ortansa Dorohoi, *J. Adv. Res. Phys.* **2**, 011105 (2011).
- [26] D. O. Melnyk, O. V. Shyuchuk, *Phys. Chem. Solid State* **3**, 346 (2002).
- [27] Р. Ю. Бараков *та ін.*, *Вісн. Черкас. ун-ту, сер. "Хімічні науки"* **174**, 80 (2010).
- [28] И. К. Петрушенко, К. Б. Петрушенко, В. И. Смирнов, Б. А. Трофимов, *Изв. Акад. наук, сер. хим.* **7**, 1433 (2008).

AN EXPERIMENTAL STUDY AND QUANTUM-CHEMICAL CALCULATIONS OF SPECTRAL AND LUMINESCENCE PROPERTIES OF PROLINE MOLECULES

M. I. Myhovich, V. A. Kelman

*Institute of Electron Physics, National Academy of Sciences of Ukraine,
21, Universytetska St., UA-88017, Uzhhorod*

The spectra of photoluminescence of the proline molecule in the powder state and the aqueous solution one, excited by the action of irradiation $\lambda = 253$ nm of Ti: sapphire laser, were investigated and analyzed. The spectrum of photoluminescence of the aqueous solution revealed a greater spectral width and a long-wave shift of the main maximum of radiation compared with the spectra of photoluminescence of the powder, which is due to the influence of the solvent on the molecule of the proline. Finding the abscissa of the intersection point of the longwave edge of the absorption curve also measured in a spectral range of 200–350 nm, and the short-wave edge of the photoluminescence curve, the energy of the first excited singlet state of the proline molecule was determined as -3.9 eV.

Using the methods of quantum chemistry, electronic absorption spectra of the proline molecule are calculated, which are well matched with experimental data. It is established that the long-wave absorption band, which is responsible for the first excited singlet state, is mainly due to transitions from the higher occupied molecular orbital to the lower unoccupied molecular orbital. In aggregate, these data determine the detailed composition of the absorption bands and their origin. Also, a dipole momentum, and atomic distribution of charges of a molecule of proline, are calculated. A comparison of experimental data with theory is drawn. A low level of quantum exit of luminiscence was found.