

# Определение фотофизических параметров молекул триптофана методами лазерной флуориметрии

А.А.Банишев, Е.А.Ширшин, В.В.Фадеев

*Методами наносекундной лазерной флуориметрии определены фотофизические параметры молекул триптофана в его слабоконцентрированном водном растворе при возбуждении импульсами лазерного излучения с длиной волны 266 нм. Количественно охарактеризованы происходящие при этом двухступенчатые процессы (обратимые и необратимые фотохимические превращения) и показано, что при плотности потока фотонов возбуждающего излучения  $F < 5 \times 10^{24} \text{ см}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$  в импульсах длительностью  $\sim 10 \text{ нс}$  ими можно пренебречь.*

**Ключевые слова:** триптофан, нелинейная и кинетическая флуориметрия, молекулярные фотофизические параметры.

## 1. Введение

Известно, что многие белки флуоресцируют в ближней УФ области, что обусловлено наличием в них остатков триптофана, тирозина и фенилаланина (ароматические аминокислотные остатки) [1]. Поскольку характеристики спектров флуоресценции (положение, форма, интенсивность и др.) ароматических аминокислот (флуорофоров) отражают их взаимодействие с окружением, они могут быть использованы как источники информации о свойствах белковых молекул. Для получения более полной информации в дополнение к этим характеристикам важно знать молекулярные фотофизические параметры флуорофоров: сечения поглощения, константы синглет-триплетной конверсии и др. Особое значение имеет изучение природы флуоресценции молекул триптофана, поскольку именно триптофановая флуоресценция доминирует в так называемой собственной флуоресценции белков [1]. Хотя изучению флуоресценции триптофана в растворах и белках посвящено много работ (их обзор представлен в [1]), задачу установления природы полосы флуоресценции этой аминокислоты пока нельзя считать решенной. Определение всей совокупности фотофизических параметров молекулы триптофана и их зависимости от факторов окружающей среды представляется перспективным подходом в развитии метода флуоресцентной диагностики белков.

В настоящей работе представлены результаты измерения молекулярных фотофизических параметров триптофана в его водном растворе методом наносекундной лазерной флуориметрии, основанным на одновременной (на одном лазерном спектрометре) регистрации кривых кинетики и насыщения флуоресценции. Как показано в [2–4], этот метод позволяет определять (путем обработки указанных зависимостей) совокупность фотофизиче-

ских параметров, для измерения которых в классической спектроскопии необходимо использовать несколько методов и соответствующих им приборов. Метод нелинейной флуориметрии [2] позволяет, в частности, находить сечение поглощения флуорофора в отсутствие информации о его концентрации и в условиях, когда на полосу поглощения флуорофора накладываются полосы поглощения других молекул. Последнее важно при исследовании сложных природных органических соединений, в частности белков, как это было убедительно продемонстрировано в работе [5].

## 2. Объект

В экспериментах использовался раствор L-триптофана (Ajinomoto, Япония) в воде марки mQ (MilliPor, США). Для спектrophотометрических измерений использовались концентрации  $1.3 \times 10^{-4} \text{ М}$ , а при регистрации спектров флуоресценции и в нелинейной флуориметрии –  $2 \times 10^{-9} \text{ М}$ . Все эксперименты проводили при температуре  $25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ .

При возбуждении молекулы триптофана УФ излучением возможно протекание ряда фотофизических процессов и фотохимических реакций с участием возбужденного состояния. Хотя изучению фотофизических характеристик молекул триптофана посвящено много работ, механизмы их фотопревращения до конца не установлены. Приведенные в литературе значения фотофизических параметров, соответствующих этим процессам, значительно различаются [6–14] (см. ниже табл.1).

Можно выделить следующие механизмы дезактивации первого возбужденного синглетного состояния, которые оказывают влияние на формирование флуоресцентного отклика слабоконцентрированного раствора триптофана при возбуждении наносекундными импульсами лазерного излучения.

1. Излучательный и безызлучательный переходы в основное состояние.

2. Синглет-триплетная конверсия.

3. Спонтанная ионизация.

4. Фотоионизация. Процесс подробно нигде не рассмотрен, указано лишь, что он имеет место и что про-

А.А.Банишев, Е.А.Ширшин, В.В.Фадеев. Московский государственный университет им. М.В. Ломносова, физический факультет, 119992 Москва, Воробьевы горы; e-mail: fadееv@lid.phys.msu.su

Поступила в редакцию 14 июня 2007 г., после доработки – 20 июля 2007 г.

дукты ионизации аналогичны продуктам, образуемым при одноступенчатой ионизации [6–9]. Данный процесс, как и процесс 3, носит обратимый характер с временами рекомбинации в диапазоне от микро- до миллисекунд [7].

5. Образование невосстанавливаемого фотопродукта. О существовании подобного необратимого механизма указано в работе [6], однако, подобно процессу 4, он нигде количественно не исследован. По всей видимости, данный процесс, так же как и процесс 4, обусловлен поглощением фотона молекулой в первом возбужденном синглетном состоянии (и, следовательно, в целом является двухступенчатым); на это указывает то, что зависимость скорости образования фотопродукта от интенсивности отклоняется от линейной (вставка на рис.1,а), а спектрально образование фотопродукта проявляется в постепенном падении (по мере УФ облучения) интенсивности флуоресценции и оптической плотности как в первой, так и во второй полосе синглетного поглощения образца (рис.1).

Малая изученность двухступенчатых процессов 4 и 5 связана с тем, что в случае двухквантовой реакции экспериментальное определение квантового выхода ионов и фотопродукта вызывает большую сложность, поскольку для этого необходимо знать концентрацию возбужденных молекул, поглощающих второй квант света, а также их коэффициент экстинкции на длине волны возбужде-

ния. Таким образом, эти процессы сложно описать количественно в рамках традиционных классических подходов. В большинстве работ (например, по флеш-фотолизу [7–10]) авторы намеренно подбирали энергетические параметры установки таким образом, чтобы свести к минимуму вклады двухступенчатых процессов (специально оговаривая этот момент) в определяемые количественные характеристики. При нахождении же молекулярных фотофизических параметров методом нелинейной флуориметрии в случае использования возбуждающего излучения с высокой интенсивностью процессы типа 4 и 5 могут вносить заметный вклад в формирование флуоресцентного отклика, поэтому их учет может привести к ошибкам в определении значений остальных параметров. Более того, учет этих процессов при использовании метода нелинейной флуориметрии позволяет получить их количественные характеристики.

### 3. Аппаратура и методы

Используемый в работе лазерный флуориметр описан в работах [1, 4, 16]. Источником излучения являлся импульсный (частота следования импульсов 10 Гц) Nd:YAG-лазер с длиной волны излучения 266 нм (четвертая гармоника основной длины волны излучения лазера – 1064 нм), максимальной энергией в импульсе 0.7 мДж и длительностью импульса 10 нс. В качестве приемника излучения использовался оптический многоканальный анализатор, который состоит из полихроматора и многоканальной камеры (фирма «ДельтаТех», Научный парк МГУ), позволяющей получать двумерное оптическое изображение в плоскости выходной щели полихроматора. Камера состыковывалась с компьютером, программное обеспечение которого позволяло осуществлять работу как в непрерывном (при реализации нелинейной флуориметрии), так и в стробируемом (при реализации кинетической флуориметрии) режиме; длительность строба составляла 10 нс, шаг изменения времени задержки был равен 2.5 нс. Интенсивность флуоресценции измерялась при изменении плотности потока фотонов лазерного излучения  $F$  от  $2 \times 10^{24}$  до  $5 \times 10^{25} \text{ с}^{-1} \times \text{см}^{-2}$ . При фиксированном значении  $F$  (и фиксированной задержке в случае кинетических измерений [16]) сигнал получался в результате усреднения по 100 импульсам. При исследовании динамики образования фотопродукта методами абсорбционной и флуоресцентной спектроскопии использовался раствор препарата объемом 3 мл. При реализации нелинейной и кинетической флуориметрии для исключения процесса накопления фотопродукта применялась система прокачки. Спектры поглощения измерялись на спектрофотометре PerkinElmer Lambda 25 (PerkinElmer Inc.).

Современные версии методов нелинейной и кинетической флуориметрии сложных органических соединений (СОС) подробно изложены в [2–4]. В настоящей работе мы отметим лишь основные их моменты и сделаем дополнения с учетом специфики объекта – слабоконцентрированного водного раствора триптофана.

Модель формирования флуоресцентного отклика, используемая в методах нелинейной и кинетической флуориметрии и учитывающая указанные в разд. 1 процессы, математически описывается следующей системой кинетических уравнений для населенностей энергетических состояний молекулы СОС (рис.2):

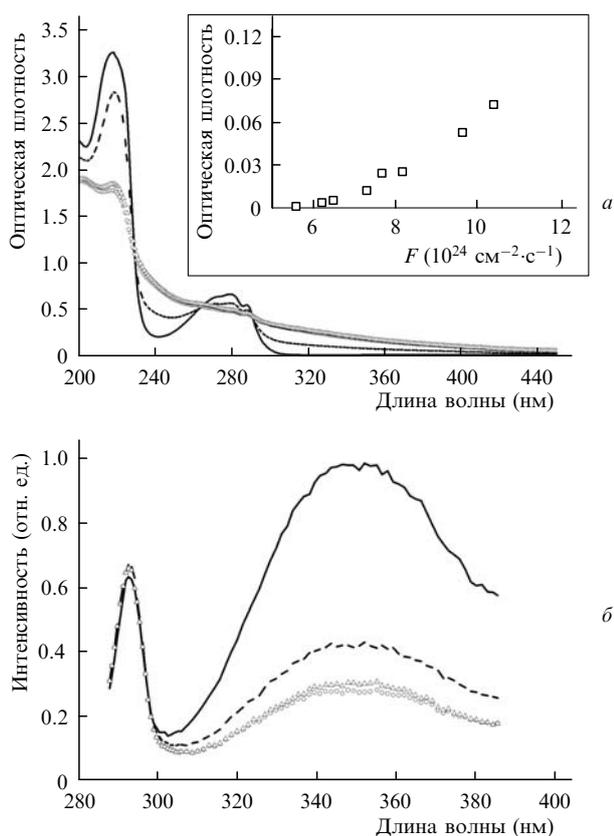


Рис.1. Необратимое изменение спектров поглощения (а) и флуоресценции (б) раствора триптофана по мере его облучения УФ светом: перед облучением (сплошная кривая), после 15-минутного облучения (штриховая кривая), после 30-минутного облучения (кружки) и через шесть часов после окончания 30-минутного облучения (треугольники) при плотности потока фотонов  $F = 10^{25} \text{ см}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ . На вставке – зависимость изменения оптической плотности (на длине волны 278 нм) водного раствора триптофана вследствие образования фотопродукта от плотности потока фотонов возбуждающего излучения; время облучения 30 мин.

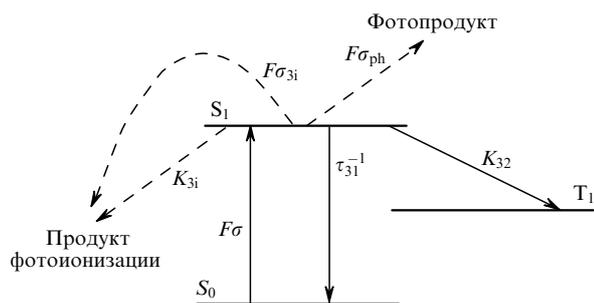


Рис.2. Схема уровней СОС, соответствующая системе кинетических (балансных) уравнений (1). Стрелками изображены рассматриваемые (см. разд.1) процессы ( $F\sigma$  – вероятность поглощения фотона из состояния  $S_0$ ;  $\tau_{31}^{-1}$  – суммарная скорость излучательного и безызлучательного переходов из возбужденного синглетного состояния  $S_1$  в основное состояние  $S_0$ ;  $K_{32}$  и  $K_{31}$  – константы скоростей синглет-триплетной конверсии и спонтанной ионизации соответственно;  $F\sigma_{3i}$  и  $F\sigma_{ph}$  – вероятности вынужденной фотоионизации и образования фотопродукта соответственно).

$$\begin{aligned} \frac{\partial n_3(t, \mathbf{r})}{\partial t} &= F(t, \mathbf{r})\sigma n_1(t, \mathbf{r}) - \frac{n_3(t, \mathbf{r})}{\tau_{31}} - (K_{32} + K_{31})n_3(t, \mathbf{r}) \\ &\quad - F(t, \mathbf{r})(\sigma_{3i} + \sigma_{ph})n_3(t, \mathbf{r}), \\ \frac{\partial n_2(t, \mathbf{r})}{\partial t} &= K_{32} n_3(t, \mathbf{r}), \\ \frac{\partial n_i(t, \mathbf{r})}{\partial t} &= K_{31} n_3(t, \mathbf{r}) + F(t, \mathbf{r})\sigma_{3i}n_3(t, \mathbf{r}), \\ \frac{\partial n_{ph}(t, \mathbf{r})}{\partial t} &= F(t, \mathbf{r})\sigma_{ph}n_3(t, \mathbf{r}), \\ n_0 &= n_1 + n_2 + n_3 + n_i + n_{ph}, \end{aligned} \quad (1)$$

где  $n_0$  – сумма концентраций исходных молекул СОС и их фотопродуктов;  $n_3$ ,  $n_2$  и  $n_1$  – концентрации молекул, находящихся в первом возбужденном синглетном ( $S_1$ , уровень 3), в первом возбужденном триплетном ( $T_1$ , уровень 2) и в основном ( $S_0$ , уровень 1) состояниях соответственно;  $n_i$  – суммарная концентрация обратимо ионизированных и фотоионизированных молекул;  $n_{ph}$  – концентрации обратимо фотоионизированных и необратимо фотодеградировавших молекул соответственно;  $F(t, \mathbf{r})$  – плотность потока фотонов возбуждающего излучения в момент времени  $t$  в точке с координатой  $\mathbf{r} = \{x, y\}$  в плоскости, перпендикулярной направлению оси лазерного пучка (зависимость параметров от координаты  $z$  вдоль направления пучка пренебрегаем, т. е. используем приближение оптического тонкого слоя);  $\sigma$  – сечение поглощения флуорофора;  $\tau_{31} = 1/(K_{31} + K'_{31})$ ;  $K_{31}$ ,  $K'_{31}$  – константы скоростей излучательного и безызлучательного переходов из возбужденного синглетного состояния  $S_1$  в основное состояние  $S_0$  (уровень 1);  $K_{32}$  – константа скорости синглет-триплетной конверсии;  $K_{31}$  – константа скорости спонтанной ионизации из состояния  $S_1$ ;  $\sigma_{3i}$  и  $\sigma_{ph}$  – сечения фотоионизации и фотодеградации молекул из состояния  $S_1$  под действием возбуждающего излучения. Полное время жизни молекулы в состоянии  $S_1$  (время затухания флуоресценции) в данной модели определяется выражением

$$\tau_3^{-1} \equiv K_3 = \tau_{31}^{-1} + K_{32} + K_{31} + F(\sigma_{3i} + \sigma_{ph}), \quad (2)$$

которое при низких значениях интенсивности возбуждения (таких, что поглощением излучения молекулами в состоянии  $S_1$  можно пренебречь) переходит в выражение

$$\tau_3^{-1} \equiv K_3 = \tau_{31}^{-1} + K_{32} + K_{31}. \quad (3)$$

Времена перехода  $T_1 - S_0$  и рекомбинации ионов могут лежать в микро- и миллисекундном диапазонах, что значительно больше длительности лазерного импульса, но меньше времени между импульсами (0.1 с). Это позволяет не учитывать данные процессы в системе (1) [6–9, 12].

Зная закон изменения концентрации молекул  $n_3(t, \mathbf{r})$ , можно рассчитать число фотонов флуоресценции  $N_{fl}$ , испущенных в результате воздействия лазерного импульса. Для осесимметричного пучка

$$N_{fl} = K_{31}l \int_0^{+\infty} 2\pi r dr \int_{-\infty}^{+\infty} n_3(t, \mathbf{r}) dt, \quad (4)$$

где  $l$  – толщина слоя среды, из которого регистрируется флуоресценция.

При небольших значениях  $F$  (интенсивности возбуждающего излучения) зависимость числа испущенных фотонов флуоресценции от  $F$  является линейной (т. е.  $N_{fl} \sim F$ ), однако с увеличением интенсивности падающего излучения она начинает отклоняться от линейной – происходит насыщение флуоресценции (для большинства органических соединений насыщение начинает проявляться при  $F > 10^{23} \text{ см}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ ). В рассматриваемой модели насыщение флуоресценции обусловлено конечным временем возврата флуоресцирующих молекул из возбужденного состояния  $S_1$  в основное состояние  $S_0$ , синглет-триплетной конверсией, механизмами ионизации, фотоионизации и образованием фотопродукта.

Метод нелинейной флуориметрии состоит в определении (путем решения обратной задачи) молекулярных фотофизических параметров органических соединений из вида зависимости  $N_{fl}(F)$ , называемой кривой насыщения. При экспериментальной реализации метода удобно число регистрируемых квантов флуоресценции  $N_{fl}$  нормировать на реперный сигнал  $N_{rep}$ , в качестве которого можно использовать сигнал комбинационного рассеяния (КР) молекулами воды (или другого растворителя), и оперировать не зависимостью  $N_{fl}(F)$ , а зависимостью  $(\Phi(F))^{-1} = N_{rep}/N_{fl}$ , где  $\Phi(F)$  – флуоресцентный параметр.

В принципе из кривой насыщения флуоресценции могут быть определены все фотофизические параметры, фигурирующие в модели (1). Однако практическая устойчивость решения соответствующей обратной задачи позволяет в настоящее время определить не более трех параметров [2]. Поэтому одновременно с измерением кривой насыщения на том же лазерном спектрометре снималась кривая кинетики флуоресценции, представляющая собой зависимость числа фотонов флуоресценции в стробе приемника от времени задержки строба относительно лазерного импульса  $t_{del}$ :  $N_{fl}(t_{del})$ . За нулевую задержку принималось такое положение строба, при котором его центр совпадал с максимумом лазерного импульса, что экспериментально регистрировалось по достижению сигналом КР воды максимального значения [16].

При определении значения параметра  $\tau_3$  из кривой кинетики флуоресценции и при решении обратной задачи нелинейной флуориметрии мы использовали вариацион-

ный алгоритм [17], в котором путем вариации параметров минимизировалась невязка между экспериментальными кривыми и зависимостями, рассчитанными по модели (1).

Найденное из кинетической кривой  $N_{\text{fl}}(t_{\text{del}})$ , снятой при низких значениях интенсивности лазерного импульса ( $F < 10^{23} \text{ см}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ ), время жизни  $\tau_3$  (см. (3)) являлось фиксированным параметром в модели, описывающей кривую насыщения. Указанная процедура (т. е. совместное использование кинетической и нелинейной флуориметрии) позволяет с достаточной практической устойчивостью решать четырехпараметрическую обратную задачу. Однако, как видно из равенства (2), при использовании метода кинетической флуориметрии можно определить и два параметра,  $\alpha \equiv \tau_3^{-1} = \tau_{31}^{-1} + K_{32} + K_{3i}$  и  $\beta \equiv \sigma_{3i} + \sigma_{\text{ph}}$ , если снять несколько (минимум две) кинетических кривых при разных значениях  $F$ . Путем дальнейшего усложнения процедуры измерений, основанной на совместном применении нелинейной и кинетической флуориметрии, можно решать обратные задачи еще большей размерности [4].

#### 4. Результаты экспериментов и их обсуждение

В работах [11, 14, 15], показано, что при возбуждении водного раствора триптофана пикосекундными лазерными импульсами кинетика затухания флуоресценции триптофана имеет двухэкспоненциальный характер: выявлены долгоживущий ( $\sim 3$  нс) компонент, вклад которого является доминирующим (85% – 95%), и короткоживущий ( $\sim 0.5$  нс). Пока нет убедительного объяснения механизмов формирования флуоресцентного отклика триптофана, которые могли бы привести к немоноэкспоненциальному затуханию флуоресценции. Поэтому, а также с учетом наносекундной длительности возбуждающего импульса и при наносекундной аппаратной функции приемника, для решения обратной задачи кинетической флуориметрии мы использовали модель с одним временем жизни возбужденного состояния:  $\tau_3 = (\tau_{31}^{-1} + K_{32} + K_{3i})^{-1}$ .

На рис.3 приведена одна из полученных нами кинетических кривых. Обработка таких кривых вариационным методом дала  $\tau_3 = 2.8 \pm 1$  нс.

На рис.4 приведена одна из полученных кривых насыщения флуоресценции. Решение трехпараметрической обратной задачи при фиксированном значении параметра  $\tau_3 = 2.8$  нс дало следующие значения остальных

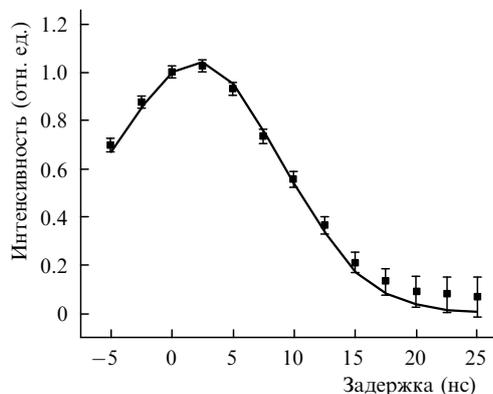


Рис.3. Кинетическая кривая флуоресценции триптофана при возбуждении лазерным импульсом длительностью 10 нс с  $F = 10^{23} \text{ см}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ ; точки – экспериментальные данные, сплошная линия – теоретическая кривая.

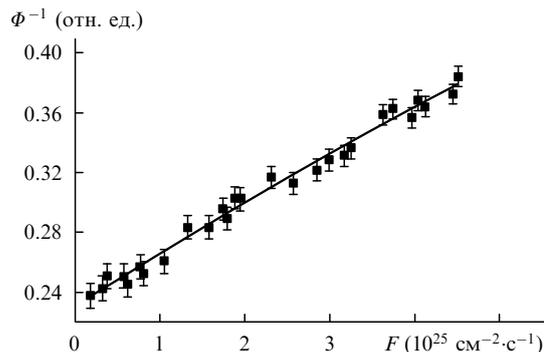


Рис.4. Кривая насыщения флуоресценции триптофана  $(\Phi(F))^{-1}$ ; точки – экспериментальные данные, сплошная линия – теоретическая кривая, рассчитанная по формулам (1)–(4) для  $\tau_3 = 2.8$  нс,  $\sigma = 1.6 \times 10^{-17} \text{ см}^2$ ,  $\sigma_{3i} + \sigma_{\text{ph}} = 2.2 \times 10^{-18} \text{ см}^2$ ,  $K_{32} + K_{3i} = 6 \times 10^7 \text{ с}^{-1}$ .

параметров модели:  $\sigma = (1.6 \pm 0.3) \times 10^{-17} \text{ см}^2$ ,  $\sigma_{3i} + \sigma_{\text{ph}} = (2.2 \pm 0.7) \times 10^{-18} \text{ см}^2$ ,  $K_{32} + K_{3i} = (6 \pm 2) \times 10^7 \text{ с}^{-1}$ . Этим величинам соответствует сумма квантового выхода в триплет и квантового выхода ионизации  $\eta_T + \eta_i = 0.17 \pm 0.05$ .

Параметр  $\beta \equiv \sigma_{3i} + \sigma_{\text{ph}}$  определялся также и из кинетических измерений. Для этого были сняты две кинетические кривые – при низком и высоком значении  $F$ . При  $F = 10^{23} \text{ см}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$  восстановленное время  $\tau_3$  оказалось равным  $2.8 \pm 1$  нс, а при  $F = 10^{26} \text{ см}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$  оно составило  $2 \pm 1$  нс. Далее, используя (2), определили  $\sigma_{3i} + \sigma_{\text{ph}} = (1.2 \pm 0.4) \times 10^{-18} \text{ см}^2$ , что удовлетворительно (с учетом доверительного интервала) согласуется со значением, полученным из кривой насыщения.

Поскольку влияние интеркомбинационной конверсии (скорость  $K_{32}$ ) и спонтанной ионизации (скорость  $K_{3i}$ ) на кривые кинетики и насыщения флуоресценции неразличимо, то в рамках использованного нами метода мы можем определить лишь сумму скоростей этих процессов. Аналогичная ситуация имеет место и для сечений процессов обратимой фотоионизации ( $\sigma_{3i}$ ) и образования стабильного фотопродукта ( $\sigma_{\text{ph}}$ ). Для раздельного определения упомянутых параметров необходимо дополнить использованный нами метод классическими методами – импульсным фотолизом и методом кинетической спектрофотометрии.

В табл.1 сравниваются полученные в данной работе результаты с имеющимися в литературе. Для оценки последствий неучета двухступенчатых процессов экспериментальные кривые насыщения аппроксимировались кривыми, численно рассчитанными по модели (1), в которой  $\sigma_{3i} = \sigma_{\text{ph}} = 0$ . В результате значения найденных па-

Табл.1. Фотофизические параметры молекул триптофана в его водном растворе.

Параметр	Настоящая работа	Литературные данные
$\tau_3$ (нс)	$2.8 \pm 1$	3.32 [14], 3.13 [6]
$\sigma (10^{-17} \text{ см}^2)$ , нелинейная флуориметрия	$1.6 \pm 0.3$	–
$\sigma (10^{-17} \text{ см}^2)$ , фотометрия	1.7	1.9 [17]
$\eta_T + \eta_i$	$0.17 \pm 0.05$	$\eta_T = 0.08$ [10], $\eta_T = 0.12$ [6], $\eta_i = 0.25$ [7], $\eta_i = 0.08$ [6, 8, 10], $\eta_i = 0.21$ [9]
$K_{32} + K_{3i} (10^7 \text{ с}^{-1})$	$6 \pm 2$	–
$\sigma_{3i} + \sigma_{\text{ph}} (10^{-18} \text{ см}^2)$	$2.2 \pm 0.7$	–

раметров  $\sigma$  и  $K_{32} + K_{3i}$ , при которых невязка достигала минимума, оказались равными  $1.9 \times 10^{-17} \text{ см}^2$  и  $7 \times 10^7 \text{ с}^{-1}$  соответственно (т. е. примерно на 17% отличаются от значений, полученных для модели (1) с  $\sigma_{3i} + \sigma_{ph} \neq 0$ ). Сама минимальная невязка возросла в 1.2 раза, и это свидетельствует о том, что модель, учитывающая двухквантовые процессы, более адекватна реальной ситуации формирования флуоресцентного отклика молекул триптофана при импульсном лазерном возбуждении с использованными параметрами импульсов.

## 5. Выводы

Продемонстрированы возможности пока еще мало используемого метода лазерной флуориметрии при исследовании сложных органических соединений, фотофизические процессы в которых описываются значительным числом параметров (в данном случае – четырьмя). В дальнейшем планируется реализация так называемого матричного метода [4], основанного на синтезе кинетической и нелинейной флуориметрии, который позволит более детально исследовать фотофизические процессы в двух- и трехфлуорофорных белках с учетом межмолекулярного переноса энергии между флуорофорами.

Совместно реализуемыми на одном лазерном спектрометре методами наносекундной кинетической и нелинейной флуориметрии определены значения фотофизических параметров молекул триптофана в его слабоконцентрированном водном растворе при возбуждении лазерными импульсами с длиной волны 266 нм: время жизни возбужденного состояния (в моноэкспоненциальном приближении и при низком уровне возбуждения)  $\tau_3 = 2.8 \pm 1 \text{ нс}$ ; сечение поглощения  $\sigma = (1.6 \pm 0.3) \times 10^{-17} \text{ см}^2$ ; суммарная скорость интеркомбинационной конверсии и ионизации из первого возбужденного синглетного состояния ( $S_1$ )  $K_{32} + K_{3i} = (6 \pm 2) \times 10^7 \text{ с}^{-1}$ ; сумма квантового выхода в триплет и квантового выхода ионизации  $\eta_T + \eta_i = 0.17 \pm 0.05$ ; суммарное сечение обратимого и необратимого фотопревращения при поглощении возбуждающего излучения (266 нм) молекулами в первом возбужденном состоянии  $\sigma_{3i} + \sigma_{ph} = (2.2 \pm 0.7) 10^{-18} \text{ см}^2$  (получено из кривой насыщения) и  $\sigma_{3i} + \sigma_{ph} = (1.2 \pm 0.4) \times 10^{-18} \text{ см}^2$  (кинетические измерения).

Значения параметров  $\tau_3$ ,  $\sigma$  и  $\eta_T + \eta_i$  в пределах ошибок эксперимента совпали с их значениями, измеренными

другими методами [6, 11, 14, 15, 18], значение параметра  $\sigma_{3i} + \sigma_{ph}$  получено впервые и свидетельствует о том, что процессами, которые он описывает, можно пренебречь при плотности потока фотонов возбуждающего излучения  $F < 5 \times 10^{24} \text{ см}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$  в импульсах длительностью  $\sim 10 \text{ нс}$ . При определении же фотофизических параметров методом нелинейной флуориметрии неучет указанных процессов может привести к ошибкам в определении  $\sigma$  и  $\eta_T + \eta_i$  порядка 17%.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 05-05-65075) и Междисциплинарного научного проекта МГУ № 4 (2007).

1. Пермяков Е.А. *Метод собственной люминесценции белка* (М.: Наука, 2003).
2. Fadeev V.V., Dolenko T.A., Filippova E.M., Chubarov V.V. *Opt. Commun.*, **166**, 25 (1999).
3. Dolenko S.A., Dolenko T.A., Fadeev V.V., Gerdova I.V., Kompitsas M. *Opt. Commun.*, **213**, 4 (2002).
4. Fadeev V.V., Dolenko T.A., Banishev A.A., Litvinov P.N., Maslov D.V., Ostroumov E.E. *Proc. SPIE Opto-Ireland 2005: Optical Sensing and Spectroscopy* (Ireland, Dublin, 2005, p. 44).
5. Банишев А.А., Вржеш Е.П., Дмитриенко Д.В., Друца В.Л., Маслов Д.В., Пашенко В.З., Шишин Е.А., Вржеш П.В., Фадеев В.В. *Биофизика*, **52**, 792 (2007).
6. Robbins R.J., Fleming G.R., Beddard G.S., Robinson G.W., Thistlethwaite P.J., Woolfe G.J. *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 6271 (1980).
7. Bryant F. D., Santus R., Grossweiner L.I. *J. Phys. Chem.*, **79** (25), 2711 (1975).
8. Klein R., Tatischeff I., Bazin M., Santus R. *J. Phys. Chem.*, **85**, 670 (1981).
9. Bent D.V., Hayon E. *J. Am. Chem. Soc.*, **97**, 2612 (1975).
10. Amouyal E., Bernas A., Grand D. *Faraday Discuss. Chem. Soc.*, **74**, 147 (1982).
11. Fleming G.R., Morris J.M., Robbins R.J., Woolfe G.J., Thistlethwaite P.J., Robinson G.W. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **75**, 4652 (1978).
12. Sherin P.S., Snytnikova O.A., Tsentlovicha Yu.P., Sagdeev R.Z. *J. Phys. Chem.*, **125**, 144511 (2005).
13. Kang H., Dedonder-Lardeux C., Jouvett C., Martrenchard S., Grégoire G., Desfrancois C., Schermann J.P., Fayeton J.A. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **6**, 2628 (2004).
14. Chen Yu, Barkley M.D. *Biochemistry*, **37**, 9976 (1998).
15. Szabo A.G., Rayner D.M. *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 554 (1980).
16. Банишев А.А., Маслов Д.В., Фадеев В.В. *ПТЭ*, **3**, 143 (2006).
17. Эльсгольд Л. Э. *Дифференциальные уравнения и вариационное исчисление* (М.: Наука, 1956).
18. Du H., Fuh R.A., Li J., Corkan A., Lindsey J.S. *Photochem. Photobiol.*, **68**, 141 (1998).