

ЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ УРАЦИЛА НА ПОВЕРХНОСТИ КЕРАМИКИ ПРИ ВОЗБУЖДЕНИИ ЭЛЕКТРОННЫМ УДАРОМ

И. И. Шафраньш*, И. Е. Митропольский, В. В. Кузьма,
Ю. Ю. Свидя, М. И. Суховия

УДК 535.37;537.53;547.854.4

Ужгородский национальный университет,
88000, Ужгород, ул. Подгорная, 46, Украина; e-mail: ivanshafr@gmail.com

(Поступила 26 апреля 2017)

Метод электрон-фотонной спектроскопии применен к важному классу шестичленных гетероциклических соединений — пиримидиновых азотистых оснований, входящих в состав нуклеиновых кислот. Проанализирован спектр свечения молекул урацила, адсорбированных на поверхности керамики, полученный при бомбардировке электронами с энергией 600 эВ в глубоком вакууме. В УФ и видимой областях обнаружены широкие полосы с максимумами при 335, 435 и 495 нм. Наиболее интенсивная полоса ($\lambda = 335$ нм) отнесена к флуоресценции и соответствует синглет-синглетному переходу с первого возбужденного электронного состояния в основное состояние молекулы. Электронные переходы из триплетного T_1 в основное состояние формируют менее интенсивную полосу фосфоресценции ($\lambda = 435$ нм). Обсуждается природа полосы с максимумом 495 нм. Полученный спектр люминесценции сопоставлен со спектрами фотолюминесценции в разных фазовых состояниях.

Ключевые слова: электрон-фотонная спектроскопия, пучок электронов, поверхность, урацил, люминесценция.

The method of electron-photon spectroscopy was applied to an important class of six-membered heterocyclic compounds-pyrimidine nitrogen bases, which are part of nucleic acids. Excited by electron bombardment with energy of 600 eV in a high vacuum, luminescence spectrum of uracil molecules adsorbed on the ceramic surface was analyzed. Broad bands with maxima at 335, 435, and 495 nm were found in the UV and visible regions. The most intense band ($\lambda = 335$ nm) is related to fluorescence and corresponds to the singlet-singlet transition from the first excited electronic state to the ground state of the molecule. Less intense phosphorescence band ($\lambda = 435$ nm) is formed by electron transitions from the triplet T_1 to the ground state. The nature of the band with a maximum of 495 nm is discussed. The obtained luminescence spectrum is compared with the photoluminescence spectra in different phase states.

Keywords: electron-photon spectroscopy, electron beam, surface, uracil, luminescence.

Введение. Исследованию электронной структуры и свойств нуклеиновых кислот (НК) (ДНК и РНК) в настоящее время уделяется пристальное внимание. При этом широко используются различные спектроскопические и теоретические подходы. Необходимость подобных исследований обусловлена тем, что НК играют центральную роль в клетке, поскольку их функции связаны с хранением и передачей генетической информации, закодированной последовательностью нуклеотидов. Важнейшими компонентами нуклеотидов, определяющими их физические свойства и биологическую значимость, являются азотистые основания — производные гетероциклических молекул пурина и пиримидина. К пуриновым основаниям НК относятся аденин и гуанин, к пиримидиновым — цитозин, урацил и тимин.

LUMINESCENCE OF URACIL ON THE CERAMICS SURFACE AT ELECTRONIC EXCITATION
I. I. Shafranyosh*, I. E. Mitropolskiy, V. V. Kuzma, Yu. Yu. Svyda, M. I. Sukhoviya (Uzhhorod National University, 46 Pidgirna Str., Uzhhorod, 88000, Ukraine; e-mail: ivanshafr@gmail.com)

Деструктивные изменения в первичной структуре НК преимущественно вызывают вторичные электроны (с энергией десятки и сотни эВ), которые образуются в большом количестве при прохождении через биоструктуры потоков высокоэнергетического излучения. Взаимодействие вторичных электронов с элементарными компонентами НК характеризуется значительными эффективными сечениями столкновений. В результате таких столкновений происходит возбуждение электронно-колебательных состояний молекул с их последующим распадом с разной вероятностью по различным каналам. Прежде всего это радиационные переходы как в молекулах, так и в ее диссоциированных фрагментах, а также электронные переходы с образованием положительных и отрицательных ионов. Следовательно, люминесцентные свойства азотистых оснований существенно дополняют физическую картину процессов возбуждения органических молекул. Отличительная черта люминесценции азотистых оснований при нормальных условиях — очень низкий квантовый выход из-за сложной структуры этих молекул и проявления различных процессов тушения. Этим объясняется небольшое количество исследований механизмов люминесценции при генерации электронами. Вместе с тем характерным примером плодотворного исследования спектральных характеристик органических кристаллов при облучении мощным электронным пучком являются работы [1, 2] по поиску активных сред лазеров. Для изучения свойств возбужденных состояний сложных органических молекул в газовой фазе применялась техника оптической спектроскопии с использованием электронных пучков низких энергий [3—7]. В частности, для всех оснований НК — цитозина и аденина [3, 4], урацила и тимина [5, 6], гуанина [7] — получены спектры люминесценции, проведена их идентификация, оценены вероятности процессов возбуждения, ионизации и фрагментации. Обеспечение жесткой фиксации нестабильных молекул путем их иммобилизации в твердых матрицах позволяет увеличить эффективность флуоресценции и фосфоресценции [8, 9], что связано с улучшением отношения сигнал/шум в экспериментальных спектрах. По нашему мнению, такие исследования представляют интерес для решения проблемы абиогенного происхождения жизни на Земле и определения возможных причин дисфункции механизмов узнавания на макромолекулярном уровне [10].

Цель настоящей работы — регистрация и анализ спектров люминесценции молекул урацила под действием электронного пучка в условиях, когда эти молекулы находятся на поверхности поликристаллической матрицы. Подобные экспериментальные исследования, несомненно актуальные для практики квантово-химических расчетов вероятностей излучательных переходов урацила в твердой фазе, в известной нам литературе отсутствуют.

Эксперимент. Исследования проведены чувствительным к свойствам поверхностного слоя методом электрон-фотонной спектроскопии (ЭФС) [11], который основан на процессах, приводящих к возникновению электромагнитного излучения при облучении поверхности твердого тела электронами. В противоположность действию фотонов возбуждение электронной бомбардировкой представляет собой исключительно поверхностное явление, а метод ЭФС характеризуется возможностью создания высокой концентрации возбужденных состояний исследуемых образцов. Использован препарат урацила ($C_4H_4N_2O_2$) фирмы Reanal (чистота 99 %). По информации поставщика в препаратах данной фирмы отсутствуют люминесцирующие примеси. Иммобилизация биомолекул осуществлялась путем их высадки с водного раствора на поверхность керамической матрицы с последующим прогревом до $110\text{ }^\circ\text{C}$ при $P \leq 10^{-1}$ Па непосредственно перед загрузкой в рабочую камеру. Подложки представляли собой плоскопараллельные пластины размером $10 \times 10 \times 2$ мм, поверхность которых до нанесения биомолекул химически очищалась. Основные свойства керамики, которые определили ее выбор в качестве матрицы для биомолекул, — гидрофобность, низкое давление насыщенных паров в вакууме даже при повышенной температуре, пористость и стойкость к облучению. Этим критериям соответствует стеатитовая керамика марки С230 ($Mg_3(Si_4O_{10})(OH)_2$), ее пористость $\geq 30\%$.

Измерение спектров электрон-фотонной эмиссии (ЭФЭ) проведено на сверхвысоковакуумном электрон-фотонном спектрометре [12], созданном на базе установки УСУ-4. В рабочей камере установки создавался вакуум $P \leq 5 \cdot 10^{-7}$ Па. Электронная пушка формировала пучок электронов диаметром 4 мм с равномерной плотностью тока по его поперечному сечению. Оптимальная энергия первичных электронов $E = 500\text{—}800$ эВ при плотности тока на поверхности $j = 0.05\text{—}0.30$ мА/мм². Выбранные параметры пучка сводят к минимуму нагрев образца и испарение материала. Температура мишени $95\text{—}108\text{ }^\circ\text{C}$.

Угол бомбардировки (от нормали к поверхности) 15° . Эмитированное с поверхности излучение с помощью кварцевого конденсора фокусировалось на входную щель дифракционного монохроматора (область $200\text{—}800$ нм) и детектировалось ФЭУ-106. Далее сигнал усиливался и регистрировался

счетчиком фотоэлектронов и компьютером, где экспериментальные данные конвертировались в графическое представление. Излучение наблюдалось под углом 30° . Изменение геометрии опытов (угла наблюдения) позволяет установить, что основной вклад в свечение вносят процессы, протекающие непосредственно на поверхности мишени, бомбардируемой электронами. При наблюдении вдоль поверхности, когда в “поле зрения” монохроматора не попадает поверхность мишени, в спектрах обоих образцов (керамика и керамика + урацил) излучение, которое формируется при спонтанном девозбуждении частиц, отлетающих от поверхности мишени, не выявлено.

Результаты и их обсуждение. При энергиях электронов 500—800 эВ в УФ и видимой областях спектра ЭФЭ молекул урацила, адсорбированных на поверхность керамики, выявлены бесструктурные полосы. На рис. 1 с учетом спектральной чувствительности системы регистрации показаны результаты при бомбардировке электронами с $E = 600$ эВ и плотностью тока $j = 0.1$ мА/мм². Видно, что спектр 3 состоит из трех хорошо разделенных широких полос с максимумами при $\lambda = 335, 435$ и 495 нм. Для корректной интерпретации данных проведем их сравнение со спектрами фотолюминесценции. Как показано в [2], такой подход является плодотворным. На рис. 2 приведены типичные спектры фотолюминесценции урацила, полученные в разных экспериментальных условиях. Видно, что люминесцентная способность определяется одной полосой с максимумом при $\lambda = 420$ нм. Эту полосу авторы [13, 14] относят к фосфоресценции. В [14] отмечается, что при комнатной температуре появляется полоса флуоресценции малой интенсивности с максимумом при $\lambda = 350$ нм.

В водной среде при комнатной температуре возбуждение урацила фотонами с $\lambda = 255$ нм дает спектр с максимумом 320 нм [15] (рис. 2, кривая 1). В ацетонитриле по сравнению с водным раствором максимум флуоресценции сдвигается на 10 нм в синюю область [16]. В зависимости от длины волны возбуждения ксеноновой лампой в области $\lambda \geq 300$ нм, где мономеры урацила не поглощают,

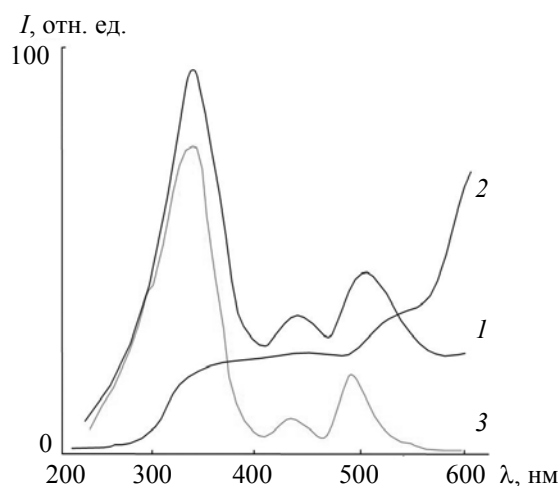


Рис. 1. Спектры ЭФЭ: 1 — керамики и молекул урацила, адсорбированных на ее поверхности, 2 — чистой керамической поверхности, 3 — разность спектров 1 и 2

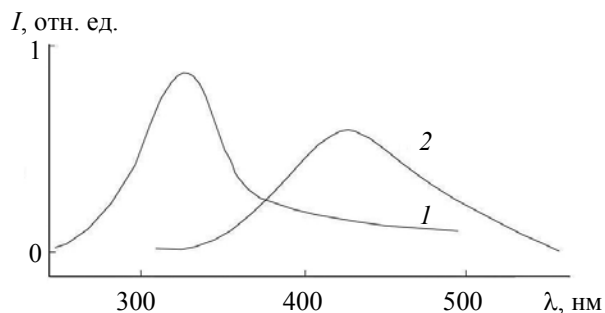


Рис. 2. Спектры фотолюминесценции урацила: 1 — водный раствор [15], 2 — поликристаллическая пленка [13]

для водного раствора урацила в [17] зарегистрированы полосы люминесценции стэкинг-агрегатов с $\lambda_{\text{max}} = 385, 410, 450$ и 500 нм. При облучении фотонами с $\lambda = 260$ нм наблюдается полоса с максимумом 350 нм, которую авторы [17] относят к мономеру молекулы (ее форма близка кривой I на рис. 2).

На рис. 3 показан спектр фотолюминесценции урацила из [18], зарегистрированный с экспозицией 8 с при воздействии импульсно-периодическим лазерным излучением (5 мВт) с $\lambda = 266$ нм на твердотельный порошок урацила при комнатной температуре. Для него характерна широкая полоса $380\text{—}600$ нм с выраженной структурой в виде максимумов при $417, 449, 495, 532$ нм. Коротковолновая часть спектра отнесена в [18] к синглет-синглетному переходу $S_1 \rightarrow S_0$ молекулы, а длинноволновая — $T_1 \rightarrow S_0$. Тонкая структура не объясняется.

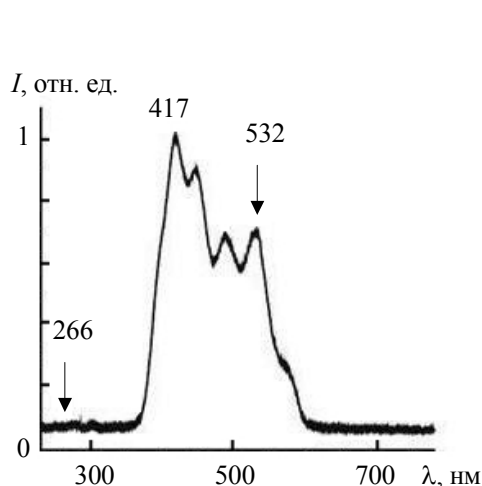


Рис. 3. Спектр люминесценции твердотельного урацила при возбуждении импульсно-периодическим лазерным излучением с $\lambda = 266$ нм; стрелки — линии YAG-лазера (266 и 532 нм) [18]

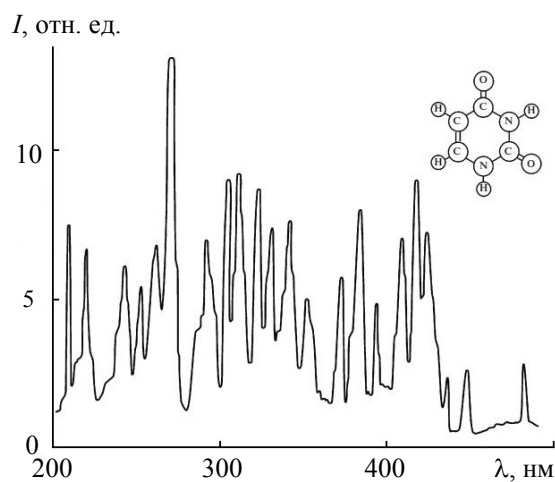


Рис. 4. Спектр люминесценции молекул газовой фазы урацила при энергии возбуждающих электронов 100 эВ [5]

Существенное различие оптических спектров наблюдается при электронном возбуждении урацила в разных агрегатных состояниях. На рис. 4 показан спектр люминесценции молекул газовой фазы урацила, измеренный при взаимодействии молекулярного пучка с монокинетическими электронами с энергией 100 эВ. Авторы [5] показали, что оптический спектр формируют процессы диссоциативного возбуждения молекул и диссоциативного возбуждения с ионизацией. Обращается внимание на то, что в области $300\text{—}440$ нм прослеживаются две широкие молекулярные полосы, которые частично перекрываются и являются фоном для структуры из более узких полос. Первую полосу $320\text{—}340$ нм авторы [5] отождествляют с излучением S_1 -состояний молекул урацила, а вторую $\sim 420\text{—}430$ нм — с излучением T_1 -состояний тех же молекул в результате возбуждения π -электронов. Из сравнения спектров на рис. 3 и 4 видно, что максимумы $\sim 417, 449$ нм при фотонном возбуждении практически совпадают с максимумами полос люминесценции при электронном ударе молекул урацила в газовой фазе, природа которых обусловлена диссоциативными процессами [5].

Интерпретируя полученные нами данные, следует иметь в виду, что в противоположность действию фотонов возбуждение электронной бомбардировкой представляет собой исключительно поверхностное явление. Независимость структуры спектров ЭФЭ урацила от времени бомбардировки и параметров пучка, хорошее согласие по форме и положению максимумов полос излучения с данными, полученными при оптическом способе возбуждения ($\lambda \sim 310\text{—}350$ и $400\text{—}450$ нм), указывают на то, что акт излучения системы урацил—керамика ограничен пределами отдельных молекул. Это не означает, что молекулы не испытывают влияния потенциального поля твердой матрицы, но энергетическая структура подложки не оказывает существенного влияния на формирование первой (335 нм) и второй (435 нм) полос излучения урацила. Таким образом, относительно природы появления полос люминесценции урацила на поверхности керамики при электронной бомбардировке (рис. 1, спектр 3) можно сказать следующее. Под действием электронного пучка происходит возбуждение π -электронов молекулы урацила из основного синглетного состояния S_0 в возбужденные синг-

летные состояния S_n , далее происходит дезактивация состояний S_n в первое синглетное состояние S_1 , радиационный распад которого и вызывает появление первой полосы. Эту полосу можно связать с флуоресценцией урацила. Вторая полоса представляет собой полосу фосфоресценции, которая по физическим представлениям является длинноволновой. Относительная интенсивность этой полосы в сравнении с первым максимумом ($\lambda = 335$ нм) составляет 1:8. Для ее появления необходимо возбуждение электронным ударом π -электронов молекулы урацила из основного состояния S_0 в возбужденные триплетные состояния T_n с их дезактивацией в состояние T_1 и его радиационным переходом в основное состояние S_0 . Существует еще один канал заселения состояния T_1 — интеркомбинационные переходы $S_1 \rightarrow T_1$. Такие переходы в случае оптического возбуждения молекул, как правило, становятся основной причиной появления фосфоресценции [14]. Именно в твердой фазе многие биосистемы способны проявлять эффективную фосфоресценцию за счет уменьшения безызлучательной дезактивации триплетно-возбужденных молекул.

Спектр ЭФЭ молекул урацила, иммобилизованных в твердую матрицу, отличается от спектров люминесценции молекулы урацила в газовой фазе [5] и имеет сходства при оптическом возбуждении поликристаллических пленок, порошков, растворов [13—18]. В отличие от оптического возбуждения при электронной бомбардировке диапазон энергий возбуждения электронных состояний увеличивается [2], поэтому можно сделать вывод, что фрагментация молекул урацила в твердой фазе под действием первичного электронного пучка ($E = 600$ — 800 эВ) и вторичных электронов пренебрежимо мала, основной механизм люминесценции молекул, иммобилизованных в твердую матрицу, под действием электронного пучка определяется флуоресценцией, соответствующей положению первого возбужденного электронного синглетного состояния в исследуемом веществе. Отметим, что соотношение интенсивностей полос зависит от энергии возбуждающих электронов. Перераспределение интенсивностей свидетельствует о влиянии способа подвода энергии на вероятности излучающих переходов. Установлено, что интенсивность полосы с максимумом при 495 нм с увеличением энергии электронов от 500 до 750 эВ возрастает, а далее практически не изменяется. В то же время интенсивность полосы флуоресценции в диапазоне 500—850 эВ уменьшается в три раза по линейному закону. При $E = 850$ эВ в спектрах ЭФЭ длинноволновый максимум становится доминирующим. Кроме квантового выхода с увеличением E другие характеристики ЭФЭ (форма спектра, положение максимумов) не изменяются, т. е. время жизни возбужденного состояния не сокращается, а уменьшается лишь усредненное количество молекул, обладающих флуоресценцией. Снижение интенсивности полосы фосфоресценции по сравнению с полосой флуоресценции меньше (из-за малости сигнала и наличия рядом более интенсивных эмиссий корректная оценка ее изменения затруднена). Вероятно, с ростом E и j более эффективно заселяются триплетные уровни с высоких колебательных подуровней синглетного возбужденного состояния. Это хорошо согласуется с аналогичной зависимостью от длины волны облучения константы скорости интеркомбинационной конверсии в триплетное состояние, полученной методом флеш-фотолиза [19].

Физическая причина появления третьей полосы с максимумом при 495 нм пока неясна. В возбужденном состоянии (в режиме непрерывной бомбардировки электронным пучком генерируются все возможные переходы) возрастает способность молекул азотистых основ НК к ассоциации. Не исключено, что статическое и динамическое взаимодействия молекул могут приводить к образованию комплексов, обладающих свечением, но в иной области спектра по сравнению с мономерными молекулами, подобно исследованиям фотолюминесценции водных растворов урацила [17], где полосы 410 и 450 нм отождествляются со стэкинг-димерами и стэкинг-тримерами.

При электронном возбуждении в отличие от оптического энергия возбуждения передается как матрице, так и внедренным в нее молекулам урацила. Поэтому, кроме того что ван-дер-ваальсово взаимодействие между матрицей и адсорбированной молекулой вызывает сдвиги спектральных полос, величина и направление которых зависят от сорта матрицы, возможны излучающие переходы с участием энергетических уровней подложки. В связи с этим корректное отнесение обнаруженной длинноволновой полосы ЭФЭ к излучателю возможно лишь на основании последующих экспериментов.

Заключение. Впервые получен спектр электрон-фотонной эмиссии молекул азотистого основания нуклеиновой кислоты урацила, внедренных в керамическую подложку, при использовании электронов с энергией 600 эВ в условиях сверхвысокого вакуума ($P \leq 5 \cdot 10^{-9}$ Па). В УФ и видимой областях спектра обнаружены широкие бесструктурные полосы с максимумами при 335, 435 и 495 нм. Природа двух полос связывается с возбуждением π -электронов молекулы урацила из основного

синглетного состояния S_0 в возбужденные синглетные состояния S_n и возбужденные триплетные состояния T_n с последующей их дезактивацией в состояния S_1 и T_1 . Радиационный распад нижнего синглетного состояния в основное состояние формирует полосу флуоресценции с максимумом при 335 нм, которая является доминирующей в спектре электрон-фотонной эмиссии молекул урацила, внедренных в твердотельную матрицу. Молекулярная полоса с максимумом при 435 нм является полосой фосфоресценции и обусловлена радиационным переходом $T_1 \rightarrow S_0$. Формирование полосы с максимумом 495 нм определяется другими механизмами. Фрагментация молекул урацила, иммобилизованных в твердую матрицу, под действием электронной бомбардировки ($E = 600\text{—}800$ эВ) пренебрежимо мала. Следовательно, адсорбция биомолекул в пористые поверхности твердого тела может защитить их от деградации в окружающей среде. Апробированный метод электрон-фотонной спектроскопии может быть полезен при исследовании свойств биологических молекул, поскольку кроме разрешенных переходов он позволяет наблюдать полосы, обусловленные интеркомбинационными переходами, запрещенными правилами отбора по спину электрона.

- [1] В. В. Грузинский, В. С. Горобченко, С. В. Давыдов, В. В. Еременко, И. И. Кулак, А. И. Митьковец, Л. А. Огурцова. Журн. прикл. спектр., **53**, № 3 (1990) 461—463 [V. V. Gruzinskii, V. S. Gorobchenko, S. V. Davydov, V. V. Eremenko, I. I. Kulak, A. I. Mit'kovets, L. A. Ogurtsova. J. Appl. Spectr., **53** (1990) 984—986]
- [2] А. В. Кухто. Журн. прикл. спектр., **65**, № 5 (1998) 694—708 [A. V. Kukhto. J. Appl. Spectr., **65** (1998) 722—738]
- [3] М. И. Суховия, В. Н. Славик, И. И. Шафраньош, Л. Л. Шимон. Биополимеры и клетка, **7**, № 6 (1991) 77—82
- [4] М. И. Суховия, Є. І. Вощепинець, І. І. Шафраньош, Л. Л. Шимон. Биополимеры и клетка, **12**, № 3 (1996) 97—100
- [5] I. I. Shafranyosh, M. I. Sukhoviya. J. Chem. Phys., **137** (2012) 184303—184309
- [6] И. И. Шафраньош, М. И. Суховия. Опт. и спектр., **102**, № 4 (2007) 553—556
- [7] Ю. Ю. Свида, М. І. Шафраньош, Е. Ю. Шамудовський, І. І. Перчак, М. О. Маргітич, М. І. Суховія, М. М. Чаварга, І. І. Шафраньош. Наук. вісн. Ужгород. ун-ту. Сер. Фізика, **39** (2016) 106—110
- [8] M.-J. Lin, À. J. Jimenéz, C. Burschka, F. Würthner. Chem. Commun., **48** (2012) 12050—12052
- [9] W. Tischer, F. Wedekind. Top. Curr. Chem., **200** (1999) 95—126
- [10] U. Pedreira-Segade, C. Feuille, M. Pelletier, L. J. Michot, I. Daniel. Geochim. Cosmochim. Acta, **176** (2016) 81—95
- [11] С. С. Поп, І. С. Шароді. Фізична електроніка, Львів, Євросвіт (2001)
- [12] М. І. Лінтур, Л. М. Маркович, В. О. Мастюгін, М. В. Приходько, І. С. Шароді. Наук. вісн. Ужгород. ун-ту. Сер. Фізика, **10** (2001) 191—194
- [13] И. П. Виноградов, В. В. Земских, Н. Я. Додонова. Опт. и спектр., **36**, № 3 (1974) 596—599
- [14] N. Ya. Dodonova. J. Photochem. Photobiol. B: Biol., **18** (1993) 111—121
- [15] T. Gustavsson, Á. Bányász, E. Lazzarotto, D. Markovitsi, G. Scalmani, M. J. Frisch, V. Barone, R. Improta. J. Am. Chem. Soc., **128** (2006) 607—619
- [16] T. Gustavsson, N. Sarkar, E. Lazzarotto, D. Markovitsi, R. Improta. Chem. Phys. Lett., **429** (2006) 551—557
- [17] V. L. Rapoport, V. M. Malkin, A. V. Savina, E. A. Safargaleyeva, V. V. Goryuchko. Biophysics, **57**, N 1 (2012) 9—13
- [18] М. Ф. Умаров, В. С. Горелик. Оптическая спектроскопия биоактивных препаратов, Вологда, ВоГУ (2014)
- [19] M. Etinski, T. Fleig, C. M. Marian. J. Phys. Chem. A, **113** (2009) 11809—11816