

ФОСФОРЕСЦЕНЦИЯ ХЛОРОФИЛЛОВ *a* И *b* И ИХ ФЕОФИТИНОВ

С. С. Дворников, В. Н. Кнюкшто, К. Н. Соловьев и М. П. Цвирко

С применением фосфороскопической техники при 77 К для хлорофиллов *a* и *b* и их феофитинов, а также для цинковых комплексов феофитинов *a* и *b* измерены скорректированные спектры фосфоресценции, флуоресценции и длительность фосфоресценции, квантовые выходы флуоресценции и фосфоресценции. Квантовый выход фосфоресценции составляет величину $1 - 3 \cdot 10^{-5}$ для хлорофилла *a*, $3 - 5 \cdot 10^{-5}$ для хлорофилла *b* и феофитинов *a* и *b*, $3.5 - 3.9 \cdot 10^{-5}$ для Zn-феофитина *a* и $2.0 - 2.6 \cdot 10^{-4}$ для Zn-феофитина *b* в зависимости от состава растворителя. Рассчитаны вероятности падающих и безызлучательных переходов, определяющие дезактивацию энергии нижнего триплетного состояния. Обсуждаются механизмы излучательных и безызлучательных интеркомбинационных переходов в исследованных системах.

Введение

Изучению фосфоресценции хлорофиллов посвящено достаточно большое число работ, начиная с первой работы по триплет-синглетной фосфоресценции хлорофиллоподобных молекул [1]. Низкая интенсивность фосфоресценции, трудность получения препаратов хлорофиллов высокой степени чистоты и недостаточно высокая чувствительность спектрографических методов в ближней ИК области спектра привели к появлению в литературе противоречивых сведений о фосфоресценции хлорофиллов [2-6]. В начале 70-х годов Литвиным, Красновским с сотрудниками с применением фотоэлектрической регистрации спектров были получены данные, показывающие, что максимум фосфоресценции хлорофиллов расположен в более длинноволновой области, чем это считалось ранее [7, 8]. Ими обнаружена также фосфоресценция феофитинов *a* и *b* и измерена длительность фосфоресценции для указанных пигментов. Несколько позже подобные результаты были получены в работе [9], хотя форма спектра фосфоресценции и положения максимумов в ряде случаев отличается от данных [7, 8]. Отметим, что спектры фосфоресценции в работах [7, 8] имеют значительно большую полуширину, чем спектры флуоресценции, и лишены характерной для металлопорфиринов и металлохлоринов колебательной структуры. В ряде случаев отмечено несовпадение спектров возбуждения фосфоресценции и спектров поглощения.

С целью получения количественных данных о фосфоресценции хлорофиллов *a* и *b*, феофитинов *a* и *b*, а также Zn-феофитинов *a* и *b* нами измерены скорректированные спектры фосфоресценции, спектры возбуждения, абсолютный квантовый выход и длительность фосфоресценции в идентичных условиях опыта.

Методика эксперимента

Измерение спектров люминесценции и возбуждения производилось на установке с двумя светосильными дифракционными монохроматорами. В качестве источника возбуждения использовалась ксеноновая лампа ДКСШ-2000. Для выделения фосфоресценции использовался двухдиско-

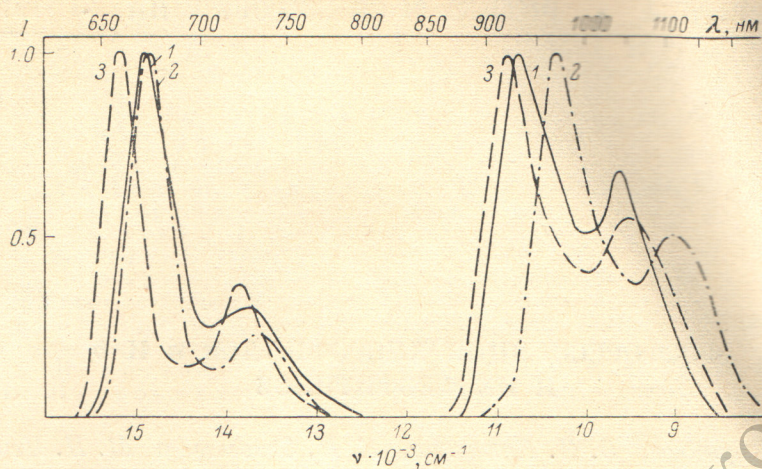


Рис. 1. Спектры флуоресценции и фосфоресценции при 77 К.
 1 — хлорофилла *a* в октане, 2 — хлорофилла *a* в ЭПИП, 3 — хлорофилла *b* в ЭПИП ($\Delta\lambda_{\text{рег.}} = 12$ нм).

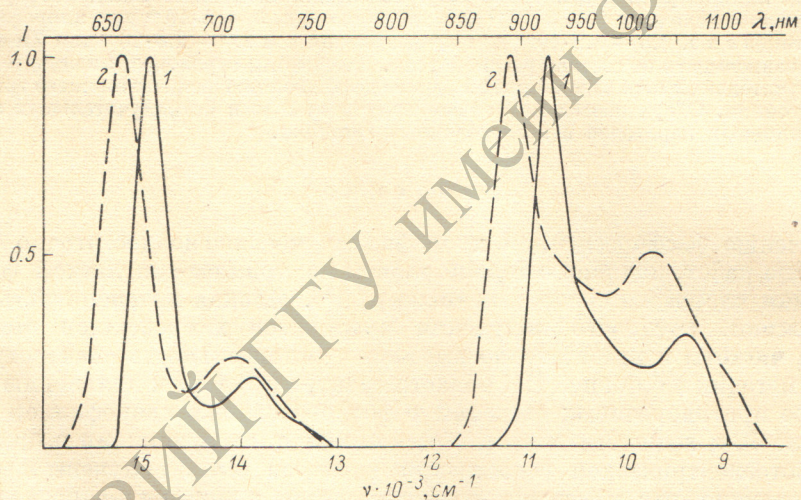


Рис. 2. Спектры флуоресценции и фосфоресценции в ЭП при 77 К.
 1 — феофитина *a*, 2 — феофитина *b* ($\Delta\lambda_{\text{рег.}} = 6$ нм).

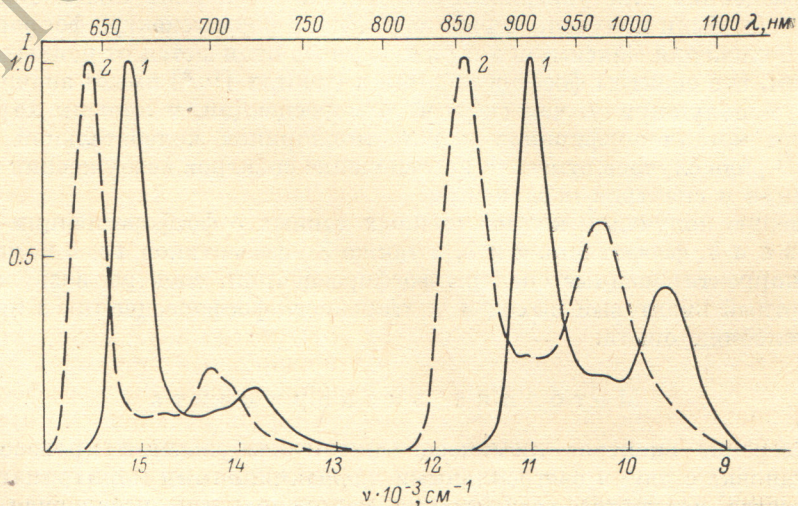


Рис. 3. Спектры флуоресценции и фосфоресценции в ЭП при 77 К.
 1 — Zn-феофитина *a*, 2 — Zn-феофитина *b* ($\Delta\lambda_{\text{рег.}} = 6$ нм).

вый флуорескоп, аналогичный описанному Паркером [10]. В качестве фотоприемника применялся охлаждаемый термохолодильником до -60°C ФЭУ-83 (фотокаод $S - 1$). Измерения $\tau_{\text{фосф.}}$ были выполнены импульсным методом. Возбуждение производилось импульсной лампой ИСП-100 ($E=16$ Дж, $\tau=20$ мкс) через стеклянный светофильтр СЗС-21, регистрация — дифракционным монохроматором ($\Delta\lambda_{\text{рег.}}=6$ нм), охлаждаемым ФЭУ-83 и осциллографом.

Все низкотемпературные (77 К) измерения проведены в кварцевых кюветах и кварцевом сосуде Дьюара.

Измерения квантовых выходов флуоресценции проводились относительно выхода флуоресценции того же соединения при 77 К. Квантовый выход флуоресценции при 77 К в стеклюющихся смесях определялся в специальных опытах относительно квантового выхода флуоресценции при 20°C .

В качестве стеклюющихся при 77 К растворителей использовались смеси: диэтиловый эфир—петролейный эфир (1 : 1) — ЭП, диэтиловый эфир—петролейный эфир—изопропанол (5 : 5 : 2) — ЭПИП и ЭПИП с 5% -й добавкой пиридина — ЭПИПП.

Результаты

Измеренные спектры флуоресценции ряда исследованных соединений представлены на рис. 1—3. В таблице приведены положения главных максимумов (0—0-полос) флуоресценции и флуоресценции. Спектры возбуждения флуоресценции при регистрации в максимуме первой полосы флуоресценции в пределах точности эксперимента (± 1 нм) совпадают со спектрами возбуждения флуоресценции и низкотемпературными спектрами поглощения. Это доказывает, что измеряемая флуоресценция действительно принадлежит исследуемым соединениям, а также показывает, что в используемых растворителях пигменты находятся в виде одной спектральной формы. Для металлокомплексов феофитина, как и для других металлопорфиринов (МР), возможно образование трех форм, различающихся числом дополнительных лигандов: $\text{МР}\cdot\text{L}_0$, $\text{МР}\cdot\text{L}_1$, $\text{МР}\cdot\text{L}_2$, в которых координационное число атома металла составляет 4, 5 и 6 соответственно. Эта особенность металлокомплексов приводит к тому, что для хлорофиллов (Mg-феофитинов) наблюдается существенная трансформация спектров поглощения при понижении температуры, в результате которой между длинноволновой полосой и ее колебательным спутником (670 и 617 нм для хлорофилла *a* в ЭП) появляется новая полоса, которая принадлежит второму электронному переходу [11, 12]. Общий характер спектра поглощения и положение максимумов полос поглощения хлорофиллов в стеклюющихся смесях при 77 К близки к спектру поглощения хлорофиллов в пиридине или смеси пиридин—толуол, для которых показано, что хлорофилл образует двухлигандный комплекс с растворителем, т. е. координационное число атома магния равно 6 (см. также [13]). Таким образом, наблюдаемая нами в стеклообразных матрицах флуоресценция принадлежит форме $\text{Chl}\cdot\text{L}_2$. Для Zn-феофитинов изменения спектров поглощения при понижении температуры значительно слабее (второй электронный переход смещается лишь на ~ 200 cm^{-1} в отличие от смещения на ~ 2000 cm^{-1} для хлорофиллов), однако, по-видимому, и в этом случае при 77 К стабилизируется двухлигандный комплекс. Спектры флуоресценции, как и спектры флуоресценции, состоят из двух полос, соответствующих чисто электронному переходу и вибранным переходам с частотой около 1300 cm^{-1} . Интенсивность вибранный полосы в спектре флуоресценции значительно больше, чем в спектре флуоресценции, что приводит к перекрытию с 0—0-полосой и кажущемуся уширению последней. Отметим, что повышенная интенсивность вибранный полос в спектре флуоресценции характерна для Mg-порфиринов, а также для свободных оснований [14]. Длительность флуоресценции находится в пределах нескольких миллисекунд и в некоторой степени зависит от использованного

Фотофизические параметры хлорофилла и его аналогов

Вещество	Растворитель	$\lambda_{\text{фл.}}^0$, нм	$\lambda_{\text{фосф.}}^0$, нм	ΔE_{S-T} , см ⁻¹	ρ_0 , 293 К	ρ_0 , 77 К	ρ/η	$\varphi \cdot 10^3$	$\tau_{\text{фосф.}}$, мс	$p \cdot 10^3$, с ⁻¹	$q \cdot 10^{-3}$, с ⁻¹	$P_{\text{фосф.}}^{00}$, %
Феофитин <i>a</i>	ЭП	670	923	4090	0.19	0.28	8050	3.4	1.0	4.7	1.0	+30
	ЭПИП	668	930	4220	0.23	0.37	7600	4.9	0.87	8.9	1.15	+30
	Хлорофилл <i>a</i>	670	930	4185	0.35	(0.35)	14885	2.4	0.94	3.9	1.06	—
	Хлорофилл <i>a</i>	671	960	4485	0.35	0.54	51185	1.1	1.4	1.7	0.71	+30
Хлорофилл <i>a</i>	ЭП	675	970	4520	0.35	0.54	38100	1.4	1.2	2.5	0.83	+30
	ЭПИП	673	970	4550	0.46	0.60	32070	1.9	1.5	3.2	0.67	+30
	Хлорофилл <i>a</i>	681	980	4485	(0.46)	(0.60)	20020	3.0	1.1	6.8	0.91	—
	Хлорофилл <i>a</i>	662	911	4130	0.17	0.23	5960	3.9	1.1	4.6	0.91	-9
Zn-феофитин <i>a</i>	ЭПИП	664	910	4070	0.17	0.23	6270	3.7	1.0	4.8	1.0	0
	ЭПИП	665	917.5	4140	0.20	0.26	7500	3.5	1.0	4.7	1.0	+4
	Феофитин <i>b</i>	658	890	3960	0.14	0.20	3900	5.1	1.7	3.8	0.59	+35
Хлорофилл <i>b</i>	ЭП	660	920	4280	0.11	0.14	5000	2.8	2.8	1.2	0.36	+35
	ЭПИП	—	—	—	—	—	—	—	3.3	—	0.30	—
	ЭПИП	660	920	4280	0.13	0.16	2930	5.5	3.4	1.9	0.29	+35
Zn-феофитин <i>b</i>	ЭП	644	857	3865	0.06	0.08	330	24	2.2	12.0	0.45	+14
	ЭПИП	642.5	854	3855	0.06	0.08	400	20	2.6	8.5	0.38	+8
	ЭПИП	645	866	3955	0.08	0.11	460	24	2.0	13.5	0.50	+16

растворителя. С учетом этой зависимости можно считать, что наши результаты по τ_T согласуются с данными [8, 9].

Измеренные значения выхода флуоресценции также зависят от растворителя и находятся в пределах $1 - 3 \cdot 10^{-5}$ для хлорофилла *a*, $3 - 5 \cdot 10^{-5}$ для хлорофилла *b* и феофитинов *a* и *b*, $3.5 \cdot 10^{-5}$ для Zn-феофитина *a* и $2.0 - 2.6 \cdot 10^{-4}$ для Zn-феофитина *b*. Для хлорофиллов выход несколько возрастает при введении более электроно-донорных компонент (пиридина) в растворители.

В работах [7, 8] были получены спектры возбуждения флуоресценции хлорофиллов *a* и *b*, которые для большинства растворителей (за исключением смеси эфир—пиридин 6 : 1) отличались от низкотемпературных спектров поглощения и были близки к спектрам поглощения, измеренным при комнатной температуре. Авторами [7, 8] был сделан вывод о том, что флуоресценция хлорофиллов в эфире, этаноле, ЭПА принадлежит форме Chl·L₁. Из этих данных следует также, что форма Chl·L₁ должна иметь существенно больший квантовый выход флуоресценции, чем форма Chl·L₂. Нам не удалось наблюдать флуоресценцию моносолевых хлорофиллов *a* и *b* в стеклюющихся смесях. Поэтому мы исследовали хлорофиллы *a* и *b* в н.-октане, где, согласно [15], при очень низкой концентрации ($C < 10^{-6}$ м/л) хлорофилл *a* находится в виде моносолеватного комплекса с водой Chl·H₂O. В этих условиях нам удалось наблюдать флуоресценцию ($\lambda_{\max} = 669$ нм) и флуоресценцию ($\lambda_{\max} = 930$ нм), спектры возбуждения которых соответствовали спектрам поглощения хлорофилла *a* в н.-октане и эфире при комнатной температуре. Квантовый выход флуоресценции монолигандного комплекса хлорофилла в н.-октане, согласно нашим измерениям, составляет $2.4 \cdot 10^{-5}$, т. е. практически совпадает с выходом флуоресценции Chl·L₂. Это показывает, что данные работы [7, 8] о несовпадении спектров поглощения и возбуждения ошибочны.

Обсуждение

В таблице представлены рассчитанные на основании полученных экспериментальных данных значения вероятностей излучательной (*p*) и безызлучательной (*q*) дезактивации энергии нижнего триплетного состояния, а также величины синглет-триплетного интервала $\Delta E_{S-T} = \nu_{\text{фл.}}^{\max} - \nu_{\text{фосф.}}^{\max}$.

Величина синглет-триплетного интервала для молекулы порфина и его металлокомплексов составляет около 3700 см^{-1} , для алкилзамещенных порфиринов 3200 см^{-1} и для металлохлоринов около 4000 см^{-1} . Полученные значения ΔE_{S-T} для феофитинов и Zn-феофитинов в общем близки к синглет-триплетным интервалам более простых по структуре хлоринов, т. е. наличие сложной системы заместителей приводит к параллельному понижению $S_1 - T_1$ -уровней. Обращает на себя внимание низкое положение триплетного уровня у двухлигандного комплекса хлорофилла *a* и соответственно большое значение $S - T$ -интервала $\sim 4500 \text{ см}^{-1}$, существенно большее, чем у феофитинов, Zn-феофитинов и у Chl·L₁. Это связано с тем, что, как показывают поляризационные данные [12], нижний триплетный уровень у двухлигандного комплекса хлорофилла родственен синглетному уровню S_2 . При переходе от Chl·L₁ к Chl·L₂ уровень S_2 и соответственно родственный ему уровень, который мы обозначаем $T_{2,1}$ понижаются значительно сильнее, чем уровень S_1 , что приводит к увеличению $S - T$ -интервала.

Значение вероятности *p* для феофитинов и хлорофиллов находится в пределах $2 - 8 \cdot 10^{-2} \text{ с}^{-1}$, что близко к величине *p* для свободного основания октаэтилхлорина. Следует отметить, что эти соединения имеют практически одинаковое значение фундаментальной степени поляризации флуоресценции (около 30%) и подобные поляризационные спектры флуоресценции. Это показывает, что механизм излучательных интеркомбина-

¹ Мы отступаем здесь от традиции нумеровать триплетные уровни в порядке возрастания энергии и говорим об инверсии уровней T_1 и T_2 в случае Chl·L₂.

ционных переходов в молекулах октаэтилхлорина, феофитинов и хлорофиллов одинаков, несмотря на достаточно сильные различия в молекулярной структуре. Таким образом, наличие гидрированного кольца является главным фактором, определяющим вероятности не только синглет-синглетных, но и триплет-синглетных переходов.

Полученные нами данные о влиянии атома цинка на флюоресценцию не имеют аналогии в случае порфиринов и хлоринов. Введение атома цинка обычно увеличивает вероятность p по отношению к свободным основаниям и магниевым комплексам в 10—15 раз^[14, 16]. В противоположность этому в случае феофитина a при введении Zn вероятность p не возрастает, а для феофитина b возрастает лишь в 3 раза. Такое поведение связано с особенностями строения системы электронных уровней у хлорофиллов и Zn-феофитинов. Согласно поляризационным данным, для спин-орбитального взаимодействия в молекулах феофитинов и металлофеофитинов справедливы правила отбора для группы симметрии C_{2v} ^[12]. В случае хлорофиллов и феофитинов нижним триплетным уровнем является уровень T_2 , родственный уровню S_2 ^[12], в то время как для Zn-феофитинов флюоресценция обусловлена переходами с двух близкорасположенных триплетных состояний T_1 и T_2 ^[17], причем в случае Zn-феофитина a преобладает излучение с T_1 -уровня, а для Zn-феофитина b — испускание с T_1 и T_2 -уровней проявляется в равной степени. Согласно правилам отбора, для спин-орбитального взаимодействия для группы симметрии C_{2v} среди низших возбужденных $\pi\pi^*$ -состояний разрешено смешение лишь между состояниями S_1 и T_2 или S_2 и T_1 . Поскольку вероятность перехода $S_0 \rightarrow S_1$ значительно больше (\sim в 10 раз), чем для перехода $S_0 \rightarrow S_2$, и, кроме того, разность $\Delta E_{S_1-T_2} < \Delta E_{S_2-T_1}$, то вероятность излучательного $T_1 \rightarrow S_0$ -перехода должна быть значительно меньше, чем для перехода $T_2 \rightarrow S_0$. С учетом этого обстоятельства отсутствие возрастания вероятности p у Zn-феофитина a может быть объяснено компенсирующим действием двух факторов: изменением электронной природы излучающего триплетного состояния, приводящим к уменьшению p , и возрастанием спин-орбитального взаимодействия при введении тяжелого атома цинка. У Zn-феофитина b наблюдается испускание из T_1 - и T_2 -уровней, и поэтому вероятность p возрастает, приближаясь к значению p для Zn-октаэтилхлорина (0.2 с^{-1})^[18]. Вероятность p у хлорофиллов довольно заметно зависит от природы экстра-лигандов — возрастает в 4 раза при переходе от спирта к пиридину. Из таблицы видно, что возрастание p коррелирует со смещением уровней S_1 и T_2 вниз, т. е. определяется взаимодействием магний—лиганд. Чем больше эти взаимодействия, тем сильнее нарушается нестрогий запрет на смешивание синглетных и триплетных ($\pi\pi^*$) состояний для плоских сопряженных систем (экстра-лиганд нарушает плоское строение молекулы металлопорфирина).

Сравнительно большая вероятность безызлучательного перехода $T_1 \rightarrow S_0$ у феофитинов и их металлокомплексов обусловлена, по-видимому, понижением уровня T_1 при гидрировании пиррольного кольца. Наличие карбонильной группы в положении 3 у соединений ряда b в несколько раз уменьшает вероятность q . Введение металла слабо влияет на величину q в отличие от более простых порфиринов и хлоринов, у которых при введении магния или цинка величина q заметно уменьшается. В настоящее время трудно выделить один фактор, отвечающий за сокращение τ_T у хлорофилла, обусловленное, по-видимому, рядом причин.

При измерениях квантового выхода флюоресценции замороженных образцов мы наблюдали заметное возрастание ρ_0 при понижении температуры до 77 К (аналогичные данные по τ_f были получены в работах^[19, 20]). Частично в случае хлорофиллов это связано с дополнительным комплексообразованием, поскольку для пиридина и ЭПИПП значения ρ_0 (293 К) выше, чем для других растворителей. В свою очередь влияние экстра-лигандов на ρ может быть объяснено уменьшением вероятности перехода $S_1 \rightarrow T_2$ вследствие понижения уровня T_2 . Однако возгорание флюоресценции хлорофиллов в ЭПИПП и феофитина a в ЭП и ЭПИПП при пони-

жении температуры свидетельствует о наличии других причин явления. По-видимому, существенную роль в дезактивации уровня S_1 играет термически активируемый безызлучательный переход на уровень T_3 , расположенный незначительно выше уровня S_1 . При понижении температуры этот канал безызлучательной дезактивации выключается.

Авторы благодарны М. В. Саржевской за любезно предоставленные хлорофиллы.

Литература

- [1] M. Calvin, G. D. Dorough. *J. Am. Chem. Soc.*, **70**, 699, 1948.
- [2] R. S. Becker, M. Kasha. *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 3669, 1955.
- [3] А. Н. Теренин. В сб.: Проблемы фотосинтеза. 9. Изд. АН СССР, 1959.
- [4] J. Fernandez, R. S. Becker. *J. Chem. Phys.*, **31**, 467, 1959.
- [5] J. S. Singh, R. S. Becker. *J. Am. Chem. Soc.*, **82**, 2083, 1960.
- [6] R. L. Amster. *Photochem. Photobiol.*, **9**, 331, 1969.
- [7] А. А. Красновский, В. Л. Романюк, Ф. Ф. Литвин. *ДАН СССР*, **209**, 965, 1973.
- [8] А. А. Красновский, Н. Н. Лебедев, Ф. Ф. Литвин. *ДАН СССР*, **216**, 1406, 1974.
- [9] A. W. Mau, M. Ruza. *Photochem. Photobiol.*, **25**, 601, 1977.
- [10] С. Паркер. Фотолюминесценция растворов. «Мир», М., 1972.
- [11] А. Н. Севченко, К. Н. Соловьев, В. А. Машенков, С. Ф. Шкирман, А. П. Лосев. *ДАН СССР*, **175**, 797, 1967.
- [12] С. С. Дворников, В. Н. Кньюкшто, А. Н. Севченко, К. Н. Соловьев, М. П. Цвирко. *ДАН СССР*, **240**, 1457, 1978.
- [13] T. M. Cotton, A. D. Trifunac, K. Ballshmiter, J. J. Katz. *Biochim. Biophys. Acta*, **368**, 181, 1974.
- [14] М. П. Цвирко, К. Н. Соловьев, А. Т. Градюшко, С. С. Дворников. *Опт. и спектр.*, **38**, 705, 1975.
- [15] R. P. Kooyman, T. J. Schaafsma, J. F. Kleibeucker. *Photochem. Photobiol.*, **26**, 235, 1977.
- [16] А. Т. Градюшко, М. П. Цвирко. *Опт. и спектр.*, **31**, 548, 1971.
- [17] С. С. Дворников, В. Н. Кньюкшто, А. Н. Севченко, К. Н. Соловьев, М. П. Цвирко. *ДАН СССР*, **242**, 1060, 1978.
- [18] А. Т. Градюшко, К. Н. Соловьев, А. Е. Туркова, М. П. Цвирко. *Биофизика*, **20**, 602, 1975.
- [19] Б. М. Джагаров, Г. П. Гуринович. *Опт. и спектр.*, **30**, 425, 1971.
- [20] Р. П. Тамкиви, Р. А. Авармаа. *Изв. АН СССР, сер. физич.*, **42**, 568, 1978.

Поступило в Редакцию 20 июня 1978 г.