

УДК 577.3.1

БИОФИЗИКА

А. А. КРАСНОВСКИЙ м.л., В. А. ШУВАЛОВ, Ф. Ф. ЛИТВИН,
член-корреспондент АН СССР А. А. КРАСНОВСКИЙ

ИССЛЕДОВАНИЕ ФОСФОРЕСЦЕНЦИИ И ЗАМЕДЛЕННОЙ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ПРОТОХЛОРОФИЛЛОВЫХ ПИГМЕНТОВ

Триплетным возбужденным состояниям хлорофилла и его аналогов посвящены многочисленные исследования; в частности, изучены замедленная флуоресценция (¹⁻³) и фосфоресценция (⁴⁻⁶) ряда пигментов. Однако протохлорофилл оказался вне круга этих работ. Между тем изучение триплетных молекул этого пигмента представляет интерес для выяснения механизма биосинтеза хлорофилла и бактериохлорофилла.

Целью настоящей работы явилось исследование триплетных состояний протохлорофилла и протофеофитина по фосфоресценции и замедленной флуоресценции пигментов в растворе.

Установка с фосфороскопом (³) позволяла измерять интенсивность, длительность послесвечения ($\tau \geq 10^{-4}$ сек) и флуоресценцию образцов при возбуждении импульсами ксеноновой лампы-вспышки ИСШ-100-3 (продолжительность импульса 10^{-6} сек., энергия 0,5 дж.). Спектры возбуждения измерялись с помощью монохроматора (относительное отверстие 1:3), спектры послесвечения — с набором интерференционных светофильтров (полуширина полосы 10—15 м μ). В качестве приемника света использован специально отобранный фотоумножитель ФЭУ-38, чувствительный в области 400—1000 м μ .

Выделенный из семян тыквы 4-винилпротохлорофилл (⁷) был дополнительно освобожден от следов протофеофитина на колонке с целлюлозой. 4-Винилпротофеофитин получен путем обработки эфирного раствора протохлорофилла 10% HCl. В качестве растворителя служил перегнанный этанол («ректификат» или «абсолютный»). Использовались растворы пигментов ($2 \cdot 10^{-6}$ M) в кварцевых вакуумных трубках после откачивания воздуха вакуумным диффузионным насосом ($5 \cdot 10^{-5}$ мм рт. ст.). Откачивание производилось по обычной методике при пятикратном замораживании — размораживании.

Замедленная флуоресценция. В эвакуированных растворах пигментов при +20° обнаружено послесвечение с $\tau = 10^{-4}$ — 10^{-3} сек. (табл. 1). Спектры возбуждения свечения совпадают со спектрами погло-

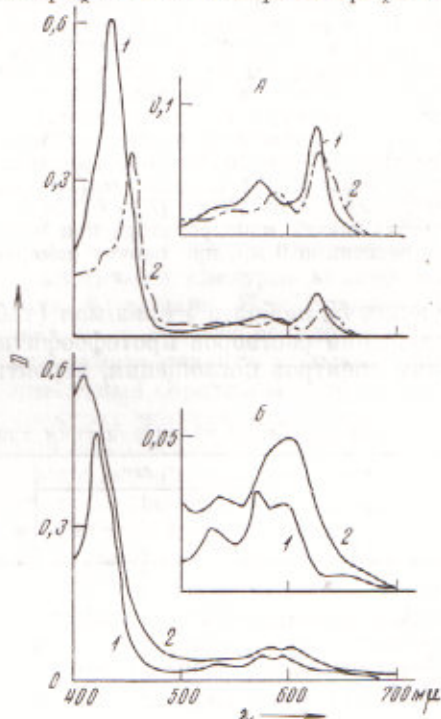


Рис. 1. Спектры поглощения спиртовых растворов ($2 \cdot 10^{-6}$ M) 4-винилпротохлорофилла (A) и 4-винилпротофеофитина (B) при +20° (1) и -196° (2)

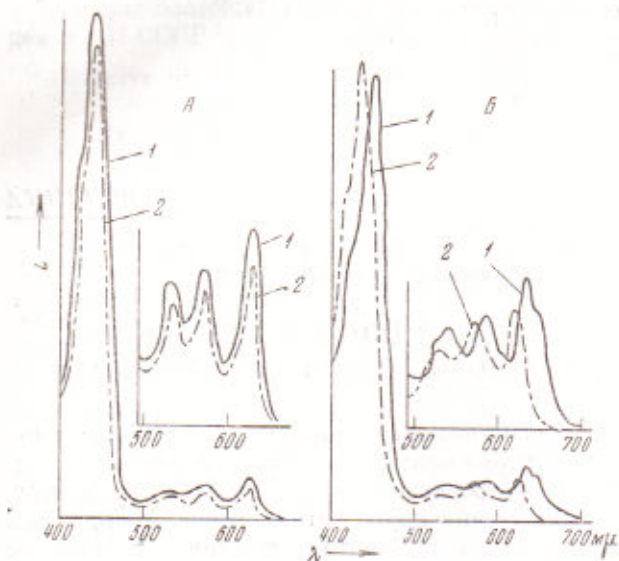


Рис. 2. Сравнение спектров возбуждения флуоресценции (1) и послесвечения (2) растворов 4-винилпротохлорофилла при $+20^\circ$ (А) и -196° (В). Сравнимые спектры измерены на одном и том же образце; поправка на интенсивность возбуждающего света не вводилась (максимум излучения лампы в области 400—500 м μ). Флуоресценцию регистрировали через светофильтры ФС-7 и КС-19 ($\lambda \geq 740$ м μ), фосфоресценцию — через ИКС-1 ($\lambda \geq 800$ м μ), замедленную флуоресценцию через КС-11 ($\lambda \geq 600$ м μ). Спектральная ширина щелей монохроматора при измерении фосфоресценции 9 м μ , при прочих измерениях 3 м μ .

вующее E_e не более 1 ккал/моль (табл. 1). Следует указать, что длительное освещение растворов протофеофитина приводило к необратимым изменениям спектров поглощения, вероятно, обусловленным фотореакцией меж-

ценция и возбуждения флуоресценции (рис. 1—3, табл. 2); спектры излучения совпадают со спектрами флуоресценции (рис. 4, табл. 2). В присутствии воздуха свечение исчезает.

Зависимость интенсивности послесвечения L от интенсивности возбуждающего света I близка к линейной. Отклонения от линейности наблюдались у протохлорофилла при высоких интенсивностях возбуждения (при $I \geq \geq 0,1 \cdot I_{\max}$, $L \sim I^{1,2}$).

Зависимость L от температуры для протохлорофилла описывается уравнением Аррениуса с энергией активации $E_e = 8,5$ ккал/моль. Однако в растворах протофеофитина изменение температуры от -70 до $+50^\circ$ вызвало незначительное изменение L , соответ-

Таблица 1
Количественные характеристики триплетных состояний молекул пигментов

Пигмент	τ , сек.		Φ_e/Φ_f	Φ_p/Φ_e	E_e	ΔE	E_T
	$+20^\circ$	-196°					
ккал/моль							
4-Винил-протохлорофилл	10^{-3}	$4 \cdot 10^{-3}$	10^{-4}	3	$8,5 \pm 0,5$	8,0	37
4-Винил-протофеофитин	$4 \cdot 10^{-4}$	$2 \cdot 10^{-3}$	$2 \cdot 10^{-3}$	20	≤ 1	9,4	34

Примечание. Φ_e , Φ_f и Φ_p — квантовые выходы замедленной флуоресценции и флуоресценции при $+20^\circ$ и фосфоресценции при -196° ; E_T — энергия, соответствующая коротковолновому максимуму фосфоресценции.

ду пигментом и этанолом (усиливалось поглощение в области 600—620 и 440 м μ); в растворах протохлорофилла подобный эффект не наблюдался.

Совокупность данных позволяет предположить, что свечение протохлорофилла является замедленной флуоресценцией, возникающей в результате термоиндуцированного $T - S$ -перехода (E -тип по классификации Паркера (1, 2)). Свечение протофеофитина, учитывая аномально низкую E_e и описанную фотореакцию, можно рассматривать также, как фотохемилюминесценцию, сопровождающую рекомбинацию радикалов, образовавшихся при реакции триплетных молекул пигмента с растворителем. Однако

измерения показали, что послесвечение протофеофитина наблюдается в разных растворителях (этанол, диэтиловом эфире и в адсорбированном состоянии на бумаге) и во всех случаях характеризуется низкой величиной E_c . В связи с этим более вероятно, что люминесценция протофеофитина также является замедленной флуоресценцией E -типа.

Фосфоресценция пигментов обнаружена при -196° как в эвакуированных растворах, так и в присутствии воздуха. τ фосфоресценции в 4–5 раз больше τ замедленной флуоресценции. Выход фосфоресценции протофеофитина примерно в 5 раз выше выхода фосфоресценции протоклорофилла. Максимумы спектров излучения расположены в инфракрасной области (рис. 4, табл. 2).

Форма спектров возбуждения фосфоресценции приближается к форме

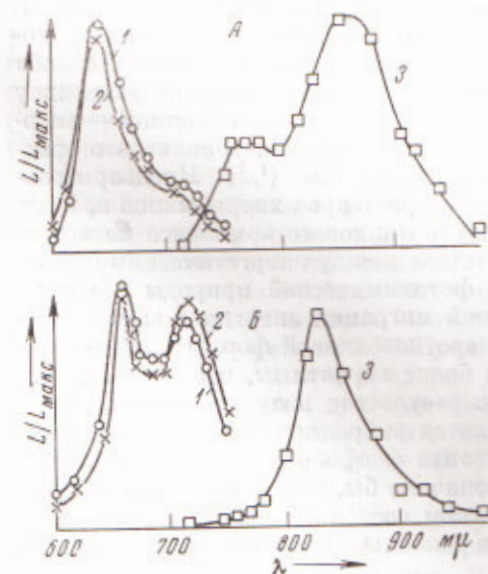


Рис. 4. Сравнение спектров флуоресценции (1) и послесвечения (2, 3) 4-винилпротоклорофилла (А) и 4-винилпротофеофитина (Б) при $+20^\circ$ (1, 2) и -196° (3). Измерено с использованием интерференционных светофильтров

слабее. Спектр возбуждения фосфоресценции протоклорофилла в пределах ошибки измерений совпадает со спектрами поглощения и возбуждения флуоресценции при $+20^\circ$ (рис. 1–3, табл. 2).

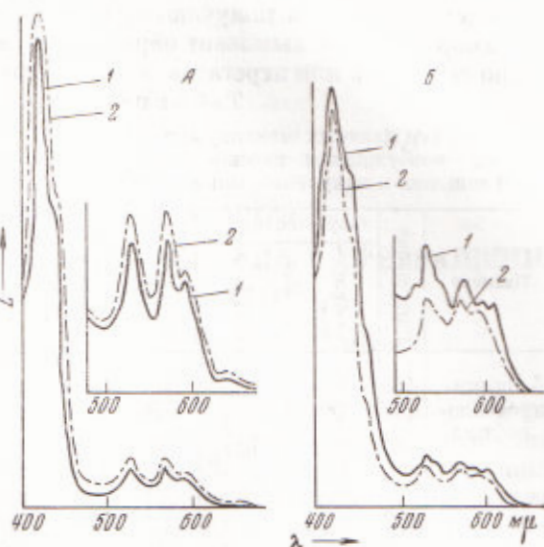


Рис. 3. Сравнение спектров возбуждения флуоресценции (1) и послесвечения (2) растворов 4-винилпротофеофитина при $+20^\circ$ (А) и -196° (Б). Спектральная ширина щелей монохроматора 3 м μ , прочие условия как на рис. 2

спектров поглощения и возбуждения флуоресценции, измеренных при $+20^\circ$, и резко отличается от аналогичных спектров замороженных растворов. Как следует из рис. 1–3, эффект обусловлен тем, что замораживание вызывает значительные обратимые изменения в спектрах поглощения и возбуждения флуоресценции. При этом для протоклорофилла характерен сдвиг главных максимумов на 5–15 м μ в длинноволновую сторону (табл. 2) и появление плеч при 440, 462, 475, 627 и 646 м μ на спадах синего и красного максимумов. У протофеофитина наблюдался сдвиг синего максимума поглощения до 408 м μ и сглаживание структуры спектра; положение основных максимумов возбуждения флуоресценции оставалось таким же, как и при $+20^\circ$, но появился ряд новых плеч при 408, 440, 460, 520, 540 и 608 м μ . В спектрах возбуждения фосфоресценции протофеофитина описанные плечи также появились, но выражены значительно

Описанные факты получают простое объяснение, если предположить, что замораживание вызывает образование нескольких форм пигмента, возможно сольватов или агрегатов, в разной степени способных к флуоресценции и фосфоресценции. При этом наиболее интенсивно фосфоресцирует форма пигмента, преобладающая в растворе при 20° и являющаяся сольватированным мономером.

Таблица 2*

Положение главных максимумов спектров возбуждения люминесценции, поглощения и излучения пигментов (м μ)

Пигмент	Поглощение	Флуоресценция		Послесвечение	
		возбужде- ние	излучение	возбужде- ние	излучение
4-Винил- протохло- рофилл	440	441		441	
	$\overline{456}$	$\overline{456}$		$\overline{442}$	
	540	540	638	538	640
	$\overline{550}$	$\overline{548}$	$\overline{637}$	$\overline{538}$	$\overline{770}$
	578	577		577	
	$\overline{591}$	$\overline{590}$	690	$\overline{577}$	700
			$\overline{690}$		$\overline{870}$
	630	630		630	
	$\overline{637}$	$\overline{637}$		$\overline{629}$	
4-Винил- протофеофитин	422	423		423	
	$\overline{408}$	$\overline{421}$		$\overline{421}$	660
	530	530	662	530	$\overline{840}$
	$\overline{540}$	$\overline{530}$		$\overline{531}$	
	572	572		572	
	$\overline{577}$	$\overline{574}$	713	$\overline{571}$	720
			$\overline{712}$		—
	595	591		593	
	$\overline{600}$	$\overline{595}$		$\overline{593}$	

Примечание. Ошибка в определении максимумов излучения послесвечения 10 м μ , прочих максимумов 2м μ .

* Над чертой +20°, под чертой -196°.

Измерения показали, что $\Delta E \approx E_0$ для растворов хлорофиллов a, b, их феофитинов, но для протопорфирина и его цинкового комплекса E_0 заметно меньше ΔE . Наблюдаемое несоответствие между энергетическими параметрами можно объяснить исходя из фотохимической природы свечения или предположив наличие эффективной миграции энергии в замороженных растворах с триплетного уровня коротковолновой формы пигмента на длинноволновую. Нам представляется более вероятным, что в молекулах протофеофитина и протопорфирина в результате излучательного $T - S$ -перехода наиболее интенсивно заселяется вибрационный подуровень основного состояния, т. е. величина кванта фосфоресценции уменьшается из-за растраты энергии в тепло. Это означало бы, что равновесная конфигурация указанных молекул в триплетном состоянии соответствует большему межъядерным расстояниям, чем в основном и возбужденном синглетном состоянии.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
7 IV 1971

Институт биохимии им. А. Н. Баха
Академии наук СССР
Москва

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ C. A. Parker, T. A. Joyce, Nature, 210, 701 (1966). ² C. A. Parker, T. A. Joyce, Photochem. and Photobiol., 6, 395 (1967). ³ В. А. Шувалов, А. А. Красновский, Молек. биол., 5, № 5 (1971). ⁴ M. Calvin, J. Dorough, J. Am. Chem. Soc., 70, 696 (1948). ⁵ I. S. Singh, R. S. Becker, J. Am. Chem. Soc., 82, 2083 (1960). ⁶ R. S. Becker, I. Allison, J. Phys. Chem., 67, 2662 (1963). ⁷ C. Houssier, K. Sauer, Biochem. et biophys. acta, 172, 476 (1969).