

А. А. КРАСНОВСКИЙ м.л., В. А. РОМАНЮК, Ф. Ф. ЛИТВИН

О ФОСФОРЕСЦЕНЦИИ И ЗАМЕДЛЕННОЙ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ХЛОРОФИЛЛОВ И ФЕОФИТИНОВ *a* и *b*

(Представлено академиком А. И. Опариным 11 X 1972)

Фосфоресценции и замедленной флуоресценции хлорофиллов посвящены исследования нескольких лабораторий (¹⁻⁵), однако измерения спектров возбуждения свечений ранее не проводились. Тем не менее такие измерения представляют интерес для выявления состояния пигментов, ответственных за люминесценцию, а также роли в свечении посторонних примесей. В нашей предшествующей работе путем анализа спектров возбуждений триплетных свечений растворов протохлорофилловых пигментов было показано, что люминесценция сопряжена с определенным типом сольватов, преобладающих в растворе при 20°, но слабо проявляющихся при низкой температуре (⁶). Настоящая работа посвящена выяснению роли сольватов в послесвечении хлорофиллов и феофитинов *a* и *b*.

Измерения проводились на установке с фосфороскопом, позволяющей измерять интенсивность и время полузатухания послесвечения с $t \geq 10^{-4}$ сек. и флуоресценцию образцов при возбуждении светом лампы накаливания 340 Вт (ПЖ-26). Спектры возбуждения измеряли с помощью монохроматора с репликой дифракционной решетки (относительное отверстие 1 : 3, дисперсия 6 мμ/мм), спектры излучения — набором интерференционных светофильтров (полуширина полосы 10—15 мμ). В качестве приемников излучений использованы фотоумножители ФЭУ-38 (область чувствительности 400—1000 мμ, максимум 450 мμ) и ФЭУ-83 (400—1200 мμ, максимум 750 мμ); первый охлаждали водой до 6°, второй — сухим льдом до -60°. Хлорофиллы выделены по известным методикам; феофитины получены путем обработки хлорофиллов 10% HCl. Все пигменты непосредственно перед измерениями очищали хроматографией на бумаге. В качестве растворителя служил этанол-ректификат. Использованы растворы пигментов ($2-4 \cdot 10^{-6}$ M) в кварцевых вакуумных трубках после откачивания воздуха форвакуумным насосом (10^{-3} мм рт. ст.). Откачивание производилось при комнатной температуре при медленной отгонке в ловушку части растворителя. Спектры поглощения измеряли на спектрофотометре СФ-10 с разработанными в лаборатории приставками для низкотемпературной и производной спектрофотометрии.

Фосфоресценция хлорофиллов *a* и *b* в этаноле наблюдалась при -196°, как в эвакуированных растворах, так и в присутствии воздуха. τ фосфоресценции около 10^{-3} сек; максимумы излучения лежат в и.-к. области (табл. 1, рис. 2). Выход фосфоресценции хлорофилла *b* приблизительно в 5 раз выхода свечения хлорофилла *a*.

При анализе спектров возбуждения фосфоресценции замороженных растворов пигментов установлено, что они существенно отличаются от спектров поглощения, измеренных при той же температуре (табл. 2, рис. 1). Отличия особенно заметны в области красной полосы, где максимумы возбуждения на 10—11 мμ короче соответствующих максимумов поглощения. При этом измерения показали, что на второй производной красной полосы поглощения отчетливо заметно плечо, совпадающее по положению с красным максимумом спектра возбуждения (рис. 1). Отсюда можно предположить, что фосфоресценция обусловлена формой пигментов

(возможно, сольватом или агрегатом), слабо проявляющейся по спектрам поглощения.

С целью выяснения природы этой формы представляло интерес сопоставить спектры поглощения растворов при 20 и -196° (табл. 2, рис. 1). В согласии с данными других авторов (^{4, 7, 8}), нами обнаружено, что замораживание приводит к сдвигу главных максимумов поглощения в длинноволновую сторону, увеличению экстинкции и сужению полос. При этом

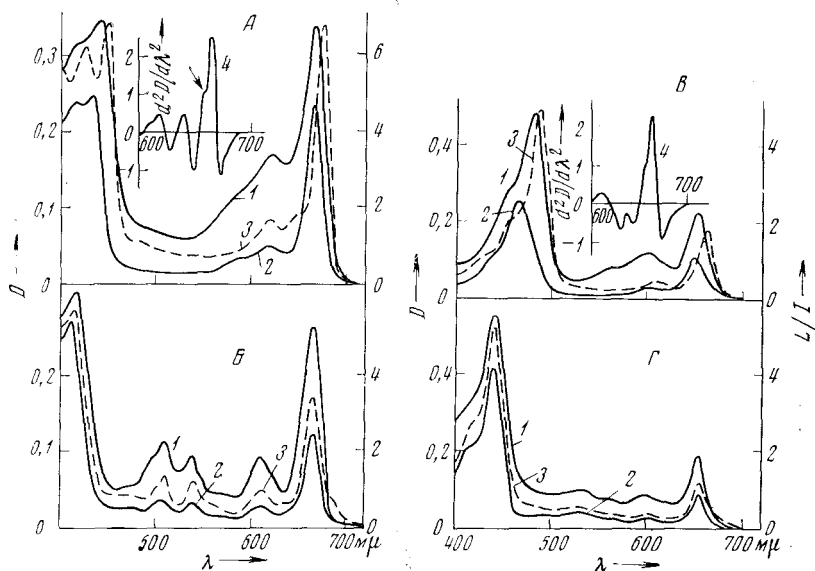


Рис. 1. Сравнение спектров возбуждения флуоресценции (1) хлорофилла а (А) и феофитина а (Б) и хлорофилла б (В) и феофитина б (Г) в этаноле со спектрами поглощения при 20 (2) и -196° (3). 4 — спектр второй производной красной полосы поглощения при -196° ; стрелкой отмечено плечо, соответствующее максимуму спектра возбуждения. Спектральная ширина щелей монохроматоров для 1 — 12 мμ; для 2—4 — 1 мμ. Концентрация пигментов $3 \cdot 10^{-6}$ М, D — оптическая плотность, L — интенсивность свечения, I — интенсивность возбуждающего света при данной λ.

в спектре хлорофилла а появляется дополнительная полоса при 650 мμ. Нагревание замороженных растворов до 20° приводило к полной регенерации исходных спектров поглощения. Учитывая низкую концентрацию пигментов в этих опытах ($3 \cdot 10^{-6}$ М), а также высокую сольватирующую активность этанола, представляется наиболее вероятным, что указанные эффекты обусловлены взаимодействием пигментов с растворителем и не связаны с агрегацией хлорофиллов при охлаждении. Поскольку в сольватации молекул пигментов могут принимать участие центральные атомы магния их молекул, важно сопоставить описанные данные с характеристиками флуоресценции и поглощения феофитинов.

Флуоресценция феофитинов а и б в этаноле примерно в 3 раза интенсивнее флуоресценции соответствующих хлорофиллов; ве-

Таблица 1

Время жизни и максимумы спектров послесвечения пигментов при 20 и -193°

Пигмент	Флуоресценция, -193°		Замедленная флуоресценция, 20°	
	τ, мсек.	λ (± 15), мμ	τ, мсек.	λ, мμ
Хлорофилл а	1,6	985, 1050	0,7	680, 730
Феофитин а	1,4	940, 1000	0,6	680, 730
Хлорофилл б	2,2	930, 1010	0,9	665, 720
Феофитин б	1,8	910, 980	0,7	670, 720

личина τ несколько меньше, чем у хлорофиллов; максимумы лежат в более коротковолновой области (табл. 1, рис. 2).

Спектры возбуждения флуоресценции по положению главных максимумов совпадали со спектрами поглощения. Однако в спектрах возбуждения отсутствовало плечо на длинноволновых спадах главных максимумов, отчетливо заметное по поглощению (табл. 2, рис. 1). Из рис. 1 видно, что в отличие от хлорофиллов спектры поглощения феофитинов в этаноле

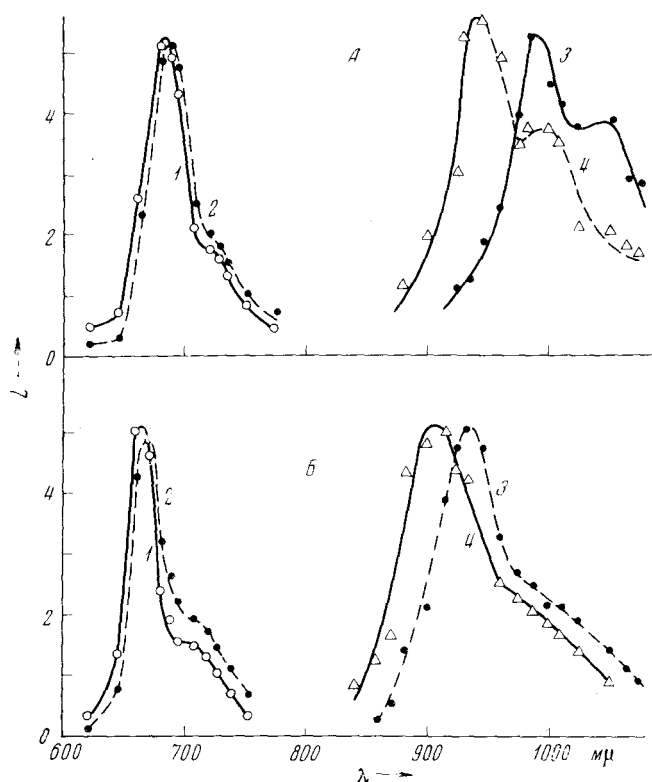


Рис. 2. Спектры излучения послесвечения хлорофиллов и феофитинов а (А) и б (Б) в этаноле. 1 — флуоресценция при 20°; 2 — послесвечение хлорофиллов при 20°; 3 — при -196°; 4 — флуоресценция феофитинов при -196°

сравнительно мало изменяются при замораживании, новым формам можно приписать лишь отмеченное выше небольшое длинноволновое плечо.

Таким образом, можно сделать вывод, что необходимым условием появления в замороженных растворах большого количества длинноволновых

Таблица 2

Положение максимумов спектров поглощения и спектров возбуждения послесвечения растворов пигментов в этаноле, мμ

Пигмент	Поглощение		Возбуждение послесвечения		Пигмент	Поглощение		Возбуждение послесвечения	
	20°	-196°	20°	-196°		20°	-196°	20°	-196°
Хлорофилл а	433	450	433	442	Феофитин а	411	416	411	416
	620	624	620	621		610	611	610	612
	665	650	665	666		667	667	667	666
Хлорофилл б		676			Феофитин б	437	440	437	439
	464	485	464	482		601	600	600	600
	601	610	600	601		655	655	655	665
	650	661	649	652					

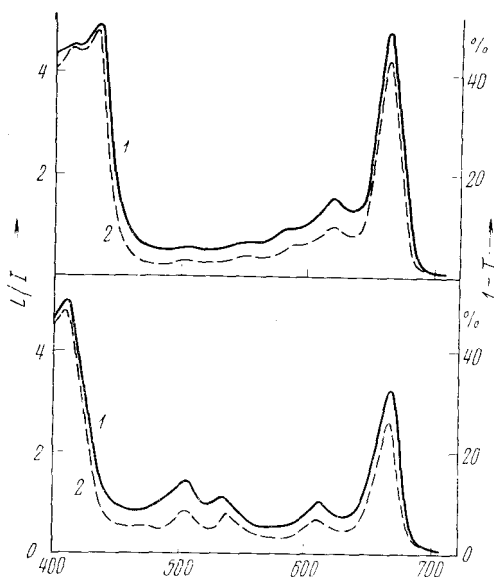


Рис. 3. Сравнение спектров возбуждения замедленной флуоресценции (1) и спектров поглощения (2) для спиртовых растворов хлорофилла а (вверху) и феофитина а при 20°. Т — пропускание растворов

ля преломления⁽⁸⁾, оказывающих значительное влияние на спектры⁽⁹⁾.

Замедленная флуоресценция хлорофиллов и феофитинов наблюдалась при 20° в отсутствие кислорода; τ в 2–3 раза меньше τ фосфоресценции; спектры излучения в пределах экспериментальных ошибок совпадали со спектрами флуоресценции (рис. 2, табл. 1). При высоких интенсивностях возбуждающего света ($I > 10^4$ лк) для хлорофилла и феофитина а зависимость интенсивности свечения (L) от I близка к квадратичной ($L \sim I^{1,6-1,7}$), при низких — близка к линейной. Для феофитина б хлорофилла б в наших условиях эта зависимость близка к линейной при всех использованных значениях I .

В согласии с данными Паркера и Джойс⁽⁵⁾ можно предположить, что в области квадратичной зависимости L от I свечение обусловлено аннигиляцией триплетных молекул (P -тип), в линейной — термoinдуцированным внутримолекулярным $T \rightarrow S$ -переходом (E -тип).

Из рис. 3 видно, что спектры возбуждения замедленной флуоресценции близки к спектрам поглощения пигментов. Таким образом, при 20° за излучение и поглощение ответственны одни и те же формы.

В заключение может сделать вывод, что послесвечение пигментов, по-видимому, является свойством одного типа сольватов пигментов, преобладающего в растворе при комнатной температуре и слабо выраженного в низкотемпературных спектрах поглощения хлорофиллов.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
10 VIII 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ М. Calvin, J. Drought, J. Am. Chem. Soc., **70**, 696 (1948).
- ² J. S. Singh, R. S. Becker, J. Chem. Soc., **82**, 2082 (1960).
- ³ А. Н. Теренин. В сборн. Проблемы фотосинтеза, Изд. АН СССР, 1959, стр. 9.
- ⁴ Г. П. Гуринович, А. Н. Севченко, К. Н. Соловьев, Спектроскопия хлорофилла и родственных соединений, Минск, 1968.
- ⁵ С. А. Parker, T. A. Joyce, Photochem. and Photobiol., **6**, 395 (1967).
- ⁶ А. А. Красновский мл., В. А. Шувалов и др., ДАН, **199**, 1181 (1971).
- ⁷ S. Freed, K. M. Sanceir, J. Am. Chem. Soc., **70**, 198 (1954).
- ⁸ S. S. Brody, S. B. Brody, Biophys. J., **8**, 1511 (1968).
- ⁹ Б. С. Непорент, Н. Г. Бахшиев, Ю. Т. Мазуренко, В сборн. Элементарные фотопроцессы в молекулах, «Наука», 1966, стр. 80.