

А. А. КРАСНОВСКИЙ м.л., Н. Н. ЛЕБЕДЕВ, Ф. Ф. ЛИТВИН

**СПЕКТРАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ФОСФОРЕСЦЕНЦИИ
ХЛОРОФИЛЛОВ И ФЕОФИТИНОВ а и в**

(Представлено академиком А. И. Опариным 1 III 1974)

Информация о флюоресценции хлорофилла весьма ограничена и противоречива (1-3). Сообщалось о существовании π - π -флюоресценции пигментов с двумя максимумами излучения 860-890 нм для хлорофилла в (1-3, 5) и 885 и 925 нм для хлорофилла а (5) и n - π -флюоресценции с максимумами при 733 нм для хлорофилла в и 755 нм для хлорофилла а (4). Оба типа свечения наблюдались в замороженных растворах (-196°), первый - в полярных растворителях (в основном в ЭПА), второй - в неполярном 3-метилпентане, очищенном от следов воды. В наших предыдущих работах при исследовании флюоресценции хлорофиллов а, в, протохлорофилла и их феофитинов в этаноле (7, 8) было обнаружено, что, судя по спектрам возбуждения, свечение принадлежит коротковолновым сольватам пигментов, причем спектры излучения (измеренные с помощью интерференционных светофильтров) существенно от-

Таблица 1

Основные максимумы спектров поглощения и спектров возбуждения и излучения флюоресценции растворов хлорофилла и феофитина а (нм)

Растворитель	Хлорофилл				Феофитин			
	поглощение		флюоресценция		поглощение		флюоресценция	
	20°	-196°	возбуждение	излучение	20°	-196°	возбуждение	излучение
Диэтиловый эфир	661	668	658	930	667	664	664	930
	616	620	618		610	605	605	
	430	435	431		534	538	536	
					506	510	508	
					410	416	418	
Этанол	665	675	668	985	667	667	666	935
	619	650	622		610	611	612	
	431	624	444		537	538	539	
		449			507	509	508	
					411	415	418	
ЭПА	664	670	666	970	667	665	664	930
	616	633	634		609	606	606	
	431	618	618		535	538	538	
		443	442		505	509	509	
					410	418	419	
Эфир + пиридин 6 : 1	664	670	669	975	667	665	665	940
	635	642	640		610	610	610	
	615	617	617		536	539	538	
	440	448	445		507	510	509	
					411	419	420	

Примечание. Полуширина главной полосы излучения 60-70 нм. Точность при измерении максимумов спектров поглощения ± 1 , спектров возбуждения ± 2 и спектров излучения ± 5 нм.

личаются от спектров, описанных другими авторами (главный максимум для хлорофилла а 985 нм, для хлорофилла в 920—930 нм). В данной работе поставлена задача изучить влияние растворителей на спектральные свойства флюоресценции пигментов.

Измерения производились на двух установках с флюороскопами и светосильными монохроматорами на репликах дифракционных решеток. В качестве источников света применялась лампа накаливания с иодным циклом 300 вт или ксеноновая лампа ДКСШ-1000.

Спектры поглощения измеряли на спектрофотометре СФ-10 с приставкой для низкотемпературной спектрофотометрии. Пигменты получены по обычным методикам с конечной хроматографией на сахарозе; использовались растворители ч.д.а. и х.ч., дополнительно перегнанные в соответствующих условиях. Измерения производились в кварцевых трубках Тунберга и кварцевых сосудах Дьюара при -196° в присутствии воздуха.

Полярные растворители (флюоресценция сольватов)

Хлорофиллы. В полярных растворителях флюоресценция хлорофилла а наблюдалась в области $\lambda > 900$ нм (табл. 1, рис. 1), $\tau = 2,0 \pm 0,2$ мсек. В этаноле, кроме главного максимума при 985 нм, при измерениях с монохроматором обнаружилось плечо 930 нм. В смеси растворителей ЭПА (эфир : пентан : этанол 5 : 5 : 2) максимум излучения флюоресценции хлорофилла а лежал при 970 нм, что существенно отличается от данных (5). Для хлорофилла в (табл. 2) в этой смеси положение максимума излучения (890 нм) совпадало с данными работы (3).

Спектры возбуждения флюоресценции хлорофилла а в большинстве растворителей отличались от спектров поглощения, измеренных при -196° (главные максимумы возбуждения смещены в коротковолновую сторону). Исключение составляли растворы в пиридине и стеклющейся смеси эфир — пиридин (рис. 2, табл. 1).

Феофитины. Спектры излучения флюоресценции феофитинов зависели от природы растворителей слабее, чем аналогичные спектры хлорофиллов. При этом максимумы излучения феофитинов во многих растворителях смещены в коротковолновую сторону (табл. 1, 2, рис. 1). τ флюоресценции феофитинов меньше, чем у хлорофиллов (1, 2 ±

Таблица 2

Главные максимумы флюоресценции хлорофилла и феофитина в различных растворителях, нм

Растворитель	Хлорофилл в	Феофитин в
Диэтиловый эфир	890	890
Этанол	912	910
ЭПА	890	890
Пентан	950	960

Примечание. Концентрация пигментов $1-3 \cdot 10^{-5}$ М; полуширина главной полосы 50—60 нм.

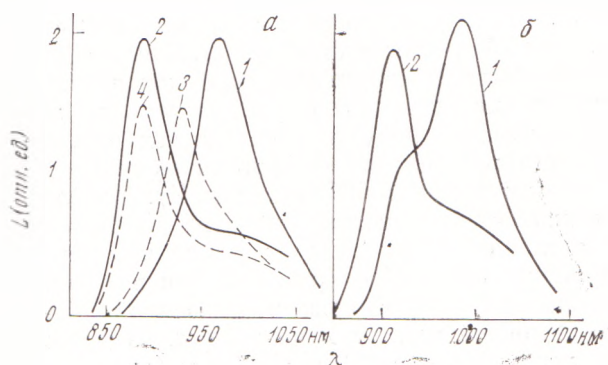


Рис. 1. Спектры излучения флюоресценции пигментов ($2-8 \cdot 10^{-5}$ М) в ЭПА (а) и этаноле (б). 1 — хлорофилл а, 2 — хлорофилл в, 3 — феофитин а, 4 — феофитин в. Возбуждение $\lambda \geq 600$ нм, ширина щели монохроматора 6—10 нм. Спектры исправлены с учетом спектральной чувствительности установки. L — интенсивность флюоресценции

$\pm 0,1$ мсек). Спектры возбуждения флюоресценции разбавленных растворов феофитинов ($0,3-1 \cdot 10^{-5} M$) во всех растворителях совпадали с их низкотемпературными спектрами поглощения (табл. 1).

Неполярные растворители (флюоресценция мономеров и агрегатов)

Хлорофиллы. В неполярных растворителях (пентане, гексане, нонане, октане, вазелиновом масле, бензоле) флюоресценция хлорофиллов также лежит в области $\lambda > 850$ нм. Положение главных максимумов и τ

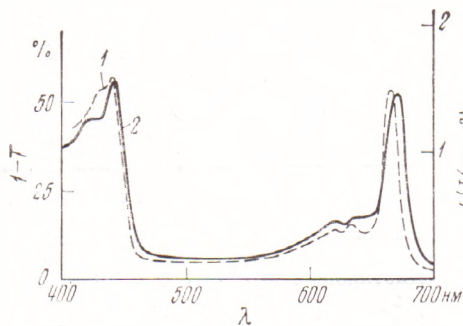


Рис. 2. Спектр возбуждения флюоресценции (1) и спектр поглощения (2) растворов хлорофилла а ($5 \cdot 10^{-6} M$) в ЭПА. Ширина щели для I 4 нм, измерение через ИКС-5 ($\lambda \geq 850$ нм), I — интенсивность возбуждающего света

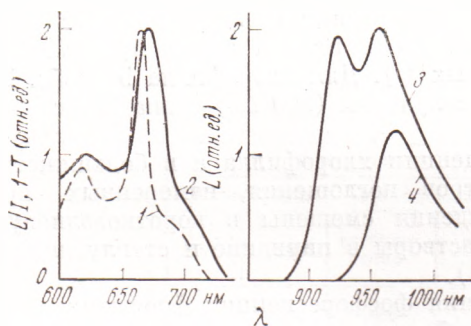


Рис. 3. Спектр возбуждения флюоресценции (1), спектр поглощения (2) и спектры излучения флюоресценции (3, 4) растворов хлорофилла а ($2 \cdot 10^{-5} M$) в октане. 3 — возбуждение светом $\lambda \geq 600$ нм, 4 — $\lambda \geq 680$ нм

излучения зависели от длины волны возбуждающего света. Для хлорофилла а ($1-3 \cdot 10^{-5} M$) при возбуждении в области $\lambda \geq 600$ нм проявлялись две основные полосы 920–930 и 950–980 нм, $\tau = 2,2 \pm \pm 0,2$ мсек. Соотношение полос сильно зависело от природы растворителя и концентрации пигмента. При возбуждении в области $\lambda \geq 680$ нм коротковолновый максимум 920–930 нм исчезал (рис. 3), τ уменьшалось до $1,2 \pm 0,2$ мсек. Наиболее вероятно, что в последнем случае регистрировалась флюоресценция агрегатов хлорофилла.

Анализ спектров поглощения и возбуждения флюоресценции подтвердил эту точку зрения. На рис. 3 показано, что охлаждение растворов хлорофилла приводит к смещению его главных полос поглощения в длинноволновую сторону и появлению интенсивного плеча агрегатов в области 700 нм. Указанное плечо отчетливо проявляется и в спектрах возбуждения флюоресценции, хотя главный максимум возбуждения по положению близок к максимуму поглощения мономерного пигмента (662–666 нм).

В неполярных растворителях, не подвергавшихся специальной очистке от примеси воды, нам не удавалось наблюдать люминесценцию хлорофилла а с максимумом 755 нм, описанную в (4). С целью обнаружения этой люминесценции была предпринята тщательная очистка препаратов пигмента и растворителя (пентана) от следов воды по методикам, данным в (4, 9). «Высушивание» продолжалось до тех пор, пока в спектре люминесценции, регистрируемой без флюороскопа при -196° , не возникал единственный максимум при 755 ± 5 нм (рис. 4). Появление этой люминесценции сопровождалось появлением плеча на длинноволновом склоне красной полосы поглощения при 20° (4) и усилением длинноволновых максимумов поглощения при -196° (рис. 4). При измерениях через флюороскоп люминесценции хлорофилла в указанной области спектра не обнаруживалась. Основной максимум излучения, измеряемого в этом случае, по-прежнему лежал в области 950–1000 нм (рис. 4). На

основании этих данных удалось оценить нижний предел люминесценции при 755 нм; $\tau \leq 10^{-5}$ сек. Измерение τ , выполненное с помощью фазового флуориметра, дало значение 4 псек. Отсюда наиболее вероятно, что свечение с максимумом 755 нм является флуоресценцией агрегированного хлорофилла.

Феофитины при замораживании в неполярных растворителях также образовывали длинноволновые агрегаты, поглощающие в области 680–700 нм. Главный максимум флюоресценции феофитина а обнаруживался в области 950–1000 нм. В спектре возбуждения флюоресценции феофитина а доминирует мономерный максимум 665–670 нм.

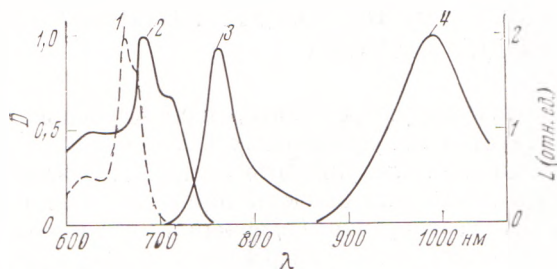


Рис. 4. Спектры поглощения (1, 2) и спектры люминесценции (3, 4) растворов хлорофилла а в «сухом» пентане ($2 \cdot 10^{-4}$ M). 1 – измерен при 20°, 2–4 – при -196° ; 3 – регистрация без флюороскопа при возбуждении в области 350–450 нм, 4 – измерение через флюороскоп

Таким образом, во всех использованных растворителях флюоресценция наиболее интенсивна у коротковолновых сольватов мономерного пигмента. В полярных растворителях хлорофиллы образуют также относительно слабо флюоресцирующие длинноволновые сольваты (видимо, дисольваты по магнию⁽¹⁰⁾), которые не обнаруживаются в растворах феофитинов. В неполярных растворителях наблюдается флюоресценция длинноволновых агрегатов пигментов. Максимумы излучения флюоресценции мономерных и агрегированных форм лежат в области $\lambda > 850$ нм. При этом данные Синха и Беккера о спектрах π – π -флюоресценции хлорофилла а⁽⁵⁾ не подтвердились в наших измерениях (табл. 1). Люминесценция хлорофилла а при 755 нм в «высушенном» пентане, интерпретированная Фернандезом и Беккером⁽⁴⁾ как n – π -флюоресценция пигмента, по нашим данным, является не флюоресценцией, а флуоресценцией агрегированного хлорофилла. В итоге, согласно нашим измерениям, энергия триплетного уровня хлорофилла а несколько меньше, чем это принималось до сих пор.

Авторы благодарят А. Ю. Борисова и В. И. Годик за измерение τ на фазовом флуориметре.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
25 II 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ M. Calvin, G. D. Dorough, J. Am. Chem. Soc., v. 70, 699 (1948). ² R. S. Becker, M. Kasha, J. Am. Chem. Soc., v. 77, 3669 (1955). ³ А. Н. Теренин, В сборн. Проблемы фотосинтеза, Изд. АН СССР, 1959, стр. 9. ⁴ J. Fernandez, R. S. Becker, J. Chem. Phys., v. 31, 467 (1959). ⁵ J. S. Singh, R. S. Becker, J. Am. Chem. Soc., v. 82, 2083 (1960). ⁶ Г. П. Гуринович, А. Н. Севченко, К. П. Соловьев, Спектроскопия хлорофилла и родственных соединений, Минск, 1968. ⁷ А. А. Красновский мл., В. А. Шувалов и др., ДАН, т. 199, 1181 (1971). ⁸ А. А. Красновский мл., В. А. Романюк, Ф. Ф. Лигвин, ДАН, т. 209, 965 (1973). ⁹ K. Ballschmitter, J. J. Katz, J. Am. Chem. Soc., v. 91, 2661 (1969). ¹⁰ S. Freed, K. N. Sancier, J. Am. Chem. Soc., v. 76, 198 (1954).