

В. Б. ЕВСТИГНЕЕВ и А. А. КРАСНОВСКИЙ

## ТУШЕНИЕ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ФТАЛОЦИАНИНА МАГНИЯ И ХЛОРОФИЛЛА ПОСТОРОННИМИ МОЛЕКУЛАМИ

(Представлено академиком А. Н. Терениным 19 II 1948)

Известны наблюдения над тушением флуоресценции хлорофилла в растворе кислородом<sup>(1-3)</sup>, бензидином, анилином и иодистым натрием<sup>(2)</sup>. Эти работы представляют интерес в связи с выяснением механизма передачи энергии от возбужденной светом молекулы хлорофилла, хотя исследования последних лет показали в ряде случаев независимость процессов тушения флуоресценции и фотосенсибилизации друг от друга<sup>(4, 5)</sup> и большую роль длительно живущего «фотоактивированного», по терминологии А. Н. Теренина, возбужденного состояния, возникающего при внутримолекулярной конверсии электронной энергии возбуждения<sup>(6)</sup>.

В наших предыдущих сообщениях<sup>(5, 7, 8)</sup> было показано, что фталоцианин магния по своим оптическим и фотохимическим свойствам близок к хлорофиллу.

Спектр флуоресценции спиртового раствора фталоцианина магния при наблюдении в малый спектрометр Цейсса представляется в виде узкой красной полосы, лежащей в области 670—675 м $\mu$ , т. е. приблизительно на 5 м $\mu$  дальше в длинноволновую часть спектра по сравнению с главной полосой флуоресценции хлорофилла.

В настоящей работе измерялось тушение флуоресценции фталоцианина магния и хлорофилла (а + b) в спиртовом растворе кислородом, хиноном, гидрохиноном, аскорбиновой кислотой, иодистым калием и иодистым натрием. Эти вещества были выбраны как представители соединений, имеющих различное сродство к электрону, и в большинстве являются участниками биологических окислительно-восстановительных систем. Во избежание сильного фотохимического воздействия при возбуждении ультрафиолетом флуоресценция возбуждалась в красном максимуме поглощения; во всех случаях одновременно с тушением флуоресценции измерялось изменение величины коэффициента поглощения в максимуме, характеризующее возможное химическое взаимодействие между молекулами пигмента и тушителя.

В качестве прибора для измерения интенсивности флуоресценции нами был использован фотометр Пульфриха с приставкой для измерения мутности (рис. 1).

Свет от лампы накаливания *a* проходит через красный светофильтр RG-2 *b* и фокусируется на пробирке *c* с флуоресцирующим раствором.

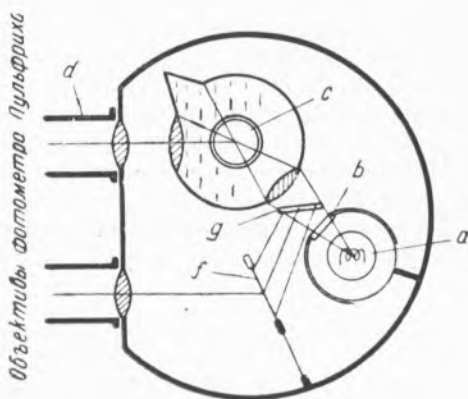


Рис. 1

Свет флуоресценции через объектив  $d$  попадает в левую диафрагму фотометра Пульфриха. Его интенсивность сравнивается с интенсивностью свечения матового стекла  $f$ , на которое падает луч света от лампы  $a$ , прошедший через светофильтр  $b$  и частично отраженный посредством стеклянной пластинки  $g$ .

Интенсивность флуоресценции выражалась в делениях процентной шкалы правого барабана фотометра Пульфриха, отсчитанных при установке левого барабана на 100% и при достижении равенства освещения обеих полей зрения. Перед окуляром фотометра находился светофильтр RG-2. Пропуская водопроводную воду через рубашку прибора, можно было в течение опыта поддерживать температуру постоянной в пределах  $\pm 0,5^\circ \text{C}$ .

Контрольными измерениями прозрачных нефлуоресцирующих жидкостей было показано, что отсчет для интенсивности отраженного и рассеянного света не превышает 2—3 делений при использовании для сравнения матового стекла № 4. Контрольное измерение проводилось перед каждым опытом, и полученная величина вычиталась из измеренной интенсивности флуоресценции.

Ход кривой зависимости интенсивности флуоресценции от концентрации при данной методике измерения подобен для обоих соединений. Максимальную интенсивность флуоресценции показывают в обоих случаях растворы с коэффициентом погашения 0,5 в красном максимуме поглощения (668  $\mu\text{m}$  для фталоцианина магния и 664  $\mu\text{m}$  для хлорофилла), что соответствует концентрации 0,25—0,3 · 10<sup>-5</sup> М/л.

Интенсивность флуоресценции пигментов зависит от примененного растворителя, что видно из табл. 1.

Тушение флуоресценции кислородом измерялось в вакуумной трубке Тунберга специальной формы, допускающей ее установку в кювето-

Таблица 1

Растворитель	Фталоцианин магния		Хлорофилл (a + b)	
	Коэффициент погашения раствора в красном максимуме кривой поглощения	Интенсивность флуоресценции в условн. единицах	Коэффициент погашения в красном максимуме кривой поглощения	Интенсивность флуоресценции в условн. единицах
Этанол 95% . . . . .	0,415	61,5	0,418	40,5
Ацетон . . . . .	0,413	70,5	0,417	50,5
Пиридин . . . . .	0,412	35,5	0,416	32,0

Примечание. Измерения при  $7 \pm 0,5^\circ \text{C}$ .

Таблица 2

	Коэффициент погашения $E$	Интенсивность флуоресценции		Коэффициент погашения $E$	Интенсивность флуоресценции	
		в условн. единицах	в %		в условн. единицах	в %
Спиртовый раствор фталоцианина магния, температура $7 \pm 0,5^\circ \text{C}$ $E^1 \text{ см}$ при 668 $\mu\text{m}$						
После удаления воздуха . . . . .	1,07	75	100	0,490	86	100
После насыщения $\text{O}_2$ . . . . .	1,07	63	84	0,486	69	80,5
После удаления $\text{O}_2$ . . . . .	1,08	75	100	0,489	86	100
Спиртовый раствор хлорофилла (a + b) $E^1 \text{ см}$ при 664 $\mu\text{m}$						
После удаления воздуха . . . . .	0,541	51	100	0,207	36,5	100
После насыщения $\text{O}_2$ . . . . .	0,545	41	80,5	0,207	30,5	83
После удаления $\text{O}_2$ . . . . .	0,542	51	100	0,208	37,0	101,5

держатель спектрофотометра Бекмана.

В начале опыта воздух удалялся из раствора при кипении под вакуумом в течение нескольких минут, затем измерялось погашение  $E$  раствора в красном максимуме поглощения и интенсивность флуоресценции непосредственно в трубке. Те же измерения производились после впуска кислорода под атмосферным давлением и насыщения раствора при взбалтывании и, наконец, после повторного удаления кислорода под вакуумом.

Степень тушения флуоресценции обоих соединений зависит от процентного содержания воды в спирте. Чем больше воды содержит спирт, тем меньше тушится флуоресценция, что связано, очевидно, с меньшей растворимостью кислорода в воде. При 25% воды в спирте тушение флуоресценции хлорофилла кислородом уже нельзя заметить. С фталоцианином подобный опыт не мог быть произведен, так как при разбавлении спирта водой пигмент выпадает из раствора.

Один из нас (7) указывал на то, что не удалось наблюдать тушения флуоресценции растворов этих пигментов воздухом при возбуждении ртутной линией 365 м $\mu$ ; повидимому, величина эффекта была близка к пределу возможной ошибки измерения на примененном тогда фотоэлектрическом флуорометре Колемана, обладающем фотоэлементом, сравнительно малочувствительным в крайней красной области спектра. Примененный в настоящей работе метод измерения дает возможность обнаружить тушение флуоресценции воздухом, хотя и в этом случае величина наблюдаемого эффекта близка к субъективной ошибке измерения. Тушение флуоресценции остальными веществами определялось в пробирке, в которую наливалось 10 мл раствора. В табл. 3 приводятся данные опытов с хиноном (свежевозогнанным) и гидрохиноном.

Таблица 3

Спиртовый раствор фталоцианина магния, температура $16 \pm 0,5^\circ \text{C}$							
Концентрация хинона в М/л . . .	0	0,0019	0,0065	0,016	0,034	0,066	0,122
Коэффициент погашения $E^{1 \text{ см}}$ при 668 м $\mu$ . . .	0,530	0,528	0,520	0,525	0,520	0,509	0,500
Интенсивность флуоресценции в условн. единицах	63	57	44	34	21	16	13
То же в % . . . .	100	90,5	70	54	33,5	25,5	20,5

Спиртовый раствор хлорофилла (a + b), температура $12 \pm 0,5^\circ \text{C}$							
Концентрация хинона в М/л . . .	0	0,0019	0,0055	0,016	0,031	0,065	0,147
Коэффициент погашения $E^{1 \text{ см}}$ при 664 м $\mu$ . . .	0,282	0,280	0,276	0,275	0,272	0,264	0,252
Интенсивность флуоресценции в условн. единицах	37	35	31	24	18	11	8
То же в % . . . .	100	95	84	65	49	30	22

Спиртовый раствор фталоцианина магния, температура $12 \pm 0,5^\circ \text{C}$							
Концентрация гидрохинона в М/л . . .	0	0,039	0,129	0,268	0,542	—	—
Коэффициент погашения $E^{1 \text{ см}}$ при 668 м $\mu$ . . .	0,509	—	0,502	0,499	0,495	—	—
Интенсивность флуоресценции в условн. единицах	67	66	60	52	40	—	—
То же в % . . . .	100	98	90	77,5	59,5	—	—

Концентрация гидрохинона в М/л . . . . .	0	0,061	0,165	0,328	0,566	1,10	—
Коэффициент поглощения $E^{1\text{ см}}$ при 664 мμ . . . . .	0,264	—	—	0,260	—	0,258	—
Интенсивность флуоресценции в условн. единицах	37	37	35,5	35	34	32	—
То же в % . . . . .	100	100	96	94,5	92	86,5	—

При растворении гидрохинона (х. ч. от Мерка) образовывалась некоторая муть, которую необходимо было удалять во избежание ошибок при измерениях. Как показали контрольные опыты, муть полностью удаляется фильтрованием через плотный бумажный фильтр. Адсорбции красителя на бумаге не наблюдалось.

Мы не приводим цифр для опытов с KJ, NaJ и аскорбиновой кислотой. Эти соединения практически не тушат флуоресценции фталоцианина магния и хлорофилла при концентрациях, соответствующих их насыщению в 95% этаноле. Заметное тушащее действие можно было наблюдать только при значительных концентрациях KJ и NaJ для растворов хлорофилла, содержащих 20—25% воды.

Следует отметить, что хотя изменение поглощения в красном максимуме после прибавления тушения очень невелико, оно все же превышает возможную ошибку эксперимента. Это побудило нас исследовать полный спектр поглощения спиртовых растворов хлорофилла и фталоцианина магния после прибавления хинона. В качестве контрольного раствора при спектрофотометрировании служил раствор хинона соответствующей концентрации. Было обнаружено, что прибавка хинона не вызывает заметного изменения положения и величины максимумов поглощения в сине-фиолетовой части спектра для хлорофилла и в ультрафиолете для фталоцианина магния.

Из полученных данных можно сделать следующие заключения.

1. Тушение флуоресценции фталоцианина магния посторонними молекулами подобно тушению флуоресценции хлорофилла; таким образом, этот эффект не связан с наличием в молекуле хлорофилла лабильных атомов водорода и свидетельствует о подобии свойств тетразапорфиновой и порфиновой системы конъюгированных двойных связей.

2. Молекулы-окислители, обладающие сродством к электрону (хинон, кислород), сильно тушат флуоресценцию исследованных пигментов, тогда как восстановители (гидрохинон, аскорбиновая кислота, NaJ и KJ) гораздо менее активны.

В заключение приносим глубокую благодарность акад. А. Н. Теренину за ценные указания и помощь в работе.

Институт биохимии им. А. Н. Баха  
Академии Наук СССР

Поступило  
12 II 1948

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> Н. Kautsky и А. Hirsch, Ber. Deutsch. chem. Ges., **64**, 2677 (1931).  
<sup>2</sup> Т. Franck и Н. Levi, Z. phys. Chem., B, **27**, 409 (1934). <sup>3</sup> Э. В. Шпольский и Г. Шереметьев, ЖФХ, **8**, 640 (1936). <sup>4</sup> Э. В. Шпольский и Е. В. Гришкун, там же, **19**, 107 (1945). <sup>5</sup> А. А. Красновский и Г. П. Брин, ДАН, **58**, 1087 (1947). <sup>6</sup> А. Н. Теренин, Фотохимия красителей, изд. АН СССР, 1947; Acta Physicochim. URSS, **18**, 210 (1943). <sup>7</sup> А. А. Красновский, ДАН, **58**, 617 (1947).  
<sup>8</sup> В. Б. Евстигнеев и А. А. Красновский, ДАН, **58**, 417 (1947).