

ФИЗИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

В. Б. ЕВСТИГНЕЕВ и В. А. ГАВРИЛОВА

**СРАВНЕНИЕ СПЕКТРАЛЬНЫХ СВОЙСТВ ХЛОРОФИЛЛА
И ФЕОФИТИНА В РАЗЛИЧНЫХ РАСТВОРИТЕЛЯХ**

(Представлено академиком А. Н. Терениным 10 VI 1952)

В настоящем сообщении приводятся сравнительные данные о величине поглощения, интенсивности флуоресценции и тушении хиноном для хлорофилла и феофитина в различных растворителях (1, 2).

При исследовании были использованы: хлорофилл (a + b), полученный из сухого порошка крапивы хроматографическим методом разделения, и феофитин (a + b), полученный из того же исходного материала по Фишеру (3). Измерения поглощения растворов производились в стеклянной трубке специальной формы с притертой пробкой на фотоэлектрическом спектрофотометре с кварцевой оптикой. Ширина щели спектрофотометра при работе в области спектра 660—670 м μ была 0,025—0,03 мм и соответствовала $\sim 1,5$ м μ . Интенсивность флуоресценции растворов при возбуждении красным светом (участок спектра выше 600 м μ) до и после прибавления тушителя измерялась на фотометре Пульфриха с приспособлением, описанным ранее (4). Табл. 1 представляет собой сводку полученных нами результатов. Кроме того, на рис. 1 приведены соответствующие спектры поглощения феофитинов (a + b) в различных растворителях.

В пределах серии измерений для одного пигмента концентрация взятых растворов была одинаковой во всех опытах. Это достигалось путем использования заранее приготовленного основного раствора пигмента в серном эфире. Точно отмеренный и всегда одинаковый объем охлажденного +2—3° раствора испарялся при комнатной температуре без вскипания, с выкачиванием на водоструйном насосе. Сухой остаток сейчас же растворяли в определенном объеме исследуемого растворителя.

Для достижения полной сравнимости данных для всех растворителей непосредственно измеренный эфирный раствор приготавливался подобным же образом. Некоторые авторы (5) указывали, что выпаривание и высушивание хлорофилла из эфирного раствора вызывает его частичную феофитинизацию. Специально поставленные нами опыты показали, что подобный эффект получается только при использовании недостаточно чистого эфира. Серный эфир, взболтанный с FeSO₄ для удаления перекисей, выдержанный над металлическим натрием и затем перегнанный обычным образом, совершенно не изменил величины поглощения в максимумах кривой поглощения хлорофилла.

Концентрации растворов хлорофилла и феофитина могут быть приблизительно сравниваемы друг с другом по величине поглощения. Соотношение величины поглощения в красном максимуме для хлорофилла и феофитина при одинаковой концентрации составляет приблизительно 1,7 (5).

Величины коэффициентов поглощения примененных нами растворов хлорофилла и феофитина близки друг к другу. Отсюда следует, что весовая концентрация растворов феофитина несколько выше, чем хлорофилла. Сравнивая данные, приведенные в табл. 1, можно отметить следующее. Положение красного максимума, соответствующего первому элект-

тронному уровню молекулы, меняется при переходе от одного растворителя к другому в случае феофитина, как правило, несколько слабее, чем в случае хлорофилла, и не всегда в том же направлении. Изменение абсолютной величины поглощения несколько больше для феофитина, но отношение интенсивности поглощения в обоих максимумах, наоборот, меняется относительно сильнее для хлорофилла.

Все это свидетельствует о том, что взаимодействие с растворителем не совсем одинаково для обоих пигментов, и выявляет роль магния в моле-

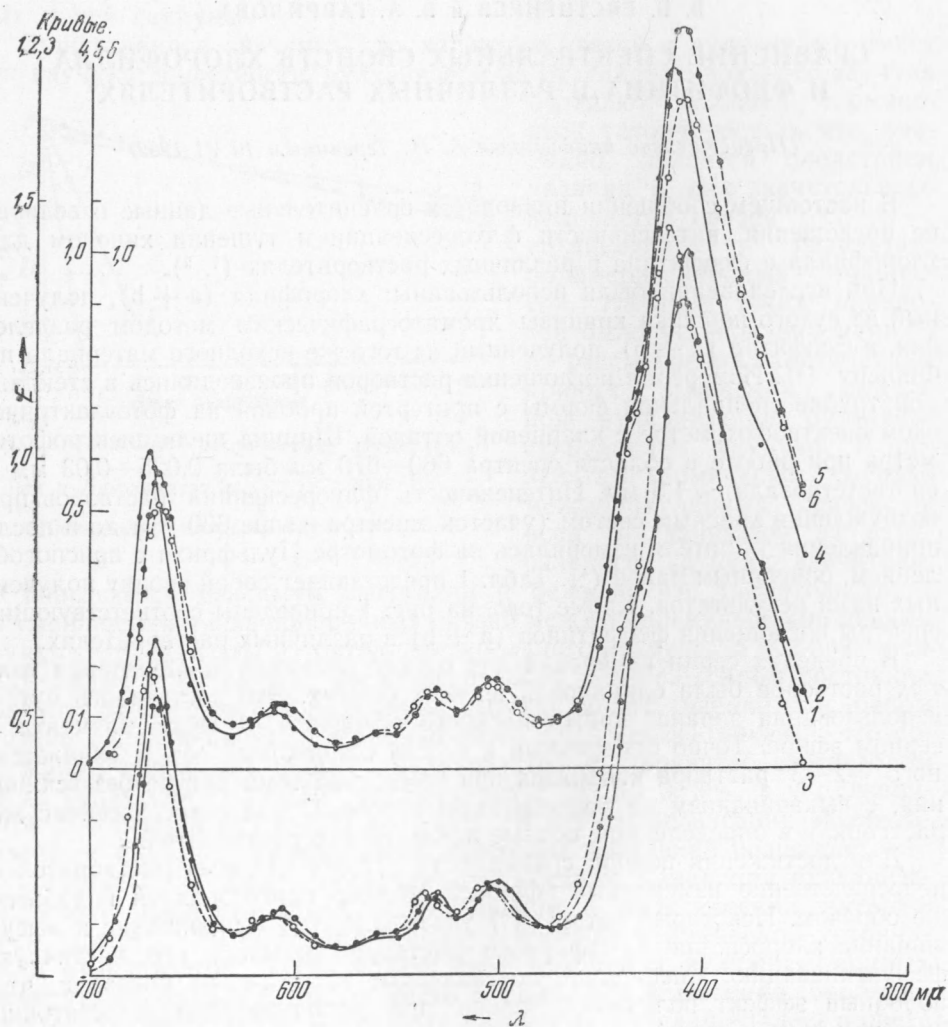


Рис. 1. Спектр поглощения феофитина (a + b) в различных растворителях. 1 — этиловый эфир, 2 — этанол, 3 — пиридин, 4 — толуол, 5 — ацетон, 6 — метанол

куле пигмента. Однако отсутствие большой разницы между поведением хлорофилла и феофитина в разных растворителях говорит о том, что влияние магния не настолько сильно, чтобы коренным образом изменить свойства молекулы пигмента. Роль конъюгированной системы связей остается, видимо, решающей для обоих пигментов.

Разница в положении красного максимума при переходе от хлорофилла к феофитину в одном и том же растворителе неодинакова для разных растворителей. Она, например, составляет 6 мμ для этилового эфира и равна нулю для пиридина. Это говорит о специфичности действия раство-

Влияние природы растворителя на спектральные свойства хлорофилла и феофитина

Растворитель	Красный максимум			Синий максимум			Соотнош. интенсивн. поглощения в синем и красном максимуме	Интенсивн. флуоресц., отн. един.	Относит. интенсивн. флуоресц. по отношению к этрному раствору	% тушения флуоресценции 0,01 М хинона*
	положение в мμ	коэф. поглощения	относит. интенсивн. поглощения	положение в мμ	коэф. поглощения	относит. интенсивн. поглощения				
Хлорофилл (a + b)										
Эфир этиловый . . .	661	0,580	1,00	428	0,900	1,00	1,55	62	1,00	52
Ацетон	662	0,555	0,96	429	0,828	0,92	1,49	53	0,85	43
Пиридин	669	0,572	0,99	442	0,782	0,87	1,37	38	0,61	42
Этанол	664	0,539	0,93	429	0,442	0,75	1,19	40	0,64	33
Толуол (влажный)	665	0,560	0,97	430	0,855	0,95	1,53	45	0,73	46
Бензол	665	0,558	0,96	430	0,855	0,95	1,53	45	0,73	44
Феофитин (a + b)										
Эфир этиловый . . .	667	0,650	1,00	408	1,39	1,00	2,14	24	1,00	46
Ацетон	665	0,572	0,88	408	1,45	1,04	2,52	23	0,96	39
Пиридин	669	0,592	0,91	415	1,45	1,04	2,44	16	0,67	32
Этанол	666	0,532	0,82	408	1,30	0,94	2,44	22	0,87	24
Толуол (влажный)	670	0,610	0,94	412	1,35	0,97	2,22	18	0,75	35
Метил. спирт . . .	665	0,520	0,80	408	1,30	0,94	2,50	19	0,79	27

* Хинон не поглощает ни возбуждающего света, ни испускаемого красного света флуоресценции. Проценты показывают долю исчезнувшей флуоресценции.

рителей в зависимости от их природы и возможности взаимодействия пигмента со средой не только по центру, но и по другим местам его молекулы (6). Интенсивность флуоресценции феофитина значительно ниже, чем хлорофилла, и при приблизительно одинаковом поглощении в красном максимуме не превышает 40—50% от интенсивности флуоресценции последнего. Тушение флуоресценции в присутствии одинаковой концентрации хинона (0,01 М) также заметно меньше для феофитина. В отношении измерений тушения флуоресценции на основании наших опытов необходимо отметить, что видимый процент тушения хиноном заметно зависит от концентрации применяемых растворов пигмента даже при очень небольших абсолютных изменениях концентрации (10^{-5} — 10^{-6} мол/л).

В одном из опытов при концентрации хлорофилла в спирте, соответствующей коэффициенту поглощения $K_{664\text{ мμ}} = 1,0$, тушение 0,01 М/л хинона было 31%, при $K_{664} = 0,58$ 37% и при $K_{664} = 0,26$ 42%. Поэтому сравнение свойств пигмента в этом отношении, во избежание получения несравнимых результатов, должно проводиться при одинаковом или близком поглощении в том участке спектра, в котором производится возбуждение флуоресценции. В случае работы со спиртовыми растворами, содержащими воду, эффект тушения может зависеть от количества последней, уменьшаясь, в частности, для хинона с увеличением содержания воды.

На рис. 2 приведены кривые интенсивности флуоресценции хлорофилла (a + b) и феофитина (a + b) при разной концентрации хинона в толуоле, этиловом спирте и пиридине. Измерения интенсивности флуоресценции проводились вышеупомянутым способом. Все кривые рис. 2 получены в присутствии воздуха. Как нами было установлено ранее (4), тушение флуоресценции хлорофилла кислородом воздуха не превышает

3—4% и, следовательно, близко к точности применяемого метода измерения.

Поглощение растворов обоих пигментов в красном максимуме было одинаковым во всех случаях ($K_{\text{макс}}^{\text{красн.}} = 0,4$). Как следует из рисунка, кривые тушения флуоресценции феофитина лежат в случае всех растворителей выше, чем хлорофилла. Наиболее сильное тушение для обоих пигментов наблюдалось в случае толуоловых растворов, что может быть объяснено малым взаимодействием молекул пигмента с молекулами неполярного растворителя.

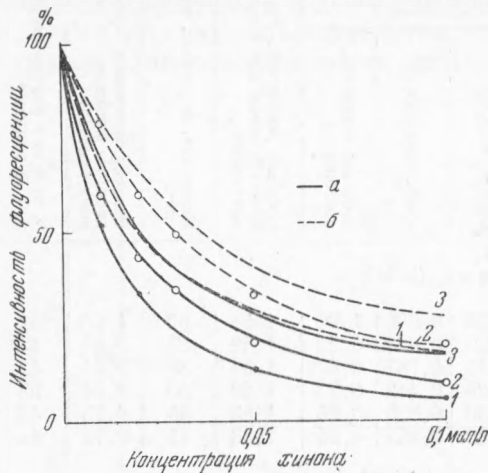


Рис. 2. Кривые тушения флуоресценции хлорофилла (а + б) и феофитина (а + б) *n*-хиноном в различных растворителях. а — хлорофилл, б — феофитин. 1 — в толуоле, 2 — в пиридине, 3 — в этаноле (96%). Интенсивность флуоресценции выражена в % от первоначальной (без тушителя)

Концентрация половинного тушения, хотя и неодинакова для разных растворителей по абсолютной величине, но во всех случаях для феофитина приблизительно в два раза больше, чем для хлорофилла, и составляет, соответственно, 0,01—0,015 и 0,02—0,03 мол/л хинона. Из этого следует, что способность взаимодействия возбужденных молекул пигмента с посторонними молекулами окислителями заметно выше в присутствии магния. Возможно, что это связано с установленным нами ранее (2) фактом более легкой окисляемости (способности к от-

даче электрона) хлорофилла по сравнению с феофитином.

Известно (1), что кинетика тушения флуоресценции разбавленных растворов красителей удовлетворительно выражается формулой $F_0/F = 1 + KC$, где F_0 и F — интенсивности флуоресценции до и после прибавления тушителя; C — концентрация тушащего вещества; K — константа тушения. Средние величины K , вычисленные по нашим экспериментальным данным (для 5 точек кривых) для трех растворителей, приведены в табл. 2.

Удовлетворительное постоянство величины K для различных точек одной кривой, наблюдавшееся в наших опытах, свидетельствует о годности указанной формулы для исследованных нами растворов. Расхождение величин констант для отдельных точек заметно выше для хлорофилла, чем для феофитина.

Приносим глубокую благодарность акад. А. Н. Теренину и докт. биол. наук А. А. Красновскому за ценные советы и помощь в работе.

Таблица 2

Константы тушения K флуоресценции хлорофилла и феофитина хиноном в различных растворителях

Растворитель	Хлорофилл	Феофитин
Толуол . .	127	55
Этанол . .	53	27
Пиридин .	65	34

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

Поступило
12 III 1952

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- 1 Е. Рабинович, *Photosynthesis and Related Processes*, 2, part. 1, 1951.
2 В. Б. Евстигнеев и В. А. Гаврилова, ДАН, 74, 781 (1950). 3 Н. Fischer, A. Stern, *Die Chemie des Pyrrols*, 2, H. 2, 56, 1940. 4 В. Б. Евстигнеев, А. А. Красновский, ДАН, 60, 623 (1948). 5 F. P. Zscheile, C. L. Comar, *Bot. Gaz.*, 102, 463 (1941). 6 В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова, А. А. Красновский, ДАН, 70, 261 (1950).