

ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЙ АНАЛИЗ ТРИПЛЕТНЫХ СОСТОЯНИЙ ХЛОРОФИЛЛОВ

А. А. КРАСНОВСКИЙ мл.

Биологический факультет Московского Государственного Университета им.
М. В. Ломоносова. СССР

Кратко суммированы данные о триплетных состояниях хлорофилла и его аналогов, полученные путем анализа длительных послесвечений различных типов: фосфоресценции, замедленной флуоресценции E и P-типов, фотосенсибилизированной люминесценции кислорода, фотохемилюминесценции. Измерены энергия и время жизни триплетных состояний хлорофилла *a*, *b*, хлоробииум-хлорофиллов, протохлорофилла и их феофитинов в замороженных растворах (-196°C). Изучено влияние сольватации и агрегации на параметры триплетов. С помощью фосфоресценции зарегистрированы триплетные состояния прохлорофилла (ида), хлорофиллида и хлорофилла *a* в этилированных и зеленеющих листьях, хлоропластах и их фрагментах, обогащенных фотосистемой 1 или 2. Продемонстрирована способность триплетов указанных пигментов, а также бактериохлорофилла и бактериофеофитина передавать энергию кислороду в растворе. Зарегистрирована люминесценция синглетного кислорода (1270 нм), возникающего в этом процессе. Анализ фотохемилюминесценции показал, что синглетный кислород, триплетные состояния и лабильные перекиси пигментов являются интермедиями в процессе необратимого фотоокисления пигментов кислородом.

Триплетные состояния хлорофиллов исследовались в течение многих лет с использованием различных методов анализа — импульсного фотолиза, ЭПР, длительных послесвечений и др. В ходе этих исследований накоплена большая информация о свойствах триплетов в растворах; в последнее время образование триплетных состояний обнаружено в агрегатах пигментов [1, 2] и фотосинтетических мембранах [2—6]. В настоящей статье кратко суммированы результаты нашего исследования триплетных состояний хлорофиллов, выполненного с использованием длительных послесвечений различных типов.

Методы исследования

Для измерения длительного послесвечения с временем затухания (τ) более 10^{-1} сек применялись установки с механическими фосфороскопами, медленно затухающие свечения ($\tau > 10^{-1}$ сек) регистрировали с помощью простых механических затворов однократного действия. Приемниками света служили охлаждаемые фотоумножители с характеристиками типа C—1 или C—5. Для регистрации спектральных параметров использованы светосильные диффракционные монохроматоры. Возбуждение люминесценции производилось светом мощных ламп накаливания или ксеноновых ламп (500—1000 вт). Установки поз-

воляли изучать кинетику, спектры возбуждения и излучения и квантовые выходы (ϕ) послесвечений с $\tau \cong 10^{-4}$ сек и $\phi \cong 10^{-8}$ [1, 5]. Пигменты получали по обычным методикам колонной хроматографией на сахарозе, бумаге или целлюлозе [7].

Результаты исследования

Механизмы изученных нами свечений иллюстрируются рис. 1. Из рисунка видно, что они различаются по сложности и природе промежуточных стадий. Характеристика каждого из них приводится ниже.

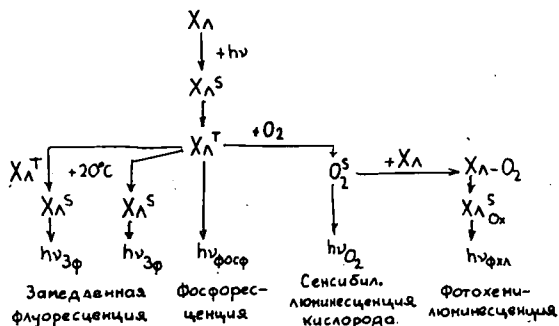


Рис. 1. Механизмы длительных послесвечений растворов хлорофиллов

Фосфоресценция сопровождается прямым излучательным переходом молекул из триплетного в основное состояние. Впервые о фосфоресценции хлорофиллов *a* и *b* сообщалось в [8—11]. Однако из-за использования сравнительно мало чувствительных фотографических методов надежных данных получено не было. Авторы предположили, что существуют два типа фосфоресценции замороженных растворов пигментов (-196°C): Один, коротковолновый, — при 730—760 нм [10], другой, длинноволновый, — при 840—890 нм [8, 9, 11, 12]. Поскольку первый наблюдался в неполярном растворителе — пентане, а второй — в смеси полярных растворителей, их связали соответственно с $\pi^* - n$ и $\pi^* - \pi^*$ переходами в молекулах.

Мы повторили эти измерения с использованием современной спектральной и фотометрической техники (см. «Методы исследования»). В результате удалось обнаружить и изучить фосфоресценцию нескольких хлорофиллов и феофитинов в различных растворителях [1, 5, 6, 13, 14]. Параметры свечения сведены в Табл. I. В полярных растворителях при -196° зарегистрирована фосфоресценция двух сольватов хлорофиллов — моно- и дисольватов по магнию. Люминесценция моносольватов преобладала в диэтиловом эфире, дисольватов — в пиридине. У феофитинов в тех же условиях наблюдалась только одна фосфоресцирующая форма, близкая по свойствам к моносольватам хлорофиллов (Табл. I). В неполярных растворителях удалось наблюдать фосфоресценцию мономерных и агрегированных форм (Табл. I). Агрегация приводит к смещению максимумов излучения в длинноволновую сторону и сокращению времени жизни [1, 5, 6].

Таблица 1.
 Параметры флуоресценции растворов хлорофилла и других пигментов при -196°C

Пигмент	Диетиловый эфир (магные моносолеваты)			Пиридин (магные дисолеваты)			Петролейный эфир (агрегаты)		
	максимум спектров возбуж- дения (нм)	максимум спектров эмиссии (нм)	время жизни (мсек)	максимум спектров возбуж- дения (нм)	максимум спектров эмиссии (нм)	время жизни (мсек)	максимум спектров возбуж- дения (нм)	максимум спектров эмиссии (нм)	время жизни (мсек)
Хлорофилл <i>a</i>	658	930	2,4	672	985	1,8	690—720	970—1000	1—1,2
Феофитин <i>a</i>	664	930	1,2	665	940	1,8	—	—	—
Хлорофилл <i>b</i>	644	890	4,3	657	930	3,1	—	940—1000	—
Протохлорофилл	622	845	11,5	636	920	4,5	630—635	890—930	4,5
Протофеофитин	564, 587	796, 897	9,1	569, 592	798, 905	10	—	—	—
Хлоробинум-хлорофилл «660»	658	960	1,5	—	—	—	700—745	1050	0,7—0,9
Хлоробинум-хлорофилл «650»	649	920	2,3	—	—	—	—	—	—

Ошибки измерений максимумов эмиссии и возбуждений были ± 5 и ± 2 соответственно. Точность измерений времени жизни и квантового выхода флуоресценции составляли приблизительно $\pm 10\%$ и 10^{-5} .

Коротковолновую фосфоресценцию в области 730—760 нм нам наблюдать не удавалось. (Такой же отрицательный результат был описан Амстером [12.]). С целью регистрации этой люминесценции мы попытались воспроизвести условия работы [10], в которой она была описана. Раствор хлорофилла *a* в пентане очищали от следов воды до тех пор, пока в спектре люминесценции, измеряемой без фосфороскопа при -196° , не возникал единственный максимум при 755 ± 5 нм (рис. 2). При измерениях через фосфороскоп указанная люминес-

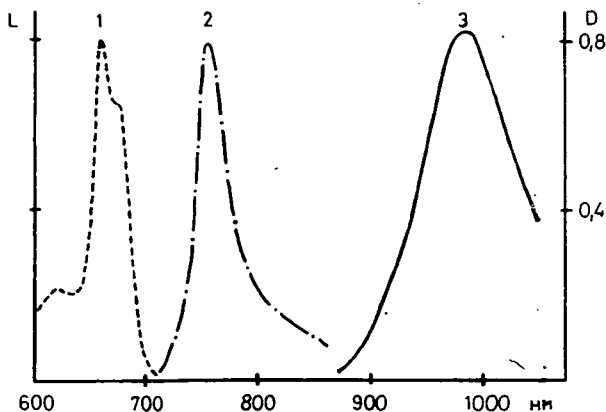


Рис. 2. Спектральные характеристики раствора хлорофилла *a* в «сухом» пентане. (Повторение эксперимента Фернандеза и Бекера [10]. 1 — спектр поглощения при $+20^\circ\text{C}$; 2, 3 — спектры эмиссии при -196°C ; 2 — измерение без фосфороскопа, 3 — измерение через фосфороскоп. — L — интенсивность люминесценции, D — оптическая плотность

ценция не обнаруживалась. Вместо нее наблюдалось на 5 порядков более слабое свечение при 950—1000 нм (рис. 2), т. е. в том же спектральном интервале, что и фосфоресценция сольватов. Оценка времени жизни люминесценции при 755 нм, выполненная с помощью фазового флуорометра дала величину 4 нсек [1]. Отсюда наиболее вероятно, что указанное свечение является флуоресценцией хлорофилла. Следовательно можно заключить, что существует только один тип фосфоресценции пигментов в области более длинноволновой, чем предполагалось ранее.

Фосфоресценцию удавалось наблюдать не только в растворах, но и после включения пигментов в твердые пленки полимеров [6, 15]. В этом случае она возникала уже при комнатной температуре.

Полученные в модельных системах результаты послужили основанием для поиска фосфоресценции пигментов *in vivo*. Фосфоресценция различных форм протохлорофилла (ида,) хлорофиллида и хлорофилла *a* была найдена при -196° в этиолированных и зеленеющих листьях фасоли, изолированных хлоропластах и их фрагментах, обогащенных фотосистемой 1 или 2 [5, 6]. Спектральные характеристики фосфоресценции этиолированных и зеленеющих листьев пред-

ставлены на рис. 3. Из рисунка видно, что одновременно с фосфоресценцией наблюдалась низкотемпературная замедленная флуоресценция (-196°), совпадающая по положению максимума излучения с флуоресценцией формы протохлорофиллида «650» и хлорофилла *a* «670». На изолированных хлоропластах и фрагментах обнаружена фосфоресценция, близкая по спектру к фосфоресценции хлорофилла *a* в зеленеющих листьях (максимум 960—980 нм). Интенсивность этой фосфоресценции возрастала после тепловой денатурации, в присутствии детергентов или органических растворителей, мочевины, а также после добавления восстановителя — дитионита. Таким образом, можно предположить, что интенсивность фосфоресценции хлоропластов зависит от степени повреждения нативных мембран и, возможно, окислительно-восстановительного состояния реакционных центров.

Замедленная флуоресценция наблюдалась в растворах и пленках пигментов в отсутствие кислорода. Замедленная флуоресценция хлорофиллов *a* и *b* была впервые описана в [16, 17]. Мы обнаружили ее также у протохлорофилла, хлоробииумхлорофилла, феофитинов [6, 14, 13]. Квантовый выход свечения при $+20^{\circ}$ составлял $10^{-4} - 10^{-6}$. Для всех пигментов удалось наблюдать два типа люминесценции: один, сопровождающий аннигиляцию триплетных молекул при соударениях (Р-тип), другой (Е-тип) — внутримолекулярный термоиндуцированный триплет-синглетный переход (рис. 1). Р-тип замедленной флуоресценции преобладал при высоких интенсивностях света ($\cong 10^5$ эрг/см² сек) в вязких растворах при относительно низких температурах ($-70 - 0^{\circ}$ С). Интенсивность свечения пропорциональна квадрату интенсивности возбуждающего света (I), энергия активации (ΔE) близка к энергии активации вязкости растворителя (3—4 ккал/моль), время затухания вдвое меньше τ триплетных состояний. Е-тип замедленной флуоресценции доминировал в вязких растворителях, полимерных пленках или в невязких средах, но при $I \cong 10^4$ эрг/см² сек. Интенсивность этого свечения пропорциональна I , ΔE обычно около 10 ккал/моль, τ вдвое больше τ люминесценции Р-типа. В случае хлорофиллов *a*, *b*, протохлорофилла, хлоробииум-хлорофилла энергия активации люминесценции Е-типа близка к энергии синглет-триплетного расщепления (E_{ST}), рассчитанной по нашим спектральным данным. Однако для феофитинов ΔE несколько меньше E_T . Особенно существенная разница была найдена у протофеофитина $\Delta E \approx 1$ ккал/моль, $E_{ST} = 12,5$ [14].

В этиолированных листьях, как указывалось, обнаружен еще один тип замедленной флуоресценции, возникающей при -196° С. Интенсивность свечения пропорциональна I^2 , поэтому наиболее вероятно, что она сопровождается ре-

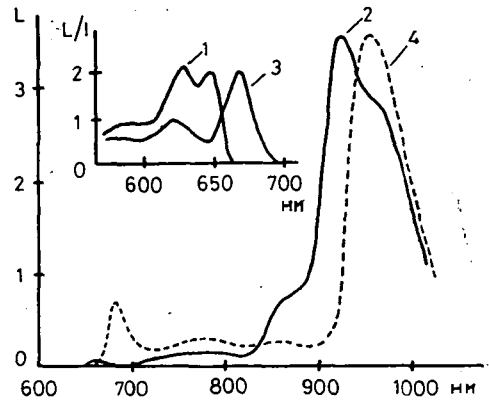


Рис. 3. Спектральные параметры длительных послесвечений протохлорофилла (ида) в этиолированных листьях фасоли (1, 2) и хлорофилла *a* в зеленеющих листьях через час после освещения (3, 4) при -196° С; 1, 3 — спектры возбуждения; 2, 4 — спектры эмиссии

комбинационный процесс, например, слияние триплетных экситонов или рекомбинацию радикалов [5].

Сенсибилизированная люминесценция кислорода. Описанная выше люминесценция наблюдалась либо в системах, лишенных кислорода, либо в замороженных образцах или твердых пленках. В присутствии O_2 в жидких растворах фосфоресценция и замедленная флуоресценция не возникали. Известно, что тушение люминесценции является следствием эффективного переноса энергии от триплетных молекул на кислород, приводящего к образованию возбужденного, синглетного кислорода (1O_2). Недавно нам удалось зарегистрировать свечение 1O_2 в этом процессе [18]. Свечение наблюдалось на установках с фосфороскопом при использовании в качестве растворителя четыреххлористого углерода, в котором τ 1O_2 имеет аномально высокое значение [19]. В качестве фотосенсибилизаторов были использованы хлорофилл *a*, *b*, протохлорофилл, бактериохлорофилл, феофитины, порфирины, антрацен и нафтацен. Во всех случаях спектры возбуждения свечения совпадали со спектрами поглощения пигментов, а спектры излучения имели один максимум при 1270 нм (рис. 4). При использовании в качестве фотосенсибилизатора протопорфирина было установлено, что τ свечения около 10^{-2} сек, квантовый выход примерно $3 \cdot 10^{-5}$.

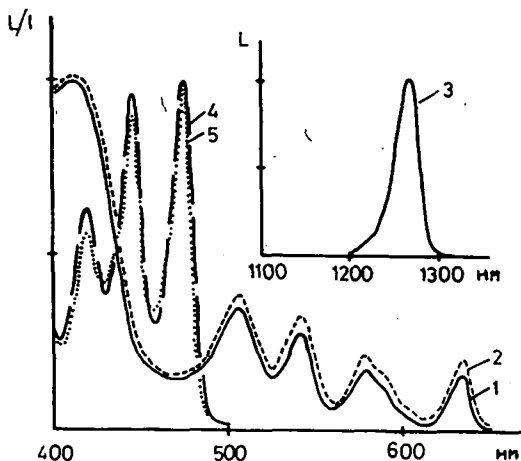


Рис. 4. Послесвечение синглетного кислорода в растворе протопорфирина (1—3) и нафтацена (4,5) в четыреххлористом углероде при $+20^\circ C$; 1, 4 — спектры поглощения; 2, 5 — спектры возбуждения; 3 — спектр эмиссии.

Фотохемилюминесценция возникала после освещения насыщенных воздухом растворов пигментов в различных растворителях. Длительность свечения несколько десятков минут, квантовый выход варьировал от 10^{-5} до 10^{-8} [20—22]. В серии предшествующих работ было показано, что фотохемилюминесценция наблюдается в растворах всех фотосинтетических пигментов, порфиринов, синтетических красителей и ароматических углеводородов. Во всех случаях она сопровождается процессом деструктивного фотоокисления пигментов

кислородом. Интермедиатами этого окисления, как было установлено, являются синглетный кислород и лабильные перекиси пигментов. Термоиндуцированный распад перекисей приводит к накоплению конечных продуктов фотоокисления пигментов. Часть молекул конечных продуктов образуется не в основном, а в возбужденном состоянии. Деактивация возбуждения приводит к излучению фотохемилюминесценции. Таким образом, спектр излучения совпадает со спектром флуоресценции конечных продуктов фотоокисления, а не с флуоресценцией исходного пигмента (рис. 5).

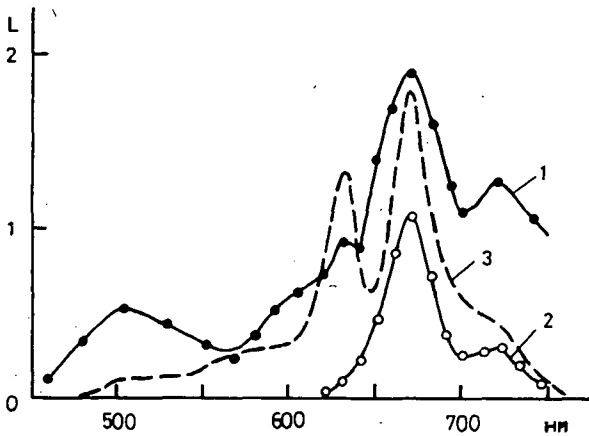


Рис. 5. Спектры фотохемилюминесценции (1) и спектр флуоресценции (2) хлорофилла *a* в ацетоне; 3 — спектр флуоресценции в результате интенсивного фотоокисления через 30 минут кислородом

В итоге, с помощью длительных послесвечений удалось описать свойства триплетных состояний разных пигментов, наблюдать генерацию триплетов в агрегатах пигментов и фотосинтетических мембранах, доказать способность пигментов передавать энергию кислороду. С помощью фотохемилюминесценции было установлено, что синглетный кислород и лабильные перекиси пигментов являются интермедиатами процесса деструктивного фотоокисления хлорофиллов. Все это демонстрирует широкие возможности использования длительных послесвечений в качестве метода анализа триплетных состояний и первичных фотореакций пигментов *in vivo* и *in vitro*.

Литература

- [1] Krasnovsky Jr., A. A., N. N. Lebedev, F. F. Litvin: Dokl. Akad. Nauk USSR **216**, 1406 (1974).
- [2] Uphaus, K. A., J. R. Norris, J. J. Katz: Biochem. Biophys. Res. Com. **61**, 1057 (1974).
- [3] Leigh, Jr., J. S., R. L. Dutton: Biochem. et Biophys. Acta. **357**, 67 (1974).
- [4] Parson, W. W., R. L. Cogdell: Biochem. et Biophys. Acta **416**, 105 (1975).
- [5] Krasnovsky Jr., A. A., N. N. Lebedev, F. F. Litvin: Dokl. Akad. Nauk USSR **225**, 207 (1975).
- [6] Krasnovsky Jr., A. A., F. F. Litvin: Isv. Akad. Nauk. USSR, ser. fiz. **39**, 1948 (1975).
- [7] Shaposhnikova, M. G. A. A. Krasnovsky: Biokhimiya USSR **38**, 193 (1973).

- [8] Calvin, M., G. D. Dorough: J. Am. Chem. Soc. **70**, 99 (1948).
 [9] Becker, R. S., M. Kasha: J. Am. Chem. Soc. **77**, 3669 (1955).
 [10] Fernandez, J., R. S. Becker: J. Chem. Phys. **31**, 467 (1959).
 [11] Singh, J. S., R. S. Becker: J. Am. Chem. Soc. **82** 2083 (1960).
 [12] Amster, R. L.: Photochem. Photobiol. **9**, 31 (1969).
 [13] Krasnovky Jr., A. A., V. A. Shvalov, F. F. Litvin. A. A. Krasnovsky: Dokl. Akad. Nauk USSR **199**, 1181 (1971).
 [14] Krasnovky Jr., A. A., V. A. Romaniuk, F. F. Litvin: Dokl. Akad. Nauk USSR **209**, 965 (1973).
 [15] Lebedev, N. N., J. Naus, A. A. Krasnovsky Jr.: Biofizika USSR **21**, 382 (1976).
 [16] Parker, C. A., T. A. Joyce: Nature **210**, 701 (1966).
 [17] Parker, C. A., T. A. Joyce: Photochem. Photobiol. **6**, 395 (1967).
 [18] Krasnovsky Jr., A. A.: Biofizika USSR **21**, 748 (1976).
 [19] Long, C. A., D. R. Kearns: J. Am. Chem. Soc. **97**, 2018 (1975).
 [20] Krasnovsky Jr., A. A., F. F. Litvin: Molek. Biol. USSR **1**, 699 (1967).
 [21] Krasnovsky Jr., A. A., F. F. Litvin: Molek. Biol. USSR **3**, 282 (1969).
 [22] Krasnovsky Jr., A. A., F. F. Litvin: Photochem. Photobiol. **20**, 133 (1974).

LUMINESCENT ANALYSIS OF TRIPLET STATES OF CHLOROPHYLLS

A. A. Krasnovsky Jr.

Five types of afterglow of chlorophylls, bacteriochlorophylls and their analogs have been studied: phosphorescence, P- and E-types of delayed fluorescence, photosensitized emission of oxygen and photochemiluminescence. Phosphorescence has been found at -196° in solutions, etiolated and greening leaves, chloroplasts and chloroplast fragments enriched in photosystems 1 and 2. The phosphorescence of Mg-monosolvates, Mg-disolvates and aggregates is revealed. Evidence is presented that only $\pi^*-\pi$ phosphorescence of pigments exists and that the short wavelength emission at 730—760 nm ascribed by FERNANDEZ and BECKER to $\pi^*-\pi$ transitions is in reality the fluorescence of aggregated chlorophyll. The P- and E-types of delayed fluorescence of the pigments have been detected in degassed solutions and solid foils of polymers. The first is due to the annihilation of triplet molecules in collisions, the second—to thermoinduced $T-S$ transitions. Emission of singlet oxygen has been observed in solutions of the pigments in CCl_4 . It has a maximum at 1270 nm, the quantum yield near to $3 \cdot 10^{-5}$ and the lifetime 10^{-2} sec. Its excitation spectra coincide with the absorption spectra of the pigments. The photochemiluminescence which accompanies photooxidation of the pigments by oxygen has been investigated. It is due to thermal decomposition of unstable pigment peroxides formed in the reaction between singlet oxygen and unexcited pigment molecules.