

В. ТЫНИССОО, Р. ТАМКВИ

**СРАВНЕНИЕ МЕТОДОВ ОЧИСТКИ ХЛОРОФИЛЛА ПО
ИНТЕНСИВНОСТИ СВЕЧЕНИЯ ПОСТОРОННИХ ПРИМЕСЕЙ**

При разработке методов хроматографической очистки хлорофилла (Хл) *a* и других родственных соединений обычно преследовались аналитические цели [1]. В связи с поисками слабых коротковолновых полос в спектре флуоресценции Хл *a* [2] вновь возникла проблема получения очень чистых препаратов. Оказалось, что имеющиеся стандартные методы очистки не гарантируют достаточной степени чистоты Хл. Как показано в [2], в низкотемпературном спектре излучения очищенного обычными методами колоночной хроматографии [3] Хл *a* (растворенного в диэтиловом эфире), наряду с основным максимумом флуоресценции Хл *a*, расположенным около 675 нм (Ф 675), присутствует и малоинтенсивная полоса свечения при 624 нм (Ф 624). Здесь же, с помощью дополнительных спектроскопических методов, установлено, что Ф 624 представляет собой полосу флуоресценции посторонней примеси, родственной по спектральным признакам протохлорофиллу.

Необходимость в избавлении от этой примеси, с точки зрения дальнейшего исследования сверхслабых свечений (в том числе горячей люминесценции) самого Хл *a* в данной области спектра, и заставила нас прибегнуть к поиску более совершенных способов очистки Хл *a*. Притом одним из основных параметров, характеризующих чистоту объекта, было выбрано отношение пиковой интенсивности полосы Ф 675 к пиковой интенсивности Ф 624 (I_n^0), значение которого у изученного в [2] препарата было ~ 200 . Выяснилось, что такой подход обладает гораздо большей чувствительностью к изменениям состава образца, чем обычный метод, основывающийся на сравнении спектров поглощения с известными стандартами (см., например, [4]). Естественно, одного только значения I_n^0 недостаточно для полной идентификации препарата — некоторые растворы оказались измененными уже по спектрам поглощения. Однако в этих случаях имела место качественная корреляция между результатами применения обоих критериев — объекты, имевшие искаженные спектры поглощения, как правило, давали и малые значения I_n^0 . Это и заставило нас приняться за более детальное сравнение разных методов очистки Хл *a*, на этот раз — с точки зрения уточнения влияния их отдельных факторов на отношение I_n^0 , а также в целях поиска возможных путей повышения чистоты получаемых препаратов.

Экспериментальная часть

С целью выполнения поставленной задачи были проведены две серии экспериментов.

В первой серии за основу был принят изложенный в трудах Института фотобиологии АН БССР стандартизованный метод бумажной хроматографии [5], заключающийся в пятикратном перехроматографировании пигмента разными смесями проявляющих растворителей. Исходным продуктом для такой обработки служил Хл *a* (основной компонент), предварительно выделенный из воздушно-сухих листьев крапивы путем двукратной хроматографии на сахарной колонке (методика описана в [3]).

Второй цикл опытов был направлен на более точное установление связи между отдельными факторами, обычно изменяющими качество Хл, с одной стороны, и величиной I_n^0 , с другой. С этой целью было проделано несколько вариантов колоночной хроматографии, более часто встречающихся в литературе [3, 6-9], комбинируя их в некоторых случаях с элементами нехроматографической очистки (предварительное отделение желтых пигментов от зеленых путем осаждения последних на тальке или распределения между несмешивающимися растворителями [7, 8]) для достижения максимальной чистоты пигмента, или, наоборот, — упрощая методику в интересах увеличения скорости обработки.

Сырьем для получения пигментов во втором цикле работ служили двухнедельные в среднем проростки ячменя, выращенные по методике, данной в [5]. Фиксация, в зависимости от выбранной методики, производилась путем растирания в присутствии сернокислого натрия, кипячения в ацетоне или воде или путем замораживания в жидком азоте.

Наряду со свежесобранными проростками, в опытах были использованы и консервированные образцы, изготовленные по методике З. Шестака [10] и простоявшие перед использованием от одной до десяти недель. В некоторых случаях, для сравнения, в качестве сырья были взяты также свежие или сушеные листья крапивы.

Хроматографирование и вспомогательные операции велись при слабом электрическом свете или с применением для освещения светофильтра СЗС-3, область максимального пропускания которого лежит между главными пиками в спектре поглощения Хл *a*.

Полученные чистые препараты элюировались этиловым эфиром и хранились в холодильнике при температуре от 0° до -5°С.

Для выяснения влияния чистоты растворителей в одной части экспериментов были использованы этиловый эфир и петролейный эфир, очищенные согласно [8], а в другой — те же растворители без предварительной обработки. Ацетон, использованный для первичной экстракции и консервации, был либо подщелочен углекислым магнием [10], либо нейтрален.

Спектры излучения были сняты на установке, которая состояла из возбуждающего Сd-лазера (линия 441,6 нм) и регистрирующих спектрометра ДФС-24, фотоумножителя ФЭУ-79 в режиме счета фотонов и многоканального анализатора LP 4840 фирмы «Nokia».

Для более удобного сравнения интенсивностей полос использовались стеклянные фильтры НС-9 и НС-10, вставление которых в регистрирующий канал компенсировало интенсивность свечения в области основной полосы флуоресценции Хл *a*.

Исследуемые эфирные растворы Хл *a* находились в кварцевых кюве-

тах (толщина слоя ~ 3 мм), введенных затем в иммерсионный криостат ($T=77$ К).

Предварительно были сняты и спектры поглощения (при 300 К) каждого объекта на спектрофотометре «Acta M VII» фирмы «Beckman».

Кроме того, для контроля природы и чистоты полученных образцов были использованы еще фазовая проба и люминесцентный анализ, предложенный В. М. Кутюриным и др. [8].

Результаты и их обсуждение

Измерения I_n^0 в первой серии (бумажная хроматография) показали, что полученный в конечном итоге Хл *a* по своим спектральным свойствам очень близок к окисленной форме Хл *a*, выделенной уже в начальной стадии очистки на колонке (со значениями I_n^0 , соответственно, 720 и 710).

Учитывая длительность процедуры, долговременное соприкосновение пигмента с воздухом и т. п., полученный результат вполне правдоподобен и намекает на существование довольно однозначного соответствия между изменениями структуры пигмента и значениями I_n^0 . Это давало надежды на повышение качества пигмента путем возможно более полного устранения факторов, сдвигающих структуру Хл в сторону разложения, и тем самым выяснять обстоятельства, больше всего влияющие на интенсивность Ф 624.

Более детальное сравнение относительной интенсивности примесного излучения в зависимости от выбранной методики, условий обработки, качества сырья, длительности хранения, чистоты растворителей и т. д. во второй серии привело, однако, нас к выводу, что не все условия, обычно считавшиеся влияющими на качество Хл, одинаково воздействуют в данном случае (т. е. на I_n^0). Следовательно, применение более строгих мер осторожности при обработке пигментов в довольно широкой области остается безрезультатным.

Так, например, выяснилось, что качество используемого для приготовления растворов диэтилового эфира не оказывает заметного влияния в относительно широких пределах изменения. Практически одинаковые результаты давали и растворы пигмента в освобожденном от перекисей и полностью обезвоженном эфире, измеренные в день их изготовления, как и растворы в неочищенном эфире, стоявшие до измерения в растворе до трех недель. То же самое относится и к чистоте других используемых растворителей (ацетон, петролейный эфир).

В широких пределах могут варьироваться и условия освещения: примерно одинаковые результаты получили и в опытах с рассеянным дневным светом, и с применением в осветителе инактивирующего светофильтра СЗС-3.

В ходе этих опытов выяснилось также, что небольшие количества каротиноидов и феофитина, часто остававшиеся в качестве примеси при использовании укороченной методики [6], совершенно безвредны при поисках полос горячей люминесценции у Хл *a*.

Эти результаты позволяют заметно упростить и ускорить процедуру приготовления образцов Хл *a*, используемых для данного рода измерений, уменьшив, тем самым, в несколько раз затрату растворителей.

Что касается методов фиксации материала, то наилучшей оказалась фиксация жидким азотом, позволяющая одновременно быстро и тонко

измельчать материал. Результаты почти не изменились и при использовании ранее консервированных [10] образцов, хранившихся перед хроматографированием в ацетоновом растворе до двух месяцев.

Фиксация с применением сернокислого натрия, имеющая в общем те же преимущества, что и фиксация азотом, вызвала заметное уменьшение отношения I_n^0 . Такое же влияние намечалось и при использовании крапивы (свежей или сушеной) вместо ячменя.

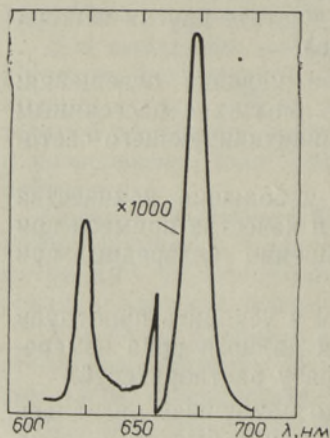
Несколько неясным остается вопрос о связи между значениями I_n^0 и структурными изменениями в молекуле Хл а, соответствующими его отдельным формам (см. [3]). В то время как алломеризованная форма Хл а, равно как и Хл а', дает довольно хорошо воспроизводимые результаты (в обоих случаях значения I_n^0 низкие, не превышающие 200), основная и окисленная формы обычно дают столь разбросанные значения I_n^0 (от 50 до 2000), что невозможно установить, какая из них более пригодна для дальнейшего изучения.

Такие результаты наводят на мысль, что примеси (или изменения в структуре), обуславливающие появление полосы излучения при 624 нм, не являются естественными спутниками природного Хл а, избавление от которых возможно простой хроматографической очисткой, а, скорее всего, продуктами химического изменения Хл а в процессе его выделения, которые могут возникать уже в самых ранних стадиях этого процесса.

Таким образом, можно констатировать следующее: методы, применявшиеся обычно с целью достижения максимальной аналитической чистоты Хл (как, например, предварительное отделение желтых пигментов от зеленых путем осаждения последних или распределением между несмешивающимися растворителями, многократное перехроматографирование на бумаге, применение специально очищенных растворителей и т. д.), не оказывают заметного действия на содержание примеси с полосой свечения около 624 нм.

Лучшие результаты были получены методом колоночной хроматографии с применением толуеновых и пропаноловых проявляющих растворов (на одной или на двух последовательных колонках), дающих возможность разделить Хл а на отдельные компоненты (см. [3]), при использовании в качестве сырья ячменя.

По сравнению с другими способами (бумажная хроматография или многократная колоночная хроматография с использованием крапивы в качестве сырья), эти опыты давали уменьшение содержания примеси в среднем в два раза (в отдельных случаях I_n^0 достигало даже значений, превышающих 2000; см. рисунок). При этом нужно констатировать, что применение той или иной методики не является еще достаточным условием, гарантирующим получение заданного значения относительной ин-



Спектр флуоресценции эфирного раствора Хл а (концентрация $5 \cdot 10^{-6}$ моль/л) при возбуждении линией 441,6 нм Cd-лазера, $T = 77$ К, $I_n^0 \sim 2000$.

тенсивности I_n^0 примесного свечения при 624 нм. Лишь путем выбора из ряда проб можно получить наиболее чистые препараты.

Хотя, насколько нам известно, специальные исследования показателя чистоты I_n^0 ранее не проводились, во многих случаях отмечалось присутствие довольно сильной полосы Ф 624 в спектре Хла (см., например, [11]). Достигнутое нами отношение $I_n^0 \sim 2000$ (т. е. содержание примеси ниже 0,1%), по-видимому, является пределом для стандартных методов очистки.

В заключение следует отметить, что даже у объекта, имеющего значение $I_n^0 \sim 2000$, горячая люминесценция не была обнаружена, т. е. она была еще более слабая. Таким образом, возможность обнаружения подобных сверхслабых свечений самого Хла требует более полного избавления от посторонних примесей. Однако дальнейшее повышение чистоты растворов Хла требует, очевидно, разработки новых методов.

Авторы выражают благодарность Р. Авармаа за предложение темы и постоянное обсуждение настоящей работы и Т. Кару за полезные замечания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Цвет М. С. Хроматографический адсорбционный анализ. М., 1946.
2. Авармаа Р. А., Тамживи Р. П. Природа дополнительных полос в спектре люминесценции хлорофилла. — Ж. прикл. спектроскопии, 1977, т. 27, № 2, с. 259—262.
3. Лосев А. П., Гуринович Г. П. О природе форм восстановленного хлорофилла. — Биохимия, 1967, т. 32, № 2, с. 409—415.
4. Goedheer, J. C. Visible absorption and fluorescence of chlorophyll and its aggregates in solution. — In: The chlorophylls. New York & London, Academic Press, 1966, p. 147—181.
5. Шлык А. А. Метаболизм хлорофилла в зеленом растении. Минск, 1965.
6. Strain, H. H., Svec, W. A. Extraction, separation, estimation and isolation of the chlorophylls. — In: The chlorophylls. New York & London, Academic Press, 1966, p. 22—65.
7. Пигменты пластид зеленых растений и методика их исследования. М.—Л., 1964.
8. Кутюрин В. М., Улугбекова М. В., Артамкина И. Ю. Метод выделения хлорофилла из растений. — Физиол. растений, 1962, т. 9, № 1, с. 115—120.
9. Ротфарб Р. М. О некоторых изменениях в хроматографическом методе разделения растительных пигментов. — В кн.: Биохимия и физиология растений. Минск, 1958, с. 118—126.
10. Šestak, Z. On the chromatography of plant pigments. — Biol. plant. Scient. Bohemosl., 1966, v. 1, N 4, p. 28—34.
11. Mau, A. W.-H. Fluorescence of chlorophyll in EPA. — Chem. Phys. Lett., 1976, v. 38, N 2, p. 279—282.

Институт физики
Академии наук Эстонской ССР

Поступила в редакцию
11/XI 1977.

V. TÕNISSOO, R. TAMKIVI

KLOROFÜLLI PUHASTAMISE MEETODITE VÕRDLUS VÕÖRLISANDITE KIIRGUSE INTENSIIVSUSE ALUSEL

On uuritud võimalusi klorofüll (Chl) *a* eetrilahuste vabastamiseks lisandist, mis tekitab nende kiirgusspektris riba 624 nm kohal, segades Chl *a*-le kuuluva ülinõrga kiirguse — kuumluminestsentsi — otsinguid selles spektripiirkonnas. Selleks varieeriti kirjanduses esitatud Chl *a* kromatograafiliste eraldus- ja puhastusmeetodite puhul Chl kvaliteeti mõjustada võivaid tegureid, kusjuures tulemuste hindamisel oli põhiliseks kriteeriumiks nimetatud lisariba intensiivsus Chl *a* fluorestsentsi põhimaksimumi suhtes. See osutus märksa tundlikumaks lahuses asetleidvatele muutustele kui harilikud, neeldumisspektriga seotud karakteristikud.

Katsete põhjal jõuti järeldusele, et seni kasutatud kromatograafilised meetodid ning nende täiendamine rangemate ettevaatusabinõudega võimaldavad saada kuni 0,1%-lise lisandisisaldusega preparaate, kuid mitte küllaldase reprodutseeritavusega. On tõenäoline, et segavat kiirgust põhjustav komponent moodustub puhastusprotsessi enese kestel, mistõttu katsed eraldada seda kromatograafilisel teel ei saagi anda tulemusi. Seega eeldab ülinõrkade kiirguste uurimiseks vajaliku veelgi puhtama Chl *a* saamine ilmselt uusi, kvalitatiivselt erinevaid puhastusmeetodeid.

V. TÕNISSOO, R. TAMKIVI

COMPARISON OF THE PURIFICATION METHODS OF CHLOROPHYLL ON THE BASIS OF THE EMISSION INTENSITY OF CONTAMINATING IMPURITIES

Some possibilities of eliminating the impurity responsible for the 624 nm emission band in the spectra of chlorophyll (Chl) *a* in ether, thus disturbing the seeking for the superweak emission (hot luminescence) of Chl *a*, have been investigated. For that reason the factors liable to affect the quality of Chl have been varied within the limits of the previously described chromatographical extraction and purification methods. Besides, the intensity of the 624 nm emission band mentioned in relation to the main Chl *a* fluorescence maximum served as a criterion for the estimation of the results, which proved to be considerably more sensitive to the various changes in the solution than the traditional absorption spectrum characteristics.

From the results of the experiments one may infer that the chromatographical methods used up to now and also some additional precautions used in the course of the operations permit to get preparations with the concentration of the undesirable impurity up to 0.1 per cent in relation to Chl *a*, but not with a sufficient recurrence. It is quite possible that the impurity under discussion is generated during the purification processes, and the attempts to extract it in this way cannot be a success. It may be concluded that a still higher purity degree of Chl *a*, required for the investigation of superweak emissions, can obviously be obtained only by an application of new qualitatively different purification methods.