

## Studije o klorofilu. II

### Gašenje fluorescencije klorofila

T. VRBAŠKI

Nastavljajući radove<sup>1)</sup> o fizikalno kemijskim osebinama klorofila istražio sam utjecaj nekih stranih tvari na gašenje fluorescencije alkoholne otopine ove biljne boje. To su aromatski nitrozo- i nitroso spojevi na pr. p-nitrozodimetilanilin, nitrozobenzol, N-nitrozo-p-nitrozofenilpiperazin, nitrobenzol,  $\alpha$ -nitronaftalin i dr. U prijašnjem radu pokazao sam, da te tvari mogu u velikoj mjeri ili čak i potpuno stabilizirati alkoholnu otopinu klorofila prema termičkoj i fotokemijskoj oksidaciji. Zanimljivo je, da ovi spojevi mogu u stanovitoj mjeri gasiti fluorescenciju alkoholne otopine klorofila. Ovim pojavama gašenja fluorescencije klorofila djelovanjem takovih tvari pripada prema tome određena važnost kod tumačenja mehanizma djelovanja istih kod fotokemijske i termičke oksidacije alkoholne otopine klorofila. Može se također očekivati, da će istraživanja gašenja fluorescencije klorofila pomoću tih tvari dati stanoviti uvid u fizikalno kemijski odnos te biljne boje prema ovim tvarima, jer gašenje fluorescencije može često dati stanoviti putokaz u stvaranju labilnih kemijskih vezova kao što su molekularni spojevi, polimerizirane molekule i dr. Ove fine kemijske promjene klorofila mogle bi imati i neko biokemijsko značenje kod odvijanja procesa asimilacije.

Gašenje fluorescencije, bilo to koncentraciono gašenje ili gašenje pomoću stranih dodataka svodi se, prema teoriji udaraca drugog reda<sup>2)</sup> na dezaktiviranje podraženih molekula fluorescirajuće tvari pomoću molekula dodatka, odnosno nepodraženih molekula iste tvari. Pod udarcima drugog reda treba razumjeti pretvorbu podražne energije putem sudara dviju molekula u kinetičku energiju druge molekule<sup>3)</sup>. Kod toga treba pretpostaviti, da se kod sudara podraženih molekula tvari, koja može da fluorescira sa molekulama otapala ne prevodi podražna energija u kinetičku energiju druge molekule, dočim svi sudari s nepodraženim molekulama, bilo to molekule, koje mogu fluorescirati ili pak dodatka, uzrokuje pretvorbu podražne energije, koja postoji u obliku kinetičke energije molekule, u kinetičku energiju druge molekule, t. j. u toplinu. To se vidljivo očituje u gašenju fluorescencije.

Tumačenje gašenja fluorescencije pomoću teorije međureakcija predstavlja neku vrstu proširenja tumačenja pomoću teorije udaraca drugog

<sup>1)</sup> T. Vrbaški, Arhiv za kemiju, 22, (1950). 101.

<sup>2)</sup> J. M. Frank u S. J. Wawilow, Z. Physik, 69, (1931) 100.

<sup>3)</sup> C. Klein u, S. Roseland, Z. Physik, 4, (1921) 46.

reda. Ova teorija objašnjava zapravo mehanizam sudara t. j. način, kojim se pretvara podražna energija u toplinu kod sudara dviju molekula i kemijske reakcije koje su sa ovom prilikom povezane. Teorija međureakcija

što se računski postizava lako, ako su poznate neke eksperimentalne veličine fluorescirajuće tvari i dodatka.

Za ukupnu apsorpciju svjetla ( $A$ ) takovog sistema, koji sadrži dvije komponente, vrijedi kod određene dužine vala, u ovom slučaju 366 m $\mu$ , jednadžba:

$$A = I_0 (1 - 10^{-\epsilon_1 c_1 p - \epsilon_2 c_2 p}) \quad (1)$$

$I_0$  označuje u toj jednadžbi intenzitet svjetla prije apsorpcije,  $\epsilon_1$  i  $\epsilon_2$  su konstante apsorpcije,  $c_1$  i  $c_2$  su koncentracije prve i druge komponente t. j. klorofila i nitrozo- ili nitrosojoda, a  $p$  je debljina sloja. Apсорpcija i intenzitet svjetla izražava se obično u postocima, koncentracija također u postocima ili u mol/l., a debljina sloja  $p$  u centimetrima. Za parcijalnu apsorpciju ( $A_1$ ) jedne komponente t. j. klorofila u smjesi vrijedi jednadžba<sup>9)</sup>

$$A_1 = \frac{\epsilon_1 c_1}{\epsilon_1 c_1 + \epsilon_2 c_2} I_0 (1 - 10^{-\epsilon_1 c_1 p - \epsilon_2 c_2 p}) \quad (2)$$

Ako druga komponenta t. j. dodatak djeluje samo kao unutrašnji filter, postojat će proporcionalitet između intenziteta fluorescencije  $\Phi_0$  i vrijednosti parcijalne apsorpcije ( $A_1$ ) tvari, koja može fluorescirati t. j. klorofila.

$$\Phi_0 = K \cdot A_1 \quad (3)$$

Faktor proporcionaliteta  $K$  znači iskorištenje fluorescencije, a bit će u najpovoljnijem slučaju jednak jedinici. Nemoguće je, da se emitira više energije u obliku sekundarnog svjetla, nego što se prima apsorpcijom. Emisija je manja, jer se jedan dio apsorbirane energije pretvori putem sekundarnog procesa u toplinu.

Ako međutim druga komponenta djeluje još i kao inhibitor, bit će intenzitet fluorescencije manji, nego u slučaju same parcijalne apsorpcije ( $A_1$ ).

Budući da inhibitori gase fluorescenciju prema eksponencijalnoj jednadžbi F. Perrin-a<sup>10)</sup>, koja uzima u obzir u kvantitativnom pogledu ovisnost inhibitorskog djelovanja o koncentraciji upotrebljenog inhibitora, može se jednadžba (3) modificirati dodatkom prvog člana geometrijskog niza Perrin-ove eksponencijalne jednadžbe:

$$\Phi = \Phi_0 \frac{1}{1 + bc_2} \quad (4)$$

u kojoj  $c_2$  označava koncentraciju inhibitora, a  $b$  inhibitorSKU konstantu. Ako se vrijednosti za  $A_1$  izraze kod svih mjerenja u postocima od ukupne apsorpcije  $A$ , a intenzitet fluorescencije  $\Phi$  u prisutnosti inhibitora koncentracije  $c_2$  u postocima od intenziteta fluorescencije otopine bez inhibitora  $\Phi_0$ , dobit će se u smislu jednadžbe (4) uvijek manje vrijednosti za  $\Phi$  nego li za  $A_1$ . Tek u slučaju kada nema pravog inhibitorskog djelovanja, t. j.  $c_2 = 0$  postaju vrijednosti za ove veličine jednake.

<sup>9)</sup> K. Weber, Z. Elektrochem., 36, (1930) 26; Z. physik. Chem., (B), 19, (1932) 33. K. Weber i J. Hojman, Arhiv kem. 21, (1949) 37.

<sup>10)</sup> F. Perrin, Compt. rend., 178, (1914) 1978

Iz do sada iznesenog proizlazi, da problematika gašenja fluorescencije alkoholne otopine klorofila pomoću aromatskih nitrozo- i nitrospojeva leži u tome, da se ustanovi, da li te tvari djeluju na gašenje fluorescencije klorofila samo kao unutrašnji filter ili pak dezaktiviraju podražene molekule klorofila, te da li možda kod tog gašenja nastupaju neki izvanredni odnosi, iz kojih bi se moglo zaključiti, da ovi spojevi kemijski reagiraju sa klorofilom.

#### EKSPERIMENTALNI DIO

Kvantitativna mjerenja fluorescencije klorofilnih otopina u metanolu kao i mjerenja apsorpcije klorofilnih otopina i otopina dodatka u ultraljubičastom svjetlu dužine vala oko 366 m $\mu$  mjerio sam fotoelektričnim fluorometrom. Kao izvor svjetla služila mi je »Philips Philora« sijalica od 500 W. Apsorpciju i fluorescenciju mjerio sam osjetljivim »Multiflex« galvanometrom po B. Lange-u, čija osjetljivost iznosi  $2,6 \times 10^{-9}$  amp. Točnost očitavanja iznosila je kod mjerenja apsorpcije oko  $\pm 1\%$ , a kod mjerenja fluorescencije oko  $\pm 2$  do  $\pm 7\%$ . Između otopine i selenove fotostanice nalazio se kod mjerenja fluorescencije sistem optičkih filtrata BG<sub>10</sub> i GG<sub>10</sub>, a kod mjerenja apsorpcije samo filter GG<sub>10</sub>. Sistem filtra BG<sub>10</sub> i GG<sub>10</sub> imao je zadaću, da apsorbira čitavo primarno svjetlo, te da dozvoli pristup u selenovu fotostanicu samo sekundarnom svjetlu. Optički filter GG<sub>10</sub> propušta samo svjetlo uskog spektralnog područja, koje odgovara linijskom spektru žive dužine vala 366 m $\mu$ .

Otopina klorofila u metanolu dobivena je metodom brze ekstrakcije brašna od koprive »Urtica dioica«. Metoda je detaljno opisana u prethodnom radu. Koncentracija klorofila u metanolu iznosila je kod svih mjerenja  $1,13 \times 10^{-3}$  g% odnosno  $1,26 \times 10^{-5}$  mol/l. Debljina sloja  $p$  fluorescirajuće otopine bila je 1,2 cm. Rezultati mjerenja izraženi su u postocima intenziteta fluorescencije  $\Phi$  u prisutnosti dodatka koncentracije  $c_2$  obzirom na intenzitet fluorescencije  $\Phi_0$  otopine bez dodatka. Funkcionalna povezanost tih veličina ( $\Phi_0$ ,  $\Phi$  i  $c_2$ ) daje kvantitativnu sliku gašenja fluorescencije djelovanjem upotrebljenog dodatka.

Kvantitativne pokuse gašenja fluorescencije otopine klorofila izveo sam pomoću p-nitrozodimetilanilina, nitrobenzola i  $\alpha$ -nitronaftalina. Da bi se moglo obraditi računski gašenje fluorescencije prema jednadžbi (2) djelovanjem ovih tvari i ustanoviti, da li postoje osim efekta unutrašnjeg filtra još i drugi utjecaji, bilo je potrebno odrediti brojčane vrijednosti ekstinkcionih koeficijenata za klorofil ( $\epsilon_1$ ) kao i za p-nitrozodimetilanilin ( $\epsilon_2$ ) odnosno nitrobenzol i  $\alpha$ -nitronaftalin i to za dužinu vala od 366 m $\mu$ , kod kojeg su rađeni svi pokusi gašenja fluorescencije. Za čisti metanol nisam posebno odredio vrijednost ekstinkcionog koeficijenta kod te dužine vala, budući da je isti vrlo mali i iznosi u ovom spektralnog području ca 0,001, te se može zanemariti<sup>11)</sup>. Određivanje ekstinkcionih koeficijenata izveo sam također fluorometrijski. Dobiveni rezultati uneseni su u tabelama 1, 2, 3 i 4.

<sup>11)</sup> V. Henri, Études de Photochimie, Paris 1919; vidi i Landoldt-Börnstein, Physikalisch-chemische Tabellen, II, 901, Abb. 26.

Tabela 1

Ekstinkcioni koeficijenti  $\epsilon_1$  za klorofil u metanolu

$c_1$ u g <sup>0</sup> / <sub>0</sub>	$\epsilon_2$
$2,27 \times 10^{-3}$	212,2
$1,70 \times 10^{-3}$	206,3
$1,13 \times 10^{-3}$	173,7
$0,57 \times 10^{-3}$	127,0
Srednja vrijednost	179,8

Tabela 2

Ekstinkcioni koeficijenti  $\epsilon_1$  za p-nitrozodimetilanilin u metanolu

$c_2$ u g <sup>0</sup> / <sub>0</sub>	$\epsilon_1$
$1,00 \times 10^{-3}$	939
$5,00 \times 10^{-4}$	1079
$3,75 \times 10^{-4}$	1000
$2,50 \times 10^{-4}$	865
$1,25 \times 10^{-4}$	756
$5,00 \times 10^{-5}$	804
Srednja vrijednost	908,7

Tabela 3

Ekstinkcioni koeficijenti  $\epsilon_2$  za nitrobenzol u metanolu

$c_2$ u g <sup>0</sup> / <sub>0</sub>	$\epsilon_2$
$2,00 \times 10^{-2}$	50,9
$1,00 \times 10^{-2}$	58,2
$5,00 \times 10^{-3}$	59,4
$2,00 \times 10^{-3}$	63,2
$1,00 \times 10^{-3}$	71,8
Srednja vrijednost	60,7

Tabela 4

Ekstinkcioni koeficijenti  $\epsilon_2$  za  $\alpha$ -nitronaftalin u metanolu

$c_2$ u g <sup>0</sup> / <sub>0</sub>	$\epsilon_2$
$1,00 \times 10^{-3}$	1085
$5,00 \times 10^{-4}$	1371*)
$1,00 \times 10^{-4}$	1041
$1,00 \times 10^{-5}$	1009
Srednja vrijednost	1045

Iz tabela se razabire, da ekstinkcioni koeficijenti ni u jednom slučaju ne ostaju konstantni sa promjenom koncentracije  $c$ . To znači, da kod ovih sistema prema tome ne vrijedi točno Beer-ov zakon,\*\*) te stoga i jednadžba (2) može dati samo približne vrijednosti za  $\epsilon_1$  i  $\epsilon_2$ , koje su međutim dovoljne za kvalitativno razmatranje mehanizma gašenja fluorescencije klorofila. Iz tako dobivenih vrijednosti za ekstinkcione koeficijente  $\epsilon_1$  i  $\epsilon_2$ , i iz poznatih koncentracija  $c_1$  i  $c_2$  izračunate su pomoću jednadžbe (1) vrijednosti za ukupnu apsorpciju svijetla ( $A$ ) otopine klorofila i gasila, a pomoću jednadžbe (2) vrijednosti za parcijalnu apsorpciju klorofila ( $A_1$ ) u smjesi. Izračunate vrijednosti prikazane su u tabelama 5, 6 i 7.  $\Phi_{ra\bar{e}}$ .

<sup>12)</sup> G. Schelbe, Ber., 59 (1926) 2617; Landoldt-Börnstein, Physikalisch-chemische Tabellen, II. Ergänzungsb. II. Teil, S. 695. Ekstinkcioni koeficijent  $\Sigma_2$  za nitrobenzol u metanolu kod dužine vala od 366 m $\mu$  iznosi 263,10.

\*) Ova vrijednost za  $\epsilon_2$  nije mogla biti reproducirana. Može se smatrati, da nije sasvim točna i stoga nije uzeta u obzir kod izračunavanja srednje vrijednosti za  $\epsilon_2$  za  $\alpha$ -nitronaftalin.

\*\*\*) Za ove i slične pojave kod drugih sistema teško je naći pravo teoretsko tumačenje.

je intenzitet fluorescencije dobiven računom iz tih podataka pomoću jednadžbe:

$$\Phi_{\text{rač.}} = \frac{A_1 \times 100}{A} \quad (5)$$

$\Phi_{\text{eksp.}}$  je intenzitet fluorescencije, koji je dobiven direktnim mjerenjem na fluorometru.

Tabela 5

Klorofil  $1,13 \times 10^{-3}$  g%;  $p = 1,2$  cm, dodatak p-nitrozodimentilanilin

p-nitrozospoj $c_2$ u g%	$A$	$A_1$	$\Phi_{\text{rač.}}$	$\Phi_{\text{eksp.}}$
$1,00 \times 10^{-3}$	95,8	14,8	15,5	18
$5,00 \times 10^{-4}$	87,0	23,3	26,8	31
$3,75 \times 10^{-4}$	79,4	27,5	34,6	38
$2,50 \times 10^{-4}$	68,0	32,5	47,8	54
$1,25 \times 10^{-4}$	55,4	37,5	67,7	74
$5,00 \times 10^{-5}$	48,1	40,0	83,1	91

Tabela 6

Klorofil  $1,13 \times 10^{-3}$  g%;  $p = 1,2$  cm, dodatak je nitrobenzol

nitrobenzol $c_2$ u g%	$A$	$A_1$	$\Phi_{\text{rač.}}$	$\Phi_{\text{eksp.}}$
$2,00 \times 10^{-2}$	96,5	15,4	15,9	27
$1,00 \times 10^{-2}$	88,4	22,4	25,3	41
$5,00 \times 10^{-3}$	74,5	29,7	39,9	59
$2,00 \times 10^{-3}$	59,1	36,1	61,0	82
$1,00 \times 10^{-3}$	52,4	38,4	73,3	91

Tabela 7

Klorofil  $1,13 \times 10^{-3}$  g%;  $p = 1,2$  cm, dodatak je  $\alpha$ -nitronaftalin

$\alpha$ -nitronaftalin $c_2$ u g%	$A$	$A_1$	$\Phi_{\text{rač.}}$	$\Phi_{\text{eksp.}}$
$1,00 \times 10^{-3}$	97,1	14,9	15,4	27
$5,00 \times 10^{-4}$	91,3	20,4	22,4	45
$1,00 \times 10^{-4}$	56,5	37,0	65,4	82
$5,00 \times 10^{-5}$	49,6	39,5	79,6	91

Iz dobivenih vrijednosti za intenzitete fluorescencije  $\Phi_{\text{rač.}}$  i  $\Phi_{\text{eksp.}}$  vidi se, da se one ne poklapaju, te da su u svim slučajevima vrijednosti za  $\Phi_{\text{rač.}}$  znatno manje od stvarno izmjerenih intenziteta  $\Phi_{\text{eksp.}}$ . Razlike iznose u nekim slučajevima 40%. To znači, da kod stvarnog gašenja fluorescencije otopina klorofila emitira više svjetla, nego što to proizlazi iz jednadžbe (2 i 5), t. j. kada bi dodaci djelovali samo kao unutrašnji filtri. Jasno je, da kod toga nema niti govora o nekom inhibitorском djelovanju dodanih tvari.

Za obrazloženje ove interesantne pojave postoji više različitih tumačenja. Izgleda, da se ovdje ne radi o pojavi senzibilizirane fluorescencije, a i neke tautomerne odnosno mezomerne promjene molekularnog oblika klorofila jedva dolaze u obzir. Pojave senzibilizirane fluorescencije dokazane su često u plinskim smjesama, međutim u otopinama do sada nije uspjele pronaći sasvim sigurno ovakove procese<sup>18)</sup>. Osim toga nema osnova pretpostaviti, da se ukupno apsorbirano svjetlo u sistemu razdijeljuje na komponente po nekoj drugoj zakonitosti, nego što je određuje jednadžba (2), budući da je ista potvrđena u načelu na svim sistemima, koji su u tom pogledu ispitani. Ova pojava pojačanog intenziteta fluorescencije klorofila u prisutnosti aromatskih nitrozo- i nitrospojeva može se tumačiti pretpostavkom, da klorofil kemijski reagira sa dodanom tvari. Uslijed takove reakcije nastupaju sasvim novi odnosi, tako da se eksperimentalni podaci razumljivo ne mogu poklopiti sa vrijednostima dobivenim računom. Ovim

Tabela 8

*b*-vrijednosti p-nitrozodimetilanilina

$c_2$ u g%	<i>b</i>
$5,00 \times 10^{-5}$	2020
$1,25 \times 10^{-4}$	2810
$2,50 \times 10^{-4}$	3347
$3,75 \times 10^{-4}$	4355
$5,00 \times 10^{-4}$	4450
$1,00 \times 10^{-3}$	4510

Tabela 9.

*b*-vrijednosti za nitrobenzol

$c_2$ u g%	<i>b</i>
$1,00 \times 10^{-3}$	101,0
$2,00 \times 10^{-3}$	110,0
$5,00 \times 10^{-3}$	138,4
$1,00 \times 10^{-2}$	145,5
$2,00 \times 10^{-2}$	133,25

Tabela 10

*b*-vrijednosti za  $\alpha$ -nitronaftalin

$c_2$ u g%	<i>b</i>
$5,00 \times 10^{-5}$	2020
$1,00 \times 10^{-4}$	2230
$5,00 \times 10^{-4}$	2406
$1,00 \times 10^{-3}$	2662

<sup>18)</sup> G. Cario u. J. Frank, Z. Physik, 11, (1922) 161; 17, (1923) 202. Vidi i Th. Förster, Z. Elektrochem., 53, (1949) 93.

tumačenjem nije isključena mogućnost, da višak dodane tvari djeluje čisto fizikalno kao unutrašnji filter na gašenje fluorescencije novonastalog spoja. Ovo tumačenje stoji također u skladu sa dosadašnjim istraživanjem na tom području<sup>1)</sup>, te donekle potvrđuje osnovnu pretpostavku stvaranja kompleksnog spoja između klorofila i aromatskih nitrozo- i nitrosojveva. Da se takav proces zaista i zbiva trebalo bi još egzaktno dokazati kemijskim putem.

U tabelama 8, 9 i 10 prikazane su vrijednosti za inhibitorску konstantu  $b$ , koja je izračunata pomoću jednadžbe (4) iz eksperimentalnih podataka. Ova konstanta  $b$  označava se i sa  $\beta$  ili  $k$ , a pretstavlja konstantu gašenja fluorescencije. Razabire se da vrijednosti za konstante  $b$  ne ostaju za vrijeme gašenja fluorescencije konstantne, već polagano rastu sa rastućom koncentracijom dodatka. To je i za očekivati obzirom da je već dokazano, da se kod gašenja fluorescencije klorofila pomoću aromatskih nitrozo- i nitrosojveva ne radi o inhibitorском djelovanju, već po svoj prilici o stvaranju novog kompleksnog spoja, kod čega ne može više da vrijedi inhibitorска jednadžba (4).

## ABSTRACT

### Studies of Chlorophyll. II

The Extinction of the Fluorescence of Chlorophyll

by

T. VRBAŠKI

In continuation of the investigations on the physico-chemical properties of chlorophyll, the influence of the addition of certain substances on the extinction of the fluorescence of chlorophyll in methanol solution has been examined. In particular the influence of p-nitrosodimethylaniline, nitrobenzene and  $\alpha$ -nitronaphthalene has been studied.

The measurements of the extinction of fluorescence of chlorophyll in the presence of added substances as well as of the absorption of the chlorophyll solution and of the solutions with added substances were carried out with a photoelectric fluorometer in the ultraviolet at about 366 m  $\mu$ .

It was found that added substances extinguish the fluorescence of chlorophyll to a much smaller degree than it should be expected from the action of these substances as an internal light-filter. The measured intensity of fluorescence in the presence of those substances differs in some cases up to 40% from the computed value. It is evident that we cannot speak here of a true inhibitory influence of the added substances because the observed effect is quite different from a real inhibitory action.

It is certain that the effect observed represents neither an anomalous absorption phenomenon nor a sensitized fluorescence phenomenon. This effect can be explained by assuming that the chlorophyll reacts chemically with the added substance forming a new complex compound. In such a case the experimental data for the intensity of fluorescence cannot, however, agree with the computed values. This explanation does not exclude the possibility that the added substance acts also physically as an internal light filter in the extinction of the fluorescence of the new compound. This explanation agrees also with other investigations made in this field thus far. It is necessary, however, to prove the real existence of such a complex compound between the chlorophyll and the used aromatic nitroso and nitrocompounds by further investigations.

[Received, December 8, 1950]