

А. А. КРАСНОВСКИЙ

## ОБРАТИМОЕ ФОТОХИМИЧЕСКОЕ ВОССТАНОВЛЕНИЕ ХЛОРОФИЛЛА АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТОЙ

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

Установление возможности обратимого окислительно-восстановительного превращения хлорофилла при фотосинтезе существенно для познания природы элементарного механизма этого явления. К. А. Тимирязев<sup>(1)</sup> впервые предположил, что хлорофилл при фотосинтезе испытывает обратимое химическое превращение. Ему удалось экспериментально показать возможность восстановления хлорофилла в растворе цинком с уксусной кислотой и обратного окисления на воздухе слабо окрашенных продуктов восстановления. Т. Годнев и С. Калишевич<sup>(2)</sup> при восстановлении подобным методом протохлорофилла установили образование лейкосоединения, окисляющегося кислородом воздуха. Имеются указания на то, что спектр флуоресценции и поглощения регенерированного пигмента несколько отличен от исходного, что приписывалось необратимому восстановлению винильной группы хлорофилла<sup>(3)</sup>.

Мы исследовали возможность фотохимического восстановления хлорофилла и фталоцианина магния распространенными в зеленой клетке соединениями: кислотами аскорбиновой, пировиноградной, щавелевой, яблочной, лимонной, а также этиловым спиртом, фенилгидразином и гидрохиноном.

Реакции проводились в спиртовом и пиридиновом\* растворах при концентрации восстановителя до  $5 \cdot 10^{-2}$  М/л и концентрации пигмента  $5 \cdot 10^{-6}$  М/л. Опыты проводились в вакуумных трубках специальной формы, помещаемых в кюветодержатель спектрофотометра Бекмана. 5 мл раствора в трубке эвакуировалось масляным насосом; кислород воздуха удалялся при кипении растворителя. Освещение производилось кинолампой 500 W через конденсор, водяной фильтр и красный фильтр RG-2 (Шотт). В спиртовом растворе не удалось констатировать течения фотохимического процесса, обратимого в темноте. Однако в пиридине хлорофилл быстро реагирует с аскорбиновой кислотой; раствор теряет флуоресценцию уже после 1—2 мин. освещения; в темноте реакция идет обратно с возвратом флуоресценции и зеленой окраски раствора. Реакция идет также с фенилгидразином; остальные соединения были неактивны. Добавка пиридина или аммиака в спиртовой раствор хлорофилла с аскорбиновой кислотой также приводила к образованию некоторого количества обратимо-реагирующего фотопродукта.

До освещения измерялся спектр поглощения эвакуированного раствора, после выключения света производились отсчеты коэффициента

\* Применялся пиридин, обезвоженный путем разгонки с бензолом на ректификационной колонке высотой 120 мм с насадкой Фенске.

погашения в максимуме поглощения хлорофилла, характеризующие скорость обратной реакции. По окончании темновой реакции (2—3 часа) снова измерялось поглощение по всему спектру. Спектральная харак-

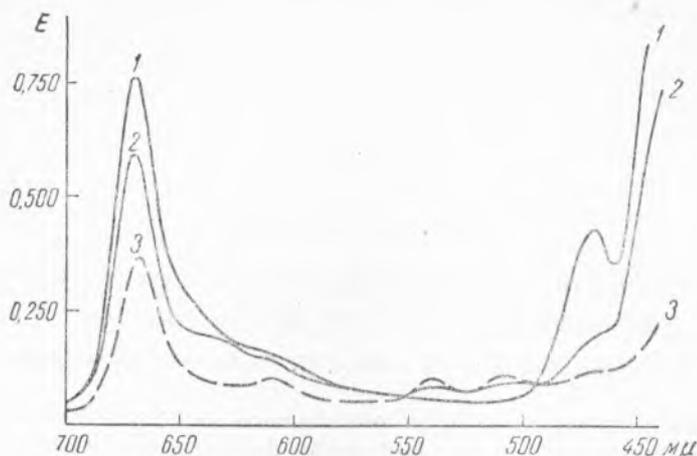


Рис. 1. Обратимое фотохимическое восстановление хлорофилла  $a + b$  аскорбиновой кислотой в пиридине: 1 — спектр поглощения исходных пигментов в безводном пиридине; 2 — спектр поглощения пигментов после обратной реакции в безводном пиридине; 3 — спектр поглощения пигментов после обратной реакции в водном пиридине (16% воды)

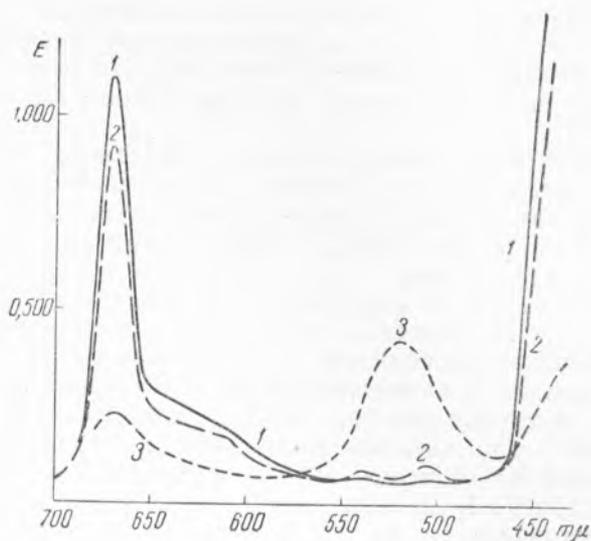


Рис. 2. Обратимое фотохимическое восстановление хлорофилла  $a$  аскорбиновой кислотой в пиридине: 1 — спектр поглощения исходного хлорофилла в безводном пиридине; 2 — спектр поглощения хлорофилла после обратной реакции; 3 — приближенный спектр поглощения неустойчивого фотопродукта через 6 мин. после выключения света (точность значений  $E$  в пределах  $\pm 10\%$ )

теристика быстро реагирующих восстановленных продуктов измерялась в ряде опытов с учетом скорости процесса; так удалось получить приближенную спектральную кривую неустойчивого фотопродукта (рис. 2).

Из рассмотрения полученных опытных данных следуют заключения:

1. Хлорофилл фотохимически восстанавливается аскорбиновой кислотой против темновых равновесных условий; образующиеся активные фотопродукты в темноте реагируют обратно. Фталоцианин магния восстанавливается значительно труднее хлорофилла и в условиях опыта образует больше продуктов необратимого восстановления.

2. Реакция может быть обнаружена лишь в среде, обладающей сродством к протону; в этих условиях осуществляется стабилизация лабильных фотопродуктов. В среде, обладающей большей концентрацией водородных ионов, происходит образование устойчивых продуктов деструктивного восстановления; уже небольшое содержание воды в пиридине приводит к относительно большому увеличению количества этих соединений.

3. Спектр поглощения регенерированного пигмента после восстановления хлорофилла ( $a + b$ ) несколько отличен от спектра исходного соединения. Характерный для хлорофилла  $b$  максимум при 470  $m\mu$  сглаживается после регенерации; соответственно наблюдается относительно большее падение поглощения в области красного максимума хлорофилла  $b$ ; отношение  $E_{670\ m\mu} / E_{650\ m\mu}$  у исходного хлорофилла ( $a + b$ ) равно 2,55, у регенерированного 3,2. Общий вид спектра поглощения после регенерации приближается к виду спектра хлорофилла  $a$ , что свидетельствует о необратимом фотохимическом восстановлении карбонильной группы хлорофилла  $b$  аскорбиновой кислотой. В присутствии воды явно идет реакция образования феофитина, характеризующаяся появлением максимума при 540  $m\mu$  и ходом коротковолновой ветви спектральной кривой. Обратная реакция в присутствии кислорода идет гораздо быстрее и ведет к получению того же продукта, что и при течении обратной реакции в анаэробных условиях.

4. Спектр поглощения обратно образованного пигмента при восстановлении хлорофилла  $a$  подобен спектру исходного соединения; некоторые отличия наблюдаются лишь в величине максимумов при 505 и 540  $m\mu$ , характерных для феофитина; вероятно, имеет место побочное образование этого соединения. В случае хлорофилла  $a$ , у которого альдегидная группа восстановлена до метильной, не наблюдается необратимого фотохимического изменения, происходящего у хлорофилла  $b$ .

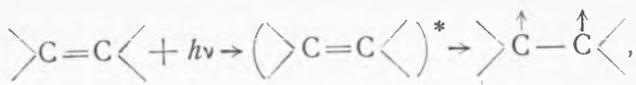
5. Наиболее вероятно, что первичный фотопродукт получается за счет размыкания конъюгированной по кругу системы двойных связей порфирина в одном месте. В пользу этого предположения свидетельствует следующее:

а) При размыкании конъюгированной по кругу системы 9 двойных связей порфирина следует ожидать значительного сдвига максимума поглощения в коротковолновую часть спектра; например, у соединений из ряда каротиноидов с 9 двойными связями (виолоксантин, фукоксантин) максимумы расположены в области 450—500  $m\mu$ <sup>(4)</sup>. Максимум поглощения лабильного фотопродукта лежит при 530  $m\mu$ .

б) Молярный коэффициент погашения у системы, конъюгированной по кругу, выше, чем у разомкнутой системы; например, у хлорофилла  $a$  и фталоцианина магния этот коэффициент равен  $1,7 - 2 \cdot 10^5$ <sup>(5)</sup>, у каротиноидов — около  $1 \cdot 10^5$ . Отношение молярных коэффициентов погашения хлорофилла и фотопродукта  $\Delta E_{670\ m\mu} / \Delta E_{530\ m\mu} = 1,8$ , что соответствует вышеприведенным значениям.

в) Согласно гипотезе А. Н. Теренина<sup>(6, 7)</sup>, наиболее вероятна бирадикальная природа возбужденного состояния пигмента-сенситизатора; в этом случае первичный фотоакт связан с размыканием одной из двойных связей системы.

6. Исходя из бирадикальной гипотезы возбужденного состояния, схему фотовосстановления можно представить следующим образом



где \* — символ электронного возбужденного состояния,  $\uparrow$  — символ электрона с неспаренным спином. Образуется бирадикал, обладающий повышенной тенденцией к отдаче или приему электрона.

Аскорбиновая кислота (восстановитель), ассоциированная с растворителем — пиридином посредством водородной связи, способна легко отдать свой электрон с образованием радикалов — ионной формы семихинона пигмента и монодегидроаскорбиновой кислоты; предположим, что этот процесс имеет следующий механизм:



Образованная ионная форма семихинона хлорофилла могла бы захватить протон с последующей дисмутацией до лейкосоединения, согласно работам Михаэлиса<sup>(8)</sup>. Однако возможность захвата протона уменьшается в среде, обладающей большой величиной сродства к протону (пиридин); нужно полагать также, что весьма велики стерические препятствия бимолекулярной дисмутации в случае большой и несимметричной молекулы хлорофилла. Поэтому неясно, чем является обнаруженный фотопродукт с максимумом поглощения при 530 м $\mu$ , — лейкосоединением хлорофилла, нейтральной или ионной формой семихинона; последнее нам кажется более вероятным. Решение вопроса о природе этого соединения, повидимому, возможно лишь путем магнетометрических измерений.

В спиртовой среде не удается наблюдать образования обратимо-реагирующего фотопродукта. Следует полагать, что это объясняется быстро текущей обратной реакцией семихинона в неионной форме, менее устойчивого, чем семихинон в ионной форме, обладающий дополнительными возможностями резонанса структур. Можно думать, что фотохимическая реакция между хлорофиллом и его неизменным спутником в зеленой клетке — аскорбиновой кислотой связана с элементарными процессами фотосинтеза. Нам удалось также показать, что активные фотопродукты, образуемые при фотовосстановлении хлорофилла, играют важную роль при сенсibiliзирoванных реакциях в простых системах и, вероятно, при фотосинтезе.

Приношу глубокую благодарность А. Н. Теренину за существенные указания и помощь в работе и Т. Н. Годневу за ценную дискуссию.

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

Поступило  
12 II 1948

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> К. А. Тимирязев, *Nature*, **32**, 342 (1885); **31**, 52 (1886); Сб. Солнце, жизнь и хлорофилл, 1923. <sup>2</sup> Т. Н. Годнев и С. Калишевич, *Тр. Ин-та физиол. растений АН СССР*, **4**, в. 2, 160 (1945). <sup>3</sup> V. Albers, H. Knorr and P. Rothemann, *Phys. Rev.*, **47**, 198 (1935); P. Rothemann, *Cold Springs Harbour Symp. Quant. Biol.*, **3**, 171 (1935). <sup>4</sup> R. Morton, *The Appl. of Absorption Spectra to the Study of Vitamins, etc.*, L, 1942. <sup>5</sup> В. Б. Евстигнеев и А. А. Красновский, *ДАН*, **58**, № 3 (1947). <sup>6</sup> А. Н. Теренин, *Acta physicochim. URSS*, **18**, 210 (1943); *Фотохимия красителей*, изд. АН СССР, 1947; *Изв. АН СССР*, сер. биол., № 3, 369 (1947). <sup>7</sup> А. А. Красновский, *Изв. АН СССР*, сер. биол., № 3, 377 (1947); *ДАН*, **58**, № 4, 5 (1947); *Усп. совр. биол.*, **21**, 153 (1945); А. А. Красновский и Г. П. Брин, *ДАН*, **58**, № 6 (1947). <sup>8</sup> L. Michaelis, *Cold Springs Harbour Symp. Quant. Biol.*, **7**, 33 (1939).