

А. А. КРАСНОВСКИЙ, Г. П. БРИН и К. К. ВОЙНОВСКАЯ

## УСЛОВИЯ ОБРАТИМЫХ ПРЕВРАЩЕНИЙ ХЛОРОФИЛЛА, ИДУЩИХ ПОД ДЕЙСТВИЕМ СВЕТА

(Представлено академиком А. Н. Терениным 24 IX 1949)

В предыдущих сообщениях была описана найденная одним из нас реакция обратимого фотохимического восстановления хлорофилла аскорбиновой кислотой в пиридиновом растворе (1) и изложены результаты работ, показавших участие активной фото-восстановленной формы хлорофилла в сенсibilизированных окислительно-восстановительных реакциях (2, 3)\*.

В этом сообщении излагаются результаты исследования условий обратимого фото-восстановления хлорофилла а и b разными соединениями и в различных средах. Методика осуществления реакции была подобна описанной ранее: опыты производились в вакуумной трубке специальной формы, вставляемой попеременно в кюветодержатель спектрофотометра и в термостатируемую установку для освещения кинолампой 500 вт через конденсор и красный светофильтр RG-2. О ходе реакции судили по изменению вида спектра и величины коэффициента погашения  $E$  в максимуме поглощения.

В трубку вводили 6 мл раствора хлорофилла с концентрацией около  $10^{-5}$  мол/л и от 1 до 20 мг испытуемого соединения (восстановителя), эвакуировали трубку при взбалтывании в течение 3 мин. масляным вакуум-насосом и освещали от 1 до 3 мин. в термостатируемой установке при  $10^\circ$ . Измерение спектра поглощения в видимой области производилось с помощью кварцевого спектрофотометра Бекмана после эвакуации, через 30 сек. после выключения облучения и после 2 час. стояния в темноте (температура  $20^\circ$ ), где проходила обратная реакция.

В табл. 1 результаты опытов охарактеризованы значениями  $K_n = \frac{E_1 - E_2}{E_1} 100$ , выражающим глубину прямой фотохимической реакции, и  $K_o = \frac{E_3 - E_2}{E_1 - E_2} 100$ , выражающим обратимость реакции в темноте. Значения коэффициентов погашения измерены при 670 м $\mu$ ,  $E_1$  — после эвакуирования до освещения,  $E_2$  — после освещения,  $E_3$  — после 2-часового стояния в темноте.

Хлорофилл а + b был выделен обычным способом из листьев крапивы, хроматографическое разделение компонентов а и b на сахарозе осуществлялось в условиях, близких к описанным (4).

\* Подобным хлорофиллу оказалось поведение протохлорофилла (11), фталоцианина магния и феофитина; в случае фталоцианина меди и гемина фотореакция не идет.

Таблица 1

Среда	$E_{1-1000}$	$E_{1-100}$	$E_{1-1000}$	$K_n$	$K_o$
Пиридин . . . . .	311	20	248	93	78
» . . . . .	810	49	641	94	80
» . . . . .	1100	59	840	95	75
Смесь пиридин — вода в отношении:					
5:1 . . . . .	629	26	372	96	57
2:1 . . . . .	432	56	250	87	52
1:1 . . . . .	266	41	172	85	58
1:2 . . . . .	117	42	100	64	77
1:5 . . . . .	92	74	81	20	39
Анилин . . . . .	366	285	331	22	57
Спирт этиловый 96% . . . . .	430	344	356	20	14
Спирт этиловый, содержащий:					
14% пиридина . . . . .	385	54	233	86	54
3% пиридина . . . . .	595	123	350	79	48
16% воды и 0,3% пиридина . . . . .	498	134	305	73	47
16% воды и 0,3% имидазола . . . . .	405	53	236	87	52
16% воды и 0,3% гистидина . . . . .	440	85	252	81	47
Ацетон . . . . .	530	376	405	29	19
Ацетон, содержащий:					
14% пиридина . . . . .	401	15	208	96	50
3% пиридина . . . . .	470	83	231	83	38
0,3% пиридина . . . . .	525	325	377	38	26

Примечание. Этиловый спирт, ацетон и пиридин разогнаны на лабораторной ректификационной колонке с насадкой Фенске высотой 150 мм.

1. Фото-восстановление хлорофилла а и в в различных средах.

Из сравнения значений  $K_o$  табл. 1 видно, что наблюдение обратимой реакции в явной форме возможно лишь в среде органических оснований, либо при добавке оснований к другим растворителям. Существенно, что действие добавок гистидина, имидазола и пиридина подобно. Способность хлорофилла к обратимым превращениям в таких средах указывает на аналогию с гемохромогенами, легкость окислительно-восстановительных превращений которых определяется связью центрального атома железа с молекулой органического основания; такая связь возможна и в случае хлорофилла, атом магния которого обладает двумя „вакантными“ координационными местами\*.

С целью получения данных о взаимодействии хлорофилла с пиридином мы произвели детальное измерение спектров поглощения хлорофилла а и в в пиридиновом и эфирном растворах; последний обладает системой полос, подобной наблюдаемой в других растворителях<sup>(5)</sup>.

Адсорбированный на сахаре хлорофилл а извлекали эфиром и измеряли спектр поглощения на спектрофотометре, затем под вакуумом испаряли эфир, к сухому остатку добавляли тот же объем пиридина и снова производили измерение спектра поглощения (рис. 1). Максимумы полос ( $\pm 1$  м $\mu$ ) в эфире; 662, 615, 577, 531, 428, 410 м $\mu$ ; в пиридине: 669, 643, 622, 543, 442, 420 м $\mu$ .

\* Судя по тому, что аналог хлорофилла, фталоцианин магния дает кристаллический гидрат с двумя молекулами воды.

Значительная деформация вида спектра свидетельствует о взаимодействии хлорофилла с пиридином, наиболее вероятно координационно связанного с центральным атомом Mg, или посредством водородной связи с другими частями молекулы хлорофилла. Ни в одном из ранее исследованных растворителей столь значительного изменения в положении II и III полос поглощения хлорофилла а не наблюдалось<sup>(5)</sup>.

2. Фото-восстановление хлорофилла а + b различными соединениями. Были исследованы кислоты: аскорбиновая, диоксималеиновая, янтарная, яблочная, молочная, фумаровая, лимонная, пировиноградная, щавелевая, уксусная, глиоксалева, глутаминовая, гликоль, глюкоза, глицерин, глицеральдегид, пирокатехин, резорцин, гидрохинон, цистеин, аспарагин, гипоксантин, ацетугусный эфир, фенилгидразин, сероводород, иод\*. Фото-восстановление хлорофилла удалось наблюдать лишь с аскорбиновой и диоксималеиновой кислотой, цистеином, фенилгидразином и сероводородом. При этом образуется восстановленная форма хлорофилла с максимумом поглощения при 525 мμ, в темноте обратимо окисляющаяся до хлорофилла (быстрее в присутствии кислорода воздуха).

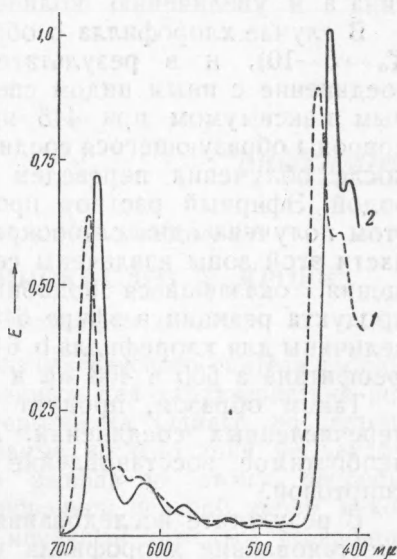


Рис. 1. Раствор хлорофилла а: 1 — в пиридине, 2 — в эфире

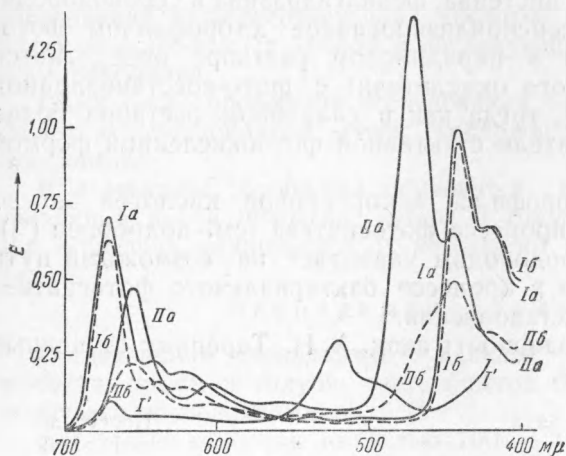


Рис. 2. I a — 6 мл раствора хлорофилла а в пиридине + 1 мг аскорбиновой кислоты, эвакуировано, до освещения; I' — после 1,5 мин. освещения (из другого опыта; снято в течение 5 мин., от 420 мμ); I б — после 2 час. стояния в темноте. II а — 6 мл раствора хлорофилла б в пиридине + 1 мг аскорбиновой кислоты, эвакуировано, до освещения; II б — после 2 час. стояния в темноте

3. Раздельное фото-восстановление хлорофилла а и б. При фото-восстановлении в пиридиновом растворе хлорофилла а + б после окончания обратной темновой реакции исчезает коротковолновый максимум (470 мμ) хлорофилла б<sup>(1)</sup>, что привело к предположению о необратимом восстановлении альдегидной группы хлорофилла б до метильной группы. Для решения этого вопроса мы исследовали фото-восстановление хроматографически изолированных компонентов а и б. Результаты опытов видны из рис. 2.

В случае хлорофилла а обратимость реакции высока; спектр регенери-

\* Опыт с иодом был поставлен, исходя из недавних наблюдений<sup>(7)</sup> над тем, что иод сильно повышает обратимость выцветания растворов хлорофилла в метаноле. В наших опытах иод оказался неактивным. Повидимому, в спирте происходит преимущественное фотоокисление хлорофилла<sup>(8, 9)</sup>, а в основных средах — восстановление.

рованного хлорофилла подобен спектру исходного. Введение избытка аскорбиновой кислоты, длительное освещение и увеличение содержания воды в пиридине приводят к фотохимическому образованию феофитина а и увеличению количеств необратимых фотопродуктов.

В случае хлорофилла b обратимость вообще невелика ( $K_n = 60-70$ ,  $K_o = 5-10$ ), и в результате фотохимической реакции образуется соединение с иным видом спектра поглощения, обладающее характерным максимумом при 445 мμ (в пиридине). С целью исследования природы образующегося соединения, пигмент из пиридинового раствора после облучения переведен в петролейный эфир, пиридин отмыт водой. Эфирный раствор пропущен через колонку с сахаром, при этом получена одна слабоокрашенная в зеленый цвет зона; различные части этой зоны извлечены серным эфиром и сняты спектры поглощения, оказавшиеся подобными. Главные максимумы поглощения продукта реакции в эфире 643 и 432 мμ, тогда как соответственные величины для хлорофилла b 642 и 453 мμ, хлорофилла а 662 и 428 мμ, феофитина а 665 и 408 мμ и феофитина b 653 и 443 мμ.

Таким образом, продукт фотореакции не является ни одним из перечисленных соединений. Можно предположить, что происходит необратимое восстановление альдегидной группы хлорофилла b до спиртовой.

В результате исследования установлено, что: 1) обратимое фото-восстановление хлорофилла удается наблюдать лишь в присутствии органических оснований; 2) обратимость фото-восстановления хлорофилла а весьма высока, тогда как хлорофилла b в тех же условиях дает преимущественно продукты необратимого фото-восстановления; 3) образование обратимых окислительно-восстановительных систем с хлорофиллом (под действием света) установлено для аскорбиновой и диоксималеиновой кислот, цистеина, фенилгидразина и сероводорода.

Следует полагать, что сенсibilизированное хлорофиллом фото-окисление этих соединений в пиридиновом растворе определяется реакцией кислорода (или иного окислителя) с фото-восстановленной формой хлорофилла (<sup>2</sup>, <sup>3</sup>, <sup>6</sup>, <sup>8</sup>), тогда как в спиртовом растворе более вероятна реакция восстановителя с активной фотоокисленной формой хлорофилла (<sup>8-10</sup>).

Фото-восстановление хлорофилла аскорбиновой кислотой может быть связано с ее ролью в процессе фотосинтеза (см. подробнее (<sup>6</sup>)), а фото-восстановление сероводородом указывает на возможный путь участия бактериохлорофилла в процессе бактериального фотосинтеза посредством обратимого восстановления.

Приносим глубокую благодарность акад. А. Н. Теренину за ценные указания и помощь в работе.

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

Поступило  
5 IX 1949

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> А. А. Красновский, ДАН, 60, 421 (1948). <sup>2</sup> А. А. Красновский, ДАН, 61, 91 (1948). <sup>3</sup> А. А. Красновский и Г. П. Брин, ДАН, 67, 325 (1949). <sup>4</sup> F. Zscheile, C. Somar, Botan. Gaz., 102, 463 (1941). <sup>5</sup> D. Harris, F. Zscheile, Botan. Gaz., 104, 515 (1943). <sup>6</sup> А. А. Краенковский, Докторская диссертация, Ин-т биохимии им. А. Н. Баха АН СССР, 1948. <sup>7</sup> J. McVardy and R. Livingston, Journ. Phys. Coll. Chem., 52, 662 (1948). <sup>8</sup> А. Н. Теренин, Фотохимия красителей, изд. АН СССР, 1947. <sup>9</sup> А. А. Красновский, ДАН, 58, 617 (1947). <sup>10</sup> А. А. Красновский и Г. П. Брин, ДАН, 58, 1087 (1947). <sup>11</sup> А. А. Красновский и К. К. Войновская, ДАН, 66, 663 (1949).