

Л. М. КОСОБУЦКАЯ и А. А. КРАСНОВСКИЙ
**ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОДУКТОВ ВОССТАНОВЛЕНИЯ
ХЛОРОФИЛЛА, ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ И АНАЛОГОВ
ПО РЕАКЦИИ ТИМИРЯЗЕВА**

(Представлено академиком А. Н. Терениным 24 VI 1950)

К. А. Тимирязев (¹⁻³) в 1885 г. открыл реакцию обратимого восстановления хлорофилла цинковой пылью в присутствии уксусной кислоты. При этом наблюдалось образование продуктов восстановления желто-коричневого цвета; при стоянии на воздухе возвращалась зеленая окраска раствора. До настоящего времени, однако, с полной определенностью не установлена природа образующихся при этой реакции продуктов. Изучение реакции Тимирязева представляет значительный интерес в связи с проблемой химического участия хлорофилла в процессе фотосинтеза.

Кун и Винтерштейн (⁴) нашли, что продукты окисления восстановленных форм хлорофилла а и b по реакции Тимирязева тождественны с исходным веществом, в случае феофитина и феофорбида было установлено образование их цинковых производных. Однако Альберс, Кнорр и Ротемунд (⁵) обнаружили различия в спектрах флуоресценции и поглощения исходного хлорофилла и регенерированных продуктов после реакции. Подобное различие в спектрах поглощения наблюдал Т. Н. Годнев (⁶) при восстановлении протохлорофилла.

С целью установления природы образующихся при реакции Тимирязева продуктов мы произвели сравнительное исследование восстановления хлорофилла (а + b), а и b, феофитина, его цинкового и медного комплекса, а также аналога хлорофилла-фталоцианина магния.

Хлорофилл а и b получали хроматографическим разделением на сахаре в условиях, близких к описанным (⁷). Феофитин получали непосредственно из порошка сухих листьев крапивы по Фишеру (⁸). Цинковый и медный комплекс были получены при взаимодействии ацетонового раствора феофитина с нагретым раствором ацетата меди или цинка в метаноле. Реакция проводилась в вакуумных трубках с отводом особой формы, позволяющей устанавливать их в кюветодержателе спектрофотометра Бекмана. В отвод вводилось 0,3 г цинковой пыли, 3 мл пиридинового раствора исследуемого пигмента с концентрацией 10^{-4} М/л, 0,06 мл ледяной уксусной кислоты, 0,04 мл воды. В трубку отвода вводился ватный фильтр. В нижний конец трубки наливалось 3 мл пиридина.

Трубку эвакуировали при взбалтывании в течение 3 мин. масляным вакуумным насосом. В течение нескольких секунд происходил переход зеленой окраски раствора в желто-бурую. Затем при наклоне трубки раствор фильтровали через ватный фильтр в нижнюю часть вакуумной трубки. Таким образом, фильтрование продуктов реакции от цинка происходило в вакуумных условиях.

Измеряли спектр поглощения продуктов после реакции и после пуска воздуха на фотоэлектрическом спектрофотометре через каждые

5 мμ, были проведены контрольные опыты с заменой раствора хлорофилла пиридином. Спектры контрольных опытов учитывали при построении кривых поглощения.

Таблица 1

Положение главных максимумов поглощения (красного и фиолетового) в пиридине

Пигмент	Исходный продукт		После обратной реакции	
Хлорофилл (a+b)	670	442	661	431
Феофитин (a + b)	677,5	415	661	431
Хлорофилл a	670	442	661	430
Хлорофилл b	656	470	644	459
Zn-феофитин (a + b) . .	661	431	661	431
Cu-феофитин (a + b) . .	655	422,5	660	428
Zn-феофитин a	661	430	—	—
Zn-феофитин b	644	459	—	—
Фталоцианин магния . .	672,5	607,5	672,5	607,5

Хлорофилл b восстанавливается полнее, чем хлорофилл a, некоторое количество которого в большинстве опытов оставалось непрореагировавшим.

Продукт восстановления фталоцианина магния окрашен и не поглощает в видимой области спектра. Пуск воздуха приводит к окислению продуктов восстановления, раствор при этом зеле-

неет. Существенно, что у всех производных хлорофилла образуются продукты, обладающие подобным спектром поглощения с главными максимумами при 661 и 431 мμ (± 1 мμ).

Вид спектра поглощения конечных продуктов реакции соответствует поглощению Zn-феофитина (см. рис. 1 и 2) *.

С целью дополнительной идентификации было произведено хроматографическое разделение.

Продукты окисления хлорофилла a и b переводились в серный эфир. Раствор в смеси 30% серного и 70% петролейного эфира хроматографировали на сахарной колонке по Цвету. В случае хлорофилла b наблюдались две зоны — верхняя, серая, содержащая неизвестные продукты распада, и нижняя, зеленая, со спектром, соответствующим Zn-феофитину b. В случае хлорофилла a можно было заметить образование трех зон — верхней, серой (продукты разложения) и двух сине-зеленых, разделенных полоской бесцветного сахара. В верхней слабой зоне адсорбировался непрореагировавший хлорофилл a, в нижней — более широкой — цинковое производное хлорофилла a.

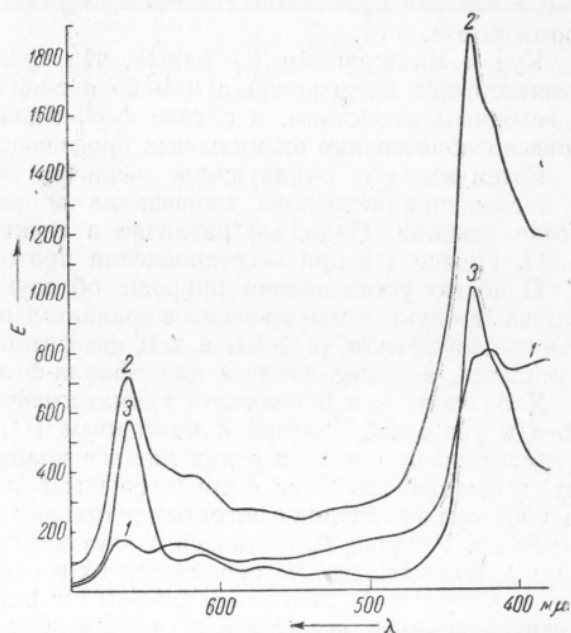


Рис. 1. Восстановление феофитина (a + b) по реакции Тимирязева: 1 — восстановленный продукт, 2 — продукт обратного окисления кислородом воздуха, 3 — цинковый комплекс феофитина (a+b)

* На рис. 1, 2 и 3 спектр поглощения Zn-феофитина дан в произвольной концентрации лишь для сопоставления вида спектров.

В случае Си-феофитина спектр регенерированных окисленных продуктов реакции был сдвинут в сторону более коротких длин волн, по сравнению с Zn-феофитином. У феофитина спектр продуктов реакции был подобен цинковому комплексу (см. рис. 3). У фталоцианина магния наблюдалось полное соответствие спектров поглощения до и после реакции.

На основании проведенных опытов можно прийти к следующим заключениям.

1. При действии цинковой пыли на пиридиновые растворы хлорофилла, феофитина, цинкового и медного производных хлорофилла и фталоцианина магния происходит восстановление пигментов с падением поглощения в области главных максимумов этих соединений в видимой области спектра, что свидетельствует о нарушении хромофорной системы конъюгированных связей молекулы пигмента. Применение весьма концентрированных растворов хлорофилла дает возможность обнаружить полосу поглощения в области 510—530 м μ . Химическая природа образующихся

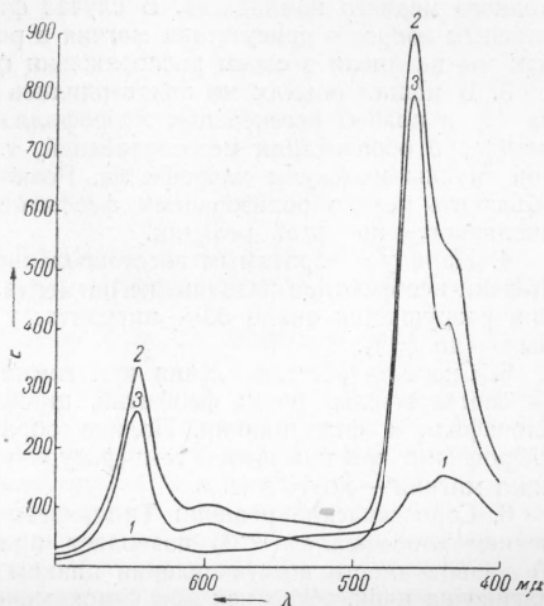


Рис. 2. Восстановление хлорофилла а по реакции Тимиризева: 1 — восстановленный продукт, 2 — продукт обратного окисления кислородом воздуха, 3 — цинковый комплекс феофитина а

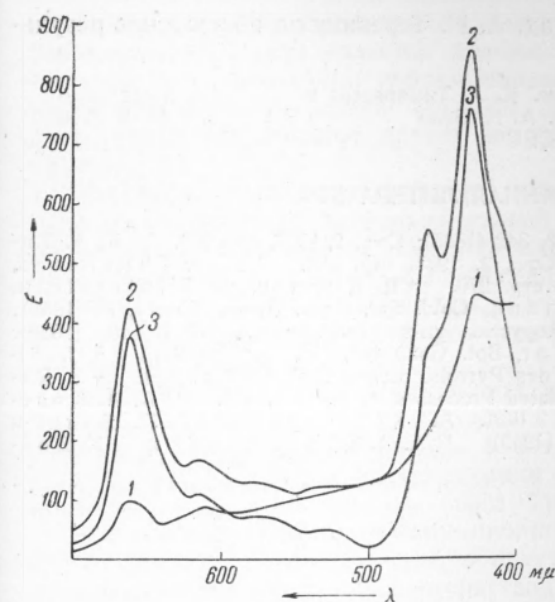


Рис. 3. Восстановление хлорофилла б по реакции Тимиризева: 1 — восстановленный продукт, 2 — продукт обратного окисления кислородом воздуха, 3 — цинковый комплекс феофитина б

восстановленных соединений остается неясной.

2. После пуска воздуха происходит обратное образование зеленого пигмента. Спектральные и хроматографические исследования показали, что в случае хлорофилла и феофитина происходит образование цинкового комплекса. В случае хлорофилла а часть первоначального продукта не участвует в реакции. Можно думать, что эта часть незначительна, так как спектр продукта после окисления не дает отклонений от спектра Zn-феофитина а. При реакции с цинковым комплексом происходит его обратная регенерация. В случае медного комплекса продукт после реакции обладает флуоресценцией, тогда как исходное медное соединение ее не имеет; однако спектр пол-

ностью не соответствует цинковому комплексу. Наиболее вероятно, что при этом получается смесь способного к флуоресценции цинкового и исходного медного комплексов. В случае фталоцианина магния остается неясным вопрос о присутствии магния в регенерированном продукте, так как мы не имели в своем распоряжении фталоцианина цинка.

3. В наших опытах не подтвердились данные Куна и Винтерштейна ⁽⁴⁾ о полной регенерации хлорофилла и предположения Рабиновича ⁽⁹⁾ об образовании мезосоединений, т. е. о восстановлении винильной группы молекулы хлорофилла. Реакцию Тимирязева нельзя также объяснить только образованием феофитина, так как феофитин восстанавливается при этой реакции.

4. Наряду с обратимым восстановлением происходит в значительной степени необратимое разрушение пигмента. В случае фталоцианина магния разрушается около 80% пигмента, у хлорофилла и его производных — до 50%.

5. Скорость восстановления при комнатной температуре уменьшается соответственно ряду: феофитин, цинковый комплекс, хлорофилл b, хлорофилл a, фталоцианин. Полное обратное окисление производных хлорофилла при комнатной температуре требует 1,5—2 часа, фталоцианина магния — до 10 час.

6. Сопоставление реакции Тимирязева с обратимым фотовосстановлением хлорофилла ⁽¹⁰⁻¹²⁾ позволяет прийти к следующим выводам: а) необратимость восстановления цинком объясняется заменой атома магния на цинк, тогда как при фотохимической реакции удается наблюдать лишь побочное образование феофитина; б) красный промежуточный продукт фотовосстановления хлорофилла а имеет максимум при 525 мμ, тогда как при восстановлении цинком не происходит значительного накопления красных промежуточных продуктов; введение цинка в молекулу хлорофилла приводит в изменению спектральных свойств промежуточного продукта восстановления. Свойства продуктов темнового и фотохимического восстановления будут сопоставлены в последующих работах.

Приносим благодарность акад. А. Н. Теренину за обсуждение результатов.

Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева и
Институт биохимии им. А. Н. Баха
Академии наук СССР

Поступило
18 V 1950

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ К. А. Тимирязев, *Nature*, 32, 342 (1885); *Соч.*, 2, 1937, стр. 268. ² К. А. Тимирязев, *С. R.*, 102, 686 (1886); *Соч.*, 2, 1937, стр. 264. ³ К. А. Тимирязев, *Nature*, 34, 52 (1886); *Соч.*, 2, 1937, стр. 270. ⁴ R. Kuhn u. A. Winterstein, *Ber.*, 66, 1741 (1933). ⁵ P. Rothenmund, *Cold. Spr. Harb. Symp. Biol.*, 3, 71 (1935). ⁶ Т. Н. Годнев, *Уч. зап. Белорусск. ун-та (сер. хим.)*, № 1, 15 (1939). ⁷ F. K. Zscheile and C. L. Comar, *Bot. Gaz.*, 102, No. 3, 453 (1941). ⁸ H. Fischer u. A. Stern, *Die Chemie des Pyrrols*, Leipzig, 2, 1940, p. 329. ⁹ E. Rabinowitch, *Photosynthesis and Related Processes*, 1, 1945, p. 457. ¹⁰ А. А. Красновский, *ДАН*, 60, 42 (1948). ¹¹ А. А. Красновский, Г. П. Брин и К. К. Войновская, *ДАН*, 69, 393 (1949). ¹² А. А. Красновский и К. К. Войновская, *ДАН*, 66, 663 (1949).