

А. А. КРАСНОВСКИЙ и Г. П. БРИН

О ПРИРОДЕ АКТИВИРУЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ ОСНОВАНИЙ НА  
РЕАКЦИЮ ОБРАТИМОГО ФОТОХИМИЧЕСКОГО  
ВОССТАНОВЛЕНИЯ ХЛОРОФИЛЛА И ФЕОФИТИНА

(Представлено академиком А. Н. Терениным 20 I 1953)

Реакция обратимого фотохимического восстановления хлорофилла, его аналогов и производных, изученная в предыдущих работах нашей лаборатории (<sup>1-3</sup>), идет достаточно глубоко лишь в среде органических оснований или при добавке оснований к другим средам, что, вероятно, определяется спецификой сольватации реагирующих молекул (<sup>4</sup>). Относительно природы активирующего действия оснований на эту реакцию в наших работах 1948—1949 гг. были высказаны следующие предположения: 1) среды, обладающие средством к протону, приводят к стабилизации образующейся при реакции ионной формы свободного радикала — продукта фотовосстановления; 2) основания образуют с хлорофиллом координационные соединения по типу гемохромогенов.

В настоящей работе, с целью получения данных о природе активирующего действия оснований, произведено сравнительное исследование их влияния на спектральные и фотохимические свойства хлорофилла а и феофитина а.

Спектральные проявления взаимодействия хлорофилла а и феофитина с основаниями. Ранее (<sup>2</sup>) мы обратили внимание на то, что хлорофилл а в пиридине обладает, наряду с главным красным максимумом поглощения при 669 м $\mu$ , новой полосой поглощения при 640—643 м $\mu$ , которая не наблюдалась в ранее изученных растворителях. Известно, что растворы хлорофилла в более сильных основаниях — пиперидине (<sup>5</sup>) и бензилаmine (<sup>6</sup>) — обладают главным красным максимумом поглощения при 642 м $\mu$ . Мы детально исследовали спектры поглощения свежевыделенного (хроматографически) хлорофилла а и феофитина а в свежеперегнанных, высушенных над

Таблица 1

Положение явных максимумов поглощения ( $\pm 1$  м $\mu$ ) (главные максимумы даны жирным шрифтом)

Растворитель	Хлорофилл а	Феофитин а
Эфир . . . . .	<b>661</b> , 614, 576, 530, <b>427</b> , 409	<b>665</b> , 608, 531, 503, <b>408</b>
Пиридин . . . . .	<b>669</b> , 640, 618, 540, 508, <b>442</b> , 417	<b>666</b> , 611, 536, 507, <b>413</b> , 400
Пиперидин . . . . .	<b>643</b> , 612, 590, 533, 498, <b>424</b> , 408	<b>664</b> , 611, 561, 529, 501, <b>405</b>
Хинолин . . . . .	<b>672</b> , 620, 540, 508, 435, <b>419</b>	<b>670</b> , 610, 540, 510, <b>420*</b>
Никотин . . . . .	<b>669</b> , 638, 618, <b>432</b> , 412	—
Фенилгидразин . . . . .	<b>671</b> , 640, 625, 540, <b>437</b>	—
Пиррол . . . . .	<b>666</b> , 615, 540, 508, <b>418</b>	—

\* Феофитин а + б.

окисью бария, химически чистых основаниях; измерения вели на фотоэлектрическом спектрофотометре (табл. 1).

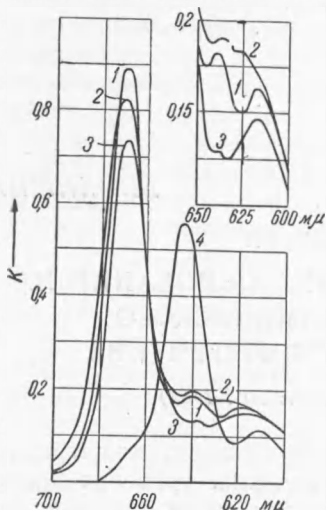


Рис. 1. Спектры поглощения хлорофилла а. 1—в пиридине, 2—в фенолгидразине, 3—в никотине, 4—в пиперидине

отчетливо у хлорофилла, но не у феофитина, могло бы привести к предположению о связи оснований по центральному атому магния (8); однако против этого говорит тот факт, что спектры поглощения координационных соединений хлорофилла с основаниями в неполярных растворителях (6, 8) не обладают сдвигом спектра и полосой поглощения при 638—643 мμ, наблюдаемым в растворе оснований, где, вероятно, доминирует иной тип взаимодействия, связанный с поляризацией молекулы пигмента и ионизацией «кислых» групп его молекулы. Это заключение находит подтверждение в наших измерениях спектра поглощения фталоцианина магния (не обладающего такими «кислыми» группами) в пиперидине; в этом случае полосы поглощения лежат при 670, 642 и 605 мμ, что мало отличается от их положения в пиридине, толуоле и спирте (9).

В спиртовом растворе едкого калия (0,01—0,1 N) происходит постепенное перемещение красного максимума поглощения хлорофилла а к 640 мμ, и синего — к 615 мμ, что, вероятно связано с конечным образованием хлорина е (10); введение щелочи, однако, не приводит к фотохимической активации. Введение исследованных оснований (до 1%) и аммиака в спиртовой раствор хлорофилла и феофитина не приводит к изменению «спиртового» спектра поглощения пигментов, но приводит к фотохимической активации, что видно из табл. 2. Таким образом, следует полагать, что спектральные проявления сольватации молекулы хлорофилла основаниями определяются различными типами взаимодействия, причем, вероятное связывание по магнию входит лишь в качестве одного из слагаемых, мало влияющих на спектр поглощения пигмента (6, 8).

Спектр хлорофилла а наиболее сильно смещен в короткую сторону в пиперидине; в пирроле и хинолине сохраняется «обычная» структура спектра поглощения; в пиридине появляется максимум при 640 мμ; в фенолгидразине и никотине также удается наблюдать слабую полосу поглощения при 640—643 мμ. Существенно, что структура красной части спектра феофитина а является сходной во всех основаниях, в том числе и в пиперидине (см. также (7)). Полоса поглощения хлорофилла а в пиридине при 640 мμ, не связана с наличием в нем примесей пиперидина; об этом свидетельствуют следующие данные: 1) сухой химически чистый пиридин из разных источников и при разных методах очистки дает сходные спектральные кривые; 2) введение малого количества пиперидина в пиридин приводит при стоянии к постепенному росту поглощения при 643 мμ, что указывает на химическое взаимодействие хлорофилла с пиперидином. То, что эти спектральные смещения проявляются более

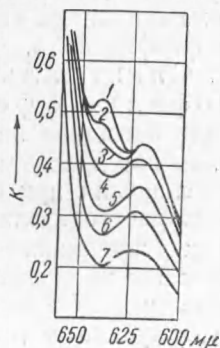


Рис. 2. Влияние добавок воды на спектр поглощения хлорофилла а в пиридине. 1—в сухом пиридине; к 4,5 мл раствора (1) добавлено воды: 2—0,2 мл; 3—0,4 мл; 4—1,0 мл; 5—2 мл; 6—3 мл; 7—4,5 мл

Мы исследовали влияние добавок воды на вид спектра хлорофилла в пиридине; введение воды приводит к постепенному исчезновению максимума поглощения при 640 м $\mu$  (рис. 2); возможно, что образование «гидрата» пиридина, обладающего меньшей основностью, ослабляет поляризацию молекулы пигмента, определяющую появление полосы при 640 м $\mu$ . Введение воды мало влияет на глубину фотовосстановления, приводя к увеличению количества побочно образуемого феофитина (1, 2).

Действие оснований на фотохимическое восстановление пигментов. Опыты проводили в анаэробных условиях, согласно неоднократно описанной нами ранее методики (1<sup>4</sup>) в жидких основаниях и при добавке оснований к спиртовому раствору хлорофилла.

Т а б л и ц а 2\*

Основания	Добавлено основания к 5 мл спирт. раствора в мг	Хлорофилл а		Феофитин а		Способность оснований к образованию гемохромогенов (11)
		осталось после фотореакции в %	после обратн. реакции в %	осталось после фотореакции в %	после обратн. реакции в %	
Пиридин . . . . .	—	6	87	15	68	даст
Пиперидин . . . . .	—	31	39	5	50	"
Никотин . . . . .	—	61	81	—	—	"
Пиррол . . . . .	—	81	81	—	—	—
Хинолин . . . . .	—	93	94	72	86	нет
Фенилгидразин ** . . . . .	—	4	62	—	—	—
Спирт этиловый . . . . .	—	82	85	73	76	нет
В спирте						
Пиридин . . . . .	50	42	52	43	54	даст
Пиперидин . . . . .	50	19	29	16	36	"
Никотин . . . . .	95	8	58	36	72	"
Уротропин . . . . .	80	19	29	—	—	—
Хинолин . . . . .	90	98	98	61	90	нет
Аргинин . . . . .	насыщ.	94	93	—	—	"
Фенилгидразин ** . . . . .	100	52	85	—	—	—
Аммиак *** . . . . .	—	9	26	—	—	даст
Едкий калий . . . . .	0,1—0,01N	98	99	—	—	—

\* В вакуумной трубке 5 мл раствора пигмента около 10<sup>-5</sup> мол/л; 5 мг аскорбиновой кислоты. После эвакуации освещение 3 мин. через светофильтр RG-2 в фокусе конденсора кинолампы 500 вт; водяное охлаждение трубки, температура опыта 20°. Обратная реакция в темноте без доступа воздуха 2 часа. Подсчет процента от исходного количества пигмента, оставшегося после реакции, по величине K в красном максимуме поглощения; измерение в трубке на спектрофотометре.

\*\* Опыты с фенилгидразином вели без аскорбиновой кислоты.

\*\*\* В боковой отвод головки вакуумной трубки вводили 1 мл водного раствора NH<sub>3</sub>; после эвакуации раствор в отводе нагревали до 60°, при этом пары NH<sub>3</sub> насыщали спиртовой раствор пигмента, находящийся в трубке.

Реакция хлорофилла а в пиперидине сопровождается полным изменением характера спектра; вероятно, идет глубокое восстановление молекулы пигмента; феофитин в пиперидине восстанавливается более обратимо, однако спектр поглощения продукта после обратной реакции отличен от исходного; появляется новая полоса при 640 м $\mu$ . В хинолине и пирроле реакция практически не идет. Добавки хинолина к пиридину тормозят фотореакцию. В пиридине и фенилгидразине реакция идет достаточно глубоко и обратимо с образованием красного продукта фотовосстановления с максимумом поглощения около 523 м $\mu$  (рис. 2). Введение оснований в спирт ведет к глубокому и частично обратимому восстановлению; наибольшая обратимость наблюдалась при добавке

никотина. После пуска воздуха в трубку происходила более полная регенерация пигмента.

Рассматривая связь между спектральными и фотохимическими свойствами хлорофилла в присутствии оснований, можно придти к тому заключению, что в общем случае интенсивность полосы поглощения при 638—642 м $\mu$  не определяет глубины и обратимости фотовосстановления;

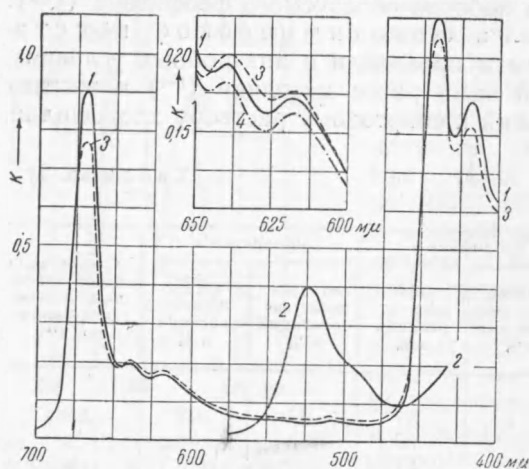


Рис. 3. Обратимое фотохимическое восстановление хлорофилла а в пиридине. Спектры поглощения: 1— хлорофилла а в пиридине с аскорбиновой кислотой после эвакуации; 2— после фотовосстановления без воздуха; 3— после обратной реакции без воздуха (в темноте); 4— хлорофилл а в пиридине без аскорбиновой кислоты

наиболее активны основания, в которых эти полосы слабо выражены (пиридин, фенилгидразин, никотин) (рис. 3). Наконец, в спектрах спиртовых растворов в присутствии оснований вообще не удается наблюдать наличия этой полосы. Вероятно, на фотохимические свойства молекулы пигмента оказывает влияние также другой тип взаимодействия, не оказывающий столь значительного влияния на вид спектра,— координационное связывание оснований по центру молекулы пигмента. По аналогии с гемохромогенами, у которых связь гема с основаниями значительно повышает величину окислительно-восстановительного потенциала молекулы (12), следует предположить, что связывание хлорофилла с основаниями также приводит к увеличению срод-

ства молекулы к электрону (т. е. к усилению ее окислительной способности) и тем самым дает возможность осуществления элементарного акта фотовосстановления за счет кванта красного света. Установленное в наших работах действие оснований позволяет подойти к пониманию природы активирующего действия белка на фотохимические свойства хлорофилла в естественном состоянии, на что мы указывали ранее (2, 3). Связь хлорофилла с основными (гистидиновыми) группами белка может определять высокую эффективность первичной фотохимической реакции белково-липидного соединения хлорофилла в пластидах растений.

В заключение приносим глубокую благодарность акад. А. Н. Тернину за советы и помощь в работе.

Поступило  
7-1 1953

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> А. А. Красновский, ДАН, 60, 421 (1948). <sup>2</sup> А. А. Красновский, Г. П. Брин, К. К. Войновская, ДАН, 69, 393 (1949). <sup>3</sup> А. А. Красновский, Г. П. Брин, ДАН, 67, 325 (1949); 73, 1239 (1950). <sup>4</sup> А. А. Красновский, В. А. Гаврилова, ДАН, 81, 1105 (1951). <sup>5</sup> E. Katz, E. C. Wassink, *Enzymol.*, 7, 97 (1939). <sup>6</sup> R. Livingston, W. F. Watson, J. McArdle, *J. Am. Chem. Soc.*, 71, 1542 (1949). <sup>7</sup> В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова, ДАН, 85, 1073 (1952). <sup>8</sup> В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова, А. А. Красновский, ДАН, 70, 261 (1950). <sup>9</sup> В. Б. Евстигнеев, А. А. Красновский, ДАН, 58, 417 (1947). <sup>10</sup> G. Fischer, A. Stern, *Die Chemie des Pyrrols*, 2, T. 2, 1940. <sup>11</sup> R. Lemberg, J. Legge, *Hematin Compounds and Bile Pigments*, 1949. <sup>12</sup> E. C. Barron, *J. Biol. Chem.*, 121, 285 (1937). <sup>13</sup> Г. П. Брин, А. А. Красновский, *Биохимия*, 16, 453 (1951); А. А. Красновский, *Усп. биохимии*, 1, 473 (1950).