

В. Б. ЕВСТИГНЕЕВ и В. А. ГАВРИЛОВА

## СПЕКТРАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ВОССТАНОВЛЕННОЙ ФОРМЫ ХЛОРОФИЛЛОВ а и b

(Представлено академиком А. Н. Терениным 6 VI 1953)

На основании экспериментальных данных в настоящее время наиболее правдоподобной считается гипотеза о непосредственном химическом участии хлорофилла в процессе фотосинтеза. А. А. Красновским<sup>(1)</sup> впервые было осуществлено обратимое фотохимическое восстановление хлорофилла в растворе рядом соединений в присутствии веществ основного характера и показана возможность сенсбилизации хлорофиллом фотовосстановления красителей, имеющих окислительно-восстановительный потенциал более отрицательный, чем примененный донор водорода. Полученные результаты опытов позволили ему выдвинуть гипотезу о фотохимическом восстановлении хлорофилла как о первичном фотохимическом акте фотосинтеза<sup>(2-4)</sup>.

Основные эксперименты Красновского с сотрудниками были проведены в пиридиновых растворах с применением аскорбиновой кислоты в качестве донора водорода, т. е. в условиях, когда обратная реакция при выключении света в темноте идет быстро и поэтому невозможно было снять точный спектр поглощения восстановленной формы хлорофилла.

Как нами было выяснено, реакция фотохимического восстановления хлорофилла хорошо проходит в толуоловом растворе при применении основного фенилгидразина в качестве восстановителя и одновременно его же в качестве вещества, создающего основность среды. Обратная реакция в этом случае идет значительно медленнее, чем в пиридине, что позволяет при быстрой работе снять спектр поглощения без заметных ошибок. Данное сообщение посвящено результатам работы с такими растворами по изучению спектральных свойств восстановленной формы хлорофиллов а и b.

Чистые хлорофиллы а и b получались из хлорофилла а + b путем хроматографического разделения на колонке из сахарозы. Толуол очищался многократным взбалтыванием с серной кислотой  $d = 1,8$  и последующей перегонкой над металлическим натрием. Фенилгидразин — основание — получался из солянокислого фенилгидразина воздействием КОН и перегонкой над цинковой пылью. Фотохимическая реакция проводилась в вакуумных трубках, позволяющих непосредственное измерение поглощения на спектрофотометре. В качестве осветителя служила лампа накаливания 500 вт (кинолампа) с конденсором и светофильтром RG-2 толщиной 10 мм (см. описание установки в<sup>(5)</sup>). Растворы хлорофилла имели обычно концентрацию в пределах  $10^{-4}$  —  $10^{-5}$  М/л.

Восстановленная форма хлорофилла а. В вакуумную трубку наливали 5,5 мл раствора хлорофилла а в толуоле и добавляли 0,1 мл фенилгидразина. Раствор эвакуировали при кипении 3 мин. форва-

куумным насосом и освещали 2 мин. После этого трубку вставляли в спектрофотометр и проводили по возможности быстрое измерение спектра поглощения полученного красного раствора в пределах от 700 до 400 м $\mu$ . На рис. 1 приводится спектр раствора сразу после освещения и его изменение при стоянии в темноте.

Как видно из рис. 1, спектр освещенного в описанных условиях, раствора хлорофилла обладает 4 максимумами. Непосредственно относящи-

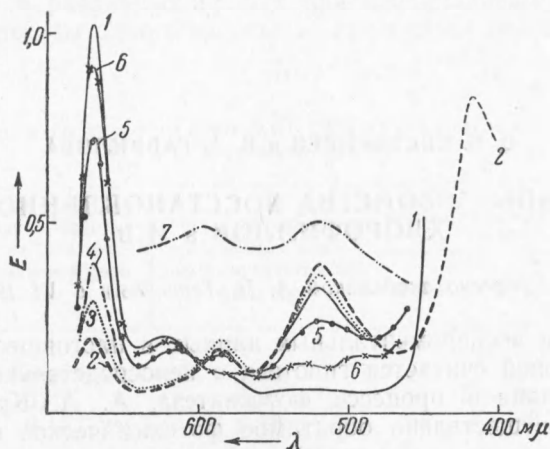


Рис. 1. Спектр поглощения фотовосстановленного раствора хлорофилла а в толуоле и его изменения в темноте. 1—эвакуированный раствор до восстановления, 2—после освещения, 3—через 30 мин. стояния в темноте в анаэробных условиях, 4—то же через 160 мин., 5—через 100 мин. после выпуска воздуха (впущен после измерения 4), 6—через 1 сутки, 7—спектр поглощения фотовосстановленного феофитина (в большем масштабе)

мися к восстановленной форме и имеющими количественное значение можно считать два средних максимума, при 518 и 585 м $\mu$ , так как слабый максимум при 670—665 м $\mu$  принадлежит частично оставшемуся невосстановленному хлорофиллу а, а пик с максимумом около 415 м $\mu$  может быть несколько искажен собственным поглощением фенолгидразина.

При стоянии в темноте спектр постепенно меняется. Пик с максимумом 670 м $\mu$  начинает расти, а с максимумом 518 м $\mu$  снижаться. Поглощение в области 585 м $\mu$  сначала, как правило, немного увеличивается, а затем также начинает понижаться. Эти изменения заметно ускоряются при впуске воздуха, что явно свидетельствует об окислительном характере происходящих в растворе обратных реакций.

Следует отметить, что максимум красной полосы начального раствора хлорофилла находился при 665 м $\mu$ , а после освещения обратная темновая реакция приводит к образованию пика с максимумом 670 м $\mu$ . Это свидетельствует о том, что в случае медленной обратной реакции одновременно с обратимым окислением восстановленного продукта происходит и феофитинизация образующегося хлорофилла. Кривая поглощения окончательного продукта окисления обладает всеми максимумами поглощения феофитина а. Если окисление фотовосстановленного продукта проводится быстро, например с помощью такого окислителя, как хинон, то быстро вырастающий пик в красной области спектра обладает максимумом при 665 м $\mu$ , что говорит об образовании хлорофилла а. О том, что в растворе после освещения содержатся продукты обратимого восстановления именно хлорофилла а, а не непосредственно феофитина, а феофитинизация это только вторичный процесс, говорит также тот факт, что восстановление

феофитина в подобных условиях приводит к образованию продукта синевioletового цвета, обладающего другой, более плоской кривой поглощения (см. рис. 1).

В присутствии некоторого количества пиридина (или если реакция проводится вообще в пиридине с использованием в качестве восстановителя аскорбиновой кислоты) полоса при 585 м $\mu$  вообще не появляется. При прибавлении капли пиридина в толуоловый раствор, восстановленный, как выше описано, полоса при 585 м $\mu$  быстро исчезает, а при 670 м $\mu$  заметно и при 518 м $\mu$  очень немного увеличивается. Подобный эффект производит и прибавление некоторого количества этанола. Наоборот, прибавление в фотовосстановленный раствор хлорофилла а 1 капли 10% уксусной кислоты в толуоле вызывает резкое падение пика при 518 м $\mu$  и некоторое увеличение полос при 670 и 585 м $\mu$ . При длительном стоянии в обоих случаях остающиеся полосы при 518 или 585 м $\mu$  постепенно исчезают и спектр поглощения становится соответствующим феофитину.

Эти факты заставляют предполагать, что полосы поглощения с максимумами 518 и 585 м $\mu$  не являются простыми частями одной кривой поглощения, а принадлежат двум различным формам восстановления хлорофилла а. Дело, очевидно, идет о диссоциированной и недиссоциированной семихинонных формах восстановленного хлорофилла (1). Воздействие сильного основания — пиридина или вещества с большой диэлектрической постоянной этанола способствует диссоциации семихинона и приводит к образованию только диссоциированной формы с максимумом поглощения 518 м $\mu$ , тогда как прибавление кислоты уменьшает основность и благоприятствует существованию недиссоциированной формы с максимумом 585 м $\mu$ , хотя следует отметить, что при прибавлении кислоты должно происходить не меньше трех параллельно идущих процессов: 1) переход диссоциированной формы в недиссоциированную, 2) переход ее же в обычную форму хлорофилла с последующей феофитинизацией и 3) непосредственная феофитинизация восстановленной формы.

Следует отметить, что при использовании толуола в качестве растворителя и фенолгидразина в качестве донора водорода при фотовосстановлении можно работать с весьма интенсивно окрашенными растворами хлорофилла и получать соответственно интенсивно окрашенные растворы его восстановленной формы. В случае пиридина это невозможно, так как при использовании аскорбиновой кислоты реакция идет до конца только в слабых растворах, а при применении фенолгидразина идет по другому пути, так как красной окраски раствора получить не удается.

Восстановленный раствор хлорофилла а обладает флуоресценцией, спектр которой наблюдался нами в малый спектроскоп прямого зрения. При обыкновенной температуре и возбуждении ртутной линией 365 м $\mu$  цвет флуоресценции оранжево-красный и в спектроскоп видна довольно узкая полоса в области 600—635 м $\mu$ . При охлаждении раствора жидким азотом до замерзания флуоресценция становится ярко желто-зеленой и в спектроскоп, кроме вышеупомянутой, видны еще две зеленые полосы: одна очень яркая в области 525—545 м $\mu$  и другая, более слабая, 550—570 м $\mu$ . Ряд контрольных опытов показал, что эти зеленые полосы появляются только тогда, когда в растворе имеется восстановленная форма хлорофилла а с максимумом поглощения 518 м $\mu$  и, очевидно, этой формой и обуславливаются. Появление их только при низкой температуре, когда раствор затвердевает, говорит о том, что в условиях меньшей вероятности рассеивания энергии появляется возможность высвечивания по новому, более высокому уровню, тогда как при обычной температуре эта форма или флуоресцирует совсем, или высвечивание идет только по самому низкому уровню, соответствующему оранжевой полосе. Появление зеленых полос наблюдается и в пиридиновом растворе хлорофилла а при фотовосстановлении аскорбиновой кислотой.

Восстановленная форма хлорофилла *b*. Получение фотовосстановленной формы хлорофилла *b* проводилось точно таким же образом, как и в случае хлорофилла *a*. Цвет раствора после восстановления также красный, но с более бурым оттенком, чем в случае хлорофилла *a*. На рис. 2 изображен спектр поглощения восстановленного раствора хлорофилла *b* в толуоле и его изменение в темноте. Восстановленный хлорофилл *b* обладает также двумя полосами поглощения, лежащими в средней части видимого спектра с максимумами при 565 и 635 м $\mu$ . По аналогии с хлорофиллом *a* можно думать, что и тут мы имеем дело с полосами, принадлежащими двум состояниям восстановленной формы хлорофилла *b* — диссоциированному и недиссоциированному семихинону.

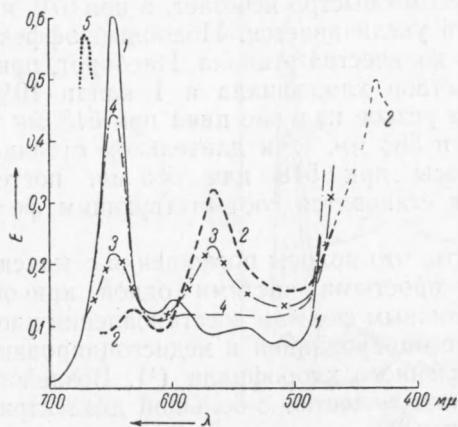


Рис. 2. Спектр поглощения фотовосстановленного раствора хлорофилла *b* в толуоле и его изменения в темноте. 1 — эвакуированный раствор до восстановления, 2 — после освещения, 3 — через 25 мин. стояния в темноте в анаэробных условиях, 4 — через 60 мин. после впуска воздуха (впуск после измерения 3), 5 — положение красного максимума по прошествии 1 суток

положения говорит то, что стояние толуолового раствора хлорофилла *b* в темноте с фенилгидразином приводит к подобному же изменению спектра.

Флуоресценция восстановленного раствора хлорофилла *b* имеет несколько более красноватый оттенок, чем у хлорофилла *a*. В спектроскоп при обычной температуре видны две полосы; довольно яркая 600—630 м $\mu$  и более слабая 645—670 м $\mu$ . При замораживании в жидком азоте зеленых полос не появляется, что опять-таки подтверждает происхождение зеленой флуоресценции только от восстановленной формы хлорофилла *a*.

Таким образом, можно считать установленным, что хлорофиллы *a* и *b* обратимо восстанавливаются фенилгидразином в толуоловых растворах, причем образующаяся семихинонная восстановленная форма этих пигментов находится, вероятно, в двух состояниях — диссоциированном и недиссоциированном, отличающихся по спектру поглощения.

В заключение выражаем благодарность акад. А. Н. Теренину и А. А. Красновскому за ценные указания и обсуждение работы.

Поступило  
26 V 1953

#### 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, Г. П. Брин, ДАН, **67**, 325 (1949); **73**, 1239 (1950). <sup>4</sup> А. А. Красновский, Усп. биол. хим., **1**, изд. Акад. мед. наук, 1950, стр. 473—506. <sup>5</sup> В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова, ДАН, **89**, 524 (1953).