

В. Б. ЕВСТИГНЕЕВ и В. А. ГАВРИЛОВА

О МЕХАНИЗМЕ ФОТОВОССТАНОВЛЕНИЯ НЕКОТОРЫХ КРАСИТЕЛЕЙ, СЕНСИБИЛИЗИРОВАННОГО ХЛОРОФИЛЛОМ И РОДСТВЕННЫМИ ЕМУ СОЕДИНЕНИЯМИ

(Представлено академиком А. Н. Терениным 26 VI 1954)

В работах данной лаборатории было показано, что хлорофилл способен к сенсibilизации реакций между аскорбиновой кислотой, с одной стороны, и сафранином Т, рибофлавином ⁽¹⁾ и кодегидразой I ⁽²⁾, с другой, идущих на свету против термодинамически равновесных темновых условий. В этих работах были приведены экспериментальные доводы в пользу того, что сенсibilизированная реакция идет через стадию обра-

зования фотовосстановленной формы хлорофилла. Позже в той же лаборатории было установлено, что фотовосстановление хлорофилла и родственных ему соединений происходит в две стадии и первичным фотохимическим актом является, повидимому, образование электро-активной, лабильной восстановленной формы пигмента, которая уже вторичным темновым путем переходит в красную восстановленную форму ⁽³⁾. Естественно было поэтому предположить, что при сенсibilизации восстановления этими пигментами дело не доходит до образования вторичной (красной) восстановленной формы и темновая реакция указанных выше «окислителей» происходит уже с первичной фотовосстановленной формой. Это предположение кажется тем более правдоподобным, что сенсibilизированное восстановление наблюдается даже в таких условиях, когда образование вторичной восстановленной формы не имеет места, как, например, для хлорофилла b в пиридине и в случае ряда других пигментов при низкой температуре.

В настоящем сообщении приводятся экспериментальные данные, свидетельствующие о правильности подобного предположения.

На рис. 1 изображено изменение спектра поглощения пиридинового раствора феофитина а ($\sim 10^{-5}$ М/л), содержащего аскорбиновую кислоту ($\sim 10^{-2}$ М/л) и сафранин Т, при освещении светом с длиной волны $\lambda > 650$ м μ , который не поглощается сафранином (максимум поглощения 540 м μ) при температуре -40° . Описание установки приведено в ⁽³⁾. Феофитин в этом случае, как и в ряде других, был взят из-за его

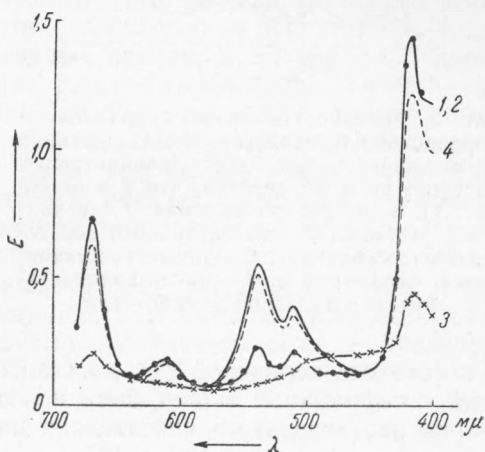


Рис. 1. Фотовосстановление сафранина при -40° , сенсibilизированное феофитином а. Спектры поглощения: 1 — исходный, 2 — после полного восстановления сафранина (2,5 мин. освещения), 3 — после восстановления феофитина а, 4 — после подогрева до комнатной температуры

сильной способности к фотовосстановлению, обусловленной, повидимому, сдвигом равновесия обратимой реакции окисления — восстановления между пигментом и восстановителем в случае феофитина в восстановительную сторону. Применение низкой температуры было необходимо, чтобы полностью замедлить обратную темновую реакцию.

Из рис. 1 видно, что при освещении раствора сразу начинает снижаться полоса поглощения с максимумом 540 м μ , обусловленная сафранином, в то время как величина полосы поглощения с максимумом 670 м μ , принадлежащей феофитину, остается неизменной. Таким образом, эта стадия представляет собою сенсibilизированное фотовосстановление сафранина в бесцветную лейкоформу. Через 2,5 мин. освещения сафранин полностью восстанавливается, и спектр поглощения определяется только присутствием феофитина. Дальнейшее освещение приводит к снижению максимума при 670 м μ и к образованию первичной фотовосстановленной формы самого феофитина а⁽³⁾. При выключении света при —40° обратная реакция идет очень медленно, при подогревании до комнатной температуры она сильно ускоряется. Сначала исчезает первичная восстановленная форма и затем регенерирует сафранин.

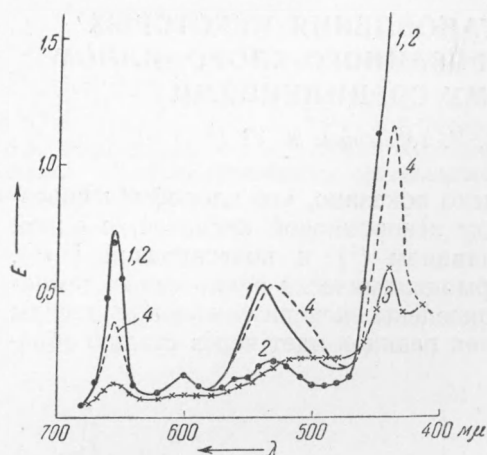


Рис. 2. Фотовосстановление сафранина аскорбиновой кислотой, сенсibilизированное феофитином b при —65° (концентрации раствора того же порядка, что и в опыте рис. 1). Спектры поглощения: 1 — исходного раствора, 2 — после полного восстановления сафранина, 3 — после восстановления феофитина b, 4 — после подогревания до комнатной температуры

Факт появления восстановленной формы сенсibilизатора только после того, как весь сафранин оказывается восстановленным, свидетельствует о наличии реакции между этими соединениями.

Способность первичной фотовосстановленной формы феофитина а к реакции с сафранином может быть непосредственно показана путем приливания раствора этого красителя в пиридине к полученной заранее восстановленной форме при —40°. Сафранин, если он не взят в слишком большом количестве по сравнению с количеством имеющейся в растворе первичной фотовосстановленной формы, мгновенно восстанавливается. При подогревании до комнатной температуры сафранин регенерирует обратно так же, как и при сенсibilизированной реакции.

Как было показано ранее⁽³⁾, вторичная фотовосстановленная форма феофитина а при —40° в заметных количествах не образуется. Эта форма, полученная заранее, не обладает способностью к быстрой реакции с сафранином при низкой температуре.

Такая же картина, как с феофитином а, получается и с феофитином b (см. рис. 2). Однако вследствие того, что последний обладает особенно сильной склонностью к восстановлению, в примененных нами условиях⁽³⁾ опыты пришлось проводить при температуре —65° с применением в качестве растворителя спиртопиридиновой смеси (20% этанола). Способность феофитина b к фотовосстановлению настолько велика, что даже при этой температуре (и в особенности при последующем подогревании) наблюдается образование некоторого количества вторичной восстановленной формы (см. на рис. 2 смещение полосы поглощения сафранина после подогревания), что приводит к меньшей обратимости всего процесса и опять-таки свидетельствует о том, что вторичная восстановленная

форма феофитинов не способна к быстрой реакции с сафранином даже при комнатной температуре.

Кроме сафранина, в качестве объекта сенсibilизированного фотовосстановления нами применялись также рибофлавин и метиловый красный. Во всех случаях наблюдалась хорошо выраженная реакция при температурах -40° и -65° . Применение метилового красного особенно удобно, так как его восстановление протекает необратимо, что позволяет использование его для количественных опытов без применения низкой температуры для замедления обратной реакции.

Таким образом, можно считать показанным, что в случае феофитинов, т. е. аналогов хлорофиллов, не содержащих магния, процесс сенсibilизации обуславливается, повидимому, мгновенной реакцией активной первичной фотовосстановленной формы феофитина, образующейся при освещении в качестве промежуточного продукта.

Более сложной задачей является непосредственное доказательство подобной роли первичной фотовосстановленной формы в случае хлорофиллов. Как было показано ранее (⁴, ⁵), наличие магния в молекуле хлорофилла сильно повышает его способность к окислению по сравнению с феофитином. Атом магния, заменяя водороды в центре порфиринового кольца, хотя и не оказывает сильного влияния на систему конъюгированных связей, о чем говорит не очень большая разница в спектрах поглощения хлорофиллов и феофитинов, но все же достаточно сильно влияет на молекулу, чтобы изменить ее окислительно-восстановительные свойства. Подобное усиление способности к окислению от присутствия магния имеет место не только для неизмененных пигментов, но и для их восстановленных форм. Например, красная фотовосстановленная форма хлорофилла а, с максимумом поглощения 525 мμ в пиридине, гораздо быстрее реагирует с окислителями и, в частности, с кислородом, чем соответствующая форма феофитина а. Даже при низкой температуре -40° , -65° можно наблюдать очень медленную реакцию красной восстановленной формы хлорофилла а с сафранином, что совсем не имеет места для вторичной восстановленной формы феофитина а. Поэтому следует думать, что первичная фотовосстановленная форма хлорофилла тем более должна значительно быстрее реагировать с подходящим акцептором водорода, чем соответствующая форма феофитина, хотя и последняя является крайне реакционноспособной и очень быстро реагирует с рядом «окислителей» даже при очень низкой температуре. В частности, обратная реакция с дегидроаскорбиновой кислотой, являющейся продуктом окисления аскорбиновой кислоты при фотовосстановлении пигментов, проходит в случае хлорофилла, повидимому, гораздо быстрее, чем в случае феофитина, что и обуславливает то, что у хлорофилла равновесие всей реакции сдвинуто по сравнению с феофитином в окислительную сторону и в растворе при освещении содержится значительно меньшее количество «равновесной» первичной восстановленной формы, чем у феофитинов. Большой скоростью обратной окислительной реакции объясняется, повидимому, и то, что даже при низкой температуре, препятствующей в других случаях протеканию обратной реакции, в случае хлорофилла не удается получить значительного количества первичной восстановленной формы, хотя по результатам электрометрических измерений наличие некоторого количества ее не вызывает сомнения.

Невозможность получения больших количеств первичной фотовосстановленной формы хлорофилла в условиях наших опытов не дает возможности показать ее роль при сенсibilизации так же наглядно спектрофотометрическим методом, как для феофитинов, но в пользу предположения о подобной ее роли свидетельствует то, что хлорофиллы а и b хорошо сенсibilизируют восстановление красителей при низких температурах. Из примененных нами красителей реакция проходит особенно хорошо для метилового красного. Повидимому, благодаря необратимо-

сти этой реакции, малая стационарная концентрация первичной фотовосстановленной формы, образовавшаяся при освещении, оказывается достаточной, чтобы реакция фотовосстановления быстро продвигалась вперед. Появляющаяся при освещении восстановленная форма мгновенно используется на восстановление красителя-акцептора, что создает условия для образования новых количеств этой формы. В случае обратимых

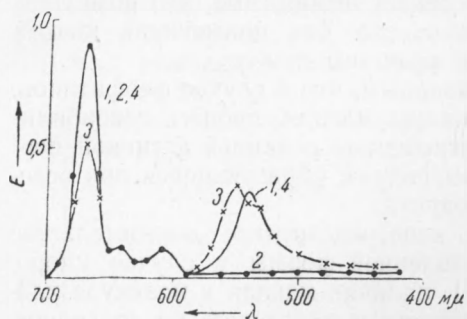


Рис. 3. Фотовосстановление сафранина аскорбиновой кислотой, сенсибилизированное фталоцианином магния. Спектры поглощения: 1—исходного раствора, 2—после полного восстановления сафранина, 3—после восстановления фталоцианина магния, 4—после подогревания до комнатной температуры или впуска воздуха

концентрации скорость реакции должна быть еще меньше. Экспериментальный материал по сенсибилизации хлорофиллом восстановления метилового красного в пиридине приводится нами в другом сообщении.

На рис. 3 показано изменение спектра поглощения при освещении красным светом пиридинового раствора фталоцианина магния, уже давно применяемого в данной лаборатории в качестве более просто построенного аналога хлорофилла (^{1, 6}), содержащего сафранин и фенилгидразин, при температуре -40° . Картина, получающаяся с этим пигментом, очень похожа на ту, которая имеет место в случае феофитинов: сначала понижается максимум 540 мμ, соответствующий сафранину, затем наступает момент, когда окраска раствора определяется только фталоцианином и, наконец, дальнейшее освещение вызывает появление весьма реакционноспособной восстановленной формы самого фталоцианина магния с максимумом поглощения при 550 мμ. При подогревании до комнатной температуры или при впуске воздуха реакция быстро идет в обратном порядке с полной обратимостью.

Результаты, полученные с фталоцианином магния, также определенно показывают, что в случае присутствия магния в центре тетраза-порфинового кольца, не отличающегося в сильной степени по свойствам от порфинового, механизм сенсибилизации вряд ли качественно отличается от механизма в случае порфириновых молекул без магния (феофитинов).

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

Лаборатория фотобиохимии
Института биохимии им. А. Н. Баха
Академии наук СССР

Поступило
18 VI 1954

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ А. А. Красновский, ДАН, **61**, 91 (1948). ² А. А. Красновский, Г. П. Брин, ДАН, **67**, 325 (1949); А. А. Красновский, К. К. Войновская, ДАН, **87**, 109 (1952). ³ В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова, ДАН, **92**, 381 (1953); **95**, 841 (1954); **96**, № 6 (1954). ⁴ Е. Рабинович, Фотосинтез, **1**, 1951, стр. 467. ⁵ В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова, ДАН, **74**, 781 (1950). ⁶ А. А. Красновский, Г. П. Брин, ДАН, **53**, 447 (1946); В. Б. Евстигнеев, А. А. Красновский, ДАН, **58**, 417 (1947).