

В. Б. ЕВСТИГНЕЕВ и В. А. ГАВРИЛОВА

О ФОТОВОССТАНОВЛЕНИИ ФЕОФИТИНОВ а и б

(Представлено академиком А. Н. Терениным 17 III 1954)

В связи с тем значением, которое имеет изучение фотохимических свойств хлорофилла, большой интерес представляют исследования свойств его аналогов, т. е. веществ, близких к хлорофиллу по строению молекулы. Особое место среди подобных соединений занимают феофитины а и б, отличающиеся от хлорофиллов а и б только тем, что в центре их молекулы находится не магний, а атомы водорода.

Как ранее было установлено, феофитины, подобно хлорофиллам, способны к фотовосстановлению в присутствии органических оснований (¹, ²), причем скорость процесса фотовосстановления для феофитина (а + б) значительно выше, чем для хлорофилла (а + б) (²). Вследствие этого нам казалось целесообразным более подробно изучить фотовосстановление феофитинов, тем более, что, судя по спектральным данным, возможно, что в зеленых растениях наряду с хлорофиллами имеется также и некоторое количество феофитинов.

Феофитины а и б получались нами путем хроматографического разделения на колонке из сахарозы их смеси, выделенной из порошка сухих листьев крапивы. Чистота пигментов контролировалась спектрофотометрически. Фотохимические реакции проводились обычно в вакуумных сосудах на установке, описанной ранее (³), с применением красного светофильтра RG-2.

Освещение при нормальной температуре пиридинового раствора феофитинов а или б, освобожденного от воздуха выкачиванием при кипении и содержащего аскорбиновую кислоту, светом, поглощаемым данным пигментом, приводит к тому, что окраска раствора из характерной для этих пигментов серо-зеленой (а) или желто-зеленой (б) переходит, соответственно, в красно-фиолетовую или красноватую. Спектральные изменения, происходящие при этом, показаны на рис. 1. При выключении света реакция постепенно идет обратно и, судя по спектру, неизменный пигмент в значительной степени регенерируется, за исключением некото-

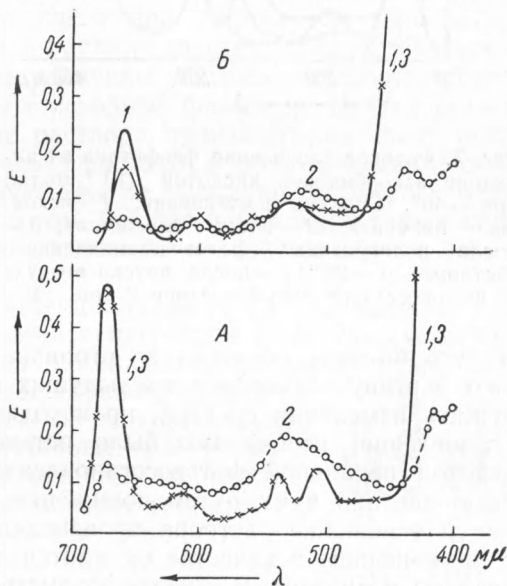


Рис. 1. Фотовосстановление феофитина а (А) и б (Б) в пиридине аскорбиновой кислотой ($5 \cdot 10^{-3}$ мол/л) при $+20^\circ$. Спектры поглощения: 1 — до освещения; 2 — после освещения; 3 — после впуска воздуха и стояния 12 час.

рого его количества, подвергшегося, повидимому, необратимым изменениям. Последние более значительны в случае феофитина b, что, повидимому, объясняется особо сильной склонностью его к фотовосстановлению (см. ниже). Скорость обратной реакции невелика, и даже после выпуска воздуха реакция заканчивается только через несколько часов.

Как было показано ранее (3), освещение пиридиновых растворов хлорофилла, феофитина и других пигментов, содержащих аскорбиновую кислоту или фенилгидразин, сопровождается изменением в восстанови-

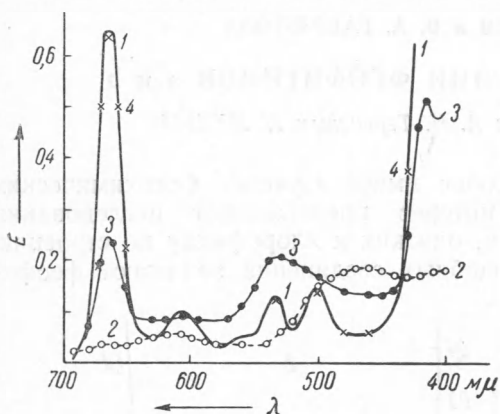


Рис. 2. Фотовосстановление феофитина а в пиридине аскорбиновой кислотой (10^{-2} мол/л) при -40° . Спектры поглощения: 1—исходного пигмента; 2—после освещения; 3—после подогревания фотовосстановленного раствора до $+20^\circ$; 4—после выпуска воздуха в фотовосстановленный раствор 2 при -40°

тельной сторону окислительно-восстановительного потенциала этих растворов, что может быть обнаружено по изменению в отрицательную сторону потенциала платинового электрода, опущенного в реагирующий раствор. Это изменение обуславливается образованием электродно-активной лабильной восстановленной формы пигмента. По результатам спектрофотометрических измерений при нормальной температуре невозможно решить вопрос, сопровождаются ли потенциальные изменения растворов также и спектральными изменениями, т. е. обладает ли первичная фотовосстановленная форма пигмента спектром поглощения, отличным от спектра исходного пигмента, потому что быстрое образование вторичной восстановленной формы затемняет картину возможных предыдущих изменений. Для того чтобы обнаружить изменения спектра, происходящие при первой стадии фотовосстановления, необходимо было остановить или хотя бы затормозить переход первичной фотовосстановленной формы во вторичную, что и было сделано нами путем понижения температуры раствора. Охлаждение и освещение раствора производилось в прозрачном сосуде Дюара с применением в качестве охлаждающей смеси раствора твердой углекислоты в ацетоне. В спектрофотометре имелось приспособление, позволявшее поддерживать необходимую низкую температуру в процессе измерения и при стоянии раствора. Запотевание охлажденных измерительных сосудов предотвращалось путем покрытия их поверхности тонким слоем смеси глицерина со спиртом (4).

Для опытов были использованы растворы феофитинов в пиридине концентрацией около 10^{-5} мол/л, содержащие аскорбиновую кислоту ($\sim 10^{-2}$ мол/л). На рис. 2 показаны результаты, полученные с феофитином а. При освещении раствора этого пигмента, имеющего температуру -40° , спектр поглощения, характерный для феофитина, исчезает и заменяется кривой поглощения, постепенно поднимающейся, начиная с 540 мμ, по направлению к сине-фиолетовому концу спектра и обладающей плоским максимумом в области 460—470 мμ (см. рис. 2, 2); соответственно этому цвет раствора становится желтым. При стоянии в темноте при -40° спектр весьма медленно меняется, и постепенно появляются максимумы при 670, 415 и 525—530 мμ. Реакция в темноте идет, повидимому, в двух направлениях: часть образовавшейся первичной восстановленной формы переходит обратно в исходный пигмент, а другая часть — в более устойчивую вторичную восстановленную форму. Этот процесс очень сильно

ускоряется, если восстановленный при -40° раствор подогреть до комнатной температуры (см. рис. 2, 3).

Если в фотовосстановленный при -40° и находящийся при этой температуре раствор впустить воздух и взболтать раствор, то спектр его мгновенно меняется и становится идентичным спектру первоначального феофитина с очень хорошей обратимостью.

Для того чтобы убедиться, что именно та фотовосстановленная форма пигмента, спектр поглощения которой представлен кривой 2 рис. 2, является и электродно-активной, было проведено наблюдение за изменением во времени потенциала платинового электрода, опущенного в эвакуированный раствор феофитина а в пиридине, содержащий аскорбиновую кислоту, при низкой температуре после освещения. Ранее было установлено ⁽³⁾, что изменение подобного электрода в темноте после освещения при комнатной температуре продолжается 3—4 мин.—факт, свидетельствующий о том, что электродно-активная восстановленная форма существует в этих условиях только указанный период времени. Спектрально наличие лабильной восстановленной формы пигмента можно показать, если раствор тотчас же после освещения при нормальной температуре охладить до -40° , что имеет целью предотвращение быстрого изменения этой формы, происходящего при нормальной температуре ^(3, 4). Если в такой охлажденный раствор впустить воздух, то можно наблюдать мгновенное изменение величины поглощения, соответствующее окислению лабильной формы в исходный феофитин. Другой результат получается, если охлаждение раствора произвести не сразу после освещения, а дать ему предварительно постоять в темноте 4 мин. Последующее охлаждение и выпуск воздуха уже не вызывают быстрого изменения спектра, что свидетельствует о том, что при нормальной температуре быстрые спектральные изменения полностью заканчиваются также за 3—4 мин.

Что же касается изменения потенциала раствора, освещенного при -40° и находящегося затем при этой температуре (о сосуде см. ниже), то получается следующая картина: потенциал после выключения света некоторое время не только не идет обратно, но даже продолжает медленно изменяться в отрицательную сторону, что можно объяснить установлением равновесия, затем останавливается и остается на одном уровне длительное время. При повышении температуры до комнатной потенциал начинает очень быстро повышаться и возвращается к исходному. Таким образом, в одинаковых условиях наблюдается полное соответствие во времени потенциальных и интересующих нас спектральных изменений: это и позволяет считать весьма вероятным, что желтая восстановленная форма феофитина является одновременно и электродноактивной. В этом убеждают также результаты наших опытов по спектральным измерениям скорости образования первичной восстановленной формы при различной температуре. Оказалось, что скорость изменения поглощения в красном максимуме поглощения феофитина, растворенного в спирто-пиридиновой смеси (20—30% этанола, замерзающей при температуре ниже -70°), содержащей аскорбиновую кислоту, при освещении при -65° не только не меньше, но даже несколько больше, чем при -40° . Это соответствует данным, полученным ранее ⁽⁴⁾ при потенциометрических измерениях, в которых была установлена независимость потенциальных изменений при освещении растворов хлорофилла от температуры. Для феофитинов последнее обстоятельство подтверждено новыми измерениями, причем опыты

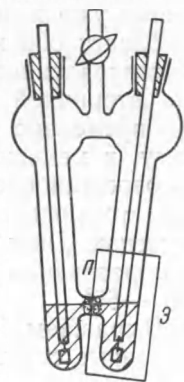


Рис. 3. Электродный сосуд для работы при низких температурах. П—ватная пробка, Э—темный экран (цилиндр)

с этими пигментами, как и все остальные потенциометрические измерения, о которых шла речь в данном сообщении, проводились в вакуумном электродном сосуде, изображенном на рис. 3. Ватная пробка *П* в соединительной трубке практически полностью предохраняла от влияния на результат измерений диффузии, которое было сильным в случае кварцевого измерительного сосуда, описанного ранее ⁽⁴⁾. Независимость скорости изменения потенциала и максимума поглощения феофитина от температуры говорит о том, что в обоих случаях имеет место чисто фотохимическая реакция.

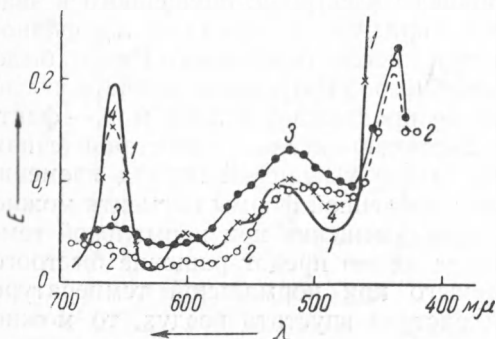


Рис. 4. Фотовосстановление феофитина *b* в пиридине аскорбиновой кислотой (10^{-2} мол/л) при -65° . Спектры поглощения: 1 — исходного пигмента; 2 — после освещения; 3 — после подогревания фотовосстановленного раствора до $+20^{\circ}$; 4 — после впуска воздуха в фотовосстановленный раствор 2 при -65°

Результаты, подобные описанным выше, были получены и с феофитином *b*. Следует отметить, однако, что фотовосстановление в присутствии оснований для феофитина *b* проходит еще более легко, чем для феофитина *a*. Понижение температуры до -40° оказывается недостаточным, чтобы полностью прекратить образование вторичной восстановленной формы феофитина *b* в пиридиновом растворе; эта форма даже за короткий период освещения образуется в значительном количестве. Поэтому, чтобы иметь возможность измерить спектр первичной восстановленной формы феофитина *b*, пришлось применить пиридиновые растворы с добавкой этанола (20—30%), охлажденные

до -65° . На рис. 4 приведены полученные данные.

Кривая поглощения первичной восстановленной формы феофитина *b* похожа на соответствующую кривую феофитина *a*, но подъем ее начинается уже в области 560—570 мμ и довольно плоский максимум лежит в области 500 мμ. При подогревании до нормальной температуры фотовосстановленного при низкой температуре раствора происходит образование вторичной восстановленной формы с максимумом 520 мμ, причем одновременное обратное образование исходного пигмента идет, повидимому, в меньшей степени, чем в случае феофитина *a*. Впуск воздуха в фотовосстановленный при -65° раствор регенерирует неизмененный пигмент с хорошей обратимостью. Однако обратимость здесь все же несколько меньше, чем в случае феофитина *a*, повидимому, вследствие частичного образования вторичной восстановленной формы, имеющего место даже при -65° .

Выражаем благодарность акад. А. Н. Теренину и А. А. Красновскому за ценные советы и обсуждение работы.

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

Поступило
17 III 1954

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ А. А. Красновский, Г. П. Брин, К. К. Войновская, ДАН, **69**, 393 (1949); А. А. Красновский, К. К. Войновская, ДАН, **87**, 109 (1952); А. А. Красновский, Г. П. Брин, ДАН, **89**, 527 (1953). ² В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова, ДАН, **74**, 781 (1950). ³ В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова, ДАН, **92**, 381 (1953). ⁴ В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова, ДАН, **95**, № 4 (1954).