

А. А. КРАСНОВСКИЙ и К. К. ВОИНОВСКАЯ

ОБРАТИМОЕ ФОТОХИМИЧЕСКОЕ ВОССТАНОВЛЕНИЕ ПОРФИРИНА ДО ХЛОРИНА И БАКТЕРИОХЛОРИНА

(Представлено академиком А. Н. Терениным 20 III 1954)

Реакция обратимого фотохимического восстановления хлорофилла, открытая в нашей лаборатории ⁽¹⁾, в последующих работах была распространена на весь ряд аналогов и производных хлорофилла — протохлорофилл, бактериохлорофилл, феофитины, фталоцианин магния. В результате этой реакции образуются активные неустойчивые промежуточные соединения, обладающие поглощением в более короткой области спектра, чем исходные пигменты. В темноте, в результате обратимого окисления фотопродуктов, происходит более или менее полная регенерация исходной молекулы пигмента в зависимости от условий проведения реакции.

В данной работе описаны результаты исследования фотовосстановления гематопорфирина, являющегося типичным представителем группы порфиринов, не содержащих координационно связанного центрального атома металла.

В проведенных ранее работах нашей лаборатории было показано чрезвычайное влияние величины сродства среды к протону на стабильность фотопродуктов ⁽²⁾, в соответствии с этим реакция исследовалась в средах, обладающих различной основностью: ледяной уксусной кислоте, спирте, пиридине и пиперидине. В качестве восстановителя мы использовали, главным образом, аскорбиновую кислоту в соответствии с нашими исходными работами ^(1, 2). 5 мл раствора гематопорфирина с величиной коэффициента погашения $K = 0,5$ во «втором» максимуме 495—500 м μ вводили в вакуумную трубку Тунберга, применяемую в наших работах для измерения на фотоэлектрическом спектрофотометре в анаэробных условиях. К раствору добавляли от 1 до 50 мг аскорбиновой кислоты, удаляли воздух, взбалтывая раствор при кипении растворителя под вакуумом масляного насоса в течение 3 мин., и освещали раствор в трубке в термостатических условиях (обычно 20°) в фокусе конденсора кинолампы 500 вт (обычно около 10^6 эрг/см 2 · сек). Спектрофотометрические измерения производили перед освещением, в течение освещения, после выдержки в темноте без воздуха и после пуска воздуха в трубку. Уже первые опыты показали, что конечные продукты фотовосстановления гематопорфирина отличаются от продуктов восстановления хлорофилла и его аналогов; после освещения наблюдалось появление новых характерных максимумов поглощения при 650—740 м μ , свидетельствующих о восстановлении молекулы порфирина с образованием хлорина и бактериохлорина*. Структура спектров поглощения этих соединений столь характерна ⁽³⁾, что для суждения об их образовании достаточными являются спектральные измерения. Появление интенсивных полос хлорина и бактериохлорина при малом падении максимумов порфирина

* Следует указать на то, что недавно ⁽⁹⁾ опубликованы наблюдения глубоко идущего восстановления порфирина с частичным образованием бактериохлорина в атмосфере водорода при действии ультразвука.

объясняется гораздо более высокой величиной молекулярного коэффициента погашения восстановленных соединений, что хорошо известно ⁽³⁾. Более детальное исследование показало следующее:

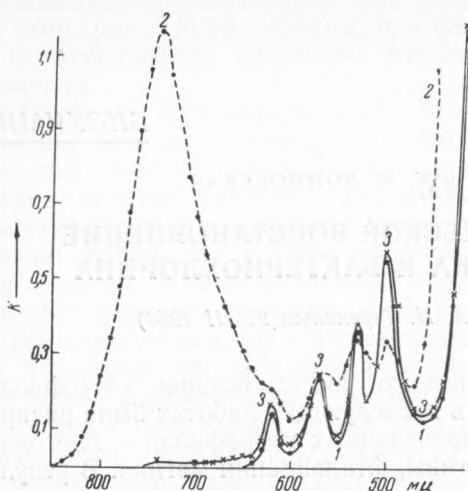


Рис. 1. Фотовосстановление гематопорфирина аскорбиновой кислотой в спирте с 10% пиридина. 1 — исходный спектр поглощения; 2 — после 3 мин. освещения; 3 — через 2 часа после пуска воздуха

ном восстановлении одной двойной связи, т. е. об образовании структуры хлорина. Введение уже 1% пиридина в спирт приводит к ускорению реакции восстановления двух двойных связей; при 30—50% пиридина в спирте у продуктов восстановления наблюдаются два максимума при 660 и 740 мμ. В водной среде реакцию наблюдать не удастся, но при добавлении к воде 10% пиридина происходит фотохимическое образование хлорина и бактериохлорина (см. рис. 1, 2 и 3).

4. Проведение реакции в среде весьма сильного основания — пиперидина — приводит к получению хлорина с максимумом поглощения при 650 мμ; в ледяной уксусной кислоте реакция образования конечных восстановленных продуктов идет весьма медленно.

5. Исследованные реакции обратимы в темноте. Следовало ожидать, что по мере образования хлорин и бактериохлорин будут претерпевать обратимое фотовосстановление с образованием лабильных продуктов, исследованных в предыдущих работах нашей лаборатории. Это явление наблюдается наиболее отчетливо в воде и спирте, содержащих 10% пиридина. В процессе освещения быстро растет максимум поглощения при 740 мμ, указывающий на образование бактериохлорина; при выключении света, в темноте, без доступа воздуха продолжается дальнейший рост этого максимума, свидетельствующий об обратной реакции частично образованных лабильных продуктов фотовосстановления бактериохлорина ⁽⁴⁾.

1. Реакция идет быстрее всего в полном свете лампы накаливания. Исключение короткой области спектра, от 500 мμ, или выделение зеленой области 500—560 мμ приводит лишь к замедлению реакции.

2. В качестве восстановителя наиболее пригодна аскорбиновая кислота. В присутствии цистеина реакция идет медленно. Увеличение количества восстановителя ускоряет реакцию. Без восстановителя реакция не идет вообще.

3. Природа среды влияет на направление и скорость процесса. В спирте наблюдается преимущественное образование структуры бактериохлорина с максимумом при 745 мμ, т. е. восстановление двух двойных связей; в пиридине образуется новая полоса с максимумом при 650—655 мμ, свидетельствующая о преимуществен-

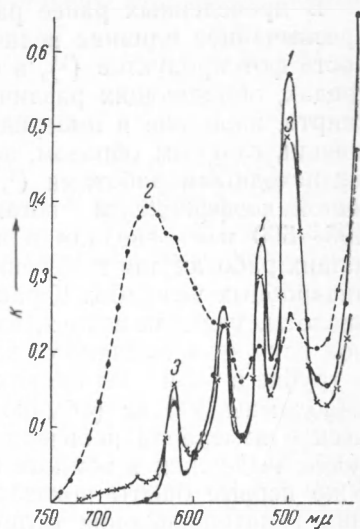


Рис. 2. Фотовосстановление гематопорфирина аскорбиновой кислотой в пиридине. 1 — исходный спектр поглощения; 2 — после 7 мин. освещения; 3 — через 1 час 10 мин. после пуска воздуха

В анаэробных условиях образованный бактериохлорин устойчив, но при пуске воздуха происходит его обратимое окисление с возвратом к исходному спектру поглощения порфирина; эта реакция идет медленно и заканчивается обычно полностью за 2 часа (при 20°). Ход этих превращений виден на рис. 4. Возникает вопрос, можно ли окислить образованные продукты более слабыми окислителями, чем кислород. Мы проверяли эту возможность при помощи ряда соединений, испытанных нами для окисления фотовосстановленной формы хлорофилла; методика этих опытов описана нами ранее (5). Однако ни сафранин *T* ($E_0' = -0,22$ в), ни дихлорфенолиндофенол* ($E_0 = +0,3$ в) не приводят к окислению конечных продуктов восстановления, что указывает на их относительную устойчивость.

6. Обратимость восстановления гематопорфирина указывает на его возможное фотосенсибилизирующее действие при реакции переноса водорода (6). Наряду с образованием конечных устойчивых продуктов фотовосстановления следует ожидать, так же как и в случае хлорофилла, образования активных восстановленных продуктов, определяющих течение сенсibilизированных реакций; индикатором образования таких соединений является изменение окислительно-восстановительного потенциала системы при освещении (5, 7). Измерения фотопотенциала системы гематопорфирин — аскорбиновая кислота, проведенные в нашей лаборатории В. Б. Евстигнеевым и В. А. Гавриловой, показали, что величина потенциала лежит в пределах, обычно наблюдаемых у хлорофилла и его аналогов (7). Мы показали, что гематопорфирин сенсibilизирует восстановление рибофлавина до лейкосоединения в присутствии аскорбиновой кислоты. Опыты ставились следующим образом. В вакуумную трубку вводили 4,5 мл раствора гематопорфирина в этиловом спирте с $K = 0,5$ при 500 м μ , 0,5 мл раствора рибофлавина в пиридине с $K = 1,5$ при 440 м μ и 20 мг аскорбиновой кислоты; удаляли воздух при кипении раствора под вакуумом и освещали через желтый светофильтр с

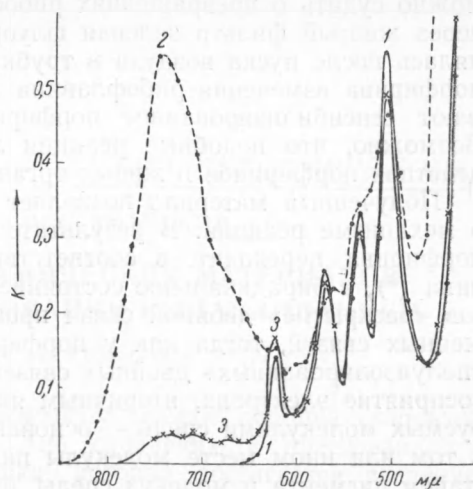


Рис. 3. Фотовосстановление гематопорфирина аскорбиновой кислотой в воде с 10% пиридина. 1 — исходный спектр поглощения; 2 — после 2 мин. освещения; 3 — через 1 час 20 мин. после пуска воздуха

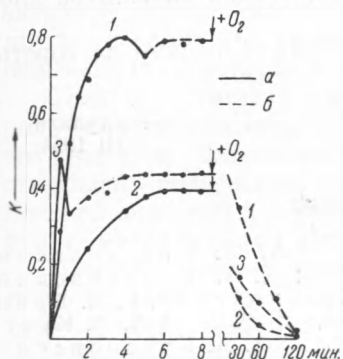


Рис. 4. Кинетика фотовосстановления гематопорфирина. 1 — спирт + 10% пиридина (K при 740 м μ); 2 — пиридин (K при 650 м μ); 3 — вода + 10% пиридина (K при 740 м μ), α — освещение; β — темнота; + O_2 — пуск воздуха

границей пропускания при 510 м μ в течение 1—2 мин. В этих опытах трудно следить за восстановлением рибофлавина путем спектрофотометрических измерений (6) из-за наложения спектров поглощения реагирующих компонентов в области 400—500 м μ . Поэтому за восстановлением рибофлавина удобнее следить, наблюдая его флуоресценцию. В растворе

* В этом случае окислителем должен быть продукт взаимодействия дихлорфенолиндофенола с аскорбиновой кислотой.

гематопорфирин обладает полосой флуоресценции в красной области спектра, а рибофлавин — в зеленой. Наблюдая через зеленый светофильтр за флуоресценцией раствора при возбуждении линиями ртути при 365 мμ, можно судить о превращениях рибофлавина. После освещения раствора через желтый фильтр зеленая флуоресценция пропадала и снова появлялась после пуска воздуха в трубку. В контрольном опыте без гематопорфирина изменения рибофлавина не наблюдалось. Эти опыты показывают сенсibilизированное порфирином восстановление рибофлавина. Возможно, что подобные реакции лежат в основе фотодинамического действия порфиринов в живых организмах.

Полученный материал позволяет высказать следующие соображения о механизме реакции. В результате поглощения кванта света молекула порфирина переходит, в соответствии с представлениями А. Н. Теренина⁽⁸⁾, в бирадикальное состояние. В случае хлорофилла и его аналогов «раскрытие» двойной связи происходит, вероятно, в системе сопряженных связей, тогда как у порфирина велика вероятность раскрытия «полуизолированных» двойных связей; в первичном процессе происходит восприятие электрона, вторичным является перенос протонов, катализируемых молекулами среды — основания. Вероятность «раскрытия» связи в том или ином месте молекулы пигмента также связана с взаимодействием пигмента и молекул среды, определяющим, таким образом, течение первичного фотоакта и последующих темновых стадий⁽²⁾. Исследованные реакции типичны для этого класса соединений; поведение порфиринов, выделенных нами из культуры фотосинтезирующих бактерий и полученных нами из протохлорофилла, оказалось подобным гематопорфиру.

В заключение следует указать на то, что исследованная в нашей работе реакция фотовосстановления порфирина до хлорина и бактериохлорина позволяет подойти к пониманию биохимической природы и воспроизведению вне организма конечных световых стадий биосинтеза хлорофилла и бактериохлорофилла.

Приносим глубокую благодарность акад. А. Н. Теренину за советы и помощь.

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

Поступило
6 III 1954

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ А. А. Красновский, ДАН, **60**, 421 (1948). ² А. А. Красновский, Г. П. Брин, К. К. Войновская, ДАН, **69**, 393 (1949); А. А. Красновский, В. А. Гаврилова, ДАН, **81**, 1105 (1951); А. А. Красновский, Г. П. Брин, ДАН, **89**, 527 (1953). ³ Е. Рабинович, Фотосинтез, **2**, 1952. ⁴ А. А. Красновский, К. К. Войновская, ДАН, **81**, 879 (1951). ⁵ А. А. Красновский, Г. П. Брин, ДАН, **73**, 1239 (1950). ⁶ А. А. Красновский, ДАН, **61**, 91 (1948); А. А. Красновский, Г. П. Брин, ДАН, **67**, 325 (1949); А. А. Красновский, К. К. Войновская, ДАН, **87**, 109 (1952). ⁷ В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова, ДАН, **91**, 899 (1953); **92**, 381 (1953). ⁸ А. Н. Теренин, Фотохимия красителей, Изд. АН СССР, 1947. ⁹ И. Е. Эльпинер, Л. А. Блюменфельд, С. Е. Красовицкая, ДАН, **79**, 495 (1951).