

Л. М. ВОРОБЬЕВА, член-корреспондент АН СССР А. А. КРАСНОВСКИЙ

ФОТООКИСЛЕНИЕ ФЕОФИТИНА, СОПРЯЖЕННОЕ С ДЕЗАГРЕГАЦИЕЙ ДЛИННОВОЛНОВОЙ ФОРМЫ ПИГМЕНТА

При освещении раствора феофитина в водном ацетоне и диоксане, содержащих мономерную и агрегированную формы пигмента, была обнаружена необратимая фотохимическая дезагрегация его длинноволновой формы (1); существенно то, что дезагрегация наблюдалась только в присутствии кислорода воздуха. Поэтому было необходимо исследовать фотохимическое взаимодействие феофитина с кислородом, практически не изучавшееся ранее; есть лишь данные об индуцированной светом хемилюминесценции растворов феофитина в присутствии кислорода (2).

В данной работе исследовали свойства продукта, накапливающегося в растворах феофитина а при освещении в присутствии O_2 , а также промежуточные ступени реакции, ведущей к образованию этого продукта. Основные методы работы и условия проведения опытов описаны ранее (1).

Наши опыты показали, что при освещении растворов феофитина а в сухом и водном (40% воды) ацетоне и серном эфире красным или белым светом (рис. 1) накапливается продукт, отличный от исходного пигмента: при разделении при помощи тонкослойной хроматографии образованный на свету пигмент обладал меньшей подвижностью (R_f 0,42) по сравнению с исходным феофитином (R_f 0,74). Существенно то, что мы не смогли обнаружить различий в спектрах поглощения измененного продукта и исходного феофитина в видимой и у.-ф. области спектра (220—750 м μ), а также в спектре флуоресценции (600—800 м μ).

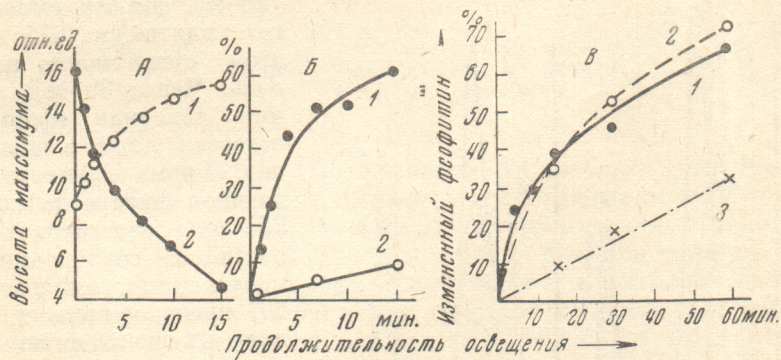


Рис. 1. Изменение высоты максимумов поглощения 670 м μ (1) и 700 м μ (2) при освещении феофитина а в 63% ацетоне белым светом в присутствии кислорода (А) и кинетика накопления измененного феофитина а при освещении в присутствии кислорода (Б, В). Б — освещение пигмента в 63% ацетоне белым светом при 20° (1 — доля измененного феофитина; 2 — доля фотодеструкции); В — освещение пигмента светом $\lambda > 700$ м μ при -30° в 63% ацетоне (1) и белым светом при 21° в 100% ацетоне (2) и серном эфире (3)

Сравнительное исследование фотохимических свойств показало, что измененный продукт более легко восстанавливается аскорбиновой кислотой в ацетоне и пиридине в отсутствие воздуха при 20 и -40°. Спектральные изменения при фотовосстановлении были аналогичными в опытах с исходным и измененным феофитином, однако скорость фотовосстановления последнего (о которой судили по кинетике понижения поглощения в «красном» максимуме) была в 2—3 раза более высокой. При этом фотовосстановление аскорбиновой кислотой не вело к превращению измененного пигмента в исходный феофитин.

Для изучения промежуточных ступеней фотопревращения феофитина а в водном ацетоне, ведущего к образованию измененного продукта, исследовали спектральные изменения, происходящие в результате освещения растворов пигмента в 60% водном ацетоне при -30° и -196° .

Спектры поглощения при -30° . Освещение при -30° вызывало лишь незначительное понижение длинноволнового максимума поглощения агрегированной формы пигмента, возрастания поглощения мономера не наблюдалось. При помощи нашей методики мы не смогли обнаружить сдвига максимума поглощения агрегированного феофитина в результате освещения при -30° или образования новой спектральной формы пигмента. После нагревания освещенного раствора до комнатной температуры обнаруживалось возрастание максимума поглощения мономерного пигмента по сравнению с неосвещенным образцом. Таким образом, несмотря на то что при освещении водно-ацетоновых растворов феофитина при 20° изменения характеризуются изобестическими точками, свидетельствующими об отсутствии промежуточных продуктов (¹), изучаемая реакция, по-видимому, обладает промежуточными стадиями, ускользающими от наблюдения в том случае, когда процесс прослеживается по спектрам поглощения и флуоресценции при комнатной температуре.

Спектры флуоресценции при -196° . При -196° феофитин а в 60% ацетоне обладает, помимо флуоресценции мономера при 674—676 м μ , максимумом агрегированной формы пигмента при 745—750 м μ (рис. 2) (⁴). В замороженном растворе при -196° мы не смогли заметить существенных изменений при освещении, — лишь немного снижалась интенсивность флуоресценции.

Однако в случае освещения раствора красным светом $\lambda > 700$ м μ при -30° и измерения флуоресценции при -196° происходило быстрое понижение максимума агрегированной формы при 750 м μ и образование нового

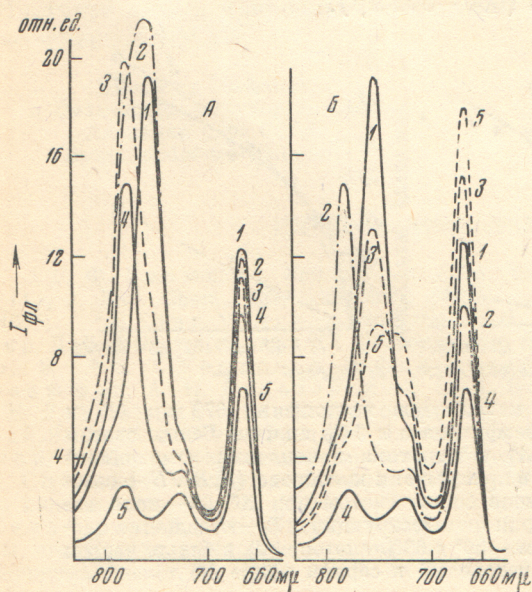


Рис. 2. Спектры флуоресценции (-196°) при фотоокислении феофитина а в 63% ацетоне кислородом. А: 1 — исходный раствор при -30° , 2 — 5 сек., 3 — 30 сек., 4 — 5 мин., 5 — 60 мин. освещения при -30° , $\lambda > 700$ м μ . Б — сразу после освещения при -30° 5 мин. (2) и 60 мин. (4) и после размораживания и 1 часа выдерживания в темноте исходного раствора (1), и освещенного в течение 5 мин (3) и 60 мин. (5)

максимума при 772—780 м μ ; высота «мономерного» максимума 675 м μ при этом существенно не менялась. Через 30 сек. освещения исходная «форма 750» остается лишь в виде «плеча». Форма пигмента, обладающая флуоресценцией при 775 м μ , представляет собой нестойкое соединение и при повышении температуры до 20° превращается в исходную агрегированную форму феофитина с максимумом низкотемпературной флуоресценции при 750 м μ .

По мере дальнейшего освещения при -30° и немедленной фиксации продуктов реакции в жидком азоте наблюдалось понижение флуоресценции в обоих максимумах, причем максимум промежуточного продукта при 775 м μ уменьшался с большей скоростью, чем мономерный при 675 м μ .

После размораживания растворов и измерения флуо-

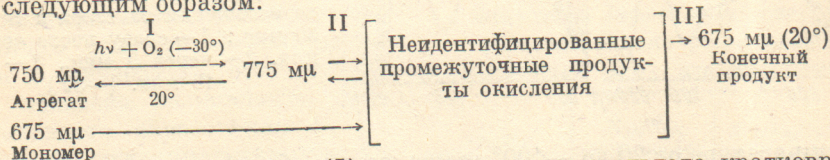
ресценции при 20 и -196° было обнаружено возрастание максимума мономера (в результате освещения, проведенного при -30°).

Спектры флуоресценции при -30° . Несколько иная спектральная картина наблюдалась в том случае, когда освещение и измерение флуоресценции растворов феофитина производили при -30° . В этих условиях в спектре исходного раствора до освещения, помимо флуоресценции мономера при 675 м μ и второго максимума этой формы при 720 м μ , обнаруживалась длинноволновая форма 775 м μ ; обычный максимум агрегированной формы при 750 м μ практически отсутствовал. По-видимому, в этих условиях образование промежуточной формы 775 м μ происходит под влиянием возбуждающего света (рис. 3). В начале освещения (до 30 сек.) наблюдалось дальнейшее возрастание максимума 775 м μ , тогда как мономерный по величине существенно не изменялся. После 5—15 мин. освещения флуоресценция при 775 м μ значительно понижалась, максимум 675 м μ возрастал; последующее выдерживание в темноте при -30° вызвало увеличение флуоресценции при 775 м μ .

В результате 30 мин. освещения происходило дальнейшее понижение максимума 775 м μ и значительное возрастание флуоресценции при 675 м μ ; в темноте при -30° величина флуоресценции при 775 м μ не изменялась, но наблюдался дальнейший рост максимума при 675 м μ .

Освещение в отсутствие воздуха в течение 15 мин. при -30° приводило лишь к общему небольшому снижению флуоресценции по всей измеряемой области спектра. Пуск кислорода не изменял вида спектра. Освещение (2 мин.) в присутствии кислорода воздуха при -30° вызвало появление длинноволнового максимума 775 м μ .

Результаты описанных выше опытов свидетельствуют о том, что феофитин в водно-ацетоновых растворах подвергается фотохимическому превращению, идущему в несколько ступеней. Схематически наблюдаемые спектральные изменения (максимумы флуоресценции в м μ) можно изобразить следующим образом:



Первая ступень реакции (I) проявляется в результате кратковременного освещения при -30° и заключается в превращении агрегированной формы пигмента 775 м μ в новую форму, флуоресцирующую при 775 м μ . Возможно, что в результате световой реакции образуется комплекс агрегированного феофитина с кислородом типа перекиси, распадающийся при нагревании до комнатной температуры. Растворитель, по-видимому, входит в образующийся молекулярный комплекс ($^{\circ}, ^{\circ}$); предполагается, что в водно-диоксановых коллоидах две молекулы пигмента связываются с кислородом молекулы диоксана. Возможно предположить, образование при освещении димеров, у которых две молекулы пигмента связаны с молекулой кислорода, образуя таким образом агрегированную форму феофитина с максимумом флуоресценции при 775 м μ .

Второй ступенью реакции (II) является фотоокисление пигмента кислородом в предполагаемом комплексе, сопровождающееся понижением флуоресценции по всему спектру. Максимумов поглощения и флуоресценции промежуточных продуктов окисления измерить пока не удалось. Тот факт, что в начале освещения раствора при -30° после выключения света наблюдается возрастание максимума промежуточного продукта 775 м μ , а после более продолжительного освещения — увеличение флуоресценции мономера, может указывать на то, что пока ускользающая от изучения стадия окисления феофитина включает две элементарные реакции, одна из которых обратима. Понижение максимума 675 м μ , наблюдающееся на этой стадии реакции, свидетельствует о том, что мономерная форма феофитина в этих условиях также окисляется кислородом.

В темноте при комнатной температуре происходит обратная реакция (III), в результате которой из окисленных продуктов образуется соединение, сходное по спектральным свойствам с мономерным феофитином. В случае проведения опыта при комнатной температуре промежуточные стадии окисления феофитина протекают быстро и поэтому не могут быть обнаружены. Конечным спектральным проявлением окисления феофитина

в этом случае является дезагрегация длинноволновой формы, которая, по-видимому, связана с большей растворимостью в водном ацетоне продукта обратной реакции фотоокисления феофитина.

При кратковременном (15—30 сек.) освещении феофитина а в безводном ацетоне

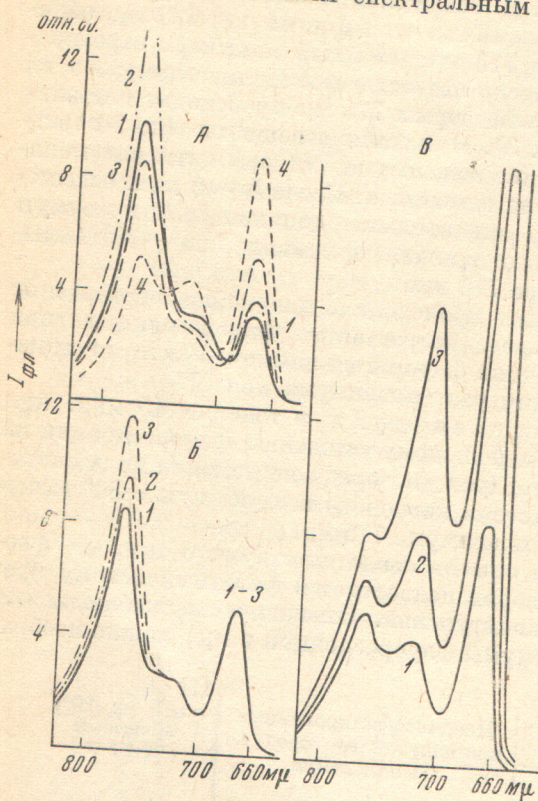


Рис. 3. Спектры флуоресценции феофитина а в 63% ацетоне кислородом в результате освещения при -30° светом $\lambda > 700$ мμ. А — освещение: 1 — исходный раствор, 2 — через 30 сек., 3 — 5 мин., 4 — 30 мин.; Б — возрастание максимума 775 мμ в темноте после освещения раствора в течение 5 мин.: 1 — сразу после освещения, 2 — через 3 мин. темноты, 3 — через 10 мин. (-30°); В — возрастание максимума 675 мμ в темноте после освещения раствора в течение 30 мин.: 1 — сразу после освещения, 2 — через 5 мин., 3 — через 10 мин. (-30°)

при температуре от 20 до -100° мы не смогли обнаружить промежуточных стадий окисления пигмента кислородом, однако при этом наблюдается накопление того же измененного продукта, что и в водном ацетоне. Хроматографическое разделение показало, что после 1,5 час. освещения феофитина в ацетоне при 20° весь исходный пигмент превращался в измененный феофитин и продукты деструктивного окисления.

Полученные данные недостаточны для суждения о природе химических изменений, происходящих в молекуле феофитина под действием света в присутствии кислорода, однако трудно сомневаться в том, что ранее обнаруженная фотохимическая дезагрегация длинноволновой формы феофитина сопряжена с фотоокислением пигмента кислородом. В связи с полученными данными требует исследования участие кислорода в механизме обнаруженной ранее фотодезагрегации хлорофилла в листьях растений (⁷), возможно тоже сопряженной с фотоокислением пигмента.

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

Поступило
25 VIII 1970

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Л. М. Воробьева, А. А. Красновский, ДАН, 189, 420 (1969). ² А. А. Красновский, Ф. Ф. Литвин, Молек. биол., 3, 282 (1969). ³ А. А. Красновский, М. Г. Шапошникова, Физиол. раст., 17, 436 (1970). ⁴ М. И. Бытская, А. А. Красновский, Молек. биол., 2, 847 (1968). ⁵ Л. М. Кособуцкая, А. А. Красновский, Биохимия, 18, 340 (1953). ⁶ Т. Т. Vannister, B. V. Love, J. Biophys., 3, 99 (1963). ⁷ Ф. Ланг, Л. М. Воробьева, А. А. Красновский, ДАН, 183, 711 (1968).