

В. Б. ЕВСТИГНЕЕВ, В. А. ГАВРИЛОВА

О ВОССТАНОВЛЕНИИ ХЛОРОФИЛЛА АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТОЙ В ДИОКСАНЕ

(Представлено академиком Г. М. Франком 27 XI 1970)

Обнаружено (¹), что обезгаженный раствор хлорофилла в водном диоксане, содержащем аскорбиновую кислоту, теряет при стоянии в темноте свою зеленую окраску; основные максимумы поглощения хлорофилла при этом уменьшаются, и несколько увеличивается поглощение в средней части видимого спектра. Этот факт объясняется авторами, как темновое восстановление пигмента аскорбиновой кислотой.

В нашей работе (²) было показано, что темновое взаимодействие хлорофилла с аскорбиновой кислотой происходит и в пиридине, если к последнему добавить 7—15% обычного реактивного диоксана (марки ч.д.а.). В этом случае наряду с падением максимумов поглощения возникал новый явно выраженный максимум в области 520—525 м μ . Подобное активирующее действие добавки диоксана представляет безусловный интерес в связи с изучением фотовосстановления хлорофилла, как реакции, могущей иметь значение при фотосенсибилизирующем действии этого пигмента (³). В нашей работе (²) возможность восстановления хлорофилла аскорбиновой кислотой без участия света рассматривалась как факт, говорящий в пользу отсутствия запасаания световой энергии при реакции фотовосстановления этого пигмента и его аналогов.

При дальнейшем изучении этого явления оказалось, что оно не наблюдается, если для опытов используется диоксан, подвергшийся тщательной очистке от перекисей. Мы предположили, что основную роль в интересующей нас реакции играет не сам диоксан, а перекиси, легко образующиеся в этом растворителе при стоянии в аэробных условиях.

Возможная роль перекисей в данном случае подтверждалась результатами, полученными в работах Гуревича по изучению «индуцированной» реакции восстановления красителей (^{4, 5}). Гуревич обнаружил, что под действием молекулярного кислорода и особенно перекиси водорода, в присутствии ионов меди или железа как катализаторов, значительно ускоряется реакция восстановления ортодинитробензола, метилового красного и ряда других красителей аскорбиновой кислотой, фенилгидразином или цистеином. Гуревич объяснил это явление тем, что в присутствии ионов меди или железа образующаяся или внесенная перекись водорода моновалентно окисляет, например, аскорбиновую кислоту до монодегидроаскорбиновой кислоты. Последняя представляет собой химически весьма активное соединение, типа свободного радикала, легко способное отдать второй водород даже не очень активному акцептору, в частности указанным выше красителям. Поэтому вторая ступень, т. е. окисление монодегидроаскорбиновой кислоты до дегидроаскорбиновой, может происходить с участием не только перекиси, но и метилового красного и других красителей.

Представлялось возможным, что и в случае темнового восстановления хлорофилла аскорбиновой кислотой в присутствии диоксана реакция происходит при промежуточном образовании монодегидроаскорбиновой кислоты под влиянием перекисей, присутствующих в диоксане. Настоящая ра-

бота посвящена экспериментальной проверке предположения о роли перекиси в этой реакции.

Продажный диоксан (ч.д.а.) очищали от перекисей с помощью обработки сернокислым железом (FeSO_4) и металлическим натрием и хранили в анаэробных условиях. Реакцию проводили в стеклянных вакуумных сосудах, позволяющих непосредственное измерение спектра поглощения исследуемого раствора. Для работы использовались диоксановые растворы

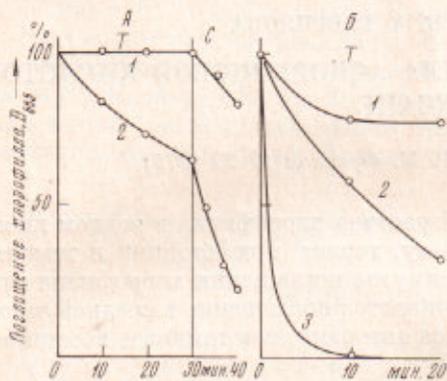


Рис. 1

Рис. 1. А — обесцвечивание хлорофилла ($a + b$) ($\sim 10^{-5}$ M) в очищенном (1) и неочищенном (2) диоксане в присутствии аскорбиновой кислоты (10^{-3} M). Т — темнота, С — освещение. Б — влияние содержания воды на скорость обесцвечивания хлорофилла ($a + b$) (10^{-5} M) в неочищенном от перекисей диоксане в присутствии аскорбиновой кислоты (10^{-3} M). Содержание воды: 6% (1), 10% (2), 20% (3)

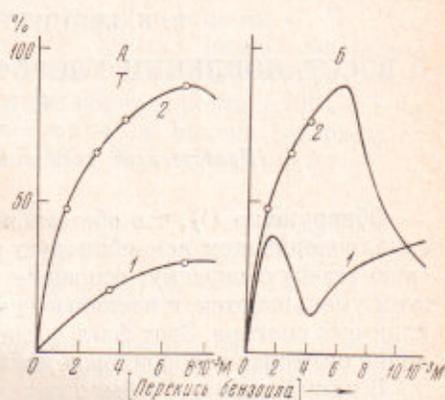


Рис. 2

Рис. 2. А — обесцвечивание хлорофилла ($a + b$) (10^{-5} M) в темноте в очищенном диоксане в зависимости от концентрации добавленной перекиси бензоила в присутствии аскорбиновой кислоты ($0,7 \cdot 10^{-2}$ M). 1 — без добавки CuSO_4 , через 30 мин. после эвакуации воздуха; 2 — с добавкой CuSO_4 , через 10 мин. после эвакуации воздуха. Б — то же для разных количеств аскорбиновой кислоты, через 5 мин. после эвакуации воздуха. Концентрация аскорбиновой кислоты: $1,4 \cdot 10^{-3}$ M (1), $7 \cdot 10^{-3}$ M (2); CuSO_4 , 10^{-4} M. По оси ординат — понижение максимума поглощения хлорофилла в процентах от исходного

смеси хлорофиллов а и б, выделенной из крапивы неоднократно описанным ранее способом. В опытах с освещением использовался конденсированный свет лампы накаливания 300 вт, пропущенный через красный светофильтр. Откачка растворов производилась на форвакуумном насосе.

Рис. 1А показывает разницу в поведении хлорофилла, растворенного в очищенном и неочищенном диоксане, содержащем аскорбиновую кислоту. В первом случае за тридцать минут стояния в темноте не произошло никакого обесцвечивания хлорофилла. В опыте с более длительным стоянием раствора (20 час.) было обнаружено понижение «красного» максимума пигмента всего на 2,2%. Освещение красным светом приводило к значительному ускорению реакции (рис. 1А). В случае неочищенного диоксана реакция начиналась сразу после выкачивания воздуха из раствора. Обесцвечивание и в этом случае ускорялось при освещении.

Скорость темнового обесцвечивания хлорофилла увеличивалась при увеличении содержания воды в диоксане от 6 до 20% (рис. 1Б). Это связано, по-видимому, с увеличением степени диссоциации аскорбиновой кислоты. В сухом диоксане последняя нерастворима.

Если к очищенному диоксану прибавить некоторое количество органической перекиси или перекиси водорода, то способность этого растворителя вызывать темновую реакцию пигмента с аскорбиновой кислотой восстанавливается. Обесцвечивание пигмента ускоряется при увеличении концентрации перекиси до некоторой величины, определяемой содержанием ас-

корбиновой кислоты (рис. 2А, 1). Еще большее ускорение реакции наблюдается при внесении в раствор наряду с перекисью небольшого количества CuSO_4 , в качестве катализатора взаимодействия перекиси с аскорбиновой кислотой (рис. 2А, 2). В отсутствие аскорбиновой кислоты или перекисей добавка медной соли не оказывает никакого действия на хлорофилл.

Подобная же картина получается и с пиридиновыми растворами. В пиридине, содержащем очищенный диоксан, никакого обесцвечивания хлорофилла в присутствии аскорбиновой кислоты не наблюдается. Добавка перекиси бензоила или перекиси водорода вызывала постепенное понижение максимумов поглощения пигмента. Присутствие CuSO_4 ускоряло реакцию. В случае перекиси водорода появлялся довольно хорошо выраженный максимум в области 525 м μ .

Следует отметить, что при добавке перекиси в диоксан наблюдается явное обесцвечивание хлорофилла в темноте и в отсутствие восстановителя. Подобное явление для спиртовых растворов было установлено уже давно⁽⁶⁾. По-видимому, это обесцвечивание и в диоксане носит окислительный характер и является результатом прямого взаимодействия перекиси с пигментом. Добавка аскорбиновой кислоты после реакции приводила к слабому повышению поглощения хлорофилла, что свидетельствует о некоторой обратимости реакции.

Вряд ли можно сомневаться в восстановительном характере изменения хлорофилла в присутствии аскорбиновой кислоты, тем более, что реакция ускоряется при освещении и идет быстрее в случае феофитина и хлорофилла b, более склонных к восстановлению, чем хлорофилл a. Однако определенное недоумение вызывает необратимость реакции при впуске кислорода или добавке окислителя типа хинона. Только в пиридиновом растворе, содержащем диоксан, наблюдалось в этом случае понижение максимума в области 525 м μ . Тем не менее основные максимумы пигмента при этом не возрастали. Возможно, что реакция восстановления пигмента в темноте монодегидроаскорбиновой кислотой, имеющей природу свободного радикала, приводит сразу к более глубокому, деструктивному восстановительному изменению пигмента.

Скорость восстановительного выцветания пигмента и, в особенности, характер изменения его поглощения в средней части спектра явно зависят от кислотности раствора. Если в неочищенном диоксане, содержащем аскорбиновую кислоту, наблюдается только некоторое повышение поглощения в области 500 — 600 м μ , то при подщелачивании раствора до pH 6 — 7 появляется явный максимум при 520 — 525 м μ . Здесь, по-видимому, сказывается та же зависимость спектра поглощения восстановленных форм хлорофилла от кислотности, что и в случае восстановления этого пигмента цинковыми опилками⁽⁷⁾.

Таким образом, важную роль перекисей в темновом выцветании хлорофилла в диоксане как в отсутствие, так и в присутствии восстановителя можно считать подтвержденной. В обоих случаях перекись проявляет свое окисляющее действие. Естественно, что в присутствии восстановителя с перекисью сначала реагирует последний, как более легко окисляемый компонент. Образующаяся полуокисленная более активная форма восстановителя вовлекает в реакцию и пигмент. Ясно, что эта форма может реагировать и с перекисью, но если количество последней исчерпается, то основным реагентом остается пигмент. Из этого следует, что при наличии перекиси в количестве, превышающем эквивалентное количество восстановителя, выцветание пигмента должно уменьшиться, так как полуокисленная форма восстановителя продолжает в основном реагировать с перекисью. Опыт подтверждает это предположение. Особенно резкое уменьшение после достижения определенной концентрации перекиси наблюдается в присутствии катализатора (CuSO_4) (рис. 2). При уменьшении концентрации восстановителя максимум скорости реакции сдвигается в сторону меньших концентраций перекиси (рис. 2Б). Скорость выцветания пигмен-

та опять увеличивается при еще большем увеличении концентрации перекиси, но тогда оно носит явно окислительный характер.

Что касается влияния природы восстановителя на выцветание пигмента, то было установлено, что вместо аскорбиновой кислоты могут быть с успехом использованы цистеин, тиомочевина и некоторые другие восстановители.

Следует думать, что исследованное в данной работе явление темнового восстановления хлорофилла в диоксане имеет прямое отношение к данным, полученным в работе Красновского и Луганской⁽⁸⁾ по ускорению сенсibilизированного хлорофиллом фотовосстановления метилвиологена и некоторых других красителей тиомочевинной в присутствии кислорода воздуха. Авторы дают объяснение наблюдаемым в их работе фактам, в котором основная роль отводится перекиси пигмента (мольоксиду), образующейся при освещении раствора в присутствии кислорода.

Институт фотосинтеза
Академии наук СССР
Пушино на Оке Моск. обл.

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

Поступило
25 XI 1970

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ А. А. Красновский, В. А. Гаврилова, ДАН, 81, 1105 (1951). ² В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова, Биофизика, 10, 770 (1965). ³ В. Б. Евстигнеев, ЖФХ, 32, 969 (1958). ⁴ А. А. Гуревич, ДАН, 82, 431 (1952); 91, 543 (1953); 145, 443 (1962). ⁵ А. А. Гуревич, Н. А. Голосова, ДАН, 126, 1125 (1959). ⁶ А. А. Красновский, ДАН, 58, 1087 (1947). ⁷ В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова, ДАН, 108, 507 (1956). ⁸ А. А. Красновский, А. Н. Луганская, ДАН, 183, 1441 (1968).