

Ученые записки Крымского федерального университета имени В. И. Вернадского  
Биология. Химия. Том 7 (73). 2021. № 4. С. 234–241.

**УДК 544.478-03**

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПРИРОДНЫХ МЕТАЛЛОПОРФИРИНОВ В ФОТОКАТАЛИЗЕ

*Вяткина О. В., Кандагура Е. А., Изнаунова М. Д.*

*Институт биохимических технологий, экологии и фармации (структурное подразделение)  
федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего  
образования «Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского», Симферополь,  
Россия  
E-mail: oksana\_vyatkina@list.ru*

В статье представлены результаты изучения каталитической активности веществ, имеющих в своём составе структуру порфирина, а именно: хорофиллсодержащих препаратов, выделенных из шпината, туи и зеленого чая;  $\text{Cu}^{2+}$ -замещенного хлорофилла шпината; препарата пероксидазы, выделенной из корнеплодов редьки черной, в водных растворах пероксида водорода под действием излучения видимой и ультрафиолетовой областей. Наличие порфириноподобных структур в препаратах, выделенных из растительного сырья было подтверждено методом ИК-спектроскопии и спектрофотометрии в УФ и видимой областях. Проведено сравнение каталитических свойств порфириносодержащих жидких спиртовых экстрактов и препаратов, выделенных из них в твердой форме методом вакуумной перегонки. В ходе исследований установлено, что замещение  $\text{Mg}^{2+}$  на  $\text{Cu}^{2+}$  в молекулах хлорофилла приводит к увеличению оксидоредуктазной активности как при воздействии видимого света, так и при воздействии УФ-излучения. Удельная активность медного комплекса хлорофилла, выделенного в твердом виде, больше удельной активности пероксидазы в 1,5 раза на видимом свете. Экспериментально подтверждена активация пероксидазы редьки черной УФ- излучением в исследуемых системах.

**Ключевые слова:** фотокатализ, металлопорфирины, хлорофилл, пероксидаза, оксидоредуктазная активность.

### ВВЕДЕНИЕ

Порфирины и металлопорфирины, широко распространены в природе и имеют большое биологическое значение. Молекулярные комплексы, содержащие порфириновую группировку, служат активными центрами белковых макромолекул – ферментов и переносчиков электронов в дыхательных цепях живых организмов и играют определяющую роль в фотосинтезе. Выполнение этими соединениями важнейших биохимических, ферментативных и фотохимических функций основано на особых свойствах тетрапиррольного макроцикла и его взаимодействии с другими функциональными элементами. Однако синтез порфиринов из-за своей сложности и многостадийности, до сих пор не поставлен на промышленный поток, поэтому

изучение особых свойств природных порфиринов служит основой не только для решения значимых проблем, но и многих практически важных вопросов, например создание сенсорных и каталитически активных материалов нового поколения. Поэтому нашей целью было изучение оптических и фотокаталитических свойств порфириноподобных структур, выделенных из природного сырья в нативном виде.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для изучения фотолюминесцентных и каталитических свойств из природного сырья выделяли препараты, содержащие хлорофилл и пероксидазу по методикам указанным в [1–3]. В качестве экстрагентов хлорофилла использовали этиловый и изопропиловый спирты. Пероксидазу (PR) из корнеплода черной редьки экстрагировали в фосфатный буфер с рН=7. Концентрации веществ в экстрактах определяли методом прямой фотоколориметрии на приборе ЭКСПЕРТ-003, принимая, что для хлорофилла  $\varepsilon_{655}=1 \cdot 10^4$  л/(моль см),  $\varepsilon_{400}=2 \cdot 10^5$  л/(моль см); для пероксидазы  $\varepsilon_{400}=9,6 \cdot 10^4$  л/(моль см).

Полученные образцы исследовали методом ИК-спектроскопии (ИК-спектрометр Perkin Elmer Spectrum Two, снабженный призмой НПВО (нарушенного полного внутреннего отражения). Запись спектров осуществляли в диапазоне 4000–400 см<sup>-1</sup>) и спектрофотометрии в УФ и видимой областях электромагнитного излучения. Использовались приборы (Спектрофотометр cintra 4040: спектральный диапазон (190–900 нм), Точность установки длины волны, нм (шаг 0,1 нм), ширина щели в диапазоне (0,1–2,0 нм)).

В молекулах хлорофилла, выделенного из шпината по методике [4] произвели замещение иона Mg<sup>2+</sup> на ион Cu<sup>2+</sup> (Chl(Mg<sup>2+</sup>) → Chl(Cu<sup>2+</sup>)), которое подтвердили методами спектроскопии в УФ и видимой области спектра. Из спиртовых экстрактов в образцах, полученных из листьев шпината, выделяли препарат в твердой форме методом вакуумной перегонки (Chl(Mg<sup>2+</sup>)(s), Chl(Cu<sup>2+</sup>)(s)).

Осаждение фермента из фосфатного буфера проводили в ацетоне, при температуре 4 °С в течении 24 часов. Состав осадителя: (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO–(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; где концентрация сульфата аммония C((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) = 0,2 моль/л. Соотношение объемов экстракта пероксидазы, раствора сульфата аммония и ацетона составляло V<sub>п</sub>:V<sub>с</sub>:V<sub>о</sub> = 1:1:1 (100 мл). Полученные осадки отделяли с помощью центрифуги на 7000 об в течении 15 мин. Затем, максимально удалив жидкость фермент высушивали в течение 12 часов при комнатной температуре, получая (PR)(s) [5].

У полученных препаратов изучали каталитическую и фотоактивность в водных растворах пероксида водорода методом волюмометрии. Состав каталитических систем указан в табл. 1.

Относительную активность катализаторов в исследуемых процессах в гомогенных системах рассчитывали по формуле:

$$A(\Gamma) = w/v, \text{ мл/(моль} \cdot \text{мин.)} \quad (1)$$

Где: w, (мл/мин) – скорость выделения кислорода  
v, (моль) – количество активных центров катализатора.

Относительную активность катализаторов в гетерогенных системах рассчитывали по формуле:

$$A(s) = w/v_s, \text{ мл}/(\text{моль}(s) \cdot \text{мин}) \quad (2)$$

Где:  $w$ , мл/мин – скорость выделения кислорода  
 $v_s$ , (моль) – количество активных центров в твердом катализаторе массой  $m$ .

**Таблица 1**  
**Состав систем, используемых для определения каталитической активности препаратов**

Системы	Состав	V(H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) (мл)	C(H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) (моль/л)	катализатор
A1	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , Chl(Cu <sup>2+</sup> )	10	0,98±2·10 <sup>-4</sup>	1 мл Chl(Cu <sup>2+</sup> )
A2	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , Chl(Mg <sup>2+</sup> )			0,7 мл Chl(Mg <sup>2+</sup> )
A3	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , Chl(Cu <sup>2+</sup> )(s)			0,005 г Chl(Cu <sup>2+</sup> )(s)
A4	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , (PR)(s)			0,005 г пероксидаза

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе эксперимента были получены спиртовые растворы хлорофилла из чая, туи и шпината. Для последнего был снят спектр поглощения в диапазоне от 300 нм до видимой области (рис. 1), в котором наблюдается часть широкой полосы поглощения на границе УФ и видимой областей ( $\lambda=370-420$  нм) – полоса Core ( $\epsilon_{400}=2 \cdot 10^5$ ). Вторая характеристическая полоса (точка А) соответствует максимуму поглощения порфирина при длине волны 660 нм – Q-полоса (I). Обе полосы обусловлены электронным  $\pi-\pi^*$  переходом [6].

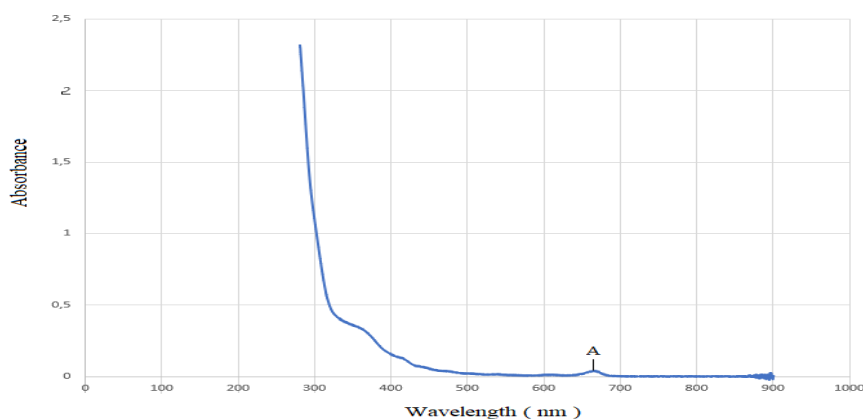


Рис. 1. Спектр поглощения Chl(Mg<sup>2+</sup>).

Также в соответствии с методикой описанной в [4] был получен хлорофилл, с замещением Mg<sup>2+</sup> на Cu<sup>2+</sup>. Спектр этого образца изображен на рис. 2. Точка А1- максимум поглощения при длине волны 645 нм. Спиртовой раствор Chl(Mg<sup>2+</sup>), должен иметь максимум поглощения при длине волны 662–652 нм, смещение

максимума поглощения в область 648–652 нм подтверждает замещение ( $\text{Chl}(\text{Mg}^{2+}) \rightarrow \text{Chl}(\text{Cu}^{2+})$ ).

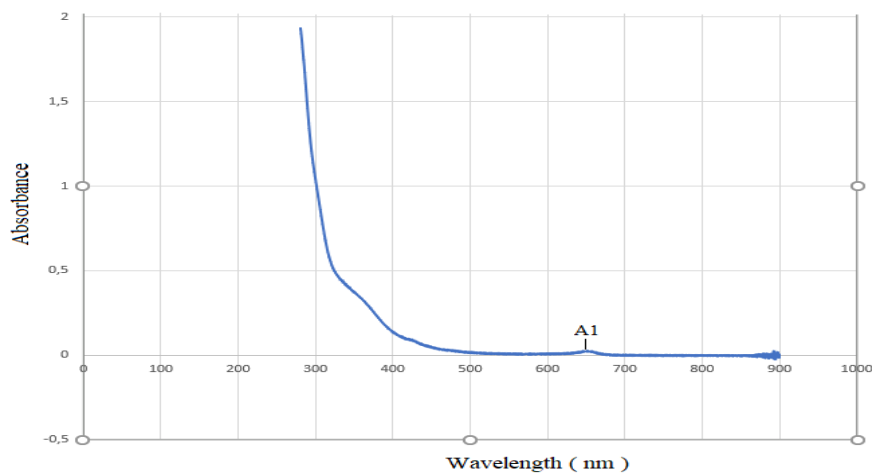


Рис. 2. Спектр поглощения  $\text{Chl}(\text{Cu}^{2+})$ .

Для образцов  $\text{Chl}(\text{Mg}^{2+})$ ,  $\text{Chl}(\text{Cu}^{2+})$ ,  $\text{Chl}(\text{Cu}^{2+})(\text{s})$ ,  $(\text{PR})(\text{s})$  были сняты ИК-спектры.

На спектре  $\text{Chl}(\text{Mg}^{2+})$  (рис.3) идентифицируется ряд полос поглощения. Полоса в области  $3350 \text{ см}^{-1}$ , соответствует колебаниям N–H группы,  $2950 \text{ см}^{-1}$  интерпретируется, как асимметрические колебания C–H связей порфирина. Группа  $\text{C}=\text{O}$  характеризуется полосой поглощения в области  $1750 \text{ см}^{-1}$ ,  $1400 \text{ см}^{-1}$  свойствен группе  $\text{C}=\text{N}$  [6]. В ИК-спектрах поглощения  $\text{Chl}(\text{Cu}^{2+})$ ,  $\text{Chl}(\text{Cu}^{2+})(\text{s})$ ,  $(\text{PR})(\text{s})$  в жидком и твердом виде других значимых полос не наблюдается, что подтверждает наличие порфиринового кольца во всех исследуемых препаратах, однако отмечено незначительное смещение исходных, которое вероятно связано с сменой центрального атома в активном центре молекулы.

Параллельно проводились количественные фотоколориметрические исследования спиртовых экстрактов содержащих порфирин, которые показали, что максимумы светопоглощения наблюдаются при длинах волн  $\lambda=400 \text{ нм}$  и  $\lambda=655 \text{ нм}$ . Используя характерные для этих длин волн молярные коэффициенты светопоглощения хлорофиллов рассчитали их эффективные концентрации, которые приведены в табл. 2.

Максимальное светопоглощение экстрактов, а следовательно и содержание экстрагированных веществ наблюдается при  $\lambda=655 \text{ нм}$ . Однако, учитывая, что именно при  $\lambda=400 \text{ нм}$  поглощают порфириноподобные активные центры исследуемых биомолекул в качестве критерия степени чистоты экстрактов использовали отношение  $C_2/C_1$  (табл. 1). Эксперимент показал, что меньше посторонних светопоглощающих примесей экстрагируется вместе с хлорофиллом из растительного сырья при использовании этилового спирта. Поэтому именно такие экстракты использовали для исследования оксидоредуктазной активности в

водных растворах пероксида водорода волнометрическим методом. Состав каталитических систем показан в (табл. 1). Использовали объемы жидких экстрактов, изоляционные по каталитическим центрам. Среднее количество активных центров в твердых образцах рассчитывали делением их массы на средние молекулярные массы хлорофилла и пероксидазы ( $M(PR)=40000$ ,  $M(Chl)=894$ ). Результаты представлены в табл. 3–4.



Рис. 3. ИК-спектр поглощения  $Chl(Mg^{2+})$ .

Таблица 2

Концентрации порфиринов содержащих веществ в спиртовых экстрактах

Сырьё	Растворитель	$C_1 \cdot 10^{-4}$ , моль/л При $\lambda=655$ нм	$C_2 \cdot 10^{-4}$ , моль/л При $\lambda=400$ нм	$C_2/C_1$
Шпинат	Изопропиловый спирт	1,90	0,120	0,06
	Этиловый спирт	$Chl(Cu^{2+})$	0,64	0,072
		$Chl(Mg^{2+})$	0,91	0,099
Чай	Изопропиловый спирт	1,70	0,120	0,07
Туя		0,85	0,099	0,12

В  $Chl(Cu^{2+})$  (система А1) наблюдается активация катализатора на видимом свете, в отличие от  $Chl(Mg^{2+})$  (система А2), поскольку медь является металлом переменной степени окисления и способна проявлять каталитическое действие в Red/Ox реакции разложения пероксида водорода [7]. Без доступа излучения видимой области (в темноте) ни одна из систем не является активной.

Активность  $Chl(Cu^{2+})(s)$  (А3), больше активности пероксидазы (PR)(s) в 1,5 раза на видимом свете. Данный факт логичен, так как благодаря особенностям

возбужденных состояний порфиринового фрагмента в хлорофилле, таких как энергетическая близость возбужденных состояний  $T1^*$  и  $S1^*$ , высокий квантовый выход интеркомбинационной конверсии  $S1^* \sim \rightarrow T1^*$  и длительное время жизни триплетного состояния  $T1^*$  ( $\tau = 0,01 - 0,1$  с), хлорофилл является одним из наиболее эффективных фотосенсибилизаторов, выполняя исключительную роль в процессе фотосинтеза [2, 8].

Таблица 3

Скорость разложения  $H_2O_2$  в гомогенных системах (A1, A2) в различных условиях

Система	Условия	w, (мл/мин)	A(г) ( $10^6$ ), мл/(моль·мин)
A1	видимый свет	0,13	25
	в темноте	–	–
	УФ	0,15	28
A2	видимый свет	–	–
	в темноте	–	–
	УФ	0,1	20

Таблица 4

Скорость разложения  $H_2O_2$  в системах A3 A4 с использованием препаратов, выделенных в твердом (s) виде, в различных условиях

Система	Условия	w, (мл/мин)	A(s), мл/(моль·мин)
A3	видимый свет	0,03	$186 \cdot 10^6$
	в темноте	–	–
	УФ	0,05	$19 \cdot 10^7$
A4	видимый свет	0,07	$112 \cdot 10^6$
	в темноте	–	–
	УФ	0,15	$2,4 \cdot 10^8$

При воздействии УФ излучения A(s) пероксидазы превышает активность  $Chl(Cu^{2+})(s)$  в 1,3 раза. Фотоактивность пероксидазы под действием УФ-излучения была доказана нами ранее [9]. В темноте обе системы не активны.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Замещение  $Mg^{2+}$  на  $Cu^{2+}$  в молекулах хлорофилла приводит к увеличению оксидоредуктазной активности катализатора под воздействием тзлучений видимого и УФ-диапазонов.
2. Медный комплекс хлорофилла в твердом состоянии более активный фотосенсибилизатор на видимом свету по сравнению с пероксидазой редьки черной, тогда как водействие УФ-излучения приводит к обратному эффекту.

### Список литературы

1. Аскарлов К. А. Способы выделения порфиринов из естественных источников и модификация с целью применения в медицине [Электронный ресурс] / К. А. Аскарлов – Респ. Узбекистан: 2019. – Режим доступа: <https://scientific-conference.com/images/PDF/2019/14/sposoby-vydeleniya.pdf>
2. Денисов Ю. А. Экстракция хлорофилла изопропанолом. Люминесценция экстракта хлорофилла в ультрафиолетовом свете [Электронный ресурс] / Ю. А. Денисов // Журнал Химиков-Энтузиастов. – 2017. – № 4. – Режим доступа: [http://chemistrychemists.com/N4\\_2017/ChemistryAndChem..](http://chemistrychemists.com/N4_2017/ChemistryAndChem..)
3. Селибер Г. Л. Большой практикум по микробиологии. / Селибер Г. Л. – М.: Мир, 1962. – 492 с.
4. Патент 2611409 Россия, МПК А61К36/00, А61К33/34. Способ получения медного комплекса хлорофилла / Л. И. Мухортова, Н. С. Никифорова, П. М. Лукин; Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова. – № 2016109418; заявл. 03.15.2016; опубл. 02.21.2017, Бюл. № 6. – 3 с.
5. Вяткина О. В. Проблемы выделения и очистки растительных пероксидаз. / О. В. Вяткина // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. – 2012. – Т. 25 (64), №3. – С. 271–276.
6. Тарасевич Б. Н. ИК спектры основных классов органических соединений (Справочные материалы) / Б. Н. Тарасевич. – М.: МГУ им. М. В. Ломоносова, 2012. – 55 с.
7. Першина Е. Д. Сравнительный анализ распада пероксида водорода в присутствии ионов меди(II) и железа(III) / Е. Д. Першина, И. В. Алексахин, О. В. Вяткина // Проблемы, достижения и перспективы развития медико-биологических наук и практического здравоохранения/ Труды Крымского государственного медицинского университета им С. И. Георгиевского. – 2003. – Т. 139.– С. 120–124.
8. Бабаян Н. С. Исследование *in vitro* зависимости структура/активность новых порфиринов как радиосенсибилизаторов / Н. С. Бабаян. // Ученые записки Ереванского государственного университета. – 2011. – 5 с.
9. Конарчук К. В. Влияние иммобилизации на фотоактивацию пероксидазы / К. В. Конарчук, С. Р. Измайлова, О. В. Вяткина // XXI Международная научно-практическая конференция «Химия и химическая технология в XXI веке» (Томск, 21–24 сентября 2020 г.): материалы конференции / Томск (Россия), 2020. – С. 262–263.

## USE OF NATURAL METALLOPORPHYRINS IN PHOTOCATALYSIS

*Vyatkina O. V., Kandagura E. A., Iznairova M. D.*

*Institute of Biochemical Technologies, Ecology and Pharmacy (structural subdivision) of the Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education "Vernadsky Crimean Federal University", Simferopol, Russia  
E-mail: oksana\_yatkina@list.ru*

The article presents the results of a study of the catalytic activity of substances which contain porphyrin structures, namely: chlorophyll-containing preparations isolated from spinach, thuja and green tea; Cu<sup>2+</sup>-substituted chlorophyll of green tea and spinach; peroxidase preparation isolated from black radish root crops in water solutions of hydrogen peroxide under the action of electromagnetic radiation of visible range and ultraviolet region. The presence of porphyrin-like structures in the preparations isolated from plant raw materials was confirmed by infrared spectroscopy and spectrophotometry in the UV and visible regions. It was found that chlorophyll extracted with ethyl alcohol

contains a smaller amount of impurities that do not contain a porphyrin center in comparison with extracts into isopropyl alcohol. The catalytic properties of porphyrin-containing liquid alcohol extracts and preparations isolated from them in solid form by vacuum distillation were compared. In the course of the studies it was found that the substitution of  $Mg^{2+}$  for  $Cu^{2+}$  in chlorophyll molecules leads to the increase in oxidoreductase activity both in visible light and when being exposed to UV radiation. The specific activity of Copper Chlorophyll complex isolated in solid form is 1.5 times higher than the specific activity of peroxidase in visible light. This fact is logical, since due to the peculiarities of the excited states of the porphyrin fragment, chlorophyll is one of the most effective photosensitizers. The activation of black radish peroxidase by UV radiation in all systems studied was experimentally confirmed.

**Keywords:** photocatalysis, metalloporphyrins, chlorophyll, peroxidase, enzymatic activity.

### References

1. Askarov K. A. *Methods of isolation of porphyrins from natural sources and modification with the purpose of application in medicine*, Available at: <https://scientific-conference.com/images/PDF/2019/14/sposoby-vydeleniya.pdf> (in Russ.)
2. Denisov Y. A. *Extraction of chlorophyll with isopropanol. Luminescence of chlorophyll extract in ultraviolet light*, Available at: [http://chemistrychemists.com/N4\\_2017/ChemistryAndChem](http://chemistrychemists.com/N4_2017/ChemistryAndChem).
3. Seliber G. L. *A large workshop on microbiology*, 492 (Mir, Moscow, 1962). (in Russ.)
4. Patent 2611409 Russia, IPC A61K36/00, A61K33/34. Method of obtaining chlorophyll copper complex / L. I. Mukhortova, N. S. Nikiforova, P. M. Lukin; *Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Professional Education Chuvash State University named after I. N. Ulyanov*. – No. 2016109418; application. 03.15.2016; publ. 02.21.2017 (in Russ.)
5. Vyatkina O. V. Problems of allocation and clearing plant peroxidase, *Scientific Notes of Taurida V. I. Vernadsky National University, Biology, Chemistry*, **67**(1), 271 (2012) (in Russ.)
6. Tarasevich B. N. *IR spectra of the main classes of organic compounds (Reference materials)*, 55 (Lomonosov State University, Moscow, 2012). (in Russ.)
7. Pershina E. D., Aleksashkin I. V., Vyatkina O. V. Comparative analysis of hydrogen peroxide decomposition in the presence of copper(II) and iron(III) ions. Problems, achievements and prospects of medical and biological sciences and practical healthcare, *Proceedings of the Crimean State Medical University named after S. I. Georgievsky*, **139**, 120 (2003). (in Russ.)
8. Babayan N. S. *In vitro study of structure/activity relationship of new porphyrins as radiosensitizers*, *Scientific Notes of Yerevan State University*, 5 (2011). (in Russ.)
9. Konarchuk K. V., Izmailova S. R., Vyatkina O. V., Effect of immobilization on photoactivation of peroxidase, *Proceedings of the XXI International Scientific and Practical Conference "Chemistry and Chemical Technology in the XXI Century"*, Tomsk, 262 (2020). (in Russ.)