



УДК 547.963.4.057:541.144.7:543.426

СИНТЕЗ И ФОТОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ДИАД ТИПА АМИНОКИСЛОТА–ПОРФИРИН

© 1995 г. Р. П. Евстигнеева, С. Е. Грибкова, В. Н. Лузгина, В. З. Пащенко*,
В. Б. Тусов*, Б. Н. Корватовский*

Московская государственная академия тонкой химической технологии им. М.В. Ломоносова;

*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

Поступила в редакцию 10.06.94 г.

Осуществлен синтез порфиринов, ковалентно связанных с аминокислотами Туг и Тгр. Показано образование состояний с разделенными зарядами в диадах типа аминокислота–порфирин при импульсном возбуждении в полосу поглощения порфирина. Методом кинетической флуоресцентной спектроскопии высокого временного разрешения определены константы скоростей и квантовые выходы образования состояний с разделенными зарядами и времена (константы скоростей) рекомбинации зарядов.

Ключевые слова: фотосинтез, порфирины, аминокислоты, перенос энергии, разделение зарядов.

Химическое моделирование отдельных стадий фотосинтеза позволило установить пути переноса энергии и электрона от фотовозбужденного пигмента на акцептор – хинон, а также участие донорных молекул каротиноидов, ароматических и алифатических аминов в состояниях с разделенными зарядами [1 - 5]. В настоящее время выяснение механизмов пигмент-белковых взаимодействий, реализуемых в различных фотосинтезирующих организмах, представляет собой одну из ключевых задач [6, 7]. Известны данные, позволяющие предполагать вовлечение аминокислотных фрагментов белков в качестве донорных компонентов в состояниях с разделенными зарядами [8], а также реализовать перенос энергии с хромофора на хромофор через пептидный мостик [9, 10]. Для подтверждения функции белка в процессе переноса электронов и энергии при фотосинтезе необходимо дальнейшее исследование модельных систем, и в первую очередь диад, включающих пигмент и аминокислоту. При этом можно надеяться на количественную оценку различных аминокислот как донорных компонентов при первичном разделении зарядов.

Порфириновые компоненты представлены 5-аминофенил-10,15,20-трифенилпорфирином (I) и 2-(2-карбоксивинил)-5,10,15,20-тетрафенилпорфирином (V), а аминокислоты – тирозином и триптофаном. Последние, поглощая в УФ-области спектра, наиболее предпочтительны для изучения процессов переноса электрона и энергии и, кроме того, могут послужить в качестве донор-

ных компонентов при создании в дальнейшем фотосинтетических систем, моделирующих первичные процессы фотосинтеза.

Ковалентное связывание порфиринов с аминокислотами достигнуто реакцией ацилирования. В результате хромофоры оказываются соединенными гибкой связью и перенос электрона может осуществляться как по связям, так и через пространство при реализации соответствующей конформации. Следует отметить, что ацилирование тирозина карбоксипорфирином проводили и ранее [11 - 13].

Синтезы соединений (I) - (III) были описаны в работе [14]. Амид (II) получали двумя способами: с использованием в качестве активирующих агентов изобутилхлорформиата и DCC; выходы составляли 26.6 и 75% соответственно. Удаление защитных группировок с тирозилпорфирина (II) достигалось действием трифторуксусной кислоты с 92% выходом соединения (III) (схема 1) [14]. Аналогичным путем исходя из 5-(*n*-аминофенил)-10,15,20-трифенилпорфирина (I) и Вос-защищенного триптофана получили соединение (IV) с выходом 71%.

Взаимодействие 2-(2-карбоксивинил)-5,10,15,20-тетрафенилпорфирина (V) и гидрохлорида метилового эфира тирозина с применением DCC привело к соединению (VI) (схема 2) с выходом 40%. При аналогичной конденсации порфирина (V) с метиловым эфиром триптофана образовалось соединение (VII) с выходом 38.7%.

Структура всех полученных соединений подтверждена данными УФ-, ИК-, ¹H-ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии. Для диады (III)

* Адрес для переписки: 117571, Москва, пр. Вернадского, 86, МИТХТ, Р.П. Евстигнеевой.

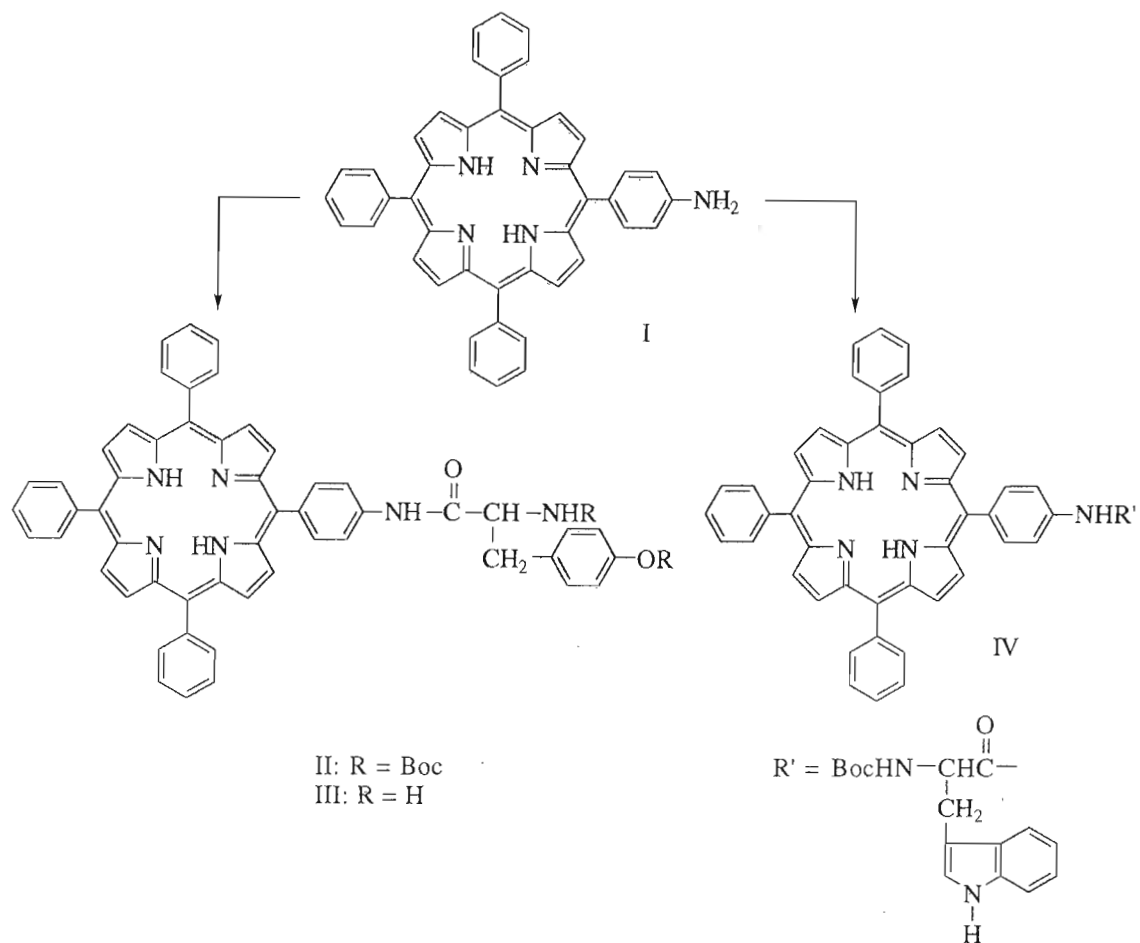


Схема 1.

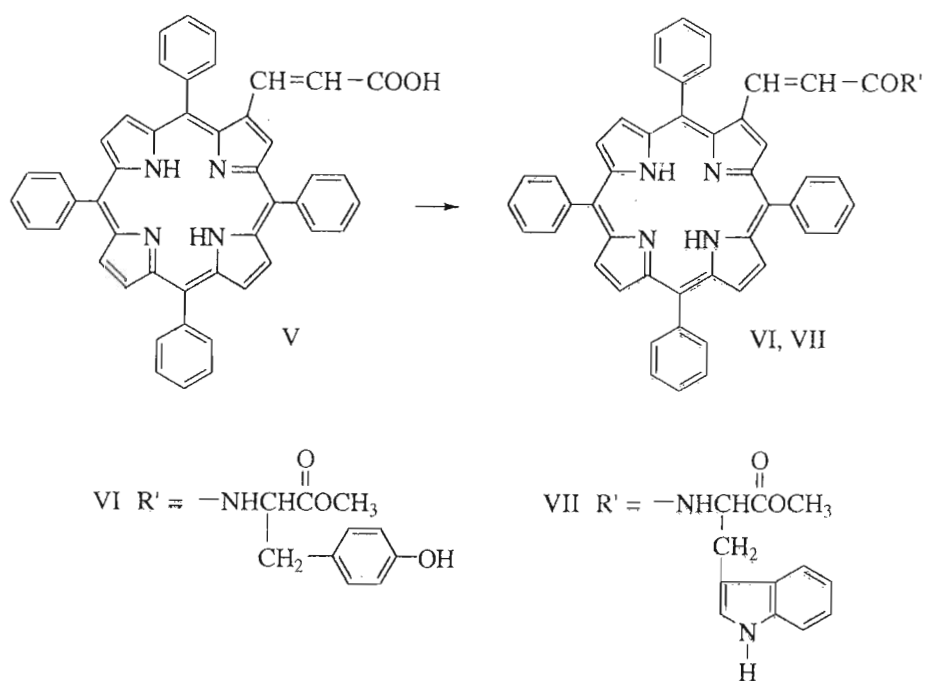


Схема 2.



Рис. 1. Схематическое изображение предпочтительной конформации соединения (III), полученное методом компьютерного моделирования.

была определена предпочтительная конформация методом компьютерного моделирования (программа "Chem 3D Plus I" 3.0) как "сложенная" (рис. 1, 2). Это коррелирует с данными о наличии "сложенной" конформации у порфиринов-хинонов, полученных на основании изучения спектров ПМР [15].

При исследовании фотохимических свойств полученных диад методом стационарной флуоресцентной спектроскопии отмечено усиление интенсивности флуоресценции на 37% для соединений (II) и (VI) по сравнению с исходными порфиринами (I), (V).

Снятие защитных *трет*-бутильных группировок с остатка тирозина приводило к увеличению флуоресценции соединения (III) на 79%. В случае соединений (IV) и (VII) выход флуоресценции увеличивался на 22 и 15% по сравнению с исходными порфиринами (I), (V), что свидетельствует о значительном влиянии аминокислот на процессы дезактивации синглетного состояния порфирина.

При изучении реакций образования состояний с разделенными зарядами измеряли кинетику затухания флуоресценции синтезированных соединений.

Установлено, что кинетики затухания флуоресценции порфиринов (I, рис. 3) и (V, рис. 4) моноэкспоненциальны, длительности флуоресценции (τ) составляют 4.4 и 6.3 нс соответственно. Кинетики затухания флуоресценции соединений (II, IV, рис. 3) и (VI, VII, рис. 4) двухкомпонентны, длительности ($\tau_{1,2}$) и амплитуды ($A_{1,2}$) компонент приведены в таблице. Для объяснения двухком-

Фотофизические данные*

Соединение	τ_1 , пс	τ_2 , нс	A_1	A_2	$k_1 \times 10^{-8}$, c^{-1}	$k_2 \times 10^{-7}$, c^{-1}	Φ_m	E , эВ
II	410	8.8	0.79	0.21	22	11.1	0.90	2.03
IV	270	8.5	0.86	0.14	35	11.7	0.94	2.03
VI	3000	10.8	0.7	0.3	1.7	9.2	0.42	2.01
VII	620	9.1	0.81	0.13	16	11	0.8	2.03

* τ_1 – время образования состояния с разделенными зарядами; τ_2 – время рекомбинации; $A_{1,2}$ – относительные амплитуды компонент кинетики затухания флуоресценции; k_1 – константа скорости образования состояния с разделенными зарядами; k_2 – константа скорости рекомбинации; Φ_m – квантовый выход.

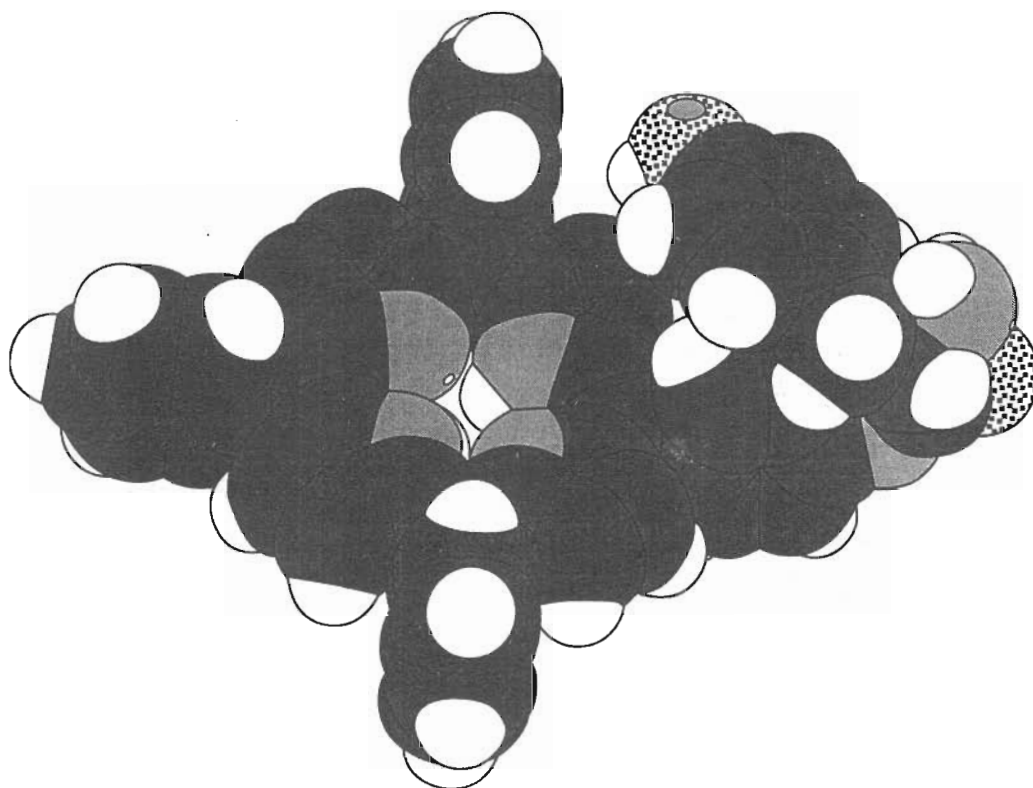
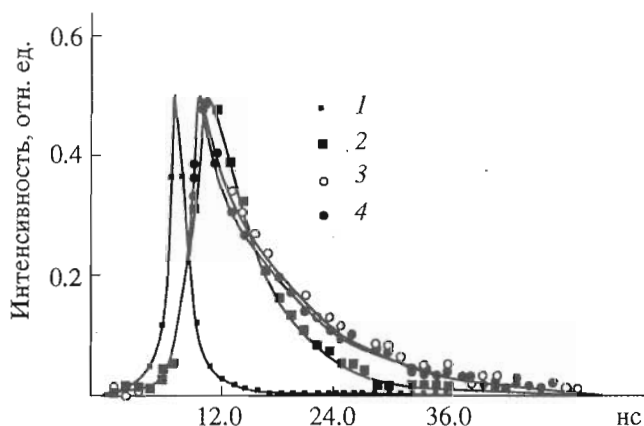
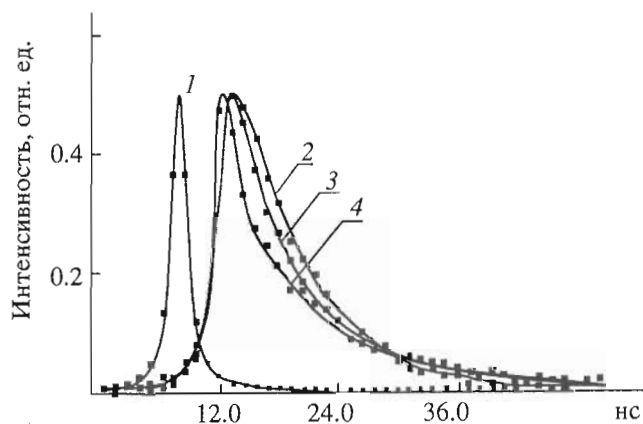


Рис. 2. Молекулярная структура соединения (III).

Рис. 3. Кинетика затухания флуоресценции соединений (I), (II), (IV) в метаноле, $c \cdot 10^{-5} \text{ M}$, $\lambda_{\text{возб}} 530 \text{ нм}$, $\lambda_{\text{рег}} > 580 \text{ нм}$: 1 – аппаратная характеристическая функция, 2 – (I), 3 – (IV), 4 – (II).Рис. 4. Кинетика затухания флуоресценции соединений (V), (VI), (VII) в метаноле, $c \cdot 10^{-5} \text{ M}$, $\lambda_{\text{возб}} 532 \text{ нм}$, $\lambda_{\text{рег}} > 580 \text{ нм}$: 1 – аппаратная характеристическая функция, 2 – (V), 3 – (VI), 4 – (VII).

понентного характера кинетики флуоресценции предполагается, что быстрая компонента соответствует времени образования состояния с разделенными зарядами, медленная – времени рекомбинации этих состояний. Сокращение времени жизни флуоресценции хромофора от единиц наносекунд (соединения I, V) до сотен пикосекунд (τ_1 для соединений II, IV, VI, VII) позволяет определить константы скоростей образования состоя-

ний с разделенными зарядами (k_1) и квантовые выходы этих реакций (φ_m) из соотношений

$$k_1 = 1/t_1 - \Sigma k_i,$$

$$\varphi_m = k_1 / (\Sigma k_i + k_1),$$

где Σk_i – сумма констант скоростей внутримолекулярной релаксации синглетного возбужденного состояния порфирина в отсутствие процессов

разделения зарядов. $\Sigma k_i = 1/\tau$ (τ – длительность флуоресценции порфиринов (I, V)).

Квантовые выходы колеблются в пределах 0.42 - 0.94. Таким образом, белок может играть существенную роль в природных фотосистемах при реализации состояний с разделенными зарядами.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Конденсации осуществляли в безводных растворителях. Индивидуальность полученных соединений и ход реакции контролировали ТСХ на пластинках Silufol UV-254 (Kavalier) в следующих системах: хлороформ–метанол, 10 : 0.5 (А), эфир (Б), хлороформ–метанол, 4 : 1 (В).

Очистку веществ проводили колоночной хроматографией на силикагеле L 100/160. Дополнительную очистку осуществляли препаративной ТСХ на пластинках с кизельгелем G 60 (Merck) (20 × 20 см).

Электронные спектры регистрировали на приборе Beckman DU-6, Hitachi UV-557, ИК-спектры – на спектрофотометре Shimadzu IR-435, спектры флуоресценции – на спектрофлуориметре Hitachi-850.

¹H-ЯМР-спектры получены на приборе Bruker WM-250. Масс-спектры регистрировали на спектрометре МСБХ методом времяпролетной масс-спектрометрии.

5-(*n*-Аминофенил)-10,15,20-трифенилпорфирин (I), 5-[*n*-N-(N^α-трет-бутилоксикарбонил-*O*-трет-бутилоксикарбонилтирозил)аминофенил]-10,15,20-трифенилпорфирин (II), 5-(*n*-N-тирозиламинофенил)-10,15,20-трифенилпорфирин (III) синтезировали по описанной методике [14].

Кинетики затухания флуоресценции регистрировали на лабораторном пикосекундном импульсном флуорометре, описанном ранее [16]. Для возбуждения флуоресценции использовали одиночные импульсы света с длиной волны 266 и 532 нм, длительность которых на полувысоте составляла 30 пс. Флуоресценцию регистрировали с помощью электронно-оптической камеры “Агат СФ-3М”, сопряженной с видеоконсом и компьютером IBM PC AT. Система регистрации позволяет одновременно регистрировать аппаратную характеристическую функцию флуорометра (АХФ) с кинетикой затухания флуоресценции, производить отбор импульсов возбуждения по энергии и длительности, накапливать экспериментальные данные до заданного отношения сигнал/шум, выполнять математический анализ данных.

Математическую обработку кинетик затухания флуоресценции осуществляли сверткой модельной кривой вида

$$\Phi(t) = I(0)(A_1 e^{-t/\tau_1} + A_2 e^{-t/\tau_2})$$

с аппаратной характеристической функцией.

В уравнении $\tau_{1,2}$ и $A_{1,2}$ – длительности и амплитуды компонентов кинетики затухания флуоресценции, $A_1 + A_2 = 1$ для $t > 0$.

5-[*n*-N-(N^α-трет-бутилоксикарбонил-*L*-триптофил)аминофенил]-10,15,20-трифенилпорфирин (IV). Раствор 0.04 г порфирина (I), 0.04 г Вос-*L*-Тгр и 0.08 г DCC в 10 мл хлористого метилена перемешивали при 20°C в течение 2 ч. Образовавшуюся дициклогексилмочевину отделяли, реакцию массу промывали 5% раствором бикарбоната натрия. Растворитель удаляли в вакууме. Остаток очищали препаративной ТСХ на пластинках с кизельгелем, элюируя хлороформом. Выход 0.047 г (71%). R_f 0.62 (А). Электронный спектр (хлороформ, $\lambda_{\text{макс}}$, нм ($\epsilon \times 10^{-3}$): 646.7 (3.92), 590.0 (4.18), 550.8 (6.68), 515.8 (13.76), 408.3 (58.93). ¹H-ЯМР-спектр (CDCl₃, δ , м. д.): 8.75 (8H, с, β -H), 8.25 - 7.80 (19H, м, аром. H), 7.41 (1H, д, СН имид. Тгр), 7.72 - 7.30 (4H, м, аром. Тгр), 5.40 (1H, д, CONH), 5.0 (1H, д, CONH Тгр), 4.10 - 4.18 (1H, м, СН-CH₂), 3.49 (2H, д, СН-CH₂), 1.24 (9H, с, CH₃ Вос). Масс-спектр, m/z : 917 [M]⁺, 918 [M + H]⁺.

2-2'-(*O*^α-метил-*L*-тирозино)карбонилвинил-5,10,15,20-тетрафенилпорфирин (VI). К суспензии 0.180 г гидрохлорида метилового эфира тирозина в 3 мл хлороформа добавляли 0.225 мл триэтиламина и перемешивали при 20°C 1 ч до полного растворения. Раствор упаривали в вакууме досуха. Остаток растворяли в 10 мл хлороформа, добавляли 0.040 г порфирина (V) и 0.025 г DCC и перемешивали 2 ч при 20°C. Образовавшуюся дициклогексилмочевину отделяли, реакцию массу промывали 5% раствором бикарбоната натрия (100 мл) и водой (2 × 100 мл), экстрагировали хлороформом (3 × 30 мл). Растворитель удаляли в вакууме. Остаток очищали на колонке (4 × 15 см) с силикагелем, элюируя системой растворителей эфир–гексан, 4 : 1. Выход 0.023 г (40%). R_f 0.59 (Б). Электронный спектр (хлороформ, $\lambda_{\text{макс}}$, нм ($\epsilon \times 10^{-3}$): 660.0 (3.17), 598.3 (5.52), 560.8 (6.78), 522.5 (16.84), 415.0 (76.25). ИК-спектр (в вазелиновом масле, ν , см⁻¹): 1735 (СО сл. эфира), 1635 (амид I), 1575 (амид II), 1515 (C=C-сопряжение). ¹H-ЯМР-спектр (CDCl₃, δ , м. д.): 8.87 (7H, с, β -H), 7.72 - 8.26 (20H, м, аром. порф.), 7.07 (2H, д, аром. Тур), 6.91 (1H, д, J 12.5 Гц, СН=СН), 6.80 (1H, д, J 12.5 Гц, СН=СН), 6.76 (1H, м, аром. Тур), 6.57 (1H, д, аром. Тур), 5.95 (1H, д, CONH), 4.10 - 4.20 (1H, м, СН-CH₂), 3.75 (3H, с, ОСН₃), 3.12 (2H, д, СН-CH₂). Масс-спектр, m/z : 862.1 [M]⁺.

2-2'-(*O*^α-метил-*L*-триптофано)карбонилвинил-5,10,15,20-тетрафенилпорфирин (VII). К суспензии 0.1 г гидрохлорида метилового эфира триптофана в 3 мл хлороформа добавляли 0.112 мл триэтиламина и перемешивали при 20°C 1 ч до полного растворения. Раствор упаривали в вакууме

досуха. Остаток растворяли в 10 мл хлороформа, добавляли 0.035 г порфирина (V) и 0.025 г ДСС и перемешивали 2 ч при 20°C. Образовавшуюся дициклогексилмочевину отделяли, реакционную массу промывали 5% раствором бикарбоната натрия (100 мл) и водой (2 × 100 мл), экстрагировали хлороформом (3 × 30 мл). Растворитель удаляли в вакууме. Остаток очищали на колонке (4 × 15 см) с силикагелем, элюируя системой эфир–гексан, 4 : 1. Выход 0.018 г (38.7%). R_f 0.67 (Б). Электронный спектр (хлористый метилен, $\lambda_{\text{макс}}$, нм ($\epsilon \cdot 10^{-3}$): 654.5 (1.91), 599.0 (3.82), 556.5 (5.09), 518.0 (10.84), 416.0 (68.29). ^1H -ЯМР-спектр (CDCl_3 , δ , м. д.): 8.85 (7H, с, β -H), 8.25 (9H, м, аром. порф.), 7.71 (11H, д, аром. порф.), 7.1 - 7.4 (4H, м, аром. Trp), 7.01 (1H, д, J 12.5 Гц, $\text{CH}=\text{CH}$), 6.60 (1H, д, J 12.5 Гц, $\text{CH}=\text{CH}$), 6.0 (1H, д, CONH), 4.05 - 4.20 (1H, м, $\text{CH}-\text{CH}_2$), 3.70 (3H, с, OCH_3), 3.4 (2H, д, $\text{CH}-\text{CH}_2$). Масс-спектр, m/z : 884.5 $[M]^+$.

Авторы благодарят Российский фонд фундаментальных исследований за поддержку данного исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gust D., Moore T.A. // *Science*. 1989. V. 244. P. 35 - 41.
2. Gust D., Moore T.A. // *Top. Cur. Chem.* 1991. V. 159. P. 103 - 151.
3. Wasielewski M.R. // *Chem. Rev.* 1992. V. 92. P. 435 - 461.
4. Боровков В.В., Евстигнеева Р.П., Стрекова Л.Н., Филиппович Е. И., Хайрутдинов Р.Ф. // *Успехи химии*. 1989. Т. 48. В. 6. С. 1032 - 1063.
5. Грибкова С.Е., Евстигнеева Р.П., Лузгина В.Н. // *Успехи химии*. 1993. Т. 62. № 10. С. 1020 - 1036.
6. Nixon P.J., Diner B.A. // *Biochemistry*. 1992. V. 31. P. 942 - 948.
7. Hallaham B.J., Nugent J.H.A., Warden J.T., Evans M.C.W. // *Biochemistry*. 1992. V. 31. P. 4562 - 4573.
8. Le Nouen D., Marko J., Vermeersch G., Febvay-Garot N., Lablache Combiner A., Persce-Fauvet M., Gaudermer A. // *J. Phys. Org. Chem.* 1990. V. 3. № 2. P. 69 - 76.
9. Tamiaki H., Nomura K., Maryama K. // *Bull. Chem. Soc. Jap.* 1993. V. 66. P. 3062 - 3068.
10. Mecklenburg S.L., Peek B.M., Schoonover J.R., McCafferty D.G., Wall C.G., Erickson B.W., Meyer Th.J. // *J. Amer. Chem. Soc.* 1993. V. 115. P. 5479 - 5495.
11. Boxer S.G., Bucks R.R. // *Isr. J. Chem.* 1981. V. 21. № 4. P. 259 - 264.
12. Maruyama K., Yamada H., Osuka A. // *Photochem. Photobiol.* 1991. V. 53. № 5. P. 617 - 626.
13. Osuka F., Maruyama K. // *J. Chem. Res. (S)*. 1987. P. 286 - 288.
14. Грибкова С.Е., Лузгина В.Н., Евстигнеева Р.П. // *Журн. орг. химии*. 1993. Т. 29. № 4. С. 758 - 763.
15. Боровков В.В., Евстигнеева Р.П., Китайгородский А.Н., Чамаева О.А., Чупин В.В. // *ДАН СССР*. 1990. Т. 312. № 2. С. 382 - 386.
16. Пащенко В.З. // *Новые физические методы в биологических исследованиях* / Ред. Г.Н. Берестовский. М.: Наука, 1987. С. 45 - 65.

Synthesis and Photochemical Properties of Amino Acid–Porphyrin Dyads

R. P. Evstigneeva, S. E. Gribkova, V. N. Luzgina, V. Z. Pashchenko*,
V. B. Tusov*, and B. N. Korvatovskii*

Moscow State Academy of Fine Chemical Technology, Moscow;

**Lomonosov Moscow State University, Moscow*

Abstract – Synthesis of porphyrins covalently linked with amino acids such as Tyr and Trp have been carried out. Formation of the charge separated states in the amino acid dyads by impulse excitation of porphyrin is shown. The rate constants and quantum yields of the charge separated states formation and charge recombination to the ground state by the time-resolved fluorescence spectroscopy were determined.

Key words: photosynthesis, porphyrins, amino acids, energy transfer, charge separation.