



УДК 547.977.733 : 535.372 + 535.343

## ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ПРОТОПОРФИРИНА IX И ЕГО ДИМЕТИЛОВОГО ЭФИРА, СОЛЮБИЛИЗИРОВАННЫХ НА МИЦЕЛЛАХ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ.

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ И СПЕКТРОФЛУОРИМЕТРИЧЕСКОЕ ТИТРОВАНИЕ\*

Савицкий А. П., Угарова Н. Н., Березин И. В.

*Кафедра химической энзимологии Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова*

Получены спектры поглощения и флуоресценции, а также сняты кривые спектрофлуориметрического и спектрофотометрического титрования протопорфирина IX  $H_2Por(COOH)_2$  и его диметилового эфира  $H_2Por(COOSCH_3)_2$ , солюбилизованных на мицеллах поверхностно-активных веществ (ПАВ): тритона X-100 и цетилтриметиламмонийбромид. Показано, что в присутствии ПАВ эти порфирины солюбилизируются на мицеллах ПАВ в форме мономеров. В водном растворе  $H_2Por(COOH)_2$  агрегирован, а  $H_2Por(COOSCH_3)_2$  практически нерастворим.

Определены  $pK$  пропионовокислых остатков в  $H_2Por(COOH)_2$ , солюбилизованном на мицеллах ПАВ. Обнаружено сильное уменьшение критической концентрации мицеллообразования для ПАВ в присутствии протопорфиринов. Сделан вывод, что молекулы протопорфиринов структурируют вокруг себя молекулы ПАВ, причем порфириновый макроцикл локализуется в гидрофобном ядре мицеллы, а полярные группы пропионовокислых остатков располагаются в слое Штерна. Исходя из данных о смещении  $pK_3$  протопорфиринов, солюбилизованных на мицеллах ПАВ, для диэлектрической проницаемости ( $\epsilon$ ) в гидрофобном ядре мицеллы получена величина, равная  $\sim 10$ .

Молекулы порфиринов ( $H_2Por$ ) являются составной частью простетической группы обширного класса гемсодержащих ферментов и белков и играют важную роль в формировании и поддержании третичной структуры этих белков [2—4]. Не исключено и прямое участие порфиринового макроцикла в реакциях электронного транспорта [5]. Физико-химические свойства порфиринов заметно изменяются при варьировании свойств окружающей их микросреды. Поэтому функционирование комплексов порфиринов с металлами, включенных в состав гембелков, в значительной степени определяется физико-химическими свойствами микросреды и локализацией (т. е. доступностью) простетической группы в ферменте. В связи со сказанным несомненный интерес приобретают исследования влияния микросреды на физико-химические свойства порфиринов.

Достаточно подробно изучены свойства порфиринов и металлопорфиринов в органических растворителях [6, 7] и сравнительно мало — в водных растворах в присутствии поверхностно-активных веществ (ПАВ) и белков

\* Краткое изложение некоторых результатов этой работы дано в [1]. Использованные сокращения: ПАВ — поверхностно-активные вещества, ЦТАБ — бромистый цетилтриметиламмоний, ККМ — критическая концентрация мицеллообразования;  $H_2Por$  — порфирин.

Спектральные и протолитические свойства  $H_2Por(COOH)_2$  и  $H_2Por(COONH_3)_2$ , солюбилизованных на мицеллах ТХ-100 и ЦТАБ

Порфирин	Солюбилизирующая добавка	Первый максимум флуоресценции, нм	Время жизни $H_2Por$ в возбужденном состоянии, нс	$pK_3$	Число при-соедине-мых прото-нов	$pK_{COOH}$	Число при-соединен-ных прото-нов
$H_2Por(COOH)_2$	Без добавки	617	16,2	6,5	1,2	*	*
	0,6% ТХ-100	634	16,4	0,8	2	6,5	1
	1 мМ ЦТАБ	635	16,3	0,7	2,5	4,6	1
$H_2Por(COONH_3)_2$	0,6% ТХ-100	634	16,2	0,8	3	—	—
	1 мМ ЦТАБ	635	16,3	0,7	3,5	—	—
	0,05 мМ ЦТАБ	635	Не измерялись			—	—
	0,005 мМ ЦТАБ	635	»			—	—

\* Данные не подлежат математической обработке.

[7]. Однако для выяснения механизма и условий функционирования металлопорфиринов в белковых системах важно иметь подробные сведения о свойствах порфиринов в водных растворах в присутствии ПАВ. Именно мицеллярные растворы являются зачастую удобными моделями ферментов [8].

Целью настоящей работы явилось изучение физико-химических свойств одного из наиболее распространенных в биологических системах порфиринов — протопорфирина IX  $H_2Por(COOH)_2$  и его диметилового эфира  $H_2Por(COONH_3)_2$ , солюбилизованных на мицеллах ПАВ: нейтральных мицеллах тритона X-100 (ТХ-100) и положительно заряженных мицеллах цетилтриметиламмонийбромида (ЦТАБ).

В водных растворах молекулы  $H_2Por(COOH)_2$  заметно агрегированы, поэтому полосы поглощения этого вещества сильно уширены (рис. 1, I). При солюбилизации на мицеллах ТХ-100 и ЦТАБ в спектре  $H_2Por(COONH_3)_2$  проявляются хорошо разрешенные полосы с максимумами при 407, 504, 539, 576 и 632 нм для ЦТАБ и 408, 504, 539, 576, 630 нм для ТХ-100, что характерно для мономерной формы протопорфирина, находящегося в неполярном окружении, как это было показано для растворов порфиринов в неводных растворителях [7]. К этому же выводу приводит и анализ спектров флуоресценции (таблица). Положение максимума флуоресценции смещается от 617 нм в водном растворе к 634—635 нм для  $H_2Por(COOH)_2$ , солюбилизованного на мицеллах ПАВ. Следует отметить, что при этом квантовый выход флуоресценции и время жизни возбужденного состояния не изменяются (таблица).

В присутствии протопорфирина у ПАВ наблюдается сильное понижение критической концентрации мицеллообразования (ККМ). Для ТХ-100 величина ККМ уменьшается от 0,54% [9] до 0,01% (рис. 2). Для ЦТАБ отмечается уменьшение ККМ в 200 раз в присутствии  $H_2Por(COONH_3)_2$  (таблица). При этом уже в присутствии 5 мкМ ЦТАБ флуоресцентные свойства  $H_2Por(COONH_3)_2$  свидетельствуют, что молекула порфирина находится в неполярном окружении. Следовательно, молекулы порфирина являются центрами мицеллообразования и структурируют вокруг себя гидрофобные хвосты молекул ПАВ. Поскольку размеры молекул порфиринов сравнимы с размерами мицелл [7, 8], то не исключено, что мицеллы, на которых солюбилизованы молекулы порфиринов, будут иметь форму, несколько отличную от сферической. Структурирующая роль порфиринового макроцикла, по-видимому, особенно ярко проявляется при образовании гембелковых комплексов. Тогда становятся понятными сильные конформационные изменения, которые наблюдаются при переходе от апобелков к нативным гембелковым комплексам [2—4, 10—12].

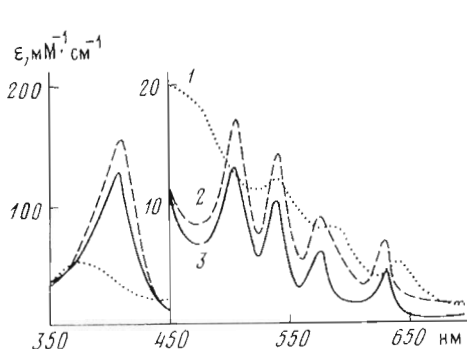


Рис. 1

Рис. 1. Спектры поглощения 10 мкМ раствора протопорфирина IX (1) и его диметилового эфира (2, 3). Условия: pH 8,0; 5 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 20°. Солюбилизирующие добавки: 1 — нет; 2 — 0,6% раствор TX-100; 3 — 1 мМ раствор ЦТАБ

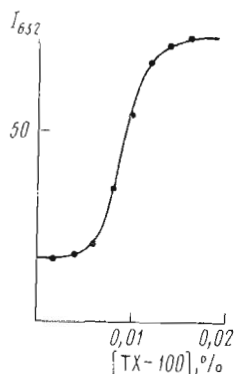
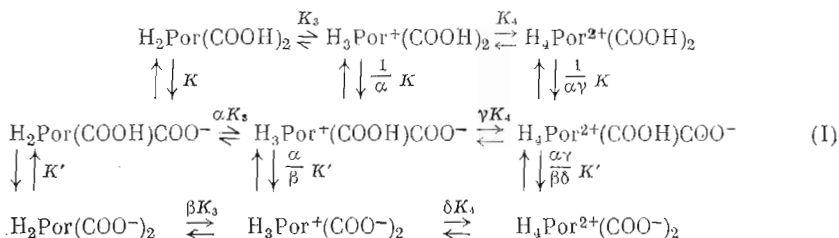


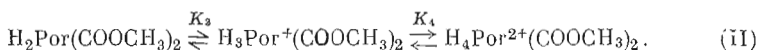
Рис. 2

Рис. 2. Зависимость интенсивности флуоресценции 0,01 мкМ раствора протопорфирина IX при 632 нм от концентрации TX-100. Возбуждение при 400 нм. Условия: 5 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 8,0; 20°

Молекула протопорфирина содержит два пиррольных азота, способных присоединять протоны, и два пропионовокислых остатка, карбоксильные группы которых способны к диссоциации. Протолитические равновесия в молекуле H<sub>2</sub>Por(COOH)<sub>2</sub> можно представить следующей схемой:



Для диметилового эфира протопорфирина схема упрощается:



Протонированные по пиррольному азоту монокатион H<sub>3</sub>Por<sup>+</sup> и дикатион H<sub>4</sub>Por<sup>2+</sup> протопорфиринов имеют характерные спектры поглощения [6, 13, 14]. Нейтральные молекулы H<sub>2</sub>Por имеют интенсивный спектр флуоресценции с максимумом при 617—635 нм в зависимости от природы растворителя (таблица). Флуоресценция монокатиона H<sub>3</sub>Por<sup>+</sup> весьма слабая [13], а дикатион H<sub>4</sub>Por<sup>2+</sup> имеет интенсивную флуоресценцию [14], однако параметры флуоресценции H<sub>4</sub>Por<sup>2+</sup> сильно отличаются от параметров флуоресценции H<sub>2</sub>Por. Спектр флуоресценции H<sub>2</sub>Por имеет максимум при 635 нм (таблица), а для H<sub>4</sub>Por<sup>2+</sup> характерен спектр флуоресценции с максимумами при 610 и 660 нм [4, 14]. Существование заметных различий в спектрах поглощения и флуоресценции молекул порфиринов, различающихся по протонированию пиррольных азотов, дает возможность осуществлять спектрофотометрическое и спектрофлуориметрическое титрование порфиринов и изучать влияние среды на константы протонирования пиррольных азотов порфирина. Как было показано ранее, pK пиррольных азотов в основном и возбужденном состояниях различаются незначительно, и в органических растворителях отмечалось симбатное изменение спектров поглощения и флуоресценции при изменении состава раствора [6]. Следует отметить, что сильная агрегация H<sub>2</sub>Por(COOH)<sub>2</sub> в водных растворах затрудняет проведе-

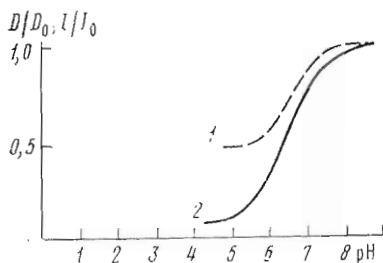


Рис. 3. Зависимость поглощения 0,05 мкМ раствора протопорфирина IX при 400 нм (1) и интенсивности флуоресценции при 617 нм (2) от рН. Возбуждение при 400 нм. Условия: 5мМ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , рН 8,0; 20°

раствора  $\text{H}_2\text{Por}(\text{COOH})_2$  при изменении рН раствора. Оказалось, что для водного раствора  $\text{H}_2\text{Por}(\text{COOH})_2$  наблюдается симбатное изменение оптической плотности при 400 нм и интенсивности флуоресценции при 617 нм при изменении рН (рис. 3). Полученные кривые имеют точку перегиба при рН 6,5.

При изучении кинетики комплексообразования порфиринов с ионами металлов было высказано предположение о том, что важную роль в механизме комплексообразования играет деформация порфиринового макроцикла [15]. Возможно, что для присоединения протона деформация порфиринового макроцикла имеет не менее важное значение, и за время жизни молекулы порфирина в возбужденном состоянии (16 нс) порфириновый макроцикл не успевает деформироваться, чем и объясняется отсутствие сдвигов рК протонирования протопорфирина в возбужденном состоянии.

Таким образом, в водных растворах протонирование пиррольных азотов в  $\text{H}_2\text{Por}(\text{COOH})_2$  характеризуется рК, близким к 6,5. Точное определение рК оказывается невозможным, поскольку, во-первых, величины рК<sub>3</sub> и рК<sub>4</sub> (схема I) близки, во-вторых, ионизация пропионовокислых остатков также влияет на величины рК<sub>3</sub> и рК<sub>4</sub>. По литературным [7] и по нашим экспериментальным данным (приведены ниже), пропионовокислые остатки протопорфирина в водном растворе диссоциируют в той же области рН, где наблюдается протонирование пиррольных азотов. Взаимное наложение нескольких рК в узком интервале делает невозможным их раздельное определение. Поэтому, когда это было возможно, мы использовали диметилловый эфир порфирина, для которого протолитические равновесия описываются гораздо более простой схемой (II). Кривая зависимости флуоресценции  $\text{H}_2\text{Por}(\text{COOCH}_3)_2$ , солюбилизированного на мицеллах ТХ-100, от рН обнаруживает спад интенсивности флуоресценции при 635 нм с точкой перегиба при рН ~ 0,9 (рис. 4а, I), а в случае положительно заряженных мицелл ЦТАБ точка перегиба расположена при рН ~ 0,7 (рис. 4б, I). В диапазоне рН 2—8 для ТХ-100 и 1—8 для ЦТАБ интенсивность флуоресценции порфирина и форма спектров флуоресценции и поглощения не изменяются, что указывает на неизменность хромофора. Даже в 0,1 М HCl в присутствии мицеллы ЦТАБ  $\text{H}_2\text{Por}(\text{COOCH}_3)_2$  находится в непротонированном состоянии, и сдвиг рК протонизации  $\text{H}_2\text{Por}(\text{COOCH}_3)_2$  при солюбилизации его на мицеллах ПАВ может достигать 6 ед.

Данные ЯМР по солюбилизации протогемина IX на мицеллах додецилсульфата натрия и ЦТАБ показывают, то гемин сорбирован не на поверхности мицеллы (в слое Штерна), а в гидрофобном ядре [16]. Это позволяет предположить, что молекула  $\text{H}_2\text{Por}(\text{COOCH}_3)_2$  солюбилизирована также не в слое Штерна, а в гидрофобном ядре мицеллы. Для проверки

ние спектрофотометрического титрования, в мономерной же форме  $\text{H}_2\text{Por}(\text{COOH})_2$  в водных растворах существует лишь при концентрациях ниже 0,1 мкМ, где спектрофотометрия не дает достоверных результатов. Поэтому вполне понятно, что в нашей работе мы в основном использовали метод спектрофлуориметрического титрования, который дает возможность работать с очень низкими концентрациями протопорфирина.

Кривые спектрофотометрического титрования  $\text{H}_2\text{Por}(\text{COOH})_2$  были получены нами с использованием техники двухволновой спектрофотометрии (см. «Экспериментальную часть»), которая дает возможность наблюдать изменения оптической плотности при 400 нм для 0,05 мкМ

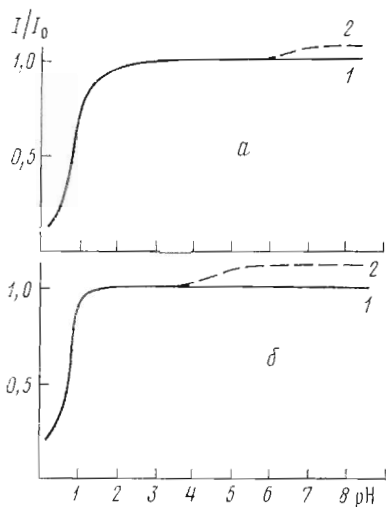


Рис. 4

Рис. 4. Зависимость интенсивности флуоресценции протопорфирина IX (1) и его диметилового эфира (2) от pH в присутствии 0,6% TX-100 (а) и 1 мМ ЦТАБ (б). Возбуждение при 400 нм, флуоресценция при 635 нм. Условия: 5 мМ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 20°

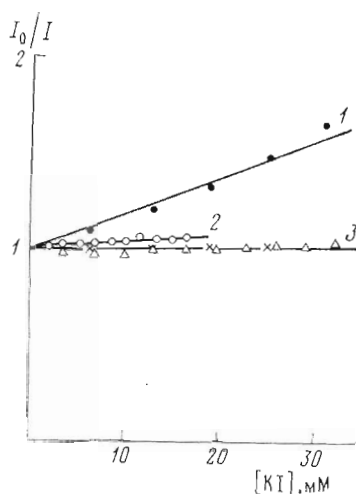


Рис. 5

Рис. 5. Зависимость тушения флуоресценции протопорфирина IX (1, 2) и его диметилового эфира (3) ионами  $\text{I}^-$  при pH 8,0; 20°. Тушитель — KI. Солюбилизирующие добавки: 1 — нет; 2, 3 — 0,6% TX-100

этого предположения мы изучили тушение флуоресценции  $\text{H}_2\text{Por}$  в присутствии нейтральных мицелл TX-100. При солюбилизации  $\text{H}_2\text{Por}(\text{COOH})_2$  и  $\text{H}_2\text{Por}(\text{COOCH}_3)_2$  на мицеллах время жизни в возбужденном состоянии не меняется, а константа тушения (в уравнении Штерна — Фольмера) уменьшается приблизительно на порядок (рис. 5). Это свидетельствует о значительном уменьшении доступности порфиринового цикла для тушителя при переходе от водного к мицеллярному окружению. Красное смещение первого максимума флуоресценции также указывает на понижение полярности окружения молекулы порфирина [6]. Полученные данные подтверждают, что молекула  $\text{H}_2\text{Por}$  погружена внутрь неполярного ядра мицеллы. Мы предположили, что сильный сдвиг  $rK_3$  связан с низким значением диэлектрической постоянной в гидрофобном ядре мицеллы. Однако как по сдвигу положения максимума спектра поглощения, так и по сдвигу положения максимума спектра флуоресценции не представляется возможным определить диэлектрическую постоянную в гидрофобном ядре, так как функция универсальных взаимодействий, которая описывает сдвиги положения максимумов поглощения и флуоресценции при изменении свойств среды, зависит не только от диэлектрической постоянной, но и от показателя преломления, или поляризуемости среды [17, 18]. Мы использовали другой способ оценки диэлектрической постоянной, который состоит в следующем. При измерении константы протонирования  $\text{H}_2\text{Por}$ , находящегося в мицеллярной фазе, определяем лишь кажущуюся константу ( $K_{\text{каж}}$ ):

$$K_{\text{каж}} = \frac{a_{\text{H}^+}[\text{H}_2\text{Por}]_{\text{м}}}{[\text{H}_3\text{Por}^+]_{\text{м}}}, \quad (1)$$

где  $[\text{H}_2\text{Por}]_{\text{м}}$  и  $[\text{H}_3\text{Por}^+]_{\text{м}}$  — экспериментально определяемые концентрации  $\text{H}_2\text{Por}$  и  $\text{H}_3\text{Por}^+$  в мицеллах, а  $a_{\text{H}^+}$  — измеряемая на опыте активность ионов водорода в водной фазе. Легко показать, что константа протонирования  $\text{H}_2\text{Por}$  в воде ( $K_{\text{в}}$ ) и кажущаяся константа протонирования  $\text{H}_2\text{Por}$

в присутствии мицелл связаны между собой уравнением

$$pK_e - pK_{\text{каж}} = \lg \frac{\gamma_{\text{H}_2\text{Por}}}{\gamma_{\text{H}_3\text{Por}^+}}, \quad (2)$$

где  $\gamma_{\text{H}_2\text{Por}}$  и  $\gamma_{\text{H}_3\text{Por}^+}$  — коэффициенты активности для  $\text{H}_2\text{Por}$  и  $\text{H}_3\text{Por}^+$  соответственно. Если предположить, что гидрофобные взаимодействия молекул  $\text{H}_2\text{Por}$  и  $\text{H}_3\text{Por}^+$  со средой приблизительно одинаковы, то отношение  $\gamma_{\text{H}_2\text{Por}}/\gamma_{\text{H}_3\text{Por}^+}$  можно оценить, исходя из уравнения Борна для свободной энергии сольватации иона:

$$\Delta G = \frac{NZ^2e^2}{2r} \left( \frac{1}{\epsilon_1} - \frac{1}{\epsilon_2} \right), \quad (3)$$

где  $\epsilon_1$  и  $\epsilon_2$  — диэлектрические постоянные для воды и ядра мицеллы соответственно,  $r$  — радиус катиона,  $Z$  — заряд катиона,  $e$  — заряд электрона,  $N$  — число Авогадро. Из определения коэффициентов активности следует

$$\frac{\gamma_{\text{H}_2\text{Por}}}{\gamma_{\text{H}_3\text{Por}^+}} = e^{-\frac{\Delta G}{RT}}. \quad (4)$$

Подставляя (3) и (4) в (2), получаем

$$pK_e - pK_{\text{каж}} = \frac{NZ^2e^2}{2r} \left( \frac{1}{\epsilon_1} - \frac{1}{\epsilon_2} \right). \quad (5)$$

При фиксированных  $\epsilon_1$  и  $\epsilon_2$  сдвиг  $pK$  будет максимален при минимальном значении  $r$ . Поэтому для оценки верхнего предела диэлектрической проницаемости мы приняли минимальное возможное значение радиуса катиона, предположив, что заряд полностью локализован на одном из атомов азота и радиус катиона равен радиусу иона аммония. В этом случае сдвиг  $pK$  в 6 единиц должен наблюдаться, если величина диэлектрической проницаемости в мицелле близка к 10. Это значение диэлектрической постоянной для гидрофобного ядра мицеллы интересно сопоставить со значением диэлектрической проницаемости в слое Штерна, которое равно 36 [19]. Расчет по уравнению (5) показывает, что если диэлектрическая проницаемость во всем объеме мицеллы такая же, как в слое Штерна, то в этом случае должны наблюдаться сдвиги  $pK$  в 1,5 ед., как это имеет место для соединений, сольubilизированных в слое Штерна [8]. Следовательно, полученные нами данные показывают, что диэлектрическая проницаемость в гидрофобном ядре мицеллы гораздо ниже, чем в слое Штерна. Одновременное присоединение двух протонов к пиррольным азотам  $\text{H}_2\text{Por}$ , несмотря на квадратичную зависимость  $\Delta G$  от  $Z$ , не может объяснить сдвиг  $pK$  в 6 ед. при относительно высоких значениях  $\epsilon$  для гидрофобного ядра мицеллы, так как в случае присоединения двух протонов увеличивается минимально возможный радиус катиона. Все четыре атома азота  $\text{H}_4\text{Por}^{2+}$  эквивалентны, и, по данным рентгеноструктурного анализа, область локализации положительного заряда может быть оценена как сфера с радиусом 2,8 Å [20]. Следует также отметить, что получаемые значения диэлектрической постоянной являются в действительности оценкой ее верхнего предела, а для сдвига  $pK$  — соответственно оценкой нижнего предела, так как в кислой области протонирование  $\text{H}_2\text{Por}$  — следствие разрушения мицелл. О разрушении мицелл в этой области рН свидетельствует крутизна наклона рН-зависимости флуоресценции, соответствующая присоединению 2—3,5 протонов (таблица), что больше числа протонов, реально присоединяемых к молекуле  $\text{H}_2\text{Por}$ .

Исследование рН-зависимости флуоресценции  $\text{H}_2\text{Por}(\text{COOH})_2$  на мицеллах показывает, что локализация порфиринового макроцикла на ми-

целле существенно не зависит от этерификации пропионовокислых остатков. Спектр поглощения и флуоресценции для  $H_2Por(COOH)_2$  не изменяется в том же диапазоне рН, что и для  $H_2Por(COONH_3)_2$ , однако квантовый выход  $H_2Por(COOH)_2$  изменяется: для TX-100 в диапазоне рН 5—7, а для ЦТАБ — в диапазоне рН 3—5 (рис. 4, 2). Отсутствие этих изменений у  $H_2Por(COONH_3)_2$  позволяет отнести эти изменения к ионизации пропионовокислых остатков. В литературе известны примеры, когда ионизация карбоксильных группировок, отстоящих на две  $CH_2$ -группы от флуоресцирующего хромофора, приводила к изменению квантового выхода флуоресценции. В частности, такие данные были получены для молекулы триптофана [18]. Обработка кривых флуориметрического титрования в диапазоне рН 3—5 для ЦТАБ и в диапазоне рН 5—7 для TX-100 по уравнению

$$\lg \left( \frac{I_2 - I_1}{I - I_1} - 1 \right) = -n\text{pH} + pK \quad (6)$$

( $I_2$  — интенсивность флуоресценции с полностью ионизированным пропионовокислым остатком;  $I_1$  — интенсивность флуоресценции с неионизированным пропионовокислым остатком;  $I$  — интенсивность флуоресценции в промежуточной точке;  $n$  — число присоединяемых протонов) позволяет определить значение  $pK$  пропионовокислых остатков  $H_2Por(COOH)_2$  (рис. 6) и число присоединяемых протонов (таблица). В обоих случаях присоединяется только один протон, и, следовательно, получаемые значения  $pK$  относятся к присоединению первого протона (первая ступень ионизации). Вторая ступень ионизации не регистрируется спектрально. По-видимому, влияние карбоксильных групп порфирина на квантовый выход связано с взаимодействием заряженных карбоксильных групп. Как видно из данных таблицы, появление заряда на мицелле сдвигает  $pK$  на 2 единицы, что соответствует нормальным сдвигам  $pK$  групп, находящихся в слое Штерна, под воздействием заряда [8]. По сравнению пропионовой кислотой ( $pK$  4,8)  $pK$  пропионовокислого остатка  $H_2Por(COOH)_2$  на нейтральной мицелле TX-100 довольно сильно смещено.

На основании полученных данных можно предложить следующую модель расположения  $H_2Por(COOH)_2$  на мицеллах: тетрапиррольный макроцикл погружен в неполярное ядро, а пропионовокислые остатки находятся на поверхности мицеллы в слое Штерна. По данным рентгеноструктурного анализа, именно таким образом ферропротопорфирин расположен в белковых молекулах миоглобина и гемоглобина [21].

### Экспериментальная часть

В работе использовали препараты ЦТАБ (Chemapol, СССР) и TX-100 (Ferak, Западный Берлин), протопорфирин IX (Calbiochem, США), диметилловый эфир протопорфирина IX (Sigma, США). Остальные вещества были марки ос. ч. или соответствующим образом очищенными. Растворы готовили с использованием трижды перегнанной воды. Для повышения растворимости  $H_2Por(COOH)_2$  предварительно переводили в форму соли дикатиона, растворяя в минимальном объеме 3M HCl и высушивая в вакуумном эксикаторе над КОН [7].  $H_2Por(COOH)_2$  растворяли в минимальном объеме 0,1 M NaOH и вводили в водный раствор ПАВ соответствующей

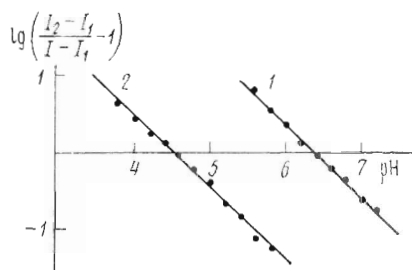


Рис. 6. График для расчета  $pK$  пропионовокислых остатков в протопорфирине IX, солюбилизованном TX-100 (1) и ЦТАБ (2). Обработка экспериментальных зависимостей интенсивности флуоресценции, представленных на рис. 4,2

концентрации.  $\text{H}_2\text{Por}(\text{COOCH}_3)_2$  растворяли в минимальном объеме ацетона и вводили в раствор ТХ-100. Ацетон удаляли, продувая в течение нескольких минут аргоном подогретый до  $70^\circ$  раствор.  $\text{H}_2\text{Por}(\text{COOCH}_3)_2$  в ЦТАБ готовили путем прямого растворения  $\text{H}_2\text{Por}(\text{COOCH}_3)_2$  в 2% растворе ЦТАБ при энергичном перемешивании в течение 30 мин. Нерастворившийся  $\text{H}_2\text{Por}(\text{COOCH}_3)_2$  удаляли центрифугированием, надосадочный раствор разбавляли до требуемой концентрации ЦТАБ. Спектры поглощения регистрировали на двухлучевом решеточном спектрофотометре Beckman В-25 (США), спектры флуоресценции — на спектрофлуориметре Hitachi MPF-4 (Япония). рН-зависимость интенсивности флуоресценции измеряли по методу непрерывной регистрации на установке, описанной в работе [4]. Время жизни протопорфирина в возбужденном состоянии измеряли на установке, описанной в работе [22]. рН-зависимость оптической плотности записывали с помощью спектрофотометра Hitachi 356 в двухволновом режиме. Оптическую плотность регистрировали при 400 нм, луч сравнения имел длину волны 700 нм. Сигнал с логарифматора подавался на Y-координату двухкоординатного самописца. рН изменяли с помощью цифровой титрационной системы DTS-633 фирмы Radiometer (Дания). Раствор из ячейки титратора с помощью перистальтического насоса подавали в проточную кювету спектрофотометра. Полная смена раствора в проточной кювете происходила за 10 с. Общий объем титруемой смеси составлял 3 мл. Сигнал с рН-метра подавался на X-координату двухкоординатного самописца.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Савицкий А. П., Угарова Н. Н., Березин И. В. (1978) Докл. АН СССР, 241, № 4, 977—980.
2. Fisher W. R., Taniuchi H., Anfinsen C. B. (1973) J. Biol. Chem., 248, 3188—3195.
3. Larsson L. O., Hagman L.-O., Kierkegaard P., Jonetani T. (1970) J. Biol. Chem., 245, 902—903.
4. Савицкий А. П., Угарова Н. Н., Березин И. В. (1977) Биоорг. химия, 3, 1242—1250.
5. Castro Ch. E. (1974) J. theor. Biol., 33, 475—490.
6. Гуринович Г. П., Севченко А. Н., Соловьев К. П. (1968) Спектроскопия хлорофилла и родственных соединений, «Наука и техника», М.
7. Falk J. E. (1964) Porphyrins and Metalloporphyrins, Elsevier, Amsterdam — N. Y. — London.
8. Березин И. В., Мартинек К., Яцимирский А. К. (1973) Успехи химии, 42, 1729—1756.
9. Fendler E. J., Fendler J. H. (1970) Advances in Physical Organic Chemistry, 8, 271—406.
10. Phelps C., Forlani L., Antonini E. (1971) Biochem. J., 124, 605—614.
11. Rosen C.-G., Nilson R. (1971) Biochim. et biophys. acta, 236, 1—7.
12. Stellwagen E. H., Rysavy R. (1972) J. Biol. Chem., 247, 8074—8077.
13. Цвирко М. П., Соловьев К. П., Кнюкшто В. Н., Градюшко А. Т. (1975) Ж. прикл. спектроскопии, 23, 643—647.
14. Градюшко А. Т., Кнюкшто В. Н., Соловьев К. П., Цвирко М. П. (1975) Ж. прикл. спектроскопии, 23, 444—452.
15. Hambright P., Chok P. B. (1974) J. Amer. Chem. Soc., 96, 3123—3131.
16. Simplicio J., Schwenzer K., Maena F. (1975) J. Amer. Chem. Soc., 97, 7319—7326.
17. Самокин В. А., Ануфриева Е. В., Волькенштейн М. В. (1971) Молекулярн. биология, 5, 711—717.
18. Черницкий Б. А. (1972) Люминесценция и структурная лабильность белков в растворе и клетке, «Наука и техника», М.
19. Mukerjee P., Ray A. (1966) J. Phys. Chem., 70, 2144—2148.
20. Fleischer E. B., Stone A. (1968) J. Amer. Chem. Soc., 90, 2735—2748.
21. Perutz M. F. (1965) J. Mol. Biol., 13, 646—668.
22. Кузьмин М. Г., Садовский Н. А. (1975) Химия высоких энергий, 9, 291—310.

Поступила в редакцию  
30.VII.1978



PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF PROTOPORPHYRIN IX AND ITS DIMETHYL  
ESTER SOLUBILIZED ON SURFACTANT MICELLES. SPECTROPHOTOMETRIC AND  
SPECTROFLUORIMETRIC TITRATION

SAVITSKI A. P., UGAROVA N. N., BEREZIN I. V.

*Department of Chemistry, M. V. Lomonosov State University, Moscow*

The absorption and fluorescence spectra have been studied and spectrophotometric titration curves recorded for protoporphyrin IX ( $H_2Por(COOH)_2$ ) and its dimethyl ester ( $H_2Por(COOCH_3)_2$ ) solubilized on the micelles of surfactants Triton X-100 and cetyltrimethylammonium bromide. It has been shown that the porphyrins under study are solubilized on the micelles as monomeric entities. In aqueous solution  $H_2Por(COOH)_2$  aggregates and  $H_2Por(COOCH_3)_2$  is practically insoluble. A marked shift of the  $pK_3$  (by 6 units) of the solubilized protoporphyrin in comparison with the respective value for aqueous solution was observed. The  $pK$  of the propionic acid residues were determined for solubilized  $H_2Por(COOH)_2$ . Strong reduction of the critical micelle concentration was found for the above surfactants in the presence of the protoporphyrins. It was suggested that the protoporphyrin molecules facilitate structural ordering of surfactant molecules around them, the porphyrin macrocycle being localized in the micelle hydrophobic nucleus and the propionic acid polar groups situated in the Schtern layer. From the  $pK_3$  shift of the solubilized protoporphyrins the dielectric constant equal to 10 was calculated for micelle hydrophobic nucleus.

---