

В. Б. ЕВСТИГНЕЕВ и В. А. ГАВРИЛОВА

ОБ ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНОМ ПОТЕНЦИАЛЕ ФОТОВОССТАНОВЛЕННОЙ ФОРМЫ ХЛОРОФИЛЛА

(Представлено академиком А. Н. Терениным 6 VII 1953)

Хлорофилл в пиридиновом растворе обратимо восстанавливается аскорбиновой кислотой при облучении светом, поглощаемым этим пигментом, что впервые было установлено А. А. Красновским (1). Представлялось интересным проследить процесс фотовосстановления хлорофилла путем измерения потенциала инертного металлического электрода, опущенного в реагирующий раствор. Хотя средой для данного процесса служит органический растворитель, все же благодаря значительной проводимости пиридина можно было надеяться, что происходящие при этом электронные изменения отразятся на потенциале инертного электрода так же, как и в водной среде.

На рис. 1 изображена схема использованной для опытов установки. Электродный сосуд 4 сделан из обычного стекла. Выкачивание воздуха производится через верхнюю трубку А, сосуд закрывается поворачиванием пробки Д. Электролитическое соединение жидкости внутри сосуда с насыщенным раствором хлористого калия в трубке Г производится через шлифованные поверхности пробки крана, заранее смоченные горячим раствором агара (10%) с хлористым калием и затем охлажденные до застывания агара. Такое соединение позволяет беспрепятственно производить эвакуацию раствора форвакуумным насосом при взбалтывании в течение 3 мин. и более. Никаких затруднений при измерении разницы потенциалов между индикаторным золотым и стандартным каломелевым электродами не наблюдалось.

В результате опытов было установлено, что при коротком освещении (1—2 мин.) эвакуированного раствора хлорофилла (а + б) в пиридине, содержащем аскорбиновую кислоту, происходит быстрое изменение потенциала золотого электрода в отрицательную сторону (см. рис. 2 А). Абсолютная величина изменения потенциала зависит от ряда причин: концентрации аскорбиновой кислоты, хлорофилла, интенсивности освещения и некоторых других еще не выясненных факторов. При выключении света потенциал быстро изменяется в обратную сторону и через несколько минут останавливается на уровне заметно более низком по

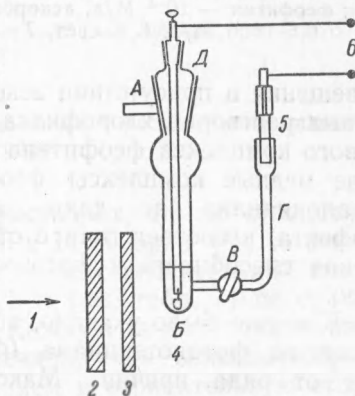


Рис. 1. Схема установки: 1 — свет от 500-ваттной кинолампы 127 в при накале 80 в, через конденсор $d = 8$ см; 2 — светофильтр, задерживающий инфракрасные лучи; 3 — светофильтр RG-1 толщиной 5 мм; 4 — электродный сосуд; 5 — насыщенный каломелевый электрод; 6 — к ламповому потенциометру МОСКИП (ЛП-5). Б — золотой электрод, В — шлифованный кран

сравнению с исходным потенциалом до освещения. Повторное включение и выключение света вызывает те же явления, но амплитуда изменений потенциала постепенно уменьшается.

При освещении раствора в течение более длительного времени наблюдается обычно следующее: минуты через три после начала освещения падение потенциала прекращается, он достигает минимума и затем начинает изменяться в положительную сторону. Подъем потенциала может происходить довольно долго (30—40 мин.) с постепенно уменьшающейся скоростью; абсолютная величина подъема не всегда одинакова. При выключении света после длительного освещения потенциал быстро поднимается приблизительно до того же значения, которое достигается в темноте после короткого освещения (см. рис. 2 Б).

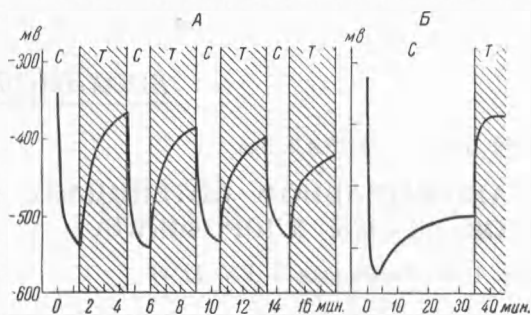


Рис. 2. А — изменения редокспотенциала пиридинового раствора хлорофилла а + б при коротких промежутках освещения и затемнения. Хлорофилл $\sim 10^{-4}$ М/л, аскорбиновая кислота $0,8 \cdot 10^{-2}$ М/л; Б — изменения редокспотенциала пиридинового раствора феофитина а + б при длительном освещении; феофитин $\sim 10^{-4}$ М/л, аскорбиновая кислота $0,6 \cdot 10^{-2}$ М/л. С — свет, Т — темнота

освещении в присутствии аскорбиновой кислоты эвакуированных пиридиновых растворов хлорофилла а, хлорофилла б, феофитина (а + б), цинкового комплекса феофитина и фталоцианина магния; нефлуоресцирующие медные комплексы феофитина и фталоцианина не дают описанного эффекта, в соответствии с отсутствием у них способности к фотовосстановлению.

Как уже было указано, абсолютная величина фотопотенциала (ФП) зависит от ряда причин. Максимальные ФП в первые минуты освещения, полученные в наших опытах для различных соединений, приведены в табл. 1.

Наибольшее изменение наблюдалось, следовательно, для феофитина и равно около — 0,35 в.

Таким образом, можно считать установленным, что в упомянутых выше растворах при освещении образуются вещества, обладающие весьма лабильными электронами, легко воспринимаемыми инертным электродом. Можно думать, что окислительно-восстановительные свойства этих растворов определяются следующим. До освещения определяющей будет, очевидно, обратимая система аскорбиновая кислота \rightleftharpoons дегидроаскорбиновая кислота при сильном преобладании восстановленного компонента — аскорбиновой кислоты. Растворенный хлорофилл в малой концентрации (10^{-4} М/л) и в невозбужденном состоянии вряд ли может оказывать заметное влияние на потенциал электрода.

При освещении в растворе появляется восстановленная форма хлорофилла и одновременно с этим соответствующее количество дегидроаскорбиновой кислоты (или монодегидроаскорбиновой кислоты (2)). Измене-

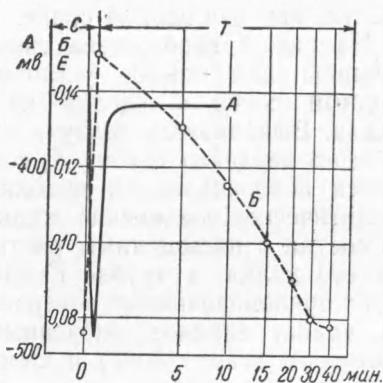


Рис. 3. Сравнение изменений редокс-потенциала (А) и поглощения при 525 мμ (Б) для раствора хлорофилла а + б в пиридине. Хлорофилл $1,8 \cdot 10^{-5}$ М/л, аскорбиновая кислота $0,6 \cdot 10^{-2}$ М/л. С — свет, Т — темнота

ния в системе аскорбиновая кислота \rightleftharpoons дегидроаскорбиновая кислота, вызванные окислением некоторого количества аскорбиновой кислоты в результате восстановления хлорофилла, очень мало скажутся на потенциале, так как эти изменения очень малы. Если принять, что при образовании одной молекулы восстановленного хлорофилла используется одна молекула (или две) аскорбиновой кислоты, то при концентрации хлорофилла 10^{-4} М/л при полном его восстановлении изменение концентрации аскорбиновой кислоты (0,01 М/л) не будет превышать 1—2%. Следует поэтому, думать что наблюдаемое понижение потенциала обуславливается почти целиком появлением в растворе восстановленной формы хлорофилла или другого пигмента. Хотя концентрация этой формы и невелика, но ее способность к отдаче электрона, очевидно, весьма значительна и ее появление сильно увеличивает восстановительную способность среды.

Если допустить, что в пиридиновых растворах сохраняется хотя бы приблизительно такая же разница в нормальных окислительно-восстановительных потенциалах для различных систем, какая наблюдается в водных растворах, что по существу и было показано в работе А. А. Красновского и Г. П. Брин (2), то можно считать, что освещение понижает окислительно-восстановительный потенциал исследованных растворов на 0,25—0,35 в (см. табл. 1) по сравнению с потенциалом аскорбиновой кислоты. Каждую из полученных нами величин ФП скорее можно считать заниженной, чем завышенной, по сравнению с действительно полным изменением в отрицательную сторону, потому что, как было уже указано, потенциал осветленного раствора вслед за понижением быстро начинал повышаться. Это вероятнее всего, говорит о наличии процесса, идущего в обратном направлении. О возможности такого процесса говорит также факт, что в сильно окрашенных растворах хлорофилла в пиридине в случае присутствия малых количеств аскорбиновой кислоты (1) невозможно провести полное восстановление до получения красной окраски раствора. (О толуюловых растворах при использовании фенилгидразина в качестве восстановителя см. (3)).

Понижение потенциала на 0,35 в, достигнутое в случае феофитина (наибольшее по сравнению с другими пигментами, очевидно благодаря большей легкости его восстановления (4)), в значительной степени уменьшает разницу между окислительно-восстановительным потенциалом аскорбиновой кислоты (+ 0,04 в) и потенциалом водородного электрода (—0,42 в при рН 7). Приближение к последнему требуется, как известно, для возможности прямого восстановления CO_2 . Величина понижения — 0,35 в очень близка к величине окислительно-восстановительного потенциала фотовосстановленной формы хлорофилла (\sim —0,35 в), полученной А. А. Красновским и Г. П. Брин (2) на основании данных по темновому восстановлению с помощью этой формы красителей и других веществ с различными нормальными окислительно-восстановительными потенциалами.

Таблица 1

Пигмент	Коефф поглощения раствора в красном максимуме	Начальный потенциал, в *	Потенциал при освещении, в *	Время освещения, мин.	ФП
Хлорофилл (a + b)	~ 8	—0,375	—0,669	3	—0,294
Хлорофилл а	~ 8	—0,370	—0,660	2	—0,290
Хлорофилл b	~ 2	—0,340	—0,589	1	—0,249
Феофитин (a + b)	~ 10	—0,363	—0,709	1	—0,346
Zn-феофитин	~ 10	—0,370	—0,702	2	—0,332
Фталоцианин магния	~ 10	—0,359	—0,650	4	—0,291

* По отношению к насыщенному каломелевому электроду.

При проведении опытов с одновременным измерением ФП и спектра поглощения нами было обращено внимание на то, что изменения потенциала после выключения света происходят значительно быстрее, чем изменения спектра поглощения. На рис. 3 приведены результаты опытов с более разбавленными растворами, позволяющими проводить измерения на спектрофотометре. Из кривых этого рисунка видно, что в то время,

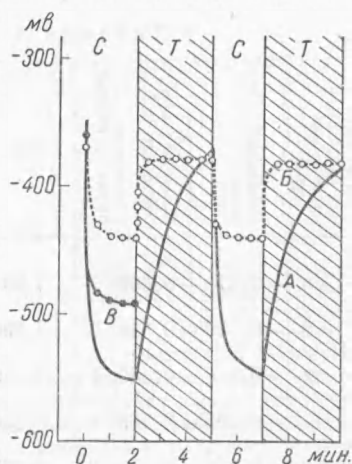


Рис. 4. Изменения редокспотенциала при освещении раствора хлорофилла в пиридине в присутствии акцептора водорода. А — раствор хлорофилла $a + b \cdot 10^{-4}$ М/л + аскорбиновая кислота $0,6 \cdot 10^{-3}$ М/л; В — то же + сафранина Т $2 \cdot 10^{-4}$ М/л; В — то же, что А, + рибофлавин $4 \cdot 10^{-4}$ М/л. С — свет, Т — темнота

как изменения потенциала через 2—3 мин. после выключения света уже полностью закончились, поглощение изменилось еще довольно мало и продолжает изменяться в течение дальнейших 40 мин. Можно поэтому думать, что наблюдаемая электродная активность при освещении не есть проявление свойств восстановленной формы пигмента, ответственной за изменение цвета раствора, а обусловлена наличием более лабильной восстановленной формы, образующейся в первые мгновения освещения и быстро исчезающей в темноте. Вполне возможно, что процесс образования и дальнейшей реакции этой лабильной формы и является тем основным процессом, который обуславливает сенсбилизацию восстановления акцепторов водорода, в частности и при фотосинтезе. Для решения вопроса о природе этой формы, является ли она семихиноном или еще более ранней формой восстановленного красителя, требуется дополнительный экспериментальный материал.

В ряде работ нашей лаборатории (5) было показано, что хлорофилл в пиридиновом растворе может сенсбилизировать перенос водорода от аскорбиновой кислоты к акцептору с нормальным окислительно-восстановительным потенциалом, более отрицательным, чем у аскорбиновой кислоты. На рис. 4 показано изменение потенциала электрода, опущенного в пиридиновый раствор хлорофилла с аскорбиновой кислотой в присутствии сафранина Т ($E_0' = -0,29$ в). Как видно из кривых, глубина падения потенциала при освещении в этом случае значительно меньше, чем в отсутствие акцептора водорода, и уровень, на котором останавливается потенциал, определяемый, повидимому, потенциалом и количеством восстановленной формы добавленного акцептора. Эти опыты также подтверждают механизм непосредственного участия хлорофилла в процессах фотохимического переноса водорода, показанный в предыдущих работах нашей лаборатории.

В заключение выражаем благодарность акад. А. Н. Теренину и А. А. Красновскому за ценные советы и обсуждение работы.

Лаборатория фотобиохимии
Института биохимии им. А. Н. Баха
Академии наук СССР

Поступило
27 VI 1953

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ А. А. Красновский, ДАН, 60, 421 (1948); А. А. Красновский, Г. П. Брин, К. К. Войновская, ДАН, 63, 393 (1949); А. А. Красновский, Г. П. Брин, ДАН, 89, 527 (1953). ² А. А. Красновский, Г. П. Брин, ДАН, 73, 1329 (1950), ³ В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова, ДАН, 91, № 4 (1953). ⁴ В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова, ДАН, 74, 781 (1950). ⁵ А. А. Красновский, ДАН, 61, 91 (1948); А. А. Красновский, Г. П. Брин, ДАН, 67, 325 (1949); А. А. Красновский, К. К. Войновская, ДАН, 87, 109 (1952).