

В. Б. ЕВСТИГНЕЕВ, Т. А. ШВЕДОВА

О ФОТОПОТЕНЦИАЛЕ ПРИ ОБРАТИМЫХ ФОТОХИМИЧЕСКИХ РЕАКЦИЯХ ХЛОРОФИЛЛА С ОКИСЛИТЕЛЯМИ

(Представлено академиком А. И. Опариным 7 VIII 1970)

В работе нашей лаборатории было обнаружено (¹), а затем подтверждено и изучено (²⁻⁵) образование положительного фотопотенциала при обратимом фотоокислении хлорофилла и его аналогов различными окислителями в спиртовых растворах.

Наличие положительного фотопотенциала объяснялось нами тем, что в результате происходящей фотохимической окислительно-восстановительной реакции в растворе появляется положительно заряженная лабильная окисленная форма пигмента, обладающая большей электродной активностью, чем образующийся одновременно семихинон или продукты его изменения.

Обнаружение этой формы, исследование ее спектральных свойств (¹) и доказательство ее радикальной природы методом э.п.р. позволило полностью подтвердить возможность первичного фотохимического окисления пигмента при его фотосенсибилизирующем действии на окислительно-восстановительные реакции (⁶). Данные, прямо говорящие о возможности «окислительного» пути фотосенсибилизации, были получены также в работе Дилунга с сотрудниками (⁷).

Величина фотопотенциала зависит от кислотного — основного равновесия в среде. Положительный фотопотенциал был максимальным для большинства пигментов при рН этанола $\sim 4,0$. При повышении рН он обычно понижался и при рН > 6 исчезал или даже становился отрицательным.

Обнаруженная нами (¹⁻⁵) зависимость фотопотенциала раствора хлорофилла а, содержащего окислитель или восстановитель, от рН была подтверждена для случая хинона и гидрохинона в работе Фуджимори и Тавля (⁸) и Симпсона и сотрудников (⁹).

В последней работе авторы пытаются дать объяснение возникновению положительного фотопотенциала и изменению его знака при повышении рН, отличающееся от выдвинутого в нашей работе. Они считают, что потенциал электрода передвигается в кислой среде в положительную сторону вследствие появления в растворе в результате фотохимической реакции хинона или гидрохинона с пигментом дополнительных свободных протонов. Однако это полностью исключается данными наших опытов (¹⁰), в которых было показано, что в слабокислой среде рН раствора в результате фотореакции не уменьшается, а явно увеличивается.

Прежде всего нами были проведены дополнительные измерения фотопотенциалов, возникающих при освещении раствора хлорофилла а в этаноле, содержащем парабензохинон или гидрохинон в различных концентрациях. Опыты подтвердили, что во всех случаях величина и знак фотопотенциала зависят от кислотности среды. Перемена знака фотопотенциала происходила обычно при рН $\sim 5,0-6,0$.

Концентрация окислителя или восстановителя, которая варьировала в пределах от $2 \cdot 10^{-5}$ до 10^{-3} М, не меняя существенным образом общую картину происходящих явлений, оказывала, тем не менее, явное влияние

на величину фотопотенциала и на кинетику его изменения после включения и выключения света.

Максимальное значение положительного фотопотенциала получалось, в согласии с предыдущими результатами, при $\text{pH} \sim 4$, отрицательного фотопотенциала — при $\text{pH} \sim 7-8$. Понижение или повышение pH по сравнению с этими значениями приводило обычно к некоторому уменьшению абсолютной величины фотопотенциала.

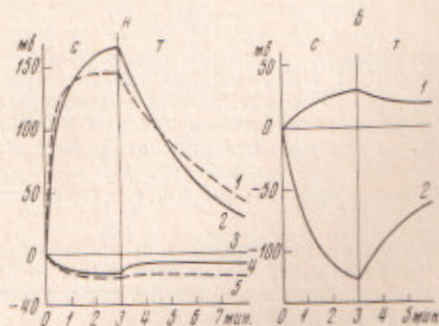


Рис. 1

Рис. 1. Фотопотенциал возникающий при освещении растворов хлорофилла а ($10^{-5} M$) в этаноле. А — в присутствии парабензохинона ($2 \cdot 10^{-5} M$): 1 — pH раствора 3,4, 2 — 3,9, 3 — 5,6, 4 — 8,7, 5 — 7,7; Б — в присутствии гидрохинона ($2 \cdot 10^{-4} M$): 1 — pH раствора 4,0, 2 — 7,2. с — свет, т — темнота

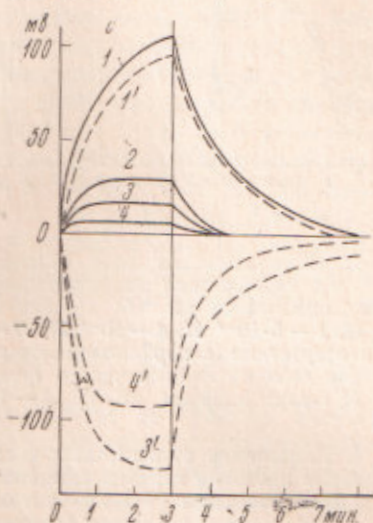


Рис. 2

Рис. 2. Фотопотенциал при освещении этаноловых растворов хлорофилла а ($10^{-5} M$), содержащих динитробензол ($10^{-4} M$): 1 — pH раствора 3,8, 2 — 5,4, 3 — 7,0, 4 — 8,7. 1', 3' — с добавкой гидрохинона ($2 \cdot 10^{-5} M$). с — свет, т — темнота

На рис. 1 приведены типичные серии кривых, получающихся в присутствии парабензохинона (А) и гидрохинона (Б). Для растворов, содержащих хинон, характерно появление значительного положительного фотопотенциала, довольно быстро обратимого в темноте, и небольшого отрицательного фотопотенциала, исчезающего в темноте не всегда полностью. В случае гидрохинона наблюдалась противоположная картина: при более высоких pH — значительный отрицательный фотопотенциал, довольно хорошо обратимый в темноте, и при $\text{pH} < 5$ — небольшой, медленно нарастающий положительный фотопотенциал, только частично обратимый в темноте. Следует подчеркнуть, что величина отрицательного фотопотенциала и степень его обратимости в темноте возрастали при повышении концентрации гидрохинона.

Результаты, полученные при освещении красным светом, поглощаемым только хлорофиллом, и синим светом, поглощаемым частично и хиноном, существенно не различались.

В предыдущих работах (1) нами было отмечено, что положительный фотопотенциал в спиртовых растворах хлорофилла возникает не только в случае использования хинонов, но и при применении в качестве окислителей нитросоединений. Однако в этом случае при повышении pH фотопотенциал хотя и уменьшается, но даже в щелочной среде не меняет знака. На рис. 2 приведены результаты одного из опытов с динитробензолом ($10^{-4} M$) при концентрации хлорофилла а $10^{-5} M$. Даже при pH 8,7 фотопотенциал оставался положительным. В соответствии с нашими представлениями, это должно означать, что или в растворах данного окислителя не содержится достаточного количества его восстановленной формы, или последняя неспособна к фотореакции с хлорофиллом.

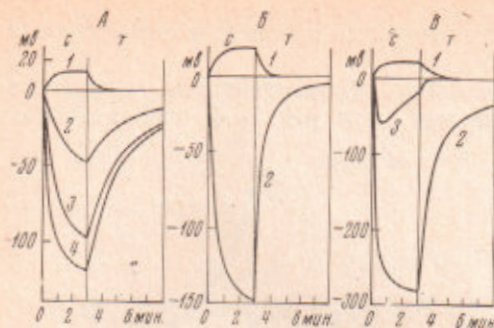


Рис. 3

Рис. 3. Фотопотенциал при освещении этаноловых растворов хлорофилла а (10^{-5} M), содержащих динитробензол (10^{-4} M). А — при добавке разных количеств гидрохинона рН 8,0: 1 — без гидрохинона, 2 — концентрация гидрохинона 10^{-6} M, 3 — $5 \cdot 10^{-6}$ M, 4 — 10^{-5} M; В — при добавке аскорбиновой кислоты рН 8,3: 1 — в отсутствие аскорбиновой кислоты, 2 — с аскорбиновой кислотой 10^{-3} M; С — при добавке солянокислого фенилгидразина: 1 — без добавки, рН 8,9, 2 — 10^{-4} M фенилгидразина, рН 8,0, 3 — 10^{-5} M фенилгидразина, рН 8,6. с — свет, т — темнота

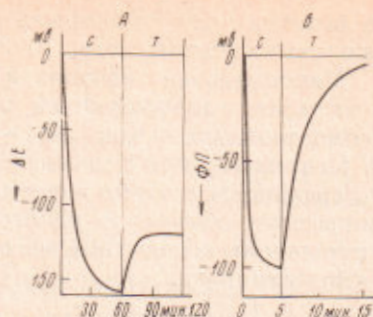


Рис. 4

Рис. 4. Понижение окислительно-восстановительного потенциала при длительном освещении раствора парабензохинона ($2 \cdot 10^{-5}$ M) в этаноле белым светом (рН \sim 8) (А) и фотопотенциал (ФП), полученный после добавки хлорофилла а в тот же раствор после его освещения (В). Объяснение в тексте

Для получения материала о роли восстановителей в образовании отрицательного фотопотенциала в растворах хлорофилла при рН $>$ 6 мы решили добавить некоторое количество восстановителя к раствору, содержащему динитробензол. Рис. 2 показывает, что после прибавления $2 \cdot 10^{-5}$ M гидрохинона к раствору хлорофилла с динитробензолом (10^{-4} M) кривая фотопотенциала при рН \sim 4 почти не изменилась, а при рН 7 и 8,7 появился весьма значительный и почти целиком обратимый отрицательный фотопотенциал. Из рис. 3 видно, что отрицательный фотопотенциал при рН 8,0 появляется уже при концентрации добавленного гидрохинона 10^{-6} M, т. е. на два порядка более низкой, чем концентрация динитробензола, и увеличивается при повышении ее до 10^{-5} M.

Появление еще большего и хорошо обратимого отрицательного фотопотенциала наблюдается при прибавлении в слабощелочной этаноловый раствор хлорофилла, а с динитробензолом аскорбиновой кислоты (рис. 3В) и, в особенности, солянокислого фенилгидразина (рис. 3С).

Следует отметить, что в последнем случае, а также в случае аскорбиновой кислоты при более низких рН резко выраженный и устойчивый на свету отрицательный фотопотенциал появляется только при концентрации добавленного восстановителя, большей или равной концентрации динитробензола. При меньших концентрациях появившийся в первые мгновения освещения заметный отрицательный фотопотенциал затем, при продолжающемся освещении, быстро исчезает (рис. 3В, 3). Следует думать, что это объясняется сенсibilизированным хлорофиллом быстрым фотоокислением прибавленного восстановителя динитробензолом и исчезновением вследствие этого условий, благоприятствующих сохранению в растворе электроноактивной восстановленной формы хлорофилла.

Добавка такого окислителя, как тринитротолуол, к динитробензолу не меняла существенно картины сдвига потенциала в растворе хлорофилла ни при кислых, ни при щелочных рН. То же имело место в случае добавки менадиона. Добавка хинона к щелочному (рН 8—8,5) раствору динитробензола приводила к появлению медленно развивающегося отрицательного фотопотенциала, только частично обратимого в темноте.

Появление значительного и хорошо обратимого отрицательного фото-

потенциала при добавке к раствору динитробензола восстановителей, способность которых к фотореакции с хлорофиллом хорошо известна, свидетельствует о том, что и в случае хинона обратимый отрицательный фотопотенциал связан с восстановительными изменениями пигмента.

В последнем случае восстановителем служат восстановленные формы парабензохинона, уже имеющиеся в растворе в равновесных количествах в темноте; их концентрация может увеличиваться в результате прямого и сенсibilизированного хлорофиллом восстановления хинона спиртом при освещении. Для подтверждения последнего нами был проведен следующий опыт. Эвакуированный раствор хинона в спирте с $pH \sim 8$ освещался в электродном сосуде белым светом, и велось наблюдение за изменением потенциала золотого электрода, опущенного в раствор. Рис. 4А показывает, что потенциал постепенно понижался (за 1 час почти на 160 мв); при выключении света наблюдалась некоторая обратимость, но окончательно установившийся в темноте потенциал лежал на уровне, заметно более низком (на 120 мв) по сравнению с исходным. Это могло свидетельствовать о том, что в растворе хинона произошли восстановительные процессы, приводящие к образованию некоторого количества достаточно устойчивых восстановленных соединений.

В раствор хинона после подобного освещения добавлялся хлорофилл ($0,5 \cdot 10^{-3} M$) и проводился обычный опыт по измерению фотопотенциалов (рис. 4Б). Оказалось, что в этом случае быстро обратимое отрицательное изменение потенциала достигало значительно больших величин, чем в случае не освещенных предварительно растворов хинона с хлорофиллом, и было подобным по величине и характеру изменениям, происходящим в растворах хинона или динитробензола с добавкой гидрохинона.

Таким образом, имевшиеся ранее и полученные в настоящей работе данные позволяют считать наиболее вероятным следующее объяснение картины фотопотенциала в этаноловых растворах хлорофилла, содержащих окислитель. Обратимый в темноте положительный фотопотенциал, возникающий при $pH > 5,5-6,0$, обуславливается образованием в растворе электродноактивной окисленной формы пигмента. Быстро обратимый в темноте компонент отрицательного фотопотенциала, появляющегося в случае бензохинона при $pH > 5,5-6,0$, обуславливается фотовосстановительными изменениями пигмента с образованием лабильной электродноактивной восстановленной формы пигмента.

Налагающееся на этот фотопотенциал небольшое необратимое или медленно и частично обратимое понижение потенциала при освещении объясняется процессами сенсibilизированного образования восстановленной формы хинона. Увеличение концентрации последней в растворе хинона приводит к более интенсивному фотовосстановлению пигмента и, как следствие, к большей величине обратимого в темноте отрицательного фотопотенциала.

Институт фотосинтеза
Академии наук СССР
Пушкино-на-Оке

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

Поступило
7 VIII 1970

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова, ДАН, 165, 1435 (1965); Биофизика, 11, 593 (1966); 14, 43 (1969). ² В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова, Н. А. Садовникова, Биохимия, 31, 1229 (1966). ³ В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова, Г. Д. Оловянишникова, Молекулярная биология, 1, 59 (1967). ⁴ В. Б. Евстигнеев, Н. А. Садовникова, Г. Д. Оловянишникова, Молекулярная биология, 2, 21 (1968); 3, 41 (1969). ⁵ V. B. Evstigneev, Progress in Photosynthesis Research, 2, 733 (1969); J. chim. phys. et phys. chim. biol., 65, 1447 (1968). ⁶ В. Б. Евстигнеев, Биофизика, 8, 664 (1963); Photochem. Photobiol., 4, 171 (1965). ⁷ И. Н. Ивницкая, В. А. Мищенко, И. И. Дилунг, Биофизика, 13, 329 (1968). ⁸ E. Fujimori, M. Tavlá, Photochem. Photobiol., 8, 31 (1968). ⁹ W. H. Simpson, R. A. Freeman, P. J. Reucroft, Photochem. Photobiol., 11, 319 (1970). ¹⁰ В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова, Молекулярная биология, 2, 869 (1968).