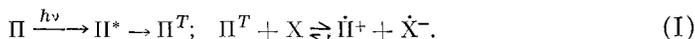


А. П. БОБРОВСКИЙ, В. Е. ХОЛМОГОРОВ

**О ПРИРОДЕ ПЕРВИЧНОГО ФОТОХИМИЧЕСКОГО АКТА
ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ХЛОРОФИЛЛА С ХИНОНАМИ**

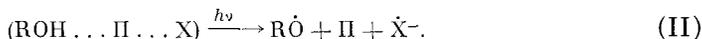
(Представлено академиком А. П. Виноградовым 19 V 1972)

Изучению фотохимического взаимодействия хлорофилла с хинонами уделяется большое внимание, поскольку предполагается ⁽¹⁾, что в нативных системах хиноны могут являться первичными акцепторами электрона в цепи превращений, следующих за актом поглощения света молекулами пигмента. Впервые достоверные доказательства возможности осуществления переноса электрона на хинон с участием возбужденных состояний хлорофилла были получены методом э.п.р. Толлином с сотрудниками ⁽²⁾. В качестве возможного механизма фотореакции предполагалось непосредственное взаимодействие возбужденного пигмента с хиноном, происходящее по схеме



Однако ни в этом, ни в одном из многочисленных последующих исследований ⁽³⁻⁵⁾ не удалось наблюдать сигнал э.п.р., который можно было бы отождествить с сигналом от катион-радикала хлорофилла*.

По этой причине механизм (I) не нашел полного подтверждения и был предложен новый, альтернативный первому ⁽⁵⁾. В соответствии со вторым механизмом в первичном акте фотовозбужденный хлорофилл восстанавливается молекулами растворителя, за чем следует быстрая реакция восстановленного хлорофилла с хиноном с образованием нейтрального пигмента и восстановленного хинона



Несмотря на несоответствие многим экспериментальным фактам ⁽⁷⁻⁸⁾, механизм (II) не может быть отвергнут до тех пор, пока не будут получены прямые данные об образовании катион-радикала пигмента в фотореакции с хинонами. Именно с целью получения однозначных доказательств одноэлектронного окисления хлорофилла хинонами была выполнена настоящая работа. Методами э.п.р. и абсорбционной спектроскопии исследовался первичный акт фотохимического взаимодействия хлорофилла а + b и некоторых его аналогов с *p*-бензохиноном и 2,3,5,6-тетрафтор-*p*-бензохиноном (фторанилом) в спиртовых растворах.

Образцы тщательно дегазировались до остаточного давления $10^{-4} \div 10^{-5}$ тор. (В дальнейшем было установлено, что присутствие кислорода в системе не сказывается на стабильности катион-радикальной формы пигмента, однако влияет на эффективность ее образования, вероятно, за счет дезактивации кислородом триплетно-возбужденных молекул хлорофилла.) Используемые в работе акцепторы — хиноны были очищены повторной сублимацией в вакууме, после чего содержались в вакуумированных сосудах. Внесение хинонов в спиртовые растворы пигментов осу-

* По-видимому, синглетный сигнал э.п.р. с $\Delta H = 7 \div 8$ э, наблюдавшийся при окислении хлорофилла хиноном в кислом спирте (рН 4) ⁽⁶⁾, принадлежит катион-радикалу хлорофилла. Однако авторы работы, не обладая достаточным количеством экспериментального материала, не смогли сделать такого вывода.

ществлялось также в анаэробных условиях — путем вымораживания их паров в вакууме в ампулы с замороженным раствором. Измерения спектров э.п.р. выполнены на радиоспектрометре ЭПП-2М, а спектров поглощения — на спектрофотометре SV-50А фирмы «Shimadzu». Источником света служила ксеноновая лампа ДКСШ-1000 в сочетании с водными и цветными стеклянными фильтрами. Облучение образцов проводили в процессе их замораживания до 77° К. Этот экспериментальный прием позволяет преодолеть возникающие трудности в генерации и стабилизации первичных продуктов фотореакции. Образующиеся ион-радикальные формы компонентов первичной стадии окислительно-восстановительной реакции, осуществляемой в сильно охлажденном, но еще достаточно под-



Рис. 1

Рис. 1. Спектры э.п.р. одноэлектронного окисления хлорофилла хипонами. Спектры *a* и *б* получены при облучении в процессе замораживания до -196° спиртовых растворов хлорофилла в присутствии фторанила и *p*-бензонхинона соответственно; *б* — анион-радикал фторанила; *в* — анион-радикал *p*-бензохинона; *г* — катион-радикал хлорофилла. Спектры записаны при -196°

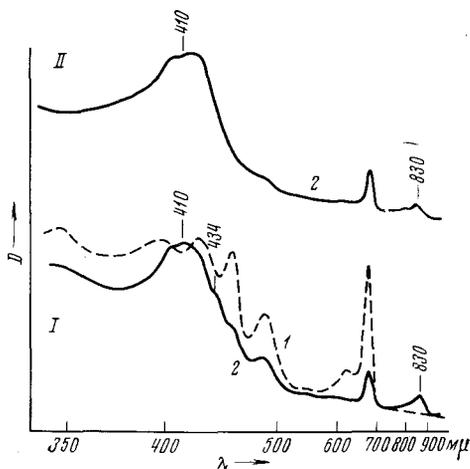


Рис. 2

Рис. 2. Фотоокисление хлорофилла фторанилом (I) и *p*-бензохиноном (II). 1 — исходный спектр поглощения в этаноле при -196° ; 2 — изменения в спектре после облучения в процессе замораживания от 20° до -196°

вижном растворе, стабилизируются в матрице в момент ее стеклования (в этаноле — при достижении температуры -130°).

Исследование методом э.п.р. На рис. 1, *a* представлен спектр э.п.р., возникающий в результате облучения красным светом образцов спиртовых растворов хлорофилла *a* + *b* ($C = 5 \cdot 10^{-4}$ мол/л) с добавкой фторанила ($C = 5 \cdot 10^{-3}$ мол/л) в процессе их замораживания от 20° до -196° С. В спектре присутствуют два сигнала э.п.р., обусловленных наличием в системе парамагнитных центров разной природы. Одним из этих центров является ион-радикальная форма фторанила, принявшего электрон. Как известно (⁹), анион-радикал фторанила обладает в жидких растворах хорошо разрешенным 5-компонентным спектром э.п.д. в соответствии с взаимодействием неспаренного электрона с ядрами четырех эквивалентных атомов фтора хиноидного кольца. Разрешенная СТС сохраняется и при замораживании растворов до 77° К. На рис. 1, *б* представлен спектр э.п.р. анион-радикала фторанила, полученный нами при прямом возбуждении ($\lambda > 370$ мμ) фторанила (в отсутствие пигмента) в спиртовом растворе при замораживании от комнатных температур до 77° К. Расщепление между компонентами СТС в этом спектре равно 5,2 э, и этому же значению равно расщепление в СТС спектра э.п.р., полученного в реакции хлорофилла с фторанилом. Произведя графическое вычитание

спектра анион-радикала фторанила из суммарного спектра на рис. 1, а, удается выделить синглетный сигнал э.п.р. (рис. 1, б), принадлежащий второму парамагнитному центру исследуемой системы. Параметры синглетного сигнала э.п.р. $\Delta H = 8,2$ э и $g = 2,0025$ хорошо соответствуют характеристикам спектра э.п.р. катион-радикала хлорофилла, полученного ранее в результате фотохимического⁽¹⁰⁾ и электрохимического окисления⁽¹¹⁾. Поэтому можно предположить, что вторым парамагнитным центром, регистрируемым методом э.п.р., является катион-радикал хлорофилла.

По аналогичной методике было проведено исследование взаимодействия хлорофилла с *p*-бензохиноном в спиртовом растворе. Было установлено, что при облучении таких образцов красным светом в процессе их замораживания до 77°K возникает спектр э.п.р., представленный на рис. 1, в. И в этом случае в спектре удается различить два сигнала, на этот раз оба синглетных: один с $\Delta H = 12$ э и второй — более узкий, с $\Delta H = 8,2$ э.

По всей видимости, более узкий синглетный сигнал идентичен синглетному сигналу, возникающему в фотореакции хлорофилла с фторанилом, и является сигналом от катион-радикала хлорофилла. Природу второго сигнала удалось установить специальными опытами. Оказалось, что при облучении ближним у.-ф. светом жидких спиртовых растворов *p*-бензохинона в отсутствие хлорофилла наблюдается пятикомпонентный сигнал э.п.р. с расщеплением $\Delta H = 2,5$ э, характерный для анион-радикала *p*-бензохинона, возникающего при взаимодействии фотовозбужденного хинона с этанолом⁽¹²⁾.

Если, не прекращая облучения, быстро заморозить такие образцы до 77°K , то структура в спектре анион-радикала *p*-бензохинона смазывается и наблюдается синглетный сигнал с $\Delta H = 12$ э (рис. 1, г). Именно такой сигнал был получен при взаимодействии хинона с хлорофиллом, и мы связываем его с анион-радикалом *p*-бензохинона. Таким образом, при выполнении некоторых экспериментальных условий нам удалось методом э.п.р. одновременно зафиксировать оба парамагнитных продукта, возникающих в результате элементарного акта взаимодействия фотовозбужденного хлорофилла с хинонами (фторанилом и *p*-бензохиноном) и тем самым показать, что первым актом данной реакции является перенос электрона от пигмента к акцептору.

Спектрофотометрические измерения. При освещении красным светом раствора хлорофилла в этаноле, содержащем *p*-бензохинон либо фторанил, при комнатной температуре не удается обнаружить каких-либо изменений в оптическом спектре поглощения пигмента. Спектр остается без изменения и при облучении образцов при пониженных температурах. Однако использование экспериментального приема, примененного в э.п.р.-измерениях, — облучения образцов в процессе их замораживания — оказалось успешным и в спектрофотометрических исследованиях. На рис. 2, I отображена картина спектральных изменений в облученных по этой методике образцах растворов хлорофилла в присутствии фторанила. Наряду с сильным уменьшением основных максимумов поглощения пигмента возникают новые в области 410 и 830 м μ . Эти максимумы хорошо соответствуют спектру поглощения катион-радикала хлорофилла, полученному независимыми методами^(10, 11). Одновременно в спектре наблюдается характерный максимум у 434 м μ , принадлежащий анион-радикалу фторанила⁽¹²⁾. Действительно, этот максимум также возникал в результате элементарного восстановления фотовозбужденного фторанила спиртом в отсутствие хлорофилла.

Изменения, происходящие в спектре поглощения хлорофилла в результате облучения в процессе замораживания до 77°K его растворов в этаноле в присутствии *p*-бензохинона, показаны на рис. 2, II. И в этом случае появляются полосы поглощения катион-радикала хлорофилла —

у 410 и 830 м μ . Максимум поглощения анион-радикала *p*-бензохинона наблюдать не удалось, поскольку он перекрывается с коротковолновым максимумом поглощения катион-радикала хлорофилла*.

Фотоокисление аналогов хлорофилла. Проведенное по аналогичной методике исследование Mg-содержащих аналогов хлорофилла — бактериохлорофилла, Mg-фталоцианина и Mg-этиопорфирина показало, что эти пигменты также эффективно окисляются хинонами. В фотореакции с фторанилом спектрально регистрируются оба первичных ион-радикальных компонента одноэлектронной окислительно-восстановительной реакции — анион-радикал фторанила (максимум в области 434 м μ в оптическом спектре и пятикомпонентный спектр э.п.р.) и катион-радикал соответствующего пигмента — бактериохлорофилла (максимумы у 430, 520, 880 и 950 м μ , синглет э.п.р. с $\Delta H = 13,5$ э), Mg-фталоцианина (максимум у 510 м μ , синглет э.п.р. с $\Delta H = 4,1$ э) и Mg-этиопорфирина (максимумы у 365, 385, 402 и 685 м μ , синглет э.п.р. с $\Delta H = 4 \div 5$ э). При кратковременном повышении температуры облученных образцов от -196 до -130° C (при этой температуре начинается плавление матрицы) анион-радикал фторанила исчезает, а катион-радикалы пигментов частично сохраняются. Более длительное выдерживание образцов при этой температуре приводит к полной гибели катион-радикалов с одновременным восстановлением исходного спектра поглощения пигментов.

Несколько отлично поведение катион-радикала Mg-фталоцианина, обнаружившего повышенную по сравнению с катион-радикалами других пигментов стабильность в растворе. Он способен существовать в течение длительного времени в спиртовом растворе даже при температуре $-70 \div 80^\circ$ C. Обращает на себя внимание и сильная насыщенность сигнала э.п.р. катион-радикала Mg-фталоцианина: синглетный сигнал с $\Delta H = 4,1$ э удается наблюдать только в жидком растворе, а при -196° C сигнал полностью отсутствует.

На основании полученных в работе результатов можно с уверенностью утверждать, что хлорофилл и его Mg-содержащие аналоги взаимодействуют с хинонами в спиртовых растворах по механизму (1). С целью установления влияния центрального атома металла в структуре пигмента на одноэлектронное окисление хинонами был взят безметалльный аналог хлорофилла — феофитин. Никаких спектральных проявлений, указывавших бы на осуществление такого взаимодействия, получено не было. Таким образом, присутствие атома металла необходимо. Является ли окисление пигментов хинонами специфичным только для Mg-содержащих пигментов, покажут дальнейшие исследования.

Поступило
19 V 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ H. H. Stiehl, H. T. Witt, Zs. Naturforsch., **24b**, 1588 (1969). ² G. Tollin, G. Green, Biochim. et biophys. acta, **60**, 524 (1962). ³ G. Tollin, K. K. Chatterjee, G. Green, Photochem. Photobiol., **4**, 593 (1965). ⁴ D. C. Mukherjee, D. H. Cho, G. Tollin, Photochem. Photobiol., **9**, 273 (1969). ⁵ R. White, G. Tollin, Photochem. Photobiol., **14**, 15 (1971). ⁶ В. Б. Евстигнеев, Н. А. Садовникова и др., Биофизика, **16**, 431 (1971). ⁷ А. В. Карякин, А. К. Чибисов, В сборн. Элементарные фотопроеессы в молекулах, «Наука», 1966, стр. 296. ⁸ В. Б. Евстигнеев, В сборн. Молекулярная фотоника, «Наука», 1970, стр. 178. ⁹ D. H. Anderson, P. J. Frank, H. S. Gutowsky, J. Chem. Phys., **32**, 196 (1960). ¹⁰ А. П. Бобровский, В. Е. Холмогоров, Оптика и спектроскопия, **30**, 32 (1971). ¹¹ D. C. Borg, J. Fojer et al., Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., **67**, 813 (1970). ¹² В. Е. Холмогоров, Теоретич. и эксп. хим., **6**, 826 (1969).

* В контрольных опытах нам удалось установить, что анион-радикал *p*-бензохинона имеет максимум поглощения в оптическом спектре у 412—414 м μ .