

В. Б. ЕВСТИГНЕЕВ, Н. А. САДОВНИКОВА, А. П. КОСТИКОВ, Л. П. КАЮШИН
**ИССЛЕДОВАНИЕ ПЕРВИЧНЫХ ПРОДУКТОВ ФОТООКИСЛЕНИЯ
ХЛОРОФИЛЛА а МЕТОДОМ ЭЛЕКТРОННОГО
ПАРАМАГНИТНОГО РЕЗОНАНСА**

(Представлено академиком Г. М. Франком 9 IV 1971)

Способность хлорофилла служить обратимым фотохимическим донором электрона была показана в ряде работ, проведенных в последнее время (см. обзоры (^{1, 2})). Обычно полагают, что первичным продуктом фотоокисления хлорофилла является его катион-радикал (³). Однако прямых доказательств наличия радикала хлорофилла в реагирующей системе до сих пор получено не было, несмотря на использование наиболее подходящего для этой цели метода — электронного парамагнитного резонанса (э.п.р.).

Впервые метод э.п.р. для изучения фотоокисления хлорофилла применен Г. Толлиным с сотрудниками (⁴). При освещении этаноловых растворов хлорофилла а и хинона эти авторы регистрировали при температурах, близких к комнатной, спектр э.п.р. радикала семихинона. Однако не был зарегистрирован сигнал, который свидетельствовал бы о присутствии положительного ион-радикала хлорофилла. Последнее авторы объяснили наличием быстрого процесса диспропорционирования двух радикалов хлорофилла с образованием нерадикальных форм (^{5, 6}).

В нашей предыдущей работе (⁷) при исследовании фотоокисления хлорофилла а *n*-бензохиноном в этаноловых растворах установлено, что интенсивность сигнала э.п.р. радикалов хинона зависит от рН раствора. Интенсивность была минимальна в области рН $\approx 6-7$ и увеличивалась при изменении рН в обе стороны. Рост сигнала в кислотной области соответствовал результатам измерения оптических спектров поглощения и фотопотенциалов (^{3, 8}) и свидетельствовал о том, что слабокислая среда благоприятствует способности хлорофилла к фотоокислению. В щелочной области увеличение интенсивности светового сигнала э.п.р., скорее всего, отражало фотовосстановление пигмента восстановленными формами хинона. При рН 3,5 можно было заметить наряду со спектром э.п.р. семихинона синглетный сигнал, который можно было бы приписать катион-радикалу хлорофилла, однако показать это однозначно не удалось.

В данной работе мы предприняли попытку использовать для обнаружения катион-радикала хлорофилла реакцию его с *m*-динитробензолом. Нитросоединения неоднократно применялись для изучения фотореакций хлорофилла (^{9, 10}). В работе (⁸) с использованием электрометрических методов обнаружено следующее отличие хода фотореакции хлорофилла с пнитробензолом от хода реакции с хиноном. И в том и в другом случае течение реакции зависело от величины рН раствора. Наибольший положительный фотопотенциал был при рН около 4 и уменьшался при повышении рН. Однако, если в случае хинона при достижении рН 5,5—6 положительный фотопотенциал исчезал и затем переходил в отрицательный, то в случае нитросоединений он оставался положительным даже при рН ~ 9 , хотя и сильно уменьшался.

Можно было думать, что в использованных условиях, если растворы нитробензола и содержат его восстановленную форму, то она не реагирует фотохимически с хлорофиллом. Подобное различие давало основание

надеяться, что зависимость концентрации парамагнитных продуктов от рН среды при освещении системы хлорофилл — нитробензол будет отличаться от аналогичной зависимости в системе хлорофилл — хинон.

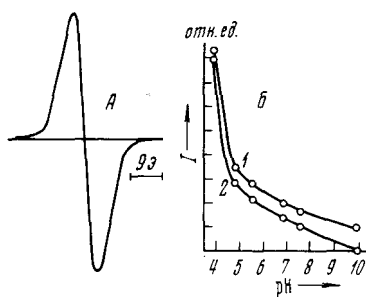


Рис. 1. А — сигнал э.п.р. катион-радикала хлорофилла а, образующегося при освещении этанолового раствора хлорофилла а и м-динитробензола при -15°C и рН 4–10. Б — зависимость интенсивности сигнала э.п.р. катион-радикалов хлорофилла а от значений рН среды во время освещения (1) и после выключения света (2)

Температура препарата ($\pm 2^{\circ}$) регулировалась скоростью паров азота, пропускаемых через специальный сосуд Дьюара в резонаторе спектрометра.

При освещении красным светом этанолового раствора хлорофилла а, содержащего м-динитробензол, при -15° мы наблюдали синглетный сигнал э.п.р. с полушириной ~ 9 э и g -фактором, близким к g -фактору свободного электрона (рис. 1А). Температура -15° выбрана нами по следующим причинам. Повышение температуры до комнатной приводило к уменьшению интенсивности сигнала э.п.р. При понижении же температуры до -100° сигнал увеличивался по интенсивности, однако при столь низких температурах невозможно наблюдать сверхтонкое расщепление в спектре.

Поскольку с самого начала не было ясно, какой формы сигнал мы должны наблюдать, мы выбрали температуру -15° . К тому же из наших опытов с хлорофилл-хиноновой системой ⁽³⁾ выяснилось, что температура -15° является в некотором смысле оптимальной: при этой температуре структурированный сигнал радикала семихинона еще не уширился и имел наибольшую интенсивность.

Интенсивность синглетного сигнала э.п.р. зависела от кислотности среды, что видно из рис. 1Б, где показана зависимость от рН интенсивности сигнала э.п.р., наблюдаемого при освещении хлорофилл-нитробензольного раствора. Если сравнить кривые рис. 1Б с соответствующими кривыми, полученными для системы хлорофилл а — *n*-бензохинон ^(7, 12), то можно констатировать, что в слабокислой среде ход зависимости интенсивности сигнала э.п.р. от значений рН среды в обоих случаях одинаков. В щелочной же среде, если в системе хлорофилл — хинон при повышении рН от 7 до 10 происходит увеличение интенсивности сигнала э.п.р., в системе хлорофилл — динитробензол,

Хлорофилл а получали путем экстракции из сухого порошка крапивы с последующей очисткой на хроматографических колонках из сахарозы ⁽¹¹⁾, а м-динитробензол марки ч.д.а. употреблялся без дальнейшей очистки. Исследуемые растворы в этаноле содержали хлорофилл в концентрации $4 \cdot 10^{-5}$ мол/л и м-динитробензол в концентрации 10^{-3} мол/л. Величину рН растворов изменяли прибавлением разбавленного раствора HCl или аммиака. Измерение рН производили при помощи стеклянного электрода, калиброванного по водным буферным растворам. Спектры э.п.р. снимали на отражательном спектрометре 3-сантиметрового диапазона. Растворы помещали в кварцевые трубки диаметром 3 мм, откачивали до 10^{-3} тор и освещали в резонаторе спектрометра светом ртутной лампы сверхвысокого давления СВДШ-1000 через светофильтр КС-13 ($\lambda > 630$ мμ).

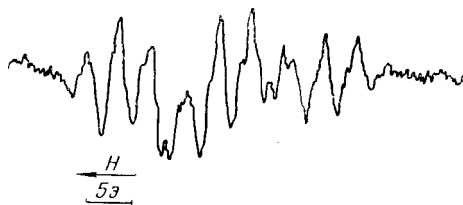


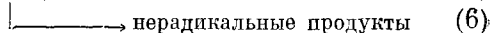
Рис. 2. Сигнал э.п.р. радикалов, образующихся при освещении красным светом этанолового раствора хлорофилла а и м-динитробензола, рН 11

наоборот, его интенсивность постепенно уменьшается, что согласуется с малой активностью фотореакции хлорофилла с нитросоединениями в этом интервале значений рН⁽⁸⁾.

В сильно щелочной среде, при $\text{pH} \geq 11$, при облучении красным светом смеси хлорофилл — динитробензол возникал структурный сигнал (рис. 2), принадлежащий, по-видимому, анион-радикалу *m*-динитробензола или, во всяком случае, продуктам его разложения⁽¹³⁾. Для выяснения условий существования анион-радикала *m*-динитробензола мы исследовали фотолиз динитробензола под действием ультрафиолетового света в зависимости от значений рН среды. Оказалось, что спектр э.п.р. продуктов фотолиза динитробензола, в число которых входит и анион-радикал, регистрируется только в сильно щелочной среде. Отсюда можно сделать вывод, что в условиях наших экспериментов анион-радикалы *m*-динитробензола не дают вклада в наблюдаемый спектр э.п.р. в области значений рН от 4 до 10.

Таким образом, оказывается весьма вероятным предположение, что за синглетный сигнал э.п.р., возникающий под действием красного света в системе хлорофилл — *m*-динитробензол в кислых и нейтральных средах ответственны катион-радикалы хлорофилла. Это заключение подтверждает также следующий факт. Спектр поглощения окисленного соединения хлорофилла, полученного при освещении смеси хлорофилла а с *m*-динитробензолом или с *n*-бензохиноном, совпадает со спектром катион-радикала хлорофилла, полученным Боргом с сотрудниками⁽¹⁴⁾ полярографическим методом. Спектр э.п.р. катион-радикала хлорофилла, измеренный в⁽¹⁴⁾, представляет собой синглетный сигнал с полушириной 9 э и $g = 2,0025$, т. е. с параметрами, соответствующими параметрам синглетного сигнала, наблюдавшегося и нами в данной работе.

Мы получили некоторые кинетические характеристики реакции фотохимического окисления хлорофилла *m*-динитробензолом (рис. 3). Вид кривых рис. 3 можно легко объяснить, если обратиться к следующим схемам реакций:



Здесь Хл^* — хлорофилл в возбужденном синглетном или триплетном состоянии, Хл^+ — катион-радикал хлорофилла, НБ^- — анион-радикал *m*-динитробензола. Видно, что после выключения света имеются две фазы исчезновения сигнала: быстрая и медленная. За быструю фазу ответственна, по-видимому, реакция (3), за медленную — реакции (4), (5) и (6). Из схемы ясно, почему мы наблюдали зависимость сигнала э.п.р. от значений рН среды.

В самом деле, в кислой среде реакция (4) ускоряется, в результате чего концентрация анион-радикалов нитробензола уменьшается и становится столь малой, что не наблюдается сигнала э.п.р. При сдвиге же кислотно-основного рав-

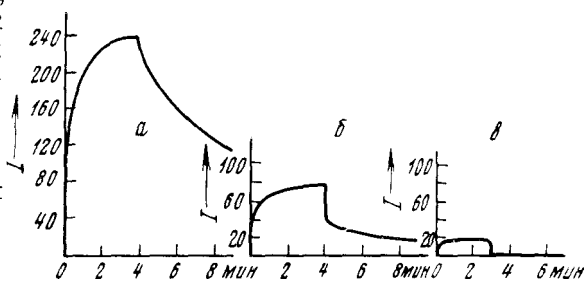


Рис. 3. Кинетика возникновения и исчезновения сигнала э.п.р., образующегося при освещении красным светом этанолового раствора хлорофилла а и *m*-динитробензола. Значения рН: а — 4, б — 6, в — 10

новесия в щелочную область реакция (4) все более и более замедляется и, наконец, при $\text{pH} \geq 11$ концентрация анион-радикалов достигает столь большой величины, что можно наблюдать их спектр э.п.р. В противоположность этому, зависимость концентрации анион-радикалов хинона от значений pH среды значительно менее выражена: спектр э.п.р. радикалов хинона легко регистрируется при значениях pH вплоть до 3—4 ⁽¹⁵⁾.

Следует отметить, что в экспериментах, где можно ожидать возникновения двух сортов парамагнитных частиц, необходимо учитывать условия записи спектров э.п.р., в особенности величину амплитуды высокочастотной модуляции магнитного поля. Так, в наших опытах для наблюдения спектров э.п.р. радикалов нитробензола или радикалов бензохинона ⁽⁷⁾ амплитуду высокочастотной модуляции приходилось уменьшать до 0,3 э и меньше, при этом амплитуда синглетного сигнала с полушириной 9 э уменьшается в 10—20 раз по сравнению с амплитудой того же сигнала, записанного при модуляции 9 э, т. е. чувствительность спектрометра также уменьшается в 10—20 раз. Из сказанного ясно, почему попытки наблюдать спектр э.п.р. катион-радикалов хлорофилла в системе хлорофилл — бензохинон окончились неудачей как в нашей работе ⁽⁷⁾, так и в работах американских исследователей ⁽⁴⁻⁶⁾.

Институт фотосинтеза
Академии наук СССР

Поступило
6 IV 1971

Институт биологической физики
Академии наук СССР
Пушкино-на-Оке

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ В. Б. Евстигнеев, В сборн. Молекулярная фотоника, «Наука», 1970, стр. 178.
- ² V. B. Evstigneev, In: Progress in Photosynthesis Research, Tubingen, 1969, p. 733.
- ³ В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова, ДАН, **165**, 1435 (1965); Биофизика, **11**, 593 (1965).
- ⁴ G. Tollin, G. Green, Biochem. et biophys. acta, **60**, 524 (1962); **66**, 308 (1963); Photochem. Photobiol., **5**, 593 (1965).
- ⁵ D. H. Cho, G. Tollin, Photochem. Photobiol., **8**, 317 (1968).
- ⁶ D. C. Mukherjee, D. H. Cho, G. Tollin, Photochem. Photobiol., **9**, 273 (1969).
- ⁷ В. Б. Евстигнеев, Н. А. Садовникова и др., Биофизика, **16**, 431 (1971).
- ⁸ В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова, Н. А. Садовникова, Биохимия, **31**, 1229 (1966).
- ⁹ И. И. Дилуг, И. Н. Чернюк, ЖФХ, **37**, 1100 (1963).
- ¹⁰ И. Н. Чернюк, И. И. Дилуг, ДАН, **165**, 1350 (1965).
- ¹¹ E. P. Zscheile, C. L. Comar, Bot. Gaz., **102**, 463 (1941).
- ¹² В. Б. Евстигнеев, Биофизика, **15**, 239 (1970).
- ¹³ W. E. Griffiths, C. J. Gutch et al., J. Chem. Soc., **7B**, 785 (1968).
- ¹⁴ C. D. Borg, J. Fajer et al., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., **67**, 813 (1970).
- ¹⁵ J. C. P. Smith, A. Carrington, Mol. Phys., **12**, 439 (1967).