

BBA 45505

DAS CHLOROPHYLL-RADIKAL, GENERIERT DURCH POLAROGRAPHISCHE REDUKTION

H. BERG UND K. KRAMARCZYK

Deutsche Akademie der Wissenschaften zu Berlin, Institut für Mikrobiologie und experimentelle Therapie, Abteilung Biophysikochemie, Jena (D.D.R.)

(Eingegangen am 18. März, 1966)

(Revidiertes Manuskript eingegangen am 18. Juli, 1966)

SUMMARY

The chlorophyll radical, generated by polarographic reduction

Using the polarographic KALOUSEK commutator technique the chlorophyll radical has been generated by reversible addition of an electron. In aqueous solvents a proton may subsequently be taken up. The radical is adsorbed to some extent on the surface of the dropping-mercury electrode.

It is also possible to estimate the life-time of the radical from the dependence of radical oxidation current on alternating current frequency. An obvious reduction mechanism is indicated.

EINLEITUNG

Für die Funktionen der Chlorophylle im Photosynthesesyklus sind ihre Radikale als Elektronenüberträger von ganz entscheidender Bedeutung. Daher hat es nicht an Bemühungen gefehlt, ihre Existenz *in vitro* nachzuweisen und ihre Eigenschaften kennenzulernen. Blitzspektroskopisch konnte das durch Elektronenaufnahme verursachte Radikalspektrum photographiert werden¹. Hingegen wird das ESR-Spektrum in belichteten Gemischen von Chlorophyll und Wasserstoffdonatoren verschieden interpretiert^{2,3}.

Der Radikalnachweis auf polarographischen Wegen gelang erst in jüngster Zeit. Hierbei sind zu unterscheiden (a) das durch Oxydation⁴ an der rotierenden Platinelektrode erhaltene positive Radikal und (b) das durch Reduktion^{5,6} an Quecksilbertropfelektroden nachgewiesene negative Radikal.

In vorliegender Mitteilung wird über die kurzzeitige elektrolytische Generierung des negativen Radikals und einige seiner Eigenschaften berichtet.

EXPERIMENTELLES

Die Chlorophyllproben waren teils selbst aus Blättern von *Spinacia oleracea* oder *Urtica dioica*, sowie aus photosynthetisierenden Bakterien (*Rhodospirillum rubrum*) isoliert oder kommerzieller Herkunft (Chlorophyll-*a* und -*b* von Serva, Heidelberg). Die Messungen erfolgten mit Lösungen der 10^{-4} M Farbstoffe in: (1) 60

Volumenprozent Isopropanol (Aceton, Methanol, Acetonitril) mit Phosphatpuffer oder 0.1 M NaOH; (2) 100 Prozent Dimethylformamid oder Dimethylsulfoxid mit LiCl als Leitsalz und Bodenquecksilber oder Normalkalomelektrode als Gegenelektrode. Die Quecksilbertropfelektrode in der temperierbaren Messzelle konnte auf verschiedene Tropfzeiten eingestellt werden.

Ein Umschalter nach KALOUSEK, der mit 1.6–5.5–9.2–20 Hz zwischen einem konstanten Generierungspotential und dem jeweiligen Registrierpotential oszillierte, diente zur kurzzeitigen Bildung von Reduktionsprodukten. In der Umschalttechnik unterscheidet man: (a) die klassische Ausführungsform nach KALOUSEK⁷ unter Registrierung gemittelter Ströme, (b) die periodische oszillographische Aufzeichnung von Momentanströmen⁸ und (c) eine Potentialeinzelspannungsmethode, wie sie KOOPMANN⁹ verwendet hat.

In jedem Falle ermöglicht die dabei registrierte Strom–Spannungs- oder Strom–Zeit-Kurve Rückschlüsse auf die Reversibilität von Zwischenprodukten der Elektrodenreaktion. In vorliegender Arbeit machten wir von (a) und (c) gebrauch. Bei (a) ist während der Regenerierung der Stromkreis unterbrochen. Das Polarogramm erfasst alle Depolarisatoren, ohne durch den Generierungsprozess beeinflusst zu werden. Bei (c) erfolgt der einmalige Potentialsprung vom Generierungspotential auf das Registrierpotential vor den Reduktionsstufen einer der Chlorophyllstufen. Die Umschaltdauer der Relais beträgt etwa 10^{-2} sec. Der nicht unbeträchtliche Kapazitätsstrom muss bei der Grundlösung ermittelt und bei der Auswertung der Strom–Zeit-Kurven berücksichtigt werden.

ERGEBNISSE

Die Strom–Spannungskurven (Polarogramme) der Chlorophylle in gleichem Medium sind sich ähnlich. Betrachtet man jedoch nur eines der Chlorophylle in verschiedenen Lösungsmitteln, so zeigt sich eine beträchtliche Formenvielfalt der Polarogramme, was auf Adsorptionsvorgänge und Zwischenreaktionen an der Elektrodenoberfläche schliessen lässt. Abb. 1 zeigt zwei Beispiele für das Chlorophyll-*a* in den Medien: (a) wässrig-alkoholische Pufferlösung und (b) neutralsalzhaltiges Dimethylsulfoxid.

Die Ausbildung der beiden Hauptstufen mit kleiner Vorstufe wird durch die

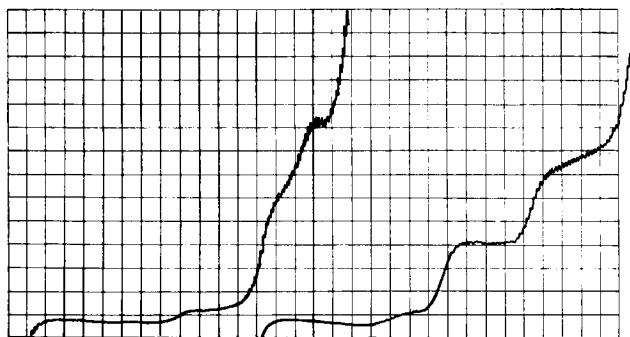


Abb. 1. Gleichspannungs-Polarogramme von Chlorophyll-*a* ($2 \cdot 10^{-4}$ M). Links: Leerlösung 80 % Isopropanol–0.1 M $\text{CH}_3\text{COONH}_4$. Rechts: Leerlösung 100 % Dimethylsulfoxid–0.04 M LiCl. Beginn ab 0 V, Potentialmarkenabstand 0.1 V (Radiometer Polarograph PO-4).

reduktive Bildung eines Chlorophyllradikals beträchtlicher Stabilität (Halbstufenpotentialdifferenz zwischen beiden einelektronigen Stufen bei Chlorophyll-*a*: 0.45 V) und seine bevorzugte Adsorption verursacht. Demgegenüber ist der Verlauf der Polarogramme mit wasserhaltigen Grundlösungen oftmals komplizierter, zumal die zweite Hauptstufe deformiert wird und näher an die erste heranrückt (Abb. 1), die sich mit steigendem pH-Wert um ca. 60 mV/pH negativiert.

Die Lage der betreffenden Halbstufenpotentiale ($\pi_{1/2}$) (in 60 % Isopropanol, Phosphatpuffer vom Ausgangs-pH-Wert 7, Bezugselektrode: NCE) erstreckt sich über einen breiten Potentialbereich, wobei darauf hinzuweisen ist, dass sich die Aldehydgruppe von Chlorophyll-*b* infolge Hydratisierung nicht gesondert bemerkbar macht.

	$(\pi_{1/2})_1 (V)$	$(\pi_{1/2})_2 (V)$	$(\pi_{1/2})_3 (V)$
Chlorophyll- <i>a</i>	—0.85	—1.3	—1.5
Chlorophyll- <i>b</i>	—0.85	—1.35	—1.55
Bakteriochlorophyll	—0.70	—1.05	—1.55

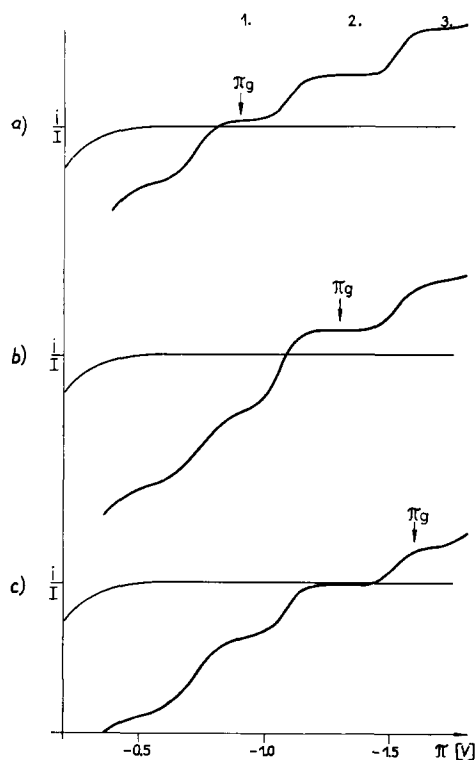


Abb. 2. Umschalter-Polarogramme von Chlorophyll-*a* ($2 \cdot 10^{-4}$ M in 100 % Dimethylsulfoxid-0.04 M LiCl) mit unterschiedlichen Einstellungen des Generierungspotentials π_g . (a) Das Generierungspotential ist auf den Grenzstrom der Vorstufe (1.) eingestellt ($\pi_g = -0.9$ V). (b) Das Generierungspotential ist auf den Grenzstrom der ersten Hauptstufe (2.) eingestellt ($\pi_g = -1.4$ V). (c) Das Generierungspotential ist auf den Grenzstrom der 2. Hauptstufe (3.) eingestellt ($\pi_g = -1.6$ V).

Daher sind auch die Umschalter-Polarogramme in "wasserfreiem" Dimethylsulfoxid am ausgeprägtesten. Die Einstellung des konstanten Generierungspotentials erfolgte einzeln auf die kleine Vorstufe i_1 und beiden Hauptstufen i_2 und i_3 (Abb. 2), wodurch partielle Reduktionen während einer Umschalthalbperiode ausgelöst werden. Das während der Registrierperiode gewonnene Polarogramm zeigt die Oxydationsströme der reversibel oder irreversibel reoxydierbaren Elektrodenprodukte an. Bei den Generierungspotentialen π_g werden folgende Oxydationsströme I gefunden und zwar: π_g auf der Vorstufe i_1 (Abb. 2a): relativ hoher reversibler Oxydationsstrom I_1 ; π_g auf der Hauptstufe i_2 (Abb. 2b): I_1 und der reversible Oxydationsstrom I_2 ; π_g auf der Hauptstufe i_3 (Abb. 2c): $I_1 + I_2$. I_1 verhält sich so ähnlich wie die bekannte Vorstufe bei Methylenblau. Seine Höhe wird in nichtwässrigem Medium durch Temperatur- oder Umschaltfrequenzeinflüsse weniger geändert als in wässrigem. Die Differenz zwischen den Halbstufenpotentialen von I_1 und I_2 ist mit 0.3 V (Dimethylsulfoxid) und 0.4 V (wässriges Aceton) jedoch grösser als beim Methylenblau 0.25 V (Wasser).

I_2 nimmt mit steigender Temperatur in wässriger Lösung stark ab und wächst mit steigender Frequenz stärker an als die entsprechende Oxydationsstufe des stabilen Perinaphthenonradikals (bei pH 13), wie aus den Relativwerten (in Klammern die für Perinaphthenon) deutlich wird.

	1.6 Hz	5.5 Hz	9.2 Hz
$\frac{I_2}{i_2} =$	1 (1)	2.9 (1.4)	3.4 (1.8)

Der Wassergehalt in der Grundlösung wirkt sich auf Höhe und Steilheit von I_2 ungünstig aus.

DISKUSSION

Das negative Radikal des Chlorophylls wurde reduktiv generiert, um seine charakteristischen Eigenschaften studieren zu können. Seine Reoxydation unter Abgabe eines Elektrons verläuft in zwei reversiblen Stufen (I_1 und I_2), und zwar zuerst aus dem adsorbierten Zustand und anschliessend als freies Radikal. Aus der Umkehrung der Höhenverhältnisse von den Oxydations- (I) und Reduktions- (i)-strömen

$$\frac{I_1}{I_2} \gg \frac{i_1}{i_2} \quad (1)$$

lässt sich aus dem Vergleich zur umgeschalteten Adsorptionsstufe von Methylenblau schliessen, dass die an der Elektrodenoberfläche adsorbierten Chlorophyllradikale gegenüber denen in der Diffusionsschicht verweilenden stabilisiert werden. Aus dem Frequenzgang für I_2/i_2 lässt sich weiterhin abschätzen, dass die Halbwertszeit $\tau_{1/2}$ des Radikals im Bereich $0.1 > \tau_{1/2} > 0.01$ sec liegt. Eine quantitative Bestimmung von $\tau_{1/2}$ unter den verschiedenen Bedingungen, insbesondere Temperaturabhängigkeit, wird jedoch erst mit Hilfe der oszillographischen Umschalttechnik⁸ möglich. Vorläufige Bestimmungen ergaben einen Näherungswert ≈ 0.11 sec an der oberen Grenze. Für das reduktive Chlorophyll-Radikal stehen bisher kaum Vergleichsdaten aus anderen Untersuchungen zur Verfügung. Dennoch kann der $\tau_{1/2}$ -Wert¹ des photochemisch generierten Chlorophyll-*a*-Radikals (10^{-6} M in Gegenwart von Ascorbinsäure und

Pyridin, 1 % Wasser; 20°) zum Vergleich herangezogen werden. Aus der nach Blitzbelichtung resultierenden Absorptionsänderung bei 435 nm wurde für $\tau_{1/2} = 0.05$ sec ermittelt. Zieht man in Betracht, dass bei der Potential-Umschaltmethode die adsorbierten Radikale auf Grund ihrer höheren Lebensdauer mitbestimmend sind, so darf man annehmen, dass es sich in beiden Fällen um das gleiche Radikal handelt. Es erhebt sich nun die Frage nach dem Mechanismus der Elektrodenreaktion einerseits und der Weiterreaktion des Radikals andererseits.

Die Elektrodenreaktion

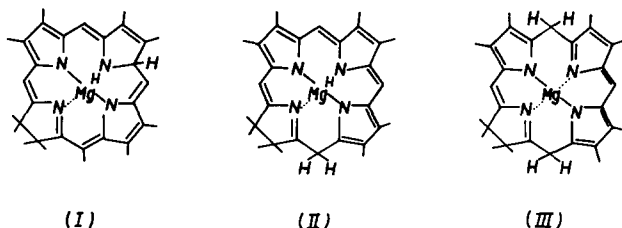
Für den Molekülteil, in dem das 1. Elektron aufgenommen wird, gibt es mehrere Möglichkeiten. Aus dem Vergleich mit Chlorophyllinen geht hervor, dass der Ring V keine so entscheidende Rolle als Akzeptor spielen kann. Am wahrscheinlichsten hebt das erste Elektron zunächst eine Doppelbindung an einem Heteroatom auf, wie es in den allermeisten Fällen bei reversiblen Teilverlauf gefunden wurde und ist dann im gesamten Konjugationssystem delokalisiert.



In wässrigen Lösungen wird schliesslich noch ein Proton addiert. Erst danach führt das zweite Elektron zur Unterbrechung der Gesamtkonjugation und zur Bildung einer Dihydroverbindung.

Die Radikalreaktion

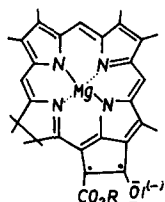
In einem inerten Lösungsmittel wäre eine Radikaldisproportionierung 2. Ordnung als Weiterreaktion zu erwarten. Vom Chlorin ausgehend sind grundsätzlich 3 Produkte mit ihren Isomeren zu diskutieren:



In jedem Fall wird die Gesamtkonjugation unterbrochen. Nach SEELY UND FOLKMANIS¹⁰ spricht das Spektrum für die Strukturen (II) oder (III), wobei in Gegenwart von Mg^{2+} die Form (III) angenommen wird. CLOSS¹¹ formuliert dagegen trotz Anwesenheit eines Zentralatoms (Zn^{2+} oder Mg^{2+}) bei seiner Untersuchungsreihe an Tetraphenylporphinen aufgrund von Kernresonanzspektren eine Phlorin-Struktur analog (II). JÄGER¹² bewies für in schwerem Wasser coulometrisch reduzierte Chlorine aufgrund von Kernresonanzspektren die Struktur (II). Da er beim Potential der ersten Stufe an einer grossen Fläche elektrolysierte, isolierte er das Disproportionierungsprodukt (II):



so dass noch nicht einwandfrei feststeht, ob das Reduktionsprodukt beim Potential der 2. Stufe ebenfalls mit (II) identisch ist oder zunächst Struktur (I) entsteht. Demgegenüber haben FELTON, SHERMAN UND LINSCHITZ¹³ spektroskopische Hinweise, dass bei elektrolytischer Reduktion von Chlorophyll in Dimethylsulfoxid unter Abspaltung eines H-Ions das bekannte Phasentestprodukt (IV) entsteht. Da letzterer Vorgang im Gegensatz zu (3) pseudomonomolekular ablaufen müsste, ist eine Entscheidung über den Mechanismus der chemischen Radikalreaktion und damit zwischen (II) und (IV)



(IX)

auch von kinetischer Seite zu erwarten. Soviel steht nunmehr fest, dass vorliegendes reduktive Chlorophyllradikal in wasserhaltigen Lösungen instabiler (Halbstufenpotentialdifferenz 0.25 V) als in nichtwässrigen ist (Halbstufenpotentialdifferenz 0.43 V) und allgemein eine wesentlich kürzere Halbwertszeit aufweist, als das oxydativ⁴ entstandene, welches im Photosyntheseyklus die bedeutendere Rolle zu spielen scheint.

ZUSAMMENFASSUNG

Mit Hilfe der polarographischen Umschaltertechnik nach KALOUSEK wird das Chlorophyll-Radikal durch reversible Addition eines Elektrons generiert. In wasserhaltigen Grundlösungen wird ausserdem ein Proton aufgenommen. Das Radikal adsorbiert sich an der Elektrodenoberfläche.

Aus dem Oxydationsstrom in Abhängigkeit von der Umschaltfrequenz liess sich die Radikal-Lebensdauer abschätzen. Ein plausibler Reduktionsmechanismus wird diskutiert.

LITERATUR

- 1 G. ZIEGER UND H. T. WITT, *Z. Physik. Chem. Frankfurt*, 28 (1961) 286.
- 2 A. A. KRASNOVSKY, in B. CHR. CHRISTENSEN AND B. BUCHMANN, *Progress in Photobiology*, Elsevier, Amsterdam-London-New York-Princeton, 1961, S. 561.
- 3 S. S. BRODY, G. NEWELL UND T. CASTNER, *J. Phys. Chem.*, 64 (1960) 554.
- 4 A. STANIENDA, *Z. Physik. Chem. Leipzig*, 229 (1965) 257.
- 5 H. BERG, *Tagungsbericht Biophysik (Wien)*, 14-16 Sept., 1964.
- 6 K. KRAMARCZYK UND H. BERG, *III. Jena. Symp. (1965), Elektrochemische Methoden und Prinzipien in der Molekular-Biologie*, Akad. V. Berlin, 1966, S. 363.
- 7 M. KALOUSEK, *Collection Czech. Chem. Commun.*, 13 (1948) 105.
- 8 H. BERG, E. BAUER UND D. TRESSL, in I. S. LONGMUIR, *Advances in Polarography*, Pergamon Press, Oxford-London-New York-Paris, 1960, Bd. 1, S. 382.
- 9 R. KOOPMAN, *Ber. Bunsenges. Physik. Chem.*, 70 (1966) 121.
- 10 G. R. SEELY UND A. FOLKMANIS, *J. Am. Chem. Soc.*, 86 (1964) 2763.
- 11 G. L. CLOSS UND L. E. CLOSS, *J. Am. Chem. Soc.*, 85 (1963) 818.
- 12 P. JÄGER, Dissertation an der Technischen Hochschule zu Braunschweig, 1965.
- 13 R. FELTON, G. M. SHERMAN UND H. LINSCHITZ, *Nature*, 203 (1964) 637.