

О НЕРАВНОВЕСНОМ ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНОМ ПОТЕНЦИАЛЕ

Н. И. Некрасов

В настоящее время одним из самых актуальных вопросов учения об окислительно-восстановительном (редокс¹⁾) потенциале является вопрос о смысле и значении редокс-потенциала, определяемого в неравновесных и необратимых редокс-системах. Чтобы охарактеризовать важность этого вопроса, достаточно напомнить, что неравновесным является подавляющее большинство биохимических и биологических редокс-систем (растворы большинства органических веществ, способных к окислению-восстановлению, многие бактериальные культуры, тканевые жидкости и т. п.). В то же время вся теория редокс-потенциалов, базирующаяся на положениях классической электрохимии, непосредственно приложима в сущности лишь к обратимым равновесным редокс-системам (в том числе и новые отрасли теории, как, например, положения о редокс-буферности и др.). В результате создается своеобразный „разрыв“ между теорией редокс-потенциала и тем экспериментальным материалом, с которым приходится иметь дело биологической физико-химии.

Некоторые авторы — прежде всего Вюрмзер^{1,2} склонны „свести“ проблему редокс-потенциалов в неравновесных системах к обычным основным представлениям о равновесных потенциалах.

Выдвигается предположение, что восстановитель, — например глюкоза, — способен переходить в особую, активную (для редокс-реагирования) форму, причем скорость такого перехода весьма мала, а эта активная форма уже может давать обратимую редокс-пару, которая и диктует редокс-потенциал системы. Такой подход, в сущности, лишь обходит вопрос о физико-химическом значении неравновесных редокс-потенциалов. Как мы увидим дальше, редокс-потенциал может принимать неравновесный характер даже в присутствии заведомо обратимых „редокспар“, если только скорость реагирования их компонентов мала.

Другие авторы^{3,4} более настойчиво подчеркивают неравновесную, кинетическую природу потенциалов, „устанавливающихся“ в необратимых биохимических редокс-системах, но и они ограничиваются, в сущности, отрицанием термодинамического значения этих потенциалов и указанием, что все же они в некоторых случаях могут служить, — очевидно, чисто эмпирической — характеристикой редокс-состояния системы.

¹⁾ В дальнейшем термин „редокс“ в этой статье будет употребляться вместо „окислительно-восстановительный“.

Стационарный характер неравновесного редокс-потенциала и вывод выражения для него

Чтобы осветить физический смысл редокс-потенциала, измеряемого в неравновесной и необратимой редокс-системе, вспомним, как протекает процесс формирования определенного потенциала на индиферентном электроде, опущенном в водную редокс-систему.

Несомненно, что в водной среде любому потенциалу индиферентного электрода, т. е. электрода, вещество которого само по себе не может влиять на электродный потенциал (обычно платиновый или золотой электроды), отвечает определенная степень насыщения его поверхности водородом или кислородом за счет обмена зарядами между электродом и H^+ - или OH^- -ионами, или же путем обмена H (или O) атомами между электродом и редокс-веществами, если последние способны к непосредственному отщеплению (или присоединению) водорода или кислорода в порядке редокс-реагирования ¹⁾.

Как бы ни проходил процесс насыщения поверхности электрода водородом (кислородом), он идет до тех пор, пока он не компенсируется противоположным процессом, уводящим водород (кислород) с электрода.

Ox-форма и *red*-форма ²⁾ при своем „реагировании“ с электродом (т. е. при образовании потенциала на нем) взаимно регенерируют друг друга, что и является основным признаком истинного (подвижного) химического равновесия.

В системе же необратимой, — например, *Ox*-форма цистеина, — цистин не может „забирать“ водород с электрода и вообще не восстанавливается в обычных условиях, тогда как *red*-форма — цистеин, так или иначе реагирует с электродом, сдвигает его потенциал в отрицательную сторону. Но ограничивать это смещение потенциала будут, очевидно, какие-то процессы, отнюдь не ведущие уже к регенерации исходной *red*-формы, но лишь противоположные по результатам своего действия на электрод. На электроде создается типичное стационарное состояние ¹⁴.

Рассмотрим вначале простой и наиболее обычный случай, когда реакционноспособных *Ox*-форм в редокс-системе совсем нет. Тогда электродный потенциал может смещаться в положительную сторону, во-первых, под влиянием молекулярного кислорода, если последний имеется, или в окружающей электрод среде, или

¹⁾ Это, разумеется, не противоречит „электронным“ схемам редокс-процессов (вроде: $Fe^{+++} + e \rightleftharpoons Fe^{++}$), так как всякое изменение плотности зарядов двойного слоя на электроде, погруженном в водный раствор, неразрывно связано с изменениями в концентрации („активности“) адсорбированных на его поверхности электрохимически активных веществ — прежде всего водорода и кислорода.

²⁾ В дальнейшем везде редуцированная форма окислительно-восстановительного реагента будет обозначаться символом *Red*, а его концентрация — $[Red]$ — для необратимо или медленно реагирующих редокс-веществ; для веществ, реагирующих быстро и обратимо, редуцированная форма — *red* и ее концентрация — C_{red} . Соответственно этому окисленная форма будет обозначаться *Ox*, а ее концентрация $[Ox]$ и C_{ox} . Таким образом под *Red* могут быть подразумеваемы: цистин, сахар, молочная кислота (из редокс-пары: пировиноградная — молочная кислота) и т. п. Под *red* (и C_{red}) — Fe^{++} -ионы (из редокс-пары Fe^{++}/Fe^{+++}), лейкобаза метиленовой сини и, вообще — редуцированная форма обратимого редокс-индикатора.

растворен в металле самого электрода, во-вторых, благодаря оттоку водорода с электрода — путем ли прямой диффузии в окружающую среду или путем рекомбинации в H_2 -молекулы с последующей их диффузией.

Электродный потенциал достигает устойчивой величины, т. е. станет предельным потенциалом, выражаясь по Михаэлису, тогда, когда суммарная скорость этих процессов окажется равной скорости смещения потенциала в отрицательную сторону неравновесной *Red*-формой, например, цистеином.

Допустим, — в соответствии со сказанным выше, — что потенциал электрода определяется поверхностной концентрацией водорода на нем — C_H , т. е.

$$E = \frac{RT}{F} \ln \frac{[H^+]}{a \cdot C_H} + E_0, {}^1) \quad (1)$$

где $[H^+]$ — концентрация H^+ -ионов в растворе, E_0 — постоянная („нормальный потенциал“).

Выразим алгебраически зависимость C_H от различных факторов, для простейшего случая, когда скорость „отвода“ водорода с электрода определяется, главным образом, окислением его молекулярным кислородом, растворенным в окружающей среде. Тогда

$$\frac{dC_H}{dt} = K_1 [Red] - K_2 \cdot C_H [O_2], \quad (2)$$

где $[O_2]$ — концентрация кислорода в растворе, K_1 — константа скорости реакции $Red = (Ox) + H$, (Ox) — неактивная *Ox*-форма, K_2 — константа скорости реакции окисления водорода кислородом на поверхности электрода.

При достижении стационарного состояния, т. е. при достижении стационарного „предельного“ потенциала, должно иметь место

$$\frac{dC_H}{dt} = 0, \text{ т. е. } K_1 [Red] = K_2 C_H [O_2];$$

$$C_H = \frac{K_1 [Red]}{K_2 [O_2]} \text{ и, следовательно,}$$

$$E = \frac{RT}{F} \ln \frac{K_2 [O_2]}{K_1 [Red]} + \overbrace{\frac{RT}{F} \ln [H^+]}^{E_0'} + E_0. \quad (3)$$

На первый взгляд может показаться, что это уравнение таково же, каким было бы обычное термодинамическое уравнение

¹⁾ Здесь мы не ставим вопроса, находится ли на поверхности электрода водород в атомарной или в молекулярной форме; поэтому числовая величина константы E_0 не рассматривается. Дальнейшие выкладки с успехом могли бы проводиться также и с уравнением вида

$$E = \frac{RT}{F} \ln \frac{[H^+]}{V[H_2]}.$$

для данного редокс-потенциала, если только считать, что роль *Ox*-формы играет кислород. На самом деле между нашим уравнением и обычным термодинамическим имеется глубокое различие. Именно — для обратимой реакции — константы скоростей прямого и обратного процессов, как известно, связаны между собой соотношением $\frac{K'}{K''} = K$, где K — константа равновесия реакции $Red \rightleftharpoons Ox + H$. Эта связь вытекает из закона действующих масс.

Тогда уравнение (3) можно бы переписать в следующем виде:

$$E = \frac{RT}{F} \ln \frac{K' [Ox]}{K'' [Red]} + E_0' = \frac{RT}{F} \ln \frac{[Ox]}{[Red] K} + E_0' = \frac{RT}{F} \ln \frac{1}{[H]} + E_0'. \quad (4)$$

Как видим, никакие кинетические факторы не отражаются на конечном потенциале равновесной редокс-системы.

В уравнении же, выведенном для неравновесной системы, константы K_1 и K_2 в общем случае не связаны между собою.

Ситуация, имеющая место при определении E_H в неравновесной редокс-системе — индикаторным методом — может быть разобрана с помощью выражений того же типа, какие использовали О. Варбург и Христиан⁵ для вывода зависимости степени окисления „желтого окислительного фермента“ от содержания кислорода в жидкости.

Обобщая выражения, выведенные ими для их специального случая, получаем следующее.

Положим, что C — общая концентрация редокс-индикатора равна $C_{Ox} + C_{red}$ и что скорость окисления восстановителя *Red* кислородом очень мала по сравнению со скоростью окисления его *Ox*-формой индикатора (так именно обычно и бывает в биохимических редокс-системах).

Тогда

$$-\frac{dC_{Ox}}{dt} = K_1 C_{Ox} [Red] - K_2 C_{red} [O_2],$$

где K_1 — константа скорости реакции между *Ox*-формой индикатора и восстановителем, содержащимся в системе; K_2 — константа скорости реакции между *red*-формой индикатора и кислородом.

При достижении стационарного состояния

$$K_1 C_{Ox} [Red] = K_2 C_{red} [O_2],$$

а так как

$$C_{red} = C - C_{Ox}$$

то

$$K_1 C_{Ox} [Red] = K_2 C [O_2] - K_2 C_{Ox} [O_2],$$

$$\frac{C_{Ox}}{C} = \frac{K_2 [O_2]}{K_1 [Red] + K_2 [O_2]}.$$

Как известно, $\frac{C_{Ox}}{C}$ — „степень окрашенности“ индикатора (*Färbungsgrad*), т. е. та величина, по которой в индикаторном методе рассчитывают редокс-потенциал. Как видим, величина эта в неравновесных системах самым непосредственным образом зависит от „кинетических факторов“: от констант скоростей реагирования индикатора с редокс-компонентами системы.

Итак, как бы ни измерять редокс-потенциал в неравновесной системе, измеренная величина неизбежно будет отражать не только концентрации редокс-компонентов и соотношение концентраций окислителей и восстановителей, но и кинетические характеристики системы — константы скоростей соответствующих редокс-реакций. Так как константы скоростей зависят от концентрации „ускорителей“: катализаторов, ферментов, то, например, прибавление к системе фермента, ускоряющего отщепление водорода от восстановителя, сдвинет измеряемый потенциал в отрицательную сторону совершенно так же, как и увеличение концентрации *Red*. Наоборот, появление фермента, ускоряющего окисление кислородом, т. е. увеличение K_2 , произведет эффект того же типа, как и увеличение концентрации самого кислорода.

Разумеется, сразу же встает вопрос: наблюдается ли такая зависимость на опыте. Оказывается, что ряд наблюдений, сделанных иногда с целями, посторонними данному вопросу, которые показывают, что фактический редокс-потенциал в стационарных (следовательно, неравновесных) системах явно зависит от скоростей соответствующих редокс-процессов. Из таких наблюдений отметим:

1. Снижение предельного редокс-потенциала в растворах цистеина при прибавлении к нему веществ, известных в качестве катализаторов его окисления (дегидрирования) ^{1,3}.

2. Снижение предельного редокс-потенциала в растворах ацетальдегида при прибавлении к нему препарата дегидразы ^{1,3}.

3. Зависимость „степени окрашенности“ желтого окислительного фермента Варбурга-Христиана (который функционирует как редокс-индикатор) от скорости поглощения кислорода раствором ⁵.

4. Ряд работ по внутриклеточному редокс-потенциалу ^{4,6,7}. Авторы прибавляли к водным суспензиям клеток весьма малые дозы веществ, известных как дезактиваторы тех или других редокс-энзиматических „аппаратов“ клеток. Оказалось, что реагенты, угнетающие окислительные энзимы (KCN, CO, H₂), резко снижают внутриклеточный редокс-потенциал в аэробных условиях и не влияют на него в анаэробных. Реагенты, отравляющие дегидрогеназы (этилуретан, натрий-пирофосфат), сдвигают аэробный предельный потенциал в положительную сторону. Аналогичные результаты получил Корр ⁸, определявший редокс-потенциал в культуре светящихся бактерий.

О физическом смысле E_H и iH_2 в неравновесных редокс-системах

Тот вывод выражения для E , который выше трактуется с точки зрения образования потенциала на электроде, целиком остается в силе и в отсутствии какого бы то ни было электрода. Тогда C_H будет концентрацией (или — при достаточно положительных потенциалах — „вероятностью появления“) водорода не на электроде, а непосредственно в самом растворе, именно:

$$C_H = \frac{1}{RT} \cdot 10^{-iH_2}.$$

Стационарный (предельный) редокс-потенциал является мерой

фактической работы, которую может совершить система при редокс-реагировании, если константы скоростей останутся при этом теми же, что и при измерении потенциала. Разумеется, эта работа не будет равна изменению свободной энергии системы, но это не мешает ей выражать собой фактическую интенсивность окислительного и восстановительного действия, на которое способна система при данных концентрациях редокс-веществ и при данных кинетических характеристиках.

По поводу физического смысла gH_2 (соответственно — gO_2) как в равновесных, так и в неравновесных системах необходимо добавить следующее: использование понятия gH_2 для характеристики редокс-состояния водного раствора вовсе не означает, даже и в случае равновесных систем, что элементарные акты восстановления производятся атомами (или молекулами) водорода. Несомненно, во многих случаях реакции восстановления проводятся непосредственно активными молекулами восстановителя *Red*, и таким образом gH_2 характеризует концентрацию (или вероятность появления) этих активных молекул.

Если же в качестве единственного восстановителя фигурирует газообразный водород, насыщающий данную среду, под тем или иным парциальным давлением p_{H_2} , то gH_2 в сущности лишь в том случае можно безоговорочно принимать равным $lg p_{H_2}$, если водород в любой точке системы способен ко всем тем же редокс-реакциям, как и водород, адсорбированный на поверхность платинированной платины, с помощью которой реализуется, как известно, „водородный электрод“. Если же такие свойства молекулярный водород в данной редокс-системе проявлять не может, то создается стационарное состояние, у которого эффективное gH_2 может и не совпадать с $lg p_{H_2}$.

Стационарный редокс-потенциал в системах обратимых, но медленно реагирующих

1. Все сказанное относится не только к необратимым редокс-системам. Совершенно такие же выводы имеют место и в отношении обратимых редокс-систем с медленно реагирующими компонентами, например, известных в биологической физико-химии редокс-пар: янтарная кислота — фумаровая кислота; пировиноградная — молочная, ацетальдегид — этиловый алкоголь и некоторые др. — даже если они активированы соответствующими ферментами. С помощью уравнений, аналогичных приведенным выше, легко показать, что редокс-потенциал в таких системах будет стационарным и, как таковой, будет заметно зависеть от кинетических факторов и от концентрации O_2 , если окисленная форма какого-либо из упомянутых выше веществ (например, альдегид, фумаровая кислота и др.) реагирует (окисляет) не быстрее или лишь немногим быстрее, чем кислород.

2. Медленность редокс-действия таких веществ (даже в присутствии не только фермента, но и „посредника“ какого-либо редокс-индикатора) может быть охарактеризована следующими примерами: по данным И. Лемана⁹ электродный потенциал в растворе, содержащем ацетальдегид-этиловый алкоголь (концентрация 4 моль/л), „устанавливается“ в течение, примерно, 2 час., причем и после этого

продолжается еще некоторое изменение потенциала во времени, приписываемое „побочным причинам“.

Обесцвечивание метиленовой сини раствором этилового алкоголя (концентрация 1 моль/л) в присутствии алкоголь-дегидрогеназы (конечная концентрация метиленовой сини $1 \cdot 10^{-5}$ моль/л) происходит не менее чем в 7 мин.

По данным Баумбергера¹⁰ в системе молочная кислота—энзим—пировиноградная кислота—платиновый электрод принимает равновесный потенциал лишь спустя 3—4 час.

3. Выражение для стационарного редокс-потенциала для медленно реагирующих обратимых редокс-веществ может быть выведено следующим образом:

$$\frac{dC_H}{dt} = K_1' [Red] - K_2 C_H [O_2] - K_2' C_H [Ox]$$

(опять-таки полагаем, что в качестве необратимого окислителя функционирует только кислород). K_1' и K_2' — константы скоростей прямого и обратного процессов в обратимой реакции $Red \rightleftharpoons Ox + H$.

При стационарном состоянии

$$C_H (K_2 [O_2] + K_2' [Ox]) = K_1' [Red]; \quad C_H = \frac{K_1' [Red]}{K_2 [O_2] + K_2' [Ox]}.$$

Следовательно,

$$E = \frac{RT}{F} \ln \frac{K_2 [O_2] + K_2' [Ox]}{K_1' [Red]} + \frac{RT}{F} \ln [H^+] + E_0.$$

Если $K_2' [Ox]$ меньше, равно или немногим лишь больше, чем $K_2 [O_2]$, редокс-состояние системы будет носить стационарный характер со всеми вытекающими отсюда следствиями.

Если же $K_2' [Ox]$ много больше, чем $K_2 [O_2]$, — редокс-состояние приближается к равновесному, и выражение для E превращается практически в обычное термодинамическое уравнение равновесного редокс-потенциала

$$E = \frac{RT}{F} \ln \frac{K_2' [Ox]}{K_1' [Red]} + E_0' = \frac{RT}{F} \ln \frac{[Ox]}{[Red]K} + E_0' = \frac{RT}{F} \ln \frac{1}{[H]} + E_0'.$$

K — константа равновесия реакции $Ox + H \rightleftharpoons Red$.

Поэтому для измерения равновесного редокс-потенциала в таких медленно реагирующих системах приходится их „эвакуировать“ или производить измерения в атмосфере азота уменьшая тем самым $K_2 [O_2]$.

4. Разумеется, совершенно подобные же соотношения сложились бы в такой редокс-системе, если бы в ней присутствовал необратимый восстановитель RED . Опять-таки редокс-состояние системы было бы стационарным при

$$K_1' [Red] \lesssim K_1 [RED]$$

и равновесным (точнее приближающимся к равновесному) при

$$K_1' [Red] > K_1 [RED].$$

Такой случай, кажется, *in vitro* никем не был реализован, в тканях же, бактериальных культурах и т. п. вполне возможен (например, в присутствии веществ с сульфгидрильной группой, быть может, также сахаров).

5. Как известно, определения редокс-потенциала в обратимых медленно реагирующих редокс-системах производились обычно в присутствии так называемых „посредников“ (кроме энзимов), т. е. обратимых редокс-веществ, быстро реагирующих как с электродом, так и с компонентом медленно реагирующей редокс-пары. В качестве „посредников“ всегда брались редокс-индикаторы. Состояние медленно реагирующей редокс-пары с быстро реагирующей (при обратимости обоих) получило название „сопряженной“ редокс-системы, или системы с „переносчиком“ (*carrier-linked*). Основные функции „посредника“ в такой редокс-системе касаются редокс-буферности, и характеристика их выходит за рамки этой статьи. Поэтому здесь ограничимся приведением обычного уравнения стационарности для такого случая. Именно:

$$\begin{aligned}\frac{dC_{Ox}}{dt} &= -K_1' C_{Ox} [Red] + K_2 C_{red} [O_2] + K_2' C_{red} [Ox] = \\ &= -K_1' C_{Ox} [Red] + K_2 (C - C_{Ox}) [O_2] + K_2' (C - C_{Ox}) [Ox].\end{aligned}$$

Здесь — как и выше — C — концентрация редокс-краски („посредника“), равная сумме концентраций его окисленной (C_{Ox}) и восстановленной (C_{red}) формы.

При стационарном состоянии $\frac{dC_{Ox}}{dt} = 0$, откуда

$$\frac{C_{Ox}}{C} = \frac{K_2 [O_2] + K_2' [Ox]}{K_1' [Red] + K_2 [O_2] + K_2' [Ox]} = f$$

(„степень окрашенности“).

Опять-таки, — как и в отсутствие „посредника“, — имеем, если

$$K_2' [Ox] < K_2 [O_2],$$

то редокс-состояние системы носит стационарный характер, если

$$K_2' [Ox] > K_2 [O_2]$$

— равновесный. Легко показать, что в последнем случае из предыдущего выражения для $\frac{C_{Ox}}{C}$ вытекает обычное термодинамическое уравнение для редокс-потенциала (принять во внимание, что

$$E = E_0 + \frac{RT}{F} \ln [H^+] + \frac{RT}{F} \ln \frac{f}{1-f}).$$

В условиях, когда редокс-потенциал сопряженной системы неравновесен, выражение для E опять-таки оказывается совершенно тем же, что и в отсутствие „посредника“ (разумеется, если редокс-буферность последнего не превзойдет буферности медленно реа-

гирующей редокс-пары). Однако скорость „установления“ стационарного (предельного) потенциала, иначе говоря, скорость, с какой система стремится к стационарному состоянию, конечно, увеличивается в присутствии посредника. Во-первых, наличие „посредника“ увеличивает все константы скоростей. Во-вторых, при тех концентрациях „посредника“, к которым обычно прибегают в опытах с медленно реагирующими редокс-системами, C_{red} значительно больше, чем C_N (конечная концентрация „посредника“ — редокс-индикатора — в „сопряженной“ системе, как правило, бывает не меньше 10^{-5} моль/л). То и другое, разумеется, сильно увеличивает числовую величину производной по времени.

О некоторых особенностях стационарных химических систем. Сдвиги стационарного редокс-потенциала при изменении парциального давления кислорода

Для правильного понимания всего изложенного выше, необходимо не упускать из виду одну из главных черт всех стационарных (не заторможенных) химических систем: непрерывное исчезновение реагентов, не восполняемое обратными процессами. Так, в стационарной редокс-системе все время идет необратимое уничтожение восстановителя (*Red*) и кислорода. Поэтому редокс-состояние стационарной системы может оставаться неизменным лишь в двух случаях: если, несмотря на убывание (*Red*) и (O_2), отношение их остается неизменным или если система не замкнута, т. е. имеются „источники“, восполняющие убыль необходимого восстановителя и окислителя.

„Источниками“ восстановителя могут быть, в сущности, лишь биологические факторы, связанные с исследуемой физико-химической редокс-системой, например, микроорганизмы в микробиологических культурах, клетки тканей (при определении „тканевых“ редокс-потенциалов) и т. п. В отсутствии же таких биологических источников концентрация необратимого (или медленно „регенерируемого“) восстановителя может приниматься постоянной, строго говоря, лишь для ограниченных промежутков времени.

„Источником“ окислителя кислорода во многих реальных случаях является просто окружающая атмосфера (воздушная или с иным содержанием кислорода). Подобный источник зачастую, действительно, практически неисчерпаем, и, значит, концентрация кислорода (O_2) в стационарном редокс-растворе в самом деле может оставаться постоянной, пропорциональной парциальному давлению кислорода p_{O_2} в газовой фазе. Однако коэффициент пропорциональности между p_{O_2} и $[O_2]$ в стационарных системах сам может при известных условиях зависеть от величины p_{O_2} . Это обстоятельство порождает иногда весьма любопытные явления, и на нем стоит остановиться подробнее.

Прежде всего отметим, что между кислородом в газовой фазе и кислородом в неравновесной редокс-системе равновесия быть не может, т. е. не может быть насыщения водной среды кислородом, покуда в растворе имеется вещество с восстановительной функцией,

способное окисляться кислородом. Чем активнее восстановитель, т. е. чем больше скорость его реагирования, например с кислородом, тем дальше от равновесия соотношения между p_{O_2} и $[O_2]$.

В водной среде, где „потребляется“ кислород, притекающий из газовой фазы, имеем в простейшем случае:

$$[O_2] = \frac{K_D \cdot b \cdot p_{O_2}}{K_D + K_2 \cdot C_H},$$

где K_D — постоянная, включающая коэффициент диффузии кислорода в данной среде и величину, характеризующую длину пути диффузии (от поверхности жидкости, где концентрация $O_2 = b \cdot p_{O_2}$, до $[O_2]$); b — произведение коэффициента пропорциональности из закона Генри на переводной множитель от давлений к концентрациям.

При всей упрощенности этого выражения оно все же ясно указывает, что $[O_2]$ отнюдь не всегда „регулируется“ одним лишь парциальным давлением кислорода в газовой фазе, а лишь в том случае, если числовая величина $K_2 \cdot C_H$ очень мала. Но стационарное C_H само связано с величиной $[O_2]$, причем, вообще говоря, C_H растет по мере уменьшения $[O_2]$. Таким образом, разбирая вопрос пока лишь качественно, можно видеть, что в неравновесной водной редокс-системе, имеющей достаточно активный восстановитель (т. е. заметную величину $K_2 \cdot C_H$), концентрация кислорода будет падать при уменьшении p_{O_2} более резко, чем само p_{O_2} .

Отсутствие равновесия между кислородом в газовой фазе и кислородом в водной неравновесной редокс-системе и вытекающие отсюда следствия объясняют одно странное на первый взгляд обстоятельство, почему-то не обращавшее на себя специального внимания, хотя наблюдавшееся весьма часто. Во многих случаях при удалении кислорода из редокс-системы (т. е. при продувании ее азотом или при эвакуации насосом) измеряемый редокс-потенциал сдвигается в „водородную“ сторону гораздо значительней, чем можно бы ожидать по обычному термодинамическому уравнению для E . Таких случаев много. Например: 1. По Михаэлису¹¹ при снижении содержания кислорода в газовой фазе, „равновесной“ с раствором цистеина с 1 до 0,1%, измеряемый редокс-потенциал сдвигается, в „водородную“ сторону, примерно, на 0,080 V. Легко видеть, что если бы система была равновесной, сдвиг потенциала определялся бы соотношением

$$\Delta E = \frac{RT}{4F} \ln 10 \simeq 0,015 \cdot \lg 10 \simeq 0,15 \text{ V.}$$

Если принять во внимание потенциал при 6,5% O_2 , то при снижении p_{O_2} до 0,1% получается еще более кричащее расхождение: теоретически — $0,015 \cdot 1,81 = 0,027 \text{ V}$; на опыте — 0,120 V.

2. По данным Клайвера и Гугерхайда¹² в их работе с суспензиями дрожжевых клеток при замене атмосферы „чистого“ азота (очищенного от кислорода пропусканием над накаливаемой медью) воздухом измеряемый редокс-потенциал сдвигается в „кислородную“ сторону на 0,140 V. В случае равновесной системы такой сдвиг соответствовал бы увеличению содержания кислорода в атмосфере:

$$\Delta E = 0,015 \lg x = 0,140 \text{ V; } \lg x \simeq 9,3,$$

т. е. содержание кислорода в очищенном над медью азоте пришлось бы полагать равным $\frac{1}{5} \cdot 10^{-9,3} = 10^{-10}$ ат. Между тем равновесное давление кислорода над окисью меди, т. е. p_{O_2} , до которого медь может снизить содержание O_2 в пропускаемом над нею азоте, даже при столь невысокой (сравнительно) температуре, как $450^\circ C$, равна приблизительно $10^{-6,6}$ ат, т. е. в несколько тысяч раз больше (при $550^\circ p_{O_2}$ доходит уже до $2,5 \cdot 10^{-4}$ ат). Мы не говорим уже о том, что даже при наилучшей герметичности газопроводящих путей крайне трудно уберечься от повышения содержания кислорода в очищенном азоте, например, со стенок трубок, и вообще удалить кислород из водной среды, из тела самих клеток до таких ничтожных p_{O_2} без помощи восстановителя вряд ли возможно.

3. Еще более демонстративны в этом отношении данные Липмана¹³ по измерению редокс-потенциалов в бродящем дрожжевом экстракте. При откачке воздуха из реакционного сосуда водоструйным насосом измеряемый редокс-потенциал становится менее положительным на $0,50-0,70$ V, что соответствует по термодинамической формуле падению p_{O_2} в 10^{10} раз. Достаточно привести эту цифру, чтобы увидеть полную «диспропорцию» между уменьшением p_{O_2} в газовой фазе в результате откачки и фактическим уменьшением E_n , а следовательно, стационарной концентрации кислорода в водной редокс-системе.

Второй пример из той же работы (объект тот же). При замене воздуха чистым кислородом редокс-потенциал становится положительнее на $0,4$ V. Для равновесной же редокс-системы сдвиг потенциала не мог бы превышать $0,01$ V.

Если только в экспериментах Липмана не действовали какие-то неучтенные факторы, то приходится предположить, что K_2 в его средах имело весьма большую величину, может быть, из-за добавления редокс-индикаторов. Отчасти это подтверждается большой скоростью сдвигов E в его экспериментах при изменении содержания O_2 в газовой фазе (что, может быть, объясняется частично также употреблением гладких Pt-электродов).

В перечисленных примерах редокс-потенциал измерялся электрометрически. Может явиться мысль, что непомерно большие сдвиги E обусловлены неравновесностью самого электрода со средой, например, наличием во внутренних слоях электрода заметных следов водорода и т. п.¹⁾ Приведем поэтому аналогичные примеры, где E измерялось индикаторно.

По Маклису и Грину⁴ внутриклеточный редокс-потенциал (в сперме морских звезд) в аэробных условиях лежит в пределах от $+0,077$ до $+0,151$ V, а в анаэробных (после откачки воздуха насосом) от $-0,228$ до $-0,197$ V (измерения производились с помощью индикаторов *o-cresol-indo-2,6-dichlorphenol* и *Cresyl-blue-chloride* для аэробных условий, и *Cresyl-violet* и *Janus green* — для аэробных).

¹⁾ Подобное предположение возможно, в частности, потому, что даже в таких растворах, где нет никаких специально восстановителей, уменьшение p_{O_2} вызывает более резкие сдвиги электродного потенциала (Pt-электрод), чем это можно ожидать по логарифмической формуле¹⁴. Правда, различие не столь велико, как в присутствии восстановителей.

Таким образом фактический сдвиг E равняется примерно $+0,110 - (-0,210) \sim +0,320$ V.

Опять-таки находим, что, если бы внутриклеточная редокс-система была равновесна с газовой фазой, такой сдвиг соответствовал бы изменению парциального давления кислорода в газовой фазе более, чем в 10^{20} раз, что заведомо невозможно.

Аналогичные факты можно найти в экспериментальных данных Л. Бека⁷, определявшего внутриклеточный редокс-потенциал дрожжевых клеток и в некоторых других работах.

Все эти данные, во-первых, ярко демонстрируют неравновесную природу редокс-потенциалов, измеряемых в подобных биохимических и биологических системах, а во-вторых, заставляют обратить внимание на пределы приложимости простого уравнения для стационарной концентрации C_n , на необходимость учитывать снижение концентрации O_2 в самой стационарной редокс-системе в результате его редуцирования.

О стационарном редокс-потенциале в анаэробных условиях

Чем более редокс-система приближается к условиям полной анаэробности, тем сильнее на ее редокс-потенциале будет сказываться не окисляющее действие кислорода, а какие-то другие процессы, „отводящие“ активный водород (активные молекулы восстановителя). Если в редокс-систему введен металлический электрод, то поверхностная концентрация водорода на нем (которая, как известно, непосредственно определяет собой потенциал индиферентного электрода в анаэробных условиях) будет лимитироваться не только молизацией водорода на электроде, но и диффузией его с поверхности вглубь металла или раствора (не говоря уже о восстановлении следов O_2 внутри металла). Поэтому нелегко предсказать, каковы будут предельные потенциалы на электродах из различных металлов в растворе какого-либо необратимого восстановителя в полностью анаэробных условиях. Таким образом известные соображения Диксона¹⁵ по поводу предельного потенциала в растворах цистеина, правильные сами по себе, вряд ли достаточны, и факт близости предельных потенциалов, обнаруживаемых в цистеине электродом из золота и ртути, сам по себе еще не является аргументом против концепции Диксона, как это счел Вурмзер¹. Вообще говоря, для обоснованных суждений о зависимости от природы электрода анаэробных предельных потенциалов необратимых восстановителей необходимы измерения, проведенные при тщательном удалении кислорода не только из раствора, но и из самих электродов.

О зависимости стационарного редокс-потенциала от свойств „измеряющего агента“

Предельный редокс-потенциал в неравновесных системах зависит от констант скоростей редокс-реакций. Отсюда, как уже отмечалось выше, неизбежно следует, что величина потенциала зависит от каталитических свойств „измеряющего агента“ — будь то электрод

или индикатор. Утверждение это легко иллюстрировать фактами. Известно, например, что в растворе ацетальдегида (уже упомянутого выше) потенциалы, измеренные индикаторами, не совпадают с теми, которые показывает индифферентный электрод. Альдегид восстанавливает феносафранин, зона потенциала которого лежит значительно ниже, чем это показывает платиновый электрод, опущенный в чистый раствор альдегида.

Аналогичные факты наблюдаются в культурах некоторых бактерий. Юдкин¹⁶ констатировал, что, в культурах *Bact. alkaligenes* и *Cl. sporogenes* электрод показывает гораздо менее отрицательные потенциалы, чем индикаторный метод (разница на 0,2 и даже на 0,4 V), в обеих культурах восстанавливается даже бензилвиологен.

В то же время в культуре *B. Coli* электрометрический и индикаторный методы дают вполне совпадающие результаты.

Похожие факты зарегистрированы в работе Липмана¹³, определявшего редокс-потенциал в бродящем экстракте дрожжей. Например, различные индикаторы, будучи прибавлены к бродящему экстракту, весьма различно влияют на показания индифферентного электрода, что Липман объясняет „различием сродства отдельных индикаторов к энзиматической системе“ (не раскрывая детальнее, что он под этим подразумевает).

Интересно, что, например, в присутствии нилблау наиболее отрицательный потенциал, которого достигает электрод в бродящем экстракте, лежит около 0,090 V, а в присутствии галлофенина — при прочих равных условиях — около 0,120 V, хотя собственные „нормальные потенциалы“ у нилблау и галлофенина почти одинаковы.

Я намеренно не привожу здесь примеров несовпадения величин потенциала, показываемых в одном и том же растворе разными электродами. Эти случаи слишком многочисленны и хорошо известны каждому, кто имел дело с измерением редокс-потенциалов в неравновесных средах. Плохая воспроизводимость потенциала — это наиболее „бросающийся в глаза“ эмпирический признак неравновесных редокс-систем. Но „разнобой“ в показаниях электродов имеет своей причиной не только различие в каталитических свойствах электродов, но также присутствие в электродах растворенных в них электрохимически активных газов (например, того же кислорода), остающихся после всяких „предшествующих воздействий“ на электроды.

Зависимость редокс-потенциала, измеряемого в неравновесных системах, от каталитических свойств „измеряющего агента“ представляется на первый взгляд обстоятельством весьма тягостным. На самом деле этот факт означает лишь, что для характеристики редокс-состояния неравновесных систем необходимо наряду с прочим иметь сведения о кинетических их свойствах. В этом отношении могут оказаться весьма полезными как раз те моменты, которыми до сих пор при изучении редокс-потенциалов пренебрегали, например, скорости, с какими „устанавливается“ потенциал, измеряемый в неравновесной системе, сама „кривая“ этого „становления“ потенциала, скорости восстановления редокс-красок и т. п. Необходимо организованное — если так можно выразиться — накопление такого рода экспериментального материала, например, изучение „установления“ электродного потенциала в неравновесной редокс-системе при

строго определенном начальном состоянии электрода, изучение скоростей деполяризации электрода в соответствующих редокс-системах, количественное изучение скоростей восстановления редокс-индикаторов в исследуемых редокс-системах и т. п. С другой стороны, для любых суждений о влиянии редокс-потенциала и (и H_2) среды на биообъекты, как правило, весьма желательны сведения о кинетических свойствах биообъектов — об их ферментативном аппарате.

Об изменениях редокс-состояния исследуемого раствора около поверхности электрода

Во всем изложенном выше предполагалось, что „измеряющий агент“ (электрод, редокс-индикатор) не смещает стационарных концентраций редокс-компонентов. На практике, однако, случаи смещения нередки. Величина и длительность смещения зависят от буферных свойств системы и „измеряющего агента“ и потому выходит за рамки данной статьи. Здесь имеется в виду лишь подчеркнуть, что при измерениях редокс-потенциалов неравновесных систем необходимо тщательно различать случаи, когда вмешательство измеряющего агента ограничивается влиянием на скоростные константы и когда агент изменяет само C_H или $[\text{O}_2]$. Нечего и говорить, что последнее может внести новый элемент неопределенности в измерения редокс-потенциала, и потому непременно должно быть избегнуто, тем более, что это вполне достижимо. Всегда можно дождаться выравнивания $[\text{O}_2]$ на поверхности индиферентного электрода и в растворе и можно весьма ускорить это выравнивание.

Сдвиги стационарной концентрации C_H или (O_2), производимые измеряющим агентом, сравнительно легко констатируемы, когда таким агентом является электрод. Обычно электрод „сдвигает“ C_H или (O_2) только в той зоне редокс-системы, которая непосредственно с ним соприкасается. В результате электродный потенциал оказывается чувствительным к перемешиванию той среды, где ведется определение E .

В литературе специально зафиксирован случай весьма своеобразного влияния перемешивания на потенциал индиферентного электрода в неравновесной редокс-системе — в растворе цистеина¹¹.

При очень малых скоростях продувания газа (азот + 0,08% O_2) через раствор измеряемый потенциал становится гораздо менее положительным (сдвигается в „водородную сторону“), при возрастании же скорости продувания вновь смещается в положительную — „кислородную“ сторону. Продувание и связанное с ним перемешивание не могли, конечно, повлиять на константы скоростей процессов, определяющих электродный потенциал, и следовательно, почти неизбежно предположить, что сдвиги потенциала были связаны с какими-то изменениями концентраций редокс-реагентов у поверхности электрода¹⁴.

Выводы

1. Редокс-потенциал, измеряемый в неравновесной редокс-системе, хотя и не пропорционален изменению свободной энергии (и в этом смысле „лишен термодинамического значения“, как обычно отмечают в литературе), тем не менее отражает собой определенные физико-химические соотношения.

Показано, что величина такого потенциала зависит не только от соотношения концентраций окислительных и восстановительных компонент, но и от соотношения констант скоростей соответствующих редокс-процессов.

2. Такой же характер может иметь редокс-потенциал, даже при обратимо реагирующих редокс-компонентах, если только они реагируют медленно (редокс-вещества, активируемые энзимами: янтарная-фумаровая кислота, ацетальдегид — спирт и др.).

3. Изменение парциального давления O_2 в газовой фазе может приводить к сдвигам редокс-потенциала в неравновесных системах — гораздо более резким, чем для равновесных систем.

4. Рассмотрены следствия, вытекающие из неравновесности редокс-состояния различных водных редокс-систем, прежде всего зависимость редокс-состояния от скоростей различных физико-химических процессов.

Москва

Академия наук СССР

Лаборатория физиологии низших организмов

Поступило в редакцию
4 июля 1937 г.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Р. Вюрмсер, Биологическое окисление и восстановление, Москва 1935, R. Wurmser, *Oxidations et reductions*, Paris, 1930.
2. R. Wurmser, *L'électroactivité dans la chimie des cellules*, Paris, 1935.
3. Л. Михаэлис, Окислительно-восстановительные потенциалы, Москва, 1936 — L. Michaelis, *Oxydations Reductions Potentielle*, Berlin 1933.
4. S. Machlis a. D. E. Green, *Journ. cell. a. comp. Physiol.*, 4, 61, 1933.
5. O. Warburg u. W. Christian, *Biochem. Z.*, 254, 444, 1932.
6. L. V. Beck, *Journ. cell. a. comp. Physiol.*, 3, 263, 1933.
7. L. V. Beck a. J. P. Robin, *Journ. cell. a. comp. Physiol.* 4, 527, 1934.
8. I. M. Korr, *Journ. cell. a. comp. Physiol.*, 6, 181, 1935.
9. J. Lehmann, *Biochem. Z.*, 274, 321, 1934.
10. I. P. Baumberger, I. I. Jürgensen a. K. Bardwell, *Journ. Gener. Physiol.*, 16, 961, 1933.
11. L. Michaelis u. L. B. Flexner, *J. Biol. Chem.*, 79, 689, 1928.
12. A. I. Kluyver u. I. C. Hoogerheide, *Biochem. Z.*, 272, 197, 1934.
13. F. Lipmann, *Biochem. Z.*, 274, 329, 1934.
14. N. Nekrassow, *Z. Elektrochem.*, 38, 186, 1932.
15. M. Dixon, *Proc. Roy. Soc., (B)* 101, 57, 1927.
16. I. Yudkin, *Biochem. J.*, 29, 1130, 1935.