

А. А. ГУРЕВИЧ

О ФОТОСЕНСИБИЛИЗИРУЮЩЕМ ДЕЙСТВИИ ХЛОРОФИЛЛА НА ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫЕ РЕАКЦИИ

(Представлено академиком Н. А. Максимовым 22 XII 1947)

Исследования последних лет привели к признанию представления о механизме фотосинтеза зеленых растений, согласно которому в основе этого процесса лежит окислительно-восстановительная реакция, происходящая при участии активированного водорода (¹⁻⁵). Донатором этого водорода является вода, подвергающаяся фотолизу под воздействием поглощенной хлорофиллом световой энергии, а акцептором служит углекислый газ или, вероятнее, карбоксил, который, присоединяя его, восстанавливается (^{6, 7}).

В связи с признанием значения активированного водорода при фотосинтезе приобретает интерес вопрос о том, в какой мере извлеченный из растения хлорофилл способен под действием света вызывать активирование водорода и, таким образом, служить фотосенсибилизатором в окислительно-восстановительных реакциях вне растительного организма. Этот вопрос представляет известный интерес и в том случае, если сенсибилизированный хлорофиллом перенос водорода происходит с понижением энергетического потенциала, как при дыхании, а не с повышением его, как это имеет место при фотосинтезе, и, следовательно, данная окислительно-восстановительная реакция является самопроизвольной, а не вынужденной.

Как показал Бёхи (⁸), в присутствии хлорофилла и донатора водорода на свету происходит обесцвечивание красителей, связанное с их восстановлением. Но этой системе присущ тот недостаток, что красители, поглощая видимый свет, сами являются светочувствительными и обесцвечиваются, правда, значительно медленнее, также и без хлорофилла. Данное явление усложняется еще тем, что восстановление красителей на свету ускоряется хлорофиллом только при определенном соотношении между спектрами поглощения красителя и хлорофилла.

Ввиду вышеизложенного мной были проведены опыты, имеющие целью показать фотосенсибилизирующее действие хлорофилла на окислительно-восстановительные реакции, которые сами по себе, без сенсибилизатора, совершенно не светочувствительны. Для этого краситель следовало заменить другим легко восстанавливаемым акцептором водорода, который не окрашен, не поглощает видимого света и потому не чувствителен по отношению к нему.

Этому условию вполне удовлетворяет *o*-динитробензол, еще ранее использованный мной в качестве акцептора водорода при исследовании дыхания и фотосинтеза зеленых растений (⁹). В живых растительных клетках *o*-динитробензол подвергается необратимому восстановлению в

o-нитрофенилгидроксиламин. Эта реакция происходит с присоединением водорода и потому может служить индикатором на активированный водород:



В отличие от бесцветного *o*-динитробензола, продукт его восстановления *o*-нитрофенилгидроксиламин имеет светложелтую окраску. Он может быть легко обнаружен вследствие того, что в щелочной среде образуется его соль темнофиолетового цвета, который при большей ее концентрации переходит в вишневый.

В качестве донатора водорода служил фенилгидразин в форме свободного основания, использованный еще Бёхи⁽⁸⁾. Хлорофилл экстрагировался из сухих листьев крапивы этиловым спиртом и в таком виде применялся для опытов. Некоторые опыты, которые привели к такому же результату, были проведены с кристаллическим хлорофиллом (а + в)*, растворенным в этиловом спирте. *o*-динитробензол использовался в насыщенном, а фенилгидразин (свободное основание) — в 10% растворе в этиловом спирте. Концентрация хлорофилла в этиловом спирте была такова, что при толщине слоя раствора в обыкновенной пробирке он был темнозеленым, но прозрачным.

Для опыта брались 5 мл раствора хлорофилла, 0,5 мл фенилгидразина и 0,5 мл *o*-динитробензола. Растворы смешивались и разливались поровну в 2 обыкновенные пробирки, служившие для опытов. Одна из них освещалась электролампой в 300 W, нить накала которой находилась на расстоянии 15 см от пробирки. Между последней и электролампой помещалась кювета с водой для поглощения тепловых лучей. Другая пробирка затемнялась с помощью плотной черной бумаги и служила контролем. Кроме того, были проведены контрольные опыты при освещении без хлорофилла, с заменой его равным объемом чистого спирта, без фенилгидразина и без *o*-динитробензола. Температура подопытных растворов не выходила за пределы от 15 до 30°. Продолжительность большинства опытов была 30 мин., но некоторые продолжались до 3 час.

Для обнаружения *o*-нитрофенилгидроксиламина, образовавшегося при восстановлении *o*-динитробензола, после опыта в подопытные растворы вносилось по 3 капли крепкого водного раствора аммиака, дающего с *o*-нитрофенилгидроксиламином фиолетовое окрашивание. Для наблюдения хода реакции восстановления *o*-динитробензола в подопытную смесь растворов, до ее деления на 2 равные порции, вносилось 5 капель крепкого водного раствора аммиака. После опыта хлорофилл можно легко полностью отделить от окрашенной соли *o*-нитрофенилгидроксиламина путем встряхивания подопытного раствора с равным объемом бензина. Тогда хлорофилл переходит в бензин и обнаруживает яркую флуоресценцию, а *o*-нитрофенилгидроксиламин в виде своей аммиачной соли остается в спирте и придает ему вишневый цвет, который при разбавлении водой переходит в фиолетовый.

В вышеуказанных контрольных опытах образование *o*-нитрофенилгидроксиламина не имело места. В темноте подопытный раствор в течение нескольких суток оставался без изменений. Но при добавлении к нему избытка аммиака восстановление *o*-динитробензола происходит и в отсутствие света со значительной скоростью, что свидетельствует о самопроизвольности данной окислительно-восстановительной реакции.

Для того чтобы описанную реакцию, демонстрирующую фотосенсибилизирующее действие хлорофилла, сделать легко доступной, она была испытана также с солянокислым фенилгидразином и со смесью изомер-

* За предоставление кристаллического хлорофилла я весьма признателен О. П. Осиповой.

ров динитробензола, получающейся непосредственно при динитровании мононитробензола (10). Оба реактива были применены в насыщенном растворе в этиловом спирте. При растворении динитробензола его необходимо брать в значительном избытке, потому что восстанавливающиеся изомеры — орто и пара — составляют лишь около 10% смеси, преобладающая часть которой состоит из пассивного *m*-динитробензола (10).

Вполне удовлетворительный результат при 30-минутном освещении дает подопытный раствор следующего состава: 5 мл хлорофилла, 0,5 мл солянокислого фенилгидразина, 0,5 мл смеси изомеров динитробензола и 3 капли аммиака. В этом случае на свету образуется также *p*-нитрофенилгидроксиламин, который в щелочной среде придает раствору красный цвет. Специальные опыты показали, что *p*-динитробензол восстанавливается легче *o*-изомера. Поэтому следует избегать избытка реактивов, так как в противном случае данная реакция произойдет самопроизвольно в темноте. Ввиду этого чистый *o*-динитробензол заслуживает предпочтения перед смесью изомеров или *p*-динитробензолом.

В дальнейшем были проведены аналогичные опыты, в которых был применен другой, имеющий биологическое значение донатор водорода — аскорбиновая кислота.

В щелочной среде *o*-динитробензол легко восстанавливается аскорбиновой кислотой в *o*-нитрофенилгидроксиламин в отсутствие света, при комнатной температуре (11); эта реакция является самопроизвольной. Но без щелочи она не идет ни в темноте, ни на свету без участия фотосенсибилизатора. Если же ввести в эту систему хлорофилл, то при освещении совершается интенсивное восстановление *o*-динитробензола в *o*-нитрофенилгидроксиламин. Аскорбиновая кислота в этих условиях окисляется до дегидроаскорбиновой кислоты (12).

Постановка этих опытов соответствует вышеописанным, только вместо фенилгидразина в 5 мл спиртового раствора хлорофилла вносилось 50—60 мг кристаллической аскорбиновой кислоты, которая растворялась в нем. Затем добавлялся 1 мл насыщенного раствора *o*-динитробензола в этиловом спирте. Аммиак, необходимый для обнаружения реакции, вносился в количестве нескольких капель крепкого водного раствора только после экспозиции на свету, которая продолжалась обычно 30 мин. Это вызвано тем, что в присутствии аммиака в щелочной среде данная окислительно-восстановительная реакция происходит со значительной скоростью также в темноте. Такой же опыт, проведенный с кристаллическим хлорофиллом ($\alpha + \nu$), растворенным в этиловом спирте, привел к такому же результату.

В заключение было подвергнуто испытанию фотосенсибилизирующее действие некоторых флуоресцирующих красителей, помимо хлорофилла, на описанные выше окислительно-восстановительные реакции. Эти опыты, проведенные с эозином, эритрозином В и некоторыми другими, дали положительный результат. Напротив, при испытании нефлуоресцирующих красителей положительный эффект не был обнаружен.

Таким образом, мы приходим к заключению, что хлорофилл в истинном растворе обладает свойствами фотокатализатора, активирующего водород. Он является «фотодегидразой». Фотосенсибилизирующее действие хлорофилла проявляется в этих условиях, правда, лишь в самопроизвольных окислительно-восстановительных реакциях. Это обусловлено, вероятно, весьма значительным рассеянием энергии, воспринимаемой хлорофиллом в этом состоянии. Поэтому она достаточна только для преодоления незначительных энергетических барьеров активации самопроизвольных реакций.

Мы рассматриваем наши опыты как прямое экспериментальное подтверждение выдвинутого К. А. Тимирязевым еще в 1879 г. положе-

ния (¹³), что хлорофилл в процессе фотосинтеза играет роль оптического сенсibilизатора.

Лаборатория физиологии растений и микробиологии
Московской сельскохозяйственной академии
им. К. А. Тимирязева

Поступило
22 XII 1947

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ E. I. Rabinowitch, *Photosynthesis and Related Processes*, 1, N. Y., 1945.
² А. А. Красновский, *Усп. совр. биол.*, **21**, 153 (1946). ³ А. А. Гуревич, *ДАН*,
47, 672 (1945). ⁴ O. Warburg и W. Lüttgens, *Биохимия*, **11**, 303 (1946).
⁵ А. А. Гуревич, *ДАН*, **55**, 267 (1947). ⁶ S. Ruben, M. Randall, M. Камен
and J. L. Hyde, *J. Amer. Chem. Soc.*, **63**, 877 (1941). ⁷ А. П. Виноградов и
Р. В. Тейс, *ДАН*, **33**, 497 (1941). ⁸ J. Böhi, *Helv. Chim. Acta*, **12**, 121 (1929).
⁹ А. А. Гуревич, *Биохимия*, **6**, 467 (1941). ¹⁰ А. А. Гуревич, *Новый метод*
определения всхожести семян, М., 1937. ¹¹ R. Купф и F. Weugand, *Ber.*
Dtsch. Chem. Ges., **69**, B, 1969 (1936). ¹² А. А. Красновский и Г. П. Брин,
ДАН, **53**, 447 (1946). ¹³ К. А. Тимирязев, *Речи и проток. VI съезда естеств. и*
врачей в С.-Петербурге, 1879.