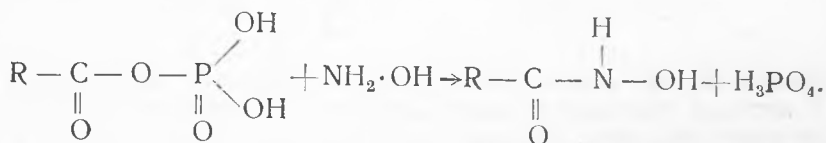


А. М. КУЗИН и М. Я. ШКОЛЬНИК

ЛАБИЛЬНЫЕ ВЕЩЕСТВА ТИПА АЦИЛФОСФАТОВ В ЗЕЛЕНОМ ЛИСТЕ РАСТЕНИЙ

(Представлено академиком А. И. Опариным 19 XI 1947)

Исходя из предположения, что в зеленом листе растения в качестве макроэргических веществ образуются соединения типа ацилфосфатов (1), мы воспользовались для их обнаружения реакцией (2) для количественного определения ацетилфосфата в животных тканях. Эта реакция основана на обнаружении гидроксамовой кислоты, образующейся при взаимодействии ацилфосфата с гидроксиламином при комнатной температуре:



Количество гидроксамовой кислоты может быть определено колориметрически благодаря образованию интенсивно окрашенных комплексов с ионом железа. Как известно, амиды и эфиры органических кислот реагируют с гидроксиламином аналогично, но только при более высокой температуре.

Поставленные нами опыты с аспарагином, а также с этиловыми эфирами уксусной, яблочной, лимонной и виннокаменной кислот показали, что в тех условиях, при которых проходит реакция с ацилфосфатом или ангидридом кислоты, аспарагин и эфиры лимонной и уксусной кислот не дают и следов гидроксамовой кислоты. Эфиры яблочной и виннокаменной кислот давали только следы гидроксамовой кислоты при испытании их в количествах, намного превосходящих возможное содержание их в свежих листьях (0,1—0,2 г).

Метод исследования. Свежие зеленые листья в количестве 1 г помещались в фарфоровую ступку и растирались в присутствии 1,5 мл ацетатного буфера (pH=5,4), 0,5 мл раствора гидроксилamina (получавшегося смешением равных объемов 28% солянокислого гидроксилamina и 14% раствора NaOH) и небольшого количества нейтрального стекла. Реакционная смесь оставлялась на 10 мин. при комнатной температуре, после чего белки и пигменты удалялись добавлением 2 мл 12% трихлоруксусной кислоты, 1 мл фильтрата брался на исследование, для чего к нему добавлялось 0,5 мл 5% раствора хлорного железа в 0,1 N соляной кислоте, и интенсивность окрашивания определялась в штупенфотометре Пульфриха со светофильтром S-50. Так как до прибавления железа растворы имели слабожелтую

окраску, то измерение производилось по сравнению с контролем, в котором листья подвергались той же обработке, но 0,5 мл раствора гидроксиламина заменялись 0,5 мл ацетатного буфера. Шкала штупенчатого фотометра предварительно калибровалась по стандартным растворам гидроксам-янтарной кислоты, полученной нами из ангидрида янтарной кислоты.

Проведенные исследования листьев различных растений показали всюду наличие активных веществ, реагирующих с гидроксиламином подобно ацилфосфатам, с образованием гидроксамовых кислот, дающих с хлорным железом вишнево-красное окрашивание. Полученные опытные данные сведены в табл. 1.

Таблица 1
Содержание активных веществ
в листьях различных растений

Исследуемое растение (листья)	Количество активн. вещ. в $\mu\text{M} \cdot 10^2$ в 100 г листьев
Традесканция	190
»	145
Рдест (<i>Potamogeton perfoliatus</i>)	150
То же	300
»	195
»	150
Свекла сахарная	52
Настурция	60
Томат	54
Проростки пшеницы	42

Предполагая, что наблюдаемая реакция является результатом наличия в листьях нестойких ацилфосфатов, мы провели аналогичные исследования с листьями, предварительно растертыми с ацетатным буфером (pH=5,4) и нагретыми до 100° в течение 5 мин. Были получены следующие результаты (табл. 2).

Таблица 2
Содержание активных веществ
в листьях до и после
нагревания

Исследуемое растение	Количество активных веществ в $\mu\text{M} \cdot 10^2$ на 100 г	
	Свежих листьев	Растертых и прогретых 5 мин. при 100°
Свекла сахарная	58	0
Традесканция	110	3
Настурция	64	0

Как видно из приведенных данных, обнаруживаемые вещества крайне непрочны и при 5-минутном нагревании при 100° С полностью разрушаются. Это делает весьма вероятным предположение, что здесь мы имеем дело с богатыми энергией нестойкими соединениями типа ацилфосфатов. Исследуя их стабильность при различных температурах, мы убедились в их крайней непрочности, даже при комнатной температуре. Достаточно растереть лист в гомогенную массу, как

тотчас же наблюдается быстрое исчезновение основной массы наблюдаемых соединений, что видно из экспериментальных данных, представленных в табл. 3.

Таблица 3

Исследуемое растение	Количество активных веществ в $\mu\text{M} \cdot 10^2$ на 100 г листьев					
	При добавлении гидроксидамина к свежим листьям	При добавлении гидроксидамина к листьям, растертым в ацетатном буфере после стояния их при 18°C				
		1 мин.	5 мин.	20 мин.	1 час	2 часа
Рдест	200	70	45	—	40	—
»	198	—	45	—	41	—
» *	145	90	22	20	—	—
Традесканция	142	110	100	55	—	—
»	120	—	—	—	20	—
» **	300	—	130	110	68	35
Томат	54	22	—	—	—	—

* Стояли при 18° в присутствии 0,02 M раствора фтористого натрия.

** Стояли в растертом состоянии при 0°C.

Из полученных данных видно, что даже при 0° время полураспада наблюдаемых веществ равно 5 мин.

Здесь интересно отметить, что присутствие в листе наблюдаемых веществ тесно связано с ненарушенной структурой листа. Если при нарушении морфологических структур (растирание листа) происходит быстрый их распад, то в неповрежденном листе указанные соединения сравнительно устойчивы, как это видно из наблюдений, сведенных в табл. 4.

Таблица 4

Исследуемое растение	Условия сохранения листьев	Количество активных веществ в $\mu\text{M} \cdot 10^2$ на 100 г листьев
Рдест	Свежие листья из водоема после 40-минутной солнечной инсоляции	350
	После стояния в лаборатории:	
»	В течение 1 суток	280
»	» 2 »	200
»	» 8 »	75
Традесканция	Свежие листья обработаны при 0°	300
»	» » » » 18°	150
»	Высушены при 40° в течение 8 час.	0
»	Сутки в темноте	140

Как видно из приведенных опытов, наблюдаемые нами лабильные вещества сравнительно устойчивы до тех пор, пока не повреждена структура листа. Только высушивание (длительное) ведет к их полному разрушению. Приведенные выше свойства обнаруженных нами в листе веществ, а именно: их реакция с гидроксидамином с образованием гидроксамовых кислот, исключительная лабильность, быстрый распад в нейтральной среде при комнатной температуре с временем

полураспада от 1 до 5 мин. — дают нам основание предположить, что наблюдаемые вещества являются соединениями, содержащими нестойкие, богатые энергией связи, и, повидимому, принадлежат к классу ацилфосфатов.

Лаборатория растительных веществ
Института биохимии им. А. Н. Баха
Академии Наук СССР

Поступило
19 XI 1947

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ В. О. Таусон, Усп. совр. биол., 24, 129 (1947). ² F. Lipmann and L. Tuttle, J. Biol. Chem., 159, 21 (1945).