

П. А. КОЛЕСНИКОВ

ОРГАНИЧЕСКАЯ ПЕРЕКИСЬ ИЗ ЗЕЛЕННЫХ ЛИСТЬЕВ

(Представлено академиком А. И. Опариным 3 XI 1948)

В одной из предыдущих работ ⁽¹⁾ было сообщено, что в зеленом экстракте из листьев ячменя в определенных условиях накапливаются органические перекиси. Описываемым здесь методом из зеленого экстракта выделена перекись муравьиного альдегида.

10 г свежих молодых листьев ячменя, независимо от возраста, разрезались ножницами на мелкие кусочки и растирались в фарфоровой ступке с 10 мл М/15 вторичного фосфата натрия. Когда содержимое принимало вид тонкой суспензии, прибавлялось 30 мл дистиллированной воды, снова растиралось и центрифугировалось несколько минут при 2000 оборотах. Зеленый центрифугат сливался в эрленмейеровскую колбу емкостью 250 см³. Остаток еще раз растирался с 10 мл фосфата натрия или воды, добавлялось еще 10 мл воды и центрифугировалось. Осадок подвергался растиранию с 20 мл воды и центрифугированию еще два раза. Все центрифугаты сливались в одну и ту же колбу. Таким образом из 10 г листьев получалось 100 см³ центрифугата. Колба с центрифугатом закрывалась ватной пробкой и ставилась в темный термостат при 30° С. Иногда центрифугат помещался в коллодийный мешочек, который погружался в стакан с 200 см³ дистиллированной воды. В этом случае накапливаемая перекись диффундирует в воду.

Для получения большего количества перекиси ставилось несколько проб. Материал держался в термостате не более 20 час., так как было обнаружено, что после 20 час. обычно наблюдалось быстрое исчезновение перекиси. Еще не установлен температурный максимум для накопления перекиси, но обнаружено, что накопление перекиси зависит от температуры. При комнатной температуре 17—20° накопление перекиси идет значительно медленнее, чем при 30°. После 20 час. инкубации содержимое колб нагревалось до кипения и фильтровалось через бумажные фильтры. Получался прозрачный желтый фильтрат. Если путем медленного фильтрования получался мутный фильтрат, то фильтрование производилось на воронке Бюхнера с отсасыванием водоструйным насосом. В воронку обычно помещалась мязга из фильтровальной бумаги. Прозрачный фильтрат выпаривался на водяной бане. Остаток растворялся в небольшом количестве воды, отфильтровывался от нерастворимых примесей и фильтрат выпаривался. Таким образом получается препарат перекиси, описанный в предыдущей работе. Он полностью растворим в воде, в сухом виде имеет вид желтоватого порошка, весьма гигроскопичен, на воздухе превращается в сиропообразную массу коричневого цвета.

Для выделения перекиси муравьиного альдегида производилась от-

гонка из подкисленного фильтрата с водяным паром. Из нейтрального раствора перекись не отгоняется с водяным паром, но после подкисления она очень летуча. Она почти полностью перегоняется с первыми 5—10 см³ дестиллята. Последующие 10 см³ дестиллята содержат лишь следы перекиси. Дестиллят перекиси имеет кислую реакцию. В этом кислом дестилляте перекись очень неустойчива. Через сутки дестиллят теряет больше 50% активного кислорода. Из дестиллята перекиси выделены были ее натриевые, кальциевые и бариевые соли. Для получения соли натрия дестиллят точно нейтрализовался едким натром. Для получения солей кальция и бария к дестилляту соответственно прибавлялся избыток карбоната кальция или бария. Смесь подогревалась и профильтровывалась. Осадок промывался холодной водой. Промывные воды смешивались с фильтратом. Нейтрализованные такими способами дестилляты выпаривались на водяной бане. Остатки после выпаривания растворялись в небольшом количестве воды и отфильтровывались. Нерастворимая часть отбрасывалась. Фильтраты выпаривались на водяной бане. Остатки вновь растворялись в нескольких куб. сантиметрах воды. Если при этом оставался нерастворимый осадок, то он удалялся фильтрованием. Такая обработка производилась до тех пор, пока остаток, получающийся после выпаривания, будет полностью растворяться в нескольких куб. сантиметрах воды. Полученный таким способом осадок подвергался дальнейшей обработке метиловым спиртом или 95% этиловым спиртом, в которых соли надкислоты растворяются. Многократными извлечениями и выпариваниями фильтратов получают порошки, растворимые полностью в нескольких куб. сантиметрах спирта. Соли перкислоты, полученные таким способом, оказываются или бесцветными, как, например, соль натрия, или слабо желтоватыми, как соли кальция и бария.

Все эти соли гигроскопичны. Для их идентифицирования они были подвергнуты элементарному анализу. Натрий определялся в виде сульфата после озоления в платиновом тигле. Кальций определялся в виде сульфата, а также путем получения шавелевокислого кальция с последующим титрованием стандартным раствором 0,01 N перманганата. Оба метода давали одинаковые результаты. Для определения металлов бралось по 4—8 мг соли перкислоты.

Количество активного кислорода определялось по количеству иода, получающегося при разложении иодистого калия. Для определения бралось 3—5 мг соли перкислоты, прибавлялось 2—3 мл воды, 0,25 мл 10% раствора KJ и 0,25 мл 10% H₂SO₄. Выделявшийся иод оттитровывался 0,01 N гипосульфитом. Титрование производилось немедленно, так как сразу же начиналось бурное выделение и улетучивание иода. Иод оттитровывался по мере его выделения. Вначале бурное, выделение иода постепенно ослабевает. Для полного выделения иода требуется около 2 час. Сожжение соли перкислоты для определения углерода и водорода сопровождается большими трудностями. При быстром нагревании соль плавится и вспыхивает со взрывом. При медленном нагревании постепенно чернеет и затем всыхивает. Ввиду наличия щелочноземельных металлов при определении количества углерода получают несколько заниженные цифры. Поэтому при сожжении к препарату прибавлялась смесь из хромовокислого свинца и 0,1 часть дихромата калия.

Ниже приводятся результаты анализов соли кальция и натрия.

Соль кальция перед анализом высушивалась в сушильном шкафу при 60° в течение нескольких часов.

Получено %: Са 20,5; С 12,70; Н 3,34; О 63,46; активный кислород 15,89.

2Н₂О(НСОО)₂Са содержит %: Са 20,2; С 12,12; Н 3,03; О 64,65; активный кислород 16,16

Соль натрия перед анализом высушена при 60°.

Получено %: Na 27,5; C 12,96; H 1,83; O 57,71; активный кислород 18,82
 HCOONa содержит %: Na 27,3; C 14,28; H 1,19; O 57,1; активный кислород 19,03

Приведенные данные являются средними из нескольких определений. Как видно из элементарного анализа полученной перекиси из листьев, они удовлетворительно согласуются с теоретическими данными для соли перекиси муравьиного альдегида. Несколько велики отклонения в содержании углерода. Но надо принимать во внимание трудность сжигания этого вещества и его гигроскопичность. Сопоставления данных элементарного анализа выделенной из листьев перекислоты с элементарным составом других возможных перекислот, кроме перекиси муравьиной кислоты, не показали какого-либо сходства. Об идентичности полученной перекиси с перекисью муравьиной кислоты свидетельствует и ее хорошая летучесть с водяными парами.

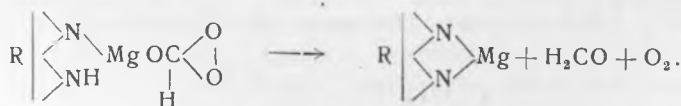
Методом, описанным выше, удается получить из 1 г свежих листьев приблизительно 0,3 мг чистой соли перекислоты. В процессе очистки наблюдаются очень большие потери. Около 50% активного кислорода теряется при дистилляции. При выпаривании нейтрлизованного дистиллята также теряется 50% активного кислорода, содержащегося в дистилляте.

В предыдущих сообщениях ⁽¹⁾ было показано, что органическая перекись, образуемая в зеленом экстракте и в присутствии гликолевой или глиоксильевой кислот, окисляет хлорофилл и аскорбиновую кислоту. Там же было высказано предположение, что эта перекись может являться источником выделяемого зелеными растениями кислорода.

Впервые А. Н. Бах ⁽²⁾ высказал предположение, что источником кислорода в процессе фотосинтеза должен быть кислород перекиси. Такой перекисью, по мнению Баха, может быть надугольная кислота. Образование и распад надугольной кислоты может происходить по следующей схеме:



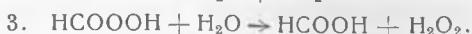
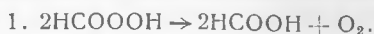
Позднее Вильштеттер и Штоль ⁽³⁾ предположили, что углекислота присоединяется к магнию хлорофилла и под действием световой энергии преобразуется в перекисное соединение. Это перекисное соединение разлагается с образованием формальдегида и свободного кислорода.



В последнее время эта схема была отвергнута, так как установлено, что углекислота фиксируется зелеными клетками не только на свету, но и в темноте и что источником выделяемого кислорода служит вода. Выделенная из зеленых листьев ячменя перекись образуется и на свету и в темноте. На свету в отсутствие гидроксиламина перекиси накапливается даже меньше, чем в темноте. Но в присутствии гидроксиламина на свету перекиси накапливается значительно больше, чем без гидроксиламина ⁽¹⁾. Гидроксиламин является ядом для каталазы, а каталаза, как известно, действует только на перекись водорода, но не действует на органические перекиси. Зеленый экстракт из листьев содержит каталазу, но она не разлагает органической перекиси, образуемой в экстракте. Как было показано в предыдущей работе, в темноте в зеленом экстракте накапливается значительное

количество перекиси. Поэтому, вероятно, на свету органическая перекись разлагается с образованием перекиси водорода, которая разрушается каталазой, а в присутствии гидроксилamina накапливается. Обнаружено, что перекись, образуемая на свету, значительно быстрее разлагает иодистый калий, чем перекись, образуемая в темноте. Для разложения иодистого калия перекисью, образуемой в темноте, требуются часы, а перекисью, накапливаемой на свету, — минуты.

Известно, что перекись муравьиной кислоты распадается с образованием углекислоты и водорода. Химическим путем получили и изучили чистую перекись муравьиной кислоты Д'Анс и Книп (4). Они предполагали, что распад перекиси муравьиной кислоты совершается по следующим схемам.



Как видно из приведенных схем, кислород может образоваться и непосредственно из перекиси муравьиной кислоты и после гидролиза ее через перекись водорода. Ввиду того, что яд каталазы гидроксилamin приостанавливает распад перекиси в зеленом экстракте, можно считать, что распад перекиси муравьиного альдегида в этом экстракте совершается через перекись водорода. С другой стороны, по данным Е. Бойченко (5), пленки хлоропластов восстанавливают углекислоту. В качестве продукта восстановления получается соединение со свойствами муравьиной кислоты. Поэтому не исключена возможность, что соединение, обнаруженное Е. Бойченко, находится в связи с перекисью муравьиной кислоты. Муравьиная кислота может образоваться путем восстановления перекиси. О возможных источниках выделенной перекиси и химизме ее образования подробнее будет сообщено в другом месте.

Приношу глубокую благодарность проф. Д. М. Михлину за ценные указания и помощь в работе.

Институт биохимии
им. А. Н. Баха
Академии наук СССР

Поступило
2 XI 1948

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ П. Колесников, Биохимия, 13, 370 (1948). ² А. Н. Бах, Сб. избр. тр., 937, стр. 3. ³ R. Willstätter u. A. Stoll, Untersuchungen über die Assimilation der Kohlensäure, Berlin, 1918. ⁴ J. D'Ans u. A. Knip, Ber. chem. Ges., 48, 1136 (1915). ⁵ Е. Бойченко, Биохимия, 13, 219 (1948).