

А. М. КУЗИН и Р. Я. ШКОЛЬНИК

О ХИМИЧЕСКОЙ ПРИРОДЕ НЕКОТОРЫХ НЕСТОЙКИХ ВЕЩЕСТВ ЗЕЛЕННОГО ЛИСТА РАСТЕНИЯ

(Представлено академиком А. И. Опариным 2 II 1949)

Нами сообщалось ранее ⁽¹⁾, что при исследовании листьев на присутствие ацилфосфатов по методу Липмана ⁽²⁾ (действие гидроксиламина и обнаружение образующейся гидроксамовой кислоты по окрашенному комплексу с железом) мы наблюдали положительный результат всегда, когда неповрежденные листья растирались непосредственно в присутствии гидроксиламина.

Результат той же реакции был отрицателен, если гидроксиламин действовал на предварительно растертые листья. Это дало нам основание утверждать, что в зеленых листьях присутствуют весьма непрочные соединения, по своей активности подобные ацилфосфатам. Попытка обнаружить лабильный фосфор, характерный для ацилфосфатов, предпринятая в нашей лаборатории А. Р. Гусевой ⁽³⁾, не увенчалась успехом. Определение различных фракций фосфора говорило против предположения, что образующееся окрашивание можно всецело объяснить реакцией ацилфосфатов. Было также показано, что и некоторые циклические соединения, например дигидрорезорцин, дают с гидроксиламином и хлорным железом аналогичную окраску ⁽³⁾. Все сказанное оставляло открытым вопрос о природе веществ, обуславливающих наблюдаемую реакцию с гидроксиламином. Так как интересующие нас соединения были крайне непрочны и разрушались при растирании листа, то было предпринято выделение уже стойких производных, получаемых при действии гидроксиламина и дающих характерную реакцию окрашивания с хлорным железом. Исходя из предположения, что при взаимодействии с гидроксиламином образуется гидроксамовая кислота, мы попытались использовать для ее изолирования характерное свойство гидроксамовых кислот давать с медью трудно растворимые соли.

Описание опыта. 600 г свежих листьев сахарной свеклы растерто в присутствии 150 мл раствора, содержащих 12 г свободного гидроксиламина (обработка осуществлялась в несколько приемов). После 10-минутного стояния из растертой массы отжимался сок. К остатку добавлено 100 мл воды, вновь растерто и вновь отжато. Полученный сок объединен и осажден равным объемом спирта. Выпавший осадок удален, а фильтрат сгущен в вакууме при 30° С до 60 мл. Отфильтрован выпавший осадок. Прозрачный фильтрат извлекался трижды амиловым спиртом для удаления всегда присутствующих соединений фенольного характера. Водный раствор, после извлечения амиловым спиртом, давал с хлорным железом в кислой

среде интенсивное вишнево-красное окрашивание. Полученный водный раствор, при нейтральной реакции, осаждался свежеприготовленным раствором уксуснокислой меди. Тотчас выпадал обильный темно-зеленый осадок, который быстро отфильтровывался. Полученный осадок промывался один раз водой и два раза спиртом, после чего взмучивался в 80% спирте и разлагался сероводородом.

Одновременно ставился контрольный опыт с теми же листьями и в тех же условиях, но без гидросиламина. Добавление уксуснокислой меди в этом опыте не давало осадка.

После разложения сероводородом выделенных в опыте медных солей сернистая медь отфильтровывалась и избыток сероводорода удалялся продуванием воздуха. Спирт отогнан в вакууме. Полученный водный раствор имел кислую реакцию на лакмус, с хлорным железом в кислой среде давал интенсивное вишнево-красное окрашивание, характерное для гидроксамовых кислот. При добавлении к водному раствору избытка гидроокиси бария была получена бариевая соль. Бариевая соль промыта водой, спиртом и высушена до постоянного веса. Выход 350 мг. Полученная бариевая соль обладала щелочной реакцией и была плохо растворима в воде. При растворении в разбавленной трихлоруксусной кислоте дает с хлорным железом интенсивное красно-фиолетовое окрашивание, характерное для гидроксамовых кислот. Снятая кривая адсорбции показала максимум при длине волны в 480 м μ , что характерно для гидроксамовых кислот.

При нагревании с концентрированной щелочью выделялся аммиак. При исследовании щелочных сплавов не удалось обнаружить фенольных производных. При нагревании выделенной соли в солянокислом растворе в присутствии нафторезорцина наблюдалось характерное для пентоз красно-фиолетовое окрашивание как в водном растворе, так и в эфирной вытяжке. Бензолом окрашенные вещества не извлекались. Реакция Молиша на углеводы положительна. Все сказанное приводило к предположению, что мы изолировали основную бариевую соль гидроксамовой кислоты производной пентозы.

Анализ выделенной соли дал:

Найдено %: С 9,55; Н 1,69; N 2,2; Ва 66,6
C₅H₇O₈NBa₂. Вычислено %: С 9,6; Н 1,4; N 2,4; Ва 66,2

Значительное содержание бария и основные свойства изолированной соли указывали на то, что выделенная соль являлась бариевым сахаратом приведенной выше гидроксамовой кислоты.

Изолирование производного пентозы наводило на мысль, что при действии гидросиламином на лист растения имеющиеся там свободные пентозы образовывали с гидросиламином оксимы. Из литературы известно (⁴), что оксимы под действием перекисей (например кислоты Каро) окисляются в гидроксамовые кислоты. Таким образом, нам казалось вероятным, что различие в реакции Липмана, наблюдаемое при ее проведении с целым и растертым листом растения, обусловлено тем, что в неповрежденном листе растения находятся весьма активные нестойкие перекиси, которые тотчас и окисляют образующийся оксим пентозы в соответствующее количество гидроксамовой кислоты.

При растирании листа эти перекиси разрушаются, и добавление гидросиламина, приводя к образованию оксимов, не приводит к появлению гидроксамовых кислот. Для подтверждения правильности высказанных предположений были проведены следующие опыты.

1. К растертым листьям, после 20-минутного пребывания их в растертом состоянии, добавлен гидросиламин. Через 10 мин. белки осаждались трихлоруксусной кислотой. В полученном фильтрате реак-

ция на гидроксамовые кислоты (с FeCl_3) отрицательна. При добавлении к фильтрату перекиси водорода в присутствии железа появляется красно-фиолетовое окрашивание, характерное для гидроксамовой кислоты. Реакция наступала быстро при добавлении 5—2,5% раствора H_2O_2 и медленно при добавлении 0,5% раствора.

2. Если к раствору пентозы добавить гидроксилламин, железо и перекись водорода, то быстро развивается красно-фиолетовое окрашивание, характерное для гидроксамовых кислот. То же наблюдается и с другими алифатическими альдегидами. Без железа окисления перекисью водорода в гидроксамовую кислоту не наблюдалось.

3. Был синтезирован оксим галактозы. При действии перекиси водорода в присутствии железа в нейтральном растворе быстро появляется при комнатной температуре интенсивное красно-фиолетовое окрашивание, характерное для гидроксамовых кислот.

4. Неповрежденные листья (традесканции) растирались в присутствии нейтрального раствора оксима галактозы. После 10-минутного стояния белки удаляли трихлоруксусной кислотой, фильтрат извлекали амиловым спиртом, после чего водный слой испытывался с хлорным железом — наблюдалось окрашивание, аналогичное опытам с гидроксилламином. Если оксим галактозы добавлялся к предварительно растертым листьям, то окрашивание было значительно менее интенсивное.

Приведенные опыты подтверждали наше предположение о наличии в неповрежденном листе непрочных перекисей. Наличие нестойких перекисей в зеленых листьях растений хорошо объясняет данные А. М. Кузина и Н. Г. Доман (5), показавших, что диоксималеиновая кислота почти моментально окисляется в диоксиантарную при инфльтрации ее в листья или при растирании листьев в присутствии диоксималеиновой кислоты.

Таблица 1

№ опыта	Состояние взятых листьев (традесканция)	Метод обработки	Характер титрования	Полученные результаты
1 1к	Целые листья, 2 г Предварительно растертые листья, 2 г	Растирание с 5% раствором КJ в 0,01 N уксусной кислоте. Через 10 мин. осаждение трихлоруксусной кислотой	Титрование 0,01 N гипосульфитом в присутствии крахмала	0,25 мл
2 2к	Целые листья, 2 г Предварительно растертые листья, 2 г			0,05 » 0,27 » 0,03 »
3 3к	Целые листья, 5 г Предварительно растертые листья, 5 г	Растирание с 0,02 N $\text{Ce}_2(\text{SO}_4)_3$ в присутствии 0,05 N раствора буры. Осадок отсосан, промыт бурой и растворен в 1 N серной кислоте. Отфильтровано	Добавлен 0,02 N TiCl_3 в атмосфере CO_2 и оттитрован избыток 0,02 N раствором железо-аммиачных квасцов в присутствии роданистого аммония	0,62 »
4 4к	Целые листья Растертые листья, 5 г			раствора титана 0,20 мл 0,30 » 0,00 »
5 5к	Целые листья, 1 г Растертые листья, 1 г	Растверто с 0,5% раствором аскорбиновокислого натрия. После 2-минутного стояния осаждено трихлоруксусной кислотой. Отфильтровано	Титрование в кислой среде раствором дихлор-фенол-индофенола	0,90 » 3,80 »

Это окисление не наблюдалось, если диоксималеиновая кислота добавлялась к предварительно растертым листьям.

Предположение о наличии в неповрежденном листе нестойких легко разрушающихся перекисей побудило нас попытаться обнаружить их другими путями. Были испытаны реакции с иодистым калием, с сернокислым церием, с аскорбиновокислым натрием. Полученные результаты сведены в табл. 1.

Как видно из приведенных данных, листья в момент растирания выделяли иод из иодистого калия, окисляли церий, т.е. давали реакции, характерные для перекисей. После растирания в присутствии ацетатного буфера с $pH = 6,5$ и последующего добавления тех же реактивов при испытании в строго сравнимых условиях эта способность исчезала. Аскорбиновая кислота окислялась и растертыми листьями (ферментативное окисление), однако при растирании с неповрежденными листьями в строго одинаковых условиях окислялось значительно больше, чем в контроле.

Проведенное исследование приводит нас к выводу о наличии в зеленом листе растения нестойких перекисей, обуславливающих реакцию образования гидроксамовых кислот при воздействии на лист гидроксиламина. Здесь интересно отметить, что перекиси органических кислот непосредственно реагируют с гидроксиламином с образованием гидроксамовой кислоты, как это было нами показано на примере перекиси бензоила.

Полученные данные о присутствии в неповрежденном зеленом листе растения активных, крайне нестойких перекисей, как нам кажется, представляют интерес в свете воззрений А. Н. Баха на роль перекисей в процессах фотосинтеза и медленного окисления.

Исследования в этом направлении продолжаются.

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

Поступило
2 II 1949

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ А. М. Кузин и Р. Я. Школьник, ДАН, 59, 941 (1948). ² F. Lippman and L. Tuttle, J. Biol. Chem., 159, 21 (1945). ³ А. Р. Гусева, ДАН, 62, 113 (1948). ⁴ E. Vamberger, Ber. Chem. Ges., 34, 2023 (1901). ⁵ А. М. Кузин и Н. Г. Доман, ДАН, 62, № 2 (1948).