

А. М. КУЗИН и Н. Г. ДОМАН

## ОКИСЛЕНИЕ ДИОКСИМАЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ В ЗЕЛЕНОМ ЛИСТЕ РАСТЕНИЯ

(Представлено академиком А. И. Опариным 8 VII 1948)

Работами Банга и Сцент-Джорджи (1), Банга и Филиппот (2) было показано наличие в листьях многих растений ферментов, окисляющих диоксималеиновую кислоту за счет кислорода воздуха. Указанные авторы, отжимая сок из растертых листьев и прибавляя к нему ацетатный буфер, получали стойкие вытяжки ферментов, сохраняющие активность длительное время.

При энергичном взбалтывании растворов диоксималеиновой кислоты с этими растворами ферментов шло поглощение кислорода и наблюдалось уменьшение редукции растворов при титровании иодом, на основании чего было высказано предположение о ферментативном окислении диоксималеиновой кислоты в диоксоянтарную за счет кислорода воздуха.

Изучая превращения диоксималеиновой кислоты, введенной в зеленый лист растения методом вакуум-инfiltrации, мы обнаружили очень быстрое исчезновение диоксималеиновой кислоты. Для количественного определения диоксималеиновой кислоты мы использовали реакцию с  $TiCl_4$ , проводя ее в присутствии гуммиарабика как стабилизирующего коллоида. Эта введенная нами модификация реакции Фентона (3) приводила к стойкому окрашиванию, поддающемуся колориметрированию. Для колориметрирования был использован ступенчатый фотометр, прокалиброванный по стандартным растворам диоксималеиновой кислоты.

Для инфiltrации были взяты листья традесканции.

Через 5 мин. после начала инфiltrации свежеприготовленного 0,2% раствора диоксималеиновой кислоты, нейтрализованного бикарбонатом натрия до  $pH=6,5$ , листья быстро растирались в токе азота с 4% трихлоруксусной кислотой, раствор немедленно отфильтровывался, и в первых же порциях прозрачного и бесцветного фильтрата сразу определялась диоксималеиновая кислота. Отрицательный результат определения указывал на полное исчезновение диоксималеиновой кислоты.

Предположив, что в указанных листьях имеются ферменты, окисляющие диоксималеиновую кислоту, мы растирали листья с буферным раствором, отжимали сок и к полученному соку добавляли диоксималеиновую кислоту. Определения через 30 мин., 1 и 3 часа неизменно показывали присутствие диоксималеиновой кислоты, очень медленно исчезающей при этих условиях.

Допуская, что окисляющие ферменты удаляются со стромой, мы видоизменили опыты. Исследуемые листья (традесканции) растирались

в присутствии ацетатного буфера (рН=6,2) с кварцевым песком, и к полученной массе добавлялся нейтрализованный раствор диоксималеиновой кислоты. Результат был тот же: диоксималеиновая кислота исчезала крайне медленно. Через 1 час оставалось 70% неизменной диоксималеиновой кислоты по отношению к количеству в контрольном опыте.

На основании полученных результатов мы пришли к выводу, что в неразрушенном листе растения имеются вещества, принимающие участие в исчезновении диоксималеиновой кислоты, вещества крайне нестойкие, разрушающиеся при растирании листа.

Чтобы проверить это предположение, мы добавляли раствор диоксималеиновой кислоты (рН=6,5) к неповрежденным листьям и растирали их с кварцевым песком в присутствии диоксималеиновой кислоты. После растирания тотчас добавлялась трихлоруксусная кислота. Исследование фильтрата в различных опытах показывало или полное или близкое к 100% исчезновение диоксималеиновой кислоты.

Результаты ряда опытов представлены в табл. 1.

Таблица 1

Исчезновение диоксималеиновой кислоты при добавлении к листьям традесканции

Диоксималеиновая кислота добавлена	Определение диоксималеиновой кислоты в % к добавленному количеству через			
	1 мин.	5 мин.	20 мин.	60 мин.
К целым листьям (растирание с диоксималеиновой кислотой в течение 0,5 мин.) . . . . .	19	7	0	0
Через 20 мин. после растирания листьев . . . . .	90	86	83	75
Через 5 мин. после растирания листьев . . . . .	87	83	81	77
Через 1 мин. после растирания листьев . . . . .	86	80	76	69
К целым листьям (растирание с диоксималеиновой кислотой в течение 0,5 мин.) . . . . .	20	8	4	0
То же . . . . .	16	0	0	0

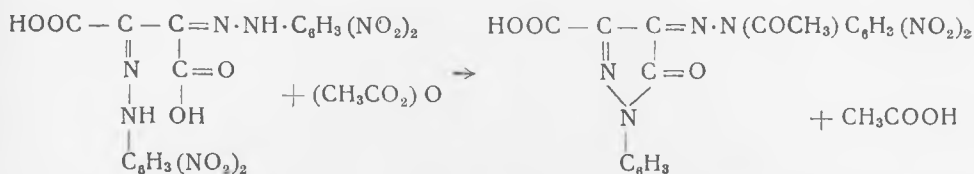
Примечание. Во всех опытах взято 1 г свежих листьев традесканции и добавлено 3 мл 0,2% нейтрализованного раствора диоксималеиновой кислоты (рН=6,5).

Убедившись в резком различии воздействия на диоксималеиновую кислоту растертых листьев и листьев в момент растирания, мы попытались изолировать вещества, образующиеся в результате исчезновения диоксималеиновой кислоты.

10 г листьев традесканции были растерты в присутствии 0,05 г диоксималеиновой кислоты. Тотчас после растирания добавлено 20 мл 8% трихлоруксусной кислоты. При добавлении к отфильтрованному прозрачному раствору, не содержащему диоксималеиновой кислоты (отрицательная реакция с четыреххлористым титаном), 2,4-динитрофенилгидразина через 30 мин. при 25°C выпадал осадок. Полученный оранжевый осадок давал со спиртовым раствором щелочи темносинее окрашивание, характерное для озазонов. После растворения в уксусном ангидриде выпадал желтый осадок, который при легком нагревании растворялся, при этом происходило резкое изменение цвета раствора, и при быстром охлаждении начиналось выделение прекрасно образованных игл яркокрасного цвета. Выделенные кристаллы плавилась при 251—252°.

Элементарный анализ дал содержание: С=39,96—39,78%; Н=1,95—1,98%; N=21,31—21,50%.

Для ацетилированного пирозалонного производного, которое могло легко образоваться из озазонов по реакции:



Вычислено С=40,76<sup>0</sup>/<sub>0</sub>; Н=1,89<sup>0</sup>/<sub>0</sub>; N=21,32<sup>0</sup>/<sub>0</sub> (C<sub>18</sub>H<sub>10</sub>O<sub>12</sub>N<sub>3</sub>).

Диоксоянтарная кислота была получена нами путем окисления диоксималеиновой кислоты раствором иода в кислой среде.

Полученное аналогичным путем производное 2,4-динитрофенилгидразона дало т. пл. 251—252°. Смешанная проба кристаллов, выделенных из опыта и полученных синтетически, дала т. пл. 251—252°.

Проведенное исследование показывает, что при растирании диоксималеиновой кислоты с неповрежденным листом происходит быстрое (1—2 мин.) окисление диоксималеиновой кислоты в диоксоянтарную. Вещества зеленого листа, обуславливающие это окисление, крайне непрочны. Достаточно прогреть неповрежденный лист в парах при 100° в течение 3 мин., как они полностью разрушаются, и дальнейшее растирание с такими прогретыми листьями не оказывает влияния на диоксималеиновую кислоту. Разрушаются указанные вещества и при действии на лист паров эфира.

Наконец, как было указано выше, они разрушаются также при нарушении структуры листа — при его растирании. Остающиеся ферменты вызывают медленное исчезновение диоксималеиновой кислоты, несравнимое с наблюдаемым в момент растирания. Являются ли эти вещества нестойкими ферментами или же нестойкими веществами с высоким окислительным потенциалом — покажет дальнейшее исследование.

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

Поступило  
6 VII 1948

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup>J. Bangau. A. Szent-Györgyi, Z. physiol. Chem., 255, 57 (1938).  
<sup>2</sup>J. Bangau. E. Philippot, *ibid.*, 258, 148 (1939). <sup>3</sup>Fenton, Soc., 93, 1069 (1907).