

СОНИЯ ВЕЙМЕР, ТИИУ ХАНСЕН

## ОБ ИДЕНТИФИКАЦИИ МНОГОАТОМНЫХ СПИРТОВ И СВОБОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ У НЕКОТОРЫХ ВИДОВ ЧЕШУЕКРЫЛЫХ

Наличие большого количества глицерина и других многоатомных спиртов у насекомых во время диапаузы уже ранее отмечалось многими авторами (Chino, 1957, 1958; Salt, 1958, 1959; Sømme 1964, 1965, 1967; Wyatt, Meyer, 1959). Имеются указания о накоплении необычно больших количеств некоторых свободных аминокислот во время диапаузы (Mansing, 1967).

Многоатомные спирты начинают накапливаться у насекомых осенью и их количество максимально зимой. В связи с этим им отводится большая роль в холодостойкости насекомых. Л. Сэмме (Sømme, 1967) показал существование прямой корреляции между температурой, при которой содержались гусеницы *Nemapogon personellus* и куколки *Pieris brassicae*, аноксией и содержанием в них трегалозы и аланина, сорбита и аланина соответственно.

Указанные авторы устанавливали наличие у насекомых многоатомных спиртов — глицерина, сорбита, маннита и дульцита при помощи хроматографии на бумаге, сравнивая  $R_f$  исследуемого раствора с  $R_f$  стандартного раствора. Так как  $R_f$  таких многоатомных спиртов, как сорбит, маннит, дульцит, очень близки, возникает сомнение в возможности разделения их смеси методом хроматографии на бумаге.

Цель данной работы — выяснение возможности разделения смеси дульцита, маннита, сорбита методом хроматографии на бумаге и идентификация многоатомных спиртов у десяти видов чешуекрылых. В то же время был определен и качественный состав свободных аминокислот у исследуемых видов насекомых.

### Материал и методика

Часть материала (*Sphingidae*, *Pieridae*) в виде гусениц была собрана в природных условиях летом 1967 г., а остальная — выведена в стеклянных банках при соблюдении высших условий. Куколки *Mamestra persicariae* L., *Pachetra brassicae* L., *Apatele aceris* L., *Clostera pigra* Hfn., *Smerinthus ocellatus* L., *Smerinthus populi* L., *Sphinx ligustri* L. и гусеницы *Amathes triangulum* Hfn. помещались для перезимовки в ящик, который был зарыт в землю и завален снегом. Температура в ящике не падала ниже  $-1,5^{\circ}\text{C}$ . Куколки *Pieris brassicae* L. и *Pieris rapae* L. хранились под стеклом, где в основном поддерживалась внешняя температура, которая здесь не опускалась ниже  $-20^{\circ}$ .

Пробы для анализа брались в конце декабря и в течение января. Исследуемый материал (гусеницы, куколки) опускали в кипящий спирт ( $96^{\circ}$ ) в колбу с обратным холодильником и кипятили в течение 30 мин. Спирт был взят в 10-кратном количестве



по отношению к весу проб. Такая обработка сохраняет материал продолжительное время, но перед дальнейшей обработкой он должен находиться в спирте не менее 2—3 суток. После этого спирт вместе с исследуемым материалом сливали в колбу Кляйзена и отгоняли в вакууме досуха. После такой обработки частично обезвоженный материал был перенесен в ступку. На стенках колбы оставался налет твердого вещества (извлеченный спиртом из исследуемого материала), который также необходимо было перенести в ступку. Для извлечения этого налета в колбу с исследуемым материалом было внесено 3—5 мл смеси спирта и эфира (1:1). При вращении колбы твердые частицы материала сняли налет со стенок колбы. После этого жидкость слили в ступку. Эта операция повторялась еще 2—3 раза, пока со стенок колбы не был снят весь налет, а колба потом промывалась еще несколько раз эфиром, который также сливали в ступку. Ступку помещали в эксикатор над серной кислотой и держали там до тех пор, пока не улетучивалась вся жидкость. Высушивание пробы продолжали при 40—60° в вакуумном шкафу до сухого состояния и растирали в ступке в мелкий порошок. Затем оставляли на сутки на воздухе до перехода его в воздушносухое состояние. Такой материал сохраняли в холодильнике в плотно закупоренных пробирках.

Материал для хроматографирования готовили методом, описанным Р. Солтом (Salt, 1959). Исследуемые растворы в разных концентрациях наносили микропипеткой на хроматографическую бумагу (марка «Ленинградская-С») в пятно диаметром 0,5 см на расстоянии 2,5 см от нижнего края бумаги. Рядом с исследуемыми растворами наносили смесь глицерина, сорбита, маннита и дульцита. На другую бумагу наносили растворы отдельных многоатомных спиртов и раствор их смеси. Было использовано шесть разных систем растворителей: *n*-бутанол—уксусная кислота—вода (4:1:2), *n*-бутанол—уксусная кислота—вода (4:1:5), этанол—аммиак водный (95:5), изопропанол—*n*-бутанол—вода (7:1:2), изопропанол—вода (4:1) и 80%-ный изобутанол. Для проявления хроматограмм были использованы следующие проявители: раствор азотнокислого серебра (5%  $\text{AgNO}_3$ , 25%  $\text{NH}_4\text{OH}$  (9:1)), проявитель, описанный Л. Сэмме (Sømme, 1964), йодная кислота— $\text{KMnO}_4$ —бензидин, бромкрезоловый зеленый — борная кислота, описанный И. Хайсом и К. Мацеком (1962), и проявитель, описанный Г. Уайтом и Б. Мейером (Wyatt, Meyer, 1959). Так как указанные проявители проявляют также сахар, то предварительно был выяснен вопрос об их присутствии в пробах с помощью следующих проявителей: а) кислый фталат анилина, б) реактив из орцина, приготовленный методом, описанным И. Хайсом и К. Мацеком (1962). Хроматограммы свободных аминокислот разгоняли сначала два раза растворителем: *n*-бутанол—ледяная уксусная кислота—вода (4:1:5), а потом еще два раза тем же растворителем, но с несколько другим соотношением компонентов (40:15:5). В качестве проявителей использовали 0,5%-ный раствор нингидрина в смеси ацетона с этанолом (96%) и 0,5%-ный раствор изатина в этаноле (96%).

## Результаты и обсуждение

Результаты разделения многоатомных спиртов на хроматограммах приведены в табл. 1 и на рис. 1 и 2.

Из рис. 1 видно, что растворитель этанол — аммиак водный (95:5) не пригоден для разделения смеси многоатомных спиртов, потому что, если в исследуемом растворе дульцита больше, чем 30  $\mu\text{g}$ , то он частично остается на стартовой линии, а частично движется вверх, образовав длинный хвост, который в дальнейшем будет мешать количественному определению этих веществ. Если же дульцита меньше 30  $\mu\text{g}$ , то он движется вместе с сорбитом и маннитом. Самым подходящим оказался растворитель *n*-бутанол—уксусная кислота—вода (4:1:2), так как при дальнейшем проявлении хроматограмм он вызывал наиболее слабый фон бумаги. Самым чувствительным оказался проявитель, описанный Л. Сэмме (Sømme, 1964). Из табл. 1 видно, что глицерин хорошо разделяется от других спиртов в пяти растворителях, а сорбит, маннит, дульцит не разделяются между



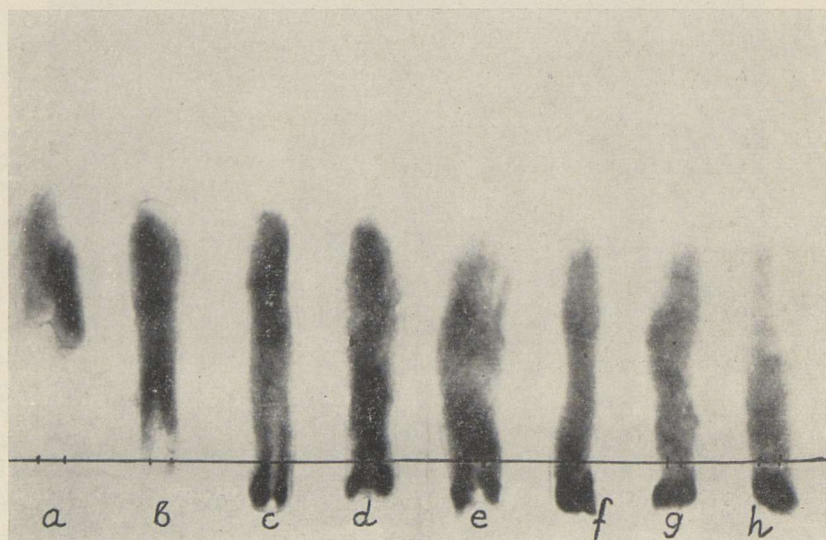


Рис. 1. Хроматограмма многоатомных спиртов в растворителе этанол—аммиак водный (95:5). Проявитель — азотнокислое серебро. *a* — смесь многоатомных спиртов: сорбита, маннита, дульцита (дульцит <math><30\ \mu\text{г}</math>), *b* — дульцит — 60  $\mu\text{г}$ , *c* — дульцит — 90  $\mu\text{г}$ , *d* — дульцит — 120  $\mu\text{г}$ , *e* — дульцит — 150  $\mu\text{г}$ , *f* — дульцит — 180  $\mu\text{г}$ , *g* — дульцит — 210  $\mu\text{г}$ , *h* — дульцит — 240  $\mu\text{г}$ .

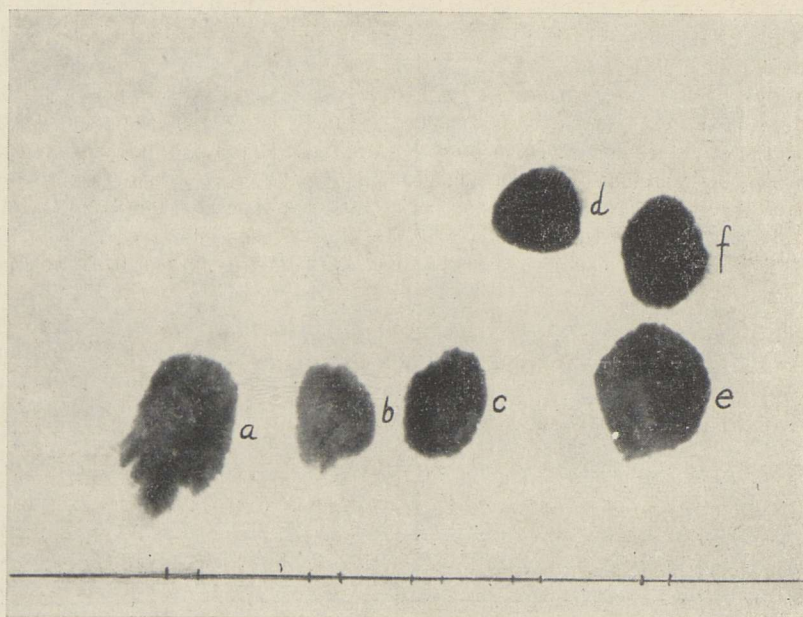


Рис. 2. Хроматограмма отдельных многоатомных спиртов и их смеси в растворителе *n*-бутанол—уксусная кислота—вода (4:1:5). Проявитель — азотнокислое серебро. *a* — сорбит, *b* — маннит, *c* — дульцит, *d* — глицерин, *e* — сорбит, маннит, дульцит, *f* — глицерин.



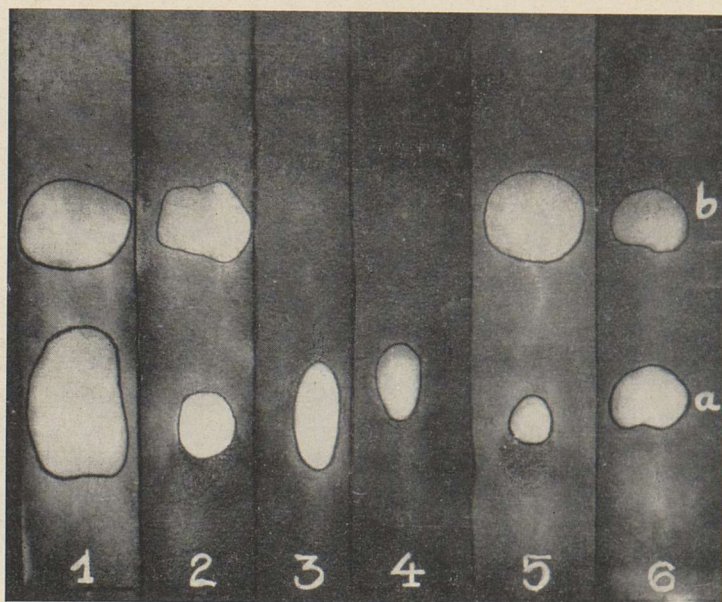


Рис. 3. Хроматограмма растворов пяти исследованных видов насекомых в растворителе *n*-бутанол—уксусная кислота—вода (4:1:2). Проявитель, описанный Сэмме (Sømme, 1964). 1 — *Amathes triangulum*, 2 — *Clostera pigra*, 3 — *Pachetra brassicae*, 4 — *Pieris rapae*, 5 — *Apatete aceris*, 6 — смесь многоатомных спиртов-свидетелей: *a* — сорбит, маннит, дульцит, *b* — глицерин.

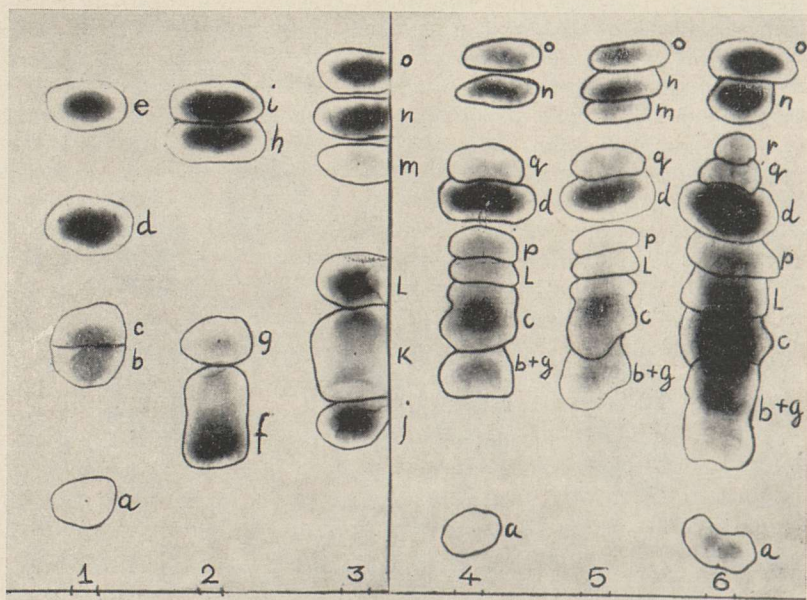


Рис. 4. Хроматограмма свободных аминокислот в растворителе *n*-бутанол—уксусная кислота—вода (4:1:5 и 40:15:5). 1—3 — аминокислоты-свидетели, 4 — *Apatete aceris*, 5 — *Pieris brassicae*, 6 — *Pachetra brassicae*. *a* — цистеин-цистин, *b* — аспарагиновая кислота, *c* — серин+глицин, *d* — аланин, *e* — норлейцин, *f* — орнитин, *g* — аспарагин, *h* — метионин, *i* — норвалин, *j* — лизин, *k* — гистидин, *l* — глутаминовая кислота + глутамин, *m* — триптофан, *n* — валин, *o* — лейцин, *p* — треонин, *q* — пролин, *r* — тирозин.



собой ни в одном из них, хотя и между их  $R_f$  существует некоторая разница. Это хорошо иллюстрирует рис. 2. Для подтверждения полученных результатов проводились опыты при разных концентрациях, начиная с 2  $\mu\text{g}$  каждого чистого вещества в смеси до 270  $\mu\text{g}$ ; результаты во всех случаях были одни и те же. В литературе опубликованы данные о присутствии не только сорбита у насекомых, но и маннита. Л. Сэмме (Somme, 1964) идентифицировал маннит в яйцах *Alsophila prometeria* Harris и *Pterocomma smithia* Mopell. Поэтому более целесообразно говорить о присутствии в исследуемых пробах группы, состоящей из сорбита, маннита и дульцита, чем о присутствии этих веществ в отдельности.

Результаты анализа состава многоатомных спиртов приведены в табл. 2 и на рис. 3. Проявители многоатомных спиртов дали на хроматограммах четкие пятна, в то время как кислый фталат анилина и ордин, которые являются очень чувствительными проявителями по отношению к альдозам и кетозам соответственно, никаких заметных пятен не вызвали. Этот факт показал, что в исследуемых пробах отсутствовали сахара и пятна вызваны многоатомными спиртами.

Из табл. 2 видно, что во время диапаузы все исследуемые виды чешуекрылых содержали группу сорбита, маннита, дульцита, но только у четырех из них *Clostera pigra*, *Mamestra persicariae*, *Apatele aceris* и *Amathes triangulum* присутствовал глицерин. Судя по интенсивности окраски пятен на хроматограммах, можно сказать, что особенно много глицерина содержали куколки *Apatele aceris* и *Clostera pigra* и гусеницы *Amathes triangulum*. Результаты показывают, что глицерин не обязательно накапливается во время диапаузы у всех видов и что образование глицерина в больших количествах характерно только для некоторых видов насекомых.

Таблица 1

Значения  $R_f$  растворов двух проб и чистых многоатомных спиртов на восходящих хроматограммах

	Растворители					
	1	2	3	4	5	6
<i>Clostera pigra</i>	0,56	0,45	0,63	0,80	0,92	0,86
<i>Pieris brassicae</i>	0,37	—	0,35	0,43	0,67	0,86
Сорбит	0,34	—	0,35	0,42	0,65	0,86
Маннит	0,30	0,24	0,34	0,39	0,68	0,84
Дульцит	0,33	0,25	0,28	0,44	0,70	0,86
Глицерин	0,29	0,25	0,25	0,40	0,56	0,84
Смесь	0,55	0,49	0,61	0,79	0,97	0,84
	0,55	0,45	0,62	0,80	0,97	0,86
	0,35	0,26	0,36	0,44	0,68	

Примечание: 1 — *n*-бутанол—уксусная кислота—вода (4:1:2); 2 — *n*-бутанол—уксусная кислота—вода (4:1:5); 3 — этанол—аммиак водный (95:5); 4 — изопропанол—*n*-бутанол—вода (7:1:2); 5 — изопропанол—вода (4:1); 6 — 80%-ный изобутанол.

Таблица 2

Качественный состав многоатомных спиртов у некоторых видов чешуекрылых во время диапаузы

Вид	Зимующая стадия	Глицерин	Сорбит Маннит Дульцит
<i>Sphinx ligustri</i>	Куколка	—	+
<i>Clostera pigra</i>	„	+	+
<i>Mamestra persicariae</i>	„	+	+
<i>Apatele aceris</i>	„	+	+
<i>Pieris brassicae</i>	„	—	+
<i>Pachetra brassicae</i>	„	—	+
<i>Smerinthus ocellatus</i>	„	—	+
<i>Smerinthus populi</i>	„	—	+
<i>Pieris rapae</i>	„	—	+
<i>Amathes triangulum</i>	Гусеница	+	+



Таблица 3

Значения  $R_f$  свободных аминокислот у трех исследованных видов насекомых (1 — *Sphinx ligustri*, 2 — *Clostera pigra*, 3 — *Mamestra persicariae*) и аминокислот-свидетелей на восходящих хроматограммах

Аминокислоты	Растворитель: <i>n</i> -бутанол—уксусная кислота—вода (4:1:5), (40:15:5)				Окраска пятен на хроматограммах	
	1	2	3	Свидетели	Нингидрин	Изатин
Цистеин-цистин	0,28	0,28	0,28	0,28	Ф	Кр-ф
Аспарагиновая кислота + аспарагин	0,48	0,48	0,48	0,51	Син-ф	Т-син
Серин + глицин	0,55	0,55	0,55	0,53	Ф, Кр-ф	Кр-ф, К-ж
Глутаминовая кислота + глутамин	0,57	0,58	0,58	0,58	Кр-ф	З-ф
$\alpha$ -, $\beta$ -Аланин	0,62	0,68	0,62	0,60	Ф	Т-син
Пролин	0,74	0,74	0,73	—	Ж	Син
Валин	0,82	0,83	0,83	0,82	Ф	Кр-ф
Лейцин	—	—	—	0,84	Ф	Кр-ф
Норлейцин	0,88	0,88	0,88	0,88	Ф	Син
Орнитин	—	—	—	0,37	Ф	—
Метинин	—	—	—	0,79	Ф	Сер-ф
Норвалин	—	—	—	0,85	Ф	Син-ф
Лизин	—	—	—	0,43	Кр-ф	Син-о
Гистидин	—	—	—	0,49	Кр-ф	З-ф
Триптофан	—	—	—	0,76	Ф	О-кр

Примечание: Ж — желтый, З — зеленый, К — коричневый, Кр — красный, О — оранжевый, Сер — серый, Син — синий, Т — темный, Ф — фиолетовый.

Таблица 4

Сводная таблица состава свободных аминокислот у некоторых видов чешуекрылых во время диапаузы

Вид	Стадия развития	Цистеин-цистин	Аргинин	Аспарагиновая кислота + аспарагин	Серин + глицин	Глутаминовая кислота + глутамин	Треонин	$\alpha$ -, $\beta$ -Аланин	Пролин	Валин	Норлейцин	Триптофан	Тирозин
<i>Sphinx ligustri</i>	Ку-колка	+	—	+	+	+	—	+	+	+	+	—	—
<i>Clostera pigra</i>	„	+	—	+	+	+	—	+	+	+	+	—	—
<i>Mamestra persicariae</i>	„	+	—	+	+	+	—	+	+	+	+	—	—
<i>Apatele aceris</i>	„	+	—	+	+	+	—	+	+	+	+	—	—
<i>Pieris brassicae</i>	„	—	—	+	+	+	—	+	+	+	+	+	—
<i>Pachetra brassicae</i>	„	+	—	+	+	+	—	+	+	+	+	—	+
<i>Smerinthus ocellatus</i>	„	+	+	+	+	+	—	+	+	+	+	—	—
<i>Smerinthus pcpuli</i>	„	+	+	+	+	+	—	+	+	+	+	—	—
<i>Pieris rapae</i>	„	—	+	+	+	+	—	+	+	+	+	+	—
<i>Amathes triangulum</i>	Гусеница	+	+	+	+	+	—	+	+	+	+	—	—

$R_f$  свободных аминокислот и исследуемых растворов, а также окраски пятен на хроматограммах приведены в табл. 3. Результаты качественного состава свободных аминокислот приведены в табл. 4 и на рис. 4. Эти данные показывают, что качественный состав свободных аминокислот у исследуемых видов в общем один и тот же. Такие аминокислоты, как аспарагиновая кислота + аспарагин, серин + глицин, глутаминовая кислота +



глутамин, аланин, пролин, валин, норлейцин присутствуют у всех исследованных видов насекомых. У большинства видов идентифицировали цистеин-цистин и треонин. Кроме названных свободных аминокислот были найдены еще аргинин, триптофан и тирозин (см. табл. 4). Судя по интенсивности окраски пятен на хроматограммах, можно сказать, что зимой, во время диапаузы, из свободных аминокислот доминируют аланин и пролин. Особенно много аланина и пролина было обнаружено у *Apatele aceris*, *Pieris brassicae*, *Pieris rapae* и *Amathes triangulum*. Эти результаты совпадают с данными Л. Сэмме (Sømme, 1967) о присутствии большого количества аланина у куколок *Pieris brassicae*, а также с данными А. Мансинга (Mansingh, 1967). А. Мансинг указывает на необычно большие количества пролина и аланина во время диапаузы у куколок *Antheraea pernyi* и считает, что накопление этих аминокислот является в природе вторичным и связано с физиологическими и биохимическими перестройками во время диапаузы, а также с холодостойкостью насекомых.

Полученные нами результаты о накоплении многоатомных спиртов и свободных аминокислот у рассмотренных видов насекомых являются предварительными. Чтобы выяснить динамику этих веществ и глубже понять процесс их накопления во время диапаузы у данных видов, необходимо провести дальнейшие исследования.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Хайс И. М., Мацек К., 1962. Хроматография на бумаге. М.
- Chino H., 1957. Conversion of glycogen to sorbitol and glycerol in the diapause egg of the Bombyx silkworm. *Nature* **180** (4586) : 606—607.
- Chino H., 1958. Carbohydrate metabolism in the diapause egg of the silkworm Bombyx mori. II. Conversion of glycogen into sorbitol and glycerol during diapause. *J. Insect Physiol.* **2** : 1—12.
- Mansingh A., 1967. Changes in the free amino acids of the haemolymph of *Antheraea pernyi* during induction and termination of diapause. *J. Insect Physiol.* **13** (11) : 1645—1655.
- Salt R., 1958. Role of glycerol in producing abnormally low supercooling and freezing points in an insect *Bracon cephi* (Gahan). *Nature* **181** (4618) : 1281.
- Salt R. W., 1959. Role of glycerol in the cold-hardening of *Bracon cephi* (Gahan). *Can. J. Zool.* **37** : 59—69.
- Sømme L., 1964. Effects of glycerol on cold-hardiness in insects. *Can. J. Zool.* **42** : 87—101.
- Sømme L., 1965. Changes in sorbitol content and supercooling points in overwintering eggs of the European red mite (*Panonychus ulmi* (Koch)). *Can. J. Zool.* **43** : 881—884.
- Sømme L., 1967. The effect of temperature and anoxia on haemolymph composition and supercooling in three overwintering insects. *J. Insect Physiol.* **13** (5) : 805—814.
- Wyatt G. R., Meyer W. L., 1959. The chemistry of insect haemolymph. III. Glycerol. *J. Gen. Physiol.* **42** (5) : 1005—1011.

Институт зоологии и ботаники  
Академии наук Эстонской ССР

Поступила в редакцию  
4/III 1969

Состав фауны макроэнтомокрылых Эстонии в 1924 году

Приведенное в монографии В. Петерсена (1924) число видов (775) не отражает действительного состава фауны, так как В. Петерсен пользовался дополнительной нумерацией (358 bis *Yaelocampa piliosa* F.)



SONIA VEIMER, TIJU HANSEN

## MITMEALUSELISTE ALKOHOLIDE JA VABADE AMINOHAPETE IDENTIFITSEERIMISEST MÖNEDEL LIBLIKALIHKIDEL

## Resümee

Mitmealuseliste alkoholide ja vabade aminohapete kvalitatiivne koostis identifitseeriti paberkromatograafia abil kümnelt liblikaliigil. Neljal liigil esines diapausi ajal glütseriin. Vabadest aminohapetest domineerisid alaniin ja proliin.

Mitmealuseliste alkoholide eraldamiseks kasutati kuut erinevat lahustit. Viies neist eraldus glütseriin hästi teistest mitmealuselistest alkoholidest, kuid sorbiiti, manniiti ja dultsiiti ei õnnestunud eraldada üheski neist.

Aminohapete eraldamiseks kasutati lahustit *n*-butanool-äädikhape-vesi (4:1:5 ja 40:15:5). Kvalitatiivseks määramiseks ilmutati kromatogrammid ninhüdrini ja isatiini lahusega.

Eesti NSV Teaduste Akadeemia  
Zooloogia ja Botaanika Instituut

Saabus toimetusse  
4. III 1969

SONIA VEIMER, TIJU HANSEN

## ON THE IDENTIFICATION OF POLYHYDRIC ALCOHOLS AND FREE AMINO ACIDS IN SOME INSECTS

## Summary

The presence of polyhydric alcohols and free amino acids was identified in ten species by paper chromatography. Glycerol was found in 4 studied species during diapause. Of all the free amino acids, alanin and prolin predominated.

Polyhydric alcohols were separated with six different solvents. In five of them, glycerol was clearly separated from other polyhydric alcohols, but it was impossible to separate sorbitol, mannitol and dulcitol in any of these solvents.

Amino acids were run on chromatographic paper with *n*-butanol-acetic acid-water 4:1:5 and 40:15:5 as a solvent. The chromatograms were sprayed with solutions of ninhydrin and isatin.

Academy of Sciences of the Estonian SSR,  
Institute of Zoology and Botany

Received  
March 4, 1969