

ЗВ'ЯЗУВАННЯ ЦІАНІДИНУ З ІОНАМИ КАДМІЮ В РОЗЧИНІ

В. С. ФЕДЕНКО, С. А. ШЕМЕТ, В. С. СТРУЖКО

НДІ біології Дніпропетровського національного університету, Україна;
e-mail: opticl@ukr.net, bmi@ff.dsu.dp.ua

Установлен эффект связывания цианидина, выделенного из корней проростков кукурузы, с ионами кадмия в растворе на основании данных абсорбционной спектроскопии и колориметрии. Определены спектральные параметры для идентификации пигмента, ассоциированного с металлом.

К л ю ч е в ы е с л о в а: цианидин, ионы кадмия, связывание, абсорбционная спектроскопия, колориметрия.

Кадмій – один із найпоширеніших поліантів серед важких металів – дуже небезпечний для живих організмів через високу токсичність [1]. Накопичення його в рослинах призводить до різноманітних порушень в метаболізмі [2]. Однією із захисних реакцій рослин вважається індукція синтезу сполук, зокрема фітохелатинів та металотіонеїнів, здатних зв'язувати цей важкий метал [2, 3]. Фітохелатини за хімічною природою належать до цистеїнвмісних пептидів, попередником синтезу яких є глутатіон [2]. Установлено корелятивний зв'язок між фіто-токсичністю металу та його здатністю асоціюватися з SH-групами в молекулах [3].

Зв'язування токсичного металу з вторинними метаболітами розглядають як альтернативу взаємодії його з біологічно важливими макромолекулами, зокрема з ДНК [4], яке може спричинити істотне порушення функціонування організму. Тому наявність у тканинах низькомолекулярних ендогенних хелаторів вважають одним із чинників видоспецифічної толерантності рослин, що здатні до гіперакумуляції кадмію [5]. Дослідження цього аспекту проблеми має практичне значення для фізіолого-біохімічного обґрунтування вибору тих чи інших рослин з метою фіторе-медіації природних середовищ, забруднених важкими металами.

Крім фітохелатинів, властивості ендогенних біолігандів притаманні також іншим низькомолекулярним метаболітам, в т. ч. фенольним сполукам, за участю яких реалізуються захисні механізми рослин у разі дії на них стресорів різної природи [6]. Серед таких сполук привертають увагу антоціани, які відіграють значну роль у формуванні стійкості рослин до несприятливих умов середовища [7]. Наявність в молекулах структурного фрагмента з *o*-гідроксильними групами в бензолному кільці В зумовлює здатність цих речовин зв'язувати іони металів. Дані літератури

щодо утворення антоціанами хелатів можна систематизувати за трьома напрямками. По-перше, вони стосуються реакцій зв'язування пігментів з іонами Al^{3+} – аналітичним реагентом для ідентифікації їхньої структури [8, 9]. По-друге, показано, що хелатування антоціанів з біогенними металами зумовлює ефект копігментації в рослинних тканинах *in vivo* [10, 11]. По-третє, в публікаціях висвітлено, що асоціація антоціанів з металами має важливе значення у процесах перероблення рослинної сировини, оскільки зміна їхнього кольору, позначається на забарвленні харчових продуктів [12]. Проте роль асоціації металів з антоціанами у формуванні стійкості рослин досліджено недостатньо. В цьому аспекті заслуговують на увагу дані К. L. Hale et al. [13] щодо ідентифікації комплексу пігментів з молібденом у проростках *Brassica juncea*.

Для виявлення ефектів асоціації антоціанів з Cd^{2+} *in vivo* необхідно здійснити попередні дослідження такої взаємодії в модельних експериментах *in vitro* з визначенням параметрів, необхідних для ідентифікації зв'язаного з металом пігменту. Оскільки надходження кадмію в рослини відбувається через кореневу систему, ефекти зв'язування його у тканинах доцільно вивчати на тест-об'єкті, який накопичує антоціани саме в коренях. Таким тест-об'єктом є проростки кукурудзи, в коренях яких, згідно з даними Т. А. Holton та Е. С. Cornish [14], накопичується ціанідин із потенційними властивостями біоліганду. Селективне поглинання ціанідином променів світла у видимому діапазоні [8] дає можливість використати спектральні методи для вивчення асоціації пігменту з металом.

Мета роботи – дослідити процес зв'язування Cd^{2+} з ціанідином у розчині, виділеного з коренів проростків кукурудзи, а також визначити спектральні параметри асоційованого з металом пігменту.

Матеріали і методи

Ціанідин екстрагували 1%-ним розчином HCl в ізопропанолі [15] з коренів проростків кукурудзи гібриду Промінь 170 МВ, які вирощували протягом 8 діб у рулонах вологого фільтрувального паперу. Концентрацію ціанідину в екстракті визначали за коефіцієнтом молярного поглинання, який становив 30 л/ммоль·см, за довжини хвилі 530 нм [16].

Взаємодію ціанідину з Cd^{2+} вивчали спектрофотометричним методом [8]. Спектри поглинання розчинів вимірювали на спектрофотометрі Specord M-40 (Німеччина) в діапазоні 350–800 нм у кюветі з довжиною оптичного шляху 1 см. Зразки екстракту ціанідину перед вимірами розводили наступним чином: 1) 1 мл екстракту + 1,5 мл води; 2) 1 мл екстракту + 1 мл води + 0,5 мл 0,1 н розчину NaOH; 3) 1 мл екстракту + 1 мл 10^{-2} моль/л розчину $Cd(NO_3)_2$ + 0,5 мл 0,1 н розчину NaOH. Диференційний спектр поглинання реєстрували для варіанта 3 відносно варіанта 2. Величину рН розчинів вимірювали на іонометрі ЕВ-74.

Зміну кольору розчинів визначали колориметричним методом на спектрофотометрі Specord M-40, який додатково обладнували касетою “Color Measurement” для математичного оброблення даних згідно з рекомендаціями в роботі [17]. Кольорові характеристики наведено в колориметричних системах XYZ (координати кольору X, Y, Z, координати кольоровості x, y; домінуюча довжина хвилі XYZ λ_d ; умовна чистота кольору P_c ; коефіцієнт яскравості L) та CIE Lab 77. На основі колориметричних коефіцієнтів розраховано різницю кольору ΔA між різними зразками з розподіленням цієї інтегральної величини на складові різниці за яскравістю ΔL , кольоровістю ΔC та кольоровим тоном ΔH .

Для виділення металовмісного препарату до вихідного екстракту ціанідину додавали 10^{-2} моль/л розчин $Cd(NO_3)_2$ у співвідношенні 1 : 1 (за об'ємом), після чого доводили рН до 7,0 0,1 н. NaOH. Осад відфільтровували, послідовно промивали 50%-ним водним ізопропанолом та водою і висушували.

Вміст кадмію в металовмісному препараті визначали методом атомно-абсорбційного аналізу на спектрофотометрі AAS-30 (Німеччина). ІЧ-Спектр препарату реєстрували на спектрофотометрі Specord-75 IR (Німеччина) в діапазоні $1100\text{--}4000\text{ см}^{-1}$ у вигляді суспензії у вазеліновому маслі на оптичному склі із флюориту. Для підготовки зразка (5%-ної суміші препарату з MgO) до вимірів спектра відбиття користувались стандартним тримачем порошкоподібних препаратів. Спектри відбиття підготовленого зразка

вимірювали в діапазоні 350–800 нм на спектрофотометрі Specord M-40, додатково обладнаного приставкою з фотометричною кулею і касетою “Data Handling I” для математичного оброблення даних [17]. Інтенсивність спектра відбиття наведено в одиницях абсорбції з метою порівняння зі спектрами поглинання розчинів за положенням максимумів. Під час колориметричних вимірів використовували іншу касету “Color Measurement” до спектрофотометра Specord M-40 [17].

Статистичне оброблення експериментальних даних здійснювали стандартними методами, похибка вимірів не перевищувала 5%.

Результати та обговорення

Відомо [14], що ціанідин у рослинах кукурудзи є 3-глікозидом і, згідно з даними літератури [12], за рН 0,9 міститься в екстракті у флавілієвій формі I (рис. 1). На селективність поглинання ним променів із максимумом 530 нм (рис. 2) не можуть впливати супутні в екстракті сполуки, зокрема білки і вуглеводи [12]. Отже, ця смуга абсорбції може бути аналітичною для оцінки ефективності зв'язування пігменту, оскільки домішки супутніх сполук або продукти можливої взаємодії їх з іонами металів унаслідок структурних особливостей не поглинають у видимому діапазоні світла.

Зважаючи на те, що ефект зв'язування пігменту з металом досліджували шляхом додавання до екстракту водного розчину Cd^{2+} , то було доцільно в попередніх експериментах з'ясувати, як впливає розведення розчину ціанідину водою на положення максимуму поглинання. Показано, що при додаванні до ціанідинового екстракту води у співвідношенні 1,0 : 1,5 (за об'ємом) $\lambda_{\text{макс}}$ гіпсохромно знижується до 524 нм, що узгоджується з даними літератури [12]. Додавання розчину Cd^{2+} до вихідного екстракту в такому самому співвідношенні не змінює значення $\lambda_{\text{макс}}$ порівняно зі зразками, які розводили водою, що свідчить про відсутність ефекту асоціації металу з ціанідином у флавілієвій формі.

Згідно з даними M. Elhabiri et al. [18], підвищення величини рН до 7,0 зумовлює структурну модифікацію флавілієвої форми I з утворенням хіноїдної основи II, якій за таких умов притаманне домінування частково іонізованого аніона III (для структур II і III можливі дві таутомерні форми). Зазначену структурну модифікацію ціанідину підтверджено нами шляхом додавання до екстракту пігменту 0,1 н розчину NaOH до рН 7,0, унаслідок чого спостерігається батохромне зміщення довгохвильового максимуму до 582 нм і перегин на спектральній кривій близько 365 нм

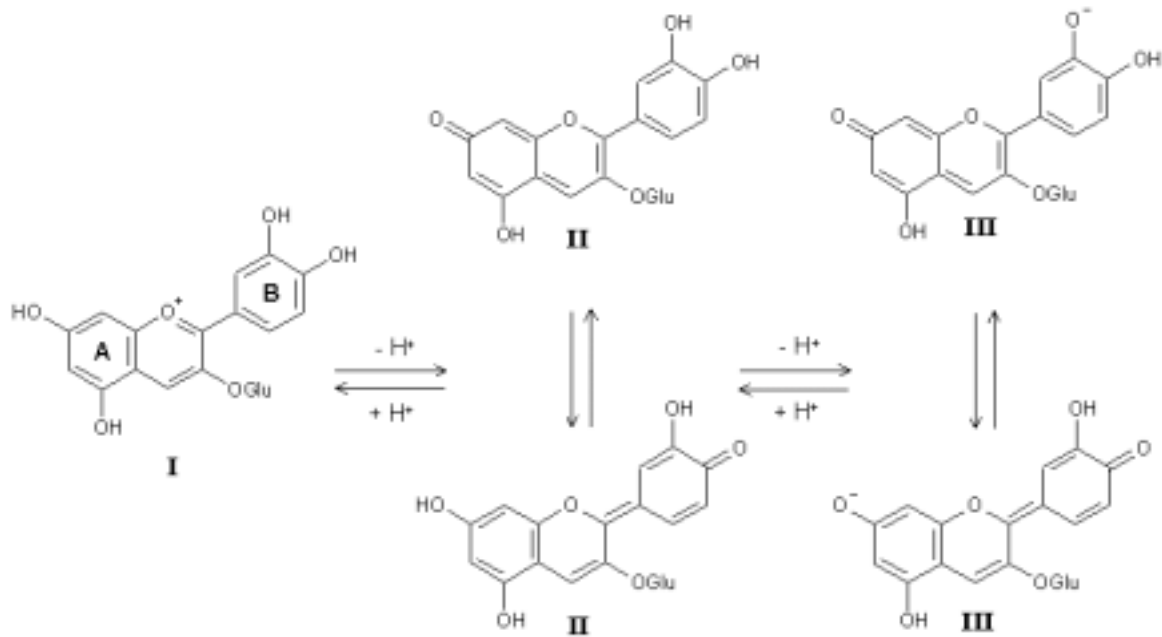


Рис. 1. Схема модифікації структури ціанідин 3-глюкозиду при підвищенні рН розчину.

(рис. 2). Реакційною здатністю хіноїдного інтермедиату III обумовлюється ефект зв'язування його з іонами Cd^{2+} за нейтрального рН, що підтверджується зміщенням довгохвильового максимуму до 596 нм водночас зі збільшенням інтенсивності та наявністю ще одного максимуму близько 400 нм. Такі зміни можливі в разі асоціації металу з лігандом за участю електронів атомів кисню гідроксильних груп в ароматичному кільці В, які включаються у спряжену систему кратних зв'язків ціанідину, що, у свою чергу, підвищує ступінь спряження хромофора. Утворення зв'язку з металом стабілізує хіноїдну структуру III. Подібну тенденцію змін спектральних характеристик також підтверджено даними, які віддзеркалюють зв'язування Al^{3+} за рН близько 7,0 з антоціанами, у структурі яких є *o*-дигідроксильні групи [18]. Слід відзначити, що утворення природних металохелатів антоціанів *in vivo* (наприклад протоціаніну у квітці *Centaurea cyanus* L. [10]) також відбувається через асоціацію ціанідину в хіноїдній формі з іонами біогенних металів (Al^{3+} , Fe^{3+}).

Іншим методичним підходом, що дозволяє виявити ефект зв'язування металу з пігментом, є реєстрація диференціального спектра розчину ціанідину за присутності або відсутності в ньому Cd^{2+} і однакового розведення вихідного екстракту (рН доведено до 7,0 додаванням до розчину 0,1 н. NaOH). Наявність у диференціальному спектрі двох максимумів – 463 та 649 нм – і мінімуму за 567 нм (рис. 3) слід вважати наслідком змін, які відбуваються у хромофорній

системі ціанідину під час взаємодії з Cd^{2+} .

Оскільки зв'язування пігменту з Cd^{2+} впливає на забарвлення пігменту, нами було визначено колориметричні параметри розчинів ціанідину (таблиця). Координати кольору X, Y, Z у тривимірному кольоровому просторі пов'язані з фізичною природою відмінностей в забарвленні досліджуваних розчинів. Перетворення координат кольору X, Y, Z в координати кольоровості x, y дозволяє виявити пігменти на графіку кольо-

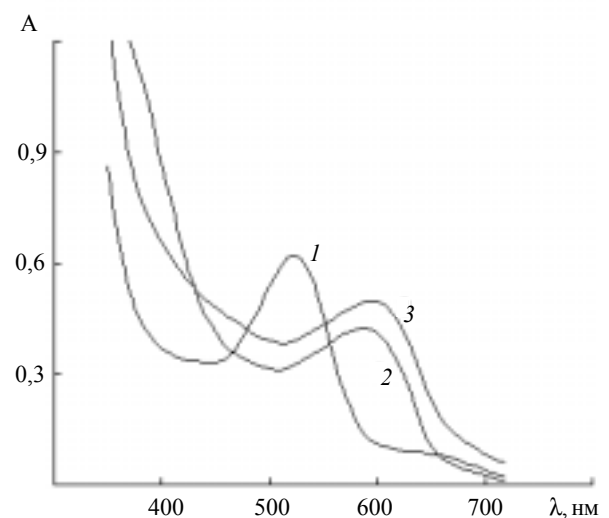


Рис. 2. Спектри поглинання розчинів: 1 – ціанідину, 2 – ціанідину + NaOH, 3 – ціанідину + NaOH + Cd^{2+} .

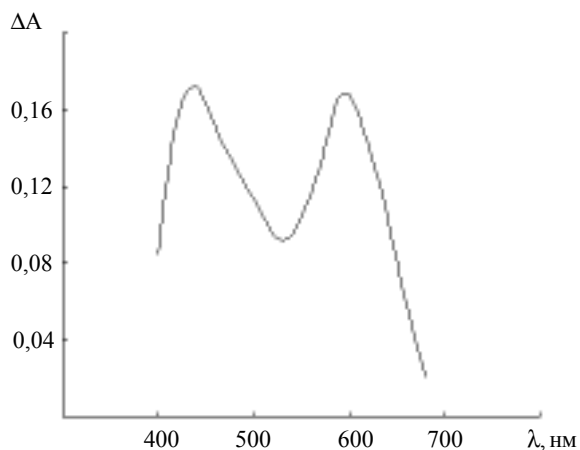


Рис. 3. Диференційний спектр поглинання розчину ціанідин + NaOH + Cd²⁺ відносно розчину ціанідин + NaOH.

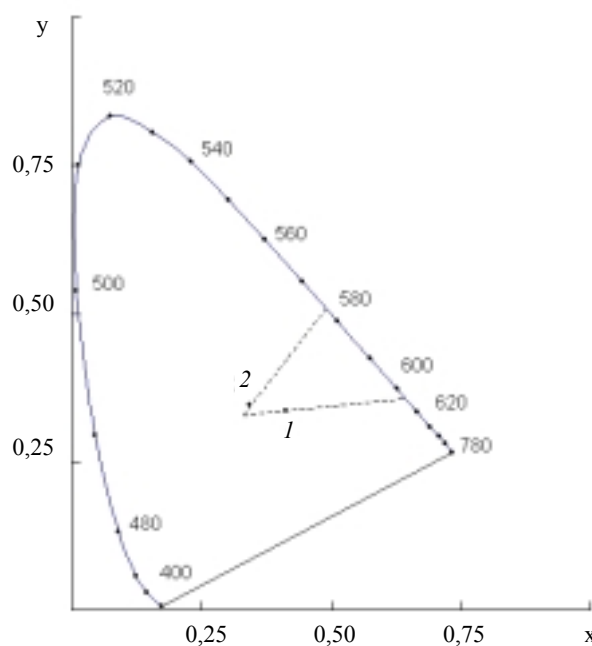


Рис. 4. Координати кольоровості розчинів: 1 – ціанідин; 2 – ціанідин + NaOH + Cd²⁺.

ровості (рис. 4). Поглинання світла пігментним екстрактом у діапазоні червоного кольору зумовлюється ціанідином у флавілієвій формі I. Доведення рН екстракту пігменту до 7,0 спричинює батохромне зміщення довгохвильового максимуму та інтенсивніше поглинання світла в межах 400–450 нм (рис. 2). Тому, згідно з фізичною теорією кольору [19], в цьому випадку значення λ_d є сумою двох кольорових стимулів, а величина умовної чистоти кольорового тону P_c знижується відповідно з відомою фізичною закономірністю (таблиця). Подібна тенденція змін значення λ_d та P_c спостерігається в разі зв'язування ціанідину з Cd²⁺ (рис. 4). В рівноконтрастній системі через структурне перетворення флавілієвої форми I на хіноїдну форму III спостерігається характерне зниження величини коефіцієнтів L та a, причому для останнього по-

казника встановлено зміну знаку з позитивного на негативний (таблиця). На основі колориметричних коефіцієнтів розраховано кольорові відміни розчину ціанідин + NaOH порівняно з розчином ціанідину (без додавання до нього луку) з метою оцінки структурних перетворень флавілієвої форми I на хіноїдну III, а також розчину ціанідин + NaOH + Cd²⁺ стосовно розчину ціанідин + NaOH – для встановлення змін, що виникають унаслідок зв'язування металу (рис. 5). Оскільки в першому випадку відбувається модифікація хромофорної системи, то найбільшим

Колориметричні параметри розчинів ціанідину

Показники	Ціанідин	Ціанідин + NaOH	Ціанідин + NaOH+ Cd ²⁺
Координати кольору:			
X	60,93	42,34	27,01
Y	49,54	41,69	27,14
Z	36,74	38,16	24,42
Координати кольоровості:			
x	0,41	0,35	0,34
y	0,34	0,34	0,35
Домінуюча довжина хвилі λ_d , нм	606,4	584,5	576,3
Умовна чистота кольору P_c , %	25,2	6,3	7,2
Коефіцієнт яскравості, L	75,79	70,66	59,11
Коефіцієнт a	15,79	-9,63	-10,47
Коефіцієнт b	-43,90	-55,31	-46,92

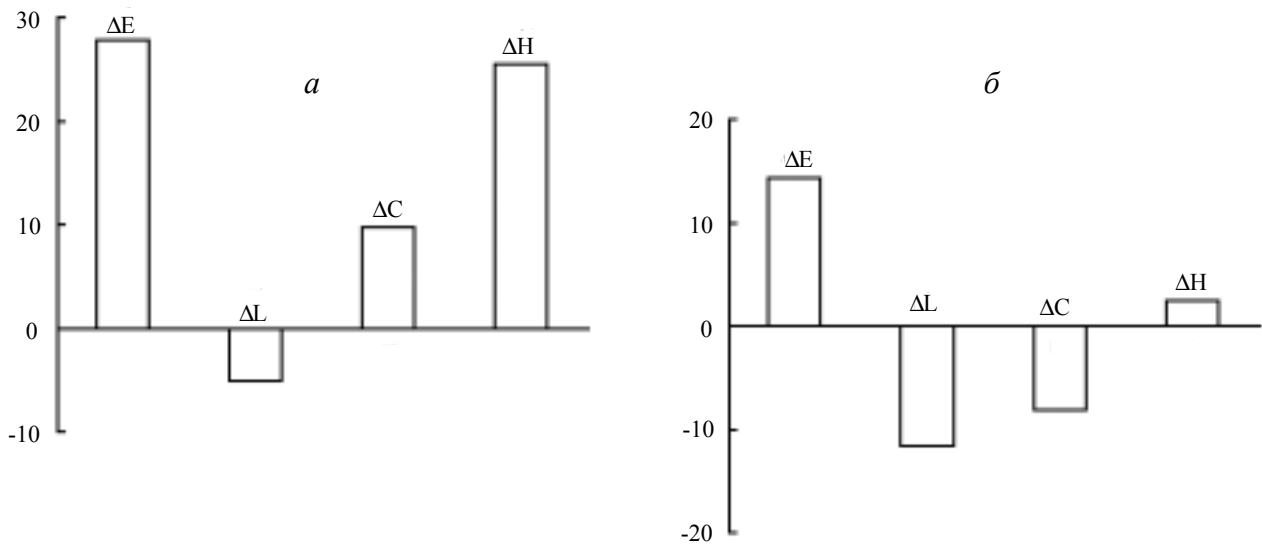


Рис. 5. Кольорові відміни: а – розчин ціанідину + NaOH порівняно з розчином ціанідину; б – розчин ціанідину + NaOH + Cd²⁺.

внеском в інтегральний показник ΔЕ є різниця за кольоровим тоном ΔН. У другому випадку через утворення металокомплексу за меншої величини ΔЕ істотною виявляється різниця за яскравістю ΔL та кольоровістю ΔС.

Після встановлення ефекту асоціації ціанідину з Cd²⁺ в розчині було виділено порошковидний металовмісний препарат. Для цього до екстракту ціанідину (рН 7,0) додавали рівний об'єм розчину Cd²⁺ (10⁻² моль/л) унаслідок чого випадав осад. Вихід порошкоподібного препарату з екстрактів ціанідину коренів проростків кукурудзи, які вирощували в модельних дослідах, становив 1,2–8,4 мг/г на сиру масу. Варіабельність виходу металовмісного препарату пояснюються тим, що рівень накопичення ціанідину залежить від фізіологічного стану рослин, який обумовлюється комплексом різних чинників.

На основі атомно-абсорбційного аналізу встановлено, що виділений препарат містить 0,9% Cd. Він не розчиняється в органічних розчинниках, а за розчинення в 1%-му розчині HCl в ізопропанолі відбувається руйнування ціанідину, що підтверджується відповідним максимумом у спектрах поглинання розчину. Іншим аргументом, який свідчить про наявність у препараті антоціанового фрагмента є максимуми в ІЧ-спектрі при 1620 і 1560 см⁻¹, що пов'язані з коливаннями спряжених С = С-зв'язків у гетероциклічному та бензольних кільцях [8]. У спектрі відбиття препарату у видимому діапазоні світла спостерігаються максимуми при 401 і 597 нм (рис. 6). Їхнє положення збігається з максимуми,

які зареєстровано після зв'язування ціанідину з Cd²⁺ в розчині при рН 7,0 (рис. 2). Зміни спектральних параметрів хромофора внаслідок взаємодії з металом підтверджується батохромним зміщенням довгохвильового максимуму у спектрі відбиття препарату порівняно з максимумом у спектрі поглинання антоціанідину у флавілієвій формі. Згідно з фізичною закономірністю [19], сума двох кольорових стимулів, які характеризуються двома максимумами у спектрі відбиття, свідчить, що значення домінувальної довжини хвилі становить 595 нм. Це було встановлено під час колориметричних вимірів, які адекватно віддзеркалюють забарвлення пігментованого зразка.

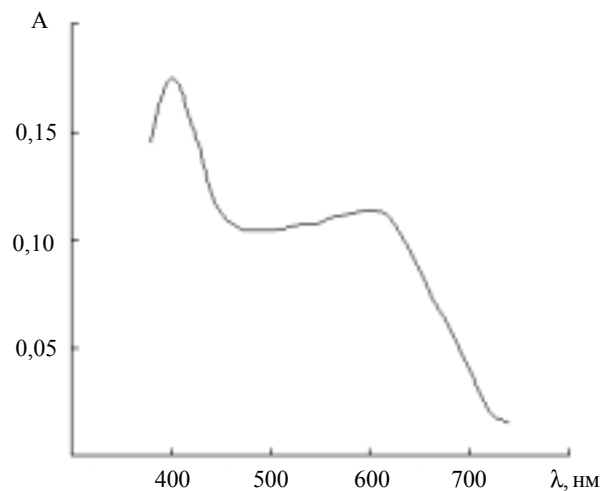


Рис. 6. Спектр відбиття металовмісного препарату (5%-на суміш з MgO).

Отже, згідно з одержаними результатами, виділений нами препарат містить антоціановий фрагмент і метал, який модифікує спектральні властивості хромофорної системи ціанідину внаслідок зв'язування з ним. Застосування спектроскопії відбиття і колориметрії дозволяє ідентифікувати асоційований з металом пігмент при дослідженні металовмісного препарату у твердій фазі.

Таким чином, за взаємодії ціанідину з іонами кадмію в розчині відбувається зв'язування металу, що зумовлює модифікацію хромофорної системи біоліганду. Виявлено спектральні параметри, необхідні для ідентифікації пігменту, який асоціюється з металом. Одержані результати доцільно використовувати при дослідженні захисної ролі антоціанів у формуванні стійкості рослин до токсичної дії кадмію.

COMPLEXATION OF CYANIDIN WITH CADMIUM IONS IN SOLUTION

V. S. Fedenko, S. A. Shemet, V. S. Struzhko

Scientific-Research Institute of Biology,
Dnipropetrovsk National University;
e-mail: opticlub@ukr.net, bmi@ff.dsu.dp.ua

S u m m a r y

The effect of complexation between cyanidin (extracted from maize seedling roots) and cadmium ions was established in solution on the basis of absorption spectroscopy and colorimetry data. Spectral parameters for identification of the pigment added to the metal has been established.

К е у w o r d s: cyanidin, cadmium ions, complexation, absorption spectra, colorimetry.

1. *Стежка В. А., Дмитрук Н. Н., Покровская Т. Н. и др.* // Соврем. пробл. токсикол. 2003. № 1. С. 22–28.
2. *СерEGIN И. В., ИВАНОВ В. Б.* // Физиол. растений. 2001. 48, № 4. С. 606–630.

3. *ИВАНОВ В. Б., Быстрова Е. И., СерEGIN И. В.* // Там же. 2003. 50, № 3. С. 445–454.
4. *Сорокин В. А., Валеев В. А., Гладченко Г. О., Сыса И. В.* // Биофизика. 1997. 42, вып. 1. С. 105–116.
5. *Vassilev A., Vangronsveld J., Yordanov J.* // Bulg. J. Plant Physiol. 2002. 28, N 3–4. P. 68–95.
6. *Dixon R. A., Palva N. L.* // Plant Cell. 1995. 7. P. 1085–1097.
7. *Chalker-Scott L.* // Photochem. Photobiol. 1999. 70, N 1. P. 1–9.
8. *Ribereau-Gayon P.* Plant phenolics. Edinburgh: Oliver–Boyd. 1972. 254 p.
9. *Левданский В. А., Полежаева Н. И., Макиевская А. И., Кузнецов Б. Н.* // Химия в интересах устойчивого развития. 2000. 8, № 6. С. 823–827.
10. *Bayer E., Egeter H., Fink A. et al.* // Angew. Chem. 1966. 78, N 18/19. P. 834–841.
11. *Феденко В. С., Стружко В. С.* // Физиол. и биохим. культ. растений. 2000. 32, № 4. С. 266–272.
12. *Танчев С. С.* Антоцианы в плодах и овощах. М.: Пищевая пром-ть. 1980. 304 с.
13. *Hale K. L., McGrath S. D., Lombi E. et al.* // Plant Physiol. 2001. 126. P. 1391–1402.
14. *Holton T. A., Cornish E. C.* // Plant Cell. 1995. 7. P. 1071–1083.
15. *Martinez A. E., Favret E. A.* // Plant Sci. 1990. 71, N 1. P. 35–43.
16. *Gitelson A. A., Merzlyak M. N., Chivkunova O. V.* // Photochem. Photobiol. 2001. 74, N 1. P. 38–45.
17. *Феденко В. С., Стружко В. С.* Колориметрія у фізіології та біохімії рослин. Дніпропетровськ: Вид-во Дніпр. держ. ун-ту. 1998. 68 с.
18. *Elhabiri M., Figueiredo P., Toki K. et al.* // J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1997. 2. P. 355–362.
19. *Джадд Д., Вышецки Г.* Цвет в науке и технике. М.: Мир. 1978. 592 с.

Отримано 24.02.2004