

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КОМПЛЕКСОНОВ ХИНАЗОЛИЛ-ФОРМАЗАНОВОГО РЯДА ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ИОНОВ Ni^{2+} , Pb^{2+} , Co^{2+} В СЕМЕНАХ РАСТЕНИЙ

Кузнецова Е.А.

ФГБОУ ВПО «Государственный университет – учебно-научно-производственный комплекс»,
Орел, e-mail: elkuznetcova@rambler.ru

Получены 4 вида формазанов с разными радикалами, которые представлены распространенными в биологических объектах функциональными группами: $-H$, $-CH_3$, $-OCH_3$, $-NO_2$. Приведены результаты спектрофотометрического исследования оптической плотности комплексных соединений тяжелых металлов Ni^{2+} , Pb^{2+} , Co^{2+} с лигандами группы хиразолил-формазанов. Изучена локализация комплексов формазанов с тяжелыми металлами в морфологических частях зерновки. Отмечено, что комплексы с никелем и кобальтом расположены главным образом в межклетниках, по которым осуществляется транспорт ионов. Комплексы со свинцом распределены в периферических слоях зерновки более равномерно, обнаруживаются в оболочках и клетках алейронового слоя. Выявленные свойства и закономерности позволят обоснованно разрабатывать методы очистки растительной продукции от загрязнения тяжелыми металлами в пищевых технологиях.

Ключевые слова: комплексообразование, хиразолил-формазаны, тяжелые металлы, локализация, семена

USE OF QUINAZOLINE (HINAZOLIL)-FORMAZANS COMPLEXES FOR IDENTIFICATION OF IONS Ni^{2+} , Pb^{2+} , Co^{2+} IN THE SEEDS OF PLANTS

Kuznetsova E.A.

The State Higher Education Professional Institution State University-Education-Science-Production
Complex, Orel, e-mail: elkuznetcova@rambler.ru

Received four types of formazans with different radicals, which are presented common in biological objects functional groups: $-H$, $-CH_3$, $-OCH_3$, $-NO_2$. The results of spectrophotometric analysis of the optical density of the complex heavy metals compounds consist of Ni^{2+} , Pb^{2+} , Co^{2+} with ligands of hinazolil-formazans. Localization of formazans complexes with heavy metals in the morphological parts of grains have been studied. It is noted that complexes containing of nickel and cobalt are located mainly in the intercellular spaces, ions transport is realized through these spaces. Complexes with lead are distributed in the peripheral layers of grains more evenly and can be found in the shells and aleurone layer cells. Identified properties and regularities allow feasible to develop methods for purification of plant products from contamination by heavy metals in food technology.

Keywords: complex formation, hinazolil-formazan, heavy metals, localization, seeds

В эпоху глобального загрязнения окружающей среды зольный состав растений рассматривается как один из существенных показателей качества, без которого невозможна оценка сырья для производства продуктов питания.

Средние уровни содержания большинства тяжелых металлов в семенах растений, произрастающих в Орловской области в условиях производственных посевов, в целом соответствуют общим закономерностям, установленным для переноса макро- и микроэлементов в звене «почва – растение», и отражают существующие различия в химических свойствах и биологической роли элементов, видовых особенностях растений. Однако отмечается превышение 0,51 уровня ДУ и наличие сопоставимых с порогом фитотоксичности пределов накопления никеля и свинца, которые определены приоритетными загрязнителями исследованных агроценозов [2]. Именно этот факт придает особую актуальность выявлению механизмов химического отклика растений на токсическое действие тяжелых металлов и поиску способов снижения содержания загрязнителей в хозяйственно полезных частях растений. В то же время

в растительной продукции в исследуемом регионе наблюдается недостаток биогенного химического элемента кобальта, а недостаточное поступление какого-либо микроэлемента приводит к отклонению от нормы роста растения или к прекращению развития [5]. В целях диагностики недостатка поступления кобальта в растительную продукцию и своевременной ликвидации дефицита элемента с помощью микроудобрений может представлять интерес гистохимический метод идентификации ионов кобальта в семенах растений.

Известно, что важным механизмом концентрирования тяжелых металлов, содержащихся в клетках растений, является их хелатирование – образование комплексных соединений. Лигандами могут быть органические кислоты, аминокислоты, фитохелатины, глутатион, никотинамид и другие органические соединения. Органические хелаты нашли широкое применение при разработке приемов снижения доступности тяжелых металлов растениям [3, 6], выявлении механизма детоксикации [1], изучении распределения по анатомическим частям органов растений [4].

Несмотря на огромное разнообразие природных соединений, образующих комплексы с тяжелыми металлами, набор функциональных групп, образующих непосредственно координационные связи с Pb^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} в природных объектах, не велик. Хорошо окрашенные устойчивые комплексы образуются при взаимодействии тяжелых металлов с формазанами – органическими соединениями, содержащими группировки $R_1N=N-C(R_2)=N-NH-R_3$.

Целью представленного исследования является изучение возможности использования комплексонов хиназолил-формазанового ряда для идентификации ионов Pb^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} в семенах растений. Объектом исследования были зерно пшеницы и семена гороха. Материал для исследования представлен комплексонами, синтезированными по основному методу синтеза формазанов – азосочетанием соответствующих 2-хиноксалилгидразонов с арилдиазонией хлоридами при низкой температуре ($t = 0-+ 5^{\circ}C$) в присутствии десятикратного объема соляной кислоты. Строение формазанов подтверждено сходством их УФ- и ИК-спектров и окислением в соли тетразолия с последующим восстановлением в исходные формазаны. Полученные соединения – стабильные кристаллические вещества с температурами плавления от 102 до 180 $^{\circ}C$, с максимумом поглощения в видимой области от 400 до 480 нм. Очистка формазанов проводилась кристаллизацией и хроматографически.

Состав комплексов и область значений рН, в которой они устойчивы, зависят не только от природы металла, но и от состава и строения групп радикалов. Были синтезированы 4 вида данного комплексона с разными радикалами X, которые представлены распространенными в биологических объектах функциональными группами: –H, –CH₃, –OCH₃, –NO₂. Формула синтезированного комплексона представлена на рис. 1.

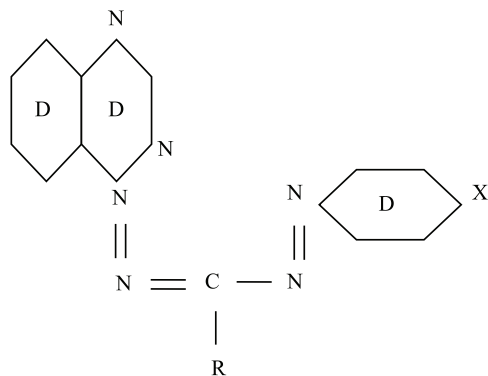


Рис. 1. Комплексон 1-(хиназолил-4')-3-фенил-5(n-фенил)-формазан, где X = H, CH₃, OCH₃ или NO₂

В состав молекулы каждого формазана входит комплексообразующий центр – имин (NH) формазановой группировки. Наличие такого реакционного центра обуславливает способность выбранных формазанов к комплексообразованию с ионами тяжелых металлов. Комплексообразователи подобраны таким образом, что они содержат как доноры, так и акцепторы электронной плотности. Выбор заместителей (доноров – акцепторов) предпринят с целью избирательности комплексообразователей к ионам металлов (увеличение разрешающей способности для обнаружения тех или иных металлов).

Для проведения дальнейших исследований готовили растворы формазанов с концентрацией 1 ммоль/л растворением точных навесок формазанов в водно-спиртовом растворе (соотношение воды и спирта H₂O:C₂H₅OH = 1:4) непосредственно перед использованием. Все растворы имели окраску различных оттенков желтого цвета. Для выявления способности давать окрашенные комплексы и определения максимума спектра поглощения готовили стандартные растворы Pb^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} с концентрацией 1 ммоль/л. Спектрофотометрическое исследование оптической плотности комплексных соединений и свободных комплексонов проводили на приборе СФ-46 в прямоугольной кварцевой кювете К-10. Значения оптической плотности определяли в диапазоне 220–680 нм. Контроль рН осуществляли с использованием рН-150М. Для проведения гистохимических исследований проводилась обработка продольных срезов семян растений водно-спиртовым раствором формазанов и при помощи микроскопа Axioskop 2 MAT фирмы «Carl Zeiss» методом контрастирования в светлом поле по характерному окрашиванию тканей идентифицировали места локализации ионов изучаемых химических элементов. С помощью электронного сканирующего микроскопа JEOL JSM 6390 была рассмотрена микроструктура внутренней части наружных покровов зерна пшеницы и семени гороха на продольных срезах нативных и обработанных хиназолил-формазаном семян.

Для выявления максимумов поглощения синтезированных формазанов были сняты спектры поглощения. Раствором сравнения служил водно-спиртовой раствор H₂O:C₂H₅OH = 1:4), толщина поглощающего слоя L = 10 мм. Спектрофотометрическое исследование полученных растворов комплексных соединений ТМ с лигандами хиназолил-формазанов показали, что в видимой и УФ-области спектров поглощения происходит изменение положения максимума по сравнению со спектрами свободных

комплексообразователей. Результаты по комплексообразованию вышеперечисленных металлов с выбранными комплексонами представлены в таблице.

Проведенные исследования показали, что в результате комплексообразования с Ni^{2+} в видимой области спектра наблюдается появление новых максимумов поглощения по сравнению со спектрами свободных лигандов на длинах волн 450, 510, 600 нм (радикал -Н), 590 нм – с радикалом $-CH_3$, 450, 580, 600 нм (с радикалом $-OCH_3$), 490, 500, 625 нм – с радикалом $-NO_2$.

При образовании комплексных соединений хиназолил-формазапов с солью

Pb^{2+} происходит изменение спектров поглощения комплексов по сравнению со спектрами свободных лигандов. У комплекса с формазапов, имеющим радикал -Н, – это максимум в видимой области спектра при длинах волн 425, 435, 445, 460 и 495 нм. У комплекса с радикалом $-CH_3$ – это максимумы при длинах волн 490, 575 нм. У комплекса с радикалом $-NO_2$ – новые максимумы при длинах волн 490, 505, 520, 535, 620 нм. У комплекса с радикалом $-OCH_3$ появляется новый максимум на длине волны 490 нм, максимумы свободного лиганда на длинах волн 345, 540, 565, 600 нм исчезают.

Изменения, наблюдаемые в видимой и УФ-областях спектров поглощения при комплексообразовании с Pb^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+}

Комплексообразователь, имеющий радикал	Положение максимума в спектре поглощения, нм			
	Свободный комплексон	Комплекс с Pb^{2+}	Комплекс с Ni^{2+}	Комплекс с Co^{2+}
-Н	245, 295, 365	225, 240, 265, 355, 425, 435, 460, 495	245, 280, 330, 385, 450, 510, 610	245, 275, 335, 375, 505
$-CH_3$	270, 335, 345	240, 275, 335, 355, 490, 575	245, 275, 330, 375, 590	245, 275, 335, 515
$-OCH_3$	270, 335, 345, 410, 540, 565, 600	240, 275, 490	275, 335, 450, 580, 600	275, 335
$-NO_2$	270, 335, 430, 450	240, 275, 335, 490, 505, 520, 535, 620	270, 325, 335, 625	270, 340, 490,

Для кобальтовых хелатных соединений характерно сохранение λ_{max} – 270 нм в случае с формазапов, имеющим радикал NO_2 (небольшое смещение на 5 нм с комплексоными, имеющими радикалы $-CH_3$ и $-OCH_3$) и λ_{max} = 335 нм со смещением вправо на 5 нм относительно спектра свободного лиганда. При этом исчезают в видимой области λ_{max} = 410, 540, 565, 600 в случае с комплексом, содержащим радикал $-OCH_3$; λ_{max} = 430, 450 нм – с ; с формазаповами, имеющими радикалы NO_2 и $-CH_3$, наоборот, появляются новые в области 515 нм.

При смешивании растворов лигандов с растворами солей свинца, никеля и кобальта наблюдались видимые изменения окраски растворов. Комплексные соединения хиназолил-формазапов, содержащие в своем составе все 4 радикала с солью Ni^{2+} , имели насыщенное синее окрашивание; с солью Pb^{2+} – розовое окрашивание; с солью Co^{2+} наблюдалась окраска от светло-серого до темно-серого цвета.

Наибольшую интенсивность при одинаковых длинах волн имеют комплексные соединения исследуемых тяжелых металлов с хиназолил-формазапов, содержащим в качестве радикала $-CH_3$. Окраска этих комплексов, наблюдаемая визуально, имеет более интенсивные по яркости оттенки.

Поэтому для дальнейших гистохимических исследований было отдано предпочтение комплексону 1-(хиназолил-4')-3-фенил-5-(п-метилфенил) формазапов, содержащему в качестве радикала $-CH_3$.

Обработка зерна злаковых культур формазапов позволяет при гистохимическом исследовании зерновки обнаружить локализацию тяжелых металлов в ее периферических частях по характерному окрашиванию тканей.

Результаты микроскопических исследований, проводимые с использованием микроскопа Axioskop 2 MAT фирмы «Carl Zeiss» методом контрастирования в светлом поле представлены на рис. 2.

В результате микроскопических исследований обнаружено, что комплексы с никелем и кобальтом расположены главным образом в межклетниках, по которым осуществляется транспорт ионов. Комплексы со свинцом распределены в периферических слоях зерновки более равномерно, обнаруживаются в оболочках и клетках алейронового слоя. Это указывает как на сорбцию ионов структурными полисахаридами матрикса клеточных стенок, так и на локализацию их в вакуолях и других клеточных структурах.

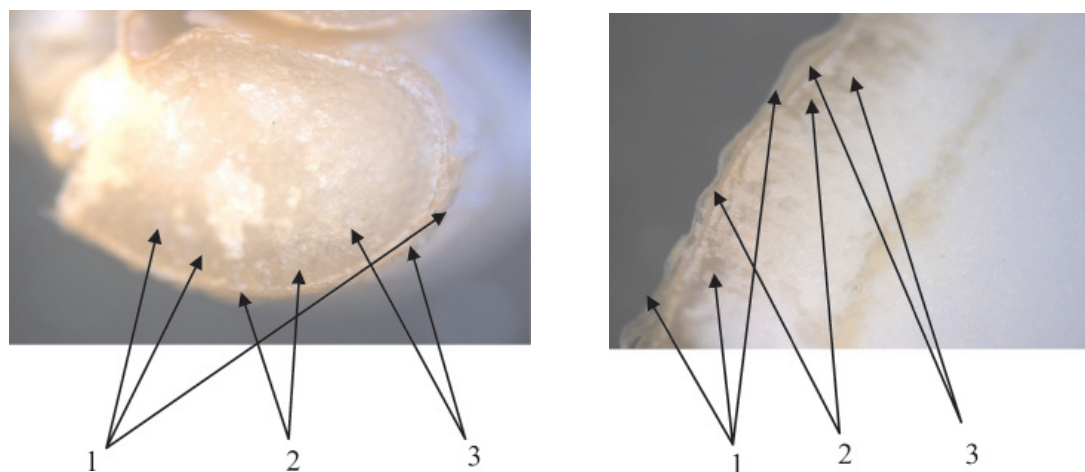
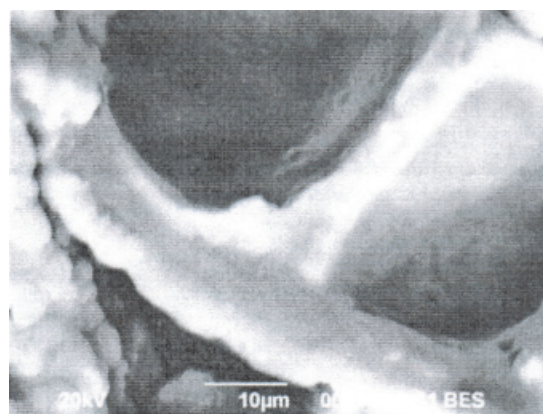


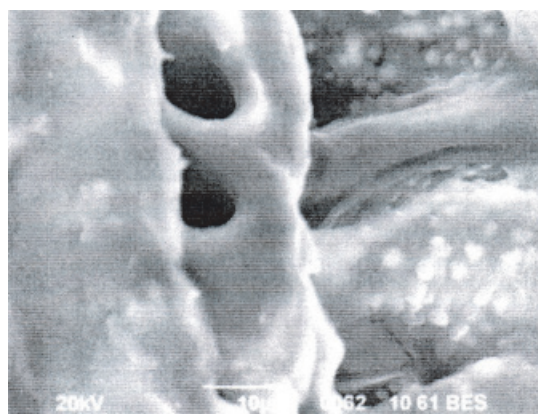
Рис. 2. Локализация тяжелых металлов в периферических частях зерновки пшеницы: 1 – синее окрашивание, характерное для комплексов с никелем; 2 – розовое окрашивание, характерное для комплексов со свинцом; 3 – серое окрашивание, характерное для комплексов с кобальтом

С помощью электронного сканирующего микроскопа JEOL JSM 6390, используя увеличение $\times 2000$, была рассмотрена микроструктура внутренней поверхности

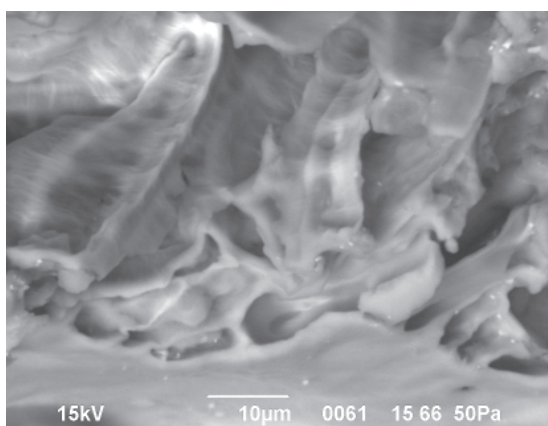
семенной оболочки зерновки пшеницы и семени гороха на продольных срезах нативного семени и обработанного хиназол-формазаном (рис. 3).



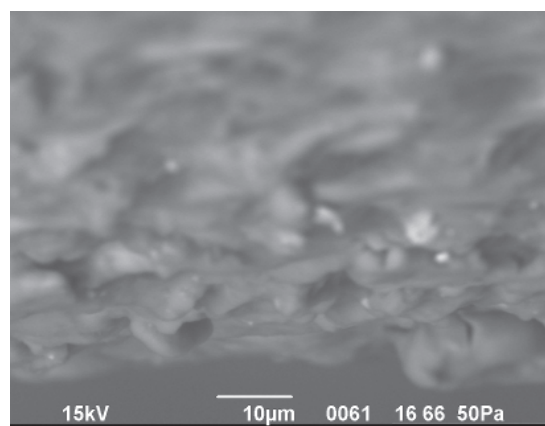
1



2



3



4

Рис. 3. Микроструктура внутренней поверхности семенной оболочки зерновки пшеницы: 1 – без обработки; 2 – обработанной комплексом и семени гороха; 3 – без обработки; 4 – обработанного комплексом

Изменения, происходящие в микроструктуре семян растений, визуально определяются на поверхности матрикса клеточных стенок в виде светящихся кристаллидных отложений величиной от 2 до 5 мкм, содержащих Pb^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , определяемые с помощью рентгеноспектрального ЭДС детектора miniCup в системе электронного сканирующего микроскопа.

Выполненные исследования позволяют продемонстрировать локализацию Pb^{2+} , Cd^{2+} и Ni^{2+} в периферических частях зерновки, что является одним из путей изучения проявления механизмов толерантности растений к металлическим загрязнениям. Выявленные свойства и закономерности позволят идентифицировать загрязнения тяжелыми металлами растительного сырья в процессе его переработки, обоснованно разрабатывать методы очистки растительной продукции от загрязнения тяжелыми металлами в пищевых технологиях, а также обнаружить недостаточное количество биогенных элементов в растительной продукции с целью корректировки обогащения ими рационов питания и кормления сельскохозяйственных животных.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант 12-04-97586 p_центр_a).

Список литературы

1. Дубцова Ю.Ю. Экологическая роль комплексообразования кадмия и цинка с биологически активными лигандами в тканях растений: дис. ... канд. биол. наук. – Новосибирск, 2004 – 91 с.
2. Кузнецова Е.А. Содержание тяжелых металлов в почвах типичного агроландшафта Орловской области и их накопление в зерне сельскохозяйственных культур // *Агрохимия*. – 2009. – № 8. – С. 60–64.
3. Ларионов Г.А. Возможность использования хелатообразующих агентов для снижения содержания тяжелых металлов в растениях / Г.А. Ларионов, К.А. Кириллов, М.А. Ершов // *Агроэкологические проблемы сельскохозяйственного производства в условиях антропогенного загрязнения: материалы Всерос. научно-практ. конф.* //

Ульяновская гос. сельскохозяйств. Академия. – Ульяновск, 2004. – С. 55–61.

4. Серегин И.В. Распределение кадмия, свинца, никеля и стронция в набухающих зерновках кукурузы / И.В. Серегин, А.Д. Кожевникова // *Физиология растений*. – 2005. – Т. 52. – № 4. – С. 635–640.

5. Ягодин Б.А. Кольцо жизни. – М.: АНО Независимый институт экспертизы и сертификации, 2002. – 135 с.

6. Turan M. Organic chelate assisted phytoextraction of B, Cd, Mo and Pb from contaminated soils using two agricultural crop species / M. Turan, I. Angin // *Acta agr. Scand. Sect. A*. – 2004. – Vol.54, № 4. – P. 221–231.

References

1. Dubcova Ju.Ju. Jekologicheskaja rol' kompleksoobrazovaniya kadmija i cinka s biologicheski aktivnymi ligandami v tkanjah rastenij: Dis....kand. biol. nauk. Novosibirsk, 2004 91 p.
2. Kuznecova E.A. Soderzhanie tjazhelyh metallov v pochvah tipichnogo agrolandshafta Orlovskoj oblasti i ih nakoplenie v zerne sel'skhozajstvennyh kul'tur // *Agrohimiya*. 2009. no. 8. pp. 60–64.
3. Larionov G.A. Vozmozhnost' ispol'zovaniya helatoobrazujushhih agentov dlja snizhenija soderzhanija tjazhelyh metallov v rastenijah / G.A. Larionov, K.A. Kirillov, M.A. Ershov // *Materialy Vseros. nauchno-prakt. konf. «Agrojekologicheskie problemy sel'skhozajstvennogo proizvodstva v uslovijah antropogennogo zagrjaznenija» // Ul'janovskaja gos. sel'skohoz. Akademija. Ul'janovsk, 2004. pp. 55–61.*
4. Seregin I.V. Raspredelenie kadmija, svinca, nikelja i stroncija v nabuhajushhih zernovkah kukuruzy / I.V. Seregin, A.D. Kozhevnikova // *Fiziologija rastenij*. 2005. t/ 52. no. 4. pp. 635–640.
5. Jagodin B.A. Kol'co zhizni. M.:ANO Nezavisimyj institut jekspertizy i sertifikacii, 2002. 135 p.
6. Turan M. Organic chelate assisted phytoextraction of B, Cd, Mo and Pb from contaminated soils using two agricultural crop species / M. Turan, I. Angin // *Acta agr. Scand. Sect. A*. 2004. Vol. 54, no. 4. pp. 221–231.

Рецензенты:

Иванова Т.Н., д.т.н., профессор, зав. кафедрой «Технология и товароведение продуктов питания», Госуниверситет УНПК, г. Орел;

Осипова Г.А., д.т.н., доцент кафедры «Технология хлебопекарного, кондитерского и макаронного производства», Госуниверситет-УНПК, г. Орел.

Работа поступила в редакцию 23.09.2013.