

## СВЯЗЫВАНИЕ ИОНОВ ЖЕЛЕЗА С МЕЛАНИНАМИ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Багиров Р.М., Боброва Е.Ю., Гафарова Х.О., Турабова Г.А., Багирова О.Ш.

Бакинский государственный университет

ул. З. Халилова, 23, г. Баку, AZ1148, Азербайджан; e-mail: rafiqbagirov@list.ru

Поступила в редакцию: 24.07.2019

**Аннотация.** Из кожуры плодов бузины черной и плюща обыкновенного выделены меланины. Для идентификации выделенных пигментов зарегистрировали их ЭПР и ИК-спектры. Связывание ионов железа с данными меланинами исследовано методом гамма-резонансной спектроскопии (ГРС). Установлено, что меланины растительного происхождения эффективно хелатируют ионы железа как в его двух, так и в трехвалентном состоянии, причем, при взаимодействии с ионами  $Fe^{2+}$  меланины их частично окисляют до  $Fe^{3+}$  неактивных в прооксидантном отношении, и помимо ионов  $Fe^{2+}$  связывают и последние. Величины параметров ГР-спектров изученных образцов характерны для высокоспиновых (ВС) комплексов ионов  $Fe^{2+}$  и  $Fe^{3+}$  с октаэдрическим лигандным окружением. Предполагается, что способность меланинов растительного происхождения эффективно связывать прооксидантные ионы  $Fe^{2+}$  может являться одним из возможных механизмов их антиоксидантных и радиопротекторных свойств.

**Ключевые слова:** меланин, комплексообразование с ионом железа, гамма-резонансная спектроскопия.

Меланины – темноокрашенные пигменты широко распространены в животном, растительном и микробном мире. Они представляют собой высокомолекулярные полимеры нерегулярной структуры, относящиеся к классу конденсированных фенольных соединений. До недавнего времени считалось, что меланины выполняют в живой клетке, главным образом, функции защитного экрана против УФ-излучения и ионизирующей радиации. Однако, неясной оставалась роль меланина, содержащегося в неосвещаемых тканях организма. К настоящему времени получен ряд важных данных об их физико-химических свойствах и биологической активности (полупроводниковые, электретные, радиопротекторные, антиоксидантные, противоопухолевые, электронно- и ионно-обменные, каталитические, участие в окислительно-восстановительных реакциях, способности к образованию КПЗ со многими электрофильными и нуклеофильными соединениями и т.д.), благодаря которым они стали объектом пристального внимания широких кругов исследователей [1-4].

Характерной особенностью меланинов является наличие высокостабильных парамагнитных центров, разнообразных функциональных групп, а также систем сопряженных связей в их молекулах. В этой связи представляет интерес получение координационных соединений меланина с металлами, в частности, с ионами железа, которые будут обладать свойствами, отличными от исходных, что позволит расширить круг их использования в науке, технике и медицине.

В представленной работе приводятся и обсуждаются результаты экспериментальных исследований комплексообразования ионов железа с меланинами, выделенными из кожуры плодов бузины черной (PM1) и плюща обыкновенного (PM2). Меланины выделены методом щелочной экстракции по ранее описанной методике с небольшой модификацией [1]. С целью идентификации полученных экстрактов регистрировали их ЭПР- и ИК-спектры (рис. 1 и рис. 2). ЭПР-спектры полученных пигментов представляют собой синглетную, слегка асимметричную линию с g-фактором приблизительно равным g-фактору свободного электрона ( $2,003 \pm 0,001$ ) и шириной  $\sim 6,5$  Гс. Вклад сверхтонких взаимодействий отсутствует. В ИК-спектрах наблюдается полосы

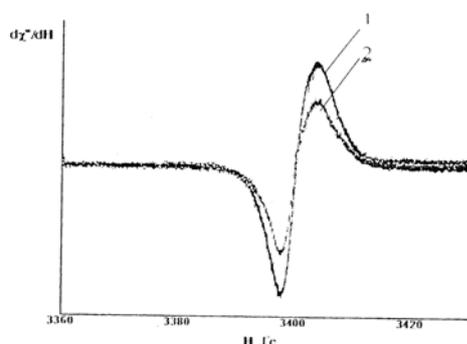


Рисунок 1. ЭПР- спектры выделенных пигментов  
1 – PM1; 2 – PM2

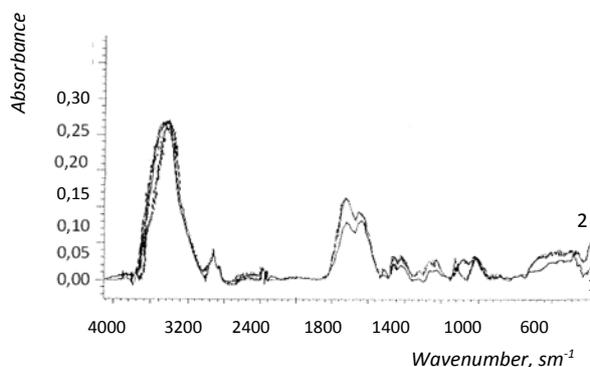


Рисунок 2. ИК-спектры выделенных пигментов  
1 – PM1; 2 – PM2

поглощения характерные для групп: amino- и фенольные гидроксила ( $3500\div 3300\text{ см}^{-1}$ ), карбонильной и карбоксильной группы ( $1720\div 1640\text{ см}^{-1}$ ), ароматические скелетные колебания C-H групп ( $1420\div 1400\text{ см}^{-1}$ ), валентные колебания C-O, C-C, C=O групп ( $1260\div 1220\text{ см}^{-1}$ ). Анализ параметров ЭПР- и ИК-спектров показал, что они хорошо согласуются имеющимися в литературе аналогичными данными [1, 2]. Это дает основание полагать, что выделенные нами пигменты являются меланинами.

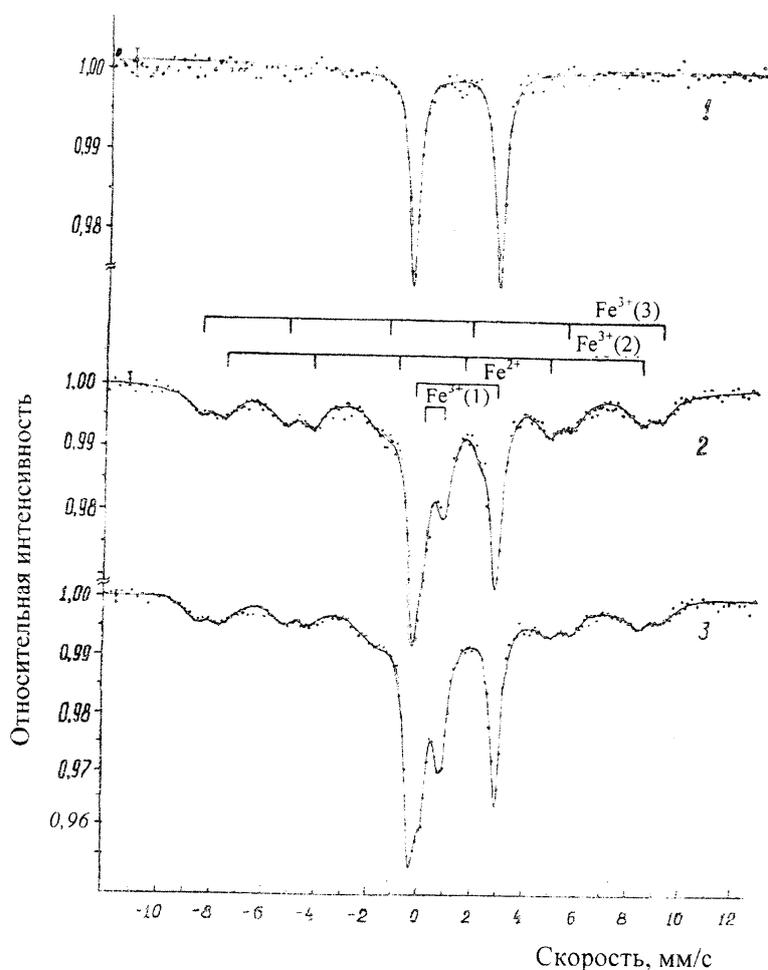
Комплексные соединения ионов железа с растительными меланинами получали инкубированием свежесыведенного меланина (18 мг сухого веса) в 8 мл растворе  $^{57}\text{FeSO}_4$  с концентрацией 0,23 мг/мл при комнатной температуре в течении 2 часов. Контрольные измерения показали, что pH системы в процессе инкубации не менялся. Полученные комплексы выделяли из суспензии центрифугированием при 5000g в течение 20 мин. После отделения супернатанта осадок дважды промывали дисциллированной водой с последующим центрифугированием. Во избежание окисления ионов  $\text{Fe}^{2+}$  в слабокислой среде в исходный раствор добавляли гидроксилламин ( $(\text{NH}_2\text{OH})_2\cdot\text{H}_2\text{SO}_4$ ), сильнопрепятствующего агента образования окислов или гидроокислов железа. Предварительные опыты показали, что гидроксилламин не восстанавливает меланин. Раствор  $^{57}\text{FeSO}_4$  получали растворением металлического  $\alpha\text{-}^{57}\text{Fe}$  («Изотоп», Россия) в разбавленной (0,1M)  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (XЧ) в инертной среде. Полученный раствор хранили под слоем гептана, добавив избыток нерастворенного металлического  $\alpha\text{-}^{57}\text{Fe}$ . Концентрацию ионов  $\text{Fe}^{2+}$  и  $\text{Fe}^{3+}$  определяли спектрофотометрически на спектрометре «SPECORD UV, VIS» (Германия), используя в качестве индикатора 0-фенантралин («SERVA», Германия) и роданид («ЧДА»), соответственно. Доля ионов  $\text{Fe}^{3+}$  в растворе  $^{57}\text{FeSO}_4$  не превышала 1% от общего количества ионов железа. ГР-спектры изученных образцов регистрировали на установке MS2001, работающей в режиме постоянных ускорений. Источником резонансных  $\gamma$ -квантов служил изотоп  $^{57}\text{Co}$  в матрице Ст. ГР-спектрометр откалибровывали по ГР-спектру  $\alpha\text{-Fe}$ .

На рисунке 3 приведены ГР-спектры при 80 К системы  $^{57}\text{FeSO}_4$  + растительные меланины полученный при pH 5,7. Параметры ГР-спектров замороженных растворов изученных образцов при температуре 80 К представлены в таблице 1. Как видно из рисунка 3 и таблицы 1, ГР-спектры исходного раствора и супернатанта после осаждения идентичны по форме – это четкий дублет с параметрами, характерными для аквакомплексов  $\text{Fe}^{2+}$ . Осадок имеет сложный ГР-спектр, состоящий, по крайней мере, из четырех парциальных спектров: двух дублетов и двух секстетов с уширенными линиями. Широкий дублет доля которого составляет (18-25) % от общей площади спектра в зависимости от типа меланинов, по значениям параметров характерен для высокоспиновых (ВС) комплексов Fe. Отличие их параметров, главным образом КР, от параметров ГР-спектров исходного раствора указывает на связывание ионов  $\text{Fe}^{2+}$  с меланинами. Центральный узкий дублет доля которого составляет (9-13)% от общей площади спектра по значениям параметров характерен для парамагнитных ВС комплексов  $\text{Fe}^{3+}$ . Параметры секстетных парциальных спектров также характерны для ВС комплексов ионов  $\text{Fe}^{3+}$ . Значения параметров всех парциальных ГР-спектров указывают октаэдрическое лигандное окружение ионов железа в комплексах. Следовательно, по отношению к ионам железа меланины выступают как лиганды слабого поля.

Значительный интерес представляет выяснение природы структур в комплексе, дающих уширенные магнитные ГР-спектры. Следует отметить, что ГР-спектры, состоящие из парамагнитного дублета и уширенного размытого секстета, могут наблюдаться как в случаях в образце мелких полидисперсных частиц (суперпарамагнетизм), так и в случаях медленной парамагнитной релаксации [5, 6].

Сравнивая параметры ГР-спектров изученных нами осадков со значениями параметров ГР-спектров исходного раствора и известных из литературы параметров ГР-спектров окислов и гидроокислов железа, установлено, что они существенно отличаются [4]. С другой стороны, в наших экспериментах, во избежание гидролиза, для контроля проводили опыты и с добавлением в реакционную среду гидроксилламина ( $(\text{NH}_2\text{OH})_2\cdot\text{H}_2\text{SO}_4$ ), сильно препятствующего агента образования окислов или гидроокислов железа. При этом анализ ГР-спектров осадков, полученных с добавлением в реакционную среду гидроксилламина и без него, показал, что формы и параметры парциальных ГР-спектров осадков исключительно идентичны. Для дополнительного исключения возможного образования высокодисперсных окислов или гидроокислов  $\text{Fe}^{3+}$ , которые также могли бы дать размытый секстетный спектр, была проведена отмывка осадков (комплексов)  $^{57}\text{FeSO}_4$ +меланины и полученных в идентичных условиях окислов и гидроокислов  $\text{Fe}^{3+}$  в растворе  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Результаты показали, что окислы и гидроокислы  $\text{Fe}^{3+}$  хорошо растворяются в  $\text{H}_2\text{SO}_4$  при pH 2,5 в то время, как ионы  $\text{Fe}^{3+}$  в осадке не отмываются даже при значении pH 1,8. Это дает основание полагать, что исследованные нами осадки не являются механической смесью меланинов с исходным раствором или мелкодисперсными частицами окислов и гидроокислов ионов  $\text{Fe}^{3+}$ , а являются координационными соединениями ионов железа с исследованными меланинами.

Известно, что растительные меланины являются сложным полимерным образованием, состоящим из мономерных единиц различной структуры. Они содержат орто-гидрохиноидные, орто-хиноидные группы, amino- и имино-группы и карбоксильные группы, каждая из которых может участвовать в связывании ионов железа полимером. Одновременное присутствие магнитной и дублетной компонент в ГР-спектрах, по-видимому, связано с неоднородным распределением железосвязывающих центров в полимере меланина. Для двух или более близко расположенных ионов  $\text{Fe}^{3+}$  (например, они могут входить в состав полиядерных ( $n\geq 2$ ) кластеров), благодаря быстрой релаксации, обусловленной эффективным спин-спиновым взаимодействием, будут наблюдаться дублетные парциальные ГР-спектра. В случае достаточно разделенных в пространстве ионов  $\text{Fe}^{3+}$



**Рисунок 3.** ГР-спектры изученных образцов (рН 5,7) при 80 К. 1 – Исходный раствор  $^{57}\text{FeSO}_4$ ; 2 – комплекс  $^{57}\text{FeSO}_4+\text{PM1}$ ; 3 – комплекс  $^{57}\text{FeSO}_4+\text{PM2}$

спин-спиновое взаимодействие сильно ослабится, и для таких структур будут наблюдаться релаксационные парциальные ГР-спектры с размытой сверхтонкой структурой [4]. Секстет с полем  $\sim 55$  Тл ( $\text{Fe}^{3+}(3)$ ) соответствуют ионам  $\text{Fe}^{3+}$  связанным с карбоксильными группами, секстет с меньшим полем ( $\sim 50$  Тл) соответствует структурам, где в координации  $\text{Fe}^{3+}$  наряду с  $\text{COO}^-$  группами участвуют также амино- или имино-группы меланина [6]. Молекулы воды, входящие в состав полимеров, также могут участвовать в координации с ионами железа. Ионы  $\text{Fe}^{2+}$  образуют с меланинами моноядерные комплексы, при этом центры связывания достаточно удалены друг от друга. Карбоксильная группа при координации с ионами железа могут участвовать как монодентатный так и бидентатный лиганд, для достижения координационной емкости до шести в координации с ионами железа могут участвовать анионы, молекулы воды или другие функциональные группы соседних мономеров полимера меланина. В слабокислых средах в координации с ионами железа могут участвовать также и фенильные группы полимера.

Все вышеперечисленные механизмы связывания ионов железа должны привести к неоднородному распределению ионов железа в объеме полимера меланина, о чем и свидетельствует результаты ГР-исследования. По своей окисляющей способности  $\text{Fe}^{2+}$  до  $\text{Fe}^{3+}$ , а также по способности к связыванию ионов железа РМ1 превосходит РМ2.

Исходя из полученных данных можно полагать, что все эти меланины содержат в своем составе аналогичные функциональные группы по отношению к связыванию ионов железа.

Таким образом, из полученных результатов следует, что растительные меланины способны образовывать комплексы ионами железа как в его двух-, так и трехвалентном состоянии. Существенно, что растительные меланины способны непосредственно связывать ионы  $\text{Fe}^{2+}$  и окислять их до трехвалентного состояния, неактивного в прооксидантном отношении с последующим связыванием. Активность обоих этих процессов растёт по мере увеличения рН реакционной среды.

**Таблица 1.** Параметры ГР-спектров замороженных растворов изученных образцов при температуре 80 К (А-исходный раствор, В – супернатант после осаждения, С – комплекс (осадок))

№	Образцы	рН	Fe <sup>2+</sup>		Fe <sup>3+(1)</sup>		Fe <sup>3+(2)</sup>			Fe <sup>3+(3)</sup>		
			ИС, мм/с	КР, мм/с	ИС, мм/с	КР, мм/с	ИС, мм/с	КР, мм/с	V <sub>эф</sub> , Тл	ИС, мм/с	КР, мм/с	V <sub>эф</sub> , Тл
<b><sup>57</sup>FeSO<sub>4</sub>+PM1</b>												
1	А	5,4	1,29	3,40	-	-	-	-	-	-	-	-
2	В		1,28	3,39	-	-	-	-	-	-	-	-
3	С		1,35	3,15	0,53	0,84	0,69	0,19	50,0	0,53	0,38	54,9
4	А	5,7	1,31	3,38	-	-	-	-	-	-	-	-
5	В		1,33	3,35	-	-	-	-	-	-	-	-
6	С		1,32	3,11	0,52	0,85	0,66	0,21	50,1	0,52	0,36	55,0
7	А	6,0	1,37	3,36	-	-	-	-	-	-	-	-
8	В		1,36	3,32	-	-	-	-	-	-	-	-
9	С		1,31	3,06	0,51	0,89	0,65	0,22	50,7	0,53	0,35	55,1
<b><sup>57</sup>FeSO<sub>4</sub>+PM2</b>												
10	А	5,4	1,29	3,40	-	-	-	-	-	-	-	-
11	В		1,27	3,38	-	-	-	-	-	-	-	-
12	С		1,31	3,16	0,52	0,83	0,68	0,20	49,9	0,52	0,34	54,8
13	А	5,7	1,31	3,38	-	-	-	-	-	-	-	-
14	В		1,34	3,34	-	-	-	-	-	-	-	-
15	С		1,30	3,10	0,50	0,86	0,65	0,22	50,2	0,52	0,31	55,1
16	А	6,0	1,37	3,36	-	-	-	-	-	-	-	-
17	В		1,35	3,31	-	-	-	-	-	-	-	-
18	С		1,28	3,05	0,50	0,89	0,63	0,24	50,4	0,51	0,29	55,6

ИС-изомерный сдвиг, КР – квадрупольное расщепление, V<sub>эф</sub> – индукция эффективного магнитного поля на ядре

Авторы выражают глубокую признательность руководителю лаборатории «ГР-спектроскопия» отдела «Строение вещества» ИХФ РАН проф. Стукану Р.А. за любезную помощь при выполнении этой работы.

#### Список литературы / References:

1. Грачева Н.В., Желтобрюхов В.Ф. Способ получения меланина из лузги подсолнечника и исследование его антиоксидантной активности. *Вестник Казанского технол. университета*, 2016, т. 19, № 15, с. 154-157. [Gracheva N.V., Zheltobryukhov V.F., Method of producing melanin from sunflower husk and the study of its antioxidant activity. *Vestnik of Kazan Technology University*, 2016, vol. 19, no. 15, pp. 154-157. (In Russ.)]
2. Сакина Н.Л., Донцов А.Е., Дегтярев Е.Н. и др. Сравнительная оценка содержания меланина в составе меланосом и меланолипофусциновых гранул клеток ретиального пигментного эпителия глаза человека. *Офтальмохирургия*, 2018, № 1, с 78-82. [Sakina N.L., Dontsov A.E., Degtyarev E.N. et al. Comparative evaluation of melanin content in melanosomes and melanolipofuscin granules from the human retinal pigment epithelium cells. *Ophthalmic Surgery*, 2018, no 1, pp. 78-82. (In Russ.)].
3. Бушманов А.Ю., Иванов А.А., Андрианова И.Е. и др. Противолучевые свойства меланина. *Саратовский научно-медицинский журнал*, 2014, т. 10, № 4, с. 828-832. [Bushmanov A.Yu., Ivanov A.A., Andrianova I.E. et al. Antiradiation properties of melanin. *Saratov Journal of Medical Cscientific Research*, 2014, vol. 10, no. 4, pp. 828-832. (In Russ.)]
4. Abbas M., Amico F.D., Morresi L. et al. Struktur, electrical and optical properties of melanin films. *European Physical Journal E*, 2009, vol. 28, no. 3, pp. 285-291.
5. Фабричный П.Б., Похолок К.В. *Мессбауэровская спектроскопия и её применение для химической диагностики неорганических материалов*. М.: МГУ, 2012, 142 с. [Fabrichniy P.B., Pokholok K.V. *Mössbauer spectroscopy and its application for the chemical diagnosis of inorganic materials*. Moscow: MSU, 2012, 142 p. (In Russ.)].
6. Vertes A., Korecz L., Burger K. *Mössbauer spectroscopy*. Budapest: Akad. Kiado, 1979, 432p

**THE BINDING OF IRON IONS WITH MELANINS OF PLANT ORIGIN**  
**Bagirov R.M., Bobrova E.Yu., Gafarova H.O., Turabova G.A., Bagirova O.Sh.**  
Baku State University  
*Z. Khalilov str., 23, Baku, AZ1148, Azerbaijan; e-mail: rafiqbagirov@list.ru*

**Abstract.** From the rind of the fruits of the elderberry black and ivy ordinary melanins were isolated. To identify the isolated pigments, their EPR and IR-spectra were recorded. The binding of iron ions with these melanins was investigated by the gamma resonance spectroscopy method (GRS). It has been established that melanins of plant origin effectively chelate iron ions both in its two and trivalent state. When interacting with  $Fe^{2+}$  ions, melanins partially oxidize them to  $Fe^{3+}$ , which are inactive in a prooxidant ratio, and bind them as well as  $Fe^{2+}$ . The parameters of the GR-spectra of the studied samples are characteristic of high-spin (HS) complexes of  $Fe^{2+}$  and  $Fe^{3+}$  ions with an octahedral ligand environment. It is assumed that the ability of melanins of plant origin to effectively bind prooxidant  $Fe^{2+}$  can be one of the possible mechanisms of their antioxidant and radioprotector properties.

**Key words:** *melanin, complexation with iron ion, the gamma resonance-spectroscopy.*