

Növényi ciánglikozidák meghatározása módosított pikrinsavas módszerrel

I. Néhány pillangós és pázsitfűfaj ciánglikozida-tartalmának változása a csírázás folyamán

VETTER JÁNOS és HARASZTI EDE

Allatorvostudományi Egyetem, Növénytan Tanszék,
Budapest

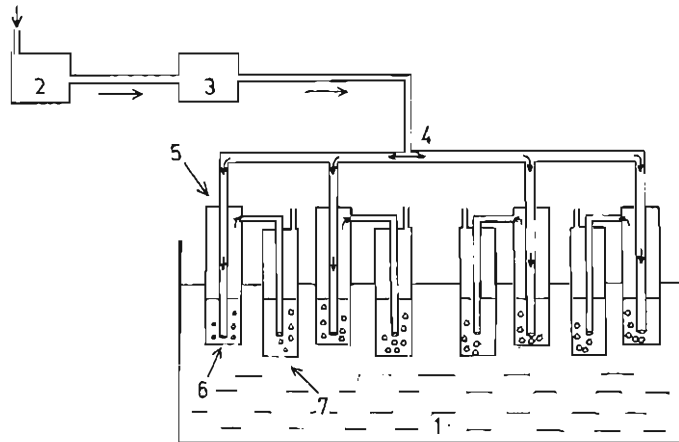
Bár a ciánglikozidákat tartalmazó növényfajok száma — az eddigi adatok szerint [10] — nem túlságosan nagy (kb. 1000), e növények nagy gyakorlati jelentősége indokoltan állítja ezeket a botanikusok érdeklődésének előterébe. Többek között fontos takarmánynövények (pl. a *Lotus*, *Trifolium*, *Vicia*, *Sorghum* genusok) vagy pl. a trópusi vidékek egyik alapvető kalória-hordozó, népelelmezési növénye, a *Manihot esculenta* tartoznak e csoportba. Mág sem megoldott az a kérdés, vajon ezen, a másodlagos anyagcseretermékek közé sorolt, vegyületek milyen szerepet töltenek be a növény életében. Az eddigi vizsgálatok részletesen foglalkoztak a ciánglikozidák kémiájával [10], bioszintézisével [6, 8, 9], a cianogenezis genetikai hátterével [1], másrészt a hidrogén-cianid felszabadulását befolyásoló enzimatis, illetve környezeti tényezőkkel [7]. A ciánglikozidák kimutatása, mennyiségük megbízható nyomon követése korszerű, lehetőleg gyors módszereket kíván. Különböző pillangós- és pázsitfűfajokkal, ill. fajtákkal végzett vizsgálatsorozatunk kapcsán — mely eredményeink egy részét másutt közöljük [11] — nem elégedtünk meg a sok szerző által használt, kvalitatív jellegű pikrinsavas tesztekkel [5]. A módszer olyan változatát dolgoztuk ki, amely kisebb anyagmennyiségből gyorsabban elvégezhető, mint a desztillációs módszerek [2], másrészt pontosabb, megbízhatóbb adatokat szolgáltat a pikrinsavas papír-tesztnél.

E módszer segítségével hasonlítottuk össze néhány — az irodalom szerint cianogén anyagokat jelentősebb mennyiségben tartalmazó — pillangós-, ill. pázsitfűfajt (fajtát) csírázásuk kezdeti szakaszában. Arra kerestünk választ, vajon a száraz magban és a csírázás első szakaszában (duzzadás és a nyúlásos növekedés kezdeti szakasza) hogyan változik a ciánglikozidák mennyisége.

Anyag és módszer

A cianogén glikozidák mennyiségének meghatározása általában közvetett módszerrel, a felszabadított HCN mérése alapján történik. A módszer lépései: a) a HCN felszabadítása. b) a felszabadított HCN izolálása és c) a HCN meghatározása alkalmas analitikai módszerrel.

Módszerünk kialakításakor a hidrolízis, illetve az elnyeletett HCN kvantitatív meghatározásának körülményeit, feltételeit kívántuk standardizálni, tekintve az irodalom ebbeli bizonytalanságait. Alapként a HCN-felszabadítás enzimatiskus módját, a kimutatás pikrinsavas és elektródos módját választottuk. Készüléket állítottunk össze, amelyben egyidejűleg négy meghatározás végezhető el. A készülék működésének lényege (1. ábra): a kis



1. ábra

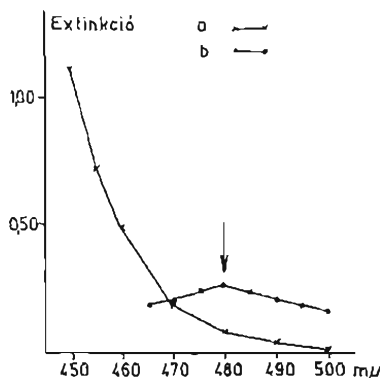
A ciánglikozidák mennyiségi meghatározására használt berendezés vázlatos rajza. 1. Vízfürdő. 2. Levegőztető. 3. CO₂-mentesítő. 4. Levegőelosztó. 5. HCN-felszabadítás. 6. Növényi homogenátum. 7. Elnyelő edény

menységű növényi anyagból (100–200 mg) 0 °C-on, Potter- Elvehjem tip. homogenizátorral homogenizátumot készítettünk. Ez a reakcióedénybe (5) került, ahol a HCN felszabadulását a homogenátumhoz adott β-glikozidáz katalizálta. A reakcióedényeket az akváriumi levegőztető által (2) szolgáltatott és 10%-os Ba(OH)₂-dal CO₂-mentesített levegővel (3) buborékolattuk és hajtottuk át az elnyelő edénybe (7). Az elnyeletést vagy pikrinsavas oldattal, vagy NaOH-oldattal végeztük, melyet első esetben spektrofotometriás, második esetben elektródos mérés követett. Az előkísérletek során a hidrogén-cianidot KCN-ből 3 n HCl-val szabadítottuk fel, a növényanyaggal végzett próbavizsgálatokat pedig *Lotus*, illetve *Sorghum* levelek homogenizátumával készítettük.

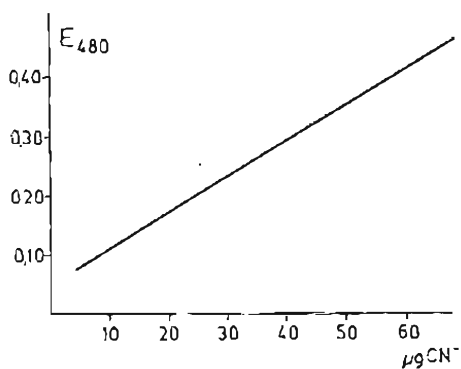
A pikrinsav és a cianidionok színreakcióját használtuk fel, mivel ismert, hogy a lúgos, pikrinsavas közegbe vitt cianidionok az időtől és a hőmérséklettől függő reakcióban színes vegyületet (Na-izopurpurátot [3]) alkotnak. A keletkező szín alkalmas a fotometriás mérésre, s a felvett spektrum tanúsága szerint (2. ábra) a görbe 480 mμ-nál maximumot mutat. Ezért választottuk azt a hullámhossz-értéket méréseinkhez.

A növényi anyagból felszabadított cianidionok meghatározásához kalibráló görbét készítettünk. Ehhez 1×10^{-3} m KCN-oldat megfelelő mennyiségéből 3 n HCl-val tettük szabaddá a hidrogén-cianidot, majd az elnyelő edényben 10 ml lúgos pikrinsavban fogtuk fel (2,28 g pikrinsav, 1 liter 0,25 n

NaOH-ban, s ez az oldat tapasztalatunk szerint $\pm 4^\circ\text{C}$ -on 4-5 napig volt eltartható). A HCN felszabadítása, illetve elhyeletése 30 percig való átbuborékolattal, $+52^\circ\text{C}$ -on történt. A kalibráló görbe (3. ábra) adatai alapján olyan faktort számítottunk ki, amely a $480\text{ m}\mu$ -on mért extinkcióértékkel szorozva közvetlenül adja a cianidion-tartalmat ($\text{Extinkció}_{480\text{ m}\mu} \times 120 \rightarrow \mu\text{g CN}^-$). A reakció mérés határa $5\text{ }\mu\text{g}-80\text{ }\mu\text{g}$.

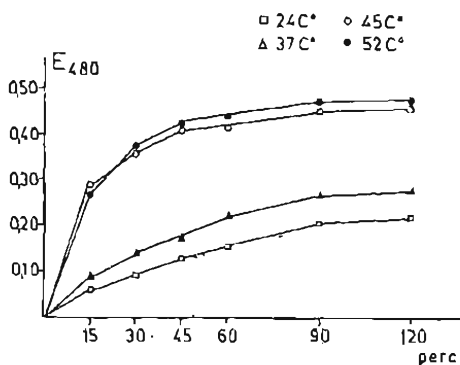


2. ábra
A Na-pikrát (a) és a Na-izopurpurát (b) spektruma

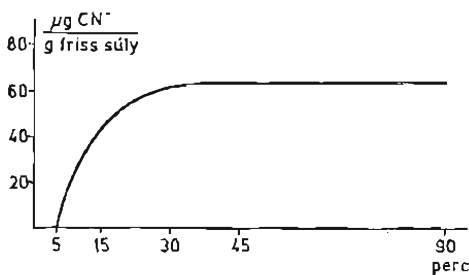


3. ábra
A cianidionok meghatározásához készült kalibráló görbe. Vízszintes tengely: a cianidionok mennyisége (μg). Függőleges tengely: extinkció $480\text{ m}\mu$ -nál

A Na-pikrát és a cianidionok színreakciójakor létrejövő vegyület, tehát a szín kialakulásának idő és hőmérsékleti viszonyait több hőfokon végzett kísérlettel határoztuk meg (4. ábra). A kapott görbék lefutása megerősíti azt a feltevésünket, hogy a mérés alapjául szolgáló szín (a színintenzitás) kialakulása nagymértékben függ a reakció idejétől és a hőmérséklettől, tehát igen fontos a körülmények standardizálása.



4. ábra
A Na-pikrát és a cianidionok színreakciójának alakulása az időben, 4 hőmérsékleten vizsgálva. Vízszintes tengely: az idő (percekben). Függőleges tengely: extinkció $480\text{ m}\mu$ -nál



5. ábra
A növényi anyagból felszabadítható HCN mennyiségének alakulása a felszabadítás idejének függvényében. Vízszintes tengely: az idő (percekben). Függőleges tengely: $\mu\text{g CN}^-/\text{g friss súly}$.

Mivel célunk a lehető legnagyobb érzékenység elérése mellett a viszonylag rövid idejű reakció is, az 52 C°-ot és a 30 perces időintervallumot választottuk.

Irodalmi utalás alapján [4] meghatároztuk a HCN át buborékoltatására használt levegő CO₂-tartalmának hatását is a kialakuló színre (1. táblázat A része). Az adatok arra utalnak, hogy a levegő CO₂-tartalma valóban zavarja a reakciót, tehát rontja a módszer érzékenységét.

A növényi anyagból (homogenizátumból) való HCN-felszabadítás módszerként a növény hidrolitikus enzimei által katalizált reakciót vizsgáltuk előkísérletben. Rendszerünk körülményei között jól mérhető HCN-mennyiségek szabadultak fel, spontán hidrolitikus reakció során.

1. táblázat

A) A levegő CO₂-tartalmának hatása a cianidionok és a Napikrát színreakciójára

	-CO ₂	+ CO ₂
E ₄₉₀	0,154	0,125
%	100,00	79,60

B) Fémionok és forralás hatása a spontán HCN-felszabadulásra (a kontroll %-ában)

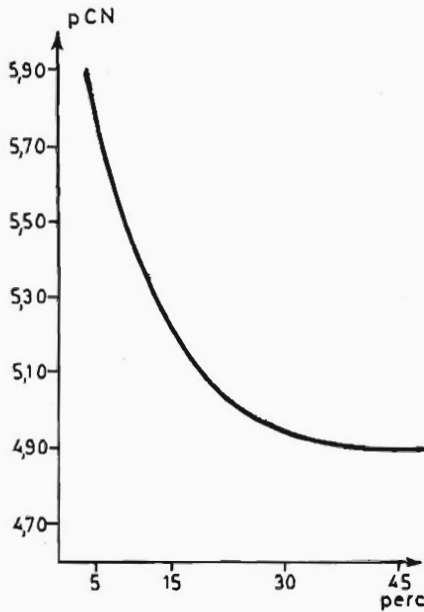
	(1) HCN-felszabadulás
Cu ²⁺ (1×10 ⁻³)	50,5 %
Zn ²⁺ (1×10 ⁻³)	55,7 %
Fe ³⁺ (1×10 ⁻³)	28,6 %
a) Forralás 10 sec	0
a) Forralás 20 sec	0
a) Forralás 50 sec	0

A reakció enzimikus jellegét fémionok hozzáadásával (Cu²⁺, Fe³⁺, Zn²⁺; 1–2×10⁻³ m koncentrációban), illetve 10–50 másodperces enzimgátlással is igazoltuk (1. táblázat B része). Tekintve, hogy nem láttuk kellőképpen bizonyítva az enzimikus hidrolízis rövid idő alatt teljes (kvantitatív) lefolyását, β-glikozidáz enzimet adtunk a homogenátumhoz (1 mg/100 ml homogenátum koncentrációban).

Az enzimikus hidrolízis lefolyásának, illetve teljességének nyomon követésére azonos növényanyag azonos mennyiségéből különböző (5 és 90 perc közötti) ideig végeztük a meghatározást. A kapott adatok (5. ábra) jól szemléltetik, hogy gyakorlatilag 25 perc után már változatlan marad a felszabaduló és kimutatott HCN mennyisége.

Előbbiekben leírt rendszerünkben a HCN-elnyelés, illetve az analitikai meghatározás membránelektrodos módszerét is alkalmaztuk. Méréseink során az elnyelést 0,1 n NaOH-dal, végeztük, s az oldatok cianid-koncentrációját Radelkis gyártmányú cianidszelektív elektróddal mértük, melyet a referencia-elektrodként szolgáló kalomelektroddal együtt Radelkis gyártmányú pX mérőhöz csatlakoztattunk. Ilyen módszerrel is meghatároztuk a különböző

ideig történő enzimes HCN-felszabadítás mértékét (6. ábra), amely görbe látszólag más lefutású, mivel itt közvetlenül a cianid-koncentráció negatív logaritmusát (pCN) ábrázoltuk. Meggyező képet ad a pikrinsavas elnyelés adataival (5. ábra). Megjegyezzük, hogy véleményünk, tapasztalatunk szerint az elektródos mérés elég időigényes és bár érzékenységének alsó határa jobb



6. ábra

A növényi anyagból felszabadítható HCN mennyiségének alakulása az idő függvényében cianidelektrodos mérés alapján. Vízszintes tengely: idő (percekben). Függőleges tengely: pCN.

a pikrinsavas módszerénél, alkalmazása csak finom skálájú pX mérőműszer esetén indokolt.

A csíráztatási kísérleteket 26 C°-on, termosztátban, sötétben végeztük. Az egyes minták szárazanyag-tartalmát 80 C°-on, súlyállandóságig való szárítással határoztuk meg.

Eredmények és értékelésük

Az előbbieken részletezett módszerünk felhasználásával 15 növényfaj (fajta) összehasonlító vizsgálatát végeztük el. A kapott adatok (2. táblázat) alapján két fő csoportba sorolhatjuk a növényeket: a pillangós fajok és a len; illetve a *Sorghum* fajok és fajták. A száraz magok HCN-tartalma az első csoportban nagyobb (16–63 $\mu\text{g/g}$ friss súly); a szudánifű és cirok fajtáknál igen kicsi (0–33 $\mu\text{g/g}$ friss súly). A 26 C°-on történt csíráztatás első 24 órája után mindkét növénycsoport HCN-tartalma lényegében változatlan maradt (pillangósok: 11–57 $\mu\text{g/g}$ friss súly; a *Sorghum* csoport 2–22 $\mu\text{g/g}$ friss súly).

2. táblázat

A vizsgált pillangós- és pászitfűfajok hidrogencianid-tartalmának alakulása a száraz és az egy napig duzzasztott magban, valamint a négy napos csíranövényekben

(1) Vizsgált növények	(2) Száras mag			(3) 1 napig duzzasztott mag			(4) 4 napos csíranövény		
	Száraz anyag, %	$\mu\text{g CN}^-$ g friss	$\mu\text{g CN}^-$ g száraz	Száraz anyag %	$\mu\text{g CN}^-$ g friss	$\mu\text{g CN}^-$ g száraz	Száraz anyag %	$\mu\text{g CN}^-$ g friss	$\mu\text{g CN}^-$ g száraz
<i>Trifolium repens</i>	92,0	67,3	73,0	30,5	47,7	156,2	9,8	49,4	500,0
<i>Trifolium pratense</i>	91,2	16,2	17,7	31,0	56,2	180,0	7,9	48,5	615,2
<i>Lotus corniculatus</i>	90,0	47,7	52,2	33,2	34,9	105,8	8,5	51,1	600,1
<i>Vicia pannonica</i>	91,1	20,3	22,5	58,6	27,5	46,5	8,1	35,0	435,0
<i>Vicia sativa</i>	91,3	59,0	65,0	47,2	27,0	57,0	7,6	51,0	670,0
<i>Vicia villosa</i>	88,3	16,7	18,8	41,3	16,5	40,5	7,0	46,5	650,2
<i>Lathyrus sativus</i>	91,6	29,2	32,0	35,7	14,0	39,5	8,3	70,0	840,0
<i>Linum usitatissimum</i>	94,4	63,5	67,5	21,7	11,0	50,5	10,5	45,0	420,0
<i>Sorghum sudanense</i>	92,2	3,2	3,4	22,4	22,4	100,0	11,7	131,8	1120,0
Hybar Mv 301	90,4	2,2	2,4	24,3	15,0	60,8	12,1	242,2	2027,0
Hybar BB 7301	91,3	21,9	24,0	25,1	2,0	8,0	10,7	127,5	1187,0
Hybar BB 7302	91,2	33,1	36,3	27,2	7,1	26,2	10,2	714,7	6997,0
Szarvasi 350	92,0	6,0	6,6	20,1	4,3	21,5	10,4	209,9	2015,0
Sz C 40	91,5	25,8	29,2	19,7	3,4	17,5	11,7	255,6	2220
<i>Sorghum bicolor</i> var. <i>technicum</i> Szegedi 425-70	92,0	0	0	20,5	5,1	25,0	10,9	295,5	2720

Az egységnyi száraz súlyra vonatkoztatott értékek alapján (a pillangós fajok magjai szárazanyag-tartalmának nagyobb eltérései miatt) az első csoport fajai kissé emelkedő tendenciát mutattak (50–180 $\mu\text{g/g}$ száraz súly), a *Sorghum* csoportnál viszont jelentős változást még nem tapasztaltunk (80–100 $\mu\text{g/g}$ száraz súly). A négy napos csíranövények adataiban már lényeges eltérés adódik. A pillangós fajok HCN-tartalmának változása továbbra sem jelentős (átlagosan 50 μg körüli érték friss súly grammonként). A *Sorghum* csoport valamennyi növényénél igen éles, ugrásszerű emelkedést tapasztaltunk (az 1 napos magok értékeihez képest átlagosan 8-10-szeres az emelkedés). Kiemelkedően magas (714,7 $\mu\text{g/g}$ friss súly, ill. 6997 $\mu\text{g/g}$ száraz súly) a *Hybar* BB 7302 csíranövényeinek HCN-tartalma.

Adataink arra utalnak, hogy a cianogén anyagok (a különböző cianoglikozidák) anyagcseréjében jelentős változásnak kell bekövetkeznie az imbibíció, ill. a nyúlásos növekedés első szakaszában. Tekintve a cianogén vegyületek anyagcseréjének viszonylag kevésbé ismert voltát, a jelenség pontos magyarázata és összefüggése a csírázás kapcsán a mag anyagcseréjének egyéb területeivel, további, finomabb vizsgálatokat kíván. Adataink arra is felhívják a figyelmet, hogy lényeges különbség látszik a pászitfűvek (*Sorghum* csoport)

és a pillangósok ciánglikozida-tartalmának alakulása között, aminek oka lehet — többek között —, hogy előbbiek dhurrint, utóbbiak más cianogén glikozidákat (lotaustralin, vicianin stb.) tartalmaznak. A vizsgált, fontos takarmánynövények cianogén glikozidái anyagcsere-folyamatában végbement változás ismerete nemcsak növényfiziológiai, agrokémiai kérdés, hanem komoly takarmányozástani, toxikológiai jelentősége van.

Összefoglalás

Növényi anyag ciánglikozida-tartalmának meghatározására módosított pikrinsavas, spektrofotometriás módszert alakítottunk ki. A kidolgozott rendszerben — amely egyidejűleg 4 vizsgálat lefolytatását is lehetővé teszi — a növényi anyag homogenizátumából enzimatis hidrolízissel (β -glikozidáz) szabadítottuk fel a hidrogén-cianidot (a felszabadított hidrogén-cianidot CO_2 -mentes levegővel buborékoltattuk át). A meghatározás egyéb paramétereit (hőmérséklet, idő) előkísérletek alapján standardizáltuk úgy, hogy a módszer érzékenysége minél nagyobb legyen. A pikrinsav és a benne elnyeletett HCN reakciójának eredményeként keletkező színes vegyület mennyiségét abszorpciós maximumán (480 $m\mu$) spektrofotométeren mértük. A NaOH-oldatban elnyeletett cianidionok mennyiségét cianid szelektív elektróddal is mértük.

Módszerünk segítségével 15 faj (pillangósok, a len és *Sorghum* fajok, ill. fajták) HCN-tartalmának változásait mértük a száraz, az egy napig duzzasztott magban és a 4 napos csíranövényekben. Adataink a ciánglikozidák tartalmának eltérő változásaira utalnak a pillangósok, illetve a pázsitfűvek esetén. A *Sorghum* fajok, ill. fajták csíranövényeiben az 1. és 4. napok között igen jelentős növekedést tapasztaltunk, míg a pillangósoknál hasonló tendenciát nem mértünk. Adataink — a cianogén növényfajok egységesebb és pontosabb vizsgálatának részeként — hozzájárulhatnak anyagcseréjük ma még kevésbé tisztázott részleteinek felderítéséhez.

Irodalom

- [1] BARNETT, R. D. & CAVINESS, G. E.: Inheritance of Hydrocyanic Acid Production in two *Sorghum* x Sudangrass-Crosses. *Crop Sci.* 8. 89—91. 1968.
- [2] DOBES, F. & JUZA, J.: Studies obsahu HCN v listech, kvetech a luscich stirovniku ruzkateho (*Lotus corniculatus* L.). *Rostlinná Vyroba.* 18. 1097—1104. 1972.
- [3] GILCHRIST, D. E., LUESCHEN, W. E. & HITTLE, C. N.: Revised method for the preparation of standards in the sodium picrate assay of HCN. *Crop Sci.* 7. 267—268. 1967.
- [4] GILLINGHAM, J. T., SHIVER, M. M. & PAGE, N. R.: Evaluation of the Orion cyanide electrode for estimating the cyanide content of forage samples. *Agron. J.* 61. 717—718. 1969.
- [5] GRANT, W. F. & SIDHU, B. S.: Basic chromosome number, cyanogenetic glucoside variation and geographic distribution of *Lotus* species. *Canad. J. of Botany*, 45. 639—647. 1967.
- [6] JONES, D. A.: On the polymorphism of cyanogenesis in *Lotus corniculatus* L. I. Selection by animals. *Can. J. Genet. Cytol.* 8. 566—567. 1967.
- [7] LOYD, R. G., GRAY, E. & SHIPE, E.: Effect of freezing on hydrocyanic acid release from *Sorghum* plants. *Agron. J.* 63. 139—140. 1971.
- [8] MAO, C. M., BLOCHER, J. P., ANDERSON, L. & SMITH, D. C.: Cyanogenesis in *Sorghum vulgare* L. *Phytochemistry.* 4. 297—303. 1965.
- [9] PHILLIPS, R. L.: Cyanogenesis in *Lotus* species. *Crop Sci.* 8. 123—124. 1968.

- [10] TAPPER, B. A. & REAY, P. F.: Cyanogenic glycoside and Glycosinolates. in: Chemistry and Biochemistry of Herbage. ed.: BUTLER, G. W. & BAILEY, R. W., Academic Press. London—New York. 1973.
- [11] VETTER, J. & HARASZTI, E.: Data on the correlation between the development and the hydrogen cyanide content of Sudan grass (*Sorghum sudanense*) variety and hybrid). Acta Agron. Hung. (in press)

Érkezett: 1975. február 22.

Determination of Cyanoglucosides of Plant Tissues by the Modified Picric Acid Technique

I. Changes in the Cynoglucoside Content of some Leguminosae and Gramineae Species in the Early Phases of Germination

J. VETTER and E. HARASZTI

Department of Botany, University of Veterinary Science, Budapest (Hungary)

Summary

A spectrophotometric method was developed for the quantitative determination of cyanoglucosides of plant material. In the developed apparatus hydrogen cyanide was liberated with enzymatic hydrolysis (β -glucosidase) in an air current free of CO_2 . The liberated HCN was absorbed in alkaline picric acid solution. A coloured compound (Na-isopurpurate) derived from the reaction between Na-picrate and HCN. The colour-intensity of the reaction mixture was measured with a spectrophotometer at the 480 m μ wave length. The different parameters of the reaction (time, temperature) were determined and standardized. The obtained data were evaluated on the basis of a calibration curve. The quantity of HCN in the absorbing glass was evaluated with a cyanide membrane electrode, too.

The hydrogen cyanide contents were evaluated in the dry and soaked seeds and in the 4-day-old seedlings of 15 plant species. Different changes in the hydrogen cyanide contents were found in the case of Leguminosae and Gramineae species. In the seedlings of Sorghum species and varieties a remarkable increase was measured between the 1st and 4th days. The HCN production of Leguminosae species remained — essentially — unchanged in the early phases of germination.

Table 1. A/ Effect of the CO_2 content of the air on the colour-reaction between Na-picrate and cyanide ions. B/ Effect of metal ions and boiling on the spontaneous enzymatic liberation of HCN (in per cent of the control). (1) Liberation of HCN. a) Boiling.

Table 2. Change in the hydrogen cyanide contents of the dry and soaked seeds and 4-day-old seedlings of the examined species. (1) Studied plants. (2) Dry seeds. (3) Seeds soaked for one day. (4) 4-day-old seedlings. Dry matter in per cent of fresh weight; HCN⁻ content: $\mu\text{g CN}^-/\text{g}$ fresh weight, $\mu\text{g CN}^-/\text{g}$ dry weight, resp.

Fig. 1. Scheme of the apparatus used for the quantitative determination of cyanoglucosides. 1. Water bath. 2. Air ventilation in the apparatus. 3. Absorption of CO_2 . 4. Air distributor. 5. Vessel for the liberation of HCN. 6. Plant homogenate. 7. Absorption of HCN in picric acid.

Fig. 2. Spectra of Na-picrate (a) and Na-isopurpurate (b).

Fig. 3. Calibration curve for the determination of cyanide ions. Horizontal axis: quantity of cyanide ions (μg). Vertical axis: extinctions at 480 m μ .

Fig. 4. Effect of various temperatures and liberation times on the colour reaction of Na-picrate and cyanide ions. Horizontal axis: time, in minutes. Vertical axis: extinctions at 480 m μ .

Fig. 5. The quantity of HCN liberated from plant homogenate, as a function of liberation time. Horizontal axis: time, in minutes. Vertical axis: $\mu\text{g CN}^-/\text{g}$ fresh weight.

Fig. 6. The quantity of HCN liberated from plant homogenate, as a function of liberation time (on the basis of the measurements with cyanide electrode). Horizontal axis: time, in minutes. Vertical axis: pCN.

Anwendung der modifizierten Pikrinsäure-Methode zur Bestimmung von Cianglykosiden in Pflanzen

I. Änderungen des Gehaltes an Cianglykosiden in einigen Leguminosen und Grasgewächsen während der Keimung

J. VETTER und E. HARASZTI

Lehrstuhl für Botanik, Universität für Veterinärmedizin, Budapest (Ungarn)

Zusammenfassung

Zur Bestimmung des Cianglykosidgehaltes im pflanzlichen Gewebe wurde eine spektrophotometrische Methode ausgearbeitet. In der hergestellten Einrichtung wird das Hydrogencyanid durch eine enzymatische Hydrolyse (β -Glukosidase) mit einem CO_2 -freien Luftstrom frei gemacht. Das freie HCN wird in einer alkalischen Pikrinsäurelösung absorbiert. Als Reaktion zwischen dem Na-Pikrat und dem HCN entsteht eine farbige Verbindung, das Na-Isopurpurat. Die Farbintensität dieser Lösung wurde bei 480 m μ im Spektrophotometer bestimmt. Die optimalen Parameter (Zeit, Temperatur) der Farbreaktion wurden bestimmt und standardisiert. Die Daten wurden mit Hilfe einer Kalibrationskurve ausgewertet. Die Menge des HCN-s im Absorptionsgefäß wurde auch mit Hilfe einer Cyanid-Membranelektrode bestimmt.

Mit der hier beschriebenen Methode wurden die Änderungen des HCN-Gehaltes von 15 Pflanzenarten (Leguminosen, Flachs und Sorgum-Arten, bzw. -Sorten) in trockenen, sowie in einen Tag lang gequellten Samen und in 4 Tage alten Keimpflanzen bestimmt. Die Ergebnisse zeigen eine unterschiedliche Abänderung des Cianglykosidgehaltes im Falle der Leguminosen, bzw. der Grasgewächse. In den Keimplanzen der Grasgewächse stieg der Cianglykosidgehalt zwischen dem ersten und vierten Tag recht bedeutend an, während bei den Leguminosen eine ähnliche Tendenz nicht bestimmt werden konnte. Die erhaltenen Daten können zur besseren Erkenntnis der noch kaum geklärten Teilvorgänge des Stoffwechsels der cyanogenen Pflanzenarten — als Teilaufgabe ihrer einheitlichen und genaueren Untersuchung — beitragen.

Tab. 1. A) Einfluss des CO_2 -Gehaltes der Luft auf die Farbreaktion der Cyanid-Ionen und des Na-Pikrates. B) Einfluss der Metallionen und des Kochens auf die spontane HCN-Bildung (im % der Kontrolle). (1) HCN Bildung, a) Kochen.

Tab. 2. HCN-Gehalt in den trockenen, sowie einen Tag lang gequellten Samen und in den 4 Tage alten Keimpflanzen von Leguminosen und Grasgewächsen. (1) Untersuchte Pflanze. (2) Trockene Samen. (3) Einen Tag lang gequellte Samen. (4) Vier Tage alte Keimpflanzen. Trockensubstanz im % der Grünmasse, HCN-Gehalt $\mu\text{g CN}^-/\text{g}$ Grüngewicht und $\mu\text{g CN}^-/\text{g}$ Trockengewicht.

Abb. 1. Skizze der zur quantitativen Bestimmung der Cianglykoside verwendeten Einrichtung. 1. Wasserbad. 2. Luftzuführung. 3. Entfernung des CO_2 . 4. Luftverteiler. 5. HCN-Bildung. 6. Pflanzliches Homogenat. 7. Absorptionsgefäß.

Abb. 2. Spektren von Na-Pikrat (a) und Na-isopurpurat (b).

Abb. 3. Kalibrationskurve zur Bestimmung der Cyanid-Ionen. Abszisse: Menge der Cyanid-Ionen (μg), Ordinate: Extinction bei 480 m μ .

Abb. 4. Zeitlicher Ablauf der Farbreaktion der Na-Pikrat und Cyanid-Ionen, bei vier verschiedenen Temperaturen. Abszisse: Zeit in Minuten, Ordinate: Extinction bei 480 m μ .

Abb. 5. Menge des aus dem pflanzlichen Material austretenden HCN-s als Funktion der Zeit. Abszisse: Zeit in Minuten, Ordinate: $\mu\text{g CN}^-/\text{g}$ Grüngewicht.

Abb. 6. Menge des aus dem pflanzlichen Material austretenden HCN-s als Funktion der Zeit mit einer Cyanid-Elektrode gemessen. Abszisse: Zeit in Minuten, Ordinate: pCN.

Использование измененного метода пикриновой кислоты для определения содержания цианогенных гликозидов

I. Изменение содержания цианогенных гликозидов в нескольких бобовых растениях и злаках

Я. ВЕТТЕР и Э. ХАРАСТИ

Ботаническая кафедра, Университет Ветеринарных Наук, Будапешт

Резюме

Был выработан спектрофотометрический метод для количественного определения цианогенных гликозидов в растительных тканях. В этом методе цианистый водород выделяли с помощью энзиматического гидролиза (β -гликозидаз) в воздушном потоке, без углекислого газа воздуха. Выделенный цианистый водород поглощался щелочным раствором пикриновой кислоты. При реакции между цианистым водородом и пикратом натрия образовалось цветное соединение. Определили интенсивность окрашивания спектрофотометром при длине волны в 480 м μ . Авторы определили и стандартизировали разные параметры (время, температура) и оценили данные на основе калибрационных кривых. Количество цианистого водорода в сосуде для поглощения определили и с помощью мембранного электрода.

Используя указанный метод, авторы определили изменение содержания цианогенных гликозидов в 15 растениях (бобовые, лен и сорго). Результаты показали, что содержание цианистого водорода изменяется различно в бобовых культурах и различных сортах сорго. В проростках последних содержание цианистого водорода резко повышалось в первые 4 дня прорастания, у бобовых была найдена другая, неизменная тенденция. Эти результаты могут способствовать изучению малоизвестных деталей метаболизма цианистых гликозидов в растениях.

Табл. 1. А. Действие углекислого газа воздуха на цветную реакцию цианистых ионов и пикрат натрия. В. Действие металлических ионов и кипения на спонтанное энзиматическое выделение цианистого водорода (в процентах контроля). (1) Выделение цианистого водорода. (2) Кипение.

Табл. 2. Изменение содержания цианистого водорода в сухих и набухших семенах, а также в проростках 15 изученных видов растений. (1) Изученное растение. (2) Сухие семена. (3) Набухшие семена. (4) Четырехдневные проростки. Сухое вещество в процентах от свежего веса; содержание цианистого водорода в $\mu\text{г}$ CN/г свежего веса и $\mu\text{г}$ CN/г сухого веса.

Рис. 1. Схема аппарата для определения цианогенных гликозидов. 1. Водяная баня. 2. «вентилятор» 3. Поглотитель CO_2 . 4. Распределить воздуха. 5. Сосуд к выделению цианистого водорода. 6. Гомогенаты растительных тканей. 7. Сосуд для поглощения выделенного цианистого водорода (щелочная пикриновая кислота).

Рис. 2. Спектры натриевой соли пикриновой кислоты (а) и изопурпурат натрия. (б)

Рис. 3. Калибровочная кривая для определения цианистых ионов. На абсциссе: количество цианистых ионов $\mu\text{г}$; на ординате: экстинкция у 480 м μ .

Рис. 4. Влияние температуры и времени на цветную реакцию натриевой соли пикриновой кислоты и цианистых ионов. На абсциссе: время (мин), на ординате: экстинкция у 480 м μ .

Рис. 5. Количество цианистого водорода, выделенного из растительного гомогената в функции времени выделения. На абсциссе: время (мин), на ординате: $\mu\text{г}$ цианистых ионов/г свежего веса.

Рис. 6. Количество выделенного цианистого водорода в функции времени, на основе электродных определений. На абсциссе: время (мин), на ординате: отрицательный логарифм концентрации цианистых ионов, pCN.