

УДК 54.062

Статья посвящается юбилею академика РАН Ирины Петровны Белецкой

НОВЫЙ КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ МЕТОД АНАЛИЗА НАТУРАЛЬНОГО КАУЧУКА НЕПОСРЕДСТВЕННО В КОРНЕ РАСТЕНИЯ-КАУЧУКОНОСА МЕТОДОМ ЭПР СПИНОВОГО ЗОНДА

© 2023 г. Л. Ю. Мартиросян^{1,2,*}, В. М. Гольдберг¹, И. И. Барашкова³,
В. В. Каспаров¹, Ю. Ц. Мартиросян^{1,2}, М. В. Мотякин^{1,3},
С. Н. Гайдамака⁴, член-корреспондент РАН С. Д. Варфоломеев^{1,4}

Поступило 23.09.2022 г.
После доработки 01.06.2023 г.
Принято к публикации 14.06.2023 г.

Впервые обнаружено явление избирательной сорбции стабильного нитроксильного радикала ТЕМПО на частицах каучука в порошке высушенного и диспергированного корня кок-сагыза. Эта особенность материала корня каучуконоса способствовала разработке нового, весьма чувствительного метода количественного анализа каучука по интегральной интенсивности сигнала ЭПР ТЕМПО. Основными достоинствами предложенного метода являются быстрота и возможность определения содержания каучука непосредственно в корнях растения в микроколичествах (5–30 мг).

Ключевые слова: ЭПР-спектроскопия, натуральный каучук, спиновый зонд, ТЕМПО, аэропонный фитотрон, *Taraxacum kok-saghyz* L.E. Rodin

DOI: 10.31857/S2686953522600659, **EDN:** BDLDRС

ВВЕДЕНИЕ

Метод электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) спинового зонда находит широкое применение в различных областях науки и техники [1, 2]. Он основан на том, что параметры спектров ЭПР зонда несут важную информацию о структуре субстанции, в которой зонд находится [1]. Хорошо известно применение спиновых зондов для изучения эластомеров. В настоящей работе продемонстрировано использование спинового зон-

да ТЕМПО для создания метода количественного анализа натурального каучука (НК) непосредственно в корнях кок-сагыза. Это растение, *Taraxacum kok-saghyz* E. Rodin, рассматривается как весьма перспективная культура для производства натурального каучука [3, 4].

Натуральный каучук является одним из ключевых продуктов в экономике и широко применяется в промышленности для изготовления резиновых изделий, таких как автомобильные, авиационные и велосипедные шины, оконные уплотнители и прокладки, крышки, шланги, медицинские изделия и т.п. [3]. Принципиально важным направлением в решении проблем продуктивности кок-сагыза являются генно-инженерные работы по модификации генома [4–6] и селекция. Для ускорения работ по отбору и размножению экзепляров, обладающих высокой скоростью биосинтеза и накопления НК, необходима методика количественного экспресс-анализа при достаточно малой массе образца.

В настоящее время наибольшее распространение имеет самый простой и достаточно надежный гравиметрический метод количественного анализа [1, 7–9]. Он является абсолютным методом и не требует предварительной градуировки. Метод за-

¹Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, 119334 Москва, Россия

²Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, 127550 Москва, Россия

³Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семёнова Российской академии наук, 119991 Москва, Россия

⁴Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Химический факультет, кафедра химической энзимологии, 119991 Москва, Россия

*E-mail: levon-agro@mail.ru

ключается в экстракции каучука из высушенных и диспергированных частей растения-каучуконоса с последующим выделением из раствора и высушиванием до постоянного веса. Однако его существенным недостатком является длительное время анализа, большую часть которого занимают экстракция и последующие операции. Кроме того, на его осуществление требуется значительное количество исходного материала. Разработка количественного метода определения содержания каучука без экстракции и в микроколичествах образца каучуконоса значительно упростила бы оценку эффективности различных приемов по интенсификации роста и производительности растений. Эта проблема может быть решена с помощью метода ЭПР спиновых зондов [9, 10].

Цель настоящей работы – разработка способа количественного анализа каучука в корнях кок-сагыза, выращенного в почве и в фитотроне аэропонной модификации [11], методом ЭПР спинового зонда. Метод основан на явлении избирательной сорбции стабильного радикала ТЕМПО на частицах каучука в корнях растения. Метод, в противоположность гравиметрическому, является относительным. Поэтому он требует предварительной градуировки по образцам с известным содержанием каучука, которое определялось независимым гравиметрическим методом.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Растения кок-сагыза выращивали 70 сут в условиях почвенного культивирования и 35 сут в аэропонном фитотроне [11]. Образцы корней кок-сагыза высушивали в течение 15–16 ч в сушильном шкафу при температуре 105°C и измельчали. Измельчение проводили в шаровой мельнице в течение 20 мин, после чего размол просеивали через сито с размером отверстий 20 мкм. Просеянный материал составлял 90 вес. % от исходного. Этот прием гарантировал постоянство среднего размера частиц в образцах.

Количество натурального каучука в образцах, использованных для градуировки, определяли гравиметрическим методом.

Для измерения сигнала ЭПР использовали навески порошка корня кок-сагыза массой 7 мг, в который вводили стабильный нитроксильный радикал 2.2.6.6-тетраметилпиперидин-1-оксил (ТЕМПО) (Sigma-Aldrich). Хорошо известно, что радикал ТЕМПО имеет низкую температуру плавления (36°C) и легко переходит в газовую фазу (обладает высокой летучестью) даже при комнатной температуре. Последняя особенность ТЕМПО широко используется в исследованиях десятилетиями [14–16]. Радикал вводили, выдерживая ампулы с образцом в эксикаторе в течение 7 мин рядом с открытым источником ТЕМПО

при комнатной температуре, после чего ампулы запаивались для предотвращения выхода радикала в атмосферу и, следовательно, для предотвращения попадания радикала на внутренние стенки резонатора. В течение месяца изменения в интенсивности ЭПР-сигнала ТЕМПО в запаянных ампулах не зарегистрированы. В не запаянных ампулах интенсивность сигнала уменьшалась в течение суток.

В качестве реперов для градуировки метода использовали образцы, в которых содержание каучука было определено традиционным гравиметрическим способом.

Для получения корректных результатов в каждом эксперименте насыщение радикалом ТЕМПО анализируемых образцов и эталонов проводили одновременно в одних и тех же условиях. Концентрация радикала ТЕМПО в образцах не превышала 1×10^{-5} М.

Спектры ЭПР ТЕМПО регистрировали в X-диапазоне на спектрометре Bruker EMX (Германия). Время корреляции вращения зонда (τ) определяли по формуле [1, 2]:

$$\tau = 6.65 \times 10^{-10} \Delta H^+ \left(\sqrt{I^+/I^-} - 1 \right),$$

где ΔH^+ – ширина низкопольной компоненты спектра, I^+/I^- – отношение интенсивностей низкопольной и высокопольной компонент соответственно. Вторым вариантом расчета времен корреляции вращения ТЕМПО в образцах проводился с помощью программы, описанной в работе Фрида и соавт. [11]. При анализе наилучшее совпадение экспериментального и теоретического спектров наблюдалось при использовании анизотропной скачкообразной модели вращения зонда. Главные значения тензора сверхтонкого взаимодействия (СТВ) и g -тензора ТЕМПО были взяты из работы [12].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Спектры ЭПР ТЕМПО в образцах кок-сагыза аналогичны спектрам этого радикала в эластомерах [1]. Времена корреляции вращения ТЕМПО и его изотропные константы СТВ в кок-сагызе $\tau = 4.1 \times 10^{-10}$ с и $a_N = 15.5$ Гс соответственно, в натуральном каучуке $\tau = 3.2 \times 10^{-10}$ с и $a_N = 15.4$ Гс.

В результате экстракции весь натуральный каучук удаляется из корней кок-сагыза в градуировочных образцах, т.к. в оставшемся материале спектры ЭПР ТЕМПО зарегистрировать не удается. Это означает, что радикал в растении избирательно сорбируется только на частицах каучука.

Близость величин основных параметров спектров и отсутствие сигнала ТЕМПО в кок-сагызе после экстракции каучука позволяют утверждать, что данный радикал локализуется только на кау-

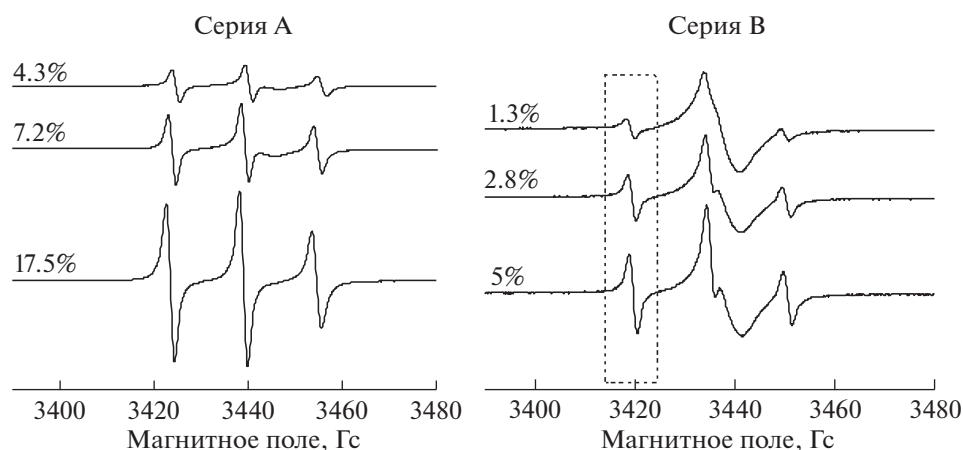


Рис. 1. Спектры ЭПР ТЕМПО в сериях А и В образцов кок-сагыза с различным содержанием натурального каучука. Цифрами указано содержание каучука, определенное гравиметрическим способом.

чуковых доменах и таким образом способен обнаруживать наличие натурального каучука (НК) в растении. Этот факт может служить основой для разработки метода количественного анализа каучука непосредственно в корнях кок-сагыза.

Для проверки этого предположения было выполнено несколько серий экспериментов с разным содержанием каучука в образцах. В качестве примера на рис. 1 приведены спектры ЭПР ТЕМПО двух серий А и В. Спектры представлены в одинаковом масштабе для сравнения.

Отметим, что время корреляции вращения радикала ТЕМПО во всех исследованных образцах кок-сагыза одинаково. Как видно из рис. 1, большему процентному содержанию каучука соответствуют более интенсивные спектры. Для количественного определения содержания каучука в образцах кок-сагыза использовали низкопольную компоненту спектра ТЕМПО, поскольку на нее не накладываются дополнительные нативные сигналы (на рис. 1 в серии В низкопольные компоненты спектров отмечены пунктирной линией).

В качестве сравнительного параметра была выбрана ее интегральная интенсивность a :

$$a = I \times \Delta H^2,$$

где I — интенсивность низкопольной компоненты спектра, ΔH — ее ширина.

Предварительные исследования показали, что одинаковым количествам каучука в разных сериях соответствуют различные интенсивности. Это объясняется тем, что концентрация адсорбированных нитроксильных радикалов в образцах зависит от многих параметров, в частности, от давления паров нитроксильного радикала и времени их нахождения в эксикаторе. Даже небольшая разница (10–20 с) во времени нахождения в эксикаторе сказывается на интенсивности ЭПР-линий. Поэтому содержание каучука определяли, сравнивая величины интегральной интенсивности низкопольной компоненты сигнала ЭПР ТЕМПО в анализируемом и эталонном образцах. В табл. 1 представлены результаты расчета содержания каучука и приведены интегральные интен-

Таблица 1. Содержание каучука в образцах кок-сагыза, определенное гравиметрическим методом и методом спинового зонда по интегральной интенсивности

Образец	Содержание каучука, % (гравиметрический метод)	Интегральная интенсивность, усл. ед.	Содержание каучука, % (ЭПР-метод)
Серия А			
0	0	0	0
1	4.3	3900	3.5
2	7.2	7700	6.8
3	17.5	20 100	17.5
Серия В			
0	0	0	0
1	1.3	4746	1.4
2	2.8	9327	2.7
3	5	16846	5

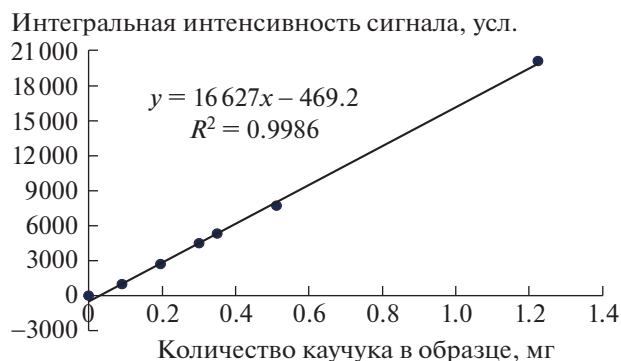


Рис. 2. Зависимость интегральной интенсивности радикала ТЕМПО от количества натурального каучука в 7 мг сухого, диспергированного корня кок-сагыза в сериях А и В.

сивности в спектрах ЭПР ТЕМПО с разным диапазоном концентраций. Эти зависимости хорошо аппроксимируются линейной функцией.

Образцы первый и второй сверху каждой серии (см. табл. 1) получали отбором навески из образца третьего сверху, в котором концентрация каучука была определена гравиметрическим методом. В табл. 1 показано изменение интегральной интенсивности в спектрах ЭПР ТЕМПО при изменении концентрации каучука в пробе. Эта зависимость хорошо аппроксимируется линейной функцией.

В каждой из серий наблюдается линейная зависимость интенсивности от содержания каучука в образце. Однако угловые коэффициенты этих прямых сильно различаются. Их соотношение $\text{tg } \alpha_B / \text{tg } \alpha_A = 2.86$ позволяет привести измерения в обеих сериях к единому масштабу. Интенсивность серии А была приведена к масштабу серии В коэффициентом $k = 2.86$.

Полученные данные дают возможность построить градуировочную прямую (рис. 2).

Корреляционное уравнение линейной зависимости на рис. 2 имеет вид:

$$y = 17074x - 626.69, \quad R^2 = 0.9965.$$

Предложенный метод позволяет анализировать микроколичества (5–30 мг) образца. На основании статистического анализа данных, приведенных на рис. 2, вычислен доверительный интервал 95%-й надежности проведенных измерений, который составил 0.02 мг. Оценка доверительного интервала весового метода, использованного для определения концентрации НК в изученных образцах, дает величину более 2 мг. Таким образом, чувствительность разработанного метода более, чем на 2 десятичных порядка превышает чувствительность весового метода.

В настоящей работе предложен новый метод количественного анализа натурального каучука по интенсивности сигнала ЭПР нитроксильного радикала ТЕМПО, адсорбированного в корнях *Taraxacum kok-saghyz* L.E. Rodin. Метод не требует экстрагирования каучука из растения-каучконоса, обладает высокой точностью, проводится достаточно быстро с весьма малыми массами анализируемого материала. Необходимо отметить, что разработанный метод является относительным и требует предварительной градуировки.

БЛАГОДАРНОСТИ

Спектры ЭПР ТЕМПО регистрировали на спектрометре Bruker EMX в центре коллективного пользования “Новые материалы и технологии” ИБХФ РАН.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследования выполнены при финансовой поддержке РФФИ, проект № 20-316-90032/20.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Вассерман А.М., Коварский А.Л. Спиновые метки и зонды в физикохимии полимеров Бучаченко А.Л. (ред.). АН СССР, Ин-т хим. физики. М.: Наука, 1986. 244 с.
2. Бучаченко А.Л., Вассерман А.М. Стабильные радикалы: электронное строение, реакционная способность и применение. М.: Химия, 1973. 407 с.
3. Salehi M., Cornish K., Bahmankar M., Naghavi M.R. // Industrial Crops and Products. 2021. V. 170. P. 113667. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113667>
4. Америк А.Ю., Мартиросян Л.Ю., Мартиросян В.В., Мартиросян Ю.Ц. // Сельскохозяйственная биология. 2022. Т. 57. № 1. С. 3–26. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2022.1.3>
5. Amerik A.Yu., Martirosyan Yu.Ts., Martirosyan L.Yu., Goldberg V.M., Uteulin K.R., Varfolomeev S.D. // Russ. J. Plant Physiology. 2021. V. 68. № 1. P. 31–45. <https://doi.org/10.1134/S1021443721010039>
6. Black L.T., Hamerstrand G.E., Nakayama F.S., Rasnik B.A. // Rubber Chem. Technol. 1983. V. 56. № 2. P. 367–371. <https://doi.org/10.5254/1.3538132>
7. Salvucci M.E., Coffelt T.A., Cornish K. // Industrial Crops and Products. 2009. V. 30. № 1. P. 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2008.12.006>
8. Pearson C.H., Cornish K., Rath D.J. // Industrial Crops and Products. 2013. V. 43. P. 506–510. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.06.052>
9. Тихонов А.Н. // Соросовский образовательный журнал. 1998. № 1. С. 8–15.
10. Птушенко В.В. // Природа. 2011. № 6. С. 53–59.
11. Мартиросян Ю.Ц., Варфоломеев С.Д., Гольдберг В.М., Мартиросян Л.Ю., Рязанцев Д.М., Миних А.А. Аэропонный фитотрон. Патент РФ 196013U1. 2020.

12. Budil D.E., Lee S., Saxena S., Freed J.H. // J. Magn. Reson., Ser A. 1996. V. 120. P. 155–189.
<https://doi.org/10.1006/jmra.1996.0113>
13. Тимофеев В.П., Мишарин А.Ю., Ткачев Я.В. // Био-физика. 2011. Т. 56. Р. 420–432.
14. Ливанова Н.М., Карпова С.Г., Попов А.А. // Высоко-мол. Соед. Сер. А. 2003. Т. 45. № 3. С. 417–423.
15. Barashkova I.I., Motyakin M.V., Komova N.N., Yasi-na L.L., Potapov E.E., Wasserman A.M. // Appl. Magn. Reson. 2015. V. 46. № 7. P. 1421–1427.
<https://doi.org/10.1007/s00723-015-0709-9>
16. Karpova S.G., Varyan I.A., Olkhov A.A., Popov A.A. // Polymers. 2022. V. 14. P. 4055.
<https://doi.org/10.3390/polym14194055>

A NEW QUANTITATIVE METHOD OF EXPRESS ANALYSIS OF NATURAL RUBBER DIRECTLY IN THE ROOT OF THE RUBBER PLANT BY THE SPIN PROBE EPR METHOD

L. Yu. Martirosyan^{a,b,#}, V. M. Goldberg^a, I. I. Barashkova^c, V. V. Kasparov^a, Yu. Ts. Martirosyan^{a,b}, M. V. Motyakin^{a,c}, S. N. Gaydamaka^d, and Corresponding Member of the RAS S. D. Varfolomeev^{a,d}

^a*N.M. Emanuel Institute of Biochemical Physics of the Russian Academy of Sciences, 119334 Moscow, Russian Federation*

^b*All-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology, 127550 Moscow, Russian Federation*

^c*N.N. Semenov Federal Research Center for Chemical Physics of the Russian Academy of Sciences, 119991 Moscow, Russian Federation*

^d*Lomonosov Moscow State University, Faculty of Chemistry, Department of Chemical Enzymology, 119991 Moscow, Russian Federation*

[#]*E-mail: levon-agro@mail.ru*

In this work, the phenomenon of selective sorption of a stable nitroxyl radical TEMPO on rubber particles in the powder of dried and dispersed root of kok-sagyz was discovered. This feature of the rubber-bearing root material contributed to the development of a new, highly sensitive method of quantitative analysis of rubber by the integral intensity of the EPR TEMPO signal. The main advantages of the proposed method are the speed and the ability to determine the content of rubber directly in the roots of the plant in microquantities (5–30 mg).

Keywords: EPR spectroscopy, natural rubber, spin probe, TEMPO, aeroponic phytotron, *Taraxacum kok-saghyz* L.E. Rodin