

УДК 577.3.0

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ НАТУРАЛЬНОГО КАУЧУКА В РАСТЕНИЯХ *Taraxacum kok-saghyz* E. Rodin МЕТОДОМ ЭПР СПИНОВОГО ЗОНДА

© 2023 г. Л.Ю. Мартиросян*, **, #, В.М. Гольдберг*, И.И. Барашкова**, В.В. Каспаров*, Ю.Ц. Мартиросян*, **, М.В. Мотякин*, ***, С.А. Гайдамака****, С.Д. Варфоломеев*, ****

*Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, ул. Косыгина, 4, Москва, 119334, Россия

**Всероссийский НИИ сельскохозяйственной биотехнологии, Тимирязевская ул., 42, Москва, 127550, Россия

***Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семёнова РАН,
ул. Косыгина, 4, Москва, 119991, Россия

****Химический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова,
Воробьевы горы, 1/11Б, Москва, 119991, Россия

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

Поступила в редакцию 16.01.2023 г.

После доработки 20.02.2023 г.

Принята к публикации 01.03.2023 г.

Предложен метод количественного анализа содержания натурального каучука в кок-сагызе *Taraxacum kok-saghyz* E. Rodin по концентрации нитроксильного радикала ТЕМПО, адсорбированного в образцах корня растения. Метод основан на сравнительном анализе интегральных интенсивностей сигналов ЭПР в эталонном и диагностируемом образцах. Разработанный способ анализа позволяет быстро и с хорошей точностью определять содержание каучука в тканях растений без его выделения из каучук-содержащей биомассы.

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

DOI: 10.31857/S0006302923040130, EDN: KLNBLV

Натуральный каучук является стратегически важным сырьем во всем мире. Его мировое потребление составляет почти 11 миллионов тонн в год, и спрос быстро растет. В настоящее время доля натурального каучука, применяемого в шинной промышленности, составляет примерно 50% от всех используемых видов каучуков [1–3]. В странах Юго-Восточной Азии — монополистов в производстве натурального каучука — существует реальная биологическая опасность поражения пальмы гевеи, которая является единственным промышленным источником натурального каучука. В течение последних лет проводятся исследования по выращиванию альтернативных каучуконосов, в том числе кок-сагыза *Taraxacum kok-saghyz* E. Rodin, в условиях умеренного климата [1, 4]. Однако развитие растений и скорость синтеза каучука в них происходит слишком медленно, чтобы производство было рентабельным. Научно-техническая проблема заключается и в мак-

симальной интенсификации процесса роста растений-каучуконосов, и в существенном увеличении выхода целевых продуктов. Ключевым направлением в решении проблем продуктивности кок-сагыза являются генно-инженерные работы по модификации его генома с целью получения растений достаточно высокой производительности по каучуку [5]. Для ускорения селекционных работ по отбору и размножению экземпляров с высокой скоростью биосинтеза и накопления натурального каучука требуется методика ускоренного анализа содержания каучука в корнях растений.

Разработки методов качественного и количественного анализа натурального каучука имеют давнюю и обширную историю, обусловленную огромным объемом его практического использования [6]. Наибольшее распространение получил гравиметрический метод. Он состоит в экстракции каучука из высушенных и диспергированных частей растения-каучуконоса, выделения каучука из экстракта и взвешивания его после сушки. Публикации на эту тему можно встретить

Сокращение: ТЕМПО — 2,2,6,6-тетраметил-пиперидин-1-оксид.

в 30-х годах XX века [7]. В последующие годы метод был существенно усовершенствован [8–11]. Очевидное достоинство гравиметрического метода заключается в том, что он является абсолютным методом. Существенным недостатком этого метода является длительное время анализа и необходимость иметь значительное количество исходного материала. В последнее время для количественного анализа натурального каучука интенсивно развивается метод инфракрасной спектроскопии в ближнем ИК-диапазоне (русская аббревиатура БИК, английская — NIRS) [12, 13]. Использование переносных БИК-спектрометров оказалось весьма продуктивным для оценки качества каучуконосов при их выращивании на грунте. Метод, однако, обладает невысокой точностью, что требует значительного количества измерений (до сотни) для набора статистики и получения надежного результата. По этим причинам для научных исследований, например, в генно-инженерной области, использование метода ИК-спектроскопии встречает серьезные затруднения. К настоящему времени разработаны спектроскопический метод в ближнем ИК-диапазоне и метод с использованием ЯМР-релаксометра [14]. Однако они требуют значительного времени и объема исследуемого материала и отличаются большой трудоемкостью.

Разработка достаточно быстрого способа определения содержания малых количеств каучука непосредственно в корнях растения значительно упростила бы оценку эффективности различных приемов по интенсификации роста и производительности растений по целевым продуктам. Эта проблема может быть решена с помощью метода ЭПР спинового зонда. Метод спинового зонда широко используется для исследования различных соединений [15–19]. Спектр ЭПР нитроксильного радикала предоставляет информацию о химических реакциях, локальной молекулярной подвижности, полярности, молекулярной организации исследуемой системы. В настоящей работе данный метод был использован для определения количества каучука в корнях кок-сагыза.

Цель настоящей работы — разработка метода количественного микроанализа каучука в корнях кок-сагыза, выращенного *in vitro* и в фитотроне аэропонной модификации [20]. В качестве реперов для градуировки метода использовались образцы корня кок-сагыза, в которых содержание каучука было определено традиционным гравиметрическим способом, — экстракцией из корня. Принципиальное отличие предложенного в настоящей работе метода от гравиметрического заключается в том, что разработанный способ анализа не требует выделения каучука из растения, а проводится непосредственно в образцах высу-

шенного корня — места его биосинтеза и накопления.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Растения кок-сагыза выращивали 70 суток в условиях *in vitro* и 35 суток в аэропонном фитотроне [20]. Образцы корней высушивали при 60°C в сушильном шкафу в течение 16 ч, после чего измельчали на шаровой мельнице KM1 (MLW, ГДР) (3000 об/мин, масса шара 0.2 кг, прилагаемая нагрузка 20–30 Н, регулировка нагрузки за счет подачи тока 173–272 мА) до получения частиц размером примерно 20 мкм. Размер частиц контролировали, просеивая их через сито 20 мкм. Экспериментальным путем установлено, что такая степень дисперсности субстрата необходима и для полноты экстракции и для оптимальной адсорбции стабильного радикала на частицах корня кок-сагыза.

Для проведения гравиметрического анализа каучук экстрагировали из диспергированного сухого корня. В качестве экстрагента использовали хлороформ. Экстракцию проводили в аппарате Сокслета в течение 3 ч при 60°C. Каучук высаживали из экстракта трехкратным избытком этилового спирта, промывали водой, ацетонитрилом и этиловым спиртом. Образцы доводили до постоянного веса в процессе сушки в течение суток при температуре 60°C.

Процентное содержание каучука ($W_{\text{кауч}}$, %) в сухом корне определяли по формуле

$$W_{\text{кауч}} = \left(\frac{V_{\text{общ}} \times M_{\text{кауч}}}{V_{\text{аликв}} \times M_{\text{корня}}} \right) \times 100\%,$$

где $V_{\text{общ}}$ — общий объем сконцентрированного хлороформенного экстракта (мл), $V_{\text{аликв}}$ — объем аликвоты хлороформенного экстракта (мл), $M_{\text{кауч}}$ — масса каучука в пробирке (г), $M_{\text{корня}}$ — вес образца сухого корня, взятого на экстракцию (г).

Стабильный нитроксильный радикал 2,2,6,6-тетраметил-пиперидин-1-оксил (ТЕМПО) (Sigma-Aldrich, США) использовали в качестве спинового зонда. В ампулах для ЭПР-спектроскопии взвешивали по 7 мг порошкообразного корня кок-сагыза. ТЕМПО вводили из газовой фазы при комнатной температуре. Для этого ампулы помещали в эксикатор объемом 200 мл, в котором находилось примерно 7 мг ТЕМПО. Оптимальное время экспозиции, обеспечивающее получение наиболее точных и хорошо воспроизводимых результатов, составляло 7 мин, при этом концентрация радикала ТЕМПО в образцах не превышала $1 \cdot 10^{-5}$ М. После введения радикала ампулы с образцами запаивали.

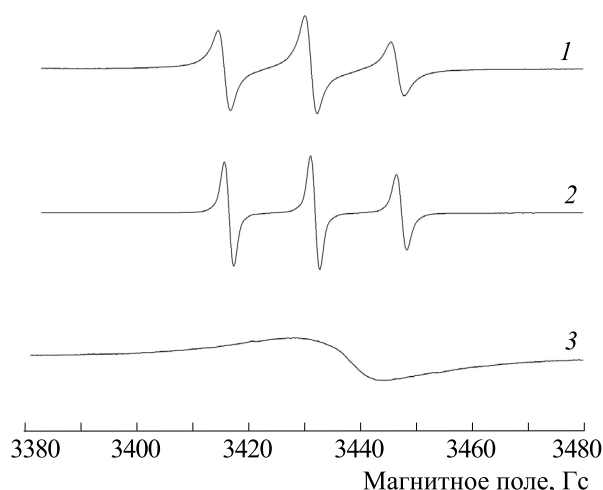


Рис. 1. Спектры ЭПР нитроксильного радикала в кок-сагызе (спектр 1), в натуральном каучуке (спектр 2) и инулине (спектр 3). Температура 20°C.

Спектры ЭПР ТЕМПО регистрировали на спектрометре EMX (Bruker, Германия) в Центре коллективного пользования «Новые материалы и технологии» ИБХФ РАН. Значение микроволновой мощности в резонаторе составляло 2 мВт, амплитуда модуляции — 0.5 Гс. Для определения магнитно-резонансных параметров спектров ЭПР использовали программы WINEPR и SIMPHONIA (Bruker, Германия). Время корреляции вращения τ зонда рассчитывали по следующей формуле [16]:

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

где ΔH^+ — ширина низкочастотной компоненты спектра, I^+/I^- — отношение интенсивностей низкочастотной и высокочастотной компонент соответственно. Ширину линии и константы сверхтонкого взаимодействия определяли непосредственно из спектров ЭПР радикала.

Для получения корректных результатов в каждом эксперименте насыщение радикалом ТЕМПО анализируемых образцов и эталонов проводили одновременно в одних и тех же условиях, а спектры ЭПР всех образцов записывали с одинаковыми параметрами.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Прежде всего отметим, что исследованные образцы корней кок-сагыза содержат собственный нативный сигнал ЭПР: синглет с g -фактором 2.0044 ± 0.0001 и шириной линии $\Delta H = 7.0 \pm 0.5$ Гс. Данный сигнал обусловлен, по-видимому, радикалами, возникающими в растениях в результате биохимических реакций. Как будет показано ни-

же, именно этот синглет накладывается на центральную компоненту ЭПР-сигнала нитроксильного радикала и не позволяет проводить анализ по интегральной интенсивности всего спектра.

Спектр ЭПР ТЕМПО в кок-сагызе представлен на рис. 1 (спектр 1). Аналогичные спектры были зарегистрированы для нитроксильного радикала, введенного в эластомеры [15]. На рис. 1 также представлен спектр ТЕМПО в натуральном каучуке (спектр 2). Времена корреляции вращения ТЕМПО и его изотропные константы сверхтонкого взаимодействия в кок-сагызе составляют $\tau = 3.0 \cdot 10^{-10}$ с и $a_N = 15.5$ Гс, в натуральном каучуке $\tau = 2.0 \cdot 10^{-10}$ с и $a_N = 15.4$ Гс. Спектр ЭПР нитроксильного радикала в инулине — втором основном компоненте растения — представляет собой широкий синглет (рис. 1, спектр 3). Очевидно, что ТЕМПО не распределяется в среде инулина. Широкий синглет возникает вследствие высоких локальных концентраций радикала на поверхности этого соединения.

Близость величин основных параметров нитроксильных радикалов (время корреляции и константа сверхтонкого взаимодействия и отсутствие триплета в инулине) дает возможность предполагать, что в кок-сагызе ТЕМПО локализуется исключительно в каучуковых доменах, и таким образом позволяет их обнаружить. Факт избирательной сорбции радикала ТЕМПО на частицах каучука подтверждается еще и тем, что после удаления каучука из образца биомассы экстракцией неполярным растворителем в оставшемся материале триплетные спектры ЭПР вновь введенного ТЕМПО не регистрируются.

Используя данную особенность локализации нитроксильного радикала в кок-сагызе, мы предлагаем метод анализа количественного содержания каучука в этом растении: чем больше каучуковых областей содержит образец, тем больше мест для локализации нитроксильного радикала, тем выше его концентрация в образце и, соответственно, тем больше интенсивность сигнала ЭПР. В данном рассмотрении предположено, что распределение каучуковых доменов на поверхности точно такое же, как и в объеме образца.

Для проверки предложенного метода анализа были выполнены несколько серий экспериментов с разным содержанием каучука в образцах. В качестве иллюстрации на рис. 2 сопоставлены спектры ЭПР ТЕМПО в образцах, полученных из высушенной измельченной ткани корня растения кок-сагыз в двух сериях «А» и «В». Серии выполнены в разное время и с разным шагом по процентному содержанию каучука в образцах. Процентное содержание каучука было определено с помощью экстракции органическими растворителями (гравиметрический метод).

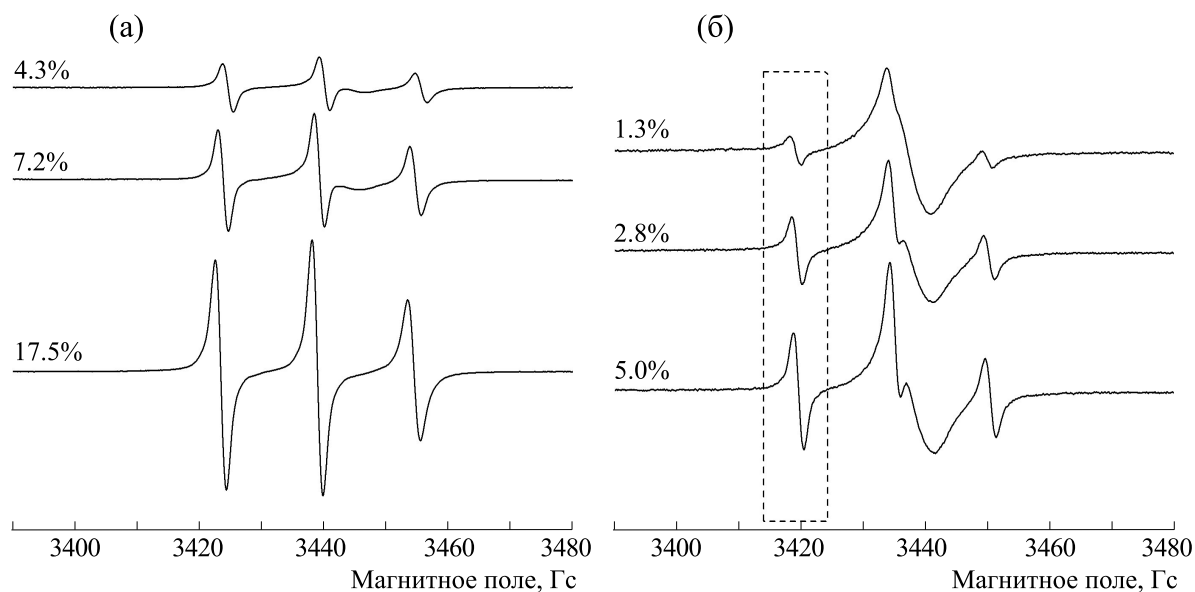


Рис. 2. Спектры ЭПР нитроксильного радикала ТЕМПО, введенного в серии «А» и «В» образцов кок-сагыза с различным содержанием натурального каучука. Цифрами указано процентное содержание каучука в образце, определенное гравиметрическим способом.

Спектры на рис. 2 представлены в одинаковом масштабе для сравнения. Отметим, что время корреляции вращения нитроксильного радикала во всех исследованных образцах кок-сагыза одинаково. Как видно из этих спектров, 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, заметно искажающие спектр при малых концентрациях каучука

(серия «В»). На рис. 2 в серии «В» низкопольные компоненты спектров обведены пунктиром. В качестве сравнительного параметра была выбрана ее интегральная интенсивность I_{In} :

$$I_{\text{In}} = I \cdot \Delta H^2,$$

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

Содержание каучука определяли, сравнивая величины интегральной интенсивности низкопольной компоненты сигнала ЭПР ТЕМПО в анализируемом образце и в эталоне. В табл. 1

Таблица 1. Процентное содержание каучука в образцах кок-сагыза, определенное гравиметрическим методом и методом спинового зонда по интенсивности сигнала

№ образца	Каучук, % (гравиметрический метод)	Интенсивность I_{In} , усл. ед.	Каучук, % (ЭПР-метод)
Серия А			
1	4.3	3900	3.5
2	7.2	7700	6.8
3	17.5	20100	17.5*
Серия В			
1	1.3	4746	1.4
2	2.8	9327	2.7
3	5	16846	5*

* – Процентное содержание каучука, относительно которого рассчитывались значения в других образцах в ЭПР методе.

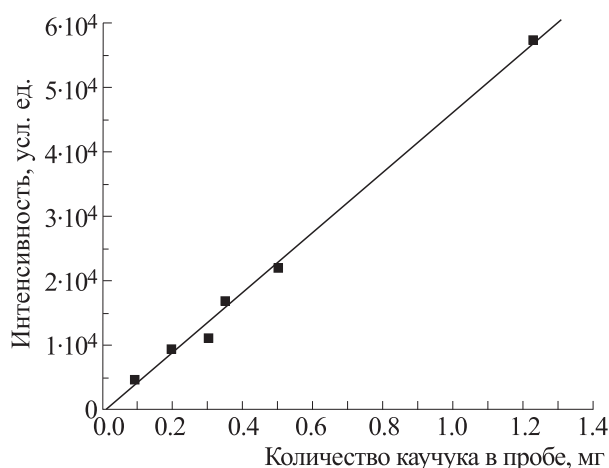


Рис. 3. Зависимость интегральной интенсивности сигнала ЭПР ТЕМПО от количества натурального каучука в образцах объединенной («А» + «В») серии.

представлены результаты расчета, а также показано изменение интегральной интенсивности в спектрах ЭПР ТЕМПО для двух серий при изменении концентрации каучука в образце.

В каждой из представленных серий измерения проводили в одном цикле работы, но показания самих серий снимали в разных соответствующих циклах. Следует отметить, 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 небольшие изменения в данных параметрах сказываются на интенсивности ЭПР-линий. Поскольку внутри серий отношение интенсивность/масса каучука сохраняется постоянной, то результаты измерения интенсивностей в обеих сериях могут быть приведены к единому масштабу (рис. 3). Интенсивность серии «А» была приведена к масштабу серии «В» с использованием вычисленного коэффициента $k = 2.86$ (отношение угловых коэффициентов линейных зависимостей серий «А» и «В»).

На рис. 3 показана зависимость приведенной интенсивности сигнала ЭПР от количества каучука в образцах для обеих серий. Как видно из рисунка, интегральная интенсивность прямо пропорциональна количеству каучука, по крайней мере до 17.5%, т.е. в тех пределах, в которых он содержался в исследованных образцах кок-сагыза. Расчет среднеквадратичного отклонения в представленной зависимости дает величину 0.01 мг. Это означает, что ширина доверительного интервала 95% надежности результатов составляет ± 0.02 мг. Отметим достаточно хорошую точность

и чувствительность предложенного метода количественного анализа натурального каучука. Так, если в сухом корне концентрация натурального каучука составляет 1%, то в 7 мг корня будет содержаться 0.07 мг каучука. Таким образом, даже такое малое количество каучука может быть определено предлагаемым методом.

ВЫВОДЫ

Предложен метод количественного анализа натурального каучука без его экстрагирования из образца *Taraxacum kok-saghyz* L. E. Rodin по интегральной интенсивности сигнала ЭПР нитроксильного радикала ТЕМПО, адсорбированного на частицах высушенных корней растения. Использование данного метода позволяет ускорить работы по отбору и размножению экземпляров с высокой скоростью биосинтеза и накопления натурального каучука.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследования выполнены при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, проект № 20-316-90032\20.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания исследований с участием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Salehi M., et al., *Industrial Crops and Products*, **170**, 113667 (2021).
2. А. Ю. Америк и др., *С.-х. биология*, **57** (1), 3 (2022).
3. Б. Р. Кулуев, Р. Р. Гарафутдинов, И. В. Максимов и др., *Биомика*, 2015, Том 7, № 4, С. 224-283.
4. *Goodyear to develop domestic source of natural rubber*, <https://www.prnewswire.com/news-releases/goodyear-to-develop-domestic-source-of-natural-rubber-301519783.html>
5. A. Y. Amerik, et al., *Rus. J. Plant Physiol.*, **68** (1), 31 (2021).
6. M. Salehi, et al., *Industrial Crops and Products*, **178**, 114562 (2022).
7. А. А. Прокофьев, *Анализ каучуконосных растений*, под ред. А. А. Ничипоровича (Всесоюз. науч.-иссл. ин-т каучука и гуттаперчи, Глав. ред. хим. лит-ры, Москва, 1936), т. 1.
8. L. T. Black, et al., *Rubber Chemistry and Technology*, **56** (2), 367 (1983).
9. M. E. Salvucci, T. A. Coffelt, and K. Cornish, *Industrial Crops and Products*, **30** (1), 9 (2009).

10. C. H. Pearson, K. Cornish, and D. J. Rath, *Industrial crops and products*, **43**, 506 (2013).
11. S. Azadi, et al., *Physiol. Mol. Biol. Plants*, **26** (10) 2047 (2020).
12. K. Cornish, M. D. Myers, and S. S. Kelley, *Industrial Crops and Products*, **19** (3), 283 (2004).
13. M. Taurines, et al., *Industrial Crops and Products*, **134**, 177 (2019).
14. M. C. Davis and Y. Huang, *Methods for quantifying rubber content in a plant with NMR*: пат. 10578567 США (2020).
15. А. М. Вассерман и А. Л. Коварский, *Спиновые метки и зонды в физикохимии полимеров* (Наука, М., 1986).
16. А. Н. Тихонов, *Соросовский образоват. журн.*, № 1, 8 (1998).
17. I. I. Barashkova, et al., *Appl. Magn. Resonance*, **46** (12), 1421 (2015).
18. M. A. Uddin, et al., *J. Polymer Sci.*, **58** (14), 1924 (2020).
19. В. В. Птушенко, *Природа*, № 6, 53 (2011).
20. Ю. Ц. Мартиросян и др., *Аэропонный фитотрон*. Патент № RU 196013 U1 (2020).

Quantitative Determination of Natural Rubber Content of *Taraxacum kok-saghyz* E. Rodin Plants Using Spin Probe Method of Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy

L.Yu. Martirosyan^{*, **}, V.M. Goldberg^{*}, I.I. Barashkova^{}, V.V. Kasparov^{*}, Yu.Ts. Martirosyan^{*, **},
M.V. Motyakin^{*, ***}, S.N. Gaydamaka^{****}, and S.D. Varfolomeev^{*, ****}**

^{*}*Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Kosygina 4, Moscow, 119334 Russia*

^{**}*All-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology, Timiryazevskaya ul. 42, Moscow, 127550 Russia*

^{***}*Semenov Federal Research Center for Chemical Physics, Russian Academy of Sciences,
ul. Kosygina 4, Moscow, 119991 Russia*

^{****}*Chemistry Department, Lomonosov Moscow State University, Vorobyovy Gory 1/11B, Moscow, 119991 Russia*

The paper presents a method to carry out a quantitative analysis of the content of natural rubber of *Taraxacum kok-saghyz* E. Rodin by measuring adsorption of the nitroxide radical TEMPO in root preparations of the said plant. The method is based on a comparison between the integrated intensity of an EPR signal of interest and a standard. The developed method of analysis makes it possible to quickly and with good accuracy determine the content of rubber of plant tissues without its extraction from rubber-containing biomass.

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