

Влияние экологических условий на молекулярную структуру лекарственных растений одуванчика (*Taraxacum officinale* Wigg.) и цикория обыкновенного (*Cichorium intybus* L.)

© 2014. И. Х. Юсупов, к.ф.-м.н., в.н.с.,

А. Д. Бахдавлатов, соискатель, н.с., Р. М. Марупов, д.т.н., г.н.с.,
Физико-технический институт им. С. У. Умарова АН Республики Таджикистан,
e-mail: usupizat@yandex.ru

Целью данной работы явилось, изучение влияния экологических условий на структуру молекул в составе различных дикорастущих лекарственных растений: одуванчика (*Taraxacum officinale* Wigg.) и цикория обыкновенного (*Cichorium intybus* L.), произрастающих в различных регионах Таджикистана.

Разработана методика исследования химической модификации молекул в составе дикорастущих лекарственных растений одуванчика и цикория методом спиновой метки. Изучена стабильность и молекулярная подвижность нитроксильного радикала, введенного в матрицу одуванчика и цикория. Установлено, что при комнатной температуре в спектрах ЭПР наблюдается заторможенность вращательной подвижности спиновой метки со временем корреляции $\tau_c \leq 10^{-7}$ с, что свидетельствует об изменении системы меж- и внутримолекулярных водородных связей в области присоединения метки.

Изменение параметров спектров ЭПР и вращательной подвижности спиновых меток при комнатной температуре зависит от экологических условий места произрастания растений.

The aim of this paper is to study the impact of environmental conditions on the molecular structure of a variety of wild medicinal plants dandelion (*Taraxacum officinale* Wigg.) and chicory ordinary (*Cichorium intybus* L.) growing in various regions of Tajikistan.

The method of chemical modification of the wild medicinal plants, dandelion and chicory, was developed with the help of the method of spin labels. We studied the stability and molecular mobility of nitroxyl radical added in the matrix of dandelion and chicory. It is established, that at room temperature in EPR spectra slowing rotational mobility of the spin labels with correlation time is $c < 10^{-7}$ s, was observed which change in the system of inter- and intramolecular hydrogen bonds in label attachment suggests a point.

The change of the EPR spectra parameters and of rotational mobility of the spin labels at room temperature depends on environmental conditions in the place of plants growth.

Ключевые слова: спиновая метка, одуванчик, цикорий, спектры ЭПР

Keywords: a spin label, a chicory, dandelion, spectra EPR

Лекарственные растения в настоящее время являются ценным средством для лечения и профилактики хронических заболеваний. Интерес к лекарственным растениям объясняется повышенным стремлением людей быть ближе к природе, избегать отрицательного воздействия синтетических средств. В то же время преимуществом большинства растений является их малая токсичность. Кроме того, считается, что более эффективными являются те лекарственные растения, которые произрастают в экологически чистых условиях [1].

Лекарственное растительное сырьё – это экологически чистые и правильно высушенные, реже свежесобранные лекарственные растения (или их части), используемые для приготовления лекарственных средств [2].

В работах [3–11] показано, что условия произрастания лекарственных растений могут

влиять как на биосинтез, так и молекулярное состояние формирования физико-химической структуры веществ, входящих в состав растения, например, на формирование системы меж- и внутримолекулярных взаимодействий.

В частности, было сделано заключение о том, что лекарственные свойства растений обусловлены накоплением свободных радикалов в процессе биосинтеза, что во многом зависит от особенностей экологических условий места произрастания.

Поэтому важно было исследовать методом ЭПР-спектроскопии молекулярную структуру листьев и лепестков цветков растений, обитающих в условиях постоянного воздействия природно-техногенного радиационного фона, то есть изотопа Pb-210, который является продуктом распада природного урана, и техногенного изотопа Cs-137. По данным [5], названные

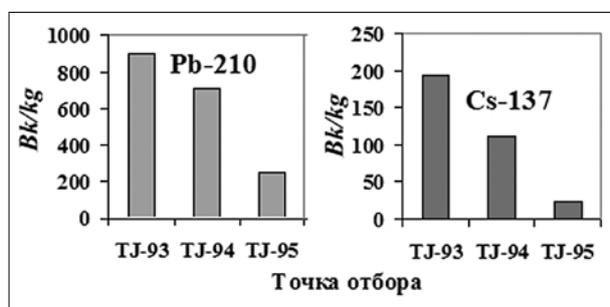


Рис. 1. Распределение дозы радиации изотопов Pb-210 и Cs-137 в местах сбора образцов: TJ-93 (Малый Игизак); TJ-94 (Большой Игизак); TJ-95 (Игизак), (TJ-93-95 – условные обозначения места сбора).

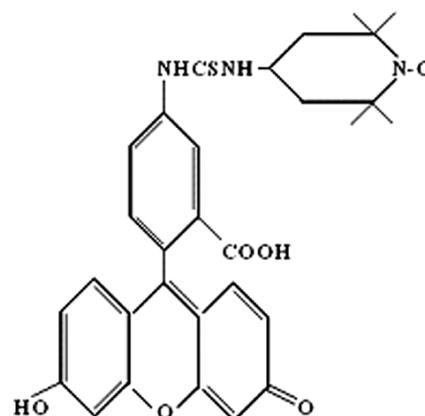
изотопы в значительных количествах аккумулярованы в ущелье реки Сиёма (приток реки Варзоб), примерно в 50 км от г. Душанбе (рис. 1).

При изучении структуры жидкостей, полимеров и биологических структур используют различные физико-химические методы. Однако многие методы не дают подробной информации о динамической структуре молекул, изменении конформационных переходов, содержании различных дефектов и микропустот. При получении информации о динамической структуре молекул широкое применение нашёл метод спиновых меток на основе стабильных нитроксильных радикалов [12–20]. Спиновые метки играют роль молекулярных датчиков и дают уникальную информацию о различных динамических изменениях исследуемой системы.

В данной работе разработана методика исследования химической модификации дикорастущих лекарственных растений одуванчика и цикория по спиновой метке, также методом ЭПР изучена подвижность спиновой метки модифицированных исследуемых объектов при комнатной температуре.

Образцы одуванчика были собраны во время цветения в местах произрастания: вблизи и вдали от автомагистрали (г. Душанбе), а также на разных высотах над уровнем моря и в различных условиях постоянного воздействия природно-техногенного радиационного фона в бассейне реки Сиёма (Варзобское ущелье, Республика Таджикистан), в местах слияния с притоком Малый Игизак, Большой Игизак и Игизак. Образцы цикория были собраны на Памире: Хорогский, Дарвазский, Шугнанский районы. Образцы тщательно очищали от сопутствующих веществ, промывали обычной и дистиллированной водой, экстрагированным эфиром, спиртом и высушивали при комнатной температуре. В качестве спиновой метки

использовали стабильный нитроксильный радикал (I), имеющий следующую структурную формулу:



Исследуемые образцы химически модифицировали по гидроксильным группам спиновой меткой (I) следующим образом: навеску образца 25 мг помещали в 0,9 мл раствора фосфатного буфера (pH=9-10) с добавлением 0,1 мл этанолового раствора спиновой метки (I) с концентрацией $4 \cdot 10^{-2}$ моль/л, после чего концентрация радикала (I) в инкубационной среде достигала $4 \cdot 10^{-3}$ моль/л. Смесь выдерживали в течение 5 суток при комнатной температуре, затем нагревали в течение 2 ч. при 60–70°C. Модифицированные образцы отмывали от непрореагировавшего радикала в следующей последовательности: вода – этанол, вода – этанол и вода до получения неизменного сигнала ЭПР. После многократного промывания образцы высушивали при комнатной температуре [13, 14, 17, 18]. Спектры ЭПР регистрировали на радиоспектрометре РЭ-1306 в стандартных молибденовых ампулах с внутренним диаметром 3,0 мм, в которые помещали по 25 мг спин-меченого образца. Спектры ЭПР записывали при следующих условиях: затухание СВЧ мощности 5 Дб, амплитуда развёртки магнитного поля 200 Э, скорость развёртки магнитного поля 40 Э/мин, постоянное время развёртки 0,3 с и амплитуда ВЧ модуляции 100 кГц при комнатной температуре. Спектры приведены на рисунках 2–4, а характеристики образцов спин-меченых одуванчика и цикория представлены в таблице. По форме спектра регистрируемого сигнала поглощения можно оценить время корреляции вращательных движений τ_c радикала в диапазоне $5 \cdot 10^{-11}$ – 10^{-7} с [12–14, 17, 18].

Для определения времени корреляции вращения спиновой метки радикала (I) в этаноловом растворе (рис. 2а) использовали формулу [12]:

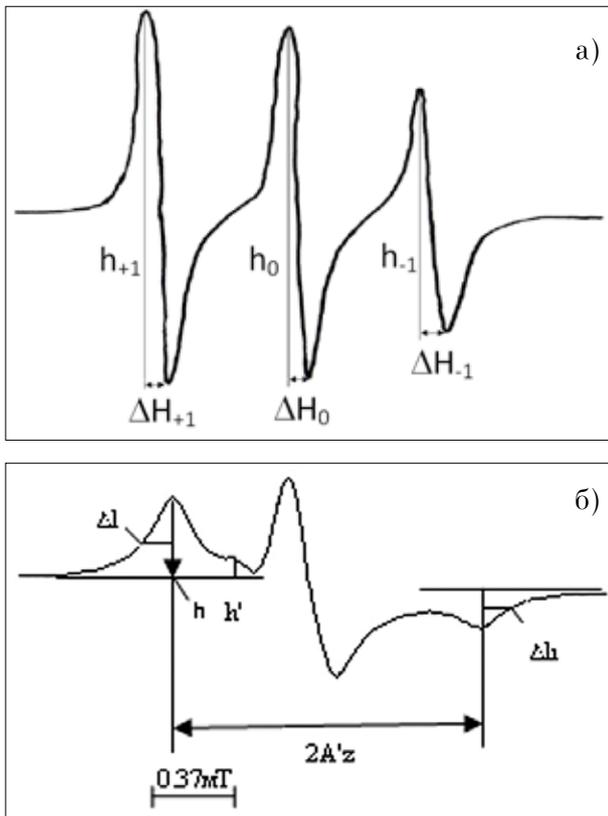


Рис. 2. ЭПР-спектры нитроксильного свободного радикала (I) в этаноловом растворе с концентрацией $4 \cdot 10^{-3}$ моль/л – (а) и спин-меченого листа одуванчика при комнатной температуре – (б).

$$\nu = \frac{1}{\tau_c} = \frac{1,2 \cdot 10^{10}}{\left(\sqrt{\frac{h_{+1}}{h_{-1}}} - 1 \right) \Delta H_0} \text{сек}^{-1},$$

где ΔH_0 – ширина центрального компонента в гауссах; h_0 , h_{+1} и h_{-1} – интенсивность компонентов спектра с $M=0, +1$ и -1 , $\nu = 1/\tau$ – величина, условно называемая «частотой вращения» радикала.

Нами в работах [17–20] исследована молекулярная динамика хлопковых волокон методом спиновых меток. Так как по происхождению основы химической структуры хлопковые волокна и лекарственные растения очень близки и в основном состоят из целлюлозы, то эти результаты при сравнении дополняют друг друга.

Согласно литературным данным [21], цикорий содержит инулин в количестве от 11 до 65% и его молекулярная структура состоит из $(C_6H_{12}O_5)_n$, содержащих большое количество ОН-групп.

Поэтому можно утверждать, что радикал (I) ковалентно взаимодействует с гидрок-

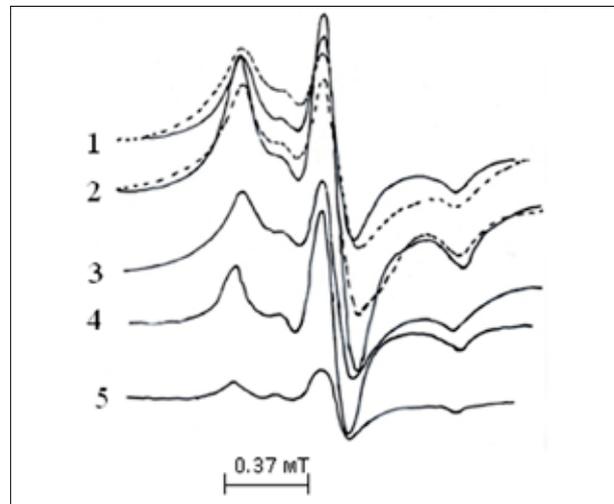


Рис. 3. ЭПР-спектры спин-меченых образцов одуванчика в зависимости от места произрастания и высоты над уровнем моря: 1 – вблизи от автомагистрали (Душанбе), 780 м над ур. м.: листья (сплошная линия), лепестки цветков (пунктирная линия); 2 – вдали от автомагистрали (Душанбе): листья (сплошная линия), лепестки цветков (пунктирная линия); 3 – Игизак, 2130 м над ур. м. листья; 4 – Большой Игизак, 2180 м над ур. м. листья и 5 – Малый Игизак, 2477 м над ур. м. листья.

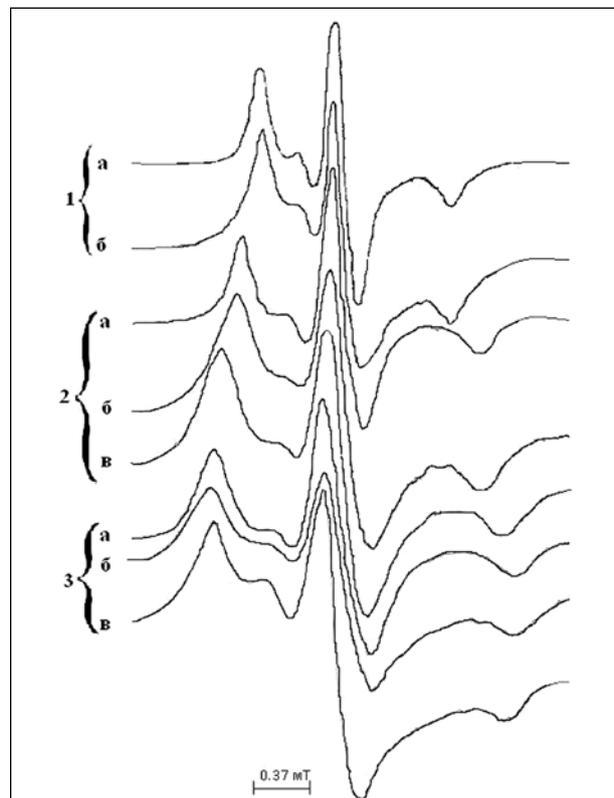


Рис. 4. ЭПР-спектры спин-меченых образцов цикория в зависимости от места произрастания и высоты над уровнем моря: 1 – Дарваз, 2160 м над ур.м.: а – листья, б – стебли; 2 – Хорог, 2200 м над ур.м.: а – листья, б – стебли, в – корни; 3 – Шугнан 2800 м над ур.м.: а – листья, б – стебли, в – корни.

Таблица

Параметры спектров ЭПР спин-меченых образцов одуванчика и цикория в зависимости от высоты над уровнем моря и места произрастания при комнатной температуре

Название образцов	Место произрастания, высота над ур.м. (м)	Части растений	Δl Гс	Δh Гс	ΔH_0 Гс	$2A'z$ Гс	h'/h
Одуванчик	Вблизи от автомагистрали (Душанбе), 780	листья	12	9,6	16,8	120	12
		лепестки цветков	15,6	18	18	120	24
	Вдали от автомагистрали (Душанбе), 780	листья	10,8	10,8	19,2	126	20,4
		лепестки цветков	12	15,6	19,2	122,4	26,4
	Игизак, 2130	листья	12	13,2	15,6	120	21,6
	Большой Игизак, 2180	листья	9,6	9,6	14,6	124,8	12
Малый Игизак, 2477	листья	9,6	9,6	15,6	123,6	2,4	
Цикорий	Дарваз, 2160	листья	10,8	9,6	19,2	168	18
		стебли	24	12	43,2	273,6	34,8
	Хорог, 2200	листья	7,2	8,4	15,6	120	31,2
		стебли	15,6	15,6	24	166,8	39,6
		корни	15,6	14,2	30	222	14,4
	Шугнан, 2800	листья	12	12	30	216	9,6
стебли		21,6	25,2	31,2	213,6	51,6	
корни		16,8	19,2	31,2	213,6	56,4	

сильной группой структуры лекарственных растений.

Об этом свидетельствует вид спектра ЭПР (рис. 2б), соответствующий заторможенному вращению радикала (с частотой вращения $\nu \approx 10^8 \text{ c}^{-1}$), а также практическая независимость спектра ЭПР от многократных промывок. В таблице приведены следующие параметры спектров ЭПР спин-меченых изученных образцов при комнатной температуре: $2A'z$ – расстояние между внешними экстремумами; Δl – полуширина линий в низком поле; Δh – полуширина линий в высоком поле; h'/h – отношение амплитуд низкочастотных линий слабо и сильно иммобилизованных меток и ΔH_0 – ширина линии центрального компонента спектра ЭПР.

Как видно из рисунка 2 (а), в спектрах ЭПР наблюдается свободная вращательная подвижность спиновой метки со временем корреляции $\tau_c \leq 10^{-7} \text{ c}$. Спектры ЭПР спин-меченых образцов (рис. 2б, 3 и 4) при комнатной температуре представляют собой суперпозиции двух сигналов и сильную заторможенность вращательной подвижности спиновой метки со временем корреляции $\tau_c \leq 10^{-7} \text{ c}$, что характеризует неоднородность аморфных областей в исследуемых образцах, в которые проникает метка, а также свидетельствует об изменении системы меж- и внутримолекулярных однородных связей в области присоединения метки.

Как видно из таблицы, параметры Δl и Δh в спектрах ЭПР (рис. 2 и 3), характеризующие

медленно вращающийся радикал, изменяются незначительно, а параметр h'/h является очень чувствительным, изменяется интенсивно и характеризует о появлении нового компонента сигнала ЭПР (рис. 4), относящегося к быстро вращающемуся радикалу, что свидетельствует о появлении сверхтонкой структуры в спектрах исследуемых образцов.

Параметры ΔH_0 и $2A'z$ для образцов одуванчика практически не изменяются, а если изменяются, то очень незначительно (табл. и рис. 3), для цикория в зависимости от составных частей эти же параметры изменяются на много больше (рис. 4). Например, для стебля цикория из Дарваза они составляют 43,2 Гс и 273,6 Гс соответственно, то есть происходит расширение линий спектров ЭПР, которое свидетельствует о значительном изменении вращательной подвижности спиновых меток, введенных в структурную матрицу цикория. Эти изменения хорошо видны на рисунке 4 в спектрах ЭПР.

Таким образом, на основании полученных экспериментальных данных можно заключить, что:

- разработана методика исследования химической модификации дикорастущих лекарственных растений одуванчика и цикория методом спиновой метки;
- радикал (I) ковалентно взаимодействует с гидроксильными группами образцов одуванчика и цикория;
- методом спиновой метки изучена стабильность и молекулярная подвижность

нитроксильной спиновой метки, введённой в матрицу одуванчика и цикория;

– установлено, что при комнатной температуре в спектрах ЭПР наблюдается заторможенность вращательной подвижности спиновой метки со временем корреляции $\tau_c \leq 10^{-7}$ с, которая свидетельствует об изменении системы меж- и внутримолекулярных водородных связей в области присоединения метки;

– параметры спектров ЭПР и вращательной подвижности спиновых меток при комнатной температуре зависят от высоты над уровнем моря и экологических условий места произрастания образцов.

Литература

1. Валягина Е.Т. Лекарственные растения России. СПб.: Издатель, 1997. 284 с.
2. Корсун У.Ф. Фитотерапевтический оздоровительный комплекс. М.: Фитосан-Интер, 1994. 31 с.
3. Шукуров Т., Хаитова З.М., Джураев Ан.А., Марупов Р. Формирование водородных связей в одуванчике лекарственном (*Taraxacum officinale* Wigg.) в зависимости от места произрастания // ДАН РТ. 2007. Т. 50. № 4, С. 334–339.
4. Шукуров Т., Джураев А.А., Хаитова З.М., Джураев Ан.А., Марупов Р. Спектроскопические свойства одуванчика лекарственного (*Taraxacum officinale* Wigg.) в средней ИК-области частот // ДАН РТ. 2007. Т. 50. №7. С. 607–612.
5. Shukurov T., Juraev A.A., Khaitova Z.M., Juraev An.A., Marupov R. – Health Phys., 2008, V.95, №1, P. S.18. (Supplement to the Health Physics Society Journal), USA.
6. Шукуров Т., Джураев А.А., Хаитова З.М., Джураев Ан.А., Марупов Р. Спектроскопические свойства листьев одуванчика лекарственного (*Taraxacum officinale* Wigg.) в зависимости от места произрастания // ДАН РТ. 2008. Т. 51. № 3. С. 193–199.
7. Шукуров Т., Джураев А.А., Хаитова З.М., Джураев Ан.А., Марупов Р. Инфракрасные спектры лепестков цветков одуванчика лекарственного (*Taraxacum officinale* Wigg.) в зависимости от места произрастания // ДАН РТ. 2008. Т. 51. № 5. С. 351–355.
8. Шукуров Т., Рахматова З.М., Марупов Р. Спектроскопические свойства дикорастущего лекарственного растения цикория обыкновенного (*Cichorium intybus* L.) // ДАН РТ. 2009. Т. 52. № 6. С. 449–455.
9. Юсупов И.Х., Шукуров Т., Марупов Р. Изучение ЭПР-спектроскопических свойств дикорастущей радио-

лы холодной (*Rhodiola gelida* Schenk) в зависимости от места произрастания // ДАН РТ. 2011. Т. 54. № 5. С. 371–375.

10. Марупов Р., Юсупов И.Х., Шукуров Т., Бахдавлатов А.Д. Изучение ЭПР-спектроскопических свойств составных частей одуванчика лекарственного (*Taraxacum officinale* Wigg.) в зависимости от места его произрастания // ДАН РТ. 2012. Т. 55. № 1. С. 30–34.

11. Юсупов И.Х., Шукуров Т., Давлатмамадова С.Ш., Бахдавлатов А.Д., Марупов Р. Изучение ЭПР-спектроскопических свойств составных частей дикорастущего лекарственного растения цикория обыкновенного (*Cichorium intybus* L.) // ДАН РТ. 2012. Т. 55. № 3. С. 354–358.

12. Лихтенштейн Г.И. Метод спиновых меток в молекулярной биологии. М.: Наука, 1974. 256 с.

13. Бободжанов П.Х., Лихтенштейн Г.И. Исследование молекулярной динамики целлюлозы методом ЭПР // ДАН Тадж ССР. 1974. Т. 17. № 10. С. 34–37.

14. Кольтовер В.К. Биофизика // Итоги науки и техники. Т. 11. М.: ВИНТИ, 1979. С. 10–18.

15. Likhtenshtein G.I., Yamauchi J., Nakatsuji S., Smirnov A., Tamura R. Nitroxides: Application in Chemistry, Biomedicine, and Materials Science WILEY-VCH. Weinheim. 2008.

16. Likhtenshtein G.I. Stilbenes: Application in Chemistry. (Life Science and Material Science WILEY-VCH. Weinheim. 2009.

17. Марупов Р., Юсупов И.Х., Бободжанов П.Х., Фролов Е.Н., Лихтенштейн Г.И. Исследование температурной стабильности растительных волокон методом спиновых меток // Биофизика. 1979. Т. 24. № 3. С. 519–523.

18. Юсупов И.Х., Бободжанов П.Х., Марупов Р., Анциферова Л.И., Кольтовер В.К., Лихтенштейн Г.И. Исследование молекулярной динамики хлопкового волокна методом спиновых меток // ВМС. Сер. А, 1984. Т. 26. № 2. С. 369–374.

19. Куликов А.В., Юсупов И.Х., Бабаджанов П.Х., Марупов Р., Лихтенштейн Г.И. Исследование надмолекулярной структуры хлопковой целлюлозы методом спиновых меток // Журнал прикладной спектроскопии. 1991. Т. 55. № 6. С. 961–965.

20. Бабаджанов П.Х., Юсупов И.Х., Марупов Р. Исследование молекулярной динамики микрокристаллической целлюлозы методом ЭПР // Журнал прикладной спектроскопии. 1992. Т. 56. № 3. С. 424–428.

21. Каррер П. Курс органической химии. Л.: Госнаучтехиздат хим. литер. 1960. С. 457–458.