

Российский химико-технологический университет имени Д. И. Менделеева

На правах рукописи

Шхйьо Мьинт У

Реакционная способность экстрактов донника, багульника, муррайи и некоторых кумаринов в их составе

02.00.04 – физическая химия

Диссертация
на соискание учёной степени
кандидата химических наук

Научный руководитель
Антропова Ирина Геннадьевна
кандидат химических наук

Москва – 2017

Введение.....	6
Глава I. Литературный обзор.....	8
1.1 Свободно-радикальные реакции окисления.....	8
1.2 Методы исследования реакционной способности полифенольных веществ в физической химии.....	13
1.3 Сведения о химических превращениях кумаринов с участием свободно-радикальных частиц, инициированных облучением.....	15
Глава II. Экспериментальная часть.....	19
2.1 Исходные реактивы и их квалификация.....	19
2.1.1 Приготовление экстрактов донника, багульника и муррайи.....	19
2.1.2 Приготовление кумаринов.....	20
2.2 Применяемые методики анализа.....	20
2.2.1 Методика выделения кумарина из донника и багульника.....	20
2.2.2 Методика определения кумарина в доннике хроматографическим методом.....	22
2.2.3 Методика определения антирадикальных свойств экстрактов растений и кумаринов по их реакционной способности взаимодействовать со стабильным радикалом 2,2-дифенил-1-пикрилгидрозилом.....	22
2.2.4 Методика определения реакционной способности кумаринов по отношению к супероксид-анион радикалу	24
2.2.5 Методика проведения реакции образования гидразона ацетальдегида.....	27
2.3 Метод спектрофотометрии.....	29

2.4	Метод хроматографии.....	31
2.5	Метод хромато-масс исследований.....	34
2.6	Метод флуориметрии.....	40
2.7	Установка для стационарного радиолиза РХМ- γ -20.....	41
Глава III. Результаты и их обсуждение.....		43
3.1	Спектрофотометрическое исследование экстрактов донника, багульника и муррайи	43
3.1.1	Спектрофотометрическое исследование исходных экстрактов донника, багульника, муррайи в различных растворителях.....	43
3.1.2	Спектрофотометрические исследования превращений экстрактов донника, багульника, муррайи в различных растворителях после воздействия ионизирующего излучения.....	53
3.1.3	Превращения экстрактов донника и багульника в 40% этаноле.....	56
3.2	Исследование спектров флуоресценции экстрактов донника и багульника.....	58
3.3	Хроматографическое исследование кумаринов и экстрактов донника, багульника и муррайи.....	61
3.3.1	Газо-жидкостная хроматография экстракта донника.....	61
3.3.2	Определение концентрации кумарина в водно- этанольных экстрактах донника после воздействия ионизирующего излучения.....	63
3.3.3	Применение высоко-эффективной жидкостной хроматографии для анализа химических превращений кумаринов с углеродцентрированными радикалами, инициированными облучением.....	72

3.3.4	Применение газо-жидкостной хроматографии для анализа химических превращений 70% деаэрированных этанольных экстрактов донника, багульника, муррайи с углеродцентрированными радикалами, инициированными облучением.....	93
3.4	Определение реакционной способности экстрактов донника, багульника, муррайи и некоторых кумаринов со стабильным радикалом 2,2-дифенил-1-пикрилгидрозилом.....	97
3.4.1	Реакционная способность водно-этанольных экстрактов донника и багульника в реакции с 2,2-дифенил-1-пикрилгидрозилом.....	99
3.4.2	Реакционная способность водно-этанольных экстрактов муррайи в реакции с 2,2-дифенил-1-пикрилгидрозилом.....	108
3.4.3	Реакционная способность некоторых кумаринов в реакции с 2,2-дифенил-1-пикрилгидрозилом.....	114
3.5	Определение реакционной способности эскулетина, эскулина с супероксид анион-радикалом с использованием нитросинего тетразолия хлорида.....	116
3.5.1	Исследование реакционной способности эскулетина, эскулина с супероксид анион-радикалом в присутствии ионов металлов.....	121
3.5.2	Сравнение экспериментальных данных протекторных свойств эскулетина и эскулина в присутствии и отсутствие ионов металлов по отношению	

	к супероксид анион-радикалу	123
3.6	Определение радиопротекторной активности	
	багульника и донника	126
	Выводы.....	128
	Список используемой литературы.....	129
	Приложение. Донник, багульник, муррайя и кумарины.....	140

Введение

Многие видные ученые мира считают, что функциональная активность природных соединений выше, а их токсичность меньше. Данная работа посвящена исследованию кумаринов, выделяемых из природных источников органического сырья. В экстрактах растений содержится целый комплекс активных веществ, которые совместно с кумаринами оказывают влияние на реакционную способность экстрактов. Реакционную способность органических веществ связывают со свободными радикалами, обладающими химической активностью и способностью инициировать быстрые, цепные неуправляемые свободно-радикальные реакции. Для контроля этих реакций обратимся к веществам полифенольной природы (кумарины, флавоноиды и др.), которые найдены в водно-органических экстрактах растений. Есть сведения, что кумарины способны перехватывать свободные радикалы или превращать их в неактивные.

Известно, что свободные радикалы образуются при действии на систему видимого света, ультразвука, ионизирующего излучения и других факторов. Для изучения реакционной способности часто применяют метод конкурирующих реакций, введение стабильных радикалов, различных индикаторов свободных радикалов, они позволяют косвенными методами оценивать кинетические характеристики. Данные по исследованию реакционной способности органических соединений, полученные методом импульсного радиолиза, позволяют предположить, что направление физико-химических реакций можно оценивать по константам скорости взаимодействия с активными короткоживущими частицами из растворителей. При этом также важно установление не только конечных продуктов, но и неустойчивых промежуточных продуктов, так как в каждом случае идет необратимый процесс изменения исходных веществ.

Физико-химические методы полезны и необходимы при определении условий и методов выделения отдельных компонентов из органического сырья. Путем изучения реакционной способности на модельных физико-

химических реакциях в экстрактах донника, багульника и муррайи с активными промежуточными частицами радиолиза растворителей можно установить применимость экстрактов с заданными антирадикальными свойствами. Это одна из задач, решаемых в настоящей работе.

С использованием теории реакционной способности и современных физико-химических методов (спектрофотометрия, флуоресценция, газо-жидкостная хроматография, высокоэффективная жидкостная хроматография со спектрофотометрическим и масс-спектрометрическим детектированием) путем определения констант скоростей элементарных стадий важных индивидуальных полифенольных веществ в составе экстрактов с активными радикальными частицами (гидроксильные радикалы, супероксид анион-радикалы, гидроксиэтильные углеродцентрированные радикалы, алкоксильные радикалы и другие) можно установить механизм химических реакций по конечным продуктам, зависимость реакционной способности от строения и концентрации отдельных компонентов в экстракте, влияние ионов металлов, условий протекания реакций. Хотя данных в литературе по исследованию синтетических органических веществ в системах, где происходят цепные труднорегулируемые процессы окисления много, например, в системах с липидами, но недостаточно сведений об ингибировании активности экстрактов природных соединений и его механизме. В литературе имеются данные по механизму и константам скорости полифенольных соединений, моноядерных фенолов с супероксид анион-радикалом, гидроксильным радикалом, гидроксиэтильным углеродцентрированным радикалом и др., но для кумаринов таких сведений недостаточно. Их поведение в экстрактах – это другое направление исследований, представленных в данной работе. Отмеченное выше объясняет актуальность данного исследования, результаты которого позволяют лучше понять механизм физико-химических процессов в реакциях экстрактов с активными частицами радиолиза растворителей и определиться с выбором активных соединений и экстрактов, в которых есть кумарины.

Глава I. Литературный обзор

1.1 Свободно-радикальные реакции окисления

В работе исследованы экстракты растений, так как для них характерно отсутствие побочных эффектов, низкая токсичность [1-3], и важно отметить противоопухолевую активность кумаринов в них [4]. Академик Н.М. Эмануэль впервые высказал предположение, что вызванные свободными радикалами повреждения могут играть важную роль в возникновении и развитии злокачественных новообразований [5].

Многие свободно-радикальные реакции инициирует анион-радикальная форма молекулярного кислорода [6], получившая название “супероксид”, в котором акцептированный молекулой кислорода электрон находится на π^* -разрыхляющей молекулярной орбитали. Как в любом ион-радикале супероксид проявляет как ион и как радикал, что проявляется в двойственном характере его реакционной способности. Зависимость химических свойств анион-радикала кислорода наиболее сильно проявляется в апротонных и неполярных растворителях и в наименьшей степени в воде. В окислительно-восстановительных реакциях супероксид может быть как окислителем, так и восстановителем [7].

Окислительные свойства анион-радикала кислорода в водных растворах менее выражены, чем в апротонных растворителях. В гидрофильной среде у супероксид более выражены его восстановительные свойства. Константа скорости восстановления хлористого паранитротетразолия супероксидом, который используют как индикатор $O_2^{\cdot-}$, достаточно высока ($6,7 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ при pH=7 и $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ при pH=10) [8].

Таблица 1.1. Методы регистрации супероксид анион-радикала O_2^- [9]

1	Спектрофотометрия	NBT-тест, цитохром <i>c</i>	Наиболее простым методом регистрации O_2^- является NBT-тест, в основе которого лежит реакция восстановления красителя нитросинего тетразолия (NBT – nitroblue tetrazolium) до диформаза с образованием стабильного промежуточного продукта – частично восстановленного моноформаза, образование которого легко регистрируется спектрофотометрическим по поглощению при 550-560 нм.
2	ЭПР	Гидроксилами 1-гидрокси 2,2,6,6-тетраметил-4-оксопиперидин, который при окислении O_2^- образуется стабильный нитросильный радикал 4-оксо-2,2,6,6-тетрамети-пиперидин-1-оксалама	O_2^- является радикалом, в принципе его образование может быть измерено с помощью ЭПР, однако практически такой способ анализа мало приемлем в связи с небольшим значением времени жизни O_2^- и его низкими концентрациями в биологических жидкостях, предельные концентрации обнаружения O_2^- простым ЭПР методом составляют около 10^{-8} М.

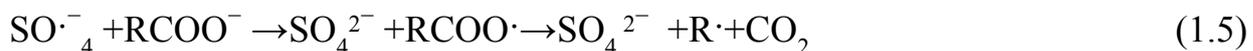
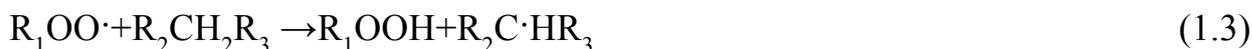
Таблица 1.1. (продолжение) Методы регистрации супероксид анион-радикала O_2^- [9]

3	Хемилюминисценция	Люминол, его аналоги (изолуминол, 8-амино-5-хлоро-7-фенилпиродол пиридазин-1,4-(2Н,3Н)дион, люцигенин, люциферины и их аналоги, фолазин (гликопротеин-связанный люциферин моллюска <i>Pholas dactylus</i>), CLA и MCLA (аналоги люмиферина рачкам <i>Cypridina</i>), целентеразин	В основе которых лежит измерение свечения, возникающего в реакциях O_2^- с люминофорами
4	Флуоресценция	Определение 4-метил- β -D-умбеллиферона, образующегося в реакции O_2^- с 4-метил- β -D-умбеллиферил глюкопиранозидом	Основанные на снижении интенсивности и флуоресценции 1,3-дифенилизообензофурана при взаимодействии с O_2^-
5	Амперометрия	Возможно окисление гидроэтидина, перекисью водорода, гипохлоритом с, пероксинитритом, цитохром с	O_2^- в микрослоях среды у поверхности одиночных клеток крови, это позволяет избежать применения химических реагентов, многие из которых обладают высокой токсичностью

Супероксид с ионами железа и меди из ферментного состава восстанавливает свободные металлы и их низкомолекулярные комплексы [10]. В 1954 г Гершман и Жильберт (Gershman, Gilbert) предположили, что многие токсичные эффекты кислорода на организм связаны с кислородными радикалами [11, 12]. Позднее эта гипотеза, известная в настоящее время как супероксидная теория токсичности кислорода [13], была развита и экспериментально подтверждена в работах Фридовича. Сейчас роль анион-радикала кислорода в генерации болезней показана, но механизмы данного процесса до сих пор исследуют.

Суммируя сведения о химической активности анион-радикала кислорода показано, что повреждение и гибель клеток в присутствии систем, генерирующих $O_2^{\cdot-}$, не может быть следствием его прямого взаимодействия с липидами, белками и нуклеиновыми кислотами. Есть экспериментальное обоснование того, что цитотоксическое действие $O_2^{\cdot-}$ косвенное через образование других форм активированного кислорода: протонированного анион-радикала кислорода ($HO_2\cdot$), синглетного кислорода (1O_2) [14], гидроксильного радикала ($\cdot OH$), пероксинитрита ($ONOO^-$).

Углеродцентрированные радикалы [15] могут образовываться в результате вторичных реакций алкоксильных (1.1, 1.2), пероксильных (1.3), азотцентрированных радикалов (1.4) или в результате декарбоксилирования карбоксильной группы (1.5) [16].



В присутствии кислорода углеродцентрированные радикалы вступают в реакции образования пероксильных радикалов, которые в результате цепи последовательных реакций могут приводить к образованию гидропероксидов, алкоксильных радикалов и гидроксильных белковых производных (или спиртов) [17].

В отсутствие кислорода углеродцентрированные радикалы могут выступать в реакции друг с другом, образуя межбелковые связи (1.6):



Реакции углеродцентрированных радикалов с кислородом протекают со скоростями, близкими к диффузионно-контролируемому пределу ($k \approx (10^9 - 10^{10}) M^{-1} s^{-1}$), тогда как димеризация радикалов является более медленным процессом, скорость которого во многом определяется структурными особенностями белковой молекулы [18].

Углеродцентрированные радикалы способны отрывать атомы водорода от соответствующих доноров (1.7):



Из литературных данных известно [19]: водные растворы спиртов как и чистые спирты дают при облучении в отсутствие кислорода водород, альфа-гликоль и карбонильные соединения. В случае разбавленных растворов этанола выходы продуктов соответствуют отрыву атомов водорода водородными атомами (с образованием H_2) или гидроксильными радикалами. Образующиеся таким образом органические радикалы либо димеризуются, образуя гликоль, либо диспропорционируют в альдегид.

В присутствии кислорода водные растворы этанола дают в три раза больше ацетальдегида, чем в его отсутствие. В более концентрированных растворах выход ацетальдегида $G=6$. Другим основным продуктом является перекись водорода, а выход гликоля полностью подавляется.

При радиоллизе деаэрированного этанола основными молекулярными продуктами являются ацетальдегид (АА) и бутандиол-2,3 (БД), которые образуются с равной вероятностью в реакциях диспропорционирования и рекомбинации альфа-гидроксиэтильных радикалов (ГЭР) [20].

Предотвратить разрушительные процессы, вызываемые свободными радикалами, можно веществами, называемыми антиоксидантами или ингибиторами окисления. По механизму действия антиоксиданты подразделяются: на снижающие скорость инициации цепной реакции и на гасящие (прерывающие) развитие цепной реакции [9, 13, 21].

Специальные соединения – антиокислители (антиоксиданты), ингибирующие радикалы и тем самым снижающие их токсичность, обладают и радиопротекторным действием [22- 24].

Известно, что антиоксидантная активность полифенольных соединений (флавоноидов, кумаринов и других) [25, 26] позволяет контролировать процессы свободно-радикального окисления органических молекул и содержания накапливающихся перекисных радикалов [27, 28].

1.2 Методы исследования реакционной способности полифенольных веществ в физической химии

В физической химии применяют источники ионизирующего излучения для генерации в растворе высокореакционных частиц и моделируют реакции взаимодействия органических веществ с радикальными частицами [29, 30].

На опыте методы определения реакционной способности веществ полифенольной природы различают на прямые и косвенные [31]. В основе прямых методов заложен процесс возникновения свободных радикалов, промежуточных комплексов и их исследование с помощью современных методов физической химии: полярографии [32], импульсного радиоллиза [33, 34] и хемилюминесцентного анализа, ЭПР. Косвенные методы основаны на изменении концентрации фенольных веществ в эксперименте с помощью

спектрофотометрии [35, 36], ЭПР, вольтамперометрически [37-39], хроматографически [40, 41].

Лучший метод исследования быстрых химических реакций и их короткоживущих продуктов - импульсный фотолиз, который позволяет обнаруживать возбужденные состояния молекул и короткоживущих продуктов их превращений [42]. Из работ по импульсному радиолизу известно, что при реакции радикала $\cdot\text{OH}$ с ароматическими молекулами (ArH) образуется ($\text{Ar}(\cdot\text{OH})\text{H}$). Максимум поглощения большинства аддуктов присоединения радикала $\cdot\text{OH}$ к производным бензола проявляется в области 310—350 нм (320—330 нм для радикала $\text{Ph}(\text{OH})_2\cdot$). Эти данные позволяют предположить, что первичная промежуточная полоса поглощения с максимумом при 335 нм отвечает радикалу $\text{Ph}(\text{OH})_2\cdot$ [43].

Радикал $\text{Ph}(\text{OH})_2\cdot$ элиминирует молекулу воды с образованием вторичного феноксильного радикала $\text{PhO}\cdot$, причем данный процесс ускоряется в присутствии кислот и щелочей. Феноксильный радикал обладает спектром поглощения с максимумами при 380 нм и 400 нм. Такую частицу обнаружили с помощью импульсного фотолиза [44] при изучении водных растворов фенола. В дальнейшем получены спектры замещенных феноксильных радикалов, содержащие полосы поглощения в районе 370—430 нм, которые по форме и положению близких полосам в спектре незамещенного феноксильного радикала. Таким образом, данные лазерного импульсного фотолиза свидетельствуют о последовательном образовании радикалов $\text{Ph}(\text{OH})_2\cdot$ и $\text{PhO}\cdot$ при возбуждении комплекса $\text{FeOH}_{\text{aq}}^{2+}$ в присутствии фенола.

Эти результаты прямого метода определения реакционной активности дали возможность предложить реакции с промежуточными частицами радиолиза. Показано, что происходит образование двух изомеров радикала $\text{Ph}(\text{OH})_2\cdot$, которые трансформируются в феноксильный радикал $\text{PhO}\cdot$ с отщеплением молекулы воды. На основе сопоставления расчетных и экспериментальных кинетических кривых определены коэффициенты

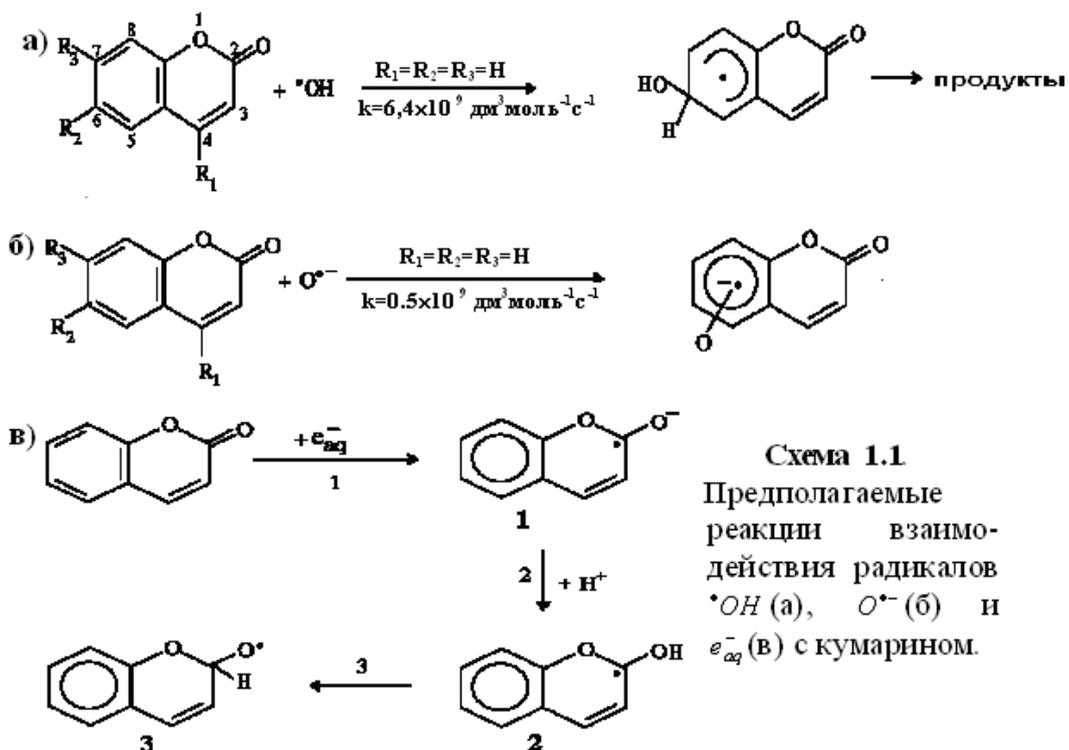
экстинкции и константы скорости реакций радикальных частиц. Среди конечных продуктов фотохимических превращений найдены охинон и дифенохиноны [45].

Среди косвенных методов зарекомендовано применение дифенилпикрилгидрозила - стабильного во времени при нормальных условиях свободного радикала. Он имеет способность восстанавливаться и изменять свою окраску в среде, и его используют при исследовании реакционной способности полифенольных веществ с помощью простого метода спектрофотометрии, это можно провести в любой лаборатории. Скорость его восстановления зависит от реакционной способности антиоксиданта напрямую [46].

1.3. Сведения о химических превращениях кумаринов с участием свободно-радикальных частиц, инициированных облучением

Авторами *Hammond G.S., Stout C.A., Lamola A.A* [47] проведены исследования превращений кумаринов в водных и водно-органических растворах под действием ионизирующего излучения и показано, что структура молекул кумаринов, природа растворителей влияют на направление радиационно-химических реакций. На основании результатов полученных методом импульсного радиолиза со спектрофотометрической регистрацией промежуточных короткоживущих частиц $\cdot OH, e_{aq}^-, H$, был предложен механизм взаимодействия $\cdot OH, O^{\cdot-}, e_{aq}^-$ с кумарином в водных растворах, что представлено на схеме 1.1 [31, 47].

Радикал $\cdot OH$ взаимодействует с кумарином с константой скорости (k), имеющей второй порядок и равной $6,4 \cdot 10^9 \text{ дм}^3 \text{ моль}^{-1} \text{ с}^{-1}$, которую измерили при длине волны 345 нм и 425 нм. Заместители в молекуле кумарина не влияют заметным образом на скорость реакции. Константы скоростей взаимодействия $O^{\cdot-}$ и гидратированного электрона с кумарином соответственно равны $0,5 \cdot 10^9 \text{ дм}^3 \text{ моль}^{-1} \text{ с}^{-1}$ (при 370 и 445 нм) и $17 \cdot 10^9 \text{ дм}^3 \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ (при 360 и 380 нм) [48].



При радиоллизе кумаринов могут образовываться гидрокси- и алкокси-производные кумарина разного строения, в том числе из-за деструкции пиранового кольца или его функционализации молекулами растворителя (схема 1.2) [31, 49, 50].

Несмотря на значительные работы в области физической химии - радиационной химии органических соединений, механизм антирадикального действия кумаринов в экстрактах лекарственных растений остаётся не до конца выясненным.

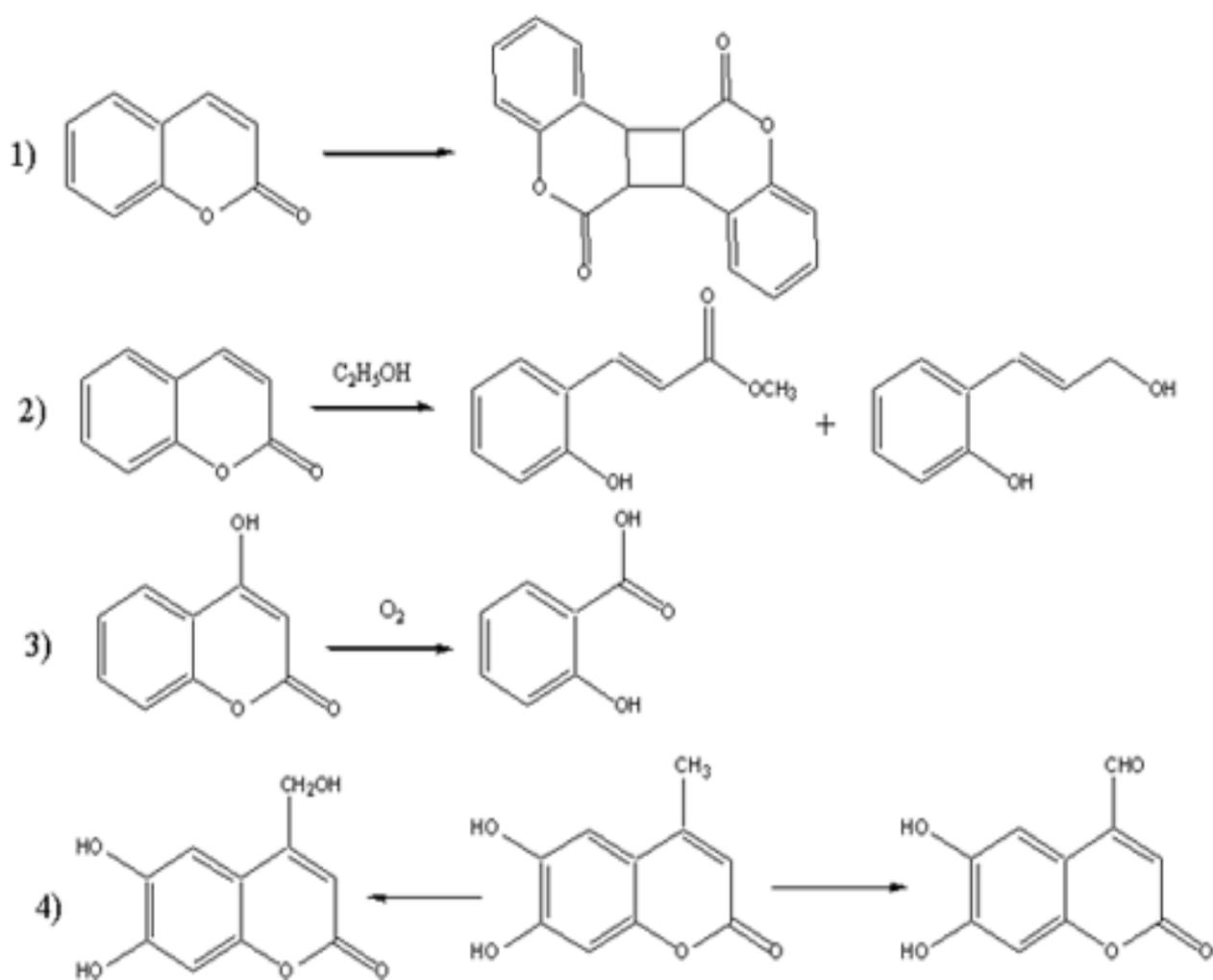


Схема 1.2. Реакции кумаринов [31, 50]

Цель данной работы состояла в выяснении реакционной способности экстрактов донника, багульника, муррайи и некоторых кумаринов в их составе в водно-органических растворах в реакциях со свободными радикалами.

Перед нами стояло решить следующие **задачи**:

- определить концентрацию кумарина в доннике в водно-спиртовых экстрактах с помощью хроматографии. Установить изменение концентрации кумарина в доннике лекарственном после облучения;
- исследовать антирадикальную активность экстрактов донника, багульника, муррайи и индивидуальных кумаринов (кумарин, дигидрокумарин, эскулетин, эскулин, скополетин, умбеллиферон) в их составе со свободно-радикальными частицами, предположить механизм реакций кумаринов по отношению к углеродцентрированным радикалам, оценить константы реакций кумаринов в реакции с супероксид анион-радикалом;
- оценить радиопротекторную активность выделенных водных растворов кумаринов из экстрактов донника и багульника.

Глава II. Экспериментальная часть

2.1 Исходные реактивы и их квалификация

В работе использованы следующие растворители: дистиллированная вода, деионизированная вода на фильтрах Millipore, этиловый спирт для медицинских целей, 96%, хлороформ марки “хч”, ацетонитрил производства J.Beker марки “о.х.ч”, ортофосфорная кислота марки “х.ч”. ДФПГ (2,2-дифенил-1-пикрилгидрозил), нитросиний тетразолий хлорид фирмы ACROS ORGANICS. 2,4-ДНФГ (2,4-динитрофенилгидразин), гептагидрат сульфат цинка $ZnSO_4 \times 7H_2O$, гептагидрат сульфат железа $FeSO_4 \times 7H_2O$, гептатагидрат сульфат магния $MgSO_4 \times 7H_2O$, пентагидрат сульфат меди $CuSO_4 \times 5H_2O$, нафталин марки “х.ч.”

В качестве образцов исследования применяли сухие образцы из аптечной сети: травы донника лекарственного (*Melilotus officinalis*), побегов багульника болотного (*Ledum palustre L.*) и листьев муррайи метельчатой (*Murraya paniculata*), которая привезена мной из Мьянмы.

В качестве образцов исследования применяли синтетические кумарин, дигидрокумарин, эскулин, эскулетин(6,7-дигидроксикумарин), скополетин, умбеллиферон, кофейная кислота фирмы SIGMA ALDRICH.

2.1.1 Приготовление экстрактов донника, багульника и муррайи

5 г (точная навеска) измельчённых и с помощью ротационного конусного делителя проб LABORETTE 27 (рис. 2.1) разделённых на равные твёрдые фракции кумаринсодержащие растения (донник лекарственный, багульник болотный, муррайя метельчатая) вносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, заливают этиловым спиртом с различным содержанием вода-спирт от 10% до 100%, взбалтывают, оставляют на неделю в темном месте. Полученный экстракт фильтруют с помощью складчатого фильтра. Далее экстракты хранят в темноте. Данные растворы далее используют для экспериментов.



Рис. 2.1. Вид ротационного делителя с точностью разделения 99,9 %

Таблица 2.1.1. Параметры ротационного делителя

Коэффициент разделения:	1:8, 1:10, 1:30
Число частей пробы:	8, 10 или 3
Макс. начальная крупность:	2,5 мм или 10 мм
Макс. количество пробы:	4.000 мл - 2.500 мл - 300 мл
Полезный объём приёмных стаканов:	500, 250, 30, 25, 20, 15 мл

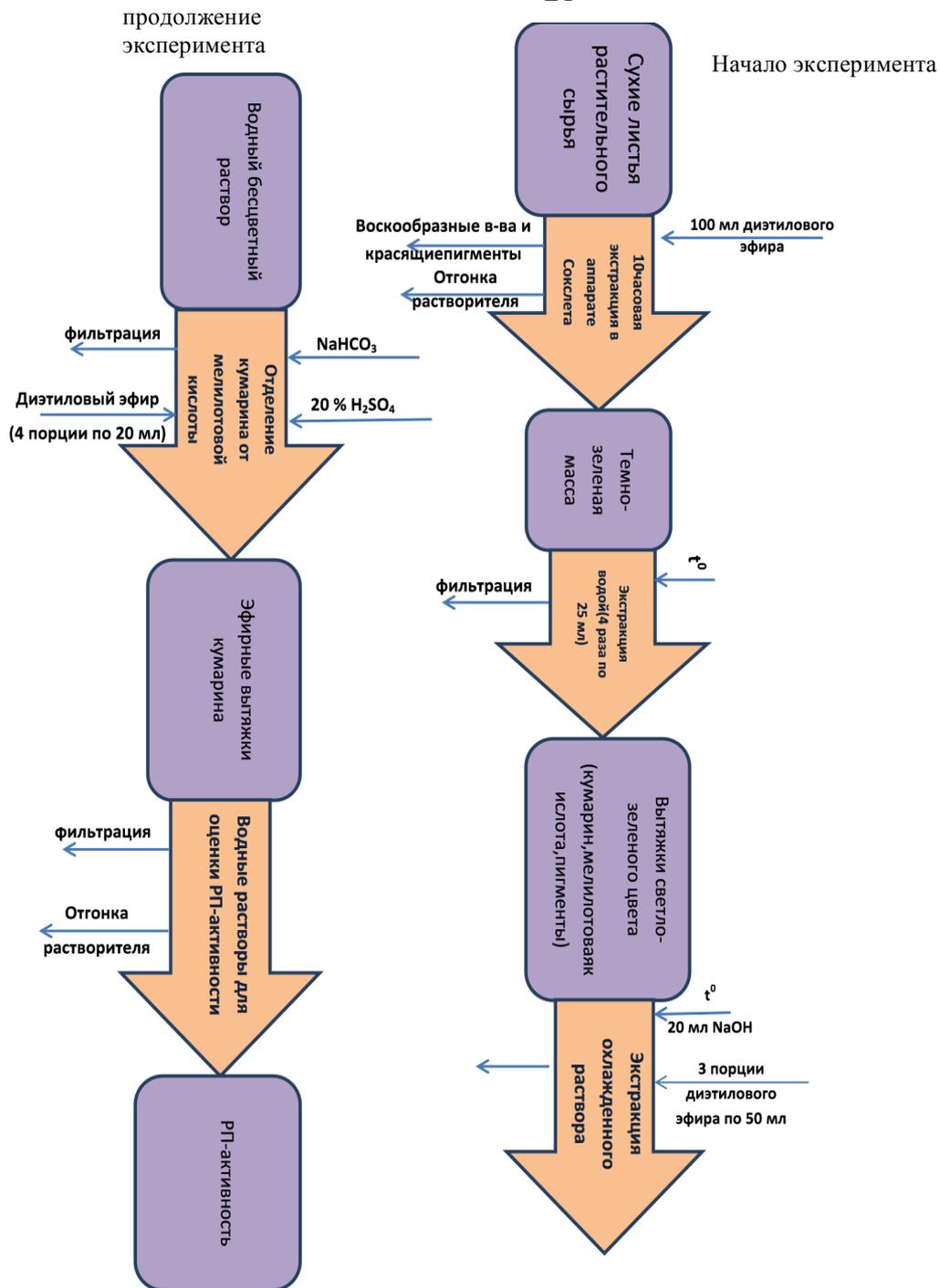
2.1.2 Приготовление кумаринов

Концентрация кумаринов равна порядка 1 мМ и 10 мМ. Растворы приготовлены в водно-этанольной системе.

2.2 Применяемые методики анализа

2.2.1 Методика выделения кумарина из донника и багульника

По методике [51] получены водные растворы кумаринов из донника лекарственного и багульника болотного (блок-схема 2.1).



Блок-схема 2.1. Процесс выделения кумаринов из лекарственного сырья

Данный раствор использовали для дальнейшего исследования по определению радиопротекторной активности с использованием установки РХМ-γ-20 (пункт 2.7).

2.2.2 Методика определения кумарина в доннике хроматографическим методом

В траве донника лекарственного из аптечной сети (*Melilotus officinalis*) концентрация кумарина определена с использованием газожидкостной хроматографии [52-54].

В круглодонной колбе смешаны 25 мл полученного экстракта (пункт 2.2.1), 200 мл деионизированной воды и 25 мл хлороформа марки “х.ч.”, хорошо перемешаны, добавлен 0.3 грамма Na_2SO_4 безводного и оставлен. Через сутки 10 мл отобранного нижнего слоя вакуумирован с помощью водоструйного насоса, высушенный остаток обработан 500 мкл нафталина в $CHCl_3$ (внутренний стандарт), хорошо перемешан. 250 мкл данного раствора использован для исследования на ГЖХ [53]. После снятия хроматограммы получено отношение площадей пиков кумарина к нафталину и по калибровочной прямой зависимости внутреннего стандарта (нафталина) от концентрации кумарина количественно определено содержание кумарина в исходном экстракте. Данная методика была применена к остальным водно-этанольным растворам донника.

2.2.3. Методика определения антирадикальных свойств экстрактов растений и кумаринов по их реакционной способности взаимодействовать со стабильным радикалом 2,2-дифенил-1-пикрилгидрозилом

Приготовлен перед экспериментом 0,2 мМ раствор 2,2-дифенил-1-пикрилгидрозилаДФПГ ($M_{ДФПГ} = 394,33$ г/моль) в этаноле [46].

Для построения калибровочной кривой использованы свежеприготовленные водно-спиртовые растворы лекарственных веществ, их содержание 1 мг/1 мл в 50% этаноле.

В контрольные пробирки вместо добавок внесены 2 мл 50% раствора этанола. Реакция запускается добавлением раствораДФПГ. Растворы приготовлены с разной концентрацией веществ в реакционной смеси

(таблица 2.2.2). В контрольном опыте вместо экстракта в реакционную систему введен чистый этанол.

Пробирки хорошо встряхнуть, поместить в темноту при комнатной температуре. Измерять в течение 30 минут с интервалом 5 минут при длине волны 517 нм, чтобы проследить динамику связывания радикаловДФПГ растворами экстрактов кумаринсодержащих лекарственных растений и синтетических кумаринов.

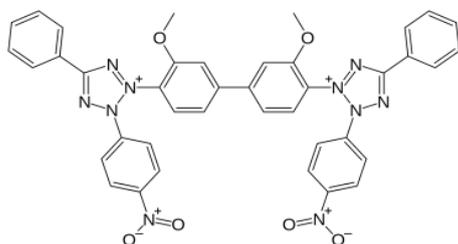
Таблица 2.2.1. Методика [46] приготовления образцов сДФПГ в зависимости от добавки экстракта в систему с равным содержанием водно-этанольной части

Объём добавок, мл	Объём 50% этанола, мкл	Объём 80% этанола для приготовления 2 мл р-ра, мкл	ОбъёмДФПГ, мл
10	40	1960	2
25	100	1900	
50	200	1800	
75	300	1700	
100	400	1600	
125	500	1500	

Таблица 2.2.2. Методика приготовления образцов сДФПГ при равной добавке экстракта в систему с разным содержанием водно-этанольной части

Водно-спиртовой раствор б.б, %	Объём экстракта, мкл	Объём воды, мкл	Объём 100% этанола для приготовления 2 мл р-ра, мкл	Объём 0,2мМ раствора ДФПГ, мкл
0	200	0	1800	2000
10		20	1780	
20		40	1760	
30		60	1740	
40		80	1720	
50		100	1700	
60		120	1680	
70		140	1660	
80		160	1640	
90		180	1620	
100		200	1600	

2.2.4 Методика определения реакционной способности кумаринов по отношению к супероксид-анион радикалу



Слева представлена линейная формула нитросинего тетразолия хлорида или NBT (nitro blue tetrazolium) $C_{40}H_{30}Cl_2N_{10}O_6$. Молекулярная масса 817,65 г/моль.

Растворы приготовлены с разной концентрацией веществ в реакционной смеси в соответствии с данными в таблице 2.2.3 и таблице 2.2.4. В контрольную пробу добавка кумаринов не вводилась. Данные исследования проводились в аэрированных условиях.

Таблица 2.2.3. Приготовление растворов для определения реакционной способности эскулина (Esc-Gl) в реакции с СОАР

№	[Esc-Gl], моль/л	V (Esc-Gl), мл	V (NBT), мл	V(EtOH), мл
1	1×10^{-3}	2	2	0
2	8×10^{-4}	1,6	2	0,4
3	6×10^{-4}	1,2	2	0,8
4	4×10^{-4}	0,8	2	1,2
5	1×10^{-4}	0,2	2	1,8

Таблица 2.2.4. Приготовление растворов для определения реакционной способности эскулетина (Esc) в реакции с СОАР

№	[Esc], моль/л	V (Esc), мл	V (NBT), мл	V(EtOH), мл
1	1×10^{-3}	2	2	0
2	8×10^{-4}	1,6	2	0,4
3	6×10^{-4}	1,2	2	0,8
4	4×10^{-4}	0,8	2	1,2
5	1×10^{-4}	0,2	2	1,8

Приготовление фосфатного буферного раствора с pH=7,4

В колбу на 400 мл помещают навеску 0,62 г $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ и 4,3 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ и доводят деионизованной водой до метки.

Методика определения реакционной способности по отношению к супероксид анион-радикалу в присутствии ионов металлов

Растворы приготовлены с разной концентрацией веществ в реакционной смеси, при постоянном объёме NBT = 2,5 мл.

Таблица 2.2.5. Приготовление растворов для определения реакционной способности по отношению к СОАР в присутствии металлов разной концентрации

№	[Me], моль/л	V(Me), мл	V(NBT), мл	V(Esc),мл	V(EtOH),мл
1	0	0	2,5	0	2,5
2	$0,5 \times 10^{-4}$	0,25	2,5	0	2,25
3	1×10^{-4}	0,5	2,5	0	2
4	2×10^{-4}	1,0	2,5	0	1,5
5	3×10^{-4}	1,5	2,5	0	1
6	4×10^{-4}	2,0	2,5	0	0,5

Таблица 2.2.6. Приготовление растворов для определения реакционной способности по отношению к СОАР в присутствии металлов разной концентрации. [Esc] = const = $0,5 \times 10^{-4}$ моль/л

№	[Me], (моль/л)	V(Me), мл	V(NBT), мл	V(Esc),мл	V(EtOH),мл
1	0	0	2,5	0,25	2,25
2	$0,5 \times 10^{-4}$	0,25	2,5	0,25	2,0
3	1×10^{-4}	0,5	2,5	0,25	1,75
4	2×10^{-4}	1,0	2,5	0,25	1,25
5	3×10^{-4}	1,5	2,5	0,25	0,75
6	4×10^{-4}	2,0	2,5	0,25	0,25

Таблица 2.2.7(а). Приготовление растворов для определения реакционной способности по отношению к СОАР в присутствии металлов разной концентрации. $[Caffeic\ acid] = 5 \times 10^{-4}$ моль/л

№	V (Caffeic acid), мл	V (NBT), мл	V (EtOH) мл	V(Zn ²⁺), мл
1	-	2,5	2,5	-
2	-	2,5	2,0	0,5
3	0,5	2,5	2,0	-
4	0,5	2,5	1,5	0,5

Таблица 2.2.7(б). Приготовление растворов для определения реакционной способности по отношению к СОАР в присутствии металлов разной концентрации. $[Esc] = const = 1 \times 10^{-3}$ моль/л

№	[Me], (моль/л)	V(Me), мл	V(NBT), мл	V(Esc),мл	V(EtOH),мл
1	0	0	2,5	1	1,5
2	$0,5 \times 10^{-4}$	0,25	2,5	1	1,25
3	1×10^{-4}	0,5	2,5	1	1,0
4	2×10^{-4}	1,0	2,5	1	0,5
5	3×10^{-4}	1,5	2,5	1	0

2.2.5 Методика проведения реакции образования гидразона ацетальдегида

2,0 мл аналита смешивали с 0,4 мл раствора 2,4-динитрофенилгидразона(2,4-ДНФГ) и ортофосфорной кислоты (1:7), смесь перемешивают и через 20 минут анализируют с помощью ВЭЖХ. Перед хроматографированием пробу фильтруют через фильтр типа “юла”. Для количественного определения проводят параллельно два опыта [55].

Для работы необходимо предварительная подготовка растворителей и реактивов, об этом будет рассмотрено в следующей части методической части диссертационной работы. Сведения из патентной работы [55].

Реакция образования гидразона [55]

2,4-динитрофенилгидразин, используемый для градуировки прибора и для последующего проведения анализов, должен иметь одну и ту же степень очистки от гидразонов. Качество раствора 2,4-динитрофенилгидразина проверяют периодически путем проведения “холостого” опыта, в котором вместо анализируемого объекта берут тот же объем смеси ацетонитрил-вода (1:1). Площади пиков “холостого” опыта при периодической проверке и при градуировке должны различаться между собой и не более чем на 10%.

Подготовка растворителей и реактивов в исследовании образования гидразона ацетальдегида [55].

Очистка этилового спирта от альдегидов и кетонов. К 200 см³ 98%-го этилового спирта добавляют 0,4 г 2,4-динитрофенилгидразина, 100 мм³ концентрированной хлористоводородной кислоты и кипятят с шариковым холодильником на водяной бане в течение 1ч. Перегоняют с дефлегматором в приборе со стеклянными шлифами, отбрасывая первые и последние 20 см³, после этого перегоняют повторно. Хранят в холодильнике, вдали от растворов альдегидов. Очистка 2,4-динитрофенилгидразона [55]. 2,4-динитрофенилгидразин (2,4-ДНФГ) очищают от примесей методом перекристаллизации из раствора в очищенном этиловом спирте. Для этого 2,4-динитрофенилгидразон растворяют в нагретом примерно до 60°C этиловом спирте до получения насыщенного раствора, раствор фильтруют через фильтр из пористого стекла. Осаждение 2,4-динитрофенилгидразина из насыщенного раствора ведут быстро при перемешивании, постепенно охлаждая его до комнатной температуры в емкости с водой, наполненной льдом. Процедура осаждения должна длиться не более 1,5 часов. Осадок,

выпавший после охлаждения спиртового раствора, должен быть мелкокристаллическим. Его отделяют центрифугированием, промывают несколькими порциями охлажденного до 4-10°C этилового спирта и высушивают в вакуумном эксикаторе до постоянного веса. Контроль чистоты проводят хроматографическим методом, для чего из перекристаллизованного 2,4-динитрофенилгидразона, вводят в хроматограф 2 мкл этого раствора и хроматографируют. На хроматограмме должны отсутствовать пики, соответствующие пикам ДНФ – производных ацетальдегида и формальдегида. В случае наличия этих пиков проводят повторную перекристаллизацию 2,4-ДНФГ. Перекристаллизованный 2,4-ДНФГ хранят в эксикаторе.

Приготовление раствора 2,4-динитрофенил гидразина в ацетонитриле 1 мг/мл [55]. В стеклянную пробирку с шлифованной пробкой берут навеску 1,5 мг перекристаллизованного 2,4-динитрофенилгидразина и растворяют в таком объеме ацетонитрила, чтобы концентрация 2,4-динитрофенилгидразина составила 1 мг/мл. Хранят в холодильнике, вдали от растворов альдегидов.

Приготовление раствора ортофосфорной кислоты (1:7) [55]. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 30-40 мл дистиллированной воды, осторожно приливают мерным цилиндром 12,5 мл ортофосфорной кислоты (85%), перемешивают и доводят до метки дистиллированной водой.

2.3 Метод спектрофотометрии

Спектры оптического поглощения кумаринсодержащих экстрактов измерены на спектрофотометре СФ-2000. Эталонем сравнения служил выбранный растворитель, длина оптического пути кварцевой кюветы равна 1 и 10 мм.



Технические характеристики прибора: рабочий диапазон от 200 до 1100 нм; предел допускаемого значения абсолютной погрешности при измерении

спектральных коэффициентов направленного пропускания равен 1%; спектральный диапазон ультрафиолетового канала от 200 до 390 нм; спектральный диапазон видимого и ближнего инфракрасного канала от 390 до 1100 нм; источники излучения при работе в спектральном диапазоне: от 200 до 390 нм – дейтериевая лампа; от 390 до 1100 нм – галогенная лампа.

Принцип действия спектрофотометра основан на измерении отношения двух световых потоков: светового потока, прошедшего через исследуемый образец, и потока, падающего на исследуемый образец (или прошедшего через контрольный образец) см. рис. 2.3.1.

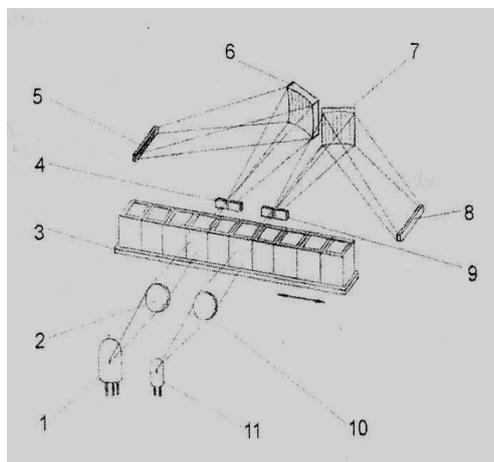


Рис. 2.3.1. Схема работы спектрофотометра

Расчет концентрации раствора через оптическое поглощение можно вести, используя закон Бугера-Ламберта-Бееера:

$$D = c \times \varepsilon \times l = \lg(I_0/I_c) \quad (2.1)$$

где c – концентрация измеряемого раствора, моль/л;

ε - коэффициент экстинкции, л/моль \times м;

l – толщина кюветы, м;

I_0 , I_c – интенсивность света после прохождения исследуемого раствора с концентрацией частиц равной нулю и отличной от нуля.

СФ-2000 состоит из оптических схем двух каналов (“У” и “В”). Каждый из каналов представляет собой полихроматор, построенный на основе вогнутой дифракционной решетки с коррекцией аберраций.

Свет от источника ультрафиолетового излучения 1, попадая на объектив 2, направляется им на образец 3 и затем проецируется на входную щель 4 канала “У” спектрофотометра. Затем световой пучок попадает на дифракционную решетку 6, после чего дифрагированный свет фокусируется на поверхности многоэлементного приемника 5.

Аналогично, свет от источника видимого излучения 11, попадая на объектив 10, направляется на образец 3, проецируется на входную щель 9 канала “В” спектрофотометра. Затем световой пучок направляется на дифракционную решетку 7, после чего дифрагированный свет фокусируется на поверхности многоэлементного приемника 8. Каждый из многоэлементных приемников регистрирует свой спектральный диапазон одновременно [56].

2.4 Метод хроматографии

Установка для газо-жидкостных хроматографических исследований на базе хроматографа “Хроматэк – Кристалл 5000”

Комплекс (рис.2.4.1) предназначен для качественных и количественных анализов жидких и газообразных проб различных органических и некоторых неорганических соединений методом газовой хроматографии.



Рис. 2.4.1. Газовый хроматограф “Хроматэк - Кристалл 5000”

Области применения комплекса: контроль среды обитания человека, контроль лекарственных препаратов, обнаружение и определение алкоголя, наркотических средств, психотропных и других токсических веществ в биожидкостях и тканях человека, судебно-химическая экспертиза, а также в учебных, научно-исследовательских учреждениях.

Комплекс образует: газовый хроматограф с комплектом сменных детекторов и устройств ввода пробы; персональный компьютер; программное обеспечение; методики анализов; хроматографические колонки; дополнительные устройства (компрессор, генератор водорода, дозаторы и др).

Составная часть комплекса хроматографа дополнена следующими детекторами: пламенно – ионизационный детектор (ПИД); детектор по теплопроводности; масс-спектрометрический детектор.

Хроматограф обеспечивает газохроматографическое разделение и детектирование: жидких проб, вводимых микрошприцем или дозатором автоматическим жидкостным; газообразных проб, вводимых дозатором автоматическим газовым; сжиженных газов, вводимых краном-дозатором сжиженных газов; твердых проб, вводимых с помощью дозатора твердых проб или испарителя пиролитического.

Кумарин методом ГХ определяли¹ на колонке VF-5ms фирмы Varian (длина 60м диаметр 0.25мм толщина слоя 0.25 мкм). Поток газа носителя (гелий марки 6.0) 2 мл/мин. Детектирование вели с использованием пламенно – ионизационного детектора ПИД (температура 250 °С). Режим хроматографирования: 200 °С (4 мин), нагрев до 290 °С со скоростью 20 °С/мин, поток газа носителя (гелий марки 6.0) 2 мл/мин. Температурный режим: испаритель 250 °С, детектор (ПИД) 250 °С, термостат 200 °С (4 мин), нагрев до 290 °С со скоростью 20 °С/мин.

¹ Работа выполнена при участии старшего преподавателя Фенина А.А., димпломницы Куракиной Е.В.

В работе применяли *метод внутреннего стандарта*. К раствору анализируемого вещества добавляется известное количество внутреннего стандарта — постороннего соединения, дающего на хроматограмме хорошо разрешенный пик. Концентрация определяемого компонента в анализируемом веществе рассчитывается по формуле:

$$C_i = \frac{S_i * K_i * M_{CT}}{S_{CT} * M_n} * 100, \text{ масс. \%}, \quad (2.2)$$

где S_{CT} – площадь пика стандарта; M_{CT} – масса добавленного внутреннего стандарта; M_n – масса пробы анализируемой смеси, к которой добавлено определенное количество внутреннего стандарта.

Приведенное уравнение может служить основой графического варианта рассматриваемого метода. Если M_{CT}/M_n остается постоянным, тогда получают калибровочные графики в координатах: $C_i - \frac{S_i}{S_{CT}}$.

Требования к внутреннему стандарту. Внутренний стандарт должен иметь хорошо разрешенный пик, расположенный на хроматограмме рядом с пиками определяемых компонентов; иметь летучесть, близкую определяемым компонентам; отсутствовать в анализируемой смеси; хорошо растворяться в анализируемой смеси, не реагировать с другими компонентами пробы; добавляться в количестве, соизмеримом с анализируемыми компонентами.

Внутренний стандарт выбирается из числа соединений, близких по структуре и физико-химическим свойствам к компонентам анализируемой смеси [57].

Использование метода внутреннего стандарта в нашем исследовании на газожидкостном хроматографе дает возможность точного измерения параметра пика, уменьшает влияние изменения чувствительности детектора из-за колебаний рабочих условий (расход газа-носителя, температура

колонок и т.д.), уменьшает ошибки, вызванные фракционированием пробы при вводе.

Ацетальдегид определяли при следующих условиях хроматографирования: колонка длиной 2 м внутренним диаметром 2 мм, заполненная Полисорбом-1 размером 0,1-0,25 мкм. Объем вводимой пробы составлял 1 мкл. Детектирование производилось на ПИД (температура 160 °С), расход воздуха 250 мл/мин, расход водорода 25 мл/мин. Расход газа носителя (гелий марки А) 30 мл/мин (9-10 мин), 40 мл/мин (13 мин), 30 мл/мин (0 мин). Температурный режим: термостат 70 °С (9мин), 40 °С/мин, 100 °С (0 мин), 240 °С (0мин), испаритель 150 °С.

2.5 Метод хромато-масс исследований

Работу вели² на хроматографе Waters Acquity UPLC/MS, который находится на кафедре химия высоких энергий и радиоэкологии в РХТУ им. Д.И. Менделеева. Данный прибор используется для разделения смеси на чистые компоненты методом высоко-эффективной жидкостной хроматографии.



Рис. 2.5.1. Внешний вид хроматомасс-спектрометра Waters Acquity UPLC/MS

² Автор выражает благодарность старшему преподавателю А.А. Фенину, аспирантке Николаевой В.В. за помощь в проведении хромато-масс-исследований, за расшировку масс-спектров – к.х.н. Щапина И.Ю.

Хроматограф имеет следующие составные элементы: автоинжектор - Sample Manager FTN, термостат - Column Manager, бинарный градиентный насос - Quaternary Solvent Manager, спектрофотометрический диодноматричный детектор - PDA eλ Detector, рефрактометрический детектор - Waters 2414 Refractive Index Detector, модуль нагрева колонок, tandemный квадрупольный масспектомертрический детектор - Waters Xevo TQD.

Основным конструктивным элементом хроматографа является колонка - трубка, заполненная неподвижной фазой, по которой во время выполнения анализа движется подвижная фаза и исследуемый образец. Именно в колонке происходит разделение компонентов исследуемой смеси.

Для подтверждения наличия в растворе кумарина использовали спектрофотометрический диодноматричный детектор (рис. 2.5.2). Он позволяет анализировать вещества, которые могут поглощать свет в ультрафиолетовой и видимой области, а это подавляющее большинство органических соединений.

Лампа видимого света, направляет свой пучок на первое зеркало, от которого свет, проходя через колонку и 2-ое зеркало, попадает на дифракционную решетку. Решетка раскладывает весь пучок света на спектр. Спектр попадает на диодную матрицу, состоящую из большого числа активных элементов, обеспечивающих оптическое разрешение 1,2 нм. Далее мы выбираем нужную нам длину волны, и компьютер нам выводит показания.

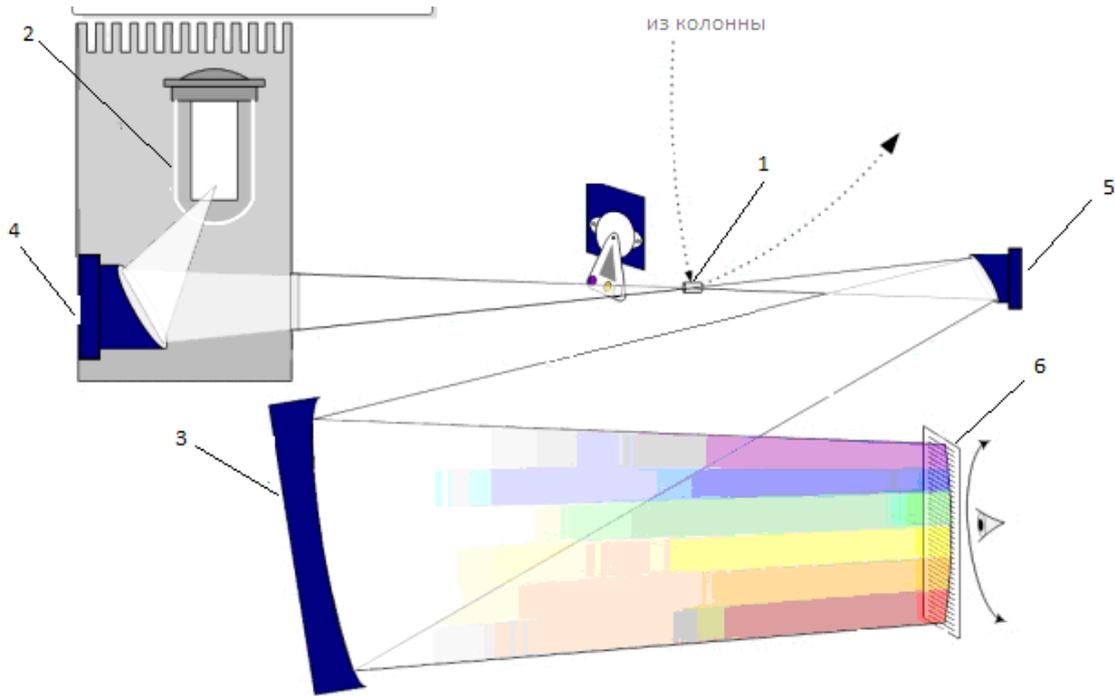


Рис. 2.5.2. Принципиальная схема работы спектрофотометрического детектора, где 1- ячейка потока; 2- лампа видимого света; 3- дифракционная решетка; 4,5- зеркала; 6- диодная матрица

Оборудование - Waters ACQUITY UPLC/MS. Система снабжена менеджером бинарных растворителей, менеджером образцов, нагревателем колонки и фотодиодной матрицей ел детектор, а также интерфейс тандемного квадруполя (TQD) (рис. 2.5.3). Масс-спектрометр оборудован источниками ионизации ESI/MS, элюирующий компонент колонки настроен в положительный режим ионизации для кумарина. Обработка и объединение данных производилась с помощью программного обеспечения Empower 2.

MS сканирование велось в диапазоне 100-1000 Да, N₂- сухой распыляющий газ, аргон- коллизионный газ. Скорость потока N₂ для десольватирования - 1000 л/час. Температура источника 150⁰С и температура десольватации 500⁰С. Оптимизация условий ионизации основана на интенсивности масс-сигналов протонирования. Напряжение капилляра 2,5 В, напряжение на конусе скиммера 40 В; энергия столкновения - 20 В. Образец вводили в масс-спектрометр с помощью

хроматографа. Детектирование кумарина производилось на 270 нм. Температура термостатирования колонки для кумарина 40⁰С. Элюцию проводили в изократическом режиме - 70% H₂O с 0,1% HCOOH, В- 30 % ацетонитрил. Скорость потока 0,4 мл/мин.

Квадрупольный масс-анализатор служит для разделения ионов по их соотношению массы к заряду (m/z), которое в свою очередь определяется траекториями движения ионов, задаваемым переменным электрическим полем. Данный детектор работает в диапазоне масс: 2-2048 m/z .

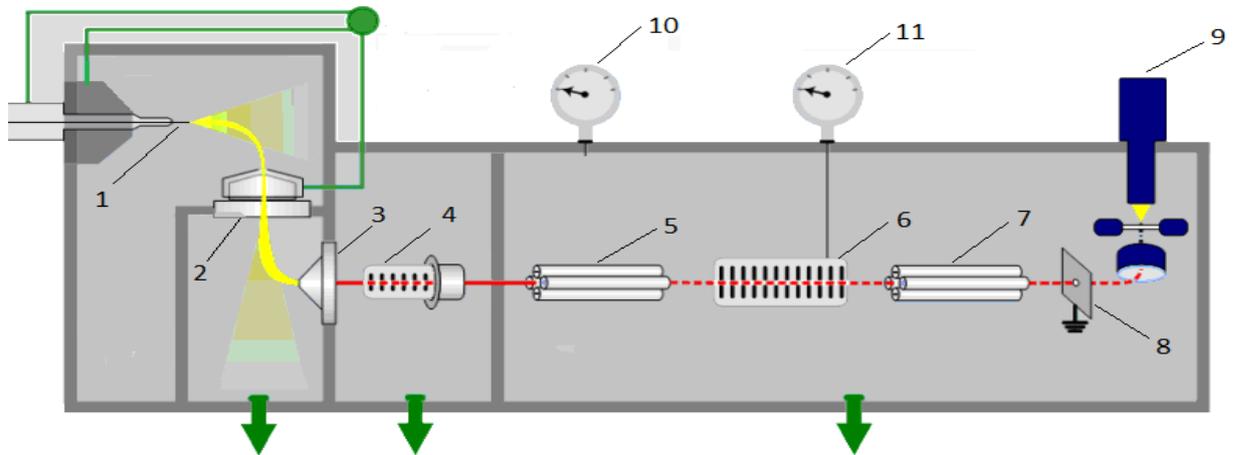


Рис. 2.5.3. Принципиальная схема тандемного квадрупольного масспектрометрического детектора - Waters Xevo TQD

По капилляру 1 элюент из хроматографа попадает в камеру где происходит его распыление за счет поддерживаемого в камере вакуума. Капельки жидкости оказываются в потоке азота, и происходит осушение капель от элюента, в результате чего заряд капли оказывается на анализируемом соединении. Заряженные частицы за счет электростатического притяжения попадают в конус 2, где поддерживается постоянное напряжение 46 В. Большая часть потока остается незаряженной и опускается, а меньшая часть потока проходит через конус, в котором повторно разделяются нейтральные атомы от ионов. Оставшиеся заряженные частицы через экстрактор 3 попадают в ионизационную камеру 4, которая ускоряет образующиеся ионы. Далее находится первый квадруполь 5, схема которого представлена на рис. 2.5.4

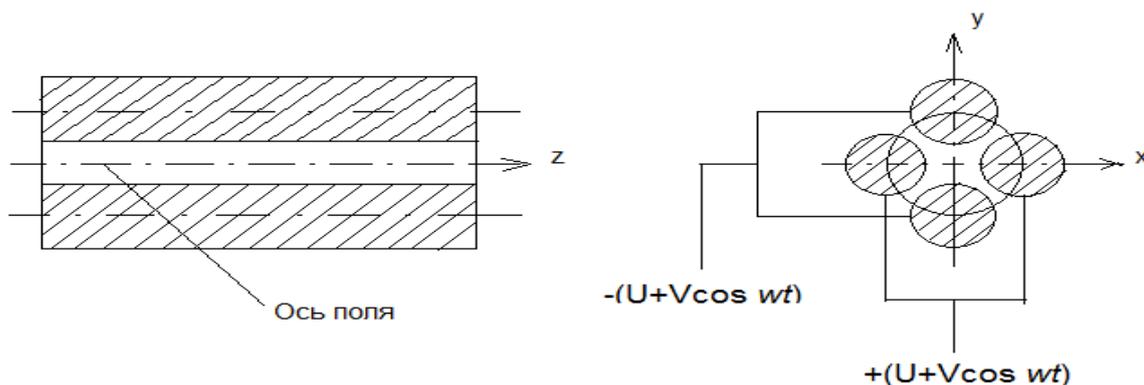


Рис. 2.5.4. Схема квадрупольного анализатора (вертикальное сечение)

Квадруполь масс-спектрометрического детектора состоит из четырех параллельных стержней (монополя) круглого или гиперболического сечения. Противоположные стержни электрически попарно соединены и находятся под напряжением, складывающимся из компоненты постоянного тока U и высокочастотной компоненты $V\cos(\omega t)$. Вторая пара стержней имеет равную по величине, но противоположную по знаку компоненту постоянного тока, а фаза высокочастотной компоненты сдвинута на 180° .

Ионы, вводимые в промежуток между полями с помощью небольшого ускоряющего напряжения (10-20 В), под действием электрического поля колеблются относительно осей x и y с возрастающей амплитудой, сохраняя направление движения вдоль электродов. Ионы, получившие большую амплитуду, могут нейтрализоваться на электродах.

При определенных соотношениях напряжений U/V , специфичных для каждого значения отношения массы к заряду, ионы соответствующей массы будут иметь ограниченную амплитуду колебаний и, двигаясь вдоль электродов, попадут в выходную щель. Таким образом, из полного потока ионов выделяется первичный ион с определенным m/z . Далее идет кализионная ячейка 6, в которой первичный ион в ходе соударений с аргоном распадается на дочерние ионы, которые попадают во второй квадруполь 7. Далее ионы с определенным отношением m/z поступают на чувствительный

элемент – диод 8 (электрод в фотоумножителе), усиленный сигнал поступает на детектор 9.

Условия ВЭЖХ-анализа кумарина: методом обращенно-фазовой ВЭЖХ на хроматографе Waters в изократическом режиме (колонка UPLC VEN, стационарная фаза C18 1.7, размер μm 21·10 nm). Подвижной фазой в анализе служила смесь ацетонитрила и воды различных соотношений с добавлением 0,1% ортофосфорной кислоты. Скорость потока при анализе составляла 300 мкл/мин. Детектирование кумаринов осуществляли при аналитической длине волны $\lambda_{\text{max}} = 270$ нм.

Для обнаружения возможных сопутствующих веществ использовали дополнительные длины волн: 220, 310, 330 нм. Условия анализа: изократический режим – 15% ацетонитрила, 85 % деионизованной воды с 0,1% ортофосфорной кислоты. Ацетонитрил производства J.Becker марки “охч”, деионизованная вода и ортофосфорная кислота марки “х.ч.”

Условия проведения хроматографического анализа гидразона ацетальдегида [55]: контролируют качество раствора 2,4-ДНФГ путем постановки и хроматографирования “холостого” опыта. Проводят идентификацию пика ацетальдегида.

Для определения выхода ацетальдегида использовали спектрофотометрический диодноматричный детектор. Он позволяет анализировать вещества, которые могут поглощать свет в ультрафиолетовой и видимой области, а это подавляющее большинство органических соединений.

Методом обращенно-фазовой ВЭЖХ на хроматографе Waters ACQUITYU HPLC/MS в изократическом режиме (колонка UPLC VEN, стационарная фаза C18 1.7, размер μm 21·10 nm). Подвижной фазой в анализе служила смесь ацетонитрила и воды в соотношении 60:40. Скорость потока при анализе составляла 300 мкл/мин. Детектирование осуществляли при аналитической длине волны $\lambda_{\text{max}} = 270$ нм. Температура термостата

колонки 35°. Время анализа 8 мин. Эффективность колонки не ниже 3000 теоретических тарелок.

2.6 Метод флуориметрии

При флуориметрических исследованиях производится измерение спектральных характеристик возбуждения и/или испускания люминесценции исследуемых объектов в момент воздействия импульсов возбуждающего света.

При исследовании задержанной люминесценции (фосфоресценции) анализируется кинетика затухания свечения при заранее выбранных условиях возбуждения и регистрации люминесценции. Дискретность изменения параметров кинетических изменений 0.05 мкс. Максимальная длительность измерительного строба 8000 мкс.

При фотометрических исследованиях проводятся измерения спектральных характеристик поглощения зондирующего излучения в анализируемых объектах.

Спектральные области в каналах возбуждения и регистрации люминесценции анализатора задаются встроенными светосильными монохроматорами. Монохроматоры управляются независимо. Аналитик может запрограммировать любую функцию их состояний в процессе измерения, в частности, можно проводить синхронное сканирование спектров. Оригинальная оптическая схема обеспечивает высокую чувствительность прибора, особенно в ультрафиолетовой области спектра, где фильтровая спектральная селекция затруднена.

Исследование проведено на приборе “Флюорат-Панорама-02”, г. Санкт-Петербург. Управление прибором осуществляется от внешнего компьютера, либо со встроенной клавиатуры. Математическая обработка результатов измерений осуществляется средствами поставляемого программного обеспечения или иными программными продуктами.

2.7 Установка для стационарного радиоллиза РХМ-γ-20

Радиационно-химическая радиобиологии многокамерная установка РХМ-γ-20 предназначена для проведения научных исследований в области химии, физики твердого тела, и др., в проточных, циркуляционных и статических условиях при температуре от -40 до $+560$ $^{\circ}\text{C}$ и давлении от 1 мПа.

Конструкция установки, которая может быть размещена в обычном служебном помещении, обеспечивает биологическую защиту обслуживающего персонала.

Установка представляет собой свинцовый контейнер, устанавливаемый на станине. В центре контейнера расположен облучатель типа “беличье колесо” с 30 источниками ^{60}Co , с максимальной мощностью поглощенной дозы ионизирующего излучения $0,111 \div 0,079$ Гр/с. Объект облучения для исследований устанавливается на рабочий столик пробки и механизмом подъема опускается в зону облучения. После облучения пробка поднимается вверх, и объект облучения извлекается из рабочей камеры. Верхняя часть пробки выполнена с козырьком, который предназначен для размещения тягового шарнира, посредством которого пробка присоединяется к Т-образному ползуну механизма подъема.

Помимо центральной ($V=4,4$ л) установка имеет шесть боковых камер ($V=0,6$ л). В данной работе облучение проводилось в центральной камере.

Радиопротекторную активность экстрактов донника и багульника оценивали³ по относительному изменению выхода ионов калия из облученных дрожжевых клеток в питательную среду [58]. В работе использовали диплоидные дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* расса Феодосия-7 в логарифмической фазе роста. Дрожжи выращивали в течении двух дней при температуре $27-29^{\circ}\text{C}$ на глюкозо-аммонийной среде следующего состава: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5.0 г, KH_2PO_4 0.85 г, K_2HPO_4 0.15 г, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 г,

³ Работа на рН-метре и дальнейшая обработка результатов выполнена при поддержке аспирантки Николаевой В.В.

NaCl 0.1 г, CaCl₂×4H₂O 0.1 г, глюкоза 20 г, дистиллированная вода 1000 мл. Использованная синтетическая среда не содержала ионов 3-d элементов, что позволило оценить их влияние на протекторную активность исследуемых соединений. Выращенную биомассу дрожжей переносили в стерильный раствор глюкозы (среда, не содержащая ионов K⁺), для этого ампулы с суспензированными дрожжами центрифугировали в течение 10 минут при 1000 об/мин. Надосадочную жидкость сливали, а дрожжи ресуспендировали в растворе глюкозы с концентрацией 20 г/л. Процедуру очистки повторяли трехкратно. Концентрация дрожжей составляла ~10⁵ КОЕ/мл. После очистки в 10 мл суспензии вводили исследуемые кумаринсодержащие вещества в концентрации 10⁻⁵ моль/л в виде водных растворов с концентрацией 10⁻³ моль/л. Дрожжи подвергали воздействию γ-излучения ⁶⁰Co на установке РХМ-γ-20, облучали в дозе 0,45 кГр и измеряли, через сутки после облучения, концентрацию K⁺ с помощью калий-селективного электрода (Россия) на рН ионометре “Экотест 2000” (Россия). Концентрацию K⁺ в растворе дрожжей, облучённых без добавок, принимали за 100%.

Глава III. Результаты и их обсуждение

3.1 Спектрофотометрическое исследование экстрактов донника, багульника и муррайи

3.1.1 Спектрофотометрическое исследование исходных экстрактов донника, багульника, муррайи в различных растворителях

На рис. 3.1.1 и рис. 3.1.2 представлены спектры оптического поглощения растворов травы донника лекарственного и багульника болотного в различных растворителях: вода, диэтиловый эфир, изопропанол и этилацетат.

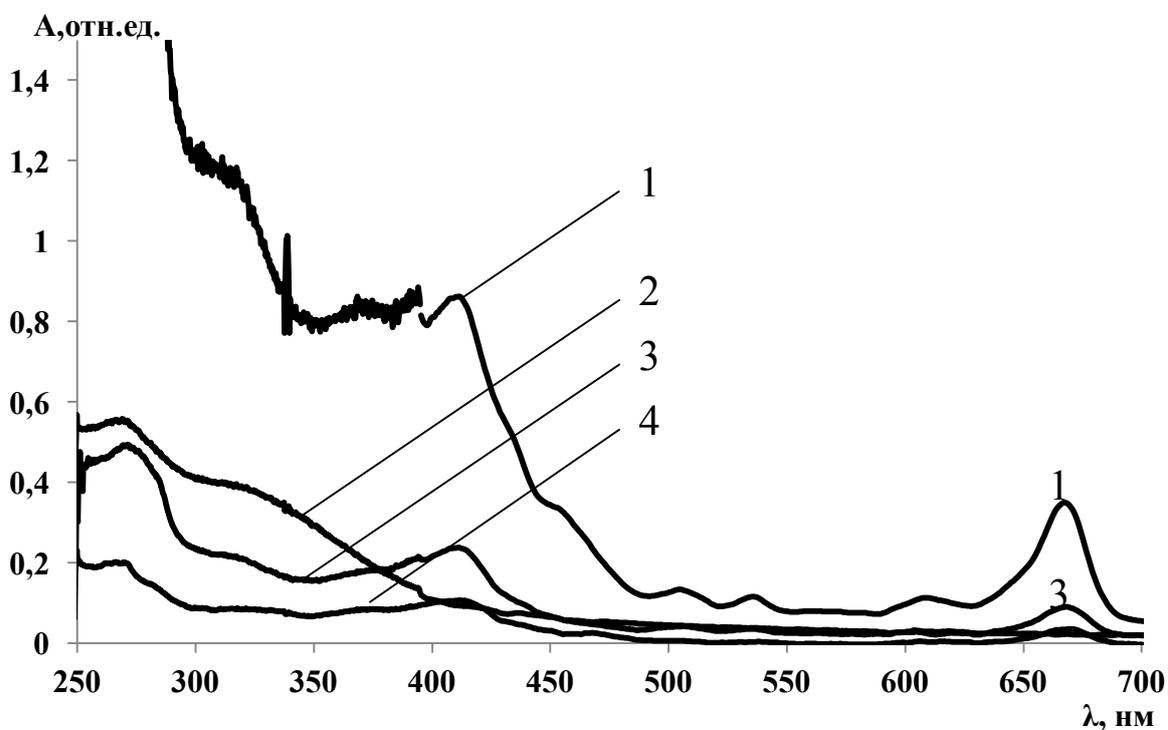


Рис. 3.1.1. Спектры оптического поглощения экстрактов травы донника лекарственного в различных растворителях: 1 – диэтиловым эфиром, 2 – водой, 3 – этилацетатом, 4 – изопропанолом

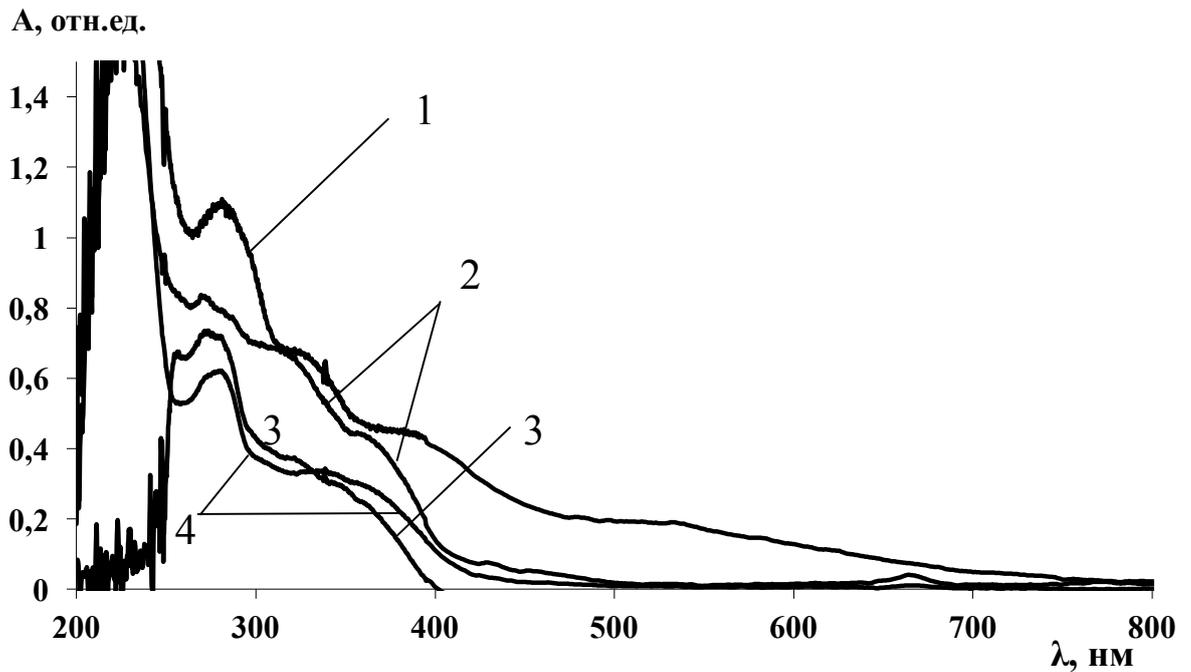


Рис. 3.1.2. Спектры оптического поглощения экстрактов побегов багульника болотного в различных растворителях: 1 – водой, 2 – диэтиловым эфиром, 3 – этилацетатом, 4 – изопропанолом

Спектрофотометрическое исследование позволяет качественно подтвердить наличие активных веществ в экстрактах растений. Известно [49, 88], что к общим свойствам кумаринов можно отнести их плохую растворимость в холодной воде и хорошую растворимость в органических растворителях – хлороформе, диэтиловом эфире, этиловом спирте и других. Методы спектрофотометрии позволяют идентифицировать по максимумам поглощения состав экстрактивных веществ [56, 57, 59]. На рис. 3.1.2 в электронных спектрах диэтилэфирного экстракта багульника болотного содержится большое количество полос поглощения, в том числе полоса при 265 нм, которая соответствует простым фенолам, полоса при 310 нм свидетельствует о наличии кумаринов, оксибензойных кислот, флавонов и полоса при 600-700 нм – о наличии хлорофилла. Такие же максимумы спектральных полос поглощения наблюдаются и для экстракта из донника лекарственного (табл. 3.1.1 и 3.1.2). Это свидетельствует о лучшей

экстракции биологически активных веществ из донника при использовании диэтилового эфира.

Таблица 3.1.1. Максимумы оптической плотности экстрактов багульника болотного в разных растворителях

растворитель	Измерения при длине оптического пути 10 мм		Измерения при длине оптического пути 1 мм	
	λ , нм	A, отн.ед.	λ , нм	A, отн.ед.
вода	269,3 315 379,9	1,135 0,725 0,457	-	-
диэтиловый эфир	245,9 264,1 280,7 Плечо 351,5 423,8 657,9	0,976 0,804 0,789 0,45 0,073 0,033	-	-
2-пропанол	267 Плечо 340,1	0,725 0,332	277,1 336,3	0,618 0,391
этилацетат	272,2 253,5	0,725 0,628	267,4 243,8 Плечо 332,4	0,103 0,150 0,055

В случае остальных растворителей, используемых для экстракции из выбранных лекарственных растений, видно, что интенсивность спектральных линий снижается у донника лекарственного, по сравнению с багульником болотным, это показано в таблицах 3.1.1 и 3.1.2.

Спектры этилацетатных экстрактов имеют полосы поглощения 267 нм и 284 нм с дополнительными максимумами 360 нм и 320 нм, соответственно, принадлежащие флавононам и флавонолам. Полосы 405 нм, 430 нм и 450 нм показывают присутствие аурионов. Также присутствуют полосы, подтверждающие присутствие хлорофилла, это полосы 532 нм и 505 нм, а также 665 нм, 650 нм и 650 нм.

На примере спиртового раствора кумарина рассмотрим разделение сложных спектров полос поглощения на основные индивидуальные полосы, которое произведено по Гауссу [31].

Таблица 3.1.2. Максимумы поглощения и значения оптической плотности в данных максимумах экстрактов донника лекарственного в разных растворителях. Измерения при длине оптического пути 10 мм

растворитель	λ , нм	A, отн.ед.
диэтиловый эфир	273	1,196
	317,5	0,836
	407,5	0,857
	Плечо 449	0,345
	502,7	0,131
	532,7	0,082
	664,5	0,337
этилацетат	267	0,483
	404,3	0,227
	663,6	0,083
2-пропанол	219,8	0,686
	Плечо 254,4	0,191
	405,1	0,009
	462,8	0,022
	660,4	0,027
вода	200,3	1,51
	260,2	0,542
	Плечо 312,4	0,4

Ниже представлен спектр (рис.3.1.3) [31] полос поглощения кумарина в координатах оптическая плотность – волновое число:

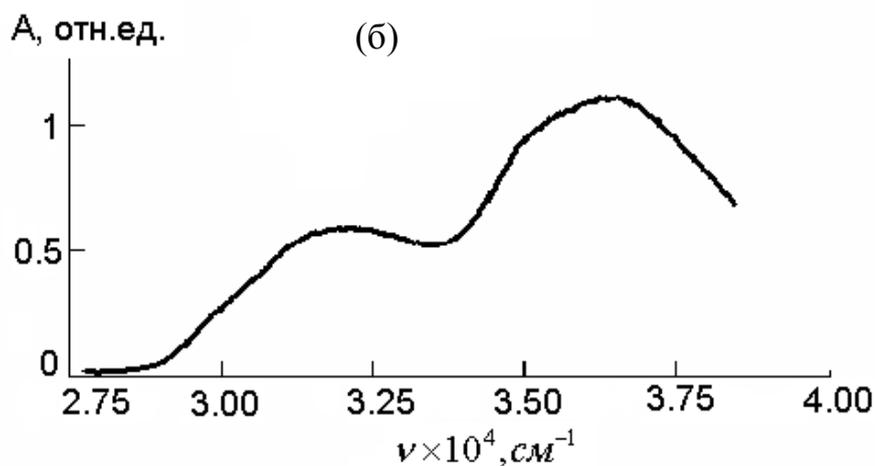


Рис. 3.1.3. Спектр поглощения спиртового раствора кумарина в координатах оптическая плотность – волновое число

Путем математических процедур определены⁴ индивидуальные полосы оптического поглощения в исходных спиртовых растворах кумарина [31].

На рис. 3.1.4 изображены гауссианы полос оптического поглощения кумарина в спирте.

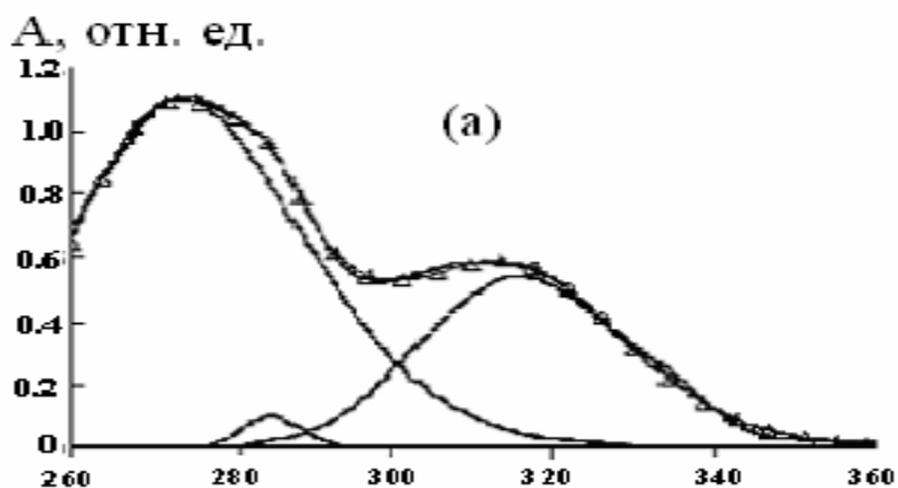


Рис. 3.1.4. Разложение суммарного оптического спектра кумарина на индивидуальные полосы: $\triangle\triangle\triangle$ - гауссовая форма линий, — - индивидуальные полосы.

⁴ Работа по расшифровке спектров поглощения выполнена при поддержке инженера каф. ХВЭиРЭ Танасюк Д.А.

Из рассмотрения рис. 3.1.4 следует, что в спектре кумарина [31, 49, 60] обнаружены две интенсивные полосы поглощения с $\lambda_{\max} = 274$ нм, $\lambda_{\max} = 315$ нм и третья полоса с $\lambda_{\max} = 285$ нм.

По такой же методике, как и для кумарина, разложили спектры оптического поглощения экстрактов травы донника лекарственного и побега багульника болотного в 40% этаноле в ограниченном спектральном интервале от 200 нм до 400 нм (рис. 3.1.5).

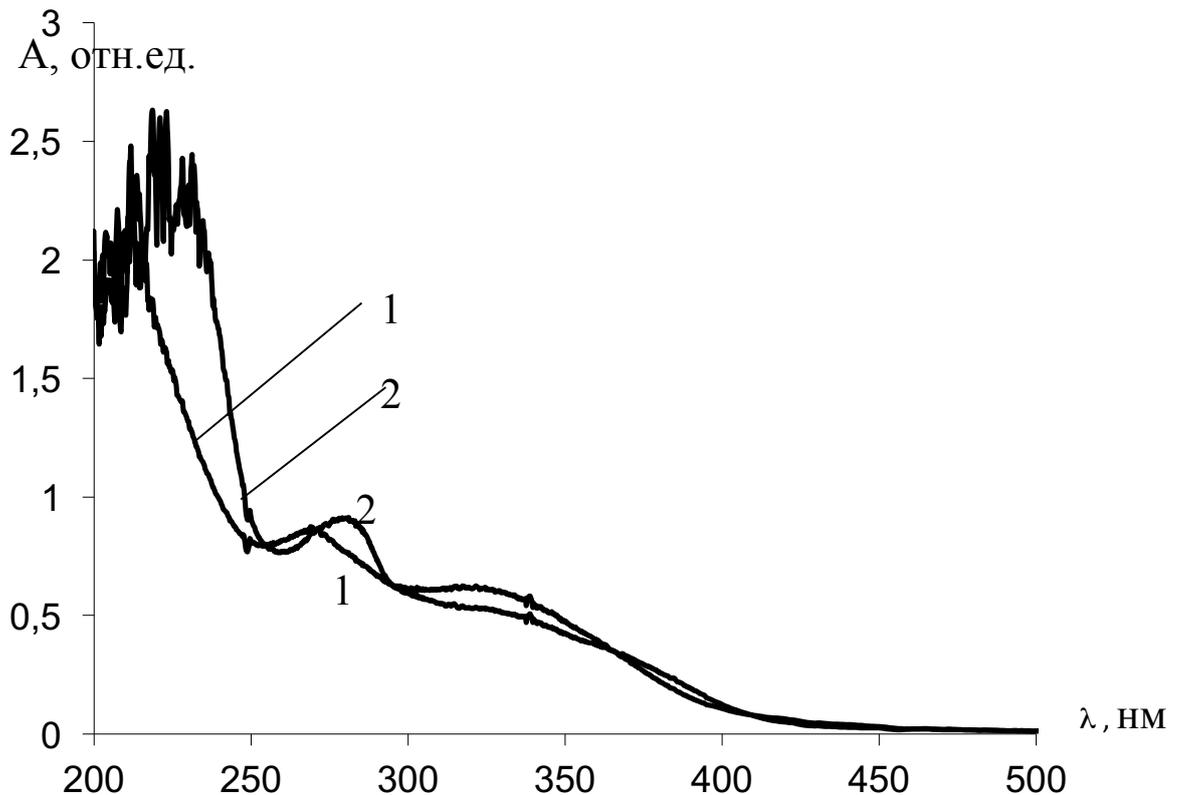


Рис. 3.1.5. Исходные спектры экстрактов багульника болотного и донника лекарственного в 40 % спирте: 1 – донник (10 мг/мл), 2 – багульник (4 мг/мл). Длина оптического пути 1 мм

Как видно, концентрация экстрагируемых биологически активных веществ в этанольном растворе неодинакова. Из этого мы делаем вывод, что активные вещества в багульнике экстрагируются полнее. Разложение на индивидуальные полосы произведено в волновых числах, но для наглядности представлены в координатах оптическая плотность-длина волны.

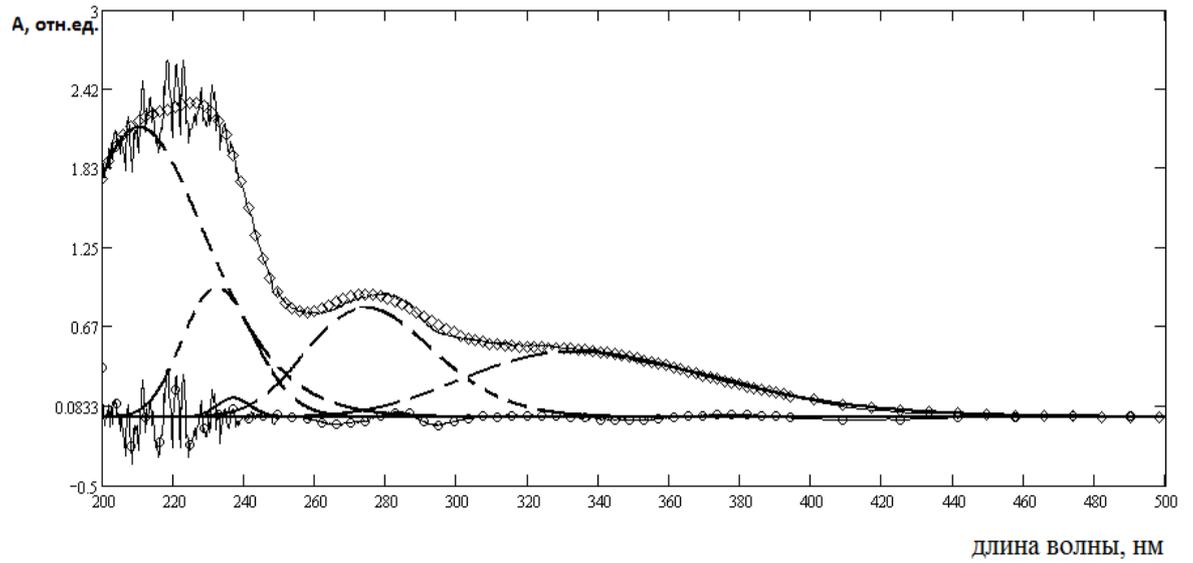


Рис. 3.1.6. Разложение оптического спектра багульника болотного на гауссову линию $\triangle \triangle \triangle$; - - - индивидуальные полосы

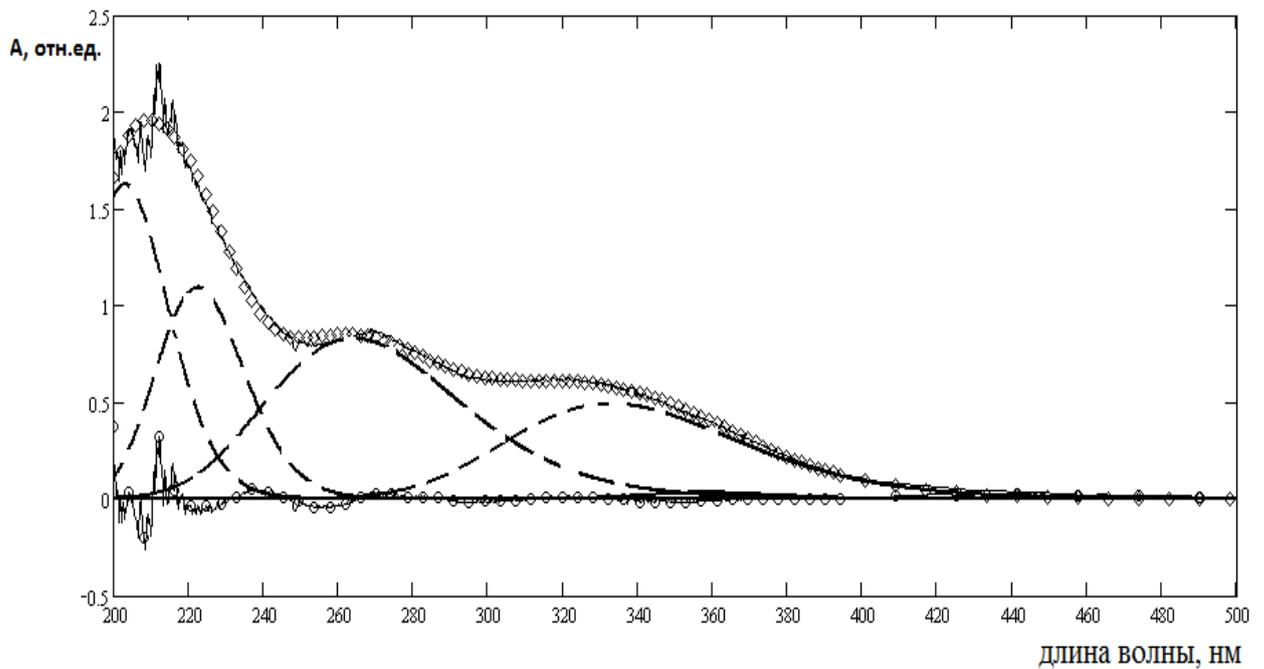


Рис.3.1.7. Разложение оптического спектра донника лекарственного на гауссовую линию $\triangle \triangle \triangle$; - - - индивидуальные полосы

Таблица 3.1.3 Спектральные характеристики донника лекарственного, с концентрацией 10 мг/мл растворителя, и багульника болотного, с концентрацией 4 мг/мл

Соединение	λ_{\max} , нм	Площадь под кривой, $S \times 10^5$	Полуширина, см^{-1}	Амплитуда
Простые фенолы и кумарин — багульник болотный	274 и 333	48	0,000336	0,805
		37	0,000437	0,483
— донник лекарственный	264 и 333	76	0,000519	0,828
		34	0,000391	0,490

При сопоставлении обработанных данных по доннику и багульнику наблюдается расхождение данных оптического спектра в максимумах исследуемых соединений. Максимум полосы, соответствующий простым фенолам, в багульнике смещен в длинноволновую область относительно максимума, который присутствует в доннике.

Однако максимумы поглощения, указывающие на присутствие кумарина, и в том и в другом лекарственном растении, совпадают. Из этого следует предположение, что производные кумарина одинакового состава.

Далее представлен спектр оптического поглощения муррайи метельчатой (рис. 3.1.8), приготовленный из высушенных листьев муррайи в 40%-ном этаноле. Измерения проведены при длине оптического пути 10 мм.

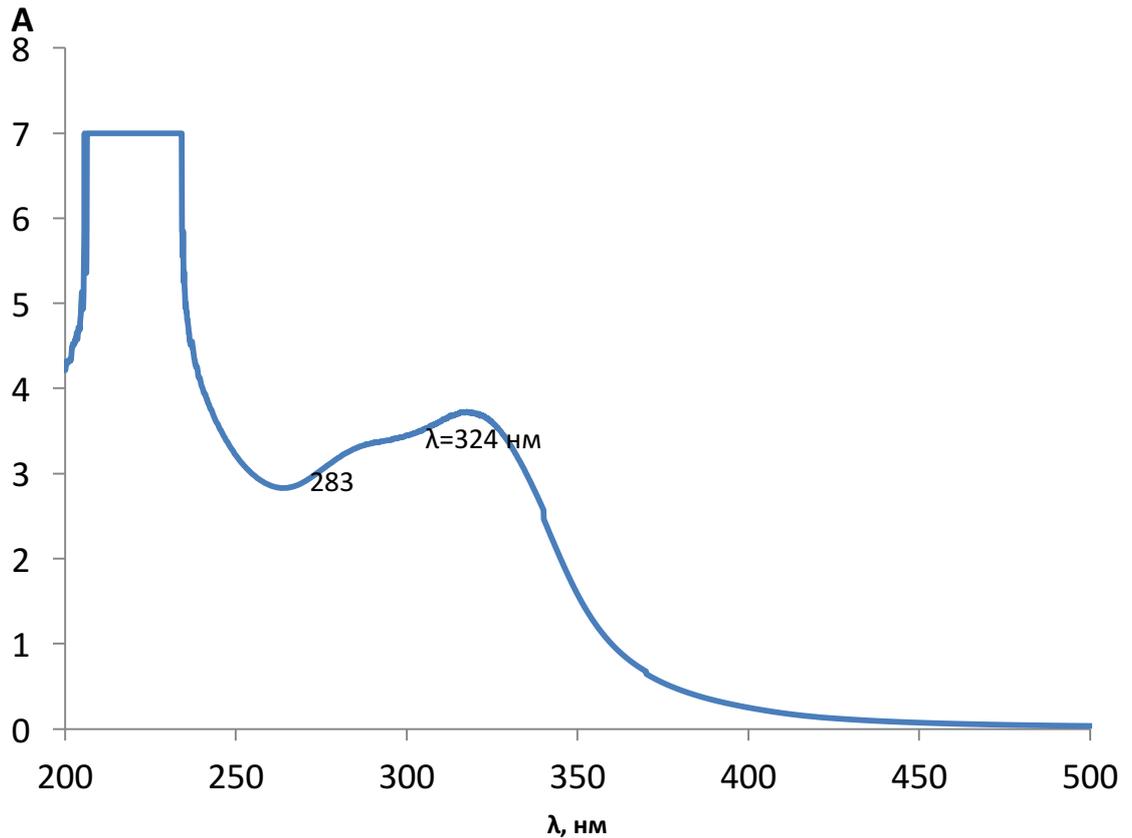


Рис. 3.1.8. Спектры оптического поглощения муррайи в 40% этаноле. Концентрация муррайи 50 мг/мл растворителя. Длина оптического пути 10 мм

На спектре отчетливо видны максимумы при длинах волн 283 нм и 324 нм, также наблюдаем плечо в области 350-380 нм. Наличие этих полос свидетельствует о присутствии простых фенолов, кумаринов, флавонов, оксибензойных кислот. Данные экстракты стабильны от времени хранения. При хранении спиртовых растворов в темноте 16 суток изменений в спектре поглощения не зарегистрировано.

Экстракцию побегов багульника болотного производили в спиртовых растворах с разным объёмным содержанием этанола, спектры оптического поглощения представлены на рис. 3.1.9. По экспериментальным данным максимумы оптического поглощения соответствуют фенолам (270 нм) и

кумаринам (310 нм). Самое интенсивное поглощение соответствует 40 % этанольному раствору багульника.

Ниже представлен график содержания активных компонентов в багульнике в зависимости от процентного содержания этанола. Для ауранов (391,4 нм) и флавонов (410 нм) содержание веществ не изменяется от процентного содержания этанола, для простых фенолов (282,1 нм) и кумаринов (331 нм) представлена полиномиальная зависимость второго рода, что свидетельствует о том, что процесс экстракции активных соединений в багульнике происходит различно, и что она полнее протекает при использовании 40%-ного этанола.

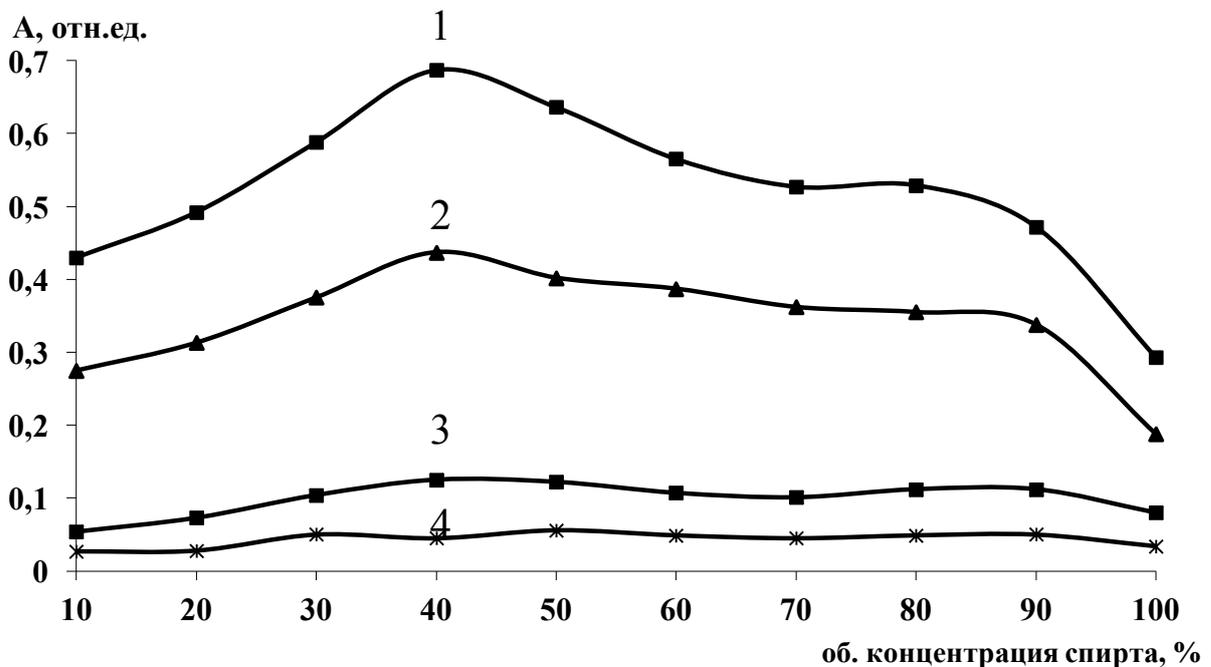


Рис. 3.1.9. Изменения оптической плотности при определённых длинах волн исходных водно-спиртовых экстрактов багульника болотного: 1 – 282,1 нм, 2 – 331 нм, 3 – 391,4 нм, 4 – 410 нм

В следующем разделе рассмотрим поведение экстрактов при воздействии ионизирующего излучения.

3.1.2. Спектрофотометрические исследования превращений экстрактов донника, багульника, муррайи в различных растворителях после воздействия ионизирующего излучения

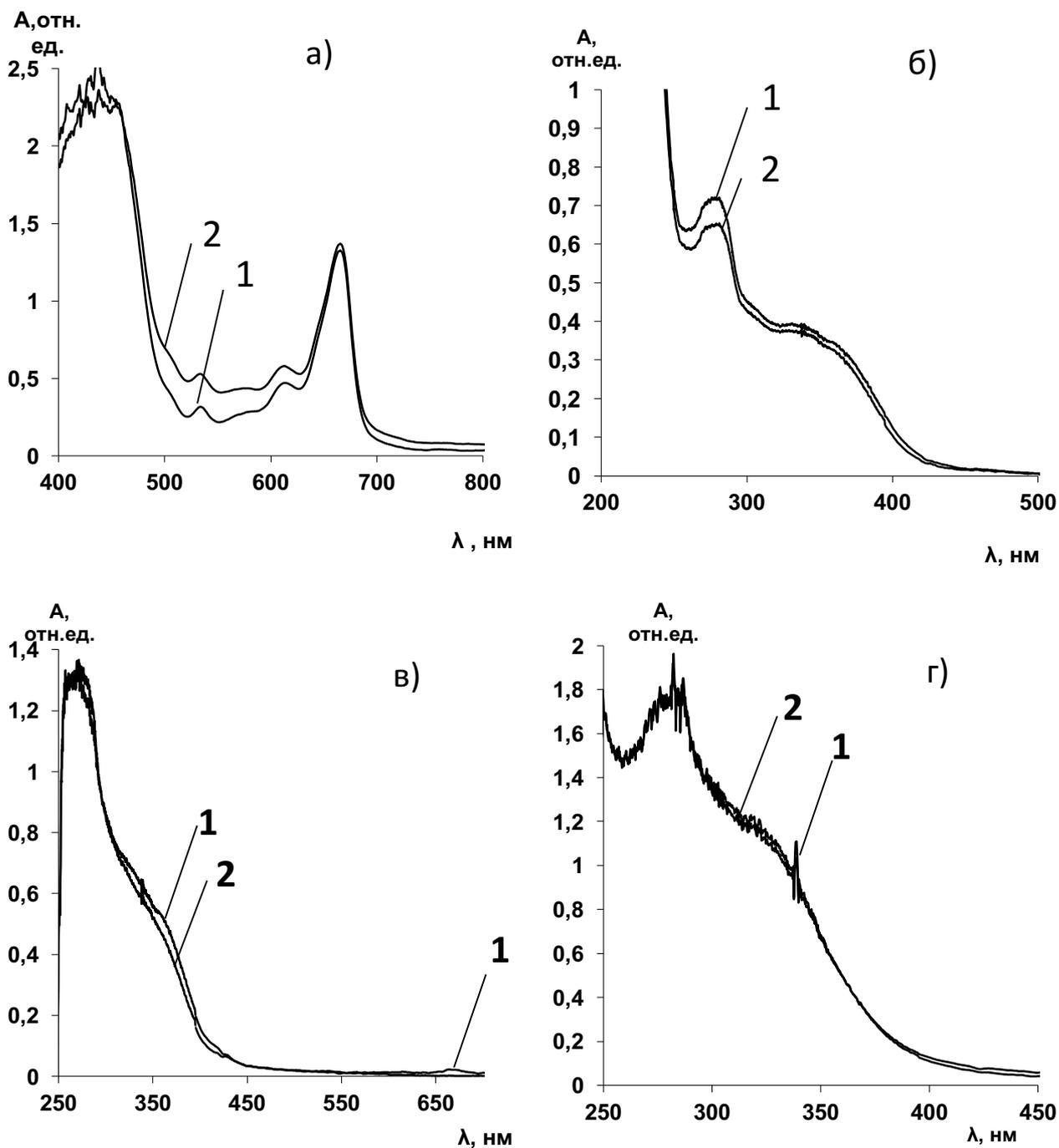


Рис. 3.1.10. Изменение спектров поглощения аэрированных экстрактов багульника болотного (1 – исходный, 2 – облученный $D=0.6$ кГр) в различных растворителях: а) - в диэтиловом эфире; б) - в изопропанолe; в) - в этилацетате; г) - в воде

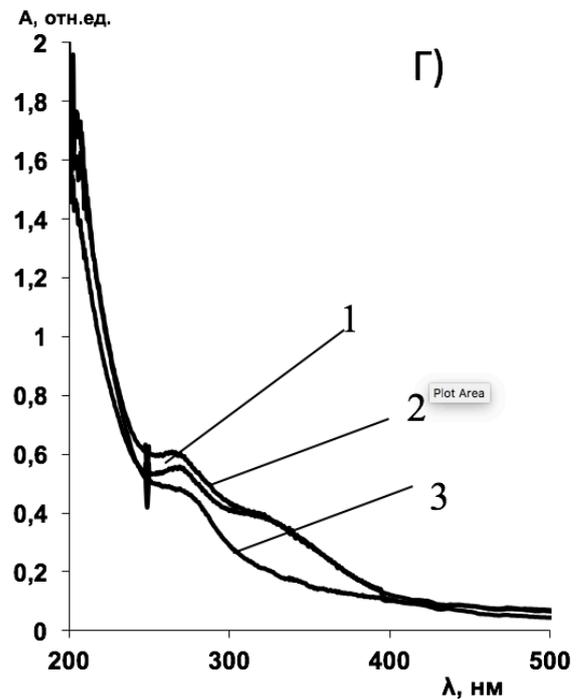
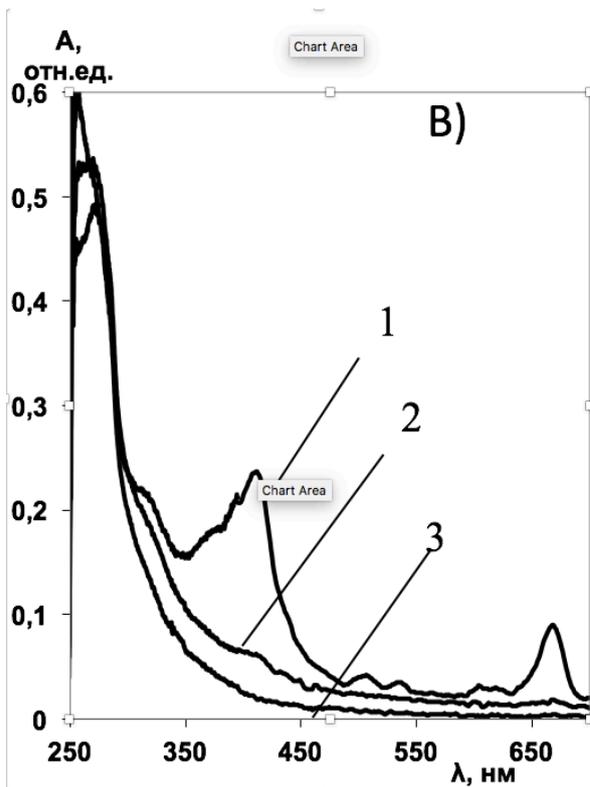
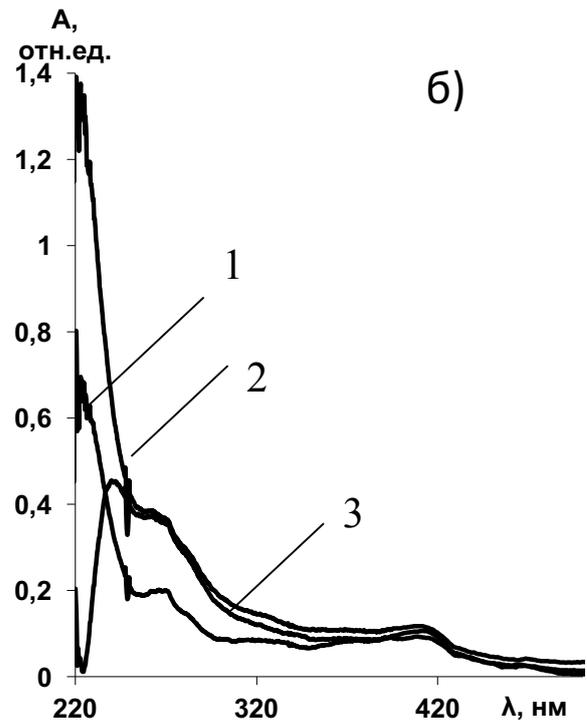
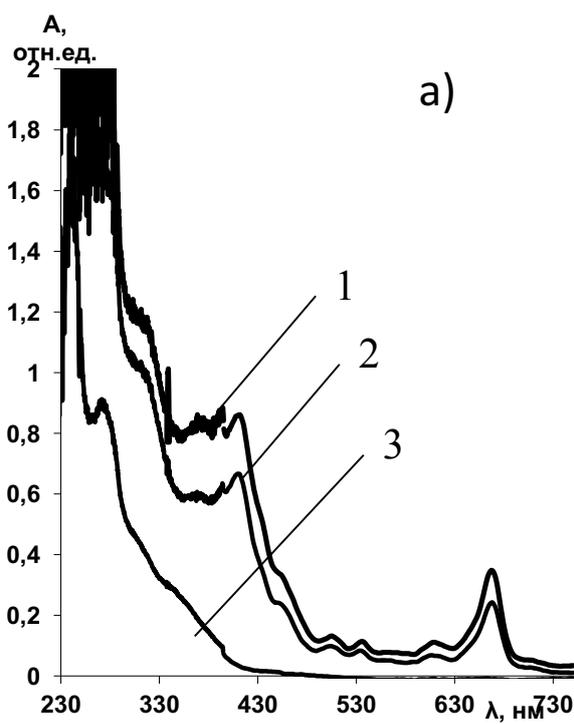


Рис. 3.1.11. Изменение спектров поглощения аэрированных экстрактов донника лекарственного 1 – исходный раствор, 2 – $D= 1,2$ кГр, 3 – $D= 6,6$ кГр в различных растворителях: а) - в диэтиловом эфире; б) - в изопропаноле; в)- в этилацетате; г) - в воде

Спектральное сравнение радиационной чувствительности багульника и донника показало, что багульник не сильно претерпевает изменения в данных растворителях в аэрированных условиях, в то время как донник лекарственный в диэтиловом эфире и этилацетате при $D=1,2$ кГр радиационно-чувствителен, при воздействии на систему $D=6,6$ кГр зарегистрирована убыль экстрагируемых веществ в диэтиловом эфире, этилацетате и воде. Интересно отметить что, в случае использования изопропанольного экстракта происходит увеличение интенсивности полосы оптического поглощения от дозы, соответствующая образованию новых продуктов. В облученных растворах полоса поглощения в водных растворах, отнесенная к кумаринам, при воздействии ионизирующего излучения $D = 6,6$ кГр исчезает, что подтверждает антиоксидантное свойство кумаринсодержащих экстрактов. Тогда как полоса поглощения при 270 – 275 нм, принадлежащая простым фенолам, практически не претерпевает изменений. Реакционная способность водных экстрактов связана с возможностью взаимодействовать с гидроксильными радикалами, генерированными в водных растворах под действием ионизирующего излучения.

Показано, что если экстракцию муррайи вести из свежесобранных листьев, то можно свидетельствовать о высокой радиационной чувствительности компонентов в экстракте. Зарегистрирована радиационная стойкость к действию ионизирующего излучения до дозы облучения 2 кГр. При воздействии ионизирующего излучения в дозе 17 кГр наблюдается расхождение всех экстрагируемых веществ (рис. 3.1.12).

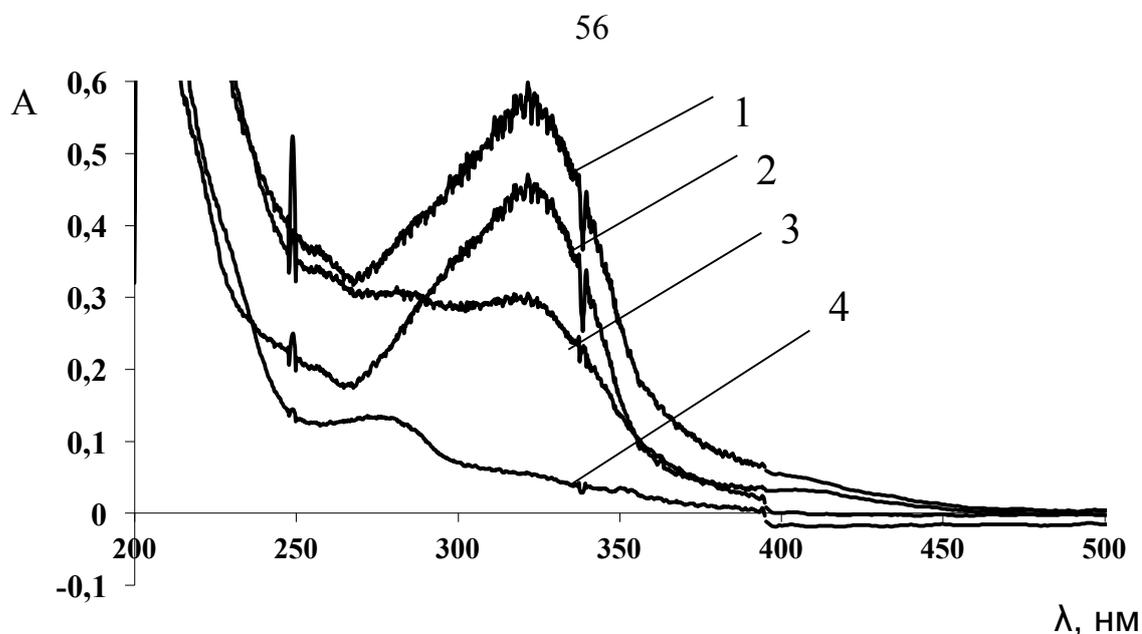


Рис. 3.1.12. Изменения спектров оптического поглощения экстрактов муррайи, приготовленных из свежесобранных листьев и высушенных образцов в 70% этаноле: 1 – исходный экстракт муррайи из сухих листьев, 2 – исходный экстракт муррайи из свежесобранных листьев, 3 – экстракт муррайи из высушенного сырья после облучения дозой 17 кГр в аэрированных условиях, 4 – экстракт муррайи из свежесобранных листьев после облучения дозой 17 кГр в аэрированных условиях.

3.1.3 Превращения экстрактов донника и багульника в 40% этаноле

Результаты исследования воздействия ионизирующего излучения на водно-спиртовые экстракты донника и багульника представлены на рис. 3.1.13. На рис. 3.1.13 видно, что значение оптической плотности при аналитических длинах волн 270 нм и 310 нм с увеличением дозы уменьшается и в экстрактах донника и для багульника. До 2 кГр явных изменений не зарегистрировано. Это подтверждается защитным влиянием на подобные системы молекулярного кислорода. В пост - радиационный период 40 % раствора в дозе 2 кГр (время после облучения составило 12 суток) нет изменений в спектрах оптического поглощения, система стабильна. Можно предположить, что наибольшая активность предполагаемых экстрактов багульника и донника наблюдается только для диапазона доз от 2-6 кГр.

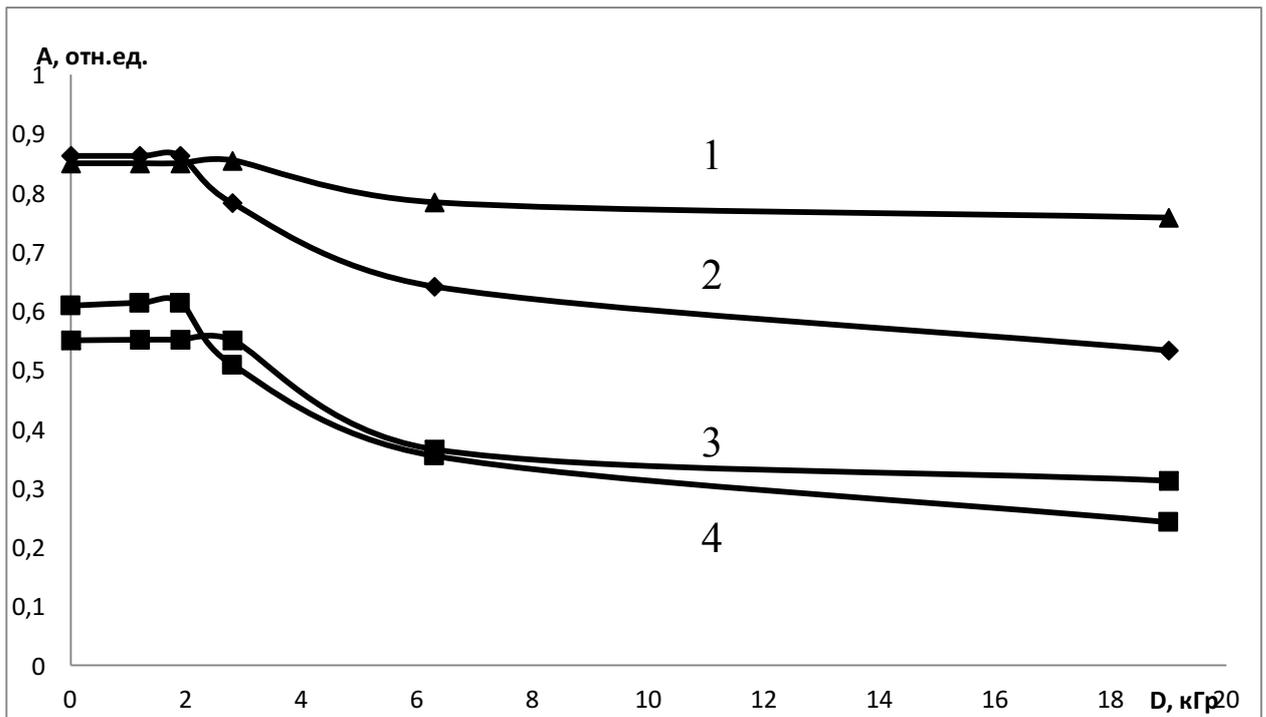


Рис. 3.1.13. Изменения оптической плотности при определённых длинах волн 270 нм и 310 нм азрированных растворов донника и багульника в 40% этаноле от дозы облучения. 1 – багульник (270 нм), 2 – донник (270 нм), 3 – багульник (310 нм), 4 – донник (310 нм).

Показано, что донник лекарственный наиболее радиационно - чувствителен, чем багульник.

Расчет степени превращения производился по формуле:

$$\frac{D_{\text{лисх.}} - D_{\text{лоблуч.}}}{D_{\text{лисх.}}} = X, \% \quad (3.1)$$

Расчет относительного изменения оптической плотности производился при аналитической длине волны 333 нм. В зависимости от концентрации сырья меняется поведение экстрактивных веществ, точнее относительный процент извлечения и расходования активного соединения.

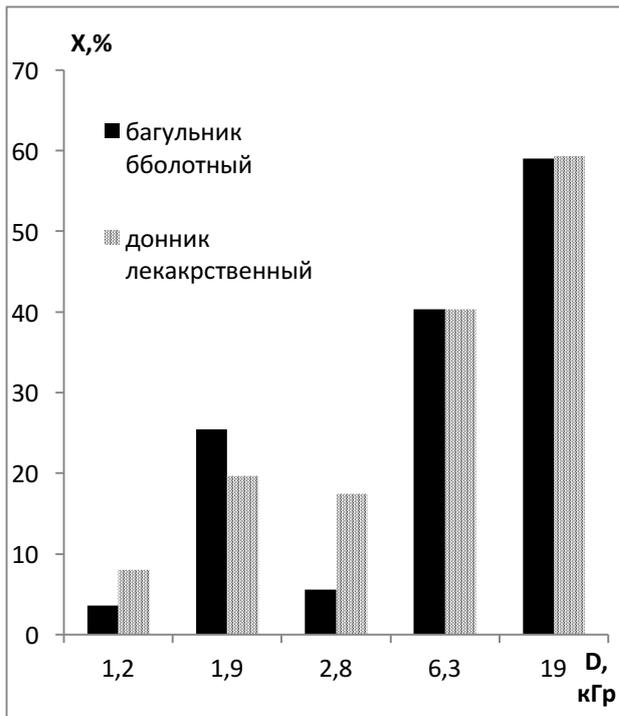


Рис. 3.1.14. Относительное изменение оптической плотности 40% водноспиртового экстракта багульника и донника при разных дозах облучения. Концентрация раствора 0,2 г на 100 мл

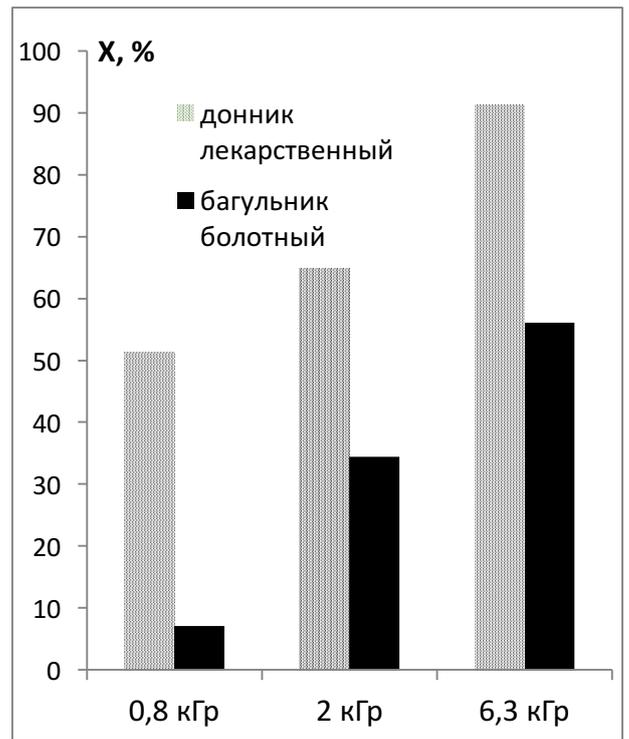


Рис. 3.1.15 Относительное изменение оптической плотности 40% водноспиртового экстракта багульника и донника при разных дозах облучения. Концентрация раствора 0,02 г на 100 мл

3.2 Исследование спектров флуоресценции экстрактов донника и багульника

Ниже представлены спектры флуоресценции водного раствора кумарина $c = 1 \times 10^{-4}$ моль/л до и после воздействия ионизирующего излучения.

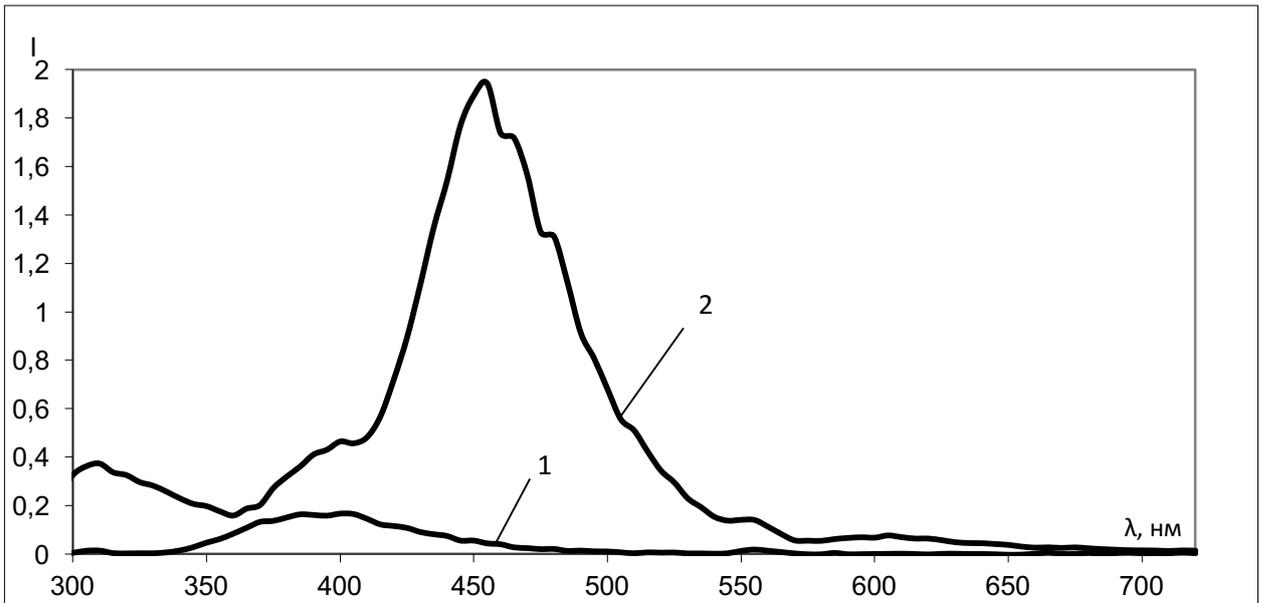


Рис. 3.2.1. Спектры флуоресценции водного раствора кумарина $c = 1 \times 10^{-4}$ моль/л: 1 - исходный раствор, 2 - после облучения $D = 0.36$ кГр. Возбуждение 280 нм

При облучении водного раствора синтетического кумарина с концентрацией $c = 1 \times 10^{-4}$ моль/л зарегистрирована полоса с максимумом флуоресценции при 455 нм. В результате радиационно-химических превращений образуется флуоресцирующее гидроксипроизводное кумарина. Об образовании гидроксипроизводной свидетельствуют данные по импульсному радиолизу [48].

Кривые флуоресценции донника лекарственного и кумарина аналогичны. Интенсивная полоса флуоресценции у донника объясняется присутствием в составе экстрактов биологически активных веществ. На рис. 3.2.2 представлены спектры флуоресценции при длине возбуждения 330 нм, которая принадлежит кумаринам и его производным.

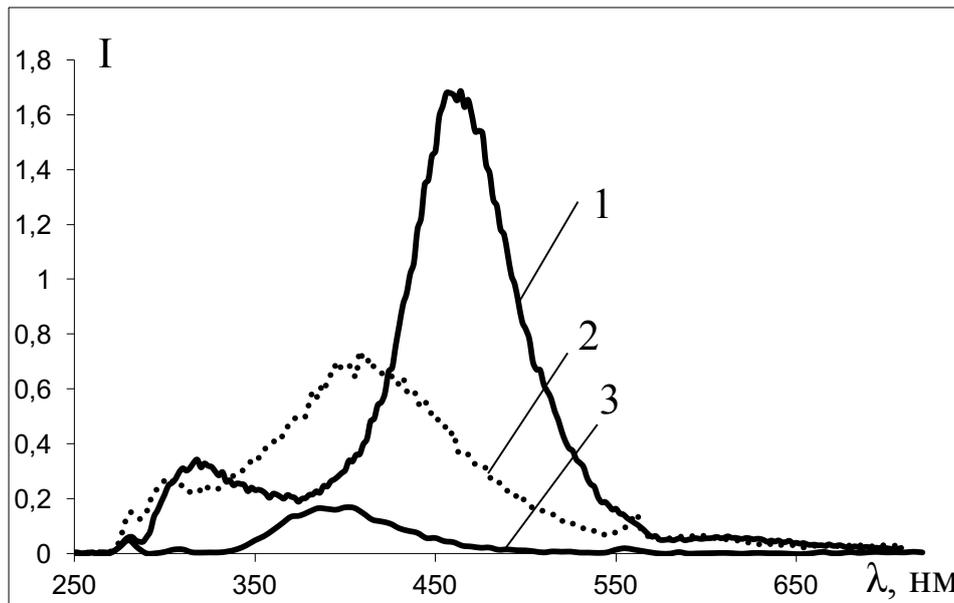


Рис. 3.2.2. Флуоресцентные кривые при возбуждении 280 нм, $c = 2 \times 10^{-4}$ мг/мл
1 - багульник болотный, 2 - донник лекарственный, 3 - кумарин

Зарегистрировано, что максимумы флуоресценции различны: в доннике 434–440 нм, в багульнике 458–464 нм.

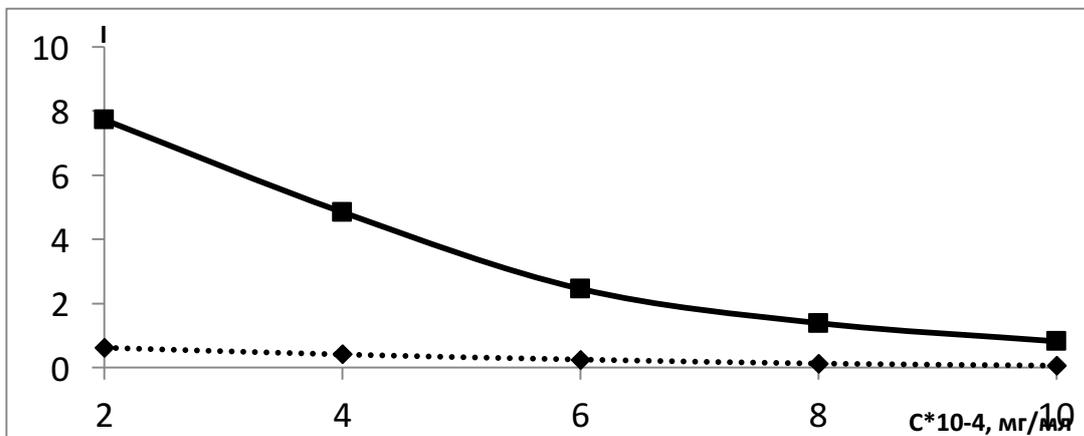


Рис. 3.2.3. Изменение интенсивности экстрактов багульника болотного при регистрации $\lambda_{\max} = 464$ нм и донника лекарственного при регистрации $\lambda_{\max} = 430$ нм в зависимости от изменения концентрации. Возбуждение 280 нм

Опираясь на справочные данные флуоресценция у кумарина не обнаруживается [61], это свидетельствует, что в доннике лекарственном содержится кумарин.

3.3 Хроматографическое исследование кумаринов и экстрактов донника, багульника и муррайи

3.3.1 Газо-жидкостная хроматография экстракта донника

Методом газо-жидкостной хроматографии (ГЖХ) исследован экстракт донника лекарственного, подготовленный к анализу по методике 2.2.2. Проанализировали суммарное содержание активных веществ в сырье.

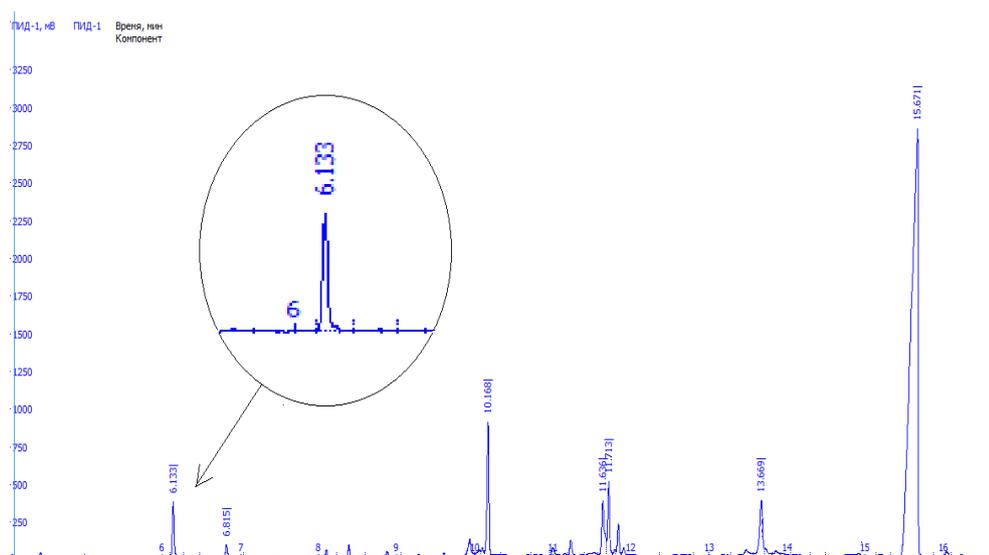


Рис. 3.3.1. Хроматограмма спиртового извлечения травы донника лекарственного

Для подтверждения присутствия кумарина в доннике лекарственном использовали метку раствора кумарина в CH_2Cl_2 . На основании данных сравнительного анализа времени удерживания пиков вещества на хроматограмме анализируемого и стандартного образца подтверждено содержание кумарина, его время удерживания 6,133 мин.

Концентрация кумарина в экстракте донника лекарственного по определенным данным равна 1.4×10^{-4} моль/л из рассчитанных на 5 г сухого порошка, растворённого в 100 мл этанола.

После воздействия на систему ионизирующего излучения повторно проанализировали состав активных веществ методом ГЖХ. Сравнение экспериментальных данных, представленных на рис. 3.3.2, наглядно

указывает какие вещества подверглись разложению после облучения системы D = 6,7 кГр.

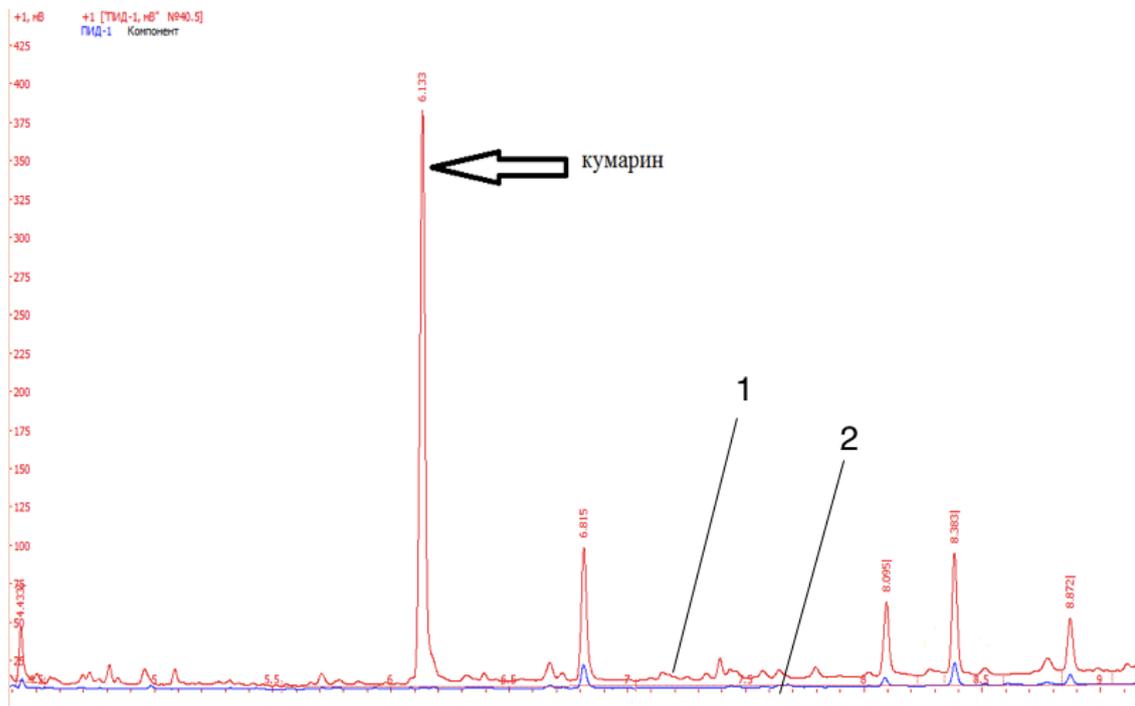


Рис. 3.3.2. Хроматограмма облученного D = 6,7 кГр спиртового извлечения донника лекарственного (синим цветом) – кривая 2 и необлученного спиртового извлечения травы донника лекарственного (красным цветом) – кривая 1 в деаэрированных условиях

Несмотря на убыль экстрактивных веществ, основной продукт, который подвергся полному разложению в результате воздействия ионизирующего излучения, является кумарин. А значит за протекторную активность выявленную у экстрактов донника лекарственного отвечает кумарин. Концентрация кумарина в суммарном пересчете составляет 2% от общей концентрации остальных веществ.

3.3.2 Определение концентрации кумарина в водно-этанольных экстрактах донника после воздействия ионизирующего излучения

Получено, что кумарин проявляет антирадикальные свойства, но эти свойства зависят от его концентрации в экстрактах донника лекарственного при использовании различных растворителей, чтобы результаты не изменялись в зависимости от условий хроматографирования в работе принято использовать внутренний стандарт [57]. В качестве внутреннего стандарта был взят нафталин, имеется четкое различие во временах удерживания раствора в хроматографической колонке, что представлено на рис. 3.3.3.

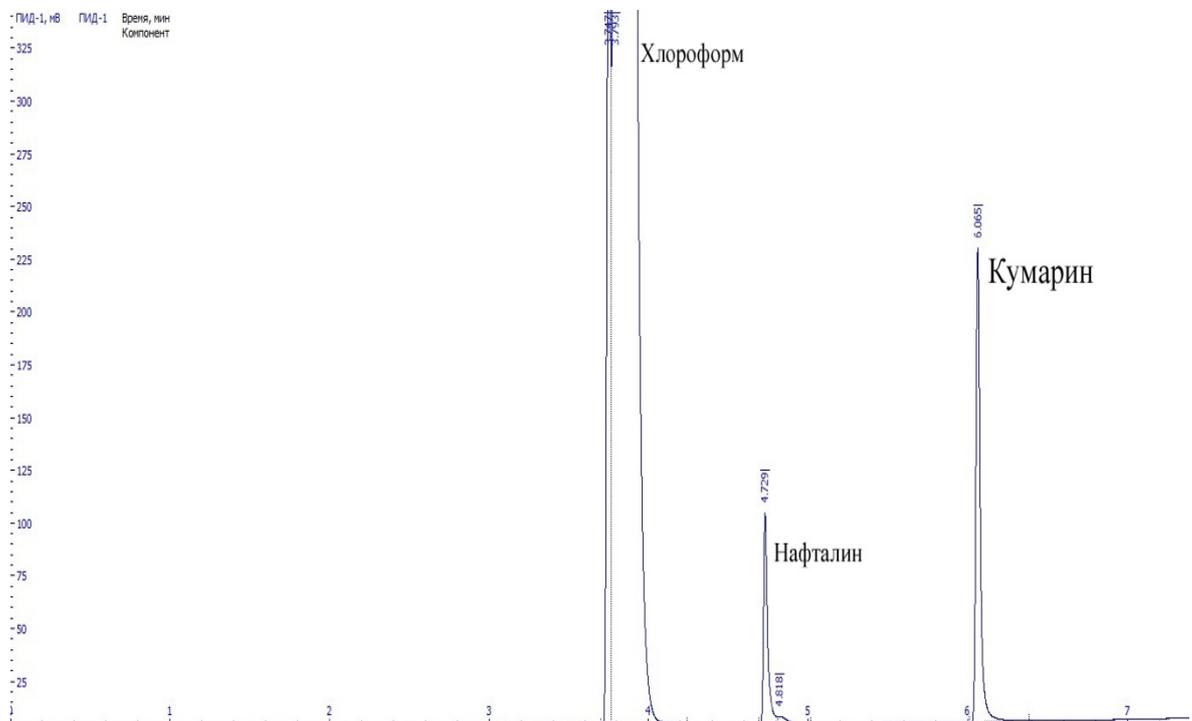


Рис. 3.3.3. Хроматограмма раствора кумарина в нафталине с хлороформом

Зависимость концентрации кумарина от соотношения площадей хроматографических пиков кумарина и стандарта-нафталина $\frac{S_{\text{кум.}}}{S_{\text{ст.}}}$ была построена (рис. 3.3.4).

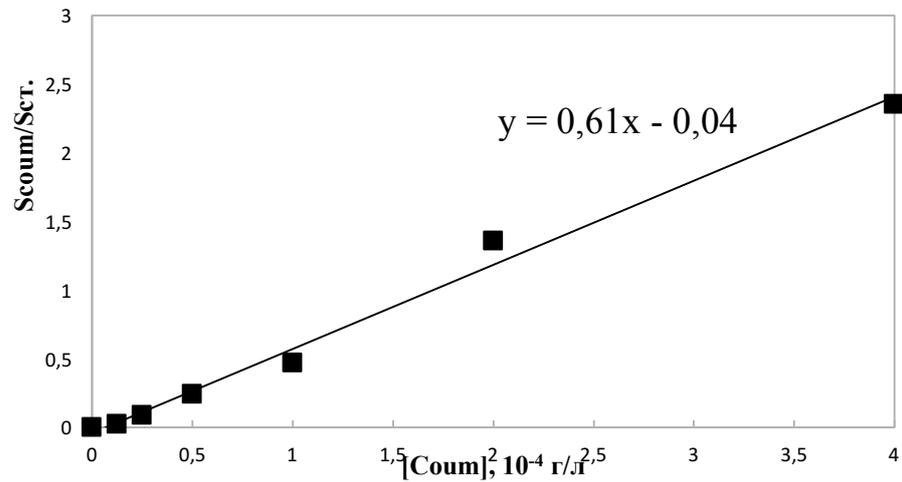


Рис. 3.3.4. Зависимость отношения площадей хроматографических пиков $\frac{S_{coum}}{S_{ct}}$ от концентрации кумарина

Аналогично построена калибровочная прямая зависимости концентрации дигидрокумарина от отношения площадей хроматографических пиков $\frac{S_{dihydroCoum}}{S_{ct}}$ (рис. 3.3.5).

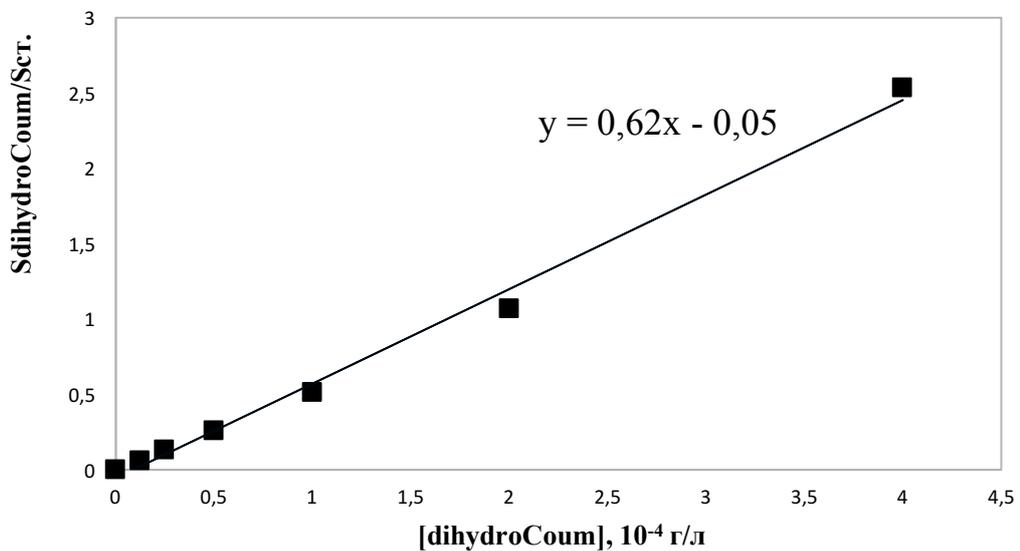


Рис. 3.3.5. Зависимость отношения площадей хроматографических пиков $\frac{S_{dihydroCoum}}{S_{ct}}$ от концентрации дигидрокумарина

Были сняты хроматограммы экстрактов донника с различным содержанием этанола. С учетом калибровочного графика с нафталином была получена зависимость концентрации кумарина от процентного содержания этилового спирта в системе (рис. 3.3.6).

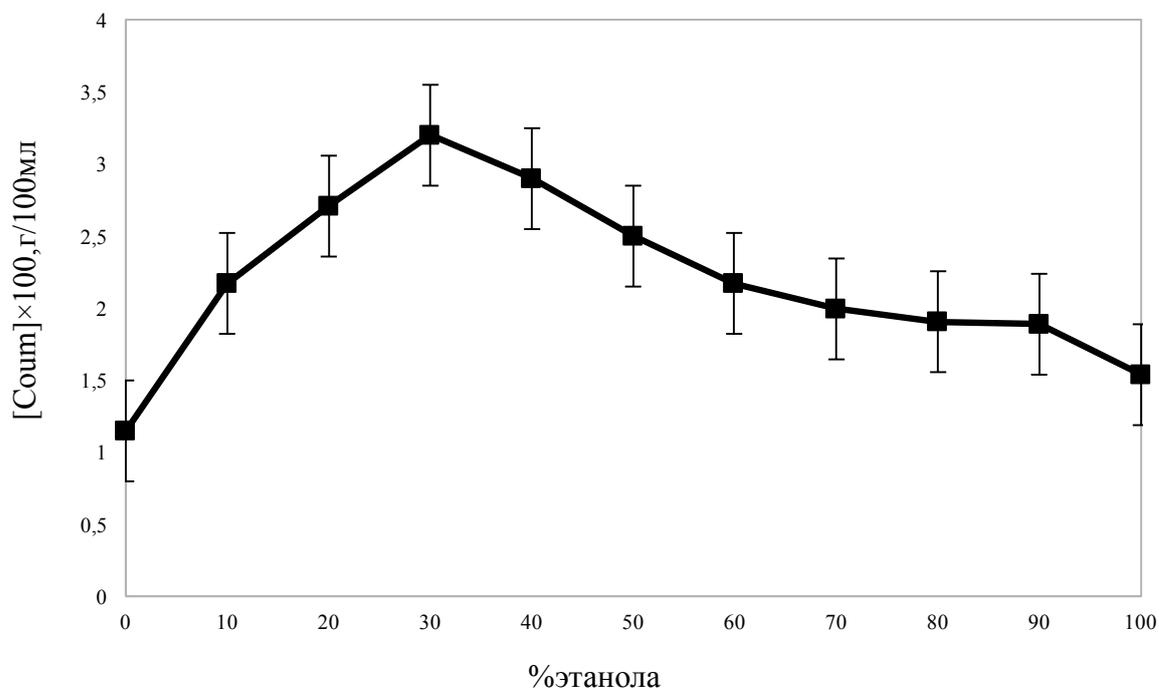


Рис. 3.3.6. Зависимость концентрации кумарина от процентного содержания этилового спирта в экстракте донника лекарственного

Полученный график показывает (рис. 3.3.6), что максимальная концентрация кумарина содержится в 30% – 40 % -ных спиртовых растворах донника.

Установлено, что использование в качестве экстрагента этилового спирта в концентрациях от 20% до 70% позволяет достигать максимального содержания кумарина в извлечениях.

Аналогично был построен график содержания дигидрокумарина в доннике (рис. 3.3.7).

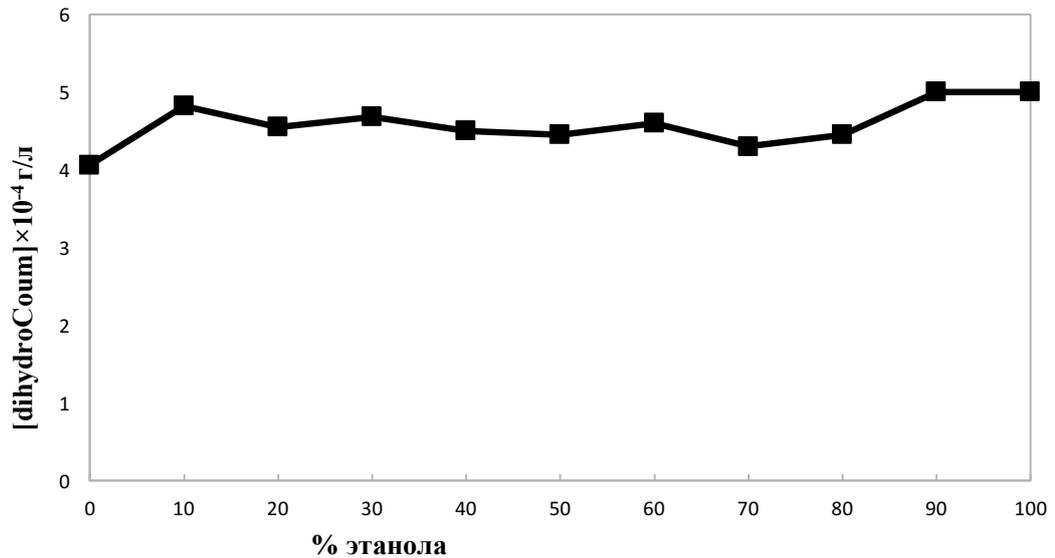


Рис. 3.3.7. Зависимость концентрации дигидрокумарина от процентного содержания этилового спирта в системе

Концентрация дигидрокумарина в экстракте донника лекарственного практически не зависит от концентрации экстрагента и равна $(4 - 5) \times 10^{-4}$ г/л.

Объектами дальнейшего исследования послужили 30%, 50% и 70% - ные этанольные экстракты донника лекарственного, чтобы проследить изменения концентрации кумарина после радиолиза. Перед облучением образец объемом 25 мл экстракта донника лекарственного помещали в стеклянные ампулы, деаэрировали. Далее воздействовали на систему ионизирующим излучением $D=6,3$ кГр на установке РХМ- γ -20. Далее облученный раствор обработали по методике 2.2.2. После хроматографирования были получены следующие данные (рис. 3.3.8 - 3.3.10).

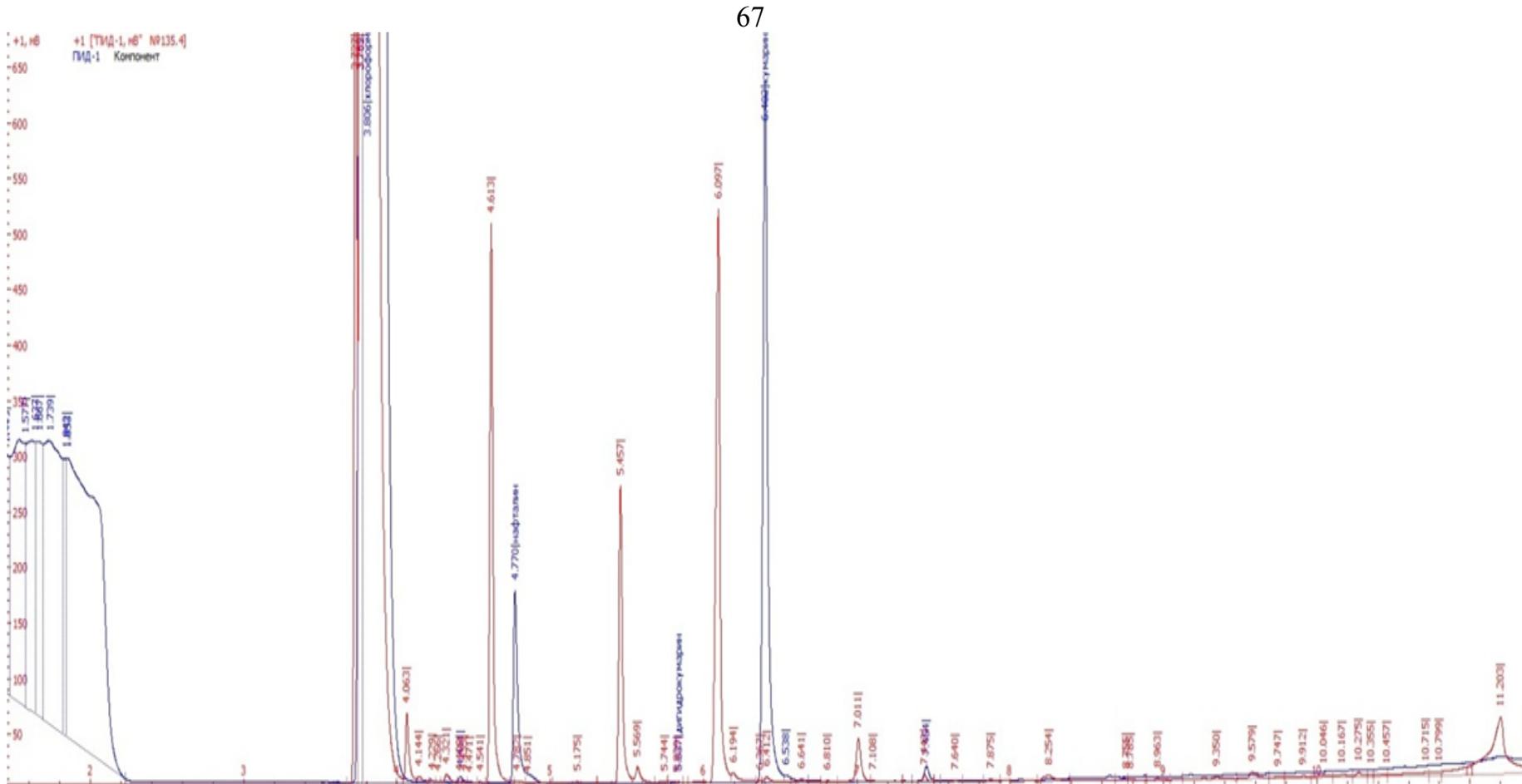


Рис. 3.3.8. Хроматограмма 30%-ного экстракта донника лекарственного до (синий) и после (красный) облучения.

D = 6.3 кГр

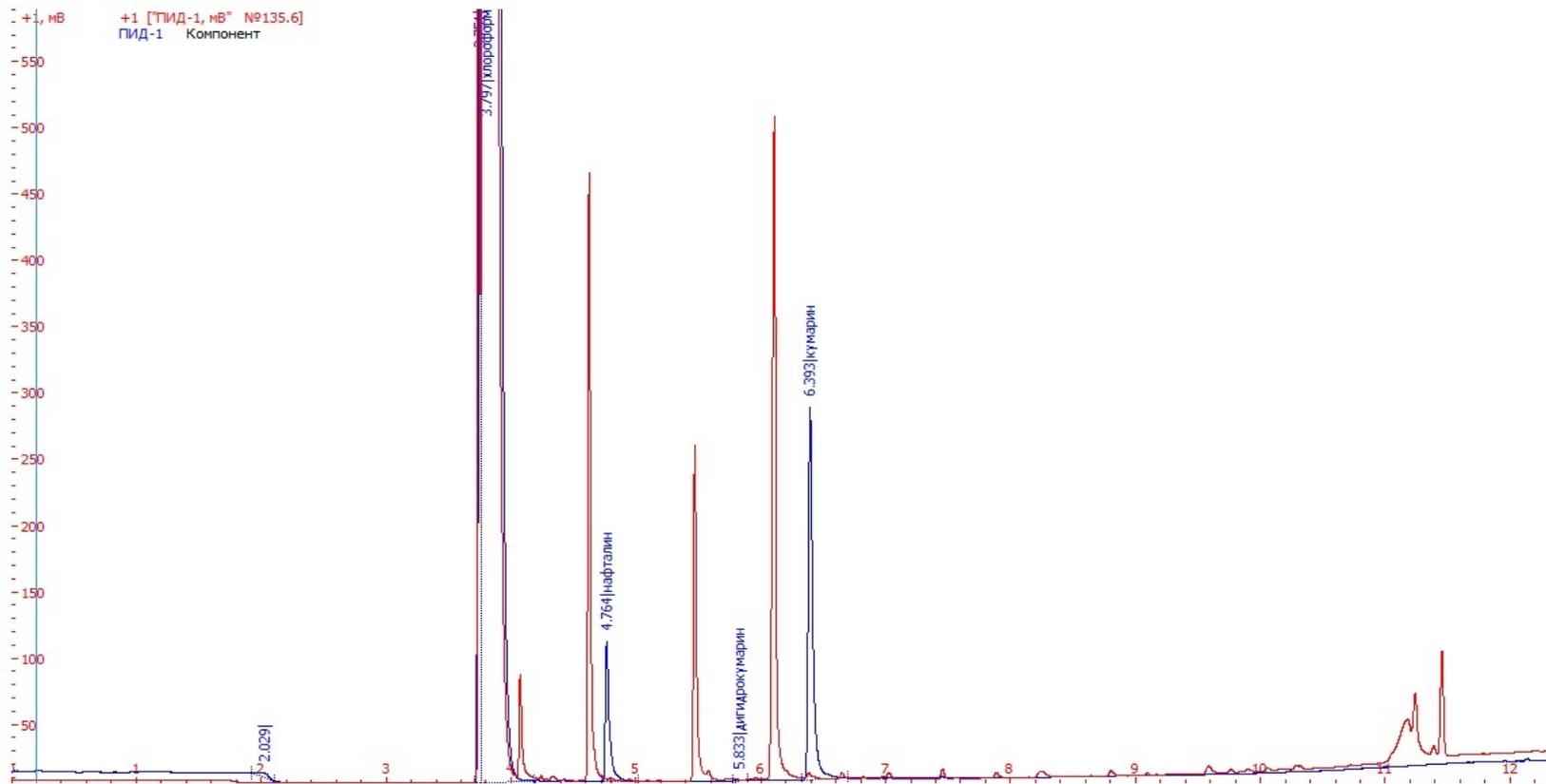


Рис. 3.3.9. Хроматограмма 50%-ного экстракта донника лекарственного до (синий) и после (красный) облучения.

D = 6.3 кГр

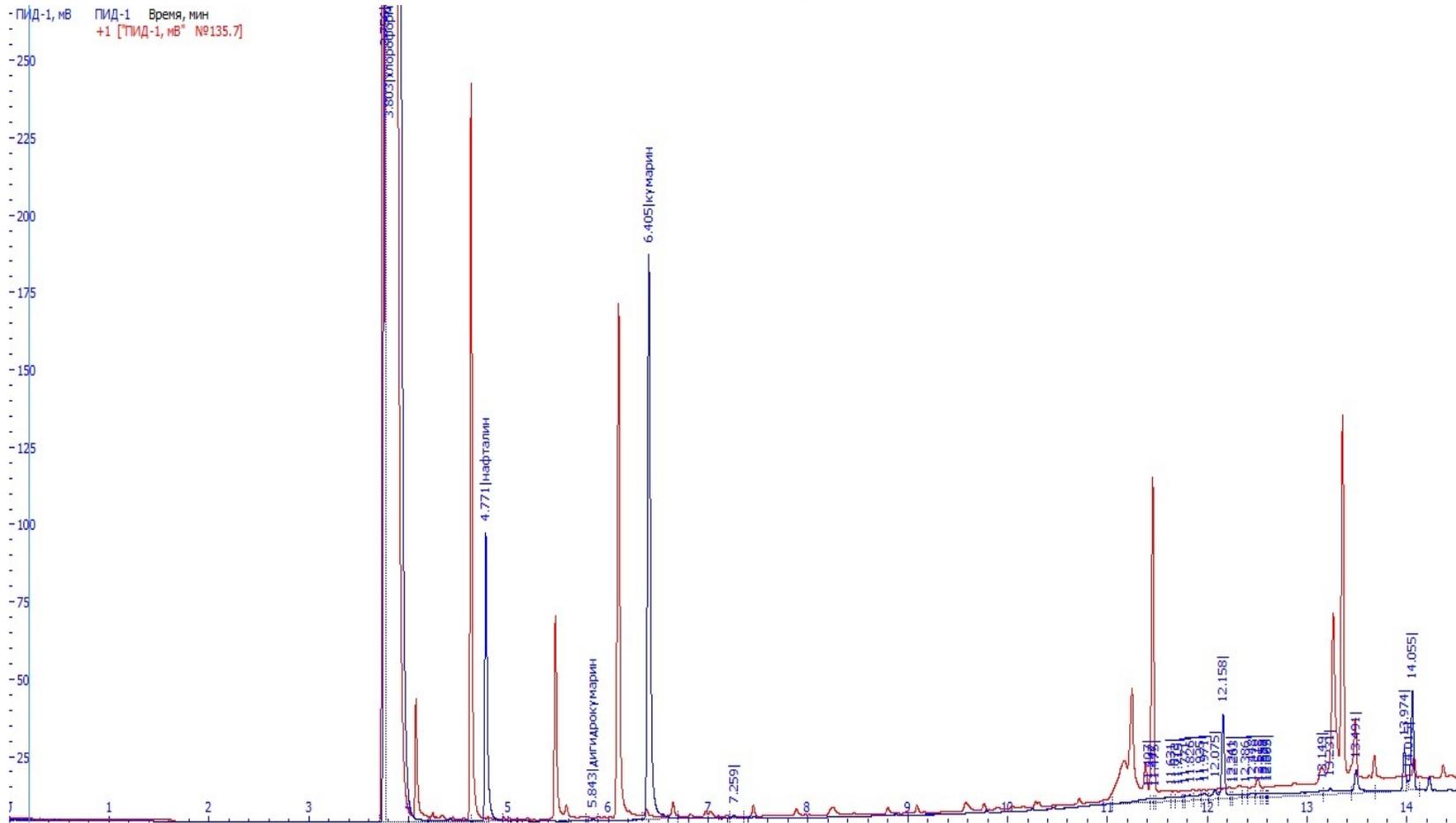


Рис. 3.3.10. Хроматограмма 70%-ного экстракта донника лекарственного до (синий) и после (красный) облучения
D = 6.3 кГр

С учётом калибровки с нафталином были рассчитаны концентрации облучённых растворов кумарина, которые представлены в таблице 3.3.1.

Таблица 3.3.1. Изменение концентраций кумарина с различным содержанием вода-спирт в зависимости от дозы

Содержание спирта в системе, % объем.	[Co _{um}], 10 ⁻⁴ , D = 6 кГр	Исходный [Co _{um}], 10 ⁻⁴	Степень превращения Co _{um} , %
30	2,3	3,2	28,1
50	2,4	2,5	4
70	1,6	2	20

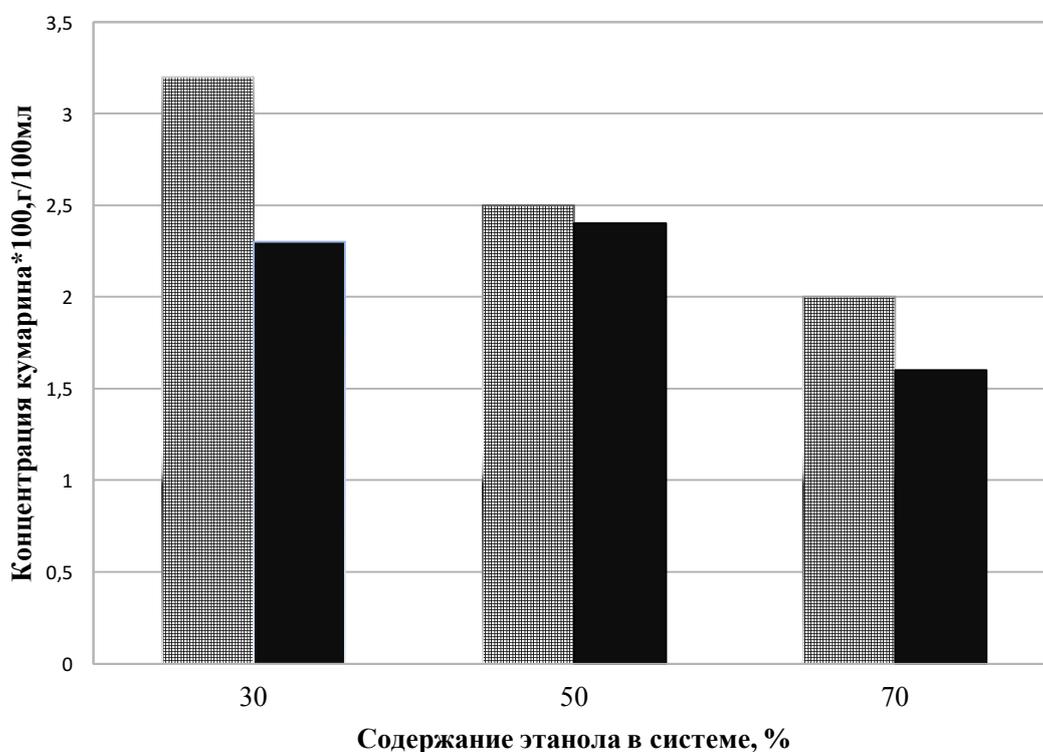


Рис. 3.3.11. Изменения концентрации кумарина до облучения (“клетка”) и после (сплошная заливка) в зависимости от содержания этанола в системе

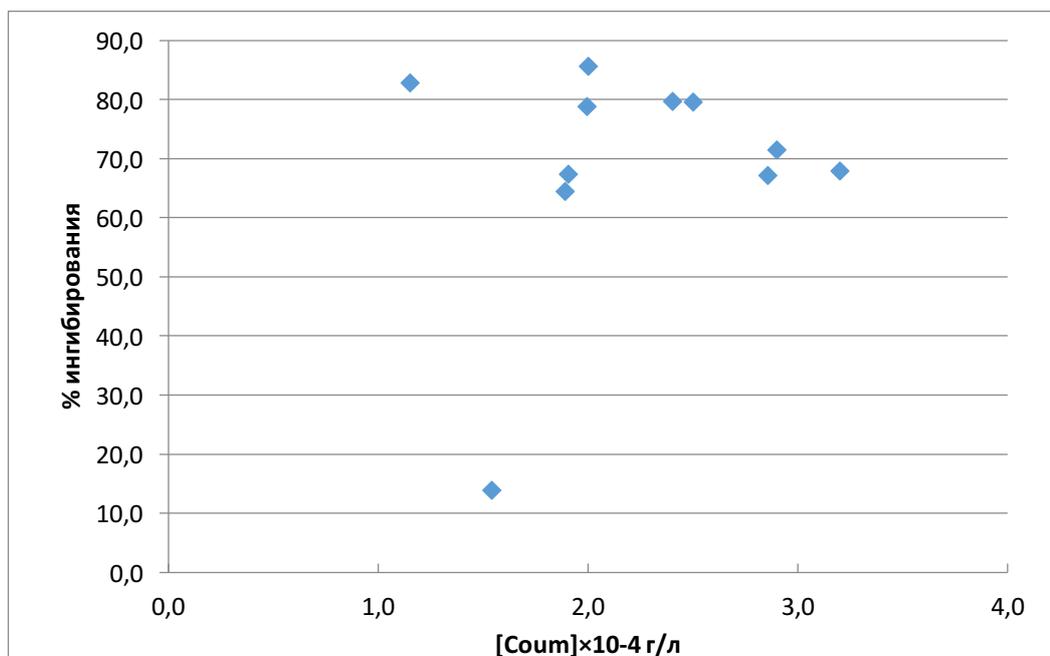


Рис. 3.3.12. Зависимость эффекта ингибирования ДФПГ донником (раздел 3.4 данной работы) от концентрации кумарина в доннике лекарственном

Иллюстрация (рисунок 3.3.12) не показывает четкой зависимости антирадикальной активности от концентрации кумарина, поэтому дальнейшие исследования будут направлены на изучение реакционной способности кумарина с углерод-центрированными радикалами.

Для детального изучения механизма радиационно-химического превращения кумарина с углеродцентрированными радикалами в системе использовали метод ВЭЖХ, об антирадикальной активности других компонентов – эскулетина и эскулина в экстракте багульника и муррайи будем вести косвенными методами: в реакции с углеродцентрированными радикалами хроматографически оценивать по выходу ацетальдегида с использованием гидразона, в реакции с супероксид анион-радикалами спектрофотометрически с использованием нитросинего тетразолия хлорида.

3.3.3 Применение высоко - эффективной жидкостной хроматографии для анализа химических превращений кумарина с углеродцентрированными радикалами, инициированными облучением

Подбор условий для проведения ВЭЖХ анализа кумарина

По литературным данным кумарин плохо растворим в воде. Мы исследовали водный раствор кумарина с 5% содержанием этанола, тем самым преследуя две задачи: увеличить растворимость кумарина и смоделировать механизм воздействия ионизирующего излучения на систему.

Экспериментальные данные хромато-спектрометрического исследования раствора кумарина представлены на рис. 3.3.13.

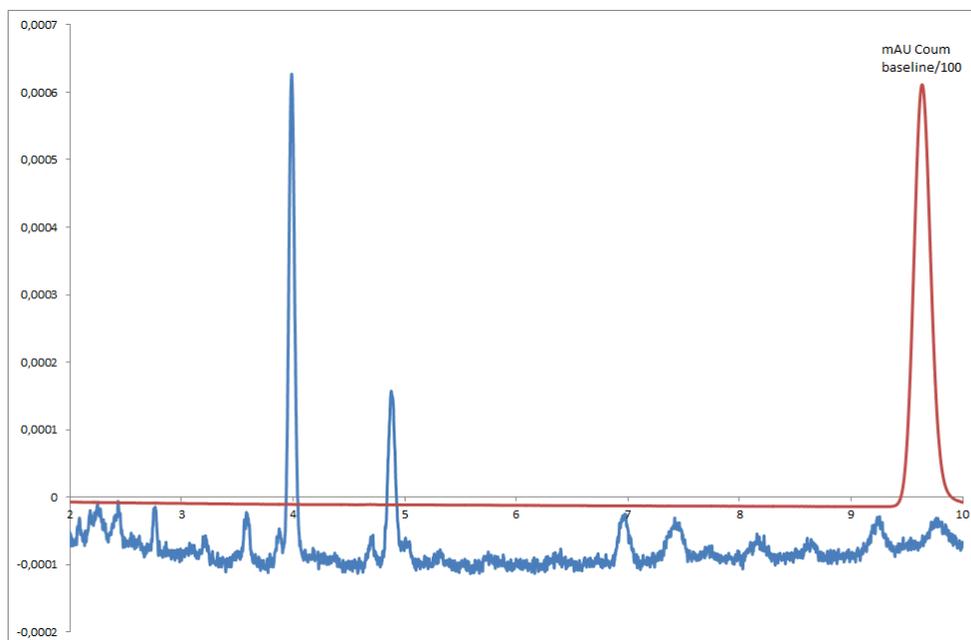


Рис. 3.3.13. Хроматограмма водного раствора с 5% добавлением этанола кумарина необлученного (красным цветом) и облученного (синим цветом) 6,7 кГр. На хроматограмме интенсивность необлученного кумарина при уменьшении в 100 раз

Анализ данных (рис. 3.3.13) показал расхождение кумарина и образование новых продуктов радиационно-химического превращения. Время удерживания кумарина составляет 9,6 мин. После облучения $D=6,7$ кГр

кумарин расходуется, наблюдается образование новых продуктов с временами удерживания 3,97 мин и 4,9 мин. Спектральные кривые продуктов имеют одинаковую полосу поглощения 272 нм. Предположительно, эти соединения относятся к классу фенольных соединений, более гидрофильные по своей природе.

Для качественного разделения раствора кумарина проводился подбор условий для проведения хроматографического анализа (рис. 3.3.14).

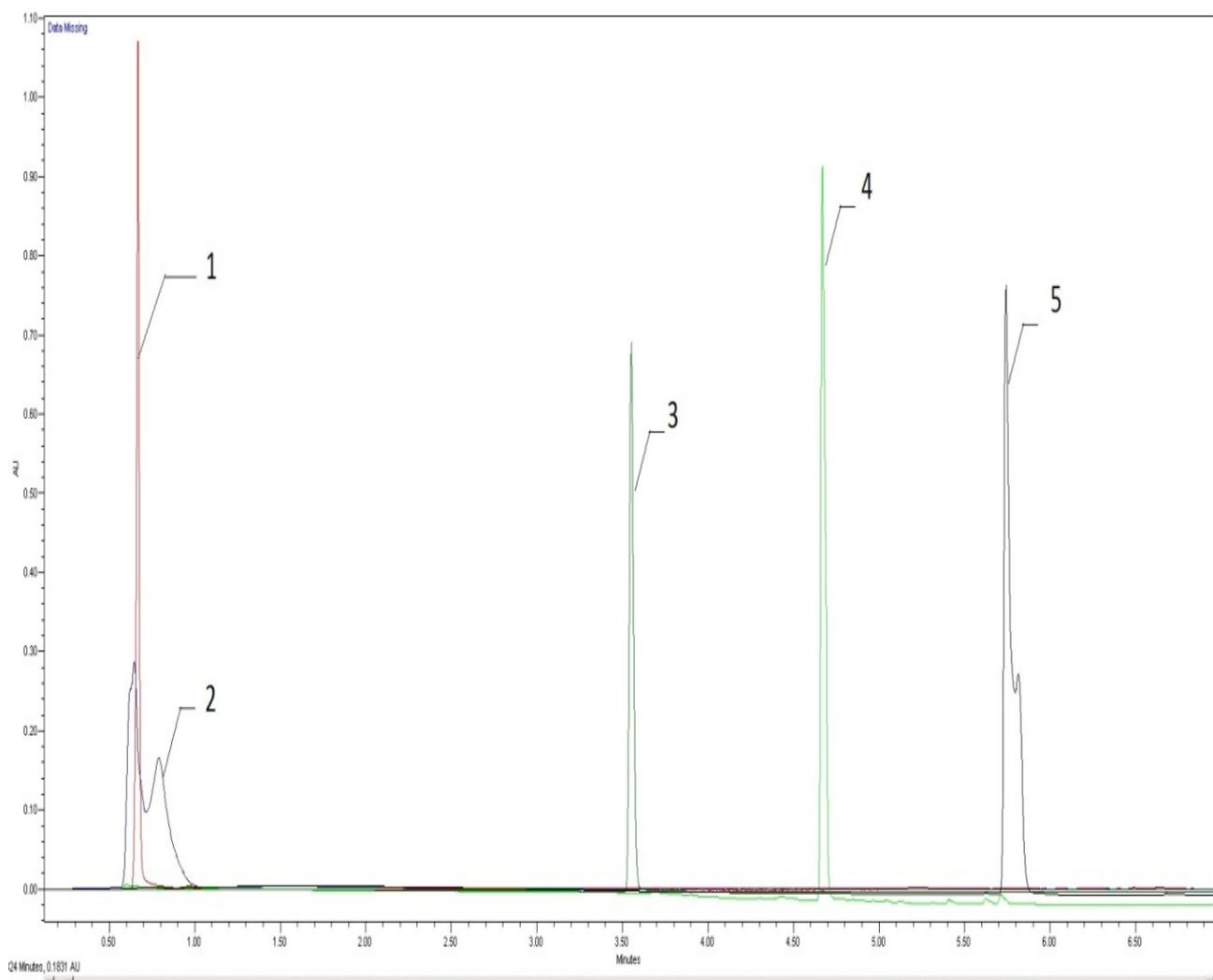


Рис. 3.3.14. Подбор условий хроматографирования градиентный режим. Длина волны детектирования 270 нм

Наш оптимальный режим хроматографирования соответствует кривой под номером 3.

1		2		3		4		5	
Поток 0,4мл/мин		Поток 0,2 мл/мин		Поток 0,4 мл/мин		Поток 0,4мл/мин		Поток 0,2 мл/мин	
H ₂ O	CH ₃ CN	H ₂ O с 0,1% H ₃ PO ₄	CH ₃ CN	H ₂ O	CH ₃ CN	H ₂ O с 0,1% H ₃ PO ₄	CH ₃ CN	H ₂ O с 0,1% H ₃ PO ₄	CH ₃ CN
мин %	%	мин %	%	мин %	%	мин %	%	мин %	%
0,0 95	5	0,0 100	0	0,0 95	5	0,0 100	0	0,0 100	0
2,0 60	40	2,0 98	2	2,0 60	40	2,0 98	2	2,0 98	2
2,2 60	40	3,0 50	50	2,2 60	40	3,0 50	50	3,0 70	30
6,0 40	60	3,8 50	50	6,0 40	60	3,8 50	50	3,8 50	50
7,0 0	100	4,0 0	100	7,0 0	100	4,0 0	100	4,0 0	100
17,0 0	100	9,0 0	100	17,0 0	100	9,0 0	100	9,0 0	100
18,0 95	5	9,2 100	0	18,0 95	5	9,2 100	0	9,2 100	0

На рис. 3.3.14 приведены усредненные данные. Каждый эксперимент проводился неоднократно. После каждого ввода пробы колонка промывалась 100 % CH₃CN в течение 10 минут, тем самым колонку приводили в равновесие и исключили возможность загрязнения компонентами предыдущего эксперимента.

Применение градиентного режима не всегда оправдано. Дальнейший подбор условий хроматографирования производился в изократическом режиме.

Важнейшим параметром хроматографического разделения являются его селективность и эффективность. Эффективность колонки, измеряемая высотой теоретических тарелок (ВЭТТ) и обратно пропорциональная их числу (N) тем выше, чем уже пик вещества, выходящего при том же времени удерживания.

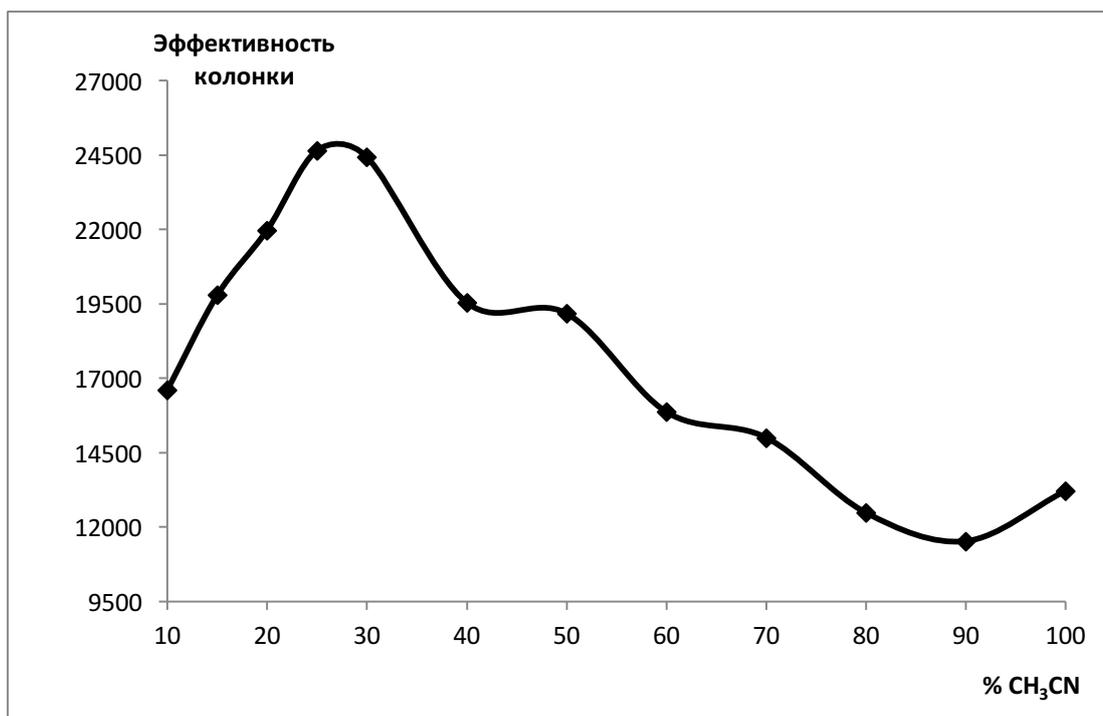


Рис. 3.3.15. Кривая эффективности колонки (N) в зависимости от % содержания CH₃CN

Максимальная эффективность колонки при хроматографическом разделении наблюдается при 30% содержании CH₃CN в подвижной фазе.

Эффективность колонки рассчитывается по формуле:

$$N = 5.54 \cdot (t_R / W_{1/2})^2, \quad (3.2)$$

t_R - время удерживания, $w_{1/2}$ - ширина пика на половине высоты.

Эффективность колонки, измеряемая высотой теоретических тарелок (ВЭТТ) и обратно пропорциональная их числу (N) тем выше, чем уже пик вещества, выходящего при том же времени удерживания. Зная число теоретических тарелок, приходящееся на колонку, длину колонки L и средний диаметр зерна сорбента d_c , легко получить значения высоты, эквивалентной теоретической тарелке (ВЭТТ), и приведенной высоты (ПВЭТТ):

$$\text{ВЭТТ} = L/N \quad \text{ПВЭТТ} = \text{ВЭТТ}/d_c$$

Скорость подачи элюента является важной характеристикой в проведении экспериментальных работ.

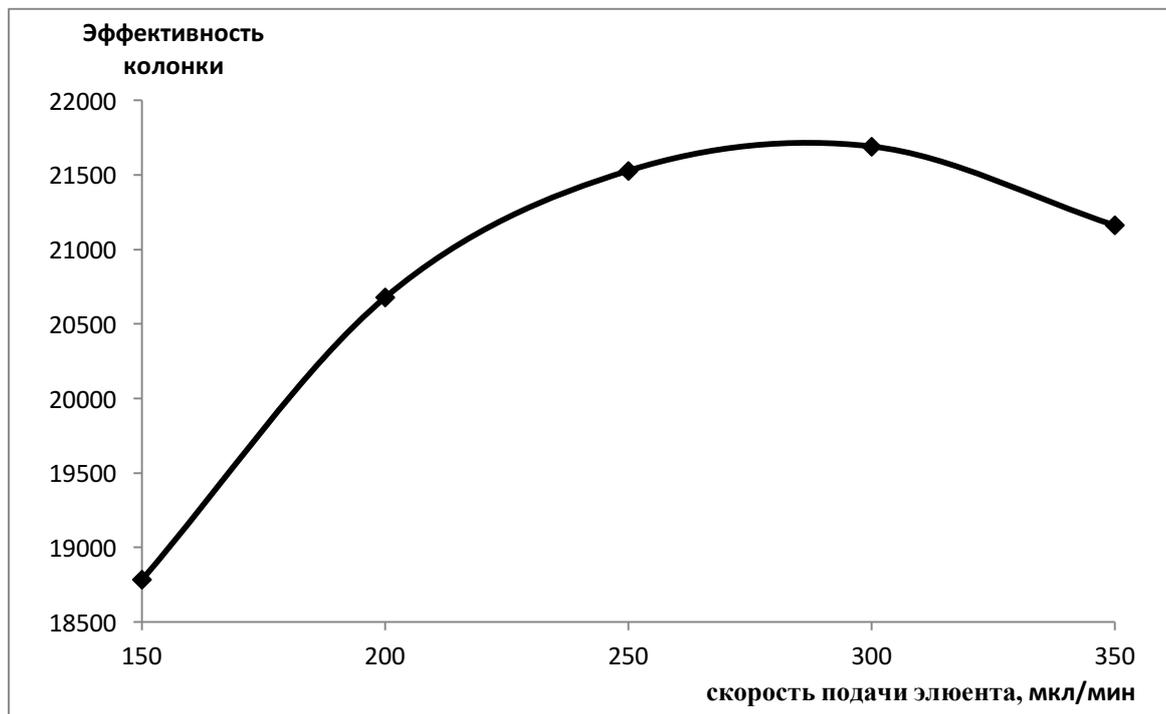


Рис. 3.3.16. Эффективность колонки в зависимости от скорости подачи элюента (для 30% CH_3CN)

Максимальное значение эффективности колонки определено для значения потока скорости 300 мкл/мин. На основе анализа полученных закономерностей делаем вывод о том, что хроматографическое исследование следует проводить в изократическом режиме с 30 % содержанием CH_3CN (70% H_2O), скорость потока элюента 300 мкл/мин, для конкретной колонки.

На рис. 3.3.17 представлена хроматограмма водного раствора кумарина синтетического при рабочих условиях. Справа приведена спектральная кривая — индивидуальная полоса оптического поглощения кумарина.

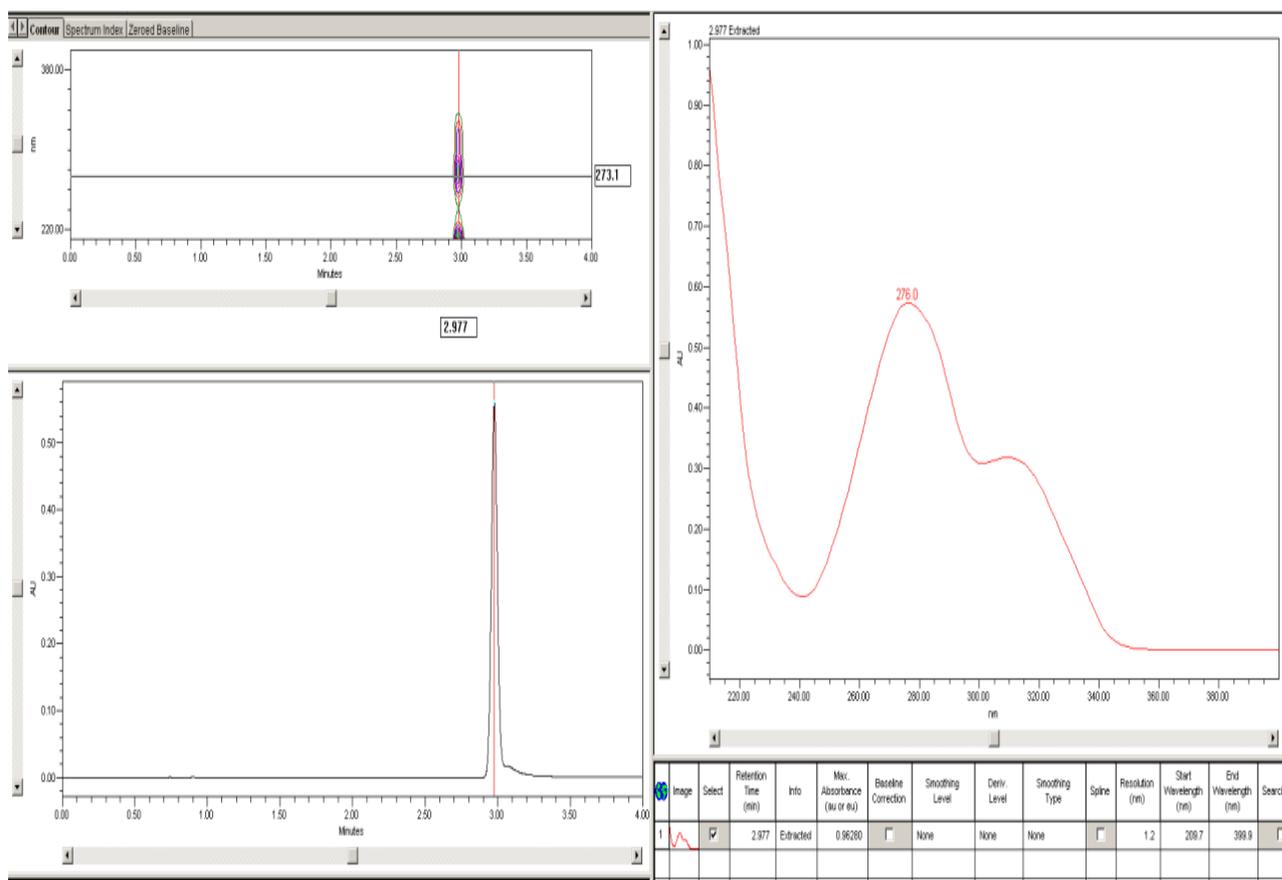


Рис. 3.3.17. 3D-хроматограмма водного раствора кумарина с $c = 10^{-3}$ моль/л с 5% содержанием этанола

При радиоллизе спирта гидроксиалкильные радикалы могут окисляться закисью азота [30]. В этом случае закись азота выступает акцептором сольватированных электронов, взаимодействующие с ним с константами скорости 10^9 - 10^{10} $\text{дм}^3/(\text{моль}\cdot\text{с})$. Константа скорости взаимодействия акцепторов с гидроксиалкильными радикалами на шесть–семь порядков ниже [15]. Константа скорости взаимодействия сольватированного электрона с кумарином: $k = 17 \cdot 10^9$ $\text{дм}^3 \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ [19]. Сравнивая экспериментальные данные констант, сольватированный электрон в первую очередь будет взаимодействовать в системе с закисью азота.

В системе при воздействии ионизирующего излучения пренебрегаем выходом первичных радикалов спирта, из расчёта, что массовая доля спирта составляет 5 %. В этом случае выход гидроксиалкильных радикалов будет

равен сумме выходов гидроксильных радикалов и выхода сольватированного электрона, который по предложенному механизму сольватированный электрон переводит в гидроксилальный радикал в реакции с закисью азота.

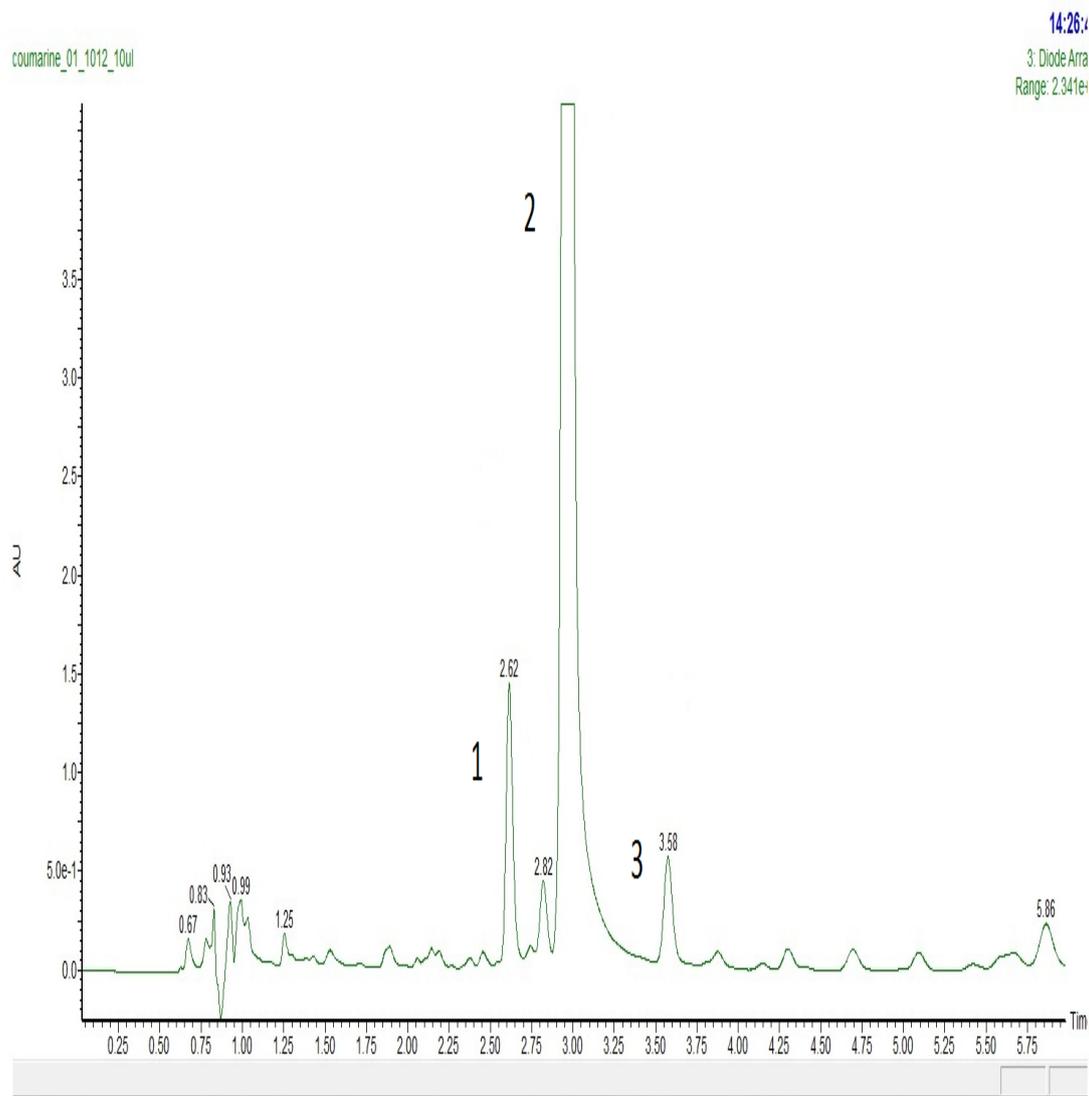


Рис. 3.3.18. Хроматографический спектр водного раствора кумарина $c = 10^{-4}$ моль/л деаэрированного и N_2O -насыщенном этаноле при воздействии $D = 0,57$ кГр; 1 - соединение с временем удерживания 2,62 мин; 2 - кумарин; 3 - продукт с временем удерживания 3,58 мин

Зарегистрировано, что образуются продукты с временами удерживания 2,62 мин и 3,58 мин. Также зарегистрирован ещё один пик с временем удерживания 2,82 мин, но его масс-спектр не удалось записать, (интенсивность сопоставима с фоном), и его вклад в радиационно-химические превращения не учитываем.

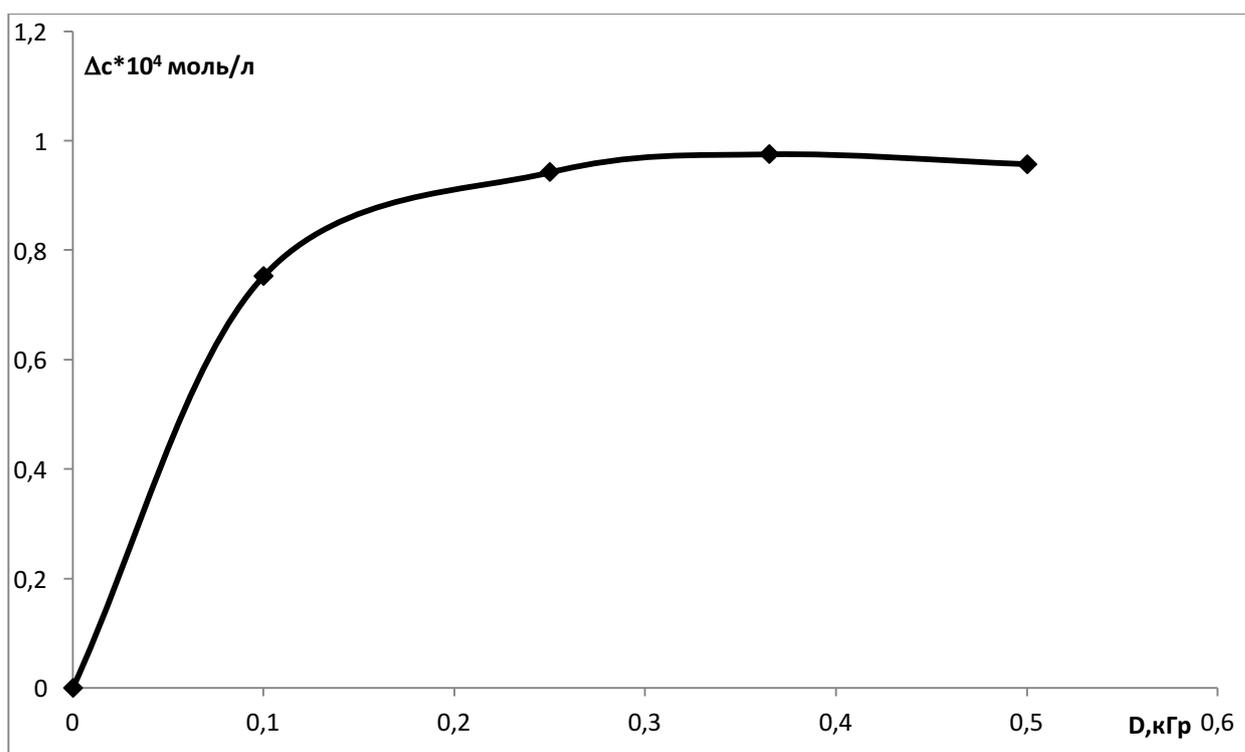


Рис. 3.3.19. Изменение концентрации водного раствора кумарина с 5% этанолом в деаэрированных условиях и насыщенного закисью азота от дозы облучения

На рис. 3.3.19 представлено, что концентрация кумарина с ростом дозы уменьшается. Расходование кумарина зафиксирована до 0,3 кГр. Далее изменений не наблюдается.

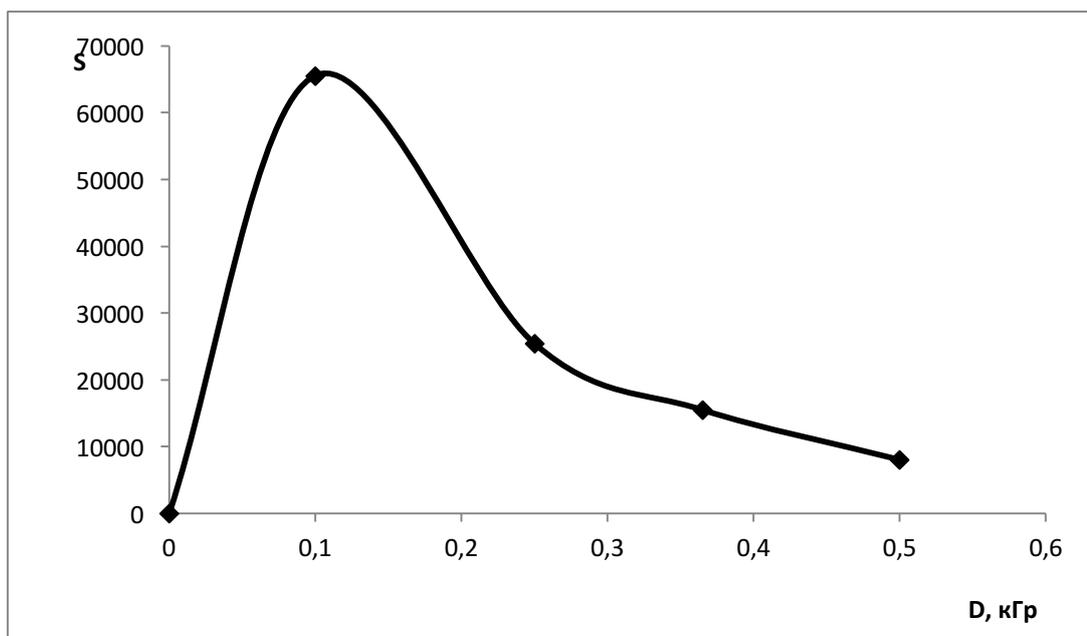


Рис. 3.3.20. Изменение площади пика под кривой (S) продукта с временем удерживания 2,62 мин от дозы облучения

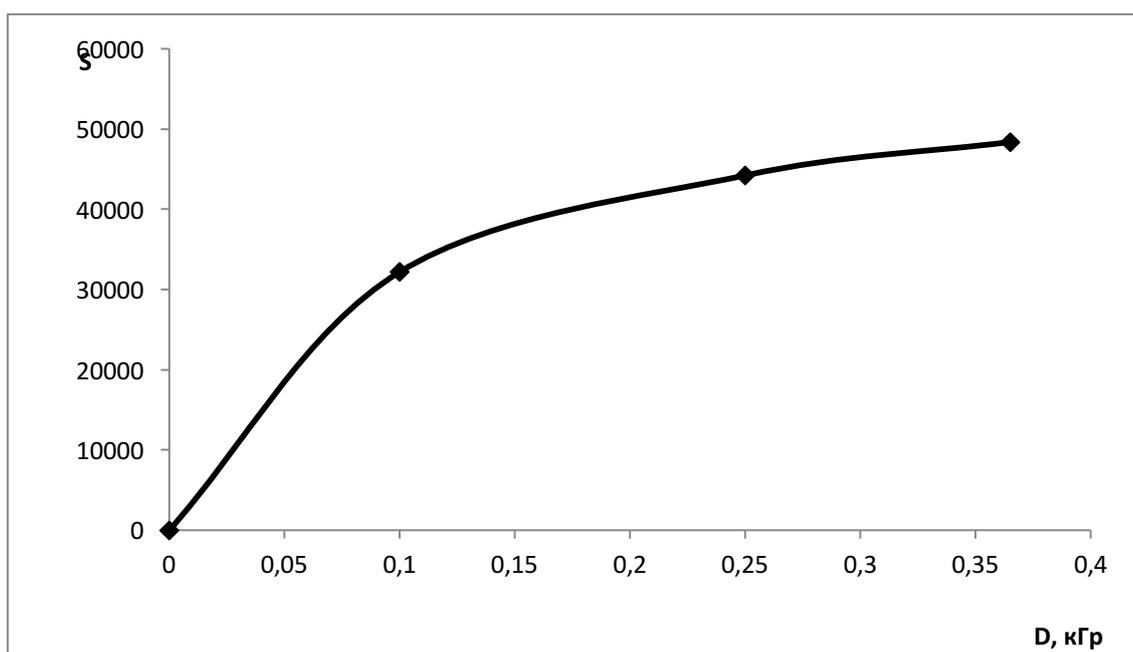


Рис. 3.3.21. Изменение площади пика под кривой (S) продукта с временем удерживания 3,62 мин от дозы

По экспериментальным данным ($y = -0,0003x + 0,8688$ уравнение линии тренда концентрации от дозы облучения) рассчитан радиационно-химический выход расщедования кумарина $G_{(-\text{Cоum})} = 0,29 \pm 0,02$ молекул/100 эВ, рассчитанный по формуле

$$G_{\text{Cоum}} = \frac{9.65 \cdot 10^9 \cdot c_{\text{Cоum}}}{\rho \cdot D}, \quad (3.3),$$

где $c_{\text{Cоum}}$ – концентрация кумарина, моль/л;

ρ – плотность растворителя, г/л;

D – поглощенная доза, Гр;

В ходе эксперимента с увеличением дозы ионизирующего излучения на растворы кумарина были выявлены два новых продукта стационарного радиолнза кумарина с временами удерживания 2,62 мин и 3,58 мин.

Обнаружено, что концентрация продуктов радиационно-химического превращения кумарина с временем удерживания 2,62 мин в зависимости от дозы ионизирующего излучения проходит через максимум, имеет экстремальную зависимость, что свидетельствует о его дальнейшем превращении по двойной связи $\text{C}_3=\text{C}_4$. Продукт с временем удерживания 3,62 мин с ростом дозы накапливается в системе, следовательно, производное дигидрокумарина не активно и в дальнейших превращениях не принимает участия и не обладает антирадикальной активностью.

Спектры, полученные с помощью СФ-детектора, представлены на рис. 3.3.22. Спектр оптического поглощения **2** относится к кумарину. Характер полосы оптического поглощения продукта **1** схож с полосой кумарина. Однако максимум сдвинут в длинноволновую область и отношение интенсивности полос очень отличается. Спектр оптического поглощения **3** имеет одну явную полосу поглощения с максимумом длины волны 273 нм.

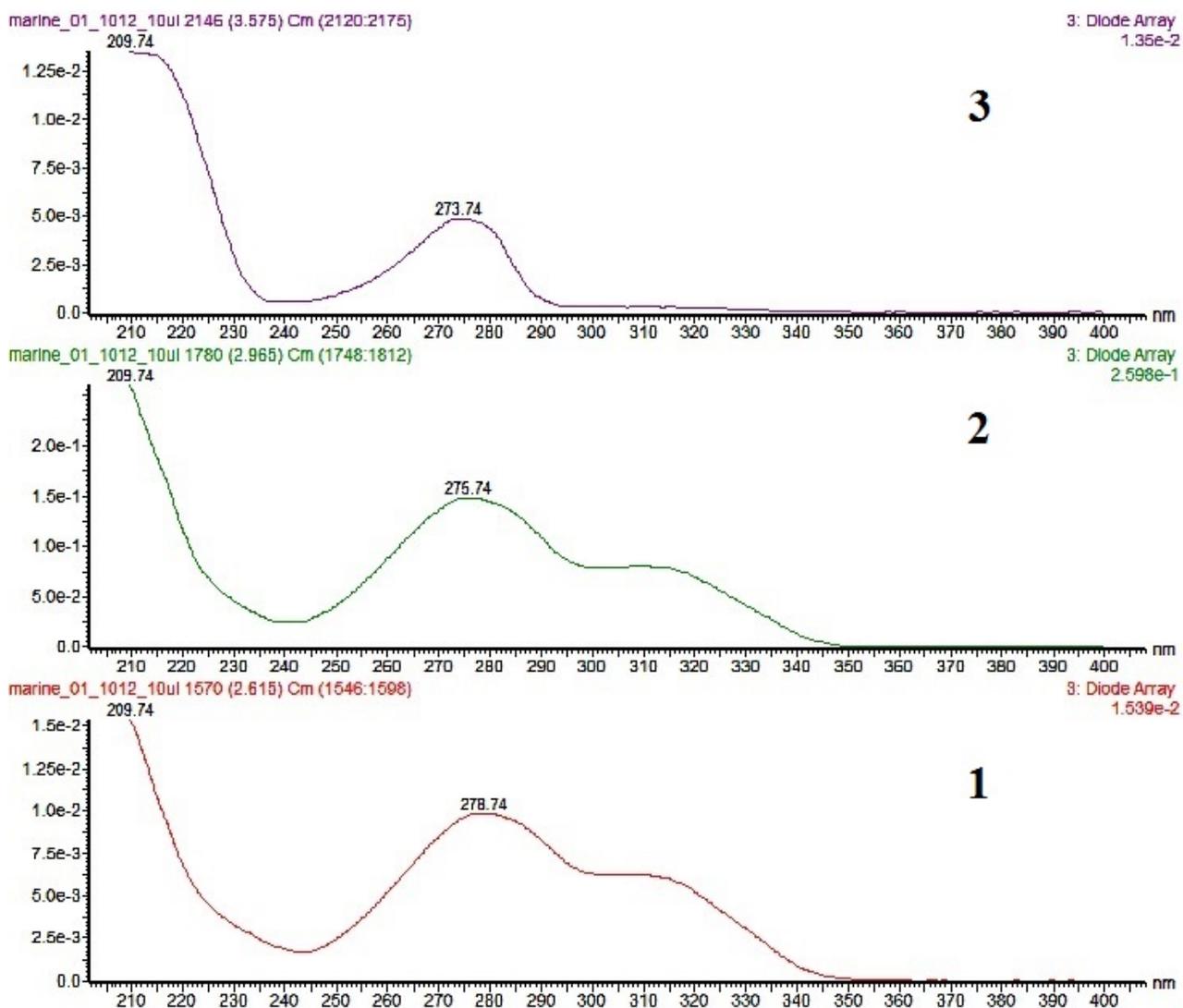


Рис. 3.3.22. Спектры оптического поглощения 1 - соединение с временем удерживания 2,62 мин; 2 - кумарин; 3 - продукт с временем удерживания 3,58 мин

Для анализа продуктов радиолитического распада водного раствора кумарина использован диодно-матричный детектор.

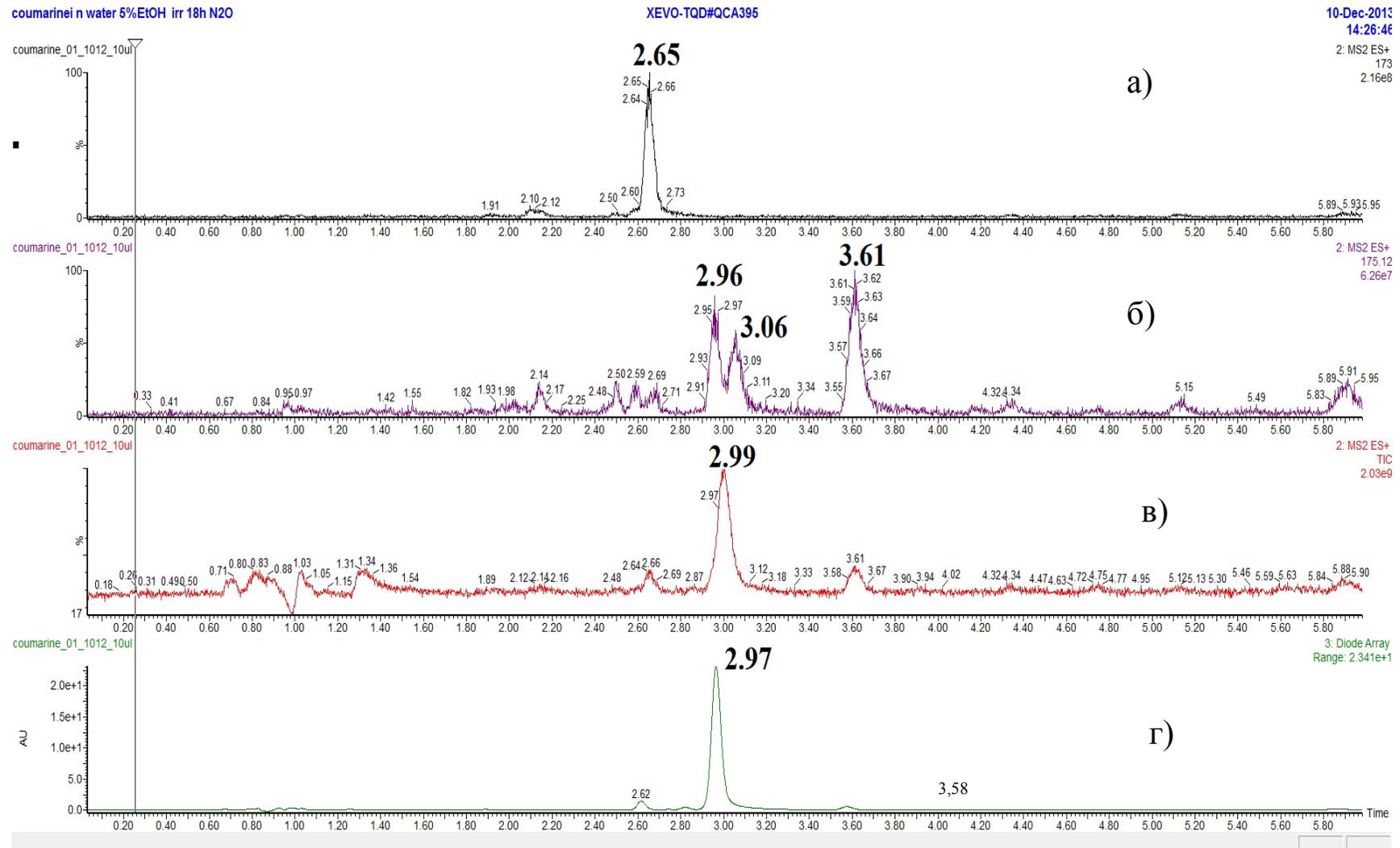
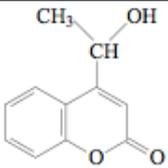
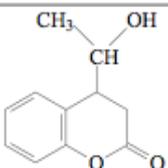


Рис. 3.3.23. Хроматограмма облученного $D=0,1$ кГр раствора кумарина $c = 10^{-4}$ моль/л; а) детектирование иона $m/z = 173$; б) детектирование иона $m/z = 175$; в) полный ионный ток; г) детектирование на диодно - матричном детекторе

Показано, что один возможный продукт с временем удерживания 2,62 мин зарегистрирован и три возможных продукта с временем удерживания 3,62 мин. В последнем случае это возможно путём введения радикальных частиц в трёх различных положения пиранового кольца молекулы кумарина.

Таблица 3.3.2. Характеристики пиков хроматограммы

Время удерживания, мин	Молекулярный пик, m/z	Отнесение пика	Предполагаемый продукт
2,62 (продукт 1)	173,95	$\text{Coum} + \text{CH}_3\dot{\text{C}}\text{HOH} - \text{H}_2\text{O}$ =146+45-18	
2,82	-	-	-
3,62 (продукт 3)	175,12	$\text{Coum} + 2\text{H} + \text{CH}_3\dot{\text{C}}\text{HOH} - \text{H}_2\text{O}$ =146+2+45-18	

Масс-спектр продукта 1, 2 и 3 представлен на рис. 3.3.24.

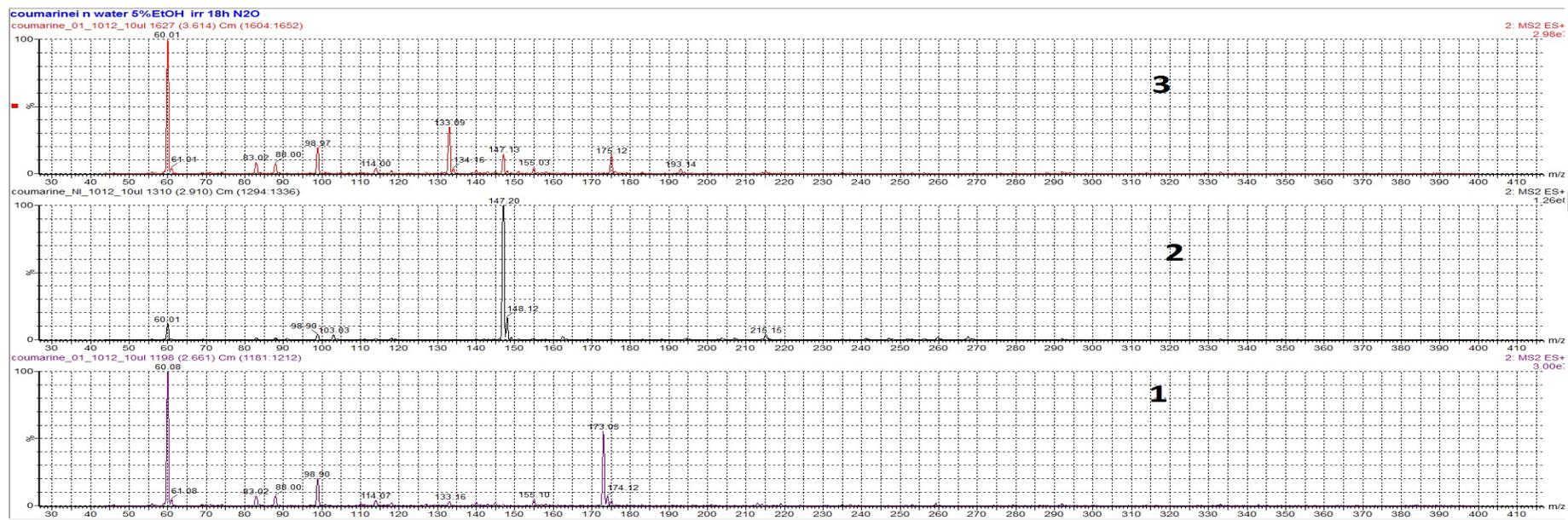
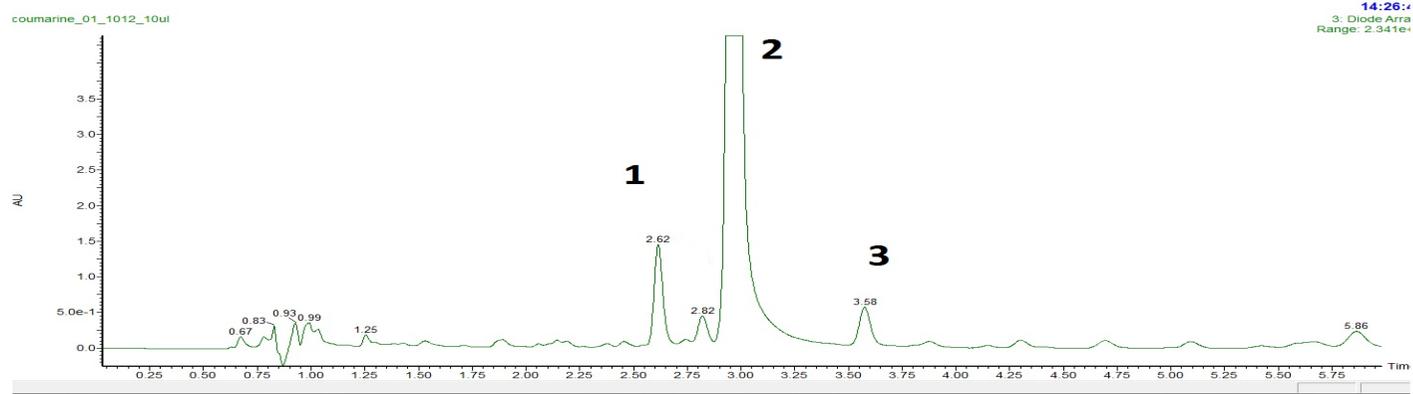


Рис. 3.3.24. Хроматограмма облученного $D=0,1\text{кГр}$ раствора кумарина $c=10^{-4}$ моль/л и масс-спектр кумарина и его продуктов

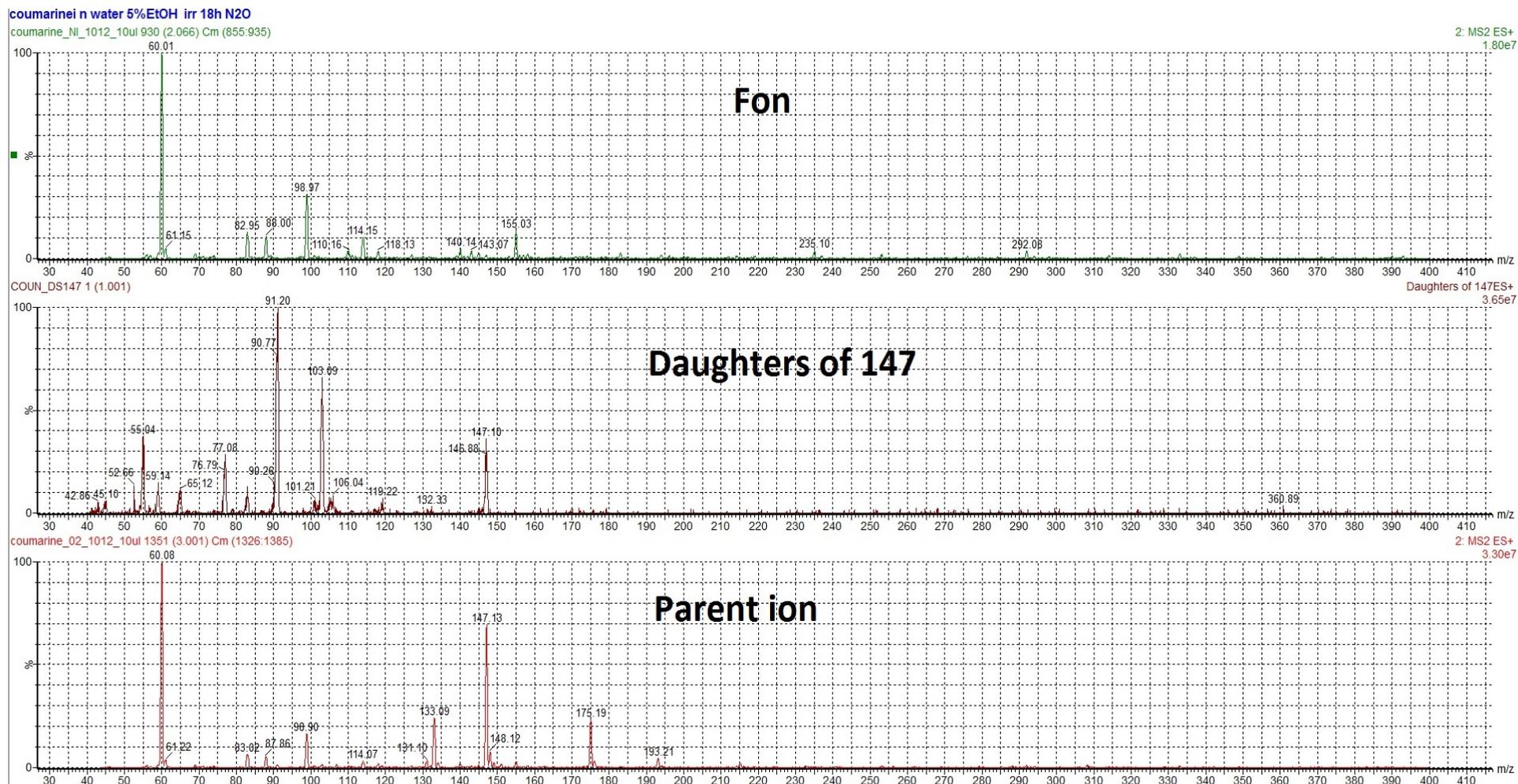


Рис. 3.3.25. Масс-спектр водного раствора кумарина $c=10^{-4}$ моль/л с 5% содержанием этанола: Fon - регистрация фона, Parent ion - регистрация материнского иона, Daughters of 147 - регистрация по дочернему иону

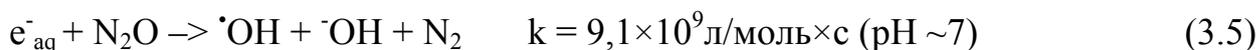
Масс-спектрометрическое исследование показало, что при радиолизе кумарина в деаэрированных условиях и N_2O - насыщенным этаноле образуется два продукта с молекулярным весом $[M+H]$ с m/z 173,05 и 175,09.

В масс-спектре водного раствора 10^{-4} моль/л кумарина в системе с 5% добавлением этанола при первичной ионизации обнаружена интенсивная полоса с m/z молекулярного иона = 147,2, обусловлено протонированием $[M+H^+]$. В дочернем ионе путём отщепления карбонильной группы CO обнаружены фрагменты $[M-CO]^+$ с $m/z = 119,22$ и $[M-2CO]^+$ $m/z = 91,20$, что согласуется с данными работ Н. С. Вульфсон, Л. С. Головкиной [62-64].

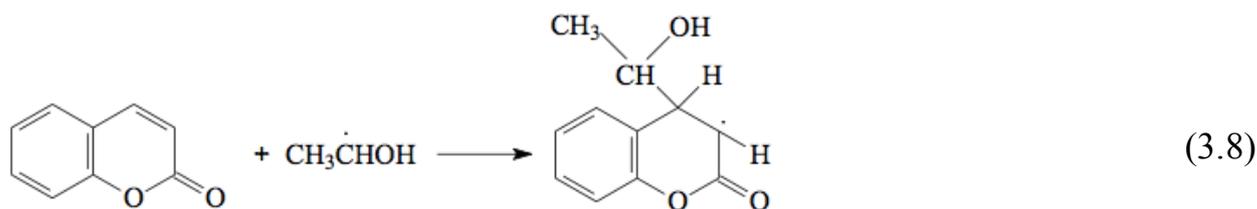
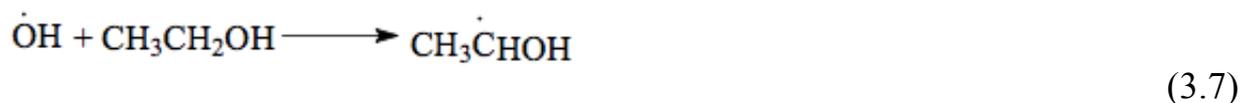
Из рассмотрения масс-спектра рис 3.3.24 и рис. 3.3.25 и возможных радиационно-химических превращений предполагаем:



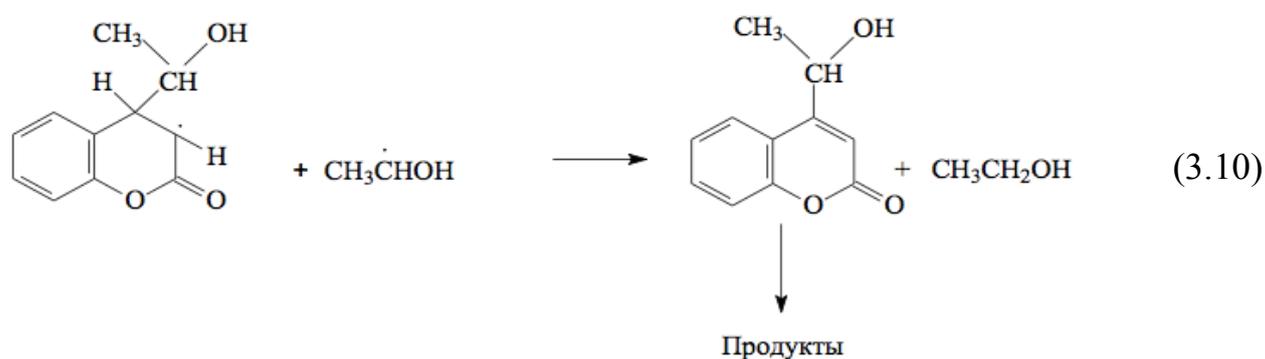
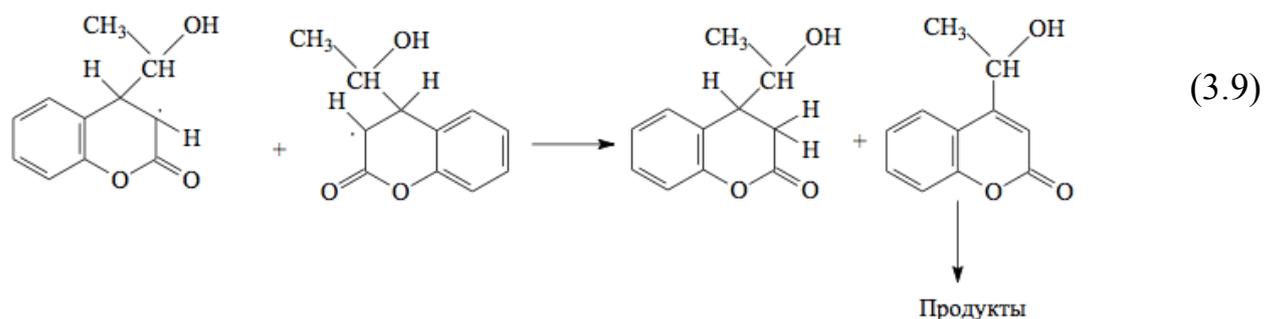
В присутствии закиси азота N_2O :



Следовательно, в закиси азота основной реакционно-способной частицей выступает OH^\bullet -радикал.



Реакция диспропорционирования:



Антирадикальная активность и, следовательно, реакционная способность кумарина связана с его способностью акцептировать гидроксильные радикалы.

Рассмотрим применение ВЭЖХ в исследовании реакционной способности производных кумарина - эскулина и эскулетина с углеродцентрированным радикалом по выходу ацетальдегида в реакции с 2,4-динитрофенилгидразоном.

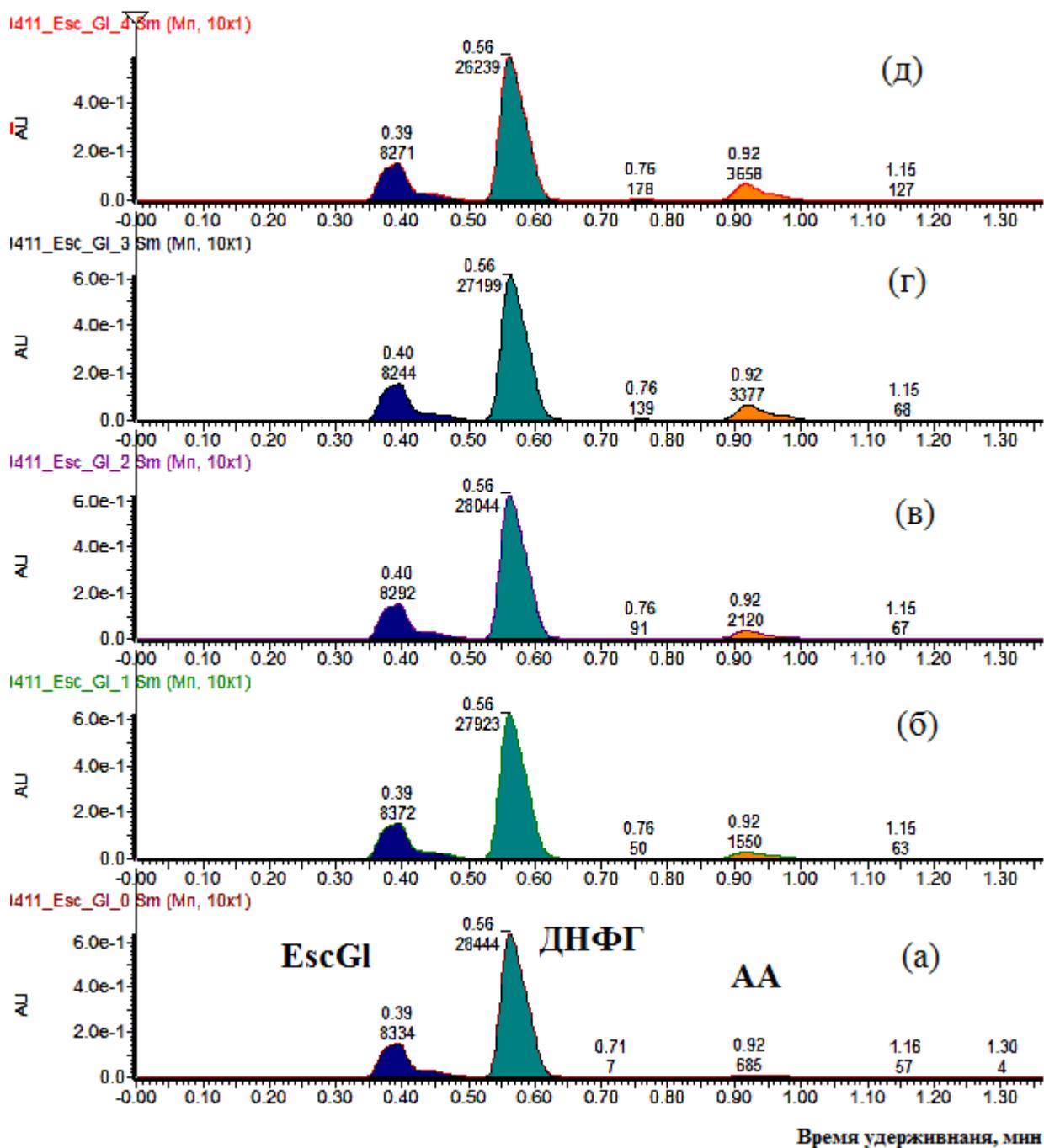


Рис. 3.3.26. Хроматограммы спиртового раствора эскулина 1мМ в реакции с ДНФГ от дозы: (а) – исходный, (б) – 25.5 Гр, (в) – 51 Гр, (г) – 76.5 Гр, (д) – 102 Гр

Эксперимент проведен в деаэрированных условиях, чтоб наблюдать за превращением углеродцентрированного радикала этанола. Далее после вскрытия по определенной методике 2.2.5 образцы были подготовлены к

анализу на ВЭЖХ. И по выходу ацетальдегида делали вывод о реакционной способности синтетических кумаринов—эскулетина и эскулина, которые присутствуют в багульнике болотном и муррае метельчатой.

На хроматограмме (рис. 3.3.26) представлены пики эскулина (EscGl), динитрофенилгидрозина (ДНФГ) и ацетальдегида (АА).

Анализируя полученную хроматограмму видим, что с ростом дозы облучения идет увеличение пика продукта с временем удерживания 0,92 мин.

Так как данным продуктом является ацетальдегид, то делаем вывод о том, что с увеличением дозы идет его накопление в системе.

Для определения концентрации ацетальдегида использовали калибровочный график (рис. 3.3.27).

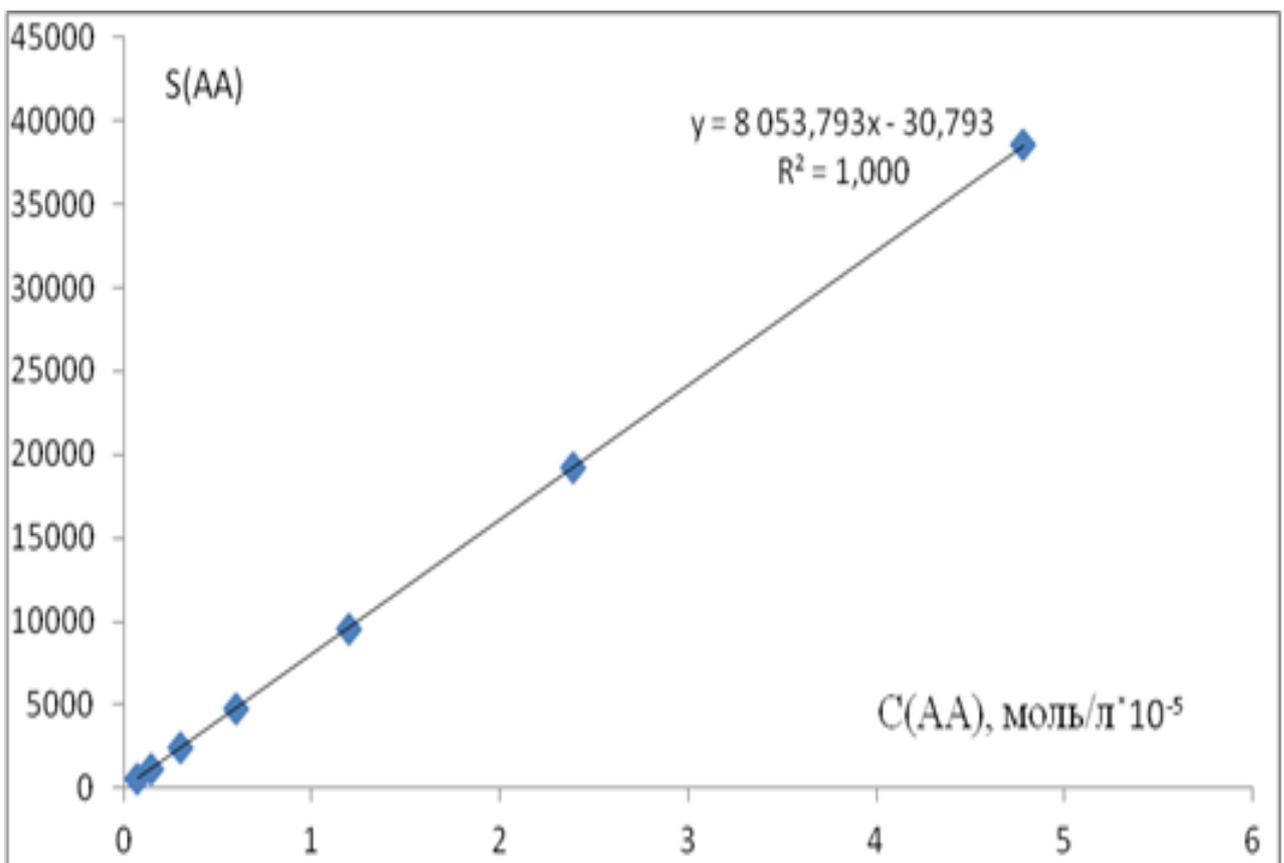


Рис. 3.3.27. График зависимости площади АА от концентрации АА

По данному графику с помощью полученного уравнения

$y = 8053,793x - 30,793$ находим концентрацию АА в системах и строим график ее зависимости от дозы.

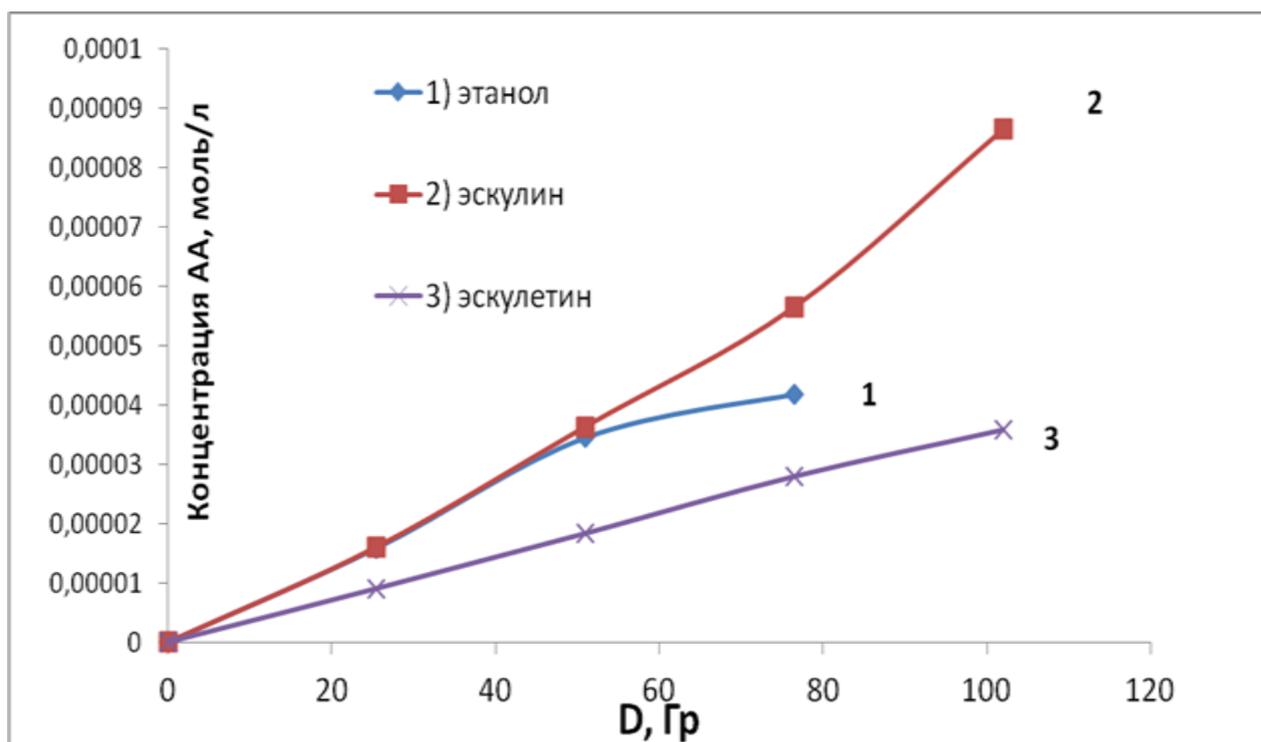


Рис. 3.3.28. Концентрация АА облученных растворов этанола, спиртовых растворов эскулина и эскулетина с концентрациями 10^{-3} , моль/л

В таблице 3.3.3 показаны выходы ацетальдегида облученных растворов эскулина, эскулетина и этанола в интервале поглощённых доз до 1,6 кГр.

Таблица. 3.3.3. Выход АА облучённых растворов этанола, эскулина и эскулетина

Доза (Гр)	EtOH	EscGl 10^{-3} моль/л	Esc 10^{-3} моль/л
-	0	0	0
25,5	$1,59 \cdot 10^{-5}$	$1,61 \cdot 10^{-5}$	$9,05 \cdot 10^{-6}$
51	$3,45 \cdot 10^{-5}$	$3,63 \cdot 10^{-5}$	$1,83 \cdot 10^{-5}$
76,5	$4,18 \cdot 10^{-5}$	$5,64 \cdot 10^{-5}$	$2,79 \cdot 10^{-5}$
102	-	$8,64 \cdot 10^{-5}$	$3,58 \cdot 10^{-5}$
1548	$6,27 \cdot 10^{-4}$	$5,29 \cdot 10^{-4}$	$3,71 \cdot 10^{-4}$
РХВ АА	$3,84 \pm 0,003$	$3,15 \pm 0,004$	$2,30 \pm 0,001$

По полученным данным можно сделать вывод о том, что произошло уменьшение радиационно-химического выхода ацетальдегида в облученных растворах эскулина и эскулетина на 20% в случае эскулина и на 40% в случае эскулетина. Таким образом, молекула эскулетина наиболее реакционноспособна по отношению к α -ГЭР при радиоллизе в деаэрированном этаноле по сравнению с эскулином.

Сравним поведение эскулетина (рис. 3.3.29) с цинком при соотношении компонентом Esc:Zn=2:1.

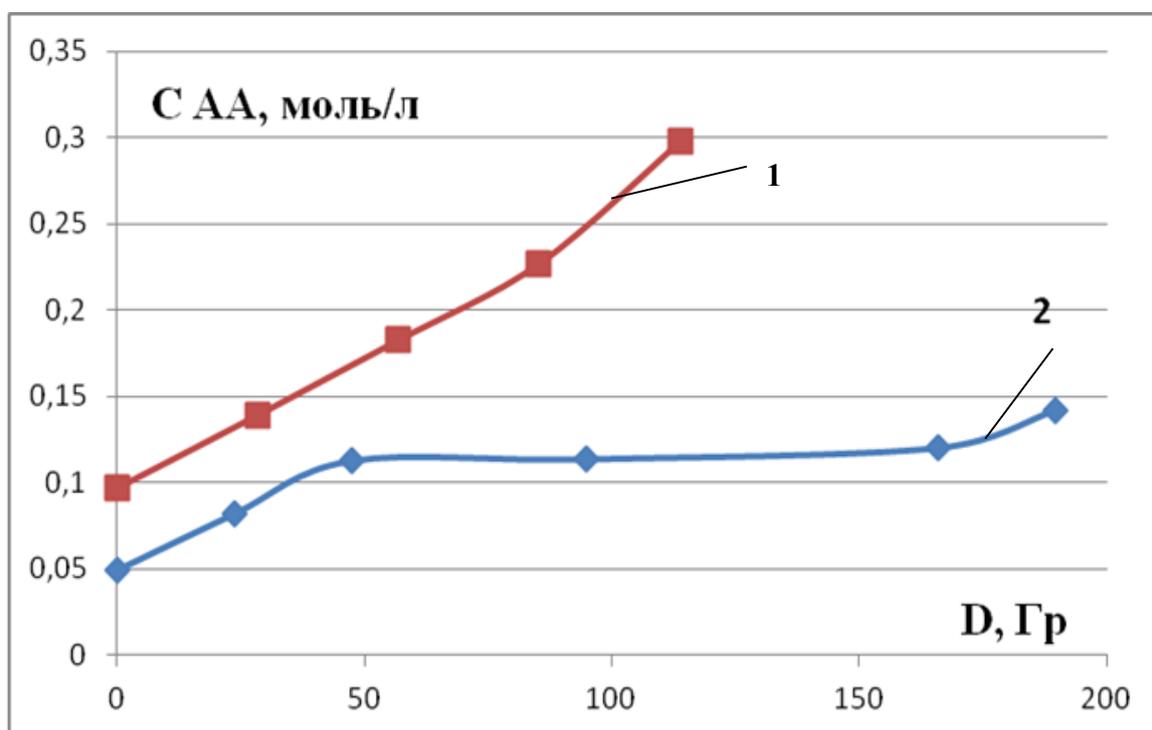


Рис. 3.3.29. Зависимость концентрации АА (моль/л) от D(Гр) в системе 1 - Esc в 5% EtOH, 2- Esc в 5% EtOH+Zn в отношении 2:1

Анализируя полученные зависимости делаем вывод о том, что добавление ионов Zn в раствор эскулетина не влияет на образование АА в системе в интервале доз облучения до 50 Гр, система 2 идентична системе 1, а далее в пределах доз до 180 Гр происходит торможение образования АА в системе 2, что, вероятно, связано с образованием комплекса Zn^{2+} с продуктами радиоллиза эскулетина.

ВЭЖХ сложно применить в исследовании экстрактов в реакции с углеродцентрированным радикалом, связано с наличием большого количества экстрагируемых веществ наряду с кумаринами. Для анализа реакционной способности исследуемых экстрактов применим газо-жидкостную хроматографию.

3.3.4 Применение газо-жидкостной хроматографии для анализа химических превращений 70% деаэрированных этанольных экстрактов донника, багульника, муррайи с углеродцентрированными радикалами, иницированными облучением

О реакционной способности кумаринсодержащих экстрактах из донника, багульника и муррайи перехватывать углеродцентрированные радикалы при радиолизе будем оценивать по выходу АА с помощью газовой хроматографии. Из литературных данных известно [64]: водные растворы спиртов как и чистые спирты дают при облучении в отсутствие кислорода водород, альфа-гликоль и карбонильные соединения. В случае разбавленных растворов этанола выходы продуктов соответствуют отрыву атомов водорода водородными атомами (с образованием H_2) или гидроксильными радикалами. Образующиеся таким образом органические радикалы либо димеризуются, образуя гликоль, либо диспропорционируют в альдегид. В присутствии кислорода водные растворы этанола дают в три раза больше ацетальдегида, чем в его отсутствие. В более концентрированных растворах радиационно-химический выход ацетальдегида $G=6$. Другим основным продуктом является перекись водорода, а выход гликоля полностью подавляется.

При радиолизе деаэрированного этанола α -ГЭР образуется с радиационно-химическим выходом $\sim 5,5$ частиц/100 эВ.

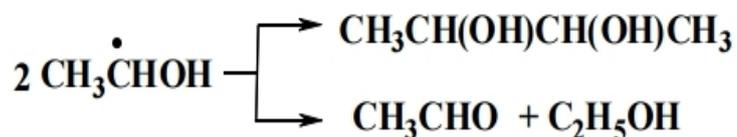
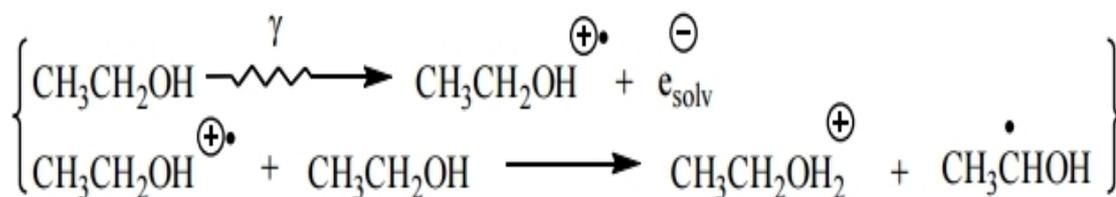


Схема 3.7. Радиолит деаэрированного этанола

Основными молекулярными продуктами являются ацетальдегид (АА) и бутандиол-2,3 (БД), которые образуются с равной вероятностью в реакциях диспропорционирования и рекомбинации альфа-гидроксиэтильных радикалов (ГЭР).

Для исследования экстрактов донника, багульника и муррайи на газовом хроматографе образцы были деаэрированы и облучены различными дозами на установке РХМ-γ-20. Содержание спирта в системах с экстрактами соответствовало 70%.

Радиационно-химический выход ацетальдегида в молек./100эВ рассчитан по формуле:

$$G_{\text{AA}} = \frac{9,65 \cdot 10^9 \cdot C_{\text{AA}}}{\rho \cdot D} \quad (3.11),$$

Где C_{AA} – концентрация ацетальдегида, моль/л;

ρ – плотность растворителя, г/л;

D – поглощенная доза, Гр;

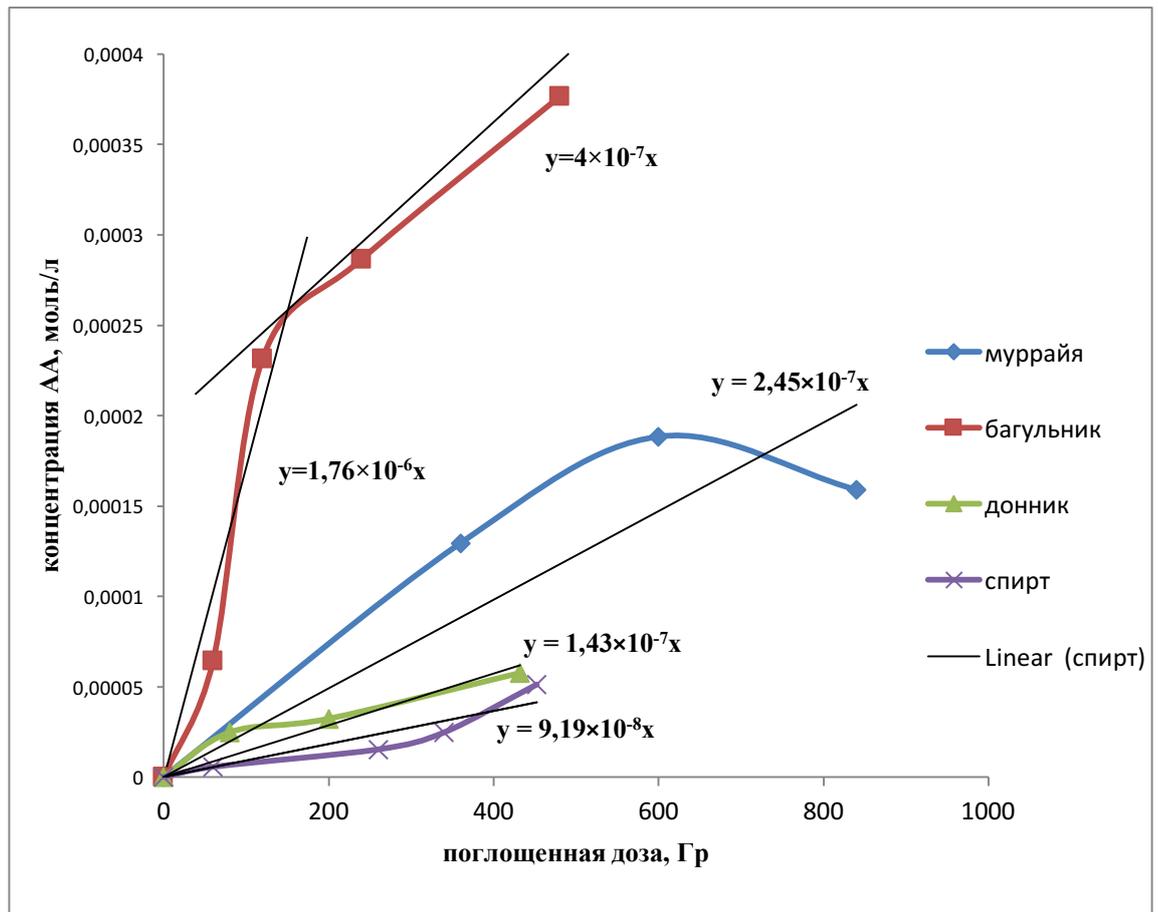


Рис. 3.3.30. Накопление ацетальдегида в зависимости от поглощенной дозы

На данном рис. 3.3.30 представлены кривые накопления ацетальдегида в системе в зависимости от увеличения поглощенной дозы.

Таблица 3.3.4. Тангенсы угла наклона прямых накопления АА

экстракт	$tg\alpha$
спирт	$9,19 \times 10^{-8}$
донник	$1,43 \times 10^{-7}$
муррайя	$2,45 \times 10^{-7}$
Багульник(0-120 Гр)	$1,76 \times 10^{-6}$
Багульник(120-480 Гр)	4×10^{-7}

Установлено, что багульник проявляет высокую активность в реакции с углеродцентрированным радикалом по сравнению с другими экстрактами.

По формуле (3.11) с учетом углов наклона прямых был рассчитан радиационно-химический выход ацетальдегида при радиоллизе кумаринсодержащих экстрактах донника, багульника и муррайи.

Таблица 3.3.5. Радиационно-химический выход ацетальдегида в 70% деаэрированных системах

система	G, частиц/100 эВ
Без добавки	1,04
Донник	1,62
Муррайя	2,77
Багульник(0-120 Гр)	19,9
Багульник(120-480 Гр)	4,53

Радиационно-химический выход АА в спирте ≈ 1 частиц/100 эВ, что соответствует данным, встречающимся в литературе и доказанных экспериментально. Кривые зависимости концентрации АА от дозы для исследуемых экстрактов на графике лежат выше спирта и демонстрируют накопление АА и, следовательно, как видно из таблицы 3.3.5 большие радиационно-химические выходы. Из литературных данных известно, что максимальное значение РХВ АА не превышает 5,5 молек/100 эВ. Для багульника в интервале доз от 0 до 120 Гр рассчитан радиационно-химический выход АА, равный ≈ 20 молек/100 эВ, что может свидетельствовать о свободно-радикальных цепных процессах, происходящих в экстракте после облучения. Можно сделать вывод, что багульник показывает аномальное действие и его использование в медико-биологической практике возможно только при низких концентрациях.

3.4 Определение реакционной способности экстрактов донника, багульника, муррайи и некоторых кумаринов со стабильным радикалом 2,2-дифенил-1-пикрилгидрозилом

Суть метода заключается в снижении оптической плотности раствора ДФПГ в присутствии добавок веществ – экстрактов кумаринсодержащих лекарственных растений и синтетических кумаринов.

Исследования производились согласно методике 2.2.3. Данные представлены в таблице 3.4.1.

Таблица 3.4.1. Оптическая плотность ДФПГ в зависимости от концентрации добавок лекарственных веществ. Измерения при длине волны 517 нм

V, мкл	Багульник	Донник	Ромашка	Багульник, разбавленный в 3 раза
контроль	1,1623	1,1446	0,9636	1,835
40	0,6215	1,1083	0,8852	1,0077
100	0,1062	1,0659	0,8135	0,8585
200	0,1001	0,9582	0,6469	0,5015
300	0,1049	0,9593	0,4748	0,2114
400	0,0957	0,7078	0,3049	0,2296
500	0,0936	0,6887	0,1422	0,1348

В доннике содержится кумарин, в багульнике болотном производные кумарина - эскулетин, эскулин, умбеллиферон, скополетин.

Для оценки реакционной способности спиртовых экстрактов лекарственных растений рассчитывали процент ингибирования ДФПГ в зависимости от концентрации (введенной добавки экстракта):

$$\% \text{ ингибирования ДФПГ} = 100 \cdot (D_k - D_o) / D_k, \quad (3.9)$$

где D_k – оптическая плотность в отсутствии антиоксидантов (контроль);

D_o – оптическая плотность в присутствии антиоксидантов.

По полученным данным построили зависимости (рис. 3.4.1) эффекта ингибирования от объема вводимой добавки экстракта растений.

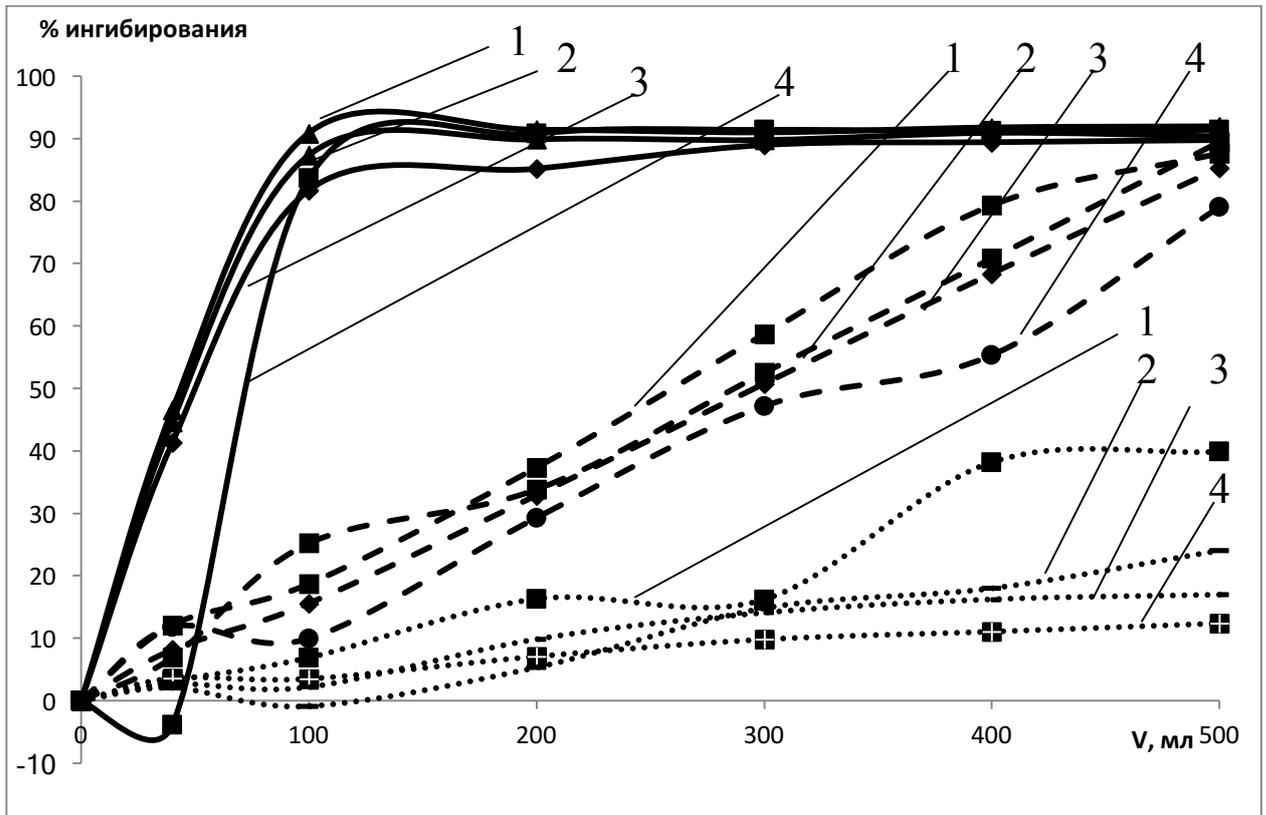


Рис. 3.4.1. Процент ингибирования ДФПГ для:

— багульника болотного, донника лекарственного, ---- ромашки лекарственной в зависимости от дозы облучения (кГр): 1 - 0, 2 - 0.36, 3 - 1.1, 4 - 7.6

Наивысшая реакционная способность наблюдается для экстрактов из багульника болотного, причём воздействие ионизирующего излучения существенно не влияет на характер кривых. Средней антирадикальной активностью обладает экстракт ромашки. Пропорционально концентрации активных веществ возрастает процент ингибирования, а значит значения антирадикальной активности. Наименьшая реакционная способность зарегистрирована у растворов донника лекарственного.

3.4.1 Реакционная способность водно-этанольных экстрактов донника и багульника в реакции с 2,2- дифенил-1-пикрилгидрозилом

Далее рассмотрим взаимодействие водно-спиртовых растворов донника лекарственного со стабильным радикаломДФПГ.

Таблица 3.4.2. Зависимость оптической плотности от времени ингибирования для водно-спиртовых растворов донника лекарственного

	5 мин.	10 мин.	15 мин.	20 мин.	25 мин.	30 мин.
0%	0,2975	0,2285	0,2094	0,1908	0,1786	0,1603
10%	0,1980	0,1331	0,1293	0,1257	0,1221	0,1206
20%	0,1996	0,2852	0,2885	0,2826	0,2792	0,2750
30%	0,4632	0,3928	0,3234	0,2747	0,2722	0,2258
40%	0,4198	0,3516	0,3013	0,2611	0,2422	0,2179
50%	0,2857	0,2231	0,1989	0,1891	0,1730	0,1669
60%	0,2399	0,1922	0,1826	0,1746	0,1728	0,1711
70%	0,3150	0,2418	0,2143	0,1919	0,1803	0,1690
80%	0,3946	0,3476	0,3106	0,2921	0,2774	0,2618
90%	0,4286	0,3832	0,3400	0,3186	0,3023	0,2829
100%	0,7818	0,7612	0,7468	0,7372	0,7317	0,7230
Контроль	0,8727	0,8650	0,8593	0,8540	0,8502	0,8468

По зависимости полученных результатов табл. 3.4.2 можно заключить, что исходные водно-спиртовые растворы донника реагируют со стабильным радикаломДФПГ с уменьшением оптической плотности, что свидетельствует о проявлении антирадикальной активности.

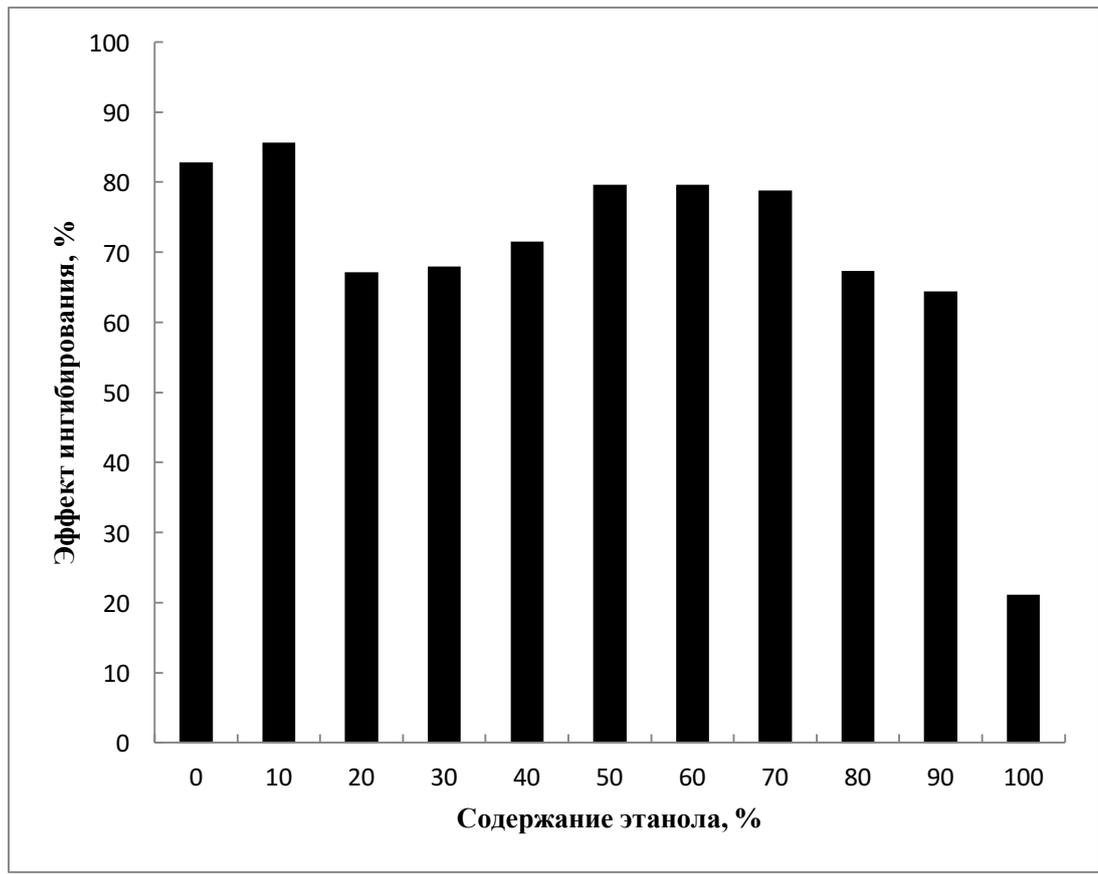


Рис. 3.4.2. Изменения эффекта ингибирования ДФПГ экстрактами донника лекарственного от содержания этанола в растворах

При добавке исходных экстрактов багульника болотного в систему с ДФПГ было определено, что багульник демонстрирует 100%-ную антирадикальную активность. Следовательно, для целесообразного определения и сравнения данных с полученными ранее данными по доннику лекарственному и муррае растворы багульника были разбавлены. В таблице 3.4.3 представлены значения оптической плотности при 517 нм экстрактов багульника болотного, разбавленных в 10 раз, на основании которых осуществляли экспрессный анализ активности экстрактов в зависимости от содержания вода-спирт [53].

Таблица 3.4.3. Взаимодействие водно-спиртовых экстрактов багульника с 0,2 мМ растворомДФПГ. Разбавление экстрактов произведено в 10 раз

% спирта	Опт. плотность, отн.ед.	% ингибирования
0	0,4798	17,95
10	0,5385	22,33
20	0,306	55,86
30	0,0887	87,21
40	0,0734	89,41
50	0,0768	88,92
60	0,0653	90,58
70	0,0566	90,51
80	0,0701	91,84
90	0,0722	89,89
100	0,6933	89,59
Контроль	0,7167	

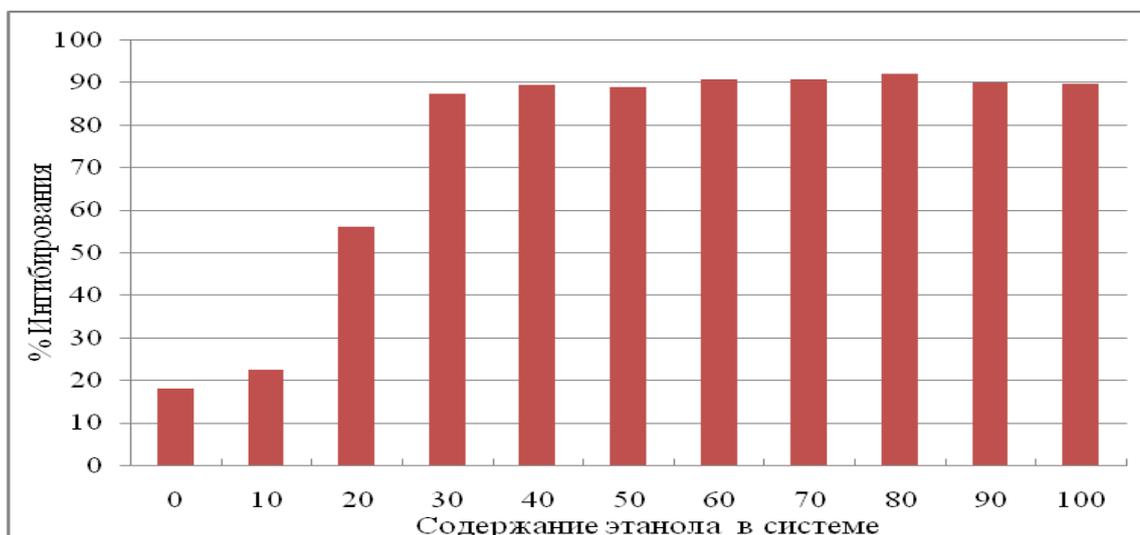


Рис. 3.4.3. Эффект ингибирования ДФПГ экстрактами багульника в зависимости от содержания этанола в системе. Разбавление экстрактов произведено в 10 раз

Далее экстракты багульника болотного разбавлялись в 20 раз (рис. 3.4.4), 30 раз (рис. 3.4.5) и 100 раз (рис. 3.4.6) и проводилась реакция с ДФПГ в течение 30 минут.

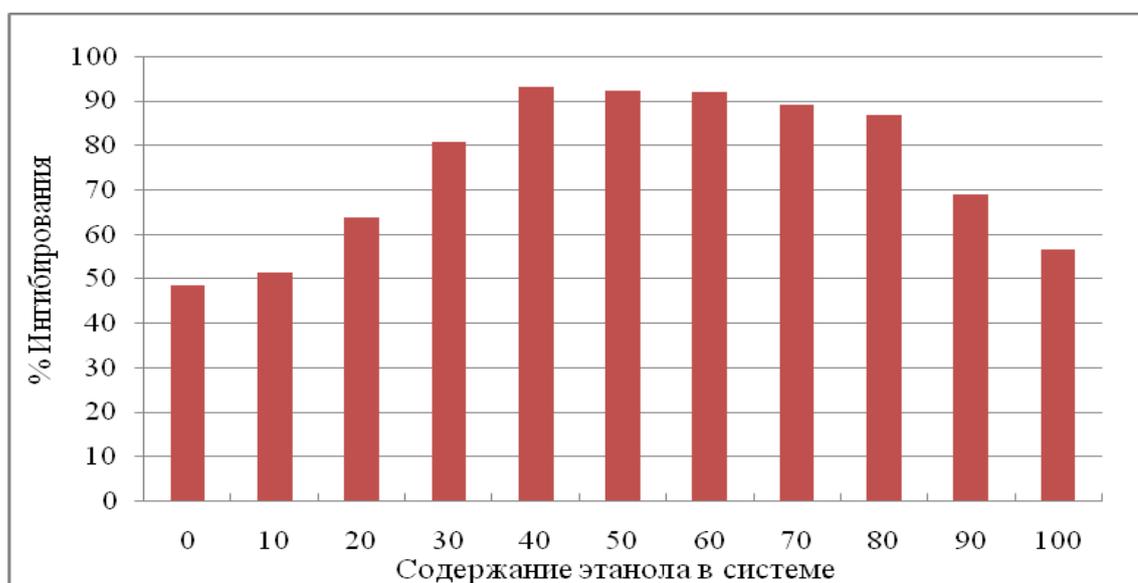


Рис. 3.4.4. Эффект ингибирования ДФПГ экстрактами багульника в зависимости от содержания этанола в системе. Разбавление экстрактов произведено в 20 раз

Таблица 3.4.4. Взаимодействие водно-спиртовых растворов, разбавленных в 20 раз с 0,2 мМ растворомДФПГ

% спирта	Опт. плотность, отн.ед.	% ингибирования
0	0,3009	48,54
10	0,3488	51,33
20	0,2604	63,67
30	0,1377	80,79
40	0,0489	93,18
50	0,0560	92,19
60	0,0569	92,06
70	0,0780	89,12
80	0,0960	86,61
90	0,2238	68,77
100	0,3116	56,52
Контроль	0,7167	

Таблица 3.4.5. Взаимодействие водно-спиртовых растворов багульника, разбавленных в 30 раз с 0,2 мМ растворомДФПГ

% спирта	Опт. плотность, отн.ед.	% ингибирования
0	0,3913	33,08
10	0,4912	34,11
20	0,4162	44,17
30	0,294	60,56
40	0,1194	83,98
50	0,1953	73,80
60	0,1267	83,00
70	0,1844	75,26
80	0,3341	55,18
90	0,3576	52,03
100	0,3887	47,86
Контроль	0,7455	

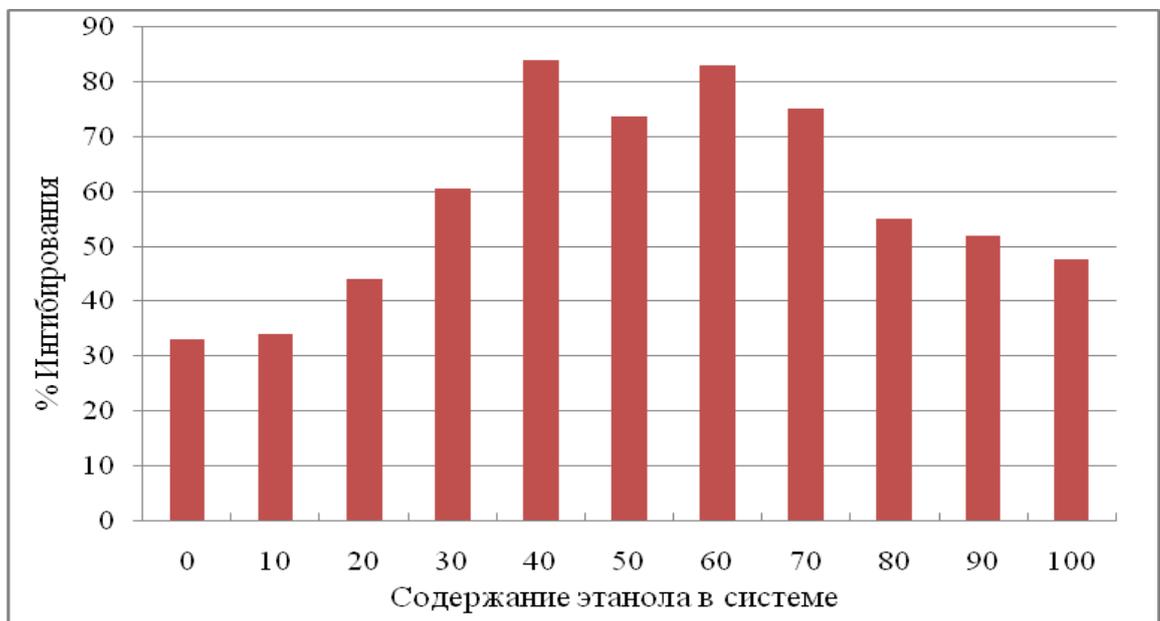


Рис. 3.4.5. Эффект ингибирования ДФПГ экстрактами багульника в зависимости от содержания этанола в системе. Разбавление экстрактов произведено в 30 раз

Таблица 3.4.6. Взаимодействие водно-спиртовых растворов багульника, разбавленных в 100 раз с 0,2 мМ растворомДФПГ

% спирта	Опт. плотность, отн.ед	% ингибирования
0	0,5617	0,04
10	0,7118	1,04
20	0,6632	7,80
30	0,6549	8,95
40	0,6317	12,18
50	0,6123	14,88
60	0,6107	15,10
70	0,5929	17,57
80	0,6333	11,96
90	0,6878	4,38
100	0,7107	1,20
Контроль	0,7193	



Рис. 3.4.6. Эффект ингибирования ДФПГ экстрактами багульника в зависимости от содержания этанола в системе. Разбавление экстрактов произведено в 100 раз

Наглядно видно, что антирадикальная активность экстрактов багульника болотного в 30 раз выше экстрактов донника лекарственного.

Ниже рассмотрим поведение 40% и 60% экстрактов багульника болотного в реакции со стабильным радикалом ДФПГ. Кинетика реакции 40% экстракта багульника болотного, разбавленного в 30 раз в реакции с ДФПГ (рис. 3.4.7). На протяжении измерения (30 минут) образцы находились в темноте.

Таблица 3.4.7. Изменение оптической плотности 40% и 60% экстрактов багульника в зависимости от времени выдерживания в темноте при реакции с ДФПГ

Время выдерживания в темноте, мин	Опт. плотность, 40% этанольный экстракт багульника	Опт. плотность 60% этанольный экстракт багульника
5	0,2685	0,2794
10	0,2273	0,2426
15	0,1948	0,2201
20	0,1791	0,2089
25	0,1675	0,1915
30	0,1540	0,1804
Контроль	0,7154	

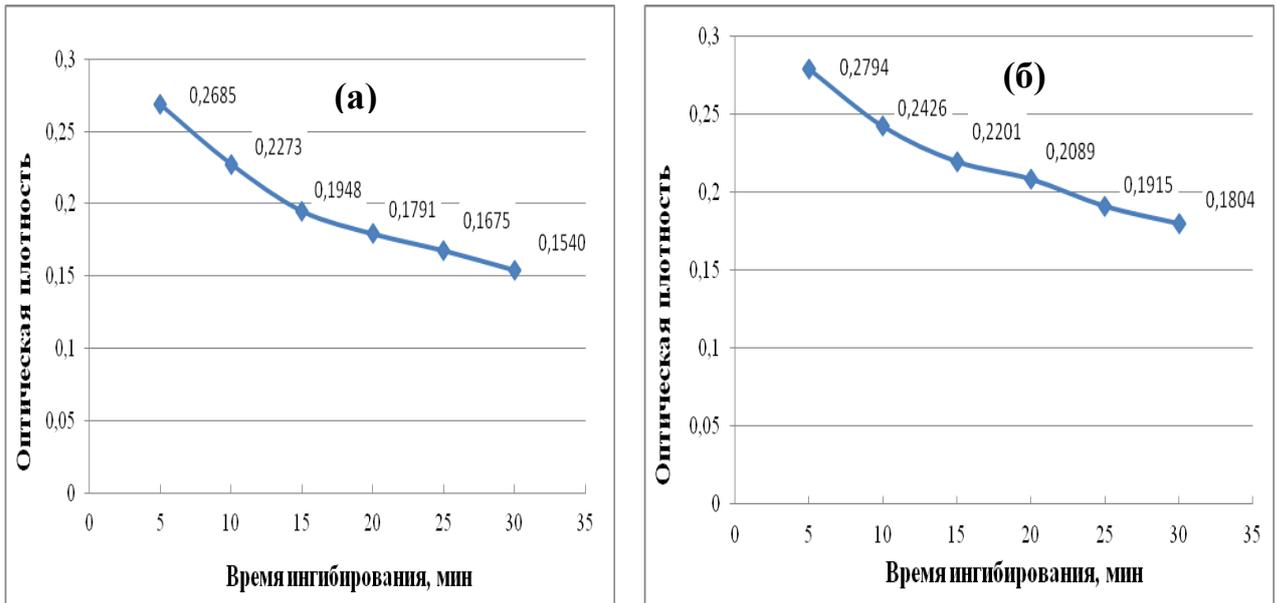


Рис. 3.4.7. Изменения оптической плотности экстрактов багульника болотного (а) – 40% объем.этанола, (б) - 60% объем.этанола, разбавленного в 30 раз от времени хранения в темноте при реакции с ДФПГ. Длина волны 517 нм

Полученные данные оптической плотности для 40% и 60% экстрактов от времени свидетельствуют о взаимодействии экстракта со стабильным радикалом ДФПГ, падение оптической плотности происходит на 30-40% за время 30 минут и далее изменений не зарегистрировано.

Далее экстракты, разбавленные в 30 раз, были облучены различными дозами на установке РХМ- γ -20.

При воздействии дозой 0,71 кГр на аэрированные экстракты багульника зарегистрировано уменьшение антирадикальной активности для 40 % экстракта на 45 %, для 60% экстракта на 37%, при более высокой дозе ионизирующего излучения значение эффекта ингибирования в реакции с ДФПГ равно 50-64% без значительного изменения от дозы.

Таблица 3.4.8. Зависимость эффекта ингибирования экстрактов багульника болотного, разбавленного в 30 раз, в реакции с ДФПГ от дозы облучения

D, кГр	Опт. плотность, отн.ед.		%Ингибирования	
	40% объем. этанола	60%	40%	60%
необл	0,1192	0,1267	84,0	83,0
0,071	0,5027	0,4418	45,6	52,2
0,141	0,4457	0,4012	51,8	56,6
0,212	0,4180	0,4402	54,8	52,4
0,282	0,3335	0,4041	63,9	56,3
0,564	0,3110	0,2960	59,0	61,0
0,846	0,2526	0,2719	56,8	53,5

3.4.2 Реакционная способность водно-этанольных экстрактов муррайи в реакции с 2,2-дифенил-1-пикрилгидрозилем

Для определения реакционной способности экстрактов из муррайи применяли свежеприготовленные растворы 0,2 мМ стабильного радикала ДФПГ. В таблице 3.4.9 представлены значения оптической плотности при 517 нм экстрактов муррайи метельчатой с различными временами облучения, на основании которых осуществляли экспрессный анализ активности экстрактов в зависимости от содержания вода-этанол.

По данным таблицы 3.4.9 построены гистограммы с различной концентрацией вода-спирт в зависимости от дозы.

Таблица 3.4.9. Процент ингибирования ДФПГ экстрактами муррайи в зависимости от дозы облучения в присутствии кислорода

% объем. этанол- ла	Опт. плотн., необл. раствор	% ингиб-я необл. раствор	Опт.плотн., D=0,81 кГр	% ингиб-я, D=0,81 кГр	Опт.плотн., D=4,73 кГр	% ингиб-я, D=4,73 кГр
0	0,289	67,7	0,566	57,1	0,353	60,5
10	0,280	68,7	0,516	60,9	0,373	58,3
20	0,281	68,6	0,429	67,5	0,311	65,2
30	0,241	73,0	0,414	68,6	0,292	67,3
40	0,235	73,7	0,359	73,1	0,237	73,5
50	0,199	77,7	0,519	61,0	0,207	76,9
60	0,208	76,7	0,301	77,2	0,201	77,5
70	0,195	78,2	0,281	78,7	0,221	75,3
80	0,185	89,3	0,347	73,7	0,246	72,5
90	0,301	66,3	0,48	63,6	0,408	54,4
100	0,602	31,0	0,916	30,6	0,811	9,3

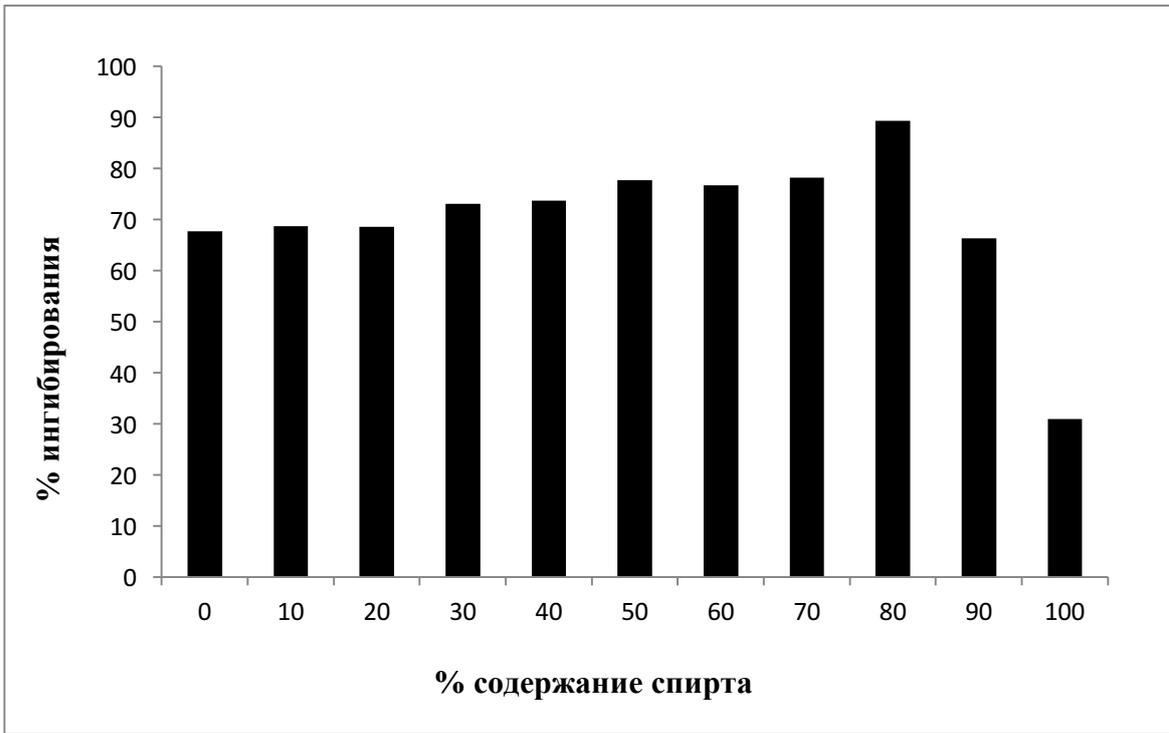


Рис. 3.4.8. Эффект ингибирования ДФПГ необлученным экстрактом муррайи от содержания этанола в системе



Рис. 3.4.9. Зависимость эффекта ингибирования от содержания этанола в системе в экстракте муррайи после облучения дозой $D = 0,81$ кГр

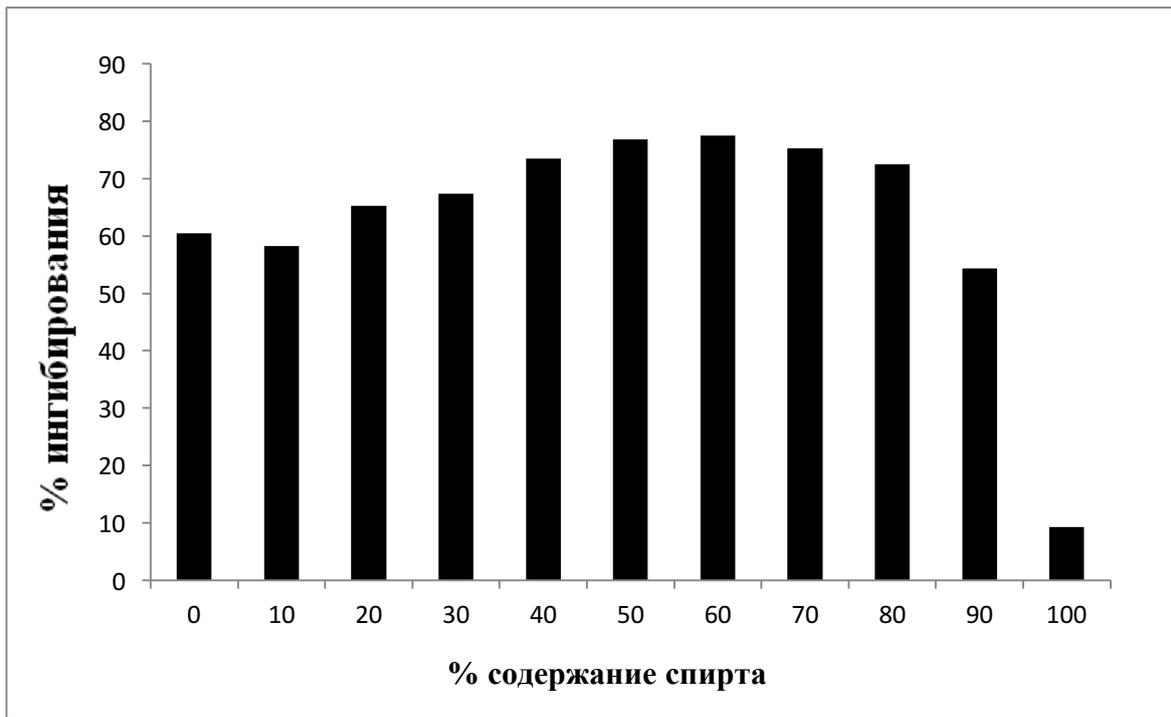


Рис. 3.4.10. Зависимость эффекта ингибирования от содержания этанола в системе в экстракте муррайи после облучения дозой $D = 4,73$ кГр

Показано, что эффект ингибирования ДФПГ экстрактами муррайи после воздействия дозами 0,81 кГр и 4,73 кГр остаётся высокой. Далее был исследован эффект ингибирования в реакции с ДФПГ для 70% экстракта муррайи в зависимости от её добавки в систему.

Таблица 3.4.10. Изменение эффекта ингибирования в зависимости от добавки экстракта в систему с ДФПГ

объём добавки, мкл	A, отн.ед.	% ингибирования
0	1,173	0
50	0,681	41,9
100	0,582	50,4
150	0,393	66,5
180	0,327	72,1
200	0,306	73,9

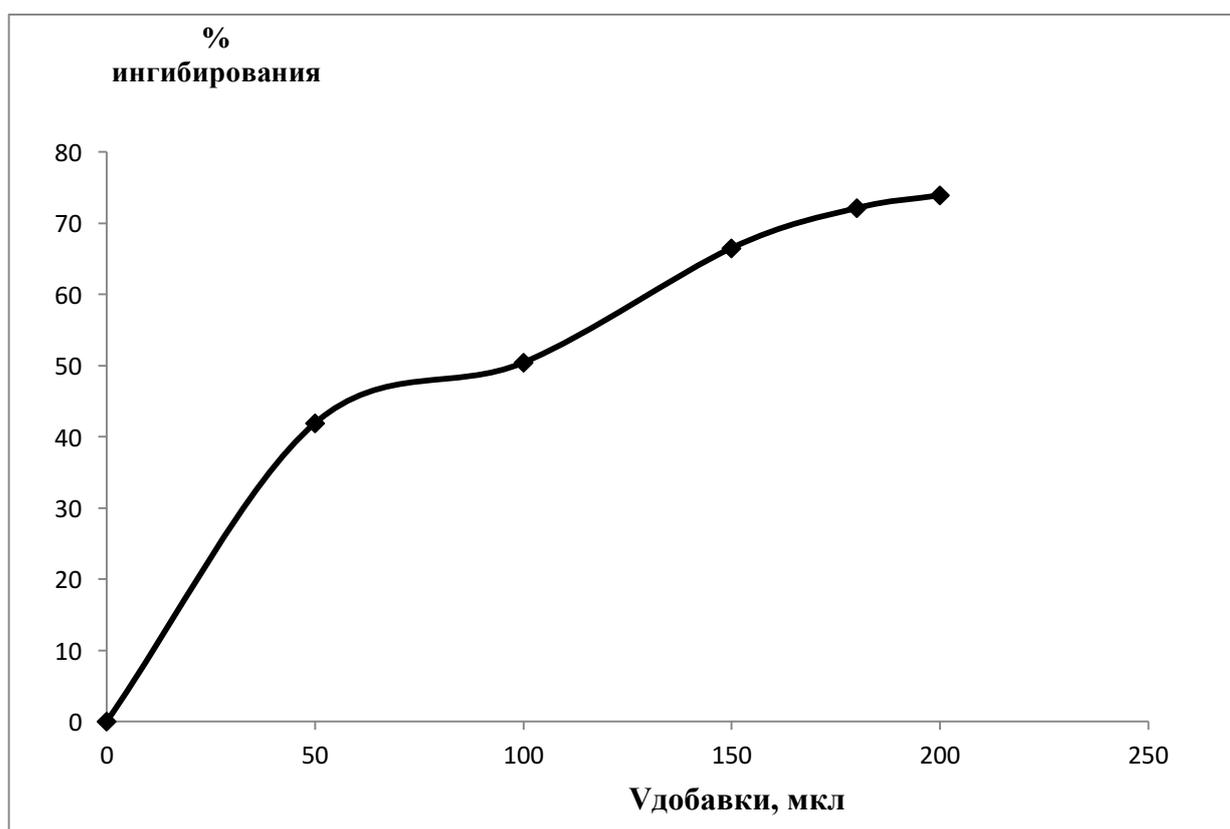


Рис. 3.4.11. Зависимость эффекта ингибирования от добавки 70% экстракта в систему

Далее разбавленные в 2 раза экстракты 70% муррай метельчатой были облучены различными дозами, и был произведен анализ зависимости антирадикальной активности от добавки экстракта в систему с использованием стабильного радикала ДФПГ (табл. 3.4.11).

Таблица 3.4.11. Изменение эффекта ингибирования ДФПГ экстрактами 70% муррай, разбавленной в 2 раза, при увеличении добавки и дозы облучения

Объем добавки, мкл	%ингибирования 0 кГр	%ингибирования 0,27 кГр	%ингибирования 1,08 кГр	%ингибирования 5,94 кГр	%ингибирования 6,48 кГр
50	0,8	3,0	12,5	16,3	17,9
100	20,7	14,0	4,7	26,7	35,1
150	38,3	34,4	24,4	39,2	45,9
180	45,9	47,3	28,5	46,3	52,0
200	51,0	55,0	38,5	49,7	57,4

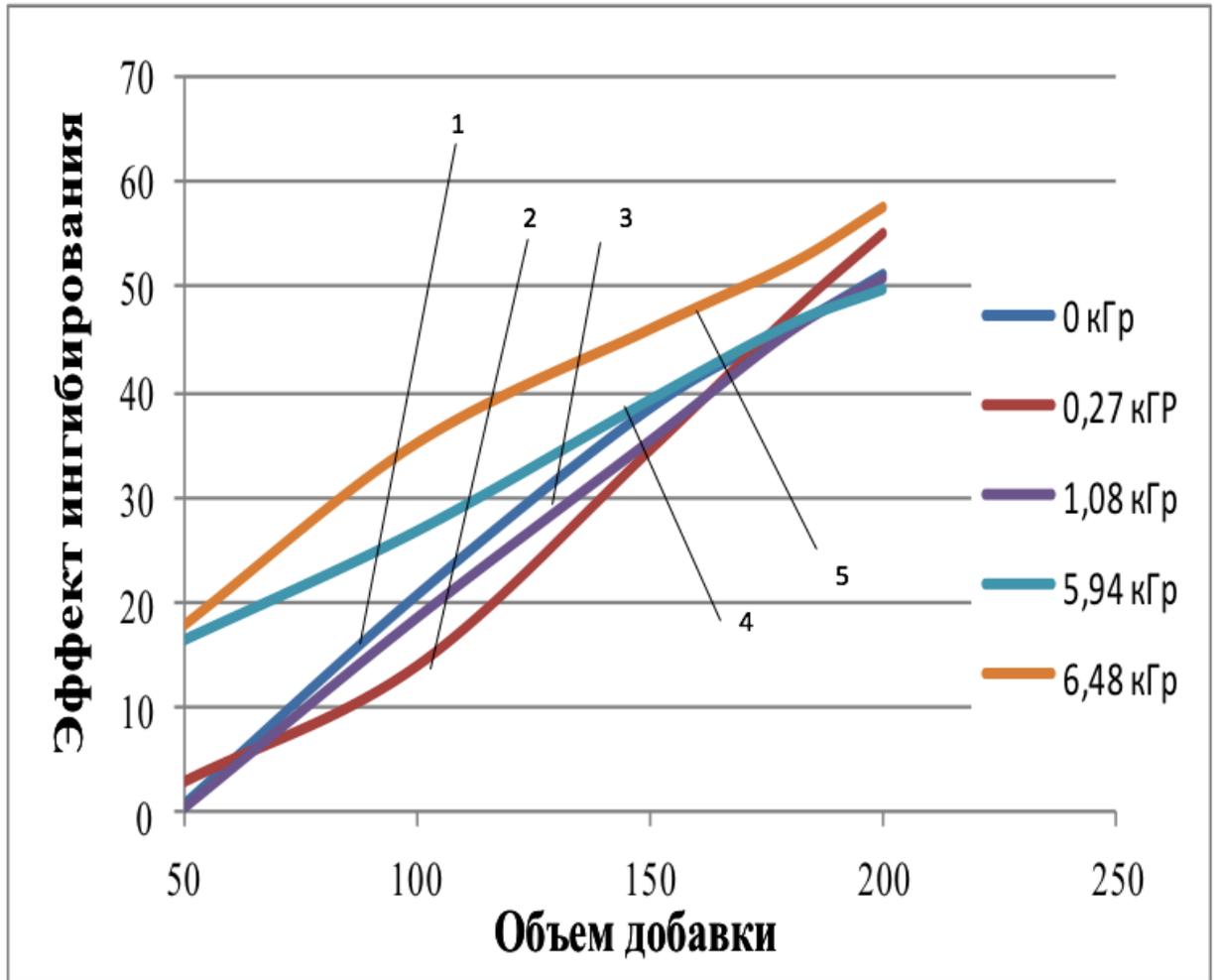


Рис. 3.4.12. Изменение эффекта ингибирования при 517 нм 70% экстрактами муррайи, разбавленного в 2 раза, в зависимости от добавки его в систему с ДФПГ при различных дозах облучения (кГр): 1 – 0, 2 – 0.27, 3 – 1.08, 4 – 5.94, 5 – 6.48

Из графика 3.4.12 видно, что при дозах облучения 0,27 кГр и 1,08 кГр эффект ингибирования ДФПГ экстрактами муррайи уменьшается по сравнению с необлученным, а при дозах выше 6 кГр наблюдается увеличение восстанавливающей способности экстракта муррайи в реакции с ДФПГ. Подобная картина наблюдалась и исследованных экстрактов донника и багульника: спектрофотометрически зарегистрировано уменьшение концентрации биологически-активных веществ в системе от дозы облучения, но увеличение ингибирующей способности в реакции с ДФПГ.

3.4.3 Реакционная способность некоторых кумаринов в реакции с 2,2- дифенил-1-пикрилгидрозилом

В качестве исследуемых веществ были взяты эскулетин, эскулин, скополетин и умбеллиферон, которые, как известно, из литературных данных содержатся в экстрактах багульника болотного и муррайи метельчатой, и с ними связывают проявление антирадикальной восстановительной активности. В качестве растворителя был выбран 40% этиловый спирт, концентрации производных кумарина равны 0,01М.

Таблица 3.4.12. Процент ингибирования ДФПГ кумарин-производными соединениями. Концентрации равны 0.01 М в 40% этаноле

Вещество	Опт.плотность	% Ингибирования
Эскулетин	0,0835	82,2
Эскулин	0,4100	12,6
Скополетин	0,4347	7,3
Умбеллиферон	0,4660	0,7
Контроль	0,4691	

Таблица 3.4.13. Процент ингибирования ДФПГ кумаринпроизводными соединениями в зависимости от дозы облучения в присутствии кислорода

D, кГр	Эффект ингибирования (%) кумаринпроизводных синтетических соединений			
	эскулетин	эскулин	скополетин	умбелли- ферон
0,14	79,46	20,25	10,50	1,78
0,28	82,06	14,26	2,38	12,68
0,56	84,29	16,22	8,26	16,56

Из рис. 3.4.13 видно, что эскулетин проявляет большую антирадикальную активность в реакции с ДФПГ, и с ним связываем антирадикальные восстановительные свойства в кумаринсодержащих экстрактах.

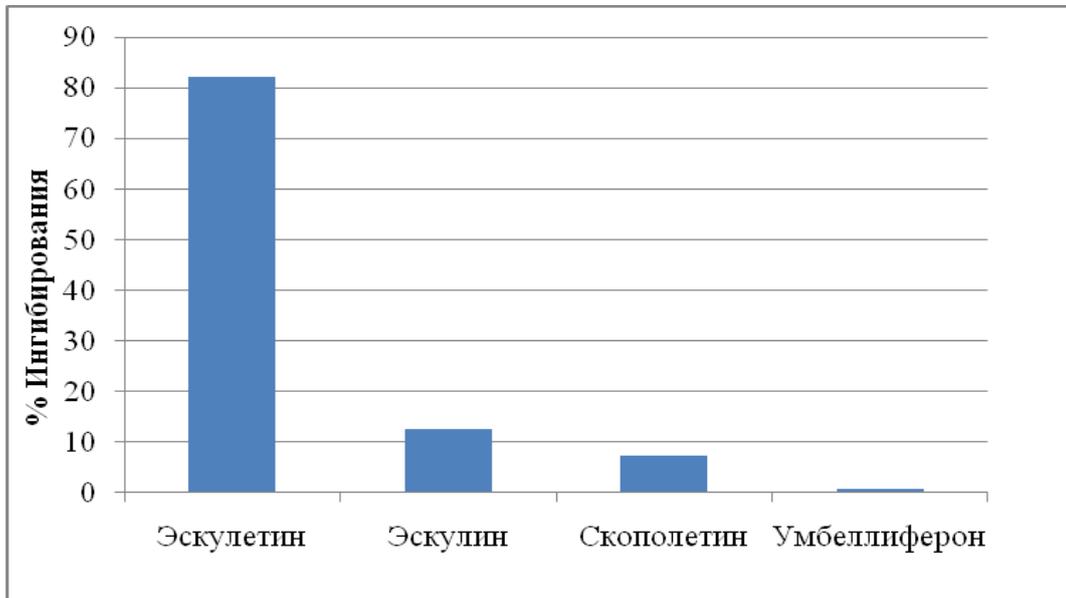


Рис. 3.4.13. Проявление антирадикальных свойств этанольных (40% объем.по этанолу) 0.01 М растворов эскулетина, эскулина, скополетина и умбеллиферона

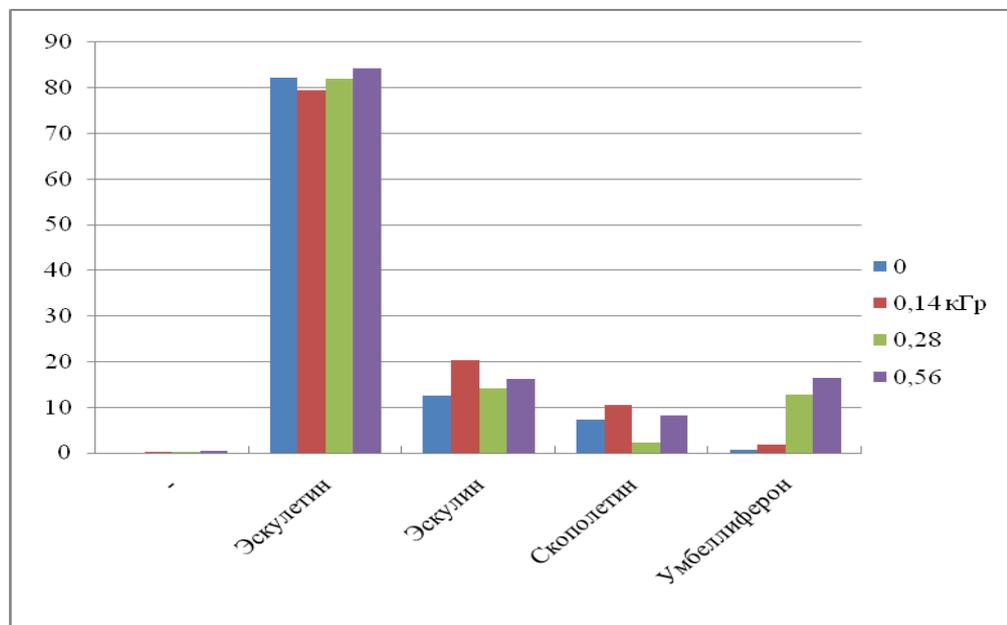


Рис. 3.4.14. Проявление антирадикальных свойств кумарин-производных соединений в зависимости от дозы облучения. В легенде к графику указаны дозы облучения

В дальнейшей главе будут представлены результаты по исследованию взаимодействия эскулетина и эскулина с супероксид анион-радикалом кислорода.

3.5 Определение реакционной способности эскулетина, эскулина с супероксид анион-радикалом с использованием нитросинего тетразолия хлорида

Нитросиний тетразолий-п (хлорид) или nitroblue tetrazolium (NBT) известен как индикатор супероксид-анионов, под действием которых NBT восстанавливается до диформаза.

A, отн.ед.

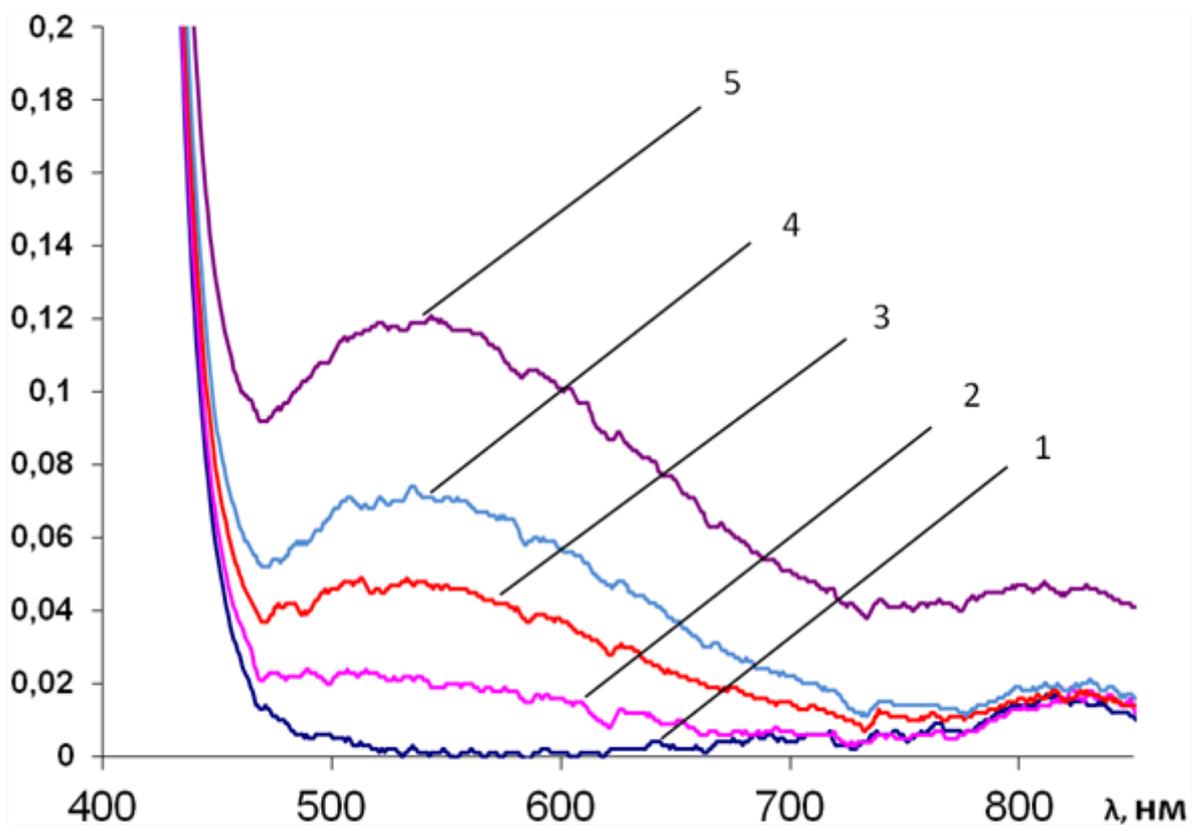


Рис. 3.5.1. Спектры оптического поглощения диформаза в зависимости от дозы облучения (Гр): 1 – 0, 2 – 24; 3 – 48; 4 – 144; 5- 220

На данном графике (рис. 3.5.1) изображены полосы поглощения диформаза в зависимости от дозы облучения. Максимумы поглощения

наблюдаем на длине волны $\lambda = 542,5$ нм, что соответствуют справочным данным, в которых указывается максимум поглощения диформаза $\lambda=540-560$ нм. В результате чего, наблюдения за образованием супероксид - анионов будем вести при этой длине волны.

Анализируя уравнения кривых исходного раствора NBT и с добавлением Esc, изображенных на рис. 3.5.2, по приблизительно равным углам наклона можно сделать вывод о том, что не происходит восстановление супероксид - анионов радикала кислорода эскулетинном, таким образом, эскулетин не проявляет антирадикальной активности в реакции с диоксид-радикал - анионом.

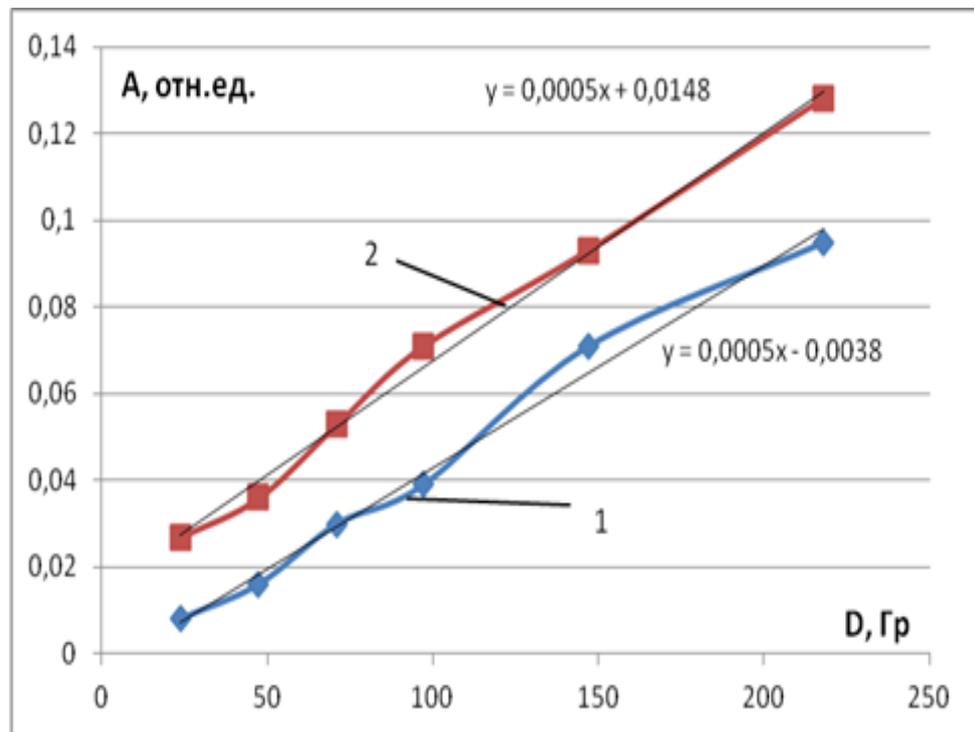


Рис. 3.5.2. Зависимость оптической плотности от поглощенной дозы при $\lambda=542,5$ нм растворов 1-NBT и 2-NBT+Esc в 5% EtOH при значении фосфатного буфера pH=7,4

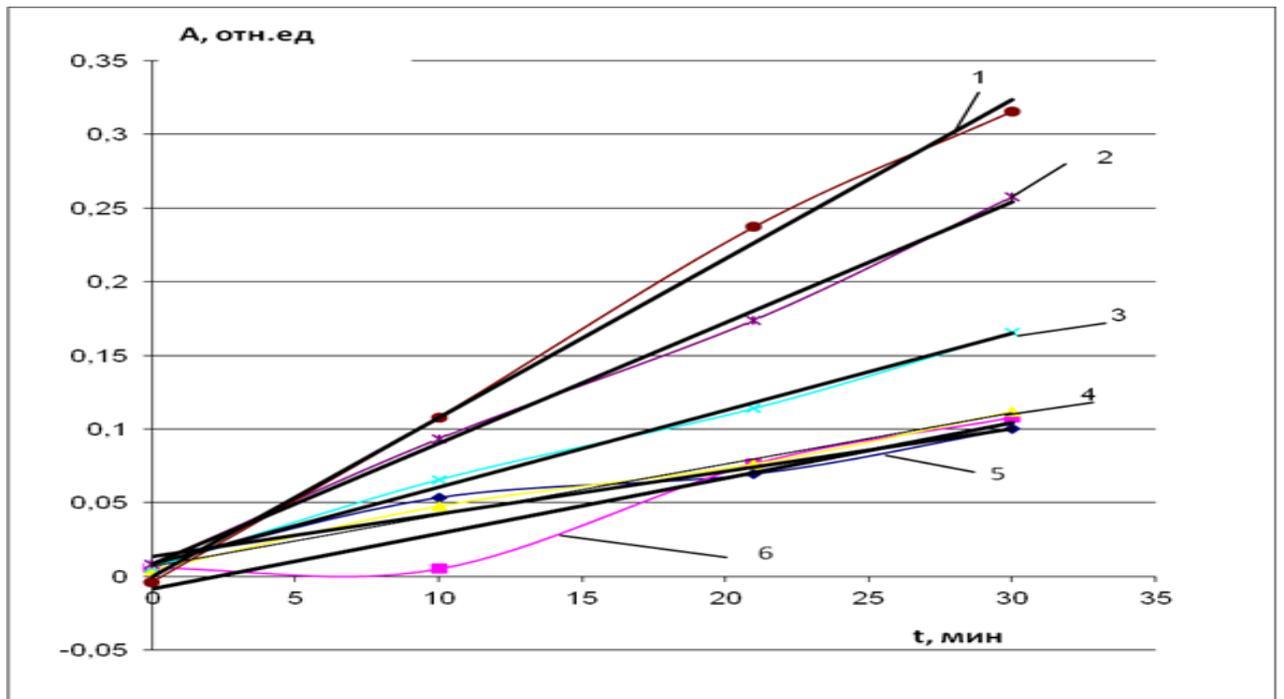


Рис. 3.5.3. Зависимость изменения оптической плотности диформаза в отсутствие добавок (кривая 1) и в присутствии эскулина в системе (кривые ниже) от времени облучения

Таблица.3.5.1(а). Уравнения тренда для систем с разной концентрацией эскулина

	Концентрация Esc-Gl, моль/л	Уравнения
1	0	$y = 0,010x - 0,000$
2	1×10^{-4}	$y = 0,008x + 0,008$
3	4×10^{-4}	$y = 0,005x + 0,008$
4	6×10^{-4}	$y = 0,003x + 0,006$
5	8×10^{-4}	$y = 0,003x - 0,008$
6	10×10^{-4}	$y = 0,002x + 0,013$

По методике 2.2.4 были построены зависимости изменения оптической плотности диформаза в отсутствие добавок и в присутствии эскулина (рис. 3.5.3) в системе от времени облучения.

Обработав полученные результаты, данные уравнения кривых были занесены в таблицу 3.5.1(a).

Далее представлена зависимость изменения $[NBT]/[Esc-GI]$ от $[W(Esc-GI)]/[W(NBT)]$.

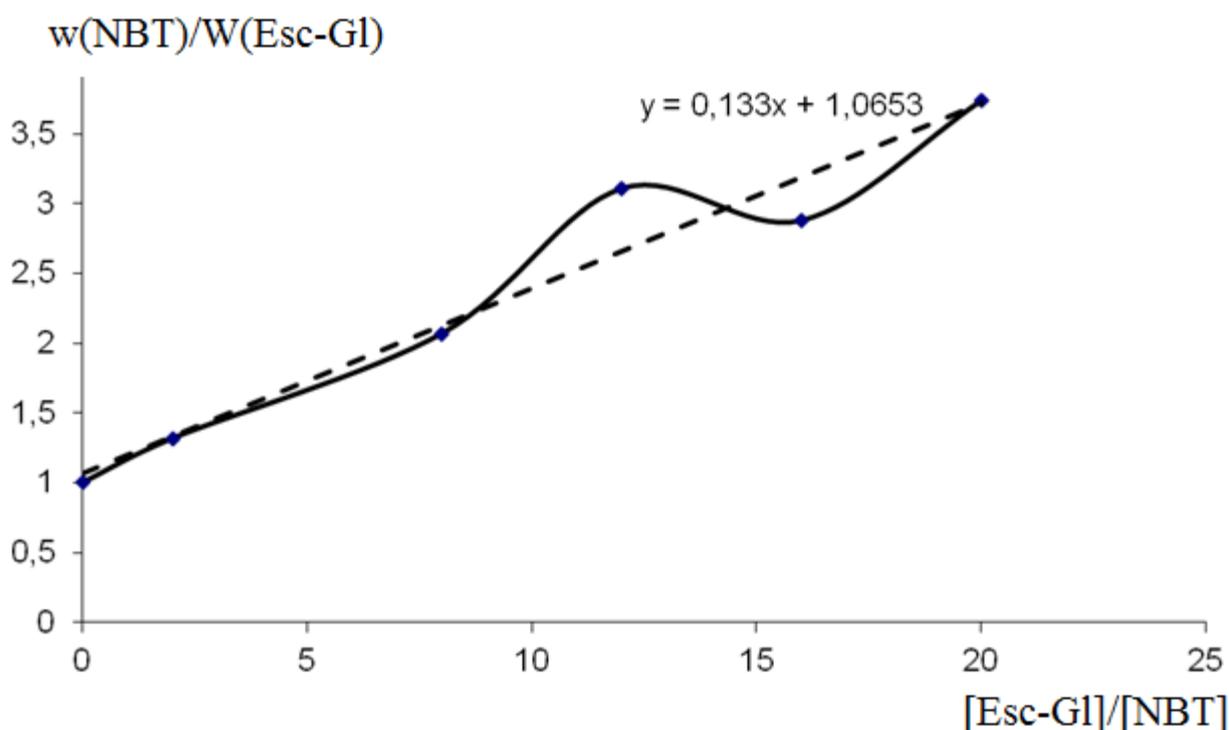


Рис. 3.5.4. Зависимость изменения $[Esc-GI]/[NBT]$ от $[W(Esc-GI)]/[W(NBT)]$

Данная зависимость (рис. 3.5.4) есть отображение отношения констант $k[Esc-GI]/k[NBT]=0.133$.

Зная $k[NBT]=6,4 \times 10^4$ л/моль \times с при pH=7.4, мы определяем константу взаимодействия эскулина и супероксид-анион радикалом (COAP):

$$k[Esc-GI+COAP]=8,91 \times 10^3 \text{ л/моль}\times\text{с} .$$

Следовательно, использование NBT позволяет определять константы взаимодействия с COAP.

Так же были построены зависимости изменения $[W(\text{NBT})]/[W(\text{analit})]$ от $[\text{analit}]/[\text{NBT}]$ (рис. 3.5.5) (табл. 3.5.1(б)).

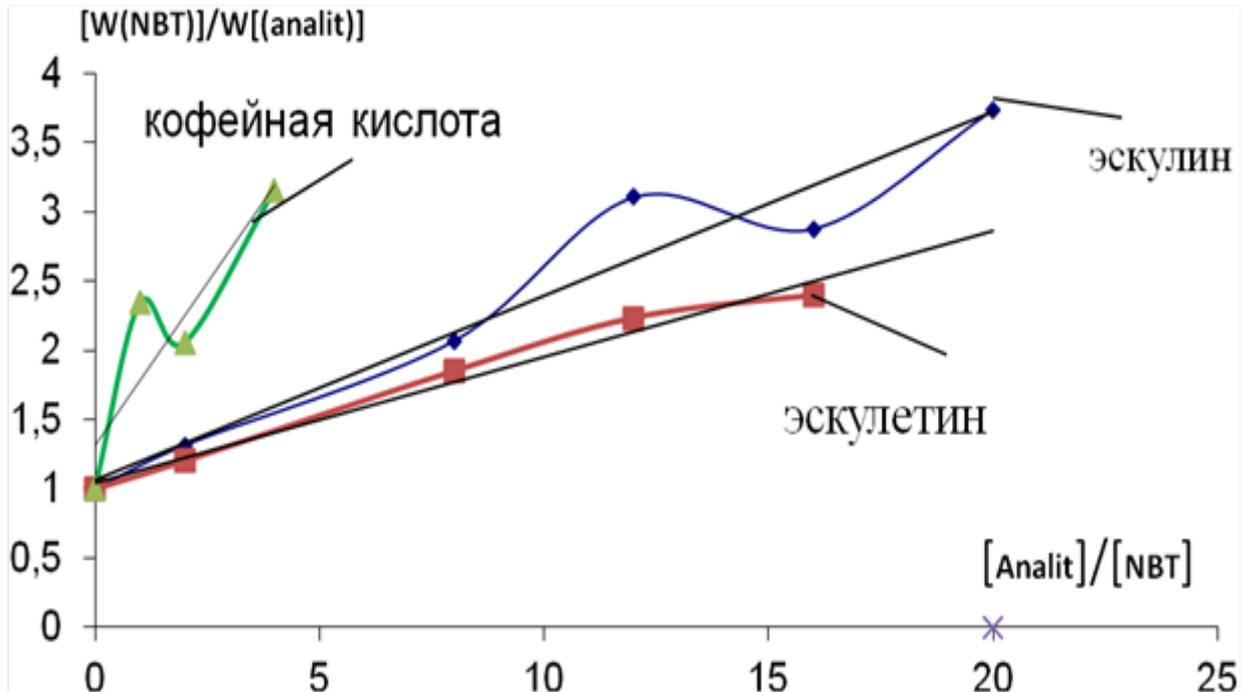


Рис. 3.5.5. Зависимости изменения $[W(\text{NBT})]/[W(\text{analit})]$ от $[\text{analit}]/[\text{NBT}]$

Таблица.3.5.1(б). Уравнения тренда для кофеинной кислоты, эскулетина, эскулина

	Соединение	Уравнение кривой
1	Кофейная кислота	$y = 0,4689x + 1,3162$
2	Эскулин	$y = 0,133x + 1,0653$
3	Эскулетин	$y = 0,0911x + 1,0426$

И также определены константы взаимодействия данных веществ с супероксид-анион радикалом (COAP): $k[\text{EscGI}+\text{COAP}]=8,91 \times 10^3$ л/(моль×с), $k[\text{Esc}+\text{COAP}]=5,8 \times 10^3$ л/(моль×с), $k[\text{Caf}+\text{COAP}]=3,2 \times 10^4$ л/(моль×с).

Таким образом, сделан вывод о том, что кофеинная кислота проявляет наибольшую антирадикальную активность по отношению к COAP в ряду:

кофейная кислота > эскулин > эскулетин. При сравнении антирадикальной активности эскулетина и эскулина по отношению к СОАР экспериментально установлено, что у агликона слабая антирадикальная активность по отношению к СОАР.

3.5.1 Исследование реакционной способности эскулетина, эскулина с супероксид анион - радикалом в присутствии ионов металлов

По методике, описанной в п.2.2.4 в присутствии металлов, были построены зависимости изменения оптической плотности диформаза в отсутствие добавок и в присутствии эскулетин+металл в системе от времени облучения (рис. 3.5.6).

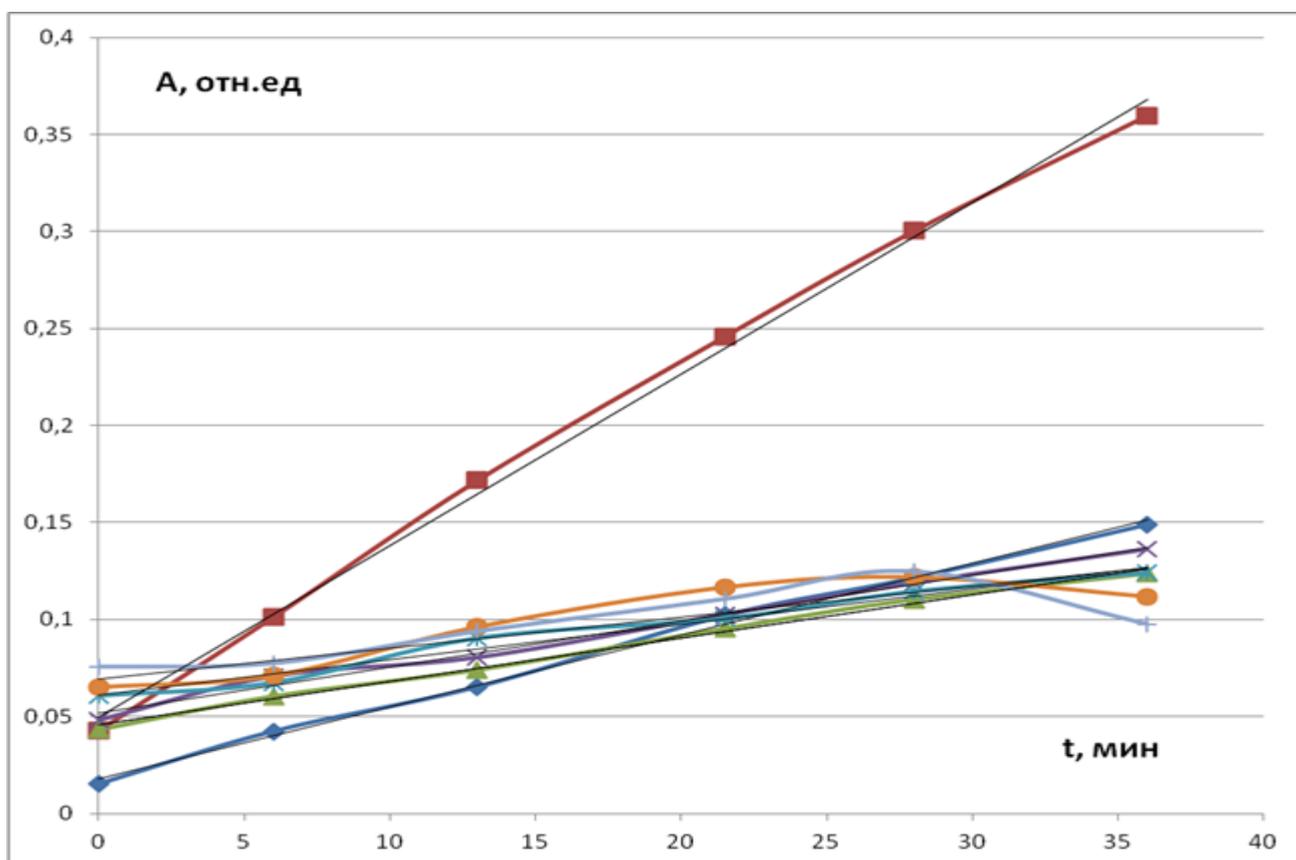


Рис. 3.5.6. Зависимость изменения оптической плотности диформаза в отсутствие добавок Me (синяя) и в присутствии Cu(II) различной концентрации, моль/л: (красная $0,5 \times 10^{-4}$; зеленая 1×10^{-4} ; фиолетовая 2×10^{-4} ; голубая 3×10^{-4} ; оранжевая 4×10^{-4}) в системе от времени облучения.

$[Esc] = 0,5 \times 10^{-4}$ моль/л

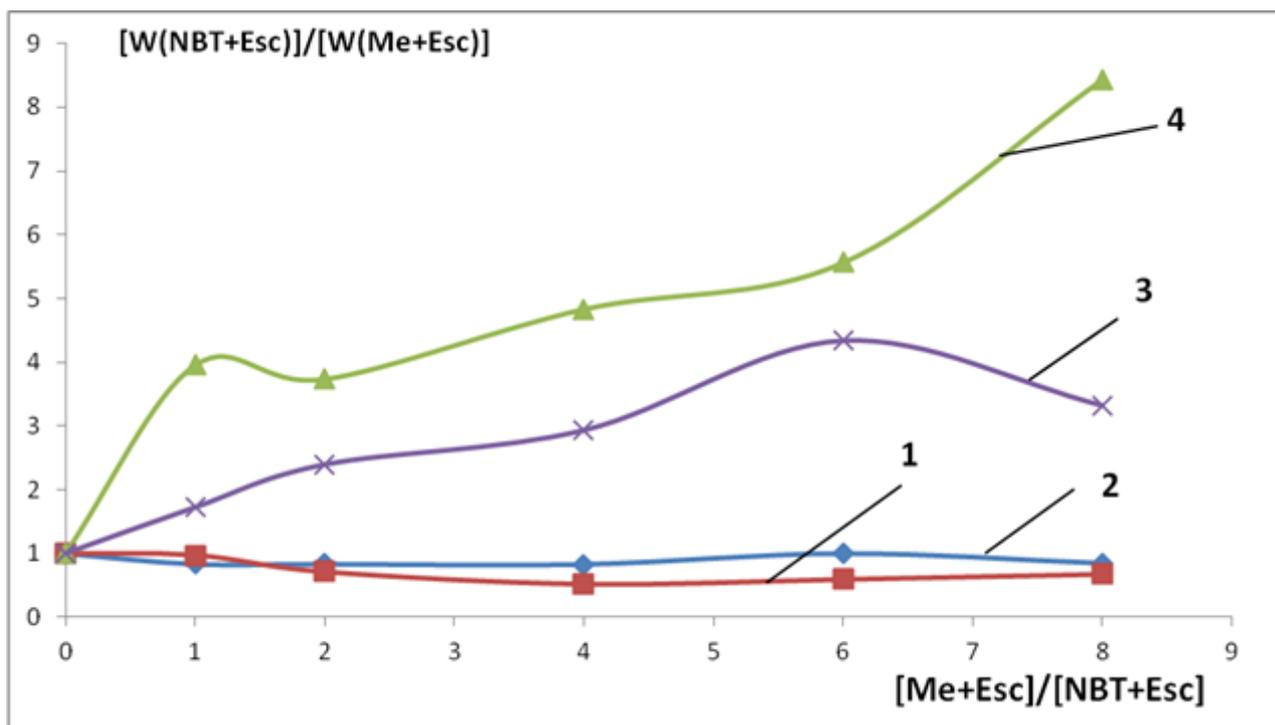


Рис. 3.5.7. Зависимость изменения $[W(NBT+Esc)]/[W(Me+Esc)]$ от $[Me+Esc]/[NBT+Esc]$, при добавлении в растворы металлов:

1 - Fe, 2 - Mg, 3 - Zn, 4 - Cu. $[Esc]=0,5 \times 10^{-4}$ моль/л

Как видно из графика 3.5.7., наибольшую антирадикальную активность к СОАР вновь проявил Cu, но уже в комплексе с эскулетинном. Причем эффект ингибирования его увеличился на 75-85%. Так же следует отметить заметное увеличение активности комплекса эскулетина с Zn.

Мы определяем константу взаимодействия эскулетина и супероксид-анион радикала (СОАР) с металлами (Zn, Cu):

$$k[Esc+COAP+Zn]=2,14 \times 10^{-4} \text{ л/моль} \times \text{с} ,$$

$$k[Esc+COAP+Cu]=4,73 \times 10^{-4} \text{ л/моль} \times \text{с} .$$

По методике, описанной в п. 2.5 были построены зависимости изменения $[EscGl+Me]/[NBT]$ от $[W(EscGl+Me)]/[W(NBT)]$ для концентрации эскулина $[EscGl]=0,5 \times 10^{-4}$ моль/л.

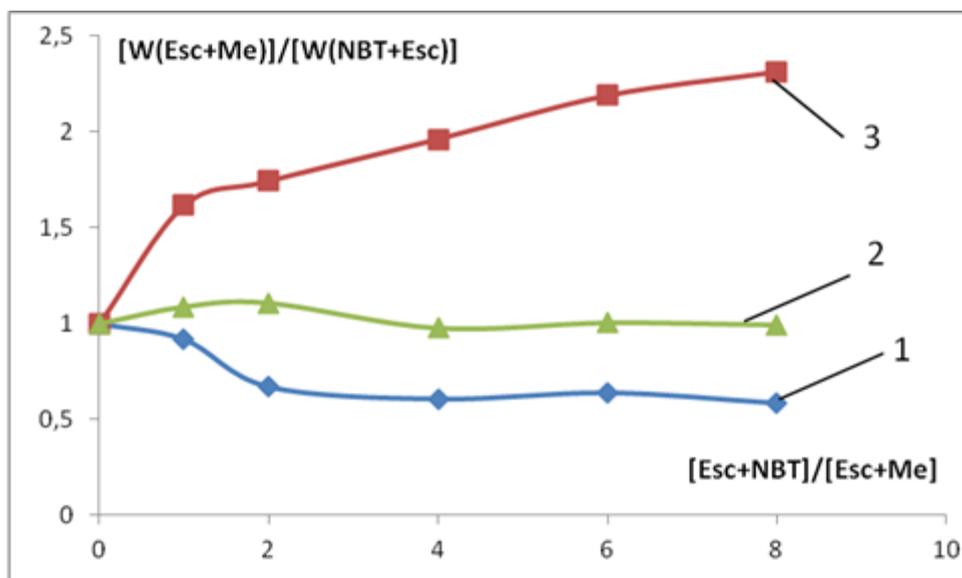


Рис. 3.5.8. зависимость изменения $\frac{[W(NBT+EscGl)]}{[W(Me+EscGl)]}$ от $\frac{[Me+EscGl]}{[NBT+Esc]}$, при добавлении в растворы металлов:

1-Fe, 2-Zn, 3-Cu. $[EscGl]=0,5 \times 10^{-4}$ моль/л

Кривые линии 1 и 2 рис. 3.5.8, соответствующие добавлению в исследуемые растворы ионов металлов Fe и Zn, соответственно, не меняют характер поведения при изменении концентрации данных ионов в реакции с NBT. Иную картину поведения показывает кривая 3, поскольку при увеличении концентрации ионов Cu в системе наблюдается слабый рост антирадикальной активности эскулина с данным металлом.

3.5.2 Сравнение экспериментальных данных протекторных свойств эскулетина и эскулина в присутствии и отсутствие ионов металлов по отношению к супероксид анион-радикалу

Определив константы взаимодействия данных веществ с супероксид-анион радикалом см. рис. 3.5.5.:

$$k[EscGl+COAP]=8,91 \times 10^3 \text{ л}/(\text{моль} \times \text{с})$$

$$k[Esc+COAP]=5,8 \times 10^3 \text{ л}/(\text{моль} \times \text{с})$$

$$k[caf+COAP]=3,2 \times 10^4 \text{ л}/(\text{моль} \times \text{с})$$

и, сравнив антирадикальную активность эскулетина и эскулина по отношению к СОАР с известным и широко применяемым антиоксидантом – кофейной кислотой, экспериментально установлено, что кофейная кислота проявляет наибольшую антирадикальную активность по отношению к СОАР в ряду: кофейная кислота > эскулин > эскулетин. Таким образом, делаем вывод о том, что агликон практически не проявляет антирадикального эффекта по отношению к СОАР. Но известно, что в эскулетине содержатся две гидроксильные группы в бензольном кольце, благодаря чему он является хорошим комплексообразователем. Из чего и сделали предложение о возможном проявлении его активности в комплексе с металлами, в качестве которых взяли физиологически необходимые.

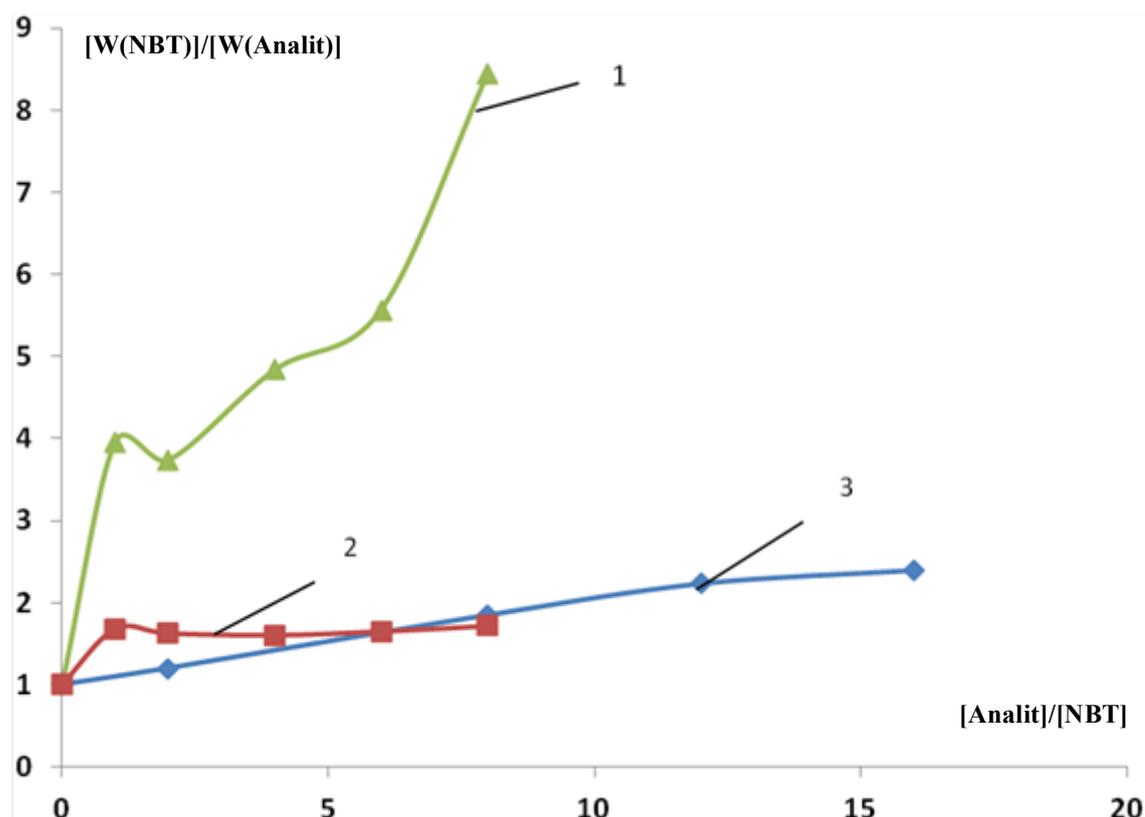


Рис. 3.5.9. Зависимость изменения $[W(NBT)]/[W(Analit)]$ от $[Analit]/[NBT]$, где Analit: 1 - изменение концентрации Cu при постоянной концентрации эскулетина, 2 - изменение концентрации Cu, 3 - изменение концентрации эскулетина

На рис. 3.5.9 показана зависимость $[W(\text{NBT})]/[W(\text{Analit})]$ от $[\text{Analit}]/[\text{NBT}]$. Согласно предыдущим исследованиям, было установлено, что ионы меди улучшают реакционную способность по отношению к СОАР. При введении в пробу добавки эскулетина наблюдаем резкое возрастание антирадикальных свойств.

Установлено, что ионы меди (II), цинка (II) оказывают каталическое влияние на акцепторную способность эскулетина в реакции с СОАР. Она сопоставима с активностью кофейной кислоты. Антирадикальная активность увеличивается в 75 раз по сравнению с эскулетином без введения ионов металлов. $k[\text{Cu}+\text{COAP}]=3,39 \times 10^3 \text{ л/моль} \times \text{с}$, $k[\text{Esc}+\text{COAP}] = 5,8 \times 10^3 \text{ л/моль} \times \text{с}$, $k[\text{Esc}+\text{COAP}+\text{Cu}]=4,73 \times 10^4 \text{ л/моль} \times \text{с}$.

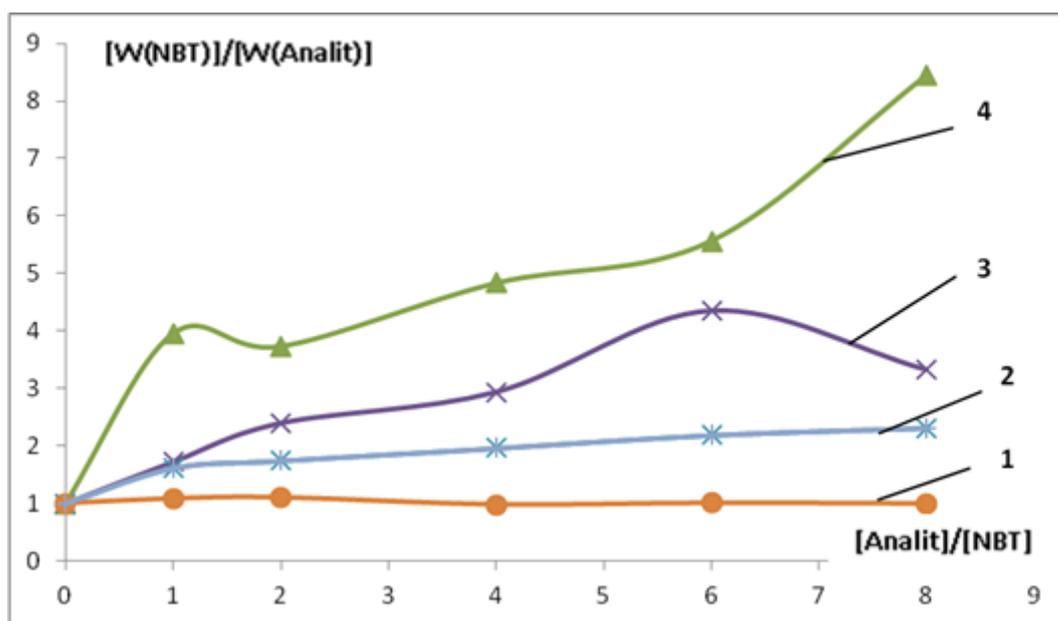


Рис. 3.5.10. зависимость изменения $[W(\text{NBT})]/[W(\text{Analit})]$ от $[\text{Analit}]/[\text{NBT}]$, где Analit: 1,3 -изменение концентрации Zn при постоянной концентрации эскулина и эскулетина, 2,4 -изменение концентрации Cu при постоянной концентрации эскулина и эскулетина, соответственно.

Сравнив экспериментальные данные эскулина и эскулетина при добавлении в системы ионов металлов меди(II) и цинка(II), делаем вывод о том, что эскулетин в комплексе с медью(II) проявил в 2 раза большую

антирадикальную активность с анион-радикалом кислорода в реакции с NBT, по сравнению с эскулетином с цинком (II), эскулин не показал проявления активности в присутствии ионов металлов (рис. 3.5.10). Полученные результаты показывают высокий антирадикальный эффект эскулетина с медью (II) и цинком (II) по отношению к СОАР сравнимую с кофейной кислотой.

3.6 Определение радиопротекторной активности багульника и донника

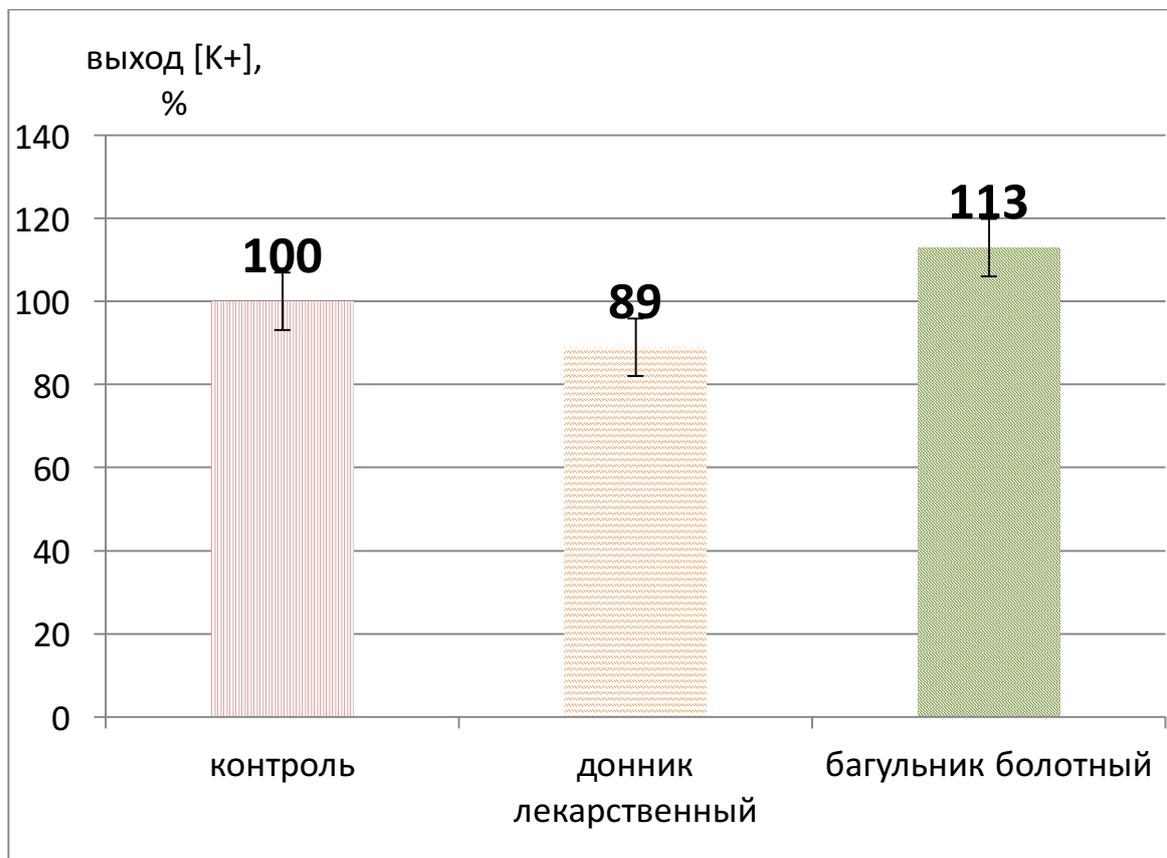


Рис. 3.6.1. Выход ионов [K⁺] % из дрожжевых клеток, облученных D= 0,4 кГр, при внесении в систему кумаринов, выделенных из экстрактов лекарственных растений донника и багульника.

По методике 2.2.1 получены водные растворы кумарина. На основании методики, указанной в п. 2.7, проведен анализ радиопротекторной активности выделенных кумаринов по отношению к дрожжевым клеткам расы Феодосия-7.

Выход ионов калия соответствует радиопротекторной активности: чем $[K^+]$ % меньше, тем больше проявление антирадикальной способности кумарина. Результаты проведенных испытаний по определению радиопротекторной активности кумаринов из лекарственных растений показали, что наибольшей активностью обладает кумарин из донника лекарственного (рис. 3.6.1).

Мы исследовали протекторную активность кумаринсодержащих экстрактов. Мы знаем, что радиопротекторная активность - это химическая защита от ионизирующего излучения. В нашей работе установлено, что багульник обладает высокими антирадикальными свойствами, но сами кумарины в данном водном экстракте показали отсутствие радиопротекторных свойств по отношению к дрожжевым клеткам расы Феодосия-7. Это может быть связано с синергизмом: влияние и металлов и других биологически-активных веществ в экстракте оказывают влияние на протекторную активность, а выделенные кумарины из багульника не проявили протекторных свойств по отношению к дрожжевым клеткам.

В работах [56, 62] исследуют препараты, в состав которых входят кумарины и другие полифенолы. Но каждое кумаринпроизводное соединение требует отдельного детального исследования. И полученные результаты на практике позволяют прогнозировать свойства лекарственных кумаринсодержащих соединений, которые в дальнейшем ищут продолжения в исследованиях на мышах, кроликах и других более организованных живых системах.

Выводы

- Впервые хромато-масс-спектрометрически установлено, что конечными продуктами элементарных реакций кумарина с участием активных радикальных частиц являются продукты реакции диспропорционирования аддукта углеродцентрированного радикала к кумарину.
- Определены константы скорости взаимодействия эскулетина $k[\text{Esc}+\text{COAP}] = (5,5 \pm 0.03) \times 10^3$ л/(моль×с) и его гликозида эскулина $k[\text{Esc-Gl}+\text{COAP}] = (8,8 \pm 0.02) \times 10^3$ л/(моль×с) с супероксид анион-радикалом. Установлено, что наличие гликозидной части у эскулетина увеличивает реакционную способность по отношению к супероксид анион-радикалу.
- Впервые показано, что наличие ионов цинка (II) и меди(II) в растворе увеличивает реакционную способность в реакции с супероксид анион-радикалом, введение ионов цинка (II) увеличивает ее в 4 раза, а введение ионов меди(II) - в 10 раз.
- Реакционная способность водно-этанольных экстрактов донника, багульника, муррайи по отношению к углеродцентрированным радикалам уменьшается в ряду багульник>муррайя>донник.
- При реакции экстрактов со стабильным радикалом дифенилпикрилгидрозилом показано, что максимальной антирадикальной способностью обладает багульник, она в 30 раз больше, чем для муррайи и донника.
- Впервые установлено, что продукты реакции индивидуальных кумаринов (эскулетин, эскулин, скополетин, умбеллиферон) с активными частицами радиолиза аэрированного этанола имеют способность связывать стабильный радикал дифенилпикрилгидрозил аналогично исходным кумаринам за исключением умбеллиферона, для которого показано увеличение этой способности.

- Показано наличие защитных свойств для кумаринов в водных растворах, выделенных из донника, и отсутствие таковых для кумаринов из багульника по оценке радиопротекторной активности.

Список используемой литературы

1. Александрова В.А., Снигирева Г.П. Создание макромолекулярных антиоксидантов для защиты генома от ионизирующей радиации // Биоантиоксидант: тезисы докл. IX международной конференции. – Москва, 2015. – 8 с.
2. Яшин Я. И., Рыжнев В.Ю., Яшин А. Я., Черноусова Н.И. Природные антиоксиданты // Содержание в пищевых продуктах и их влияние на здоровье и старение человека. - М.: Изд-во “ТрансЛит”, 2009. – 212 с.
3. Башура А.В., Кузнецов Н.А., Применение фитотерапии при злокачественных онкологических заболеваниях молочной железы у собак и кошек // Лекарственные растения: биоразнообразие, технологии, применение: сборник научных статей по материалам I Международной научно–практической конференции. – Гродно: ГГАУ, 2014. – 276 с.
4. Kai Wang, Ye Zhang, S.I.N. Ekinwe, Xianghui Yi, Xianxian Liu, Hengshan Wang, Yingming Pan. Antioxidant activity and inhibition effect on the growth of human colon carcinoma (HT-29) cells of esculetin from Cortex Fraxini // Med. Chem. Res. – 2010. – DOI 10/1007/s0044-010-9426-y.
5. Эмануэль Н. М. Общая закономерность изменения содержания свободных радикалов при злокачественном росте. Черноголовка, 1974.
6. Пиотровский М. С. Участие НАДФН-оксидазы плазмалеммы в генерации супероксид-анион радикала в апопласте. Автореф диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук. – Москва, 2012. – 23 с.
7. Benthath A., Rusznyak S., Szent-Gyrgy A., Vitamin P// Nature. P. 327.

8. Сирота Т.В. Использование нитросинего тетразолия в реакции автоокисления адреналина для определения активности супероксиддисмутазы // Биомедицинская химия. – 2013. – Т. 59 - Вып. 4. – С. 399- 410
9. Меньщикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К., Бондарь И.А., Круговых Н.Ф., Труфакин В.А. Окислительный стресс // Прооксиданты и антиоксиданты. – М.: Фирма “Слово”, 2006. – 556 с.
10. Kuo S.M., Leavitt P.S., Lin C.P., Dietary flavanoids interact with trace metals and of metallothionein level human intestinal cells// Biol Trace Elem Res, 1998
11. Костюк В.А., Потапович А.И. Биорадикалы и Биоантиоксиданты. Изд-во БГУ, Минск, 2004
12. Alvi N.K., Rizvi R.Y., Hadi S.M. Interaction of quercetin with DNA // Bioscience RePorts. – 1986. – Vol.6. – PP. 861-868
13. Harman D. Free radical theory of aging // Mutation research. — 1992. — Vol. 275, № 3-6. — P. 257—266
14. Grisiola S., Rubio V., Feijoo B., Mendelson J. Inhibition of lactic dehydrogenase and of pyruvate kinase by low concentration// Physiol. Chem. Phys., 1975. – Vol. 7. – P. 473-475
15. Кособуцкий В.С., Майборода В.Д. Электронная структура и свойства гидроксиалкильных радикалов // Химия высоких энергий, 1989. - Т. 23. - №1 – С.15
16. Своллоу А. Радиационная химия органических соединений. – М.: Издательство иностранной литературы, 1963. – 404 с.
17. Мартинович Г.Г., Чуренкевич С.Н. Окислительно-восстановительные процессы в клетках: Монография - М., 2008. - С.159.
18. Hawkins C., Davies M. // Bioch. Bioth. Acta, 2001. – Vol. 1504. – P. 196-219
19. Экспериментальные методы химии высоких энергий: Учебное пособие / Под общ. ред. М.Я. Мельникова. – М.: Изд- во МГУ, 2009. – 824 с.
20. Пикаев А.К. Современная радиационная химия. Экспериментальная техника и методы. М.: Наука, 1985.

21. Апрышко Г.Н. Потенциально лечебно-профилактические субстанции для применения в онкологии из отечественных природных объектов (по материалам банка данных по противоопухолевым веществам РОНЦ // Российский биотерапевтический журнал, 2011. - № 1. – Т. 10, – С. 5. – 84с.
22. Теплый Д.Л. Об участии свободных радикалов и антиоксидантов в молекулярно – клеточных механизмах старения // Свободные радикалы, антиоксиданты и старение: материалы II Международной научной конф. (Астрахань, 2-3 ноября 2011 г.). – Астрахань: Астраханский государственный университет, издательский дом “Астраханский университет”, 2011. – С. 5-10
23. Клебанов Г.И., Любицкий О.Б., Ильина С.Е., Медушева Е.О., Рыльцев В.В., Филатов В.Н. Антиоксидантная активность ингибиторов свободнорадикальных реакций, используемых в перевязочном материале для лечения ран // Биомедицинская химия, 2006. – Т. 52. - № 1. – С. 69-82.
24. Waterman P.G., Mole S. Analysis of Phenolic Plant Metabolites/ Blackwell Scientific Publication. London, 1994.
25. Антропова И.Г., Андриевская Д.В., Фенин А.А., Ревина А.А., Урусова Л.Н. Радиационно-химические превращения кумаринов и радиопротекторная активность кумаринов // XVIII Менделеевский съезд по общей и прикладной химии: Тез. докл. - М., 2007. - В 5 т.: Т. 4 - С. 382
26. Антропова И.Г., Фенин А.А., Семенистая Е.Н., Ларионов О.Г., Ревина А.А., Парфенов Э.А. Влияние ионов металлов на радиационно-химические превращения кумаринов в растворах // Химия высоких энергий, 2008. – Т. 42, - № 6. – С. 559-560
27. Меньщикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К., Бондарь И.А., Труфакин В.А. Окислительный стресс // Патологические состояния и заболевания. Новосибирск: Изд-во “Арта”, 2008.
28. Костюк В.А., Потапович А.И. Биорадикалы и Биоантиоксиданты. Изд-во БГУ. – Минск, 2004.

- 29.Ободовский И.М. Основы радиационной и химической безопасности: Учебное пособие/ И.М. Ободовский – Долгопрудный: Издательский дом “Интеллект”, 2013. – 304 С.
- 30.Антропова И.Г., Фенин А.А., Ревина А.А. Радиационно-химические превращения кумаринов в органических растворителях // Химия высоких энергий, 2007. – Т. 41, - № 2. – С. 90-94
- 31.Антропова И.Г. Радиационно-химические превращения кумарина и его производных в водно-органических растворах. Дисс. на соискание ученой степени к.х.н. М., 2010 г. - 145 с.
- 32.Майрановский С. Г., Страдынь Я.П., Безуглый В. Д. Полярография в органической химии, Л., 1975.
- 33.Thornalley P.J., Bannister J.V. The spin trapping of superoxide radicals // Handbook of Methods for Oxygen Radical Research. – Boca Raton: CRC Press, 1986. – P. 133-136
- 34.Halliwell B., Gutteridge J.M.C. Free Radicals in Biology and Medicine, 3rd ed. Oxford: Clarendon Press, 1999.
- 35.Антропова И.Г., Ревина А.А., Чжо Зин Хтут. Спектрофотометрические исследования радиационно-химических превращений кумаринов в обратно-мицеллярных системах // Успехи химической физики: Сб. тезисов докладов на Всероссийской молодёжной конференции, 21-23 июня 2011г. – Черноголовка, ИПХФ РАН, 2011. – С. 204
- 36.Ревина А.А., Ларионов О.Г., Кочетова М.В., Зимица Г.М., Золотаревский Г.И., Эль-Регистан Г.И. Спектрофотометрические и хроматографические исследования продуктов радиационного окисления водных растворов 3,5-дигидрокситолуола // Химия высоких энергий, 2004. – Т. 38. - № 3.
- 37.Короткова Е.И. Вольтамперометрический метод определения суммарной активности антиоксидантов в объектах искусственного и природного происхождения. Автореф. дисс. на соискание учёной степени доктора химических наук – Томск, 2009. – 44 с.

38. Безуглов В.В., Бияглоу Дж.Э., Маневич Е.М. Синтез новых производных кумарин-3-карбоновой кислоты как химических детекторов образования гидроксильных радикалов в биологических системах // Биоорганическая химия, 1991. – Т. 23, №4. – С. 310-313
39. Аврамчик О.А. Закономерности процесса электровосстановления кислорода в присутствии антиоксидантов и их применение в аналитической практике. Автореф. дисс. к.х.н. – Томск, 2006. – 21с.
40. Антропова И.Г., Фенин А.А., Семенистая Е.Н., Ларионов О.Г., Ревина А.А., Парфенов Э.А. Влияние ионов металлов на радиационно-химические превращения кумаринов в растворах // Химия высоких энергий, 2008. – Т. 42, - № 6. – С. 559-560
41. Кочетова М.В., Семенистая Е.Н., Ларионов О.Г., Ревина А.А. Определение биологически активных соединений фенольной и полифенольной природы в различных объектах методами хроматографии // Успехи химии, 2007. – Вып. 1. – Т. 76, – С. 88-101
42. Кузьмин М. Г. Методы исследования быстрых реакций, пер. с англ., М., 1977.
43. E. J. Land and M. Ebert. // Trans. Far. Soc., 1967. - Vol. 63. – P. 1181.
44. L. M. Dorfman, I. A. Taub, and R. E. Buhler. // J. Chem. Phys., 1962. – Vol. 36. - P. 3051
45. Поздняков И.П., Соседова Ю.А., Плюснин В.Ф., Гривин В.П., Воробьев Д.Ю., Бажин Н.М.. Оптические спектры и кинетические характеристики радикалов, возникающих при фотолизе водных растворов комплекса $\text{FeOH}_{\text{aq}}^{2+}$ и фенола // Известия Академии наук. Серия химическая, 2004. - № 12.
46. Patel Rajesh M. and Patel Natvar J. In vitro antioxidant activity of coumarin compounds by DPPH, Super oxide and nitric oxide free radical scavenging methods // Journal of Advanced Pharmacy Education and Research, 2011 - Vol. 1. – PP. 52-68

47. Hammond G.S., Stout C.A., Lamola A.A. Mechanisms of photochemical reactions in solution. XXV. The photodimerization of coumarin // J. Am. Chem. Soc., 1964. – Vol. 86. – PP. 3101-3106
48. Guillaume Louit, Sarah Foley, Julie Cabilic, Herve Coffigny, Frederic Taran, Alain Valleix, Jean Philippe Renault, Serge Pin. The reaction of coumarin with the OH radical revisited: hydroxylation product analysis determined by fluorescence and chromatography // Radiation Physics and Chemistry, 2005. – Vol. 72. – PP. 119-124
49. Антропова И.Г., Семенистая Е.Н., Ревина А.А. Спектральное и хроматографическое исследование гамма-радиолиза кумаринов. // Сб. тезисов IV Баховской конференции по радиационной химии. М., 1-3 июня 2005. – С.12
50. Семенистая Е. Н. Высокоэффективная жидкостная хроматография в исследовании физико-химических свойств кумаринов, фурукумаринов и их комплексов с переходными металлами: диссертация на соискание ученой степени кандидата химических наук. – Москва, 2007. – 121 стр.
51. Коренская И.М., Ивановская Н.П., Измалкова И.Е. “Лекарственные растения и лекарственное растительное сырье, содержащие флавоноиды, кумарины, хромоны”: Изд-ско-полиграфический центр Воронежского гос. университета, 2007. – С.57-205с.
52. Фитохимический анализ растений и сырья, содержащих простые фенольные соединения и кумарины // Методическое пособие по фармакогнозии по разделу: “Растения и сырье, содержащие фенольные соединения”. Иркутск, 2009.
53. Куракина Е.С., Антропова И.Г. Антирадикальная активность кумаринсодержащих экстрактов // Электронный сборник статей по материалам XXIX студенческой конференции “Научное сообщество студентов XXI столетия. Естественные науки”. – Новосибирск: Изд-во “СибАК”. – 2015. – 3(28) – С. 129-134 / [Электронный ресурс] – Режим доступа. – URL: [http://www.sibak.info/archive/nature/3\(28\).pdf](http://www.sibak.info/archive/nature/3(28).pdf).

54. Гринкевич Н.И., Сафронич Л.Н. Химический анализ лекарственных растений. – Москва, 1983.
55. Патент №2162599 - Способ идентификации и определения массовой концентрации ацетальдегида в спиртосодержащих растворах.
56. Шарифуллина Л.Р. Радиационно-химические превращения антиоксидантов фенольной природы и их комплексов с ионами металлов. Дисс. на соискание ученой степени к.х.н. Москва, 2004. – 169 стр.
57. Соколовский А.Е., Коваленко Н.А., Супиченко Г.Н., Радион Е.В.. Хроматографические методы анализа: метод. указ. по разделу курса “Аналитическая химия и физико-химические методы анализа”. – М.: Изд-во Белорусск. ун-та, - 2002.
58. Андриевская Д.В. Совершенствование технологии столовых вин на основе регулирования их протекторных свойств. Диссертации на соискание ученой степени к.т.н. М.: ГУ ВНИИ ПБ и ВП, 2009. - 154 с.
59. Александрова Э.А., Гайдукова Н.Г.. Аналитическая химия. Физико-химические методы анализа.– М. Изд-во “Юрайт”, 2016. – 355с.
60. Warren Steck, В.К. Bailey. Characterization of plant coumarins by combined gas chromatography, ultraviolet absorption spectroscopy, and nuclear magnetic resonance analysis // Canadian Journal of chem. – 1969. Vol. 47, – С. 3577-3583
61. Красовацкий Б.М., Болотин Б.М. Органические люминофоры. – М.: Изд-во “Химия”, 1884 г. - С.154-335
62. Григорьева О.А., Никишин А.Ю., Федотова О.В. Направленный поиск биологически активных веществ в ряду замещенных кумаринов // Пути и формы совершенствования фармацевтического образования. Поиск новых физиологически активных веществ: материалы IV-ой всероссийской с международным участием научно-методической конференции “Фармообразование 2010”. Часть II. “Научные основы создания новых лекарственных средств”. – Воронеж: Воронежский государственный университет, 2010. – С. 128-130

63. Исмаилова Г.О., Юлдашев Н.М., Узакбергенова З.Д., Калимбетова Р.Ю., Аташов А.К. Уточнение структуры синтетической модели 3-арилкумарина с 1,4-бензодиоксановым фрагментом с помощью масс-спектрометрического анализа // Научное обозрение, 2014. - №1. – С. 14-15
64. Бринкевич С.Д., Шадыро О.И. Влияние аскорбиновой кислоты и ее производных на радиационно-индуцированные превращения оксигенированного этанола и его водных растворов. – По материалам интернет-ресурса <http://elib.bsu.by/bitstream/123456789/21126>.
65. Барабой В.А. Растительные фенолы и здоровье человека. М.: Наука, 1984г.
66. Моисеев Д.В. Противовоспалительная активность листьев ольхи серой после хранения в различных условиях // Сборник трудов конференции “Биологические особенности лекарственных и ароматических растений и их роль в медицине”, посвященной 85-летию ВИЛАР. – М.: Щербинская типография, 2016. – С. 607-610
67. <http://noni-ru.narod.ru/article.htm>.
68. Давыденков В.В. Механизмы действия и история применения в гомеопатии лекарственных растений, обладающих противовоспалительным и ранозаживляющим свойствами на примере препарата Traumeel ad us.vet // Ветеринарная патология, 2003. - № 4.
69. Гончарова Т.А. Энциклопедия лекарственных растений, 1997. - М.: Изд. дом "МСП" - Т. 1. - 560 с.
70. Кухина Н., Цыб А., Бардищев М. и др. Биоантиоксиданты Мертвого моря в качестве средства лечения радиационной патологии // Наука, образование, культура, 1997. - № 1. – С. 36-37
71. Aoife Lacy and Richard O’Kennedy. Studies on Coumarins and Coumarin-Related Compounds to Determine their Therapeutic Role in the Treatment of Cancer // Current Pharmaceutical Design, 2004. - № 10 – с. 3797-3811
72. Cheng-Gang Zhang, Jing-Chun Huang, Tao Liu, Xiang-Ying Li. Anticancer effects of bishydroxycoumarin are mediated through apoptosis induction, cell

- migration inhibition and cell cycle arrest in human glioma cells // JBUON, 2015. - 20(6). – С. 1592-1600
- 73.Ефремов А.А., Зыкова И.Д., Целуковская М.М. Компонентный состав биологически активных веществ донника лекарственного (желтого) // Химия растительного сырья. – 2012. - №3. – С. 111-114
- 74.Valery F. Traven, Larisa I. Vorobjeva, Tatjana A. Chibisova, Edward Andrew Carberry, and Noelle Jean Beyer. Electronic absorption spectra and structure of hydroxycoumarin derivatives and their ionized forms // Can. J. Chem., 1997. - Vol. 75. – PP. 365-376
- 75.Юинг Г.В. Инструментальные методы химического анализа. – Под ред. К.Б. Яцимирского. – М.: Государственное научно-техническое изд-во химической литературы, 1960. – С. 394-411
- 76.Коккозов Д.Н., Кишкентаева А.С., Атажанова Г.А., Адекенов С.М. Ультразвуковая экстракция полыни гладкой // Сборник трудов конференции “Биологические особенности лекарственных и ароматических растений и их роль в медицине”, посвященной 85-летию ВИЛАР. – М.: Щербинская типография, 2016. – С. 476-478
- 77.Ефимов А.А. Обоснование технологии получения хлорофилла из синезеленых водорослей как пищевой добавки // Фундаментальные исследования, 2007. - №11. – С. 82-84
- 78.Семенистая Е.Н., Ларионов О.Г., Антропова И.Г., Ревина А.А. Изучение фото- и радиационно-химических комплексов кумаринов с переходными металлами методом высокоэффективной жидкостной хроматографии // Хроматография в химическом анализе и физико-химических исследованиях: Тез. докл. Всероссийского симпозиума. - М., Клязьма, 23 - 27 апреля 2007. - № 49.
- 79.Шпирная И.А., Баширова Р.М., Лебедев Я.П. Липофильные соединения пилолистника съедобного *Lentinula Edodes* (Berk.) Pegler // Сборник научных трудов международной научно-практической конференции “Биологические особенности лекарственных и ароматических растений и

- их роль в медицине”, посвященной 85-летию ВИЛАР. – М.: Щербинская типография, 2016. – С. 556-559
80. Кочетова М.В., Семенистая Е.Н., Ларионов О.Г., Ревина А.А. Определение биологически активных соединений фенольной и полифенольной природы в различных объектах методами хроматографии // Успехи химии, 2007. – Вып. 1. – Т. 76, – С. 88-101
81. Л.Н. Зимина, В.А. Куркин, В.М. Рыжов. Исследование флавоноидного состава травы зверобоя пятнистого методом высокоэффективной жидкостной хроматографии // Медицинский альманах, 2012. - №. 2.
82. Владимиров Ю.А. Свечение, сопровождающее биохимические реакции. 1999.
83. Беликов, В.Г. Фармацевтическая химия – Пятигорск, 2003. – 715 с.
84. Короткова Е.И., Аврамчик О.А., Юсубов М.С., Белоусов М.В., Андреева Т.И. Определение антиоксидантной активности экстрактов растительного сырья методом катодной вольтамперометрии // Химико-фармацевтический журнал, 2003. – Т. 37 - № 9.
85. Анцупова Т.П., Ендонова Г.Б. Методы анализа биологически активных веществ. - Улан-Удэ: Издательство ВСГТУ, 2007. - 46 с.
86. Богусевич С.Е., Матвейчук С.В. Исследование растительных экстрактов методом ЭПР // Инст. физ.-орг. хим. НАН, - Минск.
87. Федосеева Л.М., Харлампович Т.А. Разработка методики количественного определения суммы кумаринов в траве донника лекарственного // Химия растительного сырья, 2012. - №3. – С 135-141
88. Веретнова О.Ю., Поляков Н.А., Ефремов А.А. Природа экстрактивных веществ багульника болотного, произрастающего в Красноярском крае // Химия растительного сырья, 2007. - №2. – С. 67-72
89. Сафронич Е.Я., Отряшнекова В.Э. и др. Химический анализ лекарственных растений: Учеб. пособие для фармацевтических вузов/Ладыгина. - М.: Высш.школа, 1983. – 176 с.

90. Басова Е.В. Химико-фармакологическое изучение багульника болотного. Диссертация, Томск 2004.
91. Дейнека В.И., Третьяков М.Ю., Фесенко В.В., Шаркунова Н.А., Дейнека Л.А. Биологически активные вещества растений зимнего сада белгу: каротиноиды плодов *Murraya Exotica L* // Научные ведомости. – 2009, №. 11(66). – С.105-110. <http://pestik.net/articles/000144.htm>.
92. Amina Khatun, Mahmudur Rahman, Shamima Jahan. Preliminary phytochemical, cytotoxic, thrombolytic and antioxidant activities of the methanol extract of *Murraya exotica* Linn. Leaves // Orient Pharm. Med., 2014. – Vol. 14. – PP. 223-229. DOI 10.1007/s13596-014-0150-x.
93. Ganesan V., Arunkumar C., Nima P, Astalakshmi A. Green synthesis of silver nanoparticles using leaves of *murraya paniculata (L.)* Jack // International Journal of Recent Scientific Research. – July, 2013. - Vol. 4, Issue 6. – PP. 1022-1026

Приложение. Донник, багульник, муррайя и кумарины

Кумарины относятся к классу бензопиранов, которые состоят из бензольного кольца, присоединенного к пирановому кольцу. В настоящее время число выделенных природных кумаринов значительно превышает 200 соединений, которые находятся как в свободном состоянии, так и в виде гликозидов [65, 66].

Эскулетин как производное кумарина в свободном состоянии находится в семенах растения *Euphorbia Lathyris*, содержится в корнях цикория, полыни обыкновенной, ясени клювовидной, багульнике болотном, вереске обыкновенном, шалфее, мелиссе, а также может быть получен из скополетина, вещества, находящегося во многих растениях из семейства *Solaneae* и являющегося метилэскулетином, или из эскулина, имеющегося в коре индийского каштанового дерева. Эскулетин в виде гликозида – это эскулин, кристаллизуется в виде перламутровых чешуек, плохо растворяется в холодной воде и эфире и хорошо в горячей и спирте. Водный раствор эскулина дихроичен, окрашен в желтый цвет в проходящем свете и голубой — в отраженном.

Производные кумарина - умбеллиферон (7-гидроксикумарин) - обнаруживается в природе в большом количестве растений в основном семейства зонтичных *Umbelliferae*, а также рутовых и сложноцветных. В растительном организме умбеллиферон является ключевым продуктом биосинтеза различных типов природных кумаринов (фурокумаринов, дигидропиранокумаринов и др.). Структурная формула умбеллиферона свидетельствует о том, что в определённой степени он обладает химическими свойствами, присущими фенолам и кумарину.

В 1993 году исследователи из Гавайского университета выделили из фрукта нони соединение скополетин [67]. По мнению ученых именно скополетин связывается с серотонином, важным химическим веществом в организме человека. Установлено, что скополетин обладает противовоспалительным эффектом [68, 69].

Интерес к кумарину [53, 70, 71] и 7-гидроксикумарину, как к противораковым агентам, увеличился после того, как эти соединения получили объективную реакцию у пациентов с опухолью на поздней стадии. В 2015 году Cheng-Gang Zhang и сотрудники [72] впервые представили доклад об ингибирующей способности производного кумарина – дикумарола по отношению к человеческим клеткам, страдающими опухолью центральной нервной системы.

Китайскими учёными Kai Wang и работниками [4] была изучена противоопухолевая активность эскулетина из травы *Cortex fraxini* на злокачественных человеческих клетках HT-29 (аденокарцинома). Было показано, что при низких концентрациях эскулетина (0,25-2 мг/мл) ингибирования практически не происходит, однако при повышении концентрации (4-16 мг/мл) показано, что эскулетин замедляет рост HT-29 клеток.

Для идентификации кумаринов в растительном сырье применяют аналитические качественные реакции и хроматографическое исследование, используют лактонные свойства кумаринов; способность давать окрашенные растворы с диазосоединениями; флуоресцировать в УФ-свете [52, 73, 74]. Исследование состава биологически-активных веществ (БАВ) в растительном сырье проводят современными физико-химическими методами, основанных на физических, химических и биологических свойствах БАВ: экстракция [75-77], хроматография [78], хромато-спектрофотометрия, хромато-флуориметрия, хромато-масс-спектрометрия [79-81], гравиметрия, перманганатометрия, колориметрия, флуоресценция [51, 82], полярография [83, 84], спектрофотометрия в УФ- и видимой областях [85], электронный парамагнитный резонанс [86].

В данной работе хочется более подробно описать компонентный состав донника лекарственного, багульника болотного и муррайи метельчатой, которая привезена из Мьянмы. Данные растения принадлежат к разным семействам, различаются по суммарному составу активных веществ, но их

объединяет наличие кумаринов в своём составе. Считают, что препараты из донника лекарственного и багульника болотного, из-за содержащихся в них кумаринов, могут помочь больным лучевой болезнью путём увеличения концентрации лейкоцитов в крови.

Донник лекарственный (*Melilotus officinalis*) встречается в Европе, Северной и Средней Азии, Северной Африке, Северной Америке и Австралии. Из данных литературы известно [73, 87], что в наземной части донника содержится кумарин, дигидрокумарин, кумаровая кислота, дикумарол, мелилотин, мелилотовая кислота, гликозид метилотозид, производные пурина, жироподобные вещества, белок, эфирное масло, аскорбиновая кислота, каротин, витамин Е, фенольные тритерпеновые соединения, углеводные соединения, азотистые основания, аминокислоты, дубильные вещества, каротиноиды, полисахариды (рис. П-1).

Багульник считают уникальным растением с лекарственными свойствами. Багульник применяют при болезнях уха, горла и носа. Известный врач-травник Татаров А.П. в середине XX века говорил, что “с багульником дышать легче”, тем самым определяя его способность уменьшать кашель [88]. Багульник болотный (*Ledum palustre L.*) принадлежит к роду *Ledum*, подсемейству *Rhododendroideae*, семейству *Ericaceae*. Известно [89], что в составе эфирного масла багульника болотного определено 118 соединений (пальострол, ледол, лимонен и др.). Кроме эфирного масла содержится много и других компонентов, их состав на рис. П-2. Выделены кумарины – эскулин, эскулетин, скополетин, умбеллиферон, и надо отметить содержание микроэлементов (марганец, медь, алюминий, серебро) [90].

Муррайя – небольшое деревце из Страны Восходящего солнца, произрастает в горах на высоких склонах. Назвали муррайю в XVIII веке в честь ученого ботаника Юхана Андреаса Муррея. В Японии врачи назначали императорам просто вдыхать аромат муррайи, чтоб быть в тонусе и повышать иммунитет [91]. Лекарственное действие муррайи связывают с наличием

флавоноидов, гликозидов, витаминов, дубильных веществ, *кумариновых соединений* и др. (рис. П-3) [92, 93].

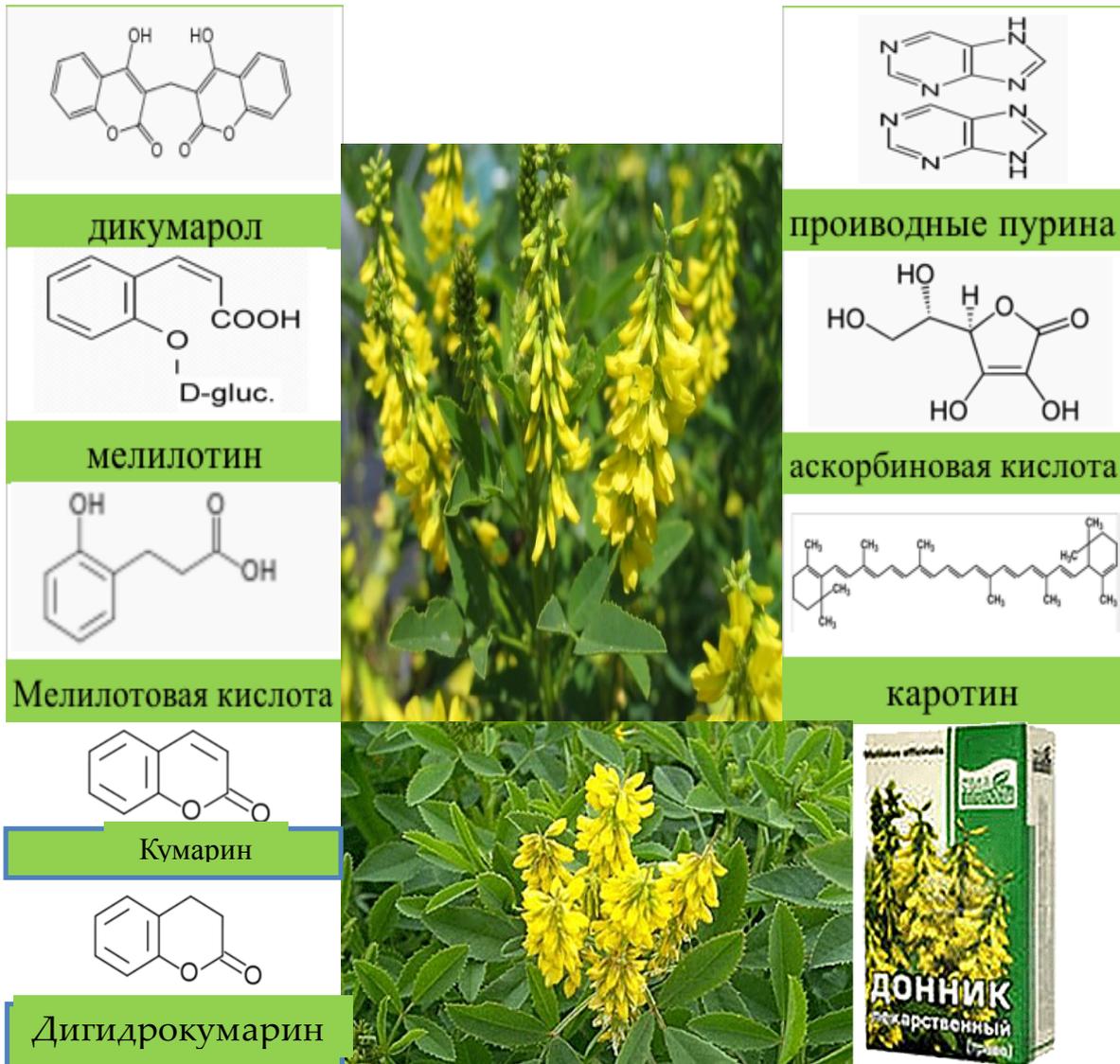


Рис. П-1. Донник лекарственный, компонентный состав [46]

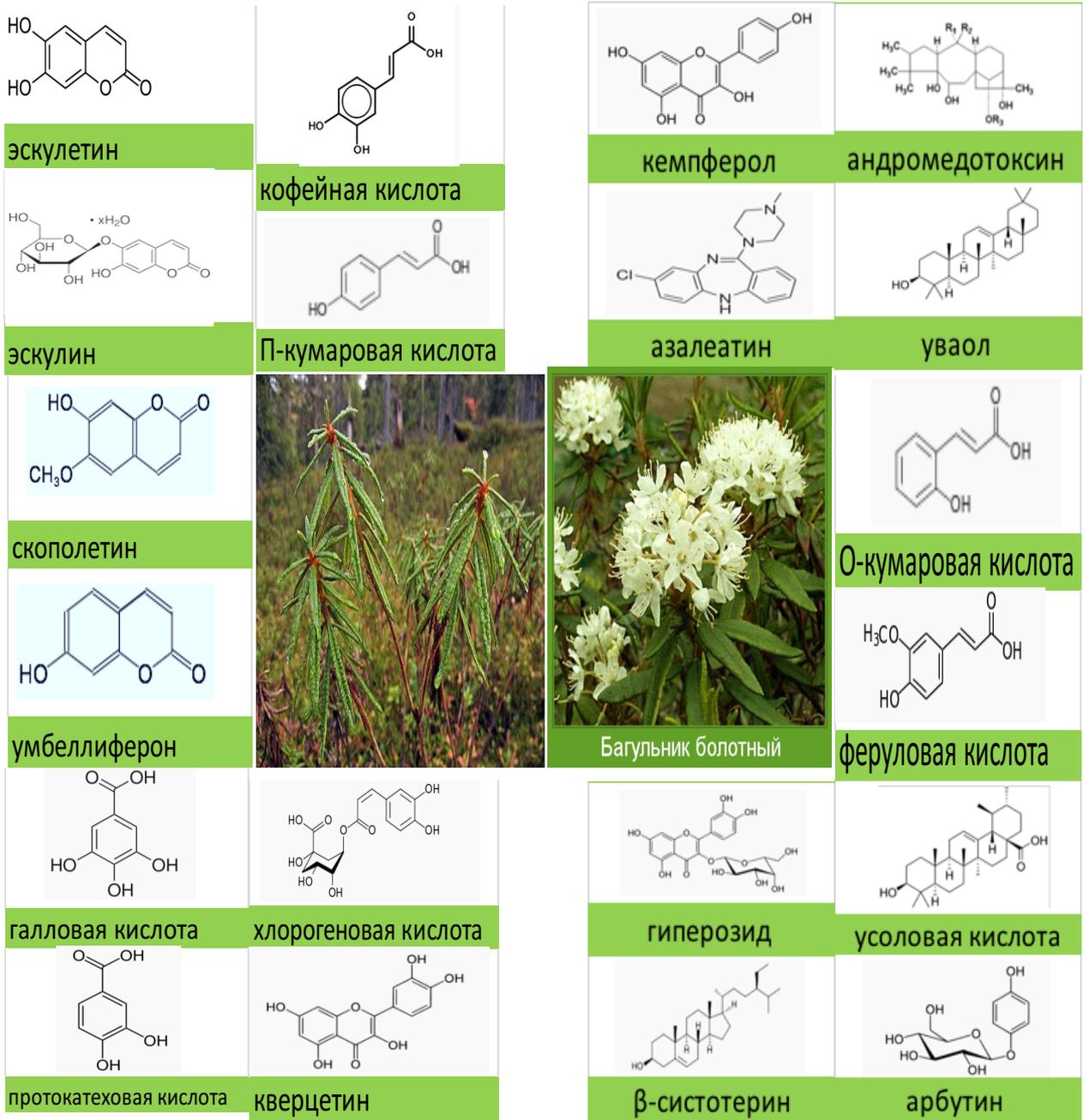


Рис. П-2. Багульник болотный, компонентный состав [90]

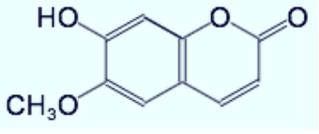
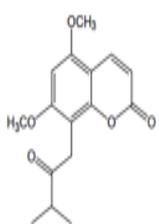
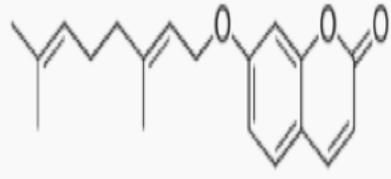
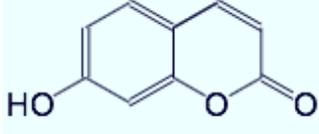
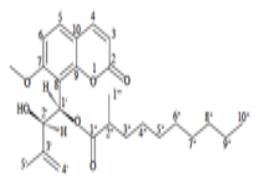
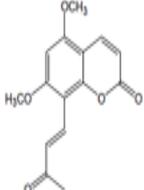
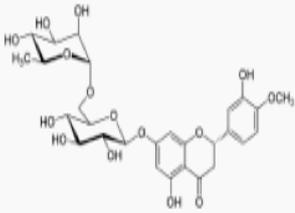
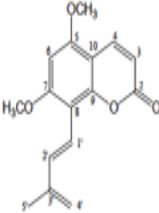
		
<p>СКОПОЛЕТИН</p>	<p>5,7-dimethoxy-8-(3-methyl-2-oxo-butyl)coumarin</p>	<p>Auraptene</p>
		
<p>умбеллиферон</p>	<p>paniculacin</p>	<p>toddalene</p>
		
	<p>Гесперидин гикозид</p>	<p>gleinadiene</p>

Рис. П-3. Муррайя метельчатая, компонентный состав

Для фараонов Египта добавляли муррайю в “эликсир жизни”.