

*М. М. ЕМУРАНОВ¹, М. А. БИЙСЕНБАЕВ¹, З. А. МАНСУРОВ¹,
А. Н. САБИТОВ², Ж. М. БАСЫГАРАЕВ², С. А. ИБРАГИМОВА³, М. К. ГИЛЬМАНОВ³*

ОЧИСТКА ФУЗИКОКЦИНОВОГО ФИТОГОРМОНА ХРОМАТОГРАФИЕЙ НА НОВОМ НАНОСТРУКТУРИРОВАННОМ УГЛЕРОД-МИНЕРАЛЬНОМ СОРБЕНТЕ

В настоящее время на мировом рынке отсутствуют сорбенты, пригодные для получения биологически активных соединений в крупных масштабах. Существующие сорбенты крайне дорогие – их стоимость колеблется от нескольких сот до нескольких тысяч долларов – и предназначены в основном для аналитических целей. Для их применения необ-

ходимы очень сложные и крайне дорогие хроматографические системы. Все это является серьезным сдерживающим фактором для широкого применения биостимулятора в сельском хозяйстве.

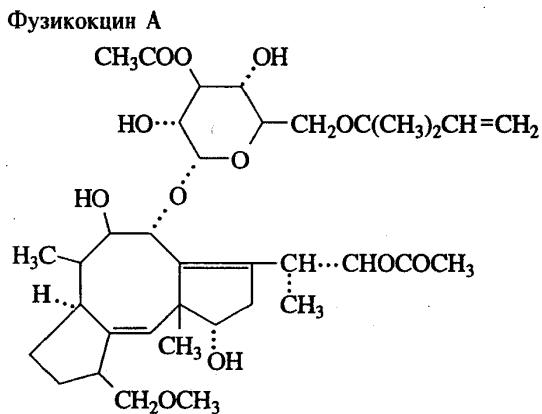
Создание новых наноструктурированных углеродсодержащих материалов с разнообразными свойствами является актуальной задачей. Своевремен-

ной проблемой остается создание материалов с заданными структурными и химическими свойствами. Это относится и к углеродсодержащим материалам – активным альтернативным углям, поскольку их использование выдвигает все более жесткие требования к их прочностным и структурным характеристикам [1].

Одним из направлений исследований, проводимых в Институте проблем горения (ИПГ) при КазНУ им. аль-Фараби, является изучение наноструктурированных углеродных и углерод-минеральных материалов на основе местного сырья Казахстана [1-3].

В лаборатории наноуглеродных материалов ИПГ синтезирован углерод-минеральный сорбент (СКРС-2) на основе карбонизованного растительного сырья, содержащий углерод и оксид кремния и обладающий наноразмерной морфологией. Наличие этих компонентов придает этому материалу специфические и необычные свойства. Если углерод является гидрофобным материалом, а оксид кремния – гидрофильным, то возникает совершенно новое сочетание гидрофобно-гидрофильных свойств. Именно эти необычные свойства позволяют предложить данный материал в качестве уникального наноструктурированного сорбента для разделения биоорганических соединений.

Исходя из изложенного явилось чрезвычайно интересным испытать разработанный сорбент для очистки биостимулятора – фузикокцина, имеющего следующую формулу:



Фузикокцин – фитогормон, впервые выделенный из грибков *Fusicoccum amygdali*, который поражает молодые миндальные деревца [4].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

СКРС-2 синтезировался карбонизацией растительного сырья во вращающемся стальном реакторе в интервале температур 300–800 °C в течение 5–60 мин в инертной среде.

Полученный материал исследовался различными физико-химическими методами анализа. Определение удельной поверхности проводилось по стандартной методике тепловой десорбции аргона. Электронно-микроскопическое исследование образцов осуществлялось на приборе ЭМ-125К при ускоряющем напряжении 75 кВ. Измерение ЭПР-спектров выполнялось при комнатной температуре на спектрометре ЭПР марки ИРС-1001 гомодинового типа, работающем в 3-см режиме.

Для выделения фузикокцина использовалась методика, разработанная в Институте молекулярной биологии и биохимии им. М. А. Айтхожина [5].

Супернатант – надосадочная жидкость, полученный в результате описанной выше методики, помещался в колонку с разделяющим материалом (в данном случае УММ). Для контроля хроматографического разделения использовали УФ-монитор типа Uvicord S II производства фирмы LKB (Швеция).

Для освобождения колонки от несорбированных веществ ее промывали 10% этианолом до их полного удаления, затем связавшийся с сорбентом медиатор элюировали 60% этианолом.

Спектроскопическое исследование очищенного фузикокцина было проведено на спектрофотометре Ultrospec 1100 pro фирмы Amersham Biosciences (Великобритания) в ультрафиолетовой и видимой областях спектра.

Элементный анализ полученного биостимулятора проводился на рентгеноанализаторе количественного содержания элементов INCA-X-RAY analytical system-Oxford (Великобритания).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Методом элементного анализа установлено, что с повышением температуры карбонизации содержание углерода в образцах увеличивается, а водорода и кислорода уменьшается, при этом также происходит выделение летучих продуктов (табл. 1).

Было показано, что удельная поверхность образцов растет с ростом температуры, достигая максимума при 650 °C (920 м²/г), и затем уменьшается. Уменьшение удельной поверхности происходит в результате уплотнения структуры (спекания).

Электронно-микроскопическое исследование показало, что изменение удельной поверхности напрямую зависит от морфологии образцов, т.е. от типа наночастиц, образующихся в ходе синтеза (рис. 1).

Таблица 1. Элементный состав карбонизованных образцов

| Образец, синтезированный при температуре, °C | C, мас.% | H, мас.% | N, мас.% | O, мас.% | Коксовый остаток, мас.% |
|--|----------|----------|----------|----------|-------------------------|
| Исходный | 67,98 | 6,40 | 0,90 | 2,87 | 21,85 |
| 500 | 81,72 | 5,61 | 1,41 | 2,60 | 8,66 |
| 550 | 81,70 | 5,02 | 1,59 | 2,46 | 9,23 |
| 600 | 82,25 | 4,50 | 1,60 | 2,53 | 9,12 |
| 650 | 82,80 | 4,57 | 1,56 | 2,48 | 8,59 |
| 700 | 82,30 | 4,36 | 1,60 | 2,09 | 9,65 |
| 750 | 83,69 | 4,36 | 1,02 | 2,33 | 8,60 |
| 800 | 92,85 | 3,03 | 1,60 | 1,05 | 1,47 |

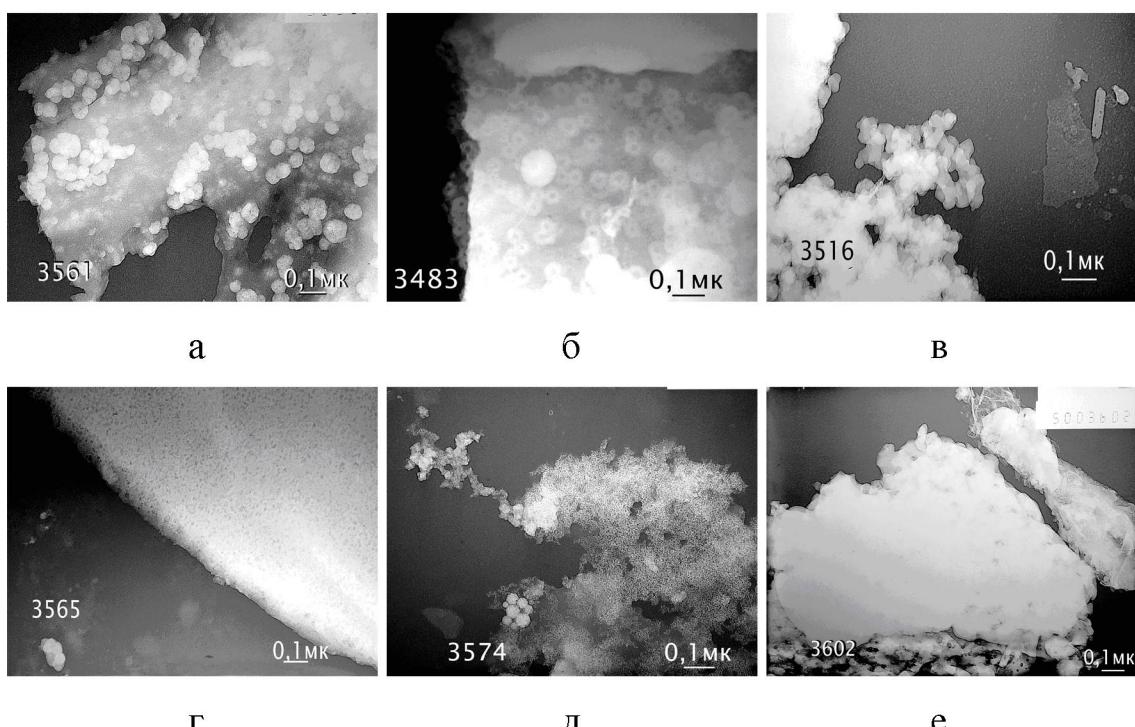


Рис.1. Электронно-микроскопические снимки СКПС-2, синтезированного при различных температурах: а) исходный образец растительного сырья; б – 400°C; в – 550°C; г – 650°C; д – 700°C; е – 800°C

Из рис. 1, а–е видно, что с ростом температуры процесса происходит структуризация поверхности образцов и наиболее развитая пористая поверхность образуется у образца, карбонизованного при 650°C. При более высоких температурах образцы покрываются тонкими графеновыми слоями, и при 800°C все наночастицы переходят в тонкие графеновые пленки.

Жидкость, содержащая фузикокцин, помещалась в разделительную колонку с синтезированным СКПС-2. Результаты хроматографического разделения представлены на рис.2.

Как видно из рис. 2, первый пик содержал вещества, не связывающиеся с сорбентом. Для освобождения колонки от несорбированных веществ

колонку промывали 10% этианолом до их полного удаления, затем связавшийся с сорбентом медиатор элюировали 60% этианолом (2-пик). Анализ картин разделения говорит о том, что СКПС-2 обладает разделительными характеристиками, не уступающими мировым аналогам. Также из рис. 2 следует, что при использовании полученного сорбента на процесс разделения затрачивается меньшее количество времени. Однако самым большим преимуществом данного материала является то, что он обладает большой стойкостью к микробиологическим средам и отсутствием паразитической сорбции в отличие от органического геля октилсепароза 4B-CL, имеющего в своем составе агарозу.

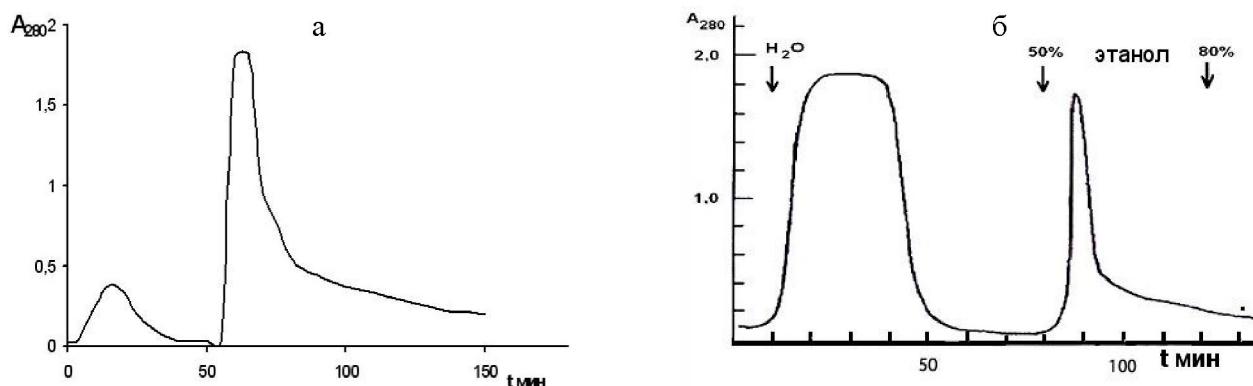


Рис. 2. График хроматографического разделения фузикокцина на колонке: а – с СКПС-2, синтезированном при 750°C; б – с органическим гелем октилсепароза 4B-CL

Таблица 2. Значения максимумов поглощения в УФ-диапазоне фитогормонов и их функциональные группы

| Фитогормон | Функциональная группа | Максимум поглощения в УФ-диапазоне, нм |
|------------------------|------------------------------------|--|
| Ауксин | Индольная группа | 300 |
| Цитокинин (зеатин) | Пуриновое кольцо | 260 |
| Фузикокцин | Дициклопентан-циклоокановая группа | 220 |

В ходе дальнейшего исследования была поставлена задача по изучению степени чистоты полученного биостимулятора после хроматографического разделения. Данное исследование было проведено для того, чтобы выяснить, содержится ли ауксин и цитокинин в растворе, являющемся так же, как и фузикокцин, сильным биостимулятором. И если содержится, то провести очистку раствора для устранения их влияния.

Для достижения этой цели было проведено спектроскопическое исследование образцов в ультрафиолетовой и видимой областях спектра. Результаты исследования представлены в табл. 2 и на рис. 3.

Как видно из табл. 2 и рис. 3, в спектре присутствует один пик в области 220 нм, принадлежащий фузикокцину, а также отсутствуют пики, характерные для цитокинина и ауксина.

Однако для подтверждения результатов УФ-спектроскопии был проведен элементный анализ с предварительной сушкой до воздушно-сухого состо-

яния препарата, который прогревали в течение 12 ч при 102 °C для полного удаления следов воды и спирта. Проведенное исследование показало, что в образце содержится углерод в количестве $72,7 \pm 0,1\%$

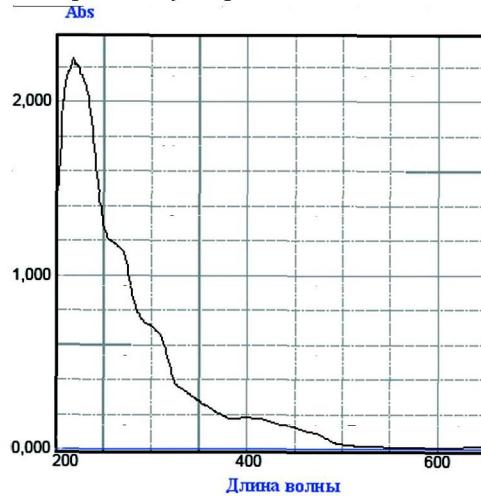


Рис. 3. Спектр очищенного фузикокцина

и кислород – $24,1 \pm 0,1\%$. Особо следует отметить, что препарат совершенно не содержал азота. Это говорит об отсутствии даже следовых количеств цитокинина и ауксина в препарате, которые являются азотсодержащими веществами (табл. 2).

Таким образом, можно сделать вывод, что результаты проведенного элементного анализа полностью коррелируют с результатами, полученными в ходе УФ-спектроскопического исследования, об отсутствии в препарате следов цитокинина и ауксина, что очень важно для изучения физиологобиохимических свойств медиатора [6–8].

Все это делает описанный СКРС-2 очень перспективным для очистки биостимулятора в крупных масштабах. Таким образом, применение нового углерод-минерального наноструктурированного сорбента открывает большие перспективы для крупномасштабной очистки фузикокцина и других биостимуляторов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Мансурова Р. М. Физико-химические основы синтеза углеродсодержащих композиций. Алматы: ХХI век, 2001.
2. Мансуров З. А., Жылбыбаева Н. К., Уалиева П. С., Мансурова Р. М. Получение и свойства сорбентов растительного сырья // Химия в интересах устойчивого развития. 2002. №10. С. 339-346.
3. Yemuranov M. M., Biisenbayev M. A., Kabylkakov D., Mansurova P. M., Mansurov Z. A. Enterosorbents on the Basis of Nanocarbon Composite Materials. Internat. symposium «Carbons for a Greener Planet». State College, Penn, USA, 24-26 May 2005.
4. Marre E. // Fusicoccin: A tool in plant physiology// Annu. Rev. Plant Physiol. 1979. V. 30. P.273-288.
5. Гильманов М.К., Ибрағимова С.А., Николенко Н.Г. // Методы изучения сигнальной трансдукции в прорастающем зерне пшеницы // Статьи методического сборника ИМБиБ «Методы молекулярной биологии, биохимии, иммунохимии и биотехнологии» Алматы, 1999. С. 107-113.
6. Гильманов М.К. Механизмы и медиаторы сигнальной трансдукции цитокининов в растениях // Вестник КазГУ. Сер. биол. 2001. №1 (13). С. 44-48.
7. Biddington N.L., Thomas T.N. A modified Amaranthus Betacyanin Bioassay for Rapid Determination of Cytokinins in Plant Cell Extracts // Planta. 1973. V. 111. P. 183-188.
8. David H.L., Garry K.B., David M.S., Paula E. J. // Cytokinins and fruit development in the kiwifruit (*Actinidia deliciosa*). Changes during fruit development // Physiologia Plantarum. 1996. V. 98. Issue 1. P. 179-186.

Резюме

Өсімдік негізіндегі шикізаттарды карбониздеу арқылы алынған көміртекті материалдардың физика-химиялық зерттеулері нәтижелері келтірілген (элементтік анализ, электронды микроскопия, ЭПР-зерттеу). Зерттеудің екінші сатысында алынған материалдардың токсикалық және радиоактивті элементтерді сорбциялау қабілеті анықталды. Карбониздеу температурасы, сорбциялау уақыты, активтеуші реагенттің табигаты, органдың pH-ы сияқты факторлардың әсері зерттелінді.

Институт проблем горения,
КазНУ им. аль-Фараби,

Институт молекулярной биологии
и биохимии им. М.А. Айтхажина МОН РК,
г. Алматы

Поступила 15.05.2006 г.