

ФИЗИЧЕСКАЯ ХИМИЯ НАНОКЛАСТЕРОВ И НАНОМАТЕРИАЛОВ

УДК 543.544.152,661.666.1,544.723.21

НАНОПОРИСТЫЙ УГЛЕРОДНЫЙ СОРБЕНТ ДЛЯ МОЛЕКУЛЯРНО-СИТОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ БЕЛКОВО-ЛИПИДНОГО КОМПЛЕКСА

© 2012 г. А. Р. Керимкулова**, Б. Б. Мансурова*, М. К. Гильманов**, З. А. Мансуров*

*Казахский национальный университет им. аль-Фараби, Институт проблем горения, Алматы

**Институт молекулярной биологии и биохимии им. М.А. Айтхожсина, Алматы

E-mail: zmansurov@kaznu.kz

Поступила в редакцию 24.05.2011 г.

Исследованы физико-химические характеристики углеродных сорбентов. Приведены данные электронной микроскопии сорбнета и выделенного белково-липидного комплекса. Установлено, что полученный углеродный сорбент обладает высокой пористостью. Получены и испытаны нанопористые углеродные сорбенты для хроматографии молекулярно-ситовых маркеров и исследована применимость нанопористого углеродного сорбента для разделения белково-липидного комплекса (БЛК).

Ключевые слова: углеродные сорбенты, молекулярно-ситовая хроматография, электронная микроскопия, пористость, белково-липидный комплекс.

Молекулярно-ситовая хроматография (МСХ) (гель-проникающая, гель-фильтрационная хроматография) – разновидность хроматографии, в ходе которой молекулы веществ разделяются по размеру за счет их разной способности проникать в поры стационарной фазы. При этом первыми выходят из колонки наиболее крупные молекулы (большей молекулярной массы), способные проникать в минимальное число пор стационарной фазы. Последними выходят вещества с малыми размерами молекул, свободно проникающие в поры. В отличие от адсорбционной хроматографии, при гель-фильтрации стационарная фаза остается химически инертной и с разделяемыми веществами не взаимодействует [1].

На колонку с сорбентом, частицы которого имеют поры определенного диаметра, наносят раствор образца. Высокомолекулярные вещества, не входящие в поры, проходят между гранулами, поэтому их объем удержания равен объему колонки за вычетом объема стационарной фазы (так называемый, свободный объем). Они элюируются первыми. Молекулы средних размеров помещаются в поры сорбента, но не полностью. Поэтому их объем удержания несколько выше свободного объема. Они элюируются вторыми. Самые мелкие молекулы свободно входят в поры вместе с молекулами растворителя. Поэтому их объем удержания в колонке, намного выше свободного и приближается к общему объему колонки. Они элюируются последними.

Большая часть фармацевтических препаратов и биомолекул чувствительна к повышенным температурам, поэтому в фармацевтических произ-

водствах широко используют хроматографию с применением разных видов сорбентов [2]. Однако совершенствование хроматографических сорбентов становится невозможным без применения идей и методов нанотехнологий. В этом плане большой интерес представляют собой наноструктурированные, нанопористые сорбенты, имеющие лучшие характеристики, чем стандартные сорбенты (например, сефарозы и сорбенты для гидрофобной хроматографии – октил- и фенил-агарозные гели) [3–5]. На мировом рынке практически не имеется сорбентов пригодных для очистки биомолекул в производственных масштабах. Существующие сорбенты крайне дороги, их стоимость колеблется от нескольких сот до нескольких тысяч долларов и предназначены они в основном для аналитических целей. Эти сорбенты большей частью изготовлены из таких углеводных полимеров как декстрановые или агарозные гели [6, 7]. Они имеют очень низкую механическую прочность. Такие гели легко атакуются грибками и микробами, поэтому все эти сорбенты недолговечны и срок их эксплуатации не превышает нескольких месяцев. Они малопригодны для разделения веществ в препаративных количествах. Поэтому существует острая необходимость, основываясь на принципах нанотехнологий создания принципиально нового поколения сорбентов предназначенных для очистки биомолекул и биоструктур [8].

Цель настоящей работы – разработать такие сорбенты, которые бы отличались высокой механической прочностью и выдерживали большое давление, обладающие большой емкостью и вы-

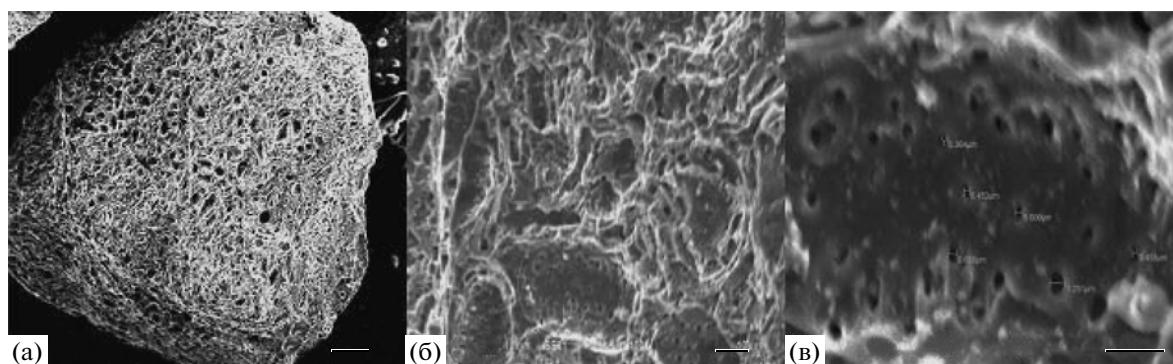


Рис. 1. Электронный микроснимок поверхности частиц карбонизованных образцов при 800°C, масштаб а – 1 : 100, б – 1 : 1100, в – 1 : 4000.

сокой износостойчивостью, позволяющей им работать длительное время [9–12]. А также необходимо исследовать применимость наноструктурированных углеродных сорбентов в молекулярно-ситовой хроматографии для очистки биомолекул. В соответствии с целью решались следующие конкретные задачи: получение и испытание наноструктурированного углеродного сорбента для хроматографии молекулярно-ситовых маркеров и испытание наноструктурированного углеродного сорбента для разделения белко-во-липидного комплекса.

Наиболее важную информацию о структуре карбонизованного углеродного материала (КУМ) может дать сканирующая электронная микроскопия. Методом сканирующей электронной микроскопии получены снимки образцов углеродного материала. Снимки карбонизованных образцов представлены на рис. 1.

Наиболее интересные результаты получены при исследовании углеродного материала, карбонизованного при температуре 800°C, где наблюдается существенное разрыхление и появление многочисленных пор.

На рис. 1а представлен снимок поверхности целой частицы абрикосовых косточек карбонизованных при температуре 800°C. Для анализа взяты образцы, диспергированные до 1 мм. Общий вид частицы представлен на рис. 1б. Как видно из этого рисунка, частицы имеют пористую структуру. Нами проведено углубленное электронно-микроскопическое исследование структуры материала, карбонизованного при температуре 800°C, при больших увеличениях.

При увеличении до 1100 раз можно увидеть, что на поверхности образца присутствуют крупные поры от 1500 нм до 3000 нм и на границах крупных пор видны двойные пористые оболочки. Как видно на микроснимке, при более сильном увеличении на внутренней поверхности крупных пор присутствуют поры размером 200 нм и менее.

Таким образом, с помощью электронной микроскопии установлено, что углеродный материал, карбонизованный при температуре 800°C, имеет наиболее хорошо развитую структуру и пористость, которые придают гранулам КУМ высокую прочность и увеличивают удельную поверхность.

В соответствии с результатами физико-химических исследований, полученный углеродный сорбент имеет высокопористую структуру и множество ячеек и пустот, т.е. по этим характеристикам он соответствует сорбентам используемым в МСХ. В последующих экспериментах нами исследовалась возможность применения созданного нами углеродного сорбента в МСХ.

В качестве цветного маркера для МСХ мы взяли общепризнанные стандарты: 1 – голубой декстрин фирмы “Фармация” с молекулярной массой 2 млн. г/моль, 2 – пищевой краситель имеющий фирменное название “Sunset Yellow” (оранжево-желтый) с молекулярной массой 300 г/моль (рис. 2). На рис. 2 приведен график разделения этих двух молекулярно-ситовых маркеров. Как видно из графика применение нашего сорбента позволило провести разделение маркеров с высоким разрешением.

Два цветных молекулярно-ситовых маркера хорошо разделились на хроматограмме (рис. 2). Голубой декстрин вышел при $V_0 = 100$ мл, а “Sunset Yellow” вышел при $V_t = 350$ мл. Соотношение $V_0/V_t = 3.5$, тогда как для классических углеводно-полимерных гелей это цифра не превышает двух единиц. Эти результаты свидетельствуют о превосходных молекулярно-ситовых характеристиках нашего сорбента.

Также к очевидным преимуществам углеродного сорбента можно отнести следующее: ввиду наличия в сорбенте прочных наноуглеродных структур, он прекрасно выдерживает гидростатическое давление, и потому пригоден для препаративных, крупномасштабных разделений, что открывает перспективы применения их в промышленной биотехнологии.

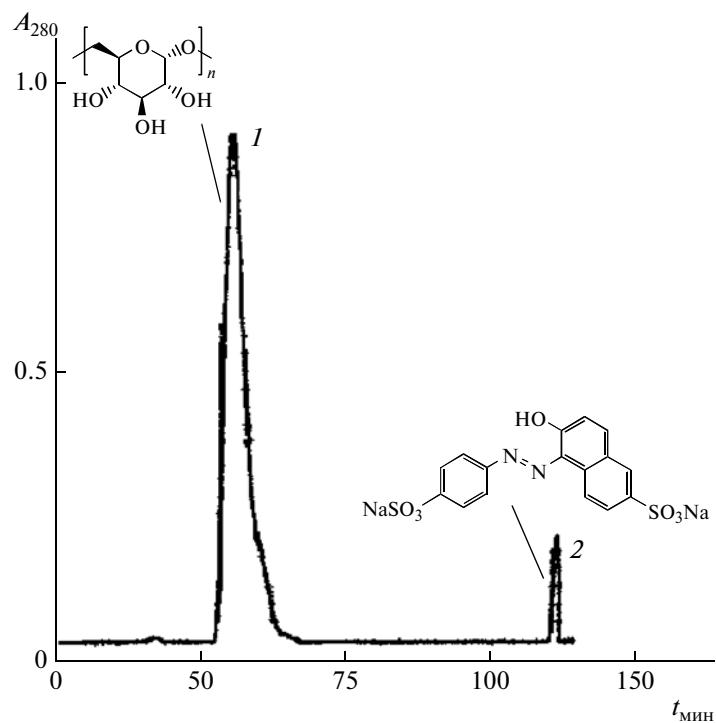


Рис. 2. Хроматограмма молекулярно-ситовых маркеров: 1 — голубой декстрин, 2 — пищевой краситель "Sunset Yellow".

В то же время, необходимо отметить, что широко применяемые углеводно-полимерные гели — сефадексы и сефарозы легко атакуются грибками и микроорганизмами и поэтому срок их эксплуатации не превышает нескольких месяцев. Кроме того эти гели являются непрочными и слабыми и потому не пригодны для препаративного разделения и почти не применяются в широком индустриальном производстве.

Таким образом, нами впервые разработан принципиально новый сорбент для молекулярно-ситовой хроматографии, который в настоящее время выпускается фирмой "Жалын" под названием "Нанокарбосорб". Сорбент отличается хроматографическими характеристиками, высокой механической прочностью и не атакуется грибками и микроорганизмами, т.е. пригоден для широкого использования в биотехнологии.

Следующей задачей исследования явилось применение углеродного сорбента для очистки крупного белок-липидного комплекса (БЛК) которым является субклеточная органелла растительной клетки — сферосома. Так как БЛК представляют собой окружные тельца диаметром ~ 1 мкм, то для ее очистки необходим сорбент с очень крупными порами. Для этих целей годятся агровозные гели "Сефарозы" типов 2В или 4В.

Для очистки БЛК использовали наноструктурированный углеродный сорбент, который для опыта готовили следующим образом. Для удаления воздуха из всех пор порошок сорбента кипя-

тили в течение 4 ч в дистиллированной воде. Затем колонку промывали 1М раствором соды (Na_2CO_3) для удаления загрязняющих сорбент примесей. Затем промывали колонку трехкратным объемом дистиллированной воды и наконец, колонку уравновешивали стартовым 0.05 М раствором три- HCl буфером, pH 7.4. После этого на колонку наносили 20 мл бесклеточного экстракта, полученного из беззародышевых половинок зерна. Благодаря наноструктурированности, хро-

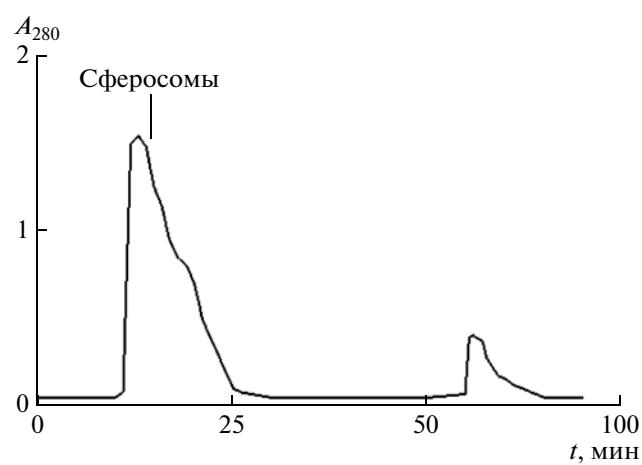


Рис. 3. Молекулярно-ситовая хроматограмма БЛК из зерна пшеницы на колонке с углеродным сорбентом.

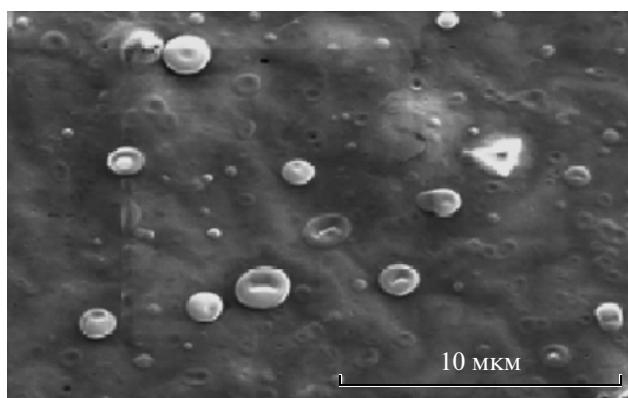


Рис. 4. Микроснимок БЛК, очищенных на колонке с углеродным сорбентом.

матография на данном сорбенте позволяет получить высокоочищенные БЛК

Для получения бесклеточного экстракта 6 г сухих семян пшеницы сорта "Стекловидная-24" тщательно растирали в фарфоровой ступке в 0.05 М трис-HCl буфере, pH 7.4. Полученный гомогенат центрифугировали при $10000 \times g$ в течение 10 мин. Затем, полученный бесклеточный экстракт фракционировали на колонке с углеродным сорбентом. Результаты фракционирования представлены на рис. 3.

Как видно из рис. 3, БЛК выходят в первом высокомолекулярном пике. А все вещества с более низкой молекулярной массой выходят во втором пике. Полученные результаты свидетельствуют о полной пригодности данного углеродного сорбента нанопористой структурой для молекулярно-ситовой хроматографии крупных белок-липидных комплексов, таких как сферосомы.

Нами проведено электронно-микроскопическое изучение фракции первого пика. Установлено, что она действительно содержит высокоочищенные сферосомы, представляющие собой сферические тельца диаметром ~ 1 мкм (рис. 4).

Электронную микроскопию проводили с помощью сканирующего электронного микроскопа, типа Joel Super Probe 733 (Япония). На микроскопическую стеклянную пластину наносили 1 каплю препарата БЛК и помещали в вытяжной шкаф для полного высушивания. Затем пластина помещалась в аппарат ion sputter (fine coat) (JFC-1100) при напряжении 1000 В и при вакууме 10^{-3} мм рт. ст. на 30 мин для покрытия БЛК тонким слоем золота. Подготовленные образцы исследовали в электронном микроскопе.

Для сравнения была проведена МСХ на классическом агарозном сорбенте-сефарозе 4В. Для этого брали беззародышевые половинки зерна пшеницы сорта "Стекловидная-24". Затем семена размалывали на лабораторной мельнице типа M-6 (Germany) и из размолотого зерна получали

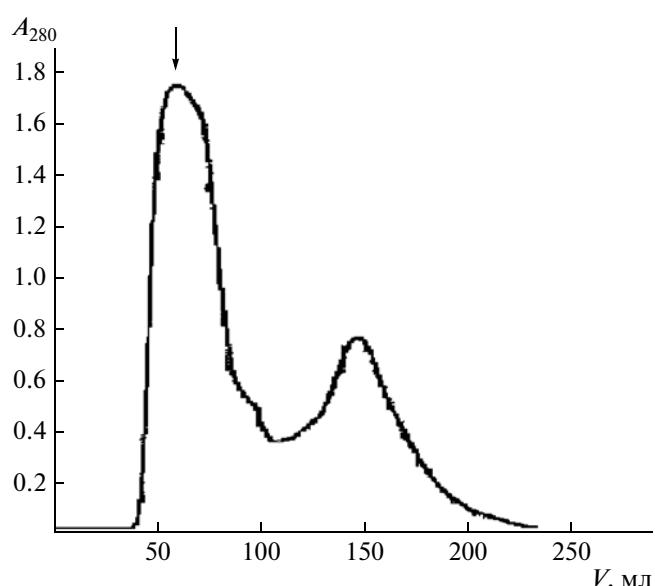


Рис. 5. Молекулярно-ситовая хроматограмма БЛК из зерна пшеницы на колонке с Сефарозой 4В.

отруби путем просеивания на сите. Для опыта брали 6 г отрубей, которые гомогенизировали в охлажденной фарфоровой ступке в 24 мл 0.05 М трис-HCl буфера, pH 7.4. После этого гомогенат центрифугировали на рефрижераторной центрифуге K-24 (Janetzki, Германия) в течение 10 мин при $10000 \times g$. Полученный бесклеточный экстракт в объеме 20 мл наносили на колонку с Сефарозой 4В. Элюцию проводили 0.05М трис-HCl буфера, pH 7.4. БЛК выходили в первом высокомолекулярном пике. Результаты представлены на рис. 5.

Сравнение МСХ БЛК на биосорбентах свидетельствует о том что МСХ на наноструктурированном углеродном сорбенте дает более четкое разделение БЛК по сравнению с таковым на "Сефарозе-4В". Следует отметить, что время разделения на углеродном сорбенте меньше, чем на агарозных гелях.

Таким образом, на основе исследования морфологии углеродного сорбента с помощью сканирующего электронного микроскопа установлено, что углеродный сорбент является высокопористым, со средним размером пор ~ 200 нм и менее. В соответствии с результатами физико-химических исследований, полученный углеродный сорбент имеет высокопористую структуру и множество ячеек и пустот, т.е. по этим характеристикам он соответствует сорбентам используемым в МСХ.

Определены особенности молекулярно-ситовой хроматографии белок-липидного комплекса на углеродном сорбенте. Полученные результаты говорят о пригодности данного углеродного сорбента нанопористой структурой для молекуляр-

но-ситовой хроматографии крупных белок-липидных комплексов, таких как сферосомы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Рудаков О.Б., Селеменев В.Ф. Физико-химические системы сорбат-сорбент-элюент в жидкостной хроматографии. Монография. Воронеж, 2003. 240 с.
2. Чижков В.П., Бойцов В.Н., Демин А.В. // Журн. физ. химии. 2011. Т. 85. № 3. С. 565.
3. Мансурова Р.М. Физико-химические основы синтеза углеродсодержащих композиций. Алматы: XXI век, 2001. 180 с.
4. Mansurov Z.A., Gilmanov M.K. // Nanostructural Carbon Sorbents for Different Functional Application / in the book Sorbents: Properties, Materials and Applications, 2009 Nova Science Publishers, Inc (N.Y.). Ed. by P. Thomas. Chapter 7. P. 217.
5. Мансуров З.А., Гильманов М.К., Керимкулова А.Р. // Способ повышения урожайности сельскохозяйственных культур. Патент РК № 20922 от 25.12.2008.
6. Гильманов М.К., Дильбарканова Р., Гуккенгеймер Е.Ю., Кульбаева Г.А. // Метод. сб. ИМБиБ Методы молекулярной биологии, биохимии, иммунохимии и биотехнологии. Алматы: 1999. С. 98.
7. Гильманов М., Фурсов О., Францев А. Методы очистки и изучение ферментов растений. М.: Наука, 1981. 123 с.
8. Kerimkulova A.R., Sabitov A.N., Gilmanov M.K., Mansurov Z.A. // Вестн. КазГУ. Сер. биологическая. 2008. № 1(36). С. 137.
9. Мансуров З.А., Шабанова Т.А., Мансурова Р.М. // Вестн. КазНУ. Сер. химическая. 2004. № 2 (34). С. 129.
10. Mansurov Z.A., Zhilybaeva N.K., Ualieva P.S., Mansurova R.M. // Chemistry for Sustainable Development. 2002. V. 10. P. 321.
11. Мансуров З.А. // Вестн. КазНУ. Сер. химическая. 2003. Т. 30. С. 29.
12. Mansurov Z.A., Kerimkulova A.R., Büsenbaev M.A., et al. // Intern. Conf. on Carbon. Nagano. 2008. P. 195.