

Рисунок 4. Блок-схема эксперимента с применением микрочипов.

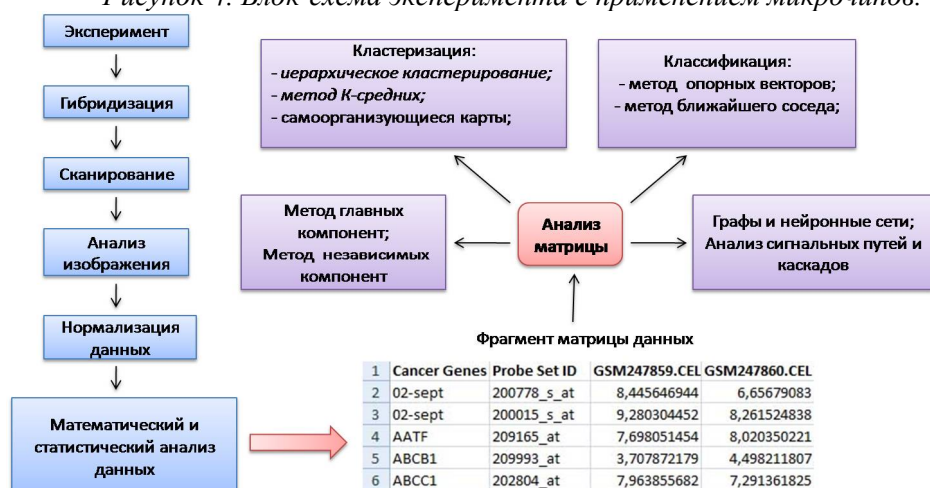


Рисунок 5. Модульная схема основных этапов микрочипового эксперимента, получения данных и типов анализа.

20. эжжжжэ

УДК 543.544.152, 661.666.1, 544.723.21

А.Р. Керимкулова, Н.А. Султанова, М.К. Гильманов, З.А. Мансуров, Ж.А. Абилов, Г.Е. Жусупова, Г.Ш. Бурашева, Ж.М. Жандосов, Б.К. Ескалиева

**ПРИМЕНЕНИЕ НАНОСТРУКТУРИРОВАННЫХ УГЛЕРОДНЫХ АДСОРБЕНТОВ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ БИОМОЛЕКУЛ И ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТИТЕЛЬНЫХ СУБСТАНЦИЙ**  
(Казахский национальный университет им. аль-Фараби)

В статье отражены результаты физико-химических исследований по разработке наноструктурированных углеродных материалов из отечественного сырья. Были получены и испытаны микро-мезопористые углеродные сорбенты для хроматографии молекулярно-ситовых маркеров и исследована применимость углеродных сорбентов для разделения белково-липидного комплекса и лекарственных растительных субстанций.

В последние десятилетия в ведущих странах мира наметилась отчетливая тенденция по увеличению в общем арсенале выпускаемых лекарственных средств доли растительных препаратов и к настоящему времени она достигает более 50 %, в то время как в нашей стране эта цифра крайне низка и колеблется в пределах от 5 % до 10 %. На территории Республики Казахстан сосредоточена уникальная флора, насчитывающая более 100 лекарственных растений, которые относятся к самовозобновляемому дикорастущему сырью и могут служить источником для получения на их основе малотоксичных, высокоэффективных лекарственных средств широкого спектра действия, не

вызывающих кумулятивных и аллергических реакций в организме, что особенно важно при длительном их использовании для лечения или профилактики различных заболеваний.

Обеспечение населения медикаментами отечественного производства является одним из основных приоритетов социально-экономической политики правительства Республики Казахстан и действующей государственной программы импортозамещения. Для решения указанной глобальной государственной проблемы необходимо осуществлять отбор наиболее перспективных видов растений, произрастающих на территории Казахстана, с учетом их биоактивности, сырьевых ресурсов, целесообразности заготовки, степени сложности технологических процессов получения субстанций на их основе, исходя из экономических и экологических расчетов.

При извлечении субстанций из растений с использованием при этом в качестве экстрагента водных растворов этилового спирта или же водных растворов ацетона извлекаются суммарные экстракты, содержащие в себе как гидрофобные, так и гидрофильные синергично действующие вещества. Для разделения и выделения индивидуальных соединений с целью стандартизации сырья и получаемых на его основе лекарственных средств используют, как правило, методы избирательной экстракции, препаративного бумажного и колоночного хроматографирования с применением в последнем случае различных сорбентов, таких как сеффадексы, силикагель, оксид алюминия, целлюлозу, силикат магния, ионообменные смолы, полиамид. Деление на сеффадексах возможно только для гидрофильных фракций природных веществ с применением для их элюирования воды и водных растворов ацетона. Силикагели различных марок и оксид алюминия применяют в основном для разделения гидрофобных фракций и они отличаются высокой адсорбцией природных гидрофильных веществ. Необходимо отметить, что наиболее удобным сорбентом из всех указанных, широко используемым для разделения различных групп полифенолов, является полиамид, который можно было бы отнести к универсальным сорбентам, так как именно при использовании данного сорбента можно элюировать вначале неполярные вещества, а затем перейти к получению элюатов, содержащих более полярные вещества. Однако недостатком данного сорбента является его невысокая емкость и малая эффективность для препаративного получения индивидуальных веществ, а также невозможность его повторного использования для хроматографического разделения.[1,2]. Все вышеперечисленные сорбенты производятся только за рубежом и являются дорогими, что указывает на необходимость производства сорбентов и, в первую очередь, созданные в Республике Казахстан, для снятия импортной зависимости в их приобретении.

В связи с вышеизложенным, применение новых разработанных эффективных сорбентов отечественного производства для очистки и разделения суммы биологически активных соединений лекарственных растений является чрезвычайно актуальным и несомненно имеет большое научное и практическое значение, так как отвечает потребностям Казахстана в получении высокоэффективных лекарственных средств на базе собственного стандартизованного растительного сырья, введенного в официальную медицину и соответствующего по качеству требованиям Фармакопеи.

В последнее время углеродные сорбенты находят широкое применение в различных процессах очистки от вредных примесей, рекуперации ценных веществ из жидких и газообразных сред; в медицине - для очистки крови от эндо- и экзотоксинов, для детоксикации желудочно-кишечного тракта и др. целей. Известны промышленные сорбенты на основе активных углей, которые получают из различных видов органического сырья: антрацита, торфа, древесины и продуктов ее переработки, материалов животного происхождения [3]. В Институте проблем горения КазНУ им. аль-Фараби проводятся исследования по разработке наноструктурируемых сорбентов, а в качестве сырья используются отходы производства рисовой шелухи, абрикосовых, виноградных косточек и скорлупа грецких орехов [4.5].

Целью исследования является экспериментальное обоснование эффективности применения новых разработанных отечественных наноструктурированных сорбентов, используемых для очистки и разделения субклеточной органеллы растительной клетки – сферосомы и основных групп биологически активных веществ (БАВ), выделяемых из промышленно значимых казахстанских лекарственных растений в виде сухих экстрактов.

Наиболее важную информацию о структуре карбонизованного углеродного материала (КУМ) может дать сканирующая электронная микроскопия. Методом сканирующей электронной микроскопии были получены снимки образцов углеродного материала. Наиболее интересные результаты были получены при исследовании углеродного материала, карбонизованного при температуре 800<sup>0</sup>С, где наблюдается существенное разрыхление и появление многочисленных пор от 200 нм и менее.

Таким образом, было установлено, что углеродный материал, карбонизованный при температуре 800<sup>0</sup>С, имеет наиболее хорошо развитую структуру и пористость, которые придают гранулам УМ 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 молекулярно-ситовой хроматографии (МСХ). В связи со сказанным, в последующих экспериментах нами исследовалась возможность применения созданного нами углеродного сорбента для использования в МСХ.

В качестве цветного маркера для МСХ мы взяли общепризнанные стандарты: 1- голубой декстран фирмы «Фармация» с молекулярной массой 2млн. г/моль, 2- пищевой краситель имеющий фирменное название «Sunset Yellow» (оранжево-желтый) с молекулярной массой 300 г/моль.

Как показали результаты два цветных молекулярно-ситовых маркера хорошо разделились на хроматограмме. Голубой декстран вышел при  $V_0=100$  мл, а «Sunset Yellow» 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. Полученные результаты свидетельствуют о превосходных молекулярно-ситовых характеристиках исследуемого нами сорбента[6].

Также к очевидным преимуществам углеродного сорбента можно отнести следующее:

- Ввиду наличия в сорбенте прочных наноглеродных структур, он прекрасно выдерживает гидростатическое давление, и потому пригоден для препаративных, крупномасштабных разделений, что открывает перспективы применения их в промышленной биотехнологии.

В то же время, необходимо отметить, что широко применяемые углеводно-полимерные гели – сефадексы и сефарозы легко атакуются грибами и микроорганизмами и поэтому срок их эксплуатации не превышает нескольких месяцев. Кроме того эти гели являются не прочными и слабыми, поэтому 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 грибами 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 округлые тельца диаметром около 1 мкм, то для ее очистки необходим сорбент с очень крупными порами. Для этих целей используют агорозные 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 кипятили в течение 4 часов в дистиллированной воде. Затем колонку промывали 1 М раствором соды ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) для удаления загрязняющих сорбент примесей. Затем промывали колонку 3-х кратным объемом дистиллированной воды и наконец, колонку уравнивали стартовым 0,05 М раствором Трис-НСI буфером, рН 7,4. После этого на колонку наносили 20 мл бесклеточного экстракта, полученного из беззародышевых половинок зерна. В результате хроматографирования на данном сорбенте получены высокоочищенные сферосомы.

Для получения бесклеточного экстракта 6 г сухих семян пшеницы сорта «Стекловидная-24» тщательно растирали в фарфоровой ступке в 0,05 М трис-НСI буфере, рН 7,4. Полученный гомогенат центрифугировали при 10000хg в течение 10 мин. Затем, полученный бесклеточный экстракт фракционировали на колонке с углеродным сорбентом. В результате БЛК элюировались в первом высокомолекулярном пике, в то время как вещества с более низкой молекулярной массой во втором пике. Далее нами было проведено электронно-микроскопическое изучение фракции первого пика. Было установлено, что данная фракция действительно содержит высокоочищенные сферосомы, представляющие собой сферические тельца диаметром около 1 мкм.

Кроме того, проведены исследования по получению наноструктурируемых сорбентов на основе абрикосовых косточек и рисовой шелухи, которые использовались в дальнейшем для очистки и разделения биологически активного комплекса (БАК), выделяемых из различных лекарственных растений, таких как *Limonium gmelinii*, *Alhagi kirgisorum Schrenk*, *Climacoptera obtusifolia* и *Tamarix hispida* [7-9].

Методами двумерной хроматографии на бумаге (БХ) и тонкослойной хроматографией (ТСХ) в различных системах растворителей с использованием специфических проявителей установлено, что основными группами биологически активных веществ надземной части исследуемых растений являются флавоноиды, аминокислоты, олиго- и полисахариды, фенолоксислоты, сапонины (*Climacoptera obtusifolia*), дубильные вещества (*Tamarix hispida*), проантоцианидины (*Limonium gmelinii*, *Alhagi kirgisorum Schrenk*) [10,11].

В соответствии с разработанными оптимальными технологическими схемами наработаны в необходимых количествах субстанции, содержащие вышеперечисленные биологически активные метаболиты.

Совместное присутствие соединений, обладающих сходным строением и близкими свойствами требует дальнейшего применения колоночной хроматографии с применением таких сорбентов, как сеффадексы, силикагель, оксид алюминия, целлюлозу, полиамид. Однако все указанные сорбенты, производятся только за рубежом и являются дорогими.

В связи с вышесказанным, для разделения БАК из исследуемых видов растений использовали разработанные наноструктурированные сорбенты. Для этого 15 г наносорбента обрабатывают водой, затем наносят эту смесь в колонку диаметром 1 см и высотой 30 см. После истечения воды на сорбент наносят 1 г сухого растительного экстракта. Элюирование ведут вначале водой, затем водными растворами этилового спирта с последующим увеличением градиента последнего. При этом вначале элюируются аминокислоты, затем в следующей последовательности разные смеси веществ, а именно: аминокислоты и моносахариды, аминокислоты и полисахариды, полисахариды и полифлаваны, полифлаваны и флавоноиды, фенолоксислоты и флавоноиды. При повторном хроматографировании получены очищенные комплексы флавоноидов, полифлаванов и фенолоксислот.

Таким образом, показано, что по разделяющей способности используемые наносорбенты не уступают таким известным и общепризнанным сорбентам как сеффадексы и полиамид. Применение относительно дешевых растительных отечественных наноструктурированных сорбентов, способных к разделению и очистке как гидрофобных, так и гидрофильных соединений, с большой удельной поверхностью и пористостью, в производстве фармацевтических препаратов позволит не только существенно улучшить качество производимых субстанций, но и создать новые отечественные препараты, отвечающие всем требованиям надлежащей практики – GMP.

Использование новых оптимальных по совокупности свойств наноструктурированных сорбентов природного происхождения для очистки, выделения, разделения и получения новых комплексов БАВ из отечественных растений позволит создать импортозамещающую технологию, что будет способствовать укреплению, устойчивому развитию и конкурентоспособности экономики и фармацевтической отрасли Республики Казахстан, повышению экспортного потенциала республики.

При создании наноструктурируемых сорбентов были учтены все закономерности, определяющие физико-химические свойства и структурную обусловленность используемых материалов.

#### **Выводы**

1. Нарботана в необходимом количестве опытная партия наноструктурируемых сорбентов, получаемых на основе абрикосовых косточек и рисовой шелухи.

2. 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.

3. Определены особенности молекулярно-ситовой хроматографии белок-липидного комплекса на углеродном сорбенте. Полученные результаты говорят о пригодности данного углеродного сорбента нанопористой структурой для молекулярно-ситовой хроматографии крупных белок-липидных комплексов, таких как сферосомы.

4. Проведены исследования по селективному разделению БАК, выделяемых из растений *Limonium gmelinii*, *Alhagi kirgisorum Schrenk*, *Climacoptera obtusifolia* и *Tamarix hispida*, на суммарные фракции с преимущественным преобладанием в каждой из них конкретных групп БАВ. Показано, что по разделяющей способности наносорбенты не уступают таким известным и общепризнанным сорбентам как сеффадексы и полиамид. Выявлено, что на наноструктурированных сорбентах лучше всего разделять вещества гидрофильной природы, а в качестве элюента также можно использовать спирт и его водные растворы.

1. Рудаков О.Б., Селеменев В.Ф. Физико-химические системы сорбат-сорбент-элюент в жидкостной хроматографии. - Воронеж, 2003. - 240 с.
2. Чижков В.П., Бойцов В.Н., Демин А.В. Общая теория разделения и жидкостная экстракция // Журн. физ. химии. - 2011, - Т.85. - № 3. - С. 565
3. Мансурова. Р.М. Физико-химические основы синтеза углеродсодержащих композиции. - 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. "Nova Science Publishers, Inc (New York). Editor: Thomas P. Willis. - 2009. - Chapter 7. - pp. 217-284.
5. Gilmanov M.K., Kerimkylova A.R., Sabitov A.N., Ibragimova S.A. The phosphatidylinositol-protein nanocomplex as a new biosensor for ecological monitoring and clinical diagnostic // Journal Biosensor and Bioelectronics. - 2009. - V. 21. -pp. 1490-1492
6. Керимкулова, А.Р., Мансурова Б.Б., Гильманов М.К., Мансуров З.А. Нанопористый углеродный сорбент для молекулярно-ситовой хроматографии белково-липидного комплекса // Журнал физической химии. - 2012. - Т. 86. - № 6. -С. 1-5
7. Султанова Н.А., Абилов Ж.А., Мансуров З.А., Жусупова Г.Е., Бийсенбаев М.А. Перспективы использования наноструктурированного сорбента для выделения БАВ из TAMARIX HISPIDA // В сб. конф. «Актуальные проблемы ботанического ресурсосведения», посвященной памяти выдающего казахстанского ботаника-ресурсоведа, член-корр. НАН РК, д.б.н. М.К. Куkenova. - Алматы, 12 мая 2010 г. - С. 354-356
8. Sultanova N.A., Zhushupova G.E., Abilov Zh.A., Mansurov Zh.A., Beisenbaev M.A. The separation of biological active complexes from genus Tamarix by using nanostructure sorbents // 2-nd Annual Russian-Korean Conf. "Current issues of natural products chemistry and biotechnology". - Novosibirsk, March 15-18, 2010. -С. 144
9. Seitimova G.A., Yeskaliyeva B.K., Burasheva G.Sh., Abilov Zh. A., Mansurov Z.A., Hajiakber A. Isolation of biological active compounds from Climacoptera obtusifolia by using Kazakhstan nanosorbents // 2nd International Symposium on Edible Plant Resources and the Bioactive Ingredients. - China, Urumqi, 2010. - P. 70.
10. Гадецкая А.В., Жусупова Г.Е., Кожамкулова Ж.А., Мурзахметова М.К., Абилов Ж.А. Физиологически активные соединения из корней Limonium myrianthum // Труды симпозиума некоммерческого партнерства РАН «Орхимед»: «Разработка лекарственных и физиологически активных соединений на основе природных веществ». - Санкт-Петербург, 2010. - 317 с.
11. Жусупова Г.Е., Кожамкулова Ж.А., Абилов Ж.А. Получение новых лекарственных средств растительного происхождения // Материалы XIX Менделеевского съезда по общей и прикладной химии. -2011. - Т. 4. - С. 146.

\*\*\*

Мақалада отандық шикізаттан алынған наноқұрылымданған көміртекті сорбенттердің физика-химиялық қасиеттерінің зерттеу нәтижелері көрсетілген. Жұмыс барысында нанокеуекті көміртекті сорбенттер алынып және олардың молекулалық-тор маркерлерлерінің хроматографиясында және белок-липидті кешендер мен дәрілік өсімдіктер субстанцияларын бөліп алуға қолданылуы зерттелді.

\*\*\*

The results of physico-chemical studies on locally produced nanostructured carbon materials are reported in this paper. Microporous-mesoporous carbonaceous adsorbents were obtained and tested for chromatographic separation of molecular sieve markers. The results suggest the applicability of carbon nanosorbents for both separation and isolation of a protein-lipid complex, as well as medicinal herbal substances.

## ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ БИОЛОГИЯ

*К.Н. Алдибекова*

### ЭЛЕКТРОМАГНИТТІК ӨРІСТІ ГЕОАНОМАЛЬДЫ БӨЛІМДЕРДІҢ ТЕХНОГЕНДІК ЕРЕКШЕЛІКТЕРІН ЗЕРТТЕУ

(І. Жансүгіров атындағы Жетісу мемлекеттік университеті)

*Қарыштап дамып отырған зымыран заманындағы адам игілігіне қызмет ететін құралдарды компьютерлік техникамен басқарудың дамуы шарықтау шегінде. Осыған орай техникалық индустрияның даму көрсеткіші, заманауи автокөлік машиналардың алыс шақырымды аз уақытта бағындыратын деңгейге жетуі, еліміздің экономикасының даму үстінде екендігін көрсетіп тұрсада, автокөлік жолдарындағы техногендік апаттарға жиі ұшырайтындығы бірнеше себептермен байланыстырылады. Бұл себептердің бірі автокөлік жолындағы аномальды бөлімдердің әсері екендігі соңғы жылдардағы ғалымдар еңбектерінде айтылып келеді. Ендеше, автокөлік жолдарындағы аномальды бөлімдерді түбегейлі әрі нәтижелі зерттеу бүгінгі күннің өзекті мәселесі.*

*Техногенді жайттардың бүлдіруші әсеріне тап болған экожүйені қадағалап отырудың және оны оңтайландыру үшін жаңа әдістерін табу қажеттігі туындап отыр. Оған, экожүйеге әсері мал бірақ, аз зерттелген геоэкологиялық процестер ерекше маңызға ие болуын жатқызуға болады. Соның бірі геоэкологиялық жайттарды зерттеу жер асты және қыртысындағы электр зарядтары мен түрлі күштерінің автокөлік жолдарының түрлі бөлімдерінде орналасуы экожүйелердің тұрақсыз болуына үлес қосуда.*

Қапшағай-Талдықорған автожолындағы геоауытқулары бар бөлімдердің тірі ағзаға, әсіресе адам психикасына және өсімдіктерге әсерін зерттеу арқылы жол апаты салдарын азайтуды ғылыми-теориялық тұрғыдан негіздеу, мақсатымызға сай төмендегідей бірнеше міндеттер анықталынды: