

УДК 001.4:634.1:631.52

ПРИМЕНЕНИЕ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОГО КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА В СЕЛЕКЦИОННОМ ПРОЦЕССЕ

Якуба Ю.Ф., канд. техн. наук

Государственное научное учреждение Северо-Кавказский зональный научно-исследовательский институт садоводства и виноградарства Россельхозакадемии
(Краснодар)

Реферат. Обсуждены возможности и новые методические решения определения общего фосфора, сахара, фитогормонов в вегетативных частях растений посредством капиллярного электрофореза. Обсуждены действующие методические подходы для проведения пробоподготовки растительных образцов.

Ключевые слова: лист, метод, электрофорез, ведущий электролит, сахар, фитогормоны

Summary. The possibilities and new methodic decisions of determination of general phosphorus, sugar, fitogormones in the vegetative part of the plant by means of capillary electrophoresis are considered. The operating systematic approach, providing control sample of the plant preparing are discussed.

Key words: leaf, method, electrophoresis, leading electrolyte, sugar, phitogormones

Введение. Листовая диагностика на основе определения массовой концентрации подвижных форм щелочных и щелочноземельных металлов, сахаров, органических кислот, витаминов, фитогормонов представляет собой оперативный метод контроля физиологического состояния плодовых, ягодных, цветочных культур и винограда, а также может служить критерием иммунной устойчивости сорта.

На долю углеводов приходится около 80 % сухого вещества растений и плодов. Углеводы синтезируются всеми зелеными растениями, изучение компонентного состава углеводов способствует раскрытию физиолого-биохимических механизмов адаптации растений к стрессам окружающей среды.

Объекты и методы исследований. В качестве объектов использовали вегетативные органы растений различной степени влажности. Для получения экспериментальных данных применяли метод капиллярного электрофореза на системе «Капель 104РТ».

Обсуждение результатов. Метод капиллярного электрофореза успешно применен для прямого определения глюкозы, сахарозы и фруктозы в винах, фруктовых соках, экстрактах из вегетативных органов плодовых культур и винограда – СТО 00668034-025-2011 «Методы оценки массовой концентрации фруктозы, глюкозы и сахарозы в биологических объектах и продуктах переработки плодов и винограда посредством высокоэффективного капиллярного электрофореза».

В анализе используют водный ведущий электролит, содержащий 0,4% сорбата калия, 0,08% цетил-триметиламмоний-основания (ЦТА-ОН), 3,2 % глицерина и 0,015% гидроксида калия; электролит расходуют в течение рабочего дня, хранению он не подлежит. Рекомендуемое отрицательное напряжение 16 кВ, при этом ток должен составить 45 ± 2 мкА, термостатирование капилляра при +24°C время анализа 15 минут.

Пробоподготовку осуществляли следующим образом: пробу сока, вина или другого жидкого объекта разбавляли в 2-50 раз (в зависимости от ожидаемого суммарного содержания сахаров, предпочтительно оценить рефрактометром и разбавить до суммарной концентрации сахаров не более 10 г/дм³), центрифугировали 3-5 минут при 6000 об⁻¹, перенесли в прибор и производили дозирование пробы пневматическим методом под давлени-

ем 30 мБар в течение 5 секунд. Гомогенизированные плоды, пюре и подобную продукцию заливали дистиллированной водой в соотношении 1:10, перемешивали, настаивали в течение часа при комнатной температуре, центрифугировали, фильтровали, при необходимости разбавляли и подвергали анализу.

Ориентировочное время выхода: глюкозы – 13,5 мин, сахарозы – 14 мин, фруктозы – 13 мин. Диапазон измеряемых значений массовых концентраций сахаров составляет 0,1-5 г/дм³. Пример определения сахаров градуировочной смеси показан на рис. 1.

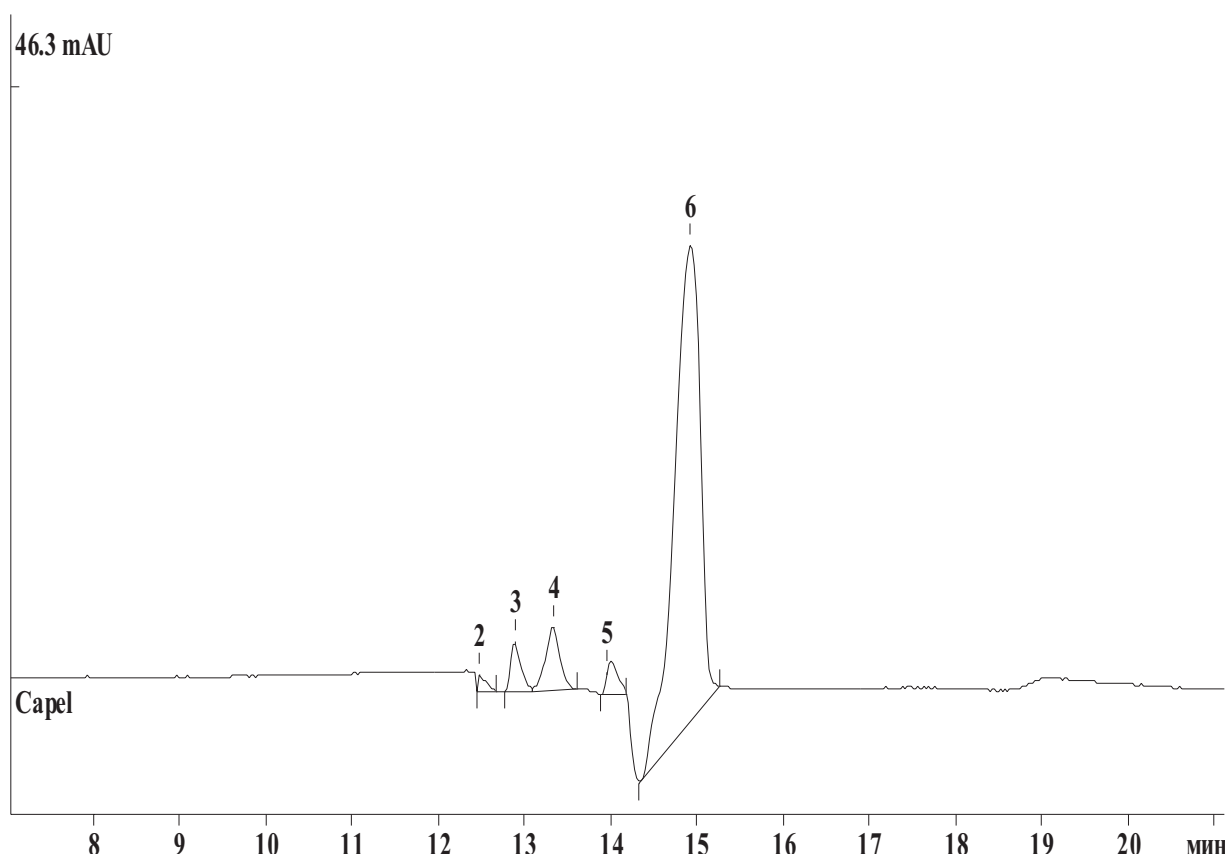


Рис. 1. Электрофореграмма градуировочной смеси сахаров
3 – фруктоза, 4 – глюкоза, 5 – сахароза, 6 – системный пик

Разработанные варианты определения массовой концентрации сахаров обеспечивают полное разделение компонентов. Анализу не мешают анионы, глицерин, этиленгликоль, изомеры пропиленгликоля и 2,3-бутиленгликоля. Контроль массовой концентрации моносахаров в клеточном соке позволяет судить о степени готовности растений к зиме.

Фосфор и азот играют исключительно важную роль в процессах обмена энергии растительных организмов. При недостатке фосфора нарушается обмен энергии и веществ в растениях. Особенно резко дефицит фосфора сказывается у всех растений на образовании репродуктивных органов. Его недостаток тормозит развитие и задерживает созревание, вызывает снижение урожая и ухудшение качества продукции. Основное накопление азота формируется в запасе аминокислот и белков, особенно это заметно для зерновых и бобовых культур. Содержание белкового азота в плодовых культурах значительно меньше, и переизбыток азотных удобрений почти не сказывается на его накоплении в плодах, в отличие от ягодных культур, в первую очередь бахчевых – где избыточное содержание нитратного и гораздо более опасного

нитритного азота часто приводит к пищевым отравлениям. Источником фосфора для растений служат неорганические соединения. Усиленное научно обоснованное снабжение растений фосфором и азотом ускоряет их развитие и позволяет получать более ранний урожай, одновременно улучшается качество продукции [1].

Сложный состав матрицы биообъектов оказывает существенное влияние на точность измерений общего фосфора и азота в случае анализа без пробоподготовки, что неприемлемо. Например, при определении общего фосфора пробу растительного сырья кипятят в смеси серной и хлорной кислот в течение нескольких часов, охлаждают, регулируют кислотность и анализируют [1]. Для определения общего азота органическое вещество окисляют кипящей серной кислотой с добавкой сернокислого калия и катализаторов: металлического селена и сернокислой меди; смесью хромовой кислоты с серной и т.д. Перспективными для осуществления массового анализа анионов являются методики, основанные на капиллярном электрофорезе [2].

Анализ общего фосфора выполняли на системе капиллярного электрофореза в кварцевом капилляре эффективной длиной 0,5 м, внутренним диаметром 75 мкм, использовали водный раствор ведущего электролита, содержащий 0,2 % хромата калия и 0,6 % уротропина при отрицательной полярности напряжения и длине волны детектирования – 254 нм. Линейный диапазон измерений – 5-500 мг/дм³. Рекомендуется термостатирование капилляра при +24 °С; ввод пробы – пневматический – 30 мБар в течение 5 секунд. Электрофореграмма показана на рис. 2.

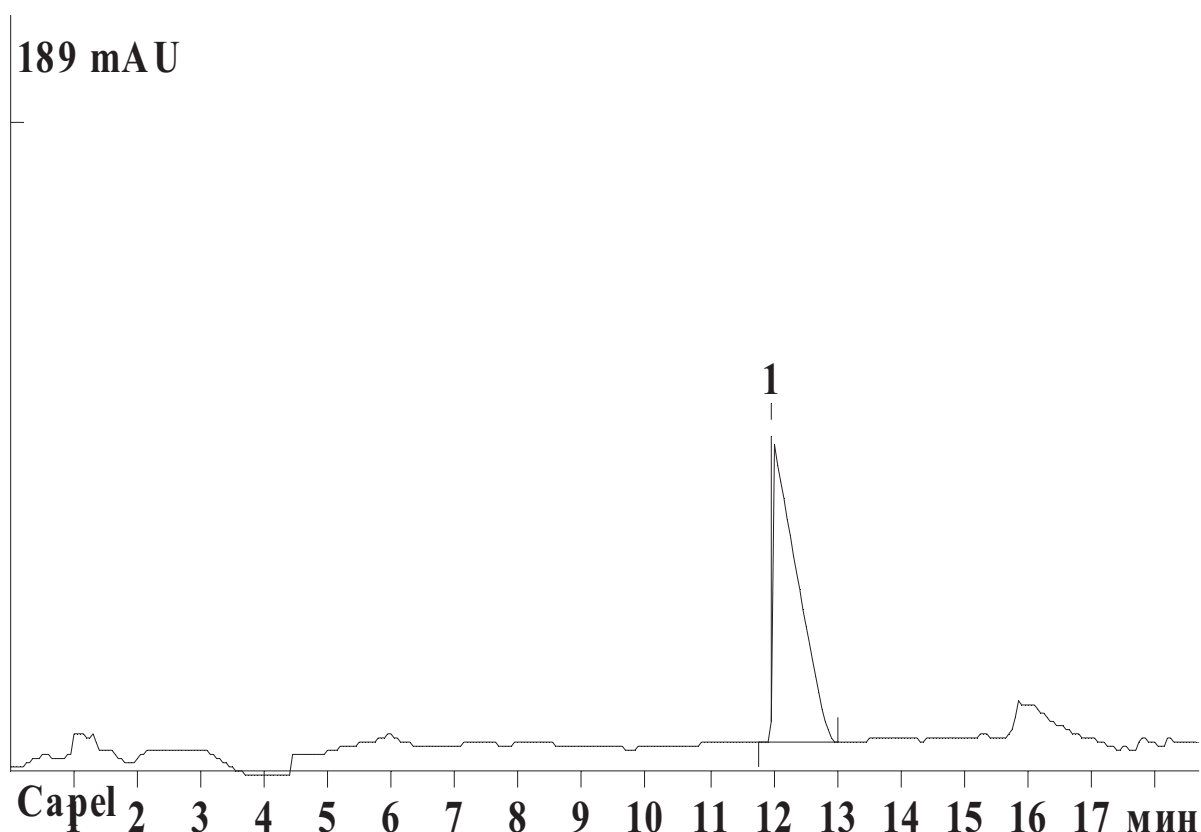


Рис. 2. Электрофореграмма фенольных соединений экстракта листьев устойчивого к коккомикозу образца АИ 1 (наличие на электрофореграмме характерного пика производного галловой кислоты со временем выхода 12,3 мин. свидетельствует об устойчивости данной формы к коккомикозу)

Определение концентраций фосфат-иона в диапазоне 1-100мг/дм³ выполняли на системе капиллярного электрофореза в кварцевом капилляре эффективной длиной 0,5 м, внутренним диаметром 75 мкм, использовали водный раствор ведущего электролита, содержащий 0,11% дипиколиновой кислоты; 1,01% тетраметиленамина; 0,09% этилендиуксусной кислоты, смешанных в объемных соотношениях 8:1:1; при отрицательной полярности напряжения и длине волны детектирования – 254 нм. Рекомендуется термостатирование капилляра при +26 °С; ввод пробы – пневматический – 30 мБар в течение 5 секунд. Разделение градуировочной смеси показано на рис. 3.

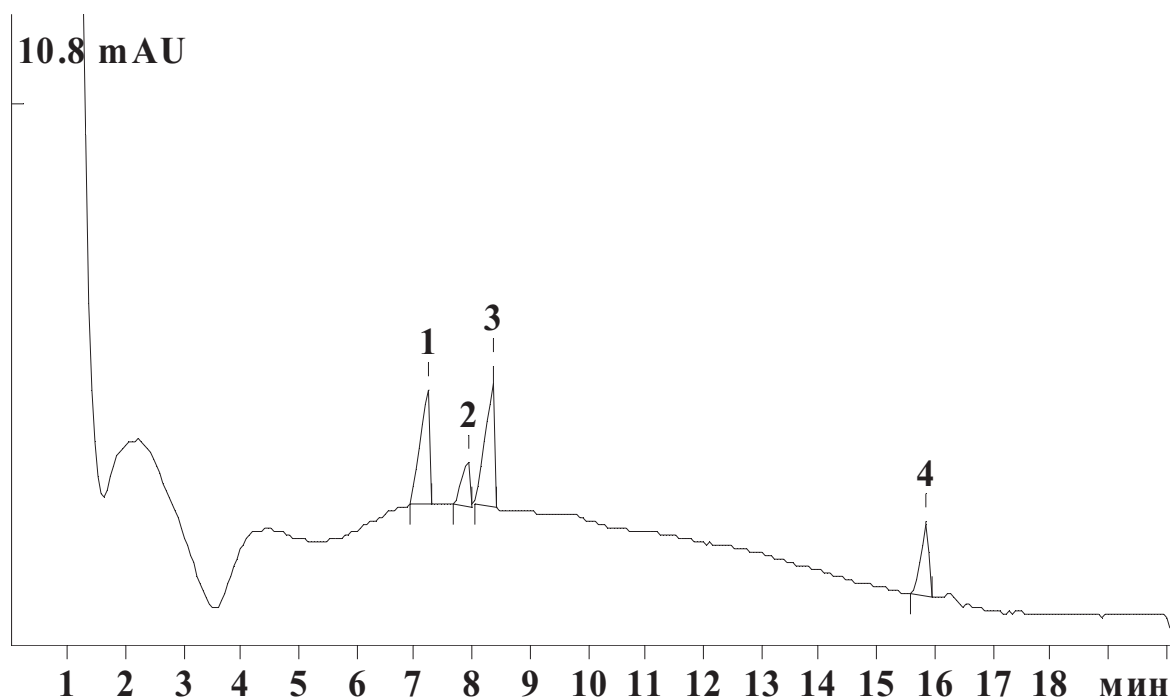


Рис. 3. Электрофореграмма градуировочной смеси с использованием электролита на основе дипиколиновой кислоты, пик №4 – фосфат

Для определения массовой концентрации катионов аммония, калия, натрия, магния, кальция в материалах растительного происхождения адаптирована методика капиллярного электрофореза [3]. Данные катионы регулируют обменные процессы в растениях.

Система капиллярного электрофореза или анализатор капиллярный ионный электрофоретический, оснащенный ультрафиолетовым фотометрическим детектором, работающим на длине волны 254 нм, или спектрофотометрический детектор с перестраиваемой длиной волны излучения в области 200-400 нм, кварцевым капилляром, длиной не менее 0,5 м до детектора, внутренним диаметром от 50 до 100 мкм, источником высокого напряжения положительной полярности с регулируемым напряжением от 1 до 25кВ и персональным компьютером с соответствующим программным обеспечением для сбора и обработки информации, например система капиллярного электрофореза «Капель» (номер Госреестра средств измерений 17727-01).

Прибор подготавливают к работе в соответствии с руководством по эксплуатации и устанавливают следующие рабочие параметры:

- положительное напряжение на капилляре – 16 кВ;
- время анализа – 12 мин;
- ввод пробы – пневматический;
- температура капилляра – от 20 до 30 °С.

Длина волны детектирования – 254 нм; при возможности перестройки ее подбирают так, чтобы высота пиков определяемых ионов была максимальной.

Разработана методика определения массовой концентрации аскорбиновой, хлорогеновой, кофейной и некоторых других кислот в вегетативных органах растений с применением капиллярного электрофореза, пригодная для исследований в селекционном процессе и для изучения витаминного состава продукции переработки плодов.

Систему капиллярного электрофореза подготавливают к работе в соответствии с руководством по эксплуатации и устанавливают следующие рабочие параметры: положительное напряжение – 16 кВ; время анализа – 15 мин; ввод пробы – пневматический; температура капилляра – от 20 до 30 °С.

Длина волны детектирования – 254 нм; при возможности перестройки ее подбирают так, чтобы высота пиков определяемых ионов была максимальной.

Пример разделения биологически активных веществ сока малины показан на рис. 4.

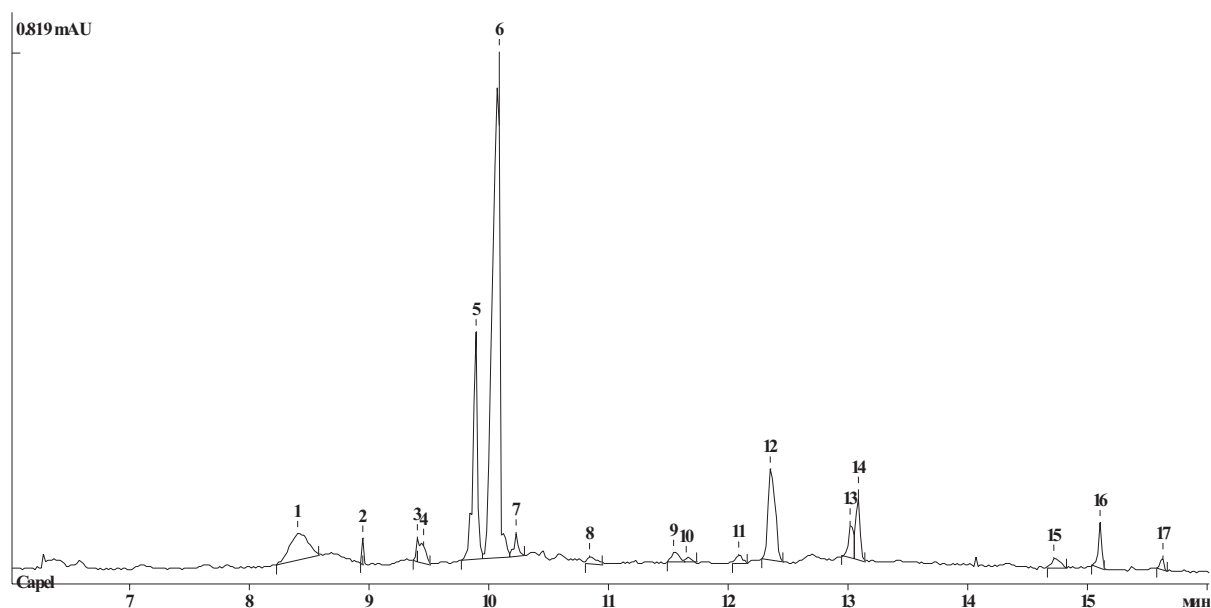


Рис. 4. Электрофореграмма биологически активных веществ сока малины, разбавление 2 раза: пик №6 – аскорбиновая кислота – 120 мг/кг, №7 – хлорогеновая – 9,4 мг/кг, №10 – салициловая – 21 мг/кг, №11 – оротовая – 4 мг/кг, №14 – кофейная – 11 мг/кг

Разработанный состав рабочего электролита при выполнении определенной пробоподготовки пригоден для анализа некоторых фитогормонов, например индолил-уксусной кислоты. Электрофореграмма определения в этом же режиме (аналогично витаминам) индолил-уксусной кислоты из экстракта виноградного листа показана на рис. 5.

Для определения массовой концентрации основных органических кислот в материалах растительного происхождения разработана методика капиллярного электрофореза. Для этого используется система капиллярного электрофореза, оснащенная кварцевым капилляром длиной не менее 50 см до детектора, внутренним диаметром 75 мкм, фотометрическим детектором, работающим на длине волны 254 нм или спектрофотометрическим детектором в интервале длин волн от 200 до 300 нм и электронно-вычислительной машиной (компьютером) с программным обеспечением для обработки электрофореграмм, например система капиллярного электрофореза «Капель».

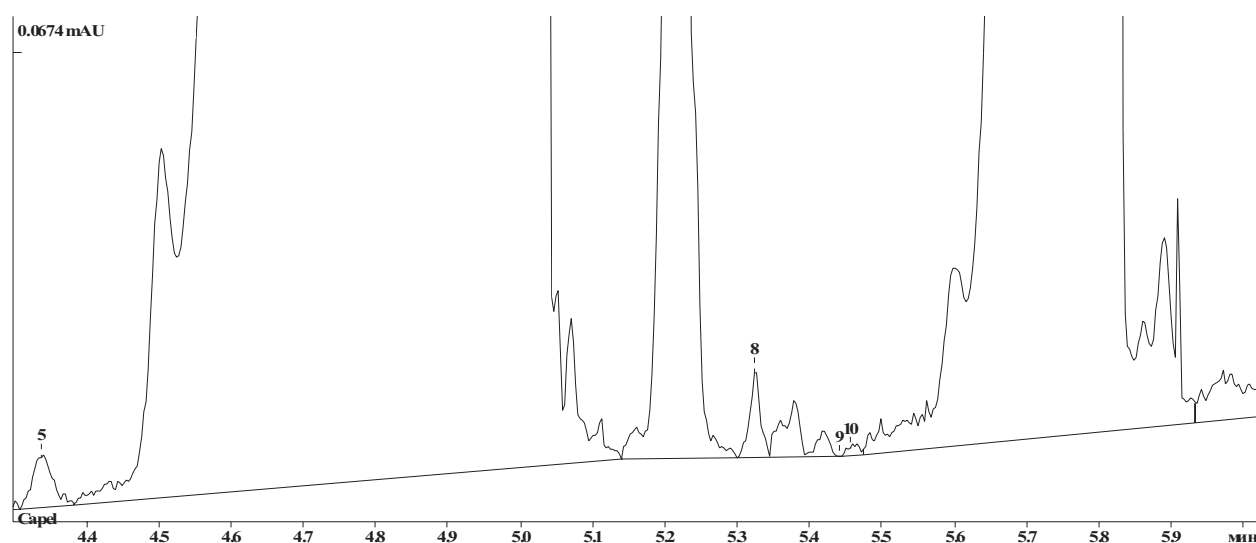


Рис. 5. Электрофореграмма экстракта из листа винограда для определения концентрации индолил-уксусной кислоты, разбавление 5 раз: пик №10 – индолил-уксусная кислота, 2,9 мг/кг

Прибор подготавливают к работе в соответствии с руководством по эксплуатации и устанавливают следующие рабочие параметры:

- длина волны спектрофотометрического детектора – 270 нм, фотометрического – 254 нм;
- отрицательное напряжение – 25 кВ;
- дозирование пробы – пневматическое при 30 мБар в течение 5 с при напряжении 0 кВ;
- время анализа – 10 мин;
- рекомендуется термостатирование капилляра при температуре 20 С.

Проведенные исследования позволили сформировать ожидаемое содержание подвижных форм компонентов в вегетативных органах некоторых плодовых культур (табл.). Концентрационные пределы остальных обсуждаемых параметров уточняются.

Для черешни в весенний период характерно появление винной кислоты. Варьирование подвижных форм питательных веществ довольно значительно, тем не менее, эти данные позволяют судить об обеспеченности растения необходимыми веществами и регулировать их содержание при необходимости подкормками.

Содержание подвижных форм питательных веществ в вегетативных органах плодовых культур, мг/кг

Компонент	Плодовые культуры, варьирование параметра			
	Вишня	Черешня	Алыча	Яблоня
Калий	500-1500	700-1400	700-2000	500-3500
Натрий	40-200	20-200	50-200	70-600
Магний	120-500	100-500	100-400	140-600
Кальций	150-600	100-300	100-600	100-600
Аскорбиновая к-та	5-22	7-18	3-14	8-100
Хлорогеновая к-та	120-570	250-700	400-1600	200-1000
Кофейная к-та	2,2-115	5-74	15-150	0-12
Яблочная	2000-6000	2000-6000	2000-5000	3000-8000
Янтарная	20-150	20-100	20-150	20-200
Лимонная	200-1000	200-1000	200-1000	200-1000
Молочная	200-2000	200-2000	200-2000	200-3000

Выводы. Разработаны экспресс-методы, которые при использовании в селекционном процессе позволяют получать воспроизводимые и надежные результаты, дающие оперативную информацию о физиологическом состоянии плодовых культур и винограда в зависимости от агротехники, сезона вегетации и года наблюдений. Предложенные экспресс-методы имеют существенные преимущества перед обработкой растительных образцов вручную с последующим использованием химических методов испытаний.

Литература

1. Агрохимические методы исследования почв / Под ред. А.В. Соколова.– М.: Наука, 1975.– 656 с.
2. Беленький, Б.Г. Высокоэффективный капиллярный электрофорез / Б.Г. Беленький. – СПб.: Наука, 2009. – 320 с.
3. Якуба, Ю.Ф. Применение свч-экстракции и высокоэффективного капиллярного электрофореза для анализа вегетативных органов растений / Ю.Ф. Якуба // II Международная конференция «Современное приборное обеспечение и методы анализа почв, кормов, растений и сельскохозяйственного сырья» Материалы конференции.– М.– 2004.– С. 71-74.