

УДК 541.64

ИССЛЕДОВАНИЕ СПЕКТРОСКОПИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ЛИГНИНА УФ- И ФЛЮОРЕСЦЕНТНЫМ МЕТОДАМИ

А. Ж. АМБАРЦУМЯН*

Кафедра физической и коллоидной химии ЕГУ, Армения

Исследованы спектроскопические свойства растворов лигнина в ДМСО методами УФ- и флюоресцентной спектроскопий. Показано, что при разбавлении раствора лигнина интенсивность электронного поглощения молекулы увеличивается, а в спектре флюоресценции появляется новый пик излучения.

Ключевые слова: клеточная мембрана растений, DHP (Dehydrogenated Polymer), лигнин, флюоресцентная спектроскопия.

Введение. В последние десятилетия многочисленные работы осуществляются в области изучения формирования и структуры растительных клеточных мембран [1, 2]. Это обусловлено тем, что в настоящее время полимеры растительного происхождения вызывают большой интерес с экологической точки зрения и интенсивно конкурируют с полимерами синтетического происхождения [3]. Как известно, растительная клеточная мембрана состоит из первичного и вторичного слоев. В отличие от первичного, вторичный слой имеет строго упорядоченную структуру, в которой параллельно ориентированные микрофибрильные волокна целлюлозы связаны с остальными компонентами клеточной мембраны (лигнин, пектин, протеины, полисахариды и т.д.) [4].

Важнейшей составной частью растительной клеточной мембраны является лигнин (в переводе с греческого “дерево”). Этот биополимер имеет сложную структуру, состоящую из ароматических мономеров [5]. Лигнин, выделенный из древесины, не является веществом с определенной структурой и химическим составом, а представляет собой смесь ароматических полимеров, имеющих схожую структуру. Химический состав лигнина не постоянен и зависит не только от вида растения, но и от метода его выделения из древесины. Следовательно, химическая формула лигнина представляет собой не конкретную, а среднестатистическую характеристику его молекулы [6].

Несмотря на сложную структуру этого полимера, в ходе многочисленных исследований показано, что в растительных клетках синтез лигнина

* E-mail: hambardz@ysu.am

осуществляется в основном радикальной полимеризацией кумарилового, кониферилового и синапилового спиртов (рис. 1) [2].

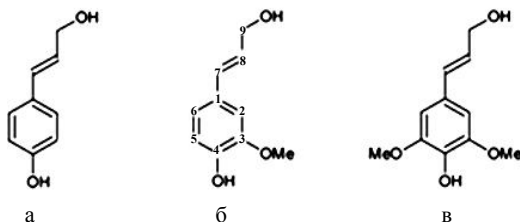


Рис. 1. Химические формулы кумарилового (а), кониферилового (б) и синапилового (в) спиртов.

В клеточной мембране в присутствии фермента пероксидазы происходит гомолитическое расщепление пероксида водорода на свободные радикалы $\text{HO}\cdot$, которые инициируют полимеризацию вышеупомянутых ароматических спиртов.

В качестве примера на рис. 2 схематически представлено формирование радикалов на разных позициях в молекуле кониферилового спирта.

Как видно из рис. 2, свободный радикал в молекуле кониферилового спирта может быть в пяти разных позициях. Существование таких радикалов дает возможность объяснить формирование наиболее часто встречающихся в молекуле лигнина атомных групп и химических связей. Например, при связывании радикалов R_8 и $\text{R}_{\text{O-4}}$ (взаимодействие типа 8–O–4), образуется β -ариль эфир, а при взаимодействии радикалов 5–8 и 8–8 – фенилкумаран и резинол соответственно [7].

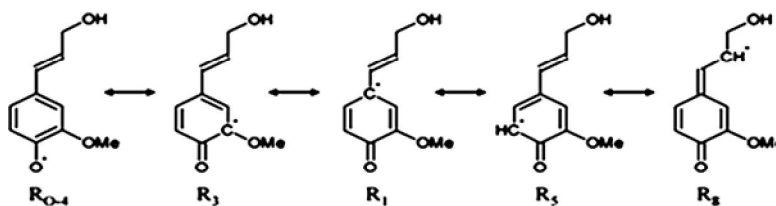


Рис. 2. Разные позиции свободного радикала в молекуле кониферилового спирта.

Так как молекула лигнина не может быть представлена конкретной химической формулой, в исследованиях его заменяют упрощенной моделью лигнина DHP (Dehydrogenated Polymer) [8]. В отличие от лигнина DHP имеет определенный химический состав и свободен от других компонентов древесины (белки, пектины, различные виды сахарозы), которые в клеточной мембране связаны с лигнином ковалентными связями.

В связи со сложной структурой клеточных мембран неизбежно создание модельных систем для их изучения. Такие модельные системы важны, так как дают возможность количественно измерять силы межмолекулярных взаимодействий между разными компонентами мембраны [9]. Для таких измерений часто используют УФ- и флуоресцентный спектроскопические методы, следовательно, необходимо знать точное значение коэффициента экстинкции DHP.

В данной работе изучены спектроскопические свойства DHP в ДМСО с целью выяснения концентрационного интервала, в котором зависимость интенсивности поглощения от концентрации изменяется линейно, то есть в котором действует закон Ламбера–Бера.

Результаты и обсуждения. DHP был получен путем радикальной полимеризации кониферилового спирта согласно методу “Higuchi” в пред-

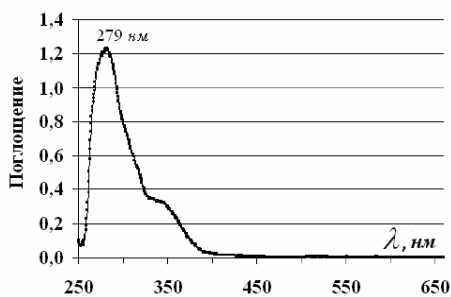


Рис. 3. УФ-спектр DHP в ДМСО с концентрацией 0,0625 г/л.

варительно промытом и заполненном азотом химическом реакторе [10]. Для осуществления реакции использовали следующие реактивы: 1) 3 мг фермента пероксидазы (HRP type VI, 250–330 мг⁻¹, “Sigma”), растворенного в 300 мл фосфатного буфера (рН 6,1; 0,033 М), фосфатный буфер готовили в дегазированной и бидистиллированной воде; 2) 300 мг (1,66 ммоль) кониферилового спирта, растворенного в смеси 10 мл ацетона и 90 мл фосфатного буфера; 3) 0,5 мл пероксида водорода (30% по массе в воде, 14,6 ммоль), смешанного с 100 мл фосфатного буфера. Растворы (2) и (3) вводили в реактор (содержащий фермент пероксидазу) с определенной “капельной” скоростью (5 мл·ч⁻¹) путем всасывания в течение 20 ч. После полного введения растворов в реактор, реакционную смесь оставляли еще на 16 ч, после чего сформированный осадок удаляли из водной фазы, промывали три раза дистиллированной водой и подвергали лиофилизации. Для осуществления работы готовили раствор DHP в ДМСО с концентрацией 0,0625 г/л, из УФ-спектра которого видно, что DHP поглощает при 279 нм (рис. 3).

Путем периодического разбавления этого раствора следили за изменением интенсивности поглощения молекулы DHP. Разбавление раствора осуществляли двумя способами: разбавление большими и маленькими порциями ДМСО. При разбавлении маленькими порциями растворителя на 2 мл раствора DHP каждый раз добавляли 10 мкл ДМСО и после тщательного перемешивания измеряли интенсивность поглощения. При разбавлении большими порциями из раствора DHP с концентрацией 0,0625 г/л каждый раз выливали 0,5 мл и добавляли 0,5 мл ДМСО.

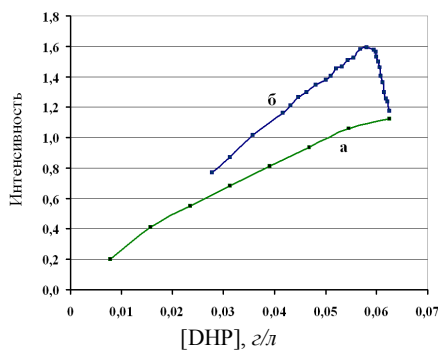


Рис. 4. Интенсивность поглощения DHP в ДМСО при разбавлении раствора большими (а) и маленькими (б) порциями.

Зависимость интенсивности поглощения раствора DHP от его концентрации при разных видах разбавления представлена на рис. 4, из которого видно, что при медленном разбавлении интенсивность поглощения прогрессивно увеличивается до определенного значения, а затем линейно снижается. Интересно отметить, что при низких концентрациях DHP кривые зависимости интенсивности поглощения от концентрации совпадают при разбавлении большими и маленькими порциями.

В растворе существует динамическое равновесие между мономерными и эксимерными формами хромофорных групп молекулы ДНР, которое при разбавлении смещается в сторону мономерных форм.

Увеличение интенсивности поглощения при разбавлении раствора маленькими порциями можно объяснить тем, что молекула ДНР раскрывается и, следовательно, ее хромофорные группы, формирующие эксимеры до разбавления, удаляются друг от друга, что и приводит к увеличению интенсивности поглощения. При разбавлении большими порциями проникновение растворителя в молекулу ДНР не происходит в той же мере, как при разбавлении маленькими порциями. Следовательно, при одной и той же концентрации интенсивность поглощения различается при разных видах разбавления.

Как известно, коэффициент экстинкции есть постоянная величина для каждой молекулы, не зависящая от концентрации раствора. Учитывая этот факт, из кривой разбавления маленькими порциями следует, что хромофорные группы молекулы ДНР в растворе с концентрацией 0,0625 г/л находятся преимущественно в виде эксимеров. Эти предположения подтверждаются результатами исследования раствора ДНР в ДМСО методом флуоресцентной спектроскопии (Varian Cary Eclipse). На рис. 5 представлены спектры флуоресцентного излучения растворов ДНР в ДМСО с разными концентрациями. При [ДМСО]=1 г/л молекула ДНР характеризуется пиком излучения при 410 нм (эксимерная форма хромофорных групп), интенсивность которого увеличивается с разбавлением раствора, что сопровождается появлением нового пика излучения при 355 нм (мономерная форма хромофорных групп).

Таким образом, УФ- и флуоресцентным спектроскопическими методами было показано, что при исследовании спектроскопических свойств ДНР важным вопросом является выяснение степени раскрытия молекулы в растворе. Этим явлением обусловлена возможность применения закона Ламберт–Бера при количественных исследованиях растворов ДНР.

Автор выражает благодарность Французскому национальному институту агроисследований (INRA) г. Реймса за предоставление некоторых химических реактивов для осуществления этой работы.

Поступила 03.10.2011

ЛИТЕРАТУРА

1. Young R.A., Rowell R.M. Cellulose. Structure, Modification and Hydrolysis. New York: Wiley-Interscience, 1986.

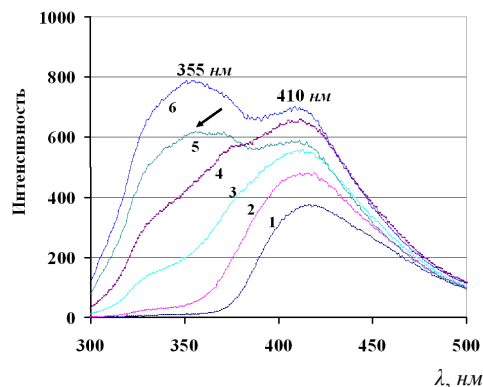


Рис. 5. Интенсивность флуоресцентного излучения раствора ДНР в ДМСО: [ДНР] = 1 (1); 0,5 (2); 0,12 (3); 0,06 (4); 0,015 (5) и 0,008 г/л (6). $\lambda=280$ нм.

2. Vanholme R., Demedts B., Morreel K., Ralph J., Boerjan W. // Plant Physiology, 2010, v. 153, p. 895–905.
3. Baumberger S., Lapierre C., Monties B. // J. Agric. Food Chem., 1998, v. 46, p. 2234–2240.
4. Elazzouzi S. // Auto-organisation de Whiskers en Suspension Dans L'eau ou Dans les Solvants Organiques Apolaires. Thèse Pour Obtenir le Grade de Docteur de l'Université Joseph Fourier: Université Joseph Fourier-Grenoble I, 2006.
5. Karhunen P., Rummakko P., Sipilä J., Brunow G. // Tetrahedron Lett., 1995, v. 36, p. 169–170.
6. <http://en.wikipedia.org/wiki/Lignin>
7. Morreel K., Dima O., Kim H., Lu F., Nicolaes C., Vanholme R., Dauwe R., Goeminne G., Inze D., Messens E., Ralph J., Boerjan W. // Plant Physiology, 2010, v. 153, p. 1464–1478.
8. Van Parijs F.R.D., Morreel K., Ralph J., Boerjan W., Merks R.M.H. // Plant Physiology, 2010, v. 153, p. 1332–1344.
9. Aguié-Béghin V., Molinari M., Hambarzumyan A., Foulon, L., Habibi Y., Heim T., Blossey R., Douillard R. // ACS Symposium Series Book: Model Cellulosic Surfaces, ACS Division of Cellulose and Renewable Material (ed. Maren Roman), 2009, v. 1019, chap. 5, p. 115–136.
10. Cathala B., Saake B., Faix O., Monties B. // Polymer Degradation and Stability, 1998, v. 59, p. 65–69.

Ա. Ժ. ՀԱՄԲԱՐԶՈՒՄՅԱՆ

ԼԻՆԻՆԻ ՍՊԵԿՏՐՈՍԿՈՊԻԱԿԱՆ ՀԱՏԿՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ
ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆ ՈՒՄ ԿԼԱՆՄԱՆ ԵՎ ՖԼՈՒՐԵՍԵՆՏ
ԱՌԱՔՄԱՆ ԵՂԱՆԱԿՆԵՐՈՎ

Ամփոփում

Ուսումնասիրվել են ԴՄՍՕ-ում Լինինի տարբեր կոնցենտրացիայով լուծույթների սպեկտրադիտական հատկությունները ՈՒՄ կլանման և Ֆլուո-րեսցենց առաքման սպեկտրոսկոպիական եղանակներով: Ցույց է տրվել, որ ԴՄՍՕ-ի փոքր քանակներով այդ լուծույթի նոսրացման դեպքում վերջինիս կլանման ինտենսիվությունն աճում է, մինչդեռ ֆլուրեսցենտ առաքման սպեկտրում առաջ է գալիս առաքման նոր գոտի:

A. J. HAMBARDZUMYAN

STUDY OF SPECTROSCOPIC PROPERTIES OF LIGNIN BY
UV AND FLUORESCENT SPECTROSCOPIC METHODS

Summary

The spectroscopic properties of lignin solution in DMSO by UV and fluorescent methods have been studied. It has been shown that during dilution of this solution with small quantity of DMSO the intensity of UV absorption increases, while in the fluorescent spectra a new emission peak appears.