

8. Бусев А.И., Киселева Л.В. 1-(2-пиридилазо)-2-нафтол как реактив для определения палладия // Вестник МГУ. – 1958. – № 4. – С. 179–186.
9. Попова Т.В., Толмачев В.Л., Аль Ансари С.В., Щеглова Н.В. Экстракционно-фотометрическое определение палладия на основе реакции комплексообразования с 1-(2-пиридилазо)-2-нафтола // Журнал аналитической химии. – 2001. – Т. 56. – № 4. – С. 412–416.
10. Гавриленко Н.А., Саранчина Н.В. Аналитические свойства 1-(2-пиридилазо)-2-нафтола, иммобилизованного в полиметакрилатную матрицу // Журнал аналитической химии. – 2009. – Т. 64. – № 3. – С. 243–247.

Поступила 13.07.2012 г.

УДК 543.5/6

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЛИПИДОВ В ПЕЛОИДАХ МЕТОДОМ ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ С ПРИМЕНЕНИЕМ ВОДНОЙ ВИБРОМАГНИТНОЙ ЭКСТРАКЦИИ

К.А. Дычко, Г.Л. Рыжова, М.А. Тюнина, В.В. Хасанов, В.А. Данекер*

Томский государственный университет

*Томский политехнический университет

E-mail: Marinda@rambler.ru

Разработан новый экологически безопасный способ водной вибромагнитной экстракции гидрофобных и гидрофильных биологически активных веществ из пелоидов различного генезиса (сапропеля и сульфидно-иловой грязи). Разработаны методики определения полярных и неполярных липидов, насыщенных и ненасыщенных жирных кислот, гуминовых кислот методами хромато-масс-спектрометрии, тонкослойной хроматографии, ИК-спектрометрии и гравиметрии. Показана интенсификация процесса водной вибромагнитной экстракции.

Ключевые слова:

Водная вибромагнитная экстракция, липиды, жирные кислоты, хромато-масс-спектрометрия, пелоиды.

Key words:

Water vibromagnetic extraction, lipids, fatty acids, gas chromatography – mass spectrometry, peloids.

Классические методы экстракции, которые применяются при процессах переработки природного органического сырья: для получения лекарственных препаратов, косметических изделий, пищевых добавок и т. д., относятся к экстенсивным технологиям [1–3]. В настоящее время появляются новые методы переработки природного сырья (интенсивные). К ним относятся механохимические [4], а также механофизические [5–9], которые позволяют перейти к созданию интенсивных, «зеленых» технологий для получения различных продуктов функционального назначения. В монографии О.И. Ломовского и В.В. Болдырева [4] дается обстоятельный обзор механохимических подходов к переработке различного растительного сырья, торфа, углей и т. д. на основе созданных механоактиваторов различного типа (мельниц планитарного типа, вибромельниц и др.). При выделении биологически активных веществ (БАВ) из биомассы природного сырья чаще всего применяется метод ультразвуковой экстракции. Данный метод является сложным в аппаратном оформлении и дорогостоящим. Поэтому создание новых достаточно простых и эффективных экстракционных аппаратов является актуальной задачей.

При экстракции в разработанном нами многофункциональном вибромагнитном реакторе (МФВМР) [10] в качестве экстрагента использует-

ся вода, что позволяет отнести данный тип экстракции к экологически безопасным. Данный способ экстракции позволяет извлекать как гидрофильные, так и гидрофобные БАВ. Продукты экстракции характеризуются сложным органическим составом, при изучении которого требуется применение современных физико-химических методов анализа.

Целью работы является интенсифицировать процесс водной экстракции липидов из пелоидов различного генезиса с точки зрения создания новых препаратов широкого спектра действия в области здравоохранения. Разработать методику определения жирных кислот методом хромато-масс-спектрометрии, которая может быть положена в основу для написания временной фармакопейной статьи на данные препараты.

Характеристика объектов исследования

Остановимся на характеристике объектов исследования сапропеля озера Карасево (Томская область) и сульфидно-иловой грязи озера Горькое-Мамонтовское (Алтайский край). Эти два пелоида отличаются по содержанию органического и минерального состава и своим физико-химическим параметрам. В табл. 1 приведены средние величины основных физико-химических показателей пелоидов. Сапропель образуется в пресном озере гумид-

ного климата, а сульфидно-иловая грязь — в соленом озере, чаще в условиях аридного климата. Продуценты в этих озерах также разные, главными продуцентами образования сапропеля являются различные водоросли, пыльца, высшие растения, остатки животной фауны и микроорганизмы. Основными продуцентами сульфидно-иловой грязи являются остатки различных растений, в том числе высших, а также остатки животной фауны, микроорганизмы и высокая минеральная составляющая. Сам пелоид состоит из трех составляющих: минеральная (песок, глина) — кристаллический остов, детрит, который представляет собой истертые частицы сырья, и, наконец, жидкий коллоидный раствор (жидкая фаза), который содержит как водорастворимые органические вещества, так и водонерастворимые.

Таблица 1. Усредненные физико-химические показатели донных отложений озер Карасевое и Горькое-Мамонтовское

Показатели	Озеро Карасевое (сапропель)	Озеро Горькое-Мамонтовское (сульфидно-иловая грязь)
Содержание органического вещества, % на а.с.с.	54,7±0,3	4,9±0,2
Влажность, %	84,1±0,3	67,2±0,2
Зольность, % на а.с.с.	35,0±0,2	74,7±0,3
pH грязевого раствора	7,2±0,2	7,7±0,2
Объемный вес, г/см ³	0,82±0,03	1,21±0,01
Оксиды, % на а.с.с.		
Железа	5,65±0,03	0,33±0,01
Фосфора	1,16±0,02	4,91±0,03
Алюминия	1,33±0,02	0,06±0,01
Серы	0,40±0,03	2,85±0,02
Азот общий, % на а.с.с.	1,95±0,02	не определено
Карбонаты, % на а.с.с.	22,1±0,2	не определено
Сульфид железа (FeS), % на сырую грязь	не определено	0,21±0,02
Органолептические показатели:		
Цвет	темно-бурый	темно-серый
Консистенция	рыхлая	мягкая
Запах	слабо-болотный	сероводородный

Экспериментальная часть

В качестве сырья использовался сапропель с влажностью 84,1±0,3 %, а сульфидно-иловая грязь — с влажностью 60,0±0,2 %. В качестве экстрагента использовалась водопроводная вода, удовлетворяющая требованиям СанПин 2.1.4.1074. Экстракция проводилась на лабораторной установке МФВМР, которая характеризуется следующими значениями параметров:

- реактор 1,5 л;
- скорость затопленных струй до 10 м/с;
- сдвиговая скорость до $15 \cdot 10^3 \text{ с}^{-1}$;
- ускорение рабочего органа до 100 g;
- перепад давления в зоне активации до 3 атм;

- частота основного воздействия 50 Гц;
- частота модуляции основного воздействия от 0,1 до 10 Гц;
- магнитная индукция в зоне активации до 1,9 Тл.

Рассмотрим, как влияют различные параметры этого устройства на интенсификацию процесса экстракции. На скорость и выход продукта экстракции влияют размеры частиц сырья, т. е. развитая поверхность, диффузионный слой на границе раздела фаз, процессы массопереноса, структура (морфология сырья) и др. Измельчение сырья до нужных размеров можно провести с помощью мельниц различного типа. На эффективность экстракции оказывают влияние не только размеры частиц сырья, но и его морфология. Уже при размерах частиц 10 мкм и меньше клеточные перегородки оказываются разрушенными, и это влияет на выход БАВ. При экстракции в МФВМР удается усилить массообмен за счет изменения скорости затопленных струй, т. е. интенсифицировать процесс перемешивания. За счет изменения сдвиговой скорости происходит истощение диффузионного слоя. Ускорение рабочего органа обеспечивает дальнейшее диспергирование сырья, что приводит к изменению морфологии клеток (разрыв клеточных перегородок).

Соотношение сырье — экстрагент 1:2; 1:3; 1:5. Экстракция проводилась в течение 10, 30, 60, 90, 120, 180, 240 мин. при температуре 25...27 °С при заданных параметрах вибромагнитного воздействия. Жидкая коллоидная фаза экстракта отделялась от твердого остатка на центрифуге ОП-8УХЛ 4.2 при 5000 об/мин. За стандартный метод экстракции липидов из природного сырья выбран метод Фолча [11]. Выделение гуминовых кислот проводилось по стандартной методике [12].

Полученные экстракты представляют собой коллоидные системы, а механизм их образования носит мицеллярный характер. Образование мицелл происходит при достижении критической концентрации мицеллообразования [13], минимальная концентрация которых может достигать 0,01...0,1 моль/л. В качестве поверхностно активных веществ в системе пелоид — вода могут выступать жирные кислоты C_{12} — C_{24} , гуминовые и фульвокислоты, а также фосфолипиды. Все эти соединения обладают одним общим признаком — амфифильностью, т. е. имеют гидрофобную и гидрофильную части. Мицеллы могут самопроизвольно сольubilизировать другие гидрофобные БАВ, например, каротиноиды, витамины и т. д. Эти образования представляют собой коллоидные частицы, размеры которых порядка 10^{-7} ... 10^{-9} м. Измерение размера коллоидных частиц в диапазоне 5...36 нм в экстракте сапропеля проводилось методом динамического рассеивания света на корреляторе «Photocor — FC».

На рисунке представлен результат измерения оптической плотности липидной фракции коллоидного экстракта в зависимости от времени вибромагнитного воздействия для соотношения сапро-

пель — вода 1:3. Для этого из аликвоты водного коллоидного экстракта липидная фракция экстрагировалась этанол-хлороформенной смесью (1:3 по объему) в равных условиях для каждого временного интервала.

Оптическая плотность измерялась на фотокориметре КФК-2-УХЛ4.2 при длине волны 440 нм и толщине кварцевой кюветы 1 см.

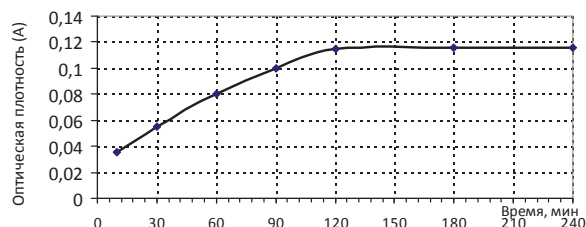


Рисунок. Зависимость изменения оптической плотности липидной фракции коллоидного экстракта сапропеля от времени вибромагнитного воздействия

В водном экстракте (соотношение сырье — вода 1:3 при 30 мин. вибромагнитного воздействия) методом гравиметрии определялся общий выход суммы экстрактивных веществ (гидрофильные и гидрофобные соединения), липидов, гуминовых кислот (табл. 2). Липиды из аликвоты водного экстракта выделяли спирто-хлороформенной смесью (1:3), втрое. Удаление экстрагента проводилось с помощью вакуумного ротационного испарителя при температуре 50 °С.

Таблица 2. Результаты гравиметрического определения экстрактивных веществ из пелоидов различного генезиса при доверительной вероятности $P=0,95$ и $n=3$

Исследуемые образцы	Выход липидов, % на а.с.с.	Выход гуминовых кислот, % на а.с.с.	Общий выход экстрактивных веществ, % на а.с.с.
Нативный сапропель	1,77±0,01	35,1±0,8	не определено
Нативная сульфидно-иловая грязь	0,63±0,01	2,22±0,02	не определено
Коллоидный экстракт сапропеля	1,19±0,02	не определено	2,60±0,01
Коллоидный экстракт сульфидно-иловой грязи	0,16±0,01	не определено	0,65±0,02

Методом тонкослойной хроматографии на пластинках «Sorbfile» идентифицированы классы липидов водного экстракта сапропеля: углеводороды, моноглицериды, диглицериды, пигменты, эфиры стерина, воска, жирные кислоты. Регистрацию ИК-спектров гуминовых кислот проводили с разрешением 4 см⁻¹ на спектрофотометре «Nicolette 3700» в интервале значений от 500 до 4000 см⁻¹. Отнесение полос осуществляли в соответствии с литературными данными.

Молекулярный состав жирных кислот пелоидов и их экстрактов определялся с помощью хромато-масс-спектрометрии на приборе Agilent. Для этого жирные кислоты переводились в метиловые эфиры.

В качестве стандарта использовались метиловые эфиры жирных кислот (МЭЖК) фирмы Sigma — Aldrich. Условия хроматографирования: колонка Ultra1 50 м, 200 °С / 3 мин / 20° мин / 290 °С / 20 мин. Диапазон масс: 30–500 *m/e*, энергия ионизации 70 эВ, режим ввода пробы: с делением потока 30:1, температура источника ионов: 250 °С, скорость потока газа-носителя 1 мл/мин.

Результаты качественного и количественного анализа исследуемых образцов представлены в табл. 3. Установлено, что наиболее представительными компонентами являются пальмитиновая, стеариновая и бегеновая кислоты. Для количественной оценки МЭЖК использовался метод эталонной добавки с использованием стандарта фирмы Sigma. Снятие спектров проводилось в режиме ион селективного мониторинга по 7 характеристическим ионам *m/e*: 74, 87, 55, 41, 79, 67, 43. В качестве внешнего стандарта для насыщенных МЭЖК использовался стандарт эфира пальмитиновой кислоты. Для ненасыщенных кислот, содержащих одну двойную связь, в качестве стандарта использовался эфир олеиновой кислоты. Считалось, что изменение числа атомов углерода жирных кислот не приводит к изменению численного значения относительных коэффициентов чувствительности, а определяется наличием и количеством двойных связей.

Из табл. 3 следует, что сумма жирных кислот в сапропеле превышает их содержание в сульфидно-иловой грязи в 2 раза, а при их выделении водной вибромагнитной экстракцией — в 3 раза.

Замена органического экстрагента на воду и интенсификация водной вибромагнитной экстракции доказана следующими экспериментальными данными. Во-первых, выход липидов, полученный с помощью вибромагнитной экстракции и методом Фолча, сопоставимы (табл. 2). Замена органических экстрагентов на альтернативный в данной системе доказывается наличием высокомолекулярных кислот как насыщенного, так и ненасыщенного ряда (табл. 3), которые используются в качестве поверхностно-активных соединений. При водной вибромагнитной экстракции кроме липидов выделяются водорастворимые БАВ. Их количество сопоставимо с содержанием липидов (табл. 2). Из водорастворимых веществ определены гуминовые и гематомелановые кислоты, содержание которых в сапропеле выше в 17 раз относительно сульфидно-иловой грязи. Сравнение количественного содержания общих липидов, карбоновых кислот, содержащихся в сапропеле и сульфидно-иловой грязи, а также содержание гуминовых кислот различно, причем большее количество этих БАВ содержится в сапропеле, чем в сульфидно-иловой грязи.

Выводы

Показано, что при вибромагнитной экстракции липидов из пелоидов различного генезиса можно использовать воду, как альтернативу органическим растворителям. Вибромагнитная экстракция отно-

Таблица 3. Содержание жирных кислот в пелоидах различного генезиса и их экстрактах при доверительной вероятности $P=0,95$ и $n=3$

Жирные кислоты	$t_{\text{уд}}, \text{ мин}$	Содержание жирных кислот, мг _{жк} /г _{а.с.с.}			
		Нативный сапропель	Коллоидный экстракт сапропеля	Нативная сульфидно-иловая грязь	Коллоидный экстракт сульфидно-иловой грязи
Каприновая C _{10:0}	3,4	0,0041±0,0003	–	–	–
Ундециловая C _{11:0}	3,7	0,0031±0,0003	–	–	–
Лауриновая C _{12:0}	3,9	0,019±0,004	0,024±0,003	0,011±0,004	0,0041±0,0004
Тридециловая C _{13:0}	5,6	0,010±0,005	0,047±0,002	–	–
Миристиновая C _{14:0}	5,7	0,050±0,002	0,013±0,004	0,033±0,002	0,014±0,004
Пентадециловая C _{15:0}	7,3	0,018±0,004	0,038±0,002	0,028±0,003	0,011±0,004
Пальмитолеиновая C _{16:1(9)}	8,9	0,011±0,005	0,012±0,005	0,014±0,003	0,013±0,003
Пальмитиновая C _{16:0}	9,5	0,300±0,020	0,077±0,001	0,054±0,006	0,016±0,002
Маргариновая C _{17:0}	12,6	0,012±0,005	0,045±0,002	–	–
Линолевая C _{18:2(9,12)}	15,2	0,0043±0,003	0,023±0,003	0,014±0,003	0,013±0,003
Олеиновая C _{18:1(9)}	15,6	0,012±0,005	0,033±0,003	0,021±0,002	0,027±0,002
Стеариновая C _{18:0}	17,1	0,130±0,040	0,069±0,001	0,11±0,02	0,041±0,003
Арахидиновая C _{20:0}	23,6	0,013±0,005	0,032±0,002	0,011±0,004	0,0091±0,0001
Бегеновая C _{22:0}	25,6	0,110±0,030	0,030±0,003	0,014±0,004	0,0032±0,0005
Лигноцериновая C _{24:0}	27,6	0,028±0,003	0,029±0,003	0,019±0,003	0,0073±0,0002
Сумма		0,720	0,470	0,330	0,159

сится к интенсивному процессу, позволяющему в одной стадии выделить как гидрофобные в мицеллярной форме, так и гидрофильные биологически активные соединения, сократить время экстракции и перейти к «зеленой» технологии. Разработанный способ водной вибромагнитной экстракции использован для получения продуктов на основе сапропеля «Паста-пелоид» и «Водный колло-

идный экстракт», применяемых в качестве косметических средств, а также для лечения кожных заболеваний и как субстанция в дополнение к классическому грязелечению. Разработанная методика определения жирных кислот методом хромато-масс-спектрометрии может использоваться для контроля качества сырья, а также при экспертизе препаратов на основе пелоидов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Саратиков А.С., Буркова В.Н., Венгеровский А.И., Кураколова Е.А. Новые гепатопротективные и противовоспалительные препараты пелоидов. – Томск: Изд-во Том. ун-та, 2004. – 178 с.
2. Цыпленков К.В. Оптимизация технологии процесса извлечения липидов из илово-сульфидной грязи // Химия в интересах устойчивого развития. – 2010. – № 18. – С. 87–94.
3. Кейтс М. Техника липидологии. Выделение, анализ и идентификация липидов. – М.: Мир, 1975. – 320 с.
4. Ломовский О.И., Болдырев В.В. Механохимия в решении экологических задач. – Новосибирск: РАН, 2006. – 228 с.
5. Водорастворимая кормовая добавка из органического сырья и способ ее получения: пат. Рос. Федерация. № 2335918; заявл. 27.03.06; опубл. 10.10.07, Бюл. № 29. – 10 с.
6. Vilku K., Mawson R., et al. Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry – A review // Innovative food science and emerging technologies. – 2008. – № 9. – P. 161–169.
7. Metherel A.H., Taha A.Y., et al. The application of ultrasound energy to increase lipid extraction throughput of solid matrix samples (flaxseed) // Prostaglandins, leukotrienes and essential fatty acids. – 2009. – № 81. – P. 417–423.
8. Молчанов Г.И. Ультразвук в фармации. – М.: Медицина, 1980. – 206 с.
9. Яцун С.Ф., Мищенко В.Я., Мищенко Е.В. Использование вибрационного воздействия в процессах массообмена // Известия высших учебных заведений. Северо-Кавказский регион. Сер. Технические науки. – 2008. – № 5. – С. 99–101.
10. Многофункциональное устройство для переработки природного органического сырья в жидкой среде: пат. Рос. Федерация. № 97363; заявл. 15.02.10; опубл. 10.09.10, Бюл. № 25. – 7 с.
11. Folch J., Lees M., Sloane Stanley G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues // Journal of Biological Chemistry. – 1957. – № 226. – P. 497–509.
12. Орлов Д.С. Практикум по биохимии гумуса. – М.: Изд-во МГУ, 1969. – 157 с.
13. Мчедлов-Петросян Н.О., Лебедь А.В., Лебедь В.И. Коллоидные поверхностно-активные вещества. – Харьков: ХНУ им. В.Н. Каразина, 2009. – 72 с.

Поступила 07.09.2012 г.