

На правах рукописи



ТЮНИНА МАРИНА АЛЕКСАНДРОВНА

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЖИРНЫХ КИСЛОТ В САПРОПЕЛЕ
МЕТОДОМ ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ
С ПРИМЕНЕНИЕМ ВОДНОЙ ВИБРОМАГНИТНОЙ ЭКСТРАКЦИИ**

02.00.02 – Аналитическая химия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Томск – 2013

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Национальный исследовательский Томский государственный университет» на кафедре органической химии

Научный руководитель: кандидат химических наук, доцент
Дычко Константин Александрович

Официальные оппоненты: **Зибарева Лариса Николаевна**, доктор химических наук, старший научный сотрудник, Сибирский ботанический сад Томского государственного университета, зав. лабораторией фитохимии

Родин Игорь Александрович, кандидат химических наук, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, кафедра аналитической химии, старший научный сотрудник

Ведущая организация: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Сибирский федеральный университет» (г. Красноярск)

Защита состоится 17 апреля 2013 г. в 14 час. 30 мин. на заседании диссертационного совета Д 212.269.04 при федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Национальный исследовательский Томский политехнический университет» по адресу: 634050, Томск, пр. Ленина, 30, корпус 2.

С диссертацией можно ознакомиться в Научно-технической библиотеке федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Национальный исследовательский Томский политехнический университет» по адресу: г. Томск, ул. Белинского, 55.

Автореферат разослан ____ марта 2013 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
канд. хим. наук, доцент

Гиндуллина
Татьяна Михайловна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Липиды, входящие в состав различных видов природного сырья, обладают биологической активностью и находят применение для создания новых водорастворимых лекарственных средств, пищевых добавок, в традиционных методах грязелечения, в косметологии. Считается, что биологическое действие липидов обусловлено наличием в их структуре свободных и связанных жирных кислот (ЖК). Традиционным методом их выделения является экстракция с применением различных органических растворителей. Наиболее часто для этих целей используют метод Фолча с применением в качестве экстрагентов спирт – хлороформных смесей. В настоящее время приоритетным является разработка новых экологически безопасных, ресурсоэффективных методов экстракции с применением воды в качестве экстрагента. Меньшая экстракционная способность воды по сравнению с органическими растворителями требует более жестких условий для эффективного извлечения целевых компонентов. В этой связи поиск оптимальных условий экстракции ЖК невозможен без разработки новых экспрессных и высокочувствительных методов их аналитического контроля. К числу таких методов относится метод хромато-масс-спектрометрии.

В качестве возобновляемого природного сырья для выделения липидов перспективно использование сапропелей. В Томской области такими запасами обладает «Санаторий «Чажемто». В нативном виде они широко применяются для курортного грязелечения как в санаториях Томской области, так и РФ, поскольку содержат широкий спектр биологически активных соединений. Однако химический состав этих сапропелей, содержащих липиды, изучен недостаточно. В значительной степени это связано с отсутствием высокочувствительных методик анализа, включающих эффективные стадии выделения целевых компонентов. Для повышения эффективности извлечения липидов из сапропелей в работе исследована возможность применения водной вибромагнитной экстракции. В этой связи разработка современных методик определения ЖК для изучения химического состава природного сырья, в том числе водных экстрактов сапропелей, является актуальным.

Работа выполнена в рамках заказа Министерства образования и науки РФ «Создание препаративных методов выделения и анализа биологически активных соединений из природных объектов и биологических жидкостей» 2008 – 2011 гг., № 01200903882; хоздоговорной работы «Создание технологии переработки сапропеля в продукт специального назначения путем вибромагнитного воздействия» № 862 по заказу ОГУЗ «Санаторий «Чажемто» (2011 г.).

Объект исследования – сапропель озера Карасёвое (Томская область «Санаторий «Чажемто»).

Предмет исследования – биологически активные липидные соединения, в том числе жирные кислоты ($C_{10:n}$ – $C_{24:n}$).

Цель работы – разработка методики определения жирных кислот в сапропеле методом хромато-масс-спектрометрии с применением водной вибромагнитной экстракции.

Для достижения поставленной цели необходимо решить следующие задачи:

1. Применить водную вибромагнитную экстракцию с целью интенсификации стадии выделения жирных кислот из сапропелей для их последующего определения методом хромато-масс-спектрометрии.

2. Определить рабочие условия (время вибромагнитного воздействия, соотношение сапропель – вода) и оценить эффективность извлечения жирных кислот из сапропелей посредством водной вибромагнитной экстракции методами гравиметрии и хромато-масс-спектрометрии.

3. Разработать методику определения жирных кислот методом хромато-масс-спектрометрии с применением стандартных образцов фирмы Sigma, включающую выбор условий хроматографического разделения кислот ненасыщенного ряда, расчет относительных коэффициентов чувствительности и оценку метрологических характеристик.

4. Применить разработанную методику для оценки содержания свободных и связанных жирных кислот в сапропеле озера Карасёвое и экстрактах на его основе.

Научная новизна работы:

1. Разработана новая методика эффективного извлечения жирных кислот из сапропелей методом водной экстракции в условиях вибромагнитного воздействия.

2. Создана методика определения жирных кислот на примере сапропеля озера Карасёвое методом хромато-масс-спектрометрии, включающая стадию пробоподготовки с применением вибромагнитной экстракции. Правильность методики доказана сопоставлением результатов анализа стандартного образца фирмы Sigma.

3. Получены новые данные о жирнокислотном составе сапропеля озера Карасёвое и экстрактов на его основе («Паста-пелоид» и «Водный коллоидный экстракт»).

Практическая значимость работы:

1. Создан и запатентован вибромагнитный экстрактор «Многофункциональное устройство для переработки природного органического сырья в жидкой среде», позволяющий эффективно и экологически безопасно выделять жирные кислоты из природных сапропелей.

2. С применением водной вибромагнитной экстракции интенсифицирована стадия пробоподготовки сапропелей и разработана методика определения жирных кислот методом хромато-масс-спектрометрии.

3. Разработанный способ водной вибромагнитной экстракции нашёл практическое применение для получения экстрактов на основе сапропеля озера Карасёвое (Томская область): «Паста-пелоид» и «Водный коллоидный экстракт». Первый экстракт предназначен в качестве косметического средства, для лечения кожных заболеваний; отмечен серебряной медалью на 5-й Биотехнологической выставке-ярмарке «РосБиоТех – 2011», г. Москва. Второй экстракт может быть использован как субстанция для получения косметических и лекарственных средств; способ получения отмечен бронзовой медалью на 23-й Международной выставке изобретений, инноваций и технологий «ИТЕХ 2012», Малайзия.

4. Разработанная методика определения жирных кислот методом хромато-масс-спектрометрии может быть положена в основу временной фармакопейной статьи при утверждении полученных экстрактов в качестве лекарственных препаратов, а также использоваться для контроля качества природного сырья и для экспертизы препаратов на основе пелоидов.

Научные положения, выносимые на защиту:

1. Методика эффективного и экологически безопасного выделения полярных органических соединений из сапропеля методом вибромагнитной экстракции с применением воды в качестве экстрагента.

2. Методика хромато-масс-спектрометрического определения насыщенных и ненасыщенных жирных кислот в сапропелях (в виде метиловых эфиров) в режиме селективного ионного мониторинга по характеристическим ионам с учетом значений коэффициентов относительной чувствительности; результаты сравнительного определения жирных кислот с использованием стандарта фирмы Sigma.

3. Результаты тестирования реальных объектов (сапропель озера Карасёвое, экстракты «Паста-пелоид» и «Водный коллоидный экстракт») на содержание свободных и связанных жирных кислот методом хромато-масс-спектрометрии с применением водной вибромагнитной экстракции.

Апробация работы. Основные положения, изложенные в работе, доложены и обсуждены на следующих научных конференциях: IV Международная конференция «Экстракция органических соединений» (2010 г., Воронеж); XV Международная экологическая конференция «Экология России и сопредельных территорий» (2010 г., Новосибирск); Всероссийская конференция с элементами научной школы «Проведение научных исследований в области синтеза, свойств и переработки высокомолекулярных соединений, а также воздействия физических полей на протекание химических реакций» (2010 г., Казань); II Международная научно-практическая конференция молодых ученых «Ресурсоэффективные технологии для будущих поколений» (2010 г., Томск); Международная научно-практическая конференция «Химия и жизнь» (2011, 2012 гг., Новосибирск); VI Всероссийская конференция молодых ученых, аспирантов и студентов с международным участием «Менделеев – 2012. Аналитическая химия» (2012 г., Санкт-Петербург); IV Всероссийская научная конференция с международным участием «Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья» (2012 г., Барнаул); Общероссийская с международным участием научная конференция «Полифункциональные химические материалы и технологии» (2012 г., Томск).

Публикации. По результатам исследований опубликовано 3 статьи в журналах из перечня ВАК, 1 патент, 14 материалов конференций и тезисов докладов.

Личный вклад. Автор принимал непосредственное участие в постановке цели и задач исследования, планировании и проведении экспериментальных работ, обработке и обсуждении результатов, формулировании выводов, написании публикаций. Автор принимал участие в создании вибромагнитного экстрактора, разработке способа водной экстракции, получении экстрактов на основе сапропеля и оформлении необходимой документации для прохождения сертификации. Автор являлся непосредственным разработчиком методики хромато-масс-спектрометрического определения жирнокислотного состава в сочетании с водной вибромагнитной экстракцией липидов из сапропеля.

Структура и объем диссертационной работы. Диссертация состоит из введения, 4 глав, выводов, 4 приложений и списка использованной литературы. Материалы диссертации изложены на 121 странице, включают 16 таблиц, 33 рисунка. Список использованной литературы включает 103 наименования.

В первой главе представлен литературный обзор по исследованию химического состава сапропелей. Рассмотрены способы выделения липидов с применением различных растворителей и различных способов экстракции. Рассмотрены возможности применения современных физико-химических методов анализа при изучении

состава жирных кислот. **Во второй главе** описан способ отбора проб сырья, реагенты, схема и принцип работы вибромагнитного экстрактора, методики эксперимента и расчетные формулы. **В третьей главе** представлены и обсуждены результаты, связанные с особенностями вибромагнитного воздействия на сапропель. Проведена оценка выхода экстрактивных веществ с применением комплекса экспрессных методов аналитического контроля (определение цветности, гравиметрии и спектрофотометрии). Методом электронной микроскопии показано, что увеличение выхода экстрактивных веществ связано с диспергированием сырья. **В четвертой главе** приведена разработанная методика определения метиловых эфиров жирных кислот методом хромато-масс-спектрометрии с применением стандартного образца фирмы Sigma. Оптимизированы условия хроматографического разделения метиловых эфиров олеиновой, линолевой и линоленовой кислот; рассчитаны коэффициенты их относительной чувствительности для проведения количественных расчетов в режиме селективного ионного мониторинга по характеристическим ионам; представлены метрологические характеристики разработанной методики. Приведены результаты анализа реальных образцов сапропеля и экстрактов, полученных с применением водной вибромагнитной экстракции.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ИНТЕНСИФИКАЦИЯ ВОДНОЙ ЭКСТРАКЦИИ С ПРИМЕНЕНИЕМ ВИБРОМАГНИТНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ

1. Выбор условий выделения экстрактивных веществ с применением водной вибромагнитной экстракции

Для интенсификации процесса извлечения липидов, включающих насыщенные и ненасыщенные жирные кислоты, использовали вибромагнитный экстрактор, принципиальная схема которого представлена на рис. 1. Экстрактор состоит из реакционной емкости, куда загружается сырье с экстрагентом, магнитной катушки и вибрирующей пластины. В зоне активации создаются следующие параметры: скорость затопленных струй до 20 м/с; сдвиговая скорость до $15 \cdot 10^3 \text{ с}^{-1}$; перепад давления в зоне активации до 3 атм; частота основного воздействия 50 Гц; частота модуляции основного воздействия до 10 Гц; магнитная индукция в зоне активации до 1,9 Тл. Совокупность данных параметров способствует интенсивному перемешиванию, снятию диффузионных затруднений, увеличению массопереноса, возникновению кавитации, диспергированию сырья, повышению экстракционной способности воды. Все эти факторы позволяют интенсифицировать процесс извлечения внутриклеточных липидных соединений.

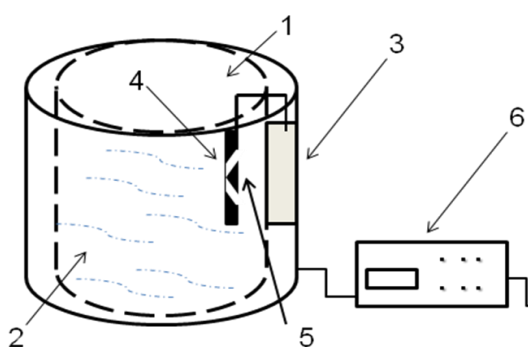


Рисунок 1 – Схема

вибромагнитного экстрактора:

- 1 – реакционная емкость
- 2 – смесь сырье – экстрагент
- 3 – магнитная катушка
- 4 – вибрирующая пластина
- 5 – зона активации
- 6 – блок управления

Совокупность данных параметров способствует интенсивному перемешиванию, снятию диффузионных затруднений, увеличению массопереноса, возникновению кавитации, диспергированию сырья, повышению экстракционной способности воды. Все эти факторы позволяют интенсифицировать процесс извлечения внутриклеточных липидных соединений.

Для выбора оптимальных условий выделе-

ния экстрактивных веществ из сапропеля озера Карасёвое с применением вибромагнитного воздействия варьировали различные соотношения сапропель – экстрагент (1:2, 1:3, 1:5) и время экстракции. Аналитический контроль выхода экстрактивных веществ осуществляли методами гравиметрии, цветометрии, спектрофотометрии.

На рис. 2 представлены зависимости выхода экстрактивных веществ при раз-

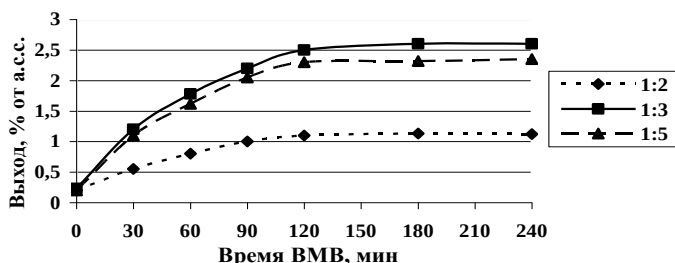


Рисунок 2 – Диаграмма сравнения выхода экстрактивных веществ от соотношения сапропель – вода при различном времени вибромагнитного воздействия методом гравиметрии

изменения интенсивности цвета водного экстракта от времени вибромагнитного воздействия. Окраску экстракта сравнивали с окраской эталонов ВУ (коричневато-желтая шкала) в соответствии с Государственной Фармакопеей РФ 2007 г. Установлено, что наибольшая интенсивность окраски экстракта также достигается за 120 мин и в дальнейшем практически не изменяется.

личных соотношениях сапропель – вода и времени экстракции, полученные методом гравиметрии. Из рисунка следует, что насыщение экстракта наблюдается при соотношении 1:3 в течение 120 мин. Дальнейшее увеличение соотношения сапропель – вода и времени экстракции практически не приводят к увеличению выхода целевого продукта. Эта закономерность подтверждена методом определения цветности.

На рис. 3 приведены результаты

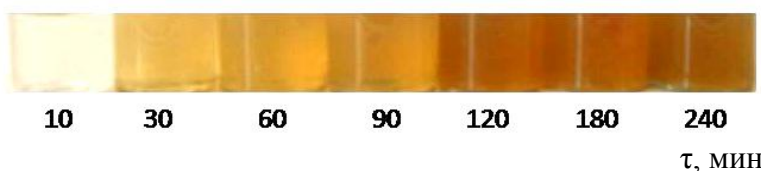


Рисунок 3 – Изменение интенсивности цвета водного экстракта от времени вибромагнитного воздействия при соотношении сапропель – вода 1:3

Дополнительно были проведены исследования по изучению динамики изменения оптической плотности хлороформных извлечений из водных экстрактов сапропеля от времени вибромагнитного воздействия. Оптическую плотность определяли методом спектрофотометрии при длине волны 440 нм, толщина кюветы 1 см.

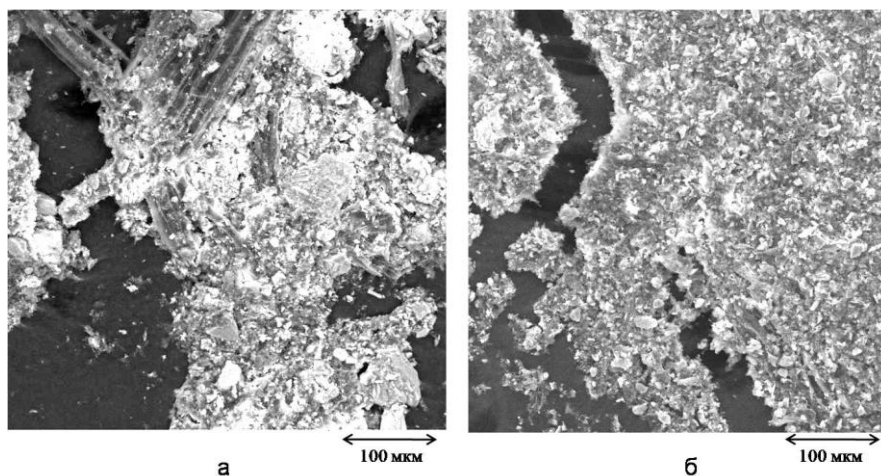


Рисунок 4 – Микроснимки нативного сапропеля (а), после водной вибромагнитной экстракции (б) при увеличении 500 мкм (зоны выбраны случайным образом), микроскоп VEGA II LMU (TESCAN)

По результатам проведенных исследований установлено, что максимальное извлечение экстрагируемых соединений наблюдается при 120 мин вибромагнитного воздействия и соотношении сапрпель – вода 1:3.

Методом электронной микроскопии изучены твёрдые остатки сапропеля до и после вибромагнитного воздействия (рис. 4). Из рис. 4а следует, что нативный сапрпель имеет включения размером от 10 мкм до 50 мкм и остатки растительных волокон. Размеры частиц сапропеля после водной вибромагнитной экстракции (рис. 4б) меньше 10 мкм. Известно, что при размерах частиц 10 мкм и меньше клеточные перегородки оказываются разрушенными, что облегчает выход экстрактивных органических веществ, включая липидные соединения.

Таким образом, вибромагнитное воздействие в водной среде обеспечивает диспергирование сырья и разрушение клеточной структуры, что способствует увеличению степени извлечения органических соединений.

2. Сравнение степени извлечения полярных органических соединений водой в условиях вибромагнитной экстракции и встряхивания

Для сравнения выхода полярных органических соединений (ПОС) использовали водные экстракты сапропеля, полученные в течение 120 мин при соотношении сырьё – вода 1:3 в условиях вибромагнитной экстракции (ВМЭ) и встряхивания. Далее проводили дополнительную экстракцию смесью спирт – хлороформ. На делительной воронке отделяли хлороформный экстракт и упаривали до постоянной массы в токе азота. Сухой экстракт в дальнейшем обозначен как липидный комплекс (ЛК). Схема выделения липидных комплексов представлена на рис. 5.

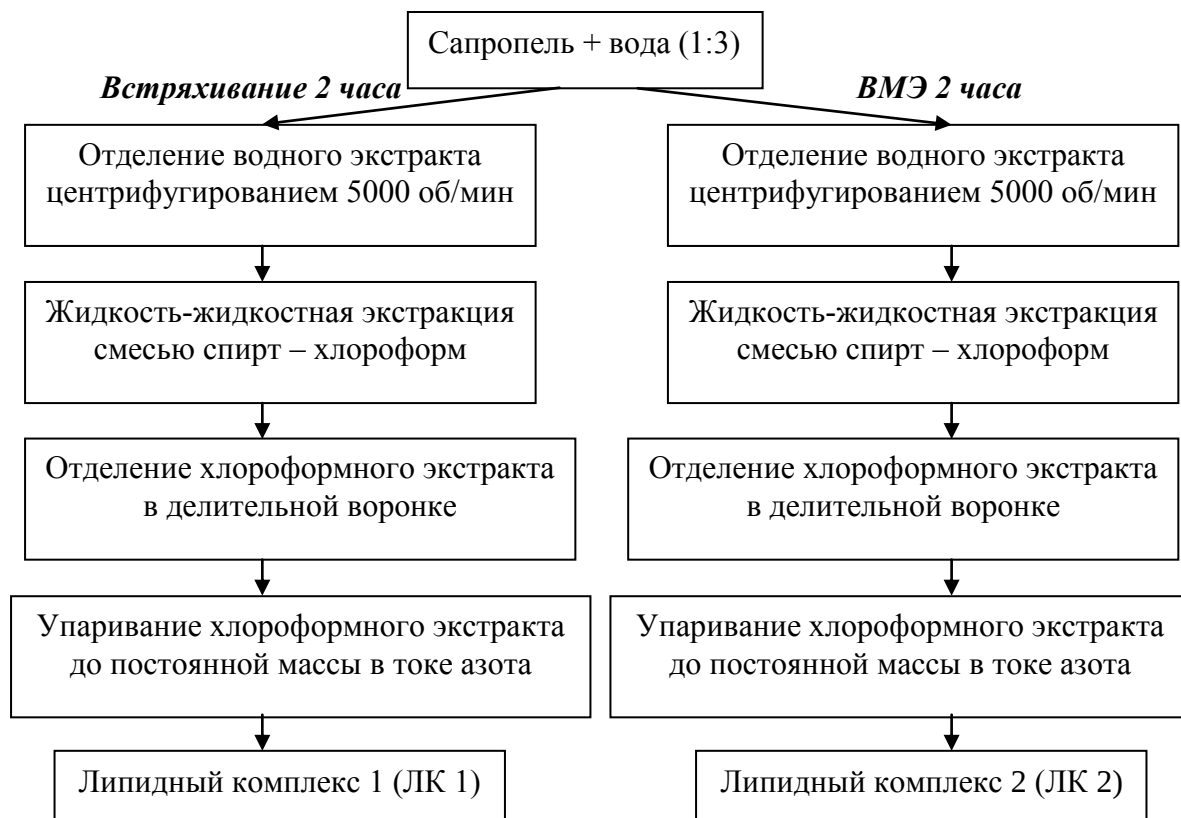


Рисунок 5 – Схема выделения липидных комплексов

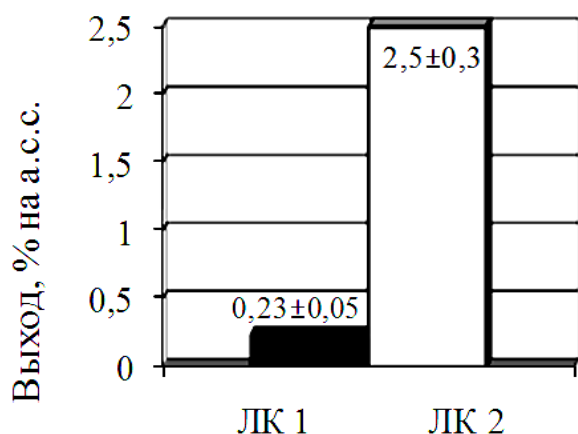


Рисунок 6 – Сравнительная диаграмма ПОС, выделенных из сапропеля водой при встряхивании (ЛК 1) и в условиях вибромагнитного воздействия (ЛК 2)

Результаты гравиметрического анализа (рис. 6) свидетельствуют о том, что степень извлечения ПОС водной вибромагнитной экстракцией увеличивается в 10 раз.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что водная вибромагнитная экстракция приводит к интенсификации экстракции полярных органических соединений из сапропеля.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СВОБОДНЫХ И СВЯЗАННЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ В САПРОПЕЛЕ МЕТОДОМ ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ (ГХ–МС)

Для создания методики определения жирных кислот в сапропелях методом ГХ–МС, включающей эффективный способ их извлечения посредством водной вибромагнитной экстракции, в работе особое внимание было уделено изучению состава свободных и связанных жирных кислот, входящих в состав липидов озера Карасёвое. Свободные жирные кислоты входят в состав веществ растительного и животного происхождения и представляют собой насыщенные и ненасыщенные кислоты, как правило, с четным числом атомов углерода. Связанные кислоты входят в состав триглицеридов, гликоглицеридов и фосфоглицеридов. Считается, что они отвечают за биологическую активность липидов, входящих в состав сапропелей. Наибольший интерес представляют ненасыщенные кислоты, так как они способны ограничивать свободно-радикальное окисление. Для выделения связанных жирных кислот проводят щелочной гидролиз липидных комплексов с дальнейшим модифицированием выделенных свободных и связанных кислот в эфиры для последующего их определения методом газовой хроматографии или хромато-масс-спектрометрии

1. Получение метиловых эфиров свободных и связанных жирных кислот (МЭЖК)

Для разработки методики анализа сапропеля методом ГХ–МС выделенные с использованием водной вибромагнитной экстракции липидные комплексы (рис. 5) были подвергнуты щелочному гидролизу с последующим переводом низколетучих свободных и связанных жирных кислот в более летучие аналитические формы – метиловые эфиры. Схема получения метиловых эфиров соответствующих жирных кислот приведена на рис. 7.

К сухому остатку липидного комплекса добавляли 10 мл 70 % этанола и КОН до $\text{pH}=10-12$. Смесь оставляли на 3 суток при периодическом перемешивании (методика холодного омыления). Неомыляемую фракцию липидов трижды экстрагировали смесью диэтиловый эфир – гексан (1:4 по объему) и отделяли на делительной воронке от омыляемой фракции. Далее к омыляемой фракции добавляли концентри-

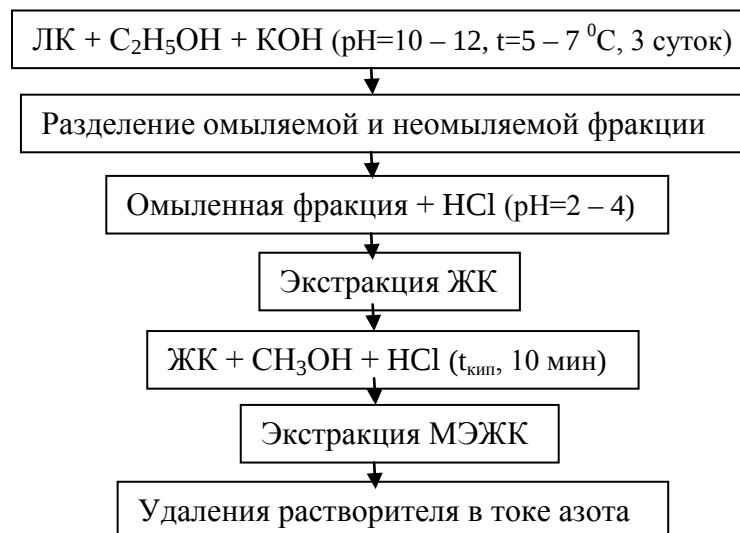


Рисунок 7 – Схема получения метиловых эфиров жирных кислот

рованную соляную кислоту до pH=2 – 3 для перевода калиевых солей карбоновых кислот в кислоты, после чего смесь выделенных жирных кислот трижды экстрагировали той же смесью. Растворитель удаляли в токе азота. Перевод жирных кислот в метиловые эфиры осуществляли с помощью реакции этерификации (метилование) в условиях кислой среды по ГОСТ Р 51486-99. Полученные МЭЖК трижды экстрагировали 10 мл смеси диэтиловый эфир – гексан (1:4 по объему). После удаления растворителя в токе азота при комнатной температуре сухой остаток МЭЖК взвешивали и растворяли в 1 мл хлороформа. Полученный хлороформный экстракт подвергали анализу методом хромато-масс-спектрометрии.

2. Выбор условий хроматографического разделения метиловых эфиров жирных кислот. Определение их количественного содержания в режиме ГХ–МС

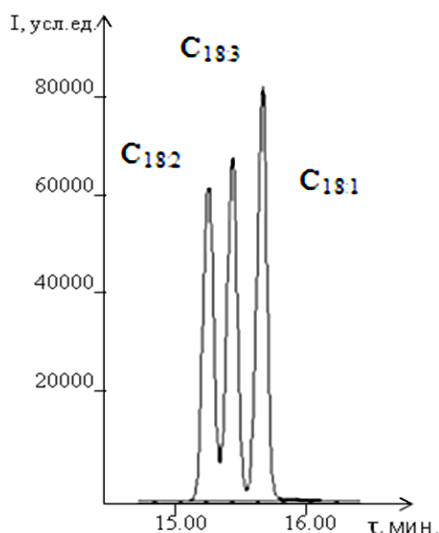


Рисунок 8 – Фрагмент хроматограммы в режиме ПИТ МЭ ненасыщенных ЖК стандарта Sigma

При определении метиловых эфиров (МЭ) жирных кислот в первую очередь возникают затруднения хроматографического разделения эфиров жирных кислот, содержащих одну, две и три двойные связи при их совместном присутствии. Предварительный анализ липидных комплексов показал присутствие в анализируемых образцах МЭ линолевой, линоленовой и олеиновой кислот. Оптимизация условий хроматографического разделения МЭ олеиновой, линолевой и линоленовой кислот было проведено с использованием стандартного образца фирмы Sigma. Стандартный образец содержал в своем составе 1 мг сухой смеси метиловых эфиров пальмитиновой, олеиновой, линолевой, линоленовой, стеариновой кислот в

равных концентрациях с чистотой 99,2 %, 99,9 %, 99,3 %, 99,7 % и 99,7 %, соответственно.

На рис. 8 представлен фрагмент хроматограммы по полному ионному току (ПИТ) МЭ ненасыщенных жирных кислот стандартного образца фирмы Sigma. Для

разделения использовали 50 м капиллярную колонку Ultra 1 (США) с нанесенной неподвижной фазой 100 % диметилполисилоксан. Режим программирования температуры: 200 °С / 3 min / 20 ° min / 290 °С / 20 min, температура испарителя 250 °С, температура интерфейсной линии 250 °С, ввод пробы 1 мкл с помощью автосемплера с делением потока 1:30, скорость потока газа-носителя (He) 1 мл/мин, энергия ионизации 70 эВ, температура ионного источника 250 °С.

Данные условия использовали для анализа реальных объектов.

3. Разработка методики определения жирных кислот в водных экстрактах сапропеля в виде метиловых эфиров

Качественный анализ водных экстрактов на содержание ЖК липидных комплексов в форме МЭЖК проводили путем анализа хроматограмм, полученных в режиме ПИТ в диапазоне сканирования масс от 30 до 500 m/e.

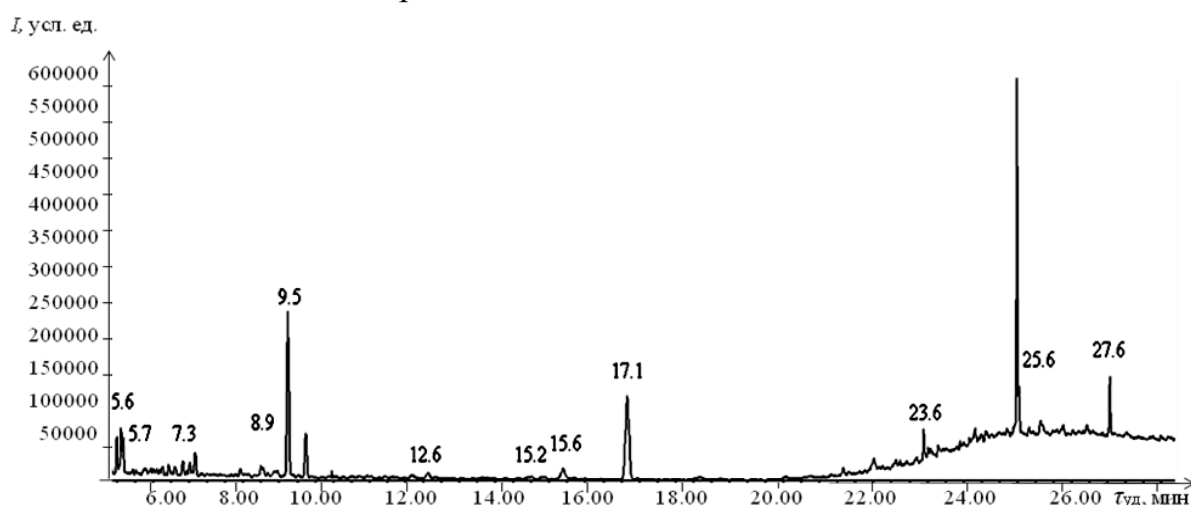


Рисунок 9 – Хроматограмма в режиме ПИТ МЭЖК водного экстракта сапропеля, полученного вибромагнитной экстракцией

На рис. 9 изображена типичная хроматограмма МЭЖК экстракта сапропеля, полученного водной вибромагнитной экстракцией. Качественный анализ проводили путем сравнения полученных масс-спектров с библиотекой спектров фирмы NIST и дополнительного сравнения масс-спектров четырех МЭЖК стандарта фирмы Sigma с масс-спектрами реальных образцов. Вероятность совпадения сравниваемых масс-спектров для МЭ насыщенных кислот составляет 99,9 %, ненасыщенных – 87 – 96 %. Надежность идентификации дополнительно доказывали совпадением времен удерживания четырех исследуемых соединений с временами удерживания МЭЖК стандартного образца. Дополнительно сопоставляли последовательность выхода метиловых эфиров путем сравнения индексов удерживания Ковача, взятых из библиотеки фирмы NIST.

Мажорными компонентами для всех полученных липидных комплексов являются МЭ пальмитиновой и стеариновой кислот. Установлено различие в качественном составе липидных комплексов, выделенных разными методами (табл. 4). В водном экстракте, полученном методом встряхивания (ЛК 1) идентифицировано 5 МЭЖК, а именно МЭ лауриновой, миристиновой, пальмитиновой, олеиновой и стеариновой кислот. Водный экстракт, полученный с применением вибромагнитного воздействия (ЛК 2), наряду с вышеперечисленными МЭ содержит дополнительно

8 МЭ жирных кислот. Наибольший интерес из обнаруженных жирных кислот представляют кислоты ненасыщенного ряда, которые трудно синтезируются в организме ($C_{16:1}$, $C_{18:1}$) или являются незаменимыми ($C_{18:2}$). Пальмитолеиновая кислота способствует регенерации кожного покрова; олеиновая кислота восстанавливает барьерные функции эпидермиса, удерживает влагу в коже, проявляет антиоксидантные свойства; линолевая кислота оказывает противовоспалительное действие, снижает уровень холестерина в крови, нормализует водный баланс кожи. Поэтому лечебные свойства экстрактов, полученных на основе сапропеля, зависят от наличия и содержания в них данных кислот. Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что вибромагнитное воздействие существенно изменяет качественный состав водного экстракта, увеличивая количество выделяемых жирных кислот от 5 до 13.

Определение МЭЖК проведено в режиме селективного ионного мониторинга (СИМ) по характеристическим пикам ионов, представленных в табл. 1. Режим СИМ по сравнению с режимом ПИТ позволяет существенно повысить чувствительность метода, снизить соотношение сигнал/шум.

Таблица 1 – Характеристические ионы МЭЖК стандарта Sigma

МЭЖК стандарта	Характеристические пики ионов, m/e, (интенсивность)
МЭ пальмитиновой кислоты $C_{16:0}$	74 (99,9%)
МЭ стеариновой кислоты $C_{18:0}$	74 (99,9%)
МЭ олеиновой кислоты $C_{18:1}$	55 (99,9%)
МЭ линолевой кислоты $C_{18:2}$	67 (99,9%)
МЭ линоленовой кислоты $C_{18:3}$	79 (99,9%)

Таблица 2 – Временные интервалы переключения на выбранные характеристические пики при записи хроматограмм в режиме СИМ

Временной интервал, мин, ($C_{N:M}$)	Характеристические ионы, m/e
3,0 – 8,0 ($C_{12-15:0}$)	74
8,0 – 9,3 ($C_{16:1}$)	55
9,3 – 15,0 ($C_{16,17:0}$)	74
15,0 – 15,3 ($C_{18:2}$)	67
15,3 – 15,6 ($C_{18:3}$)	79
15,6 – 16,0 ($C_{18:1}$)	55
16,0 – 30,0 ($C_{18-24:0}$)	74

Определив времена удерживания МЭ, была разработана программа для их определения в ходе одного эксперимента посредством переключения в процессе записи хроматограммы выбранных характеристических пиков в семи временных интервалах (табл. 2).

На рис. 10 представлена хроматограмма МЭЖК водного экстракта сапропеля, полученного вибромагнитной экстракцией, записанная в режиме СИМ.

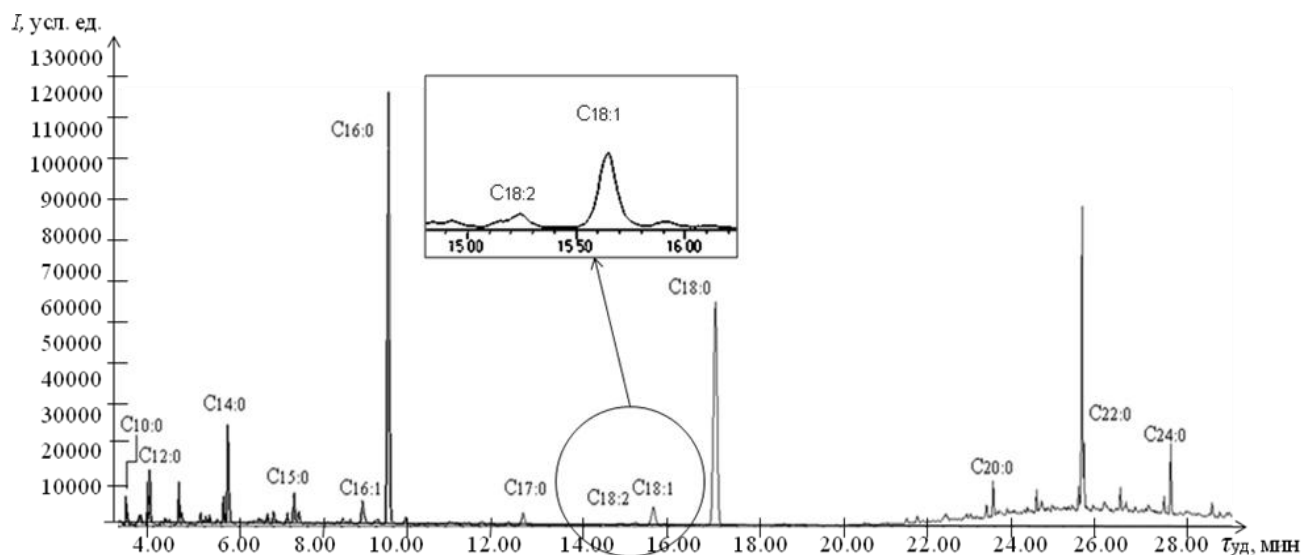


Рисунок 10 – Хроматограмма в режиме СИМ МЭЖК водного экстракта сапропеля, полученного вибромагнитной экстракцией

Количественные расчеты МЭЖК проведены с использованием метода эталонной добавки. К 400 мкл исследуемого образца добавляли 200 мкл 0,01 мг/мл стандарта, который содержит МЭ пальмитиновой, олеиновой, линолевой, линоленовой, стеариновой кислот. Площадь пика без стандарта принималась за S_1 , которая соответствует C_x . Площадь пика со стандартом принималась за S_2 , которая соответствует $2/3C_x + 1/3C_{st}$. Тогда, концентрацию определяемого соединения вычисляли по формуле:

$$C_x = \frac{C_{st} \cdot S_1}{|2S_1 - 3S_2|}$$

Расчет концентраций МЭ жирных кислот при отсутствии стандартного образца проводили методом внутреннего стандарта. Так, для насыщенных МЭЖК использовали стандарт эфира пальмитиновой кислоты. Для ненасыщенных МЭЖК, содержащих одну двойную связь, в качестве стандарта использовали эфир олеиновой кислоты.

На рис. 11 приведена хроматограмма стандартного образца фирмы Sigma, содержащего пять МЭЖК, записанная в режиме СИМ. Площади хроматографических пиков соответствующих образцов в концентрациях 0,02 мг/мл представлены в табл. 3.

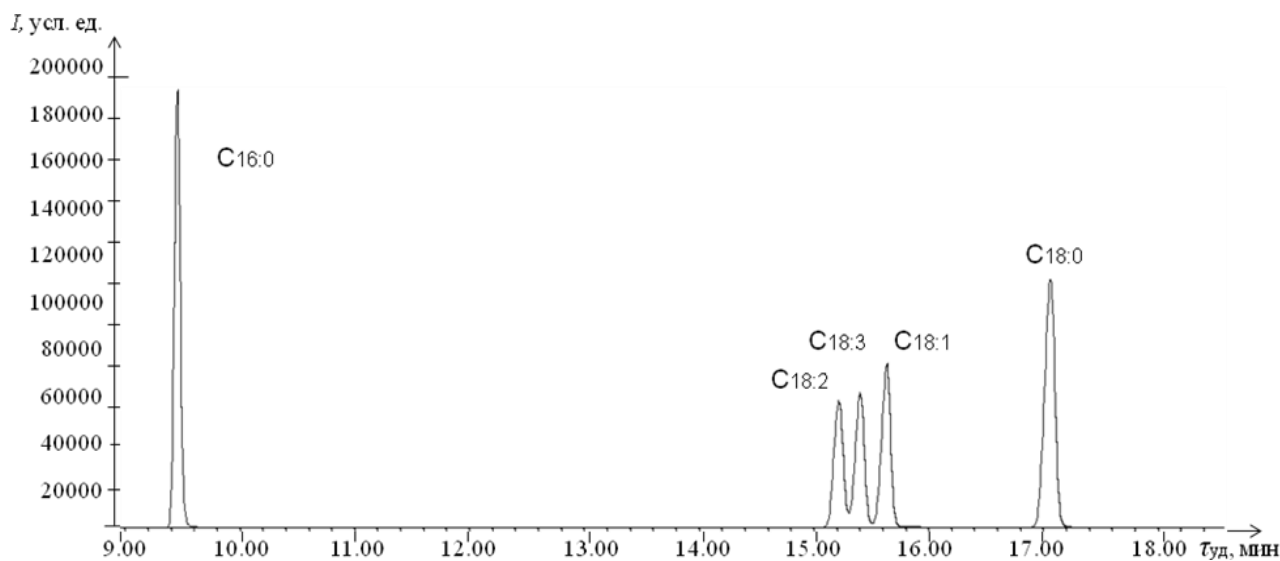


Рисунок 11 – Хроматограмма МЭЖК стандарта Sigma в режиме СИМ

Из табл. 3 следует, что площади пиков метиловых эфиров насыщенных кислот (пальмитиновой и стеариновой) примерно одинаковы. Площади пиков МЭ олеиновой, линолевой и линоленовой кислот в два раза меньше по сравнению с площадями пиков МЭ пальмитиновой и стеариновой кислот.

Таблица 3 – Изменение значений площадей пиков при равных концентрациях МЭЖК стандарта Sigma в зависимости от насыщенности кислоты

МЭЖК	t _{уд.} , мин	Характеристические ионы	Площадь пика	C, мг/мл	k _S
Пальмитиновая C _{16:0}	9,5	74	7633269	0,02	1,0
Линолевая C _{18:2}	15,2	67	3449361	0,02	2,1
Линоленовая C _{18:3}	15,4	79	3620715	0,02	2,1
Олеиновая C _{18:1}	15,7	55	4208627	0,02	1,8
Стеариновая C _{18:0}	17,1	74	7448074	0,02	1,0

Это свидетельствует о существенном различии в сечениях ионизации данных соединений, которое необходимо учитывать при проведении количественных расчетов путем введения значений относительных коэффициентов чувствительности. Для МЭ стеариновой и пальмитиновой кислот коэффициент относительной чувствительности k_S принимали за единицу (k_S=1,0), тогда k_S для МЭ олеиновой, линолевой и линоленовой кислот рассчитывали по формуле:

$$k_{Sx} = \frac{S_x \cdot k_{S(\text{Стеарк-ма})}}{S_{(\text{Стеарк-ма})}}.$$

При отсутствии стандартов МЭ других кислот сделано предположение, что с изменением числа атомов углерода относительные коэффициенты чувствительности изменяются незначительно, а значительно изменяются от степени ненасыщенности кислоты. Рассчитанные коэффициенты использовали при количественной оценке МЭЖК, что позволило значительно снизить систематическую погрешность количественных расчетов и использовать их в дальнейшем при ограниченном выборе стандартных образцов. Результаты хромато-масс-спектрометрического определения исследуемых МЭЖК приведены в табл. 4.

Таблица 4 – Результаты хромато-масс-спектрометрического определения жирных кислот, выделенных водой методом встряхивания (ЛК 1) и методом вибромагнитной экстракции (ЛК 2), (P=0,95 и n=3)

t _{уд.} , мин	МЭЖК	Содержание МЭЖК, мкг/мл	
		ЛК 1	ЛК 2
3,9	Лауриновая C _{12:0}	0,22±0,05	4,00±0,03
5,6	Тридециловая C _{13:0}	-	1,89±0,03
5,7	Миристиновая C _{14:0}	0,29±0,05	6,01±0,02
7,3	Пентадециловая C _{15:0}	-	3,67±0,02
8,9	Пальмитолеиновая C _{16:1}	-	2,12±0,05
9,5	Пальмитиновая C _{16:0}	0,77±0,04	12,6±0,4
12,6	Маргариновая C _{17:0}	-	1,17±0,02
15,2	Линолевая C _{18:2}	-	1,08±0,03
15,7	Олеиновая C _{18:1}	0,12±0,05	1,40±0,03
17,1	Стеариновая C _{18:0}	0,49±0,03	12,6±0,4
23,6	Арахидиновая C _{20:0}	-	1,38±0,02
25,6	Бегеновая C _{22:0}	-	10,9±0,03
27,6	Лигноцериновая C _{24:0}	-	3,02±0,03
Сумма МЭЖК		1,89	61,8

В результате проведенных расчетов установлено, что в процессе вибромагнитного воздействия степень извлечения лауриновой, миристиновой, пальмитиновой и олеиновой кислот увеличилось в 12 – 21 раз, стеариновой – в 26 раз. Суммарное содержание жирных кислот водного экстракта, полученного вибромагнитным воздействием, в 30 раз выше, чем в водном экстракте, полученном методом встряхивания.

Метрологическая оценка методики определения ЖК методом ГХ–МС

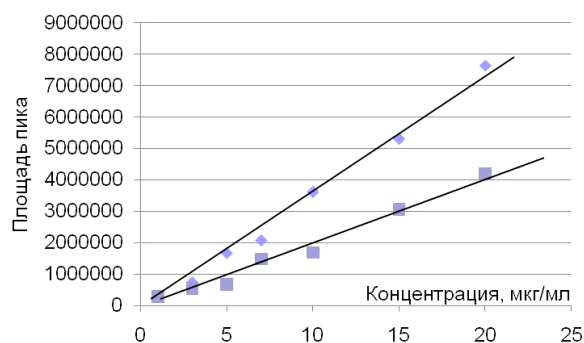


Рисунок 12 – Градуировочные графики МЭ пальмитиновой (верхняя) и олеиновой (нижняя) кислот

Метрологическую оценку разработанной методики проводили с использованием стандартного образца фирмы Sigma. При определении жирнокислотного состава методом ГХ–МС установлена линейная зависимость концентрации МЭЖК стандарта от площади хроматографического пика, которая сохраняется в диапазоне 1 – 20 мкг/мл (рис. 12).

Предел обнаружения насыщенных и ненасыщенных ЖК составляет 0,01 и 0,03 мкг/мл соответственно. Нижняя граница определяемых концентраций насыщенных и ненасыщенных ЖК составляет 0,05 и 0,10 мкг/мл соответственно. Проведена оценка правильности разработанной методики методом анализа стандартного образца на содержание ЖК и сравнения полученных результатов по t-критерию (табл. 5). Отсутствие систематической погрешности ($t^* < t_{p,f}$) доказывает её правильность.

Таблица 5 – Оценка правильности результатов ($P=0,95$ и $n=5$) по t-критерию

ЖК стандарта Sigma	μ , мкг/мл	X_{cp} , мкг/мл	t^*	$t_{p,f}$
Пальмитиновая $C_{16:0}$	1,0	1,2	2,5	2,8
	10,0	10,1	2,3	
	20,0	19,9	2,3	
Линолевая $C_{18:2}$	1,0	1,1	2,4	
	10,0	10,1	2,3	
	20,0	20,2	2,5	
Линоленовая $C_{18:3}$	1,0	1,2	2,4	
	10,0	10,1	2,2	
	20,0	20,1	2,3	
Олеиновая $C_{18:1}$	1,0	1,1	2,2	
	10,0	10,1	2,5	
	20,0	20,1	2,5	
Стеариновая $C_{18:0}$	1,0	1,2	2,5	
	10,0	10,1	2,3	
	20,0	20,0	2,4	

где $t^* = \frac{|X_{cp} - \mu| \cdot \sqrt{n}}{S_{xi}}$

Также проведена оценка межлабораторной прецизионности результатов определения ЖК в липидных комплексах сапропеля, выделенных разными способами.

Для этого были сопоставлены результаты анализа сапропеля, полученные на кафедре органической химии ТГУ и в лаборатории ЭКЦ УМВД г. Томска (Протокол № 1318-а от 09.10.2012 г.). Результаты определения согласуются в пределах погрешности.

4. Результаты тестирования методики определения жирных кислот методом ГХ–МС с применением водной вибромагнитной экстракции на реальных объектах

Разработанная методика была применена для определения ЖК в сапропеле озера Карасёвое и продуктах, полученных на его основе: «Паста-пелоид» и «Водный коллоидный экстракт». Для получения образца «Паста-пелоид» нативный сапропель обрабатывали в реакторе вибромагнитного типа при соотношении сапропель – вода (2:1) в течение 30 мин при 22 °С. Продукт представляет собой высококонцентрированную суспензию пастообразной консистенции. Продукт «Водный коллоидный экстракт» получен в аналогичных условиях при соотношении сапропель – вода (1:3). Коллоидный экстракт был отделён от твердой части на центрифуге ОП-8УХЛ4.2 при 5000 об/мин в течение 7 – 10 мин. Полученный коллоидный экстракт представляет собой опалесцирующую субстанцию желтого цвета. Результаты анализа исследуемых объектов представлены в табл. 6.

Таблица 6 – Результаты определения ЖК исследуемых образцов

ЖК	Содержание ЖК, % на а.с.с.		
	Нативный сапропель	«Паста-пелоид»	«Водный коллоидный экстракт»
Каприновая C _{10:0}	0,00041±0,00003	0,0023±0,0003	-
Ундециловая C _{11:0}	0,00031±0,00003	0,0021±0,0003	-
Лауриновая C _{12:0}	0,0019±0,0004	0,0161±0,0004	0,0041±0,0003
Тридециловая C _{13:0}	0,0010±0,0005	0,0102±0,0005	0,0017±0,0003
Миристиновая C _{14:0}	0,0050±0,0002	0,043±0,001	0,0062±0,0002
Пентадециловая C _{15:0}	0,0018±0,0004	0,0082±0,0001	0,0038±0,0002
Пальмитолеиновая C _{16:1}	0,0011±0,0005	0,0035±0,0002	0,0022±0,0005
Пальмитиновая C _{16:0}	0,030±0,002	0,141±0,005	0,013±0,004
Маргариновая C _{17:0}	0,0012±0,0005	0,0088±0,0001	0,0045±0,0002
Линолевая C _{18:2}	0,00043±0,0003	0,0024±0,0003	0,0023±0,0003
Олеиновая C _{18:1}	0,0012±0,0005	0,0049±0,0002	0,0033±0,0003
Стеариновая C _{18:0}	0,013±0,004	0,032±0,001	0,012±0,004
Арахидиновая C _{20:0}	0,0013±0,0005	0,014±0,002	0,0032±0,0002
Бегеновая C _{22:0}	0,011±0,003	0,020±0,002	0,015±0,003
Лигноцериновая C _{24:0}	0,0028±0,0003	0,031±0,001	0,0029±0,0003
Сумма ЖК	0,073	0,34	0,074

Из табл. 6 видно, что результаты определения ЖК в нативном сапропеле, сопоставимы с их содержанием в продукте «Водный коллоидный экстракт», полученном в условиях вибромагнитного воздействия. «Паста-пелоид» содержит ЖК в 5 раз больше по сравнению с нативным сапропелем. Это свидетельствует о значительной

интенсификации стадии выделения ЖК из объектов природного происхождения в процессе пробоподготовки и способствует повышению чувствительности их определения.

Полученные из сапропеля продукты прошли экспертизу федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по Томской области № 70.ТС.10.000.Т.000707.07.09 от 02.07.2009 г., получено положительное санитарно-эпидемиологическое заключение № 70.ТС.10.915.П.000762.07.09 от 09.07.2009 г. Проведены физико-химические, микробиологические, токсикологические, клинико-лабораторные испытания в НИИ гигиены Роспотребнадзора г. Новосибирска, протокол № 120405 от 15.07.2012 г. Проведены клинические испытания полученных экстрактов в условиях ОГУЗ «Санаторий «Чажемто» (Томская область), ГАО КО «Санаторий «Борисовский» (Кемеровская область). Показана высокая терапевтическая активность продуктов «Паста-пелоид» и «Водный коллоидный экстракт» по сравнению с нативным сапропелем.

ВЫВОДЫ

1. Разработана новая экологически безопасная методика выделения жирных кислот из природного сырья (сапропеля) с применением вибромагнитного воздействия и воды в качестве экстрагента. Оптимизированы условия экстракции: соотношение сапропель – вода 1:3, время вибромагнитного воздействия – 120 минут.

2. Методом сканирующей электронной микроскопии показано, что интенсификация стадии экстракции жирных кислот из сапропелей в условиях вибромагнитного воздействия связано со значительным диспергированием исходного сырья. Кроме того, методом хромато-масс-спектрометрии показано увеличение количества экстрагируемых из сапропеля жирных кислот (от 5 до 13) с одновременным увеличением их суммарного содержания в 30 раз.

3. Разработана методика определения жирных кислот в сапропелях методом хромато-масс-спектрометрии: выбраны условия хроматографического разделения метиловых эфиров насыщенных и ненасыщенных жирных кислот; рассчитаны относительные коэффициенты чувствительности для метиловых эфиров стеариновой, олеиновой, линолевой и линоленовой кислот. Нижняя граница определяемых концентраций насыщенных и ненасыщенных ЖК составляет 0,05 и 0,1 мкг/мл соответственно, предел обнаружения насыщенных ЖК – 0,01 мкг/мл, ненасыщенных ЖК – 0,03 мкг/мл. Проведена оценка правильности методики с применением стандартного образца фирмы Sigma.

4. Методика определения жирных кислот методом хромато-масс-спектрометрии с применением водной вибромагнитной экстракции протестирована при анализе сапропеля озера Карасёвое и экстрактов на его основе. Проведена идентификация ЖК и оценка их количественного содержания в режиме селективного ионного мониторинга по характеристическим пикам с применением эталонного образца фирмы Sigma. Правильность результатов анализа доказана межлабораторной прецизионностью: полученные данные в пределах погрешности согласуются с результатами анализа лаборатории ЭКЦ УМВД г. Томска.

5. Разработанный метод вибромагнитной экстракции может быть применён в процессе пробоподготовки для интенсификации извлечения различных классов ор-

ганических соединений для их последующего определения с использованием различных экстрагентов.

6. Метод водной вибромагнитной экстракции липидных соединений применен для получения продуктов «Паста-пелоид» и «Водный коллоидный экстракт» из сапропеля озера Карасёвое, предназначенных для косметологии и бальнеологии. Методика определения жирных кислот методом ГХ–МС может быть положена в основу временной фармакопейной статьи на получаемые препараты.

ОСНОВНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ ДИССЕРТАЦИИ ОПУБЛИКОВАНЫ В СЛЕДУЮЩИХ РАБОТАХ:

1. Дычко К. А. Влияние вибромагнитного воздействия на выход и состав гидрофильных и липофильных биологически активных веществ из сапропеля / К. А. Дычко, М. А. Тюнина, Г. Л. Рыжова // Химия растительного сырья. – 2012. – № 2. – С. 155 – 163.

2. Дычко К. А. Водная вибромагнитная экстракция гидрофильных и гидрофобных биологически активных веществ из пелоидов различного генезиса / К. А. Дычко, Г. Л. Рыжова, М. А. Тюнина, В. В. Хасанов, В. А. Данекер // Журнал прикладной химии. – 2012. – Т. 85, № 9. – С. 1408 – 1416.

3. Дычко К. А. 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 // Известия Томского политехнического университета. – 2012. – Т. 321, № 3. – С. 100 – 103.

4. Многофункциональное устройство для переработки природного органического сырья в жидкой среде : патент 97363 Рос. Федерация / К. А. Дычко, Г. Л. Рыжова, В. А. Данекер, С. В. Рикконен, В. Н. Воронин, М. А. Тюнина ; патентообладатель Томский гос. ун-т. – № 2010105323/22 ; заявл. 15.02.2010 ; опубл. 10.09.2010, Бюл. № 25. – 2 с. : ил.

5. Дычко К. А. Ультрадисперсные технологии глубокой переработки сапропеля и анализ липидной составляющей / К. А. Дычко, Г. Л. Рыжова, М. А. Тюнина // Инструментальные методы для исследования живых систем в пищевых производствах : материалы Всерос. конф. с элементами науч. школы, 9 – 12 нояб. 2009 г. – Кемерово, 2009. – С. 60 – 63.

6. Тюнина М. А. Механо-физическая технология переработки сапропеля озера Карасёвое и получение продукта специального назначения / М. А. Тюнина, Г. Л. Рыжова, К. А. Дычко // Молодежная научная конференция Томского государственного университета, 2009 г. – Томск : Изд-во Том. ун-та, 2010. – Вып. 2 : Проблемы естествознания. – С. 151 – 153. – (Труды Томского государственного университета. Т. 273 : Серия общенаучная).

7. Рыжова Г. Л. Нано- и субмолекулярные технологии экстракции липидов из сапропелей / Г. Л. Рыжова, М. А. Тюнина, К. А. Дычко // Экстракция органических соединений (ЭОС-2010) : IV Международная конференция, 20-24 сент. 2010 г., Воронеж : каталог докл. – Воронеж, 2010. – С. 75.

8. Тюнина М. А. Передовые технологии переработки природных ресурсов / М. А. Тюнина, К. А. Дычко // Экология России и сопредельных территорий : материалы XV междунар. экол. студ. конф. – Новосибирск, 2010. – С. 229.

9. Тюнина М. А. Рациональное использование и глубокая переработка озерных сапропелей / М. А. Тюнина, К. А. Дычко // Природные ресурсы в XXI веке: экономика, управление и инновации : сб. тр. Междунар. науч.-практ. конф., 28 – 29 октября 2010 г., г. Томск. – Томск, 2010. – С. 54 – 59.

10. Рыжова Г. Л. Гидролиз липидов при механо-физическом воздействии на сапропели / Г. Л. Рыжова, М. А. Тюнина, К. А. Дычко, В. А. Данекер // Проведение научных исследований в области синтеза, свойств и переработки высокомолекулярных соединений, а также воздействия физических полей на протекание химических реакций : сб. материалов Всерос. конф. с элементами науч. шк. для молодежи. – Казань, 2010. – С. 17.

11. Тюнина М. А. Ресурсоэффективная вибро-магнитная технология переработки сапропелей в водной среде / М. А. Тюнина, Г. Л. Рыжова, К. А. Дычко // Ресурсоэффективные технологии для будущих поколений : сб. тр. II Междунар. науч.-практ. конф. молодых ученых, 23 – 25 ноября 2010 г. – Томск, 2010. – С. 63 – 64.

12. Тюнина М. А. Выделение и анализ липидов из сапропеля с помощью вибро-магнитного воздействия / М. А. Тюнина, К. А. Дычко // Химия и жизнь : аналитическая химия : сб. тез. и докл. Междунар. науч.-практ. конф. – Новосибирск, 2011. – С. 346 – 348.

13. Тюнина М. А. Водная вибро-магнитная экстракция жирных кислот из сапропеля / М. А. Тюнина // Менделеев – 2012 : аналитическая химия : Шестая Всерос. конф. молодых учёных, аспирантов и студентов с междунар. участием : тез. докл. – СПб., 2012. – С. 288 – 289.

14. Тюнина М. А. Влияние вибро-магнитного воздействия на количественное содержание жирных кислот в сапропеле / М. А. Тюнина, К. А. Дычко // Химия и жизнь : аналитическая химия : сб. тез. и докл. Междунар. науч.-практ. конф. – Новосибирск, 2012. – С. 328 – 331.

15. Дычко К. А. Водная вибро-магнитная экстракция гидрофобных и гидрофильных биологически активных соединений из пелоидов различного генезиса / К. А. Дычко, Г. Л. Рыжова, М. А. Тюнина, В. А. Коршиков // Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья : материалы V Всерос. конф., 24–26 апр. 2012 г. – Барнаул, 2012. – С. 515 – 517.

16. Тюнина М. А. Применение вибро-магнитного воздействия для получения продукта «Паста-пелоид» из сапропеля / М. А. Тюнина, Г. Л. Рыжова, К. А. Дычко // Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья : материалы V Всерос. конф. 24–26 апр. 2012 г. – Барнаул, 2012. – С. 517 – 519.

17. Рыжова Г. Л. Зеленая химия и переработка возобновляемой биомассы пелоидов различного генеза в продукты функционального назначения / Г. Л. Рыжова, М. А. Тюнина, К. А. Дычко, В. В. Хасанов, В. А. Данекер // Полифункциональные химические материалы и технологии : сб. ст. – Томск, 2012. – С. 200 – 204.

18. Тюнина М. А. Продукты вибро-магнитной переработки сапропеля повышенной биологической активности / М. А. Тюнина, Г. Л. Рыжова, К. А. Дычко // Полифункциональные химические материалы и технологии : сб. ст. – Томск, 2012. – С. 288 – 289.

Подписано в печать 12.03.2013 г.
Формат А4/2. Ризография
Печ. л. 1,0. Тираж 100 экз. Заказ № 05/03-13
Отпечатано в ООО «Позитив-НБ»
634050 г. Томск, пр. Ленина 34а