



Определение капсаициноидов и ионола в перцовых пластырях методом микроколоночной ВЭЖХ

Рудаков О.Б., Хорохордина Е.А., Фан Винь Тхинь

Воронежский государственный архитектурно-строительный университет, Воронеж

Подолова Е.А.

Электростальский политехнический институт (филиал МИСиС)

Рудакова Л.В.

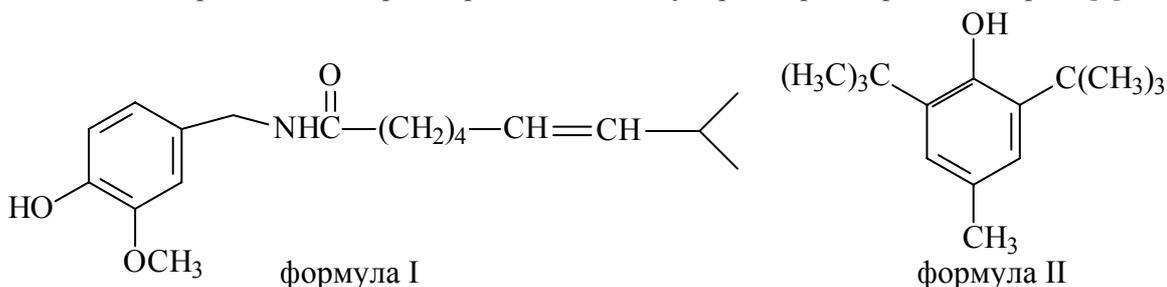
Воронежская государственная медицинская академия, Воронеж

Аннотация

Изучена жидкостная экстракция капсаициноидов и ионола из водно-солевых растворов сульфата аммония изопропиловым спиртом. Оптимизированы условия экстракции этих анализов из перцового пластыря. Предложена методика микроколоночной ВЭЖХ определения капсаициноидов и ионола в экстрактах

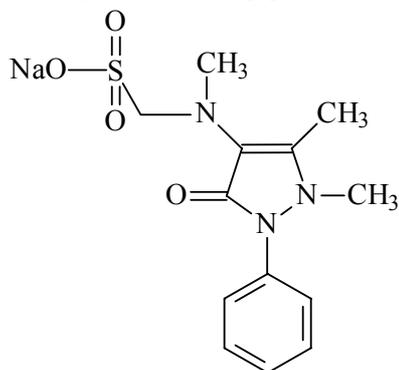
Введение

В состав перцовых пластырей с обезболивающим действием в качестве основных активных компонентов входят капсаициноиды, каротиноиды и анальгин. Для стабилизации каучуковой основы пластырей в него добавляют антиоксидантную присадку – ионол [1,2]. Капсаицин и ионол (формулы I и II) являются гидрофобными *орто*-замещенными производными фенола (критерий гидрофобности капсаицина $lgP = 3,66$ и ионола $lgP = 5,54$). Эти вещества практически не растворимы в воде, но умеренно растворимы в спиртах [3].



Содержание анальгина в пластыре в 40 раз превышает суммарное количество капсаициноидов. Методики ВЭЖХ контроля капсаициноидов разработанные и аттестованные для его анализа в пластыре [1,2], не содержащем анальгин оказались мало пригодны для новой лекарственной формы с его добавкой, так как широкий хроматографический пик анальгина уменьшает надежность определения капсаициноидов. В связи с этим актуальной является задача модификации пробоподготовки с разделением этих компонентов.

Анальгин (формула III) является полярным гетероциклическим соединением, он хорошо растворим в воде и слабо растворим в спиртах [3].



формула III

Цель данного исследования – разработка нового способа пробоподготовки анализируемой пробы из перцового пластыря и подбор условий определения капсаициноидов и ионола методом микроколоночной обращенно-фазовой ВЭЖХ.

Эксперимент

В работе применяли ионол, изопропанол, ацетонитрил, сульфат аммония квалификации «х.ч.», водный раствор аммиака (масс. доля 25 %), серная кислота ($\rho=1,84$ г/см³), государственный стандартный образец капсаицина (ВФС 42-1753-87), выделенного из красного стручкового перца (*Сарсисит апиум L*) содержащий капсаицин и основную примесь – дигидрокапсаицин, а также микропримеси: нордигидрокапсаицин, гомокапсаицин, гомодигидрокапсаицин (хроматограмма на рис. 1).

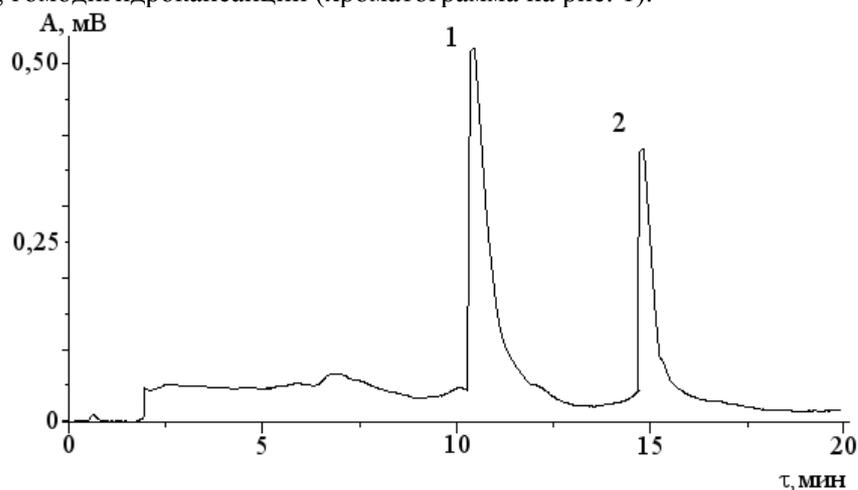


Рис. 1. Хроматограмма раствора стандартного образца капсаицина (ВФС 42-1753-87). Условия анализа приведены в тексте

Методика установления коэффициентов распределения аналитов в системе водно-солевой раствор – органический растворитель: взвешивают на аналитических весах пробу аналита $\sim 0,0050$ г с погрешностью $\pm 0,0002$ г и растворяют в воде в мерной колбе вместимостью 1000 см^3 . После растворения отбирают 100 см^3 водного раствора аналита и помещают в делительную воронку, подкисляют серной кислотой до pH 2-3, добавляют ~ 63 г сульфата аммония, 10 см^3 изопропанола и встряхивают на вибросмесителе в течение 15 мин. После расслаивания фаз (2-3 мин) из органической фазы шприцем отбирают $0,5 \text{ см}^3$ экстракта в контейнер для пробы и выполняют анализ на жидкостном хроматографе «Милихром 5».

Содержание воды в изопропанольной фазе находят по методике [4]. Полученные экстракты перцового пластыря фильтруют через фильтр типа «Миллипор» с размером пор 0,2-0,4 мкм; хроматографирование проводят на приборе «Милихром-5» с УФ- детектором в соответствии с блок-схемой анализа (рис.1).

Обсуждение результатов

В известной методике анализа капсаициноидов в пластыре для пробоподготовки точную навеску пластыря произвольно разрезают на полоски, освобождают полоски от защитного покрытия, помещают в круглодонную колбу, заливают из водным раствором этанола 54% и кипятят на водяной бане с обратным холодильником в течение 15 мин. После охлаждения вытяжку количественно переносят в мерную колбу, извлечение капсаициноидов повторяют ещё раз. Полученный водно-этанольный раствора после фильтрации используют для анализа методом ВЭЖХ. В качестве подвижной фазы применяют этанольный 54% раствор, в качестве неподвижной фазы – Сепарон С18 или аналогичный сорбент. Недостатками методики являются высокая растворимость анальгина в водно-спиртовом экстрагенте, в результате чего его присутствие на хроматограмме затрудняет определение капсаициноидов, высокая вязкость близкой к эквиобъемному составу подвижной фазы этанол-вода приводит к уменьшению надежности работы микроколоночного хроматографа и дополнительному уширению хроматографических пиков.

Нами в качестве экстрагентов испытаны системы ацетонитрил, изопропанол, ацетон, этанол и их смеси с водой и высаливатели. Найдено, что извлекаемые вещества - капсаициноиды и ионол практически полностью экстрагируются изопропанолом (ИПС) при однократной экстракции (степени извлечения 95 и 98 % соответственно), а анальгин не переходит в органическую фазу (степень извлечения ~ 0 %), то есть происходит разделение этих компонентов на стадии экстракции. Экстракт на основе ИПС в присутствии сульфата аммония содержит небольшое (~ 2 об. %) количество воды, которая незначительно разбавляет ИПС, но повышает его экстракционную способность[5].

Ниже приведена усовершенствованная методика контроля капсаициноидов и ионола с учетом требований разрабатываемой вновь фармакопейной статьи на новую лекарственную форму перцового пластыря с обезболивающим эффектом (рис.2).

Пробоподготовка. Отрезают полоску анализируемого пластыря размером 5×5 см, взвешивают на аналитических весах ($\sim 1,0 - 1,5$ г) с точностью $\pm 0,0002$ г и отделяют защитный слой бумаги, взвешивают его и вычитают из первоначальной массы. Навеску пластыря помещают в коническую колбу с притертой пробкой (предварительно можно порезать перцовый пластырь на более мелкие полоски 1×1 см), добавляют $\sim 20 \text{ см}^3$ раствора аммиака в изопропиловом спирте с $(\text{NH}_3) \approx 7$ моль/дм³ и встряхивают 15 мин на вибросмесителе.

Приготовление изопропанольного раствора NH_3 : мерной пробиркой отбирают $\sim 24 \text{ см}^3$ 25 % водного раствора аммиака помещают в мерный цилиндр, вместимостью 100 см^3 и доводят объем раствора изопропанолом до метки.

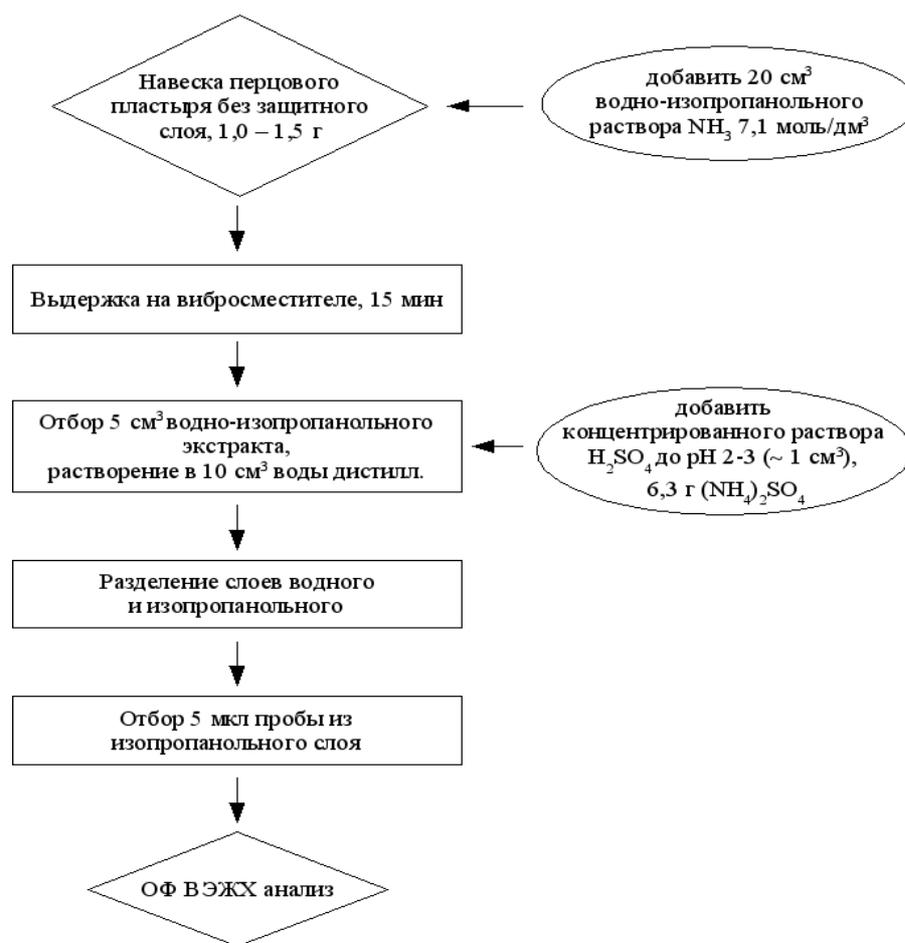


Рис.2. Блок-схема усовершенствованной методики контроля капсаициноидов и ионола

В делительную воронку отбирают пипеткой 5 см³ изопропанольного экстракта перцового пластыря, растворяют в 10 см³ дистиллированной воды и подкисляют серной кислотой до pH~2-3 (~0,8 см³ H₂SO₄ (ρ=1,84 г/см³)). Добавляют ~ 6,3 г сульфата аммония, перемешивают полученный раствор до полного растворения соли и встряхивают на вибросмесителе 15 мин. После расслаивания фаз (~2-3 мин) полученный органический слой отделяют, разбавляют в элюенте (ацетонитрил-вода) в соотношении 1:1 и хроматографируют на жидкостном хроматографе «Милихром 5».

Ход анализа. Условия ВЭЖХ анализа капсаициноидов и ионола не идентичны. Для определения ионола применяют элюент ацетонитрил-вода (в объемном соотношении 4:1), расход элюента 120 мкл/мин, параметры колонки: сорбент Диасорб 130 C₁₆T, размер частиц 7 мкм; размер колонки 2×80 мм, аналитическая длина волны 274 нм; объем анализируемой пробы 5 мкл, время удерживания ионола – 6,0 мин. Для определения капсаициноидов изменяют состав и расход элюента: элюент ацетонитрил:вода (в объемном соотношении 1:1), расход - 70 мкл/мин, параметры колонки те же. Время удерживания 2 основных капсаициноидов 10 или 15 мин.

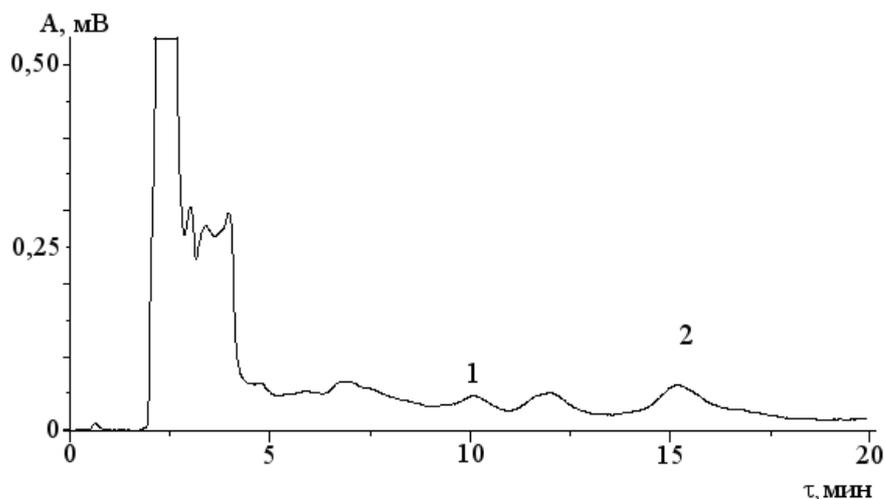


Рис. 3. Хроматограмма экстракта из перцового пластыря с применением изократического режима ОФ ВЭЖХ, ацетонитрил-вода (1:1), расход 70 мкл/мин: 1,2 - пики капсаициноидов

Расчет: содержание суммы капсаициноидов экстракте рассчитывали по линейной градуировочной зависимости суммы площадей пиков капсаициноидов от концентрации без свободного члена:

$$S = k \cdot c \quad (1)$$

где S – сумма площадей хроматографических пиков 1 и 2 (хроматограмма на рис.2); c – суммарная концентрация извлекаемых соединений, мг/дм³; k – эмпирический коэффициент.

Исходная суммарная концентрация капсаициноидов указана в сертификате к стандартному образцу экстракта перца. Выбор диапазона градуировки (0,02-0,2% капсаициноидов) был обусловлен необходимостью оптимального содержания активной лечебной формы в перцовом пластыре (не менее 0,06%). Во время стадии пробоподготовки в изопропанольный экстракт извлекаются капсаициноиды и ионол, а анальгин остается в водно-солевой фазе.

Содержание капсаициноидов в пробе исследуемого перцового пластыря рассчитывают по формуле:

$$\omega = \frac{S \cdot V}{m \cdot k \cdot R \cdot r \cdot 10^2} \quad (2)$$

где S – сумма площадей хроматографических пиков, мВ·мин; V – объем изопропанольного раствора аммиака, см³; k – эмпирический коэффициент из уравнения (1); R – степень извлечения капсаициноидов, %; r – соотношение водно-солевой и органической фаз; m – навеска исследуемого перцового пластыря, г; ω – массовая доля капсаициноидов, %.

Аналогично определяют калибровочный коэффициент для ионола по уравнению (1), где S – площадь хроматографического пика ионола, мВ·мин (хроматограмма на рис. 4).

Достоверность полученных результатов данной методикой проверяли методом «введено-найдено» (табл.1). Полученные результаты надежны ($t_{расч} < t_{табл}$) и воспроизводимы; систематическая погрешность среднего результата незначима, поэтому можно считать, что доверительная граница суммарной погрешности равна доверительной границе случайной погрешности.

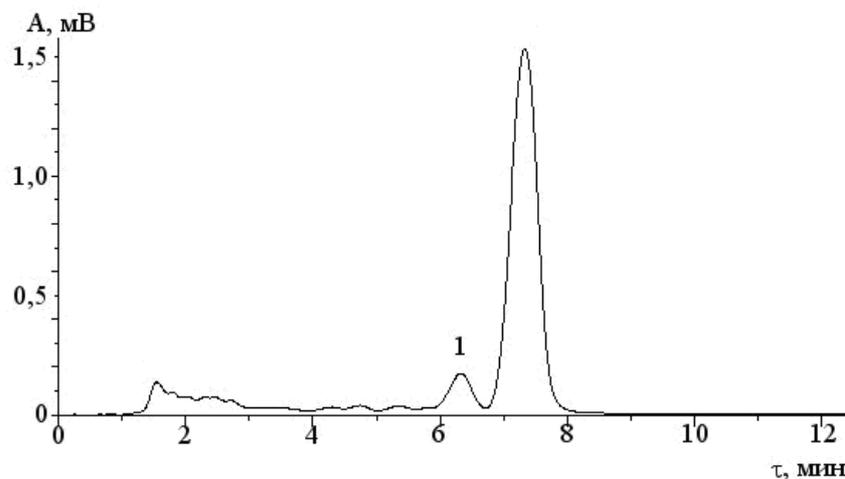


Рис. 4. Хроматограмма экстракта из перцового пластыря с применением изократического режима ОФ ВЭЖХ (элюент - смесь ацетонитрил-вода 4:1 в объёмном соотношения): 1- пик ионола

Таблица 1. Результаты определения ионола, капсаициноидов и анальгина экстракционно-хроматографическим способом ; $n=5$, $P=0,95$, $F_{\text{табл}}=6,4$, $F_{\text{эсп}}=5,2$

Введено, мг/дм ³			Найдено, мг/дм ³				
ионол	капсаициноиды	анальгин	ионол	S_r	капсаициноиды	S_r	анальгин
4,0	1,0	2,0	3,9±0,1	0,099	0,9±0,1	0,099	не обнаружено
0,40	0,1	0,2	0,40±0,02	0,019	0,09±0,01	0,0099	не обнаружено
0,04	0,01	0,02	0,04±0,001	0,001	0,01±0,002	0,0019	не обнаружено

Хроматографическое определение капсаициноидов и ионола с экстракционным разделением анализов характеризуется селективностью, низкими пределами обнаружения, правильностью и воспроизводимостью получаемых результатов. Продолжительность анализа вместе с пробоподготовкой ~ 60 мин.

Таблица 2. Результаты испытания способа определения капсаициноидов и ионола при анализе различных образцов пластырей ; $n=5$, $P=0,95$.

анализируемый пластырь	Найдено, мг/дм ³	
	капсаициноиды	ионол
«новый пластырь»	0,11±0,02	0,36±0,02
«использованный пластырь по способу применения»	не обнаружено	0,14±0,01
«пластырь с просроченным сроком действия»	0,10±0,03	0,36±0,03

Определение капсаициноидов и ионола проводили с пробами: «новый пластырь», «использованный по способу применения» и «пластырь с просроченным сроком» (табл.2). Результаты анализов различных пластырей подтверждают, что основным лечебным свойством обладают капсаициноиды и при использовании пластыря «по способу применения» капсаициноиды практически полностью расходуется [6] и поэтому в таких пробах они не обнаружены. Ионол лишь частично расходуется, так как каучуковая основа пластыря нарушается при его применении. Нами также проанализированы пробы

«пластыря с просроченным сроком», в результате анализа нами не обнаружено изменений концентраций ионола и капсаицина в составе пластырей.

Рассмотренная методика контроля капсаициноидов в перцовом пластыре с обезболивающим эффектом успешно апробирована в ОАО «Верофарм», г.Воронеж и может быть рекомендована для валидации и включения в измененную фармстатью.

Список литературы

1. ТУ 9393-021-45961725-2006. Перцовый пластырь «Доктор перец».
2. Патент РФ № 2133115, Перцовый пластырь. 1999.
3. Новый справочник химика и технолога. Аналитическая химия. Часть III. НПО Профессионал. – СПб. – 2002. – 692 с.
4. Мичелл Дж., Смит Д. Акваметрия. – М.: Химия, 1980. – 600 с.
5. Коренман Я.И., Ермолаева Т.Н., Подолина Е.А.// Журн. аналит. химии. – 1996. – Т.51, №5. – С.486-492.
6. Спиридонов В.К., Воробьева Н.Ф., Толочко З.С., Костина Н.Е., Хощенко О.М. //Бюллетень СО РАМН. – 2004, №2(112). – С.135-140.



Озонирование как способ интенсификации сорбции органических веществ гумусовой природы ионитами

Славинская Г.В., Ковалева О.В.

Воронежский государственный архитектурно-строительный университет, Воронеж

Бычковская Г.И.

Российский университет кооперации, Воронеж

Аннотация

В статье представлены результаты по влиянию озонирования при сорбции гумусовых веществ ионитами различной природы

Введение

Одной из причин недостаточной селективности ионитов к ГК и ФК является несоответствие размера пор смолы и радиуса поглощаемых молекул. Уменьшение размера последних должно приводить к росту сорбционной емкости анионитов. С целью деструкции ФК их водные растворы обрабатывали озоном.

Эксперимент

Влияние озона на структуру и свойства фульвокислот. Продукты озонирования фульвокислот исследованы методами УФ- и ИК- спектроскопии, гель-хроматографии, ВЭЖХ, потенциометрического титрования; определен их элементный состав. Установлено изменение состояния ФК при озонировании (табл. 1).

Таблица 1. Изменение свойств невыхских фульвокислот в процессе озонирования

Поглощено озона, мг/мг ФК	СФК, г/дм ³	C_{COOH} , гФК / мг – экв	pH ±0,04	Эквив. масса ФК	pKa	χ_{104} , Ом ⁻¹ см ⁻¹
0	1,016	4,15	2,37	242	4,2	3,87
0,13	0,930	6,46	2,17	148	3,7	7,17
0,23	0,883	6,62	2,18	138	3,5	7,82
0,29	0,831	6,68	2,22	153	3,6	9,90

Оказалось, что потеря массы ФК невелика и составляет при озонировании в нейтральной среде 78 %, в щелочной - 1719 %. Продукты озонолиза имеют меньшую степень ароматичности, чем исходные ФК, и меньшую молекулярную массу. Увеличивается на 50 % содержание карбоксильных групп. Рост электропроводности свидетельствует о большей подвижности продуктов деструкции в сравнении с исходными фульвокислотами.

Изменяется элементный состав ФК: становится меньше углерода, но больше кислорода.

Отмечено значительное уменьшение доли легко окисляющихся фракций ФК: перманганатная окисляемость стала ниже на 40 %. Независимо от pH исходного раствора ФК (7,0 или 9,0) на ВЭЖХ-хроматограммах озонированных образцов высота всех пиков снижается тем в большей мере, чем больше озона поглощено препаратом. Это свидетельствует о разрушении первоначальной структуры вещества, хотя новых пиков на хроматограммах не появляется.

Сорбция озонированных фульвокислот анионитами. В статических условиях сорбционная емкость анионитов разной основности (АВ-17-2П, Wofatit AD-41 и АНТ-511) по ФК возросла в 4; 2,5 и 2 раза. Причем на АВ-17-2П, судя по значениям коэффициента β , увеличение сорбции озонированных ФК выражено наиболее ярко (рис. 1, кривая 1).

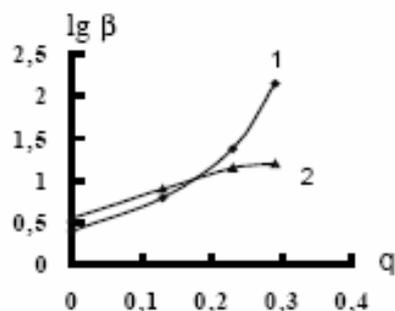


Рис. 1. Зависимость параметра β уравнения Фрейндлиха от количества поглощенного фульвокислотами озона при их адсорбции анионитами АВ-17-2П (1) и АНТ-511 (2)

Очевидно, такой положительный эффект обусловлен уменьшением размера молекул ФК и ростом содержания в препарате СООН-групп. Последнее обстоятельство увеличило долю поглощения по ионообменному механизму. Уменьшение размера молекул снижает влияние стерического фактора. Длительное озонирование, приводящее к углублению деструкции молекул ФК, закрепляет преимущество в сорбции озонированных ФК.

Характер влияния предозонирования растворов ФК на эффективность их сорбции анионитами определен также в динамических условиях методом выходных кривых, так как при этом проявляются не только равновесные, но и кинетические характеристики анионитов (рис. 2). Содержание исходных и озонированных фульвокислот в средних пробах фильтрата после анионитов показано в табл. 2.

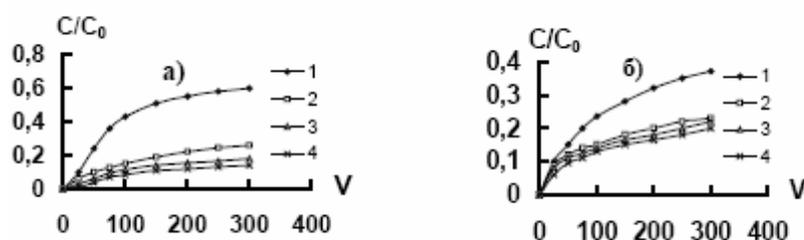


Рис. 2. Выходные кривые сорбции фульвокислот анионитами АВ-17-2П (а) и АНТ-511 (б) до поглощения O_3 (1) и после поглощения 0,13 (2), 0,23 (3) и 0,29 (4) мг O_3 /мг. СФК=19,6 мг/дм³; V=10 см³; u=10 м/ч

Согласно данным табл. 2, в динамических условиях самым эффективным сорбентом в отношении ФК до и после их деструкции является низкоосновный конденсационный фенольный анионит ИА-2.

Таблица 2. Содержание исходных и озонированных фульвокислот в средних пробах фильтрата после анионитов

Аниониты	Поглощено озона, мг О ₃ /мг ФК			
	0	0,13	0,23	0,29
АВ-17-2П	7,9	2,2	1,6	1,4
Wofatit AD-41	5,8	2,8	2,5	2,5
АНТ-511	5,4	2,7	3,0	2,6
ИА-2	3,5	0,9	0,4	0,3
ИА 1	4,6	2,0	-	-

Эксперименты с изменением высоты слоя загрузки анионитов ИА-2-С1 и АВ-17-2П-ОН (от 8 до 32 см) показали, что при сорбции озонированных ФК слоем анионита минимальной высоты (8 см) получен более высокий результат, чем в случае сорбции исходных ФК слоем анионита в 32 см. То есть увеличение объема загрузки в 4 раза приводит к такому же эффекту, что и предварительное озонирование ФК.

Влияние скорости потока раствора на величину поглощения ФК прослежено на примере выходных кривых адсорбции исходных и озонированных ФК при 6, 10 и 15 м/ч анионитами ИА-1, АНТ-511, Wofatit AD-41 и АВ-17-2П. Снижение интенсивности подачи раствора в колонку увеличивает объем очищенного раствора, причем эффективность сорбции при любой скорости потока выше в случае озонированных ФК.

Сорбция озонированных ФК сочетанием анионитов. Для установления эффективности двухступенчатой сорбционной очистки раствора от озонированных ФК испытаны схемы: ИА-2, АНТ-511 и ИА-2→АВ-17-2П. Содержание ФК с 19,0 снижено до 0,7 мг/дм³, перманганатная окисляемость - с 8,6 до 0,8 мг О₂/дм³.

Способ очистки воды от ФК с предозонированием и использованием двух разнотипных анионитов проверен в системе двухступенчатого обессоливания воды по схеме: КУ-2-8-Н → ИА-2-С1 → ЭДЭ-10П-ОН → АВ-17-2П-ОН → ФСД (КУ-2-8 + АВ-17-8).

Из воды, содержащей 19,5 мг ФК/дм³ с окисляемостью 8,8 мг О₂/дм³, получен фильтрат с окисляемостью 0,30,4 мг О₂/дм³ и удельным сопротивлением 28 Мом·см. Удалено 98 % ФК.

Глубокая очистка от ФК достигается также применением на первой ступени низкоосновного анионита АНТ-511: результат анализа фильтрата после сочетания анионитов АНТ-511 и АВ-17-2П методом ВЭЖХ на рис. 3.

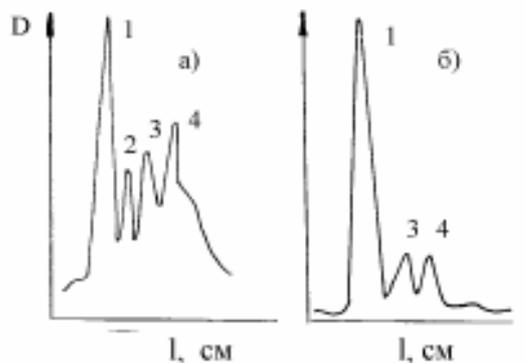


Рис. 3. Хроматограммы исходных (а) фульвокислот и озонированных (б), оставшихся в фильтрате после системы анионитов АНТ-511-АВ17-2П (упарен в 1000 раз)

Оказалось, что при таком способе очистки в фильтрате остаются, в основном, аминокислоты, которые удалось обнаружить только после 1000-кратного концентрирования.

Таким образом, предварительное озонирование воды является перспективным методом повышения сорбционной емкости анионитов в отношении гумусовых кислот.



Выделение липидов из отходов масложировой промышленности с применением экстракционного и хроматографического методов

Сикорская А.С., Назарова А.А., Селеменев В.Ф.

Воронежский государственный университет, Воронеж

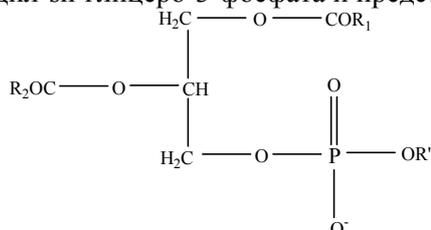
Аннотация

Предложен метод тонкослойной хроматографии для идентификации фосфолипидов и нейтральных липидов из экстрактов масложировых комбинатов

Введение

В настоящее время вырабатываемые промышленностью растительные масла характеризуются присутствием многообразных сопутствующих веществ, среди которых особое место занимают фосфолипиды.

С химической точки зрения фосфолипиды можно рассматривать как производные 1,2-диацил-*sn*-глицеро-3-фосфата и представить структурную формулу таким образом:



где R_1 и R_2 – насыщенные или ненасыщенные углеводородные остатки жирных кислот, R' – азотистые основания, аминокислоты или остаток полиола [1].

Опыт показывает, что фосфолипиды должны быть максимально выведены из масел, так как они оказывают отрицательное влияние на последующие процессы рафинации растительных масел, их гидрирования и отделения катализатора от гидрированных жиров. Кроме того, учитывая полезные физиологические и биологические свойства фосфолипидов, необходимо сохранять их качество с целью получения полноценного самостоятельного продукта – фосфатидного концентрата. На сегодняшний день проблема переработки отходов маслопроизводства является очень важной не только в плане выделения веществ, но и в том, чтобы получить максимум выгоды от производства с экономической точки зрения.

Разработка методов выделения фосфолипидов представляет особый интерес, так как фосфолипиды в эмульсиях с водой получают в отходах масложировых комбинатов. Смешивая масло с водой в соответствующих пропорциях и разделяя данную субстанцию, получают рафинированное масло, очищенное от восков, жирных кислот, солей тяжелых металлов, фосфолипидов и большого количества нейтральных липидов [1]. Эта смесь, как правило, выбрасывается, или берется в качестве добавки для корма крупного рогатого скота,

или используется при производстве мыла.

Актуальность данной работы состоит в разработке методики экспресс-анализа растительных масел для выделения и очистки этих ценных биологических веществ и для определения содержания в них фосфолипидов, так как количество этих соединений может служить показателем биологической активности масла.

Среди препаративных методов выделения фосфолипидов отмечают тонкослойную хроматографию, методы вымораживания, сорбционные методы, экстракцию [1-3]. Метод экстракции используется крайне редко, так как при этом затрачивается большое количество растворителя. Из литературных данных известно, что наиболее подходящей смесью является смесь хлороформа с метанолом [3].

Однако вследствие того, что применяемый в рекомендуемой системе метанол является ядовитым веществом, нами была проведена работа по изучению различных растворителей для экстракции фосфолипидов.

Для экстракционного выделения брали в равных количествах растворитель и отходы от производства масла, перемешивали в механическом встряхивателе в течение 30 мин, после этого проводили отделение органической и водной фаз в делительной воронке.

В табл.1 приведены характеристики растворителей, взятых нами для экстракции. Содержание липидов в экстрактах определяли гравиметрическим методом. Для этого помещали по 5 мл каждого экстракта в отдельные бюксы и доводили до постоянной массы в сушильном шкафу.

Таблица 1. Растворители, используемые для экстракции

Растворитель	Полярность	Плотность, г/см ³	Растворимость в воде, вес. %	Содержание липидов в экстракте, мг/100 мл
Гексан	0	0,6590	0,01	52,4
Диэтиловый эфир	2,9	0,7135	7,5	84,88
Бутанол	3,9	0,8096	7,9	73,84
Хлороформ	4,3	1,4890	0,82	74,52
Хлороформ - этанол	4,84	-	-	169,12

Выделение фосфолипидов из отходов масла проводили методом экстракции. После разделения оказалось, что концентрация липидов в органической и водной фазах различна. Это связано с тем, что молекулы фосфолипидов являются амфифильными, так как они состоят из двух частей, различных по своей растворимости в воде: полярной «головой» и неполярного углеводородного радикала, т.е. гидрофильной и гидрофобной частей [1].

Следовательно, полярные «головы» в неполярных или слабополярных растворителях (гексан, диэтиловый эфир) находятся в воде. Кроме того, в гексане даже углеводородные «хвосты» фосфолипидов находятся не в органической фазе, а в пограничном слое (рис. 1). У диэтилового эфира полярность (2,9) выше, чем у гексана, поэтому неполярные «хвосты» фосфолипидов находятся в органической фазе, а полярная часть находится либо на границе раздела двух фаз (негидратируемая), либо в водной фазе (гидратируемая). Растворимость бутанола в воде самая высокая из всех исследуемых растворителей, следовательно, все фосфолипиды, как гидратируемые, так и негидратируемые, переходят в органическую фазу. В хлороформе все виды фосфолипидов растворимы хорошо, поэтому большая часть их содержится в органической фазе, однако в водном слое остаются гидратируемые фосфолипиды. При экстракции хлороформом с этанолом происходит распределение фосфолипидов между тремя растворителями: в органической фазе - хлороформ (большая часть)+этанол+вода, в водной фазе - вода (большая часть)+хлороформ+этанол.

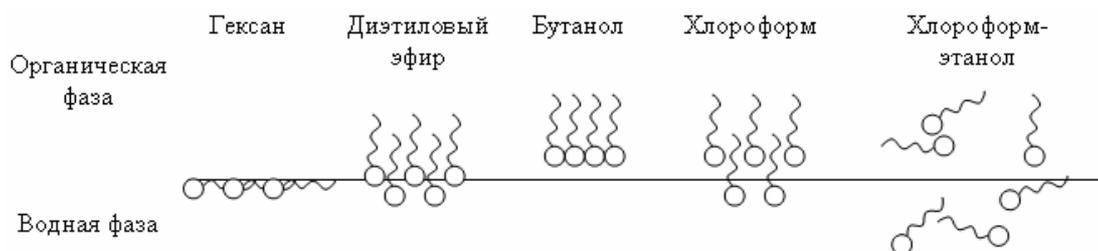


Рис.1. Распределение фосфолипидов на границе 2-х фаз

Совокупные данные по извлечению фосфолипидов различными растворителями представлены в табл.1.

Далее был проведен качественный и количественный анализ состава органической и водной фаз методом тонкослойной хроматографии. Следует отметить, что помимо фосфолипидов в отходах масла содержатся и нейтральные липиды, которые в данном случае рассматриваются как примеси. Также методом тонкослойной хроматографии был проанализирован состав нейтральных липидов. Системы для анализа фосфолипидов и нейтральных липидов представлены в табл.2:

Таблица 2. Системы для анализа фосфолипидов и нейтральных липидов

№	Система	Полярность	Обнаруживаемый класс веществ
1	Хлороформ – ацетон – уксусная кислота – метанол – вода (12:6:3:3:1) [5]	5,256	Фосфолипиды в водной и органической фазах
2	Петролейный эфир – диэтиловый эфир – уксусная кислота (90:10:1) [2]	0,349	Нейтральные липиды в органической фазе
3	Петролейный эфир – диэтиловый эфир – уксусная кислота (80:20:1) [2]	0,636	Нейтральные липиды в водной фазе

Эти системы выбраны исходя из итогов предыдущих работ [4,5]. В качестве стандартов при определении нейтральных липидов была взята стеариновая кислота, при определении фосфолипидов – фосфатидилхолин.

Для анализа методом ТСХ нами использовались пластины марки Sorbfil. После нанесения проб (объем наносимой пробы 3 мкл) пластины помещались в камеру, насыщенную парами элюента. После поднятия фронта растворителя на 8 см пластины извлекались и просушивались. В качестве проявителя использовали 5%-ный спиртовой раствор фосфорно-молибденовой кислоты (ФМК). Для проведения анализа методом ТСХ растворители испарялись в атмосфере аргона до постоянной массы, а полученные сухие остатки растворялись в хлороформе. Концентрации всех полученных растворов составили 5 мг/мл. Полученные растворы были проанализированы в приведенных выше условиях.

Качественный анализ проводили сравнением рассчитанных R_f полученных на хроматограмме зон веществ с данными, приведенными в литературе [5]. Были определены следующие липиды: лизофосфатидилхолин (ЛФХ), фосфатидилсерин (ФС), фосфатидилхолин (ФХ), фосфатидилинозиты (ФИ), фосфатидил-N,N'-диметиламин (ФДМА), фосфатидилэтанолламин (ФЭА), фосфатидилглицерины (ФГ), кардиолипин, фосфатидная кислота, 1,2-диглицериды, О-диалкиловые эфиры глицерина, высшие алифатические спирты, жирные кислоты (ЖК), триглицериды и эфиры стероидов.

Содержание фосфолипидов в полученных экстрактах представлено в табл.3:

Таблица 3. Содержание фосфолипидов в органической и водной фазах по данным тонкослойной хроматографии, мг/100мл экстракта

Вещест - во	Rf	Гексан		Диэтиловый эфир		Бутанол		Хлороформ		Хлороформ- этанол	
		орг. ф	вод.ф	орг. ф	вод. ф	орг.ф	вод. ф	орг.ф	вод. ф	орг.ф	вод.ф
ЛФХ	0,15	-	0,128	-	0,05 2	-	-	-	0,138	0,228	-
ФС	0,39	-	0,448	1,30 8	0,14 0	0,384	-	0,674	0,496	1,606	0,108
ФХ	0,41	-	0,456	1,94	0,16 0	1,554	-	0,782	0,694	2,114	0,156
ФИ	0,45	-	-	-	0,01 8	0,328	-	-	0,092	0,422	-
ФДМА	0,50	-	0,086	-	0,01 6	-	-	-	-	-	-
ФЭА	0,64	-	0,492	0,68 0	0,12 4	0,462	-	0,928	0,602	1,836	-
ФГ	0,72	-	0,814	-	0,26 2	0,396	-	1,148	0,650	1,168	0,072
Кардио- липид	0,87	-	0,160	-	0,04 4	-	-	-	0,162	-	0,042
Фосфа- тидная кислота	0,95	-	0,078	-	0,03 8	-	-	-	0,390	-	0,084

Из данных табл. 3 видно, что наибольшее количество фосфолипидов содержится в экстракте бутанола и смеси хлороформ-этанол, там присутствует даже ФИ, который содержится еще только в водных фазах после экстракции диэтиловым эфиром и хлороформом.

Характерно, что ЛФХ, обладающий патогенной активностью и нежелателен в получаемом экстракте, во всех растворителях находится в водной фазе, кроме экстракта хлороформ-этанол.

После анализа ТСХ видно, что фосфолипиды в гексане не обнаруживаются, они все остаются в водной фазе. Подобная тенденция сохраняется в случае экстракции диэтиловым эфиром, однако некоторые фосфолипиды, обладающие низкой полярностью, все же переходят в органический слой.

В случае экстракции бутанолом в водном слое не обнаруживаются фосфолипиды вообще, следовательно, этим растворителем фосфолипиды из эмульсии извлекаются наиболее полно. Отсутствие в экстракте таких компонентов, как фосфатидная кислота и ЛФХ, являющихся продуктами окисления [6], говорит о том, что в бутаноле не происходит реакций окисления и распада фосфолипидов.

Хорошо фосфолипиды извлекаются смесью растворителей хлороформ-этанол, но при этом часть фосфолипидов, хорошо растворимых в этаноле, остается вместе с ним в водной фазе, причем в достаточно больших количествах. В случае экстракции только лишь хлороформом только часть фосфолипидов переходит в органическую фазу.

В табл. 4 представлены данные по содержанию примесей в полученных экстрактах.

Из этих данных видно, что в гексане содержится довольно много триглицеридов, которых в остальных экстрактах меньше. В органическом слое после экстракции бутанолом содержатся также эфиры стероидов, которых нет ни в одном другом из проанализированных экстрактов.

Таблица 4. Содержание нейтральных липидов в органической фазе по данным тонкослойной хроматографии, %

Вещество	Rf	Гексан	Диэтиловый эфир	Бутанол	Хлороформ	Хлороформ-этанол
1,2-Диглицериды	0,15	6,3	0,35	1,43	0,52	1,23
О-Диалкиловые эфиры глицерина	0,30	19,4	1,10	1,28	1,03	0,92
Высшие алифатические спирты	0,24	4,1	0,11	1,31	0,20	0,46
ЖК	0,39	3,5	0,38	0,91	0,22	1,40
Триглицериды	0,44	44	4,73	6,13	2,19	3,56
Эфиры стеринов	0,82	-	-	1,232	-	-

Также небольшое количество примесей содержится в органическом слое экстракта хлороформ – этанол.

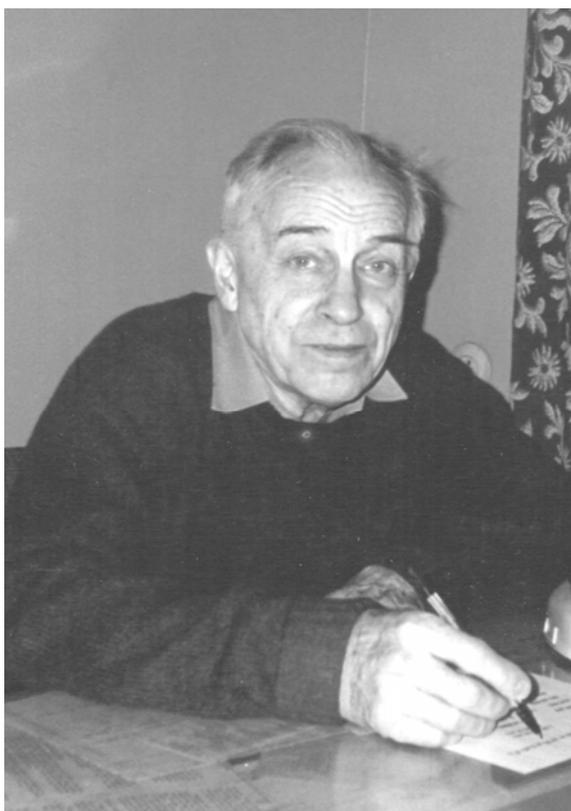
По совокупности полученных данных можно сделать вывод, что наиболее подходящими экстрагентами для извлечения фосфолипидов являются хлороформ – этанол и бутанол, так как при этом извлекается наибольшее количество фосфолипидов из эмульсии масло-вода и при этом в экстракте содержится малое количество примесей.

Список литературы

1. Арутюнян Н.С. Корнена Е.П. Фосфолипиды растительных масел. М., 1986. С.5-174
2. Кейтс М. Техника липидологии / Кейтс М. – М., 1975.
3. Ленинджер А. Основы биохимии (в 3-х т.) / Ленинджер А. – М., 1985. – 1т. – с. 325 – 337
4. Назарова А.А., Корнева Т.А., Ковалева Е.В., Рожков П.Н., Сафонова Е.Ф., Рудаков О.Б. Количественная оценка фосфолипидов методом ВЭТСХ с использованием компьютерного сканирования // ж-л Сорбционные и хроматографические процессы – 2003 – т.3 - №2 – с.213-216
5. Сафонова Е.Ф., Назарова А.А., Селеменев В.Ф., Брежнева Т.А., Сливкин А.И. Выбор оптимальных параметров разделения фосфолипидов в тонком слое сорбента // Химико-фармацевтический ж-л – 2002 – т.36 - №4 – с.41-43
6. Геннис Р. Биомембраны: Молекулярная структура и функции / Геннис Р – М., 1997.
7. Гейсс Ф. Основы тонкослойной хроматографии Т.1 М., Мир, 1981.



Памяти Владимира Ивановича Горшкова (17 ноября 1930 г. – 13 февраля 2008 г.)



13-го февраля 2008 года ушёл из жизни выдающийся ученый и педагог, профессор кафедры физической химии химического факультета МГУ, заслуженный деятель науки РСФСР, заслуженный профессор МГУ им. М.В. Ломоносова, кавалер орденов Трудового Красного Знамени и Почета, доктор химических наук Владимир Иванович Горшков.

Владимир Иванович родился в Москве в 1930 году. С 1948 года, когда Владимир Иванович поступил на учебу, вся его дальнейшая жизнь была связана с химическим факультетом Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова. С 1951 г. Владимир Иванович работал на кафедре физической химии в лаборатории стабильных изотопов, будучи студентом, аспирантом, а с 1956 года - младшим научным сотрудником, старшим научным сотрудником, заведующим лабораторией и с 1983 г. – профессором кафедры.

В 1958 году под руководством профессора Г.М. Панченкова Владимир Иванович успешно защитил кандидатскую диссертацию на тему «Исследование обмена ионов щелочных металлов на сульфосолах в различных растворителях».

В последующие годы он работал над созданием метода непрерывного разделения смесей близких по свойствам веществ с использованием противоточных ионообменных колонн. К этому времени противоточные ионообменные колонны стали достаточно широко использоваться в ряде зарубежных стран для решения проблем водоподготовки. Но задача проведения непрерывного разделения смесей близких по свойствам веществ в противоточных ионообменных колоннах являлась новой областью. Это направление потребовало глубокого изучения закономерностей селективности ионного обмена на ионитах. Особенно детально была исследована селективность сульфифенольных ионитов по отношению к смесям щелочных металлов, содержащих цезий и рубидий. Было доказано, что фенольные группы в структуре бифункциональных ионитов, даже не участвуя непосредственно в реакции ионного обмена, оказывают синергетическое действие и обуславливают повышенную селективность таких ионитов к ионам цезия и рубидия. В 1966 году в соавторстве с А.М.Толмачевым в Журнале физической химии была опубликована работа «Некоторые вопросы термодинамики ионного обмена», которая стала уже классической и неизменно цитируется во всех монографиях и обзорах по термодинамике

ионного обмена. В этой работе на основании совместного рассмотрения закона действующих масс и уравнения Гиббса-Дюгема была решена задача о нахождении термодинамической константы ионного обмена для набухающих ионитов. В методическом плане исключительно важным результатом этой работы, особо выделяемым авторами многих монографий и обзоров, явилось то, что впервые была проанализирована проблема выбора концентрационной шкалы в термодинамике ионного обмена.

В 1960-х годах В.И. Горшковым совместно с учеником и ближайшим соратником М. С. Сафоновым были исследованы условия формирования стационарных фронтов ионообменной сорбции и разработаны математические модели стационарных процессов ионообменной сорбции. Впервые были получены решения стационарных задач ионообменной сорбции из раствора смеси ионов на ионите в смешанной форме и десорбции. Были разработаны методы определения динамических характеристик ионообменных колонн и экспериментально изучено влияние скорости движения ионита и раствора на высоту, эквивалентную теоретической ступени, в колоннах с неподвижным слоем и в противоточных колоннах. Был проведен анализ фронтального разделения многокомпонентных смесей на ионитах.

Эти результаты послужили основой при создании методов непрерывного разделения различных смесей близких по свойствам веществ и очистки веществ в противоточных ионообменных колоннах. Среди них надо прежде всего упомянуть метод непрерывного концентрирования изотопа азот-15 в системе, включающей сульфокислотный катионит в аммонийной форме и раствор аммиака. В рамках государственной программы был разработан метод, и была создана пилотная установка по непрерывному получению хлорида цезия высокой степени чистоты. Были созданы непрерывные процессы очистки иттрия, разделения редкоземельных элементов.

В 1968 году по этим результатам В.И. Горшков успешно защитил докторскую диссертацию на тему «Противоточный ионообменный метод разделения и очистки веществ».

В дальнейшем Владимир Иванович продолжал работать как над проблемами ионообменного разделения смесей веществ, так и над проблемами разделения стабильных изотопов. Главным мотивом в этих работах стала задача снижения расходов в процессах разделения. В 1971 году были опубликованы яркие работы, в которых было показано, что ионообменное разделение смесей веществ можно проводить без использования вспомогательных реагентов. Был предложен способ непрерывного разделения смесей разнозарядных ионов, в котором за счет влияния концентрации раствора на селективность ионита удалось осуществлять разделение и даже глубокую очистку электролитов без использования каких-либо вспомогательных реактивов. В 1975 году аналогичный процесс со значительно сниженными расходами вспомогательных веществ был предложен для разделения смесей соединений щелочных металлов на бифункциональном сульфофенольном катионите.

В области разделения стабильных изотопов под руководством В.И. Горшкова и М.С. Сафонова в 1974 году были начаты работы по концентрированию тяжелого изотопа азот-15 в системе, образованной азотной кислотой и оксидами азота. В этих работах была впервые использована нетрадиционная область пониженных температур 250 – 230 К. По результатам выполненных исследований в НИИ стабильных изотопов в г. Тбилиси была создана промышленная установка по производству азотной кислоты, обогащенной изотопом азот-15. Испытания показали, что за счет использования пониженных температур производительность значительно увеличилась по сравнению с традиционным методом, а затраты сернистого ангидрида, используемого в реакторе обращения потока для восстановления азотной кислоты, была снижена почти в 2 раза.

В работах, выполнявшихся под руководством Владимира Ивановича на химическом факультете МГУ, был обнаружен и исследован целый ряд новых явлений. В 1966 г. в Журнале физической химии была опубликована статья «Распределение смеси хлоридов цезия и рубидия в системе вода-фенол», в которой была обнаружена высокая селективность фенола при экстракции соединений цезия и рубидия. В это же время в зарубежных работах

были исследованы аналогичные свойства других замещенных фенолов. И довольно скоро фенольные экстрагенты стали широко применяться при производстве соединений цезия и рубидия. В 1975 г. Владимир Иванович впервые исследовал ионный обмен на монофункциональном фенольном катионите и показал его наиболее высокую селективность по отношению к смесям, содержащим ионы цезия и рубидия, среди всех известных органических ионитов.

В конце 1970-х годов в работах В.И. Горшкова и одного из его учеников Д.Н. Муравьева было обнаружено новое явление – длительная стабильность пересыщенных растворов аминокислот при контакте со слоем ионообменника, а способ получения таких растворов на ионитах был назван способом изотермического ионообменного пересыщения. Обнаруженное явление было использовано при создании способов непрерывного выделения аминокислот из растворов микробиологического синтеза, а в дальнейшем в работах Р.Х. Хамизова, одного из учеников Владимира Ивановича, было показано, что явление стабилизации пересыщенных растворов выполняется и во многих других системах, и было использовано при разработке ряда технологических процессов.

В 1980-х годах под руководством Владимира Ивановича проводилась совместная с НИИУИФ им. Я.В. Самойлова работа по созданию технологии получения нитрата калия методом ионного обмена на сульфокислотном катионите. В этой работе было обнаружено явление обращения селективности катионита к смеси нитратов калия и аммония при переходе к концентрированным растворам. Это позволило создать изящный процесс ионообменного синтеза нитрата калия из нитрата аммония и хлорида калия, в котором все стадии происходят в условиях резких стационарных фронтов, что удается реализовать в ионообменных процессах исключительно редко.

В конце 1980-х годов в работах, проводившихся В.И. Горшковым совместно с В.А. Ивановым, было обнаружено сильное влияние температуры на селективность некоторых типов ионитов со слабокислотными группами, вопреки доминировавшему в то время мнению о слабом влиянии температуры на равновесие ионного обмена. Было показано, что влияние температуры на ионообменную селективность можно эффективно использовать для снижения расходов вспомогательных реактивов и даже организовывать безреагентные процессы разделения. Были разработаны процессы безреагентной очистки солей щелочных металлов от примеси двухзарядных катионов, в том числе для получения высоко чистых соединений. Эти работы Владимира Ивановича вызвали интерес к двухтемпературным ионообменным разделениям в других научных группах и привели к созданию ряда новых процессов.

В начале 1990 годов В.И. Горшков и его ученик Н.Б.Ферапонтов начали развивать направление, связанное с неионообменным сорбционным разделением смесей электролитов на ионитах без использования вспомогательных электролитов.

В эти же годы были выполнены и опубликованы работы, продемонстрировавшие важную роль естественной конвекции в процессах сорбции и ионного обмена, а также получены практически важные результаты в области ионного обмена из растворов с высокими концентрациями электролитов.

С конца 1950 годов неизменное внимание Владимир Иванович уделял развитию ионного обмена в противоточных колоннах, отмечая их более высокие производительность и экономичность по сравнению с традиционными ионообменными фильтрами. Им разработан ряд различных противоточных ионообменных колонн и установок, а также непрерывных процессов разделения веществ различных классов. Результаты работ в этом направлении были обобщены в монографии “Ионный обмен в противоточных колоннах” (1981 г.), написанной совместно с М.С. Сафоновым и Н.М. Воскресенским.

Владимир Иванович был научным редактором вышедшей в США книги “Ионный обмен. Работы российских ученых” (1999 г.), в которой были опубликованы обзорные работы ведущих российских специалистов в области ионного обмена, а также научным редактором аналогичного сборника обзоров российских специалистов в области химии и разделения стабильных изотопов, опубликованного в виде специального выпуска журнала “Separation Science and Technology” (2001 г.).

Другим важным направлением деятельности Владимира Ивановича являлась преподавательская работа. Много лет он читал общий курс лекций “Физическая химия” для студентов биологического и химического факультетов МГУ, а также специальные курсы. На основании своего опыта еще в 1986 г. Владимир Иванович совместно с профессором Иваном Алексеевичем Кузнецовым написал учебник “Физическая химия”. Главным отличием этого учебника является то, что в нем все фундаментальные положения излагаются простым и доступным языком и объясняется вывод всех формул. Данный учебник пользуется большой популярностью у студентов и широко используется преподавателями. В 1993 г. было выпущено его второе, а в 2006 г. - уже третье издание.

Под руководством Владимира Ивановича выполнено и защищено 38 кандидатских диссертаций и более 50 дипломных работ. Его учениками защищены четыре докторские диссертации. У многих специалистов, работающих в области ионного обмена, хроматографии, разделения стабильных изотопов и получения чистых веществ, Владимир Иванович был официальным оппонентом по их диссертациям – строгим и в тоже время объективным и очень доброжелательным.

С 1969 г. по 2001 г. Владимир Иванович был заведующим одной из наиболее крупных лабораторий химического факультета МГУ, много лет он являлся заместителем заведующего кафедрой физической химии, членом Научных советов РАН по химии высокочистых веществ и по хроматографии, председателем диссертационного Совета по физической химии, членом Ученого совета химического факультета. Ряд лет он работал в экспертном совете ВАК СССР.

Четыре цикла работ В.И. Горшкова были отмечены премиями Минвуза и Гособразования СССР. В 1980 году он был награжден орденом Трудового Красного Знамени, а в 2001 г. – орденом Почета. В конце 1991 года ему было присвоено почетное звание “Заслуженный деятель науки РСФСР”.

В памяти родных, друзей, учеников и коллег - всех, кто его знал, Владимир Иванович Горшков останется выдающимся ученым и педагогом, неизменно внимательным и доброжелательным к своим ученикам и коллегам, сильным и гордым человеком, добрым и отзывчивым другом.