



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

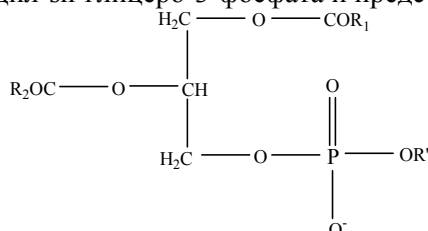
Аннотация

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.

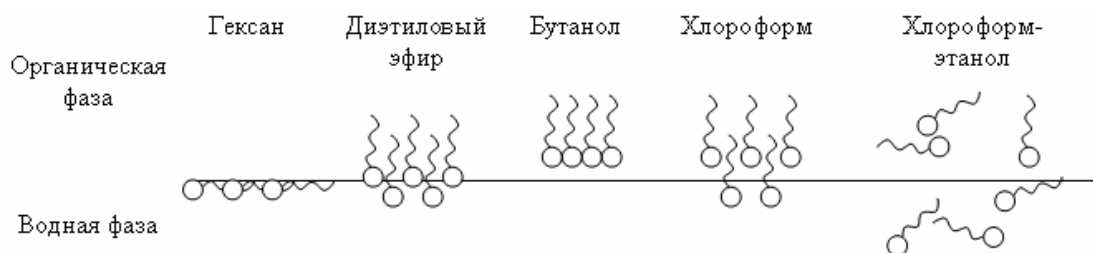


Рис.1. Распределение фосфолипидов на границе 2-х фаз

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- липиды | 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 стероидов | 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.