

УДК 663.252:631.81:634.1

**ПОДГОТОВКА ПРОБ
БИОЛОГИЧЕСКОГО
ПРОИСХОЖДЕНИЯ
ДЛЯ АНАЛИТИЧЕСКОГО
ИССЛЕДОВАНИЯ**

Якуба Юрий Федорович
канд. техн. наук, доцент,
зав. центром коллективного пользования
приборно-аналитическая

Ушакова Яна Владимировна
мл. науч. сотр.

*Государственное научное учреждение
Северо-Кавказский зональный научно-
исследовательский институт
садоводства и виноградарства
ФАНУ России, Краснодар, Россия*

Сула Роман Алексеевич
канд. техн. наук,
заместитель директора ООО «Диалог»

ООО Диалог, Горячий Ключ, Россия

Содержание коллоидных веществ, пептидов, полисахаридов, белков и других характерных для биологических объектов веществ обычно затрудняет аналитическое определение микро- и макроэлементов, фосфора, азота. Установлено, что имеются очевидные проблемы при длительной подготовке биологических проб к анализу за счет суммирования погрешностей на стадии подготовки пробы. Обсуждены существующие методики пробоподготовки образцов биологического сырья для аналитического исследования. Предложены новые методические решения процесса подготовки растительных образцов к определению катионов щелочных, щелочноземельных и некоторых тяжелых металлов. Рассмотрены возможности и условия применения различных режимов

UDC 663.252:631.81:634.1

**THE PREPARATION OF
THE SAMPLES OF BIOLOGICAL
MATERIAL FOR ANALYTICAL
RESEARCH**

Yakuba Yuriy
Cand. Tech. Sci., Docent
Head of Center of Collective Using
the Instrument and Analytical

Ushakova Yana
Junior Research Associate

*State Scientific Organization North
Caucasian Regional Research Institute
of Horticulture and Viticulture of FASO
of Russia, Krasnodar, Russia*

Sula Roman
Cand. Tecn. Sci.,
Deputy Director of LLC «Dialog»
ООО Dialog, Goryatchiy Klyutch, Russia

The maintenance of colloid substances, pepetide, polysugar, fibers and other characteristic substances of biological objects usually complicates the analytical definition micro- and macroelements, phosphorus, nitrogen. It is established that there are obvious problems during of curse of long preparation of biological tests for the analysis at the expense of summation of errors at a stage of sample's preparation. The operating methods for samples preparation of biological raw materials for analytical research are discussed. The new methodical decisions for preparation of plant samples for determination of alkaline kations, earth alkaline metals and some heavy metals are offered. The possibilities and the conditions of application of various modes of microwave processing for extraction of mobile and general forms of kations and anions are considered.

СВЧ-обработки для извлечения подвижных и общих форм катионов и анионов. Апробированы различные условия проведения окислительной подготовки образцов растительного сырья для последующего определения общего фосфора и азота. Показаны приемы подготовки биологических объектов для анализа летучих компонентов методом газовой хроматографии и масс-спектрометрии. Выявлены оптимальные условия подготовки образцов для определения компонентов с высокой температурой кипения. Главное внимание уделено повышению точности и объективности измерений за счет улучшения процесса подготовки проб биологического происхождения и соблюдения условий экологической безопасности при выполнении аналитических работ.

Ключевые слова: БИОЛОГИЧЕСКИЙ МАТЕРИАЛ, ПОДГОТОВКА ПРОБ, АНАЛИЗ, МЕТОД, ЭКСТРАКЦИЯ, РЕЖИМ ОБРАБОТКИ

The various conditions of carrying out of oxidizing preparation of staples of vegetative raw materials for the subsequent definition of the general phosphorus and nitrogen are approved. The ways of biological samples preparation for definition of volatile components by a method of a gas chromatography and mass spectrometry are shown. The optimal conditions for samples preparation for definition of components with high temperatures of boiling are revealed. The main attention is paid to increase of accuracy and objectivity of measurements at the expense of improvement of methods of preparation of sample of a biological origin and observance of conditions of ecological safety at carrying out of analytical works.

Key words: BIOLOGICAL MATERIAL, SAMPLE'S PREPARATION, ANALYSIS, METHODS, EXTRACTION, TREATMENT MODES

Введение. Образцы биологического происхождения, ввиду сложности их химического состава, нуждаются в проведении специальной подготовки перед выполнением аналитических работ, даже простое кратное разбавление дистиллированной водой следует рассматривать как подготовку материала к анализу [1]. Весьма распространены для подготовки проб к анализу различные экстракционные процессы – разные комбинации агрегатных состояний образца и экстрагента, которые в некоторых случаях могут рассматриваться в качестве собственно исполнения анализа. Постепенно появляется аппаратура для использования сверхкритической воды, в частности способной растворять кварц [2].

Одним из способов извлечения содержащихся в биологическом (растительном) материале веществ, как известно из литературы, является экс-

тракция под воздействием СВЧ-полей, которая имеет ряд определенных преимуществ перед другими способами экстракции [3]. СВЧ-экстракт получают с помощью СВЧ-минерализаторов или экстракторов [4]. Известно проведение экстракции растительного сырья 50 %-ным водно-спиртовым раствором в электромагнитном поле СВЧ с традиционными для этой цели параметрами [5].

Существует способ производства экстракта из древесины дуба, предусматривающий экстракцию водно-спиртовым раствором в поле СВЧ при периодическом сбросе давления до значения, обеспечивающего вскипание экстрагента, и повышении его до исходного значения, после чего целевой продукт выделяют из жидкой фазы известными методами [6].

Цель исследования – совершенствование процесса подготовки проб биологического происхождения для последующего анализа на приборах капиллярного электрофореза или атомных спектрометрах.

Обсуждение результатов. На базе ГНУ СКЗНИИСиВ Россельхозакадемии была разработана методика получения СВЧ-экстракта из растительного сырья с помощью минерализатора «Минотавр-1», где в качестве экстрагента использован раствор этилового спирта, впоследствии изопропанола [7]. В случае использования изопропанола обращают внимание на длительность его хранения и возможное накопление в нем кротонового альдегида, который может оказать влияние на результаты последующих анализов. Разработанная нами методика предусматривает три варианта подготовки проб растительного сырья для последующих испытаний методами капиллярного электрофореза, жидкостной хроматографии, атомной эмиссии и другими:

- выполнение СВЧ-обработки для экстракции подвижных форм ионных и биологически активных веществ;

- СВЧ-обработка для экстракции общих форм ионов щелочных и щелочноземельных металлов, цинка, марганца, железа;
- выполнение СВЧ-минерализации в присутствии окислителей (азотной, хлорной кислот, перекиси водорода и т.д.) для определения общих форм фосфора, азота и других элементов;

СВЧ-обработка для экстракции подвижных форм ионных и биологически активных веществ. Из средней пробы листьев (цельных побегов или фрагментов побегов, или их составляющих) получают высечку (нарезку) – 1 г (допускается хранение исходных растительных материалов в холодильнике в полиэтиленовом пакете при температуре +4°C, не более 3-х суток). Высечку с добавлением 25 см³ 10 %-ного водного раствора спирта-ректификата помещают во фторопластовый контейнер магнетрона СВЧ-минерализатора «Минотавр-1». Режим – «разложение без давления» с использованием 10 % мощности магнетрона минерализатора.

Время обработки – 10 минут. В указанных условиях под воздействием СВЧ-поля происходит экстракция подвижных форм ионов щелочных и щелочноземельных металлов, фенолкарбоновых, органических кислот, аминокислот и других физиологически активных веществ из листьев и вегетативных частей растений. Контейнер извлекают из СВЧ-минерализатора, охлаждают в естественных условиях в течение 3-5 минут, экстракт количественно, с добавкой исходной водно-спиртовой смеси переносят в мерную колбу объемом 25 см³. Общий расход 10%-ного раствора этилового спирта на СВЧ-пробоподготовку одного растительного образца в двух повторностях составляет 70 см³. Проведенные исследования показали, что замена этилового спирта на изопропиловый, который коммерчески более доступен и не требует специальных разрешений, возможна без ущерба для качества анализа. Не рекомендуется СВЧ-процесс использовать для экстракции сахаров, красящих и других лабильных веществ.

СВЧ-обработка для экстракции общих форм ионов щелочных и щелочноземельных металлов, цинка, марганца, железа. Навески из средней пробы свежего (высушенного) растительного материала в количестве 0,50-1,00 г помещают во фторопластовый контейнер СВЧ-минерализатора «Минотавр-1», добавляют 25 см³ 10% водного раствора уксусной кислоты и устанавливают контейнер в магнетрон минерализатора. Устанавливают режим «разложение без давления» с использованием 10% мощности магнетрона. Время обработки – 10 минут. В этих условиях проводят СВЧ-обработку для экстракции общих форм ионов щелочных и щелочноземельных металлов, цинка, марганца, железа. Через 10 мин. контейнер извлекают из СВЧ-минерализатора, охлаждают в естественных условиях (3-5 минут), полученную жидкость, добавляя 10 %-ную уксусную кислоту, переносят в мерную колбу объемом 25 см³. Полученный экстракт используют только для анализа на системах капиллярного электрофореза.

СВЧ-минерализация в присутствии окислителей (азотной, хлорной кислот, перекиси водорода и т.д.) для определения общих форм фосфора, азота, марганца, меди, кадмия, алюминия, бора. Усредненная проба в количестве 1 г измельченных листьев (или 0,50 сухих), плодов (сухих плодов 0,5 г) или других объектов помещают в пластиковые пробирки с завинчивающимися крышками, добавляют 5 см³ концентрированной азотной кислоты, плотно закрывают и оставляют для разложения при комнатной температуре на 12-24 час.

Затем содержимое переносят количественно в контейнер СВЧ-минерализатора, добавляют около 20 см³ 1Н азотной кислоты и проводят «разложение без давления» в течение 10 минут. По завершении включают режим «разложение под давлением» (1 мин.).

Через 2-3 минуты после окончания процесса необходимо вытащить контейнер из минерализатора, содержимое через бумажный фильтр пере-

лить в мерную колбу емкостью 25 см³ и довести до метки 1Н азотной кислотой. Коэффициент разбавления равен 25 при использовании навески 1 г, для сухих объектов навеской 0,50 г – 50 раз.

Разбавленную пробу, при необходимости с требуемым значением показателя кислотности, можно использовать для анализа на атомных спектрометрах или системах капиллярного электрофореза. Для подготовки определения общего азота методом СВЧ-обработки можно применить хлорную кислоту в виде окислителя, предварительно пробу подвергают разложению в смеси уксусной кислоты и перекиси водорода.

Подготовка проб растительного и животного сырья для определения летучих компонентов методом газовой хроматографии и масс-спектрометрии. Для установления качественного и количественного состава летучих компонентов сырья и продуктов различного агрегатного состояния – труднолетучие жидкости, твердые и пастообразные вещества – наиболее востребованы газовые хроматографы с капиллярными колонками и пламенно-ионизационным и масс-спектрометрическим (низкого, высокого разрешения) детекторами.

Одним из приемов подготовки таких объектов является экстракция различными растворителями или их смесями – диэтиловый эфир, ацетон, фреоны, низкокипящие углеводороды и т.д.

Полученный экстракт подвергают анализу, например ГХ-МС, полученные профили сравнивают по характерным органическим соединениям, идентифицированным при помощи библиотеки в автоматическом режиме. Однако следует учитывать, что растворители не обладают идеальной чистотой, вызывают помехи, искажая результат определения.

Поэтому часто практикуется отгонка летучих (ароматических) компонентов с водяным паром, и таким образом получают свободный от растворителей растительный образец или осуществляют парофазовый анализ,

где единственным приемом воздействия на пробу является термостатирование образца в герметичной емкости.

Парофазовый анализ (в том числе с твердофазовым концентрированием) больше подходит для надежной качественной оценки наличия летучих компонентов в аромате образца, чтобы в последующем, опираясь на полученную информацию, выполнить количественное исследование с идентифицированными компонентами.

Для отгонки летучих продуктов с водяным паром навеску гомогенизированной пробы, с содержанием жира не более 5 %, в количестве 5 г помещают в прибор и начинают перегонку. Дистиллят собирают в мерную колбу объемом 50 см³ и требуемое количество (1-5 мм³) дозируют в газовый хроматограф.

Для оценки летучих компонентов в пробе путем анализа паровой фазы проводится следующая операция. Гомогенизированным образцом заполняют герметичную емкость с эластичной мембраной (10 см³) на 50 % объема, выдерживают в течение 1 часа при +25°С для установления равновесия и 500 мм³ паровой фазы дозируют шприцем в газовый хроматограф или для идентификации в масс-спектрометр.

Для улучшения условий идентификации и повышения концентраций компонентов следует использовать термостатирование при более высоких температурах (+40°С и выше).

Заключение. Рассмотренные выше приемы экстракционной пробоподготовки, в том числе с применением СВЧ-экстракции, пригодны для анализа растительного сырья по многим показателям безопасности и качества. Обсуждаемые приемы позволяют повысить чувствительность и пределы определения изучаемых компонентов и в то же время обеспечить экологичность хода подготовки растительных образцов к анализу.

Литература

1. Брыкалов, А.В. Современные методы выделения и исследования биологически активных веществ и микроорганизмов / А.В. Брыкалов, Ю.Ф. Якуба, Н.Ю. Пилипенко, Е.В. Белик, П.Ришоме, Ф.Симоне. – Краснодар: КубГАУ, 2013.– 115 с.
2. Горбатый, Ю.Е. Сверхкритическое состояние воды / Ю.Е. Горбатый, Г.В. Бондаренко.– Сверхкритические флюиды. Теория и практика.– 2007.– Т. 2.– №2.– С. 5-19.
3. Пробоподготовка в микроволновых печах. Теория и практика / Под ред. Г.М. Кингстон, Л.-Б. Джесси.– М.: Мир, 1991.– С. 210-221.
4. Lamble, K.J. Microwave digestion procedures for environmental matrices / K.J. Lamble, S.J. Hill // Analyst . – 1998.– Vol. 123.– P. 103-133.
5. Губиев Ю.К. Научно-практические основы технологических процессов пищевых производств в электромагнитном поле СВЧ: автореф. дисс. ... д. техн. н.– М.: МТИПП, 1990.– С. 33-35.
6. Способ производства экстракта из древесины дуба, Патент РФ 2251889; О.И. Квасенков, А.Б. Тюрюков.– Бюл. №14.– 2005.
7. Якуба Ю.Ф. Применение СВЧ-экстракции и высокоэффективного капиллярного электрофореза для анализа вегетативных органов растений / Ю.Ф. Якуба // Матер. II Междунар. конф. «Современное приборное обеспечение и методы анализа почв, кормов, растений и сельскохозяйственного сырья».– М., 2004.– С. 71-74.

References

1. Brykalov, A.V. Sovremennyye metody vydeleniya i issledovaniya biologicheski aktivnyh veschestv i mikroorganizmov / A.V. Brykalov, Yu.F. Yakuba, N.Yu. Pili-penko, E.V. Belik, P.Rishome, F.Simone. – Krasnodar: KubGAU, 2013.– 115 s.
2. Gorbatyj, Yu.E. Sverhkriticheskoe sostoyanie vody / Yu.E. Gorbatyj, G.V. Bondarenko.– Sverhkriticheskie flyuidy. Teoriya i praktika.– 2007.– Т. 2.– №2.– S. 5-19.
3. Probopodgotovka v mikrovolnovykh pechah. Teoriya i praktika / Pod red. G.M. Kingston, L.-B. Dzhesi.– М.: Mir, 1991.– S. 210-221.
4. Lamble, K.J. Microwave digestion procedures for environmental matrices / K.J. Lamble, S.J. Hill // Analyst . – 1998.– Vol. 123.– P. 103-133.
5. Gubiev Yu.K. Nauchno-prakticheskie osnovy tehnologicheskikh protsessov pischevyh proizvodstv v elektromagnitnom pole SVCh: avtoref. diss. ... d. tehn. n.– М.: МТИПП, 1990.– S. 33-35.
6. Sposob proizvodstva ekstrakta iz drevesiny duba, Patent RF 2251889; O.I. Kvasenkov, A.B. Tyuryukov.– Byul. №14.– 2005.
7. Yakuba Yu.F. Primenenie SVCh-ekstraktsii i vysokoeffektivnogo kapillyar-nogo elektroforeza dlya analiza vegetativnyh organov rasteniy / Yu.F. Yakuba // Mater. II Mezhdunar. konf. «Sovremennoe pribornoe obespechenie i metody analiza pochv, kor-mov, rasteniy i sel'skohozyaystvennogo syr'ya».– М., 2004.– S. 71-74.