

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ФРЕОНОВ В СУБ- И СВЕРХКРИТИЧЕСКОМ СОСТОЯНИИ В ТЕХНОЛОГИИ ОБРАБОТКИ КСЕНОГЕННОГО КОСТНОГО МАТРИКСА

Д. Ю. Залепугин*, Н. А. Тилькунова, И. В. Чернышова, М. И. Власов

ФГУП «Государственный завод медицинских препаратов» (ГосЗМП), Москва, Россия

*zaledmit@gmail.com

Поступила в редакцию 10.11.2015 г.

Показана возможность использования суб- и сверхкритических фреонов в процессе очистки костного матрикса. Установлено, что использование фреона 22 позволяет значительно сократить продолжительность процесса очистки костного матрикса по сравнению с диоксидом углерода в сверхкритическом состоянии. Фреоны 23, 134а и 407с, не содержащие атомов хлора, оказались практически неэффективными в данном процессе.

Ключевые слова: сверхкритическая экстракция, фреоны, диоксид углерода, ксеногенный матрикс.

ВВЕДЕНИЕ

Широкое использование экстракции сверхкритическим (СК) диоксидом углерода обусловлено сравнительно низкими температурой и давлением его перехода в СК состояние, экологической безопасностью и низкой стоимостью [1]. Однако для экстракции полярных веществ, обладающих низкой растворимостью в СК-СО₂, этот метод малоэффективен и требует применения полярных со- растворителей (энтрайнеров). В качестве энтрайнеров обычно применяют изопропиловый спирт, ацетон и др. [2]. Между тем, в ряде публикаций имеются сведения об успешном применении фреонов для извлечения как полярных, так и неполярных веществ из различных матриц [3]. Так, гексафторэтан (фреон R116) использовали как альтернативу СК-СО₂ для создания тонких пленок из трис-(о-диметиламинометилфенил)-индия [4] и меди [5] методом RESS. Сочетание высокой сольватирующей способности и удобных физических параметров привлекает внимание исследователей к субкритическому фреону R134а (1,1,1,2-тетрафторэтану) [6]. В частности, его успешно применяли для экстракции пальмового масла (причем растворимость масла во фреоне была выше, чем в СК-СО₂, в более мягких условиях по температуре и давлению [7]), а также β-каротинов из плодов пальмы [8]. Субкритическую экстракцию фреоном R134а проводили для аналитического определения микроконцентраций медроксипрогестерона в пробах воды [9]. Наличие атомов фтора в структуре фреонов повышают их растворяющую способность для твердых ароматических соединений: так, растворимость бис-п-толилпропана во фреонах R134а и R152а значительно выше, чем в СК-СО₂ [10]. Пентафторэтан (фреон R125) использовали для экстракции урановых комплексов трифторметилалкилдикетонов. Преимущество данного способа экстракции заключалось в том,

что, в отличие от СК-СО₂, фреон R125 не разрушает дикетонаты [11]. Показано, что трифторметан (фреон R23) в сверхкритическом состоянии проявляет большую сольватирующую способность и селективность, чем СК-СО₂, при экстракции сульфонамидов из почвы и некоторых пищевых продуктов (сухое молоко, яичный порошок, говяжья печень и т.д.) [12], причем использование метанола в качестве модификатора существенно повышает эффективность сверхкритического фреона R23 как экстрагента [13].

Как показано выше, фреоны, не содержащие атомов хлора, используются в основном для экстракции неполярных веществ. Между тем, сведения о процессах экстракции полярных соединений хлорсодержащими фреонами весьма немногочисленны. В частности, фреоном R11 (фтортрихлорметаном) экстрагировали продукты жизнедеятельности молочнокислых бактерий [14] и жирные кислоты из сердечной ткани крыс [15] для последующего анализа. Высокой растворяющей способностью для полярных веществ обладает фреон R22 (дифторхлорметан) в субкритическом состоянии. Показано, что эффективность фреона R22 при экстракции жирных кислот и стеролов из растительных тканей равна эффективности экстракции СК-СО₂ с добавлением метанола в качестве энтрайнера [16]. В работе [17] приведены данные о возможном использовании фреона R22 как альтернативы СК-СО₂ в процессах переработки отработавшего ядерного топлива. Подробно исследовалась возможность применения фреона R22 для экстракции биологически активных компонентов растительных матриц (*Calendula officinalis L.* и *Echinacea purpurea L.*) [18]. Высокая растворимость стероидов во фреоне R22 позволяет использовать его в качестве более эффективной, чем СК-СО₂, мобильной фазы при анализе методом сверхкритической хроматографии [19].

Основные свойства фреонов по данным [20] приведены в таблице.

Согласно данным таблицы 1 многие фреоны при нормальных условиях являются газами, что является ценным преимуществом при использовании их в качестве суб- и сверхкритических сред: так же, как и СО₂, они легко удаляются из обрабатываемого материала при сбросе давления по окончании процесса; таким образом, в обработанном материале отсутствуют остаточные количества токсичных органических растворителей, что особенно важно при обработке изделий медицинского назначения. Более того, низкие критические параметры ряда фреонов, например, R13 ($T_{кр.} = 28,8\text{ }^{\circ}\text{C}$, $P_{кр.} = 38,8\text{ атм}$) и R23 ($T_{кр.} = 25,9\text{ }^{\circ}\text{C}$, $P_{кр.} = 48,2\text{ атм}$), обеспечивают условия обработки даже более мягкие, чем СК-СО₂. Большинство фреонов (за исключением тетрафторметана R14 и тетрафторэтана R116) характеризуются значениями дипольных моментов в диапазоне 0,46–2,9 D, что позволяет предположить их более высокую в сравнении с СК-СО₂ растворяющую способность в отношении широкого круга как неполярных, так и полярных веществ. Интересно, что хлорсодержащие фреоны, характеризующиеся средними значениями дипольного момента, в то же время обладают значительной растворимостью в воде, превышающей таковую для фреонов, не содержащих хлора, на 2–3 порядка.

Ранее нами был разработан метод обработки костного матрикса в суб- и сверхкритических средах [21], включающий следующие основные операции:

- удаление липидных компонентов в среде сверхкритического диоксида углерода;
- депротеинизация и удаление клеточных элементов обработкой 3 %-ной перекисью водорода;
- промывание субкритической водой;
- окончательная обработка в среде сверхкритического СО₂.

Использование фреонов в суб- и сверхкритическом состоянии в технологии обработки ксеногенного костного матрикса

На основании данных о том, что в ряде случаев фреоны в суб- и сверхкритическом состоянии более эффективны в качестве экстрагентов, чем СК-СО₂, авторами данной работы исследована возможность их использования для очистки ксеногенного костного матрикса от липидных компонентов.

Таблица

Физические свойства фреонов

| № | Формула | Техническое обозначение | Температура кипения, °С | Критические параметры T, °С/P, атм | Дипольный момент, D | Растворимость в воде при 20 °С, вес. % |
|----|--------------------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------------------|---------------------|--|
| 1 | CFCl ₃ | R11 | 23,7 | 198/43,7 | 0,46 | 0,14 |
| 2 | CF ₂ Cl ₂ | R12 | -29,7 | 112/41,2 | 0,55 | 0,035 |
| 3 | CF ₃ Cl | R13 | -81,5 | 28,8/38,8 | 0,5 | 0,0109 |
| 4 | CFCiH ₂ | R31 | -9,0 | 151,7/60,0 | 1,82 | 1,19 |
| 5 | CF ₄ | R14 | -128 | -45,6/37,5 | 0 | 0,0021 |
| 6 | CFCi ₂ H | R21 | 8,7 | 178,5/51,9 | 1,29 | 1,22 |
| 7 | CF ₂ CiH | R22 | -40,9 | 96,1/50,0 | 1,41 | 0,365 |
| 8 | CF ₃ H | R23 | -82,2 | 25,9/48,2 | 1,65 | 0,113 |
| 9 | CFCiH ₂ | R31 | -9,0 | 151,7/60,0 | 1,82 | 1,19 |
| 10 | CF ₂ H ₂ | R32 | -51,7 | 78,4/58,4 | 1,98 | * |
| 11 | CFH ₃ | R41 | -79,6 | 44,6/58,6 | 1,86 | 0,22 |
| 12 | CF ₂ CiCFCi ₂ | R113 | 47,5 | 214,0/34,1 | 1,44 | 0,017 |
| 13 | CF ₂ CiCF ₂ Cl | R114 | 3,55 | 145,7/32,7 | 0,80 | 0,007 |
| 14 | CF ₃ CF ₂ Cl | R115 | -38,97 | 80,0/31,2 | 0,80 | * |
| 15 | CF ₃ CF ₃ | R116 | -78,2 | 19,9/30,4 | 0 | 0,00075 |
| 16 | CF ₃ CF ₂ H | R125 | -48,5 | 67,7/33,9 | 1,54 | * |
| 17 | CF ₃ CCiH ₂ | R133a | 6,1 | 155,0/41,0 | 1,64 | * |
| 18 | CF ₂ HCF ₂ H | R134 | -22,5 | 110,3/37,7 | 2,9 | * |
| 19 | CF ₃ CFH ₂ | R134a | -26,5 | 101,5/40,6 | 1,8 | * |
| 20 | CFCi ₂ CH ₃ | R141 b | 31,9 | 201,5/42,5 | * | * |
| 21 | CF ₂ CiCH ₃ | R142 b | -9,2 | 136,5/41,4 | 2,14 | 0,162 |
| 22 | CF ₃ CH ₃ | R143a | -47,6 | 73,1/41,1 | 2,3 | * |
| 23 | CF ₂ HCH ₃ | R152a | -24,6 | 113,5/44,9 | 2,3 | 0,13 |
| 24 | CO ₂ ** | — | -78*** | 31,1/72,8 | 0 | 0,145 |

* Данные отсутствуют.

** Дано для сравнения.

*** Температура сублимации.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для проведения эксперимента были выбраны фреон 22 (дифторхлорметан), фреон 134а (1,1,1,2-тетрафторэтан), фреон 23 (трифторметан) и фреон 407с (смесь фреонов R32, R125 и R134а; массовые доли компонентов соответственно 23, 25 и 52 %; $T_{\text{кип.}} = -43,56\text{ }^{\circ}\text{C}$; $T_{\text{кр.}} = 86,7\text{ }^{\circ}\text{C}$; $P_{\text{кр.}} = 46\text{ атм}$), диоксид углерода 99,8 %, ГОСТ 8050-85, а также смесь диоксида углерода и фреона R22 в соотношении $\text{CO}_2/\text{R22}$ по массе 80/20 %. Все газы и их смеси были приобретены на фирме «Леона», г. Москва. Следует отметить, что фреоны R23, R134а и R407с безопасны для озонового слоя (потенциал разрушения озонового слоя $\text{ODP} = 0$, для трихлорметана $\text{ODP} = 1$). Фреон R22 представляет собой соединение с низкой опасностью для озонового слоя ($\text{ODP} = 0,05$) [17].

Образцы ксеногенного костного матрикса (губчатая бычья кость), предварительно очищенные от наружных тканей, были любезно предоставлены специалистами ЦИТО им. Приорова. Образцы имели форму параллелепипеда размерами $1,0 \times 1,2 \times 2,2\text{ см}$ и весом 2,6—2,8 г.

Исходный образец помещали в ячейку высокого давления установки сверхкритической экстракции (SFChem goszmp), принципиальная схема которой представлена на рис. 1. Все соединения между частями установки выполнены из нержавеющей стали, уплотняющие материалы — фторпласт-4 и графлекс. Для заполнения реактора экстрагентом и создания давления (до 300 атм) применяли насос «Кнауер»; для экстракции использовали ячейку высокого давления из нержавеющей стали объемом 55 мл.

Обработку костного матрикса в суб- и сверхкритических условиях осуществляли следующим образом: после установления необходимой температуры в термостате T и расхода экстрагента, заполняли бустерный баллон 3 (вентиль $V1$ открыт, вентили $V2$, $V3$ закрыты). Назначение бустерного баллона — предотвращение резких скачков давления в системе, а также предварительный нагрев экстрагента до заданной температуры. Открывая вентиль $V2$, заполняли экстрагентом ячейку высокого давления 4, в которую предварительно был помещен обрабаты-

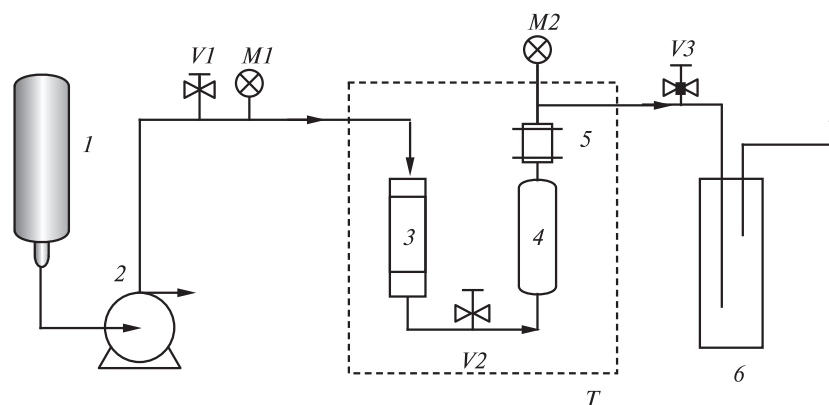


Рис. 1. Принципиальная схема установки для обработки ксеногенного костного матрикса в суб- и сверхкритических условиях:

1 — баллон с экстрагентом (CO_2 , фреон или вода); 2 — насос высокого давления с охлаждением головок; 3 — бустерный баллон; 4 — ячейка высокого давления; 5 — расширитель; 6 — сепаратор; $V1$ — вентиль высокого давления; $V2$, $V3$ — обогреваемые вентили; $M1$, $M2$ — манометры; T — термостат

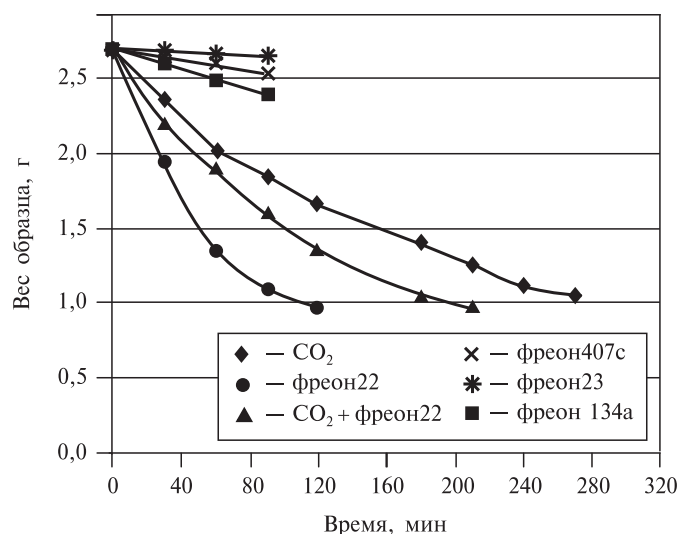


Рис. 2. Динамика потери веса образцов при обработке различными экстрагентами; весовое соотношение компонентов в экстрагенте «CO₂+фреон 22» — 80/20

аемый образец. Затем, открывая вентиль *V3*, устанавливали проточный динамический режим с определенным расходом. Между ячейкой высокого давления и вентилем *V3* располагается расширитель небольшого объема (10 мл) 5, назначение которого — предотвратить образование газовой фазы в ячейке высокого давления при резком открытии вентиля *V3* и, в конечном счете, сохранить равномерность динамических параметров процесса. Белково-липидную субстанцию, вымываемую из кости, собирали в сепараторе 6. Эксперимент проводили до постоянного веса образца. После завершения процесса подачу экстрагента отключали и через вентиль *V3* давление в ячейке высокого давления сбрасывали до нуля.

Процесс проводили в динамическом режиме при давлении 270 атм и температуре 40 °С. Скорость подачи экстрагента в ячейку составляла 20 г/мин. Через каждые 40 мин эксперимент прерывали. Образец подсушивали в термостате при температуре 40 °С до постоянного веса для десорбции из него экстрагента. Затем образец вновь помещали в термостат, и подобные циклы повторяли до постоянного веса образца. Динамика потери веса образца при обработке различными экстрагентами представлена на рис. 2. Экспериментальные кривые построены как усредненные по результатам трех параллельных экспериментов.

Согласно методике, ранее разработанной авторами [21], последующим стадиям обработки (депротеинизация и удаление клеточных элементов, промывание субкритической водой и окончательная обработка в среде сверхкритического CO₂) подвергались лишь образцы, вес которых был доведен до постоянного (обработанные фреоном R22, СК-CO₂ и смесью CO₂/фреон R22 80/20).

Депропротеинизация и удаление клеточных элементов матрикса достигались обработкой образца 3 % перекисью водорода в течение 24 часов. За это время образец теряет ~7 % веса, что соответствует данным, представленным в работе [21].

Затем на той же установке (рис. 1) из образца удалялись остаточные количества перекиси водорода и полярные продукты окисления обработкой водой под давлением в течение 40 мин при температуре 20 °С и давлении 200 атм при скорости потока 20 г/мин с последующей сушкой при 40 °С до постоянного веса.

К статье «Использование фреонов в суб- и сверхкритическом состоянии в технологии обработки ксеногенного костного матрикса»
Д.Ю. Залепугин, Н.А. Тилькунова, И.В. Чернышова, М.И. Власов



Рис. 3. Образец ксеногенного костного матрикса, очищенный в среде субкритического фреона 22:
a — исходный; *b* — после окончательной обработки

На последней стадии образец подвергался окончательной обработке сверхкритическим диоксидом углерода при температуре 40 °С и давлении 280 атм в течение 20 мин (для удаления остатков неполярных веществ). Внешний вид исходного образца до начала эксперимента и после последней обработки представлен на рис. 3 (см. цв.вкладку).

Из рассмотрения данных графика на рис. 2 следует, что использование субкритического фреона R22 для очистки ксеногенного костного матрикса гораздо более эффективно, чем при обработке сверхкритическим диоксидом углерода. Так, время удаления из матрикса равных количеств белковых и липидных компонентов (~1,7 г из каждого образца) в случае фреона R22 почти в 2,5 раза меньше, чем при использовании СК-СО₂. Эффективность применения для этих целей смеси СО₂ и фреона R22 в соотношении 80/20 занимает промежуточное положение между достигаемой при использовании чистых компонентов. Образцы костного матрикса, полученные при очистке фреоном R22 (рис. 3), по внешнему виду не отличаются от образцов, обработанных СК-СО₂ [21].

Следует отметить, что фреоны, не содержащие атомов хлора (R23, R134a и R407c), оказались крайне неэффективными экстрагентами в данном процессе: при их использовании количество белковых и липидных компонентов в образцах практически не снижалось в течение длительного времени.

ВЫВОДЫ

1. Впервые показана возможность очистки костного матрикса в среде суб- и сверхкритического фреонов.

2. Установлено, что использование фреона R22 значительно (в 2,5 раза) сокращает продолжительность процесса очистки костного матрикса по сравнению с диоксидом углерода в сверхкритическом состоянии.

3. Показано, что фреоны, не содержащие атомов хлора (R23, R134a и R407c), неэффективны в данном процессе.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дроздов А.Л., Беленева И.А., Лепешкин Ф.Д., Крутикова А.А., Устинович К.Б., Покровский О.И., Паренаго О.О. СКФ-ТП. 2012. Т. 7. № 4. С. 59.
2. Косяков Д.С., Хвиюзов С.С., Ульяновский Н.В., Кожевников А.Ю., Боголицын К.Г. СКФ-ТП. 2012. Т. 7. № 4. С. 52.
3. Newman D.A., Hoefing T.A., Beitle R.R., Beckman E.J., Enick R.M. J. of Supercrit. Fluids. 1993. Vol. 6. No. 4. P. 205.
4. Popov V.K., Bagratashvili V.N., Antonov E.N., Lemenovski D.A. Thin Solid Films. 1996. Vol. 279. No. 1—2. P. 66.
5. Louchev O.A., Popov V.K., Antonov E.N. J. of Crystal Growth. 1995. Vol. 155. No. 3—4. P. 276.
6. Corr S. J. Fluorine Chem. 2002. Vol. 118. No. 1. P. 55.
7. Mustapa N., Manan Z.A., Mohd Azizi C.Y., Nik Norulaini N.A., Mohd Omar A.K. J. Food Eng. 2009. Vol. 95. No. 4. P. 606.
8. Mustapa N., Manan Z.A., Mohd Azizi C.Y., Setianto W.B., Mohd Omar A.K. Food Chemistry. 2011. Vol. 125. No. 1. P. 262.
9. Han Y., Ma Q., Lu J., Xue Y., Xu J., Xue C. J. of Chromatography B. 2012. Vol. 897. P. 90.
10. Liu J., Li D., Byun H.S., McHugh M.A. Fluid Phase Equilibria. 2008. Vol. 276. No. 1. P. 39.
11. Babain V.A., Kamachev V.A., Kiseleva R.N., Murzin A.A., Smirnov I.V., Shadrin A.Yu., Yakimovich S.I., Zerova I.V. Radiochemistry. 2003. Vol. 45. No. 6. P. 602.
12. Combs M.T., Ashraf-Khorassani M., Taylor L.T. Anal. Chem. 1996. Vol. 68. No. 24. P. 4507.

Использование фреонов в суб- и сверхкритическом состоянии в технологии обработки ксеногенного костного матрикса

13. Ashraf-Khorassani M., Taylor L.T., Schweighardt F.K. J. AOAC Int. 1996. Vol. 79. No. 5. P. 1043.
 14. Tracey R.P., Britz T.J. Appl. Environ. Microbiol. 1989. Vol. 55. No. 6. P. 1617.
 15. Jungling E., Kammermeier H. Anal. Biochem. 1988. Vol. 171. P. 150.
 16. Klink G., Buchs A., Güllacar F.O. Organic Geochemistry. 1994. Vol. 21. No. 5. P. 437.
 17. Камачев В.А., Шадрин А.Ю., Мурзин А.А., Шафиков Д.Н. СКФ-ТП. 2007. Т. 2. № 3. С. 48.
 18. Демин М.С. Дис. ... канд. фарм. наук. ВИЛАР, Москва, 2010.
 19. Li S.F.Y., Ong C.P., Lee M.L., Lee H.K. J. Chromatography A. 1990. Vol. 515. P. 515.
 20. Максимов Б.Н., Барбанов В.Г., Серушкин В.С. и др. Промышленные фторорганические продукты: Справочник. Л.: Химия, 1990.
 21. Залепугин Д.Ю., Зайцев В.В., Тилькунова Н.А., Чернышова И.В., Селезнева И.И., Никонова Ю.А., Власов М.И. СКФ-ТП. 2014. Т. 9. № 3. С. 4.
-

**APPLICATION OF SUB- AND SUPERCRITICAL FREONS
IN XENOGENIC BONE MATRIX PROCESSING**

D. Yu. Zalepugin, N. A. Tilkunova, I. V. Chernyshova, M. I. Vlasov

Federal State Unitary Enterprise «State Plant of Medicinal Drugs», Moscow, Russia

Sub- and supercritical freons can be successfully used in the bone matrix cleaning process. In the case of freon R22 the duration of the bone matrix cleaning significantly decreases as compared to the same procedure with supercritical carbon dioxide. Freons R23, R134a and R407c which do not contain chlorine atoms, are practically ineffective in this process.

Key words: supercritical extraction, freons, carbon dioxide, xenogenic matrix.
