

Низкомолекулярные соединения

УДК 615.322:547.913(571)

СВЕРХКРИТИЧЕСКАЯ ФЛЮИДНАЯ ЭКСТРАКЦИЯ ХЛОРОФИЛЛОВ И КАРОТИНОИДОВ БАГУЛЬНИКА БОЛОТНОГО (*LEDUM PALUSTRE*)

© А.С. Попова*, А.Д. Ивахнов, Т.Э. Скребец, К.Г. Боголицын

Северный (Арктический) федеральный университет им. М.В. Ломоносова,
наб. Северной Двины, 17, Архангельск, 163002 (Россия),
e-mail: alex772977@gmail.com

Цель данной работы – исследование влияния параметров сверхкритической флюидной экстракции и качества исходного сырья на выходы пигментов из багульника болотного. В качестве метода извлечения целевых компонентов применялась сверхкритическая флюидная экстракция. Для количественного определения целевых компонентов применялись спектрофотометрический и хроматографический методы, антиоксидантная активность определялась на анализаторе антиоксидантной активности «Близар». Проведено сопоставление условий выделения хлорофиллов и каротиноидов багульника болотного (*Lédum palústre*) при применении в качестве экстрагентов сверхкритического диоксида углерода и этилового спирта. Определены параметры сверхкритической флюидной экстракции для получения экстрактов, обогащенных одним или обоими пигментами. Установлено, что варьирование давления и температуры флюида, продолжительности обработки и влажности сырья позволяет получать экстракты, обогащенные одним или обоими извлекаемыми пигментами. Оптимальное количество этанола, используемого в качестве соразтворителя, составляет 5 объемн.% и является необходимым и достаточным для эффективной экстракции пигментов сверхкритическим CO₂. Полученные данные значимы для фармацевтической, пищевой и парфюмерно-косметической промышленности, где требуются натуральные красители и антиоксиданты. В работе решается задача разработки их получения и выделения. Разрабатываются технологии получения пигментов из растений, которые ранее широко применялись для изготовления лекарственных препаратов.

Ключевые слова: биологически активные вещества, багульник болотный, сверхкритическая флюидная экстракция, диоксид углерода, хлорофиллы, каротиноиды.

Введение

Багульник болотный – это небольшой вечнозеленый кустарник семейства вересковых, образующий темно-бурые плоды. Растение является дикорастущим, особый интерес представляют его побеги. Ареал произрастания – зона тундры и лесов европейской части России, на Дальнем Востоке и в Сибири.

В медицине применяют настои или порошки багульника болотного, которые способствуют заживляющему, антиспазматическому и обезболивающему действию. Одними из наиболее важных действующих компонентов являются антиоксиданты, к которым относятся каротиноиды и хлорофиллы. Данные соединения могут оказывать как суммарное положительное действие (заживляющее, очищающее, укрепляющее), так и вызывать противоположно действующие эффекты (каротиноиды защищают фотосинтезирующие организмы от летального действия их собственного хлорофилла, являющегося сенсбилизатором фотоокисления). В литературе практически не встречаются публикации о исследованиях применения багуль-

ника как источника природных красителей: хлорофиллов и каротиноидов.

Основным способом извлечения природных красителей является экстракция этиловым спиртом. В качестве альтернативы традиционным методам жидкостной экстракции рассматривается сверхкритическая флюидная экстракция. Данный метод способствует более полному извлечению целевых ве-

Попова Александра Сергеевна – инженер,
e-mail: alex772977@gmail.com

Ивахнов Артем Дмитриевич – преподаватель кафедры
теоретической и прикладной химии,
e-mail: ivahnov-tema@yandex.ru

Скребец Татьяна Эдуардовна – доцент кафедры
теоретической и прикладной химии,
e-mail: tskrebets@mail.ru

Боголицын Константин Григорьевич – заведующий
кафедрой теоретической и прикладной химии,
e-mail: k.bogolitsin@narfu.ru

* Автор, с которым следует вести переписку.

ществ без разрушения нестабильных природных комплексов; также является одним из способов концентрирования небольших количеств биологически активных веществ. Растворители в сверхкритическом состоянии легче удаляются из полученных экстрактов, не загрязняя целевого продукта. Применение углекислого газа позволяет избежать использования в качестве соразтворителя токсичных веществ, таких как предельные и хлорированные углеводороды. Некоторые растворители достаточно дешевы, экологичны и имеют невысокие критические параметры, что способствует разработке новых технологий для лабораторного синтеза и промышленности [1–3]. Одним из таких растворителей является сверхкритический диоксид углерода, имеющий высокую экстрагирующую способность в отношении компонентов растительных материалов, в частности, пигментов и масел [4–16, 21]. Экстракты, полученные с помощью сверхкритической флюидной экстракции, безопасны для окружающей среды, а также здоровья человека.

Цель данной работы – исследование возможности выделения хлорофиллов и каротиноидов багульника болотного при применении различных условий экстракции.

Экспериментальная часть

В качестве объекта исследования выбран багульник болотный, собранный в Вельском районе Архангельской области. Исходная влажность сырья составила $43,02 \pm 1,43\%$. Содержание пигментов в исходном сырье (β -каротин (84 ± 10) мг/кг а.с.с., хлорофилла (16 ± 3) г/кг а.с.с.) было определено путем исчерпывающей экстракции ацетоном в аппарате Сокслета.

Пробоподготовка сырья для изучения влияния параметров экстракции (давления, температуры и продолжительности экстракции) и качества сырья (влажности) на выход хлорофиллов и β -каротина при СКЭ проводилась посредством измельчения сырья в сыром виде. Для исследования влияния влажности сырье высушивалось в сушильном шкафу при комнатной температуре.

Сверхкритическую флюидную экстракцию проводили на установке MV-10ASFE производства Waters Corporation. Диапазон параметров работы прибора: максимальное давление 350 атм., максимальная температура 80 °С. Мелкоизмельченную навеску сырья (1 г) определенной влажности помещали в автоклав объемом 10 мл и обрабатывали диоксидом углерода при заданных температурах (от 30 до 70 °С), давлениях (100–350 атм.) в течение определенного времени (от 20 до 80 мин). Автоклав прогревался при требуемой температуре в течение процесса экстракции. Скорость подачи диоксида углерода составляла 2,85 мл/мин, скорость подачи соразтворителя 0,15 мл/мин, таким образом доля соразтворителя в потоке составляет 5 объемн.%. При варьировании количества соразтворителя (от 5 до 25 объемн.%) скорости подачи CO_2 и этанола изменяли таким образом, чтобы суммарная скорость составляла 3 мл/мин.

Содержание хлорофиллов в экстрактах определяли фотометрическим методом в видимой области спектра на спектрофотометре Specord 250 Plus. Суммарное содержание хлорофиллов рассчитывали по оптической плотности при длине волны $\lambda=664$ нм при коэффициенте молярного поглощения $\epsilon=82,6$.

Количественное определение β -каротина проводили методом ВЭЖХ с использованием хроматографа LC-30 «Nexera» (Shimadzu, Япония), оснащенного диодно-матричным детектором. Разделение осуществлялось на колонке Luna-C18(2) ($250 \times 4,6$ мм, 5 мкм), в качестве элюента использовалась смесь ацетонитрила с изопропиловым спиртом, в соотношении 80 : 20, содержащим ацетат аммония концентрацией 50 ммоль/л. Температура термостата – 35 °С, объем инъекции составлял 20 μ л при скорости потока 1,0 мл/мин. Разделение проводилось в изократическом режиме. Запись хроматограмм вели по поглощению 450 нм, при снятии спектра в диапазоне 350–800 нм, с шагом 1 нм. Время анализа составляло 35 мин.

Количество β -каротина определяли по площади соответствующего пика на хроматограмме.

Степень извлечения пигментов рассчитывали в процентах от содержания их в исходном сырье.

Суммарное содержание антиоксидантов (АО) определяли на анализаторе антиоксидантной активности Близар, используемом для суммарного определения водо- и жирорастворимых антиоксидантов в пищевых продуктах, напитках, биологически активных добавках, лекарственных препаратах [17–20]. Принцип работы прибора основан на проточно-инжекционном методе с последующим амперометрическим детектированием суммарного содержания антиоксидантов. В качестве элюента применяли ортофосфорную кислоту. Скорость подачи элюента 1,2 мл/мин. Время анализа составляет 2 мин. Калибровку прибора осуществляли по галловой кислоте, концентрацию АО выражали в мг галловой кислоты/литр.

Результаты и обсуждение

Анализ результатов экстракции пигментов сверхкритическим CO₂ показал (рис. 1), что максимальная степень извлечения хлорофилла достигается при 300 атм и 60 – 70 °С при добавке в реакцию среду 5 объем.% этанола. Максимальная степень извлечения β-каротина может быть достигнута при аналогичных условиях (рис. 2).

Увеличение продолжительности обработки сырья позволяет достичь высоких выходов обоих пигментов при меньших температурах и давлениях (табл. 1 и 2).

Поскольку свежее сырье имеет достаточно высокую влажность (43%), провели изучение влияния влажности багульника болотного на процесс экстракции пигментов при давлении 300 атм, температуре 70 °С и доле этанола 5 объем.%, варьируя влажность исходного сырья от 43% до 15% путем высушивания. Продолжительность экстракции составила 20 мин. Результаты представлены на рисунке 3.

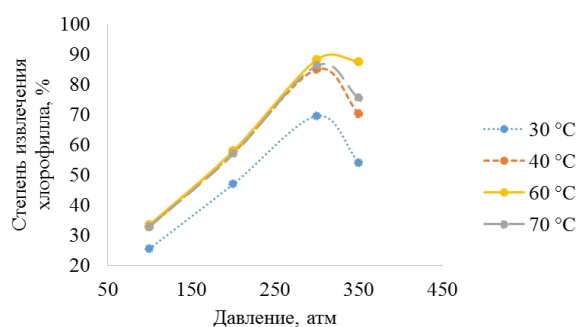


Рис. 1. Зависимость степени извлечения хлорофиллов от давления при различных температурах

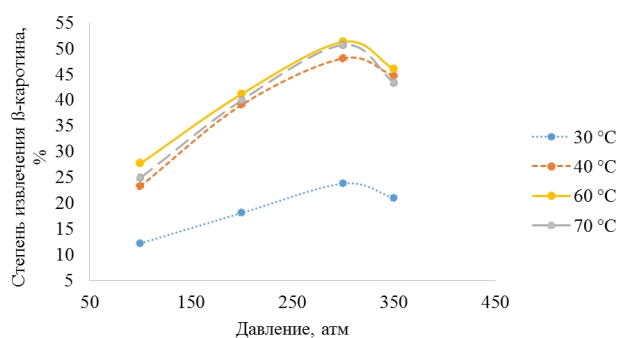


Рис. 2. Зависимость степени извлечения β-каротина от давления при различных температурах

Таблица 1. Степень извлечения хлорофилла в зависимости от продолжительности экстракции

Т, °С	Р, атм	τ, МИН						
		5	10	15	20	40	60	80
30	200	–	–	–	48,5	58,2	77,6	87,3
	300	–	–	–	66,3	68,9	73,3	77,6
	350	–	–	–	56,9	70,6	78,8	81,5
40	200	–	–	–	49,6	51,0	52,4	97,1
	300	–	–	–	48,5	87,3	97,0	100,0
	350	–	–	–	67,9	77,6	77,6	100,0
60	300	48,5	58,2	67,9	77,6	–	–	–
	350	48,5	58,2	67,9	100,0	–	–	–
70	300	58,2	59,2	77,6	87,3	–	–	–
	350	48,5	67,9	87,3	88,3	–	–	–

Таблица 2. Степень извлечения β-каротина в зависимости от продолжительности экстракции

Т, °С	Р, атм	τ, МИН						
		5	10	15	20	40	60	80
30	200	–	–	–	25,0	50,0	50,0	75,0
	300	–	–	–	25,0	50,0	50,0	75,0
	350	–	–	–	25,0	75,0	75,0	75,0
40	200	–	–	–	50,0	50,0	50,0	50,0
	300	–	–	–	50,0	75,0	100,0	100,0
	350	–	–	–	50,0	75,0	75,0	75,0
60	300	50,0	50,0	50,0	50,0	–	–	–
	350	25,0	25,0	50,0	100,0	–	–	–
70	300	25,0	50,0	75,0	75,0	–	–	–
	350	25,0	75,0	100,0	100,0	–	–	–

Из рисунка следует, что с уменьшением влажности багульника болотного от 43% до 15% выход β -каротина увеличивается от 60 до 83%. Резкое увеличение выхода наблюдается при наименьшей влажности сырья. Выход хлорофиллов увеличивается от 51 до 69% при увеличении влажности от 15 до 43%. Таким образом, из высушенного исходного сырья можно получать экстракты, обогащенные каротином, в то время как использование для экстракции свежего материала позволяет получить экстракты, обогащенные обоими пигментами. Анализ данных по суммарной концентрации антиоксидантов в экстракте показал (рис. 4), что при высокой влажности общая концентрация веществ, обладающих антиоксидантной активностью, снижается за счет разбавления экстракта водой, присутствующей в растительном материале.

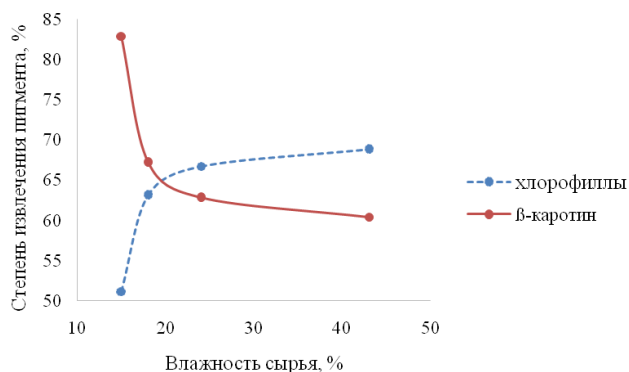


Рис. 3. Зависимость степени извлечения пигментов от влажности сырья

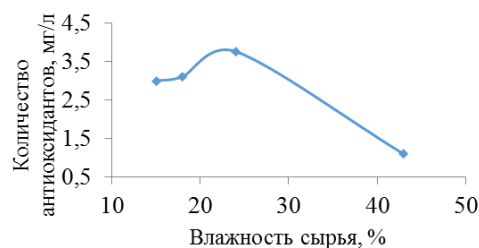


Рис. 4. Зависимость концентрации антиоксидантов в экстракте от влажности сырья

При исследовании влияния доли соразтворителя на выход пигментов был применен этиловый спирт, так как он малотоксичен, экологичен, летуч (легко удаляется из раствора и не загрязняет продукт). Изучение влияния доли соразтворителя в составе экстрагента на процесс экстракции пигментов проводили при давлении 300 атм и температуре 70 °С при продолжительности экстракции 20 мин, варьируя долю соразтворителя от 5 до 25%. Предварительно было установлено, что степень извлечения обоих пигментов составляет менее 10% в отсутствие соразтворителя в реакционной среде, а уже 5%-ная добавка этанола существенно интенсифицирует процесс. Увеличение доли соразтворителя до 25% снижает степень извлечения каротина почти вдвое и не оказывает влияния на процесс экстракции хлорофилла сверхкритическим диоксидом углерода. Таким образом, доля этанола 5% является необходимой и достаточной для эффективной экстракции пигментов.

Выводы

1. Установлена возможность извлечения хлорофиллов и каротиноидов багульника болотного (*LEDUM PALUSTRE*) методом сверхкритической флюидной экстракции при применении в качестве растворителя сверхкритического диоксида углерода и соразтворителя этилового спирта.
2. Варьируя давление и температуру флюида, продолжительность обработки и влажность сырья можно получать экстракты, обогащенные одним или обоими извлекаемыми пигментами.
3. Количество этанола, используемого в качестве соразтворителя, составляет 5 объемн.% и является необходимым и достаточным для эффективной экстракции пигментов сверхкритическим CO₂.

Экспериментальная часть работы выполнена на оборудовании ЦКП НО «Арктика» (Северный (Арктический) федеральный университет имени М.В. Ломоносова).

Список литературы

1. Зилфикаров И.Н., Челомбитько А.В., Алиев А.М. Обработка лекарственного растительного сырья сжиженными газами и сверхкритическими флюидами. Пятигорск, 2007. 244 с.
2. Arai Y., Sako T., Takebayashi Y. Supercritical fluids: molecular interactions, physical properties and new applications. Berlin: Springer, 2002. 345 p.

3. Reverchon E., De Marco I. Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter // *J. of Supercritical Fluids*. 2006. Pp. 146–166.
4. Popovici C., Gitin L., Alexe P. Characterization of walnut (*Juglans regia* L.) green husk extract obtained by supercritical carbon dioxide fluid extraction // *Journal of Food and Packaging Science, Technique and Technologies*. 2013. Pp. 104–108.
5. Macias-Sanchez M.D. Supercritical fluid extraction of carotenoids and chlorophyll a from *Synechococcus* sp // *J. of Supercritical Fluids*. 2007. Vol. 39. Pp. 323–329.
6. Macias-Sanchez M.D. Extraction of carotenoids and chlorophyll from microalgae with supercritical carbon dioxide and ethanol as cosolvent // *J. Sep. Sci.* 2008. Vol. 31. Pp. 1352–1362.
7. Catarina Guedes A. Supercritical fluid extraction of carotenoids and chlorophylls a, b and c, from a wild strain of *Scenedesmus obliquus* for use in food processing // *J. of Food Engineering*. 2013. Pp. 478–482.
8. Macias-Sanchez M.D. Supercritical fluid extraction of carotenoids and chlorophyll a from *Nannochloropsis gaditana* // *Journal of Food Engineering*. 2013. Pp. 245–251.
9. Duarte C., Moldao-Martins M., Gouveia A., Beirao da Costa S., Leitao A.E., Bernardo-Gil M.G. Supercritical fluid extraction of red pepper (*Capsicum frutescens* L.) // *The Journal of Supercritical Fluids*. 2004. Vol. 30. Pp. 155–161.
10. Ивахнов А.Д., Скребец Т.Э., Богданов М.В., Боголицын К.Г., Тремзина Е.Д. Исследование масла брусники, получаемого экстракцией сверхкритическим диоксидом углерода // *Химия растительного сырья*. 2013. №4. С. 65–69.
11. Amosova A., Ivahnov A., Skrebets T., Ulyanovskiy N., Bogolitsyn K. Supercritical fluid extraction of carotenoids from Shantane carrot // *Russian Journal of Physical Chemistry B*. 2014. Vol. 8. N7. Pp. 63–66.
12. Ульяновский Н.В., Косяков Д.С., Боголицын К.Г., Ивахнов А.Д., Амосова А.С. Разработка экспрессных методов аналитической экстракции каротиноидов из растительного сырья // *Химия растительного сырья*. 2012. №4. С. 147–152.
13. Антонов В.И., Ягодин В.И. Спектральные характеристики препаратов хлорофилла из еловой древесной зелени // *Химия растительного сырья*. 2006. №2. С. 47–49.
14. Ribeiro B.D. Technological aspects of β -carotene production // *Food Bioprocess Technol.* 2011. Vol. 4. Pp. 693–701.
15. Патент № 267816 (СССР). Способ получения масляного концентрата каротина / В.А. Папанов / 1970.
16. Deila B. Rodriguez Amaya. A guide to carotenoid analysis in foods. USA, Washington D.C.: ILSI Press, 2001. 65 p.
17. Blois M.S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical // *Nature*. 1958. Vol. 181. Pp. 1199–1200.
18. Elizabeth K. Rao MWA Oxygen radical scavenging activity of Curcumin // *J. Pharmaceu.* 1990. Vol. 58. Pp. 237–240.
19. Oyaizu M. Studies on products of browning reaction: Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine // *Jpn. J. Nutr.* 1986. Pp. 307–315.
20. Хасанов В.В., Рыжова Г.Л., Мальцева Е.В. Методы исследования антиоксидантов // *Химия растительного сырья*. 2004. №3. С. 77–85.
21. Marelli de Souza L., Ferreira K.S., Paes Chaves J.B., Teixeira S.L. Conteúdo de ácido l-ascórbico, β -caroteno e licopeno em frutos de mamão (*Carica papaya*) com e sem mancha fisiológica // *Scientia Agricola*. 2008. Vol. 65. N3. Pp. 246–250.
22. Bushway R.J., Wilson A.M. Determination of α - and β -carotene in fruit and vegetables by high performance liquid chromatography // *Can. Inst. Food. Sci. Technol. J.* 1982. Vol. 15. Pp. 165–169.

Поступило в редакцию 14 сентября 2017 г.

Popova A.S.*, Ivahnov A.D., Skrebets T.E., Bogolitsyn K.G. SUPERCRITICAL FLUID EXTRACTION OF CAROTENOIDS AND CHLOROPHYLL FROM LEDUM PALUSTRE

Northern (Arctic) Federal University named after M.V. Lomonosov, Northern Dvina Emb., 17, Arkhangelsk, 163002 (Russia), e-mail: alex772977@gmail.com

The purpose of this work is to investigate the influence of supercritical fluid extraction parameters and the quality of the feedstock on the yields of pigments from the Led Flyweed. As a method of extracting the target components, supercritical fluid extraction was used. To quantify the target components, spectrophotometric and chromatographic methods were used, antioxidant activity was determined on the anti-oxidant activity analyzer «Blizar». Comparison of the conditions for the isolation of chlorophylls and carotenoids of *Ledum palustre* (*Ledum palustre*) when using supercritical carbon dioxide and ethyl alcohol as extractants is compared. The parameters of supercritical fluid extraction for obtaining extracts enriched with one or both pigments are determined. It is established that the variation of the pressure and temperature of the fluid, the duration of processing and the moisture content of the raw material allows one to extract extracts enriched with one or both extractable pigments. The optimum amount of ethanol used as cosolvent is 5 volume% and is necessary and sufficient for efficient extraction of pigments by supercritical CO₂. The data obtained are significant for the pharmaceutical, food and perfume and cosmetic industries, where natural dyes and antioxidants are required. The problem of developing their production and isolation is solved. Technologies are being developed for obtaining pigments from plants, which were previously widely used for the manufacture of medicines.

Keywords: biologically active agents, Labrador tea marsh, supercritical fluid extraction, carbon dioxide, chlorophyll, carotenoids.

References

1. Zilfikarov I.N., Chelombit'ko A.V., Aliev A.M. *Obrabotka lekarstvennogo rastitel'nogo syr'ia szhizhen-nymi gazami i sverkhkriticheskimi fluidami*. [Treatment of medicinal plant raw materials with liquefied gases and supercritical fluids]. Piatigorsk, 2007, 244 p. (in Russ.).
2. Arai Y., Sako T., Takebayashi Y. *Supercritical fluids: molecular interactions, physical properties and new applications*, Berlin: Springer, 2002, 345 p.
3. Reverchon E., De Marco I. *J. of Supercritical Fluids*, 2006, pp. 146–166.
4. Popovici C., Gitin L., Alexe P. *Journal of Food and Packaging Science, Technique and Technologies*, 2013, pp. 104–108.
5. Macias-Sanchez M.D. *J. of Supercritical Fluids*, 2007, vol. 39, pp. 323–329.
6. Macias-Sanchez M.D. *J. Sep. Sci.*, 2008, vol. 31, pp. 1352–1362.
7. Catarina Guedes A. *J. of Food Engineering*, 2013, pp. 478–482.
8. Macias-Sanchez M.D. *J. of Food Engineering*, 2013, pp. 245–251.
9. Duarte C., Moldao-Martins M., Gouveia A., Beirao da Costa S., Leitao A.E., Bernardo-Gil M.G. *The Journal of Supercritical Fluids*, 2004, vol. 30, pp. 155–161.
10. Ivakhnov A.D., Skrebets T.E., Bogdanov M.V., Bogolitsyn K.G., Tremzina E.D. *Khimiia rastitel'nogo syr'ia*, 2013, no. 4, pp. 65–69. (in Russ.).
11. Amosova A., Ivahnov A., Skrebets T., Ulyanovskiy N., Bogolitsyn K. *Russian Journal of Physical Chemistry B*, 2014, vol. 8, no. 7, pp. 63–66.
12. Ul'ianovskii N.V., Kosiakov D.S., Bogolitsyn K.G., Ivakhnov A.D., Amosova A.S. *Khimiia rastitel'nogo syr'ia*, 2012, no. 4, pp. 147–152. (in Russ.).
13. Antonov V.I., Iagodin V.I. *Khimiia rastitel'nogo syr'ia*, 2006, no. 2, pp. 47–49. (in Russ.).
14. Ribeiro B.D. *Food Bioprocess Technol.*, 2011, vol. 4, pp. 693–701.
15. Patent 267816 (USSR). 1970. (in Russ.).
16. Deila B. Rodriguez Amaya. *A guide to carotenoid analysis in foods*. USA, Washington D.C.: ILSI Press, 2001, 65 p.
17. Blois M.S. *Nature*, 1958, vol. 181, pp. 1199–1200.
18. Elizabeth K. *J. Pharmaceu.*, 1990, vol. 58, pp. 237–240.
19. Oyaizu M. *Jpn. J. Nutr.*, 1986, pp. 307–315.
20. Khasanov V.V., Ryzhova G.L., Mal'tseva E.V. *Khimiia rastitel'nogo syr'ia*, 2004, no. 3, pp. 77–85. (in Russ.).
21. Marelli de Souza L., Ferreira K.S., Paes Chaves J.B., Teixeira S.L. *Scientia Agricola.*, 2008, vol. 65, no. 3, pp. 246–250.
22. Bushway R.J., Wilson A.M. *Can. Inst. Food. Sci. Technol. J.*, 1982, vol. 15, pp. 165–169.

Received September 14, 2017

* Corresponding author.