

УДК 615.322:547.913(571)

СВЕРХКРИТИЧЕСКАЯ ФЛЮИДНАЯ ЭКСТРАКЦИЯ ХЛОРОФИЛЛОВ И КАРОТИНОИДОВ *LAMINARIA DIGITATA*

© А.Д. Ивахнов^{1*}, Т.Э. Скребец¹, К.Г. Боголицын^{1,2}

¹Северный (Арктический) федеральный университет имени
М.В. Ломоносова, ул. Набережная Северной Двины, 17, Архангельск, 163002
(Россия), e-mail: Ivahnov-tema@yandex.ru

²Институт экологических проблем Севера УрО РАН, ул. Набережная
Северной Двины, 23, Архангельск, 163002 (Россия)

Найдены оптимальные условия сверхкритической флюидной экстракции диоксидом углерода хлорофилла из растительного сырья. Проведено сравнение предложенного метода с экстракцией в аппарате Сокслета. Показано, что сверхкритическая флюидная экстракция диоксидом углерода является эффективным и экспрессным способом выделения хлорофиллов и каротиноидов.

Ключевые слова: хлорофиллы, каротиноиды, сверхкритическая флюидная экстракция, *Laminaria digitata*, растительное сырье.

Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП НО «Арктика» (САФУ) при финансовой поддержке Минобрнауки РФ (Уникальный идентификатор работ RFMEFI59414X0004)

Введение

В настоящее время отмечается особый интерес к быстрым и селективным методам извлечения малоизмененных пигментов из растительного сырья отличающихся высокой антиоксидантной активностью. В то же время получаемые продукты, применяемые в пищевом и фармацевтическом производстве, не должны содержать следов токсичных растворителей [1]. Водорослевое сырье арктических морей (например, *Laminaria digitata*) является перспективным источником биологически активных веществ (БАВ). В настоящее время данное сырье используется в основном для получения альгинатов и в некоторых случаях – хлорофилл-содержащих спиртовых экстрактов для нужд фармацевтической и косметической промышленности.

В работе [2] показано, что экстракты ламинарии обладают высокой антиоксидантной способностью, обусловленной содержанием в них хлорофиллов и каротиноидов. В то же время в получаемых экстрактах не обнаружено соединений, обладающих мутагенным воздействием, что особенно важно при их медицинском применении.

Реальной альтернативой существующим экстракционным технологиям может служить сверхкритическая флюидная экстракция [3–6].

Ивахнов Артём Дмитриевич – кандидат химических наук, научный сотрудник центра коллективного пользования научным оборудованием «Арктика», e-mail: ivahnov-tema@yandex.ru

Скребец Татьяна Эдуардовна – кандидат химических наук, профессор кафедры теоретической и прикладной химии, e-mail: t.skrebets@agtu.ru

Боголицын Константин Григорьевич – доктор химических наук, профессор, e-mail: bogolitsyn@agtu.ru

Ввиду уникальных свойств (низкие значения критических параметров – $T_{кр}$ 31 °С, $P_{кр}$ 74 атм, негорючесть и нетоксичность, хорошая растворяющая способность по отношению ко многим веществам) диоксид углерода является одним из основных растворителей, применяемых при реализации сверхкритических флюидных технологий.

* Автор, с которым следует вести переписку.

Сверхкритическая флюидная экстракция (СФЭ) давно известна как метод выделения БАВ [7] и в настоящее время применяется главным образом при промышленном выделении пищевых эфирных масел и кофеина для нужд фармацевтической промышленности. Кроме того, СФЭ обладает высоким потенциалом при извлечении антиоксидантов из водорослевого сырья [8]. Малая устойчивость таких пигментов, как хлорофиллы и каротиноиды, особенно при высоких температурах, обуславливают высокую перспективность применения СФЭ для извлечения из растительного сырья [9].

Целью данной работы является изучение возможности выделения хлорофиллов и каротиноидов из *Laminaria digitata* с использованием в качестве растворителя сверхкритического диоксида углерода.

Экспериментальная часть

Образец *Laminaria digitata* был отобран в 2013 г. на Соловецких островах Белого моря. Образец после промывки дистиллированной водой был высушен на воздухе без воздействия прямых солнечных лучей. Влажность образца составила 6%. Слоевища были размолоты в лабораторной мельнице, и для исследования отобрана фракция 2,0–0,2 мм, составляющая 80% от размолотого образца.

Сверхкритическая флюидная экстракция выполнена с использованием установки MV-10ASFE (Waters, США). Блок-схема установки приведена на рисунке 1. Образец, подлежащий экстрагированию, помещали в автоклав 3. Диоксид углерода из баллона 1 подается насосом высокого давления в автоклав. Соразтворитель из сосуда 10 вводится в поток диоксида углерода отдельным насосом 11. Раствор соразтворителя в диоксиде углерода проходит через стальной капилляр, помещенный вместе с автоклавом в блок термостата 4. Экстракт подвергается декомпрессии в регуляторе давления 5. В связи с сильным охлаждением диоксида углерода при декомпрессии в газовый поток вводится домыывающий растворитель (ацетон), и смесь подогревается до 30 °С в проточном нагревателе 8. Поток газообразного диоксида углерода и раствора целевых компонентов в ацетоне направляется в стеклянный сепаратор 9, где и происходит их разделение. Экстракт представляет собой раствор компонентов сырья в ацетоне.

Навеску сырья (1 г) помещали в автоклав объемом 10 мл и обрабатывали диоксидом углерода при заданных параметрах в течение 20 мин при скорости потока CO₂ 5 мл/мин (температура теплообменника, охлаждающего насос и измеритель потока, 2 °С). Далее объемы диоксида углерода приведены при температуре 2 °С. В ходе опытов варьировали температуру (40, 60, 70, 80 °С) и давление (100–350 атм).

Получаемый в ходе экстракции экстракт разбавляли ацетоном и спектрофотометрически определяли валовое содержание в нем хлорофиллов и каротиноидов.

Определение содержания хлорофилла выполнено методом спектрофотометрии на спектрофотометре Specord 250 Plus. Расчет проведен относительно хлорофилла-а ($\epsilon = 91,2$, $\lambda = 662$ нм) [10, 11].

Каротиноиды также определяли спектрофотометрически после щелочного гидролиза хлорофиллов. Расчет проведен относительно β -каротина ($A_{1\text{см}}^{1\%} = 2600$, $\lambda = 450$ нм) [10, 11]. Определение содержания хлорофиллов и каротиноидов в исходном сырье проведено исчерпывающей экстракцией ацетоном в аппарате Сокслета в течение 12 ч в отсутствие воздействия света. Исходное сырье содержало 348 мг/кг хлорофиллов и 44 мг/кг каротиноидов, что сходно с литературными данными [12].

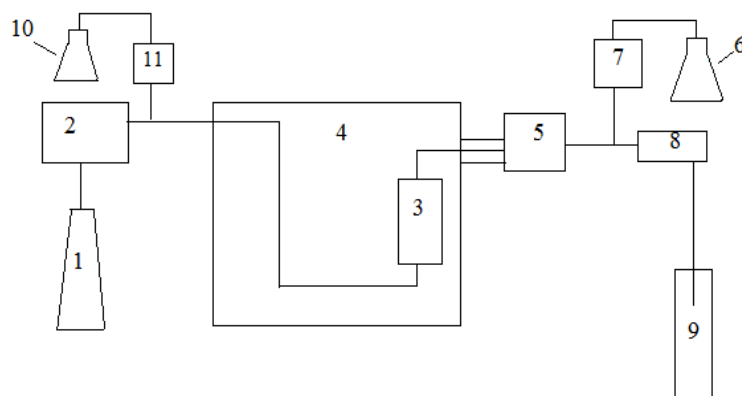


Рис. 1. Блок-схема экспериментальной установки MV-10ASFE (Waters, США)

Результаты и обсуждение

Результаты проведения процесса экстракции представлены на рисунках 2 и 3.

Экстракция при температуре ниже 60 °С показала низкую экстракционную способность сверхкритического диоксида углерода по отношению к каротиноидам, максимальный их выход составил 12,8% при давлении 350 атм. Степень извлечения каротиноидов при температуре 60 °С превышает таковую при температуре 40 °С в 5–6 раз в интервале давлений 300–350 атм. Для выхода хлорофиллов такой тенденции не наблюдается, и выходы продукта при 40 °С оказываются близкими к таковым при 60 °С. Данные закономерности объясняются различным изменением растворимости каротиноидов и хлорофиллов в интервале температур 30–60 °С [13]. Увеличение выхода пигментов при повышении температуры (давление 100–150 атм) несколько не согласуется с изменением плотности флюида. Так, плотность сверхкритического диоксида углерода при давлении 100 атм и температурах 40 и 80 °С составляет 14,28 и 5,03 моль/л соответственно [13], растворяющая способность в общем случае пропорциональна плотности флюида. Однако в данном случае закономерность не подтвердилась.

Практически полное извлечение каротиноидов наблюдается в ходе экстракции при 70 °С и выше и давлении не менее 250–300 атм. Выделение хлорофиллов в данных условиях является крайне недостаточным и степень извлечения составляет максимум 18% при проведении процесса при 40–70 °С и 45% при проведении процесса при 80 °С и давлении 350 атм.

Высокие показатели извлечения пигментов (особенно хлорофиллов) могут быть объяснены высокой влажностью сырья (6%). Остаточная влага, вероятно, поддерживает клетки слоевищ в несколько набухшем состоянии, что способствует повышенной диффузии.

С целью увеличения степени извлечения хлорофиллов нами была проведена экстракция при 80 °С и давлении 300 атм с добавкой к сверхкритическому диоксиду углерода 5, 10, 15 и 20% об этилового спирта от общего потока растворителя. Использование в качестве соразтворителя (модификатора) этилового спирта позволяет отказаться от удаления жидкого растворителя из готового продукта ввиду малой физиологической опасности этанола. Применение в качестве модификатора углеводородов (гексан) хотя и должно способствовать увеличению выхода каротиноидов и от части хлорофиллов, однако приведет к загрязнению продукта. Результаты проведения процесса представлены на рисунке 4.

Из представленных данных следует, что добавка уже 5% об этилового спирта увеличивает выход хлорофиллов практически в полтора раза, а 10% – в два раза. Это объясняется более высокой растворимостью хлорофиллов в сверхкритическом диоксиде углерода, модифицированном спиртами, в том числе этиловым [13].

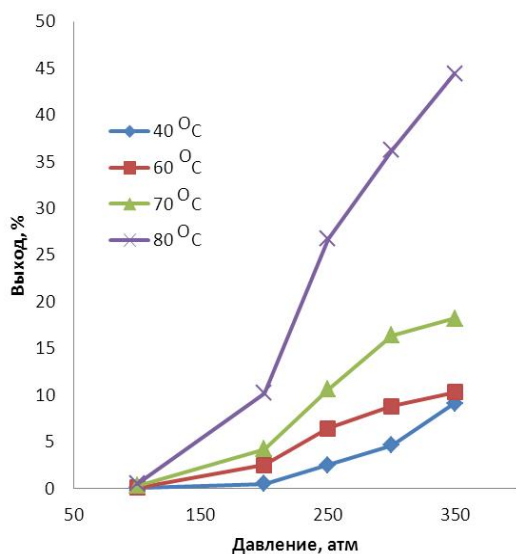


Рис. 2. Зависимость выхода хлорофиллов от температуры и давления при экстракции

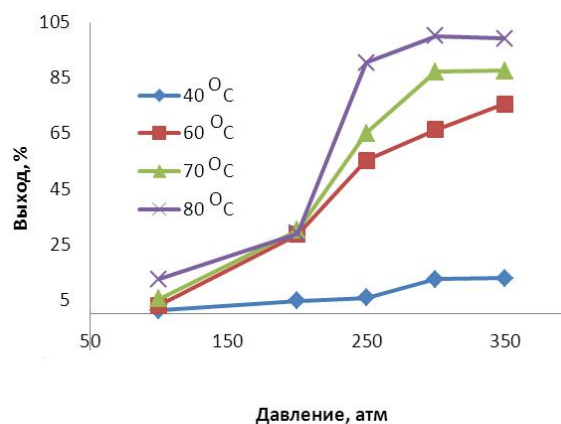


Рис. 3. Зависимость выхода каротиноидов от температуры и давления при экстракции

Таким образом, практически стопроцентное извлечение каротиноидов и хлорофиллов из слоевищ *Laminaria digitata* возможно при проведении сверхкритической флюидной экстракции диоксидом углерода, модифицированным 15% об этилового спирта, при давлении 300 атм, температуре 80 °С, расходе диоксида углерода не менее 85 г/г сырья и скорости потока экстрагента 5 мл/мин.

Снижение расхода этилового спирта возможно путем увеличения продолжительности экстракции, что и было нами опробовано в вышеуказанных условиях, но при снижении расхода этилового спирта до 5%. Параллельно проведены экстракции различной продолжительности в отсутствие спирта. Выход каротиноидов уже при 20-минутной продолжительности экстракции составлял 100%, как показано на рисунке 2. Влияние продолжительности процесса на выход хлорофилла показано на рисунке 5.

Полученные данные говорят о том, что практически полное извлечение хлорофиллов и каротиноидов в указанных условиях достигается за 90 мин. СКФЭ в данных условиях является более экспрессным методом по сравнению с экстракцией в аппарате Сокслета. Добавка 5% об этилового спирта к диоксиду углерода позволяет снизить продолжительность процесса экстракции на 40 мин.

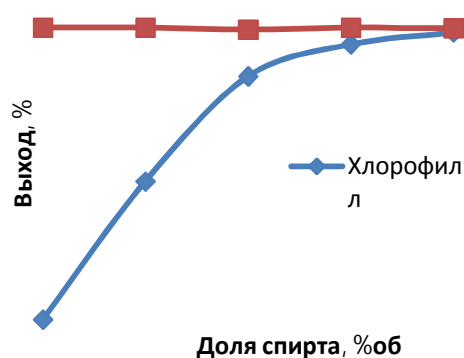


Рис. 4. Зависимость выхода хлорофиллов и каротиноидов от состава экстрагента

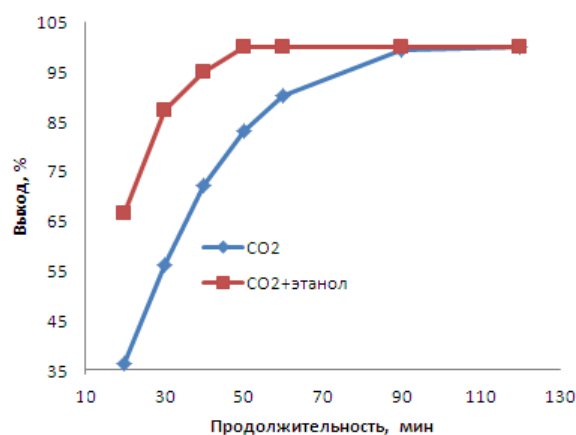


Рис. 5. Зависимость выхода хлорофиллов от продолжительности экстракции

Выводы

1. Показана возможность полного извлечения хлорофиллов и каротиноидов из таллома *Laminaria digitata* методом сверхкритической флюидной экстракции с использованием в качестве растворителя чистого диоксида углерода в сверхкритическом состоянии или модифицированного 5% об этилового спирта.

2. Полное извлечение хлорофиллов и каротиноидов достигается при экстракции диоксидом углерода под давлением 300 атм, при температуре 80 °С и расходе CO₂ 11,2 г/г сырья.

3. Введение 5% об к сверхкритическому диоксиду углерода этилового спирта позволяет снизить расход углекислоты до 6 г/г сырья при прочих равных условиях.

Список литературы

1. New research on antioxidants / Ed. D. Marín, P. García. New York, 2008. 300 p.
2. Block G., Patterson B., Subar A. Fruit, vegetables, and cancer prevention: A review of the epidemiological evidence // Nutrition and Cancer. 1992. Vol. 18. Pp. 1–29.
3. Thobani M., Diosady L.L. Two-phase solvent extraction of canola // Journal American Oil Chemist's Society. 1997. Vol. 70. Pp. 207–214.
4. Illés V., Daood H.G., Perneczki L.S., Szokonya L., Then M. Extraction of coriander seed oil by CO₂ and propane at super- and subcritical conditions // The Journal of Supercritical Fluids. 2000. Vol. 17. Pp. 177–186.
5. Hegel P.E., Zabaloy M.S., Mabe G.D.B., Pereda S., Brignole E.A. Phase equilibrium engineering of the extraction of oils from seeds using carbon dioxide + propane solvent mixtures // The Journal of Supercritical Fluids. 2007. Vol. 42. Pp. 318–324.
6. Hamdan S., Daood H.G., Toth-Markus M., Illés V. Extraction of cardamom oil by supercritical carbon dioxide and sub-critical propane // The Journal of Supercritical Fluids 2008. Vol. 44. Pp. 25–30.

7. Smith R.M. Supercritical fluids in separation science – the dreams, the reality and the future // Journal of Chromatography A 1999. Vol. 856. Pp. 83–115.
8. Wang Y., Yiping W., Yang J., Pfeffer R., Dave R., Michniak B., Wang Y. The application of a supercritical antisolvent process for sustained drug delivery // Journal of Powder Technology 2006. Vol. 164. Pp. 94–102.
9. Pessoa F.L.P., Uller A.M.C. An economic evaluation based on an experimental study of the vitamin E concentration present in deodorizer distillate of soybean oil using supercritical CO₂ // Journal of Supercritical Fluids. 2002. Vol. 23. Pp. 257–265.
10. Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. Справочник биохимика. М., 1991. 640 с.
11. Кутакова Н.А., Селянина Л.И., Селянина С.Б. Анализ БАВ и древесной зелени : методические указания к выполнению лабораторных работ. Архангельск, 2003. 31 с.
12. Коровкина Н.В., Богданович Н.И., Кутакова Н.А. Исследование состава бурых водорослей Белого моря с целью дальнейшей переработки // Химия растительного сырья. 2007. №1. С. 59–64.
13. Gupta R., Shim J.-J. Solubility in supercritical carbon dioxide. New York, 2007. 960 p.

Поступило в редакцию 12 апреля 2014 г.

После переработки 11 июня 2014 г.

Ivakhnov A.D.^{1*}, Skrebets T.E.¹, Bogolitsyn K.G.^{1,2} SUPERCRITICAL FLUID EXTRACTION OF *LAMINARIA DIGITATA* CHLOROPHYLL AND CAROTINOIDS

¹ North (Arctic) Federal University named after M.V. Lomonosov, ul. Northern Dvina Embankment, 17, Arkhangelsk, 163002 (Russia), e-mail: Ivakhnov-tema@yandex.ru

² Institute of Ecology of North, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, ul. Northern Dvina Embankment, 23, Arkhangelsk, 163002 (Russia)

Optimum conditions of supercritical fluid extraction with carbon dioxide of chlorophyll from vegetable raw materials are found. Comparison of the offered method with extraction in Sokslet's device is carried out. It is shown that supercritical fluid extraction by carbon dioxide is effective and express way of allocation of a chlorophyll and carotinoids.

Keywords: chlorophyll, supercritical fluid extraction, *Laminaria digitata*, vegetable raw materials.

References

1. *New research on antioxidants*. Ed. D. Marín, P. García. New York, 2008, 300 p.
2. Block G., Patterson B., Subar A. *Nutrition and Cancer*, 1992, vol. 18, pp. 1–29.
3. Thobani M., Diosady L.L. *Journal American Oil Chemist's Society*, 1997, vol. 70, pp. 207–214.
4. Illés V., Daood H.G., Perneckzi L.S., Szokonya L., Then M. *The Journal of Supercritical Fluids*, 2000, vol. 17, pp. 177–186.
5. Hegel P.E., Zabaloy M.S., Mabe G.D.B., Pereda S., Brignole E.A. *The Journal of Supercritical Fluids*, 2007, vol. 42, pp. 318–324.
6. Hamdan S., Daood H.G., Toth-Markus M., Illés V. *The Journal of Supercritical Fluids*, 2008, vol. 44, pp. 25–30.
7. Smith R.M. *Journal of Chromatography A*, 1999, vol. 856, pp. 83–115.
8. Wang Y., Yiping W., Yang J., Pfeffer R., Dave R., Michniak B., Wang Y. *Journal of Powder Technology*, 2006, vol. 164, pp. 94–102.
9. Pessoa F.L.P., Uller A.M.C. *Journal of Supercritical Fluids*, 2002, vol. 23, pp. 257–265.
10. Doston R., Jelliot D., Jelliot U., Dzhons K. *Spravochnik biohimika*. [Directory biochemist]. Moscow, 1991, 640 p. (in Russ.).
11. Kutakova N.A., Seljanina L.I., Seljanina S.B. *Analiz BAV i drevesnoj zeleni: Metodicheskie ukazaniya k vypolneniju laboratornyh rabot*. [Analysis of BAS and wood greens: Methodological guidelines for laboratory works]. Arhangel'sk, 2003, 31 p. (in Russ.).
12. Korovkina N.V., Bogdanovich N.I., Kutakova N.A. *Himija rastitel'nogo syr'ja*, 2007, no. 1, pp. 59–64. (in Russ.).
13. Gupta R., Shim J.-J. *Solubility in supercritical carbon dioxide*. New York, 2007, 960 p.

Received April 12, 2014

Revised June 11, 2014

* Corresponding author.