

УДК 542.06.542.61.542.46.808.542.97.542.93

РАЗРАБОТКА СПОСОБА ЭКСТРАКЦИИ ХЛОРОГЕНОВОЙ КИСЛОТЫ ИЗ ЗЕРЕН ЗЕЛЕНОГО КОФЕ В СРЕДЕ СУБКРИТИЧЕСКОЙ ВОДЫ

**¹А. В. Лекарь, ¹О. В. Филонова, ¹С. Н. Борисенко, ²Е. В. Максименко,
¹Е. В. Ветрова, ²Н. И. Борисенко*, ¹В. И. Минкин**

¹*Научно-исследовательский институт физической и органической химии
Южного федерального университета, Ростов-на-Дону, Россия*

²*Эколого-аналитический центр Южного федерального университета,
Ростов-на-Дону, Россия*

*boni@ipoc.rsu.ru

Поступила в редакцию 11.11.2013 г.

На основе исследования обработки зеленых зерен кофе в среде субкритической воды в статическом режиме разработан экстракционный способ получения хлорогеновой кислоты (ХК) без использования дорогостоящих органических растворителей. Содержание ХК в полученных экстрактах определено методом высокоточного жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Продемонстрирована высокая эффективность предложенного способа по сравнению с известным способом экстракции этанолом.

Ключевые слова: субкритическая вода, экстракция, хлорогеновая кислота, зеленый кофе, ВЭЖХ.

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы в работах по медицинской химии все большее внимание уделяется разработке методик извлечения биологически активных метаболитов высших растений, в частности, хлорогеновой кислоты (ХК), которая в больших количествах содержится в зеленых зернах кофе и прорастающих семенах подсолнечника [1, 2].

Хлорогеновая кислота — 3-О-кофеилхинная кислота (рис. 1) — является мощным антиоксидантом и содержится в различных плодах и напитках, например, в

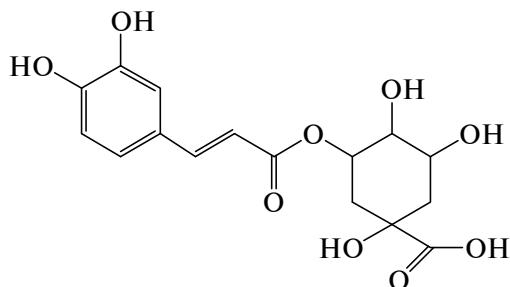


Рис. 1. Структурная формула хлорогеновой кислоты, C₁₆H₁₈O₉, MW=354,31

чернике, баклажанах, яблоках. Свойства ХК интенсивно изучаются последние несколько лет по причине широкого спектра ее биологической активности. ХК проявляет способность ингибиовать рост опухолей (*in vitro*) [3], оказывает ингибирующий эффект на колоректальный рак, рак печени, рак гортани [4–12], способствует предотвращению сахарного диабета 2-го типа [13], обладает антигипертензивным [14], антивирусным [15], антибактериальным [16] и противогрибковым [17] действием. При этом ХК обладает относительно низкой токсичностью и отсутствием побочных эффектов. Перечисленные свойства ХК нашли применение при создании пищевых добавок и косметических средств [18]. На сегодняшний день на основе ХК в Норвегии и Великобритании под торговыми марками Svetol и Coffee Slender начато продвижение пищевых добавок для снижения и контроля веса (зеленый кофе, обогащенный хлорогеновой кислотой, жевательные резинки и леденцы). С учетом указанных факторов становится актуальным поиск как новых растительных источников ХК, так и методов ее извлечения.

Для извлечения хлорогеновой кислоты из растительной матрицы предложены различные методы — от традиционных методик, основанных на использовании органических растворителей и водно-спиртовых растворов [19], до методик, использующих различные варианты физического воздействия с использованием ультразвуковых (УЗ) [20] и сверхвысокочастотных (СВЧ) генераторов [21]. Каждая из этих методик обладает теми или иными недостатками. Экстракция при использовании этих двух методов проводилась в различных средах — это метанол, этанол и вода. Переход к использованию УЗ- и СВЧ-генераторов при пробоподготовке и экстракции позволяет существенно сократить временные затраты. Последнее достигается за счет изменения структуры растительной матрицы в результате воздействия УЗ- или СВЧ-колебаний. Однако такой подход требует дополнительных затрат на модернизацию экспериментальной базы.

При использовании органических растворителей следует учитывать их дорогоизнну, а зачастую — и токсичность (например, метанола [22]). Как правило, традиционные методики требуют значительных временных затрат и последующей утилизации отходов растворителей.

Наряду с использованием обработки растительного материала физическими полями различной природы в литературе приводятся примеры экстракции ХК в среде сверхкритического (СК) CO_2 из зерен зеленого кофе [23]. Эксперименты по извлечению ХК с использованием чистого СК- CO_2 и смеси CO_2 —этанол показали, что ХК в экстрактах присутствовала в следовых количествах. Хлорогеновая кислота регистрировалась только в экстрактах, полученных в смеси CO_2 и изопропилового спирта. При этом количество ХК, извлекаемой СК- CO_2 , оказалось очень мало, что указывает на низкую эффективность экстракции в этой среде. Поскольку известно, что изопропиловый спирт в обычных условиях проявляет себя эффективным растворителем при экстракции ХК из кофейных зерен [24], то, по мнению авторов [23], причина неэффективности СК- CO_2 при экстракции ХК связана с низкой концентрацией изопропилового спирта, выступающего в роли сорасторовителя.

С другой стороны, в недавней работе [25] показано, что в плодовой мякоти зерен кофе до 77% ХК и 94% кофеиновой кислоты (КК) ковалентно связаны в соответствующей растительной матрице. Как следствие, извлечение ХК из мякоти зерен кофе требует разрушения соответствующих связей, что может быть реализовано посредством повышения температуры среды, в которой осуществляется экстракция.

С учетом этого еще одним параметром, который может и должен быть оптимизирован для увеличения эффективности процессов экстракции, наряду с подбором растворителей и сорасторителей и использованием физических полей является температура, повышение которой обеспечивает реализацию разрыва соответствующих связей с растительной матрицей [26].

В последнее десятилетие для экстракции полярных и слабополярных биологически активных соединений используется среда субкритической воды (СБВ — вода в жидкому состоянии под давлением при температурах от 100 до 374 °C) [26]. Среда СБВ обеспечивает варкирование полярности и pH среды в широком интервале при изменении температуры, обеспечивая возврат к обычным значениям полярности и pH воды при охлаждении до комнатной температуры.

Исследования, нацеленные на разработку методов экологически чистой экстракции и химической модификации биологически активных соединений, являются актуальными и имеют значительный теоретический и инновационный потенциал.

В связи с этим целью данной работы явилось изучение экстракции XK из зеленых зерен кофе в среде СБВ и разработка экологически чистого способа ее получения. Предлагаемый способ позволяет использовать зеленые зерна кофе в качестве источника XK для последующего дизайна иммуномодулирующих и гепатопротекторных препаратов в экологически чистой среде СБВ.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В качестве объекта исследования был взят зерновой зеленый кофе Robusta Uganda (поставщик ООО «АБ Синегорье», г. Ярославль).

Традиционная экстракция полифенолов из зеленого кофе включала несколько стадий [27]: 3 г молотых зерен (размер частиц 0,5—1,0 мм) зеленого кофе выдерживали в 30 мл 30 % этианола при интенсивном перемешивании на магнитной мешалке с нагреванием в течение 2 часов при 60 °C, после чего экстракт отделялся фильтрацией. Экстракцию повторяли дважды — в течение 2 и 1,5 часов. Этианольные вытяжки объединяли и анализировали. Оставшееся сырье подвергали дополнительной экстракции для проверки на полноту извлечения в течение 1,5 часов, после чего экстракт анализировали.

Экстракция XK в среде СБВ выполнена способом, аналогичным описанному ранее в работах, посвященных извлечению полифенолов [28, 29]. Процедура экстракции XK в среде СБВ состояла в следующем: навеску определенной массы молотых зерен зеленого кофе (размер частиц 0,5—1,0 мм) помещали в экстрактор из нержавеющей стали внутренним объемом 10 мл, в который добавляли 7 мл воды. Экстрактор герметично закрывали и устанавливали в сушильный шкаф с заданной температурой (точность ±1 °C) на определенное время. Затем реактор охлаждали до комнатной температуры в емкости с проточной холодной водой; полученный экстракт фильтровали через складчатый бумажный фильтр для последующего анализа с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Количество XK в экстрактах определяли с использованием обращенно-фазового варианта ВЭЖХ на жидкостном хроматографе Agilent 1200. Условия хроматографирования экстрактов: колонка Zorbax SB-C18 2,1 × 150 мм (размер зерна 3,5 мкм); подвижная фаза: элюент А — метанол, элюент В — 5 % муравьиная кислота; режим элюирования: А : В = 12 : 88 (0—10 мин), 35 : 65 (16 мин), 40 : 60 (20 мин),

20 : 80 (22 мин), 12 : 88 (24—30 мин), температура колонки 35 °C, скорость элюента 0,15 мл/мин, UV-детектор (320 и 254 нм). Количественное определение XK в экстрактах проводили по методу абсолютной калибровки. В качестве стандарта использовали изомер 3-O-кофеилхинной кислоты (99,1 %). Chengdu Biopurify Phytochemicals Ltd., CAS No.: 327-97-9, Catalogue No.: C07007).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Изучен выход XK из зерен зеленого кофе при варировании температуры, времени экстракции, природы и концентрации сорасторовителей, соотношения сырье : реагент и массы загрузки сырья при экстракции в среде СБВ. Зависимость количества XK в экстракте от температуры СБВ (от 130 до 170 °C) представлена на рис. 2. Результаты выхода XK приведены в пересчете на 1 г сухого сырья.

Зависимости количества XK в экстрактах от продолжительности экстракции в среде СБВ, а также природы и концентрации сорасторовителей (чистая вода и водные растворы этанола) представлены на рис. 3 и 4 соответственно.

Как видно из диаграмм, представленных на рис. 2 и 3, оптимальными условиями для извлечения XK являются температура 160 °C и продолжительность экстрак-

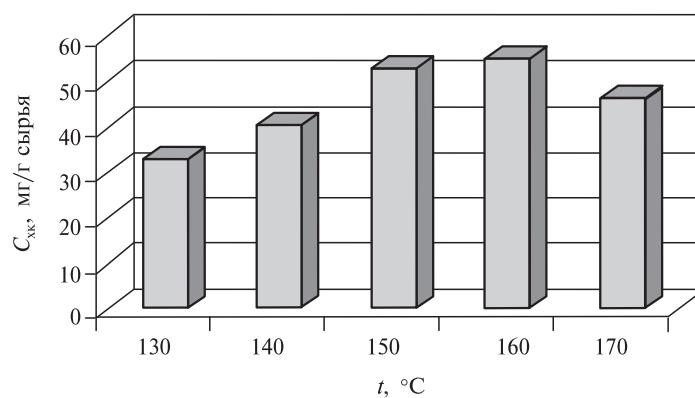


Рис. 2. Зависимость количества извлекаемой хлорогеновой кислоты (мг/г сырья) от температуры экстракции (продолжительность экстракции 40 мин)

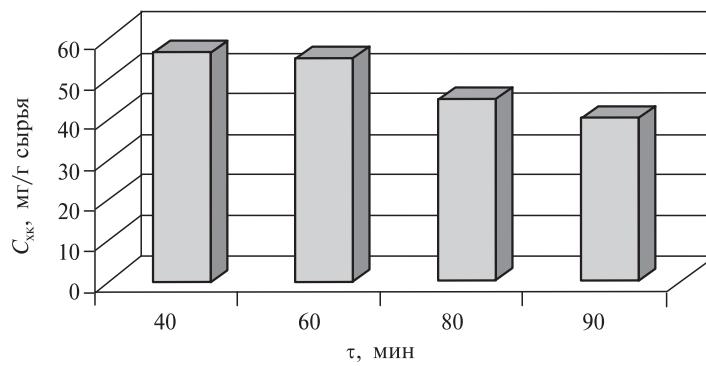


Рис. 3. Зависимость количества извлекаемой хлорогеновой кислоты (мг/г сырья) от времени экстракции (температура экстракции 160 °C)

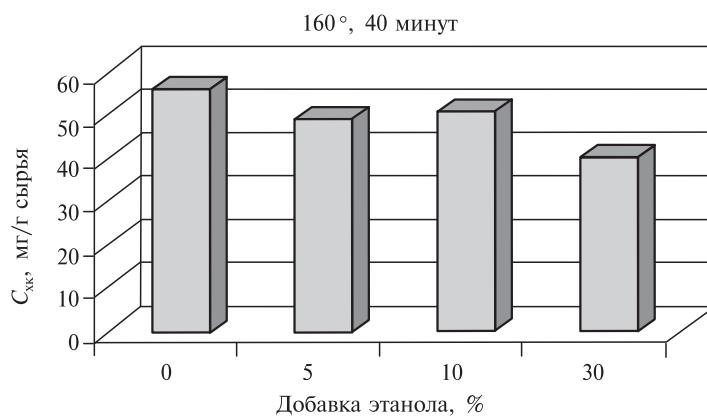


Рис. 4. Зависимость выхода хлорогеновой кислоты от концентрации сорастворителя в субкритической воде

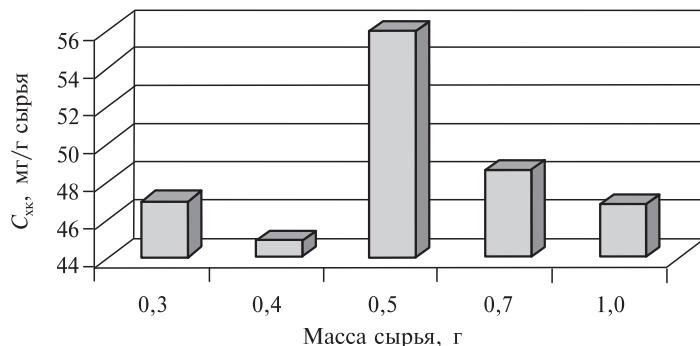


Рис. 5. Зависимость суммарного количества хлорогеновой кислоты (мг/г сырья) от массы загрузки

ции 40 мин. Диаграмма на рис. 4 показывает, что добавка этанола в качестве сорастворителя не увеличивает выход XK.

Также изучена зависимость выхода XK от соотношения сырье : экстрагент, которое определяется массой загрузки. Полученные данные приведены на рис. 5. Из представленной диаграммы видно, что максимальный выход XK в результате экстракции субкритической водой из молотого зеленого кофе в данных условиях достигается при загрузке 0,5 г сырья на 7 мл воды, т.е. оптимальное соотношение сырье : экстрагент составляет 1 : 14 при объеме реактора 10 мл.

Полученные результаты позволили определить оптимальные условия экстракции XK из зеленого кофе субкритической водой: температура 160 °C; растворитель — вода; масса сырья 0,5 г; объем раствора 7 мл; время экстракции 40 мин.

Для оценки эффективности нового способа экстракции XK с использованием СБВ также исследован выход XK с применением традиционной методики экстракции. Из полученных данных, представленных на рис. 6, следует, что количество XK, экстрагируемой в среде СБВ, в 1,25 раза превышает количество XK, извлекаемой традиционным способом с использованием дорогостоящего этанола.

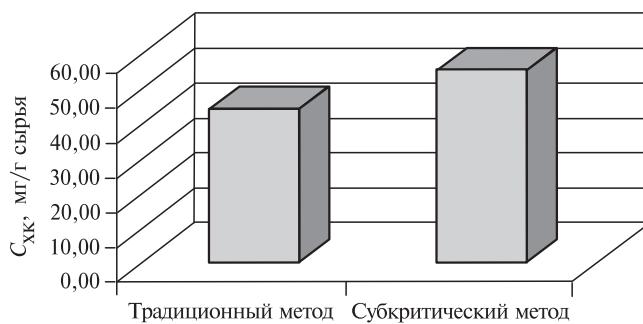


Рис. 6. Сравнение эффективности традиционной экстракции хлорогеновой кислоты из зеленых зерен кофе и экстракции в субкритической воде

Таким образом, на основе исследования обработки зеленых зерен кофе в среде СБВ в статическом режиме разработан экстракционный способ получения ХК, не требующий использования дорогостоящих органических растворителей и являющийся более эффективным по сравнению с известным способом экстракции этанолом.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ 13-03-01318, 13-03-12271 (офи-м) и гос. задания вузам на 2013 год (проект 3.5193.2011).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бузук Г.Н., Ловкова М.Я., Ёшик О.А., Соколова С.М. ДАН. 2008. Т. 421. № 4. С. 546.
2. Жукова О.Л., Абрамов А.А., Даргаева Т.Д., Маркарян А.А. Вестник Московского ун-та. Сер. 2. Химия. 2006. Т. 47. № 5. С. 342.
3. Xu R., Kang Q., Ren J., Li Z., Xu X. J. of Analytical Methods in Chemistry. 2013. Vol. 2013. Р. 7.
4. Jiang Y., Kusama K., Satoh K., Takayama E., Watanabe S., Sakagami H. Phytomedicine. 2000. Vol. 7. Is. 6. P. 483.
5. Liu J.-H., Qiu A.-Y. J. of Cereals & Oils. 2003. Is. 9. P. 44.
6. Dorrell D.G. Crop Science. 1976. Vol. 16. Is. 3. P. 422.
7. Shimizu M., Yoshimi N., Yamada Y. et al. J. of Toxicological Sciences. 1999. Vol. 24. No. 5. P. 433.
8. Matsunaga K., Katayama M., Sakata K. et al. Asian Pacific J. of Cancer Prevention. 2002. Vol. 3. P. 163.
9. Kurata R., Adachi M., Yamakawa O., Yoshimoto M. J. of Agricultural and Food Chemistry. 2007. Vol. 55. Is. 1. P. 185.
10. Rylova S.N., Amalfitano A., Persaud-Sawin D.A. et al. Cancer Research. 2002. Vol. 62. Is. 1. P. 801.
11. Pereira R.C., Delany A.M., Canalis E. Endocrinology. Vol. 145. Is. 4. P. 1952.
12. Pellati F., Benvenuti S., Magro L., Melegari M., Soragni F. J. of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2004. Vol. 35. Is. 2. P. 289.
13. Paynter N.P., Yeh H.C., Voutilainen S., Schmidt M.I., Heis G., Folsom A.R., Brancati F.L., Kao W.H.L. American J. of Epidemiology (Oxford Journals). 2006. Vol. 164. No. 11. P. 1075.
14. Zhao Y., Wang J., Ballevre O., Luo H., Zhang W. Hypertension Research. 2012. Vol. 35. No. 3. P. 370.
15. Jassim S.A.A., Naji M.A. J. of Applied Microbiology. 2003. Vol. 95. No. 3. P. 412.
16. De Sotillo D.R., Hadley M., Wolf-Hall C. J. of Food Science. 1998. Vol. 63. No. 5. P. 907.
17. Bowels B.L., Miller A.J. J. of Food Science. 1994. Vol. 59. Is. 4. P. 905.
18. Куркин В.А., Запесочная Г.Г., Ежков В.Н. Фенилпропаноиды лекарственных растений. Самара: ООО «Офорт». 2005. С. 120.
19. Grujic N., Lepojevic Z., Srdjenovic B., Vladic J., Sudji J. Molecules. 2012. Vol. 17. Is. 3. P. 2518.
20. Liu Q.M., Yang X.M., Zhan L., Majetich G. J. of Medicinal Plants Research. 2010. Vol. 4. Is. 23. P. 2503.

21. Upadhyay R., Ramalakshmi K., Rao L.J.M. Food Chemistry. 2012. Vol. 130. Is. 1. P. 184.
 22. Jina U.-H., Leea J.-Y., Kanga S.-K., Kimb J.-K., Parkb W.-H., Kimc J.-G., Moond S.-K., Kim C.-H. Life Sciences. 2005. Vol. 77. Is. 22. P. 2769.
 23. Azevedo A.B.A., Mazzafera P., Mohamed R.S., Vieira de Melo S.A.B., Kieckbusch T.G. Braz. J. Chem. Eng. 2008. Vol. 25. P. 543.
 24. Clifford M.N. Chlorogenic acids. In: Coffee: Chemistry // Ed. by R.J. Clarke, R. Macrae. N.Y., USA: Elsevier Applied Science Publishers LTD, 1985. P. 153.
 25. Torres-Mancera M.T., Baqueiro-Pena I., Figueroa-Montero A., Rodriguez-Serrano G., Gonzalez-Zamora E., Favela-Torres E., Saucedo-Castaneda G. Biotechnology Progress. 2013. Vol. 29. Is. 2. P. 337.
 26. Галкин А.А., Лунин В.В. Успехи химии. 2005. Т. 74. № 1. С. 24.
 27. Clifford M.N., Johnston K.L., Knight S., Kuhnert N. J. Agric. Food Chem. 2003. Vol. 51. P. 2900.
 28. Лекарь А.В., Борисенко С.Н., Максименко Е.В., Борисенко Р.Н., Ветрова Е.В., Борисенко Н.И., Минкин В.И. СКФ-ТП. 2008. Т. 3. № 2. С. 33.
 29. Лекарь А.В., Борисенко С.Н., Филонова О.В., Ветрова Е.В., Максименко Е.В., Борисенко Н.И., Минкин В.И. СКФ-ТП. 2013. Т. 8. № 1. С. 69.
-

SUBCRITICAL WATER EXTRACTION OF CHLOROGENIC ACID FROM GREEN COFFEE BEANS

**¹A.V. Lekar, ¹O. V. Filonova, ¹S. N. Borisenko, ²E. V. Maksimenko,
¹E. V. Vetrova, ²N. I. Borisenko, ¹V. I. Minkin**

¹Institute of Physical and Organic Chemistry of Southern Federal University, Rostov-on-Don,
Russia

²Ecological and Analytic Center of Southern Federal University, Rostov-on-Don, Russia

A method of extracting chlorogenic acid that does not utilize expensive organic solvents is developed based on the studies of the treatment of green coffee beans by subcritical water. The amount of chlorogenic acid in the obtained extracts is determined using the high performance liquid chromatography (HPLC). A high efficiency of chlorogenic acid extraction by subcritical water as compared to its extraction by ethanol is demonstrated.

Key words: subcritical water, extraction, chlorogenic acid, green coffee, HPLC.
