УДК 541:[13+123]+542:[61+62]+630.86+676.16

СВЕРХКРИТИЧЕСКАЯ ФЛЮИДНАЯ ЭКСТРАКЦИЯ КАРОТИНОИДОВ МОРКОВИ ШАНТАНЭ

А. С. Амосова, А. Д. Ивахнов*, Т. Э. Скребец, Н. В. Ульяновский, К. Г. Боголицын

Северный (Арктический) федеральный университет, институт теоретической и прикладной химии, Архангельск, Россия

*ivahnov-tema@yandex.ru

Поступила в редакцию 9.07.2012 г.

Исследовано влияние параметров процесса на эффективность извлечения каротиноидов из моркови сорта Шантане при экстракции сверхкритическим CO_2. Степень извлечения каротиноидов возрастает до ~35 % от их содержания в сырье с ростом температуры (в диапазоне 60—80 °С) и давления (до 350 атм) при почти неизменной доле β-каротина (64—70 %) в получаемых экстрактах.

Ключевые слова: сверхкритические среды, каротиноиды, экстракция, морковь, параметры процесса.

ВВЕДЕНИЕ

В связи с опасностью для здоровья синтетических пищевых красителей и строгими требованиями законодательств некоторых стран по содержанию этих веществ в пищевых продуктах в последнее время резко возрос интерес и спрос на природные красители. Каротиноиды (в этот класс входят около 30 соединений) являются одними из важнейших природных пищевых красителей. Являясь провитаминами и антиоксидантами, они составляют неотъемлемую часть рациона питания. Теоретически β-каротин обладает 100 % провитаминной активностью (1 молекула каротиноида в ходе метаболизма превращается в 1 молекулу витамина А), а α- и γ-каротины проявляют 50 % провитаминную активность. Антиоксидантная активность каротиноидов связана со снижением риска раковых заболеваний [1, 2]. Основными источниками каротиноидов являются фрукты и овощи. Особое положение среди них занимает морковь, являясь источником практически исключительно α-, β- и γ-каротина. По данным Chen с соавторами [3], β-каротин составляет большую часть каротиноидов моркови (60—80 %), на долю α-каротина приходится 10—40 %, доля лютеина не превышает 1—5 %.

Традиционные способы извлечения каротиноидов предполагают их экстракцию из природного сырья с использованием органических растворителей при относительно высоких температурах. Использование токсичных органических растворителей создает трудности при последующей очистке экстракта, а высокие температуры способствуют нежелательной изомеризации каротиноидов, приводящей к потере их активности [4—7].

Реальной альтернативой традиционным технологиям извлечения каротиноидов может служить сверхкритическая флюидная экстракция (СКФЭ), в которой в большинстве случаев в качестве экстрагента используется сверхкритический

(СК) CO_2 и обеспечивается мягкое извлечение лабильных биологически активных веществ. СК-CO_2 использовался в процессах выделения каротиноидов (как составной части суммарных экстрактов) из ряда растений, в основном цветов некоторых растений семейства розоцветных, и показал себя как хороший экстрагент [8—13]. Относительно недавно Saldaca и соавторы [4] сообщили о выделении β-каротина из сухой моркови. По данным авторов, извлекающая способность СК-CO_2 составляет ~80 мкг/моль CO_2 (при 100—150 атм и 60 °С) при использовании матрицы, содержащей 1832 мкг каротиноидов в грамме сухого вещества. Однако недостаточно широкий интервал параметров эксперимента не раскрывает всех возможностей данного процесса.

Опубликован ряд работ, посвященных использованию СК-CO_2 для экстракции β-каротина из овощей [5—10].

Низкая критическая температура CO_2 может быть полезным фактором в экстракции термолабильных веществ, таких как каротиноиды. Тем не менее, степень деградации β-каротина при окислении и изомеризации в процессе СКФЭ является предметом дискуссий в научной литературе. Chang и Randolph [11] сообщили, что β-каротин окисляется в CO_2 с образованием эпоксисоединений. Напротив, Jay и соавторы [12, 13] не нашли никаких доказательств окисления β-каротина при использовании CO_2 в качестве растворителя, в то же время Cocero и соавторы [14] утверждают, что такого рода реакции даже не представляются возможными с химической точки зрения. Данные процессы более характерны при выделении каротиноидов методом ускоренной экстракции (ASE), где изомеризационные превращения приводят к значительному снижению доли β-каротина в экстракте [15].

Таким образом, целью данной работы является изучение процесса выделения каротиноидов методом СКФЭ с использованием СК-CO_2 из природного сырья (на примере моркови) и выявление влияния параметров процесса на выход каротиноидов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Для исследования была выбрана морковь сорта Шантанэ, выращенная в Архангельской области в 2010 году. Свежее тщательно вымытое и измельченное сырье было высушено при 40 °С до влажности ~2,6 %. Фракция 0,5—1,0 мм составляла 80 % по весу. Образцы сохранялись в плотных полиэтиленовых пакетах в темноте при температуре 5 °С.

Сверхкритическая флюидная экстракция проводилась на установке СКФ-400, изготовленной в Институте аналитического приборостроения (Санкт-Петербург, Россия). Навеску сырья (1 г) помещали в автоклав объемом 10 мл. Автоклав заполняли CO_2 при комнатной температуре до давления 74 атм. Прогрев автоклава до требуемой температуры осуществляли в течение 10 минут, после чего через автоклав прокачивали 50 мл СК-CO_2 (предварительно нагретого), выпуская экстракт через кварцевый капилляр (диаметр 50 мкм) в приемный сосуд с ацетоном. В ходе опытов варьировали температуру (40, 60, 70, 80 °С) и давление (100—350 атм, шаг 50 атм). Полученный экстракт анализировали на количественное содержание каротиноидов и соотношение α- и β-каротина.

Для определения содержания каротиноидов в исходном сырье и в кубовых остатках от СКФЭ материал подвергали исчерпывающему экстрагированию ацетоном в аппарате Сокслета. Получаемые экстракты разбавляли ацетоном до 100 мл и использовали для последующего анализа.

Выход каротиноидов при экстракции определяли на основании анализа растворов СК экстрактов в ацетоне. Количественное определение каротиноидов в растворе проводили методом спектрометрии в видимой области спектра по поглощению при 450 нм. Расчет вели на содержание β-каротина по закону Бугера — Ламберта — Бера, используя коэффициент экстинкции для таких растворов, равный $1{,}4 \cdot 10^5$ л/моль · см [16, 17].

Качественный анализ каротиноидов проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на хроматографе Agilent 1260 Infiniti (Agilent Technologies, USA) с использованием колонки Zorbax Eclipse Plus C18 (длина колонки 250 мм, внутренний диаметр 3 мм, размер частиц сорбента 3 мкм) при 40 °С. Объем вводимой пробы составлял 10 мкл при скорости потока 0,6 мл/мин. Разделение проводили в изократическом режиме, состав подвижной фазы: 75 % ацетонитрила, 25 % изопропанола. В качестве детектора использовали диодно-матричный детектор Agilent 1260 DAD. Запись хроматограмм вели по поглощению при 450 нм при снятии спектров в диапазоне 300—600 нм с шагом 1 нм. Время анализа не превышало 20 мин [15].

При длине волны 450 нм отношения коэффициентов экстинкции α- и γ-каротинов к коэффициенту экстинкции β-каротина составляют 1,04 и 1,06 соответственно [16], т.е. они весьма близки. По этой причине долю каждого из каротиноидов (в т.ч. β-каротина) можно определить как удельную площадь пика, относящегося к данному соединению при хроматографическом разделении их смеси. При определении площадей плохо разделенных пиков за границу между ними принимали точку пересечения их контуров — минимум на кривой зависимости величины сигнала детектора (поглощения) от времени. Относительная погрешность при проведении трех параллельных экспериментов составила не более 8 %.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исходное сырье содержало 461 мг/кг каротиноидов при содержании β-каротина 80 % от массы каротиноидов в ацетоновом экстракте.

При температурах процесса ниже 60 °С СК-CO_2 показал крайне низкую экстракционную способность по отношению к каротиноидам. Максимальная степень их извлечения при 40 °С и 350 атм составляла 0,2 % от их содержания в исходном образце. Получаемый продукт на 85 % состоял из β-каротина.

Степень извлечения каротиноидов резко возрастает с ростом температуры экстракции. Так, уже при температуре 60 °С и давлении 100 атм извлекается 0,5 % каротиноидов, содержащихся в сырье. Данные, полученные в диапазоне давлений 100—350 атм при температурах 60, 70 и 80 °С, приведены на рис. 1.

Из приведенных данных видно, что при давлениях 100—200 атм степень извлечения каротиноидов практически не зависит от температуры процесса экстракции в интервале 60—80 °С. Увеличение давления способствует росту степени извлечения каротиноидов из сырья, причем при температурах 60 и 70 °С наблюдается выход на плато при давлениях выше 200 атм. В изученном диапазоне давлений при 60 и 70 °С максимальная степень извлечения каротиноидов достигала 20 % (при 350 атм) и 22,7 % (при 250 атм) соответственно. Наиболее резкое увеличение степени извлечения каротиноидов наблюдается при увеличении давления в системе в интервале 100—200 атм. Дальнейший рост давления не приводит к значительному ее увеличению. Степень извлечения каротиноидов возрастает с ростом давления и при 80 °С; однако при этой температуре она продолжает уве-

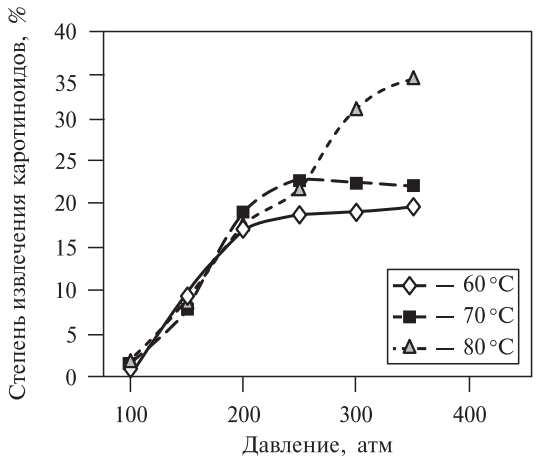

Рис. 1. Зависимости степени извлечения каротиноидов от давления в ходе СКФЭ

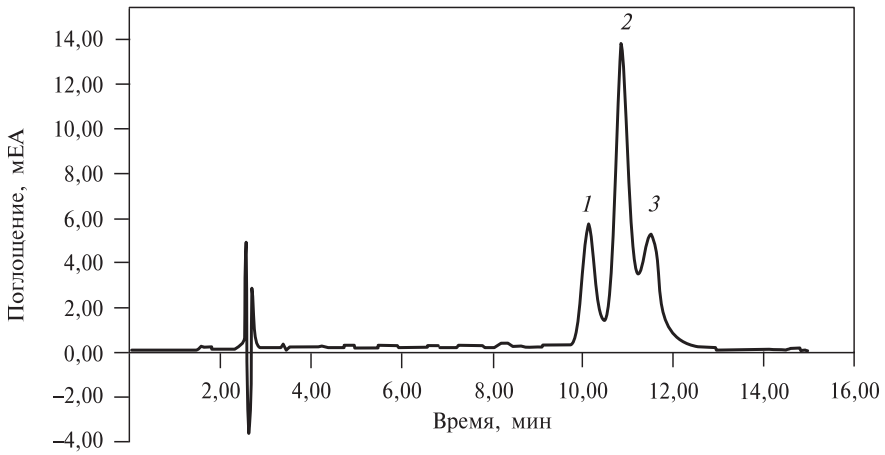

Рис. 2. Пример хроматограммы каротиноидов:
1 — α-каротин; *2* — β-каротин; *3* — γ-каротин с наложением β-каротина

личиваться во всем исследованном диапазоне давлений (100—350 атм), достигая при 350 атм 34,8 %.

Среди извлекаемых из сырья каротиноидов наибольшей физиологической активностью обладает β-каротин. По этой причине представляло интерес исследование влияния параметров процесса на долю β-каротина в общем содержании каротиноидов.

На рис. 2 представлен пример хроматограммы экстракта. Из литературных данных известно, что основными каротиноидами, содержащимися в моркови, являются α-, β- и γ-каротины. Пик *1* на хроматограммах экстрактов был однозначно отнесен к α-каротину на основании анализа УФ спектра. Пик *2*, как пик компонента с максимальным содержанием в экстракте, отнесен к β-каротину. Плохо разделенный со вторым пиком пик *3* отнесен к γ-каротину методом исключения.

На рис. 3 представлены зависимости доли β-каротина в продукте от условий проведения процесса экстракции. Следует отметить, что максимальная доля β-

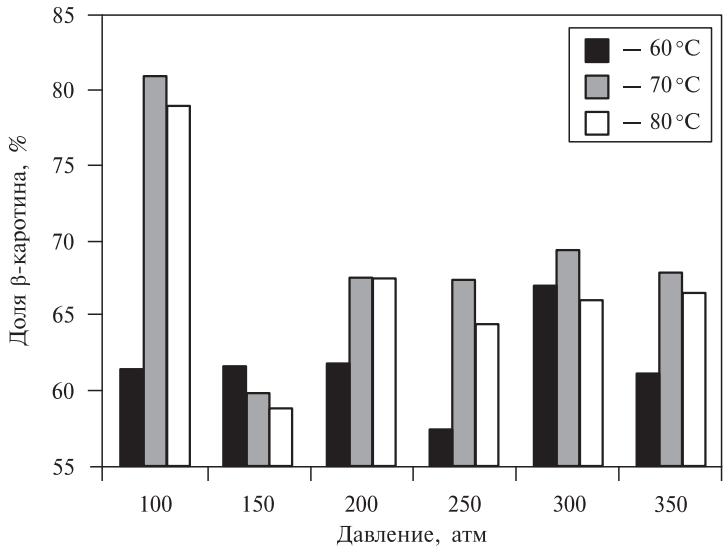

Рис. 3. Зависимость доли β-каротина в экстракте от реализуемых условий экстракции

каротина в экстракте наблюдается в ходе проведения извлечения при давлении 100 атм и составляет 81 и 79 % соответственно для температур 70 и 80 °С. В целом при этих температурах с ростом давления до 200—350 атм резких изменений в селективности процесса не наблюдается, и содержание β-каротина в продукте находится на уровне 64—70 % от суммарного содержания каротиноидов. Таким образом, ввиду слабого влияния параметров процесса на долю β-каротина в сумме каротиноидов, на наш взгляд, определяющим фактором при выборе условий проведения экстракции является степень извлечения каротиноидов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований показана возможность выделения каротиноидов как ценных биологически активных веществ из возобновляемого природного сырья на примере корнеплодов моркови Шантанэ. Установлена зависимость выхода каротиноидов от параметров процесса. Обнаружено преимущественное влияние величины давления сверхкритического диоксида углерода на суммарный выход каротиноидов при практически неизменной селективности процесса по β-каротину в диапазоне давлений 150—350 атм. В качестве оптимальных условий проведения процесса экстракции можно рекомендовать давление 350 атм при температуре 80 °С; выход каротиноидов при данных параметрах составляет ~35%.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (ГК № 14.740.11.1019 от 23 мая 2011 г.) и РФФИ (грант № 11-03-12021-офи-м-2011), а также при поддержке РФФИ (грант офи_м 13-03-12238).

Экспериментальная часть работы выполнена с привлечением оборудования ЦКП НО «Арктика» Северного (Арктического) федерального университета им. М.В. Ломоносова при частичной финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (ГК № 16.552.11.7023 от 29 апреля 2011 г.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Block G., Patterson B., Subar A.* Nutr. Cancer. 1992. Vol. 18. P. 1.
2. *Steinmetz K.A., Potter J.D.* Int. J. Cancer. 1993. Vol. 53. P. 711.
3. *Chen B.H., Peng H.Y., Chen H.E.* J. Agric. Food Chem. 1995. Vol. 43. P. 1912.
4. *Saldaca M.D.A., Sun L., Guigard S.E., Temelli F.* J. Supercrit. Fluids. 2006. Vol. 37. P. 342.
5. *Razungles A., Oszmianski J., Sapis J.C.* J. Food Sci. 1989. Vol. 54. P. 774.
6. *Bohm V., Frohlich K., Bitsch R.* Molecular Aspects of Medicine. 2003. Vol. 24. P. 385.
7. *Innocenti M., Niccoli L., Vasacci L., Vincieri F.F., Mulinacci N.* Componenti bioattivi nei falsi frutti di cultivars selezionate di Rosa canina, V Congresso Nazionale di Chimica degli Alimenti. Milan: Morgan, 2004. P. 20.
8. *Machas-Sonchez M.D., Mantell C., Rodriguez M., Martinez de la Ossa E., Lubion L.M., Montero O.* J. Supercrit. Fluids. 2007. Vol. 39. P. 323.
9. *Reverchon E., De Marco I.* J. Supercrit. Fluids. 2006. Vol. 38. P. 146.
10. *Pourmortazavi S.M., Hajimirsadeghi S.S.* J. Chromatogr. A. 2007. Vol. 1163. P. 2.
11. *Chang C.J., Randolph A.D.* AIChE. 1989. Vol. 35. P. 1876.
12. *Jay A.J., Steytler D.C.* J. Supercrit. Fluids. 1992. Vol. 5. P. 274.
13. *Jay A.J., Steytler D.C., Knights M.* J. Supercrit. Fluids. 1991. Vol. 4. P. 131.
14. *Cocero M.J., Gonzolez S., Porez S., Alonso E.* J. Supercrit. Fluids. 2000. Vol. 19. P. 39.
15. *Ульяновский Н.В., Косяков Д.С., Ивахнов А.Д., Амосова А.С., Боголицын К.Г.* Разработка экспрессных методов аналитической экстракции каротиноидов из растительного сырья. Химия растительного сырья. В печати.
16. *Delia B. Rodriguez-Amaya.* A guide to carotenoid analysis in foods. Washington, D.C.: ILSI Press, 2001. P. 65.
17. ГОСТ 13496.17-95. Корма. Методы определения каротина.

SUPERCRITICAL FLUID EXTRACTION OF CAROTENOIDS FROM SHANTANE CARROT

A. S. Amosova, A. D. Ivahnov, T. E. Skrebets, N. V. Ulyanovskiy, K. G. Bogolitsyn

Northern (Arctic) Federal University, Institute of Theoretical and Applied Chemistry, Arkhangelsk, Russia

The effect of process parameters on the efficiency of carotenes extraction from carrot samples by supercritical CO_2 is studied. The degree of carotenes extraction increases to approximately 35 % at rising temperature (in the range between 60 and 80 °C) and pressure (up to 350 atm) at nearly stable fraction of β-carotene (64—70 %) in the obtained extracts.

K e y w o r d s: supercritical fluids, carotenoids, extraction, carrot, process parameters.