

PACS: 87.15.M, 62.50.-p, 07.05.Pj, 87.64.M-, 78.20.Ci

В.Ф. Дроботько<sup>1</sup>, В.Н. Варюхин<sup>1</sup>, Г.В. Букин<sup>1</sup>,  
С.А. Соколов<sup>2</sup>, В.П. Головинов<sup>2</sup>

## ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ ЭКСТРАКЦИИ СВЕРХВЫСОКИМ ДАВЛЕНИЕМ НА ВЫХОД МАСЛА ИЗ СЕМЯН ЭНОТЕРЫ ДВУЛЕТНЕЙ

<sup>1</sup>Донецкий физико-технический институт им. А.А. Галкина

<sup>2</sup>Донецкий национальный университет экономики и торговли им. М. Туган-Барановского

Статья поступила в редакцию 23 сентября 2018 года

*Изучены оптические свойства спиртового экстракта масла семян энотеры двулетней *Oenothera biennis* L. Для извлечения масла использовали новый метод – экстракцию сверхвысоким давлением (ЭСВД). Определен спектральный состав оптической плотности масла энотеры. Обнаружено, что под воздействием давления существенно возрастает фракция жирных кислот от 6.6% при атмосферном давлении до 35.5% при 100 МПа. Изучен механизм ЭСВД. Показано наличие двух режимов диффузионных процессов для различных областей давлений: неповрежденных и частично или полностью разрушенных клеточных мембран. Вычислены эффективные коэффициенты диффузии для этих областей:  $D_{0h} = 11.743 \cdot 10^{-13} \text{ m}^2/\text{s}$  и  $D_{0и} = 8.339 \cdot 10^{-13} \text{ m}^2/\text{s}$  соответственно. С использованием модельных подгоночных кривых получены значения оптимальных величин давления, при которых выход масла энотеры наибольший. В нашем случае оптимальная величина давления  $P = 87.95 \text{ МПа}$ .*

**Ключевые слова:** экстракция сверхвысоким давлением, масло энотеры, массоперенос, эффективный коэффициент диффузии, абсорбционная спектрофотометрия, оптическая плотность

### Введение

Энотера двулетняя *Oenothera Biennis* L. является известным целебным растением благодаря большому содержанию (9.0–10.7%)  $\gamma$ -линоленовой кислоты в жирном масле семян. Основной компонент (69.6–71.6%) масла – линолевая кислота. В нем также найдены 0.2–0.3% дигомо- $\gamma$ -линоленовой и следы  $\alpha$ -линоленовой кислот. Содержание насыщенных жирных кислот довольно низкое: 7.1–10% пальмитиновой и 1.2–3.5% стеариновой. В масле энотеры холодного прессования найдены липофильные тритерпеновые эфиры [1].

Применение  $\gamma$ -линоленовой кислоты и других жирных кислот способствует укреплению защитных сил организма, снижению артериального давления и количества холестерина в крови, ускорению заживления ран, снятию воспалительных процессов, восстановлению работы головного мозга, снижению риска образования тромбов. Продукты метаболизма энотеры широко

применяются в медицине для лечения заболеваний кожи, желудка и др. [2]. В частности, каротиноиды способны снижать негативные последствия стресса и ионизирующего излучения [3], повышать иммунитет.

Ввиду ограниченных естественных ресурсов энотеры, являющейся ценным источником для получения лекарственных средств, она внесена в число культивируемых растений в Австралии, США, Новой Зеландии, Канаде, Франции, Германии, Великобритании, Голландии, Венгрии и Польше. Главными мировыми производителями семян энотеры (300–400 т в год) являются США и Канада. В научно-практической медицине, фармацевтической и пищевой промышленности России и Украины семена и жирное масло энотеры не используются.

В отечественной и зарубежной литературе данные по оптическим свойствам экстрактов биологически активных соединений из семян энотеры двухлетней практически отсутствуют. В 2004 г. впервые были опубликованы результаты работ по извлечению существенных компонентов лечебных трав экстракцией высоким давлением [4]. Были исследованы процессы массопереноса, вызванного высоким давлением, и, как следствие, регулярного осмотического обезвоживания. В работах [5,6] обнаружено, что обработка высоким давлением повреждает структуру клеточной стенки, делая ее более проницаемой, что в свою очередь ускоряет процесс переноса массы и в результате значительно сокращает необходимое время обезвоживания. Эффективность массопереноса вследствие обработки высоким давлением не привлекла должного внимания для разработки математических моделей экстракции по сравнению с тем интересом, который вызывали микробная инактивация и продление срока годности продуктов.

Цель настоящей работы – изучение оптических свойств веществ, извлекаемых при экстракции сверхвысоким давлением, и нахождение возможных модельных решений для объяснения механизма массопереноса в широкой области изменений высоких давлений на примере молотых семян энотеры двухлетней как модельного однородного растительного материала.

## 1. Материалы и методы исследования

### 1.1. Материалы

Плоды энотеры двухлетней (*Oenothera biennis* L.), заготовленные осенью после второго года вегетации в период созревания, были взяты в Донецком ботаническом саду. Использовали спелые и полуспелые плоды, высушенные при температуре не более 50°C, из которых затем отделяли семена. Окраска семян красно-коричневая, длина 1–2 мм, ширина 0.5–1.25 мм, толщина 0.5–1.25 мм.

Семена подвергали размолу на планетарной шаровой мельнице, чтобы увеличить поверхность соприкосновения между полученными частицами (агрегатой) и растворителем. В результате размола в течение 5 min средний диаметр проецируемой площади частиц  $d_{av} = 0.2 \pm 0.03$  мм [7]. Этот размер попадает в принятую область оптимальных (0.2–0.5 мм) размеров для размола

семян, когда в исходной агрегате еще сохраняется неразрушенная клеточная структура и преобладают диффузионные процессы экстракции, а экстракт энотеры содержит меньше механических примесей и легче очищается [8].

Для извлечения триглицеридов жирных масел, содержащихся в энотере двулетней, обычно используют органические растворители (бензин, н-гексан, этанол) [9]. Поскольку коммерческий гексан, компонентом которого является н-гексан, занесен в список опасных загрязнителей воздуха Агентства США по охране окружающей среды, в качестве экстрагента в соответствии с требованиями фармакопейной статьи ФС 42-3071-00 был выбран органический растворитель 70%-ный этанол.

### ***1.2. Метод экстрагирования сверхвысоким давлением***

Для процесса ЭСВД была разработана и создана лабораторная автоматизированная установка АУВД с рабочим объемом  $2.8 \text{ cm}^3$ , в котором достигаются давления от 0.1 до 1000 МПа с точностью автоматического поддержания давления  $\pm 10$  МПа. Предусмотрена также регулировка температуры с точностью  $\pm 0.5^\circ\text{C}$  в рабочем диапазоне температур от 5 до  $100^\circ\text{C}$  [10].

Соотношение массы агрегаты энотеры (solid, g) и объема растворителя (solvent, ml) как 1:11 и 1:23 (или 1:10 и 1:20 в массовом соотношении) использовали для характеристики воздействия относительного расхода растворителя на скорость выщелачивания масла энотеры в процессе ЭСВД. Такое количество растворителя полностью покрывает молотые частички семян энотеры и приблизительно удовлетворяет условию постоянства концентрации извлекаемого вещества на межфазной границе.

Смеси агрегаты и растворителей были упакованы в герметичные термосваренные полиэтиленовые пакеты низкой плотности (гидромодули). Герметичные гидромодули помещали в камеру АУВД типа поршень–цилиндр, в которой в качестве передающей давление среды использовали силиконовое масло ПЭС-3, и подвергали процессу ЭСВД при различных давлениях (25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250 и 300 МПа) в течение 20 min при температуре окружающей среды  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ . Время выхода на заданное давление и сброса давления было не более 10 s. Для контрольных образцов использовали также 20-минутную экстракцию при атмосферном давлении (0.1 МПа).

### ***1.3. Определение выхода экстракта методом абсорбционной спектрофотометрии***

Исследование спектральных свойств экстрактов масла энотеры двулетней проводили методом абсорбционной спектрофотометрии в диапазоне длин волн от 280 до 1030 nm на экспериментальной установке с модернизированным однолучевым спектрографом PGS-2 (Carl Zeiss) и фотоприемным устройством на основе спектрофотометрического детектора СФД-1 с фотодиодом ФДУК-100УТ [11]. В качестве источника непрерывного естественно поляризованного электромагнитного излучения применяли вольфрамовую

лампу накаливания мощностью 170 W с цветовой температурой 1572 K. Регистрацию и обработку измеряемых величин осуществляли с помощью разработанной компьютерной программы управления. Для градуировки измеренных спектров по длинам волн в качестве репера использовали полосу излучения зеленого лазерного светодиода с максимумом при длине волны  $\lambda \approx 531.95$  nm, которую направляли на входную щель спектрографа при помощи специального зеркала.

Каждый гидромодуль со смесью, обработанный давлением, центрифугировали при 4000 rev/min в течение 5 min для отделения экстракта от шрота, отстаивали в течение 1 h и полученную чистую надосадочную фракцию экстракта использовали для исследований.

Измеряли оптическую плотность экстракта  $D(\lambda) = \ln(I_0/I)$ , где  $I_0$ ,  $I$  – интенсивность источника излучения, прошедшего соответственно через экстрагент в стандартной кварцевой кювете и через кювету с экстрактом, извлеченным из гидромодулей. Оптическая плотность является аддитивной величиной и согласно закону Бугера–Ламберта–Бера пропорциональна концентрации извлекаемого растворенного вещества. Для регистрации спектра оптической плотности она должна быть измерена в большом интервале длин волн. Поскольку поглощение экстракта энотеры в видимой области не имело явно выраженных спектральных линий, для анализа была выбрана интегральная величина – площадь под спектральной кривой во всем исследуемом диапазоне длин волн. Эту интегральную характеристику оптической плотности определяли как величину, пропорциональную усредненной концентрации  $\bar{C}$  масла энотеры. На двух эквивалентных образцах были проведены по два измерения в одинаковых условиях, и среднее значение полученных величин использовали в качестве данных для этих образцов в следующем процессе вычисления.

#### ***1.4. Моделирование процесса экстракции масла из сырья энотеры***

Процесс экстрагирования масла из размолотых слипшихся частиц семян энотеры – агрегаты (твердое тело) 70%-ным этанолом – экстрагентом (жидкость) состоит из двух стадий извлечения: быстрой (промывочной) и медленной (диффузионной) [12]. Во время первой стадии экстракции около 85% масла извлекается простой промывкой, которая обеспечивает высокую скорость переноса масла с твердой поверхности частиц к растворителю. В этой стадии молекулы раствора проникают в матрицы растения, непосредственно подвергая цитоплазму воздействию растворителя, что облегчает растворение в нем масла. При этом наблюдается постоянная экстремально высокая скорость извлечения, что затрудняет определение периода стадии [13].

Во второй стадии оставшееся масло извлекается путем диффузии, имеющей низкую скорость переноса (низкий кинетический коэффициент) масла из внутренней области матрикса твердой частицы растения к растворителю.

Объем выхода экстракта в течение этой стадии зависит от количества неповрежденных клеток, сохранившихся после промывки [13].

Влияние двустадийного (промывка/диффузия) процесса на объем выхода экстракта может быть определено пропорцией разрушенных и неповрежденных клеток после размола семян энотеры. Кинетические коэффициенты каждой из этих стадий обусловлены коэффициентами массопереноса, соотношением массы агрегаты семян и объема растворителя и равновесным соотношением количества масла внутри или на поверхности твердых частиц и его количества в растворителе [12]. Для границы раздела системы твердое тело–жидкость уравнение общего материального баланса этого двустадийного процесса имеет вид [14]:

$$C_L = C_L^w \left(1 - \exp\left[-k_c^w t\right]\right) + C_L^d \left(1 - \exp\left[-k_c^d t\right]\right), \quad (1)$$

где  $C_L$  – концентрация масла в растворителе в любое время  $t$  в ходе экстракции, g/ml;  $C_L^w$ ,  $C_L^d$  – конечные концентрации масла в фазе растворителя после процесса экстракции в результате соответственно промывочной и диффузионной стадий, g/ml;  $k_c^w$ ,  $k_c^d$  – кинетические коэффициенты соответственно для промывочной и диффузионной стадий,  $\text{min}^{-1}$ .

### **1.5. Определение эффективного коэффициента диффузии растворенного вещества**

При экстракции натуральных материалов в системе твердое тело–жидкость процесс диффузии веществ, растворенного внутри пористого твердого тела, в растворитель, как уже отмечалось, является стадией с ограниченной скоростью. Установление механизма, ограничивающего ее скорость, важно в кинетическом моделировании, поскольку он определяет математический подход для моделирования экстракции [15]. Предположим, что:

- агрегата молотых семян энотеры состоит из твердых пористых частичек сферической формы с максимальным радиусом  $r$ . Агрегаты являются псевдогомогенной средой, которая гомогенно смешивается с растворителем;
- начальная концентрация извлекаемых из сферической частицы биологически активных составов однородная и в процессе экстракции изменяется только при изменении радиуса частицы  $r$ ;
- процесс экстракции обусловлен явлением диффузии, в котором коэффициент диффузии не зависит от времени и концентрации растворенных веществ. При диффузии растворенных активных веществ отсутствует корреляция в состояниях движения компонентов;
- длительность экстракции достаточна для установления равновесия между концентрациями растворенного вещества внутри твердой частицы и в объеме растворителя.

С использованием этих предположений диффузионная модель экстракции может быть развита на основании решения дифференциального уравнения

Фика с соответствующими краевыми условиями. В простейшем случае одномерного потока обобщенное уравнение массопроводности для сферической частицы имеет вид [15–17]:

$$\frac{C - C_i}{C_0 - C_i} = \sum_{m=1}^{\infty} \frac{6\text{Bi}^2}{\mu_m^2 (\text{Bi}^2 - \text{Bi}^2 + \mu_m^2)} \exp(-\mu_m^2 \text{Fo}). \quad (2)$$

Здесь  $C$ ,  $C_i$  и  $C_0$  – соответственно текущая, равновесная и начальная концентрации;  $\text{Bi} = \beta r/D$  – диффузионный критерий Био (где  $\beta$  – коэффициент массоотдачи в жидкой фазе,  $r$  – радиус сферической частицы,  $D$  – коэффициент внутренней диффузии (массопроводности));  $\mu_m$  – корни характеристического уравнения:  $\text{tg} \mu = \mu / (1 - \text{Bi})$ ;  $\text{Fo} = Dt/r^2$  – диффузионный критерий Фурье.

При больших значениях критерия Био ( $\text{Bi} \rightarrow \infty$ ) скорость массопереноса определяется скоростью внутренней диффузии. Таким образом, если  $\text{Bi} > 10$ , внутренняя диффузия может быть определяющим фактором при моделировании процесса экстракции. Для растительных клеток величина диффузионного критерия  $\text{Bi}$  может достигать значений  $10^7$ – $10^{10}$ , что обнаружено при исследовании экстракции каротиноидов из микроморских водорослей [18].

Для диффузионной экстракции с достаточной длительностью ( $t \rightarrow \infty$ ) установления равновесия (при котором баланс растворенного вещества, заполняющего поры сферических частиц, с внешней средой оставался постоянным) решение уравнения (2) при  $\text{Bi} \rightarrow \infty$  имеет вид [15]:

$$\frac{\bar{C}}{C_{\infty}} = 1 - \frac{6}{\pi^2} \sum_{m=1}^{\infty} \frac{1}{m^2} \exp\left(-\frac{m^2 \pi^2 Dt}{r^2}\right), \quad (3)$$

где  $\bar{C}$  – усредненная концентрация растворенного вещества, перемещенного от сферической частицы за любое время;  $C_{\infty}$  – суммарная концентрация растворенного вещества, перемещенного после бесконечного времени.

Когда величина критерия Фурье  $\text{Fo} > 0.2$ , в ряде экспоненциальных членов уравнения (3) можно пренебречь всеми членами, кроме  $m = 1$ . Тогда кривая выхода экстракта принимает простой вид:

$$\frac{\bar{C}}{C_{\infty}} = 1 - \frac{6}{\pi^2} \exp\left(-\frac{\pi^2 Dt}{r^2}\right). \quad (4)$$

Корреляция, подобная уравнению Аррениуса, предложена для объяснения воздействия высокого давления на эффективные коэффициенты диффузии [19]:

$$D = A \exp(-BP), \quad (5)$$

где  $A$ ,  $B$  – константы;  $P$  – давление обработки, МПа.

### 1.6. Метод подгонки кривой

Экспериментальные данные абсорбционной спектроскопии были сглажены псевдо-методом Гаусса (тройной проход скользящего среднего) с шириной сглаживания 45 точек и прогрессивно более мелким сглаживанием на концах кривой. Для коррекции базовой линии использовали алгоритм адаптивных итеративно перевзвешенных штрафных наименьших квадратов (airPLS) [20]. Для подгонки модельной кривой к экспериментальным данным применяли нелинейную регрессию по методу наименьших квадратов (метод Гаусса–Ньютона). Разложение спектра интегральной оптической плотности масла энотеры на отдельные фракции вещества выполняли с помощью программы LineFit [21]. Качество подгонки и разложения оценивали коэффициентом детерминации  $R^2$ , который определен как

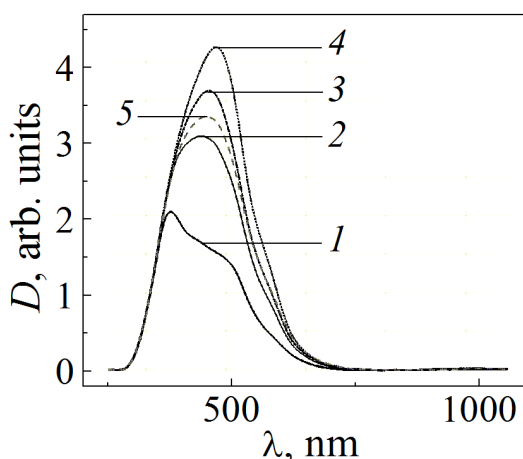
$$R^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y}_i)^2},$$

где в числителе второго члена записана сумма квадратов ошибок регрессионной модели;  $y_i$  – экспериментальная точка;  $\hat{y}_i$  – точка, предсказанная моделью; знаменатель – общая сумма квадратов, пропорциональная дисперсии данных;  $\bar{y}_i$  – среднее значение экспериментальной точки. Всю обработку данных проводили в среде Matlab с использованием функций Statistics Toolbox.

## 2. Результаты и обсуждения

### 2.1. Спектральный состав оптической плотности масла энотеры

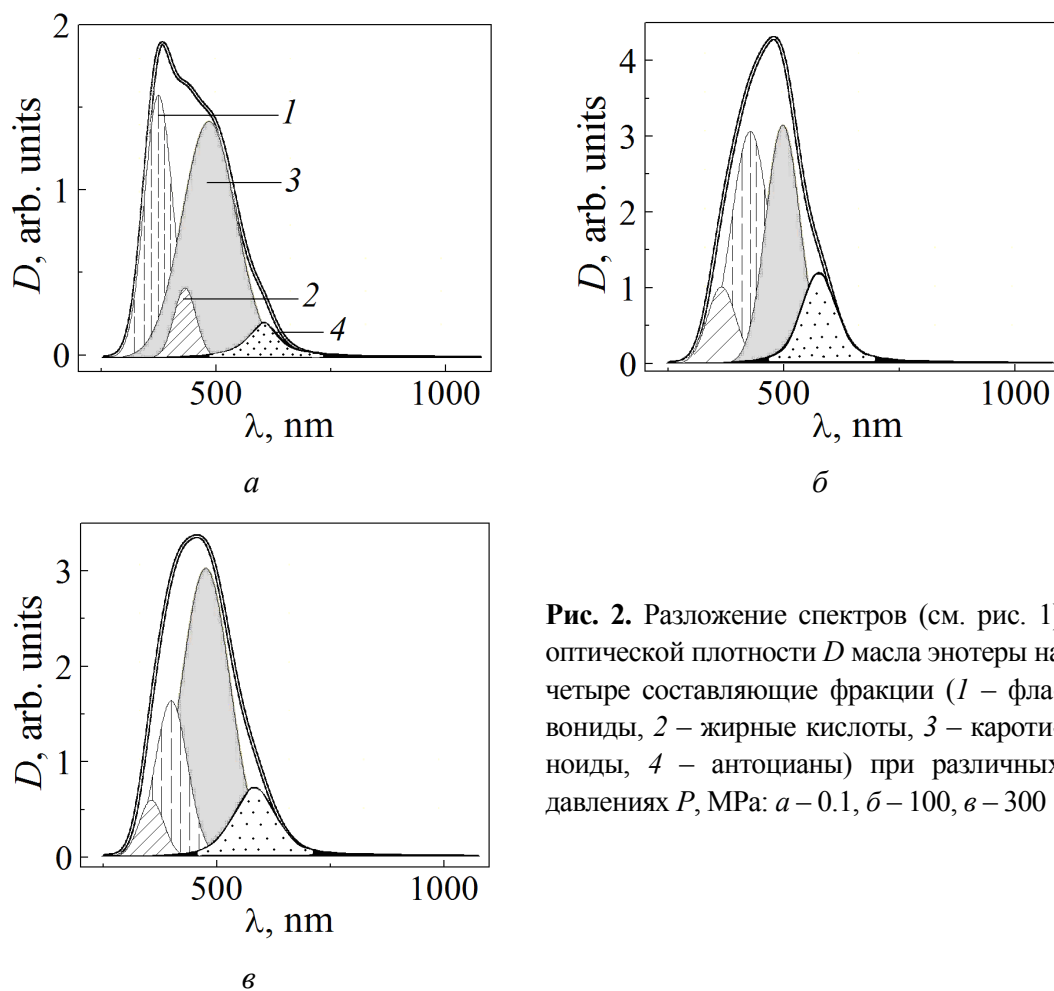
Спектры оптической плотности экстракта масла энотеры, зарегистрированные при комнатной температуре ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ) в интервале длин волн 200–1030 nm при воздействии на гидромодули различных внешних высоких и сверхвысоких давлений, показаны на рис. 1. Использовано отношение массы твердых частиц (solid, g) к объему растворителя (solvent, ml) 1:11 (или 1:10 в массовом соотношении). Из целого ряда различных давлений для наглядности приве-



**Рис. 1.** Спектры оптической плотности  $D$  экстракта масла энотеры, извлеченного при воздействии на гидромодули сверхвысокого давления  $P$ , МПа: 1 – 0,1, 2 – 25, 3 – 50, 4 – 100, 5 – 300 в интервале длин волн  $\lambda = 200\text{--}1030$  nm; solid:solvent = 1:11 g/ml

дены лишь некоторые из них. Все исследуемые спектры сравнивали с зарегистрированным при атмосферном давлении 0.1 МПа спектром, который был выбран в качестве контрольного образца. Из рисунка видно, что интегральная оптическая плотность (величина, пропорциональная усредненной концентрации  $\bar{C}$  масла энотеры) растет с увеличением давления и изменяется ее спектральный состав.

На рис. 2 представлены разложения с высокими коэффициентами детерминации  $R^2 = 0.99976\text{--}0.99985$  интегральных оптических плотностей масла энотеры на четыре перекрывающихся спектра масляных фракций при разных давлениях:  $P = 0.1$  (atm), 100 и 300 МПа. Эти четыре полосы поглощения обычно характерны для спектров значительного количества биологически активных веществ, которые являются спирторастворимыми. К ним относятся: полифенольные соединения – флавоноиды (полоса поглощения 300–400 nm, главный максимум при 380 nm) [22]; каротиноиды (400–550 nm, главный максимум при 480 nm) [23,24]; полярные флавоноиды – антоцианы (550–600 nm) [25,26]. В этой области длин волн также наблюдается поглощение в фитостеринах с максимумом 625 nm [27]. И, наконец, для продуктов высших жирных кислот в видимой области спектра наблюдается полоса поглощения 400–450 nm [28].



**Рис. 2.** Разложение спектров (см. рис. 1) оптической плотности  $D$  масла энотеры на четыре составляющие фракции (1 – флавоноиды, 2 – жирные кислоты, 3 – каротиноиды, 4 – антоцианы) при различных давлениях  $P$ , МПа:  $a$  – 0.1,  $б$  – 100,  $в$  – 300



Параметры	Флавоноиды (1)	Жирные кислоты (2)	Каротиноиды (3)	Антоцианы (4)
$P = 0.1 \text{ МПа}, R^2 = 0.99976$				
$\frac{A_i}{A_\Sigma} \cdot 100\%$	32	6.6	54.8	6.6
$p_i^{\max}, \text{ nm}$	388.1	441	488.9	597.7
$P = 100 \text{ МПа}, R^2 = 0.99985$				
$\frac{A_i}{A_\Sigma} \cdot 100\%$	9.5	38.7	35.5	16.3
$p_i^{\max}, \text{ nm}$	382.5	438.8	502.6	572.5
$P = 300 \text{ МПа}, R^2 = 0.99983$				
$\frac{A_i}{A_\Sigma} \cdot 100\%$	5.9	21.2	58.7	14.2
$p_i^{\max}, \text{ nm}$	373.5	413.7	483.1	580.4

*Примечание.* Здесь  $\frac{A_i}{A_\Sigma} \cdot 100\%$  – отношение величины спектральных площадей фракций к общей площади спектра;  $p_i^{\max}$  – максимум поглощения оптической плотности  $D$  для  $i$ -й фракции, nm.

Спектры масляных фракций позволяют визуально оценить степень извлечения биологически активных веществ из частичек энотеры при воздействии на гидромодули высоких давлений. Из разложений на рис. 2 следует, что для всех трех величин давления в масле энотеры присутствует значительное количество каротиноидов и небольшая доля антоцианов или фитостеринов.

При определении элементарного состава масла энотеры в процессе экстракции при атмосферном давлении отмечается незначительное (6.6%) количество жирных кислот. Здесь наряду с каротиноидами (54.8%) содержится большое количество флавоноидов (32%). Однако картина изменяется с повышением давления. При 100 МПа доля жирных кислот резко возрастает (38.7%), немного превышая количество каротиноидов (35.5%), а затем при 300 МПа уменьшается до 21.2%. Увеличение количества жирных кислот при высоких давлениях происходит в основном за счет существенного уменьшения доли флавоноидов (9.5% при  $P = 100 \text{ МПа}$  и 5.9% при  $P = 300 \text{ МПа}$ ). Полученные результаты свидетельствуют о том, что процесс ЭСВД характеризуется не только большим выходом масла энотеры, но и значительным увеличением в масле фракции жирных кислот с ростом давления.

## 2.2. Влияние высокого давления на выход масла энотеры

В обычно используемых методах экстракции величина выхода биологически активных веществ существенно зависит от экспериментальных условий. Остановимся на некоторых из них. В первую очередь температура ока-

зывает большое влияние на кинетику экстракции, вязкость растворителей, эффективность и общий выход экстрактов. При больших температурах уменьшается вязкость растворителя, и, как следствие, он лучше проникает в матрикс частиц и увеличивает выход большинства извлекаемых веществ. Однако высокие температуры приводят к химическому превращению термочувствительных соединений, которые теряют в результате свою биологическую активность. Поэтому процесс ЭСВД для всех образцов мы проводили при комнатной температуре  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ .

Следующим фактором является влияние концентрации этанола на экстракцию. Добавление в него воды повышает эффективность этого процесса. Экспериментально было установлено, что наибольший выход растворенных веществ наблюдается при использовании в качестве растворителя 70%-ного этанола [29]. При большей его концентрации выход экстракта быстро уменьшается, наиболее вероятно, из-за сворачивания протеинов в этаноле. Поскольку его концентрация является одним из критических факторов экстракции, в процессе ЭСВД мы использовали в качестве растворителя 70%-ный этанол с учетом его влияния на полярность извлекаемых веществ.

Для фиксированного количества агрегаты энотеры увеличение количества растворителя приводит к разбавлению растворенных веществ. При этом растет разность концентраций между внутренней частью растительных клеток и внешним растворителем, что приводит к повышению скорости экстракции и, в конечном счете, к увеличению выхода извлекаемых биологически активных компонентов. В практике широко применяется отношение  $\text{solid:solvent} = 1:20$  (g/ml). В наших исследованиях процесса ЭСВД мы использовали отношения 1:11 и 1:23.

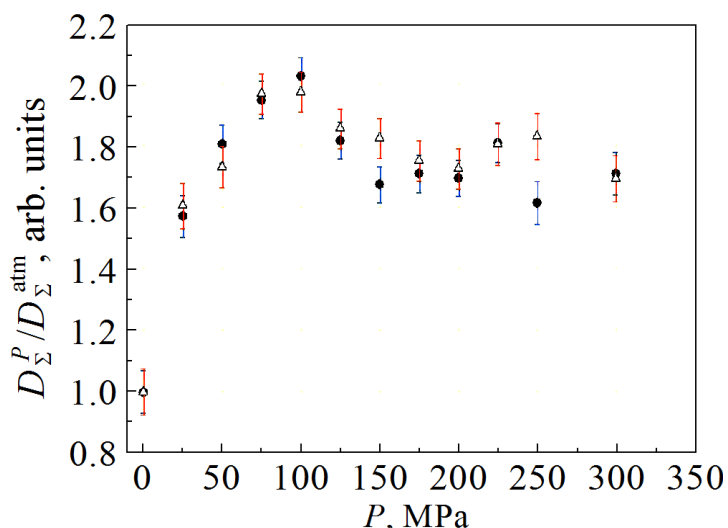
Рассмотрим еще один фактор – влияние времени на экстракцию. Обычно кривые зависимости выхода экстракта от времени растут при воздействии температуры в соответствии с уравнением Аррениуса. Как показано на рис. 1, выход экстракта также увеличивается с повышением внешнего давления. В наших измерениях время выхода на заданное значение давления и сброса давления составляло 10 s. Быстрое изменение давления приводит к росту напряжения в растительных клетках, что повышает степень их структурного повреждения (это подтверждено сканирующей электронной микроскопией) и в результате увеличивает выход извлекаемых веществ [30]. Степень разрушения клеток повышается с ростом давления и скорости его изменения. Изменение давления протекает быстро, следовательно, время извлечения главным образом зависит от времени удержания давления – времени ожидания, пока концентрация растворенного вещества в растворителе во внутренней части твердой частицы не станет равновесной концентрации растворенного вещества в объемном растворителе. В нашем эксперименте время удержания давления составляло 20 min.

На рис. 3 показана зависимость нормированной интегральной оптической плотности образцов энотеры от давления в процессе ЭСВД для двух различ-

ных отношений массы агрегаты к объему растворителя. В ходе измерений все рассмотренные выше экспериментальные факторы оставались постоянными. Предполагаем, что механизм ЭСВД включает два типа диффузионных процессов, происходящих в твердых частичках молотых семян энотеры:

- тип 1 (диапазон от атмосферного давления до 100 МПа) – диффузия из клеток с неразрушенными мембранами, осложненная осмосом;
- тип 2 (область давлений выше 100 МПа) – диффузия из клеток с частично или полностью разрушенными мембранами.

Из рис. 3 также следует, что стандартное отношение solid:solvent = 1:20, обычно используемое для экстракции масел из растительных семян, не увеличивает количество полученного масла энотеры в процессе ЭСВД. Аналогичный результат был сообщен ранее для количества масла, экстрагированного из муки сои [30].



**Рис. 3.** Барическая зависимость отношения площади под спектрами оптической плотности  $D_{\Sigma}^P$  к площади спектра при атмосферном давлении  $D_{\Sigma}^{\text{atm}}$  для масла энотеры, извлеченного методом ЭСВД из двух гидромодулей: ● – solid:solvent = 1:11 g/ml, Δ – 1:23 g/ml. Возле каждой точки показан 95%-ный доверительный интервал

### 2.3. Эффективный коэффициент диффузии в режиме процесса по типу 1

Рассмотрим область от атмосферного давления до 100 МПа, в которой осуществляется ЭСВД в предполагаемом режиме диффузии по типу 1. Путем логарифмирования уравнения (4) и учета зависимости эффективного коэффициента диффузии от давления (5) придем к уравнению логарифмической зависимости выхода экстракта от величины внешнего давления в виде

$$\ln\left(\frac{C_{\infty} - \bar{C}}{C_{\infty}}\right) = \ln\frac{6}{\pi^2} - \frac{\pi^2 t}{r^2} D_{01} \exp(-BP), \quad (6)$$

где  $D_{01}$  – эффективный коэффициент диффузии при атмосферном давлении.

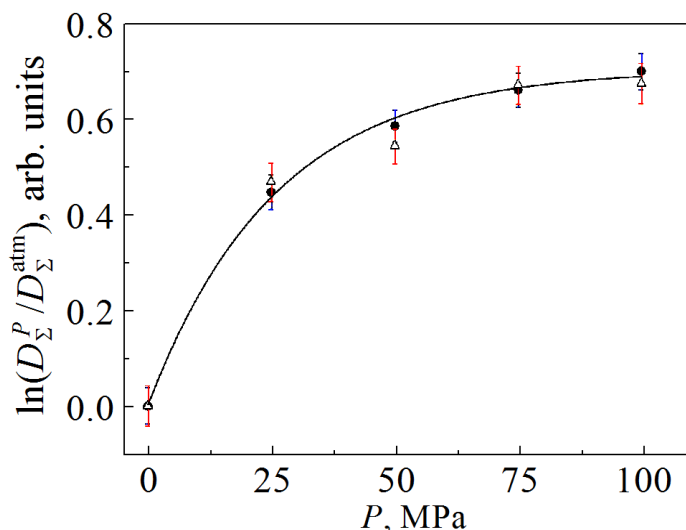
Уравнение (6) можно записать в упрощенном виде, который будет использоваться для компьютерной подгонки кривой к экспериментальным данным:

$$\ln(y) = b(1) - b(2)\exp(-b(3)x). \quad (7)$$

На рис. 4 показана логарифмическая зависимость выхода масла энотеры (измеренного методом абсорбционной спектроскопии в процессе ЭСВД в режиме диффузии по типу 1) от приложенного давления в интервале от 0.1 до 100 МПа. Подгоночная кривая построена по уравнению (7) с высоким коэффициентом детерминации  $R^2 = 0.9992$ . В результате получены значения подгоночных коэффициентов:  $b(1) = 0.7103$ ,  $b(2) = 0.7108$ ,  $b(3) = 0.0387$ . Подгоночный коэффициент  $b(2)$  можно использовать для вычисления эффективного коэффициента диффузии при атмосферном давлении из равенства

$$b(2) = \frac{\pi^2 t}{r^2} D_{01}. \quad (8)$$

Подставляя в равенство (8) время экстракции  $t = 1200$  s и средний радиус сферической частички молотых семян энотеры  $r = 0.0001$  m, вычислим значение эффективного коэффициента диффузии:  $D_{01} = 6.003 \cdot 10^{-13}$  m<sup>2</sup>/s. Порядок величины  $D_{01}$  совпадает с литературными данными для экстракции водно-спиртовыми растворами [13,31].



**Рис. 4.** Логарифмическая зависимость отношения  $D_{\Sigma}^P / D_{\Sigma}^{\text{atm}}$  от приложенного давления  $P$ . Подгоночная кривая построена по уравнению (7), коэффициент детерминации  $R^2 = 0.9992$ ; ● – solid:solvent = 1:11 g/ml, Δ – 1:23 g/ml

#### 2.4. Эффективные коэффициенты диффузии для двух типов режимов процесса

Рассмотрим теперь выход масла энотеры при экстракции во всем диапазоне исследуемых давлений, который охватывает процесс массопереноса от

твердых частиц к основной массе 70%-ного этанола, для двух режимов диффузии (по типам 1 и 2). При давлении около 100 МПа между этими режимами существует переходная область, в которой под воздействием давления начинают разрушаться плазматические мембраны растительных клеток. Обычно это происходит, когда внешнее гидростатическое давление становится больше внутриклеточного (тургорного). Благодаря наличию прочной клеточной стенки тургорное давление большинства растений достигает 5–10 МПа. Однако исследования проницаемости мембран клеток растений *Chenopodium rubrum* (марь красная) и *Morinda citrifolia* (цитрусолистная моринда) показали, что их жизнеспособность была потеряна при давлениях соответственно 110 и 75 МПа [5]. При 100 МПа и выше практически у всех крупных клеток межклеточные перегородки оказались разрушенными, площадь контакта экстрагента с поверхностью твердых частиц достигла своего максимального значения, и почти вся масса извлекаемых компонентов уже находилась в экстрагенте. Остались не разрушенными только клетки малых размеров, процесс экстракции которых носит диффузионный характер.

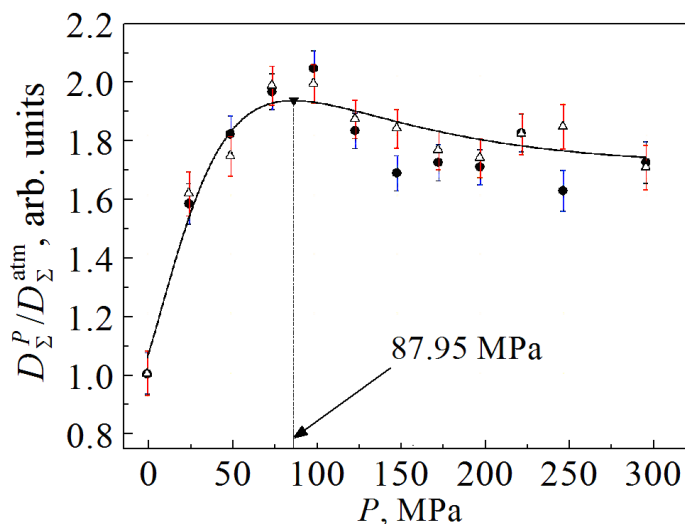
С другой стороны, высокие давления в несколько раз повышают вязкость органических растворителей (из справочных данных вязкость этилового спирта при 100 МПа увеличивается в 2.123 раза). В результате проникновение растворителя в матрикс частиц ухудшается, извлечение экстрактивных веществ уменьшается и для удержания высокого давления требуется больше времени. В итоге выход масла при давлениях от 100 МПа и выше плавно убывает.

Основываясь на традиционном приближении Фика и следуя работе [33], можно расширить уравнение (4) для описания двух типов режимов диффузии, включив такой же по форме второй член для диффузии по типу 2, но с другими подгоночными коэффициентами. В упрощенной форме, пригодной для компьютерной подгонки, такое уравнение будет иметь вид

$$y = 1 + b(1) \exp(-b(2) \exp(-0.0387x)) - \exp(-b(3) \exp(-b(4)x)). \quad (9)$$

Здесь во второй экспоненте второго члена вставлен коэффициент 0.0387, определенный ранее подгонкой по уравнению (7) для режима диффузии по типу 1. При постоянной температуре он прямо пропорционален активационному объему  $V_a$  [19], который по определению равен разности объемов системы в основном и активированном состояниях. Величина  $V_a$  является одной из важнейших характеристик для каждого из режимов диффузии. Ранее найденный предэкспоненциальный коэффициент 0.0387 участвует в новой подгонке, поскольку одновременно рассматриваются два режима диффузии.

Результат подгонки модельной кривой по уравнению (9) показан на рис. 5. Подгоночные коэффициенты равны:  $b(2) = 1.390$  и  $b(3) = 0.9873$  при коэффициенте детерминации  $R^2 = 0.9412$ . Используя равенство (8), мы вычислили эффективные коэффициенты диффузии для режимов по типу 1 (при давлениях до 100 МПа):  $D_{0h} = 11.743 \cdot 10^{-13} \text{ м}^2/\text{с}$  и по типу 2 (от 100 до 300 МПа):  $D_{0u} = 8.339 \cdot 10^{-13} \text{ м}^2/\text{с}$ .



**Рис. 5.** Зависимость отношения  $D_{\Sigma}^P / D_{\Sigma}^{\text{atm}}$  от приложенного давления  $P$  в области двух режимов диффузионной экстракции масла энотеры. Подгоночная кривая построена по уравнению (9), коэффициент детерминации  $R^2 = 0.9412$ . Стрелкой указано оптимальное давление процесса экстракции, при котором извлекается максимальная масса масла энотеры:  $P = 87.95$  МПа; ● – solid:solvent = 1:11 g/ml, Δ – 1:23 g/ml

Полученные значения коэффициентов диффузии указывают на тот факт, что основная масса масла энотеры извлекается при давлениях до 100 МПа. Подгоночная кривая, построенная по уравнению (9), имеет максимальное значение при давлении  $P = 87.95$  МПа, которое является оптимальным для процесса ЭСВД, поскольку при этом извлекается максимальная масса экстрагируемых биологически активных веществ. Следует отметить, что найденная величина оптимального давления экспериментально легко достижима, что существенно удешевляет использование в промышленности нового метода ЭСВД.

### Заключение

Разработана методика получения качественного лекарственного средства из семян энотеры двулетней, в частности термочувствительного, на основе современного метода ЭСВД и абсорбционной спектроскопии оптического диапазона длин волн. Определен спектральный состав оптической плотности масла энотеры. Обнаружено, что в процессе ЭСВД с ростом давления существенно увеличивается фракция жирных кислот от 6.6% при атмосферном давлении до 35.5% при 100 МПа.

На основе экспериментальных данных по выходу масла энотеры при ЭСВД сделано предположение, что механизм ЭСВД включает два режима диффузионных процессов:

- тип 1 – диффузия из клеток с неразрушенными мембранами, осложненная осмосом, при давлениях до 100 МПа;
- тип 2 – диффузия из клеток с частично или полностью разрушенными мембранами при больших давлениях выше 100 МПа.

Показано, что основная масса масла энотеры извлекается в первом режиме диффузии. С использованием приближения Фика записаны подгоночные уравнения для этих режимов и вычислены эффективные коэффициенты диффузии для первого и второго режимов соответственно:  $D_{0h} = 11.743 \cdot 10^{-13} \text{ m}^2/\text{s}$  и  $D_{0u} = 8.339 \cdot 10^{-13} \text{ m}^2/\text{s}$ . Показано, что подгоночная кривая имеет максимум при давлении  $P = 87.95 \text{ МПа}$ , которое является оптимальным для максимального извлечения масла энотеры при использовании процесса ЭСВД.

В работе не наблюдалось явного влияния большего количества растворителя (1:23) на количество извлеченного масла при экстракции энотеры. Полученные результаты показывают, что традиционно используемое соотношение  $\text{solid:solvent} = 1:20$  может быть неэффективным для метода ЭСВД.

Сочетание метода экстракции ЭСВД и абсорбционной спектроскопии оптического диапазона для контроля качества экстрагирования является альтернативным инструментом низкой стоимости и легкой доступности в фармацевтической промышленности.

1. R. Knorr, M. Hamburger, J Agric Food Chem. **52**, 3319 (2004).
2. Р.В. Куцик, Б.М. Зузук, Провизор № 2 (2005).
3. Л.И. Парамонова, А.Ф. Лизунков, В.К. Милованов, Доклады ВАСХНИЛ **11**, 30 (1989).
4. Z. Shouqin, Z. Junjie, W. Changzhen, International Journal of Pharmaceutics **278**, 471 (2004).
5. H. Dörnenburg, D. Knorr, Food Biotechnology **7**, 35 (1993).
6. N.K. Rastogi, A. Angersbach, D. Knorr, Journal of Food Engineering **45**, 25 (2000).
7. Г.В. Букин, В.Ф. Дроботько, В.В. Забродский, С.А. Соколов, Н.Н. Севаторов, Я.Г. Букина, И.П. Бухтиярова, Т.П. Кохан, ФТВД **27**, № 3, 51 (2017).
8. М.В. Леонова, Ю.Н. Климочкин, Экстракционные методы изготовления лекарственных средств из растительного сырья: учебно-методическое пособие, Самар. гос. техн. ун-т, Самара (2012).
9. Б.Н. Тютюнников, Химия жиров, Пищевая промышленность, Москва (1974).
10. G.V. Vukin, G.G. Levchenko, A.I. Kasyanov et al., Inter. conf. «Functional Materials (ICFM-2007)», Ukraine, Crimea, Partenit, Oct. 1-6, 2007: Abstr. Book, Simferopol (2007), p. 282; Патент Украины № 54309.
11. В. Суханов, В. Забродский, П. Аруев, Е. Шерстнев, П. Втулкин, С. Марченко, Фотоника № 1, 74 (2014).
12. G.C. So, D.G. Macdonald, The Canadian Journal of Chemical Engineering **64**, 80 (1986).
13. С.-Н. Chan, R. Yusoff, G.-С. Ngoh, Chemical Engineering Research and Design **92**, 1169 (2014).
14. G.C. So, Studies of the Oil Extraction Kinetics of Rapeseed (Canola), Master's Thesis, University of Saskatchewan (1984).
15. Г.А. Аксельруд, В.М. Лысянский, Экстрагирование (система твердое тело-жидкость), Химия, Ленинград (1974).
16. П.Г. Романков, Н.Б. Рашковская, В.Ф. Фролов, Массообменные процессы химической технологии (системы с твердой фазой), Химия, Ленинград (1975).
17. Н.А. Макаревич, Н.И. Богданович, С.И. Третьяков, Е.Н. Коптелова, Химия растительного сырья № 4, 251 (2014).

18. M.D. Maias-Sánchez, C.M. Serrano, M.R. Rodríguez, E. Martínez de la Ossa, Chem. Eng. J. **150**, 104 (2009).
19. B. Ly-Nguyen, A.M. Van Loey, C. Smout, S.E. Özcan, D. Fachin, I. Verlent, S. Vu Truong, T. Duvetter, M.E. Hendrickx, Journal of Food Science **68**, 1377 (2003).
20. Z.-M. Zhang, S. Chen, Y.-Z. Liang, Analyst **135**, 1138 (2010).
21. Zhang Jiang, 2016, <http://nanoxray.blogspot.com/>
22. S. Jing, S. Wang, Q. Li, L. Zheng, L. Yue, S. Fan, G. Tao, Food Chemistry **192**, 319 (2016).
23. А.Г. Курегян, Фундаментальные исследования № 2–23, 5166 (2015).
24. Государственная фармакопея СССР, XI издание, Выпуск 2. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье, Медицина, Москва (1990).
25. О.В. Тринева, А.И. Сливкин, М.А. Казьмина, Вестник ВГУ. Серия: Химия, Биология, Фармация № 3, 118 (2014).
26. И.Х. Хаззаа, В.А. Вайнштейн, Т.Х. Чибилев, Химико-фармацевтический журнал **37**, № 7, 20 (2003).
27. L.B.D.C. Araújo, S.L. Silva, M.A.M. Galvão, M.R.A. Ferreira, E.L. Araújo, K.P. Randau, L.A.L. Soares, Rev Bras Farmacogn **23**, 736 (2013).
28. R.P. Gonçalves, P.H. Março, P. Valderrama, Food Chemistry **163**, 83 (2014).
29. R. Chen, F. Meng, S. Zhang, Z. Liu, Separation and Purification Technology **66**, 340 (2009).
30. J.T. Uhm, W.B. Yoon, Journal of Food Science **76**, E444 (2011).
31. R. Wongkittipong, L. Prat, S. Damronglerd, C. Gourdon, Separation and Purification Technology **40**, 147 (2004).
32. M. Hojnik, M. Škerget, Ž. Knez, LWT – Food Science and Technology **41**, 2008 (2008).

V.F. Drobot'ko, V.N. Varyukhin, G.V. Bukin, S.A. Sokolov, V.P. Golovinov

## EFFECT OF CONDITIONS OF EXTRACTION BY SUPER-HIGH PRESSURE ON THE YIELD OF OIL OF TREE PRIMROSE

Optical properties of ethanolic extract of the oil of tree primrose seeds (*Oenothera biennis* L.) are studied. To extract the oil, a new method was applied, namely, extraction by super-high pressure (ESHP). The spectral composition of the optical density of the primrose oil was registered. It was found that pressure effect substantially increases the fraction of fatty acids from 6.6% under atmospheric pressure up to 35.5% under 100 MPa. The mechanism of ESHP was studied. The existence of two modes of diffusion in different pressure ranges is demonstrated. The modes are characterized by native membranes and partially or totally damaged ones. The effective diffusion coefficients are calculated in these areas;  $D_{0h} = 11.743 \cdot 10^{-13} \text{ m}^2/\text{s}$  and  $D_{0u} = 8.339 \cdot 10^{-13} \text{ m}^2/\text{s}$ , respectively. The use of fitting curves provided optimum pressure values associated with the maximum yield of oil. In our case, the optimum pressure is  $P = 87.95 \text{ MPa}$ .

**Keywords:** super-high pressure extraction, primrose oil, mass transfer, effective diffusion coefficient, UF-visible absorption spectroscopy, optical density

**Fig. 1.** Spectra of optical density  $D$  of the extract of tree primrose oil produced by super-high pressure effect on hydromoduli  $P$ , MPa: 1 – 0.1, 2 – 25, 3 – 50, 4 – 100, 5 – 300 within the wavelength range  $\lambda = 200\text{--}1030 \text{ nm}$ ; solid:solvent = 1:11 g/ml



**Fig. 2.** Expansion of the spectra of optical density  $D$  of the primrose oil (see Fig. 1) in four constituent fractions (1 – flavonoids, 2 – fatty acids, 3 – carotenoids, 4 – antocyanins) under varied pressure  $P$ , MPa:  $a - 0.1$ ,  $b - 100$ ,  $c - 300$

**Fig. 3.** Pressure dependence of the ratio of the area below the spectra of the optical density  $D_{\Sigma}^P$  to the area of the spectrum under atmospheric pressure  $D_{\Sigma}^{\text{atm}}$  for the primrose oil extracted by ESHP from two hydromoduli:  $\bullet$  – solid:solvent = 1:11 g/ml,  $\Delta$  – 1:23 g/ml. Confidence interval of 95% is shown at every point

**Fig. 4.** Logarithmic pressure dependence of the ratio  $D_{\Sigma}^P/D_{\Sigma}^{\text{atm}}$ . The fitting curve is plotted by equation (7), the coefficient of determination is  $R^2 = 0.9992$ ;  $\bullet$  – solid:solvent = 1:11 g/ml,  $\Delta$  – 1:23 g/ml

**Fig. 5.** Pressure dependence of the ratio  $D_{\Sigma}^P/D_{\Sigma}^{\text{atm}}$  in the vicinity of two modes of diffusion extraction of the primrose oil. The fitting curve is plotted by equation (9), the coefficient of determination is  $R^2 = 0.9412$ . The arrows marks the optimum pressure of extraction associated with the maximum yield of the primrose oil:  $P = 87.95$  MPa;  $\bullet$  – solid:solvent = 1:11 g/ml,  $\Delta$  – 1:23 g/ml