

УДК 54.056: 66.061.34:547:918

Марійчук Р., к.х.н., доц.; Феєр Й., PhD., наук. співр.; Еліашова А., PhD., наук. співр.;
Грульова Д., PhD., наук. співр.; Шаламон І., к.б.н., доц.

ЕКСТРАКЦІЯ АНТОЦІАНІНІВ ІЗ РОСЛИННОЇ СИРОВИНИ

Кафедра екології, Факультет гуманітарних та природничих наук, Пряшівський
університет в Пряшеві, вул. 17-го Листопада 1, 08116, м. Пряшів, Словаччина;
e-mail: mariychuk@ukr.net

Вступ

Антоціаніни це сполуки, що відносяться до фенольних флаваноїдів, які спричиняють яскраво-червоний, синій чи пурпурний колір ягід і плодів. Наприклад, малина (*Rubus idaeus* L.), бузина чорна (*Sambucus nigra* L.), чорниця (*Vaccinium myrtillus* L., *Vaccinium corymbosum* L.), горобина чорноплідна (*Aronia melanocarpa* Wild.) чи синій виноград (*Vitis vinifera*). На теперішній час відомо приблизно 400 ідентифікованих антоціанінів [1]. Інтерес до цього класу сполук пов'язаний з можливістю їх широкого застосування у якості біологічних добавок до раціону харчування, медичних препаратів, через їх сильні антиоксидантні, протиракові властивості [2]. Існують повідомлення про їх ефективність проти захворювання цукровим діабетом та для відновлення зору. В останній час, все більше публікацій присвячено проблемі застосування антоціанінів у виробництві сонячних батарей [3]. Карпатський регіон багатий на рослини, що можуть служити природним джерелом антоціанінів. Особливістю розповсюдження антоціанінів у плодах і ягодах, є їх низька концентрація, а також швидка деградація під впливом світла, кисню повітря, тепла, кислотності розчину і т.д. Метою даної роботи було проаналізувати відомі методи екстракції та очистки антоціанінів із природної рослинної сировини та вивчити спектр антоціанінів, які можна одержувати із рослинної сировини Карпатського регіону.

Експериментальна частина

Досліджувані плоди бузини, чорниці, горобини було зібрано з полів біля міста Михайлівце, південно-східна частина Словаччини. Для екстракційних експериментів використовували свіжі, та заморожені

плоди. Чистота реагентів, етанол, оцтова та лимонна кислоти, відповідали класу ч.д.а. (Sigma-Alrich). Для твердофазної екстракційної очистки антоціанінів використовували силікагелевий адсорбент C₁₈ (Silicagel 100 C₁₈, Sigma-Alrich).

Екстрагування антоціанінів з плодів водно-етанольним розчином, підкисленим щавлевою, оцтовою та лимонною кислотою з подальшим вилученням етанолу вакуумною відпаркою Buchi R3 (Швейцарія) та додатковою очисткою.

Кількісне визначення вмісту загального вмісту антоціанінів в екстрактах виконували методом рН-диференціальної фотометрії УФ-спектрофотометра Shimadzu 1800 [4]. Дві аліквоти екстракту, один з КСІ буферним розчином рН=1.0, другий з ацетатно натрієвим буферним розчином рН=4.5, фотометрували при 700 нм (для врахування поглинання завислими частинками) та при 520 нм. Загальний вміст антоціанінів розраховували на основі різниці абсорбції $A=(A_{520}-A_{700})_{\text{pH}1.0}-(A_{520}-A_{700})_{\text{pH}4.5}$ за формулою:

$$C = \frac{A \times MW \times DF \times 1000}{e \times l};$$

де MW – молярна маса ціанідін-3-глюкозиду, DF – коефіцієнт розведення, e – молярна абсорбція та l – товщина кювети. Концентрація антоціанінів розраховувалася в еквіваленті мг/мл найбільш розповсюдженого антоціаніну – ціанідін-3-глюкозиду.

Хроматографічний аналіз виконано рідинному хроматографі Dionex UltiMate 3000 Quarternary Analytical LC System з діодним детектором Germering (Німеччина) інтегрованого з мас-спектрометром Varian 310-MS, електро-іонізатор Walnut Creek (США). Використано хроматографічну колону Dionex Acclaim 120 C₁₈ з розміром частинок 5 мкм, розміром 250 мм × 4.6 мм

при температурі 25 °С. Довжина хвилі визначення 520 нм. Квантифікацію виконано за допомогою внутрішнього стандарту – ціанідін-3-глюкозиду.

Результати та їх обговорення

Процес екстракції складається з кількох кроків, які повинні бути оптимізовані у залежності від вихідного рослинного матеріалу, об'ємів екстракції, очікуваного кінцевого продукту. Одержання первинного екстракту вимагає екстракції підкисленим етанольно-водним розчинником. За ним слідує відділення етанолу вакуумним випаровуванням, очистка і розділення пігментів. З літератури [5] відомо, що ці процеси повинні пробігати без хімічних змін антоціанів, тому кислу реакцію розчинника слід створювати слабкими органічними кислотами (напр., оцтова чи лимонна), аж ніяк не сильними соляною чи сульфатною.

Найчастіше, в якості розчинника використовували підкислені метанол чи етанол. Однак, н-бутанол, охолоджений ацетон, пропіленгліколь та метанол/ацетон/вода суміші і навіть кип'яча вода також застосовувалися [5]. Переваги ж ацетон-водного розчинника описано у роботі [6]. В рамках даного дослідження, вибрано екстракційну систему на базі етанолу, оскільки він є нетоксичним і дешевим.

Кількісне вилучення антоціанінів вимагає оптимального співвідношення розчинник-зразок. Дві і більше реекстракцій свіжим розчинником необхідно для повного вилучення. З метою знаходження найбільш ефективної екстракційної системи було здійснено серії екстракційних експериментів, що відрізнялися вихідними рослинними матеріалами (свіжі, заморожені та ліофілізовані), різним співвідношенням компонентів розчинника, різним співвідношенням розчинник-зразок, кислоти для корекції рН та час екстракції.

Проаналізовано оптимальне співвідношення складу розчинника етанол-вода і за допомогою методу диференціальної рН спектрофотометрії було встановлено, що оптимальним розчинником є суміш 70 % етанолу і 30 % води [7].

Найбільшу ефективність екстракції виявлено при використанні оцтової та лимонної кислоти щавлевої кислоти [7].

Однак її застосування обмежено через здатність утворювати оксалатні камені в людському організмі. Добрі результати одержано для лимонної кислоти, однак висока температура кипіння не дозволяє вилучати її вакуумним випаровуванням, тому 0.1 % концентрація оцтової кислоти у розчиннику була визнана як оптимальна.

Оптимальний час екстракції, який відповідає настанню стану рівноваги між концентрацією антоціанінів в рідкій та твердій фазах встановлено як 20 хв [7]. Однак, час встановлення рівноваги залежить ще від ряду факторів (розмір частинок сировини, температура і т.д.), тому оптимальним часом визнано 30 хв.

В табл. 1 приведено аналіз ефективності вилучення антоціанів із плодів чорниць, горобини та плодів бузини шляхом порівняння літературних даних та експериментальних даних. В приведених результатах можна зробити висновок, що найвищий ступінь екстракції досягається для чорниць, а найнижчий для горобини и. Це може пояснюватися різною розчинністю антоціанів, що містяться у різних плодах. Так, домінуючим антоціаніном у екстракті, що одержано з бузини є ціанідін-3-глюкозид, в той час як в екстракті з чорноплодогоробини є ціанідін-3-галактозид (табл. 2).

Висновки

Показано, що природна сировина Карпатського регіону може бути потужним джерелом для одержання антоціанів, які дедалі знаходять більше застосування у харчовій промисловості, фармакології та мають перспективу знайти застосування у виробництві альтернативних джерел енергії. Найвищий вміст антоціанінів виявлено у плодах бузини, горобини та бузини, які є природним джерелом ціанідін-3-глюкозиду та ціанідін-3-галактозиду.

Дослідження виконано за фінансової підтримки Міністерства Освіти Словацької республіки в рамках проекту: *Вилучення природних компонентів рослин ліофілізацією та модифікація їх якісно-кількісних властивостей* (№ 00162-0001/MŠ SR-3634/2010-11/).

Таблиця 1. Загальний вміст антоціанів вилучений із рослинних матеріалів після трьох циклів екстракції за допомогою розчину етанол:вода:лимонна кислота =70:29.9:0.1

Вміст антоціанів, % ваг.	<i>Vaccinium myrtillus</i> L.	<i>Vaccinium corymbosum</i> L.	<i>Sambucus nigra</i> L.	<i>Aronia melanocarpa</i> Wild.
Літературні дані [1]	0.300 – 0.698		0.664 – 1.816	0.869
Експериментальні дані	0.52±0.04	0.62±0.04	0.98±0.05	0.65±0.04

Таблиця 2. Вміст антоціанів в екстрактах

Рослинна сировина	Антоціанін	Вміст антоціанів, мг/мл (рідинна хроматографія)	Загальний вміст антоціанів, мг/мл (фотометрія)
Горобина	ціанідін-3-галактозид	3.44±0.34	7.77±0.09
	ціанідін-3-глюктозид	0.34±0.04	
Бузина	ціанідін-3-диглюкозид	0.47±0.03	13.69±0.12
	ціанідін-3-глюкозид	5.76±0.44	

Список використаних джерел

- Mateus N., Silva A.M.S., Santos-Buelga C. Identification of Anthocyanin-Flavanol Pigments in Red Wines by NMR and Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, 2110-2116.
- Wu X., Gu L., Prior R., McKay S. Characterization of anthocyanins and proanthocyanidins in some cultivars of Ribes, Aronia, and Sambucus and their antioxidant capacity. *J. Agric. Food Chem.* 2004, 52(26), 7846-7856.
- Argazzi R., Murakami Iha N.Y., Zabri H., Odobel F., Bignozzi C.A. Design of molecular dyes for application in photoelectrochemical and electrochromic devices based on nanocrystalline metal oxide semiconductors. *Coord. Chem. Rev.* 2004, 248, 1299-1316.
- Giusti M.M., Wrolstad R.E. Anthocyanins. Characterization and Measurement with UV-Visible Spectroscopy. In *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. 1998, 2, 19-31.
- Giusti M.M., Ghanadan H., Wrolstad R.E. Elucidation of the structure and conformation of red radish (*Raphanus sativus*) anthocyanins using one- and two-dimensional nuclear magnetic resonance techniques. *J. Agric. Food Chem.* 1998, 46, 4858-4863.
- García-Viguera C., Zafrilla P., Tomás-Barberán F.A.. The use of acetone as an extraction solvent for anthocyanins from strawberry fruit. *Phytochemical Analysis*. 1998, 9, 274-277.
- Mariychuk R., Šalamon I., Fejer J., Grulova D., Eliasova A. The development of large-scale technique for extraction of anthocyanins from ecologically pure plant materials. *Procc. 3rd International joint conference. Budapest, Hungary*. 2012. ISBN 978-615-5018-50-3. CD-ROM, P. 169-177.

Стаття надійшла до редакції: 21.10.2014.

EXTRACTION OF ANTHOCYANINS FROM PLANTS MATERIAL

Mariychuk R., Fejer J., Eliašová A., Grul'ová D., Šalamon I.

The present investigation is dedicated to the development of large scale technique for isolation of anthocyanins from plant materials of Carpatian region. The main interest have been concentrated on local plant materials: *Aronia melanocarpa*, *Sambucus nigra*, *Vaccinium myrtillus*, *Vaccinium corymbosum*. The content and composition of anthocyanins in obtained extracts been examined by pH-differential spectroscopy and HPLC. It was found that major anthocyanin in was *Aronia melanocarpa* is cyanidine-3-galactozide (over 60 % of all anthocyanins) and the major anthocyanin in *Sambucus nigra* is cyanidine-3-glucozide (over 40%).