Влияние условий экстракции на антиоксидантные свойства извлеченных фитофенолов

Н.Ю. Грибова

Украинская лаборатория качества и безопасности продукции, АПК Национального университета биоресурсов и природопользования
ул. Героев Обороны, 15, г. Киев, 03041, Украина, gribovanataliya2007@rambler.ru

Поступила: 12 апреля 2012 г / Принята к публикации: 7 ноября 2012 г.

Фитофенолы и экстракты некоторых лекарственных растений, с высоким содержанием фитофенолов, являются перспективными ингибиторами процессов окисления липидсодержащей продукции фармацевтического и пищевого назначения. С целью повышения эффективности и специфичности извлечения фитофенолов из листьев толокнянки исследовано влияние физико-химических условий процесса экстракции на антиоксидантную активность полученного экстракта. Установлены параметры интенсификации, позволяющие получать смесь природных соединений, обладающих высокой антиоксидантной активностью, повышающие стабильность липидов подсолнечного масла к окислению в 2-4 раза.

N.Yu. HRIBOVA *EFFECT OF THE EXTRACTION CONDITIONS ON THE ANTIOXIDANT PROPERTIES OF PHENOLS IN EXTRACT - Phytophenols and extracts of some medicinal plants, high phytophenols are perspective inhibitors of lipid oxidation of pharmaceutical products and foods. In order to improve the efficiency and specificity of the extraction from the leaves of Folium Uvae ursi phytophenols investigated the influence of physico-chemical conditions of the extraction process on the antioxidant activity of this extract. The parameters of intensification, allowing obtain a mixture of natural compounds with high antioxidant activity, increasing in 2-4 times the stability of the lipid oxidation of sunflower oil.*

Ключевые слова: антиоксиданты; фитофенолы; окисление липидов; экстракты; эффективность экстракции;

Keywords: antioxidants; phytophenols, lipid, extracts, the extraction efficiency;

Фитофенолы в фармацевтической практике известны как действующие вещества лекарственных препаратов, применяемых для профилактики и лечения ряда заболеваний, в частности, в патогенезе которых индуцируются процессы перекисного окисления липидов. Липидсодержащие продукты питания, фармацевтические препараты и косметические средства подвергаются окислительному старению, торможение которого осуществляется добавками антиоксидантов (АО). Широкое распространение получили АО искусственно созданной химической структуры, название которых зашифрованы под индексом Е 300 - Е 399. Данные соединения сдерживают окисление в течение определенного времени, однако, безопасность их употребления не доказана [1].

Перспективными антиоксидантами для липидсодержащей продукции являются фитофенолы: флавоноиды, фенолкарбоновые и оксикоричные кислоты, которые входят в состав фруктов, овощей и лекарственных растений. Антиоксидантный эффект достигается при добавлении в липидсодержащий продукт экстрактов растений богатых фитофенолами [2,3], вместе с тем, эффективность таких антиоксидантов, как правило, ниже чем синтетических соединений. Для увеличения антиоксидантной активности (АОА) экстрактов необходимо повышение специфичности извлечения фитофенолов и сохранение их в неокисленной форме [4]. Поэтому, целью данной работы стало исследование влияния условий процесса экстракции на количество извлеченных фенольных соединений и антиоксидантные свойства экстракта.

В качестве источника фитофенолов были выбраны листья толокнянки, содержащие различные группы фенольных соединений. Экстракцию проводили по принципу мацерации в специально изготовленной экстракционной ячейке оборудованной графитовыми электродами для организации направленного движения ионов фенольных соединений из сырья в раствор. Экстракты стандартизированы по количеству сухого остатка, определенного методом гравиметрии [5]. АОА исследована методом хемилюминесценции в условиях инициированного (343 К) азодиизобутиро-нитрилом (АИБН) окисления подсолнечного масла (ДСТУ 4492) [6].

Извлечение фитофенолов из листьев толокнянки является частным случаем массообменного процесса, протекающего в системе твердое - жидкое, лимитирующей стадией которого является диффузия веществ в порах многослойной клеточной структуры материала. Одним из возможных способов увеличения скорости экстракции и степени истощения сырья является его тонкое измельчение при котором происходит вымывание

всех биологически-активных веществ (БАВ). Для интенсификации экстракции некоторых БАВ сырья необходимо оптимальное измельчение с сохранением клеточной структуры твердой фазы. Поэтому в работе использовались частицы разрезанных листьев толокнянки размером 1-2 мм.

Поскольку перенос вещества с поверхности растительного материала в экстракт наиболее эффективно осуществляется при конвективной диффузии, экстракция проведена при постоянном перемешивании (скорость вращения перемешивающего стержня 120 об/мин). Для установления оптимальных гидродинамических условий обтекания частиц экстракционной жидкостью процесс проведен при варьировании соотношения сырьё:экстрагент. На основании анализа данных по количеству извлеченных веществ (табл.1) можно видеть, что наиболее эффективно массообмен протекает в системе при соотношении сырье:экстрагент - 1:10.

При таком соотношении было обеспечено интенсивное перемешивание и равномерный доступ экстрагента к частицам растительного материала. Увеличение массовой доли сырья (соотношение 1:5; 1:7) затрудняет его перемешивание, приводит к спрессовыванию в приэлектродном пространстве, что равноценно выводу части растительного материала из массообменного процесса (табл.1). Увеличить растворимость веществ и их диффузию в системе твердая частица-экстрагент можно температурным фактором. Классическая мацерация с использованием этого интенсифицирующего фактора известна как горячая мацерация [7]. Такое влияние на процесс экстракции является неспецифическим: на фоне увеличения общего количества экстрагируемых веществ наблюдается изменение их физико-химических свойств. Утрачиваются нативные свойства высокореакционных природных соединений, в числе которых и фитофенолы, поэтому экстракты получены горячей мацерацией проявляют слабовыраженные антиоксидантные свойства.

Специфическая интенсификация процесса экстракции антиоксидантов должна основываться на физико-химических свойствах фитофенолов, которые отличают их от других экстрагируемых соединений. Фитофенолы, в отличие от других БАВ растительного материала, могут диссоциировать с образованием протонов и фенолят–анионов. В связи с этим исследовано влияние условий, при которых происходит диссоциация фенолов и направленное движение их ионов. Действием только полярного растворителя на растительное сырье при комнатной температуре не достигнуто перевода в экстракт значительного количества биологически-активных соединений, находящихся в виде конгломератов внутри растительных клеток (табл. 1). При подключении к источнику постоянного тока угольных электродов, расположенных в экстракционной ячейке, происходит более интенсивное накопление веществ в экстракте (табл. 2).

При этом рост количества сухого остатка происходит за счет последовательного извлечения фенольных соединений из растительного сырья. В первую очередь экстрагируются фенолкарбоновые кислоты, а затем - флавоноиды и диоксибензолы. Такая последовательность установлена по результатам определения функциональных групп фенольных соединений [8], УФ-спектральных исследований растворов, и обусловлена значениями констант диссоциации фенолов: фенолкарбоновые кислоты ($К_Д$~10^{-5}), флавоноиды ($К_Д$~10^{-9}), диоксибензоли ($К_Д$~10^{-10}).

Экстракты, полученные в данных условиях, обеспечивали торможение процесса окисления подсолнечного масла более эффективно, чем экстракты, полученные классической мацерацией (рис.1). Наиболее эффективным антиоксидантом является экстракт, полученный из листьев толокнянки при напряжении 35 В, подведенном на электроды (табл.2).

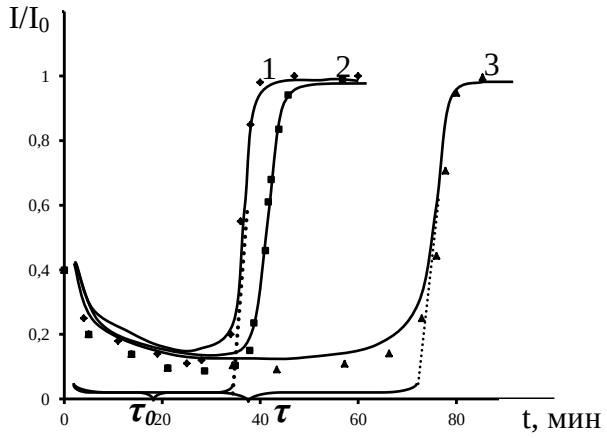

Рис. 1 Кинетические кривые изменения интенсивности ХЛ (I/I_0) при инициированном ([АИБН]=$2\cdot10^{-2}$ моль/л, [ДБА]=$2\cdot10^{-3}$ моль/л, Т=343 К) окислении масла в ХБ (1:1) (1), в присутствии водных экстрактов листьев толокнянки (0,1масс.%), полученных мацерацией: 2 – классической; 3 – интенсифицированной (U = 35 В)

Таблица 1. Количество вещетв (Wc.o., масс. %) извлеченных из листьев толокнянки методом мацерации. Экстрагент: дистиллированная вода, Т=19°С

соотношение сырьё : экстрагент	1:5	1:7	1:10	1:12	1:15
$W_{c.o.}$, масс %	1.03±0.03	1.33±0.02	1.80±0.01	1.80±0.01	1.50±0.01

Таблица 2. Количество извлеченных соединений (Wc.o., масс%) и антиоксидантная активность (τ/τ_0) водных экстрактов листьев толокнянки (метод мацерации под действием электрического тока)

U, В	0	10	15	20	25
$W_{C.O.,\ масс.\ \%}$	1.80±0.01	3.70±0.08	3.80±0.05	3.86±0.08	3.9±0.1
τ/τ_0	1.1±0.1	1.20±0.04	1.40±0.04	1.53±0.02	1.64±0.05
U, В	30	35	40	45	50
$W_{C.O.,\ масс.\ \%}$	3.96±0.07	4.2±0.1	4.2±0.1	4.21±0.05	4.35±0.05
τ/τ_0	1.70±0.05	2.03±0.08	2.00±0.08	2.00±0.1	1.95±0.08

Таблица 3. Значения $W_{C.O.}$ масс % и τ/τ_0 экстрактов листьев толокнянки (U = 35 В)

Экстрагент	$W_{C.O.}$, масс %	τ/τ_0
вода	4.2±0.1	2.03±0.08
0,5% водный р-р уксусной кислоты	3.7±0.2	2.0±0.1
1% водный р-р уксусной кислоты	3.9±0.1	2.4±0.1
1,5% водный р-р уксусной кислоты	4.10±0.05	2.20±0.08
2% водный р-р уксусной кислоты	4.8±0.1	2.0±0.1

Таблица 4. Значения $W_{C.O.}$ масс % и τ/τ_0 экстрактов листьев толокнянки, полученных в условиях интенсифицированной мацерации (U = 35 В)

Экстрагент	ε	$W_{C.O.,}$ масс %	τ/τ_0
вода (U=0 В, I=0 mA)	80	1.80±0.02	1.1±0.1
вода	76.5	4.2±0.1	2.03±0.08
10% водный раствор этанола	71	4.17±0.08	3.6±0.1
30% водный раствор этанола	58	4.63±0.09	4.0±0.2
40% водный раствор этанола	51.5	4.85±0.09	4.4±0.1
50% водный раствор этанола	46	5.0±0.1	4.8±0.1
60% водный раствор этанола	43.9	4.9±0.1	4.3±0.1
70% водный раствор этанола	38.5	4.7±0.1	3.6±0.1
80% водный раствор этанола	33.2	4.22±0.09	3.23±0.06

Экстракты, полученные при более высоких напряжениях, проявляют меньшую АОА, что обусловлено, по-видимому, накоплением в экстракте соединений не обладающих антиоксидантными свойствами.

Варьирование при экстракции температуры, диэлектрической проницаемости и поверхностного натяжения экстрагента также влияет на количество извлеченных соединений и их АОА. Выбор оптимальной температуры процесса проводили с учетом зависимости вязкости экстрагента и его проникающей способности от температуры, а также учитывая активизацию с ростом температуры процесса десорбции и электропроводности системы [9]. Повышение температуры процесса электроэкстракции от 280 до 345 К закономерно приводит к росту общего количества извлеченных веществ, однако, увеличение АОА экстрактов наблюдается лишь в диапазоне 280 – 303 К. АОА экстрактов полученных при более высоких температурах находятся в обратной зависимости от температуры. Это, по-видимому, обусловлено снижением специфичности экстрагирования веществ, в том числе и соединений нефенольной природы. Как можно видеть из рис. 2, оптимальной температурой экстракции антиоксидантов из листьев толокнянки под действием электрического тока является 302±1 К. Повысить количество экстрагированных веществ в растворе удалось добавками к экстрагенту соединений, увеличивающих электропроводность системы и смачиваемость растительного сырья [10].

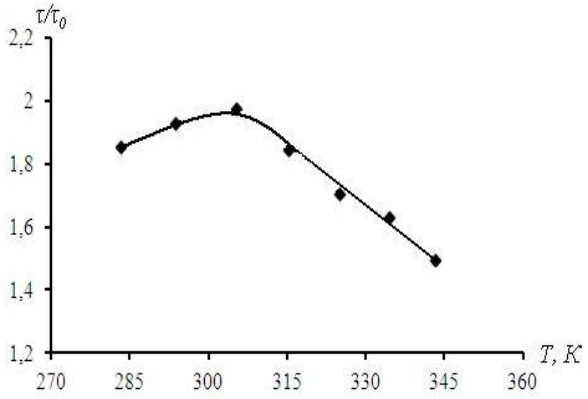

Рис. 2. Зависимость τ/τ_0 водных экстрактов толокнянки от температуры экстракции (U = 35 В)

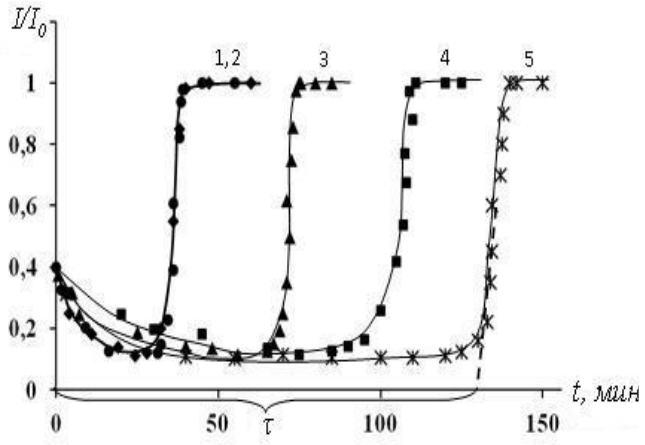

Рис.3 Кинетические кривые изменения интенсивности ХЛ (I/I_0) при инициированном ([АИБН] = $2\cdot10^{-2}$ моль/л, [ДБА]=$2\cdot10^{-3}$ моль/л, Т=343 К) окислении масла в ХБ (1:1) (1), масла в ХБ (1:1) с добавкой (0.015 масс%) Твин-80 и в присутствии экстрактов листьев толокнянки (0.1 масс.%), полученных мацерацией (1%-ный водный раствор уксусной кислоты с добавлением Твин-80 в количестве:3 – $4.4\cdot10^{-4}$ моль/л; 4 – $1.8\cdot10^{-3}$ моль/л; 5 – $8.8\cdot10^{-4}$ моль/л

В качестве потенциальных десорбирующих агентов использовали кислоты и щелочи: водные растворы органических (лимонной, уксусной) и минеральной (соляной) кислот, гидроксида натрия. Применение в качестве экстрагентов растворов минеральных кислот и щелочей не привело к положительным результатам. Добавка минеральной кислоты снижает специфичность экстракции, добавки щелочи, одновременно, с увеличением десорбции фенолов и разрушением гидролизуемых дубильных веществ, образует из фенолов феноляты. Последующее подкисление экстракта кислотой для восстановления фенолов из солей, не позволило получить комплекс веществ с высокой антиоксидантной активностью.

Результаты экстракции фенольных АО водными растворами уксусной кислоты приведены в табл. 3. Из которой можно видеть, что количество извлеченных экстрагентом веществ монотонно растет с увеличением концентрации уксусной кислоты, растет и антиоксидантная активность экстрактов, достигая максимального значения при концентрации 1-% CH_3COOH. Раствор уксусной кислоты, обладает лучшими, по-сравнению с водой, десорбирующими свойствами, а также в кислой среде более интенсивно протекает гидролиз гликозидов, галлотаннинов, флавоноидов, что способствует насыщению экстракта индивидуальными фенольными соединениями. Концентрация уксусной кислоты влияет на электропроводность системы, изменяя антиоксидантные свойства полученных экстрактов.

Поскольку скорость твердофазной экстракции связана с интенсивностью проникновения экстрагента в растительное сырьё [11], то представлялось целесообразным добавление к екстрагенту поверхностно-активных веществ (ПАВ), снижающих поверхностное натяжение на границе раздела фаз твердое сырьё – экстрагент и улучшающих смачивание водой растительного материала. Одним из ПАВ, разрешенных к применению в фармацевтической практике, является полиоксиэтиленсорбитан моноолеат (Твин-80). Варьируя количество этого ПАВ в экстрагенте, и анализируя его влияние на АОА экстракта было установлено, что наиболее выраженными антиоксидантными свойствами обладает экстракт из листьев толокнянки, полученный на основе 1%-ного водного раствора уксусной кислоты с добавлением $8.8\cdot10^{-4}$ моль/л Твин-80 (рис. 3).

Остаточные количества Твин-80 (1.5±0,5%) присутствующие в экстракте не изменяют антиоксидантной стабильности масла (рис. 3 кр.2), увеличение АОА экстрактов полученных с добавкой ПАВ обусловлены качественным и количественным составом извлеченных фитофенолов.

Известно, что наиболее распространенным в фармацевтической практике экстрагентом является этанол и его смеси с водой [12], поэтому в работе проведена экстракция с применением этих растворителей. Этанол в смесях с водой при разных соотношениях создаёт экстрагент с разной диэлектрической проницаемостью (ε=76.5÷22.3), и позволяет варьировать величину поверхностного натяжения экстрагента ($\sigma = 7\cdot10^{-2}$ – $2\cdot10^{-2}$ Н/м). Результаты исследований АОА экстрактов представлены в табл. 4.

Использование смеси вода-этанол при соотношении компонентов 1:1, по-видимому, обеспечивает как наиболее полное истощение растительного сырья, так и высокую специфичность извлечения фитофенолов. Увеличение массовой доли этанола в экстрагенте приводит к снижению диэлектрической проницаемости экрагента и, как следствие к снижению количества экстрагируемых веществ и их антиоксидантных свойств.

Таким образом, в работе установлены физико-химические условия процесса мацерации листьев толокнянки, максимально интенсифицирующие экстракцию фитофенолов, специфичность извлечения природных антиоксидантов. Наиболее эффективные для антиоксидантной стабилизации подсолнечного масла экстракты листьев толокнянки получены в следующих условиях: соотношение сырьё : экстрагент – 1:10; экстрагент- 1%-ный раствор уксусной кислоты с добавкой Твин-80 ($8.8\cdot10^{-4}$ моль/л) или водно-этанольная смесь (50 : 50), продолжительность экстракции 2 часа при Т=302±1К и величине подведенного на электроды напряжения 35 В. Добавка экстракта в количестве 0,1 масс% увеличивает стабильность масла к окислению и общий срок его хранения более чем в 4 раза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Пищевые добавки. Энциклопедия. – Санкт-Петербург: ГИОРД. 2004. – С.151.

2. Pin-Der Duh, Wen Jye Yen, Pin-Chan Du Antioxidant activity of mung bean hulls*. J. Am. Oil Chem. Soc.* 1997, 74(9), 1059-1063.

3. J.M. Joseph, K. Sowndhararajan, Dh. Rajendrakumaran, S. Manian In vitro antioxidant potential of different parts of Solanum surattense Burm. f. *Food Sci. Biotechnol.* 2011, 20(2), 477-483.

4. Chen H., Zhang Y., Lu X., Qu Zh. Comparative studies on the physicochemical and antioxidant properties of different tea extracts*. J. Food Sci. Technol.* 2012, 49(3), 356-361.

5. Государственная фармакопея СССР. – 1-е изд. М.: Медицина, 1979, С. 500

6. Шляпинтох В. Я. Хемилюминесцентные методы исследования медленных химических процессов. Под ред. В.Я. Шляпинтох, О.Н. Карпухин, Л.М. Постников, *М.: Наука*, 1966, С. 300.

7. Пономарев В.Д. Экстрагирование растительного сырья. Под ред. В.Д. Пономарев, *М: Медицина*, 1976, С. 204.

8. Блажей А. Фенольные соединения растительного происхождения, Под ред. А. Блажей, Л. Шутый, *М.: Наука*, 1977, С. 239.

9. Кондратьев Т.С. Технология лекарственных форм, *М.: Медицина*, 1991, С. 576.

10. Громова Н.А. Сравнительное изучение некоторых методов экстрагирования растительного лекарственного сырья. *М.:Наука*, 1970, С. 715.

11. Аксельруд Г.А. Экстрагирование. Система твердое тело – жидкость, Г.А. Аксельруд, В.М. Лысянский, *Л.: Химия*, 1974, С. 256.

12. Бобылев Р.В. Технология лекарственных форм: Учебник в 2-х томах. Том 2, *М.: Медицина,* 1991. С. 544