



УДК 544.726:54.056

## МЕТОД ЭКСТРАКЦИИ И ОЧИСТКИ АНТОЦИАНОВ ИЗ ПЛОДОВ АРОНИИ ЧЕРНОПЛОДНОЙ

**Л.А. ДЕЙНЕКА, И.П. БЛИНОВА  
А.Н. ЧУЛКОВ, И.И. САЕНКО  
В.И. ДЕЙНЕКА  
В.Н. СОРОКОПУДОВ**

*Белгородский государственный  
национальный исследовательский  
университет*

*e-mail: deyneka@bsu.edu.ru*

Плоды аронии черноплодной относятся к наиболее богатым источникам антоцианов. Основные компоненты антоцианового комплекса – цианидин-3-галактозид и цианидин-3-арабинозид. В работе предложен метод экстракции, очистки и концентрирования антоцианов из этого материала с использованием подготовленной кислотной обработкой глины. Обсуждаются особенности ключевых стадий метода. Установлено, что хранение в замороженном состоянии может быть использовано только на период не более 4 месяцев.

Ключевые слова: *Aronia melanocarpa*, плоды, антоцианы, экстракция, сорбция, глина, очистка, концентрирование.

К настоящему времени многочисленными исследованиями доказано, что антоцианы – синтезируемые растениями единственные водорастворимые соединения из класса флавоноидов [1], обладают не только красящей способностью (из-за чего рассматриваются как важнейшие природные колоранты [2, 3]), но и высокой биологической активностью (прежде всего из-за высокой антиоксидантной активности [3]).

Значимость антоцианов как субстанций для лекарственных препаратов признана в настоящее время и в России: выпускается, например, целый ряд готовых форм на основе антоцианов, использующих импортные составляющие. Так, в состав «Антоциан форте» входят стандартизированные растительные экстракты производства компаний «Naturex» (Франция) и «FutureCeuticals» (США). Сведения о запуске отечественных технологий получения очищенных антоцианов нами не обнаружены, хотя их внедрение в фармацевтическую и пищевую промышленность позволило бы избавиться от необходимости использования синтетических колорантов, перечень которых в числе разрешенных к употреблению в развитых странах неуклонно уменьшается.

Арония черноплодная относится к растениям, плоды которых наиболее богаты полифенольными соединениями вообще и антоцианами в частности [4]. Это растение, известное среди населения под названием «черноплодная рябина», происходит из Северной Америки. В Россию арония была ввезена лишь в тридцатые годы двадцатого века, причем как лекарственное растение (для профилактики гипертонии), и вид *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliot получил широкое распространение от Сибири до Нечерноземья [5]. Арония распространена и в Центрально-Черноземном районе, включая Белгород; она дает хорошие урожаи плодов (4 ÷ 12 кг с куста), имеет длительный продуктивный период (до 30 лет) и поэтому может рассматриваться как ценный источник сырья для промышленной переработки плодов с целью получения антоцианов.

В настоящей работе предложен вариант экстракции, твердофазной очистки и концентрирования антоцианов плодов аронии черноплодной с использованием природной глины в качестве сорбента.

**Материалы и методы исследования.** В работе использовали плоды аронии черноплодной, выращенные в сезоне 2011 года в Ботаническом саду НИУ БелГУ. Плоды собирали в стадии технической спелости; для контроля часть плодов замораживали в морозильной камере, где и хранили до исследования.

Количественное определение суммы антоцианов в плодах аронии черноплодной и в экстрактах проводили дифференциальным спектрофотометрическим методом [6].

Для ВЭЖХ определения индивидуального состава антоцианового комплекса экстракт очищали методом твердофазной экстракции на концентрирующих патронах ДИАПАК С18 [7]. Условия ВЭЖХ определения: хроматограф Agilent 1200 Infinity с диодно-матричным детектором (диапазон спектра 370–600 нм, хроматограммы записывали при 515 нм); колонка 250×4 мм Reprosil-Pur C18-AQ, 5 мкм; подвижная фаза:

10 об.% ацетонитрила (для ВЭЖХ) и 10 об.% муравьиной кислоты в дистиллированной воде.

Для экстракции антоцианов свежесобранные плоды измельчали бытовым блендером до видимой гомогенизации. Порции полученного материала смешивали с заданным объемом 0.1 М водного раствора соляной кислоты и выдерживали в течение заданного времени. После отстаивания верхний слой экстракта отфильтровывали через бумажный фильтр; при необходимости к остатку добавляли новую порцию экстрагента, повторяя процесс экстракции.

Природную глину (Маслова Пристань, Белгородская обл.) готовили кислотной обработкой и отмучиванием в 0.1 М растворе HCl; седиментированный материал высушивали в сушильном шкафу при 100°C и перед использованием растирали до порошкообразного состояния в фарфоровой ступке.

Для сорбции антоцианов экстракт смешивали с подготовленной глиной и смесь перемешивали в течение 30 мин. После отстаивания смеси фильтрат отделяли декантацией.

Для десорбции антоцианов с глин сорбент смешивали с экстрагентом: 1% раствор концентрированной HCl в этаноле. Этанол отгоняли из экстракта на вакуумном ротационном испарителе при температуре бани 35°C.

**Результаты и их обсуждение.** На хроматограмме антоцианового комплекса обнаруживаются два основных компонента: цианидин-3-галактозид (№ 1, рис. 1), цианидин-3-арабинозид (№ 3), и два – минорных антоциана – цианидин-3-глюкозид (№ 2) и еще одно производное цианидина – все четыре вещества имеют практически идентичные спектры, которые можно отнести к цианидин-3-моногликозидам ( $\lambda_{\max} = 515 \text{ нм}$ ).

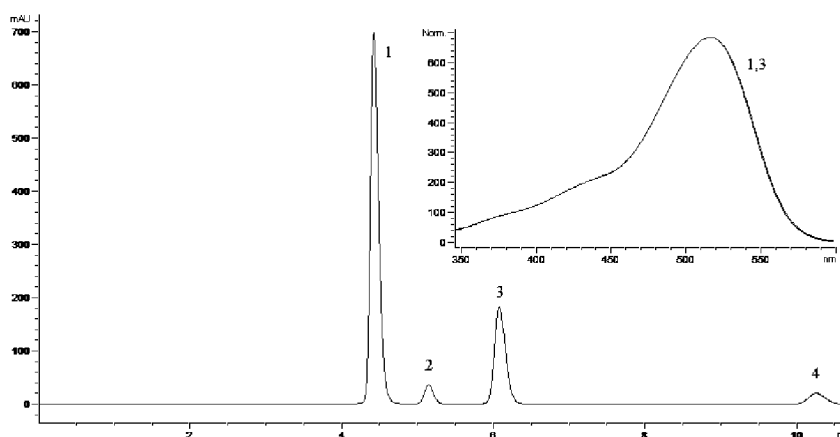


Рис. 1. Антоцианы плодов *Aronia melanocarpa*

Хроматограммы были использованы нами для качественной оценки уровня очистки антоцианов, поскольку в режиме 3D видны не только антоцианы, но и другие вещества в заданном диапазоне длин волн (рис. 2).

**Экстракция антоцианов.** Экстракция является важнейшим этапом в технологическом процессе выделения антоцианов из растительного сырья. Технология может быть эффективной только при максимально возможном извлечении антоцианов из сырья. На процесс экстракции влияют многие факторы: степень измельчения, количество экстрагента, использованного для экстракции, время контакта измельченного сырья с воздухом, время экстракции и др. В настоящей работе было установлено, что в случае плодов аронии черноплодной измельченное сырье можно выдерживать на воздухе до начала экстракции в течение, по крайней мере, 5 часов.

Измельченные блендером плоды аронии смешивали с водным раствором в различных соотношениях. При этом были найдены условия, при которых антоцианы извлекаются из плодов на 90-95% за одну экстракцию, но они не технологичны из-за высокого разбавления. Поэтому для реальных процессов использовали меньшие объемы

экстрагентов, но в таком случае для достижения высокой степени извлечения антоцианов применяли 3-кратное экстрагирование, которое позволяло извлекать выше 90 % этих колорантов (в пересчете на цианидин-3-глюкозид, Cy-3-Glu) (табл. 1).

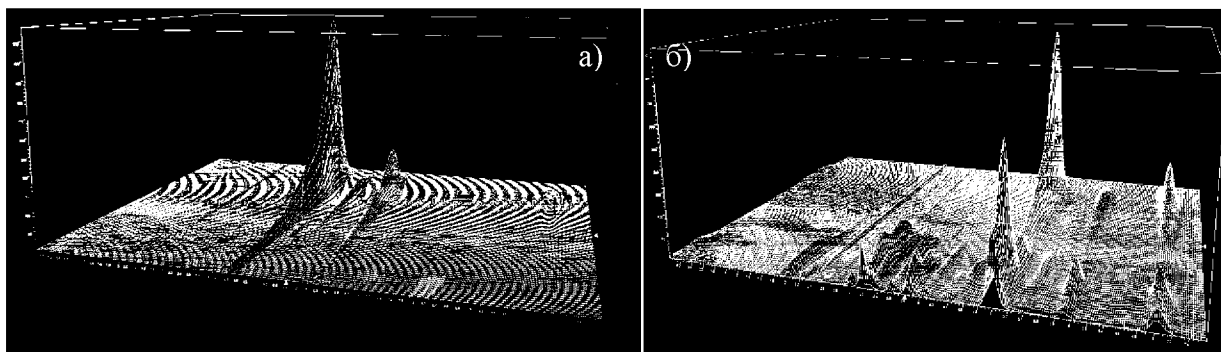


Рис. 2. 3D-Хроматограммы очищенного (а) и неочищенного экстракта плодов аронии (б)

Таблица 1

### Экстракция антоцианов плодов аронии

№	Соотношение сырье:экстрагент (кг/кг)	Объем экстракта, л	Концентрация антоцианов в экстракте (на Cy-3-Glu), ± 2.5%		Масса антоцианов, г
			моль/л	г/л	
1	2.33 / 3	3.7	0.0038	1.84	6.75
2	ост. / 3	3.3	0.0015	0.73	2.42
3	ост. / 3	3.0	0.0007	0.34	1.01
Всего:					10.18

**Сорбция антоцианов из экстракта на глине.** Многолетние исследования по сорбции антоцианов на глинах, выполненные нами ранее, показали, что сорбция антоцианов происходит по ионообменному механизму – за счет существования отрицательного заряда слоистого материала вследствие изоморфных замещений в (главным образом) октаэдрических и тетраэдрических слоях. Используемая в работе глина месторождения Маслово Пристань содержала большое количество карбонатов, которые были удалены при ее переводе в  $H^+$ -форму, необходимую для экстракции антоцианов, существующих в заряженном состоянии лишь в кислых средах.

Высушенную глину измельчали и просеивали через сито с диаметром пор 0.5 мм.

Предварительные исследования показали, что достижение равновесия в статическом методе сорбции происходит за 45–60 минут при постоянном перемешивании (рис. 3).

По использованному в работе методу к 200 г модифицированной глины добавляли по 400 мл приготовленных экстрактов. Смесь выдерживали при периодическом перемешивании примерно 1 час, затем смесь выдерживали до полного осаждения частиц и маточный раствор (бледно-розового цвета) сливали декантацией: потери антоцианов при этом не превышали 2-3%. Поэтому повторное извлечение антоцианов из фильтра считали нецелесообразным.

**Десорбция антоцианов.** К порции глин с сорбированными антоцианами добавляли 400 мл экстрагента, составленного из 395 мл этанола и 5 мл концентрированной соляной кислоты. Смесь выдерживали для десорбции в течение 30 минут для выхода на равновесие; выдерживали примерно 1 час до полного оседания частиц глины и надосадочную жидкость фильтровали через бумажный фильтр. При этом оставалась глина, окрашенная в красный цвет, что указывало на неполноту реэкстракции антоцианов. Но технологически выгодным оказалось не дальнейшая экстракция антоциа-

нов, а использование этой глины для повторной сорбции и последующей десорбции антоцианов. Через 3 цикла экстракции-реэкстракции проводили двойную обработку глины последовательными порциями экстрагента.

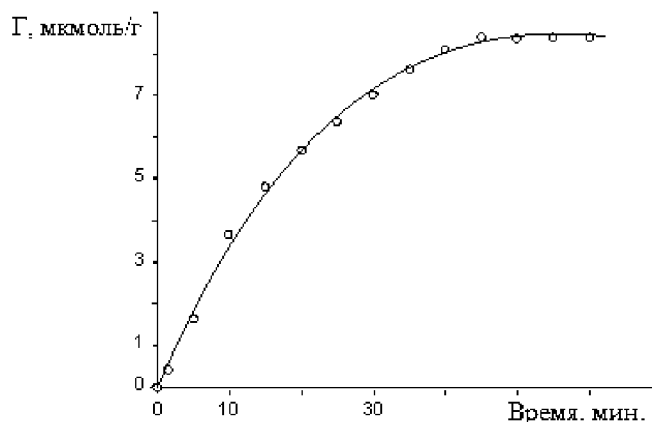


Рис. 3. Установление равновесия сорбции антоцианов на глине

Анализ материального баланса показал, что по предложенному методу удается десорбировать до 95% сорбированных антоцианов, а один и тот же подготовленный образец глины можно использовать до 20 раз.

**Концентрирование и хранение антоцианов.** Спиртово-солянокислые растворы концентрировали на вакуумном ротационном испарителе до полного удаления спирта. При этом для лучшей сохранности антоцианов при последующем хранении в бытовом холодильнике перед отгонкой спирта в концентрат добавляли нелетучую лимонную кислоту.

Еще один важнейший аспект касается условий хранения сырья. Хранение в замороженном состоянии в морозильной камере обычно считается достаточным приемом для сохранения антоцианов и иных биологически активных соединений в плодах растений. Однако выполненные нами предварительные исследования показали, что у аронии черноплодной примерно через год такого хранения антоцианы практически полностью разрушаются. Поэтому нами был поставлен эксперимент с ежемесячным контролем экстрагируемости антоцианов из плодов этого растения. Для этого известные навески плодов хранили в морозильной камере в пластиковых чашечках Петри и через определенный период времени определяли массу плодов и содержание в них антоцианов. Полученные результаты представлены в табл. 2.

Таблица 2

**Сохранность антоцианов плодов аронии черноплодной в замороженном состоянии**

№	Дата	Изменение массы плодов, %	Содержание антоцианов, мг/100 г плодов	
			фактически	на исходную массу
1	24.08.2011	100	460 ± 20	460
2	24.09.2011	97	482 ± 15	468
3	24.10.2011	96	581 ± 40	558
4	24.11.2011	95	527 ± 25	500
5	23.12.2011	92	551 ± 10	507
6	20.01.2012	91	449 ± 40	409
7	28.02.2012	91	390 ± 15	355

Как видно из представленных данных, в течение первых двух месяцев хранения концентрация антоцианов не только не уменьшается, но даже и достоверно увеличивается. Причем это увеличение не является следствием вымораживания воды из плодов.



Но после четвертого месяца падение концентрации антоцианов оказывается весьма значительным, что следует учитывать как при приготовлении быстрозамороженных плодов, так и при разработке соответствующих технологических процессов.

Таким образом, в работе представлена методика использования природных слоистых материалов для очистки и концентрирования антоцианов из плодов аронии черноплодной. Можно отметить, что по предварительным наблюдениям, применение глины приводит к резкому уменьшению обсемененности экстрактов спорами грибов – в экстрактах длительное время не образуется плесень даже при хранении при комнатной температуре.

*Работа выполнена в рамках реализации федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 гг., государственный контракт № П425 от 12 мая 2010 г. «Разработка методик выделения и определения полифенольных соединений классов флавоноидов, каротиноидов и антоцианов и технологии создания лекарственных форм на их основе».*

### Литература

1. Anthocyanins. Biosynthesis, Functions, and Applications Editors Kevin Gould, Kevin Davies and Chris Winefield. Springer Science+Business Media, LLC, 2009. – 332 p.
2. Bridle P., Timberlake C.F. Anthocyanins as natural food colours—selected aspects // Food Chem. – 1997. – V.58. – P. 103-109.
3. He J., Giusti M.M. Anthocyanins: Natural Colorants with Health-Promoting Properties // Annual Rev. Food Sci. Technol. – 2010. – V.1. – P. 163-187.
4. Oszmianski J., Wojdylo A. Aronia *melanocarpa* phenolics and their antioxidant activity // Eur. Food Res. Technol. – 2005. – V.221. – P. 809-813.
5. Садоводство. Энциклопедия : в 3 т. Т. 1. – Кишинев : Гл. ред. Молдавской Советской Энциклопедии, 1990. – С. 89-90.
6. Giusti M., Wrolstad R.E. Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy // Current Protocols in Food Analytical Chemistry. – 2001. – F1.2.1-F1.2.13.
7. Дейнека Л.А. Антоцианы плодов вишни и родственных растений / Л.А. Дейнека, А.Н. Чулков, В.И. Дейнека и др. // Научные Ведомости БелГУ. Сер. Естественные науки. – 2011. – № 9(104), Вып. 15/1. – С. 364-370.

## METHOD OF EXTRACTION AND PURIFICATION OF CHOKEBERRY FRUIT ANTHOCYANINS

**L.A. DEINEKA, I.P. BLINOVA  
A.N. CHULKOV, I.I. SAENKO  
V.I. DEINEKA  
V.N. SOROKOPUDOV**

*Belgorod National Research University*  
*e-mail: deyneka@bsu.edu.ru*

Chokeberry fruit belong to the richest sources of anthocyanins. The main components of the fruit anthocyanins complex are cyanidin-3-galactoside and cyanidin-3-arabinoside. In the paper a method for extraction, purification and concentration of the anthocyanins is proposed with utilization of acid activated clay. The particularities of the key stages of the method are discussed. It has been found that storage of freeze fruit may be no longer than 4 months.

Key words: Aronia melanocarpa, fruit, anthocyanins, extraction, sorption, clay, purification, concentration