

OPTIMALIZÁCIA EXTRAKCIE FENOLOVÝCH ZLOŽIEK Z POHÁNKY NA ZÁKLADE VÝSLEDKOV PLÁNOVANÉHO EXPERIMENTU

ANNA MIKULAJOVÁ^a, MÁRIA TAKÁCSOVÁ^a, PAVOL ALEXÝ^b a LUCIA BRINDZOVÁ^a

^a Ústav biochémie, výživy a ochrany zdravia, Oddelenie výživy a hodnotenia potravín, ^b Ústav polymérnych materiálov, Oddelenie plastov a kaučuku, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Slovenská technická univerzita, Radlinského 9, 812 37 Bratislava
anna.mikulajova@stuba.sk

Došlo 8.3.06, prepracované 16.11.06, prijaté 30.11.06.

Kľúčové slová: plánovaný experiment, optimalizácia extrakcie, fenolové zlúčeniny, antioxidačná aktivita

Úvod

Fenolové zlúčeniny iniciujú v poslednom období značný záujem tak producentov potravín ako i spotrebiteľov. Je to vďaka početným epidemiologickým štúdiám indikujúcim ich zdraviu prospešné účinky, ktoré sú väčšinou prisudzované ich antioxidačným vlastnostiam^{1,2}. Napr. rutin, ktorý sa s výnimkou pohánky nevyskytuje v žiadnej cereálii ani pseudocereálii, sa vyznačuje mnohými farmakologickými účinkami. Spomenieme napr. antihemoragické^{3,4}, antikarcinogénne^{5–7}, hypotenzívne^{3–5,7–9}, pozitívne účinky na permeabilitu ciev a protizápalové^{7–10} účinky.

Extrakcia a purifikácia bioaktívnych zlúčenín z prírodných zdrojov sú významné technologické postupy, nakoľko sa často používajú na prípravu nutraceutík, potravinových aditív, farmaceutických a kozmetických produktov. Dôležité sú i preto, že výsledky *in vitro* štúdií a pokusov so zvieratami ukazujú, že terapeuticky a klinicky dostatočné dávky fytochemikálií sú vyššie ako je ich obsah v potrave¹¹. Extrakčná procedúra je veľmi dôležitá, nakoľko podmienky extrakcie určujú kvalitatívne i kvantitatívne zastúpenie jednotlivých zložiek¹². Okrem iných, k dôležitým parametrom extrakčného procesu patria: extrakčné činidlo, čas, teplota, vzájomný pomer činidla a suroviny, extrakčný tlak. Autori pri svojich pokusoch používajú na prípravu extraktov rôzne parametre extrakcie. Konkrétne pre pohánku sa ako extrahovadlo najčastejšie používa etanol, či už absolútny alebo s určitým obsahom vody. Teploty pri extrakcii sa pohybujú od laboratórných až po reflux, pričom je adekvátne tomu prispôsobená dĺžka extrakcie, t.j. pri nižších teplotách dlhší čas a naopak. Publikovaných je niekoľko prác systematicky sledujúcich vply-

vy faktorov pri extrakcii pohánky na výtťažok rutínu^{12–14}.

Cieľom našej práce bolo optimalizovať extrakčné podmienky tak, aby boli získané extrakty nelúpanej pohánky s najväčšou antioxidačnou aktivitou, najväčším množstvom fenolov, resp. rutínu.

Experimentálna časť

Použitý materiál a chemikálie

Pohánka nelúpaná (*Fagopyrum esculentum*, odroda Špačinská) – zhomogenizovaná mletím (prepad cez sito s veľkosťou oka 0,5 mm) na laboratórnom mlyne VM 4-386.

2,2-Difenyl-1-pikrylhydrazyl voľný radikál (DPPH) (Sigma-Aldrich Chemie, Nemecko), činidlo Folin-Ciocalteu (Merck, Nemecko), etanol 96 %, uhličitán sodný, chlorid hlinitý (Lachema, Brno), štandardy kyseliny galovej a rutínu (Sigma-Aldrich Chemie, Nemecko).

Plánovaný experiment

Metóda plánovaného experimentu bola použitá za účelom komplexného popisu vplyvu skúmaných fyzikálnych parametrov extrakcie na výtťažok extrakcie. Regresné rovnice ako výstup zo štatisticko-regresného spracovania plánovaného experimentu boli ďalej využité pre optimalizačný výpočet. Realizovaný bol trojfaktorový päťúrovňový experiment. Faktory boli navrhnuté nasledovne: teplota (rozsah od 20 °C do 80 °C), čas (rozsah od 30 min do 180 min), extrakčné činidlo etanol o rôznej koncentrácii (rozsah od 40 % do 96 %). Nemenný bol pomer suroviny a extrakčného činidla 1:20 (w/v). Reálne hodnoty faktorov boli transformované na bezrozmerné kódované hodnoty. Bližšie sú podmienky a rozpis experimentu uvedené v tabuľke I a II. Meranými parametrami boli antioxidačná aktivita sledovaná metódou vychytávania voľných DPPH radikálov (AOA), celkové množstvo fenolov (TPC) a množstvo flavonoidov (FL). Matematickým vyhodnotením nameraných hodnôt boli získané regresné rovnice typu: $y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{33}x_3^2$, popisujúce závislosti meraných vlastností od kódovaných hladín sledovaných faktorov. Hodnoty regresných koeficientov sú uvedené v tabuľke IV. Systém regresných rovníc sa použil na optimalizačné výpočty pomocou podprogramu Solver programu Microsoft Excel.

Analytické metódy

Vychytávanie voľných DPPH radikálov

Množstvo vychyteného DPPH radikálu bolo stanovené modifikovanou metódou podľa Yen a Chen¹⁵. K 1 ml extraktu boli pridané 3 ml 96% etanolu a 1 ml DPPH (0,12 g l⁻¹). Presne po 10 min bola zmeraná absorbancia pri 517 nm oproti 96% etanolu. Výsledok udáva množstvo vychyteného DPPH v mg na 1 g suchej vzorky.

Tabuľka I
Podmienky plánovaného experimentu pre definované faktory

Faktor		Kódované hladiny						
		–1,682	–1	0	1	1,682	krok	stred
Teplota, °C	x1	20	32	50	68	80	17,836	50
Čas, min	x2	30	60	105	150	180	44,59	105
Koncentrace etanolu, %	x3	40	51	68	85	96	16,648	68

Tabuľka II
Rozpis pokusov experimentu

Číslo pokusu	Kódované hodnoty faktorov			Reálne hodnoty faktorov		
	teplota	čas	etanol	teplota [°C]	čas [min]	etanol [%]
1	–1	–1	–1	32	60	51
2	1	–1	–1	68	60	51
3	–1	1	–1	32	150	51
4	1	1	–1	68	150	51
5	–1	–1	1	32	60	85
6	1	–1	1	68	60	85
7	–1	1	1	32	150	85
8	1	1	1	68	150	85
9	–1,682	0	0	20	105	68
10	1,682	0	0	80	105	68
11	0	–1,682	0	50	30	68
12	0	1,682	0	50	180	68
13	0	0	–1,682	50	105	40
14	0	0	1,682	50	105	96
15	0	0	0	50	105	68
16	0	0	0	50	105	68
17	0	0	0	50	105	68
18	0	0	0	50	105	68
19	0	0	0	50	105	68
20	0	0	0	50	105	68

Stanovenie celkového množstva fenolov

Na stanovenie bola použitá metóda s činidlom Folin-Ciocalteu¹⁶. Reakciou fenolových zlúčenín s činidlom Folin-Ciocalteu vzniklo modré zafarbenie, ktorého intenzita bola meraná pri 765 nm. Ako štandard bola použitá kyselina galová (GAE) a celkový obsah fenolových zlúčenín bol vyjadrený v mg GAE na 1 g suchej vzorky. Na analýzu bolo pipetované 0,5 ml roztokov štandardu resp. vzorky, 0,5 ml činidla Folin-Ciocalteu a po 3 minútach 1,5 ml 20% uhličitanu sodného a doplnené destilovanou vodou do 10 ml. Po 2 h bola zmeraná absorbancia pri 765 nm.

Stanovenie flavonoidov

Na stanovenie obsahu flavonoidov bola použitá metó-

da prídavku AlCl_3 (cit.⁸). K 2 ml vzorky v etanole bolo pridané 0,2 ml 5% etanolového roztoku AlCl_3 . Po 30 min bola zmeraná absorbancia pri 420 nm oproti etanolu s prídavkom AlCl_3 . Výsledok bol vztiahnutý na rutín a vyjadrený v mg rutínu na 1 g suchej vzorky.

Výsledky a diskusia

Účinnosť extrakcie je vo všeobecnosti ovplyvnená viacerými faktormi, pričom ich vplyvy môžu byť buď navzájom nezávislé alebo súčinné¹². V našom experimente sme sledovali a vyhodnotili závislosť polarita extrahovadla, teploty a doby extrakcie a to z toho dôvodu, že ich po-

Tabuľka III

Namerané hodnoty sledovaných parametrov: antioxidačnej aktivity, množstva celkových fenolových zlúčenín a množstva flavonoidov

Číslo pokusu	AOA [mg DPPH/ g sušiny]	TPC [mg GAE/ g sušiny]	FL [mg rutínu/ g sušiny]
1	12,3	1,76	0,171
2	14,0	2,62	0,351
3	12,4	1,78	0,183
4	16,1	2,79	0,475
5	7,5	1,42	0,148
6	12,1	1,84	0,291
7	10,4	1,59	0,190
8	12,7	2,16	0,422
9	11,2	1,77	0,178
10	20,7	3,18	0,706
11	14,4	2,23	0,306
12	16,9	2,90	0,474
13	11,4	2,02	0,265
14	8,0	1,40	0,250
15	14,7	2,43	0,361
16	15,2	2,42	0,389
17	15,4	2,57	0,392
18	15,0	2,57	0,388
19	14,3	2,49	0,369
20	14,4	2,54	0,362

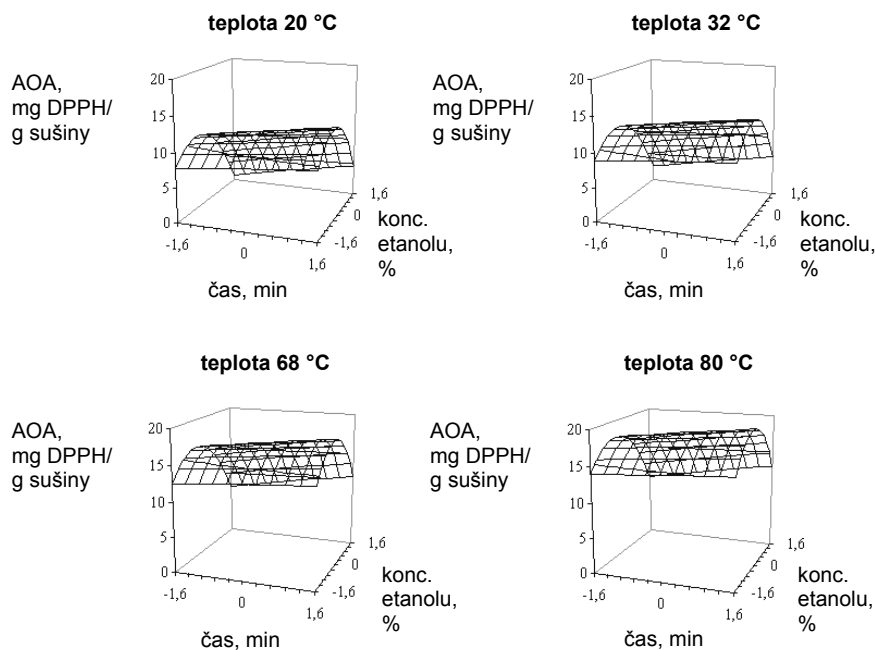
važujeme za jedny z najvýznamnejších. Rozmedzia faktorov sme vybrali na základe doterajších praktických skúseností a poznatkov. Uskutočnených bolo 20 pokusov. Výsledky stanovenia antioxidačnej aktivity, celkových fenolov a flavonoidov jednotlivých pokusov sú uvedené v tabuľke III. Získané výsledkové plochy AOA v závislosti od sledovaných faktorov sú zobrazené na obr. 1. Z výsledkových plôch zvyšných dvoch sledovaných parametrov sme na znázornenie vybrali závislosti pri najvyššej teplote (obr. 2 a obr. 3).

Koncentrácia etanolu výrazne ovplyvňuje sledované výstupné parametre. So vzrastom organickej zložky v extrakčnom médiu merané parametre stúpajú až po maximum, po ktorom nasleduje pokles. Hodnoty parametrov sú po extrakcii 96% etanolom nižšie ako po extrakcii 40% etanolom, pričom rozdiely medzi týmito krajnými bodmi sú pri nižších teplotách v prípade fenolov a flavonoidov menšie a so vzrastom teploty sa zväčšujú.

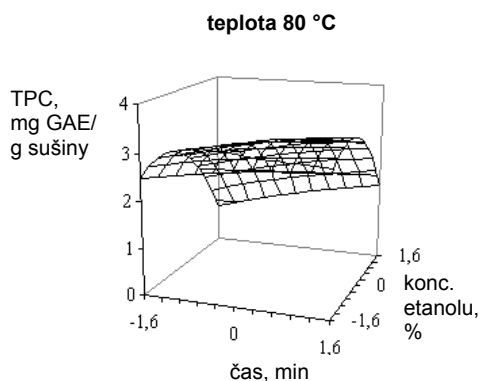
S ohľadom na extrakčnú teplotu možno z grafov vidieť, že pri narastaní teploty sa plocha grafu posúva nahor, čo znamená rast sledovaných parametrov. K nárastu dochádza v celom zadanom rozsahu teplôt, avšak rozdiely medzi 68 °C a 80 °C sú malé. Z meraných parametrov bolo teplotou najviac ovplyvňované množstvo flavonoidov.

Z nezávislých premenných bola dĺžka extrakcie najmenej vplývajúca, najmä čo sa týka antioxidačnej aktivity a obsahu fenolov. Množstvo flavonoidov záviselo od času vo väčšej miere, najmä pri vyššej teplote viedlo predĺženie extrakcie k výraznejšiemu nárastu ich množstva.

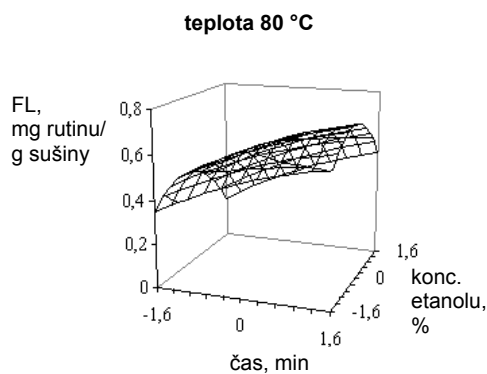
Podiel organickej zložky v extrakčnom činidle má najvýraznejší vplyv na antioxidačnú aktivitu a tiež na



Obr. 1. Výsledková plocha antioxidačnej aktivity v závislosti od času (faktor x2) a koncentrácie etanolu (faktor x3) pri rôznych teplotách (faktor x1)



Obr. 2. Výsledková plocha celkového množstva fenolov v závislosti od času (faktor x2) a koncentrácie etanolu (faktor x3) pri teplote 80 °C (faktor x1)



Obr. 3. Výsledková plocha množstva flavonoidov v závislosti od času (faktor x2) a koncentrácie etanolu (faktor x3) pri teplote 80 °C (faktor x1)

množstvo fenolov a flavonoidov v extraktoch.

Na základe regresných rovníc, ktorých vypočítané koeficienty sú uvedené v tab. IV sme sa pokúsili vypočítať optimálne podmienky pre prípravu pohánkových extraktov tak, aby tieto produkty mali čo najväčšiu schopnosť vychytávať voľné radikály.

Pre optimalizačný výpočet sme použili podprogram Solver programu Microsoft Excel, pričom ako účelová funkcia bola zadaná rovnica pre antioxidačnú aktivitu, pre ktorú sa požadovala maximálna hodnota. Výsledkom optimalizačného výpočtu sú nasledovné podmienky extrakcie: koncentrácia etanolu 65 %, teplota 80 °C, doba extrakcie 180 min.

Za týchto vypočítaných podmienok bol realizovaný experiment, ktorého výsledky boli porovnané s predpokladanými hodnotami získanými na základe výpočtu z regresných rovníc. Výsledky porovnania sú uvedené v tabuľke V.

Tabuľka IV

Vypočítané koeficienty jednotlivých regresných rovníc

Koeficienty	AOA	TPC	FL
b0	14,87	2,51	0,38
b1	2,07	0,38	0,13
b2	0,74	0,13	0,04
b3	-1,29	-0,22	-0,01
b11	0,09	-0,06	0,005
b12	-0,04	0,04	0,02
b13	0,20	-0,11	-0,01
b22	-0,03	-0,03	-0,01
b23	0,17	0,04	0,005
b33	-2,13	-0,33	-0,06

Pozn.: Hrubým sú vyznačené štatisticky významné regresné koeficienty na hladine spoľahlivosti $P=0,05$

Na základe porovnania vypočítaných a nameraných výsledkov možno konštatovať, že je medzi nimi dobrá zhoda a teda výpočet možno považovať za dostatočne vierohodný.

Metóda optimalizácie, založená na regresných rovniciach získaných pomocou plánovaného experimentu, umožňuje zohľadniť nielen izolované efekty sledovaných faktorov, ale aj ich vzájomné spolupôsobenie, vyjadrené v interakčných koeficientoch regresných rovníc. Doposiaľ publikované práce nepopisujú takéto komplexné riešenie optimalizácie prípravy pohánkového extraktu, ale vychádzajú z postupných zmien jednotlivých parametrov. Tak napríklad Kim a spol.¹³ dvojstupňovo extrahovali rutín z celej rastliny pohánky 50% etanolom pri teplotách 30 °C až 100 °C. Na dosiahnutie vysokého výťažku rutínu (stanovované pomocou HPLC) stanovili ako optimálny teplotný rozsah 60–80 °C. Následne pri teplote 80 °C sledovali vplyv času (rozsah 0,5–4 h). Obsah rutínu rástol do 1 h, potom postupne klesal. Autori pokles vysvetľujú pravdepodobnými stratami rutínu pri vyššej teplote. V našom experimente sme do 3 h pokles nezaznamenali, zhodujeme sa však s autormi¹³ v optimálnom teplotnom rozmedzí. Podľa iných autorov, predĺženie času (viac ako 2 h) pri nižšej (25 °C) i vyššej (60 °C) teplote a extrakcii 30% etanolom vedie k stratám rutínu, čo nebolo pozorované, ak sa použil 70% etanol¹². Krefť a spol.¹⁴ uvádzajú 50–60% etanol ako najvhodnejší na získavanie rutínu zo zrna pohánky, avšak pri nižšej teplote (30 °C) a dobe extrakcie 3 h.

Je však publikovaných veľa prác venujúcich sa problematike predikcie a optimalizácie chemických a biochemických procesov v rôznych oblastiach, napr. potravinárstve^{17–21}, farmácii^{22–24}, toxikológii²⁵ i poľnohospodárstve²⁶. Aplikované optimalizačné metódy v prácach sú klasické modelovacie techniky (t.j. „response surface methodology“, RSM) a tiež umelé neuronové siete

Tabuľka V

Porovnanie vypočítaných a experimentálnych hodnôt pre optimalizovaný postup extrakcie pohánky etanolom

Faktory a parametre	Požiadavka optimalizácie	Vypočítané	Experimentálne
Teplota, °C	žiadna	80	
Čas, min	žiadna	180	
Konc. etanolu, %	žiadna	65	
AOA, mg DPPH/g sušiny	maximum	19,7±2,2	20,2±0,3
TPC, mg GAE/g sušiny	žiadna	3,28±0,29	3,24±0,01
FL, mg rutínu/g sušiny	žiadna	0,719±0,093	0,748±0,005

(„artificial neural networks“, ANN). Objavujú sa publikácie, v ktorých sú porovnávané RSM a ANN^{27–30} i publikácie pojednávajúce o možnostiach vzájomného prepojenia týchto metód^{30–32}.

Záver

Pomocou regresných modelov získaných na základe plánovaného experimentu možno získať predstavu o hodnotách sledovaných parametrov v extraktoch získaných pri konkrétnych podmienkach extrakcie pohánky etanolom. Podmienky extrakcie možno voliť tak, aby bol získaný extrakt o požadovaných vlastnostiach. Umožňujú predpovedať vplyv faktorov na antioxidačnú aktivitu, resp. množstvo fenolových zlúčenín.

This work was supported by the Governmental Project 2003 SP 27/028 OE 02/028 OE 02 “Quality, Safety and Functionality of Primary Food Resources”.

LITERATÚRA

- Németh K., Plumb G. W., Berrin J.-G., Juge N., Jacob R., Naim H. Y., Williamson G., Swallow D. M., Kronon P. A.: *Eur. J. Nutr.* 42, 29 (2003).
- Arnao M. B., Cano A., Acosta M.: *Food Chem.* 73, 239 (2001).
- Fabjan N., Rode J., Kosir I. J., Wang Z., Zhang Z., Kreft I.: *J. Agric. Food Chem.* 51, 6452 (2003).
- Baumgartel A., Grimm R., Eisenbeiß W., Kreis W.: *Phytochem.* 64, 411 (2003).
- Kreft S., Štrukelj B., Gaberščik A., Kreft I.: *J. Exp. Bot.* 53, 1801 (2002).
- Song Z., Hou S.: *Talanta* 57, 59 (2002).
- Préstamo G., Pedrezuela A., Peñas E., Lasunción M. A., Arroyo G.: *Nutr. Res.* 23, 803 (2003).
- Quettier-Deleu Ch., Gressier B., Vasseur J., Dine T., Brunet C., Luyckx M., Cazin M., Cazin J.-C., Baileul F., Trotin F.: *J. Ethnopharmacol.* 72, 35 (2000).
- Suzuki T., Honda Y., Funatsuki W., Nakatsuka K.: *Plant Sci.* 163, 417 (2002).
- Oomah B. D., Mazza G.: *Food Chem.* 44, 1746 (1996).
- Rowland I.: *Proc. Nutr. Soc.* 58, 415 (1999).
- Hinneburg I., Neubert R. H. H.: *J. Agric. Food Chem.* 53, 3 (2005).
- Kim K. H., Lee K. W., Kim D. Y., Park H. H., Kwon I. B., Lee H. J.: *Bioresour. Technol.* 96, 1709 (2005).
- Kreft S., Knapp M., Kreft I.: *J. Agric. Food Chem.* 47, 4649 (1999).
- Yen G. Ch., Chen H. Y.: *J. Agric. Food Chem.* 43, 27 (1995).
- Yu L., Haley S., Peret J., Harris M.: *Food Chem.* 78, 457 (2002).
- Sérot T., Lafficher C.: *Food Chem.* 82, 513 (2003).
- Gutés A., Céspedes F., Alegret S., del Valle M.: *Biosens. Bioelectron.* 20, 1668 (2005).
- Habibi-Yangjeh A., Donandeh-Jenagharad M., Nooshyar M.: *J. Mol. Model.* 12, 338 (2006).
- Junqueira R. M., Castro I. A., Arêas J. A. G., Silva A. C. C., Scholz M. B. S., Mendes S., Oliveira K. C.: *Food Chem.* 101, 131 (2007).
- Liyana-Pathirana Ch., Shahidi F.: *Food Chem.* 93, 47 (2005).
- Peh K. K., Lim Ch. P., Quek S. S., Khoh K. H.: *Pharm. Res.* 17, 1384 (2000).
- Ben Hameda A., Gajdoová D., Havel J.: *J. Sep. Sci.* 29, 1188 (2006).
- Agatonovic-Kustrin S., Beresford R.: *Pharm. Biomed. Anal.* 22, 717 (2000).
- Dohnal V., Kuča K., Jun D.: *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub.* 149, 221 (2005).
- Trojanowicz M.: *Electroanalysis* 14, 1311 (2002).
- Bourquin J., Schmidli H., van Hoogevest P., Leuenberger H.: *Eur. J. Pharm. Sci.* 7, 17 (1998).
- Bourquin J., Schmidli H., van Hoogevest P., Leuenberger H.: *Eur. J. Pharm. Sci.* 6, 287 (1998).
- Baş D., Boyacı İ. H.: *J. Food Eng.* 78, 846 (2007).
- Agatonovic-Kustrin S., Zecevic M., Zivanovic Lj., Tucker I. G.: *Anal. Chim. Acta* 364, 265 (1998).
- Balkin S. D., Lin D. K. J.: *Appl. Regression Anal.* 29, 2215 (2000).

A. Mikulajová^a, M. Takáčsová^a, P. Alexy^b, and L. Brindzová^a (*^aInstitute of Biochemistry, Nutrition and Health Protection, Department of Nutrition and Food Assessment, ^bDepartment of Plastics and Rubber, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak Technical University, Bratislava*): **Optimization of Extraction of Phenolic Compounds from Buckwheat Based on an Experimental Design Method**

The selection of suitable extraction conditions for antioxidants from plant material is crucial. In consequence of various nature of active compounds in different plant materials, the extraction conditions cannot be generalized. The objective of this study was to optimize the extraction conditions of buckwheat phenolics using the results of an experimental design method.

APROCHEM 2008

17. Konference • Chemické technologie • Ropa • Petrochemie • Polymery

Udržitelný rozvoj průmyslu • Výzkum • Školství • Prostředí • Bezpečnost • Legislativa

14. – 16. duben 2008 • Milovy – Sněžné na Moravě • Hotel Devět Skal

ODPADOVÉ FÓRUM 2008

3. Symposium • Výsledky výzkumu a vývoje pro odpadové hospodářství

Nebezpečné, chemické, biodegradabilní a inertní odpady • Termické využití • Recyklace • Sanace zátěží • Systémové otázky • Odpadní vody • Čištění exhalací

16. – 18. duben 2008 • Milovy – Sněžné na Moravě • Hotel Devět Skal

Doprovodná technická výstavka • Firemní prezentace • Možnosti inzerce

Plná znění příspěvků na CD i v tištěné formě • Pro obě dílčí akce jediná registrace

1. cirkulář vyjde v září 2007. Nabídky příspěvků budou žádány do 15. 1. 2008, plná znění do 15. 3. 2008. 2. cirkulář vyjde v únoru 2008. Všechny informace současně na internetu.

Připravuje: PCHE s ČSPCH, ČSCHI, ČSCH, VŠCHT Praha, SCHP ČR, ÚCHP AV ČR a CEMC. Příprava 3. symposia ODPADOVÉ FÓRUM 2008 s Redakcí časopisu Odpadové fórum CEMC.

Kontakty: PCHE - PetroCHEmEng, Ing. Jaromír Škarka, CSc., Na Dračkách 13, 162 00 Praha 6
T/F: 220 518 698 • M: 607 671 866

www.aprochem.cz • pche@csvts.cz