

УДК 338.439.4

DOI: 10.18413/2408-9346-2016-2-4-53-59

Фрум А.¹
Жеоржеску Ч.²
Быркэ А. Г.³
Глигор Ф. Г.⁴
Тицэ О.⁵

ИССЛЕДОВАНИЕ КАЧЕСТВЕННОГО И КОЛИЧЕСТВЕННОГО СОСТАВА ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ЧЕРНИКИ (*VACCINIUM MYRTILLUS* L.) КАК СЫРЬЯ ДЛЯ ПИЩЕВОЙ И ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

- 1) аспирант, Университет «Луциан Блага» Сибиу, факультет сельскохозяйственных наук, пищевой инженерии и защиты окружающей среды, ул. И. Рациу, 7-9, г. Сибиу, Румыния. *E-mail: adinafrum@gmail.com*
- 2) кандидат химических наук, доцент, Университет «Луциан Блага» Сибиу, факультет сельскохозяйственных наук, пищевой инженерии и защиты окружающей среды, ул. И. Рациу, 7-9, г. Сибиу, Румыния. *E-mail: cecilia.georgescu@ulbsibiu.ro*
- 3) кандидат экономических наук, доцент, Технический Университет Молдовы, факультет технологии и менеджмента пищевых производств, ул. Штефан чел Маре, 168, Кишинев, МД-2004, Республика Молдова. *E-mail: birca.adriana1@gmail.com*
- 4) профессор, кандидат фармацевтических наук, Университет «Луциан Блага» Сибиу, медицинский факультет ул. Луциан Блага, 2А, г. Сибиу, Румыния. *E-mail: felicia.gligor@ulbsibiu.ro*
- 5) профессор, кандидат технических наук, Университет «Луциан Блага» Сибиу, факультет сельскохозяйственных наук, пищевой инженерии и защиты окружающей среды, ул. И. Рациу, 7-9, г. Сибиу, Румыния. *E-mail: ovidiu.tita@ulbsibiu.ro*

Аннотация. Черника традиционно используется как сырье в пищевой и фармацевтической промышленности. Регулярное употребление этих ягод уменьшает количество хронических заболеваний благодаря высокому содержанию полифенолов. В настоящем исследовании спектрофотометрический метод использован для количественного определения общего количества полифенолов в чернике и метод HPLC для идентификации и определения некоторых фенольных соединений. В результате были обнаружены галловая, сиреневая, коричневая, кофейная, феруловая и хлорогеновая кислоты, ресвератрол, катехин, рутин и кверцетин. Установлено, что из выделенных идентифицированных фенольных соединений хлорогеновая кислота находится в наибольшей концентрации – 85,42 мг/100 г растительного продукта, а ресвератрол в наименьшей концентрации – 0,25 мг/100 г растительного продукта.

Ключевые слова: черника; фенольные соединения; фенольные кислоты; ВЭЖХ

UDK 338.439.4

Frum A.¹
Georgescu C.²
Birca A. G.³
Gligor F. G.⁴
Tita O.⁵

STUDY QUALITY AND QUANTITY OF PHENOLIC COMPOUNDS BILBERRY (*VACCINIUM MYRTILLUS* L.) AS RAW MATERIALS FOR FOOD AND PHARMACEUTICAL INDUSTRY

- 1) Graduate Student, Lucian Blaga University of Sibiu, Faculty of Agricultural Sciences, Food Engineering and the Environment, 7-9, St. I. Ratsiu, Sibiu, Romania. *E-mail: adinafrum@gmail.com*
- 2) PhD in Chemistry, Associate Professor, Lucian Blaga University of Sibiu, Faculty of Agricultural Sciences, Food Engineering and the Environment, 7-9, St. I. Ratsiu, Sibiu, Romania. *E-mail: cecilia.georgescu@ulbsibiu.ro*
- 3) PhD in Economic Sciences, Associate Professor, Technical University of Moldova, Faculty of Technology and Management of Food Production, 168, st.Stefan cel Mare, Chisinau, MD-2004, Republic of Moldova. *E-mail: birca.adriana1@gmail.com*
- 4) Professor, Candidate of Pharmaceutical Sciences, Lucian Blaga University of Sibiu, Faculty of Medicine, 7-9, St. I. Ratsiu, Sibiu, Romania. *E-mail: felicia.gligor@ulbsibiu.ro*
- 5) Professor, Candidate of Technical Sciences, Lucian Blaga University of Sibiu, Faculty of Agricultural Sciences, Food Engineering and the Environmen, 7-9, St. I. Ratsiu, Sibiu, Romania. *E-mail: ovidiu.tita@ulbsibiu.ro*

Abstract. Bilberry is traditionally used as a raw material in the food and pharmaceutical industries. Regular consumption of these berries reduces the number of chronic diseases due to the high content of polyphenols. In the present study, a spectrophotometric method used to quantify the total amounts of polyphenols in blueberries and HPLC method for identification and determination of some phenolic

compounds. The result was discovered Gallic, lilac, cinnamon, coffee, ferulic, and chlorogenic acid, resveratrol, catechin, rutin and quercetin. It is established that of the selected identified phenolic compounds chlorogenic acid is found in greatest concentration – 85,42 mg/100 g vegetal product, and resveratrol in the lowest concentration – 0,25 mg/100 g plant product.

Keywords: blueberries; phenolic compounds; phenolic acids; HPLC

Введение. На национальном и международном уровне в настоящее время отмечается повышенное внимание к применению лесных ягод. Исследование натуральных химических соединений растительных продуктов является важной темой современной химии, которая не прекращает привлекать во многих странах живой интерес, как теоретический, так и практический.

Для полноценного использования лесных ягод необходимо использование современных методов экстракции и очистки, изучение содержания биологически активных веществ в растительных материалах, их локализация на уровне органов и тканей, а также наиболее эффективное применение этих соединений в различных областях деятельности, например, в пищевой или фармацевтической промышленности.

Черника (*Vaccinium myrtillus L.*) – это лесная ягода, традиционно используемая в Европе в питании и как медицинский продукт [12]. Вследствие накопления большого числа биологически активных веществ, макро- и микронутриентов она обладает рядом функциональных свойств. В первую очередь это обусловлено антиоксидантной активностью биологически активных веществ, способных нейтрализовать свободные радикалы [7]. Среди биологически активных веществ с сильными антиоксидантными свойствами присутствуют полифенолы, в первую очередь антоцианы [3]. Это – ответственные за красный, голубой или фиолетовый цвет поверхности фруктов, семян, цветов и некоторых листьев красящие вещества, обладающие рядом положительных биологических эффектов [6], как и некоторые другие компоненты растительных источников – каротиноиды, токоферолы, микроэлементы, полиненасыщенные жирные кислоты [11]. Синтез полифенолов в клетках животных и человека невозможен, поэтому они поступают в организм преимущественно с растительной пищей, оказывая при этом на него в целом благоприятное воздействие.

Лесные ягоды, например черника, ежевика и клюква, богаты полифенольными соединениями (флавоноидами); это, в первую очередь, антоцианы, флавоны, флаванолы, проантоцианиды, фенольные кислоты (гидроксибензойные и

гидроксикоричные) и элагитанины, которые накапливаются в различных концентрациях в зависимости от внутренних (генетических) факторов, а также от окружающей среды [5]. Черника является одной из ягод с повышенной антиоксидантной активностью, благодаря присутствию фенольных соединений в значительных количествах [8]. Она имеет антиокислительные, сосудозащитные, противодерматитные и противовоспалительные свойства. Черника используется в основном в офтальмологии, а также как вспомогательное средство при лечении заболеваний сосудов, например, капиллярной хрупкости, венозной недостаточности или геморроя [9].

Исследования показали, что регулярное потребление лесных ягод может уменьшить риск появления некоторых хронических заболеваний, например, сердечно-сосудистых, раковых, легочных заболеваний, артрита или диабета. Также был доказан и их омолаживающий эффект [8].

Антиоксиданты известны как важные биологически активные вещества, оказывающие положительное влияние на здоровье. Они широко используются в пищевой промышленности как потенциальные ингибиторы окисления липидов [10]. По этой причине внимание ученых направлено на натуральные, нетоксичные антиоксиданты, защищающие человеческий организм от воздействия свободных радикалов, которые могут обуславливать появление хронических дегенеративных заболеваний.

Учитывая известные свойства черники, в настоящей работе была поставлена цель экстрагировать, отделить и идентифицировать полифенольные соединения этих лесных ягод.

Материалы и методы.

Подготовка пробы. Черника была собрана в окрестностях г. Сибиу (Румыния), заморожена и хранилась при температуре -20°C. Для проведения анализов ягоды высушивались при 50°C в свободном потоке теплого воздуха.

500 мг порошка растительного продукта подвергали экстракции в 10 мл растворителя: метанол/вода в пропорции 70:30 (V/V). Экстракция проводилась в колбе Эрленмейера, закрытой шлифованной пробкой. Колбу выдерживали в ультразвуковой ванне в течение

30 мин. при температуре 40°C. Смесь центрифугировали при 5000 об/мин в течение 10 мин. и полученный экстракт декантировали с осадка и высушивали. Сухой остаток растворяли в 10 мл растворителя, фильтровали и доводили до объема 10 мл этим же растворителем.

Анализ общих полифенолов.
Спектрофотометрический анализ общих полифенолов проводили по методу Фолина-Чокальтеу, адаптированному по действующему изданию Европейской Фармакопеи 8.0.

К 1 мл анализируемого раствора, разбавленного в соотношении 1:10, добавляли 1 мл реактива Фолина, 15 мл дистиллированной воды и 2 мл раствора карбоната натрия 290 г/л. Приготовленную смесь встряхивали 10 минут, затем выдерживали в водяной бане при температуре 40 °С в течение 20 минут. Раствор охлаждали и измеряли оптическую плотность полученного раствора при 760 нм.

Пересчет выполняли на галловую кислоту по калибровочной кривой, которую строили, в аналогичных условиях, заменяя анализируемый раствор на раствор галловой кислоты различной концентрации в метаноле. Растворы галловой кислоты готовились следующим образом. В 5 мерных колб объемом 25 мл вводили соответственно 1, 2, 3, 4 и 5 мл раствора галловой кислоты 1 мг/мл и доводили до метки метанолом. Полученные растворы обрабатываются аналогично анализируемой пробе. Концентрацию общих полифенолов в анализируемой пробе выражали в мг галловой кислоты на 100 мг растительного продукта.

Анализ некоторых фенольных соединений.
Качественный и количественный анализ проводился методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с использованием хроматографической колонки 250×4,6 мм Zorbax Eclipse Plus C18, 5 мкм при температуре термостата колонок 25 °С. Элюирование проводилось в градиентном режиме с использованием трех растворителей: А – дистиллированная вода степени очистки Milli-Q, В – абсолютный метанол и С – смесь очищенной воды и ледяной уксусной кислоты в пропорции 96:4 (по объему). Программа градиента: 0 мин: 15% В и 85% С, 15 мин – 75% А и 25% В, 20 мин: 15% А и 85% В, 40 мин: 40% А и 60% В, 45 мин: 5% А и 95% В, 55 мин: 5% А и 95% В, 60 мин: 85% А и 15% В и 70 мин: 85% А и 15% В. При этом скорость подачи элюента составляла: 0 мин: 0,5 мл/мин. и от 15 до 70 мин: 0,8 мл/мин. Объем вводимой пробы 5 мкл. Детектирование осуществляли при 280, 303, 330 и 360 нм; указанные длины волн были предварительно выбраны по спектрофотометрическим параметрам определяемых компонентов [4].

Результаты и обсуждение. В чернике было обнаружено общее количество полифенольных соединений – 56,31 мг/100 мг растительного продукта (в пересчете на галловую кислоту). Результат был получен с использованием калибровочной кривой, представленной на рис. 1, и пересчитан на 100 мг исходного растительного продукта.

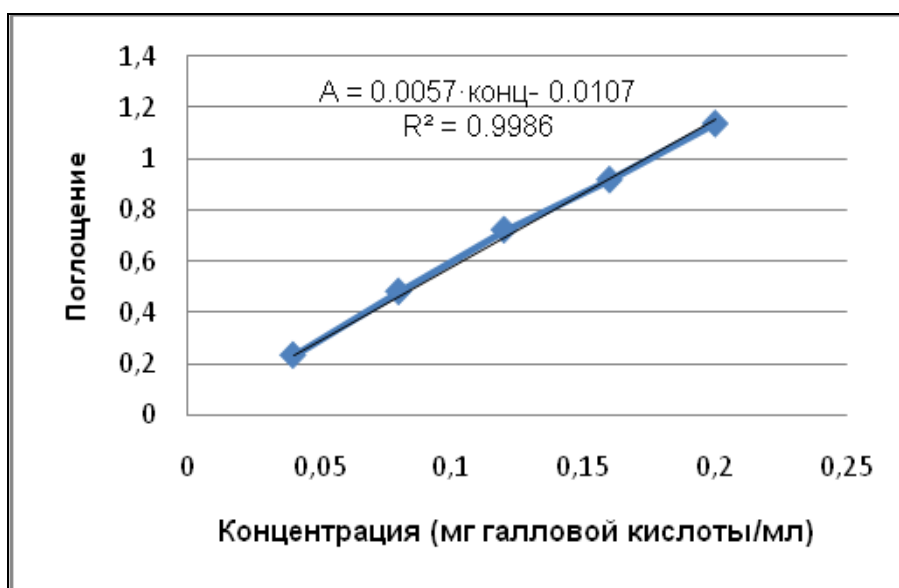


Рис. 1. Калибровочная кривая общих полифенолов в методе Фолина-Чокальтеу
Fig. 1. Total polyphenols the calibration curve in the method Polina-Ciocalteu

Эти результаты указывают на общее количество присутствовавших в экстракте полифенолов, чувствительных к реактиву Фолина-Чокальтеу.

Путем использования метода ВЭЖХ были получены иные результаты: общее количество фенольных веществ было определено в количестве 217,35 мг/100 г растительного

продукта. При этом вещества определяли при длинах волн, соответствующих максимумам абсорбции соединений: при 280 нм детектировали галловую кислоту, (+)-катехин, сиреневую и коричную кислоты, при 303 нм – ресвератрол, при 330 нм хлорогеновую, кофейную и феруловую кислоты, а при 360 нм – рутин и кверцетин (рис. 2, 3).

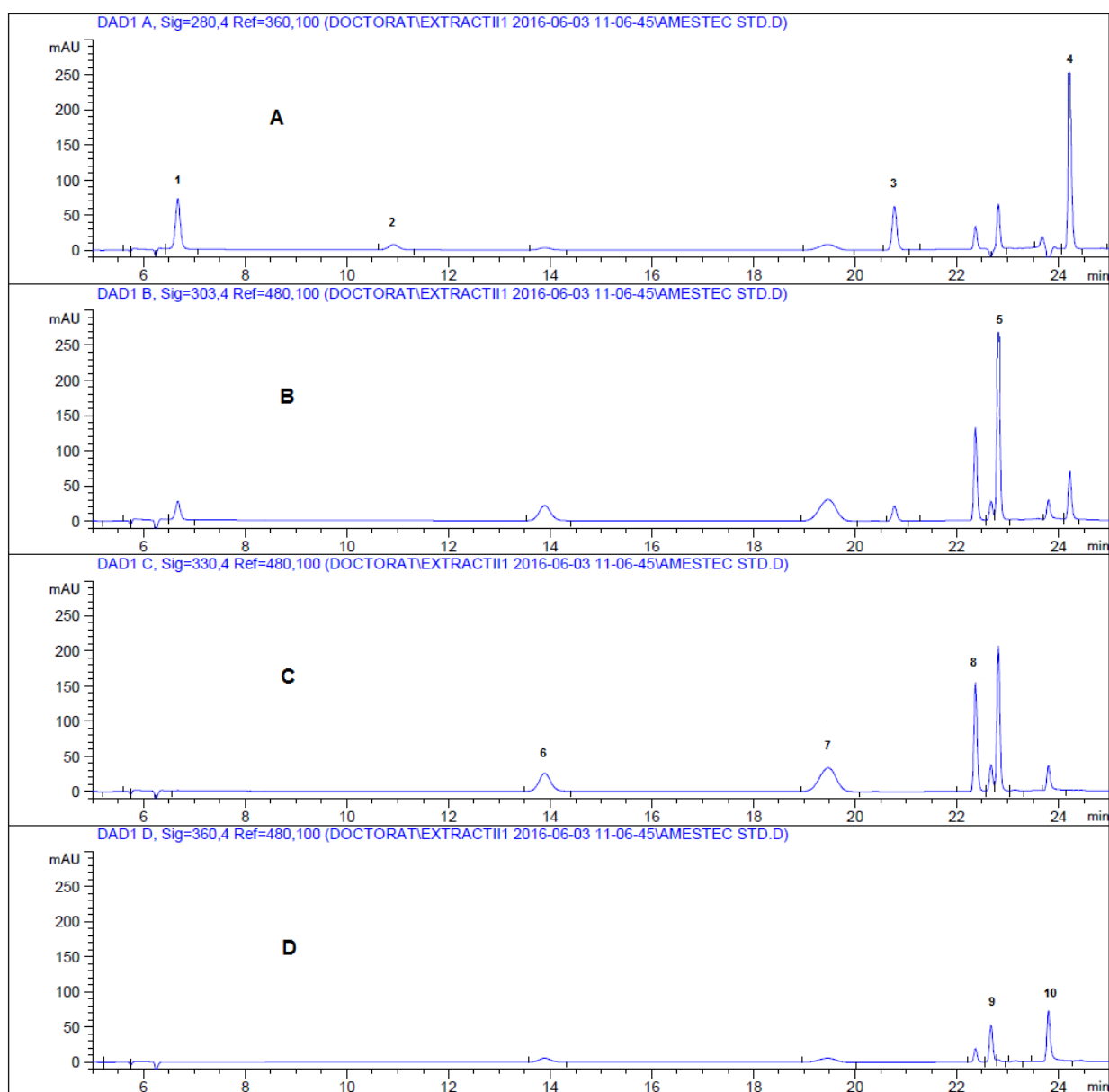


Рис. 2. Хроматограмма смеси стандартов фенольных соединений: А – 280 нм, В – 303 нм, С – 330 нм, D – 360 нм
1 – галловая кислота, 2 – (+)-катехин, 3 – сиреневая кислота, 4 – коричная кислота, 5 – ресвератрол,
6 – хлорогеновая кислота, 7 – кофейная кислота, 8 – феруловая кислота, 9 – рутин, 10 – кверцетин

Fig. 2. Chromatogram of mixture of standards of phenolic compounds:

A – 280 nm, B – nm 303, C – 330 nm, D – 360 nm

1 – gallic acid, 2 – (+)-catechin, 3 – lilac acid, 4 – cinnamic acid, 5 – resveratrol,
6 – chlorogenic acid, 7 – coffee acid, 8 – ferulic acid, 9 – rutin, 10 – quercetin

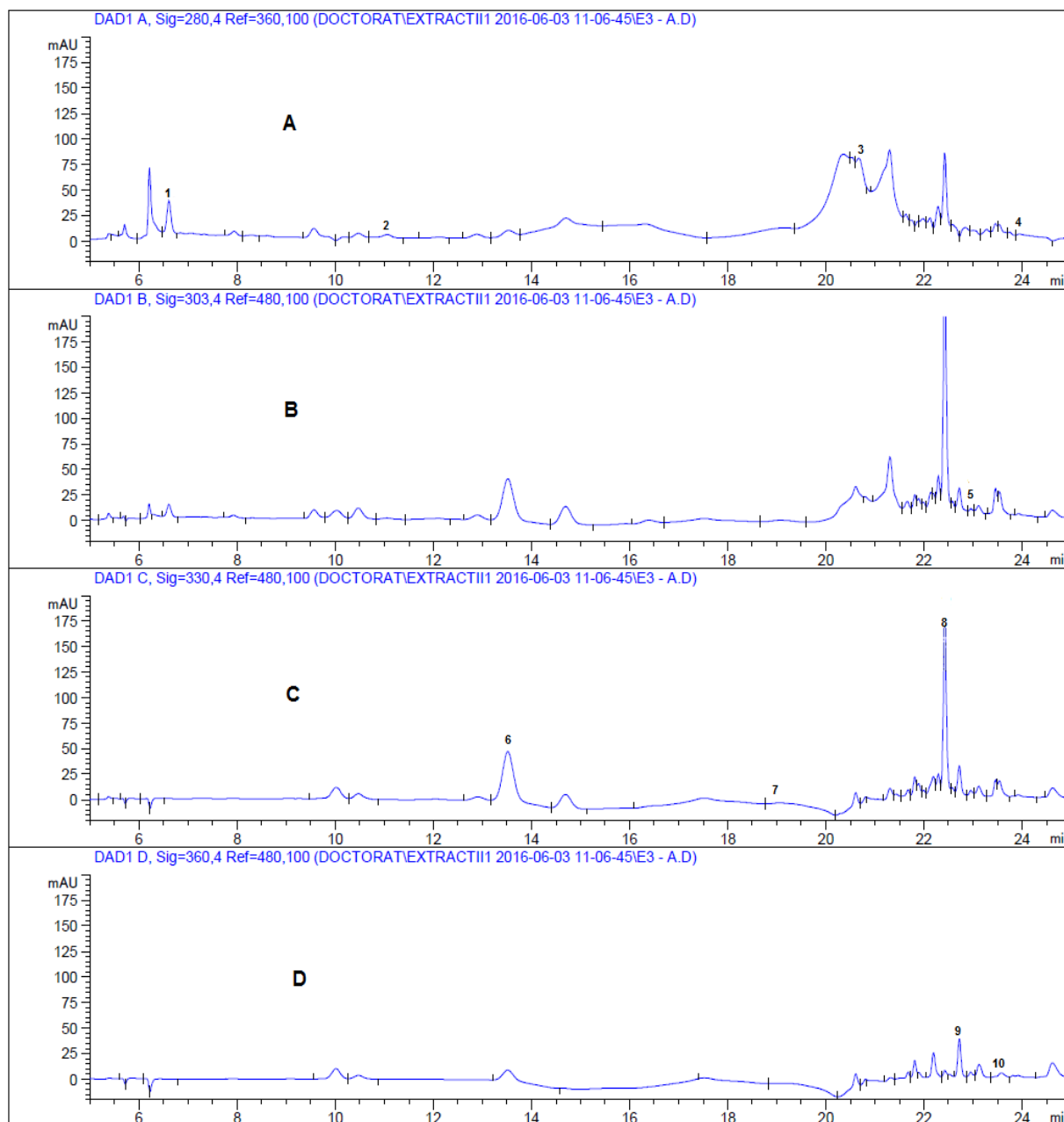


Рис. 3. Хроматограмма фенольных компонентов экстракта черники Запись экстракта при: А – 280 нм, В – 303 нм, С – 330 нм, D – 360 нм 1 – галловая кислота, 2 – (+)-катехин, 3 – сиреневая кислота, 4 – коричная кислота, 5 – ресвератрол, 6 – хлорогеновая кислота, 7 – кофейная кислота, 8 – феруловая кислота, 9 – рутин, 10 – кверцетин
 Fig. 3. Chromatogram of the phenolic components of blueberry extract Record extract at A – 280 nm, B – nm 303, C – 330 nm, D – 360 nm 1 – gallic acid, 2 – (+)-catechin, 3 – lilac acid, 4 – cinnamic acid, 5 – resveratrol, 6 – chlorogenic acid, 7 – coffee acid, 8 – ferulic acid, 9 – rutin, 10 – quercetin

Идентификация фенольных соединений проводилась путем сравнения времен удерживания (табл. 1) фенольных соединений в смеси стандартов (рис. 2) с веществами из экстракта черники (рис. 3).

Для количественных расчетов использовали площади пиков и градуировочные зависимости, построенные по стандартным веществам.

Таблица 1

Время удержания фенольных соединений

Table 1

The retention time of phenolic compounds

Фенольное соединение	Время удержания (мин)	Фенольное соединение	Время удержания (мин)
Галловая кислота	6,7	Хлорогеновая кислота	13,9
(+)-Катехин	10,9	Кофеиновая кислота	19,5
Сиринговая кислота	20,8	Феруловая кислота	22,4
Коричная кислота	24,2	Рутин	22,7
Ресвератрол	22,8	Кверцетин	23,8

Наибольшее количество из определенных в экстракте веществ пришлось на хлорогеновую кислоту 85,42 мг /100 г, затем следует феруловая кислота и рутин, содержание которых составило, соответственно 38,30 мг /100 г и 33,37 мг/100 г. Галловая кислота, (+)-катехин и кофейная

кислота найдены в количестве между 10 и 20 мг/100 г. Наименьшим оказалось содержание в растительном продукте кверцетина, сиреневого и коричной кислот и ресвератрола. Последний находится в количестве менее 1 мг/100 г (табл. 2).

Таблица 2

Количественный анализ фенольных соединений

Table 2

Quantitative analysis of phenolic compounds

Стандарт	Площадь пика в образце, mAU·с	Площадь пика стандарта, mAU·с	Масса навески, мг	Масса стандарта, мг	Содержание веществ в стандартах, %	Содержание веществ в образце, г/100 г
Кверцетин	36,11794	371,7557	530,47	5,19	95	3,61
Рутин	167,716	225,8515		6,34	94	33,37
Галловая кислота	177,1212	467,3984		5,79	98,5	16,30
Сиреневая кислота	82,75699	392,7161		5,45	95	8,23
Кофейная кислота	277,4025	773,6238		5,21	98	13,81
Коричная кислота	60,89871	1117,151		5,68	99	2,31
Феруловая кислота	683,80505	673,0148		5,05	99	38,30
Катехин	41,38238	100,7379		5,19	98	15,75
Ресвератрол	7,23756	1058,129		5,04	99	0,26
Хлорогеновая кислота	826,18671	356,8267		5,15	95	85,42
					Всего	217,35

Выводы. Исследования последних лет отмечают способность черники снижать риск возникновения определенных хронических заболеваний. Это можно объяснить значительным количеством полифенольных соединений, содержащихся в этих ягодах. Количество таких соединений в чернике, собранной в окрестностях г. Сибиу (Румыния), было определено спектрофотометрическим методом с использованием реактива Фолина-Чокальтеу, и было выражено в эквивалентах галловой кислоты в мг на 100 г продукта. В чернике было найдено 56,31 мг полифенолов на 100 г растительного продукта.

Качественный и количественный анализ фенольных соединений, выполненный методом ВЭЖХ, показал, что в этих ягодах имеется

значительное количество хлорогеновой кислоты, феруловой кислоты и рутина. Меньше всего в чернике обнаружено сиреневой кислоты, ресвератрола и кверцетина.

Список литературы

1. Farmacopeea Europeană [Text]. 2014, Editia 8.0.
2. Arevstrom, L., Landberg, R., Waldenberg, M., Blanc, S., Frobert, O. *Bilberry as a dietary supplement after myocardial infarction: The Bear Smart Trial* [Text] / L. Arevstrom, R. Landberg, M. Waldenberg, S. Blanc, O. Frobert // Journal of the American College of Cardiology, № 67(13_S). 2016. 539 p.
3. Babova, O., Occhipinti, A., Capuzzo, A., Maffei, M. E. *Extraction of bilberry (Vaccinium myrtillus) antioxidants using supercritical/subcritical CO₂ and ethanol as co-solvent* [Text] / O. Babova, A. Occhipinti,

A. Capuzzo, M. E. Maffei // The Journal of Supercritical Fluids, № 107. 2016. Pp. 358-363.

4. Frum, A., Lengyel, E., Georgescu, C., Gligor, F., Tița, O. *Analysis of phenolic compounds extracted from three types of berries* [Text] / A. Frum, E. Lengyel, C. Georgescu, F. Gligor, O. Tița // Journal of EcoAgroTourism, № 1. 2016.

5. Häkkinen, S. H., Törrönen, A. R. *Content of flavonols and selected phenolic acids in strawberries and Vaccinium species: influence of cultivar, cultivation site and technique* [Text] / S. H. Häkkinen, A. R. Törrönen // Food Res. Int., № 33. 2000. 517 p.

6. Kong, J. M., Chia, L. S., Goh, N. K. *Analysis and biological activities of anthocyanins* [Text] / J. M. Kong, L. S. Chia, N. K. Goh // Phytochem., № 64. 2003. Pp. 923-933.

7. Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., Chandra, N. *Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health* [Text] / V. Lobo, A. Patil, A. Phatak, N. Chandra // Pharmacognosy Reviews, №4. 2010. Pp. 118-126.

8. Padmanabhan, P., Coreea-Betano, J., Paliyath, G., Berries and Related Fruits [Text] / P. Padmanabhan, J. Coreea-Betano, G. Paliyath, // Encyclopedia of Food and Health, Reference Module in Food Science, 2016. Pp. 364-371.

9. Pietta, P., Gardana, C., Pietta, A. *Chapter 2- Flavonoids in Herbs, Flavonoids in Health and Disease* [Text] / P. Pietta, C. Gardana, A. Pietta, // Marcel Dekker Inc., 2003. Pp. 53-54.

10. Scherer, R., Godoy, H. T. *Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-picrylhydrazyl method* [Text] / R. Scherer, H. T. Godoy // Food chemistry № 112. 2009. Pp. 654-658.

11. Thompson, A. K. *Fruit and vegetables: Harvesting, Handling and Storage* [Text] / A. K. Thompson // John Wiley and Sons, Ltd. №1, 2015. Pp. 237-240.

12. Zoratti, L., Jaakola, L. *Bilberry (Vaccinium myrtillus L.) Ecotypes* [Text] / L. Zoratti, L. Jaakola, // Composition of Fruit Cultivars, Academic Press. 2016. Pp. 83-99.

References

1. Farmacopeea Europeană [Text]. 2014, Editia 8.0.
2. Arevstrom, L., Landberg, R., Waldenborg, M., Blanc, S., Frobert, O. *Bilberry as a dietary supplement after myocardial infarction: The Bear Smart Trial* [Text] / L. Arevstrom, R. Landberg, M. Waldenborg, S. Blanc, O. Frobert // Journal of the American College of Cardiology, № 67(13_S). 2016. 539 p.

3. Babova, O., Occhipinti, A., Capuzzo, A., Maffei, M. E. *Extraction of bilberry (Vaccinium myrtillus) antioxidants using supercritical/subcritical CO₂ and ethanol as co-solvent* [Text] / O. Babova, A. Occhipinti, A. Capuzzo, M. E. Maffei // The Journal of Supercritical Fluids, № 107. 2016. Pp. 358-363.

4. Frum, A., Lengyel, E., Georgescu, C., Gligor, F., Tița, O. *Analysis of phenolic compounds extracted from three types of berries* [Text] / A. Frum, E. Lengyel, C. Georgescu, F. Gligor, O. Tița, // Journal of EcoAgroTourism, № 1. 2016.

5. Häkkinen, S. H., Törrönen, A. R. *Content of flavonols and selected phenolic acids in strawberries and Vaccinium species: influence of cultivar, cultivation site and technique* [Text] / S. H. Häkkinen, A. R. Törrönen // Food Res. Int., № 33. 2000. 517 p.

6. Kong, J. M., Chia, L. S., Goh, N. K. *Analysis and biological activities of anthocyanins* [Text] / J. M. Kong, L. S. Chia, N. K. Goh // Phytochem., № 64. 2003. Pp. 923-933.

7. Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., Chandra, N. *Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health* [Text] / V. Lobo, A. Patil, A. Phatak, N. Chandra // Pharmacognosy Reviews, №4. 2010. Pp. 118-126.

8. Padmanabhan, P., Coreea-Betano, J., Paliyath, G., Berries and Related Fruits [Text] / P. Padmanabhan, J. Coreea-Betano, G. Paliyath, // Encyclopedia of Food and Health, Reference Module in Food Science, 2016. Pp. 364-371.

9. Pietta, P., Gardana, C., Pietta, A. *Chapter 2- Flavonoids in Herbs, Flavonoids in Health and Disease* [Text] / P. Pietta, C. Gardana, A. Pietta, // Marcel Dekker Inc., 2003. Pp. 53-54.

10. Scherer, R., Godoy, H. T. *Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-picrylhydrazyl method* [Text] / R. Scherer, H. T. Godoy // Food chemistry № 112. 2009. Pp. 654-658.

11. Thompson, A. K. *Fruit and vegetables: Harvesting, Handling and Storage* [Text] / A. K. Thompson // John Wiley and Sons, Ltd. №1, 2015. Pp. 237-240.

12. Zoratti, L., Jaakola, L. *Bilberry (Vaccinium myrtillus L.) Ecotypes* [Text] / L. Zoratti, L. Jaakola, // Composition of Fruit Cultivars, Academic Press. 2016. Pp. 83-99.

Рецензент:

Якуба А.Р., профессор, доктор технических наук
Сумской национальный аграрный университет