

OPTIMIZACIJA USLOVA MIKROTALASNE EKSTRAKCIJE FENOLNIH JEDINJENJA PLODA DIVLJE TREŠNJE (*PRUNUS AVIUM* L.)

Nevena Mihailović¹, Tijana Maksimović¹, Andrija Ćirić¹, Ljubinka Joksović¹

Izvod: Cilj ovog rada bila je optimizacija uslova mikrotalasne ekstrakcije za određivanje sadržaja ukupnih flavonoida ploda divlje trešnje (*Prunus avium* L.). Uslovi koji su optimizovani su procenat metanola, odnos mase uzorka i rastvarača, vreme i temperatura ekstrakcije. Na osnovu eksperimentalnog dizajna i softverskog paketa Design Expert 7.0.0., određeni su optimalni uslovi ove vrste ekstrakcije i to su: procenat metanola 70%, odnos mase uzorka i rastvarača 0,03 g/mL, vreme ekstrakcije 1,80 min i temperatura 78 °C. Primenom DPPH metode ispitana je antioksidativna aktivnost ekstrakta dobijenog pod optimalnim uslovima ($IC_{50} = 5,14 \text{ mg mL}^{-1}$).

Ključne reči: *Prunus avium* L., mikrotalasna ekstrakcija, optimizacija, flavonoidi, antioksidativna aktivnost

Uvod

Divlja trešnja (*Prunus avium* L.) je listopadno drvo iz familije Rosaceae i rasprostranjena je u većem delu Evrope, u umerenim klimatskim zonama američkog kontinenta, severnoj Africi, Bliskom i Dalekom istoku, južnoj Australiji i Novom Zelandu (Mariette i sar., 2010; Basanta i sar., 2014). Poznato je da se plod divlje trešnje od davnina koristi u ljudskoj ishrani. U plodu divlje trešnje identifikovani su različiti antioksidanati, uključujući fenolne kiseline, flavonoide i vitamine, za koje je potvrđeno da pokazuju korisne efekte na zdravlje čoveka, pre svega u prevenciji kardiovaskularnih oboljenja i bolesti povezanih sa oksidativnim stresom (Beattie i sar., 2005; Serra i sar., 2011).

Mikrotalasna ekstrakcija je jedna od najboljih metoda za ekstrakciju fenolnih jedinjenja zbog posebnih interakcija između mikrotalasa i materije, kao i veoma brzog vremena ekstrakcije (Li i sar., 2011). Sistem za mikrotalasnu ekstrakciju brzo stvara toplotu i ova osobina rezultuje kratkim vremenom ekstrakcije i dobrim kvalitetom ekstrakata sa boljim vrednostima iskorišćenja ciljanog jedinjenja (Barbero i sar., 2006). Efikasnost procesa mikrotalasne ekstrakcije zavisi od vremena ekstrakcije, temperature ekstrakcije, odnosa čvrste i tečne faze, kao i od tipa i sastava upotrebljenog rastvarača (Pizarro i sar., 2007).

Design Expert predstavlja statistički softverski paket iz Stat-Ease Inc (Minneapolis, Minnesota, USA), koji je posebno namenjen za pravljenje dizajna eksperimenata. Nudi uporedne testove, snimanje, karakterizaciju, optimizaciju, dizajn smeša i kombinovani dizajn. Statistički značaj ovih faktora se određuje pomoću analize varijanse (ANOVA).

¹Univerzitet u Kragujevcu, Prirodno-matematički fakultet, Institut za hemiju, Radoja Domanovića 12, Kragujevac, Srbija (i.nevena@kg.ac.rs)

Grafičke alatke služe za identifikaciju uticaja svakog faktora na željeni rezultat, kao i za otkrivanje nepravilnosti u podacima. Hemometrijski pristupi zasnovani na eksperimentalnom dizajnu mogu se uspešno primeniti za procenu promenljivih koje utiču na efikasnost mikrotalasne ekstrakcije (Zhong i sar., 2010).

Cilj ovog rada bilo je određivanje optimalnih uslova mikrotalasne ekstrakcije flavonoida ploda divlje trešnje, kao i određivanje antioksidativne aktivnosti ekstrakta dobijenog pod optimalnim uslovima.

Materijal i metode rada

Biljni materijal i priprema ekstrakata

Divlje trešnje su ubrane u Čestinu (43° 53' 21" SGŠ, 20° 48' 56" IGD) u maju 2016. godine. Masa ubranih trešanja bila je oko 1 kg. Trešnje su očišćene od koštica i zamrznute do dalje upotrebe. Deo ovih trešanja je odmrznut, izblendiran i homogenizovan. Za ekstrakciju je odmeravan po 1 g ovako pripremljenih trešanja. Urađeno je trideset različitih eksperimenata ekstrakcije korišćenjem mikrotalasne pećnice MicroSYNTH (Milestone, Italija), pri čemu su korišćene različite zapremine smeše rastvarača (metanol/voda) i različiti uslovi ekstrakcije (vreme, temperatura i odnos mase uzorka i zapremine rastvarača).

Optimizacija uslova ekstrakcije

Eksperimentalni dizajn optimizacije uslova ekstrakcije, analiza podataka i funkcija poželjnosti određeni su korišćenjem programa Design-Expert[®] verzija 7.0.0.(Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN, US).

Određivanje sadržaja flavonoida

U dobijenim ekstraktima, količina ukupnih flavonoida određena je spektrofotometrijski (UV-Vis спектрофотометар Cary 300, Agilent, USA), metodom sa $AlCl_3$ i izražena u ekvivalentima rutina, mg RU/g ekstrakta (Brighente i sar., 2007).

Antioksidativna aktivnost ekstrakta

Merenje antioksidativne osobine ekstrakta divlje trešnje dobijenog pod optimalnim uslovima izvršeno je primenom DPPH metode (Kumarasmy i sar., 2007.). Rezultat je izražen kao IC_{50} vrednost (tri ponavljanja \pm standardna devijacija), dobijen postupkom nelinearne regresije, korišćenjem softvera za analizu podataka OriginPro 8.

Rezultati istraživanja i diskusija

Metodologija odgovora površine je korišćena za ispitivanje promenljivih koje utiču na efikasnost mikrotalasne ekstrakcije. Razvijen je složen, centralni kompozitni dizajn, i frakcioni eksperimentalni dizajn sa tri nivoa/četiri faktora za ispitivanje uticaja

promenljivih faktora na efikasnost ekstrakcije flavonoida, kao i šest ponavljanja u centralnoj tački, korišćen je za određivanje greške ekstrakcije uzoraka divlje trešnje. Nezavisne promenljive su kodirane na tri nivoa (-1, 0 i +1) i svaki nivo je odabran na osnovu stabilnosti flavonoida pod uslovima mikrotalasne ekstrakcije. Kompletan eksperimentalni dizajn sastojao se od 30 eksperimentalnih tačaka i promenljive čiji je uticaj na ekstrakciju ispitivan bile su u opsegu: procenat metanola (60 – 100%), temperatura (60 – 100 °C), vreme ekstrakcije (1 – 3 min) i odnos uzorka i rastvarača (0,03 – 0,05 g/mL).

Navedeni podaci su iskorišćeni za dobijanje odgovora površine prilagođavanjem podataka polinomnom modelu. Procenjeni su efekti svakog faktora kao i interakcije između faktora. Najbitnija funkcija za centralni kompozitni dizajn je prikazana u jednačini 1:

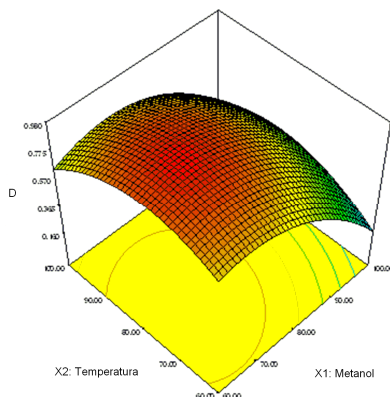
$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^n \beta_i X_i + \sum_{i=1}^n \sum_{j=i+1}^n \beta_{ij} X_i X_j + \sum_{i=1}^n \beta_{ii} X_i^2 \quad (1)$$

gde X_i predstavlja proučavane promenljive (X_1 , procenat metanola; X_2 , temperatura; X_3 , vreme ekstrakcije i X_4 , odnos uzorka i rastvarača), a Y predstavlja odgovor koji je meren (količina flavonoida dobijena ekstrakcijom). Koeficijenti β su dobijeni metodom najmanjih kvadrata.

Odgovor za svaku ekstrakciju u eksperimentalnom dizajnu je izračunat kao ukupna količina flavonoida sa nivoima iznad granica kvantifikacije. Zatim je izračunat regresioni koeficijent za svaku od kombinacija nezavisnih promenljivih dok je značajnost određena preko p – vrednosti koja je izračunata iz t – testa. Značaj efekata nezavisnih promenljivih i njihov uticaj na zavisne promenljive je proveren upotrebom ANOVA analize.

Promenljiva koja daje najveći uticaj na efikasnost ekstrakcije od glavnih promenljivih je procenat metanola (X_1), i ona je visoko značajna ($p < 0,01$). Nasuprot tome, vreme ekstrakcije (X_3) nije imalo značajan efekat ($p > 0,1$). Interakcije između ekstrakcionih promenljivih, procenta metanola i temperature (X_1X_2), temperature i odnosa mase uzorka i rastvarača (X_2X_4), su značajne ($p < 0,05$). Što se tiče kvadratnih efekata ekstrakcionih promenljivih, na flavonoide u ekstraktu značajno ($p < 0,05$) je uticao kvadratni član procenta metanola (X_1^2) i temperature (X_2^2). Ostale interakcije i kvadratni članovi ekstrakcionih promenljivih nisu bile značajne ($p > 0,1$).

Statistički podaci koji ukazuju na dobru optimizaciju su: značajnost modela (p – vrednost), podešen korelacioni faktor (R^2), koeficijent varijacije (C.V. %) i adekvatna preciznost. Faktori koji nisu značajni ($p > 0,05$) su eliminisani iz modela (Jednačina 1), korišćenjem povratne eliminacije kako bi se dobio jednostavan i realan model. Rezultati statističke analize (ANOVA) izračunatog modela su: regresioni model = $+0,015 + 6,518 \times 10^{-3} X_1 + 4,487 \times 10^{-4} X_2 + 5,485 \times 10^{-5} X_4 + 6,376 \times 10^{-4} X_1 X_2 + 3,519 \times 10^{-4} X_2 X_4 + 1,193 \times 10^{-3} X_1^2 + 8,069 \times 10^{-4} X_2^2$; p – vrednost $< 0,0001$; koeficijent varijacije (%CV) 5.64; adekvatna preciznost 22,274 i podešen korelacioni faktor (R^2) 0,9284. Odgovor površina je prikazan na Slici 1.



Slika 1. Odgovor površina za ekstrakciju flavonoida.
 Figure 1. Response surface for flavonoids extraction.

Analiza grafika perturbacija i odgovora površina optimizovanog modela pokazuje da faktori X₁ (procenat metanola) i X₂ (temperatura) imaju značajan efekat na ekstrakciju flavonoida, dok X₃ (vreme ekstrakcije) ne utiče bitno na proces ekstrakcije. Dobijeni optimalni uslovi prikazani su u Tabeli 1.

Tabela 1. Poređenje eksperimentalnih i predviđenih vrednosti odgovora pod optimalnim uslovima.

Table 1. Comparison of experimental and predicted response values under optimal conditions.

Optimalni uslovi <i>Optimal conditions</i>	% MeOH, % MeOH	Temperatura (°C), Temperature (°C)	Vreme (min), Time (min)	Odnos čvrste i tečne faze, (g/mL) <i>Solid to liquid ratio, (g/mL)</i>	Ukupna količina flavonoida, mg RU/g ekstrakta <i>Total flavonoids content, mg RU/g extract</i>
Predviđeno <i>Predicted</i>	69,38	78,00	1,82	0,03	0,1389
Eksperimentalno <i>Experimental</i>	70,00	78,00	1,80	0,03	0,1402 ± 0,004
Prosečna greška <i>Average error</i>	0,88	0,00	1,01	0,00	0,94 ± 0,007
Vrednost poželjnosti (D) = 0,978 <i>Desirability value (D) = 0,978</i>					

Dalje je izvedena mikrotalasna ekstrakcija flavonoida iz uzoraka divlje trešnje pod navedenim (optimalnim) uslovima. Koncentracija flavonoida nakon ekstrakcije pod optimalnim uslovima iznosila je 0,1402 ± 0,004 mg RU/g ekstrakta.

Antioksidativna aktivnost izražena preko IC₅₀ vrednosti izračunata je iz sigmoidalne krive zavisnosti procenta inhibicije DPPH radikala od koncentracije ekstrakta i iznosila je 5,14 ± 0,28 mg mL⁻¹.

Zaključak

U ovom radu izvršena je optimizacija mikrotalasne ekstrakcije za izolovanje flavonoida iz uzoraka divlje trešnje (*Prunus avium* L.). Parametri za ekstrakciju su istovremeno optimizovani korišćenjem statističkih alata: centralnog kompozitnog dizajna i Deringove funkcije, koji omogućavaju sagledavanje celokupnog procesa ekstrakcije. Predložena metoda za izlovanje flavonoida je brza, jednostavna, ne sadrži velike količine štetnih hemikalija i odvija se na relativno niskoj temperaturi. Ovako optimizovana metoda ekstrakcije može se primeniti u laboratorijama za kontrolu kvaliteta hrane za rutinske analize.

Napomena

Istraživanja u ovom radu deo su projekta broj OI 172016 koji finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja, Republika Srbija.

Literatura

- Barbero, G. F., Palma, M., Barroso, C. G. (2006). Determination of capsaicinoids in peppers by microwave-assisted extraction–high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Analytica Chimica Acta*, 578, 227–233.
- Basanta, M. F., Plá, M. F. E., Raffo, M. D., Stortz, C. A., Rojas, A. M. (2014). Cherry fibers isolated from harvest residues as valuable dietary fiber and functional food ingredients. *Journal of Food Engineering*, 126, 149-155.
- Beattie, J., Crozier, A., Duthie, G. G. (2005). Potential health benefits of berries. *Current Nutrition and Food Science*, 1, 71-86.
- Brighente, I. M. C., Dias, M., Verdi, L. G., Pizzolatti, M. G., 2007. Antioxidant activity and total phenolic content of some Brazilian species. *Pharm. Biol.*, 45, 156–161.
- Mariette, S., Tavaud, M., Arunyawat, U., Capdeville, G., Millan, M., Salin, F. (2010). Population structure and genetic bottleneck in sweet cherry estimated with SSRs and the gametophytic self-incompatibility locus. *BMC Genetics*, 11, 77-80.
- Serra, A. T., Duarte, R. O., Bronze, M. R., Duarte, C. M. M. (2011a). Identification of bioactive response in traditional cherries from Portugal. *Food Chemistry*, 125, 318-325.
- Kumarasamy, Y., Byres, M., Cox, P. J., Jaspars, M., Nahar, L., Sarker, S.D., 2007. Screening seeds of some Scottish plants for free-radical scavenging activity. *Phytother. Res.* 21, 615–621.
- Pizarro, C., Pérez-del-Notario, N., González-Saiz, J. M. (2007). Optimization of a microwave-assisted extraction method for the simultaneous determination of haloanisoles and halophenols in cork stoppers. *Journal of Chromatography A*, 1149, 138–144.
- Zhong, M., Huang, K., Zeng, J., Li, S., She, J., Li, G., et al. (2010). Optimization of microwave-assisted extraction of protopine and allocryptopine from stems of *Macleaya cordata* (Willd) R. Br. using response surface methodology. *Journal of Separation Science*, 33, 2160–2167.

OPTIMIZATION OF MICROWAVE-ASSISTED EXTRACTION OF WILD CHERRY FRUIT (*PRUNUS AVIUM* L.) PHENOLIC COMPOUNDS

Nevena Mihailović¹, Tijana Maksimović¹, Andrija Ćirić¹, Ljubinka Joksović¹

Abstract

The aim of this study was to optimize the conditions of microwave extraction for determining the content of the total flavonoids of wild cherry fruits (*Prunus avium* L.). The conditions that are optimized are the percent of methanol, solvent to liquid ratio, the time and temperature of the extraction. Based on the experimental design and software package Design Expert 7.0.0, the optimal conditions for this type of extraction were determined: methanol percentage 70%, solid to liquid ratio 0.03 g / mL, extraction time 1.80 min and temperature 78 ° C. Using the DPPH method, the antioxidant activity of the extract obtained under optimal conditions was determined ($IC_{50} = 5.14 \text{ mg mL}^{-1}$).

Key words: *Prunus avium* L., microwave extraction, optimization, phenolics, antioxidant activity.

¹University of Kragujevac, Faculty of Science, Department of chemistry, Radoja Domanovića 12, Kragujevac, Serbia (i.nevena@kg.ac.rs)