

ИНКАПСУЛИРОВАНИЕ АНТОЦИАНОВ ПЛОДОВ БУЗИНЫ ЧЕРНОЙ МЕТОДОМ РАСПЫЛИТЕЛЬНОЙ СУШКИ

**М.О. Костенко, магистрант, В.И. Дейнека[@], профессор,
Л.А. Дейнека, доцент**

*Белгородский государственный национальный исследовательский университет,
Белгород, 308015 Россия*

[@]Автор для переписки, e-mail: deineka@bsu.edu.ru

В работе методом распылительной сушки получены сухие формы антоцианов плодов бузины черной с концентрацией до 2 % мас., инкапсулированные в мальтодекстриновую матрицу, в виде сыпучих порошков красного цвета. Предложен вариант экстракции антоцианов из плодов и способ очистки экстрактов методом твердофазной экстракции. В работе обсуждается проблема характеристики исходного материала и полученного продукта по видовому составу антоцианов методами обращенно-фазовой и гидрофильной ВЭЖХ.

Ключевые слова: *бузина черная, плоды, антоцианы, распылительная сушка, экстракция, твердофазная экстракция, обращенно-фазовая, гидрофильная ВЭЖХ.*

ENCAPSULATION OF THE ELDERBERRY FRUIT ANTHOCYANINS BY SPRAY DRYING

M.O. Kostenko, V.I. Deineka[@], L.A. Deineka

Belgorod National Research University, Belgorod, 308015 Russia

[@]Corresponding author e-mail: deineka@bsu.edu.ru

Spray-dried forms of anthocyanins were prepared in a maltodextrin matrix. The anthocyanins were extracted by maceration of elderberry fruits in 0.1 M HCl followed by extract filtration through a paper filter. The extract was partially purified by solid phase extraction in a column filled with styrene-divinylbenzene copolymer beads (Sepabeads SP859/L) or in syringe cartridges with C18 silica (BioChemMack ST, Moscow, RF) followed by re-extraction with aqueous HCl and alcohol mixtures. The procedure of reversed-phase HPLC determination of the extracted anthocyanin type is discussed in comparison to HILIC method in DIOL silica columns. The latter method was shown to be preferable to avoid systematic errors in the anthocyanin type determination. Solid-phase extraction in syringe cartridges gave samples with very high anthocyanins concentration (up to 70 g of cyanidin-3-glucoside chloride equivalent). When using the copolymer sorbent, the concentration was somewhat lower: up to 27 g/l. After spray drying red powder samples with anthocyanins content more than 2% were prepared, although freeze drying gave only dark resin. The red color of the samples indicates the space separation of flavylium ions in the solid state by radicals of the maltodextrin background.

Keywords: *elderberry, fruits, anthocyanins, spray drying, extraction, solid phase extraction, reversed-phase HPLC, HILIC.*

Введение

Бузина черная, *Sambucus nigra L.*, не отличается особой популярностью в Российской Федерации, хотя цветки растения признаны в официальной медицине и применяются для приготовления потогонного средства при простудных заболеваниях в виде настоя [1]. При этом во многих странах мира иссиня-черные плоды бузины черной используют как богатые источ-

ники антоцианов – в качестве пищевых красителей [2] и как источник лекарственных средств [3]. Черная окраска плодов связана с очень высоким уровнем накопления в них антоцианов, – по этому свойству бузина черная может быть причислена к самым богатым доступным в России источникам антоцианов. По данным работы [4], в плодах бузины черной различных сортов и стадий созревания может содержаться от 600 до 1250 мг антоцианов на 100 г свежих плодов.

Боснийские ученые [5] установили, что содержание антоцианов в местной флоре составляет 670 мг на 100 г свежих плодов, а в ряде датских сортов бузины черной для различных стадий созревания обнаружен широкий диапазон изменчивости этого показателя от 190 до 2020 мг на 100 г свежих плодов [6].

Основа антоцианового комплекса плодов оказывается постоянной и представлена четырьмя гликозидами цианидина: 3-самбубиозидом (Cy3Sam), 3-глюкозидом (Cy3Glu), 3-самбубиозид-5-глюкозидом (Cy3Sam5Glu) и 3,5-диглюкозидом (Cy3,5diGlu) [4–6], при этом могут встречаться также в небольших количествах цианидин-3-рутинозид [4] и даже производные пеларгонидина [7]. В исследовании, выполненном в нашей лаборатории несколько лет назад [8], было установлено, что перспективными источниками антоцианов является не только бузина черная, но и бузина канадская, *S. canadensis* L. – один из интродуцентов Ботанического сада НИУ БелГУ. Причем в этом растении синтезируется иное основное производное цианидина – цианидин-3-(6-*nara*-кумарил-2-ксилозилглюкозид), а ацилированные антоцианы являются более устойчивыми к различным факторам [9] соединениями, что важно для практического использования антоцианов в качестве красителей в медицинской и пищевой промышленности. Но, к сожалению, неблагоприятные погодные условия последних нескольких лет в Белгороде этот вид бузины не выдержал, поэтому в нашем расположении оказались лишь плоды бузины черной.

Для получения красителей на основе антоцианов бузины черной в мировой литературе используют сок или экстракт выжимок после отделения сока [6, 10], и переработку сока в сухие формы лиофилизацией [11] или распылительной сушкой [12].

Однако, по нашим наблюдениям, использование сока растений как красителя в приготовлении напитков иногда приводит к выпадению нежелательных осадков. Поэтому задача данного исследования – получение очищенных концентратов на основе экстрактов плодов бузины черной.

Экспериментальная часть

В качестве источника антоцианов использовали ягоды бузины *Sambucus nigra* L., выращенные в Ботаническом саду НИУ БелГУ. Антоцианы из растительного материала экстрагировали 0.1 М раствором соляной кислоты, не размалывая ягоды, – настаиванием в течение 24 ч. Полученный экстракт отделяли от твердого остатка фильтрованием через бумажный фильтр. Экстракцию повторяли еще несколько раз, контролируя концентрацию антоцианов в полученных растворах.

Очистку объединенного экстракта от сопутствующих веществ осуществляли методом твердофазной экстракции на сополимере стирола и дивинилбен-

зола (Sepabeads SP859/L) и на октадецилсиликагеле (Патроны ДИАПАК С18). Для получения сухих форм антоцианы десорбировали смесью этанола с водными растворами соляной кислоты.

Для получения сухих форм концентрат антоцианов смешивали с водным раствором мальтодекстрина (DE 18-20) в заданном соотношении для получения сухих форм двумя методами:

1) *методом распылительной сушки*: растворы распылялись в токе воздуха при температуре 120°C с использованием распылительной сушилки «EYELA SD-1000»;

2) *методом лиофильной сушки*: растворы замораживали в морозильной камере (-20°C) и лиофильно высушивали с использованием лиофильной сушилки «LABCONCO FreeZone 2.5» (температура конденсатора -40°C).

Обобщенную концентрацию антоцианов (в пересчете на цианидин-3-глюкозид хлорид) в исследуемых образцах определяли методом дифференциальной спектрофотометрии [13] на спектрофотометре «Shimadzu UV-2550».

Для контроля видового состава антоцианового комплекса исходного сырья и полученных сухих форм использовали метод ВЭЖХ в двух вариантах с использованием хроматографа «Agilent 1260» с диодно-матричным (1260 DAD VL) и масс-спектрометрическим (Quadrupole LC/MS 66130) детектированием. В случае обращенно-фазовой хроматографии антоцианы разделяли в изократическом режиме на хроматографической колонке 4.6×250 мм Symmetry®C18, 5 мкм, в элюенте состава CH₃CN–HCOOH–H₂O (10:10:80 об. %) (1 мл/мин) при температуре термостата колонки 40°C. Для построения карт разделения изменяли содержание ацетонитрила в подвижных фазах в диапазоне 6–10 об. %. Изократический режим был использован и в условиях гидрофильной хроматографии с хроматографической колонкой 4.6×250 мм Kromasil 60-5DIOL в элюенте состава CH₃CN–H₃PO₄–H₂O (80:0.5:19.5 об. %) (1 мл/мин) при температуре термостата колонки 40°C. Во всех случаях хроматограммы записаны при 515 нм.

Результаты и их обсуждение

Аналитические исследования

По результатам определения индивидуальных антоцианов методом обращенно-фазовой ВЭЖХ с масс-спектрометрическим и УФ-детектированием (табл.1), антоциановый комплекс плодов содержал четыре компонента: Cy3Sam5Glu, Cy3,5diGlu Cy3Sam и Cy3Glu, – пики № 1, № 2, № 3 и № 4 на хроматограмме на рис. 1. Надо отметить хорошее разделение пиков двух основных антоцианов, Cy3Sam и Cy3Glu, в выбранных условиях, в то время как по данным ряда публикаций эти вещества могут и не разделяться [4,

14, 15]. Причем этот факт был установлен именно с использованием масс-спектрометрического детектирования [4, 14], а не спектрофотометрического [15].

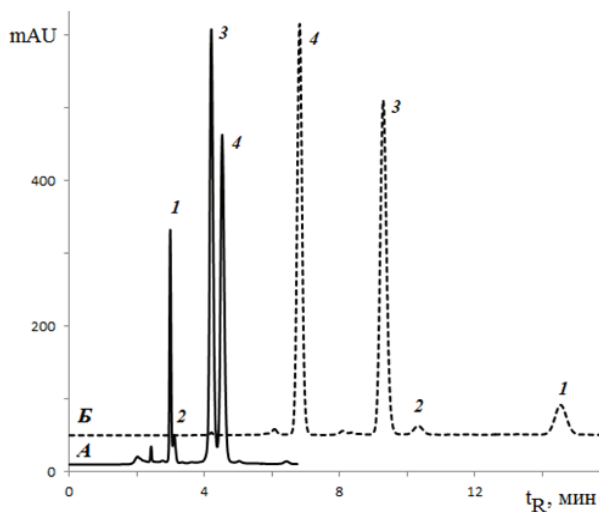


Рис. 1. Разделение антоцианов плодов бузины черной. Условия А: колонка: 4.6×250 мм Symmetry®C18, 5 мкм, в элюенте CH₃CN–HCOOH–H₂O (10:10:80 об. %). Условия Б: колонка: 4.6×250 мм Kromasil 60-5Diol, в элюенте CH₃CN–H₃PO₄–H₂O (80:0.5:19.5 об. %). Скорость подачи подвижной фазы 1 мл/мин; температура термостата колонки 40°C; детекция при 515 нм. Вещества: 1 – Cy3Sam5Glu; 2 – Cy3,5diGlu; 3 – Cy3Sam; 4 – Cy3Glu.

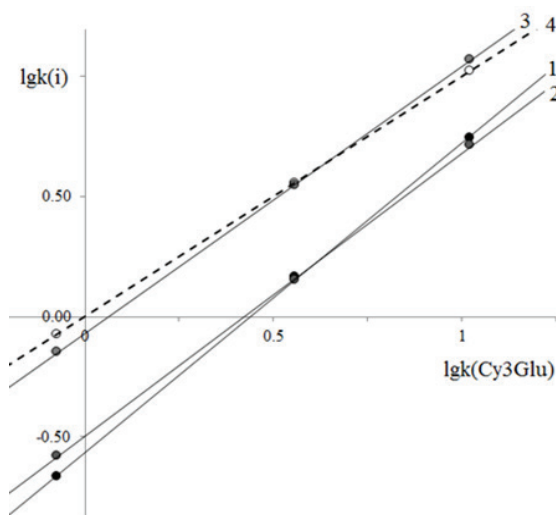


Рис. 2. Карта разделения антоцианов плодов бузины черной.

Колонка: 4.6×250 мм Symmetry®C18, 5 мкм, состав элюента CH₃CN–HCOOH–H₂O (CH₃CN – 4, 6 и 10 об. %; HCOOH – 10 об. %), 1 мл/мин, 40°C; детекция при 515 нм. Вещества: 1 – Cy3Sam5Glu; 2 – Cy3,5diGlu; 3 – Cy3Sam; 4 – Cy3Glu.

Для исключения возможных ошибок идентификации видового состава антоцианов была построена карта разделения антоцианов по методу относительного анализа удерживания [16]. Для построения этой карты использовали 3 различных состава подвижной фазы: 4, 6 и 10 об. % CH₃CN при постоянном содержании муравьиной кислоты – 10 об. % (рис. 2). В итоге было установлено, что в подвижной фазе, содержащей 6 об. % ацетонитрила, на хроматограмме обнаруживается только два пика (вместо четырех), так как не разделяются пары соединений Cy3Glu и Cy3Sam, с одной стороны, и Cy3,5diGlu и Cy3Sam5Glu, с другой. На карте удерживания в этом интервале происходит инверсия удерживания веществ из этих пар. Таким образом, при записи хроматограмм антоцианового комплекса плодов бузины черной в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ возможно соэлюирование некоторых компонентов, что может привести к ошибкам в определении даже числа компонентов.

Для исключения подобных ошибок мы предложили использовать гидрофильную хроматографию (рис. 1 Б). Удерживание веществ в этом случае имеет принципиально иной характер – наиболее сильно удерживаются антоцианы с большим числом полярных функциональных групп (остатков углеводов) в их структуре. То есть порядок элюирования должен быть и реально оказывается таким:

Cy3Glu (моноголикозид) < Cy3Sam ≤ Cy3,5diGlu (дигликозиды) < Cy3Sam5Glu (тригликозид).

Для этого варианта хроматографии нет инверсий на карте разделения, поэтому этот метод является хорошим дополнением к варианту обращенно-фазовой хроматографии для обеспечения надежности в определении видового состава сложных комплексов антоцианов.

Экстракция антоцианов из свежих плодов

Для уменьшения степени экстракции различных сопутствующих веществ антоцианы из растительного материала экстрагировали настаиванием неразмолотых плодов в 0.1 М соляной кислоте. На следующий день экстракт сливали с плодов и заливали остаток новой порцией экстрагента, повторяя мацерацию. В итоге было установлено, что для извлечения основной части антоцианов (более 95%) достаточно двукратной мацерации, а уровень содержания антоцианов в плодах, снятых с различных кустов, серьезно различался: от высокого – более 500 мг на 100 г свежих плодов до очень высокого – порядка 1.5 г на 100 г (табл. 2).

По приведенной методике получали экстракты, содержащие от 0.05 до 0.25 г антоцианов в 1 л.

Частичная очистка методом твердофазной экстракции

Очистку экстракта от сопутствующих веществ проводили методом твердофазной экстракции, пропуская полученный экстракт через слой сорбента

Таблица 1. Характеристики антоцианов экстрактов плодов *Sambucus nigra L.* по данным обращенно-фазовой ВЭЖХ с масс-спектрометрическим и УФ-детектированием

	Cy3Sam5Glu	Cy3,5diGlu	Cy3Sam	Cy3Glu
Характеристики антоцианов				
t_R , мин (ОФ ВЭЖХ*)	4.91	6.12	10.76	6.08
λ_{max} , нм	515	514	517	516
M/z	743.2 (287.0)	611.2 (287.0)	581.2 (287.0)	449.1 (287.0)
Состав антоцианового комплекса, мольн. % (по площадям пиков, n = 2)				
Исходный концентрат	12.9±0.2	1.4±0.4	53.0±0.1	32.8±0.2
Сухая форма**	11.3±0.3	2.4±0.3	41.9±0.2	41.4±0.2

* Условия ВЭЖХ: колонка 4.6×250 мм Symmetry®C18, 5 мкм; подвижная фаза CH₃CN–НСООН–Н₂O (10:10:80 об. %) (1 мл/мин); температура термостата колонки 40°C.

** См. опыт № 1 из табл. 3.

Таблица 2. Извлечение антоцианов из неразмолотых плодов бузины черной при мацерации

№	Образцы растений из ботанического сада	Масса навески, г	Объем экстракта (мл) и выход (г/100 г) антоцианов				
			1-я экстракция		2-я экстракция		Сумма $c_1 + c_2$
			V_1	c_1	V_2	c_2	
1	1 куст старые побеги	2.06	100	0.361	50	0.153	0.514
2	2 куст старые побеги	2.06	100	0.456	50	0.183	0.639
3	3 куст молодые побеги	2.10	100	0.650	50	0.089	0.739
4	3 куст молодые побеги	2.08	102	0.646	50	0.119	0.765
5	4 куст	2.03	100	1.121	50	0.344	1.465
6	5 куст	2.04	100	1.353	50	0.176	1.529

Таблица 3. Результаты анализа образцов, полученных распылительным высушиванием

№	Состав смеси для распылительной сушки			Температурный режим, °C		Содержание антоцианов в сухих формах, с, г/100 г		-Δс, %
	Масса, г		Объем смеси, мл	на входе	на выходе	задано	получено	
	матрицы	антоцианов						
1	10	0.211	200	120	80	2.11	2.04	3.6
2	10	0.148		120	80	1.49	1.43	4.1
3	10	0.106		120	75	1.07	1.06	0.8
4	10	0.053		120	80	0.54	0.53	0.6
5	15	0.053		120	80	0.72	0.66	7.2
6	10	0.211		135	95	2.11	1.82	14.2
7	10	0.106		135	95	1.07	1.01	5.3

«Sepabeads SP859/L» (диаметр слоя 24 мм, высота 15 см), которым была заполнена стеклянная колонка «Аxioma® ПСК-24-270» (БиоХимМак СТ, Москва). Для десорбции антоцианов использовали смесь, состоящую из 99 частей 95%-го этанола и 1 части 35%-го водного раствора HCl. Полученный раствор смешивали с 0.1 М HCl и этанол отгоняли на вакуумном ротационном испарителе. Содержание антоцианов в очищенном экстракте в пересчете на цианидин-3-глюкозид хлорид составило 2-5 г/л. Именно этот раствор использовали для приготовления растворов для последующего высушивания.

Методом ВЭЖХ было установлено, что полу-

ченный очищенный экстракт практически не содержал УФ-поглощающих балластных веществ. Именно такой экстракт использовали для получения сухих форм методами распылительной и лиофильной сушки. Доля индивидуальных антоцианов в полученном концентрате приведена в табл. 1.

Отметим, что если для сорбции использовать химически модифицированные (C18, Merck) силикагели, то при реэкстракции антоцианов с такого сорбента смесью этанола и 0.1 М водного раствора соляной кислоты в соотношении 1:1 удается собирать фракции, содержащие до 70 г антоцианов в 1 л реэкстракта. В случае «Sepabeads SP859/L» макси-

мальная концентрация антоцианов в наиболее концентрированных порциях элюата была в несколько раз меньше – до 27 г/л, но полимерный сорбент более устойчив к сильнокислой среде экстракта.

Распылительная сушка

Составы смесей и некоторые технологические параметры сушки готовых форм представлены в табл. 3. Метод позволил получить мелкодисперсные сыпучие порошки, размер частиц которых, оцененный методом оптической микроскопии, составил от 2 до 15 мкм. Полученные порошки легко и быстро растворялись в воде, образуя растворы с интенсивной темно-красной окраской. Содержание антоцианов в них определяли спектрофотометрическим методом после растворения образцов в 0.1 М HCl.

Как следует из представленных данных, потери антоцианов при сушке могут быть относительно небольшими – менее 5%. Но увеличение температуры распыления от 120 до 135°C приводит к заметному росту потерь. При этом удается получить образцы с очень высоким содержанием антоцианов – более 2%. Получаемый в таких условиях продукт имеет приятную яркую красную окраску. Отметим, что растворы антоцианов плодов черной бузины даже с концентрацией, в несколько раз меньшей, имеют почти черную окраску, что может быть обусловлено стэкингом катионов флавилиевого иона в крупные супрамолекулярные структуры в концентрированных растворах. В таком случае полученная для сухих форм красная

окраска может свидетельствовать о пространственном разделении флавилиевых ионов остатками глюкозы олигомерной матрицы.

Для контроля влияния высокой температуры распыления на антоциановый состав, образец порошка растворяли в 0.1 М соляной кислоте. Антоцианы из раствора концентрировали (избавляясь от полимерной матрицы) на патроне, заполненном сорбентом C18, а затем десорбировали раствором, содержащим 30 об. % CH₃CN, 30 об. % HCOOH и 40 об. % воды. Экстракт разбавили водой в 3 раза перед введением в хроматограф. Анализ полученных хроматограмм показал, что в экстракте имеются изменения, состоящие в основном в частичном гидролизе сложных гликозидов, что привело к некоторому росту содержания цианидин-3-глюкозида в готовом продукте.

Наконец, попытка получения аналогичных образцов методом лиофилизации оказалась неудачной – вместо порошка красного цвета образовался смолоподобный продукт черного цвета.

Заключение

Таким образом, по предложенной методике возможно получение антоцианов плодов бузины черной, инкапсулированной в мальтодекстриновую матрицу, с содержанием антоцианов 2% в виде красного сыпучего порошка с частицами размером 2–15 мкм и минимальными изменениями в антоциановом составе.

Список литературы:

1. Машковский М.Д. Лекарственные средства. М.: Новая волна, 2005. 424 с.
2. Szalóki-DorkóL., Stéger-Mátél M., Anrankó L. // *Int. J. Food Sci. Technol.* 2015. V. 50. P. 1317–1323.
3. Krawitz C., Abu Mraheil M., Stein M., Imirzalioglu C., Domann E., Pleschka S., Hain T. // *BMC Complementary and Alternative Medicine.* 2011. V. 11. P. 16–21.
4. Veberic R., Jakopic J., Stampar F., Schmitzer V. // *Food Chem.* 2009. V. 114. P. 511–515.
5. Rimpapa Z., Toromanovic J., Tahirovic I., Šapčanin A., Sofic E. // *Bosnian J. Basic Medical Sci.* 2007. V. 7. P. 119–122.
6. Kaack K., Fretté X.C., Christensen L.P., Landbo A.-K., Meyer A.S. // *Eur. Food Res. Technol.* 2008. V. 226. P. 843–855.
7. Anton A.M., Pinteá A.M., Rugină D.O., Sconț a Z.M., Hanganu D., Vlase L., Benedec D. // *Digest J. Nanomater. Biostruct.* 2013. V. 8. P. 973–980.
8. Deineka V.I., Sorokopudov V.N., Deineka L.A., Shaposhnik E.I., Kol'tsov S.V. // *Chem. Nat. Prod.* 2005. V. 42. P. 162–164.
9. Bałowska-Barczak A. // *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 2005. V. 14(55). P. 107–116.

References:

1. Mashkovskij M. D. *Lekarstvennye sredstva.* Moscow: Novaya volna. 2005. 424 p. (in Russian)
2. Szalóki-DorkóL., Stéger-Mátél M., Anrankó L. // *Internat. J. Food Sci. Technol.* 2015. V. 50. P. 1317–1323.
3. Krawitz C., Abu Mraheil M., Stein M., Imirzalioglu C., Domann E., Pleschka S., Hain T. // *BMC Complementary and Alternative Medicine.* 2011. V. 11. P. 16–21.
4. Veberic R., Jakopic J., Stampar F., Schmitzer V. // *Food Chem.* 2009. V. 114. P. 511–515.
5. Rimpapa Z., Toromanovic J., Tahirovic I., Šapčanin A., Sofic E. // *Bosnian J. Basic Medical Sci.* 2007. V. 7. P. 119–122.
6. Kaack K., Fretté X.C., Christensen L.P., Landbo A.-K., Meyer A.S. // *Eur. Food Res. Technol.* 2008. V. 226. P. 843–855.
7. Anton A.M., Pinteá A.M., Rugină D.O., Sconț a Z.M., Hanganu D., Vlase L., Benedec D. // *Digest J. Nanomater. Biostruct.* 2013. V. 8. P. 973–980.
8. Deineka V.I., Sorokopudov V.N., Deineka L.A., Shaposhnik E.I., Kol'tsov S.V. // *Chem. Nat. Prod.* 2005. V. 42. P. 162–164.
9. Bałowska-Barczak A. // *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 2005. V. 14/55. P. 107–116.

10. Bronnum-Hansen K., Jacobsen F., Flink J.M. // *J. Food Technol.* 1985. V. 20. P. 703–711.

11. Bronnum-Hansen K., Flink J.M. // *J. Food Technol.* 1985. V. 20. P. 713–723.

12. Murugesan R., Orsat V. // *Drying Technol.* 2011. V. 29. P. 1729–1740.

13. Mónica Giusti M., Wrolstad R.E. Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy / In: *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. John Wiley & Sons, Inc. 2001. F1.2.1–F1.2.13.

14. Jakobek L., Šegura M., Medvidović-Kosanović M., Novak I. // *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*. 2007. V. 103. P. 58–64.

15. Татвидзе М., Каландия А. // *Химия растит. сырья*. 2013. № 4. С. 265–267.

16. Deineka V.I. // *Russian Journal of Physical Chemistry*. 2006. V. 80. P. 429–434.

10. Bronnum-Hansen K., Jacobsen F., Flink J.M. // *J. Food Technol.* 1985. V. 20. P. 703–711.

11. Bronnum-Hansen K., Flink J.M. // *J. Food Technol.* 1985. V. 20. P. 713–723.

12. Murugesan R., Orsat V. // *Drying Technol.* 2011. V. 29. P. 1729–1740.

13. Mónica Giusti M., Wrolstad R.E. Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. In *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. John Wiley & Sons, Inc. 2001. F1.2.1–F1.2.13.

14. Jakobek L., Šegura M., Medvidović-Kosanović M., Novak I. // *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*. 2007. V. 103. P. 58–64.

15. Tatvidze M., Kalandiya A. // *Himiya rastitelnogo syrya*. 2013. № 4. P. 265–267 (in Russian).

16. Deineka V.I. // *Russian Journal of Physical Chemistry*. 2006. V. 80. P. 429–434