

УДК 577.164.2:582.635.5:57.086.13

І.І. Щенявський*, Ю.С. Ахатова

Залежність вмісту аскорбінової кислоти в екстрактах листя кропиви дводомної від умов кріоекстракції

UDC 577.164.2:582.635.5:57.086.13

I.I. Shcheniavskiy*, Yu.S. Akhatova

Dependence of Ascorbic Acid Content in Nettle Leaf Extracts on Cryoextraction Conditions

Ключові слова: аскорбінова кислота, кропива дводомна, кріоекстракт, середовище екстрагування, біологічно активні речовини.

Key words: ascorbic acid, nettle, cryoextract, extraction medium, biologically active substances.

Розробка методів отримання біологічно активних речовин (БАР) природного походження з рослинної сировини є одним з перспективних напрямків сучасної біології, біотехнології та фармакології [2, 3, 6]. На жаль, під час виготовлення таких препаратів у процесі децелюляризації початкової сировини, її екстракції та стерилізації залежно від обраних методів може суттєво різнитися кінцевий склад продукту, що призводить до різної концентрації діючих речовин. Так, під час екстрагування в умовах кімнатної або високої температур порушується структура багатьох БАР і, як наслідок, відбувається значне зниження або повна втрата їх біологічної активності. Уникнути впливу нагрівання, руйнівного для багатьох молекул, можна за допомогою методів виділення БАР з використанням кріотехнології [4, 5]. Низькі температури при передробці біологічної сировини сприяють повнішому руйнуванню клітинних структур і виходу БАР в екстрагуючий розчин [4]. На сьогодні у науковій літературі дуже мало експериментальних даних щодо впливу різних низькотемпературних режимів на якісний та кількісний склад кінцевих продуктів. Фундаментальні дослідження в цьому напрямку майже відсутні.

Мета дослідження — порівняння впливу різних режимів низькотемпературної деструкції й екстракції на вивільнення водорозчин-

The development of techniques to procure the biologically active substances (BAS) of natural origin from plant-based raw material is among the promising trends in current biology, biotechnology, and pharmacology [1, 2, 6]. Unfortunately, during the manufacture of these drugs, the final product composition may significantly vary depending on the methods used for decellularization, extraction and sterilization of starting raw material, which may lead to different concentrations of active substances. For example, during extraction at room or high temperatures, the structure of many BAS is disrupted and, as a result, a significant reduction or complete loss of their biological activity may occur. A destructive effect of heating on many molecules may be avoided by means of the methods for BAS isolation using cryotechnology [3, 4]. During pretreatment of biological raw materials, low temperatures promote a more complete destruction of cell structures and BAS yield in the extraction solution [3]. To date, experimental data on the effect of various low temperature regimens on qualitative and quantitative composition of final products are poorly reported in scientific literature. Fundamental studies in this area are almost absent.

The research aim was to compare the impact of different modes of low temperature destruction and extraction on the yield of water-soluble

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків, Україна

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

***Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:**

вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61016;
тел.: (+38 057) 373-74-35, факс: (+38 057) 373-59-52
електронна пошта: ivanhou11@gmail.com

***To whom correspondence should be addressed:**

23, Pereyaslavka str., Kharkiv, Ukraine 61016;
tel.: +380 57 373 7435, fax: +380 57 373 5952
e-mail: ivanhou11@gmail.com

Надійшла 30.01.2024

Прийнята до друку 22.02.2024

Received January, 30, 2024

Accepted February, 22, 2024

© Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, 2024

© Publisher Publishing House 'Akademperiodyka' of the National Academy of Sciences of Ukraine, 2024

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

них вітамінів на прикладі аскорбінової кислоти з листя кропиви дводомної *Urtica dioica L.*, а також визначення залежності ефективності екстракції від солявого складу та рН екстрагуючого середовища.

Кріоекстракти зі свіжого листя отримували з використанням 150 мМ водних розчинів NaCl та KCl з рН 5,0 та 7,4. У циліндричний поліпропіленовий контейнер діаметром 50 мм вносили подрібнене листя (50 г) і додавали екстрагуючий розчин до об'єму 500 мл. Було використано два способи кріодеструкції/екстракції — швидке заморожування – швидке розморожування і повільне заморожування – повільне розморожування. Швидке заморожування – швидке розморожування зразків проводилось шляхом занурення у рідкий азот (середня швидкість охолодження 30°C/хв, кінцева температура –196°C) і подальшого перенесення в термостат «U 15C» (MLW, Німеччина) з температурою води 37°C. Повільне заморожування — повільне розморожування здійснювали шляхом розміщення листя кропиви на 24 години в парах азоту (середня швидкість охолодження 1°C/хв) і подальшого розморожування за кімнатної температури (19–21°C). Для порівняння проводили екстракцію традиційним способом: висушене листя (≈15 г), отримане з 50 г свіжого, поклали в емальований посуд, заливали дистильованою водою кімнатної температури до об'єму 500 мл, закривали кришкою та нагрівали на киплячій водяній бані 15 хв, після чого охолоджували за кімнатної температури протягом 45 хв. Після завершення екстракції (у випадку кріоекстракції — після повного відтавання зразка) завись проціджували через чотири шари марлі. Сировину, що залишилася, віджимали до процідженого екстракту. Потім екстракти пропускали через паперовий фільтр із середньою швидкістю фільтрації. Об'єм настою доводили екстрагуючими розчинами до початкового об'єму 500 мл.

Для визначення вмісту аскорбінової кислоти в екстрактах використовували титриметричний метод [1]. Для цього відбирали 5 мл екстракту, поміщали в колбу для титрування місткістю 100 мл, додавали 5 мл 2%-го розчину соляної кислоти, 50 мл дистильованої води та титрували з мікробюретки свіжоприготованим 1 мМ розчином 2,6-дихлорфеноліндофеноляту натру до появи стійкого протягом 60 с забарвлення. Вихід аскорбінової кислоти з вихідної сировини (%) обчислювали за формулою:

vitamins by using ascorbic acid from nettle (*Urtica dioica L.*) leaves as an example, as well as to determine the dependence of extraction efficiency on salt composition and pH of extraction medium.

Cryoextracts from fresh leaves were procured by using 150 mM of NaCl and KCl aqueous solutions with pH 5.0 and 7.4, respectively. The crushed leaves (50 g) were placed into a cylindrical polypropylene container with 50 mm diameter and supplemented with extracting solution up to a volume of 500 ml. Two ways of cryodestruction/extraction were used: rapid freezing – rapid thawing and slow freezing-slow thawing. The procedure of rapid freezing-rapid thawing was performed via sample's immersion into liquid nitrogen (30°C/min mean cooling rate, 196°C final temperature) and further transfer into U 15C thermostat (MLW, Germany) with 37°C water temperature. The slow freezing-slow thawing procedure was carried out by placing nettle leaves in nitrogen vapor for 24 hrs (1°C/min mean cooling rate) and further thawing at room temperature (19-21°C). To compare, the extraction was performed using the standard technique: dried leaves (≈15 g), obtained from 50 g of fresh leaves were placed in an enamel bowl, poured with distilled water of room temperature up to a volume of 500 ml, covered with a lid and heated in a boiling water bath for 15 min, then cooled at room temperature for 45 min. When the extraction was done (after complete thawing of sample in case of cryoextraction), the supernatant was filtered through four layers of gauze. The remaining raw material was squeezed to a filtered extract. The extracts were then passed through a paper filter with mean filtration rate. The infusion volume was made up to initial volume of 500 mL using the extraction solutions.

The titrimetric method was used to determine the content of ascorbic acid in the extracts [5]. For this purpose, 5 ml of extract were taken, placed into a 100 ml titration flask, then supplemented with 5 ml of a 2% hydrochloric acid solution, 50 ml of distilled water, and titrated from a microburette with a freshly prepared 1 mM solution of 2,6-dichlorophenolindophenolate sodium until a color stable for 60 seconds appeared. The yield of ascorbic acid from the starting raw material (in ppm) was calculated by the formula:

$$X, \% = \frac{(V_0 - V_k) \times 0.088 \times 120 \times 1000}{50000},$$

where 0.088 is the amount of ascorbic acid (mg) for titration of which 1 ml of 1 mM sodium 2,6-dichlo-

$$X, \% = \frac{(V_0 - V_k) \times 0,088 \times 120 \times 1000}{50000},$$

де 0,088 — кількість аскорбінової кислоти (мг), для титрування якої необхідно 1 мл 1 мМ розчину 2,6-дихлорфеноліндофеноляту натру; 120 — коефіцієнт розведення; V_0 — об'єм 1 мМ розчину 2,6-дихлорфеноліндофеноляту натру, який використано для титрування дослідної проби, мл; V_k — об'єм 1 мМ розчину 2,6-дихлорфеноліндофеноляту натру, який використано для титрування контрольної проби, мл; 50000 — початкова маса сировини (до заморожування та висушування), мг.

Статистичну обробку отриманих результатів проводили з використанням пакета програми «Excel» (Microsoft, США). Значущість відмінностей розраховували за t-критерієм Стьюдента з урахуванням перевірки показників на нормальність розподілу ($n = 30$). Відмінності вважали значущими при $p \leq 0,05$. Дані наведені у вигляді середньої арифметичної величини \pm стандартне відхилення.

Результати аналізу впливу рН екстрагуючого середовища на вихід у кріоекстракти аскорбінової кислоти (таблиця) свідчать, що даний показник був вищим під час застосування розчинів з рН 5,0, незалежно від соляного складу та температурного режиму екстракції.

Вплив на досліджуваний показник соляного складу середовища екстрагування (таблиця) показав, що розчини 150 мМ KCl були значуще ефективнішими порівняно з 150 мМ NaCl, незалежно від рН та використаного температурного режиму.

Щодо залежності вмісту в кріоекстрактах аскорбінової кислоти від температурного режиму екстракції, то різниця між повільним заморожуванням – повільним розморожуванням та швидким заморожуванням – швидким розморожуванням була значущою лише при використанні 150 мМ KCl з рН 5,0 як екстрагуючого середовища. За цих умов дані показники були найвищими і не поступалися показникам екстрактів, отримуваних з традиційним методом екстракції — нагрівання (таблиця).

Таким чином, ефективність екстрагування аскорбінової кислоти з листя кропиви дводомної залежить від температурного режиму екстракції, соляного складу та рН екстрагуючого середовища. З усіх досліджуваних способів кріоекстракції лише використання повільного заморожування – повільного розморожування та 150 мМ KCl з рН 5,0 як екстрагуючого сере-

роphenolindophenolate solution is required; 120 is the dilution factor; V_0 is the volume of 1 mM sodium 2,6-dichlorophenolindophenolate solution used to titrate the test sample, ml; V_k is the volume of 1 mM sodium 2,6-dichlorophenolindophenolate solution used for titration of the control sample, ml; 50000 is the initial weight of the raw material (before freezing and drying), mg.

The results were statistically processed using the Excel software package (Microsoft, USA). The significance of the differences was calculated by Student's t-test, taking into account the check of the parameters for normal distribution ($n = 30$). Differences were considered significant at $p \leq 0.05$. Data were presented as arithmetic mean \pm standard deviation.

Results of the analysis of the extraction medium pH impact on ascorbic acid yield in cryoextracts (Table) show this index to be higher when using solutions with pH 5.0, regardless of the salt composition and temperature regimen of extraction.

The effect of the extraction medium salt composition on the studied index (Table) showed that solutions of 150 mM KCl were significantly more efficient than those of 150 mM NaCl, regardless of pH and temperature regimen used.

As for the dependence of the ascorbic acid content in cryoextracts on the extraction temperature, the difference between slow freezing-slow thawing and rapid freezing – rapid thawing was significant only when 150 mM KCl with pH 5.0 was used as an extraction medium. Under these conditions, the parameters were the highest and not inferior to those of the extracts obtained using the standard method of extraction: heating (Table).

Thus, the efficiency of ascorbic acid extraction from nettle leaves depends on temperature regimen of extraction, salt composition and pH of the extraction medium. Among all the studied cryoextraction methods, only the use of slow freezing-slow thawing and 150 mM KCl with pH 5.0 as an extraction medium enables obtaining the nettle (*Urtica dioica* L) leaf extracts, which are not inferior in ascorbic acid content to that procured by applying high temperature. Since the heating process destroys thermolabile molecular complexes, which significantly reduces their biological value [3, 4], the extraction of water-soluble vitamins using slow freezing-slow tha-



Вихід аскорбінової кислоти з листя кропиви дводомної *Urtica dioica* L. в екстракти, отримані з використанням різних температурних режимів та середовищ екстрагування різного складу та рН (% від маси листя, $n = 30$)
Yield of ascorbic acid from nettle (*Urtica dioica* L.) leaves in the extracts obtained using different temperature regimens and extraction media of different composition and pH (% by weight of leaves, $n = 30$)

Повільне заморожування-повільне розморожування Slow freezing-slow thawing				Швидке заморожування-швидке розморожування Rapid freezing-rapid thawing				Водяна баня, 100°C Water bath, 100°C
150 mM NaCl		150 mM KCl		150 mM NaCl		150 mM KCl		Дистильована вода Distilled water
рН 5,0	рН 7,4	рН 5,0	рН 7,4	рН 5,0	рН 7,4	рН 5,0	рН 7,4	≈рН 5,6
7,47 ± 0,16* [^]	6,74 ± 0,21* [^]	8,22 ± 0,20* [§]	7,42 ± 0,24* [§]	7,14 ± 0,17* [#]	6,53 ± 0,18* [#]	7,84 ± 0,18* [#]	7,19 ± 0,22* [§]	8,55 ± 0,26

Примітки: відмінності значущі відносно показників, отриманих під час екстрагування з використанням водяної бані (100°C) та дистильованої води (≈рН 5,6) в якості екстрагуючого розчину (*); повільного заморожування-повільного розморожування та того ж самого екстрагуючого розчину (#); з використанням того ж самого температурного режиму екстрагування та того ж самого екстрагуючого розчину з рН 7,4 (^); з використанням того ж самого температурного режиму екстрагування та 150 mM NaCl з тим самим рН в якості екстрагуючого розчину (§); $p \leq 0,05$.

Notes: differences are significant with respect to the values obtained during extraction using a water bath (100°C) and distilled water (≈pH 5.6) as the extraction solution (*); slow freezing-slow thawing and the same extraction solution (#); using the same extraction temperature and similar extraction solution with pH 7.4 (^); using the same extraction temperature and 150 mM NaCl with the same pH as the extraction solution (§); $p \leq 0.05$.

довища дозволяє отримати з листя кропиви дводомної *Urtica dioica* L. екстракти, які за вмістом аскорбінової кислоти не поступаються екстракту, отриманому з застосуванням високої температури. Оскільки в процесі нагрівання має місце деструкція термолабільних молекулярних комплексів, що суттєво знижує їхню біологічну цінність [4, 5], екстракція водорозчинних вітамінів з використання повільного заморожування – повільного розморожування та 150 mM KCl з рН 5,0 дає можливість повторного використання тієї ж рослинної сировини для екстрагування жиророзчинних вітамінів та інших БАР.

wing and 150 mM KCl with pH 5.0 makes it possible to reuse the same plant material for the extraction of fat-soluble vitamins and other BAS.

Література

- Смаглюк АА, Кобернік АО. Ідентифікація біологічно активних речовин в екстрактах плодів *Citrullus colocynthis*. Актуальні проблеми транспортної медицини. 2017; (4): 115–9.
- Kaurinovic B, Popovic M, Vlasisavljevic S, et al. Antioxidant capacity of *Ocimum basilicum* L. and *Origanum vulgare* L. extracts. *Molecules*. 2011; 16(9):7401–14.
- Nekkaa A, Benaissa A, Lalaouna AED, et al. Optimization of the extraction process of bioactive compounds from

References

- Kaurinovic B, Popovic M, Vlasisavljevic S, et al. Antioxidant capacity of *Ocimum basilicum* L. and *Origanum vulgare* L. extracts. *Molecules*. 2011; 16(9):7401–14.
- Nekkaa A, Benaissa A, Lalaouna AED, et al. Optimization of the extraction process of bioactive compounds from *Rhamnus alaternus* leaves using Box-Behnken experimental design. *J Appl Res Med Aromat Plants*. [Internet]. 2021 Nov 25 [cited 2023 Nov 20]; 25: 100345. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214786121000541>
- Osetskii AI, Grischenko VI, Snurnikov AS, et al. Cryosublimation fractionating of biological material. *Problems of Cryobiology*. 2006; 16(2):230–40.
- Osetskii O, Sevastianov S, Yevlash V, et al. Low-temperature extraction of lipid fractions from vegetable raw materials using liquefied freons. *Probl Cryobiol Cryomed*. 2023; 33(1): 38–49.

- Rhamnus alaternus* leaves using Box-Behnken experimental design. J Appl Res Med Aromat Plants. [Internet]. 2021 Nov 25 [cited 2023 Nov 20]; 25: 100345. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214786121000541>
4. Osetskiy AI, Grischenko VI, Snurnikov AS, et al. Cryosublimation fractionating of biological material. Problems of Cryobiology. 2006; 16(2):230–40.
 5. Osetskiy O, Sevastianov S, Yevlash V, et al. Low-temperature extraction of lipid fractions from vegetable raw materials using liquefied freons. Probl Cryobiol Cryomed. 2023; 33(1):38–49.
 6. Wong YS, Sia CM, Khoo HE, et al. Influence of extraction conditions on antioxidant properties of passion fruit (*Passiflora edulis*) peel. Acta Sci Pol Technol Aliment. 2014; 13(3): 257–65.
 5. Smagliuk AA, Kobernik AA. [Identification of biologically active substances in extracts *Citrullus colocynthis*]. Actual Problems of Transport Medicine. 2017; (4): 115–9. Ukrainian.
 6. Wong YS, Sia CM, Khoo HE, et al. Influence of extraction conditions on antioxidant properties of passion fruit (*Passiflora edulis*) peel. Acta Sci Pol Technol Aliment. 2014; 13(3): 257–65.

