

## استخراج آنتوسیانین گیلاس با استفاده از رزین آمبرلیت XAD-7

منصور جهانگیری<sup>۱\*</sup>، خسرو رستمی<sup>۲</sup>، حسین ثابتی فرد<sup>۱</sup> و مبینا علیمحمدی<sup>۱</sup>

<sup>۱</sup>دانشکده مهندسی شیمی، نفت و گاز، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران  
<sup>۲</sup>پژوهشکده بیوتکنولوژی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۹۲/۰۶/۲۳

تاریخ تصحیح: ۹۲/۰۸/۲۵

تاریخ پذیرش: ۹۲/۰۹/۱۰

### چکیده:

رنگدانه‌های طبیعی موجود در میوه‌جات با نام آنتوسیانین<sup>۱</sup> شناخته شده هستند. این رنگدانه‌های طبیعی از بهترین ترکیبات رنگی برای استفاده در صنایع مواد غذایی به شمار می‌آیند. در این مقاله، استخراج رنگدانه گیلاس (آنتوسیانین) با استفاده از رزین آمبرلیت<sup>۲</sup> XAD-7 مورد تحقیق قرار گرفته است. آمبرلیت XAD-7 به دلیل نداشتن گروه‌های باردار و مشبک، تداخل بالا، شرایط بسیار عالی برای فرآیند جداسازی آنتوسیانین را دارا می‌باشد. در این تحقیق ابتدا فرآیند جذب آنتوسیانین روی رزین آمبرلیت بررسی شد و بدنبال آن، فرآیند واجذب با محلول متانول اسیدی صورت گرفت. نتایج آزمایشگاهی نشان داد که حدود ۹۰٪ از ترکیبات آنتوسیانین در این فرآیند استخراج گردید. همچنین از دو مدل لانگمویر و فروندلیچ برای فرآیند جذب آنتوسیانین روی رزین استفاده گردید. نتایج حاصل نشان داد که مدل لانگمویر به خوبی فرآیند جذب آنتوسیانین میوه گیلاس روی رزین آمبرلیت را تصدیق می‌نماید.

واژگان کلیدی: آنتوسیانین گیلاس، فرآیند استخراج، رزین آمبرلیت XAD-7، مدل لانگمویر و فروندلیچ

### ۱-مقدمه:

تحقیقات نشان دادند که مصرف غذاهای سرشار از ترکیبات فنولی، توان بدن را در مواجهه با بیماری‌ها افزایش می‌دهد. ترکیبات فنولی جزء مهمترین ترکیبات میوه‌ها، سبزیجات و آب میوه‌ها می‌باشند و سهم مهمی در رنگ و خواص چشایی دارند. از جمله ترکیبات فنولی درون میوه‌ها آنتوسیانین‌ها می‌باشند که نقش مهمی در رنگ میوه دارند. همچنین قابلیت حل شدن در آب را داشته و در سیستم‌های آبی شرکت می‌کنند و تاثیرات بسیار سودمندی در سلامتی بدن دارند [۱-۳]. بالا بودن ترکیبات فنولی، آنتی اکسیدان‌ها، آنتوسیانین‌ها در میوه‌هایی مانند: انار، توت فرنگی، شاه توت، گیلاس، زغال اخته و غیره از اکسایش LDL<sup>۳</sup> خون (مواد پروتئینی حاوی چربی با چگالی کم) [۴] جلوگیری می‌نماید. از دیگر فواید این ترکیبات بر بدن می‌توان به کاهش کلسترول و خواص ضد دیابتی [۵]، افزایش پادتن پروستات [۶]، نقش حفاظتی از سلولهای کبدی جنین از اثرات مخرب [۷] کمک به بهبود امراض قلبی [۸]، آلزایمر [۹]، سرطان سینه [۱۰] و سلول‌های سرطانی روده [۱۱] نیز اشاره نمود. ترکیبات سیانیدین، پلارگونیدین، سیانیدین-۳-گلوکزید، پیونیدین، دلفینیدین از مهمترین ساختارهای آنتوسیانین در

mjahangiri@semnan.ac.ir

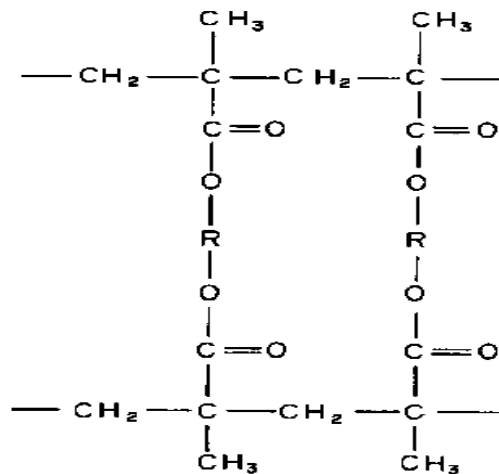
\* نویسنده مسوول: استادیار مهندسی شیمی، دانشگاه سمنان

<sup>۱</sup>Anthocyanin

<sup>۲</sup>Amberlite

<sup>۳</sup>Low-density lipoprotein

گیلاس می باشند [۳]. استخراج این ترکیبات از رنگدانه‌های طبیعی میوه‌جات و استفاده از آنها در صنایع گوناگون غذایی، سبب تولید مواد غذایی با خواص بسیار مفید برای سلامتی بدن خواهد شد. برای این منظور از آمبرلیت XAD-7 استفاده شد. این جاذب، پلیمری است به صورت ذرات متخلخل نامحلول، که مواد محلول قطبی را از سیستم آلی جذب می‌کند، و همچنین قادر به جذب بعضی از مواد محلول قطبی از حلال‌های غیر قطبی می‌باشد [۱۲]. تفاوت عمده این نوع رزین با رزین‌های تعویض یونی، نداشتن گروه‌های یونی می‌باشد. با نداشتن این گونه جایگاه‌های فعال، رزین خاصیت جذب را از مجموع تخلخل‌های مشبک بزرگ، توزیع اندازه تخلخل و سطح تماس زیاد ساختمانی با ماهیت آلیفاتیک به دست می‌آورد. آمبرلیت XAD-7 یک پلیمر آلیفاتیک با پیوندهای عرضی است که دارای ذرات متخلخل با مش ۲۰ تا ۶۰ و عمر فیزیکی بسیار خوبی بوده و برای مصارف متعدد احیاء شده و مورد استفاده قرار می‌گیرد [۱۸-۱۳]. ساختار رزین آمبرلیت XAD-7 در شکل ۱ نشان داده شده است.



شکل ۱. ساختار رزین آمبرلیت XAD-7

با توجه به اهمیت دارویی آنتوسیانین‌ها، از گذشته تا به امروز تحقیقات بسیاری در زمینه جداسازی آن‌ها از گیاهان و میوه‌ها از جمله زغال اخته [۱۹]، انگور [۲۰]، پسته [۲۱] و غیره انجام شده است. هدف از تحقیق حاضر بررسی فرآیند استخراج آنتوسیانین از میوه گیلاس با استفاده از رزین آمبرلیت XAD-7 بعنوان یک روشی نو، پربازده و با ناخالصی کمتر از میوه گیلاس، که منبع غنی از آنتوسیانین بوده می‌باشد.

## ۲- مواد و روش‌ها:

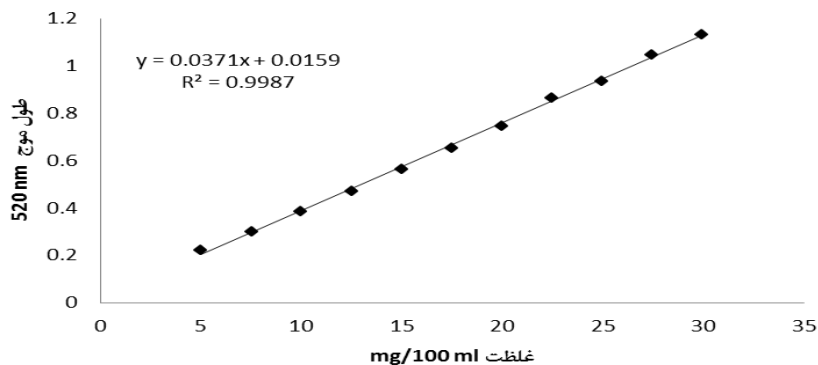
### ۲-۱- آماده سازی عصاره گیلاس برای فرآیند جذب:

عصاره گیلاس با غلظت مناسب آماده و سپس آن را فیلتراسیون و سانتریفیوژ نموده و محلول بدون کدورت حاصل گردید. برای جلوگیری از جذب برخی ترکیبات ناخواسته درون محلول گیلاس، آن را با اتیل استات مخلوط کرده و پس از تشکیل دو فاز مختلف، فاز قرمز رنگ زیری را جدا و از آن استفاده گردید.

## ۲-۲- آماده سازی ستون جاذب و آمبرلیت برای خالص سازی:

آمبرلیت XAD-7 را به اندازه کافی درون ستون آماده شده وارد نموده و روی آن متانول خالص ریخته شد و ۲۴ ساعت به آن زمان داده شد. ستون به گونه‌ای روی پایه نصب شد تا نمونه گیری به راحتی انجام شود. بورتی روی ستون دیگر نصب شد. دهانه خروجی بورت روی دهانه ورودی ستون جاذب طوری تنظیم شد که محتوی داخل بورت در شرایط عملکرد وارد ستون جاذب شود. مایع درون جاذب متانول بوده است که در آغاز آزمایش باید با حجمی ۳ یا ۴ برابر آن با آب مقطر شسته شود. توجه شود که در تمامی شرایط روی رزین مایع باید باشد (چه متانول و یا چه مایع مورد خالص سازی هر کدام که در دسترس باشد) و تمام آزمایشها در دمای محیط انجام شده است. شیر بورت را اندکی باز نموده تا محتویات آن قطره قطره وارد ستون شود و شیر ستون جاذب را باز نموده به صورتی که میزان جریان ورودی به ستون برابر جریان خروجی از آن باشد. پس از آنکه نمونه قابل خالص سازی تا حدود نصف ستون را طی کرد، از خروجی ستون جاذب نمونه گیری آغاز گردید و این نمونه گیری تا زمانی که کل رزین کاملاً قرمز شود، ادامه داده شد. سپس شیر بورت و شیر ستون جذب بسته شد. نمونه‌ها در طول موج ۵۲۰nm توسط دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شده و با استفاده از منحنی استاندارد سیانیدین کلراید (شکل ۲) غلظت نمونه‌ها اندازه گیری شد [۱۵،۱۴]. آنتوسیانین شناسایی شده در گیلان از نوع سیانیدین-۳-گلوکزید با وزن مولکولی ۴۴۹/۲g/mol و ضریب تخریب ۲۶۹۰۰L/mol.cm حاصل گردید.

برای واجذب آنتوسیانین از رزین، ابتدا ستون را با حجمی معادل ۴ برابر حجم رزین، با آب مقطر شستشو داده و سپس با متانول اسیدی (تهیه شده با اسید هیدروکلریک غلیظ استاندارد ۳۷٪) که به صورت قطره قطره وارد ستون جاذب می‌شود، شستشو داده شد، آنتوسیانین در محیط متانول اسیدی مقاومت کمی را از خود نشان داده است. شیر ستون جاذب به اندازه‌ای باز شد که سرعت جریان ورودی و خروجی از ستون جاذب باهم برابر گردد. ماده قرمز رنگ قرار گرفته روی جاذب، اندک اندک از بالا به پایین کمرنگ و شسته شد. نمونه‌های به دست آمده بعد از شستشو با متانول اسیدی تقریباً خالص بوده و با استفاده از شکل استاندارد (شکل ۲) غلظت آن‌ها محاسبه گردید.



شکل ۲. منحنی استاندارد سیانیدین کلراید

برای بیان کمی فرایند جذب آنتوسیانین به رزین آمبرلیت XAD-7، از میان انواع مختلف ایزوترم‌های موجود، دو ایزوترم لانگمویر<sup>۱</sup> و فروندلیچ<sup>۲</sup> استفاده شد. از مزایای ایزوترم فروندلیچ این است که ناهمگنی سطح را در نظر می‌گیرد ولی از معایب آن این است که جذب سطحی بر روی جاذب را نامحدود در نظر می‌گیرد. از مزایای ایزوترم لانگمویر این است که جذب محدود بر روی جاذب را پیش بینی میکند ولی عیب این ایزوترم در این است که سطح جاذب را همگن در نظر می‌گیرد. معادله لانگمویر به صورت زیر بیان می‌شود:

$$\frac{C_e}{X} = \frac{1}{K_b X_m} + \frac{C_e}{X_m} \quad (1)$$

در رابطه فوق  $C_e$  غلظت آنتوسیانین باقی مانده (پس از رسیدن به حالت تعادل)،  $X$  میزان ظرفیت جذب بر واحد وزن رزین،  $X_m$  ماکزیمم ظرفیت جذب و  $K_b$  ضریب ثابت لانگمویر هستند [۲۰، ۲۱].

همچنین معادله فروندلیچ را می‌توان به صورت زیر بیان نمود:

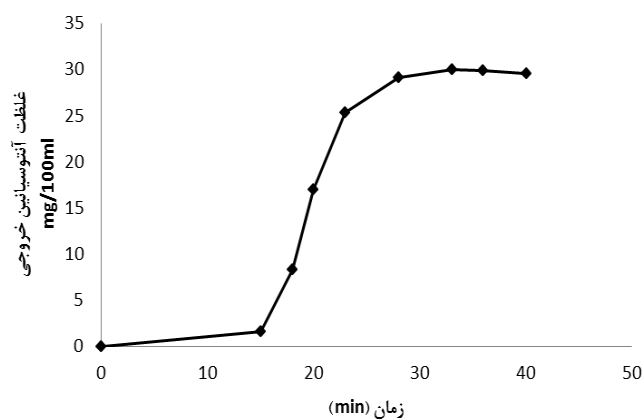
$$X = k C_e^{1/n} \quad (2)$$

$$\log X = \log k + \frac{1}{n} \log C_e \quad (3)$$

که  $k$  ضریب ثابت معادله فروندلیچ و  $\frac{1}{n}$  ضریب مربوط به شدت جذب می‌باشند.

### ۳- نتایج و بحث:

بعد از انجام مراحل جذب آنتوسیانین گیلاس و قرائت میزان غلظت‌های خروجی، شکل ۳ رسم گردید که بیانگر سینتیک جذب آنتوسیانین گیلاس بر روی رزین آمبرلیت می‌باشد.



شکل ۳. سینتیک جذب آنتوسیانین گیلاس بر روی رزین آمبرلیت

<sup>1</sup>Langmuir  
<sup>2</sup>Freundlich

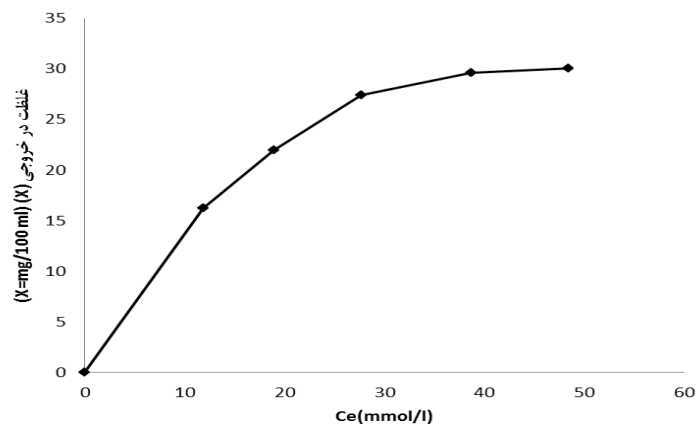
تغییرات غلظت سیانیدین کلراید ورودی و غلظت‌های خروجی در فرآیند جذب به منظور محاسبه ضرایب لانگمویر و فروندلیچ در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱. تغییر غلظت سیانیدین در فرآیند جذب برای محاسبه ضرایب لانگمویر و فروندلیچ

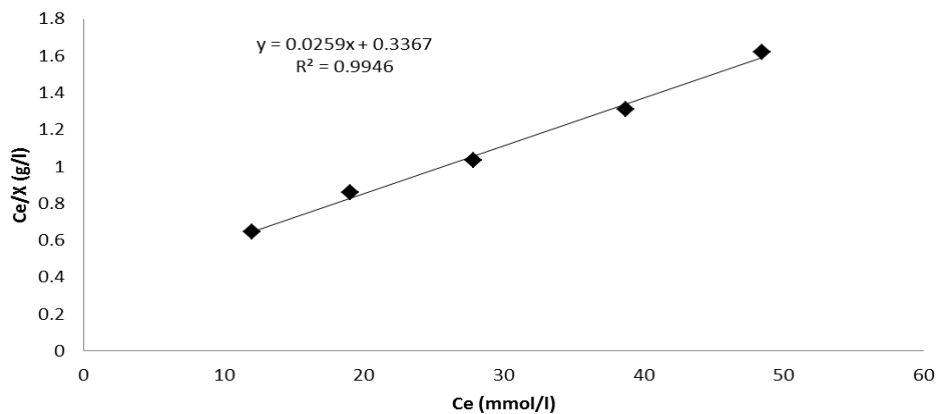
غلظت‌های خروجی (mg/100ml)	غلظت‌های سیانیدین کلراید ورودی (mmol/L)
۰/۰	۰/۰
۱۶/۲	۱۲/۰
۲۱/۹	۱۹/۰
۲۷/۳	۲۷/۸
۲۹/۶	۳۸/۷
۳۰/۰	۴۸/۴

۱-۳- محاسبه ضرایب لانگمویر:

با تغییر غلظت سیانیدین کلراید در فرآیند جذب این ماده، شکل ۴ حاصل گردید. با استفاده از رابطه (۱) و ترسیم شکل ۵ و محاسبه شیب و عرض از مبدا، ضرایب لانگمویر محاسبه گردید.



شکل ۴. جذب سیانیدین کلراید در غلظت‌های متفاوت با رزین آمبرلیت



شکل ۵. محاسبه ضرایب لانگمویر برای جذب سیانیدین کلراید روی رزین آمبرلیت.

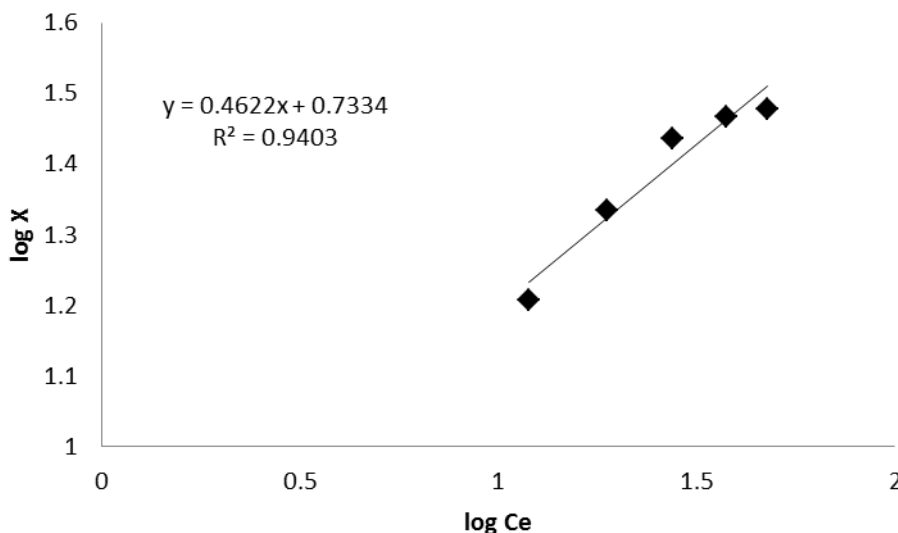
در مرحله بعد از فرآیند جذب طبق مراحل آزمایش گفته شده واجذب آنتوسیانین از روی رزین با استفاده از متانول اسیدی انجام شد. بعد از اندازه گیری غلظت آنتوسیانین خروجی، حدود ۹۰٪ آنتوسیانین کلی جذب شده از روی رزین استخراج گردید.

جدول ۲. مقادیر بدست آمده از رابطه لانگمویر و فروندلیچ در دمای ۲۹۳ K

رابطه لانگمویر	$X_m$ (mg/100ml)	$k_b$	$R^2$
	۴۰	۰/۰۷۴	۰/۹۹۴
رابطه فروندلیچ	n	k	$R^2$
	۲/۱۶	۵/۴۱۲	۰/۹۴

۲-۳- محاسبه ضرایب فروندلیچ:

با استفاده از مقادیر به دست آمده در آزمایش‌های انجام شده و استفاده از رابطه (۲) و محاسبه شیب و عرض از مبدا شکل ۶، ضرایب فروندلیچ طبق رابطه (۳) محاسبه گردید.



شکل ۶ محاسبه ضرایب فروندلیچ برای جذب سیانیدین کلراید روی رزین آمبرلیت مقدار n در معادله فروندلیچ میزان همگن و یا ناهمگن بودن سطح را نشان میدهد که حداکثر مقدار آن بطور تقریبی ۳ میباشد. با توجه به مقدار n بدست آمده در جدول ۲ و مطلب فوق میتوان چنین نتیجه گرفت که سطح جذب دارای ناهمگنی نسبتاً زیادی میباشد.

مقادیر بالای  $R^2$  در این معادلات نشان می‌دهد که داده‌های آزمایش از هر دو معادله فروندلیچ و لانگمویر تبعیت می‌کند، اما مدل لانگمویر برازش بهتری برای فرآیند جذب آنتوسیانین گیلاس روی رزین آمبرلیت XAD-7 را از خود نشان می‌دهد. بنابراین سینتیک جذب آنتوسیانین گیلاس بر روی رزین آمبرلیت XAD-7 را می‌توان بصورت موثر با مدل لانگمویر مورد استفاده قرار داد.

## ۴- نتیجه گیری:

در این تحقیق، استخراج ترکیبات آنتوسیانین از گیلان با استفاده از پلیمر آمبرلیت XAD-7 در دمای محیط به عنوان یک روش جدید و موثر با بازدهی بالا معرفی شد. عمل جذب در یک ستون پر شده از رزین پلیمری و متانول صورت گرفت و پس از جذب، عمل واجذب با استفاده از متانول اسیدی انجام شد که حدود ۹۰٪ ترکیبات آنتوسیانین گیلان در این فرآیند استخراج گردید. فرآیند جذب به وسیله دو مدل لانگمویر و فرندلیچ بررسی شد و با توجه به مقادیر  $R^2$  بدست آمده مشخص گردید که مدل لانگمویر هم‌خوانی بهتری با داده‌های تجربی بدست آمده دارد.

## ۶- مراجع:

- [1] P. Bridle and C. F. Timberlake, *Food Chemistry*, **58** (1997) 103.
- [2] C. F. Timberlake and B. S. Henry, *Progress in Clinical and Biological Research*, **280** (1988) 107.
- [3] M. M. Giusti and R. E. Wrolstad. Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy, *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, John Wiley & Sons, Inc., 2001.
- [4] Y. Chang, K. Huang, A. Huang, Y. Ho and C. Wang, *Food and Chemical Toxicology*, **44** (2006) 1015.
- [5] A. S. S. Renata and G. M. Pastore, **46** (2012) 378.
- [6] M. D. Matchett, S. L. MacKinnon, M. I. Sweeney, K. T. Gottschall-Pass and R. A. Hurta, *J Nutr Biochem*, **17** (2006) 117.
- [7] J. Chen, X. Tao, L. Li, A. Sum, Y. Wang and S. Zhang, (2013).
- [8] K. Skemiene, G. Rakauskaitė, S. T., J. Liobikas, G. C. Brown and V. Borutaite, *The Int. J. of Biochem. & Cell Biology*, **45** (2013) 23.
- [9] P. Shih, Y. Chan, J. Liao, M. Wang and G. Yen., *The J. Nutr Biochem.*, **21** (2010) 598.
- [10] C. Hui, Y. Bin, Y. Xiaoping, Y. Long, C. Chunye, M. Mantian and L. Wenhua, *Nutr Cancer*, **62** (2010) 1128.
- [11] A. Kamenickova, E. Anzenbacherova, P. Pavěk, A. A. Soshilov, M. S. Denison, M. Zapletalova, P. Anzenbacher and Z., *Toxicol Lett*, **221** (2013) 1.
- [12] Amberlite XAD-7, Technical Bulletin, Rohm and Haas Co. Philadelphia, PA, (1981).
- [13] R. Kunin., *Pure Appl. Chem.* **46** (1976) 205.
- [14] A. B. Cerezo, E. Cuevas, P. Winterhalter, M. C. Garcia-Parrilla and A. M. Troncoso, *Food Chemistry*, **123** (2010) 574.
- [15] E. Gómez-Plaza, A. Miñano and J. M. López-Roca, *Food Chemistry*, **97** (2006) 87.
- [16] S. Mustafa, K. H. Shah, A. Naeem, M. Waseem and M. Tahir, *J. Hazardous Mat.* **160** (2008) 1.
- [17] X. Zhang, K. Jiang, Z. Tian, W. Huang and L. Zhao, *J. App. Polym. Sci.*, **110** (2008) 3934.
- [18] K. Grohmann, J. A. Manthey, R. G. Cameron and B. S. Buslig, *J. Agricu. and Food Chem.*, **47** (1999) 4859.
- [19] C. C. Georgiana and G. E. Morlock, *Food Chem.*, **146** (2014) 104.
- [20] S. Mustafa, S. Murtaza, A. Naeem and K. Farina, *J. Coll. and Interf. Sci.*, **283** (2005) 287.
- [21] A. Naeem, P. Westerhoff and S. Mustafa., *Water Res.*, **41** (2007) 1596.





