

**ОТЧЕТ ПО ПРОЕКТ ЗА НАУЧНО И КАРИЕРНО РАЗВИТИЕ**  
**НАЦИОНАЛНА ПРОГРАМА „МЛАДИ УЧЕНИ И ПОСТДОКТОРАНТИ“ II ЕТАП**

**Тема: Оптимизация на процедура за екстракция на отработен розов цвят и охарактеризиране на получените екстракти чрез съвременни хроматографски и спектрални методи**

**Участник:** ас. Камелия Гечовска

/длъжност/степен, име фамилия/

**Научен ръководител:** доц.д-р Даниела Антонова

/длъжност/степен, име фамилия/

София, Февруари, 2021

**Въведение (включва анотация на представения проект, цели, работна програма, предвидени дейности - до 2 стр.)**

*Rosa damascena* Mill. (Дамаска роза) е едно от най-важните растения, принадлежащи към семейство Rosaceae (Розоцветни), с дълга историческа употреба в традиционната медицина и като ценна етерично-маслени култура. Основни продукти с индустриално значение са етеричното масло (rose otto, attar of roses), известно със своя фин аромат, както и розова вода, розов конкрет и абсолю.

България и Турция са двата основни производители на розово масло в световен мащаб. Етеричното масло от *R. damascena* е известно със своето приложение във фината парфюмерия, в разнообразни хранителни добавки, козметични продукти и фито-фармацевтични препарати. Освен като източник на розово масло, цветовете от роза намират приложение в традиционната медицина поради лекия им слабителен и противовъзпалителен ефект, както и като природен антидепресант.

*R. damascena* съдържа и множество компоненти с благоприятен върху човешкото здраве ефект. В различни части на *R. damascena* са намерени широк кръг химични съединения, сред които флавоноиди от кверцетинов и кемпферолов тип, гликозиди, терпенови съединения, антоцианини, катехинови и танинови вещества, пектин, витамини А, С, К, витамини от група В, органични киселини (лимонена, ябълчна и др.), каротеноиди и др., много от които се характеризират с полезни за човешкото здраве свойства.

В литературата са описани разнообразни фармакологични ефекти на цветовете на *R. damascena*, като напр. противовъзпалително и обезболяващо действие, антиконвулсивно действие, меко лаксативно действие, благоприятстващо функциите на черния дроб действие, антидиабетни и антидепресивни свойства и др.

Фармакологичните изследвания показват, че благоприятното физиологично действие на цветовете на *R. damascena* се дължат основно на съдържанието на полифенолни съединения. Фенолните съединения са най-голямата група природни антиоксиданти от растителен произход, които привличат все по-нарастващ интерес поради тяхното антиоксидантно, противотуморно, антидепресантно и други действия. Най-многобройната група природни полифенолни съединения са флавоноидите, с основни представители флавоноли и флавони, характеризиращи се със значителни антиоксидантни свойства и висока биологична активност, доказани както *in vitro*, така и *in vivo*.

Има данни в литературата, че ценни биологично активни съединения като флавоноидите могат да се извличат както от свеж, така и от отработен розов цвят.

Страничните продукти от промишленото преработване на разнообразни растителни суровини представляват сериозен проблем заради необходимостта от тяхното обезвреждане, но те могат да бъдат и обещаващ източник на разнообразни вещества,

които могат да се използват поради благоприятните им технологични или хранителни свойства. Поради нарастващото производство, обезвреждането на растителните отпадъци представлява нарастващ проблем, тъй като растителният материал обикновено е предразположен на бърза ферментация, ограничавайки по този начин по-нататъшната експлоатация. От друга страна, разходите за сушене, съхранение и превоз на страничните продукти са икономически ограничаващи фактори. По тази причина агро-промишлените отпадъци най-често се използват като фураж или тор. Ето защо намирането на ефикасни, евтини и екологосъобразни начини за оползотворяване на тези материали е проблем от съществено икономическо и екологично значение.

Имайки предвид особеностите на технологичния процес при производството на розов конкрет (екстракция с неполярен разтворител на свеж розов цвят) логично може да се предположи, че полученият растителен остатък ще бъде богат на полифенолни съединения и може да се използва за разработване на нови продукти с обещаващ благоприятен ефект върху човешкото здраве.

Ето защо основна цел на настоящия проект е *разработване на процедура за екстракция на отработен розов цвят, страничен продукт от производството на розов конкрет, за получаване на обогатен на биологично-активни компоненти сух екстракт от *Rosa damascena* Mill. и последващо охарактеризиране на получените екстракти чрез съвременни хроматографски и спектрални методи.*

Планираните изследвания в настоящето проектно предложение са в две основни насоки:

1. **Разработване на процедура за екстракция на отработен розов цвят, страничен продукт от производството на розов конкрет за получаване на обогатен на биологично-активни компоненти (по-специално - полифенолни съединения) сух екстракт от *Rosa damascena* Mill. чрез вариране на състава на екстрагентите; съотношението сух растителен материал - екстрагент; температура и времетраене, използване на ултразвук и др.;**
2. **Детайлно охарактеризиране на получения екстракт по отношение на съдържанието на флавоноиди чрез разнообразни съвременни хроматографски и спектрални методи (GC/MS/FID; HPLC/UV-DAD и др.).**

Планирани са и допълнителни изследвания на получения екстракт по отношение на безопасността и потенциалната биологична активност (антиоксидантна, антимикробна и др.).

**Резултати и обсъждане (до 10 стр.)**

**1.Разработване и оптимизиране на процедура за екстракция на отработен розов цвят.**

**1.1. Оптимизиране на условията на екстракция:**

Бяха проведени експерименти за оптимизиране на процедурата за екстракция чрез вариране на следните условия:

- ✓ вариране на съотношението на използваните екстрагенти;
- ✓ вариране на съотношението сух растителен материал - екстрагент;
- ✓ времетраене на екстракцията;
- ✓ температура на екстракцията;
- ✓ приложение на ултразвук.

Като екстрагент бяха използвани смеси на метанол и вода в различно съотношение.

Бяха подготвени две серии проби – със съотношение сух отработен розов цвят - екстрагент 1:8 и 1:25 съответно.

Пробите от първата серия (A1-A6) бяха разтворени в метанол и вода в съотношение 40:60, при съотношение сух материал - екстрагент 1:8. Пробите бяха подложени на нагряване при кипене и различна продължителност на престой след кипенето. Проби A1 и A2 бяха подложени на кипене с продължителност съответно 30 и 60 мин, след което веднага бяха филтрувани и анализирани. Проба A3 беше подложена на кипене с продължителност 90 мин. Проби A3, A4 и A5 бяха филтрувани и анализирани съответно 0мин, 60мин и 2ч след кипене, а проба A6 - след престой от 24 ч.

Други параметри, чийто ефект върху процеса на екстракция беше изследван, бяха съотношението на екстрагентите, температурата на екстракция (кипене, мацерация (накисване с екстрагент) при стайна температура) и влиянието на ултразвук.

Пробите са обозначени като B1-B8.

Обобщение на екстракционните параметри е представено в Таблица 1.

**Таблица 1.** Условия на екстракцията на отработен розов цвят.

Проба	Съотношение отработен розов цвят:екстрагент	Съотношение MeOH:H <sub>2</sub> O	Температурни условия	Продължителност на екстракцията	Продължителност на престой на екстракционната смес преди филтруване
A1	1:8	40:60	Кипене	30 мин	0 мин
A2		40:60	Кипене	60 мин	0 мин
A3		40:60	Кипене	1.30 ч	0 мин
A4		40:60	Кипене	1.30 ч	60 мин
A5		40:60	Кипене	1.30 ч	2 ч

<b>A6</b>		40:60	Кипене	1.30 ч	24 ч
<b>B1</b>		40:60	Кипене	1.30 ч	0 мин
<b>B2</b>		60:40	Кипене	1.30 ч	0 мин
<b>B3</b>		60:40	Накисване, стайна температура	48 ч	0 мин
<b>B4</b>		40:60	Накисване, стайна температура	48 ч	0 мин
<b>B5</b>	1:25	40:60	Накисване, стайна температура	48 ч	0 мин
<b>B6</b>		60:40	Накисване, стайна температура	48 ч	0 мин
<b>B7</b>		60:40	Ултразвук, стайна температура	45 мин	0 мин
<b>B8</b>		40:60	Ултразвук, стайна температура	45 мин	0 мин

### 1.2. Оценка на антиоксидантното действие и съдържанието на общи полифеноли:

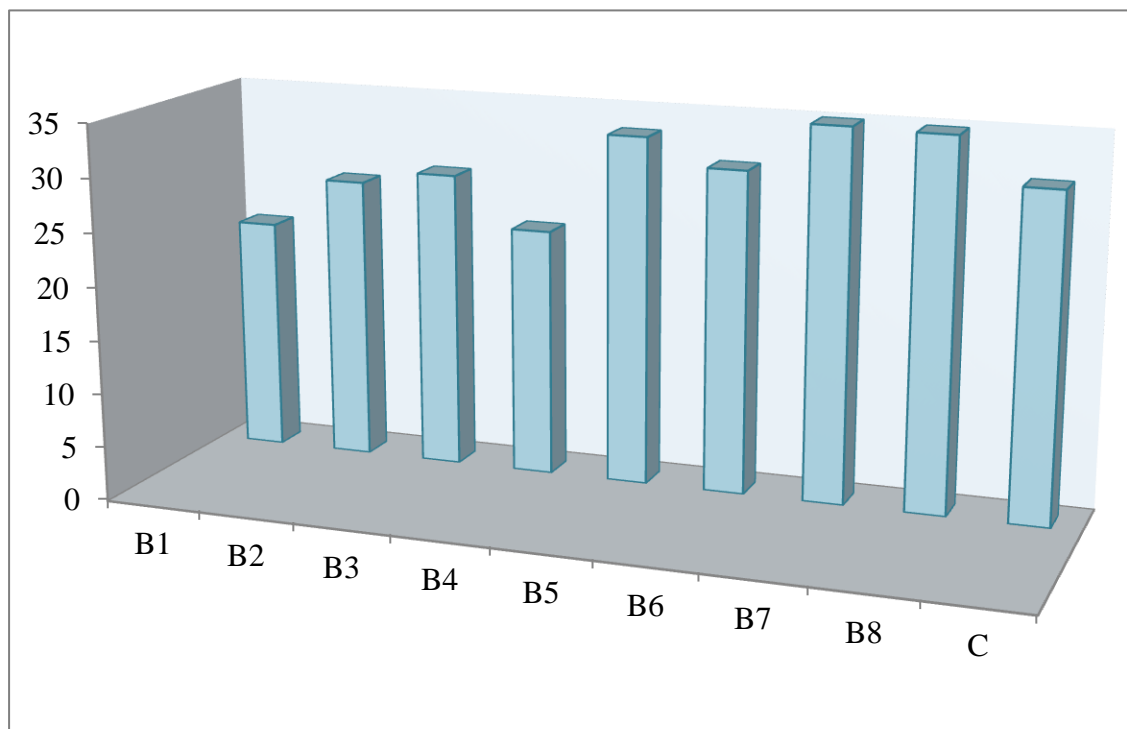
Съдържанието на фенолни съединения, флавоноидни и мономерни антоцианини в получените екстракти бяха определени чрез стандартни спектрофотометрични методи. За сравнение беше използван търговски *Gingko biloba* екстракт, предоставен от фирмата Кенди ЕООД.

Определянето на тоталното съдържание на флавоноиди и полифеноли беше извършено със спектрофотометър JASCO V-570 снабден с термостатиращо устройство HUBER, като за целта бяха построени калибровъчни графики със серия стандартни разтвори. Калибровъчните графики са показани на Фиг.2 и 3.

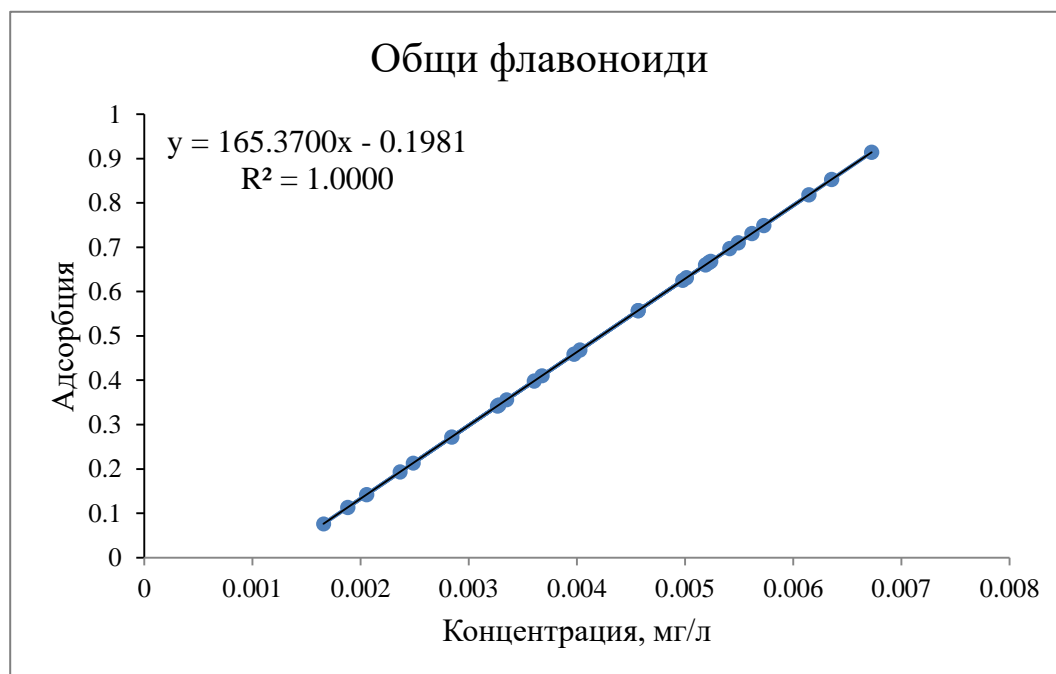
Съдържанието на общи полифеноли в екстракти от *R. damascena*, получени при различни условия на екстракция (проби B1-B8), беше определено по реакцията на Folin-Ciocalteu, в сравнение с търговския екстракт от *G.biloba* (проба C). Резултатите, изразени като еквивалент на галова киселина (GAE), са показани на Фигура 1.

Всички проби показват високо съдържание на общи полифеноли и флавоноиди, съизмеримо и дори надвишаващо в някои случаи (при проби B5, B7 и B8) това на търговския екстракт от *G.biloba*.

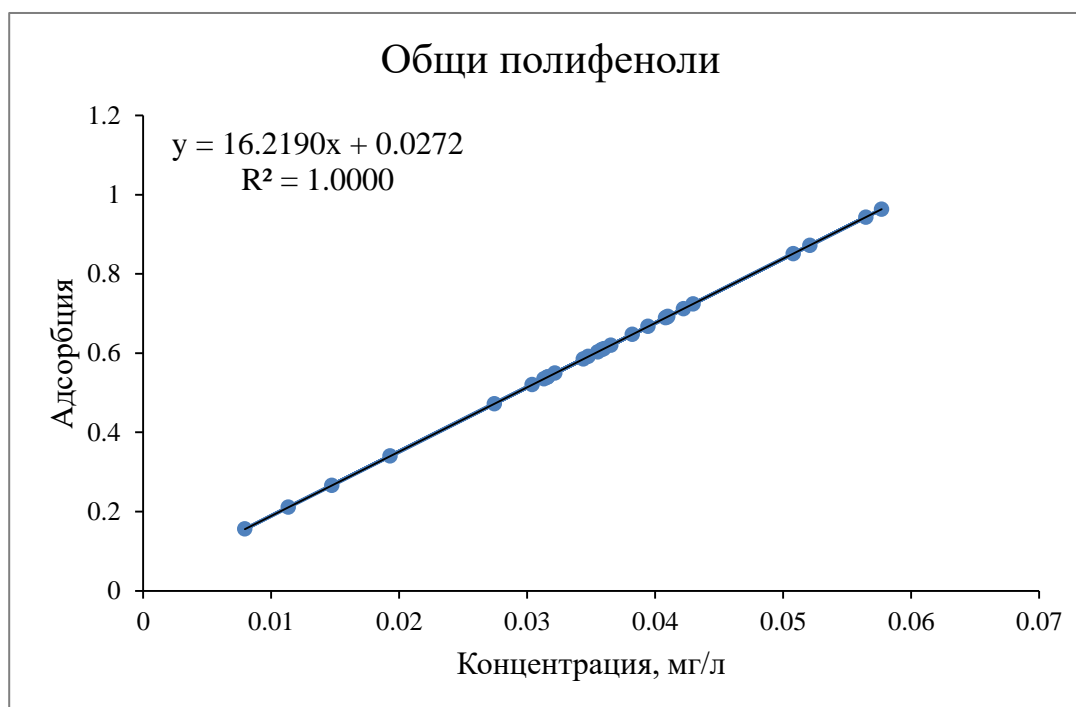
**Фигура 1.** Съдържание на общи полифеноли, определено по реакцията на Folin-Ciocalteu.



**Фигура 2.** Стандартна права за определяне на общото съдържание на флавоноиди чрез спектрофотометрично измерване (дължина на вълната 400 nm).



**Фигура 3.** Стандартна права за определяне на общото съдържание на полифеноли чрез спектрофотометрично измерване (дължина на вълната 760 nm).



## **2. Разработване на процедура за количествено определяне на съдържанието на кверцетин и кемпферол в екстракт от отработен розов цвят чрез използване на HPLC/DAD-UV-Vis.**

### *2.1. Киселинна хидролиза:*

За количествено определяне на съдържанието на индивидуалните флавоноиди в растителни материали, гликозидите обикновено се подлагат на киселинна хидролиза и получените агликонни се идентифицират и определят количествено чрез HPLC.

Беше проведена киселинна хидролиза на получените екстракти от *R.damascena*, с използване на 2N HCl като катализатор (50 мг от всеки екстракт се прибавят 10 мл 2N HCl в 50% воден метанол, нагрява се под рефлукс при 80°C в продължение на 2 ч., след което се центрофугира). Получените разтвори се подлагат на HPLC анализ.

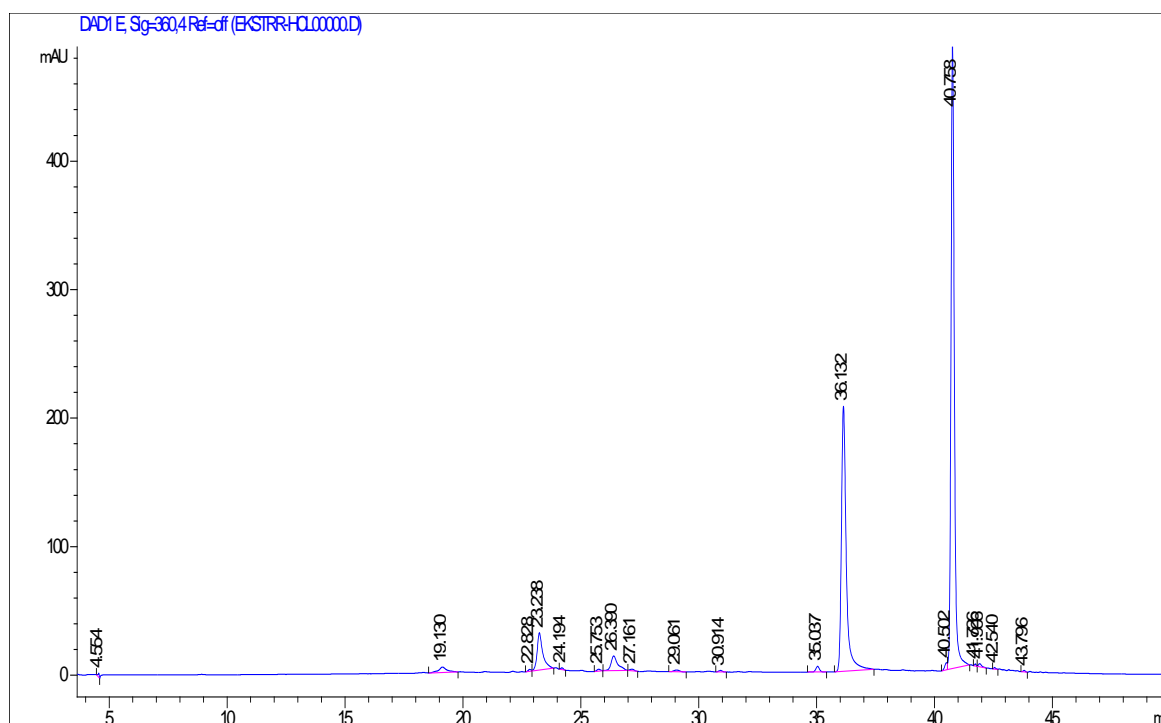
### *2.2.HPLC/DAD-UV-Vis анализ:*

Беше разработена и оптимизирана методика за определяне на общото съдържание на кверцетин и кемпферол, двата основни флавоноида (в агликонна форма), открити в *R. damascena*, чрез HPLC/UV-DAD. Беше използвана следната апаратура: високоефективен

течен хроматограф Agilent 1100 Series, снабден с кавтернерна помпа и UV-Vis детектор с диодна матрица. Анализът беше проведен в режим на обратно-фазова хроматография с градиентно елуиране, беше използвана колона ODS-C18 (4.6 x 250 мм, 5 мкм) и градиент Ацетонитрил/Вода с модификатор мравчена киселина. За количественото определяне на кверцетин и кемпферол бяха построени калибровъчни графики, които са показани на Фиг.4 и 5.

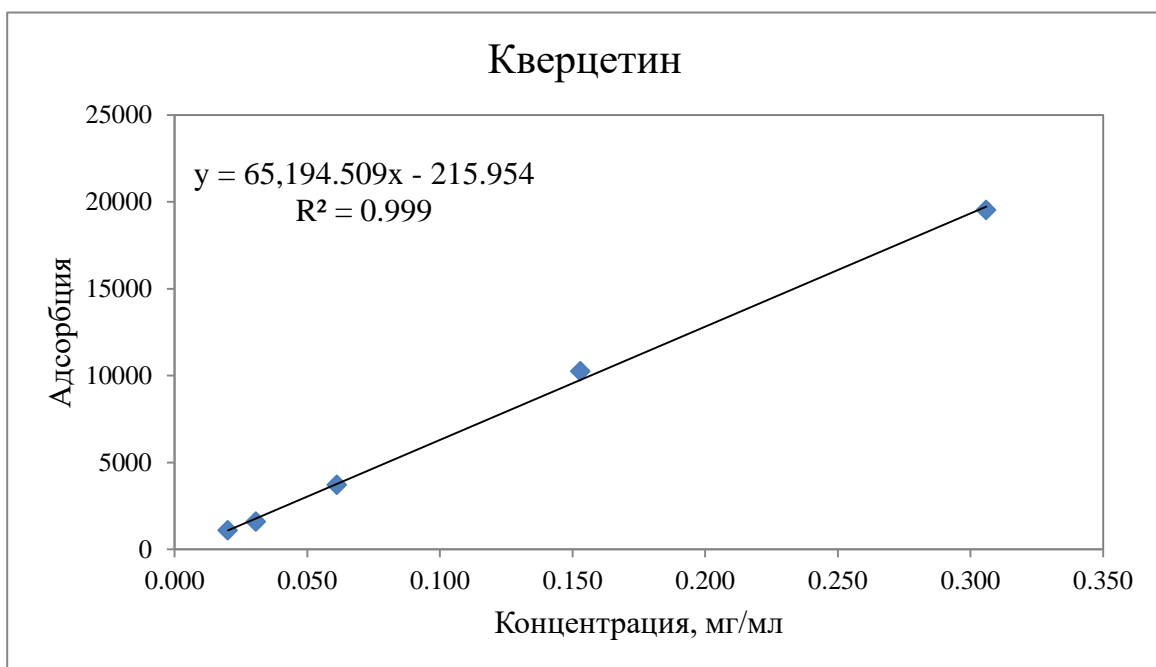
На Фиг. 6 е представена HPLC/UV-Vis хроматограма на сух екстракт от *R.damascena* Mill. (проба В2) при дължина на вълната 360 нм.

**Фигура 6.** Представителна HPLC/ UV-Vis хроматограма на сух екстракт от *R.damascena* Mill. (проба В2) (дължина на вълната 360 нм).

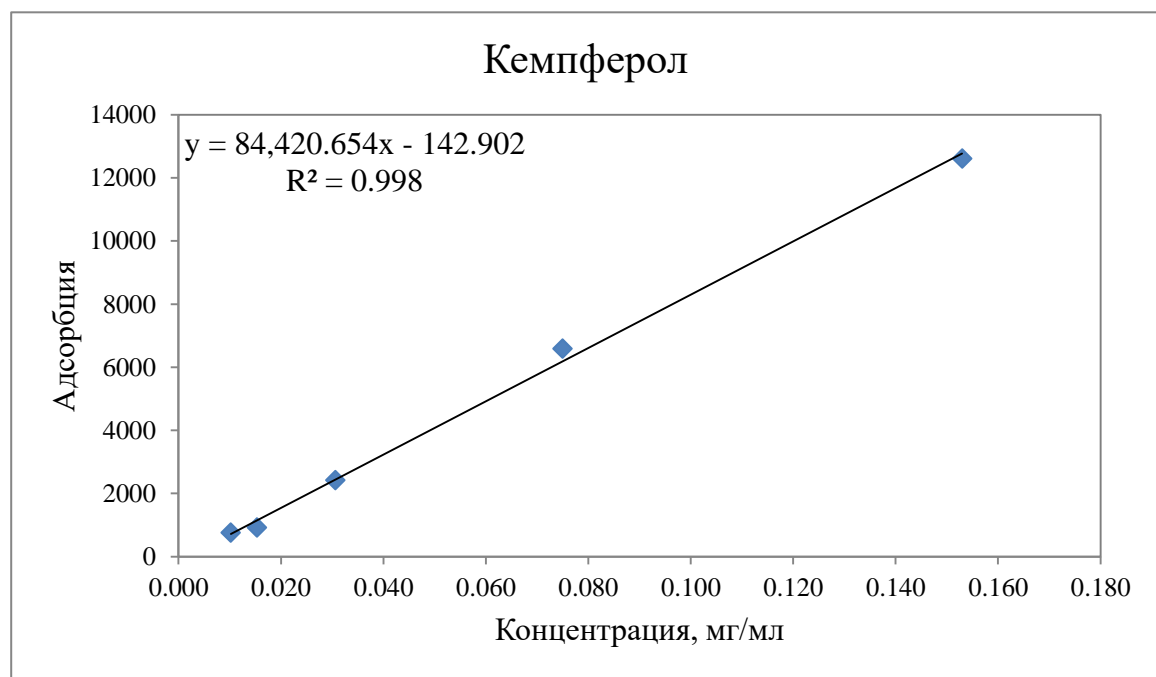




**Фигура 4.** Стандартна права за определяне на общото съдържание на кверцетин чрез HPLC/UV-DAD (дължина на вълната 360 нм).



**Фигура 5.** Стандартна права за определяне на общото съдържание на кемферол чрез HPLC/UV-DAD (дължина на вълната 360 нм).



За сравнение по разработената процедура беше проведен HPLC/DAD-UV-Vis анализ на търговски екстракт на *G. Biloba* (Кенди ЕООД, София). Резултатите са обобщени в Таблица 2.

**Таблица 2.** Съдържание на кверцетин и кемпферол (% в сух екстракт от *R.damascena* Mill. и *G. biloba*), определено чрез HPLC/UV-DAD (дължина на вълната 360 nm).

Проба	Съдържание на флавоноиди (% в сух екстракт)	
	Кверцетин	Кемпферол
<i>G. biloba</i> (Кенди ЕООД)	8.5	3.7
<i>R. damascena</i> (Проба В2)	5.3	6.6

### **Изводи/Обобщение**

- ✓ Беше разработена и оптимизирана процедура за екстракция на отработен розов цвят, страничен продукт при производството на розов конкрет.
- ✓ Беше установено, че повишаване на съдържанието на метанол води до по-високо съдържание на общи полифенолни и флавоноидни съединения в получените екстракти.
- ✓ Беше установено, че използването на ултразвук съществено благоприятства екстракционния процес и води до съкращаване на общата продължителност на екстракцията.
- ✓ Беше направена оценка на получените екстракти по отношение на тяхното общо полифенолно съдържание и общото съдържание на флавоноиди по метода на Folin-Ciocalteu.
- ✓ Беше разработена процедура за количествено определяне на съдържанието на кверцетин и кемпферол чрез използване на HPLC/DAD-UV-Vis и беше проведен количествен анализ на екстрактите от *R. damascena* Mill.
- ✓ Резултатите от проведените изследвания показват, че съдържанието на флавоноиди в получените екстракти е съизмеримо с търговски екстракт от *G. biloba* и следователно те биха могли да се използват като съставки в различни продукти като хранителни добавки, природни козметични и фито-фармацевтични препарати. Фактът, че тези екстракти са резултат от оползотворяването на странични продукти от промишлената преработка на растителни суровини, е от особена важност.

### **Публикации (излезли или подадени за печат публикации, в които изрично е изказана благодарност към Програмата) и участия на научни форуми**

1. POLYPHENOLICS CONTENT AND ANTIOXIDANT EFFECTS OF R. DAMASCENA DRY EXTRACT, CHARACTERIZED BY SPECTROSCOPIC AND CHROMATOGRAPHIC TECHNIQUES, Kamelia Gechovska, Vera Deneva, Daniela Antonova, Stanislav Bozhanov, Liudmil Antonov; Постерен доклад; **3<sup>та</sup> Международна конференция по Био-антиоксиданти “Природните био-антиоксиданти като вдъхновение за хранителната химия и фармация”**, 17-21.09. 2019 г., гр. Несебър.

**Забележка:** Постерен доклад, предвиден за представяне на „**Международна конференция посветена на медицинските, ароматните и едивните растения, както и на оползотворяването на отпадъците от тях**“, 26-27 март 2020 г., гр. Пловдив не беше представен поради отлагане на конференцията поради епидемичната обстановка.

Дата: 02.02.2021

Изготвил: .....

