

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10) **PL 243684 B1**

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **434022**

(22) Data zgłoszenia: **2020.05.21**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2021.11.22 BUP 34/2021**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2023.10.02 WUP 40/2023**

(51) MKP:

B01D 11/02 (2006.01)

B01D 61/58 (2006.01)

B01D 61/14 (2006.01)

(73) Uprawniony z patentu:

**GREENVIT SPÓŁKA Z OGRANICZONĄ
ODPOWIEDZIALNOŚCIĄ, Zambrów, PL**

(72) Twórca(-y) wynalazku:

WOJCIECH CYPLIK, Chocicza, PL

MATEUSZ BANACH, Zambrów, PL

AGNIESZKA BANAS, Lublin, PL

IWONA WAWER, Sulejówek, PL

(74) Pełnomocnik:

Magdalena Jezierska-Zięba, Warszawa, PL

(54) Tytuł:

**Rozpuszczalnik ekstrahujący do otrzymywania suchego ekstraktu z aronii
oraz sposób wytwarzania suchego ekstraktu z owoców lub wyłoków aronii**

PL 243684 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest rozpuszczalnik ekstrahujący do otrzymywania suchego ekstraktu z aronii standaryzowanej zawartości antocyjanów i związków polifenolowych oraz sposób wytwarzania suchego ekstraktu z owoców lub wyłóków aronii.

Aronia czarnoowocowa (*Aronia melanocarpa*) jest nazywana superowocem ze względu na bogactwo związków polifenolowych (bioflawonoidów) korzystnie wpływających na zdrowie, pozwala to zaliczyć jej owoce do potencjalnych surowców leczniczych. Owoce mają szczególnie wysoką zawartość antocyjanów (ciemno czerwonych barwników, obecnych m.in. w czerwonym winie) – średnio ok. 500 mg w 100 g owoców, oraz katechin i ich polimerów – tanin. Zawartość związków polifenolowych jest w granicach 1200–5000 mg, średnio wynosi 2500–3500 mg. Owoce aronii zawierają witaminy grupy B, witaminę E C i karotenoidy a także potas, wapń, magnez, żelazo, cynk, jod. Duża zawartość garbników sprawia, że owoce aronii mają lekko cierpki smak, przez co są mniej chętnie spożywane w stanie surowym. Z owoców można wytwarzać dżemy, konfitury, syropy, ale dodatek cukru nie jest korzystny dla zdrowia. Badania naukowe pokazują ważną rolę owoców jagodowych i ich przetworów w diecie.

Na rynku spożywczym, w kategorii dodatków do żywności i suplementów diety obserwuje się rosnące zainteresowanie suchymi ekstraktami z owoców, bogatych w związki polifenolowe, zwłaszcza antocyjany. Zainteresowanie antocyjanami to skutek publikacji pokazujących, że spożycie czerwonego wina na południu Europy obniża ryzyko zawału serca. Zjawisko to nazwano „francuskim paradoksem” i tłumaczono anty oksydacyjnym działaniem związków polifenolowych (Ghiselli A, Nardini M, Baldi A, Scaccini C. *Antioxidant activity of different phenolic fractions separated from an Italian red wine. J Agric Food Chem* 1998; 46: 361–7), takich jak antocyjany, katechiny czy resweratrol. Odpowiedzią przemysłu farmaceutycznego była produkcja suplementów diety zawierających ekstrakt ze skórki ciemnych winogron, owoców czarnego bzu czy aronii.

Celem stosowania ekstraktów jest uzupełnienie diety w składniki o działaniu antyoksydacyjnym, co jest ważne w profilaktyce miażdżycy i chorób układu krążenia, chorób neurodegeneracyjnych i nowotworowych.

W Polsce, w latach 1995–2010 do badań farmakologicznych i klinicznych wykorzystywany był ekstrakt z aronii („Aronox”), którego produkcję zakończono w 2009 roku. Korzystny wpływ antocyjanów obserwowano m.in. w przypadku zapalenia trzustki (A. Jankowski, B. Jankowska, J. Niedworok, *The influence of aronia melanocarpa in experimental pancreatitis, Polish Mercuriusz Lek.* 2000; 8(48): 395–398), u pacjentów po zawale serca leczonych statynami (M. Naruszewicz, I. Łaniewska, B. Millo, M. Dłużniewski, *Combination therapy of statin with flavonoids rich extract from chokeberry fruits enhanced reduction in cardiovascular risk markers in patients after myocardial infraction (MI). Atherosclerosis* 2007; 194: e179–e184), preparat obniżał również ciśnienie tętnicze (M. Broncel, M. Kozioróg-Kołacińska, G. Andrykowski i inni, *Wpływ antocyjanin z aronii czarnoowocowej na ciśnienie tętnicze oraz stężenie endoteliny-1 i lipidów u pacjentów z zespołem metabolicznym, Pol. Merk. Lek.*, 2007; XXIII, 134: 116–119). Sok i ekstrakt aroniowy zawierają związki obniżające poziom glukozy we krwi, przez co są one polecane diabetikom (Gawryś. M. Zawada K., Wawer I., *Aronia w diecie diabetyków. Diabetologia Kliniczna* 2012; 1(5): 196–200).

W badaniach biologicznych efektów antocyjanin in vivo najczęściej stosuje się ekstrakt z owoców. Pierwszym powodem jest wysoka cena czystych antocyjanidyn i antocyjanin, które są trudne do izolacji. Drugim powodem jest fakt, że do organizmu człowieka nie trafiają pojedyncze związki tylko ich mieszaniny zawarte w owocach.

Antocyjany są naturalnymi barwnikami mającymi zastosowanie w przemyśle farmaceutycznym, kosmetycznym i spożywczym. Owoce aronii zawierają cztery pochodne cyjanidyny: cyjanidyno-3-O-galaktozyd, cyjanidyno-3-O-glukozyd, cyjanidyno-3-O-arabinozyd oraz cyjanidyno-3-O-ksylozyd. Wśród innych związków polifenolowych szczególnie interesujące są: kwas chlorogenowy i kwas neochlorogenowy, będące efektywnymi antyoksydantami, mogą mieć znaczący wkład do profilaktyki (np. chorób układu krążenia), co pokazały badania in vitro. Podawanie kwasu chlorogenowego zwiększa tolerancję glukozy i zmniejsza poziom lipidów we krwi.

Podstawową metodą pozyskiwania ekstraktów bogatych w antocyjany jest ekstrakcja selektywnymi rozpuszczalnikami. Wydajność procesu zależy od wielu czynników. Szczególną uwagę zwraca się na polarność rozpuszczalnika oraz pH ekstrahenta. Antocyjany nie są stabilne w roztworach obojętnych i zasadowych, stąd podczas ekstrakcji stosuje się zakwaszone roztwory wodne, roztwory wodno-alkoholowe zawierające etanol, metanol lub izopropanol, ale można również stosować roztwory zawierające

n-butanol, aceton, glikol propylenowy. Ekstrahent zakwasza się najczęściej za pomocą kwasu solnego lub octowego.

Dotychczas przyznane patenty lub zgłoszenia patentowe opisują metody pozyskiwania antocyjanów na drodze np. ekstrakcji wyłoków aronii za pomocą wodnych roztworów soli kwasu siarkowego (PL 144239 B2); ekstrakcji za pomocą acetonu z wyłoków lub miazgi owoców aronii (PL158707 B1); wodnej ekstrakcji antocyjanów z produktów naturalnych tj. mięsże winogron, jagód i innych przy użyciu dwutlenku siarki (FR2458577 B1) lub ekstrakcji wodą zakwaszoną kwasem solnym i następnie izopropanolem (PL186849 B1).

Ponadto ze stanu techniki znane są wieloskładnikowe rozpuszczalniki ekstrakcyjne. Np. z dokumentu CN104447666A znana jest metoda ekstrakcji antocyjanów z aronii z wykorzystaniem rozpuszczalnika ekstrakcyjnego zawierającego etanol, kwas octowy i wodę w stosunku objętościowym 60:10:30. Sposób obejmuje kolejno homogenizację surowca roślinnego, dodanie do uzyskanej pulpy rozpuszczalnika ekstrakcyjnego w ilości 5 ml/g pulpy roślinnej, mieszanie, ultrasoniczną ekstrakcję w temperaturze 45°C przez 90 min. Po ekstrakcji przeprowadza się filtrację próżniową w celu usunięcia pozostałości filtra; w wyparce obrotowej z surowego ekstraktu usuwa się etanol w celu uzyskania stężonej cieczy antocyjanu. Następnym etapem jest usuwanie zanieczyszczeń za pomocą wody destylowanej; po czym następuje elucja antocyjanin stosując roztwór etanolu; po obróbce eluenta ultrawysokim ciśnieniem, następuje ekstrahowanie zanieczyszczeń za pomocą octanu etylu; po czym zbiera się fazę wodną; zamraża i suszy się roztwór antocyjanu z aronii w próżni w celu otrzymania proszku antocyjanu.

Dokument KR101287021B1 ujawnia roztwór ekstrakcyjny do ekstrakcji produktów roślinnych z roślin wybranych z grupy obejmującej czarne jagody, jagody asai, borówkę czarną, żurawinę, aronię czarną, jagody jałowca oraz truskawki. Rozpuszczalnik zawiera wodę, etanol oraz glikol 1,3-butylenowy.

Natomiast z patentu PL234212 B1 znany jest rozpuszczalnik ekstrahujący stosowany do ekstrakcji produktów roślinnych wybranych z grupy wierzba *Salix* ssp, lub topola *Populus* ssp., borówka *Vaccinium myrtillus* L, czarna malwa *Alcea Rosea* lub żurawina *Oxycoccus* ssp., bażyna – *Empetrum* (*Empetraceae*), lub aronia – *Aronia* (*Rosaceae*). Rozpuszczalnik zawiera alkohol alifatyczny C1-C3 (korzystnie metanol, etanol, propanol-1, propanol-2) w ilości 35–50%, octan etylu w ilości 35–50%, wodę dejonizowaną w ilości 15–25%, kwas bursztynowy lub migdałowy lub jabłkowy, lub fumarowy w ilości 0,35–0,7%, kwas askorbinowy w ilości 0,35–0,7%. Ponadto patent PL234212 B1 ujawnia sposób ekstrakcji materiału roślinnego z zastosowaniem wspomnianego rozpuszczalnika, który prowadzi do otrzymania produktu w postaci suchego ekstraktu i obejmuje kolejno rozdrobnienie surowca roślinnego i zalanie rozpuszczalnikiem ekstrahującym, ekstrakcję korzystnie metodą maceracji lub perkolacji, w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika ekstrahującego, którą prowadzi od 18 do 48 godz. w temperaturze od 50–80°C, filtrację, odparowywanie rozpuszczalnika, suszenie, ewentualnie odfłuszczenie ekstraktu suchego za pomocą eteru naftowego lub benzyny ekstrakcyjnej lub ich mieszaniny.

Znane sposoby ekstrakcji z zastosowaniem powyższych rozpuszczalników posiadają szereg ograniczeń.

Zastosowanie do ekstrakcji soli kwasu siarkowego (IV) lub dwutlenku siarki powoduje zanieczyszczenie produktu substancjami alergennymi – siarczynami. Nawet oczyszczanie produktu za pomocą chromatografii adsorpcyjnej nie umożliwia usunięcia pozostałości siarczynów.

Ekstrakty wytwarzane z zastosowaniem acetonu lub izopropanolu zawierają pozostałości tych rozpuszczalników. Z kolei użycie alkoholu etylowego wpływa na znaczne zwiększenie kosztów produkcji. Ponadto wszystkie wyżej wymienione rozpuszczalniki organiczne powodują wydajną ekstrakcję wysokocząsteczkowych tanin. Przed chromatografią adsorpcyjną niezbędnym etapem jest odparowanie rozpuszczalników organicznych. W czasie odparowywania rozpuszczalnika następuje wytrącanie części tanin, które z kolei adsorbują znaczną część antocyjanów z roztworu. Ten proces obniża zawartość antocyjanów w uzyskanym ekstrakcie oraz powoduje konieczność odfiltrowania wytrąconego osadu przed etapem chromatografii adsorpcyjnej.

Celem wynalazku było zapewnienie nowego rozpuszczalnika oraz sposobu ekstrakcji pozbawionych powyższych ograniczeń.

Istotą wynalazku jest rozpuszczalnik ekstrakcyjny stosowany do ekstrakcji rozdrobnionych owoców lub wyłoków aronii, charakteryzujący się tym, że stanowi wodny roztwór kwasów organicznych zawierający kwas bursztynowy w ilości 0,05–0,1%, korzystnie 0,1%, kwas jabłkowy w ilości 0,05–0,1%, korzystnie 0,1% oraz kwas wersenowy (EDTA) w ilości 0,01–0,04%, korzystnie 0,04%.

Kolejną istotą wynalazku jest sposób wytwarzania suchego ekstraktu z owoców lub wyłoków aronii z zastosowaniem rozpuszczalnika ekstrakcyjnego według wynalazku, charakteryzujący się tym, że obejmuje następujące etapy:

- ekstrakcję z wykorzystaniem rozpuszczalnika ekstrakcyjnego według wynalazku,
- filtrację wstępną i mikrofiltrację,
- ultrafiltrację,
- chromatografię adsorpcyjną permeatu uzyskanego po przeprowadzeniu ultrafiltracji,
- odparowanie rozpuszczalnika w wyparce próżniowej,
- liofilizację.

Korzystnie ekstrakcję prowadzi się w zakresie temperatur 40–70°C, korzystnie 40°C, w czasie 4–8 godzin, korzystnie 4 godziny.

Korzystnie filtrację wstępną prowadzi się na płytach celulozowych o porowatości 2 µm, a mikrofiltrację na membranach o porowatości 0,2–0,45 µm, korzystnie 0,2 µm.

Korzystnie ultrafiltrację prowadzi się na membranach o MWCO 150–300 kDa, korzystnie 300 kDa.

Korzystnie chromatografii adsorpcyjnej poddaje się permeat z procesu ultrafiltracji, podając go na kolumnę wypełnioną żywicą adsorpcyjną typu Amberlite lub Purolite, a następnie przemywa żywicę wodą i prowadzi proces elucji zaadsorbowanego ekstraktu wodnym roztworem etanolu o stężeniu 40–65%, korzystnie 65% objętościowych.

Wynalazek dostarcza następujących korzyści:

- Pozwala na uzyskanie suchego ekstraktu z aronii zawierającego standaryzowaną zawartość antocyjanów i związków polifenolowych oraz charakteryzującego się niską zawartością tanin.
- W procesie produkcyjnym według wynalazku wysokocząsteczkowe taniny ekstrahują się w niewielkim stopniu.
- Niewielka ilość wyekstrahowanych tanin jest dodatkowo usuwana na etapie ultrafiltracji razem z innymi wysokocząsteczkowymi substancjami takimi jak białka i polisacharydy. Równocześnie następuje bardzo nieznaczny spadek zawartości antocyjanów.
- Sposób według wynalazku eliminuje wady ekstraktów uzyskiwanych bez nowoczesnych metod separacji, takich jak mikrofiltracja, ultrafiltracja i rozdział na kolumnie adsorpcyjnej. Ekstrakty te zawierają niezdefiniowaną mieszaninę wysokocząsteczkowych związków i charakteryzują się również znacznie niższą zawartością polifenoli w tym antocyjanów.

Przedmiot wynalazku obrazują poniższe przykłady wykonania, nie ograniczające zakresu ochrony wyznaczonej zastrzeżeniami patentowymi.

Przykład 1

W tym przykładzie wykonania jako surowiec do ekstrakcji użyto 1,6 kg rozdrobnionego owocu aronii. Ekstrakcję prowadzono za pomocą 8 l rozpuszczalnika ekstrakcyjnego według wynalazku, który stanowi wodny roztwór zawierający 0,1% kwasu bursztynowego, 0,1% kwasu jabłkowego oraz 0,04% EDTA. Przy czym wszystkie kwasy są w jakości spożywczej.

Ekstrakcję prowadzono w temperaturze 40°C przez 4 godziny. Otrzymano 7,89 l ekstraktu o zawartości antocyjanów wynoszącej 238 mg/l. Ekstrakt oddzielono od surowca i następnie przefiltrowano za pomocą prasy filtracyjnej wyposażonej w płyty o porowatości 2 µm.

Uzyskany ekstrakt poddano mikrofiltracji prowadzonej na 7-kanalowej membranie z TiO₂ o długości 600 mm, średnicy 10 mm i porowatości 0,2 µm.

Permeat z mikrofiltracji wykorzystano do kolejnego etapu – ultrafiltracji na 7-kanalowej membranie z TiO₂ o długości 600 mm, średnicy 10 mm i MWCO 300 kDa. Przy czym, celem ultrafiltracji było usunięcie związków wielkocząsteczkowych, w tym tanin, białek oraz polisacharydów.

Do dalszych prac wykorzystano permeat z ultrafiltracji.

W wyniku ultrafiltracji otrzymano 7,3 l ekstraktu o zawartości antocyjanów 211 mg/l, który podano w całości na kolumnę szklaną wypełnioną żywicą adsorpcyjną typu Purolite o objętości 314 ml. Kolumnę przemywano wodą w ilości 1 l, a elucję prowadzono z zastosowaniem 65% etanolu. Otrzymano 380 ml frakcji głównej o zawartości antocyjanów 3327 mg/l. Frakcję główną zagęszczono na wyparce próżniowej w temperaturze poniżej 40°C do 25% suchej masy.

Otrzymany ekstrakt liofilizowano, otrzymując 6,95 g ekstraktu w postaci suchej o zawartości antocyjanów wynoszącej 18,1% oraz zawartości związków polifenolowych wynoszącej 39,8%.

Przykład 2

Sposób wytwarzania suchego ekstraktu według przykładu 1, z tym, że rozpuszczalnikiem ekstrakcyjnym był wodny roztwór zawierający 0,05% kwasu bursztynowego, 0,05% kwasu jabłkowego oraz 0,01% EDTA. Natomiast proces ekstrakcji prowadzono w temperaturze 70°C przez 5 godzin.

Przykład 3

Sposób wytwarzania suchego ekstraktu według przykładu 1, z tym, że rozpuszczalnikiem ekstrakcyjnym był wodny roztwór zawierający 0,8% kwasu bursztynowego, 0,8% kwasu jabłkowego oraz 0,03% EDTA. Natomiast proces ekstrakcji prowadzono w temperaturze 40°C przez 8 godzin.

Przykład 4

W tym przykładzie wykonania jako surowiec do ekstrakcji użyto 2,3 kg wyłoków aronii. Ekstrakcję prowadzono za pomocą 11,5 l rozpuszczalnika ekstrakcyjnego według wynalazku, który stanowi wodny roztwór zawierający 0,1% kwasu bursztynowego, 0,1% kwasu jabłkowego oraz 0,04% EDTA. Przy czym wszystkie kwasy są w jakości spożywczej.

Ekstrakcję prowadzono w temperaturze 40°C przez 4 godziny. Otrzymano 11 l ekstraktu o zawartości antocyjanów wynoszącej 258 mg/l. Ekstrakt oddzielono od surowca i następnie przefiltrowano za pomocą prasy filtracyjnej wyposażonej w płyty o porowatości 2 µm.

Uzyskany ekstrakt poddano mikrofiltracji na 7-kanalowej membranie z TiO₂ o długości 600 mm, średnicy 10 mm i porowatości 0,2 µm.

Permeat z mikrofiltracji wykorzystano do kolejnego etapu – ultrafiltracji na 7-kanalowej membranie z TiO₂ o długości 600 mm, średnicy 10 mm i MWCO 150 kDa. Do dalszych prac wykorzystano permeat z ultrafiltracji.

Otrzymano 10,3 l ekstraktu o zawartości antocyjanów 239 mg/l, który podano w całości na kolumnę szklaną wypełnioną żywicą adsorpcyjną typu Amberlite o objętości 334 ml. Kolumnę przemywano wodą w ilości 1 l, a elucję prowadzono z zastosowaniem 65% etanolu. Otrzymano 480 ml frakcji głównej o zawartości antocyjanów 4428 mg/l. Frakcję główną zagęszczono na wyparce próżniowej w temperaturze poniżej 40°C do 28% suchej masy.

Otrzymany ekstrakt liofilizowano, otrzymując 10 g ekstraktu w postaci suchej o zawartości antocyjanów wynoszącej 21,2% oraz zawartości związków polifenolowych wynoszącej 44,3%.

Przykład 5

Sposób wytwarzania suchego ekstraktu według przykładu 4, z tym, że mikrofiltrację prowadzono na membranach o porowatości 0,45 µm, natomiast proces elucji prowadzi się wodnym roztworem etanolu o stężeniu 40% objętościowych.

Zastrzeżenia patentowe

1. Rozpuszczalnik ekstrakcyjny stosowany do ekstrakcji rozdrobnionych owoców lub wyłoków aronii, **znamienny tym**, że stanowi wodny roztwór kwasów organicznych zawierający kwas bursztynowy w ilości 0,05–0,1%, korzystnie 0,1%, kwas jabłkowy w ilości 0,05–0,1%, korzystnie 0,1% oraz kwas wersenowy (EDTA) w ilości 0,01–0,04%, korzystnie 0,04%.
2. Sposób wytwarzania suchego ekstraktu z owoców lub wyłoków aronii z zastosowaniem rozpuszczalnika ekstrakcyjnego określonego w zastrz. 1, **znamienny tym**, że obejmuje następujące etapy:
 - ekstrakcję z wykorzystaniem rozpuszczalnika ekstrakcyjnego określonego w zastrz. 1,
 - filtrację wstępną i mikrofiltrację,
 - ultrafiltrację,
 - chromatografię adsorpcyjną permeatu uzyskanego po przeprowadzeniu ultrafiltracji,
 - odparowanie rozpuszczalnika w wyparce próżniowej,
 - liofilizację.
3. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że ekstrakcję prowadzi się w zakresie temperatur 40–70°C, korzystnie 40°C, w czasie 4–8 godzin, korzystnie 4 godziny.
4. Sposób według zastrz. 2 albo 3, **znamienny tym**, że filtrację wstępną prowadzi się na płytach celulozowych o porowatości 2 µm, a mikrofiltrację na membranach o porowatości 0,2–0,45 µm, korzystnie 0,2 µm.

5. Sposób według dowolnego z poprzednich zastrzeżeń od 2 do 4, **znamienny tym**, że ultrafiltrację prowadzi się na membranach o MWCO 150–300 kDa, korzystnie 300 kDa.
6. Sposób według dowolnego z poprzednich zastrzeżeń od 2 do 5, **znamienny tym**, że chromatografii adsorpcyjnej poddaje się permeat z procesu ultrafiltracji, podając go na kolumnę wypełnioną żywicą adsorpcyjną typu Amberlite lub Purolite, a następnie przemywa żywicę wodą i prowadzi proces elucji zaadsorbowanego ekstraktu wodnym roztworem etanolu o stężeniu 40–65%, korzystnie 65% objętościowych.