

УДК 664.8 + 634.11

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ УЛЬТРАЗВУКОВЫХ ВОЗДЕЙСТВИЙ НА ЭКСТРАКЦИЮ АНТИОКСИДАНТНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ЯГОД ЧЕРНИКИ (*VACCINIUM MYRTILLUS L.*)

© *Н.В. Макарова, Н.Б. Еремеева**

*Самарский государственный технический университет,
ул. Молодогвардейская, 244, Самара, 443100 (Россия),
e-mail: rmvnatasha@rambler.ru*

Интерес к ягодам со стороны производителей пищевых продуктов огромный, что объясняется хорошими органолептическими показателями и высокой биологической активностью ягод. Одним из способов сохранения свойств ягод в течение всего года является получение экстрактов. Определение условий и типа оптимальной технологии экстракции для получения биологически активных веществ из растительного сырья является важным этапом производства новых натуральных профилактических добавок. Целью данной работы является исследование химического состава и антиоксидантной активности экстрактов черники (*Vaccinium myrtillus L.*), полученных различными методами: мацерацией, ультразвуковой и микроволновой экстракцией. Использование ультразвуковой экстракции как метода интенсификации процесса извлечения биологически активных соединений из ягод черники является весьма эффективным. Это доказывает повышение уровня содержания флавоноидов в экстрактах практически в 2 раза. Однако содержание антоцианов в экстрактах ягод черники не является для ультразвуковой экстракции самым высоким (уменьшение по сравнению с мацерацией в 3.3 раза), по всей вероятности, из-за нестабильности этого класса соединений при данном виде обработки. Среди экстрактов ягод черники, полученных тремя технологиями (мацерация, микроволновая и ультразвуковая обработка), именно УЗ-экстракт имеет высшие показатели антиоксидантной активности (9.5 ± 0.1 мг/см³, 18.18 ммоль ± 0.24 Fe²⁺/1 кг, 58.6%), определенные по трем методикам: DPPH-метод, FRAP-метод, метод оценки антиоксидантных свойств с использованием модельной системы с линолевой кислотой. Ультразвуковая экстракция была выбрана как технология получения концентрированного экстракта черники.

Ключевые слова: черника, экстракция, мацерация, микроволновое облучение, ультразвуковая обработка.

Введение

Ягоды черники до недавнего времени являлись достаточно экзотическим сырьем для пищевой промышленности на большинстве территорий Российской Федерации. Однако новые агротехнологические приемы выращивания сделали чернику доступным сырьем с высокой урожайностью, хорошими органолептическими и физико-химическими свойствами. Ученые отмечают [1] прежде всего уникальный химический состав черники, наличие таких соединений, как кемпферол, кверцетин, гидроксициннамовые кислоты. В качестве направлений использования ягод черники отмечается получения вина [2], сушеных ягод [3] для кондитерской и хлебобулочной промышленности.

Не менее интересными являются результаты исследований биологического действия черники. Так, для экстракта черники был изучен антимикробное действие против роста и размножения *Listeria monocytogenes* и *Salmonella* [4]. Авторы связывают наличие антимикробного действия для экстракта черники с содержанием в ее составе хлорогеновой, элаговой кислоты, кверцетина, кверцетин-3-галактозида.

Макарова Надежда Викторовна – доктор химических наук, профессор кафедры технологии и организации общественного питания,
e-mail: MakarovaNV1969@yandex.ru

Еремеева Наталья Борисовна – кандидат технических наук, доцент кафедры технологии и организации общественного питания, e-mail: rmvnatasha@rambler.ru

Исследование способности ягод черники предотвращать и приостанавливать перерождение клеток являются очень востребованными. Это направление позволяет выбирать растительный материал с профилактическим действием против рака,

* Автор, с которым следует вести переписку.

что чрезвычайно важно, учитывая распространенность этого заболевания в Российской Федерации и смертность от нее. Так, для экстракта черники было изучено наличие антипролиферативных свойств в отношении клеток меланомы [5]. По мнению ученых, именно антоциановый комплекс черники обладает активностью.

Во многих статьях [6–8] высказывается мнение, что противораковые свойства для ягод напрямую связаны с наличием антирадикальной активности против свободных радикалов: гидроксил, пероксил, супероксид-анион и т.д.

Исследования по химическому составу и антиоксидантной активности растительного сырья играют важную роль [9, 10], так как имеется прямая взаимосвязь между качественным и количественным составом и уровнем антиоксидантной активности. А наличие антиоксидантных свойств напрямую определяет существование и других видов биологического действия.

Стремление к получению полезных веществ из ягод побуждает технологов пищевых производств стремиться к переработке фруктов как в традиционные, так и в инновационные продукты. Например, спиртовой экстракт из черники имеет больше фенолов, флавоноидов и способность улавливать свободные радикалы, чем ягоды черники сублимационной сушки [11], тогда как топпинг из ягод черники имеет худшие показатели, чем сами ягоды [12].

Экстракция является основным методом получения из растительного сырья биоактивных соединений [13]. Для обеспечения максимального выхода веществ с биологической активностью необходимо подобрать оптимальные условия экстракции. Так, для получения полифенолов из черники выполнен ряд экспериментов с использованием кислотного и щелочного гидролиза с обработкой результатов экспериментов с помощью методологии поверхностного отклика [14].

В качестве технологий, обеспечивающих интенсификацию процесса экстракции, используются микроволновое и ультразвуковое облучение.

Ультразвук – это звук, частота которого выше звуков, слышимых человеком (20 кГц–100 МГц). Эти волны способны вызывать перекрестный материальный биологический резонанс, который вызывает явление кавитации, преобразуя при этом электрическую энергию в кинетическую, а затем – в тепловую. Ультразвук передается через среду посредством волн, вызывая колебательное движение молекул, которые попеременно сжимают и растягивают молекулярную структуру среды из-за изменяющегося во времени давления. Звуковые волны приводят к образованию чередующихся циклов высокого давления и низкого давления, скорость которого зависит от частоты колебаний звуковой волны, образуя при этом кавитационные пузырьки. Эти кавитационные пузырьки схлопываются, создавая локально высокие температуры (около 5000 К) и давление (около 2000 атм.), что приводит к разрушению матрицы растительной клетки и улучшают массоперенос биологически активных веществ [15].

Микроволны – это неионизирующие электромагнитные волны, расположенные в электромагнитном спектре с частотой от 300 МГц до 300 ГГц, которые образуются двумя типами перпендикулярных полей: электрического и магнитного. Любая растительная клетка содержит в своем составе влагу, которая под действием микроволн начинает нагреваться, испаряться, создавая при этом огромное давление на клеточную стенку изнутри. Под действием внутреннего давления клетка разрывается, высвобождая активные компоненты в окружающий их растворитель [15].

Так, для извлечения полисахаридов из фрукта *Psidium quajava* L. применялась [16] обычная (водная, 70, 80, 90 °С, модуль-растворитель : фрукт 1 : 1, 2 : 1, 3 : 1, время 30, 60, 90 мин) и микроволновая (мощность 100, 200, 300 Вт, время 10, 20, 30 мин, модуль 1 : 1, 2 : 1, 3 : 1) экстракции. Определены условия для обеспечения максимального выхода полисахаридов.

Изучено [17] влияние микроволновой экстракции на содержание фенолов, флавоноидов, антоцианов, антиоксидантной активности по FRAP-, ABTS-, DPPH-методам в экстрактах ягод черники. Авторы подобрали оптимальную температуру и растворитель для обеспечения максимальных показателей.

Сравнение эффективности обычной экстракции с микроволновой, проведенное для ягод черники, показало, что выход экстракта и выход антоцианов как ключевого показателя эффективности процесса выше именно при использовании микроволновой экстракции [18].

Ультразвуковое облучение способно разрушать растительную клетку. В последние годы эту технологию успешно используют для экстракции растительного сырья. Так, с целью получения высокого выхода

антоцианинов и фенольных соединений из пурпурного сладкого картофеля использована методология поверхностного отклика с целью оптимизации условий ультразвуковой экстракции [19]: температуры, времени, модуля.

Таким образом, определение условий и типа оптимальной технологии экстракции для получения биологически активных веществ из растительного сырья является важным этапом производства новых натуральных профилактических добавок.

Цель данной работы – исследование химического состава и антиоксидантной активности экстрактов черники (*Vaccinium myrtillus* L.), полученных различными методами: мацерацией, ультразвуковой ($3.7 \cdot 10^5$ Гц) и микроволновой экстракцией ($2.5 \cdot 10^9$ Гц).

Экспериментальная часть

Подготовка ягод к экстракции. Ягоды черники перед экстракцией измельчали на лабораторном блендере НМ100 до размеров частиц 2–5 мм.

Метод мацерации для приготовления экстракта ягод черники [20]. Навеску измельченных ягод 1 г (для экстракта концентрацией 0.1 г/см^3) помещали в колбу с притертой пробкой, добавляли 10 см^3 98% этилового спирта, разбавленного водой в соотношении 1 : 1, выдерживали в термостате при $37 \text{ }^\circ\text{C}$ в течение 2 ч при непрерывном перемешивании. Далее отделяли прозрачный слой экстракта центрифугированием в течение 15 мин при скорости 3000 об/мин.

Метод приготовления экстрактов ягод черники с использованием микроволнового излучения [20]. Навеску измельченных ягод 1 г (для экстракта концентрацией 0.1 г/см^3) помещали в колбу с притертой пробкой, добавляли 10 см^3 98%-ного этилового спирта, разбавленного водой в соотношении 1 : 1, обрабатывали микроволновым излучением на лабораторной микроволновой системе «Меркурий» с частотой излучения $2.5 \cdot 10^9$ Гц и мощностью 800 Вт в течение 1 мин. Далее отделяли прозрачный слой экстракта центрифугированием в течение 15 мин при скорости 3000 об/мин.

Метод приготовления экстрактов ягод черники с использованием ультразвукового излучения [21]. Навеску измельченных ягод 1 г (для экстракта концентрацией 0.1 г/см^3) помещали в колбу с притертой пробкой, добавляли 10 см^3 98%-ого этилового спирта, разбавленного водой в соотношении 1 : 1, обрабатывали ультразвуковым излучением частотой $3.7 \cdot 10^5$ Гц с использованием прибора ПСБ-2835-05 90 мин при $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Далее отделяли прозрачный слой экстракта центрифугированием в течение 15 мин при скорости 3000 об/мин. Концентрирование происходит на циркуляционном вакуум-выпарном аппарате. Общая схема получения концентрированного экстракта черники представлена на рисунке 1.

Метод определения общего содержания фенольных веществ. Содержание полифенолов в экстракте определяют колориметрическим методом с применением реактива Folin-Ciocalteu. Реактив Folin-Ciocalteu содержит фосфорно-вольфрамовые кислоты, которые восстанавливаются при взаимодействии с легкоокисляющимися ОН-группами фенола. При этом образуется вольфрамовая синь, обладающая характерной полосой поглощения с максимумом 725 нм, придающая исследуемому раствору синий цвет. Исследования проводились по методу [22]. В стерильных пробирках приливали к 0.25 см^3 готового экстракта ягод концентрацией 0.1 мг/см^3 , 0.25 см^3 50%-ного водного раствора реактива Folin-Ciocalteu, 0.50 см^3 насыщенного раствора карбоната натрия и 4.00 см^3 дистиллированной воды. В контрольную пробу приливали вместо экстракта 0.25 см^3 дистиллированной воды. Смесь выдерживали 25 мин при $25 \text{ }^\circ\text{C}$ при постоянном помешивании для завершения реакции. Далее пробы центрифугировали 10 мин при скорости 2000 об./мин. Содержание фенольных веществ в прозрачном растворе определяли спектрофотометрическим методом на приборе КФК-2-01-ЗОМЗ. Оптическое поглощение снимали при длине волны 725 нм в кювете с толщиной слоя жидкости 10 мм. В кювету сравнения помещали контрольную пробу. Калькуляцию фенольных соединений в мг галловой кислоты/100 г ягод проводили по калибровочной кривой (мг ГК/100 г).

Метод определения общего содержания флавоноидов. Исследования содержания флавоноидов проводят по методу [23] с модификацией для ягод черники. В пробирки помещали 0.50 см^3 экстракта ягод концентрацией 0.1 мг/см^3 , 2.50 см^3 дистиллированной воды, 0.15 см^3 раствора 5% нитрита натрия. Выдерживали в течение 5 мин. Затем приливали 0.30 см^3 10%-ного хлорида алюминия (III), выдерживали в течение 5 мин. Добавляли 1.00 см^3 1 М гидроксида натрия и 5.00 см^3 дистиллированной воды. Содержание флавоноидов определяли спектрофотометрическим методом на приборе спектрофотометре. Оптическое поглощение снимали при длине волны 510 нм в кювете с толщиной слоя жидкости 10 мм. В кювету сравнения помещали дистиллированную воду. Калькуляцию флавоноидов в мг катехина/100 г ягод проводили по калибровочной кривой (мг К/100 г).

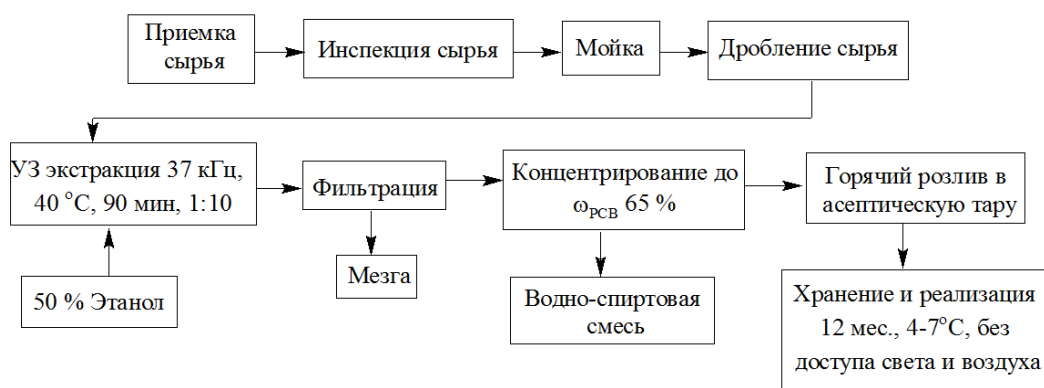


Рис. 1. Блок-схема получения полуфабриката из ягод черники

Метод определения общего содержания антоцианов. Содержание антоцианов в экстрактах ягод черники определяли спектрофотометрическим методом на спектрофотометре в экстракте функционального продукта с буферными растворами с pH 1.0 и 4.5 [24]. Калькуляцию антоцианов в мг цианидин-3-гликозида/100 г продукта проводили по формуле, приведенной в статье [24] (мг ЦГ/100 г).

DPPH-метод (метод определения радикалудерживающей способности с использованием реактива 2,2-дифенил-1-пикрилгидразила). Одним из способов оценки антиоксидантной активности является колориметрия свободных радикалов [25]. В пробирки помещали 0.20 см³ экстракта концентрацией 0.1 мг/см³, 2.00 см³ дистиллированной воды, 2.00 см³ спиртового раствора 2,2-дифенил-1-пикрилгидразила. В контрольную пробу по экстракту помещали вместо раствора 2,2-дифенил-1-пикрилгидразила дистиллированную воду. В контрольную пробу по раствору 2,2-дифенил-1-пикрилгидразила приливали вместо экстракта дистиллированную воду. Смесь выдерживали в течение 30 мин в не доступном для света месте. Колориметрию свободных радикалов 2,2-дифенил-1-пикрилгидразила проводили спектрофотометрическим методом на приборе КФК-2-01-30МЗ при длине волны 517 нм в кювете толщиной слоя жидкости 10 мм. В кювету сравнения помещали этиловый спирт. Для проведения этого исследования в качестве экстракта ягод использовали экстракты с концентрацией 0.005, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5 г/см³.

FRAP-метод (метод определения железосвязывающей активности экстрактов). Исследование восстанавливающей силы было проведено по методу [26] с модификацией для ягод. Подготавливали реактив FRAP: в колбу помещали 10.00 см³ ацетатного буфера pH 3.6, 1.00 см³ 20 мМ раствора хлорида железа (III), 1.00 см³ реагента 2,4,6-три-(2-пиридил)-1,3,5-триазина (TPTZ). Смесь выдерживали в термостате в течение 10 мин при температуре 37 °С при периодическом перемешивании. В пробирки прибавляли 1.00 см³ реактива FRAP, 3.00 см³ дистиллированной воды, 0.10 готового экстракта ягод концентрацией 0.1 мг/см³. В контрольную пробу приливали вместо экстракта 0.10 см³ дистиллированной воды. Смесь выдерживают 4 мин при температуре 37 °С при периодическом перемешивании. Определение железосвязывающей активности проводили спектрофотометрическим методом при длине волны 593 нм в кювете с толщиной слоя жидкости 10 мм. В кювету сравнения приливали дистиллированную воду. Определение железосвязывающей активности проводили по калибровочной кривой в ммоль Fe²⁺/1 кг исходного сырья (ммоль Fe²⁺/1 кг).

Метод оценки антиоксидантных свойств с использованием модельной системы с линолевой кислотой. Метод исследований на модели с линолевой кислотой основан на регистрации перокисления линолевой кислоты, которое определялось по реакции веществ, реагирующих с радикалом аммония и хлоридом железа (II) при 500 нм, образующихся при нагревании при 40 °С за период 120 ч смеси из экстракта фруктов, линолевой кислоты, фосфатного буфера и Tween-20 [27]. В колбы, снабженные притертой пробкой, к 1.00 см³ экстракта ягод концентрацией 0.1 мг/см³ приливали 1.00 см³ 2.51%-ного спиртового раствора линолевой кислоты, 2.00 фосфатного буфера pH 7.0, добавляли 1.00 см³ 50% этилового спирта и 1 см³ Tween 20. В пробы контроля вместо экстракта добавляли дистиллированную воду. Пробы выдерживали в термостате в течение 120 ч при температуре 40 °С. После выдержки отбирали 0.01 см³ смеси, добавляли 9.70 см³ 75% этилового спирта, 0.10 см³ 30%-ного раствора аммониевой соли тиоциановой кислоты. Выдерживали в течение 3 мин. Добавляли 0.10 см³ 0.1 М раствора хлорида железа (II). Анализ проводили спектрофотометрическим методом при длине волны 500 нм в кювете с толщиной слоя жидкости 10 мм. В кювету сравнения

приливали дистиллированную воду. Результаты рассчитывали в процентах ингибирования процессов окисления линолевой кислоты (%).

Опыты проводились в трехкратной повторяемости. Статистическую обработку данных анализа осуществляли с помощью программы MS Excel 2007.

Обсуждение результатов

Именно уровень содержания фенольных соединений в ягодах определяет величину антиоксидантной активности, но и по результатам многих исследований полифенолы обладают биологически активным воздействием на здоровье человека [28]. По содержанию полифенолов (рис. 2) экстракты черники, полученные по трем технологиям, – мацерация, микроволновое облучение, ультразвуковая обработка – можно расположить в ряд по убыванию данного показателя: ультразвуковая экстракция (821 ± 6 мг ГК/100 г) > мацерация (803 ± 8 мг ГК/100 г) > микроволновое облучение (630 ± 7 мг ГК/100 г). Таким образом, более высокое содержание полифенолов обеспечивает экстракция измельченных ягод черники при использовании ультразвуковой обработки. Уровень этого значения определяется многими факторами, а именно природой растительного сырья, технологией и параметрами экстракции. Однако значения фенольных веществ для ягод черники в нашей работе имеет одинаковый уровень с результатами сравнительного исследования черники трех сортов: *George*, *Aliceblue*, *Climax*, водный экстракт которых получен мацерацией в течение 10 мин [2]. Несомненно, что технология экстракции является определяющей в данном случае. Согласно механизмам микроволновой, ультразвуковой экстракции и традиционного настаивания, именно две первых технологии интенсифицируют процесс экстрагирования. Однако вероятно именно ультразвуковое воздействие приводит к интенсификации без разрушения фенольных соединений. Тогда как микроволновое воздействие является более жестким режимом, чем настаивание (мацерация).

Флавоноиды – это также класс соединений, отвечающих за антиоксидантное действие различных растительных материалов [29]. Оценка влияния технологии экстракции на уровень содержания флавоноидов в экстрактах ягод черники показала несомненное лидерство экстракта, полученного с использованием ультразвуковой обработки (рис. 3). Для него показатель содержания флавоноидов (274 ± 2 мг К/100 г) выше других объектов – экстрактов черники, произведенных по технологии мацерации (139 ± 3 мг К/100 г) и с использованием микроволнового облучения (149 ± 1 мг К/100 г), практически в 2 раза. Целью использования новых технологий при производстве экстрактов является максимальное извлечение биологически активных соединений из исходного растительного сырья. Это осуществляется за счет интенсификации процесса разрушения клеток. Но механизм этого разрушения отличен при микроволновом и ультразвуковом воздействии. Короткая обработка с помощью микроволн приводит к извлечению флавоноидов из ягод черники практически на уровне технологии настаивания. Тогда как длительная обработка ультразвуковым воздействием приводит к получению экстрактов, имеющих уровень флавоноидов выше практически в 2 раза. Полученные результаты в данной статье совпадают [17] или несколько выше [30] данных, приведенных в литературе.

Антоцианы являются основными красящими веществами ягод. Количественный и качественный состав антоцианов напрямую связан с интенсивностью и цветом ягод [31]. Также для антоцианов обнаружено противораковое действие, что позволяет многим медикам рекомендовать ягоды как профилактическое средство против рака [31]. По уровню содержания антоцианов в экстрактах черники в числе лидеров оказались экстракты, полученные технологией мацерации (74.88 ± 1.22 мг ЦГ/100 г) и микроволнового излучения (120.17 ± 2.41 мг ЦГ/100 г), тогда как ультразвуковая обработка дает самый низкий показатель антоцианов в экстрактах черники (22.56 ± 3.02 мг ЦГ/100 г) (рис. 4). Антоцианы являются очень чувствительным классом соединений к повышению температуры, повышению давления, к ультрафиолетовому и ультразвуковому воздействию, повышенному содержанию кислорода [3, 17] и, вероятно, при обработке ультразвуком большая часть антоцианов разрушилась. При микроволновом облучении основными процессами являются повышение температуры с разрушением клетки, тогда как при ультразвуковом облучении происходит образование кавитационного пузырька, при схлопывании которого происходит резкое повышение температуры и давления. Вероятно, именно во втором случае воздействие оказывает более существенное влияние на сам класс антоцианов. Показатель общего содержания антоцианов, полученных технологией настаивания для экстракта ягод черники, находится на уровне показателей спиртового экстракта [20], сравнительных исследований ягод черники сортов *Nelson*, *Legacy*, *Darrow*, *Nui*, *Bluegold*, *Toro*, *Hannah's Choice* [5], полученных мацерацией в подкисленном метаноле (0.3% HCl).

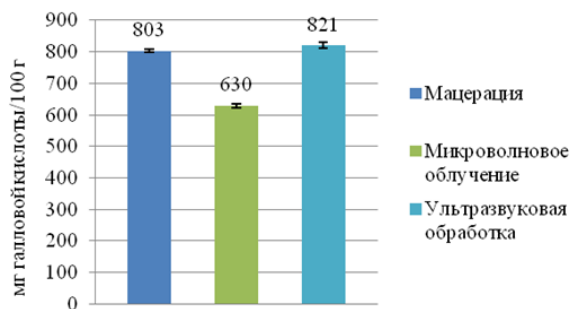


Рис. 2. Общее содержание фенолов в экстрактах черники

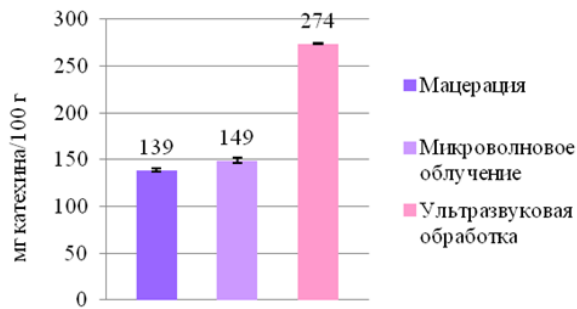


Рис. 3. Общее содержание флавоноидов в экстрактах черники

Таким образом, наивысшие показатели по содержанию фенолов и флавоноидов для экстрактов ягод черники обеспечивает использование ультразвукового метода экстракции, за исключением содержания антоцианов. Если целью экстрагирования является получение экстракта с высокими цветовыми характеристиками, то должен быть использован метод микроволнового излучения.

Антирадикальная активность является важной составляющей частью антиоксидантной способности растительного материала, так как именно свободные радикалы способны разрушать различные элементы живой клетки, провоцируя ее гибель или мутацию. Существуют различные методики исследования антирадикальной активности. Однако наиболее признанным является метод по улавливанию свободных радикалов 2,2-дифенил-1-пикрилгидразила [32]. Именно этот метод мы использовали в своей работе. Результаты определения антирадикальной активности приведены на рисунке 5. По данному показателю все экстракты можно расположить в ряд по убыванию: ультразвуковая (9.5 ± 0.1 мг/см³) > микроволновая (15.2 ± 0.2 мг/см³) > мацерация (20.5 ± 0.2 мг/см³). Таким образом, и по данному показателю ультразвуковая экстракция является более предпочтительной. Необходимо отметить, что определенный класс химических соединений, известный как антиоксиданты, не может иметь одинаковые уровни всех видов антиоксидантов, отличающихся по механизму действия: способных улавливать свободные радикалы, тормозить окисление ненасыщенных кислот, ингибировать каталитическое действие ионов металлов и т.д. Необходимо отметить, что уровень способности улавливать свободные радикалы определяется уровнем содержания фенольных веществ [30]. В нашем исследовании экстракты черники, обладающие высоким содержанием полифенолов, были получены с помощью ультразвуковой обработки, и именно эти экстракты обладали лучшей способностью улавливать свободные радикалы.

Исследование антиоксидантной способности растительных материалов по ингибированию каталитического действия ионов металлов в реакциях окисления проводится по методике FRAP, т.е. с реагентом 2,4,6-три-(2-пиридил)-1,3,5-триамина. Это очень распространенный метод, показавший устойчивые результаты для многих объектов [33]. По показателю FRAP (рис. 6) именно экстракт черники, полученный ультразвуковым методом, является лидером (18.18 ммоль Fe^{2+} /1 кг). Близкие к нему значения имеет экстракт черники, полученный методом мацерации (17.81 ± 0.12 ммоль Fe^{2+} /1 кг), тогда как экстракт черники, полученный микроволновой экстракцией, имеет наименьшее значение (15.84 ± 0.26 ммоль Fe^{2+} /1 кг). Для нескольких сортов черники является доказанным [34] тот факт, что значения показателя FRAP определяются сортом черники, а значит, зависят от химического состава ягод. В нашем случае с помощью интенсификации процесса экстракции при использовании ультразвукового облучения получены экстракты с повышенным содержанием фенолов, флавоноидов, что определяет наличие для данного экстракта высокого уровня восстанавливающей силы.

Большинство пищевых продуктов содержат в своем составе жировую фазу, и для предотвращения их окисления чрезвычайно важным является способность антиоксиданта тормозить окисление ненасыщенных кислот [35]. Нами изучена способность тормозить окисление линолевой кислоты с помощью экстрактов черники. По данному методу исследования антиоксидантной способности все экстракты сохраняют свои позиции: ультразвуковой экстракт имеет более высокие значения (58.6%), тогда как экстракты черники, полученные микроволновым (34.2%) и методом мацерации (12.3%), имеют худшие значения, что видно из рисунка 7. Способность ингибировать окисление ненасыщенных кислот – это главная характеристика антиоксиданта. Экстракты с высоким содержанием фенолов и флавоноидов могут предотвращать эти процессы окисления.

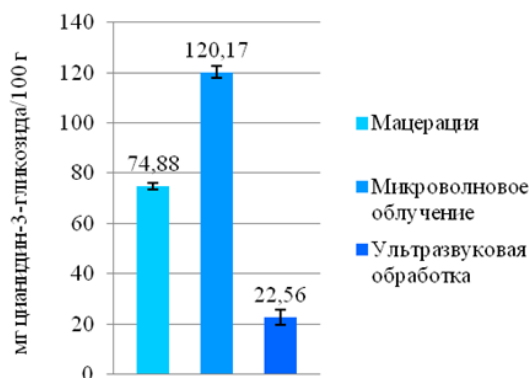


Рис. 4. Общее содержание антоцианов в экстрактах черники

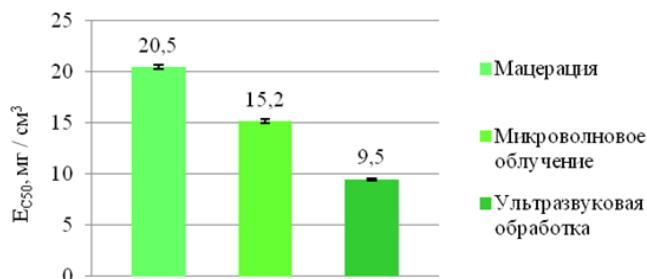


Рис. 5. Антирадикальная активность ягод черники

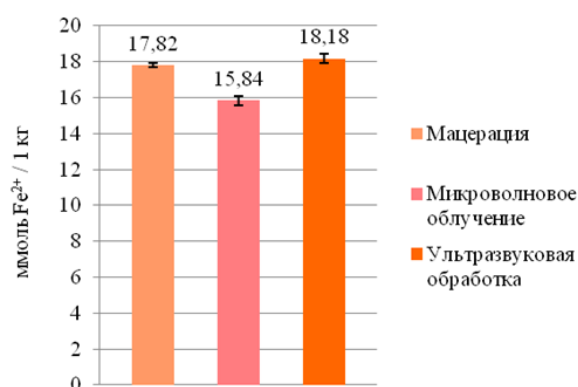


Рис. 6. FRAP значения экстрактов ягод черники

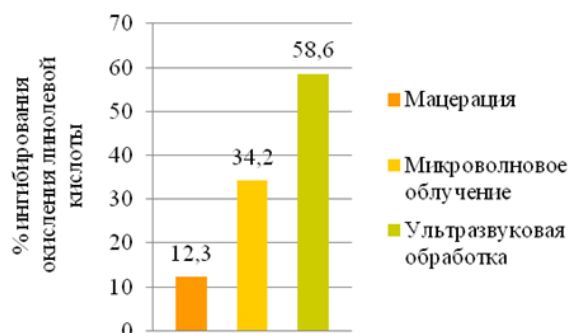


Рис. 7. Антиоксидантная активность экстрактов ягод черники

Суммируя полученные данные, можно утверждать, что использование ультразвуковой экстракции дает возможность получить экстракты с более высокими показателями антиоксидантной активности, определенной по трем методам. Наши данные, так же как и литературные [36], не позволяют выбрать из трех методов экстракции для ягод черники один как приоритетный.

Однако чтобы минимизировать техническое оснащение получения конечного экстракта, выбрана ультразвуковая экстракция как технология получения концентрированного экстракта черники. Для данного экстракта были изучены показатели химического состава и антиоксидантной активности (табл.).

Физико-химические показатели и антиоксидантная активность концентрированного экстракта черники

Показатели	Значения
Содержание растворимых сухих веществ, %	65.0±0.1
Титруемая кислотность, % (в пересчете на яблочную кислоту)	2.21±0.02
Сроки хранения, мес.	12
Общее содержание фенолов, мг ГК/100 г	1435±12
Общее содержание флавоноидов, мг катехина/100 г	1152±8
Общее содержание антоцианов, мг цианидин-3-гликозида/100 г	184.19±2.12
EC ₅₀ , мг/см ³	1.8±0.1
FRAP значение, ммоль Fe ²⁺ /1 кг	9.72±0.13
Способность ингибировать окисление линолевой кислоты, %	26.7±0.2

Выводы

Исходя из полученных данных, можно сделать следующие выводы:

- 1) использование ультразвуковой экстракции как метода интенсификации процесса извлечения биологически активных соединений из ягод черники является весьма эффективным. Это доказывают уровень содержания фенолов и флавоноидов в экстрактах;
- 2) содержание антоцианов в экстрактах ягод черники не является для ультразвуковой экстракции самым высоким, по всей вероятности, из-за нестабильности этого класса соединений при данном виде обработки;
- 3) для экстрактов ягод черники, полученных тремя технологиями (мацерация, микроволновая и ультразвуковая обработка) именно УЗ-экстракт имеет высшие показатели антиоксидантной активности, определенной по трем методикам.

Список литературы

1. Michalska A., Lysiak G. Bioactive compounds of blueberries: post-harvest factors influencing the nutritional value of products // *Int. J. Mol. Sci.* 2015. Vol. 16. Pp. 18642–18663. DOI: 10.3390/ijms160818642.
2. Santos R.O., Trindade S.C., Maurer L.H., Bersch A.M., Sautter C.K., Penna N.G. Physicochemical, antioxidant and sensory quality of Brazilian blueberry wine // *An. Acad. Bras. Cienc.* 2016. Vol. 88. N3. Pp. 1557–1568. DOI: 10.1590/0001-3765201620140491.
3. Reque P.M., Steffens R.S., Da Silva A.M., Jablonski A., Flores S.H., Rios A.O., De Jong E.V. Characterization of blueberry fruits (*Vaccinium* spp.) and derived products // *Food Sci. Technol. Campinas.* 2014. Vol. 34. N4. Pp. 773–779. DOI: 10.1590/1678-457X.6470.
4. Shen X., Sun X., Xie Q., Liu H., Zhao Y., Pan Y., Hwang Ch.-A., Wu V.C.H. Antimicrobial effect of blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) extracts against the growth of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Enteritidis // *Food Control.* 2014. Vol. 35. Pp. 159–165. DOI: 10.1016/j.foodcont.2013.06.040.
5. Bunea A., Rugină D., Sconța Z., Pop R.M., Pinteș A., Socăciu C., Tăbăran F., Grootaert Ch., Struijs K., VanCamp J. Anthocyanin determination in blueberry extracts from various cultivars and their antiproliferative and apoptotic properties in B16-F10 metastatic murine melanoma cells // *Phytochemistry.* 2013. Vol. 95. Pp. 436–444. DOI: 10.1016/j.phytochem.2013.06.018.
6. De Castro D.S.B., Teodoro A.J. Anticancer properties of bioactive compounds of berry fruits // *British J. Med. & Med. Res.* 2015. Vol. 6. N8. Pp. 771–794. DOI: 10.9734/BJMMR/2015/15289.
7. Diaconeasa Z., Leopold L., Rugină D., Ayvaz H., Socăciu C. Antiproliferative and antioxidant properties of anthocyanin rich extracts from blueberry and blackcurrant juice // *Int. J. Mol. Sci.* 2015. Vol. 16. Pp. 2352–2365. DOI: 10.3390/ijms16022352.
8. Krasto A.S., Klimis-Zacas D., Sikalidis A.K. Protective role of dietary berries in cancer // *Antioxidants.* 2016. Vol. 5. Pp. 37–45. DOI: 10.3390/antiox5040037.
9. Ендонова Г.Б., Анцупова Т.П., Жамсаранова С.Д. Химический состав и антиоксидантная активность экстрактов мильнянки лекарственной (*Saponaria officinalis* L.) // *Химия растительного сырья.* 2018. №1. С. 137–143. DOI: 10.14258/jcprm.2018012735.
10. Ветрова Е.В., Борисенко Н.И., Хизриева С.С., Бугаева А.Ф. Изучение антиоксидантной активности апорфинового алкалоида глауцина и полученного в субкритической водетфенантренового алкалоида дес-глауцина // *Химия растительного сырья.* 2017. №1. С. 85–91. DOI: 10.14258/jcprm.2017011383.
11. Jurca T., Vicas L., Marian E., Vicas S., Muresan M. A new natural antioxidant supplement – design and development // *Farmacia.* 2016. Vol. 64. N1. Pp. 135–142.
12. Zambiazzi R.C., Jansen C., Bueno-Costa F.M., Silva S.S.D., Hartwig N. Bioactive compounds and antioxidant activity of blueberry topping with honey // *Int. Food Res. J.* 2016. Vol. 23. N6. Pp. 2375–2383.
13. Варданян Л.Р., Атабекян Л.В., Айрапетян С.А., Варданян Р.Л. Влияние растворителей на степень экстракции антиоксидантов из растительного сырья // *Химия растительного сырья.* 2018. №1. С. 83–88. DOI: 10.14258/jcprm.2018011968.
14. Cheng A., Yan H., Han C., Chen X., Wang W., Xie C., Qu J., Gong Z., Shi X. Acid and alkaline hydrolysis extraction of non-extractable polyphenols in blueberries: optimization by response surface methodology // *Czech. J. Food Sci.* 2014. Vol. 32. N3. Pp. 218–225. DOI: 10.17221/257/2013-CJFS.
15. Mandal S., Mandal V., Das A. *Essentials of Botanical Extraction: Principles and Applications.* Academic Press, 2015. 220 p.
16. Arasi M.A.S.A.G., Rao M.G., Bagyalakshmi J. The comparison and analysis of two extraction methods for polysaccharides in *Psidium guajava* L. fruits // *Ind. J. Pharm. Educat. and Res.* 2016. Vol. 50. N3. Pp. 218–224. DOI: 10.5530/ijper.50.3.32.
17. Provesan N., Viera V.B., Mello R., Santos R.C.V., Vaucher R., Dressler V.L., Bizzi C.A., Fries L.L.M. Microwave-assisted extraction of bioactive compounds from blueberry (*Vaccinium ashei* Reade) and their antioxidant and antimicrobial capacity // *Int. Food Res. J.* 2017. Vol. 24. N6. Pp. 2526–2533.

18. Yu S., Hongkun X., Chenghai L., Chai L., Xiaolin S., Xianzhe Z. Comparison of microwave assisted extraction with hot reflux extraction in acquirement and degradation of anthocyanin from powdered blueberry // *Int. J. Agric & Biol. Eng.* 2016. Vol. 9. N6. Pp. 186–199. DOI: 10.3965/j.ijabe.20160906.2724.
19. Zhu Z., Guan Q., Guo Y., He J., Liu G., Li S., Barba F.J., Jaffrin M.Y. Green ultrasound-assisted extraction of anthocyanin and phenolic compounds from purple sweet potato using response surface methodology // *Int. Agrophys.* 2016. Vol. 30. Pp. 113–122. DOI: 10.1515/intag-2015-0066.
20. Еремеева Н.Б., Макарова Н.В. Применение микроволнового излучения для оптимизации процесса экстракции плодово-ягодного сырья // *Известия вузов. Пищевая технология.* 2017. №5–6. С. 47–50.
21. Еремеева Н.Б., Макарова Н.В. Влияние технологии экстракции на антиоксидантную активность экстрактов плодов черноплодной рябины // *Вестник МГТУ.* 2017. Т. 20. №3. С. 600–608. DOI: 10.21443/1560-9278-2017-20-3-600-608.
22. Alfaro S., Mutis A., Palma R., Quiroz A., Seguel I., Scheuermann E. Influence of genotype and harvest year on polyphenol content and antioxidant activity in murtila (*Ugni molinae* Turcz) fruit // *J. Soil Sci. and Plant Nutr.* 2013. Vol. 13. N1. Pp. 67–78. DOI: 10.4067/S0718-95162013005000007.
23. Rop O., Řezníček V., Mlček J., Juríková T., Balík J., Sochor J., Kramářová D. Antioxidant and radical oxygen species scavenging activities of 12 cultivars of blue honeysuckle fruit // *Hort. Sci.* 2011. Vol. 38. N2. Pp. 63–70. DOI: 10.17221/99/2010-HORTSCI.
24. Wang B.C., He R., Li Z.M. The stability and antioxidant activity of anthocyanins from blueberry // *Food Technol. Biotechnol.* 2010. Vol. 48. N1. Pp. 42–49.
25. Radovanović B.C., Anđelković A.S.M., Radovanović A.B., Anđelković M.Z. Antioxidant and antimicrobial activity of polyphenol extracts from wild berry fruits grown in Southeast Serbia // *Trop. J. Pharm. Res.* 2013. Vol. 12. N5. Pp. 813–819. DOI: 10.4314/tjpr.v12i5.23.
26. Brito A., Areche C., Sepúlveda B., Kennelly E.J., Simirgiotis M. Anthocyanin characterization, total phenolic quantification and antioxidant features of some Chilean edible berry extracts // *Molecules.* 2014. Vol. 19. Pp. 10936–10955. DOI: 10.3390/molecules190810936.
27. Zheleva-Dimitrova D., Zhelev I., Dimitrova-Dyulgerova I. Antioxidant activity of some *Carduus* species growing in Bulgaria // *Free Rad. and Antiox.* 2011. Vol. 1. N4. Pp. 15–20. DOI: 10.5530/ax.2011.4.4.
28. Tsao R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols // *Nutrients.* 2010. Vol. 2. Pp. 1231–1246. DOI: 10.3390/nu2121231.
29. Mierziak J., Kostyn K., Kulma A. Flavonoids as important molecules of plant interactions with the environment // *Molecules.* 2014. Vol. 19. Pp. 16240–16265. DOI: 10.3390/molecules191016240.
30. De Souza V.R., Pereira P.A., da Silva Th.L.T., Lima L.C.O., Pio R., Querioz F. Determination of the bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Brazilian blackberry, red raspberry, blueberry and sweet cherry fruits // *Food Chem.* 2014. Vol. 156. Pp. 362–368. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.01.125.
31. Kamiloglu S., Capanoglu E., Grootaert Ch., Van Camp J. Anthocyanin absorption and metabolism by human intestinal Caco-2 cells – a review // *Int. J. Mol. Sci.* 2015. Vol. 16. Pp. 21555–21574. DOI: 10.3390/ijms160921555.
32. Mishra K., Ojha H., Chaudhury N.K. Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results // *Food Chem.* 2012. Vol. 130. Pp. 1036–1043. DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.07.127.
33. Pokorna J., Venkutonis P.R., Kraujalyte V., Kraujalis P., Dvořák P., Tremlova B., Kopriva V., Ošťádalová M. Comparison of different methods of antioxidant activity evaluation of green and roast *C. Arabica* and *C. Robusta* coffee beans // *Acta Alimen.* 2015. Vol. 44. N3. Pp. 454–460. DOI: 10.1556/066.2015.44.0017.
34. Vuthijumnonk J., Heyes J.A., Molan A.L. Total anthocyanins, chlorogenic acid concentration, antioxidant and *in ovo* snit-angiogenic activities of rabbiteye blueberries // *Int. Food Res. J.* 2016. Vol. 23. N2. Pp. 515–520.
35. Alam N.Md., Bristi N.J., Rafiqzaman Md. Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity // *Saudi Pharm. J.* 2013. Vol. 21. Pp. 143–152. DOI: 10.1016/j.jsps.2012.05.002.
36. Vieira V., Prieto M.A., Barros L., Coutinho J.A.P., Ferreira O., Ferreira I.C.F.R. Optimization and comparison of maceration and microwave extraction systems for the production of phenolic compounds from *Juglans regia* L. for the valorization of walnut leaves // *Ind. Crops & Prod.* 2017. Vol. 107. Pp. 341–352. DOI: 10.1016/j.indcrop.2017.06.012.

Поступила в редакцию 19 сентября 2018 г.

После переработки 11 июля 2019 г.

Принята к публикации 22 октября 2019 г.

Для цитирования: Макарова Н.В., Еремеева Н.Б. Сравнительное изучение влияния ультразвуковых воздействий на экстракцию антиоксидантных соединений ягод черники (*Vaccinium myrtillus* L.) // *Химия растительного сырья.* 2020. №1. С. 167–177. DOI: 10.14258/jcprm.2020014425.

Makarova N.V., Yeremeyeva N.B.* COMPARATIVE STUDY OF THE INFLUENCE OF ULTRASONIC INFLUENCES ON THE EXTRACTION OF ANTIOXIDANT COMPOUNDS OF BLACKBERRY BERRIES (*VACCINIUM MYRTILLUS* L.)

Samara State Technical University, ul. Molodogvardeiskaya, 244, Samara, 443100 (Russia),
e-mail: rmvnatasha@rambler.ru

The interest in berries from food manufacturers is huge, which is explained by good organoleptic characteristics and high biological activity of berries. One way to preserve the properties of berries throughout the year is to obtain extracts. Determining the conditions and type of optimal extraction technology to obtain biologically active substances from plant materials is an important stage in the production of new natural preventive additives. The aim of this work is to study the chemical composition and antioxidant activity of blueberry extracts (*Vaccinium myrtillus* L.) obtained by various methods: maceration, ultrasonic and microwave extraction. The use of ultrasonic extraction as a method of intensifying the process of extracting biologically active compounds from blueberries is very effective. This proves an almost 2-fold increase in the flavonoid content in the extracts. However, the content of anthocyanins in the extracts of blueberries is not the highest for ultrasonic extraction (a decrease by 3.3 times compared with maceration), in all likelihood due to the instability of this class of compounds in this type of processing. Among the extracts of blueberries obtained by three technologies (maceration, microwave and ultrasound treatment), it is the ultrasound extract that has the highest antioxidant activity (9.5 ± 0.1 mg/cm³, $18.18 \text{ mmol} \pm 0.24 \text{ Fe}^{2+}/1 \text{ kg}$, 58.6%), determined by three methods: DPPH method, FRAP method, method for assessing antioxidant properties using a model system with linoleic acid. Ultrasonic extraction was chosen as a technology for obtaining a concentrated blueberry extract.

Keywords: blueberries, extraction, maceration, microwave irradiation, ultrasonic treatment.

References

1. Michalska A., Lysiak G. *Int. J. Mol. Sci.*, 2015, vol. 16, pp. 18642–18663. DOI: 10.3390/ijms160818642.
2. Santos R.O., Trindade S.C., Maurer L.H., Bersch A.M., Sautter C.K., Penna N.G. *An. Acad. Bras. Cienc.*, 2016, vol. 88, no. 3, pp. 1557–1568. DOI: 10.1590/0001-3765201620140491.
3. Reque P.M., Steffens R.S., Da Silva A.M., Jablonski A., Flores S.H., Rios A.O., De Jong E.V. *Food Sci. Technol. Campinas.*, 2014, vol. 34, no. 4, pp. 773–779. DOI: 10.1590/1678-457X.6470.
4. Shen X., Sun X., Xie Q., Liu H., Zhao Y., Pan Y., Hwang Ch.-A., Wu V.C.H. *Food Contol.*, 2014, vol. 35, pp. 159–165. DOI: 10.1016/j.foodcont.2013.06.040.
5. Bunea A., Rugină D., Sconța Z., Pop R.M., Pintea A., Socaciu C., Tăbăran F., Grootaert Ch., Struijs K., VanCamp J. *Phytochemistry*, 2013, vol. 95, pp. 436–444. DOI: 10.1016/j.phytochem.2013.06.018.
6. De Castro D.S.B., Teodoro A.J. *British J. Med. & Med. Res.*, 2015, vol. 6, no. 8, pp. 771–794. DOI: 10.9734/BJMMR/2015/15289.
7. Diaconeasa Z., Leopold L., Rugină D., Ayvaz H., Socaciu C. *Int. J. Mol. Sci.*, 2015, vol. 16, pp. 2352–2365. DOI: 10.3390/ijms16022352.
8. Krasto A.S., Klimis-Zacas D., Sikalidis A.K. *Antioxidants*, 2016, vol. 5, pp. 37–45. DOI: 10.3390/antiox5040037.
9. Yendonova G.B., Antsupova T.P., Zhamsaranova S.D. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2018, no. 1, pp. 137–143. DOI: 10.14258/jcprm.2018012735. (in Russ.).
10. Vetrova Ye.V., Borisenko N.I., Khizriyeva S.S., Bugayeva A.F. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2017, no. 1, pp. 85–91. DOI: 10.14258/jcprm.2017011383. (in Russ.).
11. Jurca T., Vicas L., Marian E., Vicas S., Muresan M. *Farmacia*, 2016, vol. 64, no. 1, pp. 135–142.
12. Zambiasi R.C., Jansen C., Bueno-Costa F.M., Silva S.S.D., Hartwig N. *Int. Food Res. J.*, 2016, vol. 23, no. 6, pp. 2375–2383.
13. Vardanyan L.R., Atabekyan L.V., Ayrapetyan S.A., Vardanyan R.L. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2018, no. 1, pp. 83–88. DOI: 10.14258/jcprm.2018011968. (in Russ.).
14. Cheng A., Yan H., Han C., Chen X., Wang W., Xie C., Qu J., Gong Z., Shi X. *Czech. J. Food Sci.*, 2014, vol. 32, no. 3, pp. 218–225. DOI: 10.17221/257/2013-CJFS.
15. Mandal S., Mandal V., Das A. *Essentials of Botanical Extraction: Principles and Applications*. Academic Press, 2015, 220 p.
16. Arasi M.A.S.A.G., Rao M.G., Bagyalakshmi J. *Ind. J. Pharm. Educat. and Res.*, 2016, vol. 50, no. 3, pp. 218–224. DOI: 10.5530/ijper.50.3.32.
17. Provesan N., Viera V.B., Mello R., Santos R.C.V., Vaucher R., Dressler V.L., Bizzi C.A., Fries L.L.M. *Int. Food Res. J.*, 2017, vol. 24, no. 6, pp. 2526–2533.
18. Yu S., Hongkun X., Chenghai L., Chai L., Xiaolin S., Xianzhe Z. *Int. J. Agric & Biol. Eng.*, 2016, vol. 9, no. 6, pp. 186–199. DOI: 10.3965/j.ijabe.20160906.2724.
19. Zhu Z., Guan Q., Guo Y., He J., Liu G., Li S., Barba F.J., Jaffrin M.Y. *Int. Agrophys.*, 2016, vol. 30, pp. 113–122. DOI: 10.1515/intag-2015-0066.
20. Yeremeyeva N.B., Makarova N.V. *Izvestiya vuzov. Pishchevaya tekhnologiya*, 2017, no. 5–6, pp. 47–50. (in Russ.).
21. Yeremeyeva N.B., Makarova N.V. *Vestnik MGTU*, 2017, vol. 20, no. 3, pp. 600–608. DOI: 10.21443/1560-9278-2017-20-3-600-608. (in Russ.).
22. Alfaro S., Mutis A., Palma R., Quiroz A., Seguel I., Scheuermann E. *J. Soil Sci. and Plant Nutr.*, 2013, vol. 13, no. 1, pp. 67–78. DOI: 10.4067/S0718-95162013005000007.

* Corresponding author.

23. Rop O., Řezníček V., Mlček J., Juríková T., Balík J., Sochor J., Kramářová D. *Hort. Sci.*, 2011, vol. 38, no. 2, pp. 63–70. DOI: 10.17221/99/2010-HORTSCI.
24. Wang B.C., He R., Li Z.M. *Food Technol. Biotechnol.*, 2010, vol. 48, no. 1, pp. 42–49.
25. Radovanović B.C., Anđelković A.S.M., Radovanović A.B., Anđelković M.Z. *Trop. J. Pharm. Res.*, 2013, vol. 12, no. 5, pp. 813–819. DOI: 10.4314/tjpr.v12i5.23.
26. Brito A., Areche C., Sepúlveda B., Kennelly E.J., Simirgiotis M. *Molecules*, 2014, vol. 19, pp. 10936–10955. DOI: 10.3390/molecules190810936.
27. Zheleva-Dimitrova D., Zhelev I., Dimitrova-Dyulgerova I. *Free Rad. and Antiox.*, 2011, vol. 1, no. 4, pp. 15–20. DOI: 10.5530/ax.2011.4.4.
28. Tsao R. *Nutrients*, 2010, vol. 2, pp. 1231–1246. DOI: 10.3390/nu2121231.
29. Mierziak J., Kostyn K., Kulma A. *Molecules*, 2014, vol. 19, pp. 16240–16265. DOI: 10.3390/molecules191016240.
30. De Souza V.R., Pereira P.A., da Silva Th.L.T., Lima L.C.O., Pio R., Querioz F. *Food Chem.*, 2014, vol. 156, pp. 362–368. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.01.125.
31. Kamiloglu S., Capanoglu E., Grootaert Ch., Van Camp J. *Int. J. Mol. Sci.*, 2015, vol. 16, pp. 21555–21574. DOI: 10.3390/ijms160921555.
32. Mishra K., Ojha H., Chaudhury N.K. *Food Chem.*, 2012, vol. 130, pp. 1036–1043. DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.07.127.
33. Pokorna J., Venkutonis P.R., Kraujalyte V., Kraujalis P., Dvořák P., Tremlova B., Kopřiva V., Ošťádalová M. *Acta Alimen.*, 2015, vol. 44, no. 3, pp. 454–460. DOI: 10.1556/066.2015.44.0017.
34. Vuthijumnonk J., Heyes J.A., Molan A.L. *Int. Food Res. J.*, 2016, vol. 23, no. 2, pp. 515–520.
35. Alam N.Md., Bristi N.J., Rafiquzzaman Md. *Saudi Pharm. J.*, 2013, vol. 21, pp. 143–152. DOI: 10.1016/j.jsps.2012.05.002.
36. Vieira V., Prieto M.A., Barros L., Coutinho J.A.P., Ferreira O., Ferreira I.C.F.R. *Ind. Crops & Prod.*, 2017, vol. 107, pp. 341–352. DOI: 10.1016/j.indcrop.2017.06.012.

Received September 19, 2018

Revised July 11, 2019

Accepted October 22, 2019

For citing: Makarova N.V., Yeremeyeva N.B. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2020, no. 1, pp. 167–177. (in Russ.). DOI: 10.14258/jcprm.2020014425.

