

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

імені В.Н. КАРАЗІНА

Біологічний факультет

Кафедра молекулярної біології та біотехнології

**РОЗРОБКА ТЕХНОЛОГІЙ ОТРИМАННЯ ПОЛІФЕНОЛЬНИХ
СПОЛУК З СОНЯШНИКОВОГО ШРОТУ ТА ЇХ ХАРАКТЕРИСТИКА**

Допущена до захисту

Кваліфікаційна робота

«__»_____2023р.

студента 4 курсу, кафедри молекулярної

біології та біотехнології, група БТЗ-41,

Пасічника Владислава Романовича

Науковий керівник:

д.б.н., проф. Божков Анатолій Іванович

Завідувач кафедри

д.б.н., проф. Божков Анатолій Іванович

Голова ЕК _____

Оцінка «_____»

«__»_____2023р

Харків 2023

АНОТАЦІЯ

Пояснювальна записка до дипломної роботи «Розробка технологій отримання поліфенольних сполук з соняшникового шроту та їх характеристика»: 84 с., 15 рис., 15 схем, 8 табл., 50 літературних джерел.

Об'єкт дослідження: комплексне дослідження технологій отримання поліфенольних сполук з соняшникового шроту.

Мета роботи: є розробка технології отримання поліфенольних сполук з соняшникового шроту.

Методи дослідження: фізико-хімічні, аналітичні, статистичні, математичні, порівняльний аналіз, обробка літературних джерел.

Результати дипломної роботи рекомендується використовувати під час проведення наукових досліджень та в практичній діяльності фахівців-екологів, біохіміків і хіміків.

Ключові слова: ПОЛІФЕНОЛИ, РОСЛИННІ ДЖЕРЕЛА, СОНЯШНИКОВИЙ ШРОТ, ТЕХНОЛОГІЇ ОТРИМАННЯ, МЕТОДИ ЕКСТРАКЦІЇ.

ABSTRACT

Explanatory note to the thesis "Development of technologies for obtaining polyphenolic compounds from sunflower meal and their characteristics": 84 pages, 15 figures, 15 schemes, 8 tables, 50 literary sources.

The object of the research: a comprehensive study of technologies for obtaining polyphenolic compounds from sunflower meal.

The purpose of the work: to develop a technology for obtaining polyphenolic compounds from sunflower meal.

Research methods: physico-chemical, analytical, statistical, mathematical, comparative analysis, processing of literary sources.

The results of the thesis are recommended to be used during scientific research and in the practical activities of ecologists, biochemists and chemists.

Key words: POLYPHENOLS, PLANT SOURCES, SUNFLOWER MEAL, PRODUCTION TECHNOLOGIES, EXTRACTION METHODS.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АФК – активні форми кисню

UV-A – діапазон довгохвильового ультрафіолетового випромінювання

UV-B – діапазон середньохвильового ультрафіолетового випромінювання

WBSSH – Уайт–Бейт–Сміт–Свейн–Хаслам

SET – одноелектронний перенос електронів

BDE – енергія дисоціації зв'язку

ТШХ – тонкошарова хроматографія

БАР – біологічно активні речовини

SFM – соняшниковий шрот

ЦКОП – центральне композиційне ортогональне планування другого порядку

ХГК – хлорогеновая кислота

ECGC – епігалокатехін-3-галлат

ШКТ – шлунково-кишковий тракт

UPE – метод фотонної емісії

ЗМІСТ

ВСТУП.....	7
РОЗДІЛ 1. ПОЛІФЕНОЛЬНІ СПОЛУКИ СПОСОБИ ЇХ ОТРИМАННЯ.....	9
1.1. Історія відкриття поліфенольних сполук та їх застосування	15
1.2. Природні джерела вмісту поліфенольних сполук.....	21
1.3. Способи отримання поліфенолів та їх властивості.....	30
РОЗДІЛ 2. ТЕХНОЛОГІЯ ОТРИМАННЯ ПОЛІФЕНОЛІВ З СОНЯШНИКОВОГО ШРОТУ	41
2.1. Аналіз соняшникового шроту	41
2.2. Основні способи виділення поліфенольних сполук з шроту	47
2.3. Розробка та ефективність технології виділення поліфенольних сполук з соняшникового шроту.....	50
2.4. Оцінка та шляхи ймовірного застосування одержаних поліфенольних сполук	59
РОЗДІЛ 3. ВИДІЛЕННЯ І ОЧИЩЕННЯ ХЛОРОГЕНОВОЇ КИСЛОТИ З СОНЯШНИКОВОГО ШРОТУ	68
3.1. Методи екстракції.....	68
3.2. Вплив кількості екстракцій соняшникового шроту на вихід екстрактивних речовин і хлорогенової кислоти.....	70
3.3. Вплив температури екстракції на вихід хлорогенової кислоти	72
ВИСНОВКИ.....	73
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	74
ДОДАТКИ.....	80

ВСТУП

Поліфеноли – продукти вторинного метаболізму рослин, які широко застосовуються як біологічно активні сполуки у фармакології, медицині, сільському господарстві. Фенольні сполуки зустрічаються у всіх органах різних рослин (плоди, насіння, коріння, кора, деревина і листя). У тканинах рослин ідентифіковано понад 8000 різних фенольних сполук. Широта їх поширення у рослинному світі визначає різноманітність їхньої хімічної структури. Фенольні сполуки існують у рослинах у вигляді мономерів, олігомерів, полімерів та представлені простими фенолами, гідроксибензойними спиртами, альдегідами та кислотами, флавоноїдами, стилбенами, лігнанами та їх похідними, дубильними речовинами та лігніном. Флавоноїди складають один з найчисленніших класів природних фенольних сполук, являючи собою поліфеноли, структурною основою яких служить флавонове ядро, що містить два ароматичних кільця. Залежно від структури ядра виділяють катехіни, лейкоантоціани, антоціани, флавонони, флаволи, флавоноли, халкони і т.д. У зв'язку з цим перспективним є напрям з виявлення закономірностей утримання рослинної сировини фармакологічно важливих складових. Близькість біогенетичних шляхів різних класів поліфенольних сполук передбачає, що вивчення проміжних метаболітів, у тому числі фенолів, може сприяти спрямованому та більш поглибленому аналізу.

Для підприємств, які займаються екстракцією рослинної сировини, зокрема з соняшникового шроту, актуальним є питання раціонального її використання, а саме, максимального вилучення поліфенольних сполук, оптимізації та інтенсифікації технологій для підвищення якості препаратів та підвищення ефективності технологічного процесу.

Метою роботи є розробка технології отримання поліфенольних сполук з соняшникового шроту.

Для досягнення цієї мети були поставлені такі завдання:

1. Дослідити склад і будову поліфенольних сполук, історію відкриття та поширення в природі.
2. Опис розробки технології отримання поліфенольних сполук.
3. Дослідження технології отримання поліфенольних сполук з соняшникового шроту.
4. Характеристика отриманої продукції.

Об'єкт дослідження – комплексне дослідження технологій отримання поліфенольних сполук з соняшникового шроту.

Предмет дослідження – рослинні джерела поліфенольних сполук.

Методи дослідження: фізико-хімічні, аналітичні, статистичні, математичні, порівняльний аналіз, обробка літературних джерел.

Структура та обсяг кваліфікаційної роботи. Робота складається із вступу, трьох розділів, висновків, списку використаних джерел. Робота викладена на 84 сторінках, містить 8 таблиці та 15 рисунків і 15 схем. Список використаних джерел нараховує 50 найменувань.

Розділ 1. . ОГЛЯД І АНАЛІЗ НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1.1. ПОЛІФЕНОЛЬНІ СПОЛУКИ СПОСОБИ ЇХ ОТРИМАННЯ

Поліфенольні сполуки є групою природних сполук, що налічує понад 8000 представників, і цей список постійно поповнюється. Будучи продуктами вторинного метаболізму рослин, поліфенольні сполуки не тільки широко поширені в природі, але також у продуктах, отриманих на основі рослин – червоному вині, меді, чаї, різних плодах та ягодах, насінні, корі та деревині дерев. Хімічно флавоноїди являють собою 15-вуглецевий скелет, що включає два бензойні кільця (А і В), пов'язаних через гетероциклічне піранове кільце (С). Група флавоноїдів налічує кілька класів: флавони, флавоноли, флаванони, катехіни, лейкоантоціани, антоціани, халкони [1].

Різні класи флавоноїдів відрізняються за рівнем окисленості та характером заміщення С-кільця, тоді як окремі представники флавоноїдів усередині кожного класу розрізняються за типом заміщення А- і В-кілець (рис. 1.1). Розподіл флавоноїдів на класи обумовлений особливостями їх біосинтезу в рослинних клітинах, що визначає наявність різних проміжних (халкони, флаванони, флаван-3-оли) та кінцевих (флавони та флавоноли) продуктів метаболізму [2].

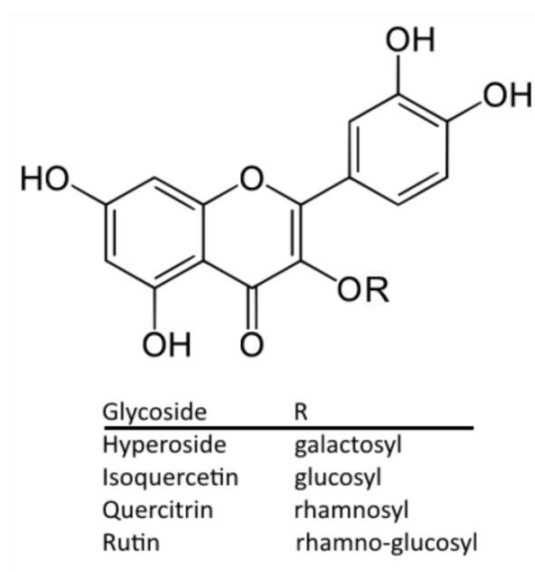


Рис. 1.1. Похідні флавоноїдів

Стильбени – ізомолекулярні ($M_r = 210-270$) сполуки поліфенольної природи, широко поширеними в природі в рослинах: винограді та чорниці. Структурно стильбени мають базовий вуглецевий скелет $C_6-C_2-C_6$, що включає 2 фенільні групи, пов'язані етиленовим містком. Стильбени існують у вигляді ізомерів Е та Z залежно від розташування функціональних груп щодо подвійного зв'язку. Z-форма стильбенів (транс-орієнтація молекул) має більш високий потенціал у реалізації антиоксидантної дії на тваринних моделях. Стильбени ($C_6-C_2-C_6$ -ряд) утворюються з пара-кумарил-КоА та 3 молекул малоніл-КоА за участю ферменту стильбенсинтази, який присутній у деяких рослин [2].

Сполуки що мають дубильні властивості класифікують на (рис.1.2.) При нагріванні з розведеними кислотами вони ущільнюються з утворенням аморфних, нерозчинних у воді полімерних сполук, що мають коричнево-червоне забарвлення. Конденсовані дубильні речовини містяться в корі та деревині дуба, верби, сосни, ялини, модрина, евкаліпта, акації, каштану та ін.



Рис. 1.2. Класифікація дубильних речовин

Основна маса фенольних та поліфенольних сполук походить з гідроксикоричних кислот, які утворюються з фенілаланіну та тирозину. Крім того, джерелом поліфенолів є проміжні сполуки, що виникають на шляху утворення фенілаланіну і тирозину – хінна та шикімова кислоти. З цих кислот утворюються фенольні кислоти та гідролізовані таніни.

Гідроксикоричні кислоти утворюють кумарини, меланіни, беруть участь в утворенні лігніну та В-кільця флавоноїдів. α -Кільце флавоноїдів синтезується з ацетил-СОА (і малонілСОА). Флавоноїди є джерелом конденсованих танінів. Флавоноїди поширені також у вигляді агліконів, глікозидів та метильованих похідних. Базова структура флавоноїдів є аглікон. Шестичленне кільце конденсовано з бензойним кільцем або у вигляді α -пірону (у флавонолів і флавононів), або його дигідропохідного. Поширення в рослинах та типові представники фітоалексинів флавоноїдної природи.

Попередником синтезу флавоноїдів є халкон, який синтезується з *n*-кумарил-СоА та 3 молекул малоніл-СоА під дією ферменту халконсинтази. Конденсовані таніни є полімерами флавоноїдів та утворюються як продукти фенілпропаноїдного метаболізму. Утворення конденсованих дубильних речовин є наслідком окисних реакцій, що каталізуються ферментами фенолоксидазного чи пероксидазного типу. Таніни, що гідролізуються, складаються з залишків галової кислоти, які переважно пов'язані з молекулами гексоз. Галові кислоти у рослин утворюються переважно шикіматним шляхом. Лігнін утворюється при полімеризації 3 монолігнолів: *n*-кумарового, синапового та коніферилового спиртів. Пероксидазне окислення оксикоричних спиртів (званих також монолігнол) відбувається з проміжним утворенням вільних феноксильних (ароксильних) радикалів. Конденсація таких радикалів призводить до утворення димерів (дилігнолів), які знову піддаються атаці пероксидазою, утворюючи вільні димерні радикали. Останні, у свою чергу, залучаються в конденсацію з моно-, ди-або більш високоолігомерними лігнолами, і процес завершується формуванням неупорядкованого тривимірного полімеру, названого лігніном [3].

Фенілаланін-аміак-ліаза (КФ 4.3.1.5) каталізує реакцію дезамінування L-фенілаланіну, що призводить до утворення транскоричневої кислоти. Ця реакція є ключовою у біосинтезі фенольних сполук, оскільки з неї починається утворення більшості поліфенолів у тканинах рослин (рис. 1.3.). Разом з тим вона є сполучною ланкою між первинним та вторинним

метаболізмом, між метаболізмом ароматичних амінокислот та метаболізмом фенольних та поліфенольних сполук. Фенілаланін-аміак-ліаза має сувору субстратну специфічність по відношенню до L-фенілаланіну. У ряді випадків виявлено, що цей фермент здатний дезамінувати не лише L-фенілаланін, але і L-тирозин, ця здатність у більшості вивчених рослин є низькою [4].

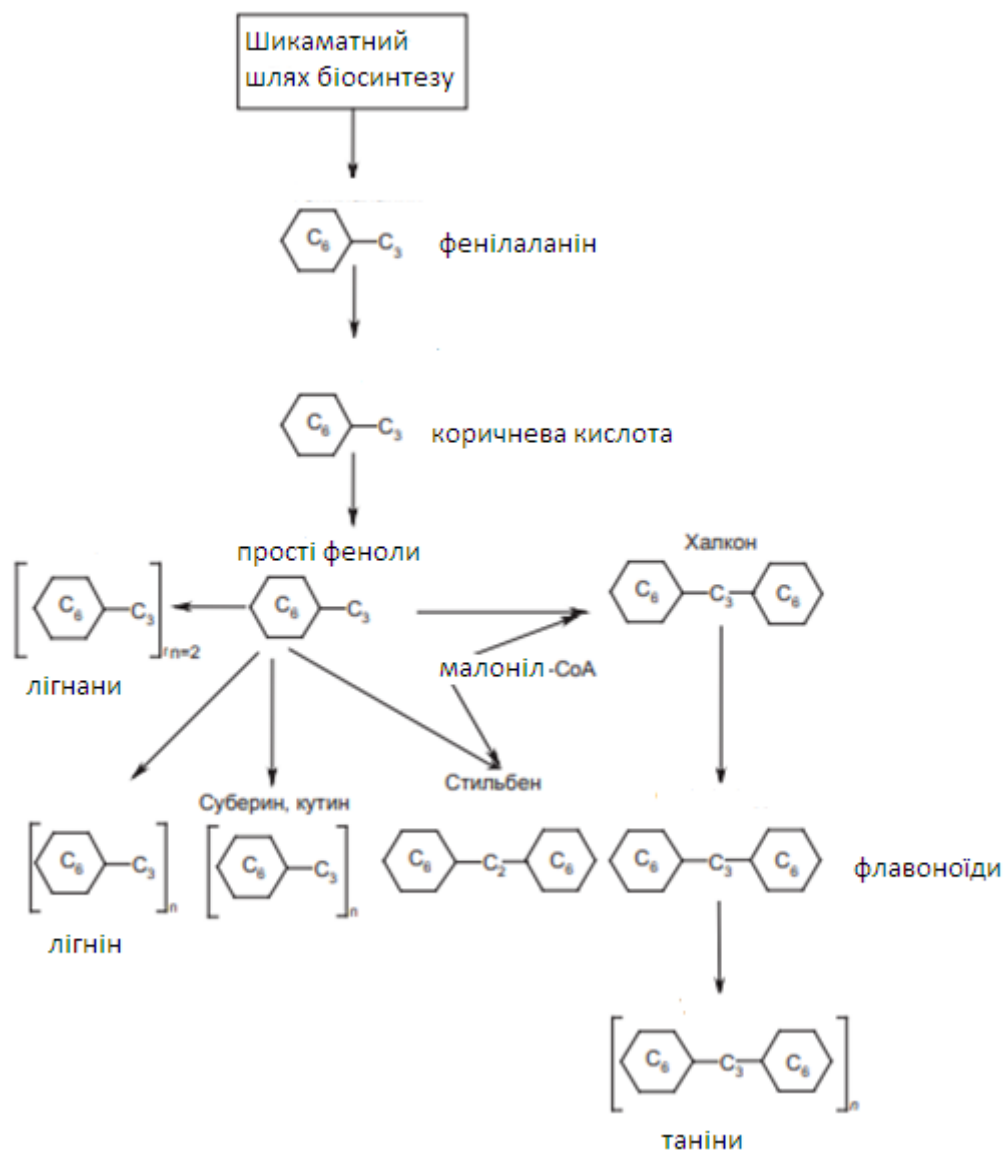


Рис. 1.3. Схема синтезу поліфенолів

У модельних дослідках було показано, що для нормального протікання процесу лігніфікації має присутність у клітинних стінках целюлозних та геміцелюлозних волокон, які служать як би матрицями в ході формування нативного лігніну. Регулювання процесів утворення поліфенольних сполук

здійснюється з використанням зовнішніх впливів: світла, температури, умов мінерального харчування, атаки патогенів. Таким чином, синтез поліфенольних сполук відбувається як в цитозолі, так і в хлоропластах, де існують два незалежні шляхи синтезу ароматичних сполук. На сьогодні повністю доведено функціонування всіх ланок шикіматного шляху у вищих рослин. Однак організація та регулювання шикіматного шляху у рослин має свою специфіку. На відміну від грибів, а також деяких бактерій та водоростей у вищих рослин не вдалося виявити існування міцно пов'язаних мультиферментних комплексів. Що приводить до дослідження суто історичного процесу відкриття поліфенольних сполук та галузей їх застосування.

Еуфорбін – виділений з рослини *E. helioscopia* L., жовтий аморфний порошок, R_f 0.38 (бутанол-оцтова кислота-вода, 40:12:28). УФ-спектр (λ_{max} , нм, MeOH): 220 ($\lg \epsilon$ 4.50), 270 ($\lg \epsilon$ 3.49). У продуктах кислотного гідролізу з 5% H_2SO_4 авторами [4] виявлено глюкозу (1), галову (2) та дилактон валонієвої кислоти (3). У продуктах ступінчастого водного гідролізу виявлено 3-О-галоілглюкозу (3) та 1,2-валонейлглюкоза (4).

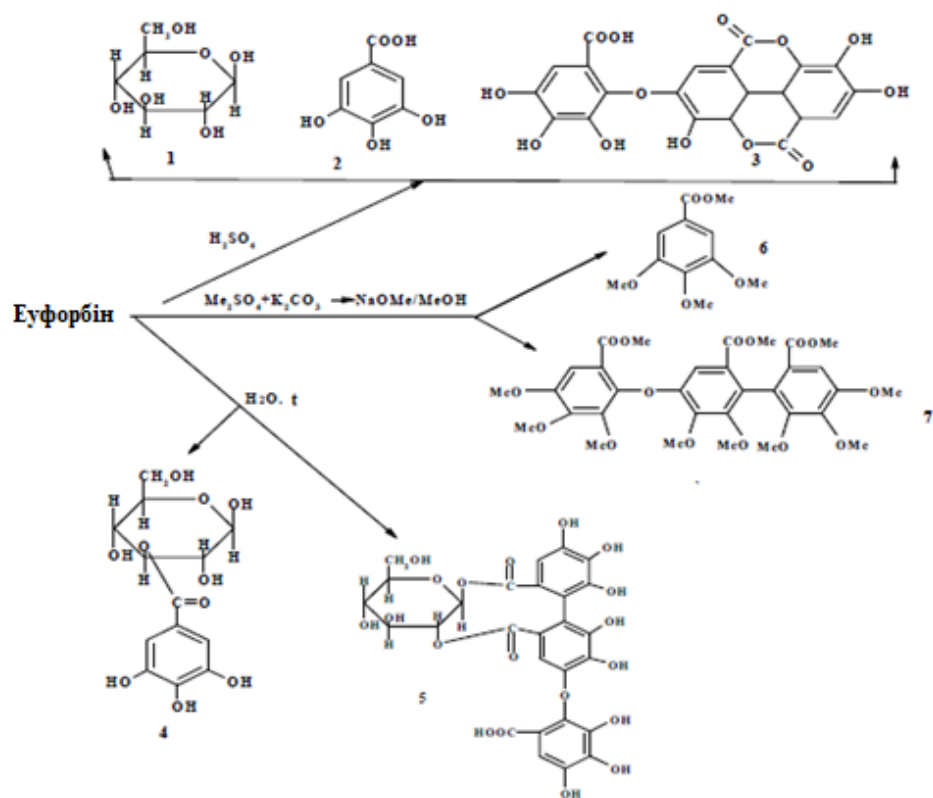


Рис. 1.4. Синтез еуфорбіну

Метилування речовини з диметилсульфатом та безводним K_2CO_3 призводить до утворення перметилату, після лужного гідролізу метанольним розчином метоксиду натрію утворилися метил три-О-метилгаллат (6) (ТШХ, R_f 0.75, система розчинників-3: бензол-ацетон 4:1) та триметил-окта-О-метил-валонієвої кислоти (7) (ТШХ, R_f 0.27: бензол-ацетон 4:1). Мас-спектрометричні дослідження еуфорбіну проводили на мас-спектрометрі Q-TOF LC-MS, в умовах негативної іонізації. Отримані результати наведено на рис 1.5.

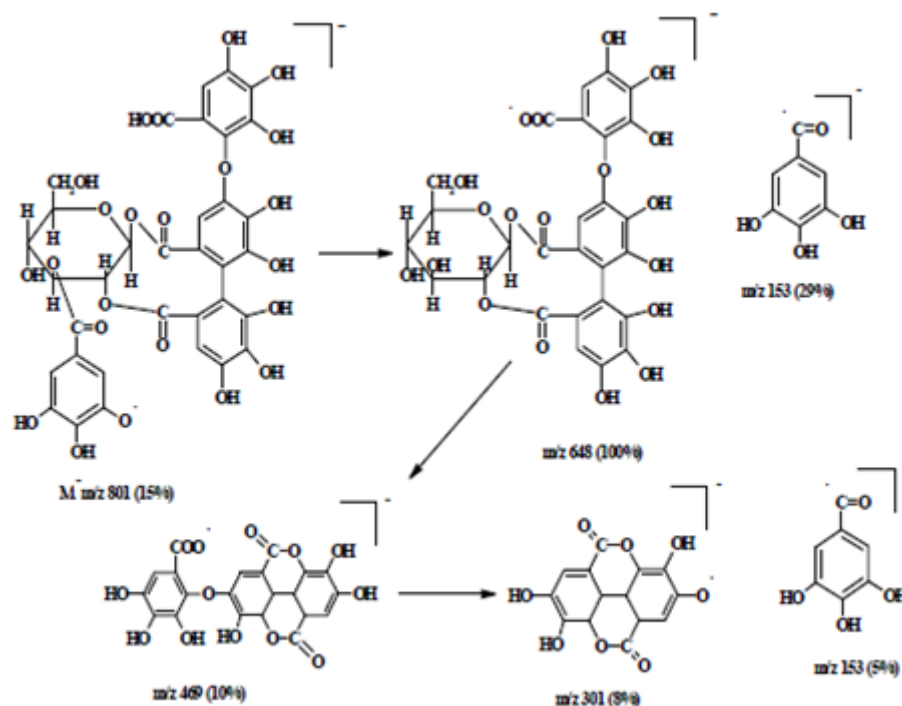


Рис 1.5. Метил три-О-метилгаллат і його розклад

Як видно на схемі, наявність у мас-спектрі сигналу молекулярного іона з m/z 801 ($[M-H]^-$) та інтенсивних осколкових іонних сигналів з m/z 153, 469, утвореного при розпаді свідчить про те, що у складі еллаготанніну міститься галоїльна та валонейльна група. Це вказує на розрив складноефірного зв'язку між глюкозою та галоїльною групою. Вторинний іон з m/z 648 далі розщеплюється на фрагменти з m/z 469. Наявність у мас-спектрі інтенсивного осколкового іонного сигналу з m/z 469, утвореного при розпаді вторинного іона з m/z 648 свідчить про те, що у складі еуфорбіну міститься валонейльна група (рис. 1.6.), що відповідає молекулярній формулі $C_{21}H_{10}O_{13}$.

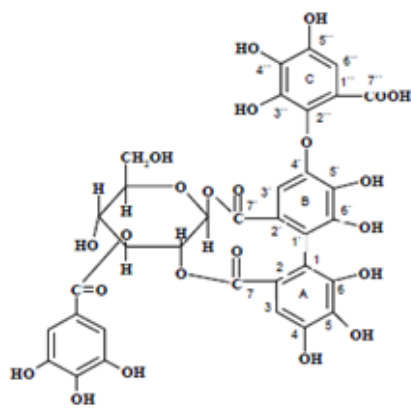


Рис. 1.6. Валонеїльна група еуфорбіну

Аналогічним шляхом із рослин *E. turkestanica* Rgl, *E. jaxartica* Prokh. виділено нові сполуки (рис. 1.7.), структура яких визначена як 2-О-галоїл-4,6-валонеїл- β -D-глюкоза (9), 1,2-ди-О-галоїл-4,6-валонеїл- β -D-глюкоза (10). Еуфорбін ефективно інгібує ВІЛ-інфекцію, ED₅₀ 0.29, індекс селективності IS 1034.

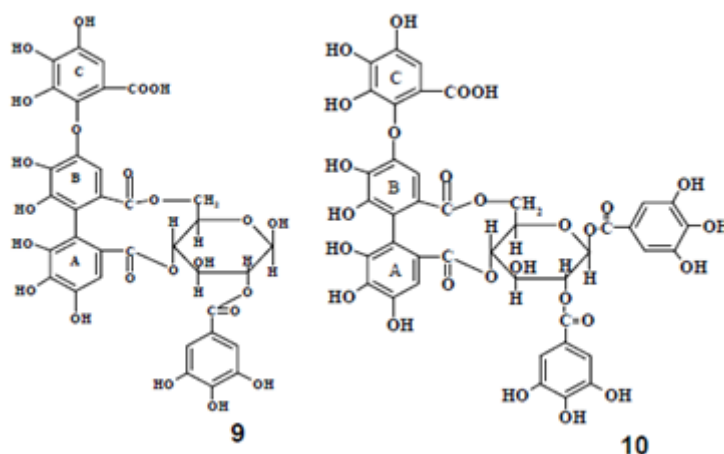


Рис. 1.7. О-галоїл-4,6-валонеїл- β -D-глюкоза (9), і 1,2-ди-О-галоїл-4,6-валонеїл- β -D-глюкоза (10)

1.1. Історія відкриття поліфенольних сполук та їх застосування

Хімічно поліфеноли являють собою групу природних сполук з фенольною структурною особливістю. Це збірний термін для кількох підгруп сполук; проте використання терміну «поліфенол» викликає деяку плутанину, а його хімічні структури часто нечіткі навіть для дослідників [5]. Навіть сьогодні наукове співтовариство не узгоджується з універсальним

використанням терміну, що позначає рослинні поліфеноли, оскільки деякі називають їх «рослинними фенолами», а деякі використовують термін «поліфеноли». За даними [6], використання терміну «поліфеноли» все ще є переважаючим переважно для комерційних цілей. Строго хімічно кажучи, термін «феноли» включають аренове кільце та його гідроксизамісник(и), і згідно з цим поняттям, термін «поліфенол» слід обмежити принаймні структурами, що несуть дві фенольні групи, незалежно від кількості гідроксильних груп, які кожна з них містить.

Визначення рослинних поліфенолів традиційно ґрунтувалося на структурних характеристиках і осадженні білка [7], але в останні роки воно було суттєво переглянуто з урахуванням структурних особливостей і шляхів біосинтезу. Історія поліфенолів та їх визначення показує, що перед тим, як їх називали поліфенолами, ці натуральні продукти рослинного походження в усьому світі називали «рослинними танінами» внаслідок їх використання з різних рослинних екстрактів при перетворенні шкур тварин на шкіру. Перше визначення «рослинних поліфенолів» в науковій літературі стосується цього початкового використання поліфенольних рослинних екстрактів. Оскільки ці сполуки були дуже потрібні в шкіряній промисловості, значні зусилля з початку 20-го століття були присвячені вивченню хімії дубильних рослинних екстрактів у спробі впоратися зі їх структурною характеристикою поліфенольних складових.

Дослідження рослинних поліфенолів змінилося після 1945 року, через відкриття паперової хроматографії та інших передових аналітичних методів, що дозволило відокремити їх численні окремі компоненти [8]. У 1957 році промисловий хімік Теодор Уайт зазначив, що термін «танін» повинен суворо стосуватися рослинних поліфенольних матеріалів, що мають молекулярні маси від 500 до 3000 (Da) і досить великі кількості фенольних груп, здатних утворювати зшиті водневими зв'язками структури з молекулами колагену (акт дублення).

Вибух дослідження поліфенолів призвів до заснування в 1957 році групи рослинних фенолів двома піонерами в цій області, Е. С. Бейт-Смітом і Тоні Суейном (Swain). У 1962 році Бейт-Сміт і Суейн придумали свою власну пропозицію щодо визначення рослинних поліфенолів як «водорозчинних фенольних сполук», які мають молекулярну масу від 500 до 3000 (Da) і, крім того, дають звичайні фенольні реакції, вони мають особливі властивості, такі як здатність осаджувати алкалоїди, желатин та інші білки з розчину». Це визначення пізніше було уточнено на молекулярному рівні Едвіном Хасламом, який розширив визначення Бейта-Сміта, Суейна та Уайта, щоб термін «поліфеноли» використовувався як дескриптор для водорозчинних рослинних фенольних сполук які мають молекулярні маси від 500 до 3000–4000 (Da) і мають 12–16 фенольних гідроксигруп та 5-7 ароматичних кілець на 1000 (Da) відносної молекулярної маси. Фокусний критерій, з якого Уайт, Бейт-Сміт, Суейн і Хаслам (WBSSH) спочатку заснували свою класифікацію рослинних фенолів як «поліфеноли», які перш за все здатність брати участь у комплексоутворенні з іншими біомолекулами. Однак це визначення було ще недостатньо точним, оскільки відповідно до нього поліфенольні речовини поділялися б лише на три класи полігідроксифенілвмісних натуральних продуктів, які відповідають обмеженням з початкового визначення. Беручи до уваги всі хімічні міркування, Кідо з співробітниками [5] запропонував нове визначення поліфенолів: «Термін «поліфенол» слід використовувати для визначення вторинних метаболітів рослин, отриманих виключно з фенілпропаноїдів, похідний шикімату, або полікетидний шлях(и), що включає більше одного фенольного кільця і позбавлений будь-якої функціональної групи на основі азоту у їх найосновнішому структурному вираженні».

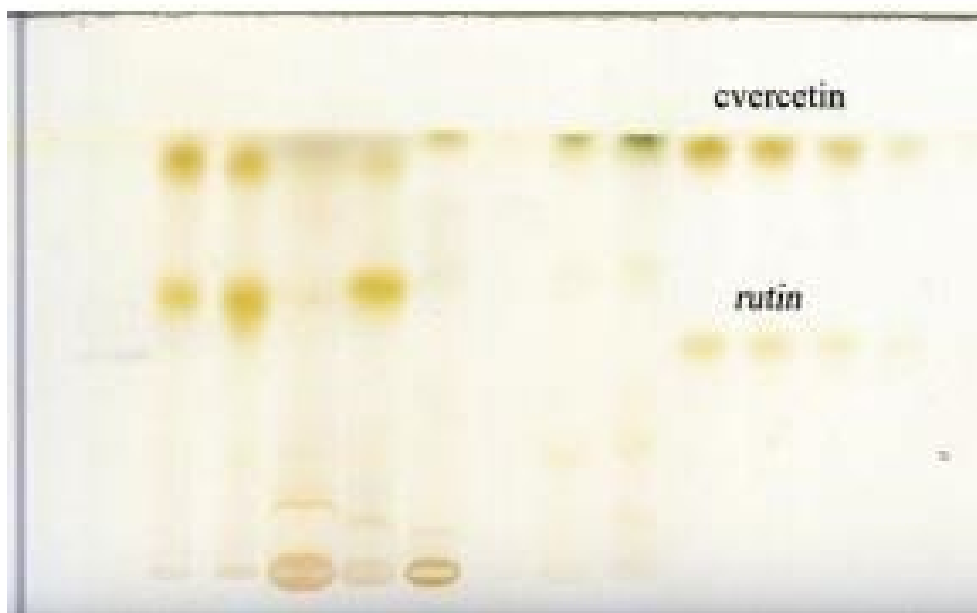


Рис. 1.8. Метод ТШХ визначення поліфенолів в екстрактах суцвіть *T. Patula* [9] [ссілка на рисунок по тексту](#) и [ссілка откуда взят этот рисунок](#)

Було ідентифіковано кілька тисяч різних поліфенольних сполук (серед них понад 8150 флавоноїдів) із широким спектром структур. За допомогою методу ТШХ авторам [9] вдалося виявити у дослідних зразках суцвіть *T. patula* кверцетин та його глікозид рутин (рис. 1.8). Різноманітність і широке поширення поліфенолів у рослинах призвели до різних способів класифікації цих природних сполук, як можна побачити в додатку А. Поліфеноли були класифіковані за джерелом походження, природним розподілом, біологічною функцією та хімічною структурою. За поширенням у природі фенольні сполуки можна розділити на три класи: малопоширені (як прості феноли, пірокатехін, гідрохінон, резорцин, альдегіди бензойної кислоти, що входять до складу ефірних масел, такі як ванілін), широко поширені (поділяються на флавоноїди та їх похідні, кумарини та фенольні кислоти, такі як бензойна та корична кислоти та їх похідні), та полімери (таніни та лігніни) [10].

Що стосується розташування в рослині (вільний у розчинній фракції клітини або зв'язаний з сполуки клітинної стінки), а також хімічну структуру цих речовин, фенольні сполуки також можна класифікувати як: прості

феноли (флавоноїди та дубильні речовини низької та середньої молекулярної маси, не зв'язані з мембранними сполуками) та по суті складаються з фенолів (конденсованих дубильних речовин, фенольних кислот та інших фенольних сполук низької молекулярної маси, пов'язані з полісахаридами або білками клітинної стінки утворюючи нерозчинні стійкі комплекси). Ця класифікація корисна з точки зору харчування з точки зору такої міри, що метаболічна доля в шлунково-кишковому тракті та фізіологічні ефекти кожної групи значною мірою залежатимуть від їхніх характеристик розчинності.

Нерозчинні фенольні сполуки не перетравлюються та можуть бути частково або повністю відновлені кількісно в калі, тоді як частина розчинних може подолати кишковий бар'єр і виявлятися в крові в незміненому вигляді або у вигляді метаболітів [11]. Найчастіше поліфеноли класифікують за хімічним складом структури агліконів. Однак, дотримуючись цього принципу, поліфенольні сполуки можна класифікувати різними способами. Відповідно до їх вуглецевого ланцюга, у 1989 році Харборн [12] розділив фенольні сполуки на 16 основних класів: прості феноли (C_6 скелет), бензохінони (C_6 скелет), фенольні кислоти (C_6-C_1 скелет), ацетофенони (C_6-C_2 скелет), фенілоцтові кислоти (C_6-C_2 скелет), гідроксикоричні кислоти (C_6-C_3 скелет), фенілпропени (C_6-C_3 скелет), кумарини та ізокумарини (скелет C_6-C_3), хромони (скелет C_6-C_3), нафтохінони (скелет C_6-C_4), ксантони (скелет $C_6-C_1-C_6$), стильбени (скелет $C_6-C_2-C_6$), антрахінони (скелет $C_6-C_2-C_6$), флавоноїди (скелет $C_6-C_3-C_6$), лігніни ($(C_6-C_3)_n$), лігнани та неолігнани (скелет $(C_6-C_3)_2$).

Крім цієї хімічної класифікації, дослідники використовують класифікацію, засновану на кількості фенольних кілець, які вони містять, і структурні елементи, які зв'язують ці кільця одне з одним. Однак деякі автори також мають дещо різні тлумачення поліфенольних класів, що призводить до незначних відмінностей у списку поліфенольних груп. Наприклад, D'Archivio та співавтори у 2007 році перерахували п'ять класів поліфенолів: флавоноїди, фенольні кислоти, фенольні спирти, стильбени та

лігніни [13]. Манах та ін. [14] визначає чотири різні поліфенольні групи: фенольні кислоти, флавоноїди, стилбени і лігнани; тоді як Хан та ін. [15], окрім фенольних кислот, флавоноїдів та стилбенів також перераховують диферулоїлметан і таніни як окремі класи поліфенолів. Основна класифікація поліфенолів включає п'ять основних класів поліфенолів: фенольні кислоти, флавоноїди, стилбени, лігнани та інші [16].

Флавоноїди є найбільш поширеними поліфенольними сполуками в рослинній їжі та також найбільш вивчені [17]. За ступенем гідроксилування та наявності подвійного зв'язку C_2-C_3 у гетероциклічному піроновому кільці, флавоноїди можна розділити на 13 класів, найважливіші представлений флавонолами, флаванолами, флавонами, ізофлавонами, антоціанідинами або антоціани та флаванони [18]. У межах цих класів існує багато структурних варіацій відповідно до ступеня гідрогенізації та гідроксилування трикільцевих систем цих сполук. Флавоноїди також зустрічаються як сульфатовані та метильовані похідні, кон'юговані з моносахаридами та дисахаридами і утворює комплекси з олігосахаридами, ліпідами, амінами, карбоновими кислотами та органічні кислоти, відомо приблизно 8000 сполук [19].

Фенольні кислоти – це сполуки, що характеризуються наявністю бензольного кільця, карбонової групи та однієї або декількох гідроксильних та метоксилових груп у молекулі [20]. Ці сполуки можна розділити на дві групи: бензойні кислоти і коричневі кислоти та їх похідні. Бензойна кислота має сім атомів вуглецю (C_6-C_1) і є найпростішими фенолокислотами, які зустрічаються в природі. Коричні кислоти мають дев'ять атомів вуглецю (C_6-C_3) і рідко зустрічаються у вільній формі в рослинах. Вони є як правило, у формі складних ефірів разом із циклічною спиртовою кислотою, такою як хінна кислота утворюють ізохлорогенову кислоту, неохлорогенову кислоту, криптохлорогенову кислоту та хлорогенову кислоту, кофейний ефір, який є найважливішою комбінацією. За даними Yang et al. [20], фенольні кислоти

складають приблизно одну третину фенольних кислотних сполук в раціоні людини і характеризуються чудовою антиоксидантною діяльністю.

Лігнани утворюються з двох фенілпропанових ланок. Найбагатшим харчовим джерелом є насіння льону, який містить секоізоларицирезінол (до 3,7 г/кг сухої маси) і низьку кількість матаірезінолу. Інші зернові, фрукти та деякі овочі також містять сліди цих самих лігнанів, але концентрації в насінні льону до 1000 разів вищі, ніж концентрації в цих інших джерелах їжі [21]. Стилбени містяться в раціоні людини лише в невеликих кількостях. Один із них, ресвератрол, для якого під час скринінгу лікарських засобів було показано антиканцерогенну дію рослин і який був широко вивчений, міститься у невеликих кількостях у вині (0,3–7 мг агліконів/л і 15 мг глікозидів/л у червоному вині).

Сучасні методи [22] поділу фенольних сполук на окремі компоненти використовують методи LC-MS на хроматографі Agilent 1200 3D LC System Technologies (США), який укомплектований діодноматричним G1325C та рефрактометричним G1362A детектор.

1.2. Природні джерела вмісту поліфенольних сполук

Лікарські рослини містять різноманітні біологічно активні речовини, що забезпечують комплексний багатосторонній вплив на організм людини. Особливою увагою користуються рослини, що містять поліфенольні з'єднання. Рослини роду верба (*Salix*) сімейства вербові (*Salicaceae*) широко поширені у флорі України, мають великі сировинні запаси, що здавна використовуються в народній медицині та вважаються перспективним джерелом отримання біологічно активних речовин (БАР) широкого спектра дії. В вербах міститься цілий комплекс БАР: фенольні глікозиди, флавоноїди, дубильні речовини конденсованої природи, кумарини, саліцилати, аскорбінова кислота, сапоніни, ефірні олії, амінокислоти, полісахариди. Найбільший інтерес представляє значну кількість природних поліфенольних сполук у сировині, які зумовлюють знеболювальну, жарознижувальну,

антиоксидантну, протизапальну, антимікробна, спазмолітична, нейропротекторна дія, Р-вітамінну активність.

Відомо, що природні речовини, зокрема фенольні сполуки є доступним джерелом для створення різних лікарських препаратів із широким спектром біологічної дії. Продовжуючи дослідження хімічного складу різних сортів бавовнику *Gossypium hirsutum* L., вивчені фенольні сполуки двох сортів – С-6524 та «Омад», що культивуються на території Республіки Узбекистан [23]. Послідовною екстракцією листя бавовнику хлороформом, 70% водним ацетоном, концентруванням екстракту під вакуумом до видалення ацетону, обробкою водного залишку етилацетатом, згущенням етилацетатного екстракту під вакуумом та додаванням до концентрату гексану, виділили суми поліфенолів. Вихід становив – 3,9% від сухої маси сировини. Суми поліфенолів піддали хроматографуванню на колонці із силікагелем (silica gel 200/300 mesh), використовуючи систему MeOH:H₂O. Отримали кілька фракцій, кожна з яких містить різні поліфеноли. Рехроматографування окремих фракцій на колонці ODS Develosil (MeOH:H₂O) та поділом їх за допомогою гель-фільтрації (LH-20), отримали фракції, що містять але 2-4 компоненти. Далі отримані фракції були розділені за допомогою ВЕРХ (Agilent 1200) на препаративній колонці та очищені. В результаті було виділено кілька флавоноїдів, які раніше не виділялися з цих рослин: (I) 4',5',7-тригідроксифлавоон (апигенін), (II) кемпферол 3-О-глюкоза (астрагалін), (III) 3',4',5,7-тертрагідроксифлавоон (лютеолін) та (IV) 3,3',4',5,5',7-гексагідроксифлавоон (міріцетин) [22].

Таблиця 1.1

Вміст поліфенолів у траві астранції великої []

Сполука	Концентрація, мг/кг	Площа піку
Гіперозид	3.84	40.50
Рутин	151.28	428.73

Ізокверцитрин	22.43	112.76
Лютеолін	5.54	37.52
Кверцетин	108.01	489.01

Поліфеноли належать до найпоширеніших класів метаболітів у природі їх поширення є майже повсюдним [23]. Поліфеноли є поширеними складовими харчових продуктів рослинного походження; кілька тисяч молекул, що містять поліфенольну структуру були ідентифіковані у вищих рослин, і кілька сотень знайдено в їстівних рослинах. Фенольні сполуки рідко зустрічаються в бактеріях, грибах і водоростях. Склад рослинних поліфенолів дуже різноманітний як якісно, так і кількісно; в той час як деякі сполуки широко поширені, інші обмежені до певних родин або видів (наприклад, ізофлавоноїди в бобових). Різноманітність поліфенолів в фруктах та рослинній їжі була ретельно переглянута, так авторами [24] досліджено кількісний склад поліфенолів у траві астранції великої, хроматографічні спектри наведені в додатку В і в табл. 1.1.

Інтерес до поліфенольних сполук в даний час величезний, що значною мірою обумовлено їх високою біологічною активністю. Рослинні поліфеноли успішно використовуються у фармакології як речовини, що володіють капіляророзміцнювальною, нейрорегуляторною, імуномодулюючою та протипухлинною активністю. Багато флавоноїдів, які в даний час все частіше називають «біофлавоноїдами», здатні нормалізувати проникність капілярів і служити синергістами вітаміну С. Поліфенольні сполуки рослинного походження надзвичайно різноманітні за своєю структурою та властивостями. Вони беруть участь у процесах дихання, фотосинтезу, формування клітинних стінок, трансдукції енергії світла, адаптації та захисту рослин від багатьох стресових дій. Відзначено та їх зростання регулюючу активність.

Поліфенольні сполуки відіграють важливу роль у житті рослин, виконуючи функції месенджерів у взаємодії рослини та навколишнього середовища. Ці сполуки здатні регулювати рух фітогормону ауксину, створюючи його градієнт у клітинах рослин та викликаючи таким чином формування різних морфоанатомічних фенотипів. Наприклад, затінені рослини, багаті кемпферолом або похідними апігеніну, мають довгі міжвузля та велику листову пластинку у поєднанні із зменшеною товщиною листя, що дозволяє їм ефективно використовувати сонячну радіацію. В основі такої регуляції лежить взаємодія поліфенолів з глікопротеїнами плазматичної мембрани, залученими до руху ауксину з клітини в клітину. Поліфеноли у рослинах виступають також біомаркерами абіотичного стресу. Вплив абіотичних стресорних чинників на рослину призводить до розвитку окислювального стресу, який, своєю чергою, призводить до генерації надлишкових кількостей активних форм кисню (АФК). Здатність поліфенолів поглинати сонячне світло при довжинах хвиль, що відповідають діапазону довгохвильового (UV-A) і середньохвильового (UV-B) ультрафіолетового випромінювання, пригнічує продукцію АФК, що індукується ним. Ця здатність до гасіння АФК строго залежить від природи замісників у фенольних кільцях сполук. Дигідроксипохідні В-кільця мають більшу антиоксидантну активність, у той час як моногідроксипохідні мають значний потенціал поглинання АФК, генерованих в ході сонячної радіації.

Ці властивості поліфенолів при надмірному сонячному опроміненні забезпечують рослинам захист механізму оптичного екранування УФ-випромінювання. Аналіз спектрів поглинання екстрактів шкірки плодів, адаптованих до сильного світла, показав, що флавоноли, представлені головним чином, глікозидами кверцетину і антоціанами, істотно поглинають світло при 400-420 нм, забезпечуючи поряд з хлорофілом і каротиноїдами, захист клітин. Антиоксидантна активність поліфенолів у рослинних клітинах, обумовлена здатністю до гасіння АФК, була нещодавно підтверджена. Виявлено, що поліфеноли локалізовані в ядрах клітин мезофілу та

хлоропластах, де відбувається первинна продукція агресивних форм АФК, включаючи гідроксильні радикали та синглетний кисень. В ході різних стресових впливів (посухи, засоленості ґрунтів, високо- та низькотемпературного стресів, обмеження живлення) відбувається також обмежена дифузія вуглекислого газу до сайтів карбоксилювання, необхідна для ефективного протікання фотосинтезу. У цих умовах відбувається значне зниження рівня антиоксидантних ферментів у хлоропласті, що компенсується зростанням синтезу АФК-детоксифікуючих поліфенолів. Відомо також про взаємодію ряду флавоноїдів, зокрема рутину, безпосередньо з головками мембранних фосфоліпідів, що призводить до підтримки цілісності мембран при оксидативному впливі. Фітоалексини флавоноїдної та стильбенової природи беруть активну участь у реакціях фітоімунітету. Показано, що інфікування злакових рослин патогенними грибами роду *Puccinia* пригнічувалося при збільшенні концентрації глікозидів флавоноїдів апігеніну та лютеоліну. Крім того, на початкових етапах інфікування рослин жита спорами *Puccinia graminis* спостерігалось збільшення вмісту поліфенольних глікозидів майже на 50%, а при інфікуванні рослин септоріозним грибом *Septoria nodorum* відбувалося специфічне новоутворення фітоалексинів флавоноїдної природи. Поліфеноли у рослин також виконують роль транскрипційних регуляторів.

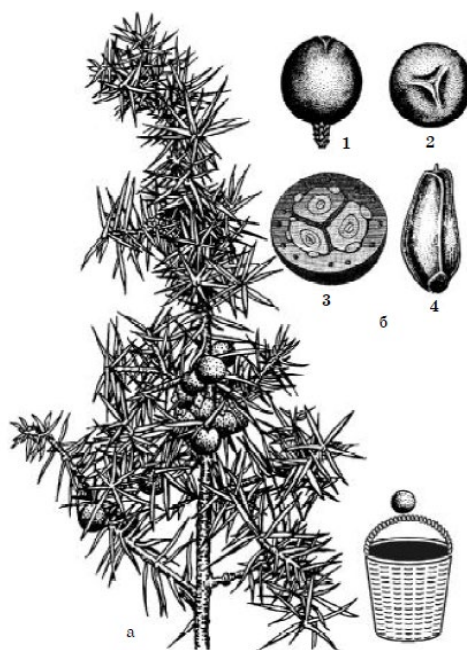


Рис. 1.9. Ялівець звичайний: а – зовнішній вигляд; б – “плоди” ялівцю: 1 – вигляд збоку; 2 – вигляд трипроменевого шва зверху; 3 – плід у розрізі; 4 – насіння

Накопичення поліфенолів у ядрах клітин було відзначено у цілого ряду видів: арабідопсису (*Arabidopsis thaliana*), ріпаку (*Brassica napus*), жовтохвоста (*Flaveria chloraefolia*), ялини (*Picea abies*) (рис. 1.9), канаської тсуґи (*Tsuga canadensis*). Передбачається, що поліфеноли можуть захищати ДНК від УФ-випромінювання та окисного руйнування, а також здійснювати прямий або опосередкований контроль транскрипції генів, необхідних для росту та розвитку рослини, у тому числі кодують білки-транспортери фітогормону ауксину. Флавоноїдні та стильбенові фітоалексини синтезуються у рослинних організмах у відповідь на розвиток мікробної інфекції, тому виявлення у них бактерицидної активності.

Екстракти цілого ряду рослин, багатих флавоноїдами, мають потужний антибактеріальний ефект. Серед поліфенолів з бактерицидною активністю були відзначені апігенін, галангін, флавіон і флавонолові глікозиди, а також флаванони та ізофлаванони. Робінетин, міріцетин та епігалокатихін мають здатність інгібувати синтез ДНК у протеях *Proteus vulgaris*. Бактерицидна дія

кверцетину та апігеніну на культуру *Escherichia coli* обумовлена інгібуванням ДНК-гірази. В останні роки все більшої актуальності набувають дослідження, спрямовані на боротьбу з інфекційними агентами, що утворюють біоплівки, зокрема збудниками туберкульозу (*Mycobacterium tuberculosis*), інфекцій верхніх дихальних шляхів (*Streptococcus pneumoniae*) і статевої сфери (*Neisseria gonorrhoeae*), що характеризуються високою мультирезистентністю до широкого числа антибіотиків. Деякі поліфенольні сполуки, зокрема, епікатехінгалат та "поліфеноли червоного вина" (кверцетин, фітезин, кемпферол, апігенін, хризин, лютеолін, ресвератрол) ефективно пригнічували зростання біоплівок, утворених *Staphylococcus aureus*. Флавоноїди з плодів цитрусових (нарингенін, кверцетин, синенсетин і апігенін) порушували міжклітинні взаємодії і таким чином перешкоджали утворенню біоплівок у *E. coli*.

Для аналізу дубильних речовин автори подрібнювали сировину до 2,00 г (точна наважка), поміщали в колбу на 100 мл, екстрагували 50 мл бідистильованої води протягом 30 хв на киплячій водяній лазні зі зворотним холодильником. Отриманий витяг фільтрували і після охолодження кількісно переносили в мірну колбу на 100 мл, розчин доводили до мітки бідистильованою водою [24]. Для аналізу гідроксикоричних кислот, кумаринів та флаваноїдів зразок сировини ретельно подрібнювали, відбирали близько 1,0-2,0 г (точна наважка), поміщали в круглодонну колбу об'ємом 100 мл, екстрагували 50 мл 60 % розчину метанолу протягом 15 хвилин на киплячій водяній бані зі зворотним холодильником при перемішуванні. Дослідження проводили методом зворотно-фазної хроматографії на хроматографічній колонці SupelcoDiscovery C18 розміром 250 × 4,6 мм з сорбентом: силікагель, модифікований октадецильними групами, з діаметром зерен 5 мкм. Об'єми проб 5-20 мкл. Використовували градієнтний режим елюювання, діапазон детектування 190-400 нм, довжина хвилі: 255, 280 нм. (флаваноїди та дубильні речовини), 320, 330 нм (гідроксикоричні кислоти). Результати досліджень наведено в таблиці 1.2.

Поліфенольні сполуки коренів люпину багатolistого

№	речовини і їх характеристики	загальна формула	Т. пл., °C	концентрація	
				мкг/мкл	%
1	2	3	4	5	6
гідроксикоричневі кислоти					
1	хлоргексанова кислота	$C_{16}H_{18}O_9$	203-205	27.26	0.11
кумарини					
1	кумарин	$C_9H_6O_2$	67-68	162.53	0.67
флаваноїди					
1	апигенін	$C_{15}H_{10}O_5$	345-350	85.54	0.35
2	катехін	$C_{15}H_{14}O_6$	175	208.06	0.49
3	епікатехін	$C_{15}H_{10}O_5$	235-237	29.72	0.07
дубільні речовини					
1	галлова кислота	$C_7H_6O_5$	250	8.31	0.02
2	елагова кислота	$C_{14}H_6O_8$	450	157.52	0.37
3	катехін галлат	$C_{22}H_{18}O_{11}$	-	50.64	0.12
4	епікатехін галлат	$C_{22}H_{12}O_{10}$	-	69.15	0.16
5	епігалокатехін	$C_{22}H_{18}O_{11}$	-	154.95	0.36

Отримані результати [24] свідчать про те, що в коренях люпину багатolistого містяться різні класи поліфенольних сполук: гідроксикоричні кислоти, кумарини, флаваноїди та дубильні речовини. Усього виявлено 10 речовин фенольної природи: 1 гідроксикоричнева кислота (хлорогенова кислота), 2 кумарин (кумарин), 3 речовини флаваноїдної природи (апигенін, катехін та епікатехін) та 5 дубильних речовин (галова та еллагові кислоти, катехін галлат, епікатехін галлат та епігаллокатехін). У кількісному

співвідношенні переважають (%): кумарин (0,67), катехін (0,49), еллагава кислота (0,37), епігалокатехін (0,36) та апігенін (0,35).

Механізм антибактеріальної активності поліфенолів детально не відомий, проте більшість авторів схилиються до множинності потенційних клітинних мішеней, через які ці поліфеноли можуть діяти, вступаючи в ковалентні та нековалентні взаємодії з компонентами бактеріальних клітин – адгезинами, ферментами, білками клітинної оболонки. Ліпофільні флавоноїди здатні взаємодіяти безпосередньо з бактеріальними мембранами. Майже всі підкласи поліфенолів характеризуються антифункційною активністю. Проведені тривалі дослідження, спрямовані на виявлення фунгіцидного ефекту цих поліфенолів щодо патогену тварин і людини гриба *Candida albicans* показали, що основні представники флавоноїдів інгібують розвиток цього штаму в системі *in vitro* в концентраціях від 4 до 197 мкг в 1 мл. Антифунгальна дія поліфенолів виявлялася як у інгібуванні зростання колоній та руйнуванні клітинної стінки гриба, так і індукції апоптозу в дріжджовій культурі.

Частиною великої групи поліфенолів є сполуки стильбену, структурно і функціонально споріднені з флавоноїдами фенольні сполуки з двома бензольними кільцями. Міністерство сільського господарства США (USDA) публікує «Базу даних вмісту флавоноїдів у вибраних харчових продуктах», яка містить вміст флавоноїдів із 506 харчових продуктів (USDA). Іншою важливою базою даних є «Фенол-Провідник» версія 1.5.7 (база даних про вміст поліфенолів у харчових продуктах) (INRA і Wishart Research Group). Він містить понад 35 000 значень вмісту для 500 різних поліфенолів у більш ніж 400 продуктах.

Сполуки стильбену зустрічаються в багатьох видах рослин, у тому числі в хвойних деревах, є природними фенольними захисними сполуками, що мають антимікробну активність по відношенню до фітопатогенів і антиоксидантну до окислювачів – озону та ультрафіолетове опромінення. Основними представниками класу стильбенів є ресвератрол, птеростильбен,

піносільвін, рапontiцин, що широко застосовуються в сучасній фармацевтиці, медицині та промислових технологіях. Типовий представник класу – стильбен широко використовується в сцинтиляційних лічильниках, а його похідні знаходять застосування як барвники, оптичні відбілювачі, протипухлинні препарати та штучні гормони з високою естрогенною активністю. Стильбени привертають велику увагу у зв'язку з широким спектром дії. Вони проявляють антиоксидантні, протипухлинні, протизапальні, антибактеріальні, антивірусні, антималярійні властивості, пригнічують різні патологічні процеси. Стильбени виявляють нейропротективні властивості при нейротоксичному впливі глутамату, ушкодженні головного мозку при церебральній ішемії, виявлено також їх гепатопротекторні властивості. Було продемонстровано, що вони можуть пригнічувати ряд ферментів, що активуються при запальних реакціях. За функціональними властивостями стильбени і флавоноїди відносяться до великого класу фітоалексинів, що являють собою рослинні антибіотики. Фітоалексини є компонентами системи захисту рослин від хвороб та здатні інактивувати мікробних збудників. Особлива увага дослідників до цих класів сполук обумовлена їх унікальними антиоксидантними, протизапальними, антимікробними, гепато- та кардіопротекторними, антиканцерогенними та антидіабетичними властивостями, які виявляють окремі їхні представники.

На сьогоднішній день із шкірки мангостану ізольовано понад 25 різних похідних поліфенолів, основним з яких є пренільований гідроксиксантон – α -мангостин. Ця сполука представляє значний інтерес не тільки для фармакології, а й для харчової промисловості, оскільки шкірка мангостану у країнах Азії є дешевою та доступною сировиною. Однак наявні в літературі дані про токсичність α -мангостину [25] щодо клітин ссавців обмежують їх застосування та зумовлюють необхідність їх тестування в біологічних системах. Біологічна активність α -мангостину може бути суттєво змінена шляхом структурної модифікації молекули введенням додаткових функціональних груп. Оцінку біологічної активності α -мангостину та його

похідних проводили *in vitro* на суспензії еритроцитів крові лабораторних мишей у фосфатно-сольовому буфері, токсичність цих поліфенолів у концентраціях 1, 10 та 30 мкМ оцінювали за їхньою здатністю індукувати гемоліз.

1.3. Способи отримання поліфенолів та їх властивості

Фенольні сполуки є одними з найбільших і широко поширених груп вторинних метаболітів у рослин. Як згадувалося раніше, поліфеноли не тільки містять широкий спектр молекул, які мають поліфенольну структуру, а також молекули з одним фенольним кільцем, такі як фенолокислоти та фенольні спирти. Хоча поліфеноли хімічно характеризуються як сполуки з фенольними структурними особливостями, ця група природних продуктів дуже різноманітна і містить кілька підгруп фенольних сполук.

Біогенетично фенольні сполуки добуваються двома метаболічними шляхами: шляхом шикімової кислоти, де утворюються, головним чином, фенілпропаноїди, та шляхом метаболізму оцтової кислоти, шлях в якому основними продуктами є прості феноли. Вважається, що існує від 100 000 до 200 000 вторинних метаболітів і близько 20% вуглець, фіксований фотосинтезом, направляється у фенілпропаноїдний шлях. Більшість фенольних сполук рослин синтезується через фенілпропаноїдний шлях [25]. Поєднання обох шляхів веде до утворення флавоноїдів, найпоширенішої групи фенольних сполук у природі. Через біосинтетичні шляхи синтезу до флавоноїдів серед недостатньо вивчених фаз конденсації та полімеризації утворюються конденсовані таніни або дубильні речовини, що не гідролізуються. Гідролізуються таніни похідні галоїчної кислоти або гексагідроксидифенової кислоти [26]. В додаток до хімічної різноманітності, поліфеноли можуть бути пов'язані з різними вуглеводами (поліфенольного скелета) та органічних кислот або один з одним (рис. 1.10).

Поліфеноли демонструють широкий спектр властивостей, залежно від їх конкретних структур. Базуючись на незліченній літературі про рослинні поліфеноли та їхні властивості, їх основні характеристики можна коротко розділити на кілька аспектів. Якщо вони повністю естерифіковані, або глікозильовані, рослинні фенольні сполуки є зазвичай розчинними в полярних органічних розчинниках. Більшість фенольних глікозидів є водорозчинними.

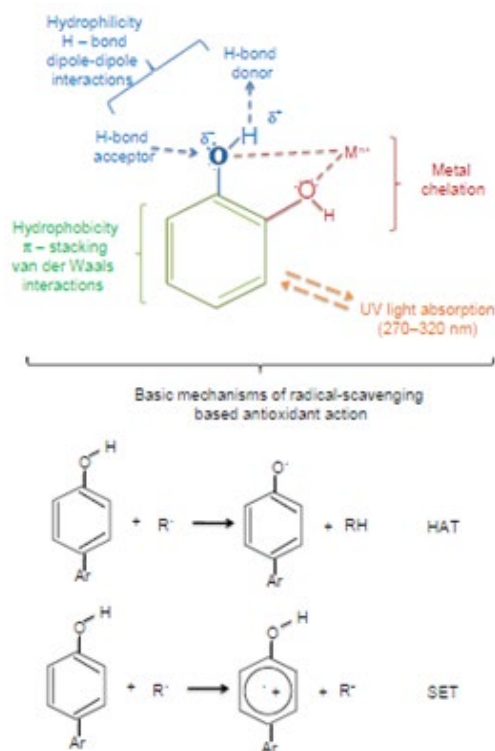


Рис. 1.10. Фізико-хімічні та молекулярні властивості та механізми антиоксидантної активності поліфенолів залежно від їх основної фенольної функціональної структури [6].

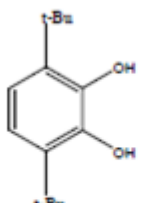
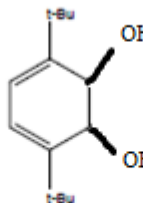
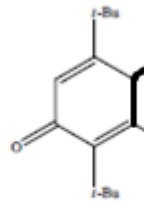
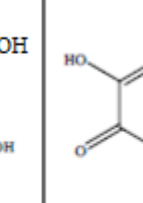
Усі фенольні сполуки демонструють інтенсивне поглинання в УФ (ультрафіолетовій) області спектру, а кольорові також сильно поглинають у видимій області. Кожен клас фенольних сполук має відмінні характеристики поглинання. Наприклад, феноли та фенолокислоти мають спектральні максимуми в області 250–290 нм; коричневі похідні кислот мають основні максимуми в області 290–330 нм; флавоони і флавоноли демонструють смуги поглинання приблизно однакової інтенсивності приблизно при 250 і 350 нм;

халкони і аурони мають пік поглинання великої інтенсивності вище 350 нм і набагато менш інтенсивна смуга при 250 нм; показують антоціани та бетаціани досить подібне поглинання у видимій області (475–560 нм і 535–545 нм відповідно) і допоміжний пік приблизно при 270–275 нм.

Протимікробна активність деяких поліфенолів наведена в табл. 1.3. Механізми антиоксидантної дії поліфенолів можуть включати пряме очищення реакційноздатних вільних радикалів, хелатування слідів іонів металів, що беруть участь в утворенні вільних радикалів, інгібування ферментів, що беруть участь у синтезі вільних радикалів, і регенерації мембранозв'язані антиоксиданти, такі як α -токоферол [27].

Таблиця 1.3

Протимікробна активність поліфенолів

Хімічна формула				
<i>E. coli</i>	169	89	38	95
<i>St. albus</i>	201	69	54	133

Встановлено, що поліфеноли є сильними антиоксидантами, здатними нейтралізувати вільні радикали шляхом віддачі електрона або атома водню. Було запропоновано два основних механізми антиоксидантної дії. Перший заснований на здатності функціональної групи фенолу до віддачі атома водню вільному радикалу $R^\bullet$, наприклад, утвореним пероксирадикалом $LOO^\bullet$ під час автоокислення ліпідів (LH). У цьому випадку (полі)феноли діють як розривники ланцюга антиоксидантів. За допомогою цього так званого механізму перенесення атомів водню фенольний антиоксидант ($ArOH$) сам стає вільним радикалом ($ArO^\bullet$; рис. 1.5). Другим механізмом є одноелектронний перенос електронів (SET) від $ArOH$ до вільного радикала $R^\bullet$ з утворенням стабільного катіон-радикала $ArOH^{\bullet+}$ (рис. 1.5). Енергія

дисоціації зв'язку (BDE) і потенціал іонізації (IP) фенолу є двома основними фізико-хімічними параметри, які можна використовувати для визначення потенційної ефективності кожного процесу, відповідно. Такі реакції можуть відбуватися під час поглинання активних форм кисню ($\text{ROS} = \text{O}_2^{\bullet-}, \text{HO}^{\bullet}, \text{RO}^{\bullet}, \text{ROO}^{\bullet}$ з $\text{R} = \text{алкіл тощо}$) надмірно виробляється під час окисного стресу (наприклад, запальної реакції після мікробної інфекції, впливу забруднюючих речовин або радіації). Данглс у 2006 році встановив [27], що антиоксидантна активність флавоноїдів може бути поєднанням хелатних властивостей металів і вільних радикалів. На додаток до вищезазначеного можливі режими антиоксидантної дії, інші механізми, такі як інгібування ксантиноксидази. Інші автори посилаються на інгібування оксидаз, таких як ліпоксигеназа (LO), циклооксигеназа (CO), мієлопероксидаза (MPO), НАДФН-оксидази та ксантиноксидази (ХО) [29], як важливі механізми для запобігання генерації більшої кількості реактивних форм кисню (АФК) *in vivo*, а також органічні гідропероксиди.

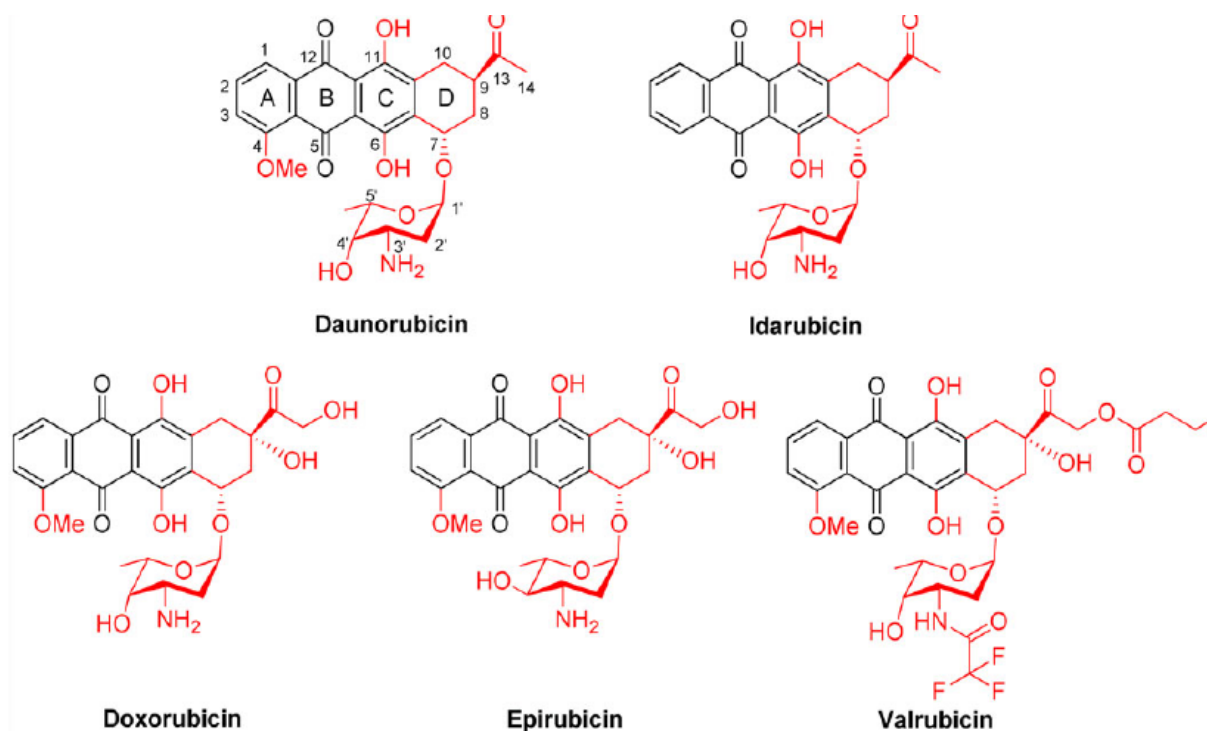


Рис. 1.11. Поліфенольні сполуки антрахінону

Даунорубіцин є природною поліфенольною сполукою, отриманою в якості вторинного метаболіту *Streptomyces* виду (sp.), специфічного виду *S.*

peucetius. Доксорубіцин був виділений з *S. peucetius* підвиду *caesius*, мутагенний вид *S. peucetius* [30-37]. Перевиробництво цих поліфенолів для задоволення потреб людини досягається в основному за рахунок генної інженерії та міжвидової технології (рис. 1.6) [38-39]. Ідарубіцин є напівсинтетичним аналогом даунорубіцину проте в нього відсутня метоксигрупа в C₄-положенні [40].

Епірубіцин, 4'-епімер доксорубіцину, отримують його напівсинтетично з даунорубіцину, або з доксорубіцину. Він також може бути отриманий за допомогою генної інженерії з *S. peucetius* [41]. Вальрубіцин є напівсинтетичним похідним його одержують шляхом хімічної модифікації даунорубіцину [42], або хімічнoензимним синтезом з доксорубіцину. Даунорубіцин, доксорубіцин і епірубіцин вводять в організм тільки внутрішньовенно, а ідарубіцин вводять перорально, і вальрубіцин вводиться внутрішньоміхуровим вливанням в сечовий міхур. Ці сполуки показують певну варіативність клінічних властивостей. У той час як даунорубіцин і ідарубіцин в основному використовуються для лікування лейкозів, доксорубіцин і епірубіцин ефективні при лікуванні великих пухлин, і вальрубіцин використовується спеціально для лікування раку сечового міхура [33].

За останні кілька років було встановлено, що окрім антиоксидантної дії, багато поліфенолів виявляють здатність реконструювати хроматин і спричиняти деякі інші епігенетичні модифікації. Багато поліфенолів можуть регулювати експресію ядерного фактора альфа В і ремоделювання хроматину через активацію або інгібування епігенетичних ферментів такі як гістонацетилтрансферази, ДНК-метилтрансферази або гістондеацетилази (HDAC). Геністеїн, фенетилізотіоціанат, куркумін, сульфорафан, і ресвератрол викликають інгібування деацетилювання білків гістонів, і деякі інші поліфеноли, такі як епігалокатехін-3-галлат (ECGC), геністеїн і куркумін діють як інгібітор ацетилювання гістонів під час епігенетичних модифікацій.

EGCG, геністеїн, лікопін, куркумін і ресвератрол пригнічують метилювання ДНК шляхом перешкоджаючи активності ДНК-метилтрансфери.

Сульфорафан, поліфенол, присутній в хрестоцвітних овочах, індукує фазу II ферментів і викликає експресію глутатіон-S-трансфери, але він також стимулює фазу II детоксикації шляхом активації фактора 2, пов'язаного з ядерним фактором E (NRF-2). Цей фактор зазвичай присутній в цитоплазмі, але при окисному стресі NRF-2 переміщається до ядра і зв'язується з антиоксидантним реактивним елементом (ARE), сприяючи експресії антиоксидантних ферментів. Сульфорафан також сприяє розвитку раку вплив через пригнічення активності HDAC.

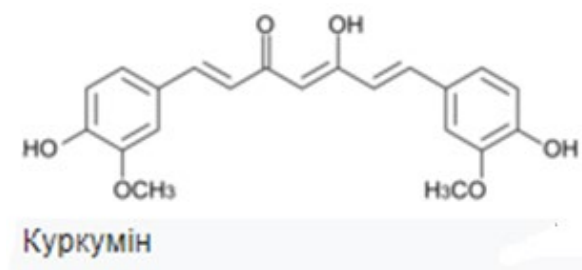


Рис. 1.12. Структурна формула куркуміну

Куркумін (рис. 1.12), відомий антиоксидант, може регулювати як ацетилювання, так і деацетилювання через модуляцію окисного стресу. Окислювальний стрес індукує шлях NF-κB через активацію активності гістонацетилаз, але він може пригнічувати HDAC. Це викликало індукцію антиоксидантних ферментів II фази шляхом активації передачі сигналу NRF-2, відновлення гена пригнічення пухлини p53 шляхом пригнічення ацетилювання гістонів і ацетилювання негістонового гена супресора пухлини p53, і модуляції медіаторів запалення (TGF-β і COX2).

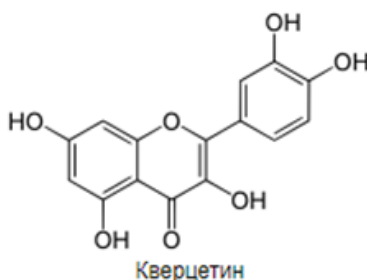


Рис. 1.13. Структурна формула кверцетину

Куркумін знижує експресію антиапоптозів ген Bcl-2 шляхом посилення регуляції miR-15a та miR-16. EGCG викликав гіперметилування p16INK4a, p15, RAR β , MGMT і hMLH1 генів, він змінив гіперметильовану ділянку гена супресора пухлини RECK, і посилена експресія цього гена. Це було пов'язано зі скороченням матриці металопротеїнази MMP-2 і MMP-9, які беруть участь у потенціалі інвазії пухлинні клітини.

Флавоноїди – клас поліфенольних сполук рослинного походження, інтерес до яких зумовлений перспективою отримання синтетичних аналогів цих речовин, які мають лікарську дію. Важливим внеском флавоноїдів на захист організму від окисного стресу є їх здатність пов'язувати метали змінної валентності. Для флавоноїдів, як і для багатьох інших біологічно-активних речовин, гідрофобність і, відповідно, здатність взаємодіяти з біологічними мембранами є однією з необхідних умов прояву фармакологічної активності.

Кверцетин — це поліфенол, який широко присутній у цитрусових, цибулі та гречці (рис. 1.13). Він знижує рівень ROS шляхом модуляції детоксикаційних ферментів, таких як SOD і каталаза. Коли його застосовували в комбінації з хіміопрепаратами, цисплатином у низьких концентраціях, він послабив терапевтичний ефект цисплатину та інших протипухлинних препаратів в клітинах раку яєчників шляхом зменшення пошкодження АФК. Було встановлено, що кверцетин пригнічує клітинний цикл і індукує апоптоз через інгібування HADC і DNMT1.

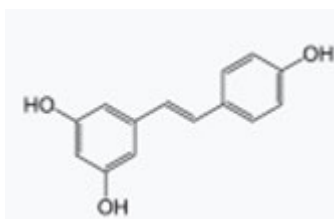


Рис. 1.14. Структурна формула ресвератролу

Ресвератрол міститься у винограді, журавлині, чорниці, горіхах і вині, має протизапальну дію. і протиракові властивості. Він модулює сигнальні шляхи, залучені до контроль клітинного циклу, апоптоз, ангіогенез і метастазування пухлини. Він має сильну антиоксидантну здатність і впливає на метаболізм глюкози. У пухлинних клітинах ресвератрол пригнічує вироблення АФК і пригнічує гліколітичний метаболізм (рис. 1.14).

За допомогою HPLC хроматографії з *C. aucheri* виділені хімічні структури поліфенольних сполук представлені на схемі 1.15 відповідно. В результаті, виявлено дев'ять поліфенольних сполук. Це сполуки: протокатехінова кислота, катехін, хлорогенова кислота, кавава кислота, ферулова кислота, рутин, розмаринова кислота, ериодиктіол і кверцетин.

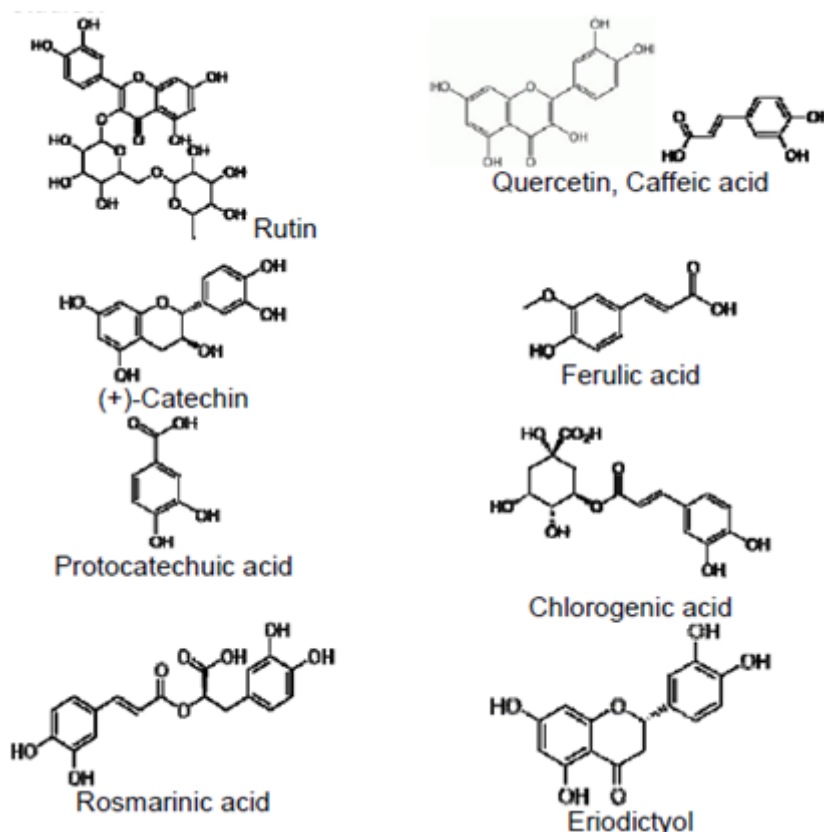


Рис. 1.15. Структурна формула поліфенольних сполук

Доксорубіцин є протираковим хіміотерапевтичним препаратом використовується для різних видів раку, таких як циста, молочної залози, голови і шиї, лейкемії (деяких видів), печінки, легень. лімфоми, мезотеліоми, міліоми, нейробластоми, яєчників, простати, саркоми, шлунку, щитовидки і

матки. Мітоксантрон і аметантрон (рис. 1.16) є протираковими препаратами які містять антрахінонове кільце і використовуються для лікування лейкемії і раку простати. Додатково мітоксантрон і аметантрон використовуються для лікування гострого склерозу, а мітоксантрон використовується для лікування його з 1980 років. Ці поліфеноли використовуються більш ніж три десятиліття як одиничні агенти також відома їх комбінаційна дія для терапевтичних цілей.

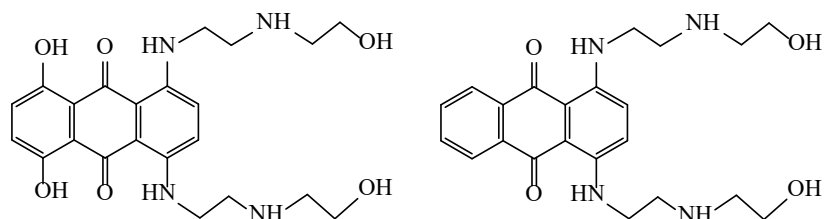


Рис. 1.16. Структурна формула мітоксантрону і аметантрону

Емодин (1,3,8-тригідрокси-6-метилантрахінон) є також хорошим біологічно активним продуктом, виділений з коріння і кореневища *Rheum palmatum* використовуються в традиційній Китайській медицині (ТКМ) для лікування каміння в шлунку, запалення, гепатитів і остеомелітів [40].

Реїн (1) є натуральним поліфенольним продуктом виділеним з рослин родини ревеню. Число похідних поліфенолу виділених з ревеню, таких як емодин, перебуває в процесі дослідження. Слід зазначити що поліфеноли, які мають схожу структуру до реїну, такі як доксорубіцин і мітоксантрон, є відомими ліками проти раку. Реїн (1) демонструє потенційну протиракову активність знищуючи клітини пухлин. На даній стадії всі аналоги реїну володіють протираковою активністю і були дослідженні на трьох різних клітинних лініях (HeLa, Hek, і KB).

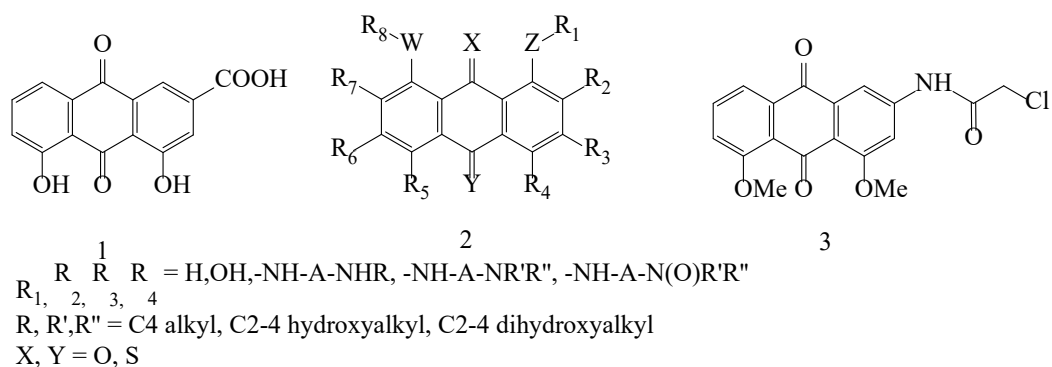


Рис. 1.17. Структурна реїну і його похідних

Всі аналоги реїну (2) проявляють протиракову активність на трьох тестових ракових клітинах (HeLa: IC_{50} область; 1.3 -- 40.0 μM Нек: IC_{50} область; 2.0 -- 8.0 μM ; KB: IC_{50} область; 4.5 -- 38.0 μM). Досліджена остання активність синтезованого похідного реїну ($IC_{50} = 40 \mu\text{M}$) продемонстрована протягом 2,5 періодів висока протиракова активність реїну становить ($IC_{50} = 100 \mu\text{M}$). Заслуговує уваги 1,8-диметокси-3-(2-хлороацетатамідо)-антрахінон (3) який демонструє протиракову активність на HeLa, Нек, і KB клітинних лініях з відповідними IC_{50} величинами 1.9, 1.3, і 5,2 μM .

Більше досліджень похідного реїну (схема 1.12) ($IC_{50} = 1.3 \mu\text{M}$) показали схожу активність з стандартом вихідного доксорубіцину ($IC_{50} = 1.4 \mu\text{M}$). 100 періодів збільшує активність реїну ($IC_{50} = 100 \mu\text{M}$) на шийних ракових клітинах HeLa. SAR стадія визначення різних алкільних груп атаки С-3 антрахінону грає ключову роль в активності. Різні алкільні групи близькі до ДНК скелету можуть допомагати ковалентною взаємодією, яка може бути активована конформаційними змінами і таким чином стати причиною загибелі клітин. Наступні SAR показали що похідні реїну які містять йодид і бромід, мають більшу активність ніж хлоридні похідні.

Синтезовані поліфеноли (2) заявлені для використання в лікуванні раку сечового міхура, раку молочної залози, раку кісток, раку мозку (включаючи різні гліобластоми і астроцитоми), раку шиї, хоріокальциноми, раку очей, раку прямої і товстої кишки, гастраціональної пухлини, раку голови і шиї, раку легень, раку гортані, лейкемії (таких як ALL, AML, CLL, CML і ракових

клітин лейкемії) раку печінки, раку легень. лімфоми (включаючи Ходкінс лімфому і нон-Ходкінс лімфому), мезотеліоми, міліоми, нейробластоми, раку яєчників, раку простати, саркоми, раку шлунку, раку щитовидки, раку матки і раку жіночих органів.

Вміст поліфенольних сполук у біологічних зразках може визначатися різними аналітичними інструментальними методами, наприклад газовою хроматографією, тонкошаровою хроматографією і капілярним електрофорезом. Однак високоефективна рідинна хроматографія (ВЕРХ) виявилася найбільш доцільною завдяки структурній подібності і різноманітності поліфенольних сполук, що дозволяє провести аналіз з достатньою точністю, вибірковістю та протягом розумного часу.

2. ТЕХНОЛОГІЯ ОТРИМАННЯ ПОЛІФЕНОЛІВ З СОНЯШНИКОВОГО ШРОТУ

2.1. Аналіз соняшникового шроту

Світове виробництво соняшникового шроту (SFM) є великим. У 1990 році воно було оцінено, як світове виробництво і становило 8,6 мільйонів метричних тонн, що зайняло в рейтингу четверте місце у виробництві олійних культур після соєвого шроту, бавовняного шроту та каноли шроту відповідно. Таким чином, SFM часто використовується в раціонах птиці. Найпоширеніша промислова обробка, спосіб виробництва SFM є додрукарська сольвент-екстракція насіння соняшника. Оскільки обробка передбачає опалення, цілком можливо, що SFM може бути переварено. Було показано, що надлишок нагрівання соєвого шроту та шроту каноли зменшує доступність *in vivo* деяких амінокислоти. Таким чином, надмірна обробка SFM може значно вплинути на його харчову цінність, оскільки соняшниковий білок є дуже дефіцитним. Розчинність білка в КОН була визначена і повідомляється як хороший показник зниження якості білка в перероблених соєю їжі, а також був корисним для виявлення надмірно

обробленого ріпакового шроту. Всі методи екстракції соняшникового шроту поділяються на лабораторні та промислові (додаток Д). Основними продуктами є хлорогенова та кавові кислоти.

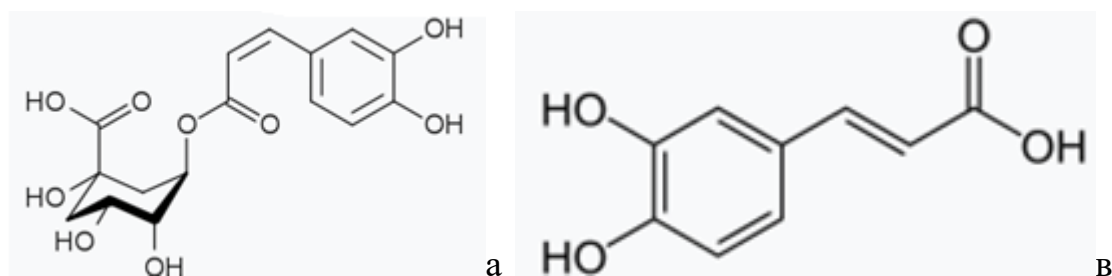


Рис. 2.1. а) хлорогенова кислота та в) кавова кислота

Для одержання екстрактів з соняшникового шроту використовують методи ремацерації, перколяції, реперколяції, циркуляційної екстракції, а також їх модифікації, які відрізняються часом настоювання, умовами поділу сировини в екстракторах, напрямком руху екстрагенту відносно рослинного матеріалу, апаратурним оформленням ті ін. Розроблена та експериментально підтверджена інтенсифікація тепломасопереносу шляхом суміщення процесів мацерації, перколяції, пульсації, нагріву та ін. Застосування термодиффузійного способу екстракції поліфенолів з соняшникового шроту дозволяє прискорити процес екстрагування в два рази. Постійний рух екстрагента через шар сировини дозволяє інтенсифікувати процес екстракції, а ламінарний режим течії його через сировину знижує вимивання баластних речовин. Знакозмінний рух екстрагента виключає утворення застійних зон, що дозволяє досягти глибокого видобування цільових речовин із сировини. Одним з простих традиційних методів екстрагування, є мацерація.

Перколяція. Власне перколяцію проводять з тою ж швидкістю яка дозволяє отримати повне виснаження сировини без поділу на первинні і вторинні витяжки, потім всі отримані витяжки згущують або висушують.

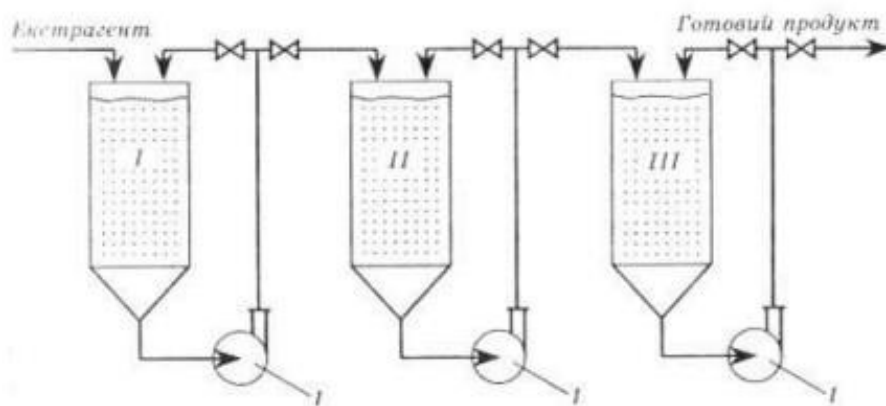


Рис. 2.2. Схема реперколяції (1 - насос, I, II, III - батареї перколяторів)

Реперколяція та матеріали для її проведення зображені на рисунку 2.2. Спосіб циркуляційного екстрагування ґрунтується на циркуляції екстрагенту. Екстракційну установку яка працює безперервно та автоматично за принципом хімічного апарату Сокслета. Вона складається із з'єднаних між собою перегінного куба, екстрактора, холодильника-конденсатора, та збірника конденсату. Суть методу полягає в багаторазовому екстрагуванні матеріалу, чистими екстрагентами. Циркуляція екстрагенту зазвичай проводили багаторазово, а отриману витяжку концентрують відгоном екстрагенту в збірник. В кубі зазвичай залишається концентрований розчин екстрактивних речовин.

Протитечієне екстрагування з переміщенням сировини і екстрагента.
Соняшниковий шрот який зібраний за допомогою транспортних пристроїв: шнеків, ковшів, дисків, стрічок, шкребків або пружинно-лопатевих механізмів зазвичай швидко переміщується назустріч руху екстрагенту. Виснажену сировину екстрагують свіжим екстрагентом, який ще повніше витягують залишковими екстрактивними речовинами.

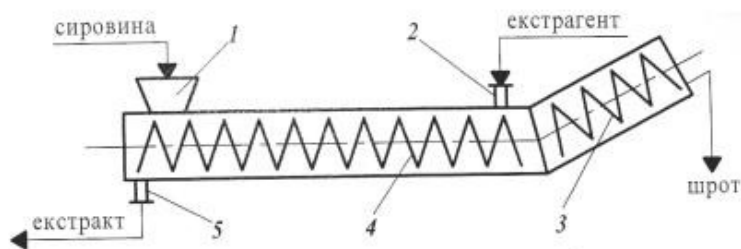


Рис. 2.3. Шнековий горизонтальний екстрактор:

1-завантажувальний бункер; 3,4-шнеки; 2,5-патрубки для екстрагента та екстракта

Екстрагування проводиться зазвичай в екстракторах різної конструкції: шнековому горизонтальному або вертикальному, дисковому, пружиннолопатевому та ін. Шнековий горизонтальний екстрактор зображений на рисунку 2.3, обладнаний бункером 1, куди подається сировина, екстрагент подається через патрубок 2 на сировину, яка рухається за допомогою шнеку 4, похилим шнеком 3 відпрацьована сировина подається на вивантаження. Через патрубок 5 зливається готовий екстракт. Таким чином, екстрагент і сировина рухаються на зустріч один одному. Недоліком такого апарату є низька ступінь заповнення апарату, в зв'язку з тим, що шнек займає значну частину вільного простору.

Електродіаліз використовується для прискорення екстрагування соняшникового шроту. Дію електричного струму змінюють на електричні потенціали поверхні сировини, поліпшується його змочуваність, прискорюється рух іонів біологічно активних речовин у порожнині клітин і в капілярах клітинних структур. В підсумку збільшується коефіцієнт внутрішньої дифузії.

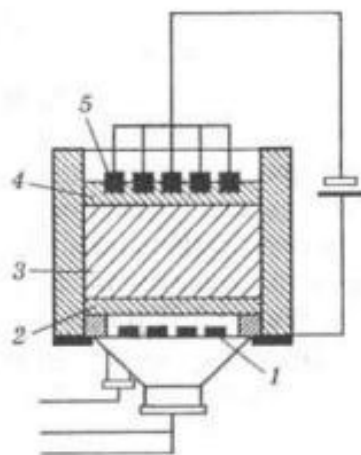


Рис. 2.4. Схема пристрою з використанням електродіалізу: 1 – перфорована пластинка; 2 – фільтр; 3 – сировина; 4 – кришка, 5 – графітовий анод.

Екстрагування цим методом проводять в апараті наведеному на рисунку 2.4. Зараз у виробництві екстрактів з соняшникового шроту вважається прогресивним метод отримання витягів з допомогою роторно-пульсаційних апаратів (РПА) і безперервно діючих робочих центрифуг. Дана технологія передбачає подрібнення рослинної сировини в середовищі розчинника з одночасним екстрагуванням і наступним поділом твердої (шроту) і рідкої (витяги) фаз на центрифугу. При цьому процес екстракції протікає зазвичай в 2-3 рази швидше, ніж при стандартних традиційних способах, а вихід діючих речовин збільшується в середньому на 15-20%. Однак, поки метод має обмежене використання, тому припускає екстракцію тільки водою [30].

На динаміку екстракційного процесу, а отже, і на швидкість та її якість впливають такі чинники: як співвідношення кількості сировини (грамм, моль) та екстрагента; гістологічну будову сировини; ступінь подрібнення сировини; матеріал з якого виготовлена апаратура; температура і час настоювання; вплив ферментів і мікрофлори; також хімічний склад діючих речовин; та рН середовища. Сучасні чинники які впливають на ці процеси зведені до мінімуму, завдяки роботі компютерезованих програм, які застосовують як на виробництві так і в лабораторії. Так компютерна програма здатна розрахувати оптимальне рН середовища завдяки обробці даних.

З метою отримання повноцінних витяжок необхідно для цього використовувати максимально можливу за даних умов кількість води. При цьому треба враховувати, що частина рідини після екстракції завжди утримується (поглинається) рослиною, тому готової витяжки виходить менше, ніж було взято води. Шляхом віджимання сировини ці втрати можна дещо зменшити, проте, повністю позбутися від них нажаль не можна.

Швидкість екстракції зазвичай залежить від структури клітинних оболонок, які є значною перешкодою для проходження екстрагента і тим,

більшою мірою, чим вони товщі і щільніше. Якщо клітинна оболонка дуже щільна, а клітинна тканина є недостатньо пухкою, та міжклітинні ходи каналів малочислені, то зазвичай екстрагування протікає більш повільно. Скелет клітинної тканини складається з целюлози. Клітинна тканина багатьох рослин містить кутин, стирол і лігнін, які перешкоджають змочуванню целюлози. Режим екстракції, або температурні умови проведення екстракції та її тривалість контакту соняшникового шроту з екстрагентом сильно впливають на якісний і кількісний склад витяжки. Підвищення температури збільшує зазвичай швидкість дифузійного обміну, що значно прискорює екстракцію.

Досліджувані зразки соняшникового шроту, які містять похідні поліфенолу авторами [47] досліджувались за якісними реакціями відомих методик. А саме, методом тонкошарової хроматографії (ТШХ) в системах розчинників бутанол: оцтова кислота: вода (4:1:5), бензол: оцтова кислота (9:2), хлороформ: оцтова кислота (9:1), хроматограми переглядали в УФ-світлі, а також при обробці парами аміаку. Для кількісного визначення та ідентифікації фенольних сполук зокрема трави астранції великої можна застосувати метод високоефективної рідинної хроматографії. Хроматографічне розділення проводять на обернено-фазовій колонці C_{18} з подальшим реєстратором хроматограм за допомогою діодно-матричного УФ-детектора при довжині хвилі 320 нм та 330 нм, що дає можливість провести ідентифікацію не тільки за часом утримування, але й за характером спектром аналізованих компонентів. Як рухому фазу використовують 0,005 N ортофосфору кислоту (елюент А) та ацетонітрил (елюент В).

Методом високоефективної рідинної хроматографії з маспектрометричним детектуванням проводять вивчення якісного складу соняшникового шроту. Зокрема визначення поліфенолів методом ВЕРХ буде полягати у розділенні компонентів проб та кількісним визначенням. Хроматографічне розділення флавоноїдів проводять на обернено-фазовій

колонці C_{18} з подальшим хроматографічним ідентифікуванням за допомогою діодно-матричного УФ–детектора. Або способом іонізації – електроспреем.

Хроматографічні дослідження автори [48] проводили у присутності стандартних зразків свідків за допомогою хромогенних реактивів. Наявність сполук з перерахованих вище груп підтверджували також методом ВЕРХ. Хроматографічний аналіз витягів соняшникового шроту автори проводили в режимі градієнтного елюювання при лінійній зміні концентрації ацетонітрилу в 0,1 % водному розчині трихлороцтової кислоти від 10 до 40 % протягом 25 хв, а потім протягом 5 хвилин до 100%. Швидкість подачі елюентів зазвичай 100 мкл/хв.

При цьому відбувається екстракція та гідроліз усіх флавоноїдів, що знаходяться в глікозидній формі, потім витяг декантували в мірну колбу місткістю 50 мл, охолоджували і доводили спиртом етиловим до мітки. Після перемішування 2 мл розчину обережно упарювали в струмі повітря і розчиняли в 2 мл диметилформаміду, отриманий розчин після центрифугування використовувався для ВЕРХ аналізу. У роботі використовують систему для ВЕРХ UltiMate 3000 (Dionex), пов'язану з МС детектором AmaZon SL (Bruker), іонізація – електророзпиленням. Хроматографування вели в градієнті від 5 до 60% ацетонітрилу за 40 хвилин при швидкості потоку 0,3 мл/хв, як другий компонент рухомої фази використовували розчин кислоти мурашиної у воді (2 г/л), для поділу використовували колонку 150×4,6 мм, заповнену зверненофазним сорбентом з щепленими октадецильними залишками. Детектування зазвичай можна проводити при довжинах хвиль 260, 280, 300, 360 нм.

2.2. Основні способи виділення поліфенольних сполук з шроту

Ідентифікацію поліфенолів проводять за допомогою реакції із солями важких металів та ціанідинової реакції:

- до 1 мл витяжки додають 5 крапель 5 % розчину заліза (III) хлориду;

- до 1 мл фільтрату додають в однаковій кількості 2 % розчину натрію карбонату та 5 % розчину алюмінію хлориду;

- ціанідинова реакція: до 2 мл фільтрату додають 0,5 мл хлористоводневої кислоти і 0,1 г порошку металічного магнію. Суміш нагрівають на киплячому водяному нагрівнику протягом 3 хвилин.

Ціанідинова реакція за Бріантом дозволяє з'ясувати агліконову чи глікозидну природу флавоноїдів. До утвореного продукту ціанідинової реакції додавали рівну кількість води очищеної, 1 мл *n*-октанолу та перемішували. Після розділення фаз глікозиди залишаються у воді, а аглікони переходять у органічну фазу.



Рис. 2.5. Схематичне представлення експериментальної установки

Можлива методика дослідження кінетики екстрагування поліфенолів в апараті з мішалкою. Дана методика полягає у використанні математичної моделі, яка базується на певній кінетиці екстрагування цільвих компонентів з соняшникового шроту. Дослідження кінетики екстрагування поліфенолів після екстракції 96% етанолом можна проводити в апараті (екстракторі) з мішалкою зображеного на рисунку 2.5.

Методика полягає в тому що шрот засипають в колбу, куди одночасно завантажують екстрагент для вторинного екстрагування. Колбу 2 закривають кришкою з резиновою прокладкою 4 і включають мішалку 5. Процес екстрагування проводять при постійному перемішуванні. Температурний режим 20 ± 2 °C підтримували за допомогою термостата 1. Через певні проміжки часу відбирають проби таким чином, щоб кількість відібраних

проб не впливала на концентрацію екстрагованих речовин в розчині, які надалі аналізували на вміст поліфенолів спектрофотометричним методом. Після відбору пробу фільтрували крізь бавовняно-волокнистий фільтр. Фільтр відтискають та переносять назад в колбу для екстрагування.

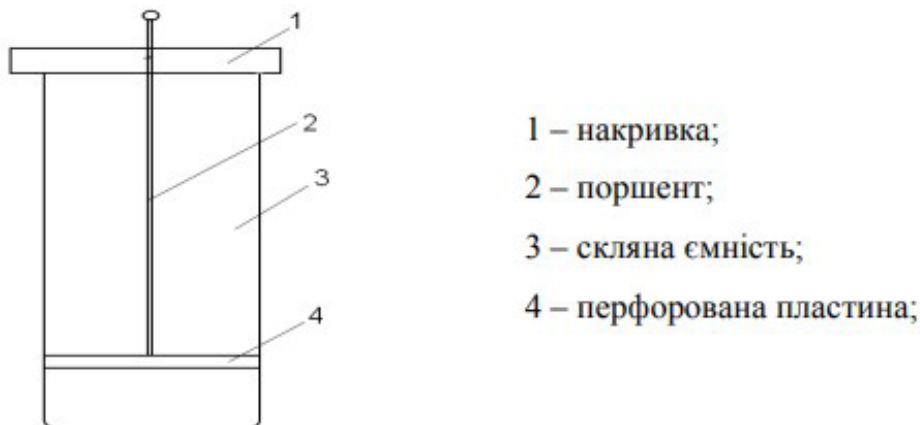


Рис. 2.6. Ємність для екстрагування

Вивчаючи це вчені почали досліджувати можливі способи модифікації даного методу. Наприклад, автори [45], запропонували обробляти вихідну рослинну сировину при атмосферному тиску киплячим розчином сірчаної кислоти з концентрацією 30-50% і взятої у кількості 300-500% від ваги вихідної сировини, потім пропускати пари, що виділяються через дефлегматор і холодильник, в якому конденсується частина пари, конденсат є концентрованим водний розчином поліфенолів. Вихід поліфенолів запропонованим методом становить 12-15%.

Згодом було запропоновано спосіб з використанням набагато меншої кількості H_2SO_4 , а саме 1-10% від ваги вихідного сировини, проте при цьому використовувати сірчану кислоту з концентрацією не нижче 65%. Наприклад, з вологістю 13% вихід поліфенолів становив 23,2% від абсолютно сухої сировини чи 95% теоретичного. В даному способі, сировина, подрібнене до розмірів 5-12 мм у кількості 2 кг, змішувалося з 180 гр 93%-ної сірчаної кислотою і подавалося в автоклав, де воно проходила термічну обробку гострим паром з температурою 150-160°C та тиском 0,5-1 атм протягом 60 хв.

Крім сірчаної кислоти, для отримання поліфенолів використовують також оцтову та фосфорну кислоти. Значне збільшення виходу поліфенолів при додаванні хлористого натрію до 1%-ної сірчаної кислоти скорочує час реакції з 7-7,5 год до 3-4 год при температурі процесу 158-160 °С.

Дослідження кінетики екстрагування кварцетину з подрібненого та подрібненого шроту соняшника після екстракції 96% етанолом при настоюванні здійснюють в ємності зображеній на рис. 2.6. Методика [56] полягає в тому що шрот соняшника засипають ємність 0.2 л, куди одночасно завантажують екстрагент – водноетанольну суміш встановленої концентрації. Через певні проміжки часу (3600, 7200, 10800, 14400, 18000, 21600, 25200, 28800, 32400, 36000, 39600, 43200, 64800, 86400 с) вміст кожної ємності зливають через фільтр. Надалі кожну з відібраних проб аналізують на вміст кварцетину спектрофотометричним методом. Процес екстрагування проводять в нерухомому шарі екстрагенту за кімнатної температури 20 ± 2 °С. Через 24 години вміст кожної ємності з відповідною концентрацією екстрагенту, екстракт зливають через фільтр. Надалі екстракт аналізують на вміст кварцетину та загального вмісту екстрактивних речовин.

Екстракцію хлорогенової кислоти з соняшникового шроту автори [57], провели подрібненням його до проходу крізь сито 0,25 мм з наважкою приблизно 2 г. Підготовка матеріалу передбачала екстракцію хлорогенової кислоти водним розчином етилового спирту який був з концентрацією 80 % при співвідношенні шрот: розчинник 1:10, тривалість екстракції – 20–30 хвилин при безперервному перемішуванні на механічному струшувачі з повторністю вісім – дев'ять разів (табл. 2.1). Залежність масової частки хлорогенової кислоти (У, %) від основних параметрів екстрагування у кодових змінних має вигляд (рис. 2.7):

$$Y = 5,1538 + 0,171 \cdot X_1 + 2,0888 \cdot X_2 - 0,196 \cdot X_3 - 0,194 \cdot X_1 \cdot X_2 - 0,239 \cdot X_1 \cdot X_3 - 0,36125 \cdot X_2 \cdot X_3 + 0,21625 \cdot X_1 \cdot X_2 \cdot X_3$$

Рис. 2.7. Параметри екстрагування

Аналіз отриманої моделі показує, що домінуючим фактором є гідромодуль шрот:розчинник, а такий фактор як концентрація водного розчину етилового спирту в межах 60–80 % не впливає на масову частку хлорогенової кислоти і коефіцієнт при X_1 є незначимим.

Таблиця 2.1

Умови проведення досліджень

№	фактори	концентрація водного розчину етилового спирту, %	гідромодуль шрот : розчинник	тривалість екстракції, хв
1	код	X_1	X_2	X_3
2	основний рівень	70	1:50	45
3	інтервал вимірювання	10	1:40	15
4	верхній рівень	80	1:90	60
5	нижній рівень	60	1:10	30

2.3. Розробка та ефективність технології виділення поліфенольних сполук з соняшникового шроту

Соняшник (*Helianthus annuus L.*) є одним із найважливіших олійних культур. Соняшники були відомий з 26 століття до н.е. і беруть свій початок у низовинах Мезоамерики. У наш час дві основні вирощують види соняшнику олійні та неолійні або кондитерські види. Залишки, що утворюються в результаті видобутку нафти, є цінним і поживний субпродукт з високим вмістом білка в діапазоні від 40% до 50% знежирених ядер залежно від типу процес екстракції. Тому шрот, приготовлений із пресових залишків, використовується переважно як корм для жуйних. На відміну від бобових, соняшник є білком джерело великого інтересу для харчування людини, особливо завдяки їх сенсорні, а також поживні та функціональні властивості.

Крім високого вмісту білка, залишки, отримані від видобутку олії, багаті фенольними сполуками, які складають 1–4% загальної маси, причому хлорогенова кислота переважний компонент. Наявність великої кількості фенольних сполук суттєво впливає на якість білків соняшнику, наприклад, знижуючи засвоюваність або спричиняючи небажане потемніння та структурну модифікацію, яка негативно змінює функціональні властивості білка та його поведінку в різних харчових системах.

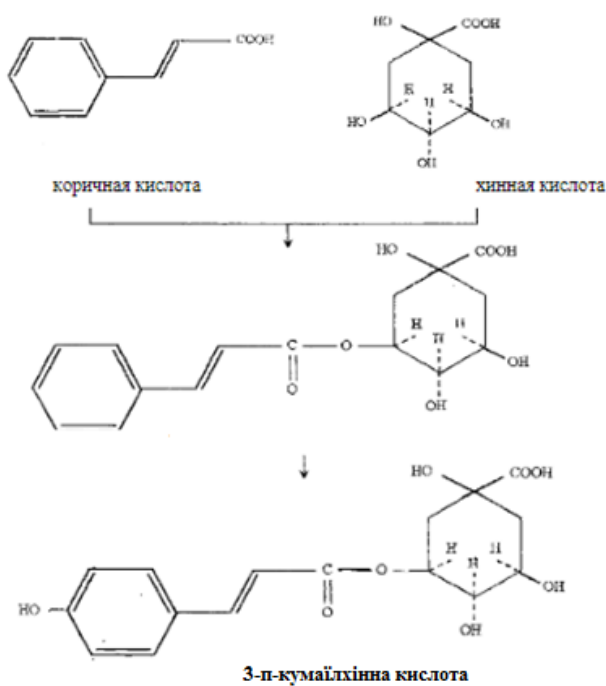


Рис. 2.8. Синтез 3-п-кумайлхінної кислоти

Як поліфенолоксидазна активність, так і звичайна екстракція білка який виконується в лужних умовах, призводить до окислення поліфенолів і, таким чином, до їх перетворення в *o*-хінони (рис. 2.8), як у випадку похідних кофеїлу або інших *o*-дигідроксистеруктур. Ці високоактивні сполуки можуть утворювати ковалентні зв'язки з тіоловими або аміногрупами білків. Харчова цінність білків соняшнику, як правило, обмежується їхнім справжнім дефіцитом лізину та додатково знижується внаслідок вищезгаданих реакцій, оскільки продукти конденсації не можуть бути метаболізованими людиною.

З цих причин протеїни соняшнику досі не використовувалися в промислових масштабах для харчування людини.

Виробництво та переробка насіння соняшника значною мірою спрямовані на виробництво олії та кормових продуктів. Зміст поліфенолів може знижувати засвоєння білків та кормову цінність. Крім того, вона забарвлює продукти, що перешкоджає переробці вторинних відходів у харчові білкові ізоляти. Перспективним є розробка ресурсозберігаючих методів вилучення поліфенолів як з вихідної сировини та продуктів, так і вторинних продуктів переробки та рослинних відходів. Комплексна переробка, і, зокрема, виділення таких компонентів як хлорогенова кислота дозволить забезпечити найбільш повну конверсію відновлюваної рослинної сировини, що має величезне значення для реалізації потенціалу регіонів із високим рівнем розвитку сільськогосподарської галузі. Традиційним для України сировиною з високим потенціалом виділення поліфенольних сполук є культура соняшника. Екстракційний шрот соняшника містить близько 3-4% поліфенольних сполук, 65% яких становить хлорогенова кислота. Інші сполуки представлені різними ефірами хінної та кавової кислот, які можуть бути використані комплексно.

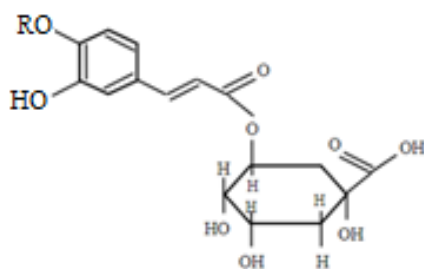


Рис. 2.9. Структурна формула хлорогенової кислоти

Розробка методів виділення поліфенольних сполук ускладнюється тим, що близько 70% ХГК пов'язано з білком. Існуючі методи засновані на екстракції фенольних сполук реагентами кислотного типу, переважно – бурштинової кислоти [44]. Однак такий метод, незважаючи на доведену

ефективність, має ряд недоліків, таких, як відносна дорожнеча самої бурштинової кислоти, велика витрата води, пов'язана з кількістю промивок. Ця технологія спрямована виключно на очищення білка і не дозволяє отримати екстракт поліфенольних сполук.

У рамках розробки комплексної технології переробки рослинної сировини проводяться дослідження щодо виділення препарату ХГК, що дозволить збільшити глибину переробки та отримати новий продукт з високою доданою вартістю. Найбільш перспективною є екстракція на стадії одержання концентрату. Рослинний матеріал, проаналізований у дослідженні [45], складався з цілого насіння соняшнику, очищеного насіння та залишок від преса промислового виробництва нафти. Крім того, насіння олійних культур і типи неолійних культур порівнювали з точки зору їх фенольних профілів і вмісту. Детальна інформація про зразки наведена в таблиці 2.2.

Таблиця 2.2

**Специфікація матеріалу проби, що використовується для аналізу
поліфенолів**

назва	тип	зразок матриці	походже ння	рік винайде ння	джерело
Gusto	неолійні	Очищене насіння	невідоме	невідоме	Gusto AG, Hohenpolding, Germany
Naturalita	неолійні	Очищене насіння	невідоме	невідоме	Maryland Trockenfrucht Vertriebs GmbH, Henstedt- Ulzburg, Germany
Dovgan	неолійні	Ціле насіння	невідоме	невідоме	DOVGAN GmbH, Hamburg, Germany
Schilfer	олійні	Залишки	невідоме	2006	Teutoburger Ölmühle

		від виробниц тва нафти			GmbH & Co. KG, Ibbenbüren, Germany
Geiger	олійні	Ціле насіння	Німеччин а	2006	Carl Geiger GmbH & Co.KG, Marbach, Germany
Італія	олійні	Ціле насіння	Італія	2006	Teutoburger Ölmühle GmbH & Co. KG, Ibbenbüren, Germany
Франція	олійні	Ціле насіння	Франція	2006	Teutoburger Ölmühle GmbH & Co. KG, Ibbenbüren, Germany
Німеччин а	олійні	Ціле насіння	Німеччин а	2006	Teutoburger Ölmühle GmbH & Co. KG, Ibbenbüren, Germany

Для аналізу похідних гідроксициннамоїлу соняшника (рис. 2.10), автори [65] використовували стаціонарну фазу C18 з гідрофільним кінцевим блокуванням. Як видно з додатку С базового поділу було досягнуто для майже всіх основних поліфенольних сполук соняшнику. Вичерпне вилучення поліфенолів в роботі [66] було досліджено за допомогою різних екстракційних розчинників, таких як ацетон (100%, 80% і 60%), метанол (100%, 80% і 60%) і етанол (100%, 80% і 60%). Оскільки водний метанол (60%) дав найвищий вихід, його використовували для всіх наступних екстракцій поліфенолів. Для попередньої обробки екстрактів соняшнику була проведена подальша пробопідготовка без твердофазної екстракції.

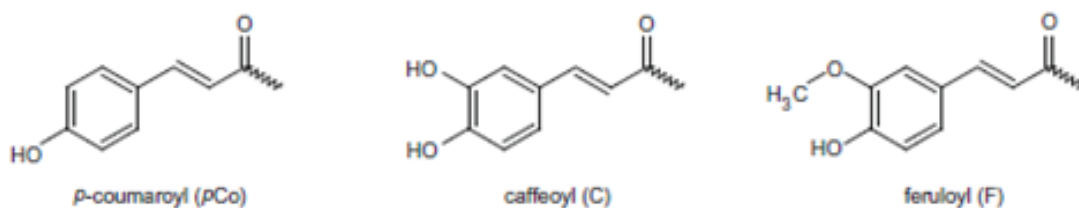


Рис. 2.10. Структури поліфенолів виявлені в насінні соняшника

Дані LC/MS усіх ідентифікованих сполук представлені в таблиці 2.3. Згідно з попередніми дослідженнями поліфенольного профілю і вмісту насіння соняшнику [67], 5-CQA було ідентифіковано як переважаючий поліфенол (сполука 2). Ідентифікація цієї сполуки була заснована на порівнянні УФ-спектрів і часів утримання з стандартною речовиною. Крім того, фрагментація вихідного іону m/z 353 давала іони-продукти m/z 191 і 179, з фрагментом хінної кислоти, що представляє основний пік, і кофеїлу фрагмент присутній лише з незначною інтенсивністю, що узгоджується з даними літератури [68] (табл. 2.3).

Таблиця 2.3

Часи утримування, УФ-спектри та характерні іони поліфенольних сполук, виявлених у ядрах та шкаралупі соняшнику

сполуки	час затримки	назва	HPLC-DAD $\lambda_{\max}$ (нм)	$[M-H]^-$ m/z	HPLC-ESI-MS m/z
1	8.0	3-О-кофеїлхінінова кислота	240, 303, 324	353	191 (100), 179 (46), 192 (11), 180 (7), 135 (4)
2	15.4	5-О-кофеїлхінінова кислота	242, 305, 326	353	191 (100), 179 (46), 119 (100)
3	17.5	4-О-кофеїлхінінова	237, 303, 326	353	173 (100), 179 (44), 191 (31),

		кислота			161 (3)
4	18.5	кофеїнова кислота	238, 302, 326	179	135 (100)
5	23.7	кофеоїлхінінова кислота	233, 314	353	191 (100)
6	25.7	5-О- кумароїлхінінова кислота	231, 310	337	191 (100), 163 (7)
7	31.5	5-О- ферулоїлхінінова кислота	243, 326	367	191 (100), 173 (5), 111 (4), 274 (3), 336 (3)
8	59.3	ферулова кислота	296, 323	193	134 (100)
9	61.4	3,4-ди-О- кофеоїлхінінова кислота	242, 303, 325	515	353 (100), 173 (23), 179 (18), 498 (14), 191 (11), 354 (9)
10	62.7	3,5-ди-О- кофеоїлхінінова кислота	241, 303, 327	515	353 (100), 191 (17), 179 (7)
11	67.3	4,5-ди-О- кофеоїлхінінова	243, 303, 327	515	353 (100), 173 (22), 173 (22), 299 (8), 255 (7), 191 (5)

Ще дві речовини, що містять іон $[M-H]$ при m/z 353 (сполуки 1 і 3) були однозначно віднесені до 3-CQA (неохлорогенна кислота) і 4-CQA (криптохлорогенова кислота). Поведінка фрагментації обох складових була добре узгодженою з літературними даними [66]. Дисоціація вихідного іона 3-CQA призвела до утворення основного піку, що відповідає фрагменту хінної

кислоти, і порівняльний інтенсивний сигнал від кавової кислоти (m/z 179), а [хінна кислота–H–H₂O] іон при m/z 173 як основний пік був виявлений для 4-CQA з помітним сигналом при m/z 179 в результаті кавової кислоти в експерименті MS2.

Таблиця 2.4

**Вміст індивідуальних поліфенольних сполук у ядрах та оболонці
соняшнику неолійного (мг/100 г)**

назва поліфенолу	Ядра та оболонки неолійних культур			
	Gusto ядро	Naturalita ядро	Dovgan ядро	Dovgan оболонка
кофеїнова кислота	20.5±1.6	21.3±1.6	27.8±3.1	0.6±0.1
ферулова кислота	7.6±3.6	10.5±1.0	9.2±3.2	0.9±0.3
Неетерифіковані фенольні кислоти	28.1±4.0	31.8±1.9	37.0±4.4	1.5±0.3
5-О- кумароїлхінінова кислота	11.3±2.4	10.2±0.8	10.6±3.3	1.1±0.0
5-О-ферулоїлхінова кислота	16.5±1.5	17.3±0.7	12.2±1.2	1.0±0.0
Похідні кумарової та ферулової кислот	27.9±2.8	27.5±1.1	22.8±3.5	2.1±0.0
3-О-кофеоїлхінінова кислота	480.4±21.6	268.4±28.0	515.9±6.8	1.9±0.2
4-О-кофеоїлхінінова кислота	2795.7±167. 4	117.1±3.5	91.2±5.1	1.8±0.2
5-О-кофеоїлхінінова кислота	3358.8±168. 8	2364.2±159.4	2473.1±45.9	20.2±2.2
кофеоїлхінінова кислота	24.7±3.3	23.3±3.0	24.1±1.5	1.4±0.1
Монокофеїлхінні кислоти	14.9±5.8	2773.0±161.9	3104.3±46.7	25.3±2.3
3,4-ди-О-кофеоїлхінінова	135.0±3.0	31.4±0.9	29.9±4.4	1.1±0.1

кислота				
3,5-ди-О-кофеїлхінінова кислота	135.0±3.0	200.7±11.5	227.6±5.3	5.1±0.3
4,5-ди-О-кофеїлхінінова кислота	46.3±2.7	227.5±13.1	133.8±3.8	3.7±0.4
Дикафеїлхініні кислоти	196.2±7.0	459.6±17.5	391.3±7.8	11.2±0.7
загальна кількість	3611.0±169. 1	3291.9±162.9	3555.5±47.7	40.8±2.4

Ізомери 5-CQA та 3-CQA були позбавлені [хініну кислота-H-H₂O], що пояснюється їх особливостями стереохімією, що не допускає участі 1,2-ацилу при фрагментації. Таким чином, вода лише значно виводиться з 4-ізомеру. Було виявлено, що інший компонент (сполука 5) демонструє іон [M-H] при m/z 353 і картина фрагментації в MS2 експеримент, подібний до 5-CQA. Спектральні характеристики сполуки 5 вказують на цис-ізомер CQA (додаток С).

Вміст поліфенольних сполук у соняшнику у кількостях представлений в таблиці 2.4 показує вміст 11 окремих сполук неолійних культур і ядра та шкаралупи соняшника. Вміст поліфенолів коливався від 2938,8 мг/100 г до 4175,9 мг/100 г сухої речовини для очищених ядер і від 40,8 мг/100 г до 86,0 мг/100 г СМ для відповідних шкаралуп, що передбачає варіацію приблизно на 30% для ядер соняшнику і 52% для оболонок. Ядра соняшнику не олійного лише незначно відрізнялися в діапазоні 3291,9–3611,0 мг/100 г сухої речовини (табл. 2.4). Як уже було зазначено, що 5-CQA була переважаючою сполукою у всіх зразках. Цей CQA та його ізомери 3- та 4-CQA, відповідно, становили 62,1% до 92,9% (додаток Е).

Оскільки ядра соняшнику містять близько 50% олії, то залишки видобутку нафти становлять приблизно 10,6 млн тонн, як можна оцінити з річного виробництва соняшникової олії. Тому, щоб зберегти харчову цінність

необхідно забезпечити повне видалення фенольних сполук при виробництві білкових концентратів або ізолятів із соняшникового насіння.

2.4. Оцінка та шляхи ймовірного застосування одержаних поліфенольних сполук

Продемонстрована можливість використання поліфенолів соняшнику як ефективних антиоксидантів для соняшникової олії. Поліфеноли отримані з соняшникового шроту, такі як кавова, хлорогенова та ферулова кислоти показали високий антиоксидантний потенціал, що може бути корисним як з технофункціональної, так і з біофункціональної точки зору. При подальшому дослідженні проводиться процедура для відновлення фенольних антиоксидантів з оболонок насіння соняшнику екстракція розчинником була розроблена в лабораторних масштабах. Повідомлялося [38], що цей екстракт шкаралупи насіння складається з протокатехуїну, хлорогенової, кавової, сиригіненової, ферулової і о-коричневої кислот.

Рослини роду верба (*Salix*) сімейства вербові (*Salicaceae*) широко поширені у флорі України, мають великі сировинні запаси, що здавна використовуються в народній медицині та вважаються перспективним джерелом отримання біологічно активних речовин (БАВ) широкого спектра дії. В вербах міститься цілий комплекс поліфенолів: фенольні глікозиди, флавоноїди, дубильні речовини конденсованої природи, кумарини, саліцилати, аскорбінова кислота, сапоніни, ефірні олії, амінокислоти, полісахариди. Найбільший інтерес представляє значну кількість природних поліфенольних сполук у сировині, які зумовлюють знеболювальну, жарознижувальну, антиоксидантну, протизапальну, антимікробна, спазмолітична, нейропротекторну дію, Р-вітамінну активність.

Хлорогенова кислота є основною поліфенольною сполукою в ядрах соняшнику з набагато меншими концентраціями другою йде кавова кислота. Вісім поліфенольних сполук у водних (негідролізованих) екстрактах

соняшникової муки були попередньо ідентифіковані та кількісно визначені. Вони володіють різними біологічними ефектами протиінфекційними, противірусними, протипухлинними, імунною дією, та інгібування розповсюджених клітин заражених раком і протидії пухлинним метастазам. Поліфенольні сполуки отримані з соняшникового шроту проявляють різну активність на клітинному рівні ZR-75-1 (IC₅₀: 0.5 – 1.5 μM) і A2780 (IC₅₀: 0.6 – 10.0). Деякі похідні демонструють різну активність на клітинному рівні людини, так HT-29, HCT-15, A-549, HOP-62 і SiHA. Вони можуть використовуватись в суміші з протеїнами Bcl-2, Bcl-XL і Mcl-1 або протидіяти протеїнам Bcl-2, Bcl-XL і Mcl-1. Також отримані похідні поліфенолів показали хорошу активність проти раку простати PC-3 і людської кальциноми товстої кишки HCT-116 клітин з IC₅₀ величинами 6.37 і 8.61 μM, відповідно.

Натуральні і синтетичні поліфенольні похідні з соняшникового шроту демонструють пробактеріальну ефективність проти *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *Tetragenococcus* (*Micrococcustetragenus*), *Sarcina lutea* (*Micrococcuslutea*), *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *S. albus*, відома як *marine* бактерія *Vibrio parahaemolyticus*, і *V. anguilla-rum*. Деякі поліфеноли продемонстрували протибактеріальний ефект проти грам-позитивної і грам-негативної бактерії зокрема: *E. coli*, *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium smegmatis* і *vancomycin-resistant Enterococcus faecalis*.

Ігараші і інші [50] описали серії поліфенолів які інгібують бактерії *methicillin resistant S. aureus*, *methicillin susceptible S. aureus*, *multidrug-resistant S. aureus*, і *van-comycin intermediate S. aureus* і демонструють протибактеріальну дію проти YucG гістидин кінази і мутацій стрибтококу VicK гістидин кінази. Юї і співробітники [41] представили різні поліфеноли з шроту які володіють протимікробним ефектом проти *Microbotryum violaceum* і *B. Megatherium*, а також інгібуючий ефект проти *Botrytis cinerea*. Тіан і інші [42] описали в своєму патенті і виділили різні поліфеноли з соняшникового

шроту і підтвердили їх протибактеріальний ефект проти *Pyricularia oryzae*, *Alternaria salani*, *Fusarium oxysporum*, *B. cinerea*, *Verticillium albo-atrum*, і *Cladosporium fulvum*.

Дослідження показали що пероральний прийом реїну перспективно поліпшує жорсткість панкреатичного фіброзу в досліджуваних мишей. Досить цікавим є те що реїн не демонструє ніякого токсичного, або пагубного ефекту на майбутньому тварини і він може бути введений через те що він не спричиняє негативного ефекту на вагу тіла миші. Наступна стадія демонструє що реїн може використовуватись в лікуванні, або послабленні фіброзного стану такого як панкреофіброз. Подальші дослідження відкривають те що реїн є профібротичним медіатором TGF- β і α -SMA відомим як сповільнювач зведеної внутрішньоклітинної матриці (типу 1 колагену і фібронектину). Естерові похідні реїну і їх використання для широкого спектру протизапальних станів включаючи: ревматизм, артрит, остеоартрит, остеопороз, язві ний коліт, переодонтит, гінгівіт, псоріаз, склеродерма, дерматит, астма, системна червона вовчанка, нефропатія і хронічної легеневої хвороби.

Ефективність антиоксидантного продукту кавової кислоти автори оцінили на різних харчових жирах, у порівнянні з стандартом пропілгаллатом. На основі їх відбирали зразки харчового жиру типовий жирнокислотний склад (табл. 2). Крім того, для своїх природного (сало) або промислового походження (рафінована оливкова олія), деякі харчові зразки жиру були істотно позбавлені нативної антиоксидантної речовини. Усі протестовані антиоксиданти додавали до зразків жиру розчиняли в ацетоні в концентрації, еквівалентній 240 кг на 21 кг жиру.

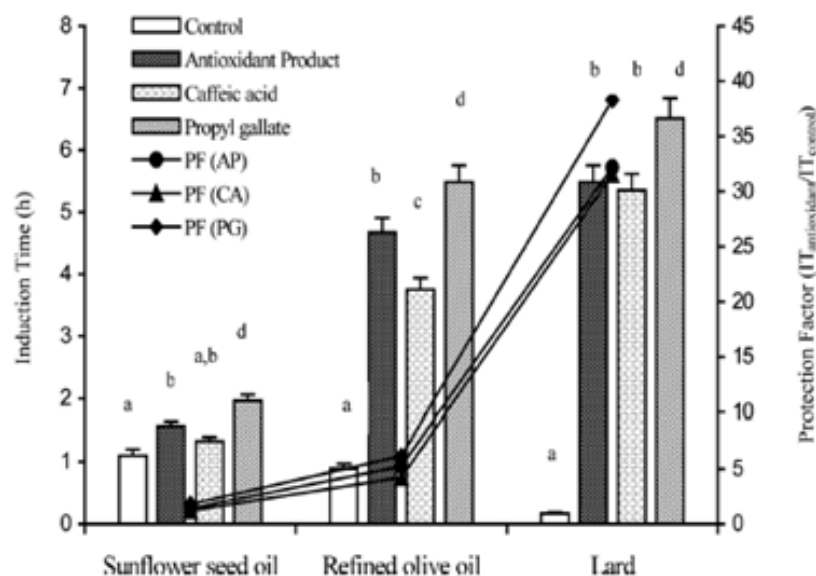


Рис. 2.11. Результати випробувань Rancimat

Дані, отримані за допомогою тестів Rancimat, наведені на рис. 2.7. Усі додані поліфеноли підвищили стійкість до окислення зразків жиру з урахуванням відповідного контролю. Ефективність виміряна як фактор захисту, становила 1,43 в соняшниковій олії, у рафінованій оливковій олії – 5,24, у салі – 32,2. Антиоксидантна ефективність досліджених поліфенолів варіювалася залежно від складу жирних кислот зразків жиру і, крім того, по відношенню до насичених/поліненасиченого співвідношення таким чином: антиоксидант, соняшникова олія, рафінована оливкова олія, свиняче сало; співвідношення насичені/поліненасичені, 0,17, 1,08, 3,35.

Природний антиоксидант продукт із насіння соняшнику при рН 5,5 відновлює Fe^{3+} , а рутин, катехін, і таксифолін були помірно активними, а кемферол і лутеолін були поганими відновниками. Цей ефект пояснюється тим, що одночасна присутність кате холу група в В-кільці та 3-гідроксильна група в С-кільці відіграє вирішальну роль у зниженні потенціалу флавоноїдів. Наявність 2,3-подвійного зв'язку в кон'югації з 4-оксогрупа в кільці С також важлива для здатності до відновлення Fe^{3+} . Здається, що 2,3-ди зв'язок збільшує планарність молекули і надає більшу жорсткість кільцю

та утримує кільця А і С у більш компланарному положенні, дозволяючи 3-гідроксилу/4-оксо групи та 5-гідроксильні/4-оксогрупи, щоб бути ближчими. Додатково визначено що флавоноїди більш ефективно хелатують залізо, коли іон металу знаходиться в двовалентній формі, це означає, що флавоноїд повинен відновити Fe^{3+} до Fe^{2+} перед асоціацією. На закінчення, поліфеноли з галоловими і катехоловими групами є найпотужнішими антиоксидантами через великі константи стабільності зв'язування заліза для цих груп.

Сезонна динаміка антиоксидантної активності та рівня поліфенольних сполук у листі журавлини, брусниці і соняшникового шроту була подібною: високі значення в періоди набухання нирок і плодоношення та зниження при цвітінні, з різницею 1,5-2,5 рази. Однак якщо сумарна антиоксидантна активність у листі всіх трьох видів була найбільшою весною, то рівень суми поліфенольних сполук та вміст проціанідинів досягали максимальних значень у осінній період (100 та 8 мг/г сирої маси відповідно), що говорить про ширші функції поліфенолів у листі, що обмежуються лише антиоксидантним значенням. Загальне кількість флавоноїдів, у тому числі і катехинів, для кожного виду у весняний та осінній період було приблизно однаково, а максимальне зниження їх кількості (у 4 рази) спостерігалось в період цвітіння.

Поліфеноли з гідроксильними групами виділені з соняшникового шроту часто інгібують систему цитохрому Р450, яка відповідає за активацію канцерогену. Поліфеноли можуть бути індукторами одного сімейства цитохромів і інгібіторами іншого. Наприклад, α -нафтофлавіон інгібітор людських CYP1A1 і 1A2, але індуктор CYP3A4. Взаємодії флавоноїдів з CYP3A4 представляють особливий інтерес, оскільки CYP3A4 є одним з основних метаболічних системи, присутні в клітинах печінки та кишечника людини, відповідальні за метаболізм більше 50% терапевтичних засобів, а також активації канцерогенів, що надходять з їжею. Одночасне призначення поліфенолів і клінічно використовуваних препаратів показало, що взаємодії

між ними часто відбуваються, тому модулюють фармакокінетики певних препаратів.

За останні кілька років було встановлено, що окрім антиоксидантної дії, багато поліфеноли виявляють здатність реконструювати хроматин і спричиняти деякі інші епігенетичні модифікації. Багато поліфенолів можуть регулювати експресію ядерного фактора альфа В і ремоделювання хроматину через активацію або інгібування епігенетичних ферментів такі як гістонацетилтрансферази, ДНК-метилтрансферази або гістондеацетилази (HDAC). Геністеїн, фенетилізоціанат, куркумін, сульфорафан і ресвератрол викликають інгібування деацетилювання білків гістонів, деякі інші поліфеноли, такі як епігалокатехін-3-галлат (EGCG), геністеїн і куркумін діє як інгібітор ацетилювання гістонів під час епігенетичних модифікацій. EGCG, геністеїн, лікопін, куркумін і ресвератрол пригнічують метилювання ДНК шляхом перешкоджаючи активності ДНК-метилтрансферази.

Поліфеноли, присутні в соняшниковому шроті, індукують фазу II ферментів і викликають експресію глутатіон-S-трансфераз, але він також стимулює фазу II детоксикації шляхом активації фактора 2, пов'язаного з ядерним фактором E (NRF-2). Цей фактор зазвичай присутній в цитоплазмі, але при окисному стресі NRF-2 переміщається до ядра і зв'язується з антиоксидантним реактивним елементом (ARE), сприяючи експресію антиоксидантних ферментів. Сульфорафан також сприяє розвитку раку вплив через пригнічення активності HDAC.

Куркумін, відомий антиоксидант, може регулювати як ацетилювання, так і деацетилювання через модуляцію окисного стресу. Окислювальний стрес індукуює шлях NF-κB через активацію активності гістонацетилаз, але він може пригнічувати HDAC. Це викликало індукцію антиоксидантних ферментів II фази шляхом активації передачі сигналу NRF-2, відновлення гена пригнічення пухлини p53 шляхом пригнічення ацетилювання гістонів і ацетилювання негістонового гена супресора пухлини p53, і модуляцію медіаторів запалення (TGF-β і COX2). Він також модулює рівень експресії

мікроРНК в ракових клітинах. Куркумін знижує експресію антиапоптозів ген Bcl-2 шляхом посилення регуляції miR-15a та miR-16. EGCG викликав гіперметилування p16INK4a, p15, RAR β , MGMT і hMLH1 генів, він змінив гіперметильовану ділянку гена супресора пухлини RECK, і посиленна експресія цього гена. Це було пов'язано зі скороченням матриці металопротеїнази MMP-2 і MMP-9, які беруть участь у потенціалі інвазії пухлинних клітин [43].

Кумарова кислота теж виділена з соняшникового шроту знижує рівень ROS шляхом модуляції детоксикаційних ферментів, таких як SOD і каталаза. Коли його застосовували в комбінації з хіміопрепаратами, цисплатиною у низьких концентраціях, він послабив терапевтичний ефект цисплатину та інших протипухлинних препаратів в клітинах раку яєчників шляхом зменшення пошкодження АФК. Було встановлено, що кумарова кислота пригнічує клітинний цикл і індукує апоптоз через інгібування HADC і DNMT1.

Група сполук поліфенольного ряду, першими представниками яких є ферулоіл та кофеіл, виділена з соняшникового шроту ефективна щодо грампозитивних, грамнегативних бактерій (стрептококів, стафілококів, шигел, сальмонел та ін.), а також трихомонад, лямблій та інших. мікроорганізмів, включаючи штами, стійкі до антибіотиків та сульфаніламідів. У невеликих концентраціях такі лікарські засоби виявляють бактеріостатичну активність, а при високих концентраціях – бактерицидну. Бактеріостатичний ефект виникає за рахунок утворення похідними комплексів з нуклеїновими кислотами, внаслідок чого порушується ДНК збудника та пригнічується синтез мембранних та енергетичних білків бактерій. Бактерицидний ефект реалізується за рахунок того, що відбувається зв'язування протонів від клітинних структур збудника, пригнічуються ферменти ланцюга дихання, що інгібується цикл Кребса, і збудник гине внаслідок руйнування мікробної клітини.

Природні антиоксиданти мають дуже специфічні властивості, які впливають на важливі процеси метаболізму ссавців, наприклад протизапальну, антистарільну, антиатеросклерозну та протипухлинну. Для отримання поліфенолів активні в організмі людини, їх біотрансформація відбувається під впливом травлення ферментів і мікробного метаболізму в кишечнику. Результати реакцій біотрансформації в утворенні різних проміжних/кінцевих продуктів з антипаразитарними, антибактеріальними і противірусні властивості.

Довічне ремоделювання індивідуального фенотипу є результатом складних взаємодій серед генома, епігенома, харчування (особливо біоактивних речовин), мікробіоти, поточне, минуле та родове середовище, що призводить до стану здоров'я. щодня, організм людини генерує приблизно 5 г внутрішньоклітинних АФК з мітохондрій дихальний ланцюг і фагоцитарний нікотинаміаденіндинуклеотидфосфат оксидази, яка є вирішальним компонентом системи імунного захисту, у сигналізації клітин і гомеостаз. Метод фотонної емісії (UPE) придатний для використання як інструмент для моніторингу окислювальних метаболізм АФК фізіологічні окисні процеси. Пошук і поєднання різних методів вимірювання окислювальних *in vivo* та стрес *in vitro* сприяє кращому розумінню дії поліфенолів на метаболізм людини. Дистальний відділ шлунково-кишкового тракту можна розглядати як резервуар для анаеробної ферментації в якому містяться полісахариди, білки, ліпіди та ксенобіотики, включаючи трансформовані поліфеноли. ШКТ багатий мікрофлорою, яка є першим бар'єром між епітеліальними клітинами, через які будуть поглинатися поліфеноли.

РОЗДІЛ 3. ВИДІЛЕННЯ І ОЧИЩЕННЯ ХЛОРОГЕНОВОЇ КИСЛОТИ З СОНЯШНИКОВОГО ШРОТУ

3.1. Методи екстракції

Широке застосування у фармації знайшов ультразвук (через швидкість передачі), який використовується при розчиненні, отриманні емульсій, суспензій, виготовленні мікрогранул, стерилізації та фонофорезі, виробництві ампул, тобто там, де ультразвук безпосередньо контактує через рідку фазу з молекулою речовини. Однак, при УЗ впливі які здатні не тільки змінити конфірмаційну структуру озвучуваної молекули, її просторову орієнтацію і властивості, але і деформувати, рвати молекулярний ланцюжок на окремі фрагменти (або їх частини). У цьому відношенні звукохімічні ефекти, пов'язані з перетворенням енергії упругих коливань ультразвуку, є одним з видів механохімічних реакцій (що здатні впливати на зв'язки молекул).

На динаміку екстракційного процесу, а отже, і на швидкість та її якість впливають такі чинники: як співвідношення кількості сировини (грамм, моль) та екстрагента; гістологічну будову сировини; ступінь подрібнення сировини; матеріал з якого виготовлена апаратура; температура і час настоювання; вплив ферментів і мікрофлори; також хімічний склад діючих речовин; та рН середовища. Сучасні чинники які впливають на ці процеси зведені до мінімуму, завдяки роботі компютерезованих програм, які застосовують як на виробництві так і в лабораторії. Так компютерна програма здатна розрахувати оптимальне рН середовища завдяки обробці даних.

З метою отримання повноцінних витяжок необхідно для цього використовувати максимально можливу за даних умов кількість води. При цьому треба враховувати, що частина рідини після екстракції завжди

утримується (поглинається) рослиною, тому готової витяжки виходить менше, ніж було взято води. Для отримання необхідної кількості витяжки потрібно додавати воду, що призводить до часткового розведення (розбавлення) настою або відвару. Це небажано, через те що втрати діючих речовин пропорційні кількості рідини, що залишається в сировині. Шляхом віджимання сировини ці втрати можна дещо зменшити, проте, повністю позбутися від них нажаль не можна.

Тому необхідну кількість води, для одержання витяжки, не можна зменшувати, так як може призвести до зменшення кількості діючих речовин із сировини. Показано, що найкращим розчинником для хлорогенової кислоти (ХК) є 70% етиловий спирт. Однак, при цьому білки, що містяться в шроті соняшнику, денатурують, що ускладнює їх подальше очищення при комплексній переробці шроту, зокрема при послідовному видаленні поліфенольних сполук і білків. Крім того, використання етанолу веде до збільшення вартості ГК і вимагає утилізації відпрацьованого розчинника, оскільки обсяги рідини при екстракції хлорогенової кислоти дуже великі, це вимагає великих витрат. Існує інший спосіб екстракції хлорогенової кислоти зі шроту - закислення середовища кислотами, що супроводжується утворенням комплексів ГК з іншими сполуками. Відомо, що хлорогенова кислота добре розчинна у спиртах, а й у воді.

З метою спрощення подальшого очищення ХК від інших поліфенольних сполук та зменшення ймовірності комплексоутворення з білками та враховуючи, що в соняшниковому шроті на хлорогенову кислоту припадає більше 50% від усіх поліфенольних сполук, використовували короткочасну водну екстракцію ХК з соняшникового шроту з подальшою із сефадексом G-50.

Екстракцію ХК проводили стерильною дистильованою водою у співвідношенні 1:4 (маса/об'єм) при перемішуванні 2 обороти/хв протягом 2 хв при різних температурах від 20 до 40°C.

3.2. Вплив кількості екстракцій соняшникового шроту на вихід екстрактивних речовин та хлорогенової кислоти

Короткочасна (до 2 хв) водна екстракція соняшникового шроту при співвідношенні 1:4 (маса/об'єм) дозволяє екстрагувати до 20% речовин, що містяться в шроті по сухій речовині після 4 послідовних екстракцій (рис. 1). Необхідно відзначити, що після першої та другої екстракції у водну фазу переходило 8,5 і 7,7% екстрактивних речовин, тобто 16% з 20 після 4 екстракцій (рис. 3.1).

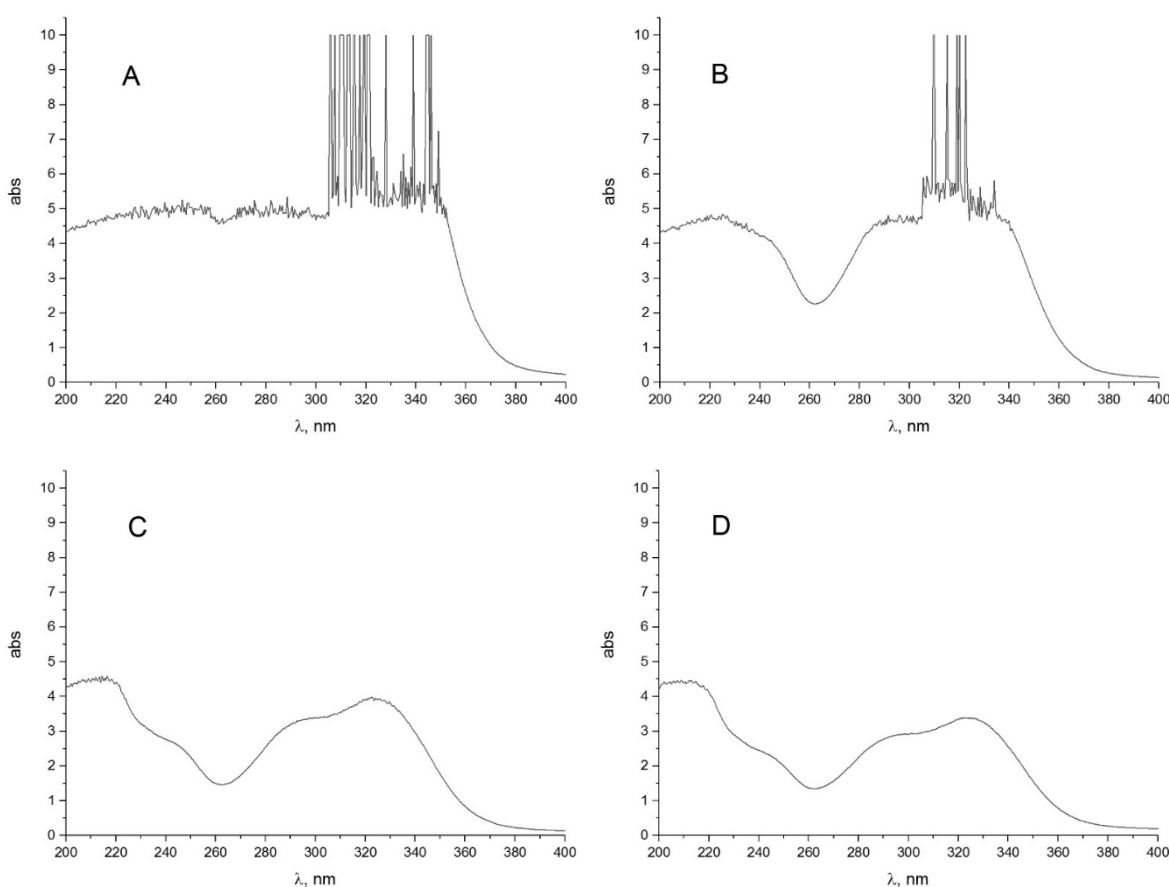


Рис. 3.1. Типові спектри поглинання в ультрафіолетовій частині спектра екстрактивних речовин після першої короткострокової (2 хв) екстракції соняшникового шроту (А), після другої екстракції за тих же умов (Б), після 3 (С) та 4 екстракції (Д). Всі зразки були розведені дистильованою водою однаковою мірою (50 разів), що дозволило зафіксувати поглинання в оптимальних межах для всіх зразків та провести порівняльний кількісний аналіз.

Короткочасна водна екстракція п.ш. після першого промивання забезпечувала перехід у водну фазу широкий спектр насамперед поліфенольних сполук, які поглинали світло в діапазоні від 300 до 350 нм і невелику кількість білків і пептидів, які поглинають в області 260-280 нм. (Рис. 3.1 А). Після другої екстракції п.ш. спектр і кількість поліфенольних сполук переходять у водний розчин значно зменшувався при цьому зменшувалася і кількість білків, що екстрагуються (рис. 3.1 В). Після другої та третьої екстракцій кількість поліфенольних сполук і білків перехідників у водну фазу різко зменшувалася (рис.3.1 С, D).

Отримані результати вказують на те, що основна кількість поліфенольних сполук переходить у водний розчин у перших двох промивках шроту дистильованою водою, за цих умов білки залишаються у складі шроту. Отримані екстрактивні сполуки розділяли на колонці із сефадексом G-50. Як елюат використовували дистильовану воду. Як видно із спектру поглинання, цей простий метод дозволяє отримати хлорогенову кислоту та її ізомери, які поглинають в ділянці 315-330 нм (рис. 3.2).

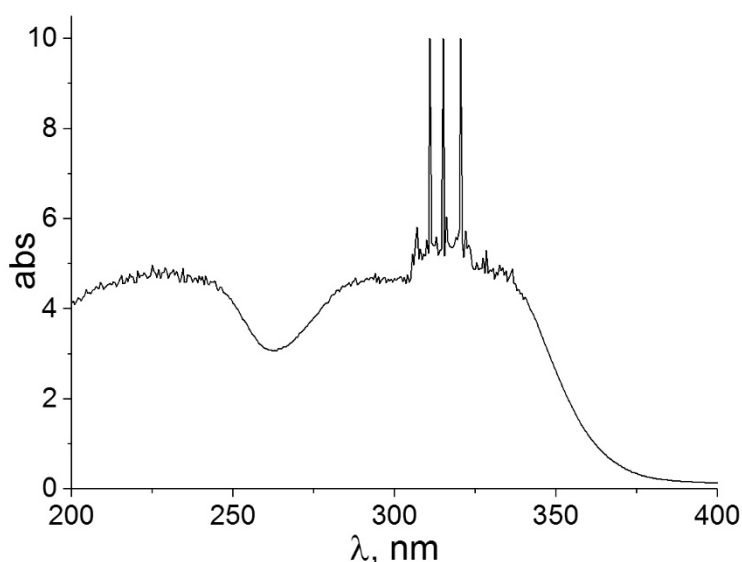


Рис. 3.2. Спектри поглинання ізоформ хлорогенової кислоти після очищення водного екстракту на колонці з сефадексом G-50 (висота колонки 400 мм, діаметр 25 мм, швидкість елюції 0.9-1.2 мл за хвилину).

3.3. Вплив температури екстракції на вихід хлорогенової кислоти

При температурі 20 С протягом 2 хв у водний розчин переходило 29 г/л сухих речовин (табл. 3.1). При збільшенні температури до 35°C супроводжувалося незначним збільшенням вмісту поліфенольних сполук у водному розчині до 32 г/л, а збільшення температури екстракції до 40°C не призводило до збільшення виходу ГК у водну фазу (табл. 3.1). Отже, температура екстракції в діапазоні від 20 до 40 незначно впливала на вихід ГК у водний розчин.

Табл. 3.1. Вихід екстрактивних речовин збагачених хлорогенової кислоти із соняшникового шроту, яку проводили протягом 2 хв за різних температур; представлені середні значення та стандартні помилки з 5 експериментів

Температура екстракції, °С	Концентрація сухої речовини (г/л)
20	29.40 ± 0.9
30	28.80 ± 1.8
35	32.40 ± 1.2 *
40	31.35 ± 0.9

* відзначений варіант для якого $p < 0.05$ порівняно з варіантом екстракції при 20°C

Надалі ізоформи хлорогенова кислота після хроматографічного очищення була сконцентрована на ротаційному випарнику до 20 мг/мл, і використана при оцінці їхньої біологічної дії на експериментальних тварин - щурах лінії Wistar. Водний розчин ГК вводили тваринам двома способами: внутрішньочеревно та перорально.

ВИСНОВКИ

1. Досліджено склад і будову поліфенольних сполук, історію відкриття та поширення в природі.
2. Описано технології отримання поліфенольних сполук з рослинних джерел. Розглянуто сучасні методи екстракції.
3. Досліджено технології отримання поліфенольних сполук з соняшникового шроту. Визначено раціональні умови процесу підготовки соняшникового шроту до екстракції поліфенольних сполук.
4. Охарактеризовано біологічну активність отриманих з соняшникового шроту поліфенолів, зокрема кавова, хлорогенову та ферулову кислоти та описано їх високий антиоксидантний потенціал.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Tuberoso C. I. G. Chemical composition and antioxidant activities of *Myrtus communis* L. berries extracts / C. I. G. Tuberoso Rosa A., E. Bifulco, M. P. Melis, A. Atzeri // *Food Chem.* – 2010. – № 123. – P. 1242 – 1251.
2. Державна фармакопея України / Державне підприємство «Науковоекспертний фармакопейний центр». – 1-е вид. Доп. 2. Харків: РІГЕР, 2008. – 620 с.
3. Dadalioglu I. Chemical compositions and antibacterial effects of essential oils of Turkish oregano (*Origanum minutiflorum*), bay laurel (*Laurus nobilis*), Spanish lavender (*Lavandula stoechas* L.), and fennel (*Foeniculum vulgare*) on common foodborne pathogens / I. Dadalioglu, G. A. Evrendilek // *J Agric Food Chem.* – 2004. – № 52(26). – P. 8255 – 8260.
4. Reena Jain, Nadhi Katare, Vijay Kumara, Amit Kumar Samanta, Swati Goswami, C.K. Shrotri In vitro antibacterial potential of different extracts of *Tagetes erecta* and *Tagetes patula*. *Journal of Natural Sciences Research*. 2012. Vol. 2, №5. P. 84-91.
5. Tsao, R., 2010. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients* 2, 1231–1246. United States Department of Agriculture [USDA], 2007. USDA Database for the Flavonoid Content of Selected Foods, Release 2.1. Available at: <http://www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/Place/12354500/Data/Flav/flav02-1.mdb>.
6. Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C., Pouységu, L., 2011. Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angewandte Chemie (International Edition)* 50, 586–621.
7. Haslam, E., Cai, Y., 1994. Plant polyphenols (vegetable tannins): gallic acid metabolism. *Natural Product Reports* 11, 41–66.
8. Swain, T., Bate-Smith, E.C., 1962. Flavonoid compounds. In: Mason, H.S., Florkin, A.M. (Eds.), *Comparative Biochemistry*, vol. 3. Academic Press, New York, pp. 755–809.

9. Lattanzio, V., Kroon, P.A., Quideau, S., Treutter, D., 2008. Plant Phenolics – Secondary Metabolites with Diverse Functions. In: Daayf, F., Lattanzio, V. (Eds.), *Recent Advances in Polyphenols Research*, vol. 1. Wiley-Blackwell, Oxford, pp. 1–35.
10. Bravo, L., 1998. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutrition Reviews* 56, 317–333.
11. Sánchez-Moreno, C., 2002. Compuestos polifenólicos: estructura y clasificación: presencia en alimentos y consumo: biodisponibilidad y metabolismo. *Alimentaria* 329, 19–28.
12. Harborne, J.B., 1989. Methods in plant biochemistry. In: Dey, P.M., Harborne, J.B. (Eds.), *Plant Phenolics*. Academic Press, London, UK.
13. D'Archivio, M., Filesì, C., Di Benedetto, R., Gargiulo, R., Giovanni, C., Masella, R., 2007. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Annali dell'Istituto Superiore Di Sanità* 43, 348–361.
14. Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C., Jimenez, L., 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition* 79, 727–747.
15. Han, X., Shen, T., Lou, H., 2007. Dietary polyphenols and their biological significance. *International Journal of Molecular Sciences* 8, 950–988.
16. Grosso, G., Stepaniak, U., Topor-Madry, R., Szafraniec, K., Pajak, A., 2014. Estimated dietary intake and major food sources of polyphenols in the polish arm of the HAPIEE study. *Nutrition* 30, 1398–1403.
17. Bravo, L., Abia, R., Saura-Calixto, F., 1994. Polyphenols as dietary fiber associated compounds: comparative study on in vivo and in vitro properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42, 1481–1487.
18. Scalbert, A., Williamson, G., 2000. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *Journal of Nutrition* 130, 2073S–2085S.
19. Duthie, G.G., Gardner, P.T., Kyle, J.A.M., 2003. Plant polyphenols: are they the new magic bullet? *Proceedings of the Nutrition Society* 62, 599–603.

20. Yang, C.S., Landau, J.M., Huang, M.T., Newmark, H.L., 2001. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annual Review of Nutrition* 21, 381–406.
21. Adlercreutz, H., Mazur, W., 1997. Phyto-oestrogens and Western diseases. *Annals of Medicine* 29, 95–120.
22. Bhat, K.P., Pezzuto, J.M., 2002. Cancer chemopreventive activity of resveratrol. *Annals of the New York Academy of Sciences* 957, 210–229.
23. Pereira, D.M., Valentao, P., Pereira, J.A., Andrade, P.B., 2009. Phenolics: from chemistry to biology. *Molecules* 14, 2202–2211.
24. Cheynier, V., 2005. Polyphenols in foods are more complex than often thought. *American Journal of Clinical Nutrition* 81 (Suppl.), 223S–229S.
25. Hollman, P.C.H., Cassidy, A., Comte, B., Heinonen, M., Richelle, M., Richling, E., Serafini, M., Scalbert, A., Sies, H., Vidry, S., 2011. The biological relevance of direct antioxidant effects of polyphenols for cardiovascular health in humans is not established. *Journal of Nutrition* 141, 989S–1009S.
26. Siebert, K.J., 1999. Effects of protein–polyphenol interactions on beverage haze, stabilization and analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47, 353–362.
27. Nijveldt, R.J., van Nood, E., van Hoorn, D.E.C., Boelens, P.G., van Norren, K., van Leeuwen, P.A.M., 2001. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *American Journal of Clinical Nutrition* 74, 418–425.
28. Dangles, O., Dufour, C., 2006. Flavonoid–protein interactions. In: Andersen, O., Markham, K. (Eds.), *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry & Applications*. CRC Press, Boca Raton, USA, pp. 443–469.
29. Groot, H., Rauen, U., 1998. Tissue injury by reactive oxygen species and the protective effects of flavonoids. *Fundamental and Clinical Pharmacology* 3, 249–255.
30. Arcamone F, Cassinelli G, Fantini G, Grein A, Orezzi P, Pol C, Spalla C. Adriamycin, 14-hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from *S. peucetius*

var. caesius. *Biotechnol Bioeng* 1969;XI:1101–1110.

31. Powis G. Free radical formation by antitumor quinones. *Free Radic Biol Med* 1989;6:63–101.

32. Nohl H, Jordan W, Youngman RJ. Quinones in biology: Functions in electron transfer and oxygen activation. *Adv Free Radic Biol Med* 1986; 2:211–279.

33. Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L. Anthracyclines: Molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev* 2004;56(2):185–229.

34. von Brockmann H. Anthracyclinone und Anthracycline (Rhodomycinone, Pyrromycinone und ihre Glykoside). *Fortschritte Der Chemie Org Naturstoffe* 1963; 21:121–182.

35. Thurlow KJ. *Chemical Nomenclature*. Springer Netherlands, B.V.; 1998. p 185–186.

36. Walczak RJ, Dickens ML, Priestley ND, Strohl WR. Purification, properties, and characterization of recombinant *Streptomyces* sp. strain C5 DoxA, a cytochrome P-450 catalyzing multiple steps in doxorubicin biosynthesis. *J Bacteriol* 1999; 181(1):298–304.

37. Malla S, Prasad Niraula N, Singh B, Liou K, Kyung Sohng J. Limitations in doxorubicin production from *Streptomyces peucetius*. *Microbiol Res* 2010;165(5):427–435.

38. Parekh S, Vinci Va, Strobel RJ. Improvement of microbial strains and fermentation processes. *Appl Microbiol Biotechnol* 2000;54(3):287–301.

39. Arcamone F, Bernardi L, Giardino P, Patelli B, Marco A, Casazza A, Pratesi G, Reggiani P. Synthesis and antitumor activity of 4-demethoxydaunorubicin, 4-demethoxy-7,9-diepidaunorubicin, and their beta anomers. *Cancer Treat Rep* 1976;60(7):829–834.

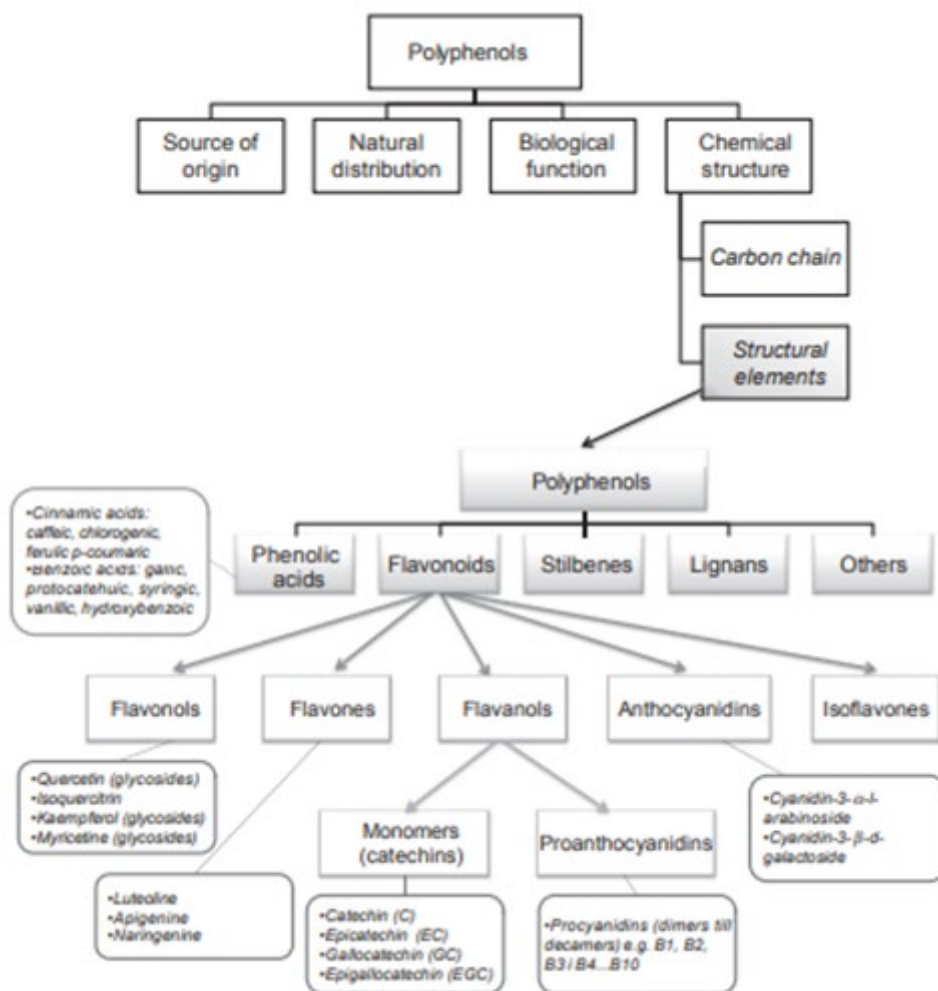
40. Suarato A, Penco S, Arcamone F. Process for the preparation of 4'-epidaunorubicin, 3',4'-diepidaunorubicin, their doxorubicin analogs, and intermediates used in said process. Patent 4345068, 1982.

41. Ma C, Wang Y-G, Shi J-F, Chen Y-Z, Chen Y-H. An efficient synthesis of N-trifluoroacetyl Adriamycin-14-valerate (AD-32). *Synth Commun* 1999;29(20):3581–3586.
42. Cotterill IC, Rich JO. Chemoenzymatic synthesis of N-trifluoroacetyl doxorubicin-14-valerate (valrubicin). *Org Process Res Dev* 2005;9:818–821.
43. Toffoli G, Sorio R, Aita P, Crivellari D, Corona G, Bearz A, Robieux I, Colussi AM, Stocco F, Boiocchi M. Dose-finding and pharmacologic study of chronic oral idarubicin therapy in metastatic breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2000;6(6):2279–2287.
44. Frederick CA, Williams LD, Ughetto G, van der Marel GA, van Boom JH, Rich A, Wang AH-J. Structural comparison of anticancer drug-DNA complexes: Adriamycin and daunomycin. *Biochemistry* 1990;29:2538–2549.
45. Yang, D. Development of a new chlorogenic acid certified reference material for food and drug analysis / D. Yang,; L. Jiao, Tai Ling [et al.] // *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. – 2017. – Vol. 140. – P. 169-173. – doi:10.1016/j.jpba.2017.03.026.
46. Schmidt, S. Potential application of oilseeds as source of antioxidants for food lipids – a review / S. Schmidt, J. Pokorny // *Czech. J. Food Sci.* – 2005. – Vol. 23. – P. 93-102. – doi: 10.17221/3377-CJFS.
47. Дмитрієвський Д. І. Технологія лікарських препаратів промислового виробництва / Д. І. Дмитрієвський. – Вінниця: Вид-во «Нова Книга». – 2008. – 277 с.
48. Сидоров Ю.І. Процеси і апарати мікробіологічної та фармацевтичної промисловості. Технологічні розрахунки. Приклади і задачі. Основи проектування: Навчальний посібник / Ю. І. Сидоров, Р. Й. Влязло, В. П. Новіков. – Львів : «Інтелект-Захід», 2008. – 736 с.
49. Weisz G.M., Kammerer D.R., Carle R. Identification and quantification of phenolic compounds from sunflower (*Helianthus annuus* L.) kernels and shells by HPLC-DAD/ESI-MSn // *Food Chemistry*. 2009. № 2 (115). P. 758–765.

50. Igarashi M, Utsumi R, Watanabe T. Novel antibacterial anthraquinone compound, MK844-mF10, microbial manufacture thereof, Streptomyces producing it, and compositions containing it. JP201843A; 2011

Додаток А

Різні класифікації рослинних поліфенолів і класи поліфенолів на основі кількості фенольних кілець і їх структурні елементи

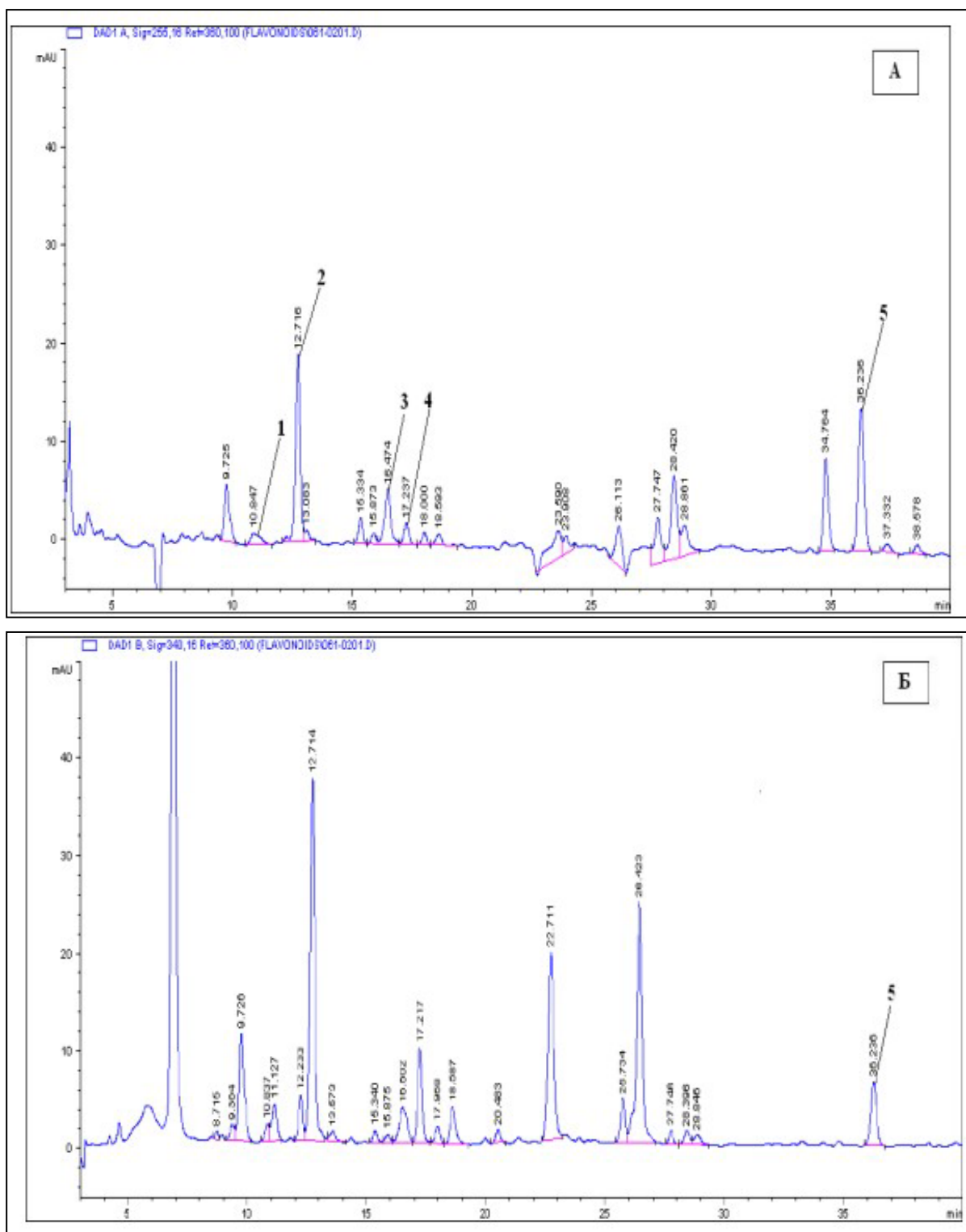


Додаток В

Хроматограми поліфенолів у траві астранції великої:

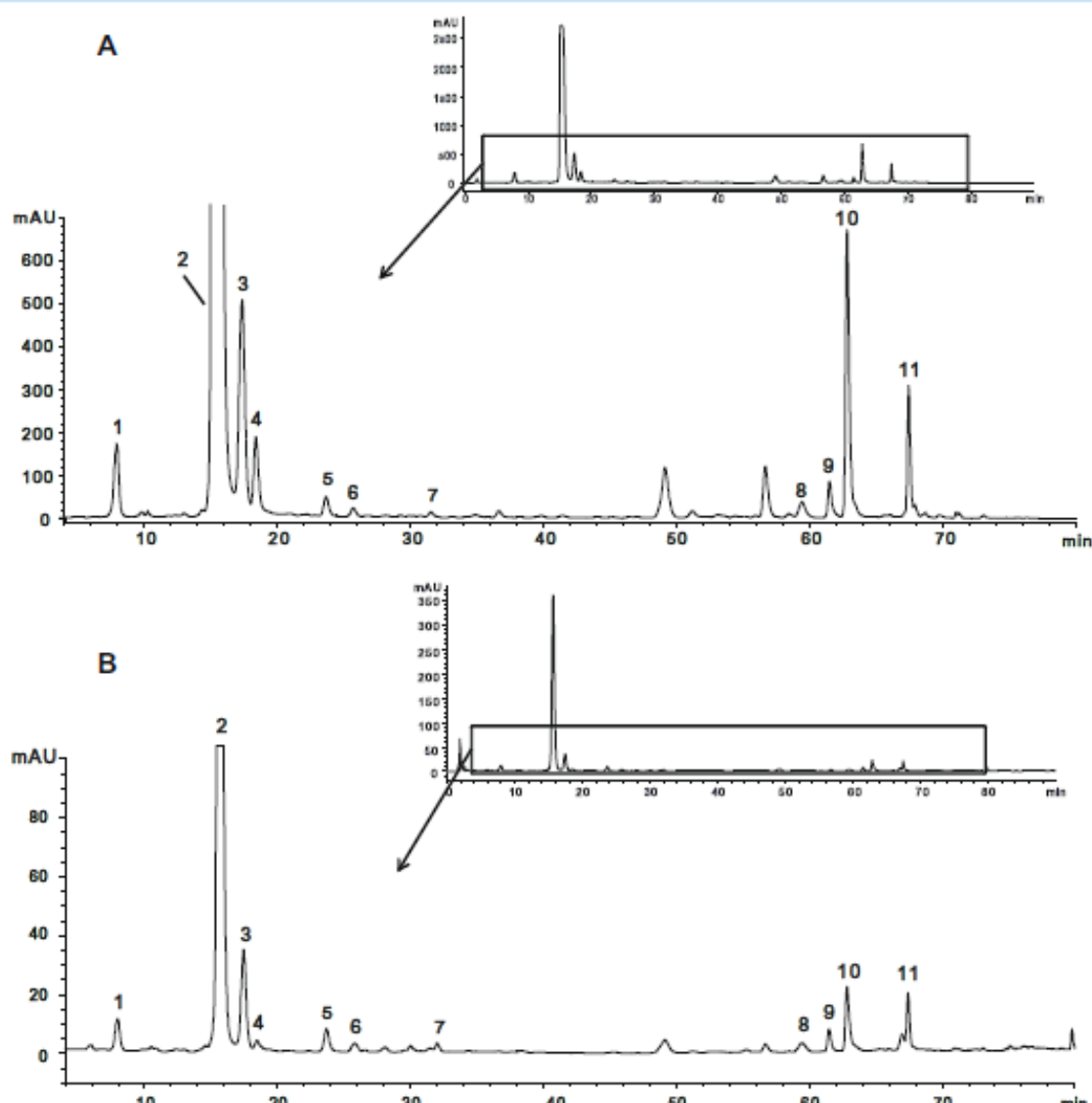
А – довжина хвилі 255 нм, Б – довжина хвилі 340 нм;

(1 – гіперозид, 2 – рутин, 3 – ізокверцитрин, 4 – лютеолін, 5 – кверцетин).



Додаток С

Розділення кофеїлхінових кислот та інших поліфенольних сполук у ядрах соняшника (А) та шкаралупі (В) за допомогою HPLC-DAD (320 нм); призначення піку: (1) 3-О-кофеїлхінінова кислота, (2) 5-О-кофеїлхінінова кислота, (3) 4-О-кофеїлхінінова кислота, (4) кавава кислота, (5) кофеїлхінінова кислота, (6) 5-О-р-кумароїлхінінова кислота, (7) 5-О-ферулоїлхінінова кислота, (8) ферулова кислота, (9) 3,4-ди-О-кофеїлхінінова кислота, (10) 3,5-ді-О-кофеїлхінінова кислота та (11) 4,5-ди-О-кофеїлхінінова кислота.



Додаток Е

Частка поліфенольних сполук в ядрах і шкарлупі соняшника

Sample	Non-esterified phenolic acids [%]	Coumaric and ferulic acid derivatives [%]	Monocaffeoyl-quinic acids [%]	Dicaffeoyl-quinic acids [%]
Gusto [kernels]	0.8 ± 0.1	0.9 ± 0.1	92.9 ± 0.1	5.5 ± 0.2
Naturalita [kernels]	1.0 ± 0.1	0.8 ± 0.0	84.4 ± 5.5	14.0 ± 0.7
Dovgan [kernels]	1.2 ± 0.1	0.6 ± 0.1	86.8 ± 1.2	11.4 ± 0.2
Dovgan [shells]	3.7 ± 0.6	5.0 ± 0.3	62.1 ± 5.9	29.2 ± 2.1
Schilfer [oil extraction residue]	1.2 ± 0.1	0.9 ± 0.0	84.0 ± 4.8	14.0 ± 0.7
Geiger [kernels]	1.1 ± 0.1	0.7 ± 0.0	87.8 ± 0.6	10.4 ± 0.0
Geiger [shells]	1.8 ± 0.2	5.9 ± 0.4	73.4 ± 3.9	19.1 ± 1.3
Italy [kernels]	0.9 ± 0.1	0.4 ± 0.0	84.1 ± 5.7	14.9 ± 0.9
Italy [shells]	2.7 ± 0.2	3.2 ± 0.2	76.9 ± 2.7	17.2 ± 0.3
France [kernels]	0.9 ± 0.1	0.4 ± 0.0	84.1 ± 5.7	14.9 ± 0.9
France [shells]	1.5 ± 0.1	3.6 ± 0.3	83.0 ± 3.9	11.9 ± 0.8
Germany [kernels]	3.6 ± 0.2	0.4 ± 0.0	84.1 ± 0.4	11.5 ± 0.2
Germany [shells]	1.6 ± 0.3	2.9 ± 0.2	83.8 ± 5.1	11.9 ± 0.6

Додаток Д

Загальна технологічна схема отримання поліфенолів з рослинної сировини

