

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
БУКОВИНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
Кафедра фармації

МАГІСТЕРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

за спеціальністю 226 Фармація, промислова фармація

спеціалізація 226.01 Фармація

на тему:

ФІТОХІМІЧНИЙ АНАЛІЗ ГІБІСКУСУ СИРІЙСЬКОГО

Виконала: здобувач вищої освіти
V курсу, 2 групи
медико-фармацевтичного
факультету, спеціальність
226 Фармація, промислова фармація,
спеціалізація 226.01 Фармація
денна форма здобуття вищої освіти
ДАЦКІВ Сніжана Михайлівна

Керівник: доцент закладу вищої
освіти кафедри фармації,
кандидат фармацевтичних наук
БАСАРАБА Роксолана Юріївна

Рецензенти: доцент закладу вищої
освіти кафедри фармації,
кандидат фармацевтичних наук
МУЗИКА Наталія Ярославівна
доцент закладу вищої освіти кафедри
медичної та фармацевтичної хімії,
кандидат біологічних наук
ВЕЛИКА Алла Ярославівна

До захисту допущено

протокол № 18 від 02.05.2025 р.

засідання кафедри фармації

Завідувач кафедри _____ доц. Олег ГЕРУШ

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	4
ВСТУП	5
РОЗДІЛ 1 БОТАНІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА, ХІМІЧНИЙ СКЛАД ТА ЗАСТОСУВАННЯ ГІБІСКУСУ СИРІЙСЬКОГО (огляд літератури).....	8
1.1 Ботанічна характеристика гібіскусу сирійського	8
1.2 Хімічний склад гібіскусу сирійського (<i>Hibiscus syriacus</i>).....	11
1.3 Використання гібіскусу сирійського в традиційній та сучасній медицині та косметології.....	14
Висновки до розділу 1.....	18
РОЗДІЛ 2 ОБ'ЄКТИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	19
2.1 Ідентифікація біологічно активних речовин у сировині гібіскусу сирійського.....	19
2.1.1 Ідентифікація БАР фенольної природи методом ТШХ.....	21
2.2 Виявлення та визначення індивідуальних компонентів дикарбонових кислот методом ГХ/МС.....	22
2.3 Кількісне визначення суми органічних кислот.....	23
2.4 Визначення кислоти аскорбінової.....	24
2.5 Дослідження індивідуальних компонентів флавоноїдів методом ВЕРХ.....	25
2.6 Кількісне визначення суми флавоноїдів.....	26
2.7 Дослідження індивідуальних компонентів гідроксикоричних кислот методом ВЕРХ.....	27
2.8 Кількісне визначення суми гідроксикоричних кислот	28
2.9 Визначення вмісту суми поліфенолів.....	29
2.10 Кількісне визначення вмісту антоціанів.....	31
2.11 Визначення числових показників якості квіток гібускусу сирійського	32
Висновки до розділу 2.....	34

РОЗДІЛ 3 ДОСЛІДЖЕННЯ ЯКІСНОГО СКЛАДУ ТА КІЛЬКІСНОГО ВМІСТУ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ КОМПОНЕНТІВ У КВІТКАХ ГІБІСКУСА СИРІЙСЬКОГО.....	35
3.1 Дослідження вмісту індивідуальних компонентів дикарбонових кислот у квітках гібіскусу сирійського	35
3.2 Визначення вмісту суми органічних кислот	38
3.3 Аскорбінова кислота.....	39
3.4 Визначення індивідуальних компонентів флавоноїдів у досліджуваному об'єкті.....	41
3.5 Встановлення вмісту суми флавоноїдів у квітках гібіскусу сирійського.....	45
3.6 Встановлення вмісту індивідуальних компонентів гідроксикоричних кислот у досліджуваній сировині.....	46
3.7 Вміст суми гідроксикоричних кислот у квітках гібіскусу сирійського.....	49
3.8 Вміст суми поліфенолів у досліджуваному об'єкті.....	50
3.9 Визначення вмісту антоціанів у квітках гібіскусу.....	52
3.10 Встановлення числових показників гібіскусу сирійського.....	55
3.10.1 Втрати в масі при висушуванні	55
3.10.2 Визначення загальної золи	56
3.10.3 Визначення золи, нерозчинної у 10 % розчині кислоти хлоридної.....	56
Висновки до розділу 3.....	57
ВИСНОВКИ.....	59
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	60

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

БАР – біологічно активні речовини;

ВЕРХ – високоефективна рідинна хроматографія;

ГХ/МС – газова хроматографія з мас-спектрометричним детектором;

ДФУ – Державна Фармакопея України;

ЛРС – лікарська рослинна сировина;

ТШХ – тонкошарова хроматографія;

ФСЗ – фармакопейний стандартний зразок.

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження

Лікарські рослини, здавна застосовувані в народній медицині, є джерелом численних біологічно активних сполук, зокрема гідроксикоричних і органічних кислот, флавоноїдів, дубильних речовин тощо. Завдяки комплексному складу ці сполуки забезпечують широкий спектр дії на різні органи й системи людського організму. Основною метою використання фітотерапії є корекція метаболічних розладів, оскільки рослинні метаболіти мають подібність до ендогенних речовин організму людини.

Попри значні досягнення у створенні синтетичних лікарських засобів, у сучасній медицині все більше уваги приділяється використанню препаратів рослинного походження. Враховуючи постійне зростання попиту промисловості на рослинну сировину для фармацевтичного виробництва, одним із пріоритетних напрямів сучасної фармацевтичної науки є як вивчення відомих, так і пошук нових джерел рослинної сировини.

Лікарські рослини слугують цінним джерелом біологічно активних сполук, що використовуються для профілактики й лікування різноманітних захворювань людини. При розробці нових фітотерапевтичних засобів науковці надають перевагу тим рослинам, ефективність яких підтверджена тривалим досвідом застосування в доказовій медицині.

Фітотерапія має низку переваг, зокрема доступність і відносно низьку вартість у порівнянні із синтетичними препаратами. Рослинні засоби вирізняються широким терапевтичним спектром дії та здатністю впливати на основні ланки розвитку патологічного процесу.

В Україні приблизно 52 % усіх лікарських препаратів виробляють із використанням рослинної сировини. Крім того, країна має значні ресурси дикорослих і культивованих лікарських рослин, що створює сприятливі умови для подальшого розвитку виробництва вітчизняних фітопрепаратів.

Останніми роками науковці виявляють зростаючий інтерес до

фітохімічного складу та фармакологічної активності рослинної сировини родини мальвових (*Malvaceae*). Завдяки видовому різноманіттю та насиченому вмісту біологічно активних речовин, рослини цієї родини становлять цінний об'єкт для наукових досліджень з метою їх подальшого застосування в медичній практиці. Зокрема, гібіскус сирійський (*Hibiscus syriacus* L.) є одним із найбільш відомих представників родини *Malvaceae*, що широко використовується у фармацевтичній галузі.

Проте на сьогодні існує обмежена кількість наукових публікацій, присвячених вивченню хімічного складу гібіскусу сирійського. У зв'язку з цим метою нашого дослідження стало виявлення основних груп біологічно активних речовин у квітках цієї рослини.

Мета та завдання дослідження. Метою досліджень було провести фітохімічний аналіз гібіскусу сирійського квіток.

Для досягнення даної мети були поставлені наступні завдання:

- здійснити аналіз наукових джерел, присвячених ботанічним особливостям, хімічному складу та фармакологічним властивостям гібіскусу сирійського;
- провести ідентифікацію основних біологічно активних компонентів, що містяться в гібіскусі;
- визначити кількісний вміст головних біологічно активних сполук у квітках гібіскусу сирійського.

Об'єктом дослідження є квітки гібіскусу сирійського, які підлягають комплексному фітохімічному аналізу.

Предмет дослідження. Дослідження якісного складу та визначення кількісного вмісту основних біологічно активних речовин у квітках гібіскусу сирійського.

Методи дослідження. У ході виконання дослідження були застосовані хімічні, фізичні, фізико-хімічні, фітохімічні та статистичні методи аналізу.

Наукова новизна одержаних результатів. У ході дослідження проведено аналіз якісного складу та визначено вміст основних груп біологічно активних речовин у квітках гібіскусу сирійського. Встановлено наявність та кількісну

характеристику гідроксикоричних кислот, флавоноїдів, поліфенолів, антоціанів і карбонових кислот. Окрім того, визначено основні числові показники досліджуваної рослинної сировини.

Практичне значення одержаних результатів. Встановлено якісний склад і визначено кількісний вміст основних груп біологічно активних речовин у квітках гібіскуса сирійського. Отримані результати підтверджують доцільність подальшого вивчення цієї рослини та перспективи використання її біоактивних компонентів у медичній і фармацевтичній практиці.

Апробація результатів дослідження і публікації. Результати дослідження були представлені на V науково-практичній конференції з міжнародною участю присвяченій пам'яті доктора хімічних наук, професорки Ніни Павлівни Максютіної (до 100-річчя від дня народження) «PLANTA+. Наука, практика та освіта» (м. Київ, 28-29 січня 2025 р.). За результатами кваліфікаційної роботи було опубліковано 1 тези.

Обсяг і структура роботи. Наукова робота складається зі вступу, огляду літератури, двох розділів власних досліджень, висновків, списку використаних джерел та додатків. Обсяг наукової роботи складає 68 сторінок друкованого тексту. Робота ілюстрована 13 таблицями і 20 рисунками. Перелік використаних джерел містить 71 найменування.

РОЗДІЛ 1

БОТАНІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА, ХІМІЧНИЙ СКЛАД ТА ЗАСТОСУВАННЯ ГІБІСКУСУ СИРІЙСЬКОГО (огляд літератури)

1.1 Ботанічна характеристика гібіскусу сирійського

Родина *Malvaceae* належить до порядку мальвоцвітих і являється родиною дводольних квіткових рослин. У даній родині міститься близько 244 родів з приблизно 4225 відомими видами рослин [1].

Гібіскус — поліморфний рід родини мальвових, який включає близько 300 видів дерев, кущів і трав, що ростуть у тропічних, субтропічних і помірних регіонах світу [2]. Рослини роду *Hibiscus* являють собою однорічні або багаторічні трав'янисті рослини, які характеризуються наявністю зірчастих та/або простих одноклітинних волосків. Вони славляться своїми лопатовими черговими черешковими листками із зрізаною основою, також із пазушними та поодинокими квітками [3].

Багато видів рослин роду гібіскус цінуються як декоративні рослини та культивуються у садах. Рослини роду *Hibiscus* привертають значну увагу завдяки великим і привабливим квіткам.

В Україні в умовах культурного вирощування використовують такі інтродуковані представники роду *Hibiscus* L. У відкритому ґрунті культивують гібіскус сирійський (*H. syriacus*), гібіскус трійчастий (*H. trionum*) та гібіскус гібридний (*H. hybridus*). У закритому ґрунті вирощується гібіскус китайський (*H. rosa-sinensis*).

Hibiscus syriacus (рис. 1.1), що має азійське походження (Китай, Індія), є листопадним деревом або кущем з насичено-зеленими листками й квітами різного кольору, діаметром 6–10 см, які зовні нагадують мальви. Росте повільно, зацвітає й утворює плоди з трьох-чотирьох років, при цьому може жити до століття. З віком рослина стає більш стійкою до морозів, витримуючи короткочасне зниження температури до -29°C. Найкраще розвивається на

помірно вологих ґрунтах, добре переносить пересадку та обрізку. Розмножується живцюванням, щепленням та насінням. У ландшафтному дизайні застосовується для створення одиночних і групових композицій [4].



Рис. 1.1 Гібіскус сирійський

Перші описи тропічних гібіскусів були зроблені наприкінці XVII століття голландськими дослідниками Георгом Румфіусом та Гендріком ван Рідом. У 1753 році Карл Лінней надав наукову назву гібіскусу з червоними махровими квітками, назвавши його китайською трояндою (*Hibiscus rosa-sinensis*). Пізніше вчені встановили, що описаний Ліннеєм гібіскус не є дикорослим видом, а є садовою гібридною формою, створеною ще давніми полінезійськими садівниками.

Hibiscus syriacus L., широко відомий як троянда Шарон (рис. 1.2), являє собою листопадний чагарник, що відноситься до родини Мальвових. Походить він родом зі Східної Азії та має достатньо культурне значення в різних країнах, особливо в Кореї, де він вважається національною квіткою, що символізує

стійкість і красу. Дана рослина має багату культурну історію і культивується протягом тисячоліть. Завдяки широкому спектру використання, різноманітному забарвленню квіток та безперервному періоду цвітіння до трьох місяців з літа до осені, достатньо сильній стійкості до навколишнього середовища, гібіскус сирійський став популярним вибором для садівництва та озеленення [5, 6].



Рис. 1.2 *Hibiscus syriacus* L.

Гібіскус сирійський можна вирощувати в різних кліматичних і ґрунтових умовах, таких як скеляста місцевість, сільськогосподарські угіддя, узбережжя, уздовж доріг і в садах, як квітуча декоративна рослина. Частина назви цього виду «syriacus» вказує на те, що цей вид гібіскуса, походить із Сирії [6]. Цей вид демонструє різноманітність у варіації в структурі рослини та інших морфологічних характеристиках, таких як колір квітки, форма, колір та зовнішній вигляд листка тощо.

Гібіскус сирійський – являє собою листопадний чагарник до 5-6 м заввишки. Стебло товсте, деревоподібне, конічної форми, голе, сильно-облиствене, сіре, тип розгалуження симподіальне. Листки прості, лопатеві з зубчастим краєм трикутно-яйцевидної форми, зеленого кольору, верхня поверхня темніша за нижню поверхню листка. Довжина листка становить 2–8,5 см, а ширина – 2–4,7 см. Жилкування перисто-сітчасте, середня жилка і великі жилки більш виражені на нижній поверхні. Черешок темно-зеленого кольору, зірчастий і циліндричний. Квітки гермафродитні, актиноморфні, зібрані в цимус. Кольорова чашечка складається з п'яти фіолетових або синьо-лавандових пелюсток з малиновими основами. Квітки поодинокі або махрові. Вони мають розміри 5,5–7 см в довжину і 2,5-4 см в діаметрі. Рослина має невеликі коробочки, які мають яйцевидну форму. Вид високоплідний, скоростиглий, морозостійкий [3].

Гібіскус сирійський (*Hibiscus syriacus*) є найпопулярнішим видом цього роду і має гермафродитні квітки білого, рожевого, червоного, лавандового або фіолетового кольору, залежно від сорту [7].

1.2 Хімічний склад гібіскусу сирійського (*Hibiscus syriacus*)

Згідно даних літератури, було досліджено та виявлено, що багато видів рослин роду *Hibiscus* містять велику кількість різноманітних біологічно активних сполук, включаючи флавоноїди, антоціани, терпеноїди, стероїди, полісахариди, алкалоїди, амінокислоти та ліпіди [8].

Результати попередніх фітохімічних досліджень показали, що у листках гібіскусу сирійського виявлено наявність флавоноїдів: дигідрокверцетину, гербацетину (рис. 1.3), кемпферолу, сапонаретину та сапонарину (рис. 1.4), раніше було продемонстровано, що він здатний зменшувати спричинену УФВ-променями еритему та пухлиноутворення в організмі людини [9].

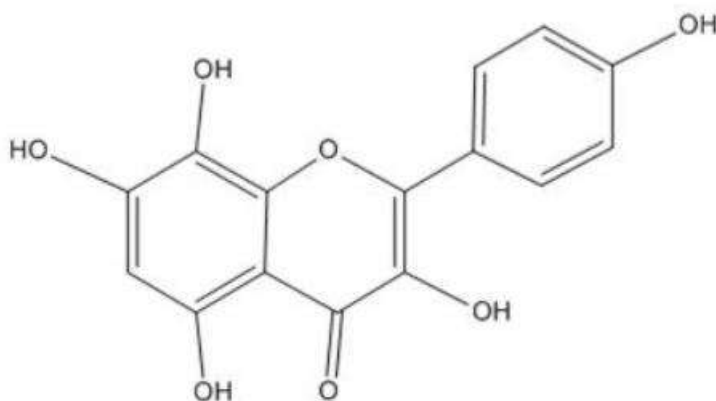


Рис. 1.3 Структурна формула гербацетину

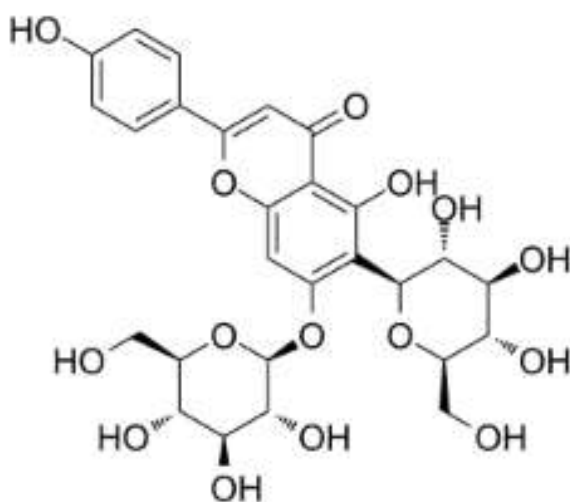


Рис. 1.4 Структурна формула сапонарину

Крім того, було виявлено, що екстракт з квіток *H. syriacus* багатий на вміст антоціанів та жирних кислот [10].

Park Y. та ін. виявили основні біоактивні сполуки в екстрактах *H. syriacus*, а саме, *o*-кумарова кислота, *n*-кумарова кислота, шафтозид, ізошафтозид, апігенін-6-С-глюкозид-7-о-глюкозид і кемпферол-3-О-галактозид-7-О-рамнозид. Загалом найбільшу кількість біологічно активних сполук, 2 фенольні кислоти та 22 флавоноїди, було виявлено в пелюстках гібіскусу сирійського [11].

Згідно літературних джерел, було виявлено, що квітки гібіскуса сирійського містять такі флавоноїди, як апігенін, паларгонідин, ціанідин, кверцетин, крізантемін, кемпферол (рис. 1.5), присутні також такі сполуки, як камфора, лимонна кислота, щавлева кислота та винна кислота. Досліджено також, що квітки містять глікозиди, тритерпеноїди, ліпіди, терпени, бета-ситостерин, та тераксерил [12].

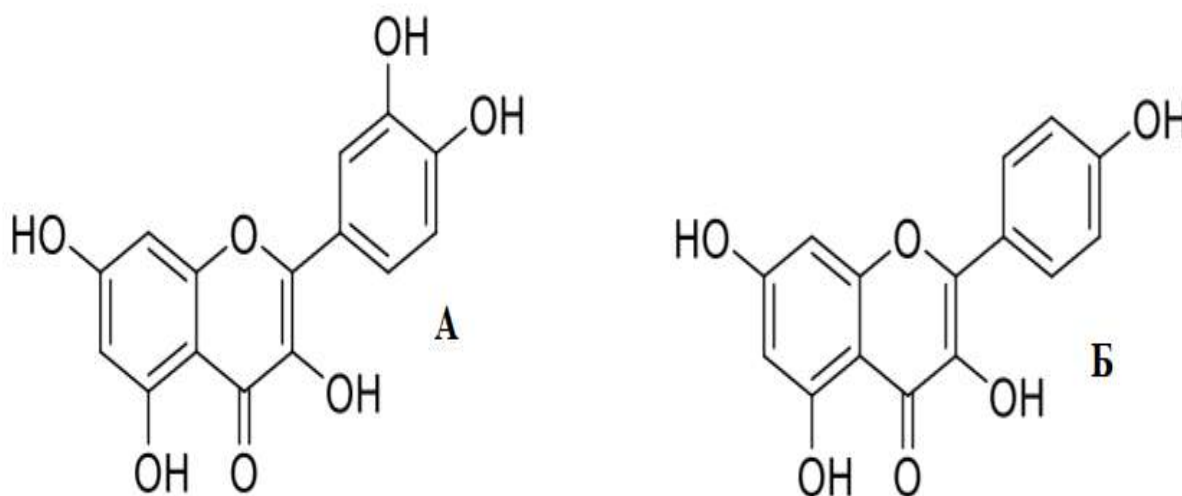


Рис. 1.5 Кверцетин (А) та кемпферол (Б)

Корейські вчені у пошуках нових ефективних сполук проти старіння, виділили з метанольного екстракту *H. syriacus* гідроксигібіскон А (1) та гібіскон D (2), нові фурано-сесквітерпеноїди, які показали помірну активність у аналізі еластази нейтрофілів людини (рис 1.6).

Сполуки 1 і 2 були отримані з шару хлороформу шляхом моніторингу інгібіторної активності еластази нейтрофілів людини (рис. 1.6). Наскільки відомо, це перше дослідження, яке демонструє інгібіторну активність похідних фурано-сесквітерпеноїдів до еластази нейтрофілів людини [13].

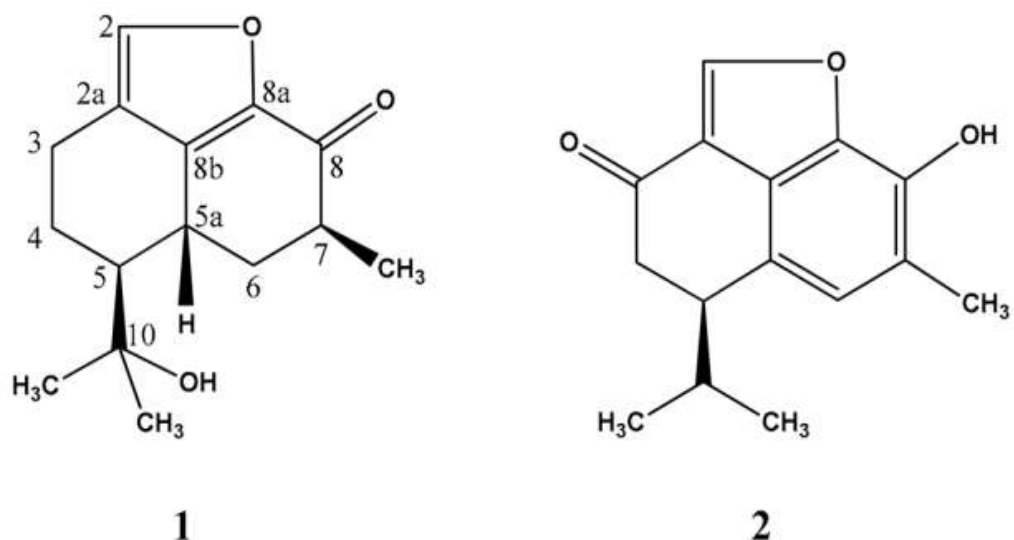


Рис. 1.6 Сполуки гідроксигібіскон А (1) та гібіскон D (2), виділенні з гібіскусу сирійського

1.3 Використання гібіскусу сирійського в традиційній та сучасній медицині та косметології

Висушений корінь і кора стебла *H. syriacus* L. застосовувалися як жарознижуючі засоби у традиційній медицині.

Geng та ін. було виявлено, що пігментний екстракт пелюсток *H. syriacus* L. володів потенційними антиоксидантними властивостями *in vitro* через посилення активності поглинання гідроксильних радикалів і зниження регуляції перекисного окислення ліпідів [14], що вказує на те, що даний екстракт можна використовувати як джерело антиоксидантів.

Квітки, корінь, стебло та кора *H. syriacus* демонструють фармацевтичну дію та широко використовуються як лікувальні засоби в Азії.

Згідно джерел літератури квітки гібіскусу сирійського використовуються для лікування дизентерії, виділень з піхви та геморою; плоди використовують як відхаркувальний засіб, а також при кашлі та неврологічному головному болю; кора має жарознижувальну, глистогінну, антибактеріальну дії [15, 16].

Важливо зазначити, що гібіскус широко застосовується у медицині. У Китаї, Індії, Мексиці та деяких африканських країнах екстракт гібіскуса використовують для лікування захворювань серця та печінки, нормалізації артеріального тиску, стимуляції перистальтики кишечника, а також як сечогінний, жовчогінний, заспокійливий, спазмолітичний і жарознижувальний засіб [16].

У 1998 році Yoo та ін. детально обговорили компоненти кори *H. syriacus*. Однак існує небагато згадок про її протиракову дію [17]. Лише дослідження 2008 року Cheng та ін. показали, що екстракт з кори гібіскусу сирійського активує p53 і фактор, який індукує апоптоз у клітинах раку легень людини [18].

В індійській медицині листя гібіскусу традиційно вважається тоніком для волосся. Відповідно, було виявлено, що місцеве застосування екстракту *H. syriacus* стимулює ріст волосся, що підтверджує медичне використання цієї рослини для лікування випадіння волосся [19].

У Кореї з давніх часів гібіскус вважався ефективним засобом від безсоння. Vanzella та ін. підтвердили, що гібіскус не мав істотного впливу на час сну [20], тоді як Fakeye та ін. продемонстрували значне зниження настання сну та збільшення тривалості сну після введення екстракту гібіскусу мишам [21]. Однак не було жодних досліджень, які б вивчали вплив гібіскусу на сон, і, незважаючи на десятиліття досліджень, остаточного механізму клінічного лікування або покращення сну та пов'язаних з ним розладів так і не було з'ясовано.

Кантин-6-он (рис. 1.7) і фракція жирних кислот, яка містить лауринову, миристинову та пальмітинову кислоти, виділені з кори *Hibiscus syriacus* L. проявляли протигрибкову активність проти *Trichophyton interdigitale* [22].

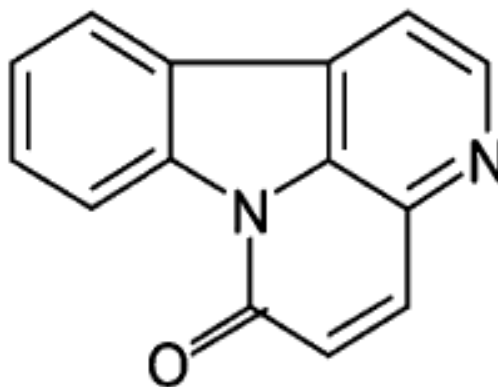


Рис. 1.7 Формула кантин-6-ону

Олія виділена з насіння гібіскусу сирійського виявляла антимікробну дію проти грамнегативних та грампозитивних мікроорганізмів. Олія не була стійкою проти *Salmonella typhi*, але проявляла активність проти *Escherichia coli*, *Salmonella Newport*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus albus*, *Bacillus subtilis* та *Bacillus anthracis*. Виділена олія також показала значну фунгіцидну активність проти досліджених патогенів рослин, а саме, *Alternaria solani*, *Aspergillus niger*, *Colletotrichum dematium*, і *Fusarium oxysporum* [23].

Корейськими вченими було досліджено, що квітки гібіскусу сирійського проявляли лікувальний ефект при запальних пошкодженнях шкіри. Встановлено, що сировина гібіскусу сирійського володіла низькою активністю поглинання діамонієвої солі 2,2-дифеніл-1-пікрилгідрозилу та 2,2'-азино-біс(3-етилбензотіазолін-6-сульфонової кислоти), гібіскус при 10 і 50 мкг/мл збільшив секрецію гіалуронану та зменшив утворення активних форм кисню в людських епідермальних кератиноцитах і це зменшило вироблення оксиду азоту, а також експресію інтерлейкіну-6/1 β та циклооксигенази-2. Також, хороший протизапальний ефект гібіскусу сирійського можна частково пояснити достатньо високим вмістом двох активних інгредієнтів, пальмітинової кислоти та лінолевої кислоти [24].

У доступних джерелах літератури повідомлялося, що етаноловий екстракт *H. syriacus* виявляє нейропротекторну та антиоксидантну дію на стрес.

Досліджено, що етанольний екстракт гібіскусу сирійського здатний пригнічувати нейрозапалення [25].

Нейрозапалення є основною патологією нейродегенеративних захворювань, таких як хвороба Альцгеймера і хвороба Паркінсона [26]. У нейрозапальних станах активується мікроглія, яка виробляє різні запальні цитокіни (такі як фактор некрозу пухлини α (TNF- α), інтерлейкін-1 β (IL-1 β) та інтерлейкін-6 (IL-6)), викликають хронічну запальну реакцію та призводять до пошкодження нейронів [27]. Підвищення рівня медіаторів запалення або прозапальних цитокінів відіграє важливу роль у нейродегенеративних захворюваннях [28]. У процесі нейродегенеративних захворювань накопичення аномальних агрегованих білків, β -амілоїду та α -синуклеїнових білків також може посилити активацію мікроглії, індукувати нейрозапалення [29]. Таким чином, інгібування нейрозапалення може затримати прогресування нейродегенеративних захворювань.

Згідно джерел літератури відомо, що квітки гібіскусу володіють антифертильною дією та антиімплантаційну, абортівну дію у гризунів. Листя використовуються як пом'якшувальний, болезаспокійливий і проносний засіб в Аюрведичній практиці [30].

Велике соціальне та економічне значення має гібіскус сирійський, квітки та насіння якого часто використовуються в промисловості. Він в основному використовується у медицині для лікування захворювань серцево-судинної системи, сечовивідних шляхів, шкіри та репродуктивної системи. Крім того, гібіскус часто використовують у виробництві засобів по догляду за волоссям і шкірою, парфумів, а також як натуральний барвник у виробництві напоїв і як джерело волокна в паперовій промисловості [31].

Відомо, що слиз гібіскусу також використовується як дезінтегратор і супердезінтегратор у фармацевтичних препаратах. Дезінтегратори - це речовини, які при додаванні до таблеток і деяких інших інкапсульованих композицій у водному середовищі демонструють розпад таблетки і капсули на

дрібні частинки або фрагменти, завдяки чому площа поверхні збільшується і призводить до більш швидкого вивільнення лікарської речовини [32].

Висновки до розділу 1

Рід *Hibiscus* належить до родини мальвових та за сучасною таксономією нараховує близько 300 видів рослин. Види роду характеризуються вмістом органічних кислот, сполук фенольної природи та володіють антиоксидантною, антимікробною активністю.

Гібіскус сирійський має широке поширення та активно використовується в традиційній медицині, що вказує на його потенціал як джерела лікарської рослинної сировини. Хоча існують окремі дані про склад первинних і вторинних метаболітів, які містяться в листках, корі, коренях та квітках цієї рослини, вони є фрагментарними та недостатньо систематизованими. Це підкреслює необхідність проведення ґрунтовного аналізу метаболітів із застосуванням сучасних наукових методів. Різноманітність фармакологічних властивостей екстрактів та окремих сполук *Hibiscus syriacus* свідчить про його потенціал як джерела активних речовин для створення новітніх фітопрепаратів. Аналіз наукових публікацій, присвячених вивченню фенольних сполук біологічного походження, показав, що ця група речовин є перспективною для подальших досліджень, зокрема в контексті вдосконалення методів їх виявлення та структурної ідентифікації.

РОЗДІЛ 2

ОБ'ЄКТ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Об'єктом для досліджень були гібіскусу сирійського квітки, які заготовляли на території Чернівецької області, влітку 2024 року (рис. 2.1).



Рис. 2.1 Гібіскусу сирійського (*Hibiscus syriacus* L.) квітки

2.1 Ідентифікація біологічно активних речовин у сировині гібіскусу сирійського

Хімічні реакції ідентифікації було застосовано для виявлення ключових груп біологічно активних сполук, присутніх у квітках гібіскусу сирійського.

Виявлення флавоноїдів

Для виявлення флавоноїдів у квітках гібіскусу сирійського використовували метод порівняння з етанольним розчином рутину. У пробірки додавали по 1 мл етанольного екстракту досліджуваної сировини та 0,05 % етанольний розчин рутину як стандарт.

Ціанідинава реакція (за Бріантом): до 1 мл водно-етанольного екстракту вносили 2–3 краплі концентрованої хлоридної кислоти та 1–2 щіпки металевого магнію. Після появи забарвлення додавали третину об'єму бутанолу, розбавляли водою, струшували та фіксували розподіл забарвлення між фазами. При цьому пігменти глікозидів флавоноїдів залишалися у водній фазі, а аглікони переходили в органічний шар. Малинове забарвлення водного шару та темно-оранжеве — бутанольного свідчило про присутність як агліконів, так і глікозидів флавоноїдів у екстракті.

Реакція з хлоридом алюмінію: до 1 мл етанольно-водного екстракту додавали 1 мл 2 % етанольного розчину хлориду алюмінію. Спостерігалось утворення жовтого забарвлення.

Реакція з ацетатом плюмбуму: до 1 мл того ж екстракту додавали 3–5 крапель 10 % водного розчину ацетату свинцю, що спричиняло утворення осаду [33].

Отримані результати хімічних реакцій підтверджують наявність флавоноїдів у квітках гібіскусу сирійського.

Виявлення гідроксикоричних кислот

З метою виявлення цієї групи сполук застосовували етанольно-водний екстракт, до якого додавали 1% розчин хлориду заліза (III). У результаті спостерігали появу зелено-сірого забарвлення, що свідчить про присутність у зразку фенольних сполук, зокрема гідроксикоричних кислот [33].

2.1.1 Ідентифікація БАР фенольної природи методом ТШХ

Хроматографічний аналіз здійснювали з використанням пластинок Sorbfil ПТСХ-П-А-УФ. Як рухому фазу застосовували систему розчинників, що складалася з етилацетату, мурашиної кислоти та води у співвідношенні 10:2:3 (за об'ємом). Розділення компонентів проводили методом висхідної хроматографії при температурі 20–25 °С з одноразовою розгонкою.

Отримані хроматограми досліджували у видимому спектрі та під ультрафіолетовим світлом. Для візуалізації фенольних сполук пластинки обробляли розчином ваніліну в концентрованій сірчаній кислоті. Після цього флавоноїди проявляли характерне жовте або коричневе забарвлення (табл. 2.1)

Таблиця 2.1

Опис хроматографічних плям фенольних сполук, виявлених у квітках
гібіскусу сирійського

№ плями	Rf	Забарвлення плям після обробки проявником	Флуорисценція в УФ-світлі
1.	0,40	Світло-коричневе	Жовта
2.	0,54	Жовте	Жовта
3.	0,58	Світло-коричневе	Блакитна
4.	0,70	Світло-коричневе	Жовта
5.	0,83	Жовте	Червона
6.	0,87	Жовте	Червона

Після обробки хроматограм специфічним проявником — розчином ваніліну в концентрованій сульфатній кислоті — було зафіксовано характерне забарвлення плям, що свідчить про наявність фенольних сполук. В УФ-світлі сполуки 1, 2, 4-6 віднесені нами до сполук флавоноїдів, а пляма 3 — до гідроксикоричних кислот.

2.2 Виявлення та визначення індивідуальних компонентів дикарбонових кислот методом ГХ/МС

Підготовка сировини для аналізу

Екстрагування органічних кислот проводили з наважки рослинної сировини (0,06-0,2 г) шляхом додавання 1,0 мл метилового спирту та 1,0 мл 0,5 Н соляної кислоти, суміш ретельно перемішували. Екстрагування проводили на ультразвуковій бані при 45 °С протягом 3 год. Після закінчення екстрагування, суміш центрифугували при 3000 об/хв протягом 5 хв. Аліквоту екстракту (1000 мкл) випарювали досуха на роторному випарювачеві при 40 °С. До сухого залишку додавали 600 мкл метилового спирту та 300 мкл 50% сірчаної кислоти, ретельно перемішували.

Метилування органічних кислот проводили протягом ночі за температури 60 °С. Після закінчення метилування суміш охолоджували до кімнатної температури, додавали 500 мкл хлороформу та 500 мкл 6,0 % розчину карбонату калію, ретельно перемішували. Для хроматографічного аналізу використовували хлороформну фазу.

Умови хроматографування

Хроматографічне розділення проводили на газовій хромато-мас-спектрометричній системі Agilent 6890N/5973inert (Agilent technologies, USA). Колонка капілярна HP-5ms (30m×0,25mm×0,25mkm, Agilent technologies, USA). Температура випаровувача 250 °С, температура інтерфейсу 280 °С. Розділення проводили в режимі програмування температури – початкову температуру 70 °С витримували впродовж 1 хв., піднімали з градієнтом 5 °С/хв до 220 °С, витримували впродовж 1 хв., піднімали з градієнтом 10 °С/хв до 300 °С. Кінцеву температуру витримували впродовж 5 хв. Пробу об'ємом 1 мкл, вводили в режимі поділу потоку 1:50. Детектування проводили в режимі SCAN в діапазоні (38-400 m/z). Швидкість потоку газу носія через колонку 1,0 мл/хв [34].

Ідентифікацію органічних кислот проводили шляхом порівняння часів утримання стандартів (щавлева, малеїнова, янтарна, ітаконова, яблучна, *альфа*-кетоглутарова, лимонна та ізолимонна кислоти) та за базою даних NIST 17.

2.3 Кількісне визначення суми органічних кислот

Для визначення загального вмісту суми вільних органічних кислот брали 25,0 г (точна наважка) подрібненої до порошкоподібного стану сировини, яку поміщали у конічну колбу об'ємом 250 мл. До сировини додавали 200 мл очищеної води (вода *P*) і витримували на водяній бані протягом 2 годин. Після охолодження екстракт повністю переносили у мірну колбу на 250 мл, доводили об'єм до мітки водою *P* та ретельно перемішували.

Далі 10 мл отриманого розчину переносили у колбу на 500 мл, додавали 200–300 мл води *P*, 1 мл розчину фенолфталеїну *PI* та 2 мл розчину метиленового синього (1 г/л). Отриману суміш титрували 0,1 М розчином натрію гідроксиду до появи характерного світло-фіолетово-червоного забарвлення піни.

Вміст суми вільних органічних кислот (*X*) у перерахунку на яблучну кислоту в абсолютно сухій сировині у відсотках обчислювали за формулою 2.1:

$$X = \frac{V \times 0,0067 \times 250 \times 100 \times 100}{m \times 10 \times (100 - W)}, \quad (2.1)$$

де: *V* – об'єм 0,1 М розчину натрію гідроксиду, витраченого на титрування, мл;

0,0067 – кількість яблучної кислоти, що відповідає 1 мл 0,1 М розчину натрію гідроксиду;

m – маса сировини, г;

W – втрата в масі при висушуванні, % [35].

2.4 Визначення кислоти аскорбінової

Вміст аскорбінової кислоти визначали за допомогою спектрофотометричного аналізу з використанням спектрофотометра Lambda 25 UV.

Для приготування розчину 0,500 г подрібненої до порошкоподібного стану сировини поміщали в круглодонну колбу. Додатково вносили 50,0 мл метанольного розчину, що містить 1,0 г щавлевої кислоти (Р), після чого суміш кип'ятили зі зворотним холодильником протягом 10 хвилин. Після охолодження в льодяній бані до температури 15–20 °С отриманий екстракт фільтрували.

Із фільтрату відбирали 2,0 мл у конічну колбу на 50 мл, поетапно додавали 2,0 мл стандартного розчину дихлорфеноліндофенолу (Р), через 60 секунд — 0,5 мл 100 г/л розчину тіосечовини в 50% етанолі (Р), а потім 0,7 мл розчину динітрофенілгідразину в сірчаній кислоті (Р). Суміш нагрівали при 50 °С упродовж 75 хв зі зворотним холодильником, після чого швидко охолоджували в льодяній бані (5 хв).

Далі краплями додавали 5,0 мл суміші води (12 мл) і сірчаної кислоти (50 мл), витримуючи інтервал додавання від 90 до 120 секунд, постійно енергійно струшуючи колбу в охолоджену стані. Після витримки при кімнатній температурі протягом 30 хв вимірювали оптичну густину при довжині хвилі 520 нм. Як компенсуючий розчин використовували розчин А.

Розчин А:

Із фільтрату, отриманого під час приготування пробного розчину, відбирали 2,0 мл і проводили обробку за описаною вище методикою, при цьому розчин динітрофенілгідразину в сірчаній кислоті додавали безпосередньо перед вимірюванням оптичної густини.

Розчин для порівняння:

40,0 мг аскорбінової кислоти (Р) розчиняли у щойно приготованому 20 г/л розчині щавлевої кислоти (Р) на основі метанолу, після чого доводили об'єм до 100,0 мл тим самим розчинником. Далі з цього розчину відбирали 5,0 мл і знову доводили до 100,0 мл свіжим розчином щавлевої кислоти у метанолі тієї ж концентрації.

Із отриманого розчину відбирали 2,0 мл та обробляли за тією ж схемою, що й фільтрат під час приготування пробного зразка. Вимірювання оптичної густини проводили при довжині хвилі 520 нм, використовуючи розчин В як компенсаційний.

Розчин В:

2,0 мл розчину для порівняння піддавали обробці за тією ж процедурою, що й розчин А.

Вміст аскорбінової кислоти, у відсотках, обчислювали за формулою:

$$X = \frac{2,5 \times A_1 \times m_2}{A_2 \times m_1}, \quad (2.2)$$

де: A_1 — оптична густина випробовуваного розчину;

A_2 — оптична густина розчину порівняння;

m_1 — маса наважки випробовуваної сировини, у грамах;

m_2 — маса наважки аскорбінової кислоти, у грамах [35].

2.5 Дослідження індивідуальних компонентів флавоноїдів методом ВЕРХ

Точну наважку досліджуваної сировини кожної проби 0,2-0,6 г, екстрагували в 10 мл 80% розчину етанолу на ультразвуковій бані при 80 С впродовж 5 годин в скляних герметичних віалах із тефлоновою кришкою. Отриманий екстракт центрифугували при 3000 об/хв та фільтрували крізь одноразові мембранні фільтри з порами 0,22 мкм.

Рідинну хроматографію було проведено на рідинному хроматографі Agilent Technologies 1200. В якості рухомої фази використовували ацетонітрил (A) та 0,1% розчин мурашиної кислоти у воді (B). Елюювання проводили в градієнтному режимі: 0 хв – A (5 %) : B (95 %); 20 хв – A (30 %) : B (70 %); 30 хв – A (60 %) : B (40 %); 50 хв – A (100 %) : B (0 %); 60 хв – A (100 %) : B (0 %).

Розділення проводили на хроматографічній колонці Zorbax SB-C18 (3,5 мкм, 150 x 4,6 мм) (Agilent Technologies, USA), швидкість потоку через колонку 0,25 мл/хв., температура термостату 30 °C, об'єм інжекції 4 мкл. Детекцію проводили з використанням діодно-матричного детектора з реєстрацією сигналу при 280 та 365 нм та фіксацією спектрів поглинання в діапазоні 210-700 нм [36].

Ідентифікацію та кількісний аналіз проводили з використанням стандартних розчинів флавоноїдів (рутину, кверцетин 3-O- β -D- глюкозиду, нарингину, неогесперидину, кверцетину, нарингеніну, кемпферолу, лютеоліну, апігеніну, кемпферол 3-O- β -D-глюкозиду, фізетину, силібеніну, байкалеїну, рамнетину, кастицину). Калібрування проводили методом зовнішніх стандартів.

2.6 Кількісне визначення суми флавоноїдів

Визначення кількості вмісту флавоноїдів (у перерахунку на рутин):

Підготовка вихідного розчину: 1,00 г точно зваженої подрібненої сировини, просіяної через сито з діаметром отворів 2 мм, поміщали у 100 мл мірну колбу зі шліфом. До неї додавали 30 мл 70% етанолу (об/об), після чого зважували. Колбу зворотним холодильником нагрівали на водяній бані протягом 2 годин, періодично струшуючи для змиття частинок зі стінок. Після охолодження до кімнатної температури знову зважували. За потреби доливали 70% етанол до початкової маси. Отриманий витяг фільтрували крізь паперовий фільтр, відбираючи перші 20 мл.

Пробний розчин: 1 мл приготованого витягу переносили в мірну колбу на 25 мл, додавали 2 мл 30 г/л розчину хлориду алюмінію в 96 % етанолі, після чого доливали етанолом до позначки і перемішували.

Компенсаційний розчин: 1 мл того ж вихідного витягу вносили у мірну колбу на 25 мл і доводили 96 % етанолом до мітки, після чого перемішували.

Вимірювання: через 40 хвилин вимірювали оптичну густину розчину при довжині хвилі 408 нм у кюветі з товщиною шару 10 мм за допомогою спектрофотометра Lambda 25 UV (Perkin Elmer, США). Паралельно визначали оптичну густину розчину стандартного зразка рутину, приготованого аналогічним чином [37].

Вміст суми флавоноїдів, у перерахунку на рутин і абсолютно суху сировину, у відсотках, обчислювали за формулою 2.3:

$$X = \frac{A \times m_0 \times 30 \times 100 \times 100}{A_0 \times m \times (100 - W) \times 100}, \quad (2.3)$$

де: A – оптична густина випробуваного розчину;

A_0 – оптична густина ФСЗ рутину;

m – маса наважки сировини, г;

m_0 – маса наважки ФСЗ рутину, г;

W – втрата в масі при висушуванні сировини, %.

2.7 Дослідження індивідуальних компонентів гідроксикоричних кислот методом ВЕРХ

Точна наважка сировини кожної проби 0,1-1,0 г, екстрагувалася в 5-10 мл 60% розчину метанолу на ультразвуковій бані при 80 С впродовж 4 годин в скляних герметичних віалах із тефлоновою кришкою. Отриманий екстракт центрифугували при 3 тис об/хв та фільтрували крізь одноразові мембранні фільтри з порами 0,22 мкм.

Рідинну хроматографію проведено на рідинному хроматографі Agilent Technologies 1200. В якості рухомої фази використовували метанол (А) та 0,1% розчин мурашиної кислоти в воді (В). Елюювання проводили в градієнтному режимі: 0 хв – А (25 %) : В (75 %); 25 хв – А (75 %) : В (25 %); 27 хв – А (100 %) : В (0 %); 35 хв – А (100 %) : В (0 %).

Розділення проводили на хроматографічній колонці Zorbax SB-Aq (4,6 мм±150 мм, 3,5 мкм) (Agilent Technologies, USA), швидкість потоку через колонку 0,5 мл/хв., температура термостату 30 °С, об'єм інжекції 4 мкл. Детекцію проводили з використанням діодно-матричного детектора з реєстрацією сигналу при 250 та 275 нм та фіксацією спектрів поглинання в діапазоні 210-700 нм [38].

Ідентифікацію та кількісний аналіз проводили з використанням стандартних розчинів гідроксикоричних сполук (гідроксифенілоцтової кислоти, хлорогенової кислоти, кофейної кислоти, сирінгової кислоти, *p*-кумарової кислоти, *транс*-ферулової кислоти, синапової кислоти, *транс*-цинамової кислоти, хінної кислоти).

2.8 Кількісне визначення суми гідроксикоричних кислот

Кількісне визначення сумарного вмісту гідроксикоричних кислот у сировині гібіскуса сирійського проводили методом спектрофотометрії.

2,0 г точно зваженої подрібненої сировини поміщали в колбу об'ємом 200 мл, додавали 70 мл 20% етанолу. Колбу з'єднували із зворотним холодильником і прогрівали на водяному нагрівнику 15 хвилин. Процес екстрагування повторювали тричі.

Одержані витяжки охолоджували і фільтрували через паперовий фільтр, використовуючи лійку Бюхнера. Об'єднаний екстракт переносили у 250 мл мірну колбу й доводили об'єм 20% етанолом до мітки — отримували розчин А.

1 мл цього розчину відбирали у мірну колбу об'ємом 50 мл, додавали 20% етанол до позначки.

Оптичну густину підготовленого розчину вимірювали на спектрофотометрі Lambda 25 при довжині хвилі 327 нм, використовуючи кювету з товщиною шару 10 мм. Як контрольний зразок застосовували 20% етанол [39].

Вміст гідроксикоричних кислот у перерахунку на хлорогенову кислоту та на абсолютно суху сировину у відсотках (X) обчислювали за формулою 2.4:

$$X = \frac{A \times 250 \times 50 \times 100}{E^{1\%}_{1cm} \times m \times 1 \times (100 - W)}, \quad (2.4)$$

де: A – оптична густина досліджуваного розчину;

250 – об'єм розчину, мл;

m – маса сировини, г;

$E^{1\%}_{1cm}$ – питомий показник поглинання хлорогенової кислоти (531);

W – втрата в масі при висушуванні, %.

2.9 Визначення вмісту суми поліфенолів

Кількісне визначення поліфенольних сполук (у перерахунку на пірогалол) методом модифікованої УФ-спектрофотометрії [40].

Таніни:

0,500 г попередньо подрібненої до порошкоподібного стану рослинної сировини поміщали в круглодонну колбу об'ємом 250 мл, додавали 150 мл очищеної води (Р) і нагрівали на водяній бані протягом 30 хвилин. Після охолодження під проточною водою, отриманий розчин кількісно переносили в мірну колбу на 250 мл. Колбу промивали водою (Р), об'єднували промивні води з основним екстрактом і доводили до об'єму 250 мл. Далі розчин залишали для осадження, після чого фільтрували через фільтрувальний папір діаметром 125 мм, відкидаючи перші 50 мл фільтрату.

Загальна кількість поліфенолів:

5 мл очищеного фільтрату розбавляли водою (Р) до об'єму 25 мл. Далі змішували 2 мл цього розчину з 1 мл фосфорномолібденово-вольфрамового реагенту (Р) і 10 мл води (Р), після чого доводили до 25 мл розчином натрію карбонату (Р) концентрацією 290 г/л. Через 30 хв вимірювали оптичну густину на довжині хвилі 760 нм (позначення — A_1), використовуючи воду (Р) як компенсаційний розчин.

Поліфеноли, не абсорбовані шкірним порошком:

До 10 мл того ж фільтрату додавали 0,10 г шкірного порошку (ФСЗ) і інтенсивно струшували протягом 60 хв. Отриману суміш фільтрували, після чого 5 мл фільтрату доводили водою (Р) до 25 мл. Аналогічно попередньому варіанту, готували реакційну суміш із додаванням фосфорномолібденово-вольфрамового реагенту, води (Р) та розчину натрію карбонату до 25 мл. Оптичну густину вимірювали через 30 хв при 760 нм (позначення — A_2), використовуючи воду як компенсаційний розчин.

Стандартний розчин пірогалолу:

Безпосередньо перед проведенням дослідження 0,050 г пірогалолу (Р) розчиняли у воді (Р) і доводили до 100 мл. З отриманого розчину 5 мл аліквоту доводили водою до 100 мл. З цієї розведеної проби брали 2 мл, додавали 1 мл фосфорномолібденово-вольфрамового реагенту і 10 мл води, доводили до 25 мл розчином натрію карбонату (Р) (290 г/л). Оптичну густину розчину вимірювали через 30 хв при 760 нм (позначення — A_3), компенсаційним розчином була вода (Р) [41].

Вміст суми поліфенолів у перерахунку на пірогалол у % обчислювали за формулою 2.5:

$$X = \frac{62,5 \times A_1 \times m_2}{A_3 \times m_1}, \quad (2.5)$$

де: m_1 — маса випробовуваного зразка, г;

m_2 – маса пірогалолу, г.

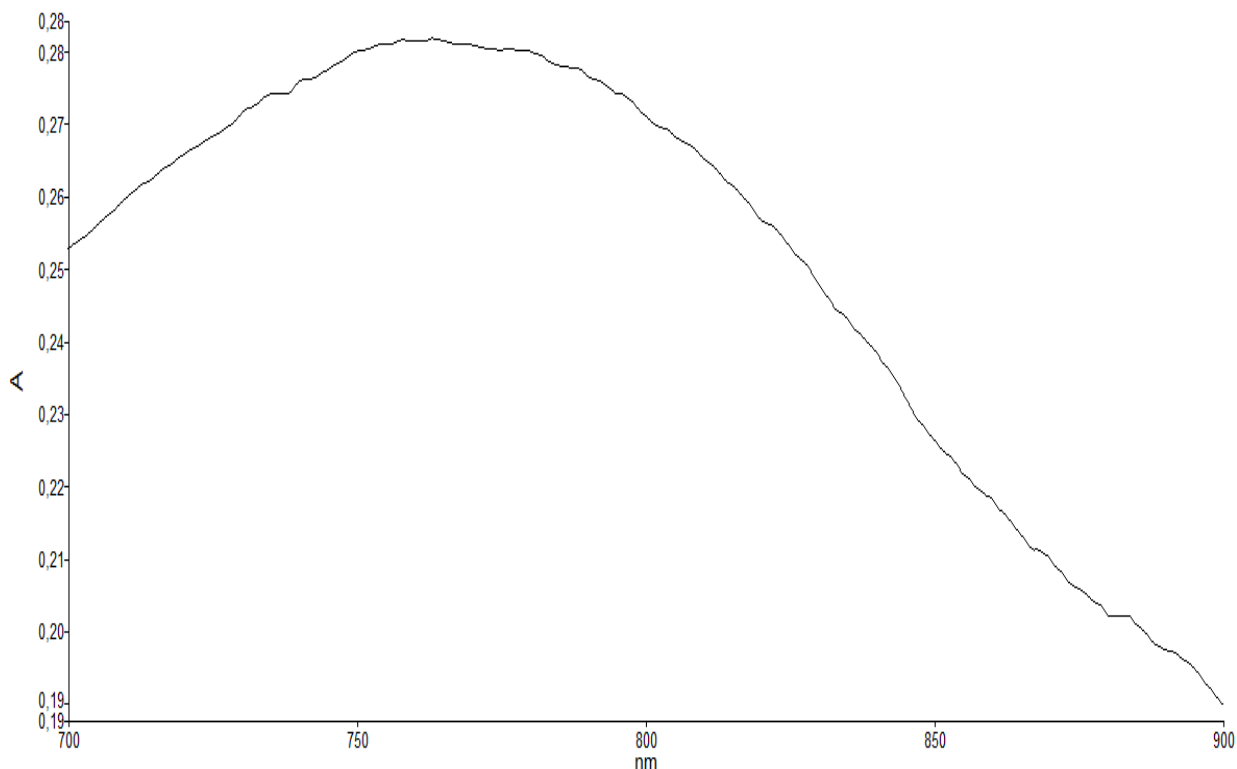


Рис. 2.2 УФ-спектр поглинання стандартного зразку пірогалолу

2.10 Кількісне визначення вмісту антоціанів

Визначення кількісного вмісту антоціанів спектрофотометричним методом (спектрофотометр Lambda 25 Perkin Elmer (США)) згідно методики, наведеної в ДФУ другого видання, том 3 у монографії «Чорниці плоди свіжі» [35].

До 5,00 г подрібненої сировини (точна наважка) додавали 95 мл *метанолу Р*, розмішували механічно протягом 30 хв, фільтрували у мірну колбу місткістю 100,0 мл. Фільтр обполіскували і доводили об'єм розчину *метанолом Р* до 100,0 мл. Готували 50-кратне розведення цього розчину у розчині 0,1% (об/об) *кислоти хлористоводневої Р* у *метанолі Р*.

Оптичну густину розчину вимірювали за довжини хвилі 528 нм, використовуючи як компенсаційну рідину розчин 0,1% (об/об) кислоти хлористоводневої *P* у метанолі *P*.

Вміст антоціанів (*X*, %), у перерахунку на ціанідин-3-О-глюкозид хлориду, обчислювали, використовуючи питомий показник поглинання ціанідин-3-О глюкозиду хлориду, що дорівнює 718, за формулою (2.6):

$$X = A \times 5000 / 718 \times m, \quad (2.6)$$

де: *A* – оптична густина випробуваного розчину за довжини хвилі 528 нм;

m – маса наважки випробуваної сировини, г.

2.11 Визначення числових показників якості квіток гібускусу сирійського

Методика визначення втрати маси при висушуванні квіток гібіскуса сирійського:

Аналітичну пробу сировини попередньо подрібнювали до частинок розміром приблизно 1 мм, ретельно перемішували і відбирали три зразки по 3,0 г кожен. Зважування здійснювали з максимальною похибкою $\pm 0,01$ г. Кожну пробу поміщали в бюкс, попередньо висушений та зважений разом із кришкою й окремо без неї. Бюкси розміщували в сушильну шафу, нагріту до температури 100–105 °С.

Перше зважування проводили після двох годин сушіння. Подальше висушування тривало до моменту стабільної маси. Стабільність вважалась досягнутою, якщо різниця між масами, визначеними після 30 хв додаткового сушіння та охолодження в ексікаторі протягом 30 хв, не перевищувала 0,01 г.

Значення втрати маси при висушуванні (*X*) визначали у відсотках за відповідною формулою (2.7):

$$X = (m - m_1) * 100 / m \quad (2.7)$$

Де: m - маса сировини до висушування, г;

m_1 – маса сировини після висушування, г [33].

Метод визначення загального вмісту золи в квітках гібіскуса сирійського:

Для аналізу брали приблизно 5,0 г точно зваженої, попередньо подрібненої сировини гібіскуса, яку рівномірно розподіляли по дну заздалегідь прокаленого та точно зваженого фарфорового тигля. Далі тигель обережно нагрівали на електроплитці, забезпечуючи поступове згоряння органічної маси при мінімально можливій температурі.

Для повного окиснення залишків вуглецю спалювання продовжували у муфельній печі при температурі 400 °С. Після охолодження залишок змочували водою, випарювали на водяній бані та повторно прожарювали.

Процес прожарювання здійснювали при температурі близько 500 °С (режим слабкого червоного жаріння) до досягнення постійної маси. Особливу увагу приділяли запобіганню спікання золи або її злиття зі стінками тигля.

Після завершення прожарювання тигель охолоджували в ексікаторі та зважували для обчислення загального вмісту золи [33].

Вміст загальної золи у квітках гібіскусу (X , %) розраховували за формулою (2.8):

$$X = (m_2 - m_1) * 100 * 100 / m * (100 - W) \quad (2.8)$$

Де: m_2 – маса тигля з сировиною, г;

m_1 – маса тигля з золою, г;

m – маса сировини, г;

W – вологість сировини, %.

Метод визначення вмісту золи, нерозчинної в хлоридній кислоті, у квітках гібіскуса сирійського:

До залишку в тиглі, який залишився після визначення загальної золи, додавали 15 мл 10 % розчину хлоридної кислоти. Тигель накривали годинниковим склом і нагрівали на киплячій водяній бані протягом 10 хвилин.

Після цього в тигель додавали 5 мл гарячої води, ретельно змиваючи залишки з годинникового скла. Отриманий розчин фільтрували через попередньо зважений беззольний фільтр, при цьому нерозчинний залишок переносили на фільтр за допомогою гарячої води.

Фільтр із залишком промивали гарячою водою до повного зникнення іонів хлоридів у промивних водах (негативна реакція з нітратом срібла). Далі фільтр із залишком переносили в той самий тигель, висушували, спалювали і прожарювали до постійної маси, уникаючи спікання.

Масову частку золи, нерозчинної в хлоридній кислоті (X , %), обчислювали за відповідною формулою (2.9):

$$X = (m_2 - m_1) * 100 * 100 / m * (100 - W) \quad (2.9)$$

де: m_2 – маса тигля з сировиною, г;

m_1 – маса тигля з золою, г;

m – маса сировини, г;

W – вологість сировини, % [33].

Висновки до розділу 2

У цьому розділі наведено опис об'єктів дослідження, подано коротку характеристику використаного обладнання, методів аналізу та застосованих реактивів. Викладено методики ідентифікації якісного складу та визначення кількісного вмісту основних біологічно активних речовин.

РОЗДІЛ 3

ДОСЛІДЖЕННЯ ЯКІСНОГО СКЛАДУ ТА КІЛЬКІСНОГО ВМІСТУ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ КОМПОНЕНТІВ У КВІТКАХ ГІБІСКУСА СИРІЙСЬКОГО

3.1 Дослідження вмісту індивідуальних компонентів дикарбонових кислот у квітках гібіскусу сирійського

При дослідженні метаболічних процесів у рослинах часто представляє інтерес визначення вмісту органічних кислот, оскільки ди- і трикарбонові кислоти беруть участь у багатьох метаболічних процесах. Вміст органічних кислот також представляє інтерес для оцінки якості фруктів, овочів та інших харчових продуктів [42].

Органічні кислоти є звичайними компонентами фруктів та рослин, виникаючи в результаті біохімічних реакцій або діяльності певних мікроорганізмів, зокрема дріжджів та бактерій. Ці сполуки, що належать до карбонових кислот, регулюють рН і загальну кислотність у рослинах. Вони також здатні пригнічувати активність ферментів, виступають як хелатуючі агенти для іонів металів, запобігаючи хімічному осадженню та процесам окиснення [43].

Методом ГХ/МС у квітках гібіскусу сирійського ідентифіковано та визначено кількісний вміст оксалової, маленової, леулінової, сукцинової, яблучної, *цис*-аконітової, лимонної та ізілімонної карбонових кислот. Результати визначення компонентного складу органічних кислот квіток гібіскусу сирійського наведено в таблиці 3.1, а хроматограма карбонових кислот– на рисунку 3.1.

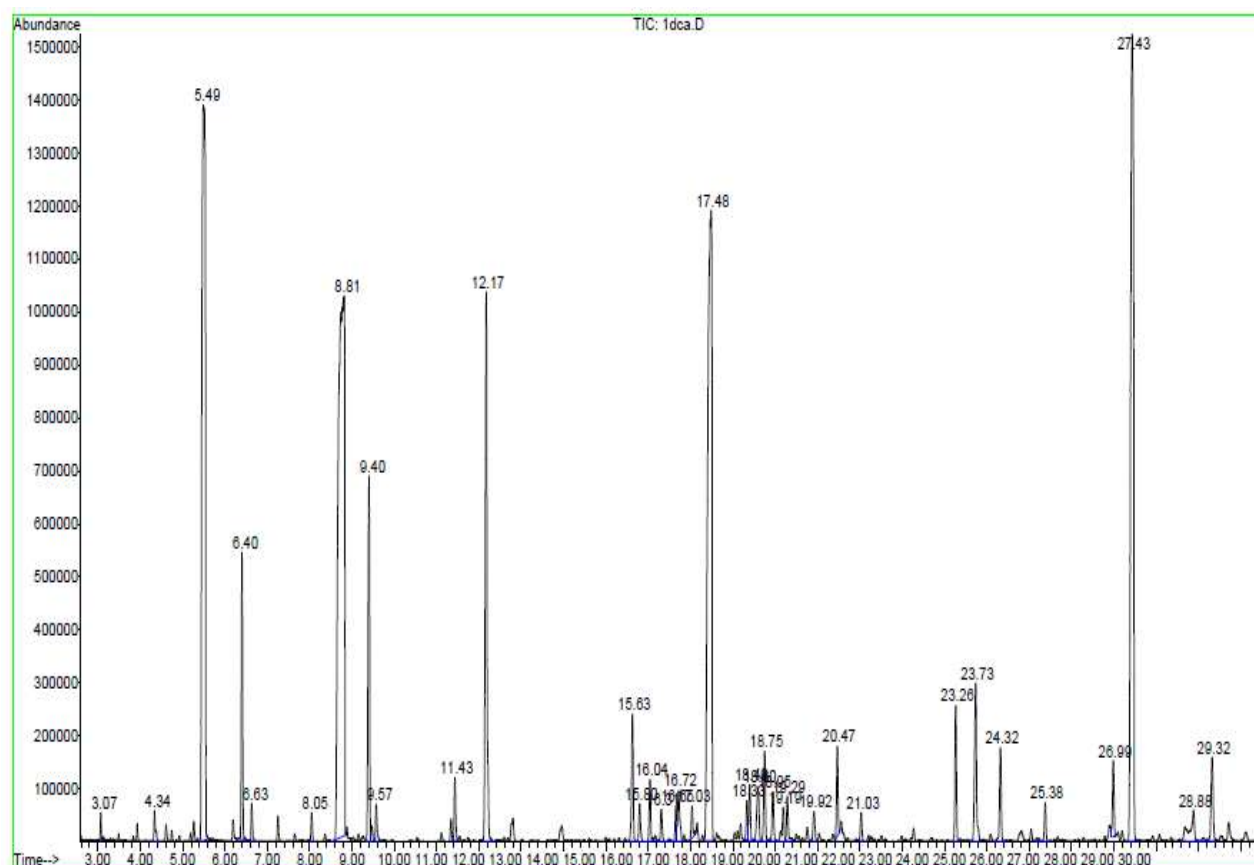


Рис. 3.1 ГХ/МС-хроматограма карбонових кислот у квітках гібіскусу сирійського

Таблиця 3.1

Визначення індивідуальних компонентів карбонових кислот у квітках гібіскусу сирійського

Назва сполуки	Rt, хв	Вміст, мкг/г
Оксалова кислота	3.07	52,54
Малонова кислота	4.34	106,29
Левулінова кислота	5.49	6043,29
Сукцинова кислота	6.39	818,69
Яблучна кислота	8.81	7680,77
<i>Цис</i> -аконітова кислота	16.65	124,29
Лимонна кислота	17.48	6029,42
Ізолимонна кислота	18.4	203,47

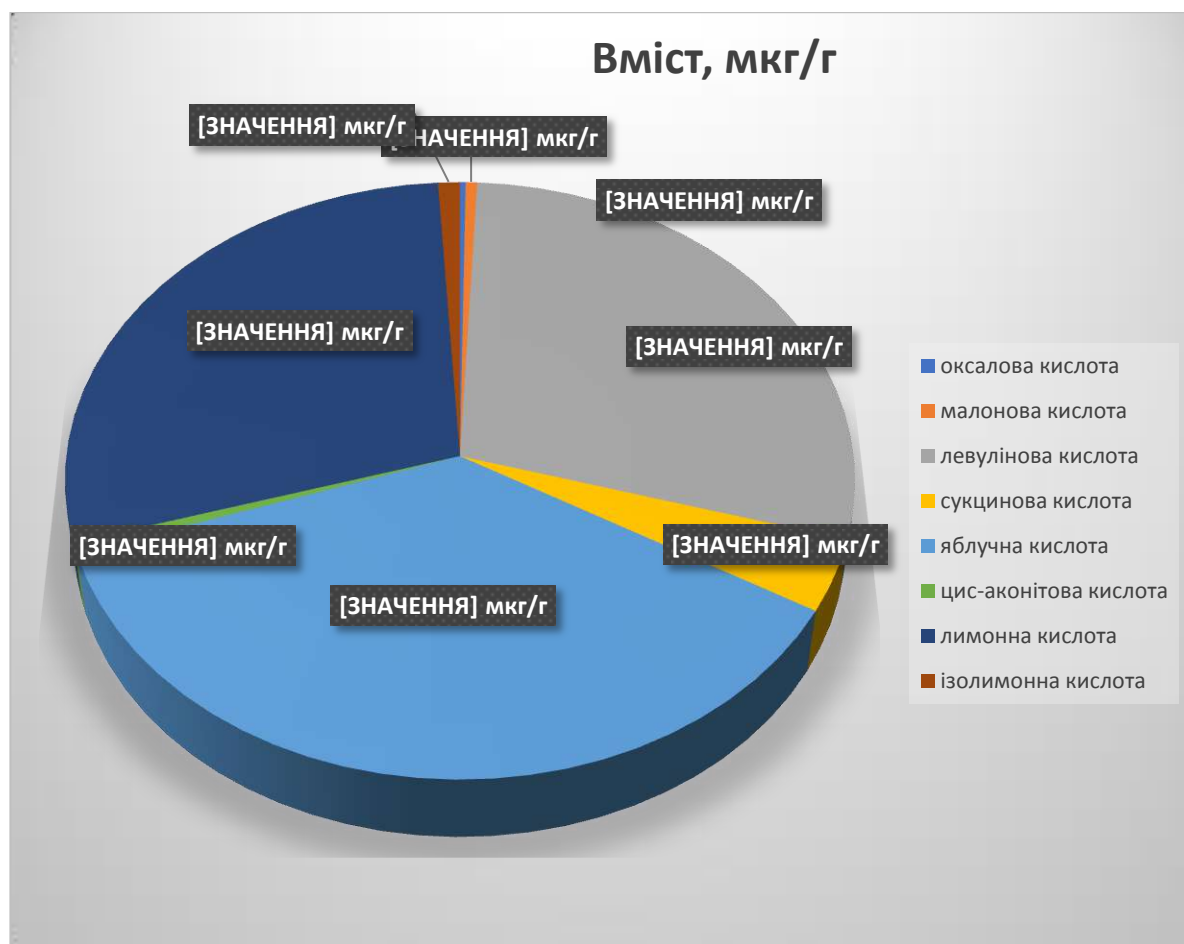


Рис. 3.2 Кількісний вміст індивідуальних карбонових кислот (мкг/г, метод ГХ/МС) у квітках гібіскусу сирійського

Серед ідентифікованих карбонових кислот у квітках гібіскусу сирійського домінуючими були – яблучна (7680,77 мкг/г), левулінова (6043,29 мкг/г) та лимонна (6029,42 мкг/г) кислоти (табл. 3.1, рис. 3.2). У квітках гібіскусу сирійського не виявлено було фумарової, малеїнової, ітаконової та саліцилової кислот.

Як свідчать дані таблиці 3.1, у гібіскусу сирійського квітках виявлено синтез таких кислот, як оксалова, малонова, ізолимонна, лимонна, яблучна, левулінова, сукцинова та *цис*-аконітова. Ці органічні сполуки виконують функції каталізаторів біохімічних реакцій і активаторів процесів клітинного дихання як у рослинному, так і в тваринному організмах [44].

Окрім широко розповсюджених карбонових кислот, у квітках гібіскусу сирійського була виявлена левулінова (4-оксопентанова) кислота. Левулінова

кислота належить до γ -кетокислот і характеризується вираженою антисептичною активністю, що дає змогу розглядати її як природну альтернативу синтетичним консервантам.

Органічні кислоти сприяють активізації низки фізіологічних функцій в організмі людини. Зокрема, вони стимулюють виділення слини, шлункового соку та жовчі, що сприяє покращенню функціонування шлунково-кишкового тракту та відновленню балансу кишкової мікрофлори. Ці сполуки характеризуються протизапальними, жовчогінними, антимікробними, противиразковими та антиоксидантними властивостями, беруть участь у регуляції обміну речовин, підвищують імунний захист та загальний життєвий тонус організму. Зокрема, яблучна кислота позитивно впливає на синтез гемоглобіну та засвоєння заліза [45].

У квітках гібіскусу сирійського було встановлено особливий склад органічних кислот, які можуть бути цікаві для фармацевтичного виробництва, а сировина цієї рослини може бути використана як джерело для нових ліків у майбутньому.

3.2 Визначення вмісту суми органічних кислот

Органічні кислоти мають важливе значення як для рослинного, так і для людського організму. У рослин вони сприяють кращому засвоєнню азоту, фосфору та заліза, а також підвищують стійкість до токсичної дії важких металів ґрунту, зменшуючи їх шкідливий вплив. Органічні кислоти відіграють важливу роль у процесах обміну речовин у рослинах, оскільки є проміжними продуктами окиснення та гідролізу вуглеводів, ліпідів, поліпептидів і білків. Їхньою особливістю є те, що частина цих кислот утворюється в процесі метаболізму сполук первинного синтезу або виступає ключовими компонентами основних біосинтетичних шляхів [44].

Кількісний вміст органічних кислот у квітках гібіскусу сирійського визначали відповідно до фармакопейної методики титрування, яка базується на

реакції нейтралізації, національна частина монографії «Шипшини плоди N» ДФУ 2.1 [46].

Титриметричним методом встановлено нами кількісний вміст суми органічних кислот, у перерахунку на яблучну кислоту, який становив у квітках гібіскусу сирійського $4,04 \pm 0,02$ % (табл. 3.2).

Таблиця 3.2

Кількісний вміст суми органічних кислот

Група БАР	Кількісний вміст, % в перерахунку на яблучну кислоту у квітках гібіскусу сирійського
Сума органічних кислот	$4,04 \pm 0,02$ %

Примітка. Вірогідність похибки $P < 0,05$.

Отримані дані, які свідчать про високий вміст органічних кислот у сировині гібіскусу сирійського, дозволяють зробити припущення щодо потенційної антиоксидантної та протизапальної активності цієї рослини.

3.3 Аскорбінова кислота

Органічні кислоти, зокрема аскорбінова, належать до ключових груп біологічно активних сполук, що відіграють важливу роль у численних фізіологічних процесах людського організму, зокрема в реакціях окиснення-відновлення, диханні та підтриманні гомеостазу. Аскорбінова кислота бере участь у формуванні і підтриманні нормального стану сполучної тканини, виявляє антиоксидантну, протизапальну, регенеративну, антиатерогенну, антицинготну, противірусну та імуномодулюючу дію [48].

За своєю хімічною будовою вітамін С є одним із найпростіших серед усіх

вітамінів, проте його хімічні та біохімічні властивості мають унікальний характер. Аскорбінова кислота широко використовується у різних сферах діяльності людини: фармацевтична, косметична та харчова промисловості щорічно споживають великі обсяги цієї сполуки

Відомо, що вітамін С не синтезується в організмі людини та може надходити лише ззовні — з їжею, переважно фруктами й овочами. Аскорбінова кислота відіграє важливу роль у метаболізмі заліза: вона відновлює тривалентне залізо (Fe^{3+}) до двовалентної форми (Fe^{2+}) у кишечнику, що сприяє його кращому засвоєнню. Крім того, вона прискорює вивільнення заліза з феритину і бере участь у перетворенні фолатів у їх активні коферментні форми. При недостатності вітаміну С порушується засвоєння заліза, що може призводити до розвитку залізодефіцитної гіпохромної анемії [49]. Тому, пошук нових рослин які містять аскорбінову кислоту є актуальним завданням для сучасної фармації.

У ході дослідження було проведено кількісне визначення вмісту аскорбінової кислоти у водних витяжках із квіток гібіскусу сирійського. Визначення здійснювали спектрофотометричним методом згідно з ДФУ, т. 3, друге видання [35], використовуючи спектрофотометр Lambda 25 UV.

Результати, перераховані на абсолютно суху речовину, наведено в таблиці 3.3.

Таблиця 3.3

Кількісний вміст аскорбінової кислоти

Група БАР	Кількісний вміст, % в перерахунку на аскорбінову кислоту у квітках гібіскусу сирійського
Аскорбінова кислота	0,78±0,01 %

Примітка. Вірогідність похибки $P < 0,05$.

У квітках гібіскуса сирійського вміст аскорбінової кислоти становив $0,78 \pm 0,01$ % за результатами кількісного аналізу (табл. 3.3, рис. 3.3).

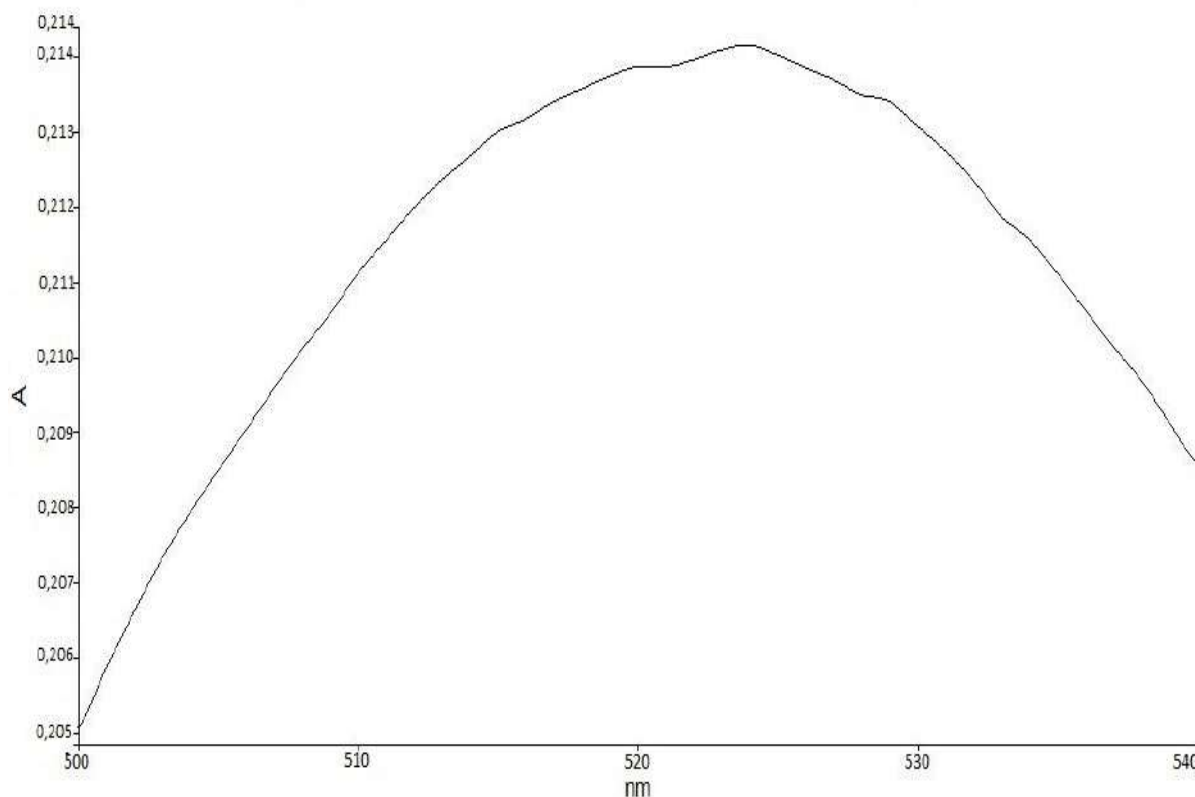


Рис. 3.3 УФ-спектр поглинання аскорбінової кислоти у квітках гібіскуса сирійського

Таким чином, проведено визначення аскорбінової кислоти у квітках гібіскусу сирійського. Результати дослідження можуть бути використані при подальших дослідженнях фармакологічної активності досліджуваної сировини.

3.4 Визначення індивідуальних компонентів флавоноїдів у досліджуваному об'єкті

Характеристика якісного складу та визначення кількісного вмісту окремих флавоноїдних сполук у досліджуваній рослинній сировині здійснювались із використанням методу вискоєфективної рідинної

хроматографії (рис. 3.4).

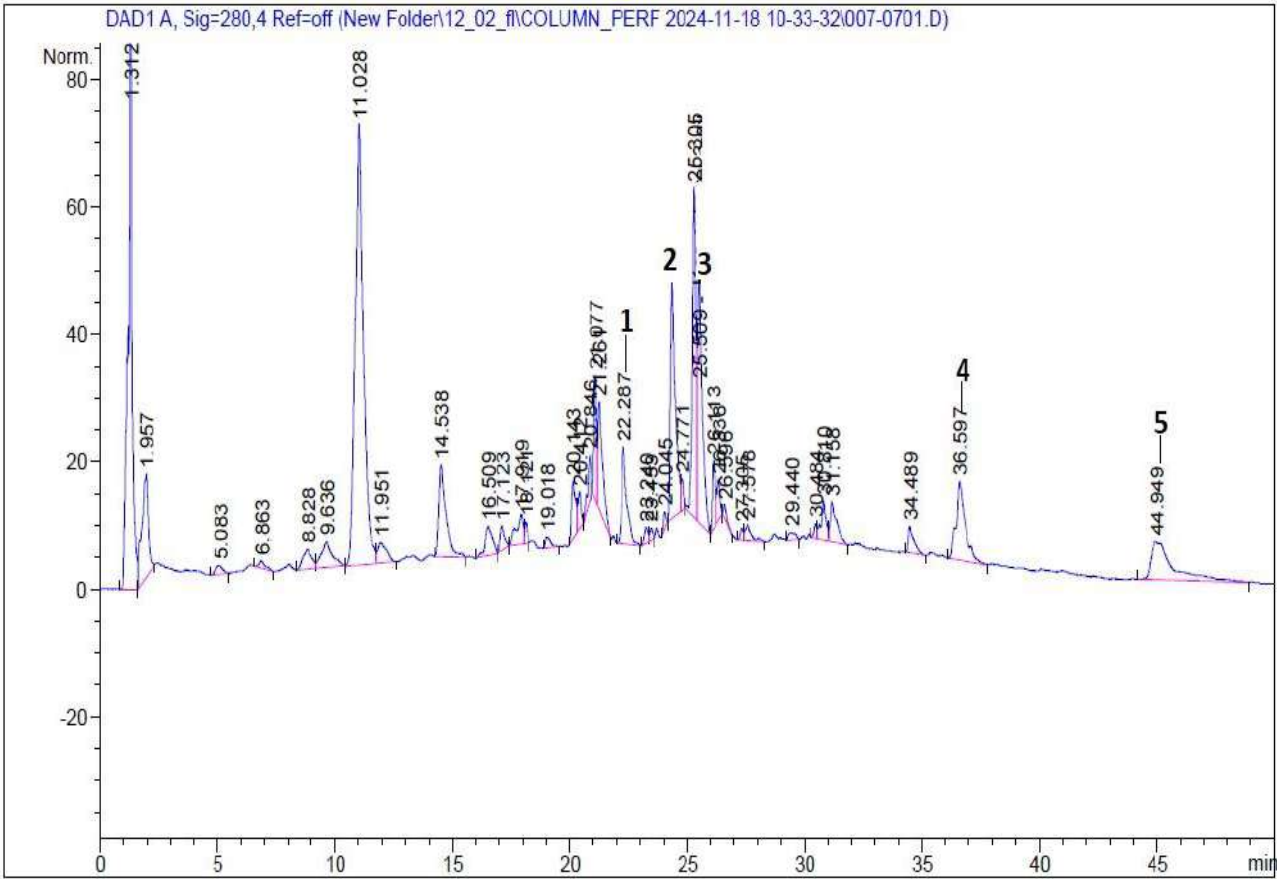


Рис. 3.4 ВЕРХ-хроматограма вмісту індивідуальних флавоноїдів у квітках гібіскусу сирійського: 1 – рутин; 2 – кверцетин 3-О- β-D-глюкозид; 3 – кемпферол 3-О-β-D-глюкозид; 4 – силібінін; 5 – рамнетин

Таблиця 3.4

Компонентний склад індивідуальних сполук флавоноїдів у квітках гібіскусу сирійського

Назва сполуки	Rt, хв	Вміст, мкг/г
Рутин	22.29	2507,96
кверцетин 3-О- β-D- глюкозид	24.22	1235,17
кемпферол 3-О-β-D- глюкозид	25.51	1392,43
Силібінін	36.59	673,14
Рамнетин	44.95	605,39

У досліджуваній сировині було ідентифіковано такі флавоноїдні сполуки: рутин, кверцетин 3-О- β -D-глюкозид, кемпферол 3-О- β -D-глюкозид, силібінін та рамнетин (рис. 3.5). У таблиці 3.3 представлено концентрації цих флавоноїдів, визначені у квітках гібіскусу сирійського. Найбільший вміст серед окремих флавоноїдів зафіксовано для рутину (2507,96 мкг/г) кемпферолу 3-О- β -D-глюкозиду (1392,43 мкг/г) та кверцетин 3-О- β -D-глюкозиду (1235,17 мкг/г) (табл. 3.4).



Рис. 3.5 Діаграма вмісту окремих індивідуальних флавоноїдів квіток гібіскусу сирійського

Рутин (рис. 3.6) позитивно впливає на секреторну та антитоксичну функції печінки, сприяє підвищенню секреції жовчі й забезпечує захист печінкової паренхіми від шкідливої дії чотирихлористого вуглецю, бензолу, хлороформу, хініну, етанолу та інших токсичних речовин. Як і інші флавоноїди,

рутин сприяє підвищенню еластичності стінок кровоносних судин, нейтралізує токсичну дію важких металів, виявляє протипухлинну та протирадіаційну активність, є нетоксичним і не викликає побічних ефектів [49].

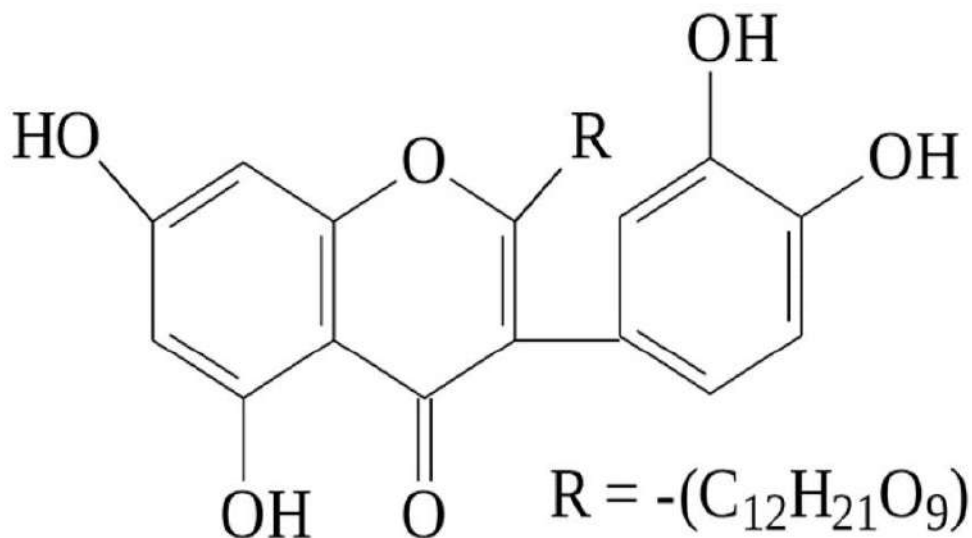


Рис. 3.6 Формула рутину

Відомо про захисну дію рамнетину на життєздатність клітин, апоптоз і виробництво АФК, рамнетин захищає клітини кардіоміобластів від загибелі клітин, викликані H_2O_2 [49, 50]. Американськими вченими було встановлено *in vitro* протипухлинну активність, антиоксидантну та антипроліферативну здатність рамнетину шляхом визначення підвищення експресії каспази-3 та каспази-9, які індукують апоптоз, а також знижують внутрішньоклітинні рівні АФК у клітинах раку простати [51].

Кемпферол-3-О- β -D-глюкозид, також відомий під назвою астрагалін, є поширеним флавоноїдом, що входить до складу багатьох лікарських рослин і проявляє антиоксидантну, протипухлинну, протизапальну та антикоагулянтну активність [52].

Кверцетин та його похідні, такі як кверцетин 3-О- β -D-глюкозид, є потужними антиоксидантами та одними з найбільш поширених флавоноїдів у раціоні людини. Кверцетин є одним із найкраще досліджених природних біофлавоноїдів, що виявляє виражені антиоксидантні, протизапальні та

імуномодуючі властивості. Він здатний регулювати активність факторів транскрипції NF-κB і Nrf2, сприяючи відновленню рівноваги між прозапальними та антиоксидантними процесами, що, у свою чергу, допомагає знижувати рівень окисно-нітрозативного стресу [53].

3.5 Встановлення вмісту суми флавоноїдів у квітках гібіскусу сирійського

Флавоноїди являють собою групу природних сполук вторинного походження рослин, біосинтез яких базується на дифенілпропановій структурі. У рослинній сировині ці речовини трапляються у вигляді агліконів, глікозидів та метильованих похідних. Вони можуть накопичуватися у всіх частинах рослини та належать до основних біологічно активних компонентів, відповідальних за фармакологічні властивості рослин.

Флавоноїди є важливим класом природних сполук. Зокрема, вони належать до класу рослинних вторинних метаболітів, що мають поліфенольну структуру, широко зустрічаються у рослинах, фруктах та овочах. Вони мають різні сприятливі біохімічні та антиоксидантні ефекти, пов'язані з різними захворюваннями, такими як рак, хвороба Альцгеймера, атеросклероз тощо [54, 55].

Флавоноїди виконують широкий спектр біологічних функцій, зокрема забезпечують захист рослин від УФ-випромінювання та патогенних мікроорганізмів, беруть участь у процесах регуляції чоловічої фертильності, впливають на транспорт ауксинів, а також визначають забарвлення квіток, що слугує привабливим сигналом для запилювачів [56]. Флавоноли, ймовірно, є найважливішими флавоноїдами, які беруть участь у реакціях на стрес; вони є найдавнішими та найпоширенішими флавоноїдами, які мають широкий спектр потужних фізіологічних дій [57].

За допомогою спектрофотометричного аналізу нами було визначено вміст суми флавоноїдів у квітках гібіскусу сирійського. Загальна кількість цих сполук у перерахунку на рутин склала $2,27 \pm 0,01\%$ (табл. 3.5).

Таблиця 3.5

Кількісний вміст суми флавоноїдів

Група БАР	Кількісний вміст, % в перерахунку на рутин у квітках гібіскусу сирійського
Сума флавоноїдів	2,27±0,01 %

Примітка. Вірогідність похибки $P < 0,05$.

Отримані результати мають важливе значення для подальших досліджень фармакологічних властивостей гібіскусу сирійського, зокрема його антиоксидантної активності, оскільки головну роль у прояві такої дії відіграють сполуки фенольної природи.

3.6 Встановлення вмісту індивідуальних компонентів гідроксикоричних кислот у досліджуваній сировині

Гідроксикоричні кислоти є фенольними сполуками, назва яких походить від їх спільного попередника — коричневої кислоти. Вони займають важливе місце серед рослинних фенолпропаноїдів, оскільки присутні майже в усіх вищих рослинах. Завдяки своїй здатності забезпечувати захист рослинних тканин від біотичних та абіотичних стресових чинників, фенольні сполуки розглядаються як універсальні фізіологічні адаптогени до несприятливих умов навколишнього середовища [58].

Гідроксикоричні кислоти — найпоширеніші поліфенольні кислоти, присутні у вищих рослинах у вигляді похідних глікозидів або складних ефірів ферулової, кумаринової, кофейної кислот, винною та хінною кислотами, а також у вигляді комплексів з білками, лігніном і целюлозою. Випробування *in vitro* гідроксикоричних кислот, а саме цикорової, кофейної, хінної, ферулової та

хлорогенової, підтвердили їхні антиоксидантні та антирадикальні властивості [58, 59]. Крім того, ферулова кислота демонструє свою терапевтичну дію при низці патологічних станів, включаючи цукровий діабет, серцево-судинні та нейродегенеративні захворювання та навіть рак [60].

Результати ВЕРХ аналізу квіток гібіскусу сирійського свідчать про присутність ряду фенольних сполук (табл. 3.6). Хроматограма гідроксикоричних кислот, отримана методом вискоєфективної рідинної хроматографії, представлена на рисунку 3.7. У досліджуваній рослинній сировині виявлено такі гідроксикоричні кислоти: гідроксифенілоцтова кислота, хлорогенова кислота, кофейна кислота, сирінгова кислота, *p*-кумарова кислота, *транс*-ферулова кислота, синапова кислота, *транс*-цинамова кислота.

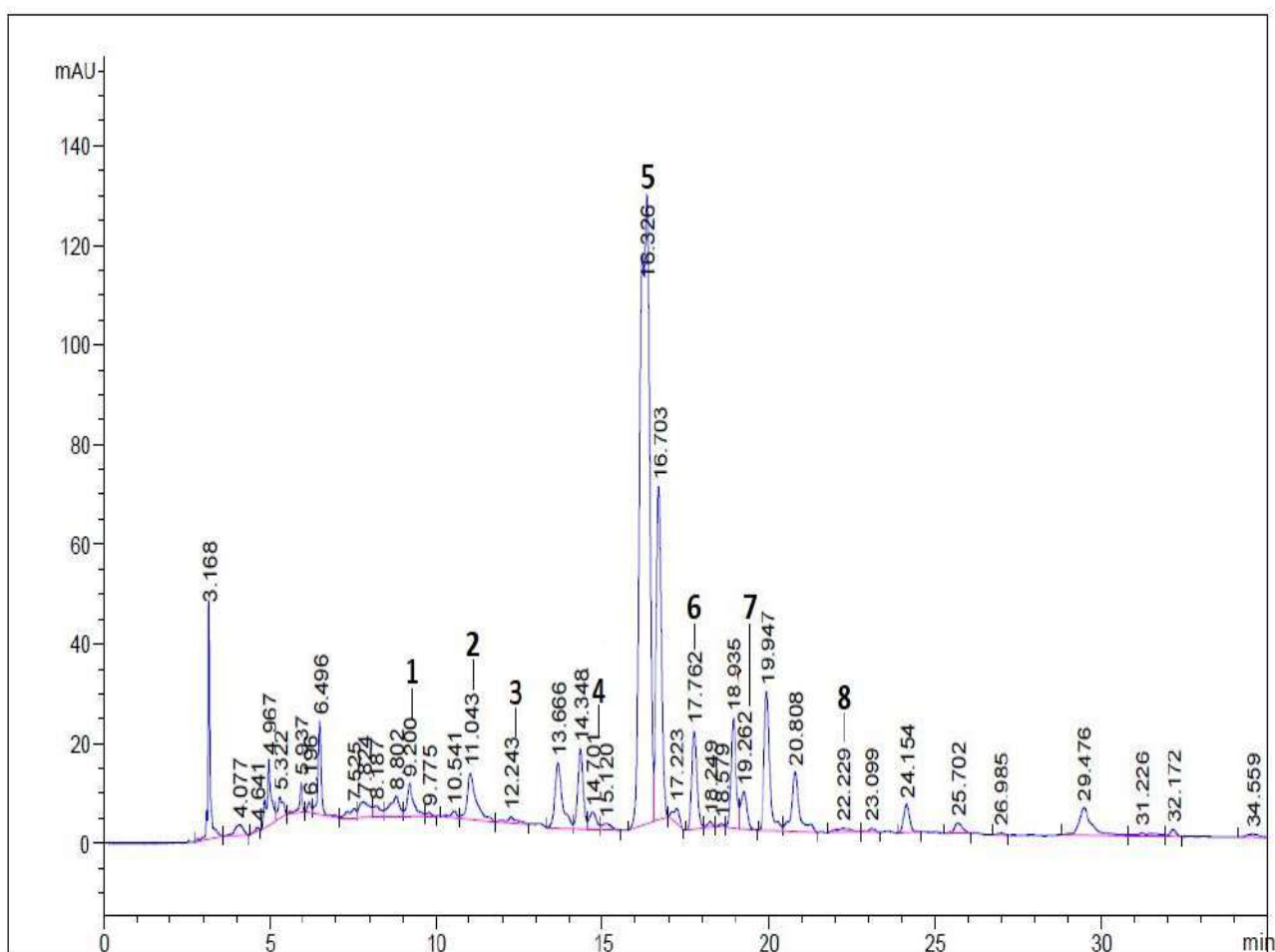


Рис. 3.7 ВЕРХ-хроматограма вмісту індивідуальних гідроксикоричних кислот у квітках гібіскусу сирійського: 1 – гідроксифенілоцтова кислота; 2 – хлорогенова кислота; 3 – кофейна кислота; 4 – сирінгова кислота; 5 – *p*-

кумарова кислота; 6 – *транс*-ферулова кислота; 7 – синапова кислота; 8 – *транс*-цинамова кислота

Серед виявлених гідроксикоричних кислот домінувала хлорогенова кислота (рис. 3.8), концентрація якої склала 5148,24 мкг/г (табл. 3.6). Ця сполука є однією з найбільш поширених серед фенольних кислот, завдяки значній кількості та широкій присутності в рослинах і продуктах харчування [61, 62].

Таблиця 3.6

Компонентний склад індивідуальних сполук гідроксикоричних кислот у квітках гібіскусу сирійського

Назва сполуки	Rt, хв	Вміст, мкг/г
гідроксифенілоцтова кислота	9.20	106,11
хлорогенова кислота	11.04	5148,24
кофейна кислота	12.24	110,05
сирінгова кислота	14.70	100,79
<i>p</i> -кумарова кислота	16.33	2047,31
<i>транс</i> -ферулова кислота	17.76	431,05
синапова кислота	19.26	161,60
<i>транс</i> -цинамова кислота	22.23	19,81

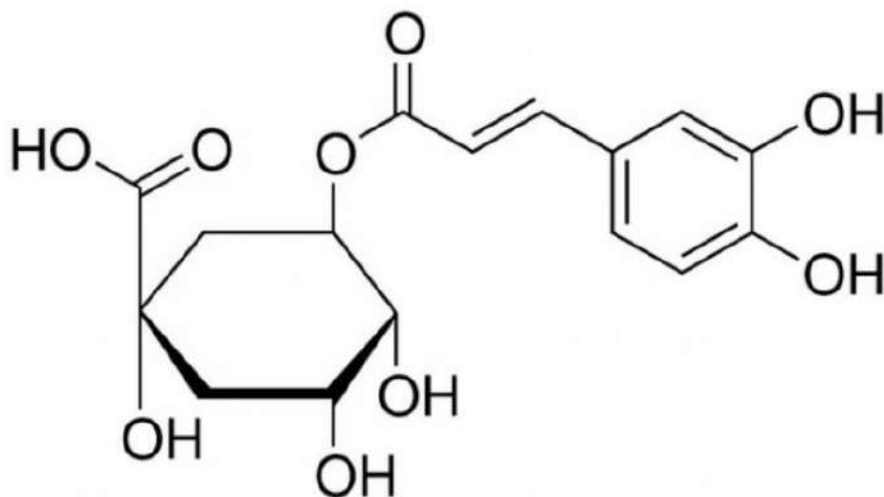


Рис. 3.8 Хлорогенова кислота

Хлорогенова кислота належить до важливих біологічно активних поліфенолів дієтичного походження, які виконують численні терапевтичні функції. Зокрема, вона проявляє антиоксидантні, гепатопротекторні, антибактеріальні, протизапальні, жарознижувальні, нейропротекторні, противірусні, антигіпертензивні та протимікробні властивості [63]. Крім того, вважається, що ця кислота бере участь у регуляції ліпідного та вуглеводного обміну, що дозволяє використовувати її для профілактики та лікування таких захворювань, як серцево-судинні патології, жирове переродження печінки, цукровий діабет і ожиріння [64].

Серед гідроксикоричних кислот у квітках гібіскусу сирійського переважає також *p*-кумарова кислота (2047,31 мкг/г) (табл. 3.6). *P*-кумарова кислота проявляє антиоксидантні властивості, які знижують ризик раку шлунка за рахунок зменшення утворення канцерогенних нітрозамінів. Експерименти *in vitro* з *p*-кумаровою кислотою показали виражену протизапальну активність [65].

3.7 Вміст суми гідроксикоричних кислот у квітках гібіскусу сирійського

Кількість суми гідроксикоричних кислот у сировині визначали за допомогою спектрофотометрії, використовуючи хлорогенову кислоту як стандарт. У квітках гібіскусу сирійського цей показник склав $2,94 \pm 0,02$ % (табл. 3.7).

Таблиця 3.7

Кількісний вміст суми гідроксикоричних кислот

Група БАР	Кількісний вміст, % в перерахунку на хлорогенову кислоту у квітках гібіскусу сирійського
Сума гідроксикоричних кислот	$2,94 \pm 0,02$ %

Примітка. Вірогідність похибки $P < 0,05$.

Гідроксикоричні кислоти належать до числа ключових біологічно активних компонентів лікарської рослинної сировини. До найпоширеніших серед них відносяться хлорогенова, ферулова та кофейна кислоти, які мають антимікробні, протизапальні, жовчогінні, гепатопротекторні та імунотропні властивості [66].

Зокрема, хлорогенова кислота характеризується також протипухлинною, знеболювальною та протизапальною активністю; кофейна — відома як потужний антиоксидант; ферулова ж демонструє протидіабетичну, протизапальну, нейропротекторну та протипухлинну дію, а також антиоксидантні властивості [67, 68].

3.8 Вміст суми поліфенолів у досліджуваному об'єкті

Фенольні сполуки представляють собою групу біологічно активних речовин і їх похідних, які характеризуються наявністю ароматичного кільця з

однією або декількома гідроксильними групами. До цього класу належать такі підгрупи, як прості феноли, хромони, фенолкарбонові кислоти, флавоноїди, кумарини, лігнани, хінони, ксантони, дубильні речовини та їх похідні. У складі рослин фенольні сполуки здебільшого зустрічаються у вигляді глікозидів або естерів. Фенольні сполуки рослинного походження здатні нейтралізувати вільні радикали, активні форми кисню та продукти їх взаємодії з органічними речовинами, а також виявляють антимуtagenні властивості. Їм притаманні антиоксидантна, протипухлинна, антимуtagenна, антиатеросклеротична, антибактеріальна, противірусна, седативна, противиразкова та протизапальна активність [69].

Кількісний вміст загальної кількості поліфенолів у гібіскусі сирійському було визначено методом спектрофотометрії відповідно до методики, викладеної в Державній фармакопеї України.

Для розрахунків використовували пірогалол як стандарт. Показники вмісту суми поліфенолів у досліджуваній сировині представлені в таблиці 3.8.

Згідно з отриманими даними, загальний вміст поліфенольних сполук у квітках досліджуваного виду склав ($5,63 \pm 0,02$) % у перерахунку на пірогалол (табл. 3.8, рис. 3.9).

Таблиця 3.8

Кількісний вміст суми поліфенолів

Група БАР	Кількісний вміст, % в перерахунку на пірогалол у квітках гібіскусу сирійського
Сума поліфенолів	$5,63 \pm 0,02$ %

Примітка. Вірогідність похибки $P < 0,05$.

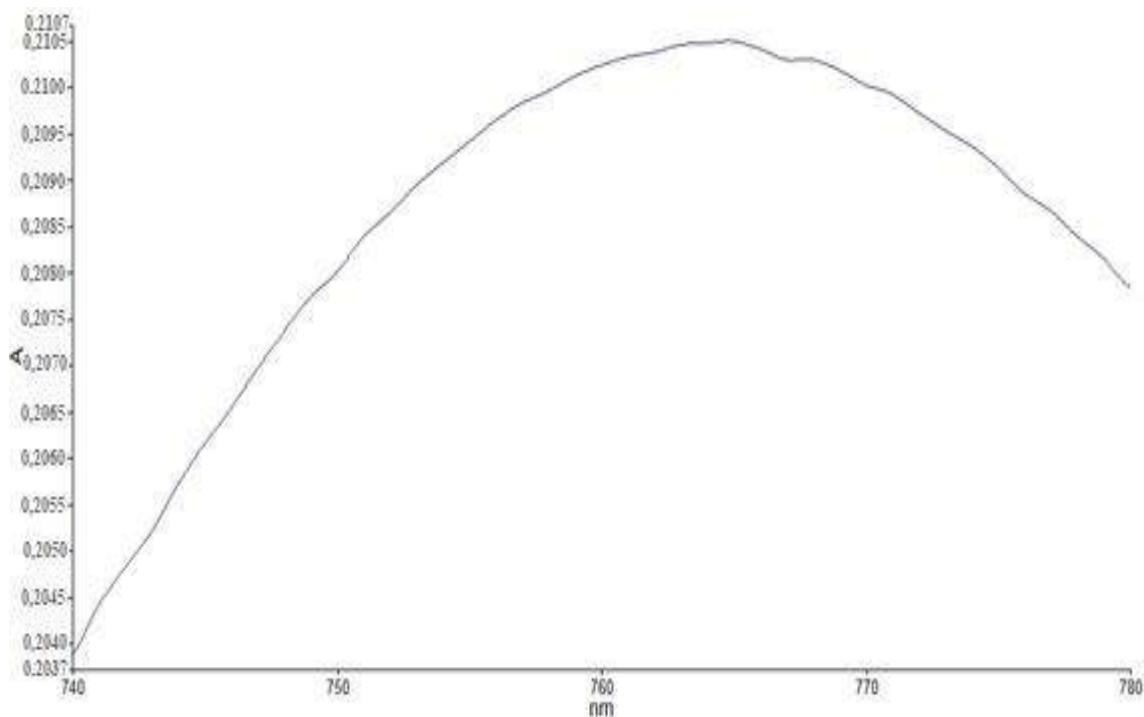


Рис. 3.9 УФ-спектр поглинання суми поліфенолів у квітках гібіскусу сирійського

3.9 Визначення вмісту антоціанів у квітках гібіскусу

Антоціани є фенольними сполуками, що локалізуються у пелюстках квітів і відповідають за їхнє забарвлення. Рослини, що містять антоціани, відзначаються високою активністю в окисно-відновних біохімічних процесах, оскільки завдяки своїй специфічній хімічній структурі аглікони антоціанів активно беруть участь у біохімічних реакціях [70].

Антоціани — природні пігменти, відповідальні за червоний, фіолетовий та синій кольори в царстві рослин. Вони є звичайними компонентами раціону людини, оскільки присутні в багатьох продуктах харчування, фруктах і овочах, особливо в ягодах та червоному вині. Антоціани додають не тільки забарвлення їжі, але й потенційну користь для здоров'я споживачів завдяки своїй здатності поглинати вільні радикали [70].

Відомо, що антоціани чинять позитивний вплив на здоров'я завдяки широкому спектру біологічної активності. Вони сприяють покращенню зору,

використовуються в терапії порушень кровообігу та нейродегенеративних захворювань, мають протипухлинні та протизапальні властивості, а також можуть відігравати роль у регуляції рівня цукру в крові. Такий ефект зумовлений їх здатністю впливати на різні ферментативні реакції й метаболічні процеси в організмі людини [71].

В доступних джерелах літератури вказано, що гібіскус сирійський містить антоціани, тому нами було проведено визначення даної групи сполук у квітках досліджуваного об'єкту.

За результатами спектрофотометричного аналізу встановлено, що вміст антоціанів у досліджуваній рослинній сировині (у перерахунку на ціанідин-3-О-глюкозид хлориду) становить $0,45 \pm 0,01$ % (табл. 3.9, рис. 3.10).

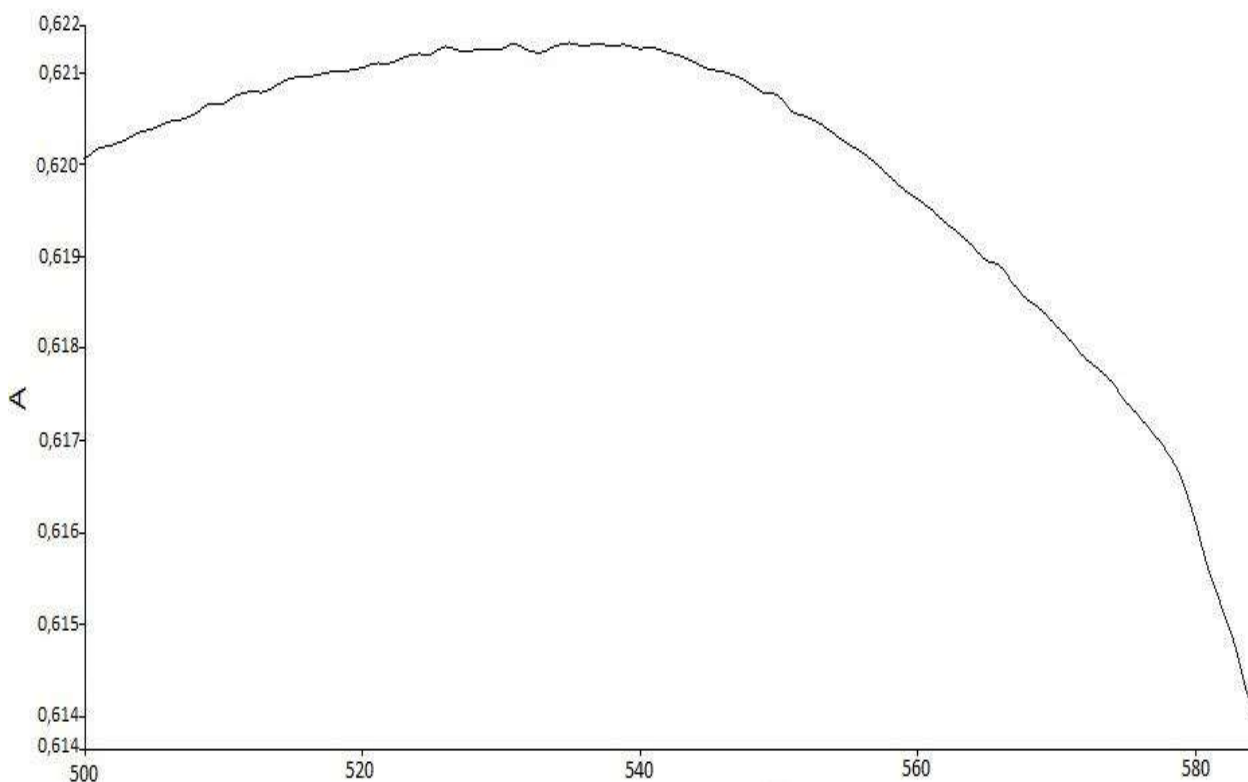


Рис. 3.10 УФ-спектр поглинання антоціанів у квітках гібіскусу сирійського

Таблиця 3.9

Кількісний вміст антоціанів

Група БАР	Кількісний вміст, % в перерахунку на ціанідин-3- О-глюкозид хлориду у квітках гібіскусу сирійського
Сума антоціанів	0,45±0,01 %

Примітка. Вірогідність похибки $P < 0,05$.

Установлено, що квітки гібіскусу сирійського можуть слугувати перспективною сировиною для отримання антоціанів, які знаходять широке застосування у харчовій промисловості, фармакології та потенційно — у сфері альтернативної енергетики. Особливу увагу привертає високий вміст антоціанінів у квітках цієї рослини, зокрема природного джерела ціанідин-3-глюкозиду (рис. 3.11).

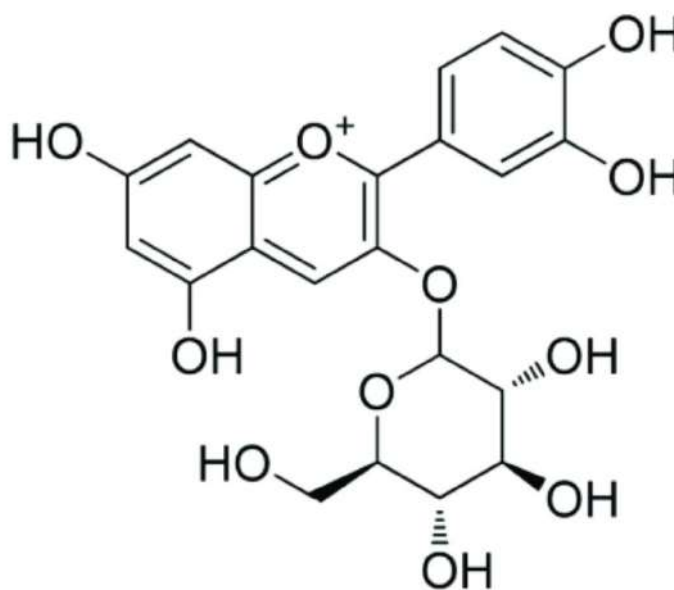


Рис. 3.11 Структурна формула ціанідин-3-глюкозиду

3.10 Встановлення числових показників гібіскусу сирійського

Якість рослинної сировини визначається відповідністю її фізико-хімічних показників вимогам чинної нормативної документації. З метою оцінки доброякісності квіток гібіскусу сирійського були проаналізовані такі параметри: втрата маси при висушуванні, загальний вміст золи, а також золи, нерозчинної в 10% розчині хлоридної кислоти [33].

3.10.1 Втрата в масі при висушуванні

Повітряно-суха лікарська рослинна сировина, залежно від її морфологічної будови, може містити до 14% гігроскопічної вологи та летких компонентів. Перевищення цього рівня негативно впливає на якість сировини: змінюється її колір, виникає неприємний запах, розвивається пліснява, а також руйнуються біологічно активні речовини [33].

У зв'язку з цим було проведено визначення допустимого рівня вологості для квіток гібіскусу сирійського.

Результати дослідження втрати маси при висушуванні подано в таблиці 3.10.

Таблиця 3.10

Визначення вологості у квітках гібіскусу сирійського шляхом висушування

№ з/п	Сировина	Втрата в масі при висушуванні, % (m=5)
1.	Квітки гібіскусу	10,02±0,51

Примітка. Вірогідність похибки $P < 0,05$.

Отже, показник втрати маси під час висушування квіток гібіскусу сирійського становить $10,02 \pm 0,51$ %.

3.10.2 Визначення загальної золи

Визначення загального вмісту золи у гібіскусі сирійському (у відсотках до абсолютно сухої маси сировини) проводили відповідно до вимог ДФУ, т. 1, друге видання.

Отримані результати наведено в таблиці 3.11.

Таблиця 3.11

Визначення загальної золи у квітках гібіскусу сирійського

№ з/п	Сировина	Вміст, % (m=5)
1.	Квітки гібіскусу	$5,53 \pm 0,11$

Примітка. Вірогідність похибки $P < 0,05$.

3.10.3 Визначення золи, нерозчинної у 10 % розчині кислоти хлоридної

Визначення кількості золи, нерозчинної в хлоридній кислоті (у перерахунку на абсолютно суху речовину гібіскусу сирійського), проводили згідно з методикою, наведеною в ДФУ, т. 1, друге видання.

Результати дослідження цього показника в аналізованій сировині подано в таблиці 3.12.

Таблиця 3.12

Визначення нерозчинної у 10 % розчині кислоти хлоридної, у квітках
гібіскусу сирійського

№ з/п	Сировина	Вміст, % (n=5)
1.	Квітки гібіскусу	2,18±0,04

Примітка. Вірогідність похибки $P < 0,05$.

Висновки до розділу 3

1. У процесі дослідження квіток гібіскуса сирійського було визначено кількісний вміст окремих груп біологічно активних речовин із використанням алкаліметричного титрування (для органічних кислот) та спектрофотометричних методів (для аскорбінової кислоти, суми гідроксикоричних кислот, антоціанів, поліфенолів і флавоноїдів). Окрім того, для ідентифікації індивідуальних карбонових кислот застосовано метод газової хроматографії в поєднанні з мас-спектрометрією (ГХ/МС), а для флавоноїдів і гідроксикоричних кислот — високоефективну рідинну хроматографію (ВЕРХ).
2. У складі карбонових кислот, ідентифікованих у квітках гібіскуса сирійського, переважають яблучна (7680,77 мкг/г), левулінова (6043,29 мкг/г) та лимонна (6029,42 мкг/г) кислоти. Загальний вміст суми органічних кислот, перерахований на яблучну кислоту, становив $(4,04 \pm 0,02) \%$, тоді як концентрація аскорбінової кислоти дорівнювала $(0,78 \pm 0,01) \%$.
3. У дослідженій рослинній сировині були визначені індивідуальні флавоноїдні сполуки, серед яких рутин, кверцетин 3-О-β-D-глюкозид, кемпферол 3-О-β-D-глюкозид, силібінін і рамнетин. Найвищі концентрації спостерігалися для рутину (2507,96 мкг/г), кемпферолу 3-О-β-D-глюкозиду (1392,43 мкг/г) і кверцетину 3-О-β-D-глюкозиду (1235,17 мкг/г). Щодо гідроксикоричних

кислот, було ідентифіковано гідроксифенілоцтову, хлорогенову, кофейну, сирінгову, *p*-кумарову, *транс*-ферулову, синапову та *транс*-цинамову кислоти. Серед них найвищий вміст продемонструвала хлорогенова кислота — 5148,24 мкг/г.

4. У дослідженій рослинній сировині загальний вміст суми поліфенольних сполук становив $(5,63 \pm 0,02)$ %, вміст суми флавоноїдів — $(2,27 \pm 0,01)$ %, суми гідроксикоричних кислот — $(2,94 \pm 0,02)$ %, та суми антоціанів — $(0,45 \pm 0,01)$ %.
5. Результати проведених фітохімічних досліджень свідчать про те, що квітки гібіскуса сирійського можуть слугувати перспективним джерелом сполук фенольної природи та окремих низькомолекулярних метаболітів. Встановлені хімічні профілі біологічної активності виявлених речовин дозволяють розглядати кожен з них як потенційний об'єкт для подальших фармакологічних досліджень.

ВИСНОВКИ

1. Аналіз літературних джерел підтвердив актуальність вивчення видів роду гібіскус як перспективної лікарської рослинної сировини. За результатами фітохімічних досліджень у квітках гібіскуса сирійського виявлено наявність флавоноїдів, гідроксикоричних кислот, поліфенольних сполук, органічних кислот, аскорбінової кислоти та антоціанів, які обумовлюють їхню фармакологічну активність.
2. Визначено кількісний вміст суми органічних кислот і аскорбінової кислоти у квітках гібіскуса сирійського, який становить відповідно $(4,04 \pm 0,02)$ % та $(0,78 \pm 0,01)$ %. Основними карбоновими кислотами в досліджуваній сировині є яблучна, лимонна та левулінова кислоти, згідно отриманих результатів методом ГХ/МС аналізу.
3. За результатами високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) було встановлено склад індивідуальних флавоноїдних і гідроксикоричних сполук у квітках гібіскуса сирійського. Серед флавоноїдів найбільший вміст мали рутин ($2507,96$ мкг/г), кемпферол 3-О- β -D-глюкозид ($1392,43$ мкг/г) та кверцетин 3-О- β -D-глюкозид ($1235,17$ мкг/г). Серед гідроксикоричних кислот домінували хлорогенова ($5148,24$ мкг/г) та *p*-кумарова кислота ($2047,31$ мкг/г).
4. У квітках гібіскуса сирійського було також визначено вміст суми сполук фенольної природи. У дослідженій сировині вміст суми флавоноїдів становив $(2,27 \pm 0,01)$ %, гідроксикоричних кислот — $(2,94 \pm 0,02)$ %, поліфенолів — $(5,63 \pm 0,02)$ %, а антоціанів — $(0,45 \pm 0,01)$ %. Окрім того, встановлено основні числові характеристики для квіток гібіскуса сирійського.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Christenhusz M., Byng J. The number of known plants species in the world and its annual increase. *Phytotaxa*. 2016. № 261(3). P. 201–17.
2. Phenotypic characteristics and karyotype analysis of *Hibiscus sabdariffa* var. *sabdariffa* by fluorescence in situ hybridization (FISH) / D. D. Mohammad, I. M. Mazharul, T. C. Ann [et al.]. *Hortic Sci Technol*. 2020. № 38. P. 695–704.
3. Botanical and genetic characterization of *Hibiscus syriacus* L. cultivated in Egypt / J. M. N. El Shazly, S. H. El Gayed, Z. A. Kandil [et al.]. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2018. № 8(12). P. 092-103.
4. Капустян В. В., Сидоренко О. В., Капустян А. В. Наукові основи використання ботанікогеографічного принципу при інтродукції тропічних та субтропічних рослин в умовах захищеного ґрунту. Інтродукція та збереження рослинного різноманіття. 2000. № 30. С. 61-64.
5. Expanded uses and trend of domestic and international research of Rose of Sharon (*Hibiscus syriacus* L.) as Korean national flower since the protection of new plant variety / H. C. Kang, D. Y. Kim, Y. G. Wang [et al.]. *J Korean Inst Landsc Archit*. 2019. № 47(5). P. 49–65.
6. Genetic relationship of *Hibiscus syriacus* L. clarified by AFLP and morphological evaluation / S. H. Kim, W. J. Kim, G. J. Lee [et al.]. *Hort Environ Biotechnol*. 2009. № 50. P. 555-565.
7. Punasiya R., Pillai S. In vitro, antioxidant activity of various leaves extract of *Hibiscus syriacus* L. *J Pharmacogn Phytochem*. 2015. № 7(1). P. 18–24.
8. Vasudeva N., Sharma S. K. Biologically active compounds from the genus *Hibiscus*. *Pharmaceutical Biology*. 2008. № 46(3). P. 145-153.
9. Bandyukova V. A., Ligai L. V. Chemical study of the composition of the polyphenolic compounds of *Hibiscus syriacus*. *Chemistry of Natural Compounds*. 1990. № 26(4). P. 470-471.

10. Barbulova A., Apone F., Colucci G. Plant cell cultures as source of cosmetic active ingredients. *Cosmetics*. 2014. № 1(2). P. 94–104.
11. Nutritional composition and phytochemical screening in different parts of *Hibiscus syriacus* L. / Y. Park, S. H. Kwon, Y. L. [et al.]. *Food Sci Nutr*. 2022. № 10(9). P. 3034-3042.
12. Sugumaran M., Poornima M., Sethuvani S. Phytochemical and trace element analysis of *Hibiscus rosa sinensis* Linn and *Hibiscus syriacus* Linn flowers. *NPAIJ*. 2012. № 8(9). P. 341-345.
13. Hydroxyhibiscone A, a novel human neutrophil elastase inhibitor from *Hibiscus syriacus* / In-Ja. Ryoo, Yu. Bong-Sik, L. In-Kyoung [et al.]. *Microbiol. Biotechnol*. 2010. № 20(8). P. 1189–1191.
14. Free radical scavenging activities of pigment extract from *Hibiscus syriacus* L. petals in vitro / M. Geng, M. Ren, Z. Liu, X. Shang. *Afr. J. Biotechnol*. 2012. № 11. P. 429–435.
15. Huang K. C. *The Pharmacology of Chinese Herbs*. 2nd ed. New York: CRC Press. 1999. p. 242.
16. *Oriental materia medica: a concise guide* / H. Y. Hsu, Y. P. Chen, S. J. Shen, [et al.]. Taiwan: Oriental Healing Arts Institute. 1986. P. 503–504.
17. Three naphthalenes from root bark of *Hibiscus syriacus* / I. D. Yoo, B. S. Yun, I. K. Lee [et al.]. *Phytochemistry*. 1998. № 47(5). P. 799–802.
18. The extract of *Hibiscus syriacus* inducing apoptosis by activating p53 and AIF in human lung cancer cells / Y. L. Cheng, S. C. Lee, H. J. Harn [et al.]. *Am J Chin Med*. 2008. № 36(1). P. 171–184.
19. Punasiya R., Verma R., Pillai S. In vitro hair growth promoting activity of various leaves extract of *Hibiscus syriacus* L. on albino rats. *International Journal of Pharmacy and Life Sciences*. 2014. № 5(5). P. 3565–3569.
20. Antidepressant-like effects of methanol extract of *Hibiscus tiliaceus* flowers in mice / C. Vanzella, P. Bianchetti, S. Sbaraini [et al.]. *BMC Complement. Altern. Med*. 2012. № 12. P. 41.

21. Fakeye T. O., Pal A., Khanuja S. P. Anxiolytic and sedative effects of extracts of *Hibiscus sabdariffa* Linn (family Malvaceae). *Afr. J. Med. Med. Sci.* 2008. № 37(1). P. 49–54.
22. Studies on isolation of naturally occurring biologically active principles IV: Antifungal constituents of the bark of *Hibiscus syriacus* L. / M. Yokota, H. Zenda, T. Kosuge, T. Yamamoto. *Yakugaku Zasshi*. 1978. № 98. P. 1508–1511.
23. Chemical composition and antimicrobial activity of some seed oils / M. A. Shah, M. M. Bokadia, B. K. Mehta, S. Jain. *Fitoterapia*. 1988. № 59. P. 126–128.
24. Skin protective and anti-inflammatory effects of *Hibiscus syriacus* L. (mugunghwa): A comparative study of five parts of the plant / J. E. Yang, S. W. Park, H. T. Ngo [et al.]. *Phcog Mag.* 2020. № 16. P. 183-191.
25. Polyphenols from the flower of *Hibiscus syriacus* Linn ameliorate neuroinflammation in LPS-treated SH-SY5Y cell / R.-R. Zhang, R.-D. Hu, X.-Y. Lu [et al.]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2020. № 130. P. 110517.
26. Niranjana R. Recent advances in the mechanisms of neuroinflammation and their roles in neurodegeneration. *Neurochem. Int.* 2018. № 120. P.13–20.
27. Calsolaro V., Edison P. Neuroinflammation in Alzheimer's disease: current evidence and future directions. *Alzheimers Dement.* 2016. № 12. P. 719–732.
28. The benefits of neuroinflammation for the repair of the injured central nervous system / H.Y.F. Yong, K.S. Rawji, S. Ghorbani [et al.]. *Cell. Mol. Immunol.* 2019. № 16. P. 540–546.
29. Mitochondrial metabolism: a common link between neuroinflammation and neurodegeneration / D. Garabadu, N. Agrawal, A. Sharma, S. Sharma. *Behav. Pharmacol.* 2019. № 30. P. 642–652.

30. Verma S. *Hibiscus rosa-sinensis* L. (Malvaceae): A Multipurpose Ornamental Plant. *International Journal of Research in Pharmacology & Pharmacotherapeutics*. 2017. № 6(1). P. 61-64.
31. The triterpenoids of *Hibiscus syriacus* induce apoptosis and inhibit cell migration in breast cancer cells / R. J. Hsu, Y. C. Hsu, S. P. Chen [et al.]. *BMC Complement Altern Med*. 2015. № 15(1). P. 65–74.
32. Pharmaceutical and pharmacological activities of *Hibiscus rosa sinensis* MUCILAGE / Sargam, Kumar D., Garg G. *The Global Journal of Pharmaceutical Research*. 2013. № 2 (3). P. 1822-1829.
33. Солодовниченко Н. М., Журавльов М. С., Ковальов В. Н. Лікарська рослинна сировина та фітопрепарати: Посіб. з фармакогнозії з основами біохімії лікар. рослин / Харків: Вид-во НФАУ. Золоті сторінки, 2001. 408 с.
34. Дослідження органічних кислот у траві та підземних органах *Saponaria officinalis* L. / Костишин Л. В., Слободянюк Л. В., Марчишин С. М. [та ін.]. *Медична та клінічна хімія*. 2020. № 4(22). С. 77-82.
35. Державна Фармакопея України: в 3 т. / ДП «Науково-експертний фармакопейний центр». 2-е вид., Т. 3. Х.: Держ. п-во «Науково-експертний фармакопейний центр», 2014. 732 с.
36. Pyrzynska K., Sentkowska A. *Chromatographic Analysis of Polyphenols. Polyphenols in Plants.* – Academic Press. 2019. С. 353-364.
37. Марчишин С. М., Гусак Л. В., Бердей Т. С. Дослідження флавоноїдів у траві та кореневих бульбах чистецю Зібольда (*Stachys sieboldii* MIQ.). *Фітотерапія. Часопис*. 2017. № 1. С. 27-30.
38. Combining pressurized liquids with ultrasound to improve the extraction of phenolic compounds from pomegranate peel (*Punica granatum* L.) / B. R. Sumere, M. C. de Souza, M. P. Dos Santos [et al.]. *Ultrasonics sonochemistry*. 2018. № 48. С. 151-162.
39. Дослідження гідроксикоричних кислот підземних органів катрану серцелистого та катрану коктебельського / О. Я. Скринчук, С. М.

Марчишин, Л. В. Слободянюк, М. М. Когут. Медична та клінічна хімія. 2020. № 22(4). С. 91-95.

40. Державна Фармакопея України: в 3 т. / ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». 2-е вид., Т. 1. Х.: Держ. п-во «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2015. 1128 с.

41. Спектрофотометричне дослідження дубильних речовин у траві *Achillea millefolium* L. / Г. П. Смойловська, О. О. Малюгіна, О. К. Єренко, Т. В. Хортецька. Current issues in pharmacy and medicine: science and practice. 2023. №16(2). С. 130-134.

42. Ersus S., Cam M. Determination of organic acids, total phenolic content and antioxidant capacity of sour *Citrus aurantium* fruits. Chemistry of Natural Compounds. 2007. № 5(43). P. 607-609.

43. Sugars, organic acids, phenolic composition and antioxidant activity of sweet cherry (*Prunus avium* L.) / V. Usenik, J. Fabcic, F. Stampar. Food Chemistry. 2008. № 107. P. 185-192.

44. Кількісний вміст суми органічних кислот у серіях сировини деяких представників родин *Polygonaceae*, *Rosaceae* та *Asteraceae* / Т. В. Опрошанська, О. П. Хворост, В. В. Кудря. Мед. та клініч. хімія. 2020. № 3(85). С. 81–86.

45. Рудник А. М. Карбонові кислоти бруньок бальзамічних тополь. Фармацевтичний часопис. 2013. №4. С. 34-36.

46. Державна Фармакопея України: в 3 т. / ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». 2-е вид., 1 допов. Х.: Держ. п-во «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2016. 360 с.

47. Camarena V., Wang G. The epigenetic role of vitamin C in health and disease. Cell. Mol. Life Sci. 2016. № 73(8). P. 1645–1658.

48. Біохімічні основи вітамінології: навчальний посібник самостійної роботи іноземних студентів фармацевтичного факультету зі

спеціальності 7.12020101 «Фармація»/Александрова Є. В, Шкода А. С., Юрченко Д. Н., Левіч С. В. Запоріжжя, 2015. 129 с.

49. Cardioprotective effects of rhamnetin in H9c2 cardiomyoblast cells under H₂O₂-induced apoptosis / E. S. Park, J. C. Kang, Y. C. Jang [et al.]. *J Ethnopharmacol.* 2014. № 153(3). P. 552-560.

50. Rhamnetin improves antioxidant status in the liver of Ehrlich solid tumor bearing mice / M. Nisari, Ö. Bozkurt, T. Ertekin [et al.]. *Medical Science and Discovery.* 2020. № 7(5). P. 494-500.

51. Antiproliferative, antioxidant and antiapoptotic effects of rhamnetin in human prostate cancer / C. Oak, N. Bhaskaran, S. Gupta, S. Shukla. *Proceedings of the 105th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research*; 2014 Apr 5-9; San Diego, CA.

52. Jun Y., Yonghao H., Hongwu D. Kaempferol-3-O- β -D-glucoside, a potential allelochemical isolated from *Solidago Canadensis* L. Liyao. *Allelopathy Journal.* 2011. №28. P. 259-266.

53. Quercetin-3-O- β -d-glucopyranoside, a dietary flavonoid, protects PC12 cells from H₂O₂-induced cytotoxicity through inhibition of reactive oxygen species / Y. Shokoohinia, M. Rashidi, L. Hosseinzadeh, Z. Jelodarian. *Food Chemistry.* 2015. № 167. P. 162-167.

54. Chemical studies of anthocyanins: a review / C. Ovando, D. Hernandez, E. Hernandez [et al.]. *Food Chem.* 2009. № 113. P. 859–871.

55. Epigallocatechin-3-gallate pre-vents lipopolysaccharide-induced elevation of β -amyloid generation and memory deficiency / Y. Lee, D. Yuk, J. Lee [et al.]. *Brain Res.* 2009. № 1250. P. 164–174.

56. Bradshaw H. D., Schemske D. W. Allele substitution at a flower colour locus produces a pollinator shift in monkeyflowers. *Nature.* 2003. № 426. P. 176–178.

57. Pollastri S., Tattini M. Flavonols: old compounds for old roles. *Ann. Bot.* 2011. № 108. P. 1225–1233.

58. In vitro and in vivo antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid / S. Yuki, I. Shirou, K. Toshimitsu [et al.]. *International Journal of Pharmaceutics*. 2011. № 403(1-2). P. 136-138.

59. Determination of hydroxycinnamic acids in raw medicinal plant materials and plant extracts / Y. V. Medvedev, O. I. Perederyaev, A. P. Arzamastsev [et al.]. *Questions of Biological, Medical and Pharmaceutical Chemistry*. 2010. №3. P. 25-31.

60. Marimuthu S., Adluri R. S., Venugopal P. M. Ferulic Acid: Therapeutic Potential Through Its Antioxidant Property. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*. 2007. № 40(2). P. 92-100.

61. Farah A., Lima J. de P. Consumption of Chlorogenic Acids through Coffee and Health Implications. *Beverages*. 2019. № 5. P. 11.

62. Hydroxycinnamic Acids and Derivatives Formulations for Skin Damages and Disorders: A Review / M. Contardi, M. Lenzuni, F. Fiorentini [et al.]. *Pharmaceutics*. 2021. № 13. P. 999.

63. Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological F. review and call for further research / M. Naveedab, V. Hejazic, M. A. [et al.]. *Asghar Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2018. № 97. P. 67-74.

64. Santana-Gálvez J., Cisneros-Zevallos L., Jacobo-Velázquez D. A. Chlorogenic acid: recent advances on its dual role as a food additive and a nutraceutical against metabolic syndrome. *Molecules*. 2017. № 26(22). P. 358.

65. Порівняльний аналіз гідроксикоричних кислот артишоку, що вирощений в Україні та Франції / А. І. Федосов, О. О. Добровольний, А. С. Шаламай [та ін.]. *Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики*. 2017. № 1(10). P. 49-53.

66. Визначення кількісного вмісту гідроксикоричних кислот у сировині дивини звичайної / А. А. Волошина, В. С. Кисличенко, І. О. Журавель, Н. Є. Бурда. *Український медичний альманах*. 2012. № 5(15). С.39-40.

67. Chlorogenic acid as potential antiinflammatory analgesic agent: an investigation of the possible role of nitrogen-based radicals in rats / A. El-Medany, Yi. Bassiouni, M. Khattab, A. Mahesar. *International Journal of Pharmacology & Toxicology Science*. 2011. № 1. P. 24–33.

68. Kashmira J. G., Shashank B. K., Rajkumari S. S. Ferulic acid – a comprehensive pharmacology of an important bioflavonoid. *IJPSR*. 2012. № 3(1). P. 700–710.

69. Лікарські рослини і лікарська рослинна сировина, які містять фенольні сполуки, алкалоїди і різні групи БАР. Товарознавчий аналіз. Модуль 2 : навчально-методичний посібник з фармакогнозії з основами фітокосметики для студентів 3 курсу фармацевтичного факультету (спеціальність «Технології парфумерно-косметичних засобів») / уклад. С. Д. Тржецинський, В. С. Доля, О. М. Денисенко [та ін.]. Запоріжжя: ЗДМУ, 2014. 136 с.

70. P. M. Kähkönen, M. Heinonen. Antioxidant activity of anthocyanins and their aglycons. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003. № 51(3). P. 628–633.

71. M. M. Giusti, R. E. Wrolstad. Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems. *Biochemical Engineering Journal*. 2003. № 14(3). P. 217–225.