

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ТЕХНОЛОГІЙ ТА ДИЗАЙНУ

Факультет хімічних та біофармацевтичних технологій
Кафедра біотехнології, шкіри та хутра

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

на тему:

**Розробка та оптимізація методу екстракції цитрусової шкірки,
стандартизація та оцінка антимікробної активності»**

Рівень вищої освіти перший (бакалаврський)

Спеціальність 162 Біотехнології та біоінженерія

Освітня програма Біотехнологія

Виконала: студентка групи ББТ1-210

Василенко Є.Ю.

Науковий керівник: к.б.н., доц. Юнгін О. С.

Рецензент: к.т.н., доц. Волошина І. М.

Київ 2024

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ТЕХНОЛОГІЙ ТА ДИЗАЙНУ

Факультет	<u>хімічних та біофармацевтичних технологій</u>
Кафедра	<u>біотехнології, шкіри та хутра</u>
Рівень вищої освіти	<u>перший (бакалаврський)</u>
Спеціальність	<u>162 Біотехнології та біоінженерія</u>
Освітня програма	<u>Біотехнологія</u>

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри БШХ

_____ Олена МОКРОУСОВА

« ____ » _____ 20 ____ р.

**ЗАВДАННЯ
НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ СТУДЕНТУ**

Василенко Євгенії Юріївни

1. Тема кваліфікаційної роботи: **Розробка та оптимізація методу екстракції
цитрусової шкірки, стандартизація та оцінка антимікробної активності**

Науковий керівник роботи Юнгін Ольга Сергіївна, к.б.н., доц.

затверджені наказом КНУТД від « ____ » _____ 20 ____ року № _____

2. Вихідні дані до кваліфікаційної роботи: завдання на кваліфікаційну роботу;
наукова література щодо екстракції гесперидину зі шкірки цитрусових, як
технологічна схема екстракції.

3. Зміст кваліфікаційної роботи: вступ, теоретична частина, експериментальна
частина, висновки, дискусія, список використаних джерел.

4. Дата видачі завдання _____

АНОТАЦІЯ

Василенко Є. Ю. Розробка та оптимізація методу екстракції цитрусової шкірки: стандартизація та оцінка антимікробної активності – Рукопис.

Кваліфікаційна робота за спеціальністю 162 «Біотехнології та біоінженерія».
– Київський національний університет технологій та дизайну, Київ, 2024 рік.

Кваліфікаційну роботу присвячено дослідженню методу екстракції гесперидину з шкірки цитрусових. Проведено аналіз існуючих методів екстракції, обрано оптимальні умови для виділення гесперидину та визначено його чистоту за допомогою високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ). Вивчено антимікробну активність отриманого продукту. Результати роботи підтверджують ефективність розробленої методики та демонструють високий потенціал гесперидину як природного антимікробного засобу.

У роботі представлено технологічну схему оптимізованого методу екстракції, а також обґрунтування вибору цього методу. Також робота включає ретельний опис проведення антимікробного аналізу гесперидину виділеного з цитрусових.

Ключові слова: екстракція, гесперидин, цитрусові шкірки, антимікробна активність, високоефективна рідинна хроматографія, біологічно активні сполуки.

е

У

и

—

3MICT

[illegible]

В	
Р и	
О	
З	
Д	
І	
Л	
В	
з	
И	
С	
Н	
Н	
Д	
О	
С	
В	
В	
К	
И	
М	
В	
И	
Т	
К	
Ф	
Р	
И	
А	
С	
Т	
А	
С	
Н	
И	
Н	
А	
Д	
Ж	
Е	
Р	
Е	
Л	
а	
б	
ё	
і	
ї	
р	
н	
ч	
ѐ	
н	

ПОДАТКИ.....	45
--------------	----

ВСТУП

Цитрусові, члени родини рутових, поширені в усьому світі та багаті корисними вторинними метаболітами. При річному виробництві, що перевищує 124 мільйони тон, значна частина проходить переробку, утворюючи значні відходи, насамперед у формі шкірки цитрусових. Ця шкірка, яка становить значну частину маси плоду, є переважаючим залишком. Без додаткової обробки ці шкірки викидаються, що призводить до значного забруднення навколишнього середовища.

Хоча багато досліджень було зосереджено на цитрусових, шкірка цитрусових приділялася відносно мало уваги, незважаючи на її широке історичне використання як харчових інгредієнтів і лікарських рослин. Цедра цитрусових багата біологічно активними сполуками, зокрема флавоноїдами, і є цінним резервуаром ефірних масел і пектину. Завдяки своєму різноманітному складу шкірка цитрусових демонструє спектр біологічних властивостей, включаючи антиоксидантну та протизапальну дію, з потенційними перевагами для здоров'я, такими як профілактика серцево-судинних захворювань і зниження ризику раку. Значна біологічна активність, виявлена в шкірці цитрусових, підкреслює їх значення як цінного природного ресурсу, кидаючи під сумнів уявлення про те, що вони просто відходи. Отже, всебічне дослідження біологічних аспектів шкірки цитрусових є своєчасним, пропонуючи розуміння її величезного потенціалу для застосування в ліках, функціональних продуктах харчування та біопаливі [1].

Гесперидин (3,5,7-тригідроксифлаванон-7-рамноглюкозид, гесперетин-7-О-рутинозид), класифікований як флаванонова сполука в підкласі флавоноїдів, привернув значну увагу через його вплив на здоров'я та фармакологічний ефект. Його терапевтичне застосування поширюється на лікування діабету 2 типу, раку, серцево-судинних захворювань, неврологічних і психіатричних розладів, а також служить радіопротектором. Крім того, застосування гесперидину показало потенційну користь для різних функцій шкіри, охоплюючи як нормальні, так і хворі стани шкіри.

Екстракція гесперидину включає важливий процес отримання цієї біологічно активної сполуки з рослинних матеріалів. Завдяки своїм корисним властивостям

гесперидин знаходить широке застосування в харчовій, косметичній і фармацевтичній промисловості. Щоб забезпечити високу якість і чистоту отриманої речовини, вирішальними є оптимальні процеси екстракції. Сучасні дослідження в цій галузі спрямовані на екологічно чисті методи екстракції флавоноїдів, включаючи гесперидин. Для вдосконалення процесу екстракції досліджувалися різні методики, такі як занурення, перколяція, кип'ятіння або безперервне кип'ятіння. Такі фактори, як вибір розчинника, температура, тривалість екстракції та співвідношення рідина-тверда речовина, відіграють ключову роль у визначенні якості екстракту та ефективності процедури екстракції

Гесперидин, відомий своєю великою кількістю в шкірці цитрусових, привернув увагу дослідників завдяки своїм численним корисним властивостям. Його потенційні переваги для здоров'я та різноманітне застосування в різних сферах привернули значну увагу. Завдяки цим перевагам гесперидин став центром інтенсивних досліджень, а методи екстракції представляють багатообіцяючу область досліджень.

Екстракція гесперидину з шкірки цитрусових є актуальною проблемою сучасної науки та промисловості, оскільки цей флавоноїд має численні корисні властивості, такі як антиоксидантні, протизапальні, антимуtagenні та протипухлинні. Цитрусові, включаючи мандарини, апельсини, лайми, лимони та грейпфрути, є багатими джерелами гесперидину. Використання їх шкіри як сировини для виділення цього компонента має велике значення для харчової, фармацевтичної та косметичної промисловості. Вирішення проблеми оптимізації методів екстракції та аналізу гесперидину сприятиме підвищенню економічної ефективності виробництва та покращенню якості кінцевої продукції. Це дасть змогу створювати нові продукти з високою біологічною активністю та широким спектром застосування.

Метою даного дослідження є розробка ефективного методу екстракції гесперидину з шкірки цитрусових плодів та проведення аналізу виділеного компонента за допомогою високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ).

Завдання дослідження:

роаналізувати існуючі методи екстракції гесперидину з шкірки цитрусових плодів.

цінити ефективність різних методів екстракції та їх вплив на характеристики гесперидину.

изначити оптимальне джерело виділення гесперидину серед цитрусових.

бґрунтувати отримані результати для покращення якості кінцевих продуктів у харчовій, фармацевтичній та косметичній промисловості.

Об'єктом дослідження є процес екстракції гесперидину з шкірки цитрусових плодів. Це явище визначає наукову проблему, яка полягає у розробці ефективних методів вилучення активної речовини.

Предметом дослідження є система властивостей та характеристик процесу екстракції гесперидину, включаючи параметри екстракції, методи аналізу та умови, що впливають на вихід і чистоту гесперидину. Дослідження охоплює вивчення ефективності різних методів екстракції та аналізу отриманого продукту.

Наукова новизна даного дослідження полягає в визначенні оптимального джерела виділення гесперидину з шкірки цитрусових плодів методом екстракції, що забезпечить високу чистоту та ефективність отриманого продукту. Також запропоновано застосування вискоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) для аналізу гесперидину, що дозволяє точно визначати його кількість та чистоту.

Практичне значення

Практичне значення даної роботи полягає в оптимізації методу виділення гесперидину зі шкірки цитрусових, а також дослідження гесперидину на антимікробну активність.

Апробація

Апробацію наукових результатів здійснено на наукових конференціях: VI Всеукраїнська науково-практична конференція «Стан і перспективи розвитку хімічної, харчової та парфумерно-косметичної галузей промисловості» (31 травня 2024 року, Хмельницький, Україна).

Публікації

Результати досліджень опубліковано у статті за матеріалами міжнародної конференції.

Бібліографія опублікованої роботи:

Василенко Є.Ю., Юнгін О.С., Василенко В.Ю. Застосування відходів цитрусових в харчовій промисловості. Стан і перспективи розвитку хімічної, харчової та парфумерно-косметичної галузей промисловості: Матеріали VI Всеукраїнської науково-практичної конференції. – Хмельницький, ХНТУ, 2024. – С.73.

Структура і обсяг

Кваліфікаційна робота складається зі вступу, 3 розділів, висновків, списку використаних джерел. Обсяг кваліфікаційної роботи складає **45 сторінок**.

РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

Загальна характеристика біологічно активних речовин в шкірці цитрусів

Фітохімічний і поживний аналізи показують, що шкірка цитрусових містить ряд функціональних сполук, включаючи флавоноїди, лімоноїди, ефірні олії та пектин, з потенційним застосуванням у медицині. В даний час близько 140 хімічних компонентів виділено і охарактеризовано з шкірки цитрусових. Серед них флавоноїди виділяються як видатна група біологічно активних сполук, що демонструють різноманітний спектр біологічних функцій [3].

Флавоноїди

Флавоноїди представляють собою клас природних сполук, що характеризуються поліфенольною структурою, широко поширених у фруктах і овочах, особливо в їх шкірці. Понад 60 різновидів флавоноїдів були виділені та ідентифіковані з цитрусових. Флавоноїди шкірки цитрусових зазвичай поділяють на дві основні групи: флаванонові глікозиди (включаючи флавонові С-глікозиди та флавонові О-глікозиди) і поліметоксифлавоїди (PMF).

Флаванонові глікозиди утворюються шляхом приєднання глікозидів до основного бензо-γ-піронового ($C_6-C_3-C_6$) скелета флавоноїдів, демонструючи протипухлинні, нейропротекторні та протизапальні властивості. Гесперидин, який міститься в шкірці цитрусових, належить до підгрупи флавонових О-глікозидів.

Fs, з іншого боку, є флавоїдами, що характеризуються двома або більше метоксигрупами в скелеті бензо-с-пірону (15-вуглецю, $C_6-C_3-C_6$) з карбонільною групою в положенні C_4 . PMFs мають менш полярну та відносно плоску структуру, сприяючи високій проникності через біологічні мембрани та легкому всмоктуванню в кровотік [4].

2 Гесперидин

Гесперидин, флаваноновий глікозид, містить аглікон гесперетин або метилериодіктіол разом із приєднаним дисахаридом рутинозою. Зокрема, гесперидин є α-7-рутинозидом гесперетину. Рутиноза, дисахаридний компонент рутинози або неогесперидози. Рутиноза, хімічно 6-О-(6-дезоксі-α-L-маннозил)-D-

глюкоза або О- α -L-рамнозил-(1 $\rightarrow$ 6) глюкоза, відрізняється від неогесперидози, хімічно О- α -L-рамнозил -(1 $\rightarrow$ 2) глюкоза, виключно в конфігурації двох блоків цукру.

Визначення положення цукрів у гесперидині передбачало частковий гідроліз розведеною кислотою, що призвело до утворення L-рамнози та гесперетин-7- α -D-глюкозиду, що розщеплюється ферментом α -D-глюкозидазою. Отже, у гесперидину глюкоза приєднана до гесперетину, тоді як рамноза приєднана до глюкози. Гесперетин (C₁₆H₁₄O₆), 3 α , 5, 7-тригідрокси-4 α -метоксифлаванон, перетворює гесперидин у 3 α , 5, 7-тригідрокси-4 α -метоксифлаванон-7-(6- α -L-рамнопіранозил- α -D-глюкопіранозид або -7-рутинозид.

При лужному гідролізі гесперидин дає флороглюцинол і гесперетенову кислоту. Кислотний гідроліз вивільняє по одній молекулі аглікону гесперетину, D-глюкози та L-рамнози. Гідроліз розведеною сірчаною кислотою або сірчаною кислотою в етиленгліколі дає оптично активну суміш (α)- і (β)-гесперетину, яку можна розділити шляхом фракційної перекристалізації. В умовах ретельно контрольованого кислотного гідролізу гесперидин дає оптично активний лівообертовий аглікон (β)-гесперетин, який після озонування виробляє L-яблучну кислоту, що вказує на конфігурацію 2S для (β)-гесперетину.

Структура дисахариду впливає на гіркоту сполуки, причому рутинозиди є несмачними, а неогесперидозиди інтенсивно гіркими. Гесперидин, будучи флавоноїдом рутинозидом, позбавлений гіркоти. У грейпфрутах переважно накопичуються гіркі неогесперидозиди, а в апельсинах і лимонах переважають негіркі рутинозиди [5].

Високі концентрації гесперидину, біофлавоноїду, містяться в цитрусових, що забезпечує численні переваги для здоров'я, такі як антиоксидантні, антибактеріальні, протимікробні, протизапальні та антиканцерогенні властивості. Харчова промисловість широко використовує цитрусові, особливо для виробництва соку, що призводить до накопичення значних побічних продуктів, таких як шкірка, насіння, залишки клітин і мембрани, які також служать багатим джерелом

гесперидину. Отже, виділення гесперидину з цих побічних продуктів викликало значний науковий інтерес для його використання як природних антиоксидантів [2].

3 Лімоноїди

Лімоноїди — це група природних тетрациклічних тритерпеноїдних сполук, які у великій кількості містяться в рослинах сімейств Meliaceae і Rutaceae. У цитрусових лімоноїди присутні як у формі аглікону, так і в формі глікозиду. Аглікони можна далі класифікувати на нейтральні ділактони, кислі монолактони та дикарбонові кислоти. У той час як більшість лімоноїдних агліконів є гіркими та нерозчинними у воді, лімоноїдні глікозиди зазвичай існують у вигляді 17-β-d-глюкопіранозидів, які менш гіркі та водорозчинні. Лімоноїди, отримані з шкірки цитрусових, демонструють різноманітну біологічну активність, включаючи антиоксидантні, антибактеріальні, антиангіогенні та протизапальні властивості. Незважаючи на те, що їх фармакологічна ефективність *in vivo* широко оцінюється за допомогою досліджень *in vitro*, їхню фармакологічну ефективність *in vivo* перешкоджає нестабільність і низька пероральна біодоступність [6].

4 Алкалоїди

Протягом тисячоліть сушена шкірка цитрусових слугувала в Китаї потужним засобом проти астми. Недавні дослідження показали значні протиастматичні властивості алкалоїдної фракції цих пілінгів. Серед основних алкалоїдних компонентів виділяються синефрин і N-метилтирамін. Синефрин, якого особливо багато в сушеній шкірці цитрусових (0,3829%), виявляє судинозвужувальну дію, підвищує артеріальний тиск, розширює трахею і потенційно прискорює метаболізм і споживання калорій [7].

Біологічна активність

Передбачається, що різноманітні біологічно активні сполуки, знайдені в шкірці цитрусових, принесуть численні переваги для здоров'я. Дійсно, нещодавні фармакологічні дослідження підкреслили позитивний вплив екстрактів шкірки цитрусових на метаболічні розлади та не тільки.

2.1 Антиоксидантна активність

Цедра цитрусових містить велику кількість природних антиоксидантів, включаючи гесперидин, нарірутин, нобілетин, тангеритин і аскорбінову кислоту, демонструючи багатообіцяючий антиоксидантний потенціал. Було виявлено, що флавоноїди, які є переважаючими сполуками в шкірці цитрусових, мають різний ступінь антиоксидантної здатності. Дослідники окреслили три основні механізми, за допомогою яких флавоноїди проявляють свою антиоксидантну дію: (1) антирадикальна активність, (2) активність проти перекисного окислення жиру та (3) активність хелатування металів. Примітно, що шкірка цитрусових демонструє вищу антиоксидантну здатність, ніж м'якоть, завдяки підвищеному вмісту флавоноїдів, вітаміну С і каротиноїдів. Для оцінки *in vitro* антиоксидантної активності шкірки цитрусових використовувалися різні хімічні аналізи, такі як антиоксидантна здатність, що знижує залізо (FRAP), здатність поглинати кисневі радикали (ORAC) і 2,2-дифеніл-1-пікрилгідразил (DPPH). пульпа [10].

2.2 Протизапальна активність

Запалення, біологічна реакція, викликана впливом інфекції, травми або подразнення, тісно пов'язана з різними захворюваннями, включаючи артрит, атеросклероз і рак. Циклооксигеназа (COX) — це фермент, який каталізує вироблення простагландинів, таких як простагландин E2 (PGE2) і циклооксигеназа-, тоді як індукцибельна синтаза оксиду азоту (iNOS) генерує неконтрольований оксид азоту (NO). І PGE 2, і NO є основними прозапальними медіаторами. Шкірки цитрусових демонструють сильні протизапальні властивості, пригнічуючи експресію генів і ферментів, пов'язаних із запаленням.

Отже, результати *in vitro* збігаються з тими, що спостерігаються *in vivo*, що свідчить про те, що екстракти шкірки цитрусових є перспективними потенційними кандидатами для розробки нових протизапальних ліків або продуктів здорового харчування [11].

2.3 Протиракова активність

Рак є відомим захворюванням, яке становить значну загрозу для добробуту людини, охоплюючи понад 100 типів, що характеризуються неконтрольованою

аномальною клітинною проліферацією з метастатичними ознаками. Було підтверджено, що біологічно активні компоненти, знайдені в шкірці цитрусових, виявляють помітний інгібуючий вплив на ріст пухлини. Протипухлинну ефективність ефірної олії апельсинової шкірки Gannan Newhall було оцінено за допомогою аналізу МТТ, що виявило його здатність перешкоджати проліферації лінії клітин раку легенів людини A549 і лінії клітин раку простати 22RV-1. Крім того, численні дослідження *in vitro* підкреслили стійкі антипроліферативні ефекти поліметоксифлавонів (PMF) шкірки цитрусових проти ракових клітин і антиген-активованих Т-лімфоцитів. Протиракові механізми, пов'язані з PMFs, включають втручання в каскад метастазів, пригнічення рухливості ракових клітин у системі кровообігу, сприяння апоптозу та інгібування ангіогенезу. Наприклад, нобілетин продемонстрував потенціал у лікуванні раку, перешкоджаючи прогресуванню клітинного циклу в лініях клітин раку молочної залози G1 MDA-MB-435 і MCF-7, а також лінії клітин раку товстої кишки людини HT-29 [12].

2.4 Регуляція метаболічних порушень

Метаболічний синдром охоплює кластер клінічних проявів, включаючи ожиріння, гіперглікемію, артеріальну гіпертензію та дисліпідемію. Поширеність метаболічного синдрому може прискорити появу та прогресування ішемічної хвороби серця та інших серцево-судинних захворювань. Екстракти шкірки цитрусових продемонстрували помітний вплив на модуляцію метаболізму ліпідів і глюкози, тим самим полегшуючи метаболічні розлади [1].

Методи екстракції

3.1 Надкритична екстракція CO₂ (SC-CO₂)

Надкритичний CO₂ є популярним методом, який використовується для вилучення багатьох біоактивних сполук, оскільки це чистий метод і вважається екологічно чистим, оскільки CO₂ є природним газом. Застосування екстракції надкритичним CO₂ дозволяє уникнути термічної деструкції та розкладання лабільних сполук завдяки тому, що робота ведеться при низькій температурі, а відсутність світла та кисню запобігає реакціям окислення. На ефективність методу

екстракції SC-CO₂ впливають численні фактори, включаючи температуру, тиск, надкритичний потік CO₂, наявність співрозчинника та час екстракції [13].

3.2 Екстракція рідини під тиском (PFE)

Рідинна екстракція під тиском (PFE) є широко використовуваною технікою для екстракції флавоноїдів. Як правило, застосування підвищеної температури та тиску прискорює швидкість екстракції та посилює дифузію розчинника в біологічну матрицю. Це явище можна пояснити частковим заповненням повітряних проміжків у рослинних тканинах рідиною під час екстракції PFE. Після подальшого скидання тиску повітря, захоплене порами, виходить назовні, викликаючи руйнування клітинних мембран рослин. Крім того, PFE може індукувати депротонування заряджених груп і руйнувати сольові містки та гідрофобні зв'язки, що призводить до конформаційних змін і денатурації білка. Отже, клітинні мембрани стають менш селективними, сприяючи більшій доступності сполук для екстракції, доки не буде досягнуто рівноваги. Порівняно з традиційною екстракцією розчинником, PFE використовує менше розчинника та мінімізує окисне розкладання флавоноїдів, оскільки працює без кисню та світла [14].

3.3 Прискорена екстракція розчинником (ASE)

Прискорена екстракція розчинником (ASE) працює в діапазоні температур від 50 до 200 °C і діапазоні тиску від 10 до 15 МПа, підтримуючи розчинник у рідкому стані нижче його критичної точки. Як правило, в ASE використовуються органічні розчинники. Цей метод нагадує традиційну екстракцію розчинником, але прискорюється за рахунок використання підвищених температур і тиску. ASE сприяє швидкій екстракції з використанням мінімального об'єму розчинника, хоча підвищені температури екстракції можуть призвести до деградації термолабільних сполук. Вплив ключових експлуатаційних параметрів докладніше описано нижче

3.4 Субкритичний відбір води (SWE)

Підкритична водна екстракція передбачає використання гарячої води, яка підтримується при температурах від 100 до 374 °C під високим тиском, щоб підтримувати її в рідкому стані (критична точка води становить 22,4 МПа і 374 °C).

При таких високих температурах ефективна полярність води зменшується, що дозволяє їй функціонувати як розчинник як для полярних, так і для неполярних сполук. Підкритична вода виявляється перспективним середовищем для вилучення всіх флавоноїдів, включаючи неполярні цитрусові флаванони.

Підвищення температури екстракції від 100 до 160 °C під тиском 10 МПа протягом 10 хвилин призвело до більш високих концентрацій гесперидину та наріутину, вилучених зі шкірки цитрусових unshiu. Однак вище 160°C спостерігалось зниження вмісту гесперидину та наріутину. Цю тенденцію можна пояснити втратою та розкладанням цитрусових флаванонів unshiu через вплив високих температур [16].

3.5 Ультразвукова екстракція (ОАЕ)

Ультразвукова екстракція являє собою сучасну технологію, яка використовується для вилучення натуральних продуктів, що раніше потребувало багатьох годин звичайними методами. Завдяки ультразвуковій допомозі тепер можна досягти повної екстракції за лічені хвилини, завдяки високій відтворюваності, спрощеному поводженню та вищій чистоті кінцевого продукту. Ультразвукові хвилі взаємодіють з відкритим рослинним матеріалом, викликаючи зміни в його фізичних і хімічних властивостях. Цей процес створює ефект кавітації, який полегшує вивільнення екстрагованих сполук і посилює масообмін шляхом руйнування стінок клітин рослин. Крім розчинника та температури, оптимізація параметрів застосування ультразвуку, включаючи частоту, потужність і тривалість обробки ультразвуком, а також розподіл ультразвукових хвиль, може призвести до покращеного відновлення вмісту клітин [17].

3.6 Мікрохвильова екстракція (МАЕ)

Мікрохвильова екстракція використовує мікрохвильову енергію для прискорення процесу екстракції. Мікрохвильове опромінення прискорює розрив клітин, що призводить до швидкого підвищення температури та внутрішнього тиску в клітинних стінках рослин або фруктів. Під час мікрохвильової обробки відбувається руйнування слабких водневих зв'язків під дією тепла, що сприяє обертальному руху дипольних молекул. Цей процес створює значний тиск

усередині біоматеріалу, змінюючи фізичні властивості біологічних тканин і збільшуючи пористість біологічної матриці. Отже, відбувається покращене проникнення екстракційного розчинника в усю матрицю, полегшуючи вилучення фенольних сполук. Ключові робочі параметри мікрохвильової екстракції (MAE) включають тип розчинника, мікрохвильову потужність і тривалість MAE [18].

3.7 Ферментативна екстракція (EAE)

Феноли часто зв'язуються з полісахаридами, невід'ємними компонентами клітинних стінок рослин. Щоб покращити екстракцію фітохімікатів, можна ввести екзогенні ферменти. Механізм ферментативної екстракції передбачає використання ферментів, що руйнують клітинну стінку, таких як глюканази та пектинази. Ці ферменти функціонують для послаблення або руйнування клітинної стінки, тим самим покращуючи доступність внутрішньоклітинних матеріалів для екстракції

3.8 Порівняльне дослідження методів екстракції

Порівняльний аналіз методів екстракції показує, що технології із застосуванням прискорювачів, таких як UAE, ННР, MAE, SWE та SC-CO₂, дають вищу ефективність екстракції порівняно з традиційним методом CSE. CSE відомий своєю довгою тривалістю екстракції, значним використанням розчинника, необхідністю випаровування розчинника та розкладання термолабільних сполук через підвищені температури. Однак такі методи, як ННР, SWE та ASE, також можуть піддавати зразки тривалому впливу високих температур або тиску, що негативно впливає на стабільність фенольних сполук.

Прискорена екстракція розчинником (ASE) є потенційною альтернативою для вилучення полярних сполук. ASE може похвалитися значним скороченням використання розчинника та часу екстракції порівняно з CSE. SC-CO₂, будучи більш екологічно стійким процесом, уникає органічних розчинників і забезпечує точний контроль параметрів тиску та температури.

MAE привертає увагу своїм скороченим часом екстракції, зменшеним споживанням розчинника та підвищеним виходом екстракції. Тим не менш,

ефективність МАЕ може бути знижена, особливо якщо використовуються неполярні або летючі розчинники.

Хоча ферментативна екстракція може не досягти такого ж рівня відновлення, як екстракція розчинником, вона має такі переваги, як використання води замість органічних розчинників.

Інтегровані підходи, такі як використання PFE перед стисненням і екстракцією, демонструють багатообіцяючий потенціал для вилучення цінних сполук із м'яких рослинних матеріалів. Технологія PEF характеризується нетермічною обробкою, низьким споживанням енергії та здатністю переробляти великі обсяги продукції [19].

1.4. Актуальність антиоксидантів природного походження

Зростаюча кількість патогенів, стійких до ліків, підкреслює нагальну потребу в ідентифікації та виділенні нових біологічно активних сполук з лікарських рослин за допомогою стандартизованих сучасних аналітичних процедур. Сполуки, отримані з лікарських рослин, пропонують багатообіцяючі способи боротьби з патогенними бактеріями.

Масове, невідповідне, нерегулярне та невибіркове застосування антибіотиків призвело до появи антимікробної резистентності, що зробило багато сучасних ліків неефективними. Ця нова тенденція викликає занепокоєння, і ВООЗ вважає її чи не найактуальнішою проблемою, яка стоїть перед медичною наукою. Отже, зростає попит на розробку нових протимікробних засобів, здатних зменшити використання антибіотиків і боротися з розвитком резистентності. Це спонукало дослідників виділяти та ідентифікувати нові біологічно активні хімічні речовини з рослин для протидії стійкості мікробів, враховуючи, що приблизно 50% сучасних фармацевтичних препаратів і нутрицевтиків є натуральними продуктами та їх похідними. Лікарські рослини є майже необмеженим джерелом біологічно активних сполук, і їх потенціал як антимікробних агентів досліджувався різними способами. Проте ці сполуки ще повністю не досліджені [20].

5. Природні антимікробні речовини

Природні антимікробні агенти можуть діяти незалежно або в поєднанні з антибіотиками для посилення антимікробної активності проти широкого спектру мікробів. Оскільки антимікробні властивості багатьох лікарських рослин залишаються невивченими, дослідники все більше зосереджуються на швидкому відкритті нових ефективних методів лікування.

Фрукти є природним багатим джерелом фітохімічних речовин, які використовуються як для споживання, так і як природні протимікробні засоби. Певні фітохімічні речовини або хімічні сполуки у фруктових екстрактах відіграють важливу роль у захисті плодів від комах і мікробів, а також від стресових умов, таких як ультрафіолетове світло та екстремальні температури. Фруктові фітохімічні речовини широко використовуються через їх медичну цінність і являють собою суміші кількох компонентів, які можна класифікувати у великі групи відповідно до їхньої хімічної структури, таких як органічні кислоти, терпени та поліфеноли.

Фітохімічні речовини фруктових екстрактів відомі своєю антиоксидантною та антибактеріальною активністю. Різноманітні фрукти привернули велику увагу завдяки своїй антибактеріальній ефективності, оскільки вони вважаються безпечними для споживання людиною. Екстракти ягід були найбільш вивчені щодо їх пригнічувальної дії проти патогенних бактерій. Зокрема, журавлина та чорниця містять конденсовані дубильні речовини (проантоціанідини), які можуть запобігти симптоматичним інфекціям сечовивідних шляхів, викликаним уропатогенними штамами кишкової палички, майже в 95% випадків. Фенольні сполуки, які містяться в ягодах і зазвичай споживаються в Європі, ефективні проти кишкової палички, яка є основною причиною діареї та викликає позакишкові інфекції. Крім того, було показано, що фенольні сполуки активні проти кишкових патогенів, таких як *Salmonella* та *Campylobacter*. Антимікробні агенти, отримані з фруктів, відомі як вторинні метаболіти, відіграють важливу роль не тільки в інгібуванні патогенів, але й у профілактиці хронічних захворювань. Повідомлялося, що такі фрукти, як виноград, ягоди, гранати та яблука, запобігають серцево-судинним захворюванням, хворобі Альцгеймера, раку, запаленням, старінню, вірусним інфекціям, алергії та

пошкодженню шкіри, включаючи канцерогенез шкіри. Більшість їх користі для здоров'я пояснюється високою антиоксидантною активністю. На сьогодні багато фітохімічних речовин з різними механізмами дії ідентифіковано як антибактеріальні сполуки. Кілька досліджень показали, що фітохімічні речовини взаємодіють із патогенними бактеріями та діють синергічно проти них за допомогою різних механізмів дії; однак точні механізми дії залишаються невідомими [21].

6. Застосування відходів цитрусових в харчовій промисловості

Різноманітні дослідження показали, що шкірка цитрусових містить ефірні олії, які можна використовувати для багатьох цілей у промисловості консервування, безпеки харчових продуктів і харчових добавок. У різних дослідженнях були створені тонкі плівки на основі ефірної олії (ЕО), мікрокапсуляція з використанням наноемульсійних покриттів, біорозкладаних полімерів, розпилення та механізм антибактеріальної дії активних хімічних речовин, присутніх в ЕО. Косметика, фармацевтика, харчові рецептури та упаковка – це лише деякі галузі, які використовують цитрусові ефірні олії (СЕО). Виконавчі директори широко використовуються в сферах безпеки харчових продуктів, пакування та зберігання

6.1 Харчові плівки та покриття на основі полісахаридів, що містять ефірну олію

Харчова промисловість стикається з серйозною проблемою у вигляді відходів, якими необхідно управляти та використовувати для багатьох цілей. Більшість підприємств харчової промисловості та харчових дослідників використовують ці харчові відходи як покриття для захисту харчових продуктів від різних факторів навколишнього середовища. Таким чином, харчові покриття та плівки привернули широкий інтерес завдяки своїм чудовим смаковим якостям та здатності до біологічного розкладання, а також здатності зберігати свіжість їжі під час зберігання. В останнє десятиліття полісахариди досліджувалися як життєздатний матеріал для їстівних плівок. Застосування, пов'язані з мікробіологічною безпекою харчових продуктів, показали, що ці полімерні

матеріали мають величезний невикористаний потенціал. У дослідженні ефірні олії (ЕО) змішували з полісахаридними матрицями для подальшого покращення функціональних якостей їстівних плівок. В іншому дослідженні холодну полуницю покривали хітозаном і ефірною олією лимона і зберігали при 5 °С. Покриття хітозаном не виявило суттєвого впливу на кислотність, рН та вміст розчинних сухих речовин у полуниці протягом усього періоду зберігання. У харчовій промисловості лимонну цедру ЕО цитрусових можна використовувати як природний антибактеріальний та антиоксидантний засіб. ЕО лимонної шкірки мають антибактеріальну ефективність проти кількох хвороб харчового походження [23].

6.2 Використання концентрату клітковини в хлібобулочних виробх

Дослідники провели дослідження щодо додавання цитрусових волокон до мафінів. Багатий на клітковину апельсиновий багасовий продукт (DFROBP) збільшив вміст клітковини в експериментальних мафінах на 40 і 63% порівняно з контрольним мафіном. Частково замінивши пшеничне борошно DFROBP, вдалося створити хлібобулочні вироби з високим рівнем загального вмісту харчових волокон і високою неперетравлюваною фракцією, дієтичними властивостями, які можуть бути корисними людям з різними харчовими потребами [24].

6.3 Використання цитрусового пектину в молочних напоях

Цитрусовий пектин, полісахарид, що міститься в клітинних стінках рослин, в основному використовується в харчовій промисловості як стабілізатор, загусник і гелеутворювач. Пектин можна отримати з шкірки різних фруктів і їх відходів; використовується в харчовій промисловості і добувається з шкірки цитрусових і яблучних вичавок. Пектин зазвичай використовується як стабілізатор підкислених молочних напоїв і йогуртів. Кисломолочні напої дуже популярні завдяки своєму натуральному смаку і високій харчовій цінності. Багато досліджень показали, що флокуляція білка і відділення сироватки в підкислених молочних напоях відбувається через відсутність стабілізатора. Крім того, цитрусовий пектин може бути доданий як захисний колоїд, щоб зупинити цю поведінку та стабілізувати молочні напої [25].

6.4 Використання ефірних олій (ЕО) для безпеки харчових продуктів

Протягом дуже тривалого часу ЕО використовувалися в харчовій промисловості для переробки та консервації для багатьох цілей. Останнім часом дослідники та науковці зосередилися на антибактеріальній харчовій упаковці, їстівних тонких плівках, ефективних антибактеріальних плівках, наноемульсіях для консервування фруктів та овочів, компонентах содового/цитрусового концентрату, ароматизаторах для коли, безалкогольних напоїв та консервації м'яса, риби, молюсків. ЕО більш складні, ніж інші типи олій, оскільки вони містять різноманітні природні біоактивні хімічні речовини, які часто використовуються в харчовій промисловості як кращі замінники. Антиоксидантні, антибактеріальні та протигрибкові властивості ЕО вивчалися в багатьох наукових роботах. ЕО, отримані з олії чайного дерева, олії кориці, кунжутної олії, олії гвоздики, лимонної олії, олії чіа та олії чебрецю, є лише кількома прикладами олій, які мають значно підвищену антиоксидантну та антибактеріальну активність, а також збільшений термін зберігання зерна та покращене харчування безпека Ключові групи ОР, такі як терпени та ароматичні леткі сполуки, сприяють безпеці харчових продуктів без шкоди для якості. Завдяки різним діям, включаючи антибактеріальну та антиоксидантну здатність, ЕО можуть замінити деякі хімічні консерванти, подовжуючи свіжість харчових продуктів, у тому числі круп та овочів [26].

7. Використання цитрусових субпродуктів

Оскільки ринок і попит на функціональні харчові продукти зростають, використання субпродуктів цитрусових як сховище функціональних сполук у харчовій промисловості є перспективним. Велика кількість поліфенолів, антиоксидантів і харчових волокон дозволяє використовувати відходи цитрусових для розробки корисних продуктів. Різні способи використання екстрагованих біологічно активних сполук включають інкапсуляцію, збагачення/додавання екстрактів або порошоків або використання висушених порошкоподібних побічних продуктів для заміни деяких інгредієнтів у харчових продуктах. На додаток до них,

комерційні пребіотики також були екстраговані шляхом ферментативного гідролізу полісахаридів у харчових волокнах фруктів і овочів.

Збагачення - це процес додавання мікроелементів до харчових продуктів для підвищення їх харчової цінності. Збагачення є найпоширенішим методом утилізації субпродуктів цитрусових. Екстраговані побічні продукти (у формі порошку чи екстракту) або порошкоподібні побічні продукти додають до харчових продуктів для підвищення нутрицевтичного потенціалу кінцевого продукту. Збагачення Болоньєзе цитрусовими волокнами забезпечило ковбасі високий вміст клітковини та нижчий рівень нітратів, таким чином зменшивши ризик нітрозамінів у м'ясі. Печиво з додаванням 10% цедри цитрусових завдяки низькому вмісту вуглеводів може бути використане для виробництва поживних функціональних продуктів для хворих на діабет, а 10% мандаринове печиво може використовуватися в раціоні людей з ожирінням через низьку калорійність. Додавання знегірчених вичавок кіноа до пасти призвело до отримання пасти, багатой на поживні речовини та антиоксидантні властивості. Цитрусові олії можна використовувати для збагачення оливкових олій для покращення сенсорного профілю та функціональних властивостей оливкових олій. Оливкова олія, що містить цитрусові олії, продемонструвала «захисну дію на рівень глюкози та ліпідів у сироватці крові, метаболічну активність адипоцитів, функціональність тканин міокарда, маркери окислювального стресу та функцію ендотелію на рівні кровоносних судин» [27].

Мікро/нанокапсуляція — це процес, у якому ефективність активних інгредієнтів зберігається шляхом інкапсуляції їх у полімерну оболонку. Інкапсулюючі матеріали повинні бути рекомендовані як безпечні для використання в харчових продуктах. Функціональність, інкапсульована концентрація, стабільність і цільове вивільнення є важливими факторами, які слід враховувати. Полісахариди, білки та ліпіди є звичайними матеріалами, тоді як емульгування, розпилювальна та сублімаційна сушка, екструзія та коацервація зазвичай використовуються для інкапсуляції. При нанокапсуляції біологічно активні речовини покриваються наноматеріалами, натомість при мікрокапсуляції беруть участь більші частинки. У процесі мікрокапсулювання готують емульсію з'єднання,

яке потрібно інкапсулювати, і полімерного матеріалу. Інкапсуляція може здійснюватися шляхом розпилювальної сушки, відцентрової екструзії, нанесення покриття на чашку тощо. Мікрокапсулювання біоактивних сполук здійснюється для підвищення їх стабільності та розчинності, а також для запобігання деградації під впливом зовнішніх факторів. У харчовій промисловості ароматизатори мають широкий спектр застосування, але деякі ароматизатори дуже леткі та чутливі до умов навколишнього середовища. При переробці втрачається близько 90% летких ароматизаторів, що призводить до погіршення якості кінцевої продукції. Таким чином, мікрокапсуляція аромату здійснюється таким чином, щоб гарантувати, що аромат виділяється лише за певних параметрів. Полісахариди та білки є широко використовуваними основними матеріалами для інкапсуляції біологічно активних сполук (особливо ароматизаторів). Завдяки своїй здатності до біологічного розкладання та економічній природі ці сполуки широко використовуються в харчовій та нутрицевтичній промисловості. Під час мікрокапсулювання β -каротину було виявлено, що тип використовуваної олії та довжина ланцюга жирної кислоти впливають на утворення мікроемульсій. Інкапсульовані молекули β -каротину були стійкі до розкладання, а мікроемульсії показали мінімальну токсичність при низьких концентраціях. Екстракти цитрусових можна використовувати для приготування поживних страв і напоїв. Функціональні харчові продукти, приготовані шляхом коацервації мікрокапсульованих екстрактів апельсинової кірки та зеленого чаю, мали більший вміст поліфенолів. Цитрусовий пектин, модифікований ультразвуковою обробкою та мікропсевдофлюїдифікацією (окремо та в комбінації), показав вищу стабільність емульсії та кращі властивості інкапсуляції для захисту вітаміну D₃ від УФ-деградації.

Нанокapсуляцію також називають біоактивною упаковкою в нанорозмірі. Завдяки меншому розміру частинок нанокapсуляція використовується для кращої доставки частинок до будь-якої частини тіла та має потенціал для забезпечення точного націлювання та контрольованого вивільнення функціональних компонентів порівняно з мікрокапсуляцією. Можна зробити висновок, що біоактивні сполуки, витягнуті з побічних продуктів переробки цитрусових, мають

величезний потенціал для використання як функціональних інгредієнтів у різних харчових системах [28].

8. Тривале зберігання різних продуктів харчування з використанням цитрусових як антимікробного засобу

За допомогою цитрусових як протимікробного засобу можна забезпечити тривале зберігання різних харчових продуктів. Розвиток бактерій і окислення ліпідів є основними факторами, що призводять до погіршення якості та скорочення терміну придатності продуктів. Для запобігання цьому часто використовуються хімічні добавки, але споживачі все більше усвідомлюють їхні недоліки. Тому природні антимікробні сполуки сьогодні отримують велику увагу.

Для забезпечення тривалого зберігання продуктів можна використовувати цитрусові, які містять антимікробні та антиоксидантні речовини. Екстракти цитрусових багаті біофітохімічними речовинами, такими як флавоноїди, фенольні кислоти та монотерпенові вуглеводні, які відомі своєю антимікробною дією. Дослідження показали, що екстракти цитрусових можуть пригнічувати ріст бактерій, таких як *Salmonella typhi*, *Bacillus cereus* і *Staphylococcus aureus*, що робить їх ефективними для збереження харчових продуктів.

Біофітохімікати з цитрусових можна додавати безпосередньо до їжі або включати в систему пакування, наприклад, через їстівні плівки та покриття, які містять природні антимікробні агенти. Такий підхід дає змогу забезпечити тривале зберігання продукції та запобігти розвитку патогенних мікроорганізмів, уникаючи при цьому використання синтетичних консервантів [29].

Висновки до розділу 1

На основі аналізу літературних джерел можна зробити висновок, що гесперидин є важливим біологічно активним компонентом шкірки цитрусових плодів з високим потенціалом для використання у різних галузях промисловості, зокрема в харчовій, фармацевтичній та косметичній. Існуючі методи екстракції гесперидину мають свої обмеження щодо ефективності та чистоти отриманого

продукту, що вказує на необхідність подальших досліджень та розробки нових методик. Оптимізація процесу екстракції та вдосконалення методів аналізу гесперидину є актуальними завданнями, вирішення яких сприятиме підвищенню економічної ефективності та якості кінцевих продуктів. Розробка нових методів екстракції гесперидину з шкірки цитрусових плодів та їх адаптація для промислового використання відкриває нові можливості для підвищення цінності вторинної сировини та зменшення екологічного навантаження.

Виходячи з аналізу літературних джерел, можна зробити висновок, що оптимальним методом екстракції гесперидину визнано метод Сокслета, який забезпечує високу ефективність вилучення цього флавоноїду зі шкірки цитрусових плодів. Оптимальні умови для проведення екстракції включають використання петролейного ефіру як розчинника та температурний режим в межах 50-60°C, що сприяє максимальному виходу та чистоті отриманого гесперидину.

РОЗДІЛ 2 ОБ'ЄКТ, МЕТА ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Мета цього дослідження полягала в тому, щоб вивчити та вдосконалити методи, які використовуються для вилучення гесперидину з цитрусових. Протягом фази експериментів ми ретельно досліджували екстракти, отримані з різних цитрусових, включаючи мандарини, апельсини, лайми, лимони та грейпфрути. Необхідно було точно визначити цитрусові, які дають найвищу концентрацію чистого гесперидину, щоб точно налаштувати процес екстракції для досягнення оптимальної ефективності.

Об'єктом дослідження є процес екстракції гесперидину з шкірки цитрусових плодів. Цей процес включає в себе ряд фізико-хімічних і технологічних аспектів, які можуть впливати на вихід і чистоту гесперидину.

Методу екстракції гесперидину з цитрусових

Екстракції гесперидину із шкірки цитрусових плодів методом екстракції на апараті Сокслета включає підготовку обладнання, підготовку сировини, технологічний процес, отримання чистого ізольованого гесперидину та його кількісний та якісний аналіз.

Цитрусові, такі як мандарини, апельсини, лайми, лимони, грейпфрути були придбані в мережі магазинів © MAXIMA LT. Потім шкірку відокремлювали від м'якоті та сушили при 50°C протягом 2 годин у сушильній шафі, як показано на рис. 1, і нарізали на дрібні шматочки.



Рис. 2.1 Сушильна шафа з відокремленою шкіркою

Петролейний ефір (40 – 60°C) об'ємом 750 мл наливали у 1000 мл круглодонну колбу з якорем для магнітної мішалки. В колбу додавали 20 г висушеної та розмеленої шкірки апельсина, яку поміщали у рукав для екстракції апарату. Зворотний холодильник поміщали на виході з апарату Сокслета і нагрівали при перемішуванні протягом 4 годин, як це показано на рис. 2.2.



Рис. 2.2 Апарат Сокслета зі зразками

Екстракт петролейного ефіру утилізували. Для видалення адсорбованого петролейного ефіру, вміст рукава для екстракції поміщали у просторий кристалізатор. Після цього вміст знову перекладали у рукав для екстракції та екстрагували 150 мл метанолу, поки розчинник, що виходив з рукава, не став безбарвним (1 - 2 години).

Отриманий екстракт випарювали на роторному випарнику до досягнення консистенції сиропу як показано на рис. 2.3.



Рис. 2.3 Роторний випарник з екстрактом

Залишок змішували з 10 мл 6% оцтової кислоти, в результаті чого випадав осад, що представляв неочищений гесперидин. Його відфільтровували на вирві Бюхнера, промивали 6% оцтовою кислотою і сушили при 60°C до постійної маси, отримуючи таким чином чистий гесперидин.

Кількісне визначення гесперидину, виділеного з шкірок цитрусових, проводили методом високоефективної рідинної хроматографії на аналітичній колонці C18 (250*4,6), в якості рухомої фази використовували суміш метанол: 0,1% ортофосфорна кислота у співвідношенні 50:50. Швидкість потоку становила 1,0 мл/хв. Температура колонки 40°C. Сигнал реєстрували на довжині хвилі 284 нм, що відповідає максимуму поглинання більшості природних фенольних і поліфенольних сполук. Об'єм ін'єкції 50 мкл.

Аналіз антимікробної активності

Для оцінки антимікробної активності рослинних екстрактів використовували аналіз дифузії в агарі. Для цієї мети чашки з поживним агаром (NA), що є універсальним середовищем для культивування мікроорганізмів. Нічну культуру

штаму *E.coli* K12 доводили стерильним фізіологічним розчином до значення мутності 1 за стандартом МакФарланда, що відповідає $3,0 \times 10^8$. Суспензію наносили на агаризовану поверхню за допомогою стерильного тампона. Після інокуляції використовували стерильні наконечники піпеток для створення лунок в агарі. У кожну лунку додавали 50 μ l розчину гесперидину, отриманого з цитрусових екстрактів, в концентрації 200 мкг/мл, що є найвищою концентрацією, що не є токсичною. Контрольні лунки заповнювали дистильованою водою. Чашки інкубували за температури 37°C протягом 24-48 годин. Після інкубації вимірювали зони інгібування навколо лунок (за наявності). Дослідження проводили в 3 повторюваностях.

Висновки до розділу 2

У розділі 2 дослідження мав на меті вивчити та вдосконалити методи екстракції гесперидину з цитрусових. Ми провели дослідження екстрактів з різних цитрусових плодів та оптимізували процес екстракції для отримання найкращих результатів. Використовуючи методи експериментального дизайну та аналізу, ми визначили, що метод екстракції на апараті Сокслета є ефективним.

РОЗДІЛ 3 ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

3.1 Екстракція гесперидину зі зразків цитрусових методом ВЕРХ

Стандартизація методики екстракції гесперидину з цитрусових відіграє ключову роль у забезпеченні якості та ефективності кінцевого продукту. У цьому дослідженні екстракти стандартизували за кількісним вмістом гесперидину. Розглянута в роботі методика, включає екстракцію з використанням вискоєфективної рідинної хроматографії (ВЕРХ), які дозволяють кількісно визначити активні компоненти та забезпечити стабільність і терапевтичну активність екстракту.

Процес стандартизації екстракції включає розробку та застосування методик, що дозволяють максимально ефективно виділяти гесперидин та інші активні компоненти з використанням сучасних аналітичних інструментів, таких як ВЕРХ. Це необхідно для того, щоб основні хімічні компоненти екстракту перебували у певному резонансі, забезпечуючи стабільність та терапевтичну активність екстракту.

Застосування стандартизованої методики екстракції та кількісного аналізу гесперидину дозволило отримати екстракти з високою стабільністю та відтворюваністю. Оптимізація умов екстракції та використання ВЕРХ допомогли значно підвищити вихід гесперидину та забезпечити його високу концентрацію в кінцевому продукті.

Таким чином, стандартизація методики екстракції гесперидину з цитрусових з використанням ВЕРХ є необхідним кроком для забезпечення якості та ефективності кінцевого продукту.

У цьому дослідженні була реалізована ретельно розроблена процедура екстракції для виділення біологічно активних сполук із різних цитрусових, включаючи мандарини, апельсини, лайми, лимони та грейпфрути. Методика вилучення була виконана з високою точністю, забезпечуючи методологічну послідовність і відтворюваність результатів, які є критичними для наукової цілісності.

У рамках цього дослідження, спрямованого на оптимізацію процесу екстракції гесперидину з цитрусових, було проведено ряд експериментів. Для оцінки кількісного вмісту цього флавоноїду в різних цитрусових фруктах був обраний традиційний метод екстракції – екстракція Сокслета. Метод екстракції Сокслета характеризується безперервною екстракцією твердих речовин розчинником при підвищених температурах, що особливо важливо, коли цільова сполука має обмежену розчинність, а домішки менш розчинні.

Після фази екстракції отримані екстракти піддавали комплексному аналізу за допомогою високоефективної рідинної хроматографії. Цей аналітичний метод, відомий своєю високою чутливістю та специфічністю, полегшив ідентифікацію та кількісне визначення широкого спектру сполук в екстрактах цитрусових, допомагаючи визначити їхній хімічний склад.

Було проаналізовано зразки різних цитрусових як джерела отримання гесперидину методом екстракції (Табл.3.1).

Таблиця 3.1. – Кількісні результати гесперидину в зразку

Тип цитрусових	Площа піку	Вміст гесперидину, мг	Відсоток вмісту гесперидину в 20 г, %
Грейпфрут	15214357	4.63	0.023
Апельсин	9973344	3.04	0.015
Мандарин	8723269	2.66	0.013
Лимон	5931621	1.81	0.009
Лайм	1883510	0.57	0.003

При більш детальному розгляді аналітичних даних, представлених у табл. 3.1, а також більш чітко на рис. 3.1, можна побачити чітку тенденцію, що шкірка грейпфрута містить найвищу концентрацію гесперидину, що дуже близько до стандартного зразка гесперидину, тоді як шкірка лайма містить найменшу кількість цього флавоноїду.



Рис. 3.1 Порівняння кількості гесперидину в зразках цитрусових

Так, екстракт апельсина містить помітну концентрацію гесперидину в 3,04 мг, що становить 0,015% від загального об'єму зразка в 20 мг. Зразок хроматограми показано на рис. 3.2.

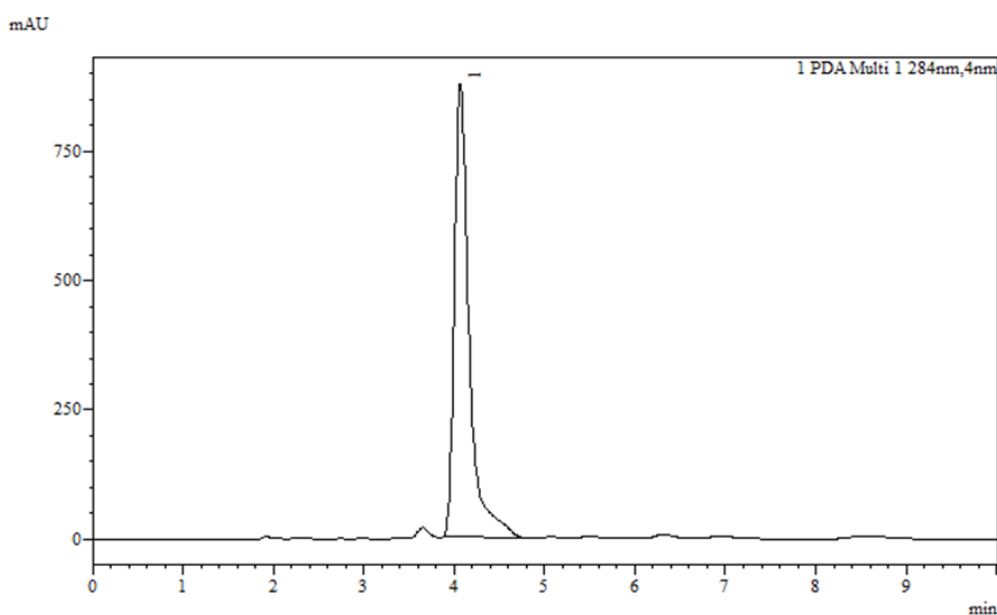


Рис. 3.2 Хроматограма екстракту апельсинової цедри.

Екстракт мандарина також характеризується значним вмістом гесперидину – 2,66 мг, що становить 0,013% від загального об'єму проби. Графічне зображення хроматограми цього зразка показано на рис. 3.3.

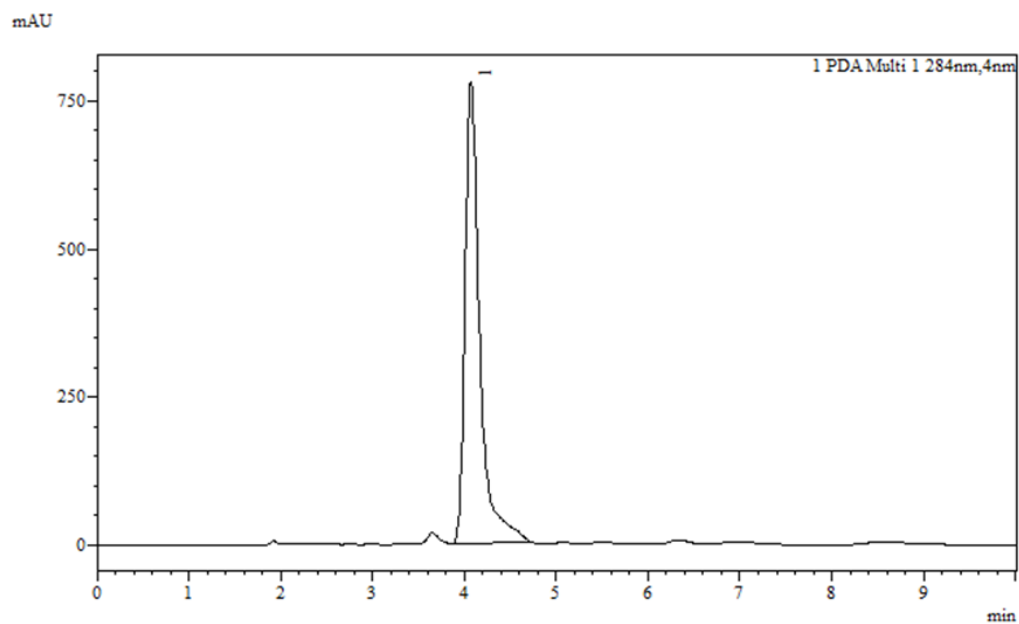


Рис. 3.3 Хроматограма екстракту шкірки мандарина.

Екстракт лайма демонструє мінімальний вміст гесперидину лише 0,57 мг, що становить 0,003% від загального об'єму зразка. Графічне зображення хроматограми цього зразка показано на рис. 3.4.

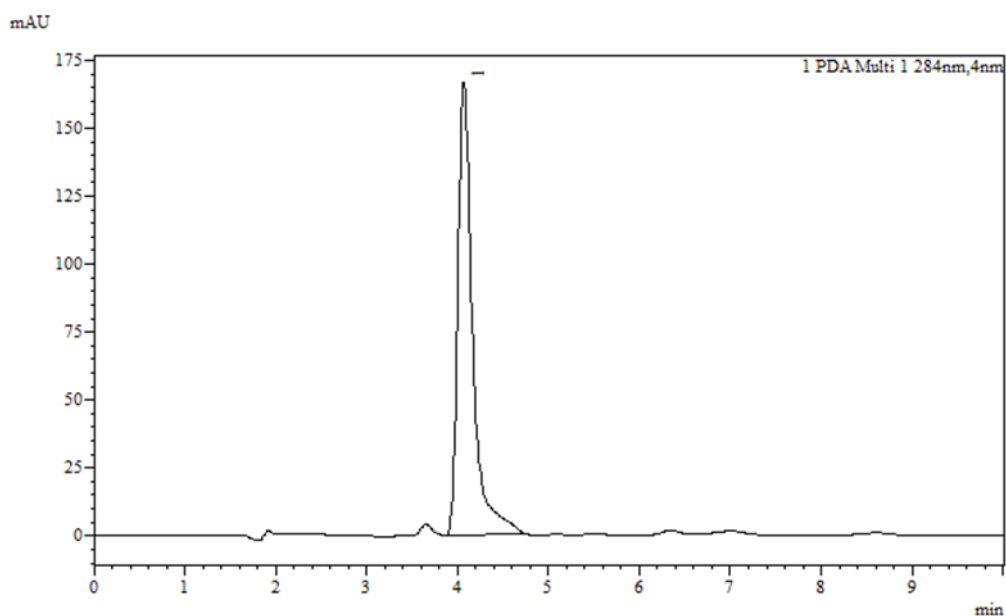


Рис. 3.4 Хроматограма екстракту цедри лайма.

Екстракт лимона містить помірну кількість гесперидину – 1,81 мг, що становить 0,009% від загального об'єму проби. Графічне зображення хроматограми цього зразка показано на рис. 3.5.

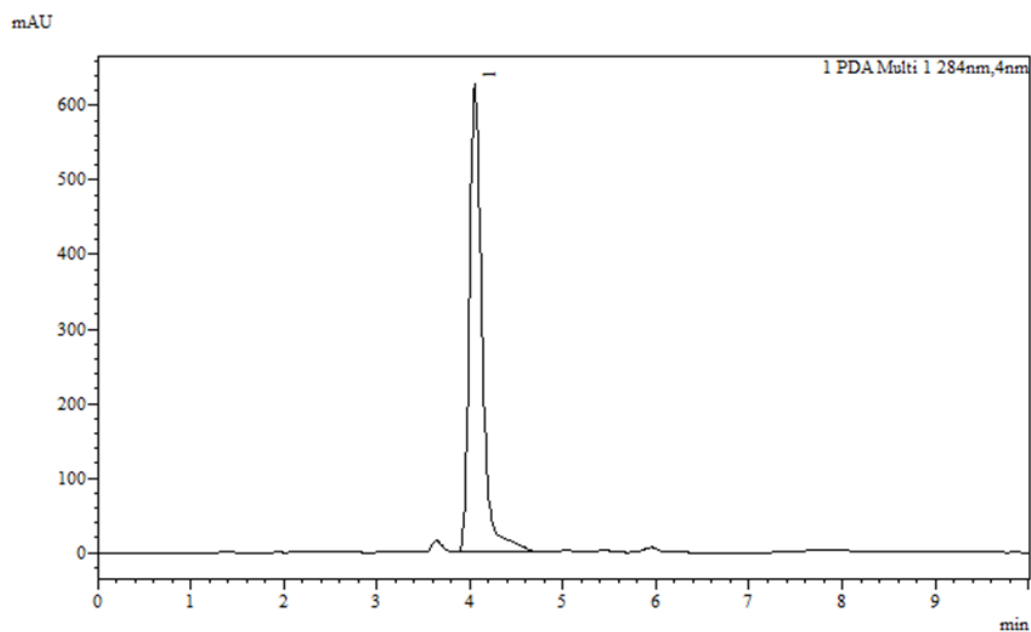


Рис. 3.5 Хроматограма екстракту цедри лимона.

Екстракт грейпфрута має найвищу концентрацію гесперидину, яка становить 4,63 мг, що відповідає 0,023% від загального об'єму проби. Графічне зображення хроматограми зразка наведено на рис. 3.6.

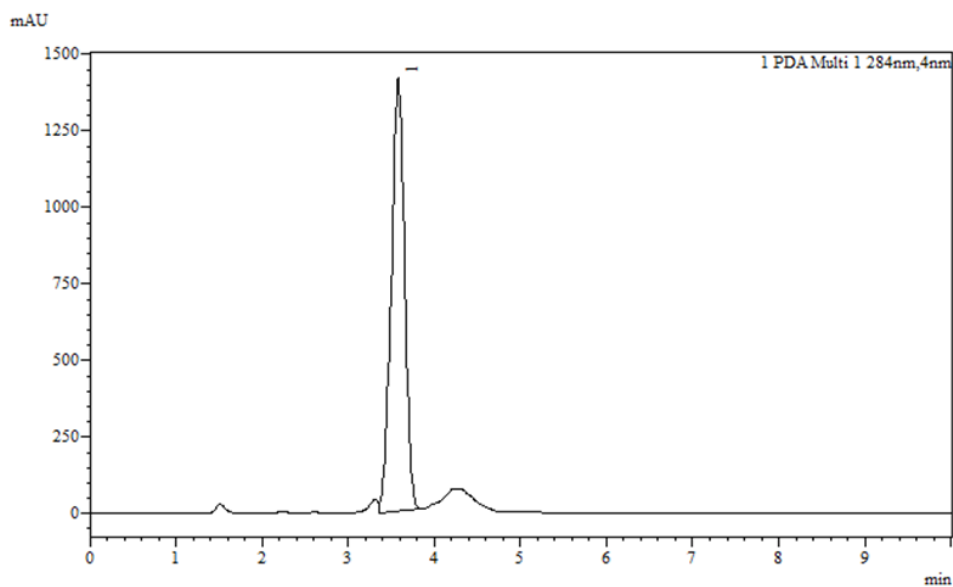


Рис. 3.6 Хроматограма екстракту шкірки грейпфрута.

Ці результати важливі не лише з огляду на наше розуміння біохімії цитрусових, але також підкреслює високий потенціал шкірки грейпфрута як

резервуара біологічно активних сполук, що може мати значення для застосування у фармацевтиці та нутрицевтиці.

Після ретельного вивчення аналітичних даних було зроблено висновок про значні відмінності у вмісті гесперидину в різних екстрактах цитрусових, що підкреслює важливість вибору відповідного джерела для вилучення цієї біоактивної сполуки.

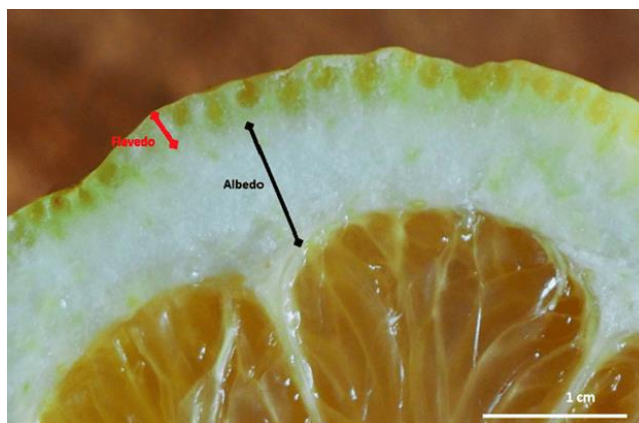


Рис. 3.7 Розташування альbedo в шкірці цитрусових

Порівняльний аналіз даних показав, що найбільша кількість гесперидину виявлено в шкірці грейпфрута, а найменша — у шкірці лайма. Цілком можливо, що ці результати пояснюються тим фактом, що альbedo, білий пористий компонент шкірки, який показаний на рис. 3.7, містить більше флавоноїдів, включаючи гесперидин, і альbedo в грейпфруті більше за об'єм, ніж альbedo в інших цитрусових. Крім того, можна припустити, що обраний метод екстракції може бути менш ефективним для лайма та лимона.

3.2 Аналіз антимікробної активності гесперидину

Гесперидин переважно міститься в шкірці та мембранних структурах цитрусових. Він служить важливим компонентом захисту рослин від навколишнього середовища, оскільки має антиоксидантні властивості, які допомагають боротися з окислювальним стресом і запобігають пошкодженню клітин. У контексті здоров'я людини гесперидин має потенційну користь для профілактики та лікування різних захворювань, таких як серцево-судинні

захворювання, запалення, рак і нейродегенеративні розлади. Екстракція гесперидину з цитрусових є важливим кроком у його вивченні та використанні в медицині та харчовій промисловості.

Результати дослідження антимікробної дії проілюстровані на рис. 3.8, показали, що не було значних зон інгібування навколо лунок, що містять гесперидин. Цей висновок вказує на те, що гесперидин, виділений з екстрактів цитрусових, не виявляє антимікробної активності проти штаму бактерій, протестованого в умовах, використаних у цьому дослідженні.

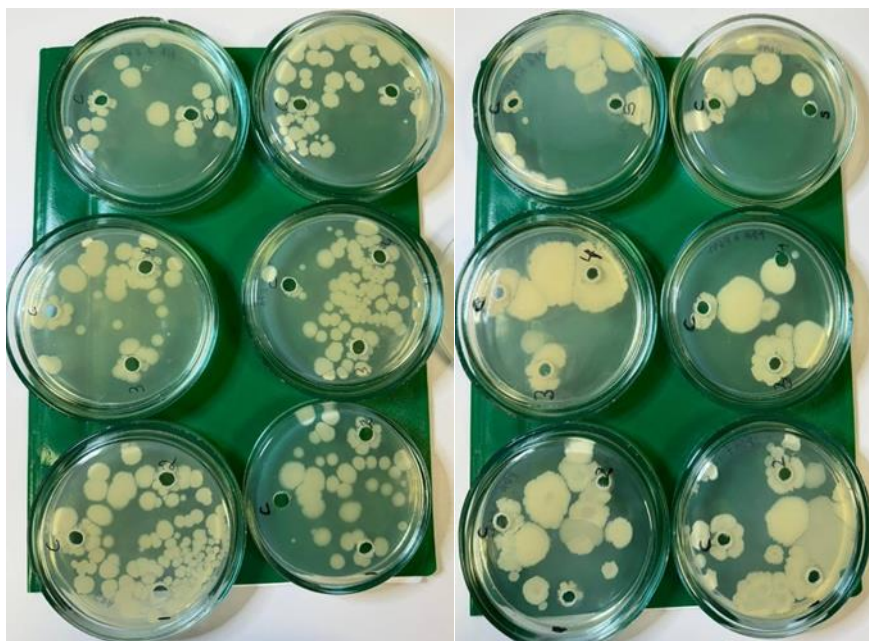


Рис. 3.8 Ріст бактерій в присутності зразків гесперидину

За результатами аналізу можна зробити висновок, що гесперидин в екстрактах цитрусових не проявляє антимікробної активності.

У контексті цього дослідження цитрусові, такі як апельсини, мандарини, лайми, лимони та грейпфрути, є значним джерелом біоактивних сполук, включаючи гесперидин. Гесперидин — це флавоноїд, який має високий потенціал для здоров'я людини завдяки своїм численним біологічним властивостям. Він широко відомий своїми антиоксидантними, протизапальними, протираковими, противірусними, серцево-судинними та захисними властивостями проти нейродегенеративних розладів.

Гесперидин відіграє важливу роль як у косметичній, так і в харчовій промисловості завдяки своїм численним корисним властивостям. У косметичній промисловості гесперидин використовується захисту шкіри від шкідливого впливу вільних радикалів, які викликають окислювальний стрес і сприяють передчасному старінню шкіри. Завдяки своїм антиоксидантним властивостям гесперидин допомагає нейтралізувати вільні радикали, зменшуючи пошкодження клітин та зберігаючи молодість шкіри. Крім того, він має протизапальні властивості, що допомагає зменшити почервоніння та подразнення шкіри, роблячи його ефективним засобом для догляду за чутливою та схильною до запалень шкірою.

Гесперидин також сприяє поліпшенню кровообігу в шкірі, забезпечуючи краще постачання клітин киснем та поживними речовинами, що надає шкірі здоровішого та яскравішого вигляду. Він допомагає зміцнити стінки капілярів, запобігаючи їх ламкості та появі судинних зірочок, що особливо важливо для людей з чутливою шкірою та схильністю до куперозу [30].

У харчовій промисловості гесперидин використовується як природний антиоксидант, який допомагає зберегти свіжість та продовжити термін зберігання продуктів. Він запобігає окисленню жирів і масел, зберігаючи їх якість та поживну цінність. Гесперидин також додається у функціональні продукти харчування, такі як збагачені соки, батончики та добавки, щоб підвищити їхню поживну цінність та забезпечити додаткові переваги для здоров'я. Дослідження показують, що гесперидин може допомагати знижувати рівень холестерину та покращувати здоров'я серцево-судинної системи, що робить його цінним компонентом у продуктах, спрямованих на підтримку серцевого здоров'я. Крім того, його імуномодуючі властивості сприяють зміцненню імунної системи, що робить його корисним для включення в продукти, призначені для підтримки загального здоров'я та благополуччя [22].

Виявлення відсутності антимікробної активності гесперидину не зменшує його значущості як біологічно активної речовини з великим потенціалом для використання в харчовій та косметичній промисловості. Важливо відзначити, що гесперидин, як і багато інших флавоноїдів, має широкий спектр біологічних

активностей, серед яких антиоксидантні, протизапальні та судинозахисні властивості.

У перспективі варто продовжити дослідження інших можливих біологічних активностей гесперидину, а також розглянути можливість комбінування його з іншими природними антимікробними речовинами для посилення загальної ефективності. Це відкриває нові можливості для створення комплексних продуктів, які можуть мати ширший спектр дії та забезпечувати додаткові переваги для здоров'я людини.

Висновки до розділу 3

У цьому дослідженні була розроблена та впроваджена ефективна процедура екстракції для виділення гесперидину з різних цитрусових фруктів, таких як апельсини, мандарини, лайми, лимони та грейпфрути. Використовуючи метод екстракції Сокслета, отримані екстракти були піддані комплексному аналізу рідинної хроматографії. Найвищий вміст гесперидину спостерігався в шкірці грейпфрута, тоді як найменший - в шкірці лайма. Але попри потенційні біологічні властивості гесперидину, виявлено, що він не проявляє антимікробної активності за умов тестування, що вказує на необхідність подальших досліджень для вивчення його потенційних застосувань.

ВИСНОВКИ

Підсумовуючи, цитрусові флавоноїди є високоактивними фітохімічними речовинами з різними фізіологічними ефектами на організм людини. Дослідження фізіологічно значущих ефектів цитрусових продуктів вказують на молекули флавоноїдів, серед яких гесперидин виділяється як одна з ключових біологічно активних сполук, що містяться в шкірці цитрусових.

Гесперидин має значний потенціал для профілактики та лікування різноманітних захворювань, включаючи серцево-судинні захворювання, запалення, рак і нейродегенеративні розлади. Завдяки своїм корисним властивостям гесперидин широко використовується в харчовій, косметичній і фармацевтичній промисловості.

Екстракція гесперидину з цитрусових є важливим кроком у вивченні його біологічних властивостей і застосування в різних областях. У нашому дослідженні розглядалися методи екстракції гесперидину з цитрусових, в результаті чого був обраний метод екстракції Сокслета. Цьому методу було віддано перевагу через його здатність до безперервної екстракції при високих температурах, що особливо важливо для вилучення гесперидину з цитрусових шкірок, які містять найбільшу кількість гесперидину.

Далі ми оптимізували існуючий метод екстракції гесперидину, який використовувався в експериментах, з подальшим аналізом ВЕРХ виділеного гесперидину з екстрактів цедри цитрусових. Отримані дані дозволили зробити висновок, що найбільша кількість гесперидину міститься в грейпфруті, а в лимоні і лаймі його вміст був низьким. Ці результати підкреслюють важливість подальших досліджень щодо оптимізації процесів екстракції та використання гесперидину з цитрусових для різних застосувань у медицині та харчовій промисловості.

Нарешті, ми перевірила протигрибкову дію. За результатами аналізу можна зробити висновок, що гесперидин в екстрактах цитрусових не виявляє антимікробної активності щодо досліджуваного штаму грибів. Однак, незважаючи на відсутність протигрибкових ефектів, гесперидин та інші екстракти цитрусових мають різноманітні корисні властивості, які можна використовувати в інших

галузях промисловості. Наприклад, у харчовій промисловості. Екстракти цитрусових можна використовувати як природні консерванти, підсилювачі смаку та харчові добавки завдяки багатому вмісту вітамінів, мінералів і біоактивних сполук. Їхні антиоксидантні властивості також можуть допомогти продовжити термін зберігання продуктів.

Також у косметичній промисловості. Антиоксидантні та протизапальні властивості гесперидину роблять його цінним інгредієнтом засобів по догляду за шкірою. Він може допомогти захистити шкіру від окислювального стресу, зменшити запалення та покращити загальний стан шкіри, що робить його популярним вибором при створенні різноманітних косметичних засобів.

Таким чином, хоча гесперидин може бути неефективним як антимікробний засіб, інші його корисні властивості гарантують, що він залишається цінним компонентом для різноманітних застосувань у харчовій та косметичній промисловості.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

[1] Liu N., Li X., Zhao P., Zhang X., Qiao O., Huang L., Gao W. A review of

c

h

e

m

[2] Pyrzynska K. Hesperidin: A Review on Extraction Methods, Stability and Biological Activities. *The Bioactive Plant Compounds for Sustainable Health*. 2022. 14(12).2387. <https://doi.org/10.3390/nu14122387>

[3] Hou H.-S., Bonku E. M., Zhai R., Zeng R., Hou Y.-L., Yang Z.-H. Extraction of essential oil from Citrus reticulate Blanco peel and its antibacterial activity against C

u [4] Zhang H., Cui J., Tian G., DiMarco-Crook C., Gao W., Zhao C., Zheng J. Efficiency of four different dietary preparation methods in extracting functional compounds from dried tangerine peel. *Food Chemistry*. 2019. 289. 340–350. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.03.063>.

a [5] Garg A., Garg S., Zaneveld L. J. D., Singla A. K. Chemistry and pharmacology of the citrus bioflavonoid hesperidin. *Phytotherapy Research*. 2001. 15(8). 655–669. doi:10.1002/ptr.1074

e [6] Yan G., Li J., Chen S., Liu Y., Wu J. L., Zhu X. M., Li N. New limonoids from the fruits of Melia toosendan and their autophagic activities. *Phytochemistry Letters*. 2020. 35. 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2019.10.012>.

u [7] Fu M., Zou B.o., An K., Yu Y., Tang D., Wu J., Ti H. Anti-asthmatic activity of alkaloid compounds from Pericarpium Citri Reticulatae (Citrus reticulata 'Chachi'). *Food and Function*. 2019. 10(2).903–911. <https://doi.org/10.1039/C8FO01753K>.

a [8] Razola-Díaz M. D. C., Guerra-Hernández E. J., García-Villanova B., Verardo V. Recent developments in extraction and encapsulation techniques of orange essential oil. *Food Chemistry*. 2021. 354.1-13 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129575>.

e [9] Cui J., Ren W., Zhao C., Gao W., Tian G., Bao Y., Zheng J. The structure–property relationships of acid- and alkali-extracted grapefruit peel pectins. *Carbohydrate Polymers*. 2020. 229.1-34 <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115524>.

([10] Czech A., Malik A., Sosnowska B., Domaradzki P., Hernández E. Bioactive substances, heavy metals, and antioxidant activity in whole fruit, peel, and pulp of citrus fruits. *International Journal of Food Science*. 2021. 1–14. <https://doi.org/10.1155/2021/6662259>.

m

e

r

1

[11] Kim J. K., Park N. H., Hwang J. S. Skin lightening effect of the dietary intake of citrus peel extract against UV-induced pigmentation. *Natural Product Communications*, 2019. 14(6).1-6 DOI:10.1177/1934578X19859979.

[12] Pugazhenthiran N., Murugesan S., Muneeswaran T., Suresh S., Kandasamy M., Vald'es H., Mangalaraja R. V. Biocidal activity of citrus limetta peel extract mediated green synthesized silver quantum dots against MCF-7 cancer cells and pathogenic bacteria. *Journal of Environmental Chemical Engineering*. 2021. 9(2). 1-10 <https://doi.org/10.1016/j.jece:2021.105089>

[13] Diaaz-Reinoso B., Moure S., Domianguéz H., Parajoa J.C. Supercritical CO₂ Extraction and Purification of Compounds with Antioxidant Activity. *J. Agric. Food Chem*. 2006. 54. 2441-2469

[14] Stalikas C.D. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science*. 2007. 30 (18). 3268–3295.

[15] Waksmundzka-Hajnos M., Wianowska D., Oniszcuk A., Dawidowicz A. L. Effect of sample preparation methods on the quantification of selected flavonoids in plant materials by high performance liquid chromatography. *Acta Chromatographica*. 2008. 20(3). 475–488

[16] Kim J.W., Nagaoka T., Ishida Y., Hasegawa T., Kitagawa K., Lee S.C. Subcritical Water Extraction of Nutraceutical Compounds from Citrus Pomaces. *Separation Science and Technology*. 2009. 44. 2598–2608

[17] Ma Y., Chen J., Liu D., Ye X. Effect of ultrasonic treatment on the total phenolic and antioxidant activity of extracts from citrus peel. *J. Food Sci*. 2008. 73. 115-120

[18] Terigar B.G., Balasubramanian S., Boldor D., Xu Z., Lima M., Sabliov C.M. Continuous microwave-assisted isoflavone extraction system: design and performance evaluation. *Bioresource Technology*. 2010. 101(7). 2466–2471

[19] M'hiri N., Ioannou I., Ghoul M., Boudhrioua N. M. Extraction Methods of Citrus Peel Phenolic Compounds. *Food Reviews International*. 2014. 30(4). 265–290. <https://doi.org/10.1080/87559129.2014.924139>

[20] Suriyaprom S., Mosoni P., Leroy S., Kaewkod T., Desvaux M., Tragoolpua Y. Antioxidants of Fruit Extracts as Antimicrobial Agents against Pathogenic Bacteria. *Antioxidants*. 2022. 11(3). 602. <https://doi.org/10.3390/antiox11030602>

[21] Vaou N., Stavropoulou E., Voidarou C., Tsigalou C., Bezirtzoglou E. Towards Advances in Medicinal Plant Antimicrobial Activity: A Review Study on Challenges and Future Perspectives. *Microorganisms*. 2021. 9(10). 2041. doi:10.3390/microorganisms9102041

[22] Maqbool Z., Khalid W., Atiq HT., Koraqi H., Javaid Z., Alhag SK., Al-Shuraym LA., Bader DMD., Almarzuq M., Afifi M. Citrus Waste as Source of Bioactive Compounds: Extraction and Utilization in Health and Food Industry. *Molecules*. 2023. 28(4). 1636. <https://doi.org/10.3390/molecules28041636>

[23] Moosavy M.H., Hassanzadeh P., Mohammadzadeh E., Mahmoudi R., Khatibi S.A., Mardani, K. Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of Lemon (Citrus limon) peel in vitro and in a food model. *J. Food Qual. Hazards Control*. 2017. 4. 42–48.

[24] Ortiz-Flores M., Portilla-Martínez A., Cabrera-Pérez F., Nájera N., Meaney E., Villarreal F., Ceballos G. PXR is a target of (-)-epicatechin in skeletal muscle. 2020. 6:e05357.

[25] Naseri A.T., Thibault J.F., Ralet-Renard M.C. Citrus pectin: Structure and application in acid dairy drinks. In *Tree and Forestry Science and Biotechnology; Global Science Books: Ikenobe, Japan*, 2008.

[26] Khalid W., Arshad M.S., Aziz A., Rahim M.A., Qaisrani T.B., Afzal F., Ali A., Ranjha M., Khalid M.Z., Anjum F.M. Chia Seeds (Salvia hispanica L.): A Therapeutic Weapon in Metabolic Disorders. *Food Sci. Nutr.*. 2022. 11. 3–16.

[27] Kaur S., Panesar P. S., Chopra H. K. Citrus processing by-products: an overlooked repository of bioactive compounds. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2023. 63(1). 67–86. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1943647>

[28] Popovic B. M., B Blagojevic D., Latković D., Četojević-Simin A. Z., Kucharska F. A one step enhanced extraction and encapsulation system of cornelian

cherry (*Cornus mas* L.) polyphenols and iridoids with β -cyclodextrin. *LWT*. 2021. 141. 110884. doi: 10.1016/j.lwt.2021.110884.

[29] Al-Dalali Sam., Prolonged the Shelf Life of Different Foods using the Citrus By-Products as Antimicrobials: A Review Article. *Annals of Agricultural & Crop Sciences*. 2019. 10.26420/annagriccropsci.2019.1039.

[30] Man M.-Q., Yang B., Elias, P. M. Benefits of Hesperidin for Cutaneous Functions. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2019. 1–19. doi:10.1155/2019/2676307