

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ**  
**ПОЛТАВСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**  
**Факультет технології і виробництва продукції тваринництва**  
**Кафедра харчових технологій**

**Пояснювальна записка**  
**до кваліфікаційної роботи на здобуття вищої освіти**  
**ступеня бакалавр**

**на тему: «Удосконалення технології вилучення біологічно активних речовин з листя обліпихи для продуктів функціонального призначення»**

**Виконала: здобувачка вищої освіти**  
**за освітньо-професійною програмою**  
**Харчові технології**  
**спеціальності 181 Харчові технології**  
**ступеня вищої освіти бакалавр**  
**групи 181 ХТ\_бз\_2020 стн**  
**ГЕЛЬДИЄВА Т. С.**

**Керівник: доцент, к.т.н. Дубова Г. Є.**

**Рецензент: проф., д.с.-г.н. Поліщук А.А.**

**ПОЛТАВСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**  
**Факультет Технології виробництва і переробки продукції тваринництва**  
**Кафедра Харчових технологій**

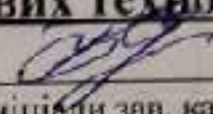
Освітньо-професійна програма Харчові технології  
*назва освітньо-професійної програми*

Спеціальність 181 Харчові технології  
*код та найменування спеціальності*

Ступінь вищої освіти бакалавр  
*бакалавр, магістр*

**ЗАТВЕРДЖУЮ**

**Завідувачка кафедри Харчових технологій**

к.т.н., доцент Будник Н.В.   
*(наукове звання, посада, прізвище та ініціали зав. кафедрою)*

«17» « Вересня » 2021 року

**З А В Д А Н Н Я**  
**НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА ВИЩОЇ ОСВІТИ**

Гельдієва Тетяна Сергіївна

*Прізвище, ім'я та по-батькові здобувача вищої освіти*

1. Тема роботи: «Удосконалення технології вилучення біологічно активних речовин з листя обліпихи для продуктів функціонального призначення».

керівник роботи докт. техн. наук, професор кафедри харчових технологій  
*(наукове звання, посада, прізвище та ініціали керівника роботи)*

Сукманов В.О.

затверджені наказом ПДАУ « 01 » « квітня » 2022 року № «188-ст».

2. Строк подання здобувачем вищої освіти роботи « 16 » « травня » 2022 р.

3. Вихідні дані до роботи:

1. Об'єкт дослідження: технології екстрагування біологічно активних речовин з листя обліпихи.

2. Базовими показниками при проведенні порівняння, необхідно використати вихід фенолів та флавоноїдів у екстрактах, отриманих різними методами екстрагування та антиоксидантні властивості даних екстрактів.

4. Зміст розрахунково-пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити):

Розділ 1. Огляд літератури за проблемою досліджень

Розділ 2. Матеріали та методи досліджень

Розділ 3. Результати власних досліджень

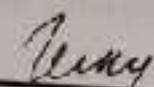
5. Перелік графічного матеріалу: схеми, рисунки, графіки, діаграми за темою

та об'єктом дослідження

### КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапів кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітки
1	Вибір і затвердження теми роботи.	15-21 вересня 2021	вик
2	Складання і затвердження розгорнутого плану та завдання на кваліфікаційну роботу	22-24 вересня 2021	вик
3	Опрацювання літературних джерел	25 вересня – 25 жовтня 2021	вик
4	Збір, вивчення і обробка інформації, необхідної для виконання роботи	26 жовтня – 26 листопада 2021	вик
5	Виконання теоретичного розділу роботи	27 листопада – 27 грудня 2021	вик
6	Виконання аналітичних розділів роботи	28 грудня 2021 – 2 лютого 2022	вик
7	Виконання експериментальної частини роботи	3 лютого – 3 березня 2022	вик
8	Оформлення тексту роботи	3 березня – 15 травня 2022	вик
9	Попередній захист роботи на кафедрі	16 травня – 22 травня 2022	вик
10	Нормоконтроль	23 травня - 26 травня 2022	вик
11	Доопрацювання роботи з урахуванням зауважень і пропозицій	27 травня – 7 червня 2022	вик
12	Захист кваліфікаційної роботи	8-15 червня 2022	

Здобувач вищої освіти



Гельдиєва Т.С.

(підпис)

(прізвище та ініціали здобувача вищої освіти)

Керівник роботи



Дубова Г.Є.

(підпис)

(прізвище та ініціали здобувача вищої освіти)

## АНОТАЦІЯ

Гельдисва Тетяна Сергіївна

Удосконалення технології вилучення біологічно активних речовин з листя обліпихи для продуктів функціонального призначення

Кваліфікаційна робота за освітньо-професійною програмою Харчові технології спеціальності 181 Харчові технології. Полтавський державний аграрний університет, м. Полтава, 2022 рік.

Пояснювальна записка до кваліфікаційної роботи: 53 с., 9 рис., 5 табл., 58 джерел.

Мета дослідження – удосконалити технологію екстрагування біологічно активних речовин з листя обліпихи шляхом ґрунтування раціональних методів їх вилучення. Об'єкт дослідження – технології екстрагування біологічно активних речовин з листя обліпихи. Предмет дослідження - загальний вміст фенолів, загальний вміст флавоноїдів, антиоксидантна активність екстрактів з використанням методів DPPH, FRAP та CUPRAC – показник загальної зменшувальної потужності екстрактів. Методи дослідження – теоретичні: аналіз, синтез, порівняння, узагальнення; експериментальні: екстрагування біологічно активних речовин методом мацерації, Сокслет-екстрагування та субкритичною водою, визначення вмісту фенолів та флавоноїдів та антиоксидантної активності екстрактів.

Пояснювальна записка містить огляд літератури з проблеми дослідження; опис експериментального обладнання та методик досліджень. Опис результатів власних експериментальних досліджень містить дослідження виходу сухих речовин при різних методах екстрагування та визначення раціональних параметрів для кожного з методів; дослідження загального вмісту фенолу та флавоноїдів; порівняльні дослідження антиоксидантних властивостей зразків екстрактів з використанням аналізів DPPH, FRAP, ідентифікація та кількісна оцінка сполук за допомогою вискоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ); висновки та рекомендації щодо подальшого використання результатів досліджень.

Ключові слова: мацерація, сокслет-екстрагування, субкритична вода, листя обліпихи, феноли, флавоноїди, антиоксидантні властивості.

## ABSTRACT

Geldieva Tatiana Sergeevna

Improving the technology of extracting biologically active substances from sea buckthorn leaves for functional products

Qualification work on the educational-professional program Food Technologies specialty 181 Food Technologies. Poltava State Agrarian University, Poltava, 2022.

Explanatory note to the qualification work: 53 pages, 9 figures, 5 tables, 58 sources.

The aim of the study was to compare the efficiency of extraction of biologically active substances from sea buckthorn leaves by maceration, Soxhlet extraction and subcritical water extraction. The object of research is the technology of extraction of biologically active substances from sea buckthorn leaves by maceration, Soxhlet extraction and extracritical water extraction. The subject of research - the total content of phenols, the total content of flavonoids, antioxidant activity of extracts using the methods of DPPH, FRAP and CUPRAC - an indicator of the total reducing power of the extracts. Research methods - theoretical: analysis, synthesis, comparison, generalization; experimental: extraction of biologically active substances by maceration, Soxhlet extraction and subcritical water, determination of phenols and flavonoids and antioxidant activity of extract samples.

The explanatory note contains a review of the literature on the problem of research; description of experimental equipment and research methods. The description of the results of our own experimental research includes a study of the yield of dry matter in different methods of extraction and determination of rational parameters for each of the methods; study of the total content of phenol and flavonoids; comparative studies of the antioxidant properties of extract samples using DPPH, FRAP assays, identification and quantification of compounds using high performance liquid chromatography (HPLC); conclusions and recommendations for further use of research results.

Keywords: maceration, soxhlet-extraction, subcritical water, seaburn leaves, phenols, flavonoids, antioxidant properties.

## ЗМІСТ

	стор.
ВСТУП	8
1. АНАЛІЗ ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ ЗА ПРОБЛЕМОЮ ДОСЛІДЖЕННЯ	11
1.1. Біологічно активні речовини, технології їх вилучення з рослинної сировини та використання у технологіях продуктів функціонального призначення	11
1.2. Технології екстрагування біоактивних сполук з рослинної сировини	13
1.2.1. Традиційні методи екстрагування	15
1.2.2. Інноваційні методи екстрагування	17
1.3. Субкритичне екстрагування та властивості субкритичної води як екстрагента	17
1.4. Екстрагування біологічно активних речовин з листя обліпихи	21
2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	23
2.1. Організація проведення експериментальних досліджень	23
2.2. Рослинний матеріал та його підготовка до досліджень	23
2.3. Апаратурне забезпечення досліджень	23
2.4. Методи екстрагування	24
2.4.1. Мацерація	24
2.4.2. Сокслет - екстрагування	24
2.4.3. Екстрагування субкритичною водою	24
2.5. Методика визначення загального вмісту фенолів	25
2.6. Методика визначення загального вмісту флавоноїдів	25
2.7. Дослідження високоефективною рідинною хроматографією (ВЕРХ)	25
2.8. Визначення антиоксидантної активності екстрактів	26
2.8.1. Аналіз DPPH	26

2.8.2. Аналіз FRAP	27
2.8.3. Визначення загальної зменшувальної потужності екстрактів	28
2.9. Статистичний аналіз	28
<b>3. РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ</b>	<b>29</b>
3.1. Проведення експериментальних досліджень	29
3.2. Дослідження виходу сухих речовин при різних методах екстрагування та визначення раціональних параметрів для кожного з методів	32
3.3. Дослідження загального вмісту фенолу та флавоноїдів	35
3.4. Оцінка антиоксидантної активності досліджуваних екстрактів	37
3.4.1. Аналіз DPPH	37
3.4.2. Аналіз FRAP	38
3.5.3. Порівняльні дослідження зміни потужності екстрактів	39
3.6. Ідентифікація та кількісна оцінка сполук за допомогою високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ)	42
<b>ВИСНОВКИ ТА ПРОПОЗИЦІЇ</b>	<b>46</b>
<b>СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ</b>	<b>47</b>

## ВСТУП

Одним із перспективних напрямів розвитку харчових технологій є розробка технологій функціональних продуктів для харчування людини. Дані продукти, крім основного завдання — харчування, впливають на психологічний або фізіологічний стан людини; наприклад, можуть знижувати рівень холестерину, зміцнювати імунну систему, відновлювати мікробіологічний баланс травної системи, підтримувати лікування синдрому роздратованого кишечника і мають протизапальну функцію.

До функціональних продуктів харчування відносять продукти які здійснюють певні спеціалізовані функції при їх вживанні, при цьому функціональне харчування не відносять до лікарських засобів, але тривале споживання функціональних продуктів харчування приводить (переважно приводить) до відповідних фізіологічних змін в організмі.

Одним із перспективних шляхів підвищення якості функціональних харчових продуктів є використання біологічно активних речовин з рослинної сировини, що не тільки підвищує їх харчову цінність, але й покращує смакові та антиоксидантні властивості, терміни зберігання та дозволяє розробляти технології харчових продуктів без використання хімічних антиоксидантів [1, 2].

Використання біоактивних сполук у харчовій промисловості означає необхідність обґрунтованих підходів при виборі методу вилучення цих активних компонентів із рослинної сировини. Наряду з традиційними методами, останнім часом було розроблено безліч нових методів екстрагування, але до цих пор ні один метод не вважається стандартом для вилучення конкретних біологічно активних сполук із конкретної рослинної сировини [3]. Ефективність традиційних і нетрадиційних методів екстракції в основному залежить від критичних вхідних параметрів; розуміння природи та будови матриць сировини та хімії біологічно активних сполук [4, 5].

В якості сировини при отриманні екстрактів в даній роботі було прийнято листя обліпихи, яке є цінним джерелом біологічно активних речовин та вітамінів [6]:

- А (або ретинол із групи каротиноїдів) – має антиоксидантні властивості, благотворно впливає на зір, регулює нормальний обмін речовин.
- групи В – надають комплексний сприятливий вплив на організм.
- С (зміст аскорбінової кислоти до 370 мг/%) – відповідає за імунітет, лікує застудні симптоми.
- Е (токоферол) – виконує захисну функцію – бореться із вільними радикалами.
- Н (біотин) – допомагає засвоєнню протеїну та вуглеводів в організмі. Регулює рівень цукру та прискорює процес розкладання жирних кислот.
- РР (нікотинамід або ніотинова кислота) – нормалізує діяльність гормональної структури та залоз внутрішньої секреції.

Листя обліпихи містять макроелементи та мікроелементи: бір, залізо, мідь, цинк, кальцій, калій, марганець та інші.

Крім вітамінів і мінералів, обліпихове листя багате:

таніном (його вміст доходить до 10%), який характеризується протизапальними та в'яжучими властивостями;

пектином, який знижує рівень холестерину, виводить шлаки та токсини з організму;

танідами (дубільними речовинами), які надають антисептичну та дезінфікуючу дії;

серотоніном (гіпофеїном), які нормалізує стан нервової системи, його нестача може призвести до гормонального дисбалансу;

тритерпеновими кислотами, які сприяють процесу відновлення клітин;

кумаринами, які перешкоджають утворенню тромбів у судинах;

флавоноїдами та фітонцидами.

**Мета дослідження** – удосконалення технології вилучення біологічно активних речовин з листя обліпихи для продуктів функціонального призначення

**Об'єкт дослідження** – технології екстрагування біологічно активних речовин з листя обліпихи методами мацерації, Соклет-екстрагуванням та екстрагуванням субкритичною водою.

**Предмет дослідження** - загальний вміст фенолів, загальний вміст флавоноїдів, антиоксидантна активність екстрактів з використанням методів DPPH (2,2-дифеніл-1-пікрілгідразил), FRAP та CUPRAC – показник загальної зменшувальної потужності екстрактів.

Для досягнення мети дослідження нами було сформульовані завдання дослідження:

- провести аналітичний аналіз наявної науково-технічної інформації з проблеми дослідження;
- дослідити вихід сухих речовин при різних методах екстрагування та визначення раціональних параметрів для кожного з обраних методів екстрагування;
- дослідити загального вмісту фенолу та флавоноїдів у екстарактів, отриманих різними методами екстрагування;
- оцінити антиоксидантну активність досліджуваних екстрактів з використання методів DPPH та FRAP;
- порівняти дослідження зміни потужності екстрактів;
- ідентифікувати та кількісно оцінити вилучені сполуки.

Дана робота виконана в рамках бюджетної теми кафедри харчових технологій ДР №0115U006745 «Інноваційні та ресурсозберігаючі технології харчових виробництв» (Розділ «Технології та обладнання субкритичної екстракції біологічно активних речовин з рослинної сировини»).

## РОЗДІЛ I

### АНАЛІЗ ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ ЗА ПРОБЛЕМОЮ ДОСЛІДЖЕННЯ

#### 1.1. Біологічно активні речовини, технології їх вилучення з рослинної сировини та використання у технологіях продуктів функціонального призначення

Натуральні продукти з лікарських рослин у вигляді чистих сполук або стандартизованих екстрактів відкривають необмежені можливості для розробки нових та вдосконалення існуючих технологій продуктів харчування. У зв'язку зі зростанням попиту на натуральні антиоксиданти, барвники, та інші природні харчові інгредієнти стають дедалі актуальнішим дослідження, спрямовані на вивчення природи біологічно активних сполук та методів їх ефективного вилучення з рослинної сировини.

Інгредієнти, що використовуються в харчових галузях складаються з різних типів біологічно активних сполук [4-6].

Існуючі класифікації біоактивних сполук за різними категоріями все ще непослідовні, швидше це залежить від наміру конкретної класифікації. Наприклад, біосинтетичні класифікації які служать простотою опису шляхів біосинтезу що не відповідає обсягу фармакологічної класифікації.

За даними досліджень [7, 8] біологічно активні сполуки рослин поділяються на три основні категорії: (а) терпени та терпеноїди (приблизно 25 000 видів), (б) алкалоїди (приблизно 12 000 типи) та (в) фенольні сполуки (приблизно 8000 типів).

Загальна будова різних категорій біологічно активних сполук наведені на рис. 1.1.

Якісні та кількісні дослідження біоактивних сполук із рослинної сировини в основному ґрунтуються на підборі належного метод екстракції [9, 10]. Найбільш поширеними факторами, що впливають на процеси екстракції, є властивості матриці частини рослини, розчинник, температура, тиск і час [11]. Розширене розуміння динамічної хімічної природи різноманітних

біоактивних речовин молекули є першоджерелом для прогресу біоактивного аналізу протягом останнього десятиліття [12, 13].

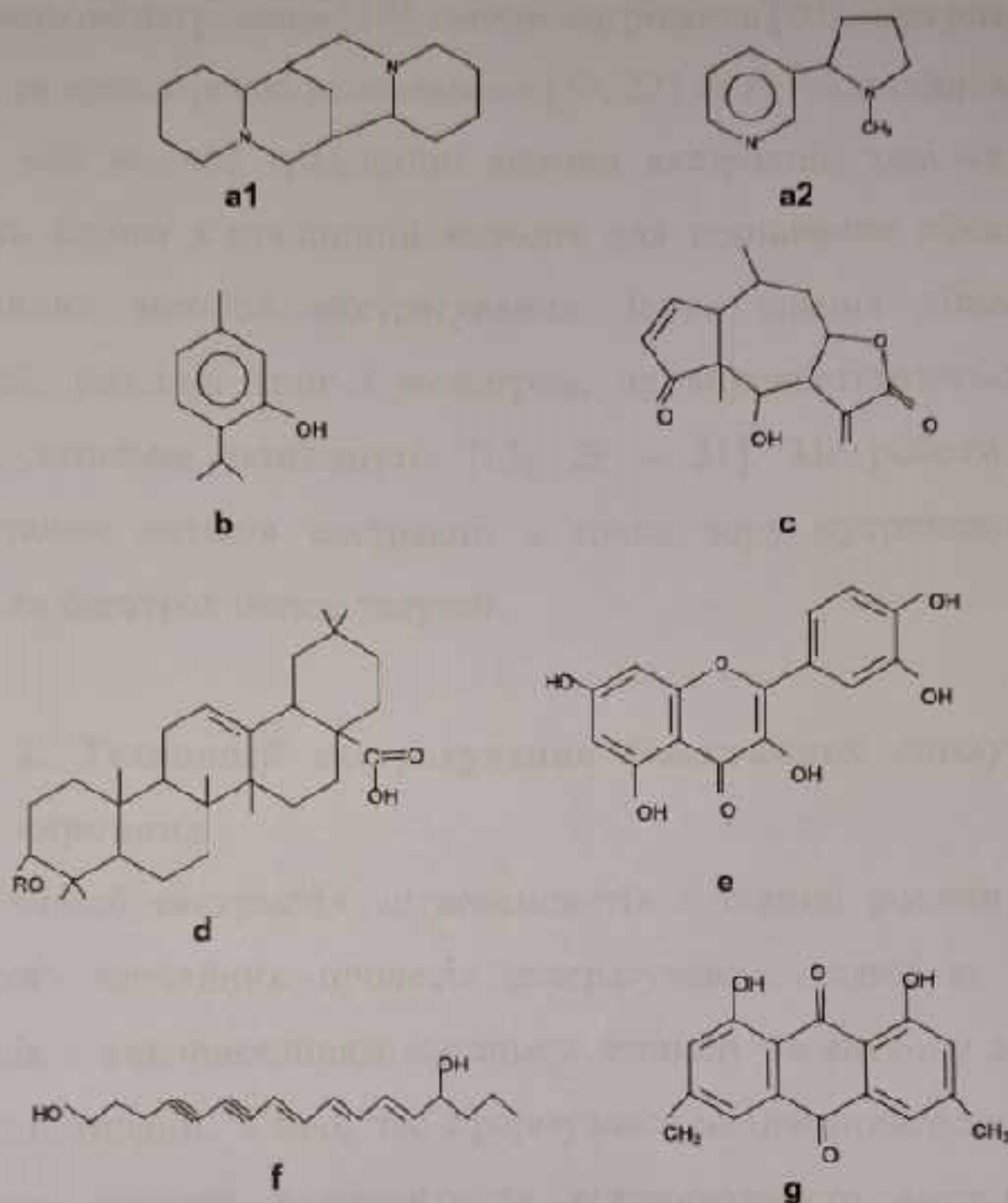


Рис. 1.1. Загальна будова різних категорій рослинних біоактивних сполук: алкалоїди (a1 і a2), монотерпени (b), сескветерпени (c), тритерпени, сапоніни, стероїди (d), флавоноїди (e), поліацетилену (f), полікетиди (g) [13].

Біоактивні сполуки можна ідентифікувати та охарактеризувати з різних частин рослин, таких як листя, стебло, квітка та плоди.

Видобуток рослинної сировини може здійснюватися різними методами. Нетрадиційні методи, які є більш екологічними за рахунок зменшення використання синтетичних та органічних хімічних речовин, скорочення робочого часу, кращий урожай і якість екстракту, розроблені протягом останніх 50 років. Для підвищення загального виходу та селективності

біоактивних компонентів з рослинні матеріали, ультразвук [14, 15], імпульсне електричне поле [16], ферментне розщеплення [17], екструзія [18], мікрохвильове нагрівання [19], омічне нагрівання [20], надкритичні рідини [15, 21 - 26], та прискорених розчинників [19, 27] як нетрадиційні методи.

У той же час традиційні методи екстракції, такі як Соклет, досі вважають одним з еталонний методів для порівняння ефективності нових інноваційних методів екстрагування. Існує значна кількість наукових доповідей, розділів книг і монограм, де використовуються нетрадиційні методи, детально розглянуто [13, 28 - 31]. Ці роботи підкреслюють використання методів екстракції з точки зору нутрицевтиків, харчових добавок та багатьох інших галузей.

## **1. 2. Технології екстрагування біоактивних сполук з рослинної сировини**

Зазвичай екстракція антиоксидантів з тканин рослин досягається за допомогою звичайних процесів екстрагування, таких як твердо-рідинна екстракція з використанням метанолу, етанолу та ацетону а також шляхом парової дистиляції. У наш час сформувався величезний попит до швидкого, екологічно чистого надійного та відтворюваного методи ефективного вилучення біоактивних сполук з рослинної сировини. У літературі, активно обговорюються різні методи екстрагування, такі як мацерація, Соклет, ультразвук, допоміжна екстракція, мікрохвильова екстракція та субкритичне екстрагування [32, 33]. Останнім часом є зростає інтерес до використання екологічно чистих технології, здатні забезпечити екстракти високої якості та високої активності одночасно виключаючи будь - яку токсичність, пов'язану з розчинниками. У цьому сенсі, обидва методи, надкритична екстракція рідиною з діоксидом вуглецю ( $\text{CO}_2$ ) як розчинником і екстрагування субкритичною водою відповідають даним вимогам та вважаються чистими та безпечними процесами [33, 34].

Методика екстрагування субкритичною водою, тобто екстрагування гарячою водою під тиском, достатнім для підтримувати воду в рідкому стані, продемонструвала свою здатність вибірково вилучати різні класи сполук залежно від використовуваної температури, причому більш полярні сполуки вилучаються при більш низьких температурах, тоді як менш полярні сполуки вилучаються при більш високих температурах. Дана технологія дозволяє маніпулювати склад екстрактів шляхом зміни робочих параметрів і його використовували для виділення різних ефірних олій [35], а також для екстракції антиоксидантів [34, 36]. Оскільки різні біоактивні властивості листя обліпихи, включаючи антиоксидантні, відносяться до присутності в ній фенольних сполук; отже, очевидно, іншою метою цієї роботи було дослідити можливість використання екстрагування субкритичною водою для швидкого та ефективного вилучення біологічно активних фенолів з рослини та порівняння його з іншими методи видобутку (мацерація та Сокслет).

Враховуючи великі відмінності між біоактивними сполуками і величезна кількість видів рослин, необхідно нарощувати стандартний і комплексний підхід до відсіву цих сполук несуть користь для здоров'я людини. У роботі [37] описано комплексний підхід, що показує послідовність лікарських рослин дослідження, яке почалося з колекції назв часто вживаних заводів і закінчився індустріалізацією.

Можна лише провести подальше поділ, ідентифікацію, і характеристика біоактивних сполук з подальшим відповідним процесом екстракції. Повинні бути різні методи вилучення використовується в різних умовах для розуміння селективності вилучення з різних природних джерел. Різні техніки, їх багато залишаються майже такими ж через сотні років; також можна використовувати до екстракт біологічно активних сполук. Усі ці методи мають деякі спільні цілі: (a) вилучення цільових біологічно активних сполук із них комплексний зразок рослини, (b) для підвищення селективності аналітичних методів (c) для підвищення чутливості біоаналізу за рахунок збільшення концентрації цільових сполук, (d) для перетворення біоактивної речовини

сполуки в більш придатну форму для виявлення та поділу, та (е) забезпечити надійний і відтворюваний метод, який не залежить від змін у матриці зразка [13].

### 1.2.1. Традиційні методи екстрагування

Біологічно активні сполуки з рослинної сировини можна вилучити шляхом різноманітних класичних та інноваційних методів екстрагування. Більшість цих технологій засновані на витяжній здатності різних розчинників, що використовуються та одночасному застосуванні тепла та/або змішування. Для отримання біоактивних сполук із рослин існують такі класичні методи:

- екстракція Сокслета;
- мацерація;
- гідродистиляція.

*Екстрактор Сокслета* вперше запропонував німецький хімік Франц Ріттер фон Сокслет (1879). Він був розроблений в основному для вилучення ліпідів, але тепер цей метод вже не обмежується лише цими речовинами. Екстракція Сокслета широко використовується для вилучення цінних біологічно активних сполук з різних природних джерел. Використовується як модель для порівняння нових альтернатив екстрагування. Для реалізації цього метода невелику кількість сухої проби поміщають в наперсток. Тоді наперсток поміщають в дистиляційну колбу, яка містить розчинник. Після досягнення рівня переливу розчин наперсток-тримач аспірується сифоном. Сифон вивантажує розчин назад в дистиляційну колбу. Цей розчин переносить екстраговані розчинені речовини в об'ємну рідину. Розчинена речовина залишається при перегонці в колбі і розчинник повертаються в сифон. Процес виконується багаторазово до завершення вилучення.

*Мацерація* довгий час використовувалася в домашньому приготуванні тоніка. Це стало популярним і недорогим способом отримання ефірних масел і біоактивних сполук. Для дрібномасштабної екстракції мацерація зазвичай складається з кількох етапів. По-перше, подрібнення рослини матеріалів на

дрібні частинки використовується для збільшення площі поверхні контакту сировини з розчинником. По-друге, в процесі мацерації, у закриту посудину додають відповідний розчинник. По-третє, рідина з екстрагованими біологічно активними речовинами проціджується, але тверді речовини (залишок) цього процесу екстракції пресуються. Отриманий екстракт проціджують і віджимають отриману рідину змішують і відокремлюють від домішок шляхом фільтрації.

Періодичне струшування під час мацерації полегшує екстрагування завдяки: (а) збільшення дифузії, (б) видалення концентрованого розчину з поверхні зразка для внесення нового розчинника до матриці сировини для більшого виходу екстракції.

*Гідродистиляція* є традиційним методом вилучення біоактивних сполук та ефірних олій з рослин. Існує три типи гідродистиляції: водна дистиляція, водно-парова дистиляція та пряма перегонка з парою [38]. При гідродистиляції, по-перше, рослинна сировина упакований у відсік-контейнер; по-друге, вода додається в достатній кількості, а потім доводиться до кипіння. В якості альтернативи в зразок рослини вводять пару. В якості основного фактора впливу на вільні біоактивні сполуки рослинної тканини та ефективності екстрагування виступають гаряча вода і пара. Наступне непряме охолодження водою конденсує парову суміш води і масло. Конденсована суміш надходить з конденсатора в сепаратор, де масло та біоактивні сполуки автоматично відокремлюються від води [39]. Гідродистиляція передбачає три основні фізико-хімічні процеси: Гідродифузія, гідроліз і розкладання під дією тепла. При високій температурі екстракції деякі леткі компоненти можуть бути втрачені. Цей недолік обмежує його використання для екстракція термолабільних сполук.

Ефективність екстракції будь-якого традиційного методу в основному залежить від вибору розчинників [40]. Полярність цільових сполук є найважливішим фактором при виборі розчинника. Молекулярна спорідненість між розчинником і розчиненою речовиною, масоперенос, використання

спільного розчинника, екологічна безпека, токсичність для людини та фінансову доцільність також слід враховувати при виборі розчинника для вилучення біоактивних сполук.

### **1.2.2. Інноваційні методи екстрагування**

Основними проблемами при використанні традиційних технологій екстрагування є тривалими час екстракції, вимога до дорогого розчинника високої чистоти, випаровування величезної кількості розчинника, низька селективність екстракції та термічний розклад термолабільних сполук [41]. Щоб подолати ці обмеження традиційних методів екстрагування, розробляються нові та перспективні методи екстрагування. Ці методи називають нетрадиційними методами екстракції. Серед найбільш перспективних є методи екстракції за допомогою ультразвуку, ферментної екстракція, екстракція за допомогою мікрохвиль, екстракція з допомогою імпульсного електричного поля, екстракція надкритичною рідиною та екстракція рідиною під тиском. Деякі з цих прийомів розглядаються як «зелені методи», оскільки вони відповідають стандартам, встановленим багатьма країнами світу, в тому числі і Агентством з охорони навколишнього середовища, США. До них відносяться менш небезпечні хімічні речовини; проектування безпечніших хімічних речовин, безпечних допоміжних розчинників, проектування енергоефективності, використання відновлюваної сировини, скорочення похідних, каталіз, дизайн для запобігання деградації, економія часу для запобігання забрудненню та за своєю природою безпечніша хімія для запобігання негативного впливу на якість харчових продуктів, виготовлених із використанням продуктів екстрагування.

### **1.3. Субкритичне екстрагування та властивості субкритичної води як екстрагента**

Субкритична вода (СКВ) - це вода в рідкому стані під тиском в температурному діапазоні між звичайною точкою кипіння (100 °C) і

критичною температурою (374 °С). СКВ залишається стійкою до критичної температури через прикладений зовнішній тиск, який піднімає точку кипіння при нагріванні рідини в закритій посудині, де рідка вода знаходиться в рівновазі з паром.

Вода має хімічні та фізичні властивості такі, як ніякий інший розчинник [42]. При температурі навколишнього середовища, вода є полярною рідиною, яка дисоціює на іон гідроксонію ( $\text{H}_3\text{O}^+$ ) і гідроксид-іона ( $\text{OH}^-$ ), як описано його константою дисоціації ( $K_D$ ), яка становить від  $1,0 \times 10^{-14}$  при 25 °С.

Крім того, вода має надзвичайно високу відносну діелектричну проникність, статична  $\epsilon_r$ , (до 80) при температурі 20 °С.

Високий дипольний момент води (1,85 D) можна пояснити високою електронегативністю кисню в порівнянні з воднем та меншим кутом між зв'язками O-H (104,5°) в порівнянні з типовим тетраедричним кутом 109°. Вода має високу здатність до утворення водневих зв'язків, що призводить до дуже високої питомої теплоємності ( $C_{p,m}$  75,3 Дж моль<sup>-1</sup> К<sup>-1</sup>, ізобарна, молярна, при 25 °С) і високої теплоти пароутворення ( $H_v$  40,7 кДж/моль при 100 °С) (табл. 1.1).

Найбільш важливим фізико-хімічним параметром, який визначає можливості води, як розчинника для екстракції БАР, є відносна діелектрична проникність. Залежність діелектричної проникності від температури - це унікальна властивість води. Вода при кімнатній температурі - дуже полярний розчинник з діелектричною проникністю  $\epsilon$  близько 80 при атмосферному тиску.

Для полярних речовин, в порівнянні з неполярними, характерні висока діелектрична проникність, підвищені температура кипіння і температура плавлення. Дипольний момент зазвичай виникає внаслідок різної електронегативності складових молекулу атомів, через що зв'язки в молекулі набувають полярність. Однак, для утворення дипольного моменту потрібно не тільки полярність зв'язків, а й відповідне їх розташування в просторі. Значення діелектричної проникності  $\epsilon$  може бути зменшено, наприклад до 27, коли вода

нагрівається до 250 °С за умови підтримування її в рідкому стані відповідним тиском.

Таблиця 1.1

**Хімічні та фізичні властивості рідкої води при різних температурах і тисках насичення [37]**

Властивість	T = 298 К (25 °С, 0,1 МПа)	T = 373 К (100 °С, 0,1 МПа)	T = 473 К (200 °С, 1,5 МПа)	T = 623 К (350 °С, 17 МПа)
Константа дисоціації, $K_d$	$1,0 \times 10^{-14}$	$5,6 \times 10^{-13}$	$4,9 \times 10^{-12}$	$1,2 \times 10^{-12}$
$pK_d$	13.99	12.25	11.31	11.92
Відносна статична діелектрична проникність, $\epsilon_r$	78,5	55,4	34,8	14,1
Дипольний момент	1,85	1,85	1,85	1,85
Питома теплоємність, $C_p$ , (г <sup>-1</sup> К <sup>-1</sup> )	4,18	4,22	4,51	10,1
Теплота пароутворення, $H_v$ (кДж/моль)	44,0	40,7	35,0	15,6
Густина (г/см <sup>3</sup> )	0,997	0,958	0,865	0,579
Динамічна в'язкість, $\eta$ (мПа с)	0,891	0,282	0,134	0,067
Поверхневий натяг (дин/см)	72,0	58,9	37,6	3,7
Коефіцієнт самодифузії, $D$ (м <sup>2</sup> /с)	$2,3 \times 10^{-9}$	$8,6 \times 10^{-9}$	$23,8 \times 10^{-9}$	N / A

Діелектрична проникність води при підвищенні температури від 100 °С до 374 °С варіює в інтервалі між  $\epsilon$  мурашиної кислоти ( $\epsilon = 58$ ) при 100 °С;  $\epsilon$  етиленгліколю ( $\epsilon = 37$ ) при 180 °С;  $\epsilon$  метанолу ( $\epsilon = 32,6$ ) при 200 °С і досягає  $\epsilon$  етанолу ( $\epsilon = 24,3$ ) при 270 °С.

Інша важлива характеристика води - величина іонного добутку – добуток концентрацій іонів водню  $H^+$  та іонів гідроксиду  $OH^-$  в воді або в водних розчинах)  $K_w = [H^+] \times [OH^-]$  є параметром, який використовують для

опису дисоціації в воді в широкому температурному діапазоні від 100 до 374<sup>0</sup>С.

На додаток до діелектричних властивостей і густини, властивості самоіонізації води також залежать від температури. Константа дисоціації води збільшується двома блоками від  $1,0 \times 10^{-14}$  при 25 °С до  $1,2 \times 10^{-12}$  при 350 °С, з максимальним значенням  $4,9 \times 10^{-12}$  при 250 °С. Це означає, що рН змінюється від 7,0 до 5,5, а іонна сила гідроксонію і гідроксид-іонів значно вища при 250 °С, ніж при температурі навколишнього середовища.

Хімічні та фізичні властивості, описані вище, відносяться в основному до термодинамічних властивостей розчинника, яким є гаряча вода, що знаходиться під тиском. Крім того, є кілька властивостей, які впливають на властивості масопередачі в рідкій воді; в тому числі в'язкість, теплопередача і поверхневий натяг, які також залежать від температури води

Коефіцієнт дифузії сполук, що екстрагуються в рідину, залежить від в'язкості. Очевидно, що коефіцієнт дифузії зростає з підвищенням температури і зменшенням в'язкості. Значення коефіцієнта самодифузії збільшується в 10 разів при збільшенні температури від 25 до до 200 °С і приблизно в 100 разів - в критичній точці (374 °С), ніж в звичайних умовах.

Поверхневий натяг води при контакті з повітрям зменшується при збільшенні її температури. Порівняння поверхневого натягу при 25 і 200 °С показує, що його значення зменшується практично на 50%. У критичній точці поверхневий натяг дорівнює 0. Зменшення поверхневого натягу при субкритичному екстрагуванні призводить до кращого змочування зразка за рахунок збільшення площі контакту між екстрагентом і структурою речовини, що, в свою чергу, призводить до більш повної екстракції.

Такі істотні зміни, що відбуваються з фізико-хімічними властивостями води при збільшенні тиску і температури дозволяють нам сформулювати основні переваги СКВ як розчинника: поєднання властивостей газів при високому тиску (низька в'язкість, високий коефіцієнт дифузії) і рідин (висока розчинююча здатність); поєднання гранично малого міжфазного натягу з

низькою в'язкістю і високим коефіцієнтом дифузії, що дозволяє СКВ проникати в пористі структури легше в порівнянні з рідинами; висока чутливість розчинюючої здатності СКВ до зміни тиску або температури; простота поділу СКВ і розчинених в ній речовин при скиданні тиску; технологічна і екологічна безпека виробництва; низька собівартість.

Використання СКВ замість органічних розчинників підвищує екологічну безпеку виробництв, а також ступінь чистоти одержуваних продуктів, враховуючи відсутність в них слідів токсичних органічних розчинників і домішок, що містяться в них; проявляє хімічну інертність до вилучених речовин.

#### 1.4. Екстрагування біологічно активних речовин з листя обліпихи

В останні роки виник широкий інтерес до пошуку природного сполуки, які зазвичай можуть замінити синтетичні антиоксиданти використовується в харчових продуктах, таких як бутильований гідрокситолуол (ВНТ) і бутильований гідроксианізол (ВНА), через його можливу токсичність та через підозру на дії як каталізаторів канцерогенезу [33]. У цьому контексті є деякі дослідження повідомив про використання трав і спецій, які зазвичай використовуються як їжа інгредієнти для ароматизації різних видів харчових продуктів, з вони містять широкий спектр сполук, які можуть бути корисними вплив на здоров'я. Також кілька досліджень показали, що рослини мають потужні антиоксиданти у вигляді вітамінів, флавоноїдів та інших фенольні сполуки, які діють як поглиначі вільних радикалів і інгібітори перекисного окислення ліпідів [32]. Серед різних рослин з антиоксидантною активністю, обліпиха (*Hippophae rhamnoides L., Elaeagnaceae*) набула великого значення як універсальна харчова культура з різноманітним застосуванням, починаючи з контролю ерозія ґрунту є джерелом корму для коней, поживних продуктів харчування, ліки та засоби по догляду за шкірою [43]. Ця рослина родом з Свразії і був одомашнений у кількох країнах (Індія, Китай, Непал, Пакистан, М'янма, Росія, Великобританія, Німеччина, Фінляндія, Румунія, Франція тощо)

на висоті 2500–4300 м. Різні частини цієї рослини використовуються в традиційних ліки для лікування таких захворювань, як грип, серцево–судинні захворювання, травми слизових оболонок та шкірні розлади [32, 44]. Різні дослідження алкогольних та гідроалкогольних екстрактів плодів, насіння та листя обліпиха підтвердила її лікувальну та харчову цінність [32, 45]. Усі частини цієї дивовижної рослини вважаються а хороше джерело великої кількості біоактивних сполук, у т.ч каротиноїди, токофероли, стерини, флавоноїди, ліпіди, вітаміни, дубильні речовини, мінерали тощо [32, 46], які сприяють її широке застосування як природний антиоксидант.

За останні роки було опубліковано багато статей про застосування різних методів екстрагування біологічно активних сполук з рослин, в тому числі, і з обліпихи. Проте, наскільки нам відомо, відсутні дослідження, які могли б проілюструвати доцільність та перспективність використання екстрагування субкритичною водою, як швидкої та ефективний інструмент екстракції, для вилучення біологічно активних речовин з потужною антиоксидантною активністю з листя обліпихи.

Аналіз наявної інформації свідчить, що робота, спрямована на удосконалення технології вилучення біологічно активних речовин з листя обліпихи для продуктів функціонального призначення є актуальною.

## РОЗДІЛ 2

### 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

#### 2.1. Організація проведення експериментальних досліджень

Експериментальні дослідження з отримання екстрактів з листя обліпихи були проведені у міжкафедральній науково-дослідній лабораторії «Субкритичні технології у харчових виробництвах» ПДАУ.

Дослідження з використанням ВЕРХ було проведено на фармацевтичному підприємстві м. Харкова.

Аналіз хімічного складу отриманих екстрактів та їх антиоксидантної активності було визначено з використанням стандартних методик з деякими поправками.

#### 2.2. Рослинний матеріал та його підготовка до досліджень

Листя обліпихи (*Hippophae Rhamnoides*) сорту «Алей» збирали в Шишацькому районі Полтавської області влітку 2021 року. Концентрація білка в листках коливалася від 20,97% до 24,03%. Вміст жиру становив 3,66% і 0,95%; концентрація вуглеводів коливалася від 4,14% до 8,06%; концентрація крохмалю коливалася від 7,59 до 12,59%. Слід зазначити, що вміст даних показників не сильно відрізнявся між чоловічими і жіночими рослинами.

Зібрані листя інспектували, промивали у проточній воді та висушували у сушильній шафі при температурі 90-95 °С протягом 8 годин. При цьому забезпечували вміст остаточної вологи на рівні 4%.

#### 2.3. Апаратурне забезпечення досліджень

При проведенні експериментальних досліджень було використано наступне обладнання: перколятор електричний лабораторний, Сокслет-екстрактор та реактор високого тиску РВД-2-250 для екстрагування субкритичною водою.

Для екстрагування сировини у середовищі субкритичної води було використано реактор високого тиску РВД-2-500, що забезпечує наступні параметри екстрагування: температура – до 220 °С, тиск – до 20 МПа. Екстрагування проводили згідно з діючими документами з експлуатації даного обладнання.

## **2.4. Методи екстрагування**

### **2.4.1. Мацерація**

100 г порошкоподібного зразка листя обліпихи замочували 500 мл дистильованої води кімнатної температури (25 °С). Через 24 год надосадову рідину зливали, фільтрували через тканину з мусліну та зберігали у пляшка бурштинового кольору. Розчин центрифугували при 8000 об/хв протягом 10 хв. Нарешті, розчин надосадової рідини ліофілізували і висушений екстракт зберігали при 5 °С для подальших досліджень.

### **2.4.2. Сокслет - екстрагування**

Екстрагували 100 г порошкоподібного зразка листя обліпихи з 350 мл 70% етанолу протягом 6–10 годин в апараті Сокслета при температурах 30, 50 та 80 °С. Екстракт фільтрували, а вміст спирту в екстракті випарювали при температурі 40 °С. Нарешті, розчин надосадової рідини ліофілізували і висушений екстракт зберігали при 5 °С для подальшого дослідження.

### **2.4.3. Екстрагування субкритичною водою**

Для екстрагування сировини у середовищі субкритичної води було використано реактор високого тиску РВД-2-500, що забезпечує наступні параметри екстрагування: температура – до 220 °С, тиск – до 20 МПа. Екстрагування проводили згідно з Керівництвом з експлуатації реактора високого тиску РВД-2-500.

### 2.5. Методика визначення загального вмісту фенолів

Загальний вміст фенолів в екстрактах визначали методом Фолина Чехольтеу з поправками, наведеними у роботі [47]. 150 л екстракту змішували з 2400 л бідистильованої води та 150 л 0,25 N реагенту Фолина – Чехольтеу і добре перемішали. Потім суміші давали прореагувати протягом 3 хв. Додали 300 л 1N розчину  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  і добре перемішали. Цей розчин інкубували при кімнатній температурі в темряві протягом 2 год. Поглинання вимірювали при 725 нм за допомогою спектрофотометра і результати виражали в міліграмах галової кислоти еквівалентів (GAE) на 1 грам екстракту.

### 2.6. Методика визначення загального вмісту флавоноїдів

Загальний вміст флавоноїдів визначали наступним чином [48]. 1,0 мл аліквоти відповідним чином розведеного зразка змішували з 2 мл дистильованої води, а потім з 0,15 мл 5% розчину  $\text{NaNO}_2$ . Через 6 хв відстоювання до 0,15 мл 10%  $\text{AlCl}_3$  розчину додавали 2 мл 4% розчину  $\text{NaOH}$ . Потім суміш ретельно перемішували. Розчини витримували 30 хв і вимірювали оптичну густина на спектрофотометрі за довжини хвилі 760 нм у кюветі з товщиною шару 10,0 мм. Усі значення були виражені у міліграмах рутину еквівалентів на грам сухої сировини.

### 2.7. Дослідження високоефективною рідинною хроматографією (ВЕРХ)

Враховуючи той факт, що при субкритичному екстрагуванні відбуваються суттєві зміни показників властивостей води (константи дисоціації, відносної статичної діелектричної проникності, дипольного моменту, поверхневого натягу та коефіцієнту самодифузії), для ідентифікації та кількісної оцінки сполук, вилучених при екстрагуванні різними методами, було використано зворотньо-фазову ВЕРХ (англ. RP-HPLC від англ. Reversed Phase — зворотня фаза), що проводиться з використанням неполярної стаціонарної фази та полярних (водних) розчинників. Стаціонарна фаза — це

звичайний силікагель, поверхня якої була модифікована з  $RMe_2SiCl$ , де R — пряма цепочка алкилових груп, таких як  $C_{18}H_{37}$  або  $C_8H_{17}$ .

Система ВЕРХ складалася з системи ВЕРХ Waters (Waters Corporation, США), оснащеного насосом HPLC Waters 515, Waters 717 плюс та УФ-детектор Waters 2487, взаємозв'язані з персональним комп'ютером. Розділення аналізованих сполук була виконано на Symmetry C18 250 4,6 мм ID; Колонка 5 лм (Waters, США) шляхом підтримки градієнтної витрати 0,75 мл/хв рухливої фази (розчин А; вода: О-фосфорна кислота 99,7: 0,3 та розчин В; ацетонітрил: метанол 75:25) та піки були виявлені при 370 нм.

Ідентифікація сполук була виконана на основі часу утримання та спектральної відповідності стандартам. Для підготовки калібрування крива, стандартні вихідні розчини сполук (1 мг/2 мл) готували в метанолі, фільтрували через фільтри 0,22 мкм (Millipore) та відповідним чином розведений (0,01–100 мг/мл) для отримання бажаних концентрацій в діапазоні кількісного визначення. Калібрувальні графіки були побудовані після лінійної регресії площ піків проти концентрацій.

## **2.8. Визначення антиоксидантної активності екстрактів**

### **2.8.1. Аналіз DPPH**

У дослідженні була використана методика аналізу, описана у роботі [47]. Основний розчин готували шляхом розчинення 24 мг DPPH в 100 мл метанолу і потім зберігають при температурі 20 °С до необхідності. Робочий розчин отримували шляхом змішування 10 мл основного розчину з 45 мл метанолу для отримання поглинання  $1,10 \pm 0,02$  одиниць при 515 нм за допомогою спектрофотометра. 150 л екстракту кореня розчину давали реагувати з 2850 л розчину DPPH протягом 2 годин у темряві. Потім поглинання приймали при 515 нм. Стандартна крива була лінійною між 25 і 200 частинами на мільйон Тролоксу. Результати виражаються в мг Тролокс еквівалент/г сухої сировини.

### 2.8.2. Аналіз FRAP

Важливий показник якості харчових продуктів, - узагальнена антиоксидантна активність (АОА). Цей інтегральний показник, виражений у перерахунку на стандартну речовину  $X_{ст}$ , є приблизною оцінкою сумарного змісту антиоксидантів, переважно поліфенолів [47, 49, 50]. Той самий показник нерідко називають антиоксидантною ємністю (ТАС). Для визначення даного показника нерідко використовують метод FRAP, заснованим на відновленні заліза (III) поліфенолами у присутності лігандів R, що дають пофарбовані комплекси з  $Fe^{2+}$  іонами. Аналітичний сигнал ( $A_{\Sigma}$ ), що виникає, вимірюють у видимій області спектру через  $\tau$  хвилин після змішування розчинів. Показник АОА ( $c^*$ ) знаходять за градувальним графіком, побудованим за розчинами  $X_{ст}$  (тролокс, кверцетин, галова або аскорбінова кислота). За великого надлишку  $Fe(III)$  сигнали поліфенолів адитивні, тому за величиною АОА можна будувати висновки про сумарному змісті поліфенолів ( $c_{\Sigma}$ ) [50].

В нашому випадку, як модельні сполуки застосовували кверцетин, рутин та галову кислоту. Оптичну густину вимірювали при 520 нм через 60 хвилин після змішування реагентів.

Вихідні розчини включали 300 мМ ацетатного буферу (3,1 г.  $C_2H_3NaO_2 \cdot 3H_2O$  та 16 мл  $C_2H_4O_2$ ), рН 3,6, 10 мМ ТРТЗ (2,4,6-трипіридил-розчин s-триазину) у 40 мМ  $HCl$  та 20 мМ  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  розчин. Свіжий робочий розчин готували шляхом перемішування 25 мл ацетатного буфера, 2,5 мл розчину ТРТЗ і 2,5 мл розчину  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ , а потім нагрівали при 37 °С перед використанням. 150 мл екстракту давали реагувати з 2850 мл FRAP розчину протягом 30 хв у темному стані. Показання забарвленого продукту [трипіридилтриазинового комплексу заліза] знімали при 593 нм. Стандартна крива була лінійною між 25 і 150 ppm Тролокс. Результати виражені в мг Тролокс еквівалент/г сухої сировини.

### 2.8.3. Визначення загальної зменшувальної потужності екстрактів

Загальну зменшувальну потужність екстрактів як показник зменшення їх антиоксидантної здатності визначали за допомогою аналізів CUPRAC [48]. При даному методі CUPRAC виміряли зменшувальну потужність складових зразків, що стосується їх здатності передавати електрон. Для цього, змішували 1,0 мл розчину екстракту листя (0,2–1,0 мг/мл) з 2,5 мл 0,2 М фосфатного буфера (рН 6,6) та 2,5 мл а 1% (мас./Об.) розчину фериціаніду калію. Суміш інкубували на водяній бані при 50 °С протягом 20 хв., потім додавали 2,5 мл 10% (мас./об.) розчину трихлоруксусної кислоти і далі суміш центрифугували при 3000 об/хв протягом 10 хв. Аліквоту 2,5 мл верхнього шару об'єднували з 2,5 мл дистильованої води і 0,5 мл 0,1% (мас./об.) розчину хлориду заліза та абсорбцію вимірювали спектрофотометрією при 700 нм. Вітамін С використовується для стандартного графіка.

### 2.9. Статистичний аналіз

Повторність експериментальних досліджень - трикратна, якщо не вказано інше. Статистичний аналіз експериментальних даних проводили з використанням статистичної програми Excel. Статистичний аналіз проводили під значущим рівнем 0,05 для всіх результатів.

### 3. РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

#### 3.1. Проведення експериментальних досліджень

При проведенні експериментальних досліджень було використано наступне обладнання: перколятор електричний лабораторний (рис. 3.1), Сокслет-екстрактор (рис. 3.2) та реактор високого тиску РВД-2-250 для екстрагування субкритичною водою (рис. 3.3 та 3.4).



*Рис. 3.1. Перколятор електричний лабораторний*



*Рис. 3.2. Сокслет-екстрактор*

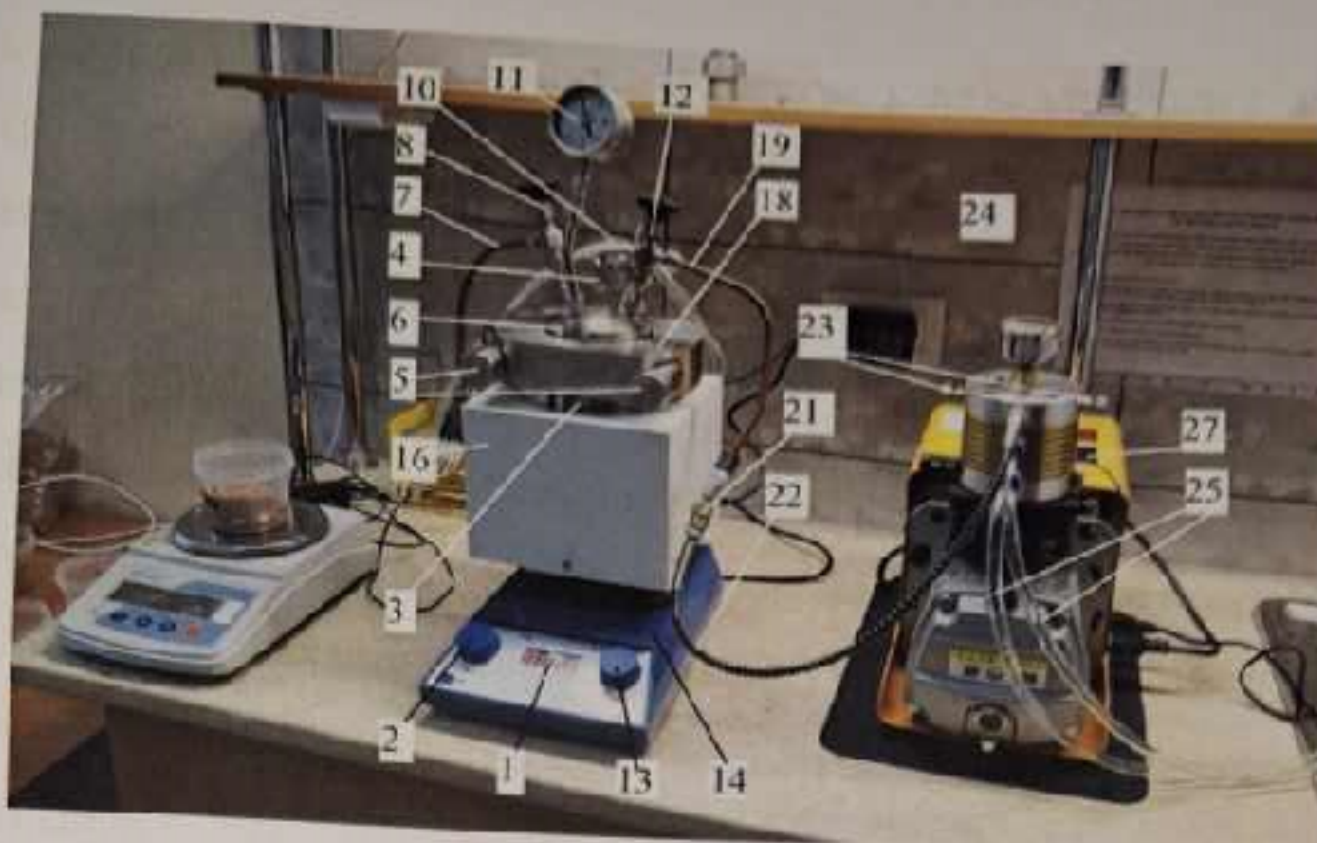


Рис. 3.3. Фотографічне зображення установки для отримання екстрактів в середовищі субкритичної води

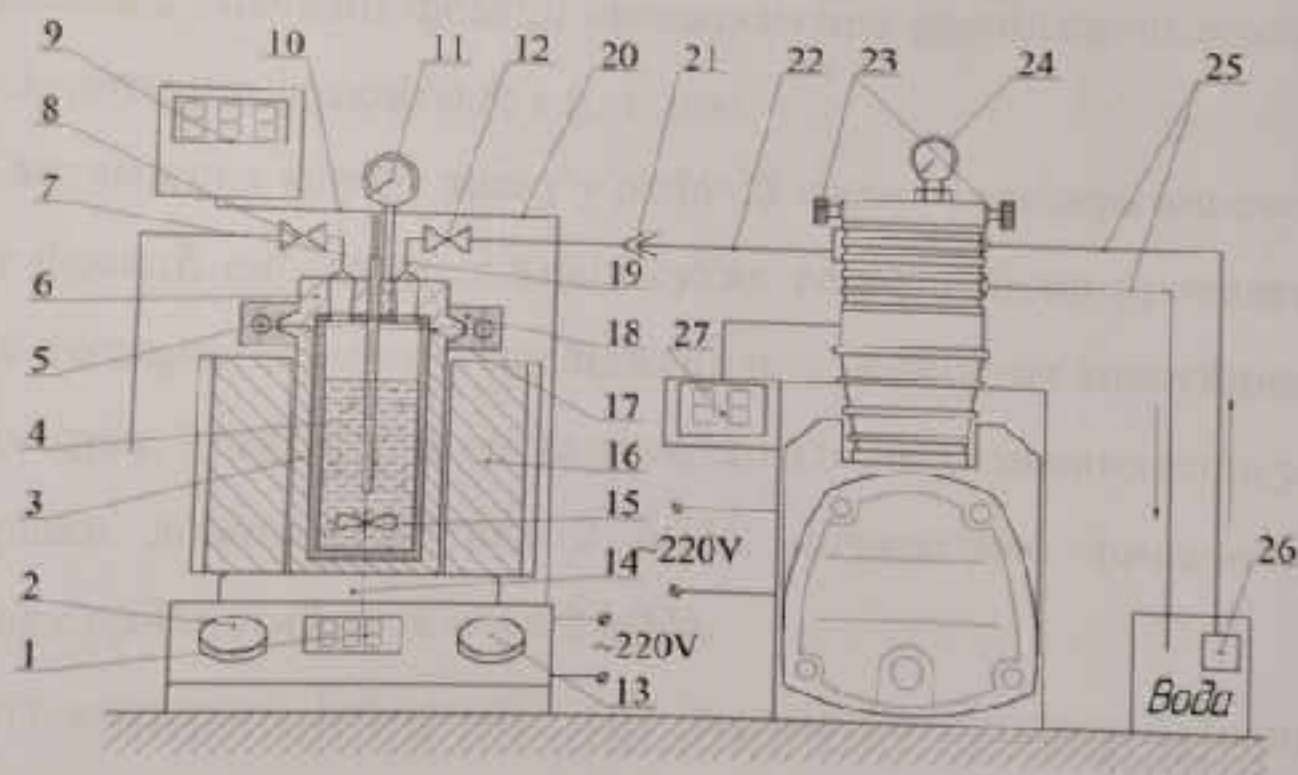


Рис. 3.4. Принципова схема установки для отримання екстрактів в середовищі субкритичної води

1 - дисплей магнітної мішалки; 2 - регулятором температури; 3 - стакан реактора; 4 - термопара; 5 - гвинти; 6 - кришка стакану реактора; 7 - спускний канал; 8 - вентиль спускного каналу; 9 - додатковий датчик температур; 10 - провід додаткового датчика температури; 11 - манометр реактора; 12 - вентиль впускного каналу; 13 - регулятор магнітної мішалки; 14 - магнітна мішалка з підігрівом; 15 - елемент магнітної мішалки; 16 - термоблок; 17 - прокладка фторопластова; 18 - хомут; 19 - впускний канал; 20 - провід основного датчика температури; 21 - з'єднання високого тиску; 22 - шланг високого тиску; 23 - спускні гвинти компресора; 24 - манометр компресора; 25 - водопровід охолодження; 26 - насос системи охолодження компресора; 27 - датчик температури компресора.

Порівняльний аналіз технологій екстрагування методами мацерації, Сокслета та субкритичною водою показав, що кожній з цих технологій притаманні свої раціональні параметри екстрагування, що забезпечують максимальний вихід цільових речовин (Розділ 1).

Аналіз апріорної інформації дозволив нам визначити діапазон варіювання параметрів екстрагування для кожного з досліджуваних методів.

Так, тривалість екстрагування методом мацерації може продовжуватися до 24 годин. Використання Сокслет - апарату дозволяє скоротити тривалість екстрагування до 8 -10 годин і тривалість екстрагування субкритичною водою – до 30 хвилин.

Температура екстрагування мацерацією та у Сокслет - апараті – кімнатна, 25 °С.

Раціональні значення фракції визначали при дослідженні виходу сухих речовин з 3- розмірів фракції 0,5; 1,0; 1,5мм.

Для визначення впливу тиску у робочій камері реактора високого тиску та розміру фракції сировини та вихід сухих речовин було проведено серію попередніх експериментальних досліджень при незмінних значеннях перших трьох параметрів. Враховуючи обставини, що для знаходження води у рідкому стані потрібен додатковий тиск 2 МПа, початковою точкою у даних дослідженнях прийнятий тиск саме 2 МПа.

Аналіз апріорної інформації про параметри процесу субкритичного екстрагування біологічно активних речовин з рослинної сировини дозволив визначити діапазон варіювання параметрів процесу екстрагування з листя облепихи: температура – від 125 до 200 °С; тривалість процесу – від 15 до 30 хв.; розмір фракції –  $0,5 \pm 0,1$  мм; тиск – 4-8 МПа; гідромодуль (співвідношення маси сировини до маси розчинника) – від 1: 15 до 1: 25.

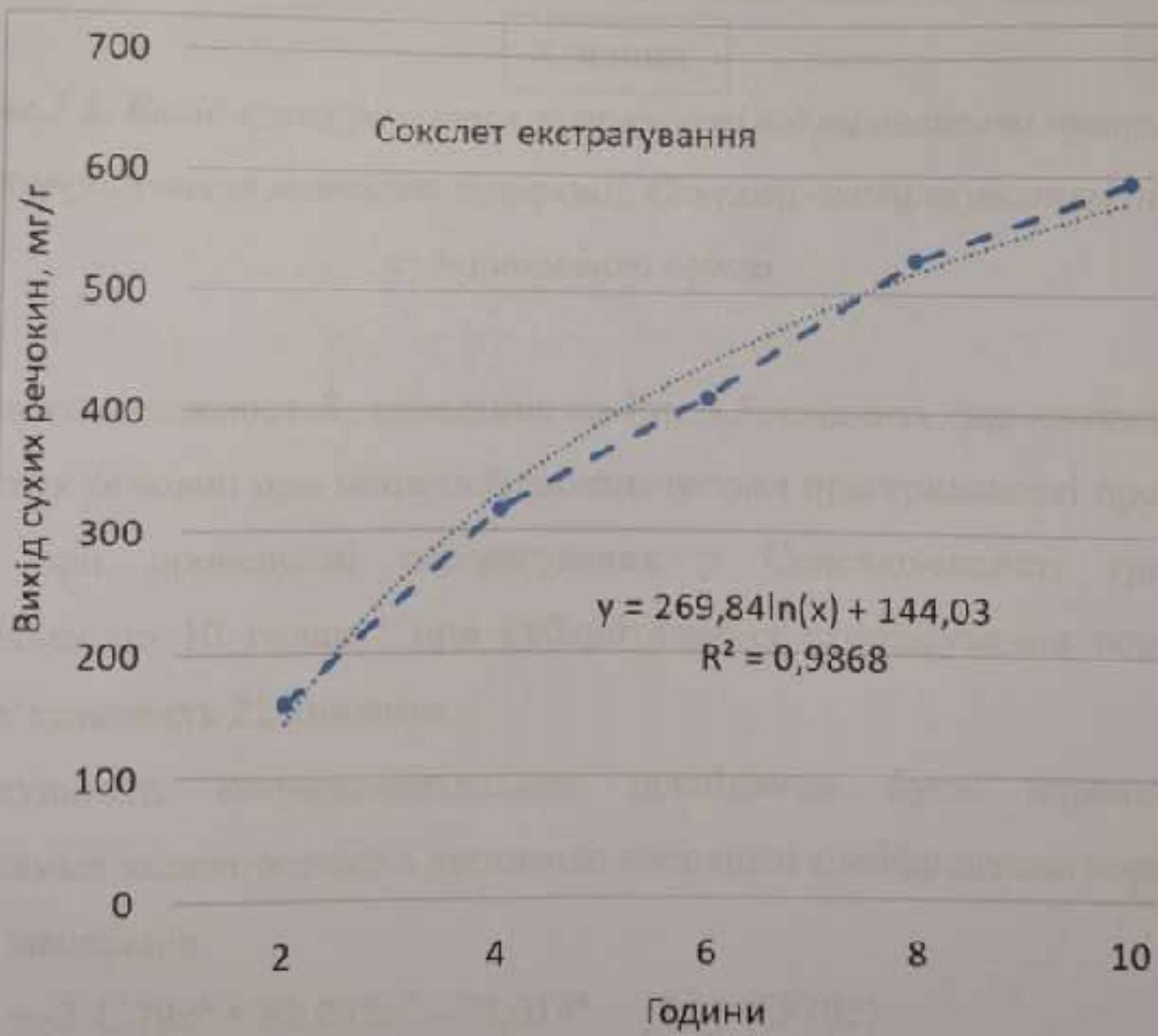
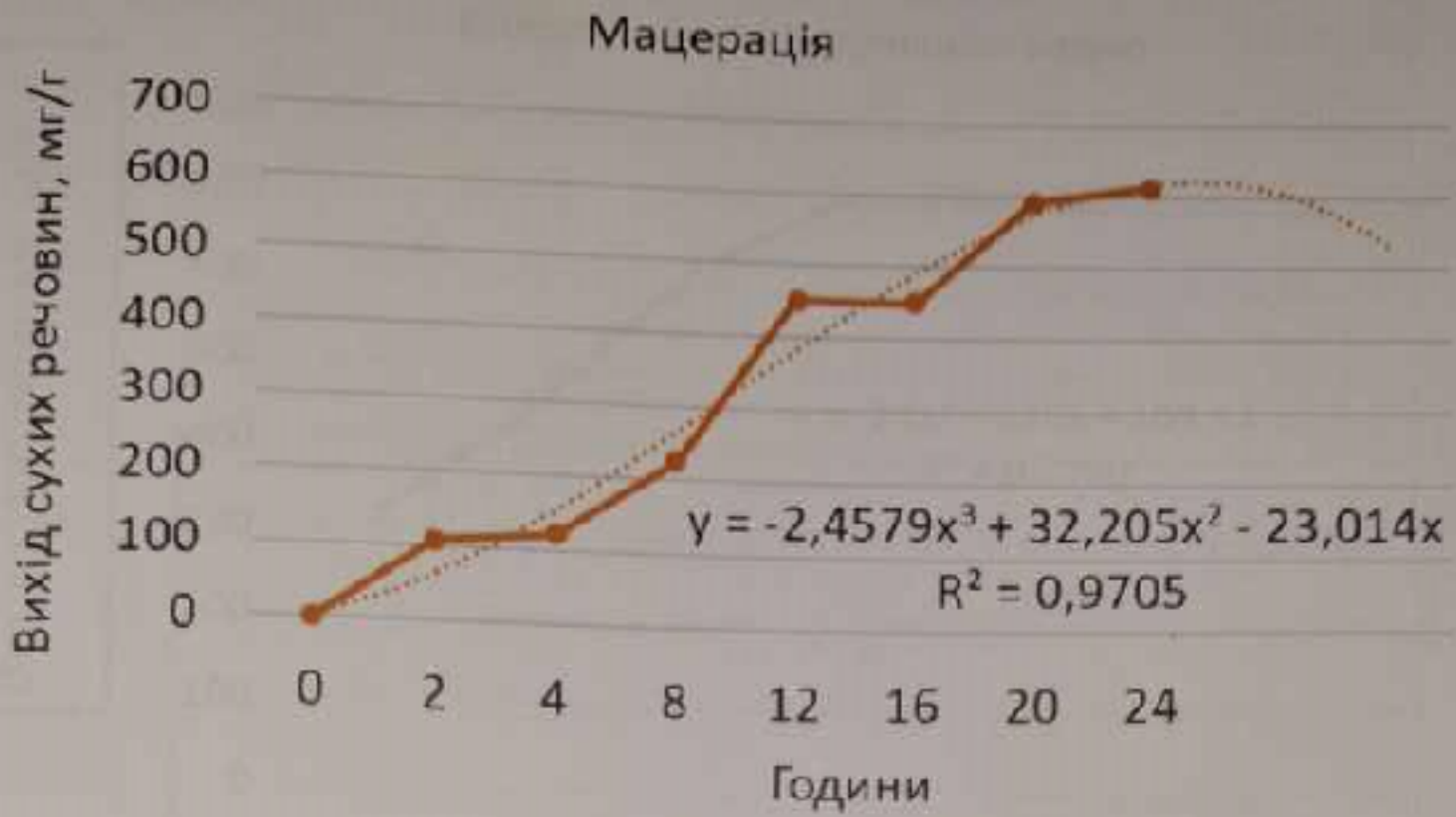
Під час підготовки сировини та екстрагента відміряти на вагах задану вимогами експерименту порцію сировини; деіонізовану або бідистильовану воду розігріти до 95 °С, відміряти на вагах необхідну кількість для заданого гідромодуля.

Підготовку реактора проводили згідно з Керівництвом з експлуатації на даний прилад.

Задану кількість сировини засипали у робочу камеру реактора, доливали необхідну кількість реагенту (вода) та герметично фіксували кришку реактора. Насосом високого тиску забезпечували необхідні параметри тиску, включали розігрів робочої камери та магнітну мішалку. На протязі заданої тривалості екстрагування підтримували необхідні значення температури та тиску у робочій камері. Після закінчення встановленої тривалості екстрагування вимикали підігрів робочої камери та після охолодження робочої камери до температури нижчої  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  повільно спустити тиск з робочої камери та відкривали кришку та зливали отриманий екстракт.

### 3.2. Дослідження виходу сухих речовин при різних методах екстрагування та визначення раціональних параметрів для кожного з методів

Найважливіший фактор, на який слід звернути увагу, є температура екстрагування. Саме температура у цьому типі екстрагування суттєво впливає на діелектричну проникність. Цей параметр можна легко модулювати в межах широкого діапазону діапазон значень, лише налаштувавши температуру витяжки. Вода при кімнатній температурі є дуже полярним розчинником, з діелектричною проникністю майже до 80. Однак цей рівень можна значно знизити до значень, близьких до 27, коли вода нагрівається до  $250\text{ }^{\circ}\text{C}$  підтримуючи рідкий стан, застосовуючи тиск. Ця діелектрична проникність значення є подібним до значення етанолу, тому є відповідним для розчинення менш полярних сполук [33, 51].



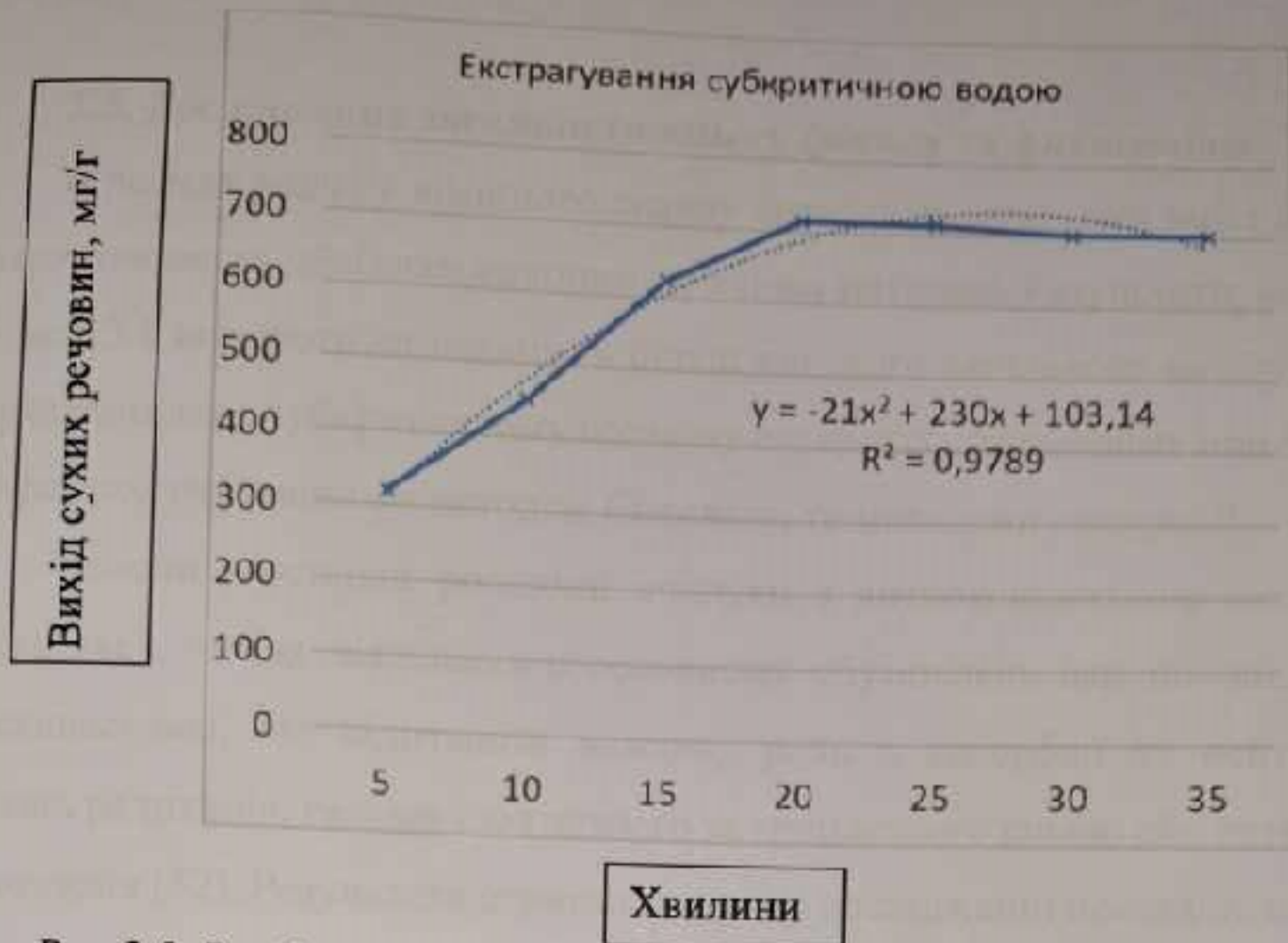


Рис.3.5. Вихід сухих речовин в залежності від тривалості процесу екстрагування методом мацерації, Сокслет-екстрагуванням та субкритичною водою

Аналіз залежностей, наведених на Рис.3.5, свідчить, що максимальний вихід сухих речовин при мацерації забезпечується при тривалості процесу 24 години, при проведенні екстрагування у Сокслет-апараті тривалість зменшується до 10 годин і при субкритичному екстрагування водою цей показник становить 22 хвилини.

Результати експериментальних досліджень були апроксимовані теоретичними залежностями з достатньо високими коефіцієнтами кореляції:

- мацерація

$$y = -2,4579x^3 + 32,205x^2 - 23,014x \quad (R^2 = 0,9705) \quad (3.1)$$

- Сокслет-екстрагування

$$y = 269,84 \ln(x) + 144,03 \quad (R^2 = 0,9868) \quad (3.2)$$

- екстрагування субкритичною водою

$$y = -21x^2 + 230x + 103,14 \quad (R^2 = 0,9789) \quad (3.3)$$

### 3.3. Дослідження загального вмісту фенолу та флавоноїдів

В рамках аналізу хімічного складу визначали загальний вміст фенолу в екстрактах листя обліпихи колориметричним методом. Результати, наведені в таблиці 3.1 вказують на наявність більш високого загального вмісту фенолів та флавоноїдів у субкритичному водному екстракті, отриманому при 150 °C та екстрактах, отриманими методом Сокслета, та методами мацерації.

Феноли - основні рослинні сполуки з антиоксидантною активністю. Вважається, що ця діяльність в основному обумовлена окисно -відновними властивостями, які відіграють важливу роль в адсорбції та нейтралізації вільних радикалів, гасіння синглетного та триплетного кисню або розкладання пероксидів [52]. Результати отримані в цьому дослідженні показали, що рівень цих фенольних сполук в екстрактах листя обліпихи було значним. Ці результати переконливо свідчать про те, що феноли є важливими компонентами цієї рослини, і деякі його фармакологічні ефекти можуть бути пояснюється наявністю цих цінних складових.

Флавоноїди утворюють клас похідних бензо-с-пірону, включаючи флавони, флавани, флавоноли, антоціанідини та катехіни. Вони володіють широким спектром біологічної активності, наприклад протиракової, антибактеріальні, протигрибкові, противірусні, спазмолітичні, гіпоглікемічні, антигістамінний та радіозахисний потенціал [53, 54]. Деякі з цих властивостей походять від вільних радикалів-очищення флавоноїдів. Результати цілої низка досліджень свідчать про потужну реакційну здатність флавоноїдів до активного кисню.

У таблиці 3.1 наведено вихід фенолів та флавоноїдів у екстрактах з листя обліпихи у різних умовах екстрагування.

На Рис. 3.6 наведено загальний вміст фенолів у екстрактах, отриманих різними методами екстрагування.

Таблиця 3.1

Визначення загального вмісту фенолу та флавоноїдів у досліджуваних екстрактах

Метод екстрагування	Температура екстрагування, °C	Вихід фенолів, мг/г сухої сировини	Вихід флавоноїдів, мг/г сухої сировини
Мацерація	25±5	28.35 ± 1.31	14.14 ± 1.12
Сокслет	30	43.77 ± 1.72	29.09 ± 1.63
	50	60.22 ± 1.93	39.81 ± 1.79
	80	77.85 ± 2.36	42.93 ± 1.93
Субкритична вода	100	76.07 ± 2.41	47.06 ± 2.15
	150	93.72 ± 2.83	66.03 ± 2.41
	200	86.70 ± 2.53	66.40 ± 2.36

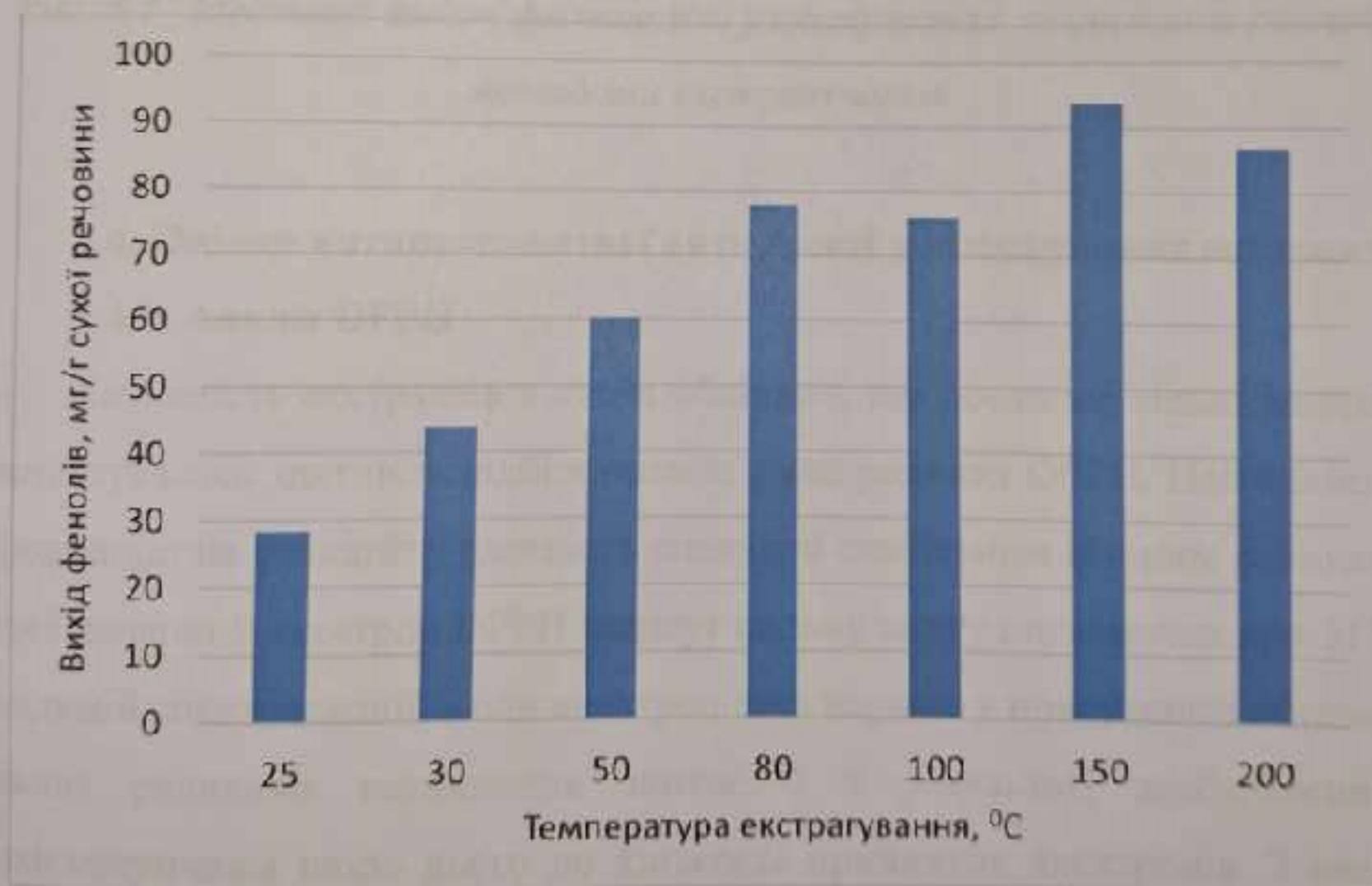
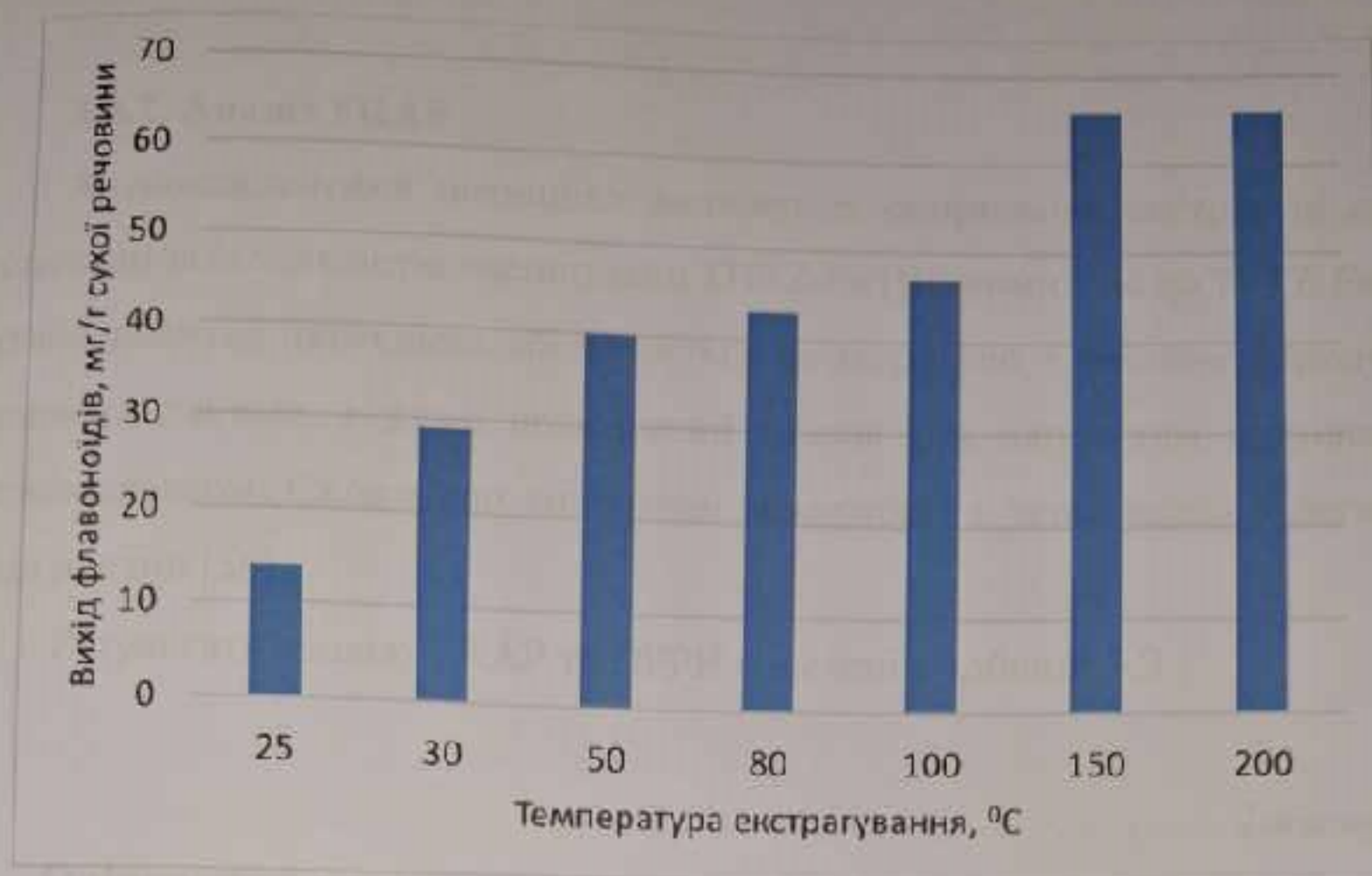


Рис. 3.6. Загальний вміст фенолів у екстрактах, отриманих різними методами екстрагування

На Рис. 3.7 наведено загальний вміст флавоноїдів у екстрактах, отриманих різними методами екстрагування.



*Рис. 3.7. Загальний вміст флавоноїдів у екстрактах, отриманих різними методами екстрагування*

### **3.4. Оцінка антиоксидантної активності досліджуваних екстрактів**

#### **3.4.1. Аналіз DPPH**

Активність екстрактів з листя обліпихи, що поглинає вільні радикали, досліджувалась здатність відбілювати стійкий радикал DPPH. Цей аналіз дає інформацію на реакційну здатність сполук зі стабільним вільним радикалом. Через непарний електрон DPPH показує сильну смугу поглинання при 517 нм у видимій спектроскопії. Коли електрон стає парним у присутності поглиначів вільних радикалів поглинання зникає, і в результаті знебарвлення є стехіометричним щодо цього до кількості прийнятих електронів. З аналізу DPPH в результаті можна припустити, що екстракт з листя обліпихи зменшує радикал до відповідного гідрозин при взаємодії з донорами водню в даних екстрактах. Відбілювання DPPH являє собою здатність екстрактів з листя обліпихи очищати вільні радикали, незалежні від ферментативної активності. Дослідження [55] також підтверджують, що екстракти з листя обліпихи є достатньо ефективними у видаленні радикалів DPPH [55].

### 3.4.2. Аналіз FRAP

Антиоксидантний потенціал водного та спиртового екстрактів листя оцінювали за їх здатністю зменшувати TPTZ-Fe (III) комплекс до TPTZ-Fe (II). Антиоксидантна активність збільшується пропорційно з вмістом фенолу. За останніми даними, є дуже позитивний зв'язок між загальним фенолом та антиоксидантом. Схоже, що аналогічні залежності є тенденцією у багатьох видів рослин [56].

Результати аналізу FRAP та DPPH наведені в таблиці 3.2.

Таблиця 3.2

#### Оцінка антиоксидантної активності досліджуваних екстрактів

Метод екстрагування	Температура екстрагування, °C	DPPH мг екв. Тролоксу/г сухої сировини	FRAP мг екв. Тролоксу/г сухої сировини
Мацерація	25±5	86.35 ± 2.93	93.91 ± 3.72
Сокслет	80	255.87 ± 5.51	217.77 ± 4.29
	30	133.31 ± 5.72	144.99 ± 4.53
	50	164.03 ± 6.28	179.62 ± 5.72
Субкритична вода	100	194.76 ± 6.71	219.03 ± 6.28
	150	353.43 ± 8.75	276.93 ± 7.71
	200	343.86 ± 7.71	261.54 ± 6.12

Отримані значення антиоксидантної здатності еквівалентів Тролоксу (TEAC) для екстрактів, поданих до аналізу FRAP, було в межах 2,03–182,13 мг/г, тоді як значення для аналізу DPPH були в діапазон 6,97–282,75 мг/г. Крім того, вища антиоксидантна активність, що проявляється у субкритичних водних екстрактах (табл. 3.2) у порівнянні з іншими методи екстрагування (Сокслета та мацерації), чітко демонструють перевагу метода субкритичного екстрагування для отримання цілових речовин з високими антиоксидантними сполуками. Тут буде доречно згадати, що інші дослідження, наприклад [52], теж демонстрували кореляцію між вмістом фенолів у рослинних екстрактах до їх антиоксидантної сили.

У нашому дослідженні також була виявлена хороша кореляція між вміст фенолів та антиоксидантною силою екстрактів. Для вимірювання загального вмісту фенолів, поглинання екстрактів з листя обліпихи визначали спектрометрично за методом Фоліна-Чокальте і обчислювали в еквівалентах галової кислоти GAE. Аналіз змісту таблиці 3.2, свідчить, що максимальний загальний вміст фенолу досягається за допомогою субкритичного екстрагування водою, за яким слідує Соклет-екстракти та екстракти, отримані мацерацією, що, очевидно, відповідає зафіксованим показникам антиоксидантної активності.

### 3.5. Порівняльні дослідження зміни потужності екстрактів

Відновлююча сила екстрактів з листя обліпихи, що може служити значним відображенням антиоксидантної активності визначалося з використанням модифікованого аналізу відновлення заліза (III) до заліза (II). У цьому аналізі, жовтий колір тестового розчину змінювався на різні відтінки зеленого і синього, в залежності від відновлюючої сили екстрактів або сполук. Присутність відновлювачів у розчині призводить до відновлення комплексу  $Fe_3^+$ /фериціаніду до двовалентної форми заліза.

Отже,  $Fe_2^+$  можна контролювати вимірюючи утворення берлінського синього кольору Перла на довжині хвилі 700 нм.

Результати експериментальних досліджень наведені у табл. 3.3.

На Рис. 3.8. показано зменшення ефективності екстрактів у порівнянні з ефективністю аскорбінової кислоти. Всі екстракти мали деяке зменшення відновлюючої дії, однак, як і очікувалося, цей показник поступається аскорбіновій кислоті, яка, як відомо, має потужну відновлювану силу.

Між зменшенням спостерігалася лінійна залежність потужності та концентрацією екстрактів із середнім значення  $r^2 = 0,988$  (рис. 3.8). Було виявлено, що відновлювальна здатність екстрактів менша, ніж стандартної аскорбінової кислоти, але помітної різниці серед досліджуваних екстрактів немає.

Таблиця 3.3

## Результати експериментальних досліджень зміни потужності екстрактів

Аскорбінова кислота									
Конц., мг/мл	0,7	1,5	2	8	9	9,5	10,8	17,5	19,9
Поглинання при 700 нм	0,42	0,62	0,72	0,89	0,94	1,2	1,7	2,0	2,4
Екстрагування гарячою водою									
Конц., мг/мл	19	29	36	44	55	72	109	142	
Поглинання при 700 нм	0,1	0,2	0,23	0,23	0,30	0,40	0,55	0,75	
Екстрагування субкритичною водою									
Конц., мг/мл	19	29	36	44	55	72	109	142	
Поглинання при 700 нм	0,12	0,23	0,25	0,31	0,35	0,47	0,70	0,92	

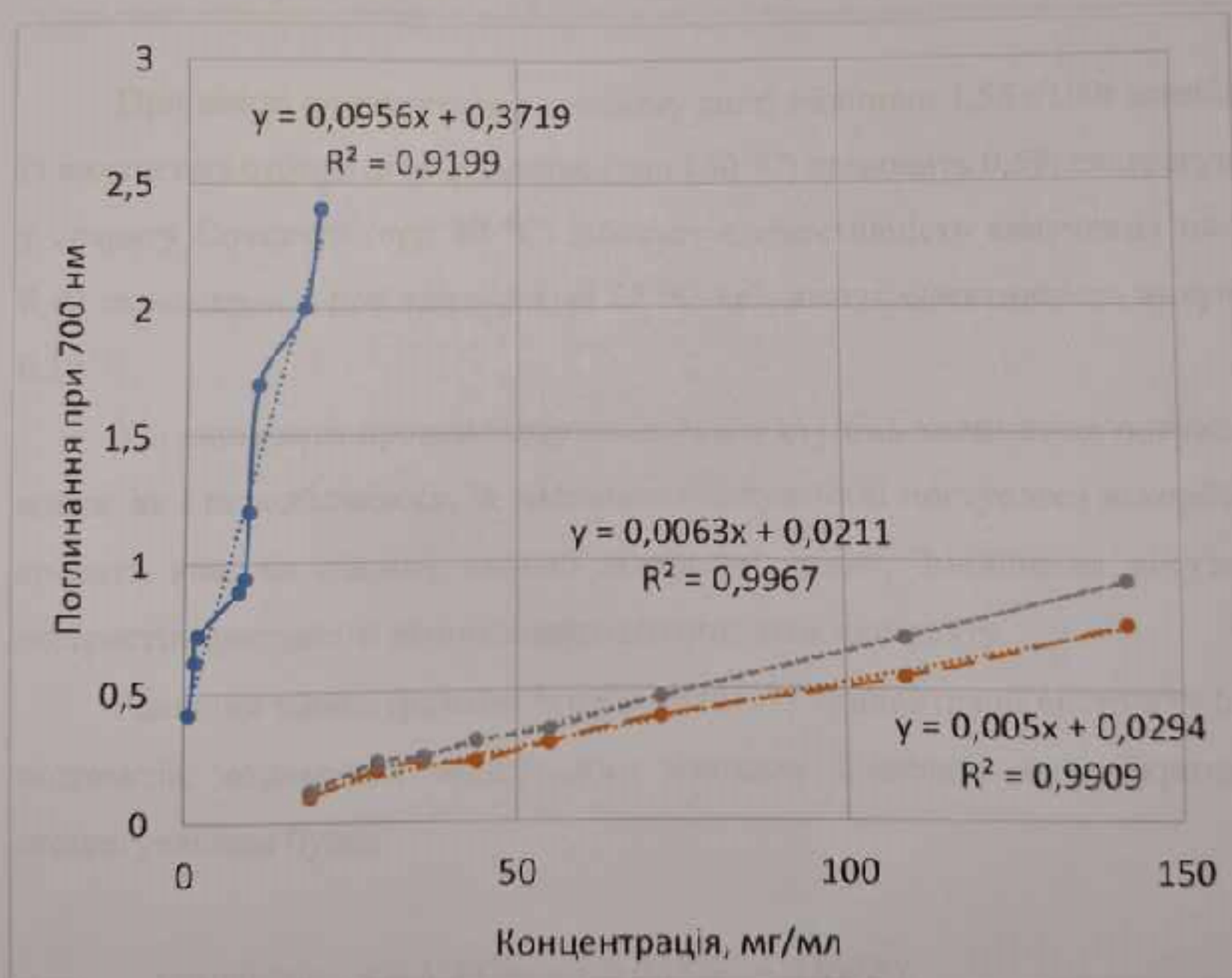


Рис. 3.8. Зменшення сили екстрактів SBT та аскорбінової кислоти.

Таблиця 3.4

Потужність екстрактів з листя обліпихи та аскорбінової кислоти,  
концентрація, мг/мл

Показники	Аскорбінова кислота	Екстракти, отримані різними методами		
		мацерація	сокслет	Субкритична вода
	0,14/0,010	0,15/0,05	0,18/0,05	0,19/0,05
	0,31/0,028	0,33/0,10	0,37/0,10	0,39/0,10
	0,41/0,038	0,48/0,15	0,53/0,15	0,55/0,15
	0,58/0,050	0,64/0,20	0,75/0,20	0,80/0,20

При вмісті поліфенолів в зеленому листі обліпихи 1,58г/100г коефіцієнт їх вилучення субкритичною водою (при 150 °С) становить 0,59; екстрагування у апарату Сокслета (при 80 °С) забезпечує ефективність вилучення на рівні 0,49 та мацерація при температурі 25 °С забезпечує ефективність вилучення 0,18.

Усі екстракти продемонстрували певну ступінь зменшення потужності; однак, як і передбачалося, їх зменшення потужності поступався аскорбіновій кислоті, яка, як відомо, сильно відновлює агент. Зменшення потужності екстрактів зростало зі збільшенням концентрації екстракту.

Рівняння зменшувальної потужності ( $y$ ) і концентрації екстракту ( $x$ ) для екстрактів, отриманих мацерацією, методом Сокслета та субкритичним екстрагуванням були:

$$\text{мацерація} - y = 3,33266x + 0,007 \quad (r^2 = 0,9965), \quad (3.4)$$

$$\text{Сокслет екстрагування} - y = 3,776x - 0,015 \quad (r^2 = 0,9993) \quad (3.5)$$

$$\text{екстрагування субкритичною водою} - y = 3,958x - 0,0125 \quad (r^2 = 0,9987) \quad (3.6)$$

Отримані залежності вказують на те, що зниження здатності добре корелює з концентрацією екстрактів. Буде доречно згадати тут, що існуючі

статті теж демонстрували кореляцію між вмістом фенолів та їх антиоксидантної сили у екстрактах з іншої рослинної сировини. Аналогічним чином, у роботі [52] виявлено хорошу кореляцію між вміст фенолів та антиоксидантну силу екстрактів з рослинної сировини.

Таким чином, зніжуюча сила аскорбінової кислоти, і екстракти з листя обліпихи дотримувалися такого порядку: аскорбінова кислота > субкритична екстракція при 150 °C > Соколет екстрагування при 80 °C > Мацерація при 25 °C.

### 3.6. Ідентифікація та кількісна оцінка сполук за допомогою високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ)



Рис. 3.9. Хроматографічна колонка для проведення зворотньо-фазової ВЕРХ

ЗФ-ВЕРХ працює на принципі гідрофобних взаємодій, які вилучаються із-за високої симетрії в дипольній структурі молекули води і відіграють найважливішу роль у всіх процесах в області науки життя. ЗФ-ВЕРХ дозволяє вимірювати ці сили взаємодії. Зв'язування аналізованої речовини з

стаціонарною (нерухомою) фазою пропорційної площі поверхні контакту навколо неполярного сегмента молекули аналізованого речовини з лігандом стаціонарної фази. Над цим сольвофобним ефектом домінує сила води «за зменшенням поверхні» навколо аналізованого речовини та цепочки  $S_{18}$  відповідно до комплексу їх обох. Енергія, що при цьому вивільняється, пропорційна поверхневому натягу елюента (вода:  $7,3 \times 10^{-6}$  Дж/см<sup>2</sup>, метанол:  $2,2 \times 10^{-6}$  Дж/см<sup>2</sup>) і гідрофобній поверхні аналізованої речовини та ліганди відповідно. Утримання речовин у колонці може бути зменшеним шляхом додавання менш полярного розчинника (метанол, ацетонітрил) у рухливій фазі для того, щоб зменшити поверхневий натяг води. Градієнтні розчинники використовують цей ефект автоматичного зменшення полярності та поверхневого натягу водної рухомої фази під час проведення аналізу [57].

Структурні властивості молекули аналізованого речовини відіграють важливу роль в характеристиках її утримання на стаційній фазі. В загальному, аналізується речовина з великою гідрофобною частиною (S-N, S-S і, зазвичай, неполярні атомні зв'язки, такі як S-S та інші) міститься більше, тому що воно не взаємодіє з водною поверхнею. З іншого боку, аналізовані речовини з великими полярними частинами у своїй структурі (імеючи в своїй структурі полярні групи, такі як -OH, -NH<sub>2</sub>, COO- або -NH<sub>3</sub><sup>+</sup>) утримуються менше, так як вони краще зв'язуються з водою. Подібні взаємодії можуть піддаватися стеричним ефектам: дуже великі молекули можуть мати лише обмежений доступ до порам стаційної фази, де проходять взаємодії з поверхневими лігандами (аксіальними цепочками). Подібне препятствие поверхні зазвичай призводить до скорочення утримання [58].

Час утримання збільшується зі збільшенням площі гідрофобної (неполярної) поверхні. Речовини з розгалуженими ланцюжками вимиваються набагато швидше, чим їх відповідні лінійні ізомери, тому що загальна площа поверхні зменшується. Не залежить від поверхневого натягу подвижної фази (організаційна сила в структурі елюента), інші характеристики мобільної фази можуть впливати на час утримання аналізованої речовини.

В даному випадку, для розвитку ефективної мобільної фази, різних систем розчинників, у т.ч. різні комбінації метанолу та води випробували ортофосфорну кислоту. Була використана система розчинників що складається з 0,3% ортофосфорної кислоти у воді та ацетонітрилу: метанол (75:25) виявився успішним, оскільки він дозволив поділити пікові сполуки з хорошою розділяючою здатністю. В екстрактах було ідентифіковано кверцетин-3-галактозид, кемпферол та ізорамнетин, які сприяють антиоксидантним властивостям екстрактів. Ідентифікація сполуки проводили на основі часу утримання, спів ін'єкцій та спектрального узгодження зі стандартом. Для кількісної оцінки, стандартні вихідні розчини кверцетину-3-галактозиду, кемпферолу і ізорамнетин (1 мг/2 мл) готували в етанолі, фільтрували через фільтри 0,22 лм (Millipore) та розбавляли (0,01–100 мкг/мл) для отримання бажаних концентрацій для кількісного визначення.

Результати, наведені в таблиці 3.5, вказують на наявність більш високого вмісту кверцетину-3-галактозиду, кемпферолу та ізорамнетину у субкритичному водному екстракті, отриманому при 150 °С, після чого екстракти, отримані методами Сокслета та методом мацерації.

Таблиця 3.5

**Визначення кверцетин-3-галактозиду, кемпферолу та ізорамнетину в  
листочках обліпихи методом ВЕРХ**

Метод екстрагування	Температура екстрагування, °С	Кверцетин-3-галактозид, мг/г сухої сировини	Кемпферол, мг/г сухої сировини	Ізорамнетин, мг/г сухої сировини
Мацерація	25±5	41.21 ± 2.71	23.72 ± 1.32	27.91 ± 2.1
Сокслет	80	58.34 ± 3.72	25.54 ± 1.72	65.69 ± 3.73
	30	176.26 ± 5.72	10.74 ± 1.53	52.92 ± 3.72
	50	233.52 ± 6.28	11.24 ± 2.71	83.31 ± 3.21
Субкритична вода	100	263.17 ± 6.71	19.62 ± 1.71	92.92 ± 4.28
	150	423.39 ± 8.75	46.43 ± 2.28	112.65 ± 5.75
	200	169.86 ± 7.71	20.44 ± 2.12	24.41 ± 1.71

Аналіз результатів експериментальних досліджень дозволяють констатувати, що удосконалення технології вилучення біологічно активних речовин з листя обліпихи для продуктів функціонального призначення можливо лише за рахунок використання технології екстрагування у середовищі субкритичної води.

Екстрагування листя обліпихи при параметрах процесу: температура – 150 0С; тривалість екстрагування – 22 хвилини; розмір фракції –  $0,5 \pm 0,1$  мм; тиск – 4-8 МПа; гідромодуль (співвідношення маси сировини до маси розчинника) – 1: 20. Використання даних параметрів забезпечує отримання екстрактів з наступними властивостями: вміст фенолів, мг/г сухої сировини -  $93.72 \pm 2.83$ , вміст флавоноїдів, мг/г сухої сировини -  $66.03 \pm 2.41$ ; вміст кверцетин-3-галактозид, мг/г сухої сировини -  $423.39 \pm 8.75$ ; вміст кемпферолу, мг/г сухої сировини -  $46.43 \pm 2.28$ ; вміст ізорамнетину, мг/г сухої сировини -  $112.65 \pm 5.75$ . Даним екстрактам притаманна потужна антиоксидантна активність, яка була оцінена показниками: DPPH мг екв. Тролоксу/г сухої сировини -  $353.43 \pm 8.75$  та FRAP мг екв. Тролоксу/г сухої сировини -  $276.93 \pm 7.71$ .

## ВИСНОВКИ ТА ПРОПОЗИЦІЇ

Аналіз наявної науково-технічної інформації підтвердив, що робота, спрямована на удосконалення технології вилучення біологічно активних речовин з листя обліпихи для продуктів функціонального призначення є актуальною.

Аналіз результатів експериментальних досліджень дозволяють констатувати, що удосконалення технології вилучення біологічно активних речовин з листя обліпихи для продуктів функціонального призначення можливо лише за рахунок використання технології екстрагування у середовищі субкритичної води.

Екстрагування листя обліпихи при параметрах процесу: температура – 150 0С; тривалість екстрагування – 22 хвилини; розмір фракції – 0,5±0,1 мм; тиск – 4-8 МПа; гідромодуль (співвідношення маси сировини до маси розчинника) – 1: 20. Використання даних параметрів забезпечує отримання екстрактів з наступними властивостями: вміст фенолів, мг/г сухої сировини -  $93.72 \pm 2.83$ , вміст флавоноїдів, мг/г сухої сировини -  $66.03 \pm 2.41$ ; вміст кверцетин-3-галактозид, мг/г сухої сировини -  $423.39 \pm 8.75$ ; вміст кемпферолу, мг/г сухої сировини -  $46.43 \pm 2.28$ ; вміст ізорамнетину, мг/г сухої сировини -  $112.65 \pm 5.75$ . Даним екстрактам притаманна потужна антиоксидантна активність, яка була оцінена показниками: DPPH мг екв. Тролоксу/г сухої сировини -  $353.43 \pm 8.75$  та FRAP мг екв. Тролоксу/г сухої сировини -  $276.93 \pm 7.71$ .

Таким чином даними дослідженнями було доведено, що екстракти з листя обліпихи, отримані при екстрагуванні субкритичною водою багаті на цінні біологічно активні речовини, є потужними антиоксидантами та можуть бути рекомендовані для використання у технологіях продуктів функціонального призначення.

Результати досліджень можуть бути рекомендована для впровадження на підприємствах харчових галузей.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Azmir, J.; Zaidul, I.S.M.; Rahman, M.M.; Sharif, K.M.; Mohamed, A.; Sahena, F.; Jahurul, M.H.A.; Ghafoor, K.; Norulaini, N.A.N.; Omar, A.K.M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, 117(4), 426–436.
2. Eng Shi Ong. Extraction methods and chemical standardization of botanicals and herbal preparations. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2004 Dec 5; 812 (1-2):23-33.
3. Sasidharan S, Chen Y, Saravanan D, Sundram KM, Yoga Latha L. Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. *Afr J Tradit Complement Altern Med*. 2011;8(1):1-10. Epub 2010 Oct 2.
4. Xiang B, Zhou X, Qin D, Li C, Xi J. Infrared assisted extraction of bioactive compounds from plant materials: Current research and future prospect. *Food Chem*. 2022 Mar 1;371:131192.
5. Fierascu RC, Fierascu I, Ortan A, Georgiev MI, Sieniawska E. Innovative Approaches for Recovery of Phytoconstituents from Medicinal/Aromatic Plants and Biotechnological Production. *Molecules*. 2020 Jan 12;25(2):309.
6. Ina Gradt, Sascha Kühn, J.-Thomas Mörsel, and Galina Zvaigzne. Chemical composition of sea buckthorn leaves, branches and bark. *Proceedings of the latvian academy of sciences. Section B, Vol. 71 (2017), No. 3 (708), pp. 211–216.*
7. Anna Jaroszewska, Wioletta Biel. Chemical composition and antioxidant activity of leaves of mycorrhized sea-buckthorn ( *Hippophae rhamnoides* L.) *Chilean J. Agric. Res.* vol. 77 no.2 Chillán jun. 2017.
8. Croteau, R., Kutchan, T.M., Lewis, N.G., 2000. Natural products (secondary metabolites). In: Buchanan, B., Gruissem, W., Jones, R. (Eds.), *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD, pp. 1250–1318.

9. Smith, R.M., 2003. Before the injection—modern methods of sample preparation for separation techniques. *Journal of Chromatography A* 1000 (1–2), 3–27.
10. Sasidharan, S., Chen, Y., Saravanan, D., Sundram, K.M., Latha, Y.L., 2011. Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. *African Journal of Traditional Complementary and Alternative Medicines* 8 (1), 1–10.
11. Hernández, Y., Lobo, M.G., González, M., 2009. Factors affecting sample extraction in the liquid chromatographic determination of organic acids in papaya and pineapple. *Food Chemistry* 114 (2), 734–741.
12. Torssell, K.G., 1997. *Natural Product Chemistry. A Mechanistic, Biosynthetic and Ecological Approach*, second ed. Apotekarsocieteten—Swedish Pharmaceutical Society, pp. 12–40.
13. Wink, M., 2003. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry* 64 (1), 3–19.
14. Vinatoru, M., Toma, M., Radu, O., Filip, P.I., Lazurca, D., Mason, T.J., 1997. The use of ultrasound for the extraction of bioactive principles from plant materials. *Ultrasonics Sonochemistry* 4 (2), 135–140.
15. Ghafoor, K., Hui, T., Choi, Y.H., 2011. Optimization of ultrasound-assisted extraction of total anthocyanins from grape peel. *Journal of Food Biochemistry* 35, 735–746.
16. Tocpfl, S., Mathys, A., Heinz, V., Knorr, D., 2006. Review: potential of high hydrostatic pressure and pulsed electric fields for energy efficiency and environmentally friendly food processing. *Food Review International* 22 (4), 405–423.
17. Gaur, R., Sharma, A., Khare, S.K., Gupta, M.N., 2007. A novel process for extraction of edible oils: enzyme assisted three phase partitioning (EATPP). *Bioresource Technology* 98 (3), 696–699.
18. Lusas, E.W., Watkins, L.R., 1988. Oilseeds: extrusion for solvent extraction. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 65 (7), 1109–1114.

19. Kaufmann, B., Christen, P., 2002. Recent extraction techniques for natural products: microwave-assisted extraction and pressurized solvent extraction. *Phytochemical Analysis* 13 (2), 105–113.
20. Lakkakula, N.R., Lima, M., Walker, T., 2004. Rice bran stabilization and rice bran oil extraction using ohmic heating. *Bioresource Technology* 92 (2), 157–161.
21. Marr, R., Gamse, T., 2000. Use of supercritical fluids for different processes including new developments—a review. *Chemical Engineering and Processing* 39 (1), 19–28.
22. Lang, Q., Wai, C.M., 2001. Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies—a practical review. *Talanta* 53 (4), 771–782.
23. Meireles, A., Angela, M., 2003. Supercritical extraction from solid: process design data (2001–2003). *Current Opinion in Solid State and Materials Science* 7 (4–5), 321–330.
24. Wang, L.J., Weller, C.L., Schlegel, V.L., Carr, T.P., Cuppett, S.L., 2008. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of lipids from grain sorghum dried distillers grains with solubles. *Bioresource Technology* 99 (5), 1373–1382.
25. Ghafoor, K., Park, J., Choi, Y.H., 2010. Optimization of supercritical carbon dioxide extraction of bioactive compounds from grape peel (*Vitis labrusca* B.) by using response surface methodology. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 11 (3), 485–490.
26. Ghafoor, K., AL-Juhaimi, F.Y., & Choi, Y.H., 2012. Supercritical fluid extraction of phenolic compounds and antioxidants from grape (*Vitis labrusca* B.) seeds. *Plant Foods for Human Nutrition*.
27. Smith, R.M., 2002. Extractions with superheated water. *Journal of Chromatography A* 975 (1), 31–46.
28. Jennings, W.G., Rapp, A., 1983. Sample Preparation for Gas Chromatographic Analysis, first ed. Verlagsgruppe Huthig Jehle Rehm GmbH, Heidelberg.

29. Moldoveanu, S.C., David, V., 2002. *Sample Preparation in Chromatography*, first ed. Elsevier, Amsterdam.
30. Majors, R.E., 2003. HPLC column packing design. *LC-GC Europe* 16 (6), 8–13.
31. Wang, L., Weller, C.L., 2006. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science & Technology* 17 (6), 300–312.
32. Upendra, K. Sharma, Kapil Sharma Nandini Sharma Abhishek Sharma Singh, Harsh. P., & Sinha, Arun. K. (2008). Microwave-assisted efficient extraction of different parts of *Hippophae rhamnoides* for the comparative evaluation of antioxidant activity and quantification of its phenolic constituents by reverse-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC). *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 56, 374–379.
33. Rodriguez-Meizoso, I., Marin, F. R., Herrero, M., Senorans, F. J., Reglero, G., Cifuentes, A., et al. (2006). Subcritical water extraction of nutraceuticals with antioxidant activity from oregano. Chemical and functional characterization. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41, 1560–1565.
34. King, J. W. (2000). Advances in critical fluid technology for food processing. *Food Science and Technology Today*, 14, 186–191.
35. Basile, A., Jimenez Carmona, M. M., & Clifford, A. A. (1998). Extraction of rosemary by superheated water. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 5204–5209.
36. Ibanez, E., Kubatova, A., Senorans, F. J., Cavero, S., & Reglero, G. (2003). Subcritical water extraction of antioxidant compounds from rosemary plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(2), 375–382.
37. Farnsworth, N.R., Akerele, O., Bingel, A.S., Soejarto, D.D., Guo, Z., 1985. Medicinal plants in therapy. *Bulletin of WHO* 63, 965–981.
38. Vankar, P.S., 2004. Essential oils and fragrances from natural sources. *Resonance* 9 (4), 30–41.

39. Silva, L.V., Nelson, D.L., Drummond, M.F.B., Dufossé, L., Glória, M.B.A., 2005. Comparison of hydrodistillation methods for the deodorization of turmeric. *Food Research International* 38 (8–9), 1087–1096.
40. Cowan, M.M., 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews* 12 (4), 564–582.
41. Luque de Castro, M.D., Garcia-Ayuso, L.E., 1998. Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future. *Analytica Chimica Acta* 369 (1–2), 1–10.
42. Субкритична екстракція біологічно активних речовин із виноградних вичавок: моногр. / В.О. Сукманов, А.І. Українець, В.Л. Зав'ялова та ін. — К.: НУХТ, 2019. - 415 с.
43. Fan, J., Ding, X., & Gu, W. (2007). Radical-scavenging proanthocyanidins from sea buckthorn seed. *Food Chemistry*, 102, 168–177.
44. Beveridge, T., Li, T. S., Oomah, B. D., & Smith, A. (1999). Seabuckthorn products: Manufacture and composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 3480–3488.
45. Geetha, S., Ram, M. S., Singh, V., Ilavazhagan, G., & Sawhney, R. C. (2002). Antioxidant and immunomodulatory properties of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) – an in vitro study. *Journal of Ethnopharmacology*, 79, 373–378.
46. Hakkinen, S. H., Karenlampi, S. O., Heinonen, I. M., Mykkanen, H. M., & Torronen, A. R. (1999). Content of the flavonols quercetin, myricetin and kaempferol in 25 edible berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 2274–2279.
47. Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Zevallos, L. C., & Byrne, H. D. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 669–675.

48. Zou, Yanping., Yanhua, Lu., & Wei, Dongzhi. (2004). Antioxidant activity of a flavonoid-rich extract of *Hypericum perforatum* L. in vitro. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 52, 5032–5039.
49. Н.С. Бриленок, В.И.Вершинин, М.В. Бахарева/ Оценка антиоксидантной активности полифенолов по методу FRAP в присутствии комплексантов *Аналитика и контроль*. 2016. Т. 20, № 3. С. 209-217.
50. Benzie I.F.F., Strain J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay // *Anal. Biochem.* 1996. V. 239, № 1. P. 70-76.
51. Miller, David. J., & Hawthorne, Steven. B. (2000). Solubility of liquid organic flavor and fragrance compounds in subcritical (hot/liquid) water from 298K to 473K. *Journal of Chemical and Engineering Data*, 45(2), 315–318.
52. Costantino, L., Albasini, A., Rastelli, G., & Benvenuti, S. (1992). Activity of polyphenolic crude extracts as scavengers of superoxide radicals and inhibitors of xanthine oxidase. *Planta Medica*, 58, 342–344.
53. Amella, M., Bronner, C., Briancon, F., Haag, M., Anton, R., & Landry, Y. (1985). Inhibition of mast cell histamine release by flavonoids and biflavonoids. *Planta Medica*, 1, 16–20.
54. Jagtap, S., Meganathan, K., Wagh, V., Winkler, J., Hescheler, J., & Sachinidis, A. (2009). Chemoprotective mechanism of the natural compounds, epigallocatechin-3-O-gallate, quercetin and curcumin against cancer and cardiovascular diseases. *Current Medicinal Chemistry*, 16, 1451–146.
55. Badami, S., Gupta, M. K., & Suresh, B. (2003). Antioxidant activity of the ethanolic extract of *Striga orobanchioides*. *Journal of Ethnopharmacology*, 85, 227–230.
56. Adedapo, A. A., Jimosh, F. O., Koduru, S., Afolayan, A. J., & Masika, P. J. (2008). Antibacterial an antioxidant properties of the methanol extracts of the leaves and stems of *Calpurnia aurea*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 8, 53–60.

57. D. T. Maheshwari, M S Yogendra Kumar, Saroj K Verma, Vijay K Singh, Som Nath Singh. Antioxidant and hepatoprotective activities of phenolic rich fraction of Seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) leaves. *Food Chem Toxicol.* 2011 Sep;49(9):2422-8.
58. Priyanka Sharma, Geetha Suryakumar, Virendra Singh, Kshipra Misra, Shashi Bala Singh. In vitro antioxidant profiling of seabuckthorn varieties and their adaptogenic response to high altitude-induced stress. *International Journal of Biometeorology.* November 2014.