

А. Г. Калейніков, Ю. Ю. Опанович, О. М. Федоришин, О. С. Яремкевич

Національний університет "Львівська політехніка",

кафедра технології біологічно активних сполук, фармації та біотехнології

olena.s.yaremkevych@lpnu.ua

ДОСЛІДЖЕННЯ АНТИОКСИДАНТНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ТА КОМПОНЕНТНОГО СКЛАДУ ЕКСТРАКТІВ ЗЛАКОВИХ КУЛЬТУР

<https://doi.org/10.23939/ctas2025.01.146>

Досліджено рівень інгібування ініційованих реакцією Фентона процесів пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) й окисної модифікації протеїнів (ОМП) у гепатоцитах щура *in vitro* за дії водних, а також 40 й 70 % водно-етанольних екстрактів пшеничних і вівсяних висівок. За допомогою якісних реакцій подана оцінка загального вмісту фенольних сполук і, зокрема, флавоноїдів. Методом тонкошарової хроматографії (ТШХ) у зразках досліджуваних об'єктів ідентифіковано галову, ферулову кислоти та кверцетин. Результати дослідження підтверджують наявність фенольних сполук, флавоноїдів та амінокислот в отриманих висівкових екстрактах і невисоку антиоксидантну активність.

Ключові слова: антиоксидантна активність, екстракти вівсяних та пшеничних висівок, пероксидне окиснення ліпідів (ПОЛ), окисна модифікація протеїнів (ОМП), фенольні сполуки, флавоноїди.

Вступ

З середини XX сторіччя й станом на першу чверть XXI розробка принципово нових фармацевтичних засобів, порівняно з практикою минулих часів, мала численні досягнення в напрямку хімічного та мікробіологічного синтезу. Однак очевидний факт, що не менш важливим аспектом підтримки здоров'я людей є їх раціональне, збалансоване харчування й підконтрольний, обґрунтований вжиток препаратів медичного призначення. З кожним днем все частіше можна почути про специфічні дієти, оздоровчі напої, фітотерапію тощо. Усе з переліченого, як і ліки (в професійному розумінні цього слова), спрямоване на поліпшення стану клітин, метаболічних процесів, налагодження роботи систем організму в цілому. Отоже, дослідження найбільш цінних компонентів буденних харчових продуктів, принципу їх сукупного біологічного впливу, а до того, ще й потенційних шкідливих ефектів, будуть актуальні для дієтології, біотехнології, біохімії й головно для гастроентерології ще досить тривалий період [1, 2].

Значна увага приділена здатності висівкових витяжок, завдяки композиції великої кількості біологічно активних сполук, зменшувати ризик роз-

витку патологічних станів у макроорганізмів. Серед вагомих визначників позитивної дії їжі/препарату на обмін речовин є пригнічення оксидативного стресу [3]: процесу, зумовленого нищівними вільнорадикальними реакціями, що провокують мутаційні зміни макромолекул у клітинах і утворюють небажані шкідливі продукти. Хімічні властивості, котрі перешкоджають описаним явищам, мають назву антиоксидантних. Вони відповідають за збереження і стабільність клітинного складу тканин внутрішніх органів, попереджають хвороби на зразок ішемічного захворювання серця [4].

Чимало наукових праць присвячено встановленню антиоксидантного потенціалу рисових, кукурудзяних, вівсяних, пшеничних і ячмінних висівкових екстрактів. Усюди використовують відмінні один від одного екстрагенти, через що передача початкових властивостей біохімічного складу рослин відбувається по-різному [5]. З огляду на здобутки хімії у медико-фармацевтичній галузі, ефективними в боротьбі з оксидативними модифікаціями (зокрема з ОМП і ПОЛ) клітинних компонентів можуть бути сполуки фенольної природи. Для їхнього екстрагування найчастіше застосовують розчини гексану чи етанолу. За

допомогою кольорових реакцій на феноли і флавоноїди можна з'ясувати багатство всього різноманіття останніх у піддослідних екстрактах. А провівши додатково спеціальну обробку зразків – кількісно проаналізувати, застосовуючи спектрофотометр, залежність ступеня їх протидії ініційованому синтезу вільних радикалів від безпосереднього складу екстрагентів [6].

Метою цієї роботи є встановлення антиоксидантної активності екстрактів пшеничних і вівсяних висівок, а також достовірне кількісне та якісне підтвердження наявності в їхньому складі флавоноїдів, фенолів і амінокислот, відповідно до результатів проведення добре відомих науці методів хімічного аналізу.

Матеріали та методи досліджень

Методика одержання екстрактів висівок.

Екстракти отримували з вівсяних і пшеничних висівок таким способом: 1) у колби під номерами 1, 2, 3, 4 поміщали по 5,0 г пшеничних висівок, а в колби 5, 6, 7, 8 – по стільки ж вівсяних; 2) у кількісному співвідношенні 1:20 зразки заливали екстрагентами, в ролі яких були використані: вода (1-ша, 5-та колби), водно-етанольні розчини з вмістом етилового спирту 20, 40, 70 % (2-га й 6-та, 3-тя й 7-ма, 4-та й 8-ма відповідно); 3) витримували на киплячій водяній бані зі зворотним холодильником протягом 30 хв; 4) отримані субстанції фільтрували й центрифугували впродовж 10 хв при 6000 об./хв.

Методика виявлення і з'ясування кількості фенольних сполук у висівкових екстрактах. У досліджуваних зразках згідно зі стандартними методиками провели оцінку якісного складу за допомогою реакцій: а) з розчином ферум(III) хлориду; б) із сумішшю ферум(III) хлориду та калію фериціаніду; в) з розчином бромтимолового синього; г) з ваніліном у концентрованій хлоридній кислоті; ґ) із сумішшю ферум(III) хлориду, калію фериціаніду та концентрованою нітратною кислотою [7, 8].

Виявлення вмісту фенольних сполук у зразках здійснили методом тонкошарової хроматографії (ТШХ), використавши пластини “Silicagel 60” 5 × 10 см в ролі стаціонарної фази і суміш 85:15:1 (об./об./об.) хлороформ: метанол: мурашина кислота в ролі рухомої фази. Після проходження в системі розчинників аналізовані речо-

вини за дії УФ-світла визначали за коефіцієнтом розподілу до і після обробки реактивом AlCl_3 порівняно з очищеними еталонними зразками, нанесеними одночасно [9].

Кількісне визначення фенольних сполук проводили спектрофотометричним методом у перерахунку на галову кислоту [10].

Методика виявлення й кількісна оцінка флавоноїдів у висівкових екстрактах. Якісний аналіз флавоноїдів проводили згідно зі стандартними методиками за реакціями [11]: а) з ферум(III) хлоридом; б) з лугом; в) із плюмбум ацетатом; г) ціанідиною реакцією.

Кількісний вміст флавоноїдів визначали в перерахунку на кверцетин за допомогою модифікованого спектрофотометричного методу із застосуванням реакції комплексоутворення між флавоноїдами та алюміній хлоридом [12].

Методика кількісного визначення амінокислот у висівкових екстрактах. Обрахунок кількості амінокислот складався з таких етапів: 1) реакція утворення забарвленого комплексу між зразками та нінгідрином; 2) аналогічна реакція зі стандартним розчином аланіну 3) порівняння на спектрофотометрі [13].

Приготування гомогенату печінки щура та визначення маркерів оксидативного стресу. Щоб отримати гомогенат ферментативно-активного біоматеріалу для подальшого проведення експерименту, в ступці розтирали частину попередньо розмороженої щурачої печінки, заливаючи поступово зверху десятикратну (по масі) кількість буферного розчину. Старт реакцій оксидативного стресу в отриманій субстанції активізували за відомою методикою британського вченого Г. Дж. Х. Фентона (Fenton's reagent). Після цього, аби відділити фракцію осаду, ставили зразки в стандартну лабораторну центрифугу, запускали її на 10 хвилин з питомою швидкістю 5 тисяч обертів. Певний об'єм супернатанту аналізували спектрофотометрично на вміст малонового діальдегіду (МДА) за рівнем забарвлення після реакції із тіобарбітуровою кислотою (ТБК). За розробленим Лоурі (Lowry, 1951) порядком з'ясовували вміст білків у відібраній з центрифужних пробірок рідкій фазі. Це необхідно було зробити, аби привести чисельне вираження інтенсивності антиоксидантної дії екстрактів до одиниці протеїнової маси в гомогенаті. Базуючись на описаному В. І.

Лушчаком способом [14], надавали специфічний колір утвореному після центрифугування осаду взаємодією з 2,4-динітрофенілгідразином. Кілька разів змивали надлишок барвника розведеним в етиловому спирті 1:1 етилацетатом. Під кінець витримували забарвлені проби в розчині сечовини та, як і в попередніх випадках, досліджували оптичну густину.

Статистичний аналіз. Дані дослідження обробляли статистично з урахуванням середніх арифметичних значень M та стандартних похибок відхилення SE у вигляді ($M \pm SE$) при $n = 5$. Досто-

вірність кореляції між експериментально встановленими величинами визначали за допомогою тесту Тьюкі однофакторного аналізу (ANOVA), де відмінності вважалися взаємопов'язаними при $p < 0,05$ [15]. Результати обробки подано у вигляді діаграм.

Результати досліджень та їх обговорення

Аналіз отриманих даних якісного дослідження показує наявність фенольних речовин в усіх зразках. Відповідні підтвердження наведено в табл. 1.

Таблиця 1

Ідентифікація простих фенолів у вівсяних і пшеничних екстрактах

Якісна реакція	Очікуваний результат	Досліджувані екстракти					
		1-П	2-П	3-П	1-В	2-В	3-В
Реакція з розчином ферум(III) хлориду	червоне забарвлення	+	+	+	+	+	+
Реакція із сумішшю ферум(III) хлориду та калію фериціаніду	синьо-зелене забарвлення	+	+	+	+	+	+
Реакція з розчином бромтимолового синього	жовте забарвлення	+	+	+	+	+	+
Реакція з ваніліном у концентрованій хлоридній кислоті	червоне забарвлення	+	+	+	+	+	+
Реакція із сумішшю ферум(III) хлориду, калію фериціаніду та концентрованою нітратною кислотою	темно-буре забарвлення	+	+	+	+	+	+

Примітки: 1П-40 % водно-етанольний екстракт пшеничних висівок; 2П-водний екстракт пшеничних висівок; 3П-70 % водно-етанольний екстракт пшеничних висівок; 1В-40 % водно-етанольний екстракт вівсяних висівок; 2В-водний екстракт вівсяних висівок; 3В-70 % етанольний екстракт вівсяних висівок.

У досліджуваних екстрактах вівсяних і пшеничних висівок методом ТШХ ідентифіковано три сполуки фенольного характеру: 1) галова кислота (зеленкувато-жовтий колір) була знайдена у 40 % водно-етанольних екстрактах вівсяних і пшеничних висівок (R_f 0,34) та у 70 % водно-етанольних екстрактах вівсяних і пшеничних висівок (R_f 0,34); 2) кверцетин (яскравий зелено-жовтий колір) було виявлено у всіх екстрактах, а саме: вівсяний водний і пшеничний водно-етанольний 40 % (R_f 0,90), у 70 % водно-етанольних вівсяних і пшеничних висівок (R_f 0,87) та водно-етанольний 40 % вівсяний і пшеничний водний (R_f 0,89); 3) ферулова кислота (блакитний колір) – у водних вівсяних і пшеничних екстрактах (R_f 0,98, R_f 0,99), у водно-етанольних 40 % вівсяних і пшеничних екстрактах (R_f 0,95), у водно-етанольних 70 % вівсяних і пшеничних екстрактах (R_f 0,99, R_f 0,97).

Результати розрахунку кількості фенольних сполук спектрофотометричним методом (рис. 1) свідчать про найвищий вміст цих речовин у екстрактах на основі водно-етанольних розчинів (40 % та 70 %) вівсяних висівок ($(0,51 \pm 0,002)$ мг/мл та $(0,33 \pm 0,001)$ мг/мл відповідно), а також у водних екстрактах пшеничних і вівсяних висівок ($(0,16 \pm 0,006)$ мг/мл та $(0,11 \pm 0,007)$ мг/мл відповідно).

Аналіз отриманих даних якісного дослідження флавоноїдів свідчить про їх наявність в дослідних зразках. Результати наведено у табл. 2.

Проведені реакції (табл. 2) підтверджують наявність флавоноїдів у дослідних зразках. Згідно з показами спектрофотометра, найвища концентрація флавоноїдів спостерігалася у водно-етанольному екстракті (20 %) пшеничних висівок (вміст становив $(1,97 \pm 0,03)$ мг/мл) та у водному екстракті вівсяних висівок (вміст становив $(0,98 \pm 0,02)$ мг/мл).

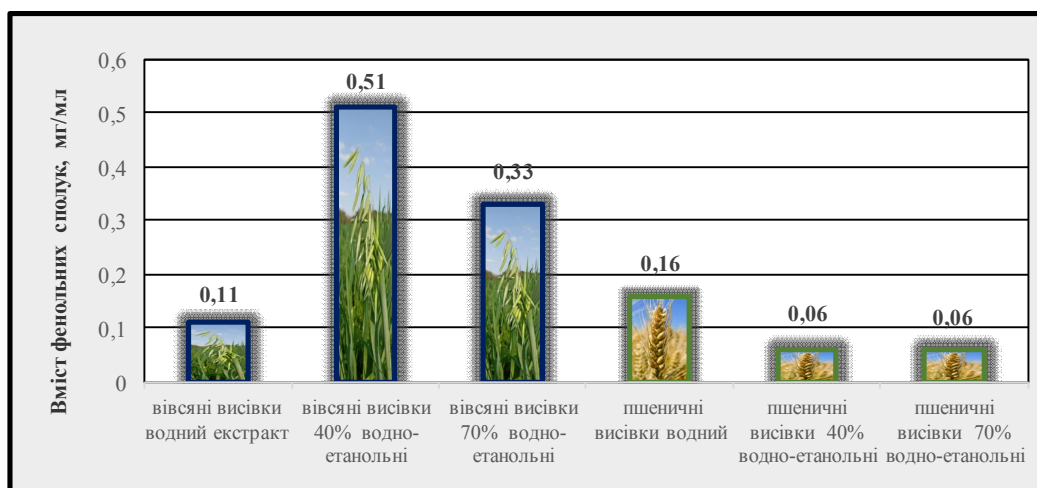


Рис. 1. Вміст фенольних сполук в екстрактах пшеничних і вівсяних висівок

Таблиця 2

Результати ідентифікації флавоноїдів у вівсяних і пшеничних екстрактах

Реакція	Очікуваний результат	Досліджувані екстракти					
		1-П	2-П	3-П	1-В	2-В	3-В
Реакція з 10 % розчином ферум (III) хлориду	коричневе забарвлення	+	+	+	+	+	+
Реакція із плумбомом ацетатом	осад	+	+	+	+	+	+
Реакція з лугом	жовте забарвлення	+	+	+	+	+	+
Ціанідинова реакція	зміна від жовтого до червоного забарвлення	+	+	+	+	+	+

Примітки: 1П-40 % водно-етанольний екстракт пшеничних висівок; 2П-водний екстракт пшеничних висівок; 3П-70 % водно-етанольний екстракт пшеничних висівок; 1В-40 % водно-етанольний екстракт вівсяних висівок; 2В-водний екстракт вівсяних висівок; 3В-70 % етанольний екстракт вівсяних висівок.

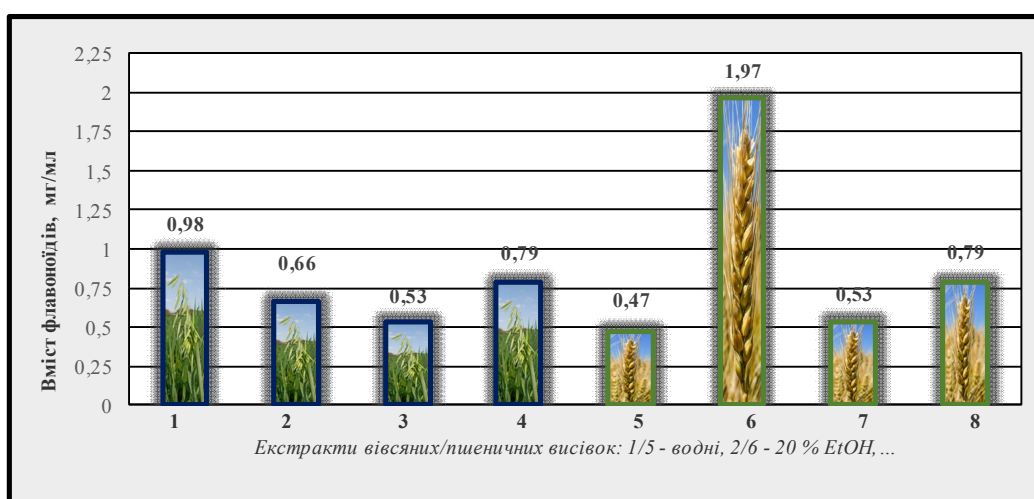


Рис. 2. Вміст флавоноїдів у екстрактах пшеничних і вівсяних висівок

Кількісне визначення амінокислот у висівкових екстрактах підтвердило наявність шу-

каних речовин. Для цього аналізу брали водні та водно-етанольні (70 %) екстракти. Відсотковий

вміст амінокислот висівкових екстрактів у перерахунку на аланін становив: для водних вівсяного і пшеничного $1,48 \pm 0,0$ і $12,28 \pm 0,01$ відповідно, для 70 % водно-етанольних вівсяного і пшеничного $3,51 \pm 0,005$ і $7,09 \pm 0,02$ відповідно.

На підставі проведених досліджень ПОЛ (рис. 3) не встановлено залежність між концентрацією розчинів етанолу, використаних для екстрактів, та антиоксидантними властивостями висівків. Порівняно з контрольним розчином, вміст малонового діальдегіду (МДА) як одного з основних показників ПОЛ у зразках, що оброблялися вівсяними екстрактами на основі води та водно-етанольних розчинів (40 % та 70 %), становив відповідно $(116 \pm 2,1)$, $(109,5 \pm 7,8)$, $(124,9 \pm 14,3)$ %, а пшеничними (в тому ж порядку) – $(116,2 \pm 7,5)$, $(128,4 \pm 9,4)$, $(106,0 \pm 5,4)$ %. Наведені дані демонст-

рують: 1) хаотичну зміну МДА гепатоцитів щура при підвищенні вмісту етилового спирту у використаних екстрагентах; 2) надмірний обсяг зазначеної речовини (патологічної природи утворення) в усіх випадках додавання екстрактів.

На діаграмі (рис. 4) чітко помітно, що кількість карбонільних груп (КГ), яка відповідно значущим показником ОМП, змінювалася при збільшенні концентрації спирту в екстрагентах майже пропорційно. Концентрація КГ в гепатоцитах щура після впливу вівсяних екстрактів на основі води та водно-етанольних (40 %, 70 %) розчинів становила порівняно з контролем $(93,4 \pm 1,8)$, $(105,3 \pm 5,6)$, $(114,7 \pm 8,6)$ %, а після пшеничних екстрактів, у відповідній послідовності, мала ще нижчий рівень: $(79,8 \pm 8,8)$, $(89,3 \pm 19,1)$, $(108,2 \pm 4,0)$ %.

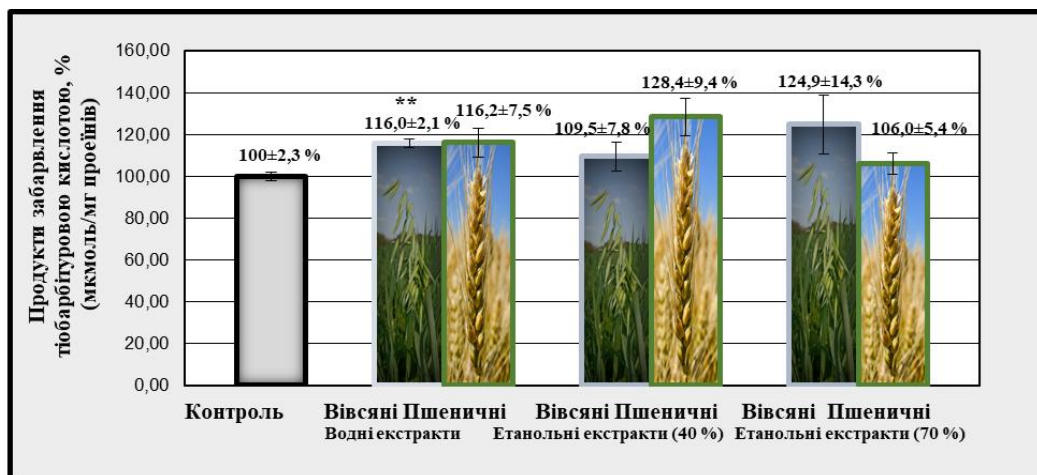


Рис. 3. Вміст ТБК-активних продуктів в гомогенаті печінки щура за дії водних та водно-етанольних висівкових екстрактів (** $p \leq 0.01$; $M \pm SE$; $n = 5$)

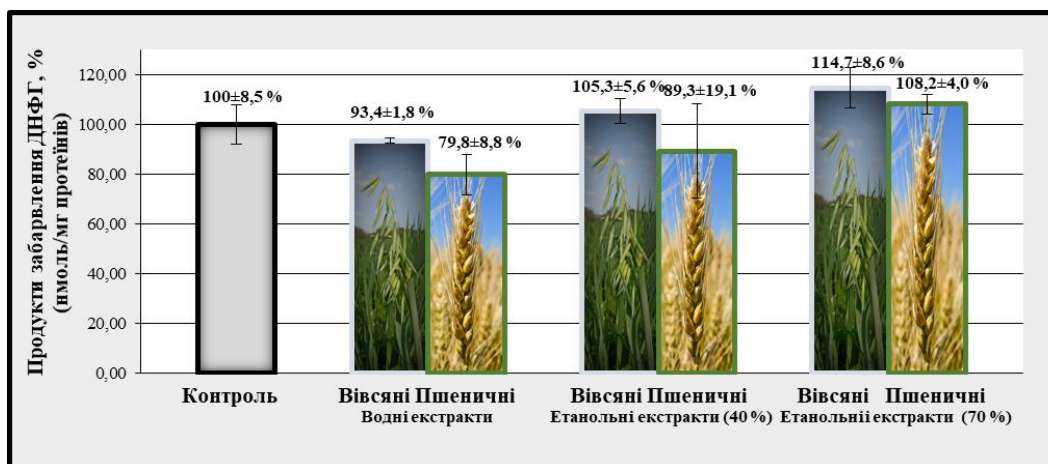


Рис. 4. Вміст карбонільних груп протеїнів в гомогенаті печінки щура за дії водних та водно-етанольних висівкових екстрактів ($M \pm SE$; $n = 5$)

Найбільш ефективними серед досліджуваних водно-етанольних екстрактів у контексті зменшення показників ОМП виявились пшеничні висівки. Найінтенсивніше знижують КГ (статистично не достовірно) водні та 40 % водно-етанольні екстракти пшеничних висівків. На завершення слід зазначити, що, незважаючи на беззаперечні численні докази наявності в досліджуваних екстрактах чималого різноманіття сполук фенольної природи, поміж яких ідентифіковано й флавоноїди, так і не було остаточно встановлено обґрунтованого сукупного зв'язку цих даних із проявом антиоксидантних властивостей (інгібуванням ПОЛ і ОМП). А тому при подальшому аналізі особливу увагу варто приділити дослідженню ферментного рівня описаних процесів.

Висновки

За допомогою декількох якісних і кількісних хімічних реакцій однозначно підтверджено наявність фенольних сполук (у концентрації 0,33–0,51 мг/мл), флавоноїдів (0,98–1,97 мг/мл) й амінокислот (1,48–12,28 %) у водно-етанольних (40 %, 70 %) екстрактах пшеничних і вівсяних висівків.

Методом ТШХ в аналізованих зразках ідентифіковано галову, ферулову кислоти та кверцетин.

На біохімічному рівні встановлено абсолютну відсутність зниження досліджуваними екстрактами ступеню пероксидного окиснення ліпідів *in vitro* у клітинах печінки щура.

Залежність рівня окисної модифікації протеїнів гепатоцитів щура від збільшення концентрації спирту в екстрактах хоч статистично і не була доведена, проте у графічному представленні відображає пряму пропорційність. Пшеничні екстракти в ній показали вищу антиоксидантну активність: 1) порівнюючи водні екстракти, середня різниця рівнів зменшення ОМП становила 13,6 % щодо вівсяних екстрактів; 2) для 40 % екстрактів різниця становила 16,0 %; 3) для 70 % екстрактів – наближалася до 6,5 %.

Загалом з'ясовано, що немає прямого зв'язку між концентраціями фенольних сполук у водно-етанольних екстрактах пшеничних і вівсяних висівків та зменшенням ними кількості згубних вільнорадикальних процесів у клітинах щурячої печінки.

References

1. Reddy, S., & Krishnan, C. (2010). Production of prebiotics and antioxidants as health food supplements from lignocellulosic materials using multienzymatic hydrolysis. *International Journal of Chemical Sciences*, 3(3), 535–549.
2. Kaprelyants, L., & Zhurlova, O. (2017). Technology of wheat and rye bran biotransformation into functional ingredients. *International Food Research Journal*, 24(5), 1975–1979.
3. Яремкевич, О. С., & Федоришин, О. М. (2024). Дослідження антиоксидантних властивостей екстрактів відкасника безстеблового (*Carlina acaulis* L.), арніки гірської (*Arnica montana* L.) та календули лікарської (*Calendula officinalis* L.). *Chemistry, Technology and Application of Substances*, 7(1), 103–111.
4. Strilchuk, L. M. (2020). Malondialdehyde and its role in pathogenesis of unstable forms of ischemic heart disease. *Medicine Today and Tomorrow*, 87(2), 20–25. <https://doi.org/10.35339/msz.2020.87.02.02>
5. Pengkumsri, N., Chaayasut, C., Sivamaruthi, B. S., Saenjum, Ch., Sirilun, S., Peerajan, S., Suwannaler, T. P., Sirisattha, S., Chaayasut, Kh., & Kesika, P. (2015). The influence of extraction methods on composition and antioxidant properties of rice bran oil. *Food Science and Technology*. 35(3), 493–501. <https://doi.org/10.1590/1678-457x.6730>
6. Dewi, S., Sadikin, M., & Mulyawan, W. (2021). Oxidative stress in the heart of rats exposed to acute intermittent hypobaric hypoxia. *The Ukrainian Biochemical Journal*, 93(3), 68–74. <https://doi.org/10.15407/ubj93.03.068>
7. Vitalini, S., Beretta, G., Iriti, M., Orsenigo, S., Basilico, N., Dall'Acqua, S., Iorizzi, M., & Fico, G. (2011). Phenolic compounds from *Achillea millefolium* L. and their bioactivity. *Acta Biochim. Pol.*, 58(2), 203–219.
8. Pavlyuk, I., Stadnytska, N., Jasicka-Misiak, I., Gorka, B., Wiczorek, P. P., & Novikov, V. (2015). A study of the Chemical Composition and Biological Activity of Extracts from Wild Carrot (*Daucus carota* L.) Seeds Waste. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 6(2), 603–611.
9. Jasicka-Misiak, I., & Stanek, N. (2018). HPTLC Phenolic Profiles as Useful Tools for the Authentication of Honey. *Food Analytical Methods*, 11, 2979–2989.
10. Quy, D. D., Artik, E. A., Phuong, L. T.-N., & Lien, H. H. Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. *Journal of Food and Drug Analysis*. 2014. Vol. 22, No. 3. P. 296–302. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2013.11.001>
11. Blyznyuk, N., Prokopenko, Yu., & Georgiyants, V. (2016). Development of methods for determination of phenolic acids and flavonoids in capsules containing *Corylus avellana* L. dry extract. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*, 2(4), 18–22.

12. Karpiuk, V., & Konechna, R. (2021). Total phenolic and flavonoid content, antioxidant activity of *Ficaria verna*. *Scientific journal of Polonia university*, 46(3), 229–234.

13. Zarivna, N. O. (2014). Study of the amino acid composition of the herb *Thymus Serpyllum*. *Ukrainian Biopharmaceutical Journal*, 3 (32), 67–70.

14. Луцкaк, В. І., Багнюкава, Т. В., & Лужна, Л. І. (2006). Показники оксидативного стресу. 2. Перекиси ліпідів. *Український біохімічний журнал*, 78(5), 113–119.

15. Morgan, G. A., Leech, N. L., Gloeckner, G. W., & Barrett, K. C. (2012). *IBM SPSS for Introductory statistics. In: Use and Interpretation*, 4-th ed.; Routledge Taylor & amp; Francis Group, New York.

A. G. Kaleinikov, Y. Y. Opanovych, O. M. Fedoryshyn, O. S. Yaremkevych

Lviv Polytechnic National University,

Department of Technology of Biologically Active Substances, Pharmacy and Biotechnology

STUDY OF ANTIOXIDANT PROPERTIES AND COMPONENT COMPOSITION OF CEREAL CROP EXTRACTS

The scientific work researched the level of inhibition of Fenton's reagent-initiated lipid peroxidation (LPO) and oxidative modification of proteins (OMP) processes in rat hepatocytes in vitro, as an effect of aqueous, and 40, 70 % aqueous-ethanolic extracts of wheat and oat bran. Qualitative reactions were used to assess the total amount of phenolic compounds, especially flavonoids. Thin-layer chromatography (TLC) identified gallic acid, ferulic acid, and quercetin in the samples of the studied objects. The study results confirm the presence of phenolic compounds, flavonoids, and amino acids in the resulting bran extracts. Spectrophotometric analysis revealed a relatively low level of antioxidant activity of the studied extracts.

Keywords: antioxidant activity, extracts of oat and wheat bran, lipid peroxidation (LPO), oxidative modification of proteins (OMP), phenolic compounds, flavonoids.