

**В.А. Литвин****СИНТЕТИЧНІ ФУЛЬВОКИСЛОТИ З ОПЛОДНЯ ГРАНАТУ**

<sup>1</sup> Черкаський національний університет імені Богдана Хмельницького, бульв. Шевченка, 81, Черкаси, 18000, Україна

\*e-mail: litvin\_valentina@ukr.net

Розроблено нову оригінальну методику одержання синтетичних фульвокислот шляхом окиснення фенольних сполук оплодня гранату (елаготанінів, лігніну) молекулярним киснем у лужному середовищі. Порівняння спектральних та фізико-хімічних властивостей одержаного продукту та природних фульвокислот свідчить про однотипність їх хімічної будови. Однак, на відміну від природних фульвокислот, синтетичні аналоги, одержані за розробленою методикою характеризуються контрольованими та відтворюваними властивостями, що значно розширює можливість їх використання у медицині.

**К л ю ч о в і с л о в а:** гумінові речовини, синтетичні фульвокислоти, елаготаніни, лігнін.

*ВСТУП.* Гумінові речовини (ГР) – це складна суміш стійких до біодеструкції високомолекулярних темнозабарвлених органічних сполук природного походження, які утворюються при розкладі рослинних і тваринних залишків під дією мікроорганізмів і абіотичних факторів середовища. Вони входять до складу органічної речовини ґрунту, природних вод, твердих горючих копалин та інших природних тіл. За розчинністю в кислотах і лугах ГР поділяють на три класи: фульвокислоти (ФК) – фракція ГР, розчинна і в лугах, і в кислотах; гумінові кислоти (ГК) – фракція ГР, розчинна в лугах і не-

розчинна в кислотах (при  $\text{pH} < 2$ ); гумін – нерозчинний у всьому діапазоні  $\text{pH}$  [1, 2]. Дослідженнями останніх років розкрито значний терапевтичний потенціал природних ФК. Вони мають протиалергічну та протизапальну дію [3, 4], виявляють антиоксидантну [5] та антимікробну активність [6], знижують шкірну імунну відповідь [7], є протипухлинними [8] та антисептичними речовинами [9], використовуються при лікуванні екземи [10], мають антиульцеровгенні властивості [11] та прекогнітивну дію, тому їх можна використовувати для лікування хвороби Альцгеймера [12]. Багатообіцяючими є

© В. А. Литвин, 2020

препарати на основі ФК для лікування та профілактики діабету [13] та вірусних захворювань [14]. При цьому ФК не мають негативних наслідків для організму в малих дозах [15].

Однак, перешкодою широкому впровадженню матеріалів на основі природних ФК у медицину є залежність властивостей кінцевого продукту від джерела та способу вилучення. Усунути ці проблеми і відповідно розширити області використання ФК можна шляхом синтезу аналогів природних матеріалів в строго контрольованих умовах. При цьому властивостями кінцевого продукту можна варіювати шляхом вибору фенольного попередника та зміни умов синтезу.

На сьогодні розроблено відносно небагато методик одержання синтетичних ФК [16-21]. Основним недоліком відомих методик є використання в ролі попередників фенольних сполук, які в своєму складі містять, крім ароматичного ядра, лише карбоксильні групи та фенольні гідроксигрупи і не містять насичених фрагментів, спиртових гідроксилів, вуглеводневих залишків, які завжди присутні у структурах природних гумінових речовин. Це приводить до одержання продукту з будовою, яка неповністю відповідає за функціональним складом і відповідно властивостями природним ФК. Тому актуальним завданням є вдосконалення існуючих та розробка нових методик одержання синтетичних ФК.

Мета роботи полягала у розробці методики одержання синтетичних ФК з використанням в якості прекурсора фенольних сполук, що містяться в оплодні гранату та комплексне дослідження їх властивостей.

**ЕКСПЕРИМЕНТ І ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ.** Синтетичні ФК одержували шляхом окиснення фенольних сполук, що містяться в шкірці гранату (*Punica Granatum*). Шкірку гранату висушували при температурі 40°C, після чого подрібнювали в лабораторному млині до стану дрібного порошку. Наважку одержаного порошку оплодня *Punica Granatum* масою 2 г вносили у колбу К'ельдаля. Після герметизації системи, повітря з колби витісняли чистим киснем. Потім у реакційну колбу вносили 80 мл 1М розчину NaOH та 20 мл дистильованої води. Вмикання механічного струшування колби сприяє ретельному перемішуванню вмісту колби. Процес окиснення проводили при кімнатній температурі та нормальному атмосферному тиску. В процесі синтезу розчин набував темно-коричневого забарвлення. Процес контролювали шляхом вимірювання об'єму кисню, який витрачався в ході реакції. Припинення споживання кисню свідчило про завершення реакції. За даних умов реакція тривала протягом 90 хвилин. Проведення процесу в сильнолужному середовищі (рН = 12) сприяє прискоренню процесу окиснення, а це в свою чергу зменшує загальний час синтезу. Для переведення фульватів натрію в форму кислоти, одержану після реакції суміш пропускали через катіонообмінну колонку.

Спектри поглинання знімали на спектрофотометрі СФ-26, в діапазоні 200-700 нм в кюветах з довжиною оптичного шляху  $l = 1$  см. В якості розчину порівняння використовували дистильовану воду. Зйомку ІЧ-спектрів проводили на

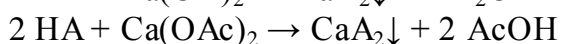
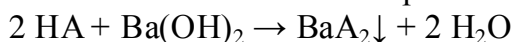
Фур'є-спектрометри Perkin Elmer Spectrum One. Зразки готували у таблетках KBr і знімали у діапазоні частот 500-4000  $\text{cm}^{-1}$ .

Рентгенівські дифрактограми синтетичних ФК знімали за методом порошку на рентгенівському дифрактометрі ДРОН-2 з  $\text{Fe}_{\text{K}\alpha}$ -випромінюванням ( $\lambda_{\text{Fe}} = 0,19360 \text{ nm}$ ) в діапазоні кутів  $2\theta = 20-120^\circ$ . Дифрактограми знімалися по точках з кроком  $\Delta 2\theta = 0,1^\circ$  при часовій накопичення у кожній точці 8 секунд.

Дослідження елементного складу синтетичних ФК проводили на СНН-аналізаторі Carlo Erba 1106. В даному приладі газу, що утворюються при спалюванні проби в атмосфері кисню, проходять через систему реакторів, потім розділяються на хроматографічній колонці і детектуються на катарометрі.

Морфологію поверхні зразків досліджували на растровому електронному мікроскопі РЕМ-100. Пробопідготовка включає висушування ФК, фіксацію одержаного порошку на струмопровідній стрічці та розміщення зразку в камері мікроскопу.

Карбоксильну кислотність одержаних препаратів синтетичних ФК визначали загальноприйнятим Са-ацетатним методом. Загальний вміст кислотних груп в структурі синтетичних ФК визначали баритовим методом [22]. Ці методики базуються на тому, що ФК утворюють з іонами  $\text{Ba}^{2+}$  та  $\text{Ca}^{2+}$  малорозчинні солі:



де HA – синтетичні ФК.

Для оцінки числа груп, що прореагували в баритовому методі надлишок

$\text{Ba}(\text{OH})_2$  титрується HCl, а в кальцій ацетатному методі визначається кількість оцтової кислоти, яка вивільнилася в результаті реакції. Не дивлячись на утворення малорозчинних сполук, обидві реакції значною мірою необоротні. В зв'язку з цим в обох випадках реагент береться в надлишку. Знаходження різниці між загальною та карбоксильною кислотністю дозволяє встановити вміст фенольних груп у складі синтезованих препаратів ФК [22].

Відновну ємність синтетичних ФК визначали за загальноприйнятою методикою [23]. Суть даного методу полягає у відновленні  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  до  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$  фульвокислотами або іншими типами гумінових речовин. Для цього готували три розчини, зокрема: 1) розчин А з концентрацією синтетичних ФК 50 мг/л і  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  концентрацією 0,25 ммоль/л; 2) холостий розчин Б з концентрацією  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  0,25 ммоль/л; 3) холостий розчин В з концентрацією синтетичних ФК 50 мг/л. Всі розчини готували на буфері з рН = 11, який одержували шляхом розчинення 6,21 г борної кислоти з 4,00 г натрій гідроксиду та 3,70 г калій хлориду в 1000 мл дистильованої води. Приготовані таким чином розчини залишали в темному місці на 24 години при кімнатній температурі. Після цього вимірювали оптичну густину всіх розчинів при 420 нм, що відповідає максимуму поглинання  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ , і розраховували зменшення оптичної густини  $\Delta A$ , обумовлене відновленням  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ , за формулою:

$$\Delta A = A(\text{B}) + A(\text{B}) - A(\text{A}),$$

де  $A(\text{A})$ ,  $A(\text{B})$ ,  $A(\text{B})$  – оптична густина розчинів А, Б, В.

Кількість калій гексаціаноферату(III), що відновився ( $\Delta n(\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6)$ ) розраховували за значенням  $\Delta A$  із градувального графіка і визначали відновну ємність (ВЄ) за формулою:

$$\text{ВЄ (ммоль/г)} = \frac{\Delta n(\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6)}{m_{\text{ФК}}} \cdot 1000,$$

де  $\Delta n(\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6)$  – кількість відновленого;  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ;  $m_{\text{ФК}}$  – маса ФК в розчині, мг.

Шкірка гранату є багатим джерелом фенольних сполук (3-28% [24, 25]), головним чином елаготанінів, включаючи пунікалагін, а також меншу кількість пунікаліну, галової кислоти, елагової кислоти та глікозидів елагової кислоти (гексозид, пентозид, рамнозид) [26-28]. Елаготаніни — це дубильні речовини, в яких гексагідроксифенова кислота сполучена з елаговою кислотою та цукровими залишками естерним зв'язком (рис. 1). Молекулярна маса елаготанінів може варіюватися від 300 до 20 000 Да [29]. Наявність елаготанінів в оплодні гранату надає можливість використати його в якості речовини-прекурсора за рахунок наявності в їх структурі великої кількості фенольних фрагментів, що є необхідною умовою для одержання синтетичних аналогів природних ФК, а також вуглеводневих залишків. Крім того, елаготаніни володіють широким спектром терапевтичних властивостей [30-33], тому очікується, що ФК, одержані на їх основі також володітимуть унікальними лікувальними властивостями.

Однак, крім елаготанінів, шкірка гранату містить 4-11 % лігніну [24. 25]. З хімічної точки зору лігнін – це складний

трьохвимірний сітчастий полімер, який має ароматичну природу і утворюється в результаті поліконденсації декількох монолігнолів – коричних спиртів (паракумарового, коніферилового та синапового). Будучи високомолекулярною речовиною нативний лігнін не розчиняється у воді, але після лужного гідролізу утворюються продукти значно меншої молекулярної маси (в тому числі і фенольні), які теж можуть слугувати попередниками у синтезі аналогів ФК. Використання шкірки гранату в якості джерела фенольних сполук пов'язано з дешевизною вихідної сировини, яка є фактично відходами

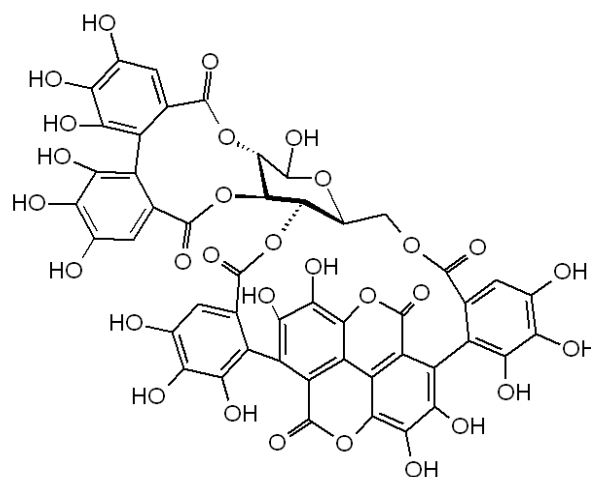


Рис. 1. Пунікалагін (елаготаніни)

Таблиця 1  
Елементний аналіз синтетичних фульвокислот з оплодня гранату в порівнянні з природними фульвокислотами

Речовина	С	О	Н	Н
Синтетичні ФК	44,2±	47,7±	4,3±	2,8±
Природні ФК [1]	0,2	0,5	0,1	0,2
	33–	44–	3–	2–
	48	60	5	4

заводів виробництва гранатових соків.

Таким чином, в умовах синтезу в лужному середовищі за наявності чистого молекулярного кисню проходять складні реакції окиснення елаготанінів, а також лужний гідроліз лігніну, з наступною окислювальною поліконденсацією утворених низькомолекулярних фенольних фрагментів. Результатом цих процесів є утворення синтетичних фульватів натрію. Внаслідок пропускання одержаної суміші через катіонообмінну колонку, йони натрію обмінювалися на  $H^+$  йони і на виході з колонки отримували синтетичні ФК. Одержаний розчин синтетичних ФК має  $pH = 2$ . Розчинність даного продукту при будь-якому значенні  $pH$  є одним із підтверджень того, що було отримано саме фульвокислоти, а не гумінові кислоти, які випадають в осад при  $pH < 2$ .

Масову концентрацію одержаних синтетичних ФК визначали гравіметрично. Вона становить 6,79 г/л.

Для підтвердження подібності будови та властивостей одержаного продукту з природними ФК було проведено комплексне дослідження їх фізико-хімічних властивостей.

Встановлений елементний склад одержаних синтетичних ФК цілком узгоджується з даними одержаними для ФК, вилучених з природних джерел (табл.1).

Однак, відсотковий склад синтетичних ФК, безпосередньо встановлений в аналізі, не дає наочного уявлення про роль окремих елементів в побудові молекул. Для з'ясування цієї ролі було обчислено атомні відношення Н/С, О/С і N/С, які показують скільки атомів Гідрогену і

Т а б л и ц я 2

**Відношення Н/С, О/С та N/С для синтетичних та природних фульвокислот**

Речовина	Н/С	О/С	N/С
Синтетичні ФК	1,17	0,81	0,05
Природні ФК[1]	0,75- 1,80	0,69- 1,36	0,04- 0,10

Оксигену припадає на один атом Карбону (табл. 2).

Величини атомних відношень Н/С дозволяють зробити висновок про співвідношення в молекулах синтетичних ФК аліфатичних та ароматичних структур.

Д.С. Орлов [2] запропонував сполуки з величиною Н/С більше двох відносити до парафінів, від 1,5 до 2 – до циклопарафінів, а менше 1,5 – до ароматичних вуглеводнів.

Згідно цьому підходу, в одержаних синтетичних ФК переважає ароматична складова.

Величина атомного відношення О/С залежить від ступеня окисненості і збільшується зі збільшенням числа гідроксильних, фенольних та карбоксильних груп. Для відношень N/С характерні самі низькі значення порівняно з Н/С і О/С. Зменшення значень Н/С, О/С і N/С свідчить про збільшення ролі атомів Карбону в побудові молекулярної структури по відношенню до атомів Гідрогену, Оксигену та Нітрогену.

Для отримання електронного спектру поглинання синтетичних ФК 1 мл розчину препарату вносили у мірну колбу на 25 мл і доводили до мітки дистильованою водою. У якості розчину порівняння використовували дистильовану воду. Для

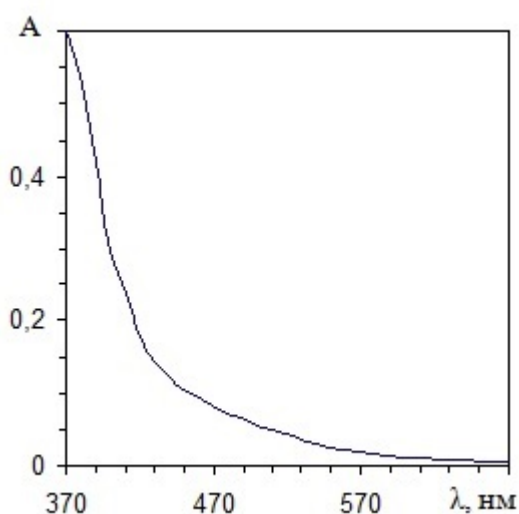


Рис. 2. Спектр поглинання синтетичних ФК

побудови графіку вимірювали оптичну густину розчину при різних довжинах хвиль (рис. 2).

Отриманий спектр має вигляд пологої кривої з поступовим зменшенням оптичної густини в міру збільшення довжини хвилі. Такий характер спектру пояснюють наявністю у структурі ФК розгалуженої системи спряжених зв'язків  $>C=C<$  [1,2]. Встановлене безструктурне поглинання є типовим і для природних фульвокислот, що підтверджує однотипність їх хімічної будови.

Більш повну інформацію про будову ФК можна отримати з ІЧ-спектрів (Рис. 3). Широка смуга поглинання при  $3440\text{ см}^{-1}$  свідчить про наявність ОН-груп, зв'язаних міжмолекулярними водневими зв'язками. Смуга поглинання при  $2960\text{--}2840\text{ см}^{-1}$  зумовлена валентними коливаннями  $-CH_2$  і  $-CH_3$  аліфатичного ланцюга, а поглинання при  $1374\text{ см}^{-1}$  свідчить про деформаційні коливання С-Н в насиченому

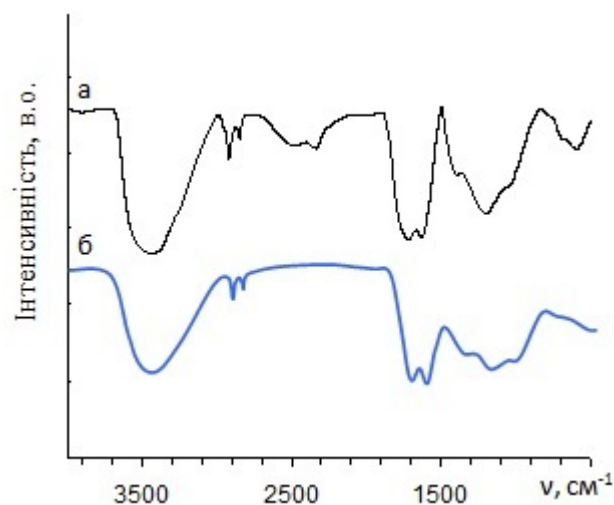


Рис. 3. ІЧ-спектри синтетичних (а) та природних (б) ФК

аліфатичному радикалі. Смуга поглинання при  $1710\text{ см}^{-1}$  характерна для карбоксильних груп. Три смуги близько  $1610$ ,  $1494$  і  $1450\text{ см}^{-1}$  характерні для коливань ароматичного кільця. Піки при  $1210\text{ см}^{-1}$  відповідають коливанням С-О зв'язків карбоксильних і фенольних груп, а в діапазоні  $1025\text{--}1066\text{ см}^{-1}$  – коливанню С-О зв'язків спиртових груп.

Порівняння ІЧ-спектрів синтетичних і природних ФК можна зробити висновок про однотипність їх хімічної структури.

За даними рентгенодифракційного аналізу синтетичні ФК не мають кристалічної структури, що є типовим для природних гумінових речовин (рис. 4).

Рельєф поверхні синтетичних ФК, одержаних з оплодня гранату, досліджували методом растрової електронної мікроскопії. Одержані знімки свідчать про однотипність одержаних частинок порошку (рис. 5).

Важливою характеристикою структу-

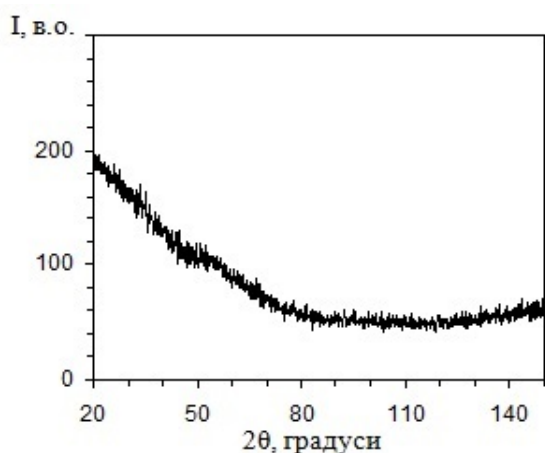


Рис. 4. Дифрактограма синтетичних ФК

ри та реакційної здатності ФК є кисневмісні функціональні групи (карбоксильні та фенольні групи), які визначають їх хімічну поведінку. Отримані значення вмісту основних кислотних груп у структурі одержаних синтетичних ФК (табл. 3) знаходяться в діапазоні, характерному для природних ФК.

Крім кислотних груп, важливою властивістю ФК є їх окисно-відновні можливості, які зазвичай характеризують окисно-відновною ємністю. Окисно-відновна ємність – це кількість окисника/відновника, яка відновлюється/окислюється при взаємодії з ФК,

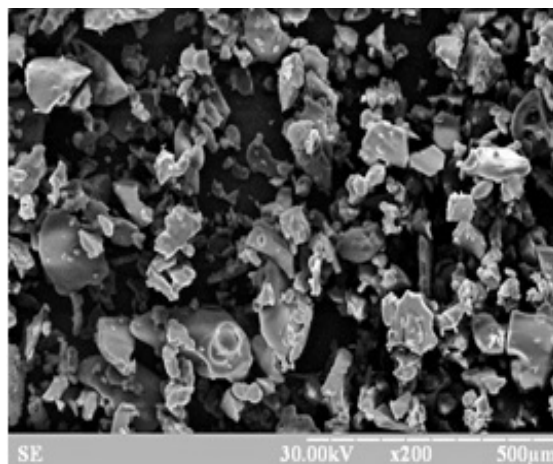


Рис. 5. РЕМ-знімки порошку синтетичних ФК

нормована на їх масу. В окисно-відновних реакціях ФК можуть виступати як окисниками, так і відновниками [34, 35].

Поширеним методом визначення відновної ємності ФК є метод запропонований Матієсеном [23], який базується на відновленні  $K_3Fe(CN)_6$  до  $K_4Fe(CN)_6$  синтетичними ФК. Використання  $K_3Fe(CN)_6$  обумовлено тим, що він має сталий окисно-відновний потенціал (0,543 В) в широкому діапазоні рН (від 4 до 11). Крім того, спектри поглинання розчинів  $K_3Fe(CN)_6$  та  $K_4Fe(CN)_6$  відрізняються один від одного, що дозволяє проводити їх

## Таблиця 3

**Функціональний аналіз (–COOH і –ОН груп) синтетичних фульвокислот з оплодня гранату**

Речовина	$\Sigma(\text{ArOH} + \text{COOH})$ , ммоль/г	–COOH, ммоль/г	ArOH, ммоль/г
Синтетичні ФК	7,8±0,2	2,7±0,2	6,0±0,1
Природні ФК [1]	5,3–13,4	2,2–10,1	1,9–7,4

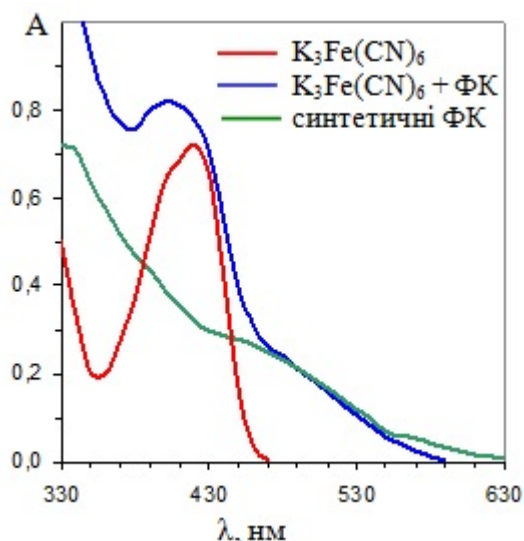


Рис. 6. Спектри поглинання  $K_3Fe(CN)_6$ , синтетичних ФК і сумарного розчину  $K_3Fe(CN)_6$  і синтетичних ФК

фотометричне визначення при сумісній присутності. Характерним є те, що при 420 нм спектр поглинання  $K_3Fe(CN)_6$  має максимум, тоді як при даній довжині хвилі поглинання  $K_4Fe(CN)_6$  дуже мале. Не мало важливим є також факт високої стабільності  $K_3Fe(CN)_6$  та  $K_4Fe(CN)_6$ , що в свою чергу попереджує перебіг побічних реакцій.

На рис. 6 зображено спектри поглинання 0,25 мМ розчину  $K_3[Fe(CN)_6]$ , розчину синтетичних ФК, одержаних окисненням фенольних сполук, що містяться в оплодні гранату, концентрацією 50 мг/л та розчину, що містив одночасно обидва попередні розчини в зазначених концентраціях.

В результаті було встановлено, що значення відновної ємності для синтетичних ФК становить  $5,2 \pm 0,3$  ммоль/г. Значення коефіцієнту варіації не перевищує 1%, що свідчить про хорошу відтворюваність даних.

Встановлено, що відновна ємність

синтетичних ФК з оплодня гранату знаходяться в діапазоні значень характерних для природних ФК вилучених з ґрунту (1,09 – 6,5 ммоль/г) [22].

**ВИСНОВКИ.** Встановлено, що фенольні сполуки, які містяться в оплодні гранату можуть бути використані в ролі попередника для одержання синтетичних фульвокислот.

Порівняльний аналіз елементного складу та спектральних характеристик одержаних за розробленою методикою синтетичних ФК з природними ФК дозволив констатувати однотипність їх хімічної будови. Рентгенодифракційний аналіз синтетичних фульвокислот свідчить про їх аморфну природу.

Розраховано вміст основних кислотних груп у структурі синтетичних ФК та їх відновну ємність. Зокрема вміст карбоксильних груп становить  $2,7 \pm 0,2$  ммоль/г, а фенольних груп –  $6,0 \pm 0,1$  ммоль/г; відновна ємність становить  $5,2 \pm 0,3$  ммоль/г.

РЕМ-знімки висушених препаратів синтетичних фульвокислот свідчать про однотипність одержаних частинок порошку.

#### СИНТЕТИЧЕСКИЕ ФУЛЬВОКИСЛОТЫ С ОКОЛОПЛОДНИКА ГРАНАТА

В. А. Литвин

*Черкасский национальный университет им. Б. Хмельницкого, бульв. Шевченко, 81, Черкаси, 18000, Украина*

*\*email: litvin\_valentina@ukr.net*

Разработана новая оригинальная методика получения синтетических фульвокислот



путем окисления фенольных соединений околоплодника граната (элаготанинов и лигнина) молекулярным кислородом в щелочной среде. Сравнение спектральных и физико-химических свойств полученного продукта и природных фульвокислот свидетельствует об однотипности их химического строения. Однако, в отличие от природных фульвокислот, синтетические аналоги, полученные по разработанной методике характеризуются контролируемыми и воспроизводимыми свойствами, что значительно расширяет возможности их использования в медицине.

**К л ю ч е в ы е с л о в а:** гуминовые вещества, синтетические фульвокислоты, элаготанины, лигнин.

#### SYNTHETIC FULVIC ACIDS FROM POMEGRANATE PEEL

V.A. Litvin

*Bohdan Khmelnytsky National University, Shevchenko str. 81, Cherkasy, 18000, Ukraine*  
\*email: [litvin\\_valentina@ukr.net](mailto:litvin_valentina@ukr.net)

It is known that fulvic acids (FA) have a whole complex of therapeutic properties, but their widespread introduction into medical practice is limited by the dependence of the properties of the final product on the source of their extraction. In this regard, research aimed at developing experimental approaches for the production of synthetic substances that are similar in structure, physical, chemical and therapeutic properties to natural FA, but characterized by standardized and controlled parameters, is of interest. The purpose of the work was to develop a method of obtaining synthetic FA using as a precursor ellagitannins and lignin extracted from pomegranate peels and comprehensive study of their properties. As a result of the experiment

and the analysis of the results it was found that the elagotannins and lignin contained in the peel of pomegranate can be used as a precursor to obtain synthetic FA. Comparative analysis of the elemental composition and spectral characteristics of synthetic FA with the literature data for natural FA allowed to ascertain the uniformity of their chemical structure. X-ray diffraction analysis of synthetic FA indicates their amorphous nature, which is typical of natural FA as well. The content of basic acid groups in the structure of synthetic FAs and their recovery capacity are calculated. In particular, the content of carboxyl groups is  $2.7 \pm 0.2$  mmol/g, and the phenolic groups -  $6.0 \pm 0.1$  mmol/g; the recovery capacity is  $5.2 \pm 0.3$  mmol/g. The SEM images of the dried synthetic FA preparations show the uniformity of the powder particles obtained. However, unlike natural FA, synthetic analogues obtained by the developed method are characterized by controlled and reproducible properties, which greatly expands their use in medicine.

**К е у w o r d s:** humic substances, synthetic fulvic acids, elagotannins, lignin

#### ЛІТЕРАТУРА

1. *Попов А. И.* Гуминовые вещества: свойства, строение, образование : под ред. Е. И. Ермакова. – СПб.: Изд-во С.-Петерб. ун-та, 2004. – 248 с.
2. *Орлов Д. С.* Гумусовые кислоты почв и общая теория гумификации. – М.: МГУ, 1990. – 325 с.
3. *Van Rensburg C. E. J.* The Antiinflammatory Properties of Humic Substances: A Mini Review // *Phytother. Res.* – 2015. – P. 1-6.
4. *Motojima H. O., Villareal M., Han J., Isoda H.* Microarray analysis of immediate-type allergy in KU812 cells in response to fulvic acid // *Cytotechnology.* – 2011. – 63(2). P. 181–90.
5. *Tachibana Y., Hiribe S., Tawa R.* Studies of antioxidative activity of humic substances in peat // *Trace Nutrients Res.* – 2004. – Vol. 23. –

- P. 104–108.
6. *Van Rensburg C. E. J., van Straten A, Dekker J.* An in vitro investigation of the antimicrobial activity of oxifulvic acid // *J. Antimicrob. Chemother.* – 2000. – Vol. 46. – P. 853–854.
  7. *Van Rensburg C. E. J., Malfeld S. C. K., Dekker J.* Topical application of oxifulvic acid suppresses the cutaneous immune response in mice // *Drug Dev. Res.* – 2001. – Vol. 53. – P. 29–32.
  8. *Kodama H.* Antitumor effect of humus extract on murine transplantable L1210 Leukemia // *J. Vet. Med. Sci.* – 2007. – Vol. 69(10). P. 1069–71.
  9. *Sherry L., Jose A., Murray C., Williams C., Jones B., Millington O., Bagg J., Ramage G.* Carbohydrate Derived Fulvic Acid: An in vitro Investigation of a Novel Membrane Active Antiseptic Agent Against *Candida albicans* Biofilms // *Front Microbiol.* – 2012. – Vol. 3. – P. 116.
  10. *Gandy J.J., Snyman J.R., van Rensburg C.E.* Randomized, parallel-group, double-blind, controlled study to evaluate the efficacy and safety of carbohydrate-derived fulvic acid in topical treatment of eczema // *Clin. Cosmet. Investig Dermatol.* – 2011. – Vol. 4. – P. 145–8.
  11. *Ghosal S., Singh S.K., Kumar Y.* Antiulcerogenic of fulvic acids and 4-methoxy-6-zarbomethoxybiphenyl isolated from shilaji // *Phytotherapy Research.* – 1988. – Vol. 2(4) . – P. 187–191.
  12. *Carrasco-Gallardo C., Guzmán L., Maccioni R.B.* Shilajit: a natural phytocomplex with potential procognitive activity // *Int. J. Alzheimers Dis.* – 2012. – P. 674142.
  13. *Winkler J., Ghosh S.* Therapeutic Potential of Fulvic Acid in Chronic Inflammatory Diseases and Diabetes // *J. Diabetes Res.* – 2018. – P. 7.
  14. *Morales O.Y., Navarrete J.M., Gracia I., Macías L., Rivera M., Sánchez F.* Fulvic Acids and Viral Infections // *Open. Conf. Proc. J.* – 2012. – Vol. 3. – P. 24–29.
  15. *Gandy J.J., Meeding J.P., Snyman J.R., van Rensburg C.E.* Phase 1 clinical study of the acute and subacute safety and proof-of-concept efficacy of carbohydrate-derived fulvic acid // *Clin. Pharmacol.* – 2012. – Vol. 4. – P. 7–11.
  16. *Cataldo F.* On the structure of macromolecules obtained by oxidative polymerization of polyhydroxyphenols and quinones // *Polym. Int.* – 1998. – Vol. 46. – P. 263–268.
  17. *Jung A. V., Frochot C., Parant S., Lartiges B. S., Selve C., Viriot M. L., Bersillon J. L.* Synthesis of amino-phenolic humic-like substances and comparison with natural aquatic humic acids: a multi-analytical techniques approach // *Org. Geochem.* – 2005. – Vol. 36. – P. 1252–1271.
  18. *Ślawińska D., Polewski K., Rolewski P., Ślawiński J.* Synthesis and properties of model humic substances derived from gallic acid // *Int. Agrophys.* – 2007. – Vol. 21. – P. 199–208.
  19. Pat. 5945446 United States, Int.Cl<sup>6</sup> A 61 K 31/35; A 01 N 35/78. Process for Preparing Synthetic Soil-Extract Materials and Medicaments Based Thereon / R. J. Laub; Laube Biochemicals. – N 08/798,329; filing 10.02.1997; publ. 31.08.99.
  20. *Litvin V.A., Minaev B.F., Baryshnikov G.V.* Synthesis and properties of synthetic fulvic acid derived from hematoxylin // *J. Mol. Struct.* – 2015. – V. 1086 – P. 25–33.
  21. *Litvin V. A., Galagan R. L., Minaev B. F.* Synthesis and Properties of Synthetic Analogs of Natural Humic Acids // *Russian Journal of Applied Chemistry.* – 2012. – Vol. 85, No. 2. – P. 296–302.
  22. *Данченко Н. Н.* Функциональный состав гумусовых кислот: определение и взаимосвязь с реакционной способностью: дисс. ... канд. хим. наук: 02.00.03, 11.00.11 / Данченко Наталья Николаевна. – М., 1997. – 135 с.
  23. *Struyk Z., Sposito G.* Redox properties of standard humic acids // *Geoderma.* – 2001. – 102. – P. 329–346.

24. *Taha M. A., Razek* Impact of primary treated sewage water on the chemical composition of safflower oil as a potential candidate for biodiesel production // *IOSR J Environ Sci Toxicol Food Technol.* – 2013. – Vol. 7 (1). – P. 38-42.
25. *Rowayshed G., Salama A., Abul-Fadl M., Akila-Hamza, S., Emad A.* Mohamed Nutritional and Chemical Evaluation for Pomegranate (*Punica granatum* L.) Fruit Peel and Seeds Powders By Products // *Middle East J. Appl. Sci.* – 2013. – Vol. 3(4). – P. 169-179.
26. *Garcia-Villalba R., Espín J. C., Kroon P. A., Alasalvar C., Aaby K., Heinonen M., Voorspoels S., Tomas-Barberan F.* A validated method for the characterization and quantification of extractable and non-extractable ellagitannins after acid hydrolysis in pomegranate fruits, juices, and extracts // *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* – 2015. – 63(29). – P. 6555-6566.
27. *Wu S., Tian L.* Diverse Phytochemicals and Bioactivities in the Ancient Fruit and Modern Functional Food Pomegranate (*Punica granatum*) // *Molecules.* – 2017. – 22(10). – P. 473-478.
28. *Yasoubi, Barzegarl M., Sahari M.A., Azizi M.H.* Total phenolic contents and antioxidant activity of Pomegranate (*Punica granatum* L.) peel extracts // *J. Agri. Sei. Technol.* – 2007. – Vol. 9. – P. 35-42.
29. *Мавлянов С.М., Исмаилов А. И., Исламбеков Ш. Ю.* Растительные дубильные вещества // *Химия природ. соединений.* – 2001. – № 1. – С. 36-42.
30. *Mahboubi A., Asgarpanah J., Sadaghiyani P.N., Faizi M.* Total phenolic and flavonoid content and antibacterial activity of *Punica granatum* L. var. *pleniflora* flowers (Golnar) against bacterial strains causing foodborne diseases // *BMC complementary and alternative medicine.* – 2015. – Vol. 15. – P. 366.
31. *Landete J.M.* Ellagitannins, ellagic acid and their derived metabolites: A review about source, metabolism, functions and health // *Food Research International.* – 2011. – Vol. 44. – P. 1150-1160.
32. *Ahmed S.A., Abood N.H., Al-Janabi A.A.* Antimicrobial effect of Pomegranate peels extract on some pathogenic microorganisms // *Engg. Tech. J.* – 2013. – Vol. 31(3). – P. 1-5.
33. *Погосян Р.А., Несторова О.В., Доброхотов Д.А.* Исторический опыт и перспектива использования плодов гранатового дерева в медицине и фармации (*Punica granatum*). – Журнал научных статей «Здоровье и образование в XXI веке». – 2016. – Т.18, № 5 – С. 131-136.
34. *Litvin V.A., Minaev B.F.* Spectroscopy study of silver nanoparticles fabrication using synthetic humic substances and their antimicrobial activity // *Spectrochim. Acta, Part A.* – 2013. – № 108. P. 115-122.
35. *Akaighe N., MacCuspie R. I., Navarro D. A., Aga D. S., Banerjee S., Sohn M., Sharma V. K.* Humic acid-induced silver nanoparticle formation under environmentally relevant conditions // *Environ. Sci. Technol.* – 2011. – Vol. 45, N 9. – P. 3895–3901.

#### REFERENCES

1. Popov A. I. Humic substances: properties, structure, formation: ed. E.I. Ermakov. - SPb.: Publishing house of St. Petersburg. University, 2004, 248 p. [in Russian].
2. Orlov D.S. Humic acids of soils and the general theory of humification. - M.: Moscow State University, 1990, 325 p. [in Russian].
3. Van Rensburg C. E. J. The Antiinflammatory Properties of Humic Substances: A Mini Review // *Phytother. Res.* 2015. 1-6.
4. Motojima H. O., Villareal M., Han J., Isoda H. Microarray analysis of immediate-type allergy in KU812 cells in response to fulvic acid. *Cytotechnology.* 2011. **63(2)**: 181–90.
5. Tachibana Y., Hiribe S., Tawa R. Studies of antioxidative activity of humic substances in peat. *Trace Nutrients Res.* 2004. **23**: 104–108.

6. Van Rensburg C. E. J., van Straten A, Dekker J. An in vitro investigation of the antimicrobial activity of oxifulvic acid. *J. Antimicrob. Chemother.* 2000. **46**: 853–854.
7. Van Rensburg C. E. J., Malfeld S. C. K., Dekker J. Topical application of oxifulvic acid suppresses the cutaneous immune response in mice. *Drug Dev. Res.* 2001. **53**: 29–32.
8. Kodama H. Antitumor effect of humus extract on murine transplantable L1210 Leukemia. *J. Vet. Med. Sci.* 2007. **69(10)**: 1069–71.
9. Sherry L., Jose A., Murray C., Williams C., Jones B., Millington O., Bagg J., Ramage G. Carbohydrate Derived Fulvic Acid: An in vitro Investigation of a Novel Membrane Active Antiseptic Agent Against *Candida albicans* Biofilms. *Front Microbiol.* 2012. **3**: 116.
10. Gandy J.J., Snyman J.R., van Rensburg C.E. Randomized, parallel-group, double-blind, controlled study to evaluate the efficacy and safety of carbohydrate-derived fulvic acid in topical treatment of eczema. *Clin. Cosmet. Investig Dermatol.* 2011. **4**: 145-8.
11. Ghosal S., Singh S.K., Kumar Y. Antiulcerogenic of fulvic acids and 4-methoxy-6-zarbomethoxybiphenyl isolated from shilaji. *Phytotherapy Research.* 1988. **2(4)**: 187–191.
12. Carrasco-Gallardo C., Guzmán L., Maccioni R.B. Shilajit: a natural phytocomplex with potential procognitive activity. *Int. J. Alzheimers Dis.* 2012. 674142.
13. Winkler J., Ghosh S. Therapeutic Potential of Fulvic Acid in Chronic Inflammatory Diseases and Diabetes. *J. Diabetes Res.* 2018. 7.
14. Morales O.Y., Navarrete J.M., Gracia I., Macías L., Rivera M., Sánchez F. Fulvic Acids and Viral Infections. *Open. Conf. Proc. J.* 2012. **3**: 24-29.
15. Gandy J.J., Meeding J.P., Snyman J.R., van Rensburg C.E. Phase 1 clinical study of the acute and subacute safety and proof-of-concept efficacy of carbohydrate-derived fulvic acid. *Clin. Pharmacol.* 2012. **4**: 7-11.
16. Cataldo F. On the structure of macromolecules obtained by oxidative polymerization of polyhydroxyphenols and quinones. *Polym. Int.* 1998. **46**: 263.
17. Jung A. V., Frochot C., Parant S., Lartiges B. S., Selve C., Viriot M. L., Bersillon J. L. Synthesis of amino-phenolic humic-like substances and comparison with natural aquatic humic acids: a multi-analytical techniques approach. *Org. Geochem.* 2005. **36**: 1252.
18. Sławińska D., Polewski K., Rolewski P., Sławiński J. Synthesis and properties of model humic substances derived from gallic acid. *Int. Agrophys.* 2007. **21**: 199.
19. Pat. 5945446 United States, Int.CI<sup>6</sup> A 61 K 31/35; A 01 N 35/78. Process for Preparing Synthetic Soil-Extract Materials and Medicaments Based Thereon / R. J. Laub; Laube Biochemicals. – N 08/798,329; filing 10.02.1997; publ. 31.08.99.
20. Litvin V.A., Minaev B.F., Baryshnikov G.V. Synthesis and properties of synthetic fulvic acid derived from hematoxylin. *J. Mol. Struct.* 2015. **1086**: 25.
21. Litvin V. A., Galagan R. L., Minaev B. F. Synthesis and Properties of Synthetic Analogs of Natural Humic Acids *Russian Journal of Applied Chemistry.* 2012. **85 (2)**: 296.
22. Danchenko N. N. The functional composition of humic acids: determination and relationship with reactivity: diss. ... cand. chem. Sciences: 02.00.03, 11.00.11 / Danchenko Natalya Nikolaevna. M., 1997. 135. [in Russian].
23. Struyk Z., Sposito G. Redox properties of standard humic acids. *Geoderma.* 2001. **102**: 329.
24. Taha M. A. Razeq Impact of primary treated sewage water on the chemical composition of safflower oil as a potential candidate for bio-

- diesel production. *IOSR J Environ Sci Toxicol Food Technol.* 2013. **7 (1)**: 38-42.
25. Rowayshed G., Salama A., Abul-Fadl M., Akila-Hamza, S., Emad A. Mohamed Nutritional and Chemical Evaluation for Pomegranate (Punica granatum L.) Fruit Peel and Seeds Powders By Products. *Middle East J. Appl. Sci.* 2013. **3(4)**: 169-179.
26. Garcia-Villalba R., Espín J. C., Kroon P. A., Alasalvar C., Aaby K., Heinonen M., Voorspoels S., Tomas-Barberan F. A validated method for the characterization and quantification of extractable and non-extractable ellagitannins after acid hydrolysis in pomegranate fruits, juices, and extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 2015. **63(29)**: 6555.
27. Wu S., Tian L. Diverse Phytochemicals and Bioactivities in the Ancient Fruit and Modern Functional Food Pomegranate (Punica granatum). *Molecules.* 2017. **22(10)**: 473.
28. Yasoubi, Barzegarl M., Sahari M.A., Azizi M.H. Total phenolic contents and antioxidant activity of Pomegranate (Punica granatum L.) peel extracts. *J. Agri. Sei. Technol.* 2007. **9**: 35.
29. Mavlyanov S.M., Ismailov A.I., Islambekov Sh. Yu. Plant tannins. *Chemistry of nature compounds.* 2001. **1**: 36. [in Russian].
30. Mahboubi A., Asgarpanah J., Sadaghiyani P.N., Faizi M. Total phenolic and flavonoid content and antibacterial activity of Punica granatum L. var. pleniflora flowers (Golnar) against bacterial strains causing foodborne diseases. *BMC complementary and alternative medicine.* 2015. **15**: 366.
31. Landete J.M. Ellagitannins, ellagic acid and their derived metabolites: A review about source, metabolism, functions and health *Food Research International.* 2011. **44**: 1150.
32. Ahmed S.A., Abood N.H., Al-Janabi A.A. Antimicrobial effect of Pomegranate peels extract on some pathogenic microorganisms. *Engg. Tech. J.* 2013. **31(3)**: 1.
33. Pogosyan R.A., Nestorova O.V., Dobrokhotov D.A. Historical experience and the prospect of using pomegranate fruits in medicine and pharmacy (Punica granatum). *Journal of scientific articles "Health and Education in the 21st Century".* 2016. **18 (5)**: 131.
34. Litvin V.A., Minaev B.F. Spectroscopy study of silver nanoparticles fabrication using synthetic humic substances and their antimicrobial activity. *Spectrochim. Acta, Part A.* 2013. **108**: 115.
35. Akaighe N., MacCuspie R. I., Navarro D. A., Aga D. S., Banerjee S., Sohn M., Sharma V. K. Humic acid-induced silver nanoparticle formation under environmentally relevant conditions. *Environ. Sci. Technol.* 2011. **45, 9**: 3895–3901.

Надійшла 10.01.2020