

Корисна модель належить до фармації та медицини, а саме до способу одержання біологічно активної субстанції - екстракту з рослинної сировини з протимікробною та антиоксидантною активністю, що може бути використаний як лікувально-профілактичний засіб.

Сучасний фармацевтичний ринок пропонує великий асортимент синтетичних лікарських засобів з протимікробною та антиоксидантною діями, проте вони провокують виникнення резистентності до них мікроорганізмів, побічні дії та часто алергічні реакції.

Як відомо, посилення процесів вільно-радикального окиснення в організмі спостерігається при багатьох видах захворювань: раку, атеросклерозу, гіпертензії, хворобі Альцгеймера, хворобі Паркінсона [Cassidy, et al., 2020; Jiang, et al., 2016], артриті, нейродегенеративних розладах, діабеті [Li, et al., 2016; Liu, et al., 2017]. Антиоксиданти є препаратами, які можуть протистояти оксидативному стресу за рахунок гальмування розвитку вільно-радикальних реакцій, попереджаючи утворення пероксидів, які пошкоджують клітинні та субклітинні мембрани організму [Karuppagounder, et al., 2021]. Створення нових лікарських засобів з протимікробною та антиоксидантною діями з рослинної сировини вирішує цю проблему.

Відомий спосіб одержання рідкого екстракту з протизапальною та анальгетичною активністю, який одержують шляхом екстрагування трави *Scorzonera Acuminata* з використанням н-гексану як екстрагенту при співвідношенні сировина-екстрагент 1:50 [Bahadır-Acıkara, Ö.; Özbilgin, S.; Saltan-İşcan, G.; Dall'Acqua, S.; Rjašková, V.; Özgökçe, F.; Suchý, V.; Šmejkal, K. Phytochemical analysis of Podospermum and Scorzonera w-hexane extracts and the HPLC quantitation of triterpenes. *Molecules* 2018, 23, 1813]. Кінцевий продукт отриманий таким способом є сухим екстрактом.

Проте такий спосіб передбачає використання як розчинника н-гексану, що знижує можливість отримання максимальної кількості фенольних сполук через його низьку полярність; трава *Scorzonera Acuminata* не властива нашому регіону, вона росте в Туреччині.

Відомий спосіб одержання рідкого екстракту з антиоксидантною активністю, який одержують шляхом екстрагування трави *Scorzonera papposa* з використанням як екстрагентів ряду розчинників із зростаючою полярністю: н-гексану, хлороформу, хлороформ-метанолу у співвідношенні 9:1 та метанолу шляхом вичерпної мацерації (3×2 л) [Milella, L.; Bader, A.; De Tommasi, N.; Russo, D.; Braca, A., Antioxidant and free radicalscavenging activity of constituents from two *Scorzonera* species, *Food Chemistry*, 2014, 160, 298-304].

Кінцевий продукт отриманий таким способом є сухим екстрактом.

Недоліком даного способу є використання великої кількості розчинників, що вказує на складність та затратність процесу екстракції.

Найбільш близьким аналогом до запропонованого способу є спосіб одержання комплексу біологічно активних речовин у формі сухого порошкоподібного екстракту з антибактеріальною та антибіоплівковою активністю шляхом екстракції повітряно-сухої трави *Scorzonera mackmeliana*, за яким екстракцію подрібненої повітряно-сухої трави здійснювали 96 % етиловим спиртом методом мацерації, з подальшим фільтруванням, упарюванням і концентруванням [Sweidan, A., El-Mestrah, M., Kanaan, H., Dandache, I., Merhi, F., & Chokr, A. Antibacterial and antibiofilm activities of *Scorzonera mackmeliana*. *Pak. J. Pharm. Sci*, 2020, 33(1), 199-206]. Кінцевий продукт отриманий таким способом є сухим порошкоподібним екстрактом.

Недоліком такого способу є складність процесу, яка обумовлена довготривалістю та високою енергозатратністю. Також цей спосіб не дозволяє одержати екстракт з трави *Scorzonera purpurea*, який проявляє протимікробну та антиоксидантну активність, а трава *Scorzonera mackmeliana* невластива нашому регіону.

В основу корисної моделі поставлена задача створити спосіб одержання екстракту з трави *Scorzonera purpurea* з протимікробною та антиоксидантною активністю, в якому за рахунок введення нових дій, а також екстрагування рослинної сировини 70 % етиловим спиртом при оптимальному співвідношенні сировина-екстрагент та параметрів процесу, що забезпечують одержання біологічно активної субстанції з високим вмістом комплексу біологічно активних речовин, головними компонентами якого є фенольні сполуки, причому отримана таким способом субстанція може бути використана як діюча речовина у складі лікарських засобів, виконаних у різних лікарських формах і придатних до тривалого застосування внаслідок практичної нетоксичності і відсутності побічних ефектів у засобах рослинного походження.

Поставлена задача вирішується тим, що у способі одержання екстракту з трави *Scorzonera purpurea* з протимікробною та антиоксидантною активністю, що включає подрібнення повітряно-сухої рослинної сировини, екстракцію рослинної сировини методом мацерації та фільтрацію, згідно з корисною моделлю, як рослинну сировину використовують траву *Scorzonera purpurea*, екстракцію здійснюють 70 % етиловим спиртом при співвідношенні сировина-екстрагент 1:10 за кімнатної температури впродовж 7 діб, а відфільтрований екстракт відстоюють при температурі від +2 до +4 °C впродовж 5-7 діб і надалі центрифугують.

Запропонований спосіб дозволяє одержати новий екстракт з трави *Scorzonera purpurea* з

протимікробною та антиоксидантною активністю.

Саме вибір трави *Scorzonera purpurea* як рослинної сировини у поєднанні з параметрами способу обумовлює одержання кінцевого продукту з необхідним спектром фармакологічної активності. А здійснення відстоювання та центрифугування дозволяє одержати біологічно активну субстанцію з високим вмістом комплексу біологічно активних речовин, головними компонентами якого є фенольні сполуки.

Вперше було виявлено протимікробну та антиоксидантну дії екстракту з трави *Scorzonera purpurea*, одержаного за даним способом. Оптимальним екстрагентом для способу є 70 % етиловий спирт. Вибір етилового спирту як екстрагенту було здійснено експериментальним шляхом, виходячи з умов максимальної екстракції фенольних сполук із вибраної рослинної сировини (Таблиця 1).

Спосіб здійснюють таким чином.

Подрібнену до розміру часток 0,2 см повітряно-суху траву *Scorzonera purpurea* екстрагують методом мацерації 70 % етиловим спиртом при співвідношенні сировина-екстрагент 1:10 впродовж 7 діб при кімнатній температурі. Одержаний екстракт фільтрують, відстоюють впродовж 7 діб в холодному місці при температурі від +2 до +4 °C для коагуляції зважених частинок, надалі центрифугують зі швидкістю обертання 3000 об./хв.

Корисна модель пояснюється прикладами.

Приклад 1. По 10 грамів попередньо подрібненої повітряно-сухої трави *Scorzonera purpurea* зі ступенем подрібнення 0,2 см поміщають у 3 скляні ємності з притертими пробками, після чого з заливають 100 мл етиловий спирт, перемішують та залишають при кімнатній температурі у темному місці на 7 діб, щоденно струшуючи.

Етиловий спирт брали в наступних концентраціях 96, 70, 40 %.

Екстракцію рослинної сировини здійснюють за наступним співвідношенням між сировиною та екстрагентом - 1:10. Після завершення мацерації вміст кожної ємності фільтрують через складчастий фільтрувальний папір, а отримані витяжки відстоюють 7 діб у щільно закритих темних флаконах при температурі від +2 до +4 °C, потім центрифугують зі швидкістю обертання 3000 об./хв.

Аналітичний контроль вмісту фенолів у перерахунку на галову кислоту виражено в міліграмах еквівалента галової кислоти (мг ГКЕ/мл) на 1 мл екстракту проводили спектрофотометричним методом. Результати наведено в Таблиці 1.

Таблиця 1

Екстрагент	96 % етиловий спирт	70 % етиловий спирт	40 % етиловий спирт
Вміст суми фенольних сполук, мг/мл $\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$, n=3	1,432±0,15	2,111±0,17	2,02±0,11

Оптимальною концентрацією екстрагенту етилового спирту є 70 % зі співвідношенням між сировиною та екстрагентом - 1:10.

Приклад 2. Антиоксидантну активність рослинного екстракту, одержаного за способом мацерації, вивчали з використанням методу FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power), який ґрунтується на здатності антиоксидантів відновлювати іони заліза з тривалентної форми (Fe^{3+}) до двовалентної (Fe^{2+}) авторів Do et al. [Do, Q. D., Angkawijaya, A. E., Tran-Nguyen, P. L., Huynh, L. H., Soetaredjo, F. E., Ismadji, S., & Ju, Y. 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, 22(3), 296-302].

Змішують 50 мкл екстракту з 150 мкл води та 1500 мкл розчину FRAP, суміш витримують протягом 4 хвилин. Для контролю готували суміш, що містила 50 мкл 70 % етилового спирту та 1650 мкл розчину FRAP. Після цього вимірюють оптичну густину зразків при довжині хвилі 593 нм на спектрофотометрі ULAB 108 UV. Для порівняння антиоксидантної активності екстракту використовують водний розчин сульфату заліза (II), який відомий високою відновлювальною здатністю.

Всі виміри відтворено тричі.

Встановлено високу відновну здатність заліза (23,58 мкмоль/мл).

Приклад 3. ДПФГ-метод оцінки антиоксидантної активності екстракту з трави *Scorzonera purpurea* передбачав використання протоколу, адаптованого з методики Ясіцької-Місяк та співавт. [Jasicka-Misiak, I., Makowicz, E., & Stanek, N. Chromatographic fingerprint, antioxidant activity, and colour characteristic of polish goldenrod (*Solidago virgaurea* L.) honey and flower. European Food Research and Technology, 2018, 244(7), 1169-1184].

Для приготування робочого розчину 2,2-дифеніл-1-пікрілгідразилу (ДПФГ) беруть 4,0 мг речовини і розчиняють у 100 мл 96 % етилового спирту. До контрольних проб додають по 200 мкл етилового спирту та 1800 мкл ДПФГ-розчину. У дослідних пробах на 200 мкл екстракту припадало 1800 мкл розчину DPPH. Кожен зразок готували у трьох повторях, витримують у темному місці протягом 20

хвилин, після чого вимірюють оптичну густину на довжині хвилі 517 нм за допомогою спектрофотометра ULAB 108 UV. Розрахунок антиоксидантної активності проводять за формулою (1):

$$\text{АОА (\%)} = ((A_0 - A) / A_0) \times 100, (1)$$

де A_0 - оптична густина розчину ДПФГ без зразка, A - оптична густина проби з екстрактом.

Всі виміри відтворено тричі.

Одержані результати оброблено статистично за допомогою програми STATISTICA 8 та пакета статистичних функцій програми Microsoft Excel. Визначено середнє арифметичне значення M , середнє арифметичне відхилення m , кількість повторень n , t - критерій Стюдента [Державна Фармакопея України. Доповнення 1 / Державне підприємство "Український науковий центр якості лікарських засобів". - 1-е вид. - Харків: Державне підприємство "Український науковий центр якості лікарських засобів", 2009. - С. 620].

Дія екстракту *Scorzonera purpurea* наведена порівняно з аскорбіновою кислотою.

Результати дослідження антиоксидантної активності екстракту трави *Scorzonera purpurea* представлені в таблиці 2.

Таблиця 2

	Антиоксидантна активність, ДФПГ (%)
Екстракт <i>Scorzonera purpurea</i>	86±0,98
Аскорбінова кислота	69,008±0,1

Як видно з таблиці 2 антиоксидантна активність екстракту трави *Scorzonera purpurea* (86±0,98 %) є вищою порівняно з активністю аскорбінової кислоти (69,008±0,1 %).

Аналіз одержаних даних свідчить про високу антиоксидантну активність екстракту з трави *Scorzonera purpurea*.

Приклад 4. Вивчення антимікробної активності екстракту з трави *Scorzonera purpurea* проводили методом дифузії в агар [Державна Фармакопея України: в 3 т. / Державне підприємство "Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів". - 2-е вид. - Харків: Державне підприємство "Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів", 2015. - Т. 1. - С. 1128.] та методом серійних розведень [Стандартизація приготування мікробних суспензій [Текст] / Ю.Л. Волянський, Л.Г. Міроненко, С.В. Калініченко [та ін.] // Інформаційний лист про нововведення в системі охорони здоров'я України № 163, 2006. - К.: (Укрмедпатентінформ), 2006. - 10 с.].

Для оцінки активності досліджуваного екстракту використовували тест культури таких мікроорганізмів: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Candida albicans* ATCC 10231.

Дослідження антимікробної дії екстракту методом дифузії в агар: в лунку вносять 0,09 мл зразка, інкубують протягом 24 годин при 35 °С для бактерій та протягом 48 годин при 25 °С. Дані дослідження наведені у таблиці 3.

Таблиця 3

Результати дослідження антимікробної дії екстракту методом дифузії в агар

№	Тест-мікроорганізм	Діаметр зони затримки росту тест-мікроорганізмів, мм	
		Екстракт	Водний розчин етилового спирту 70 %
1	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	17,0	-
2	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538-P	18,0	-
3	<i>Staphylococcus aureus</i> клінічний ізолят Н	17,5	-
4	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	16,0	-
5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	11,0	-
6	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	10,0	-

" - " зона затримки росту відсутня

Аналіз даних таблиці 3 свідчить, що найбільш чутливими стосовно досліджуваного екстракту виявилися штами *S. aureus* (діаметри зон затримки росту - 17-18 мм), та *B. subtilis* (діаметр зони затримки росту - 16 мм). Також чутливою виявилась культура *P. aeruginosa* (діаметр зони затримки росту - 11 мм). Для штаму *C. Albicans* зона затримки росту була незначною.

Для точнішого визначення характеру дії екстракту з трави *Scorzonera purpurea* використовують

метод серійних розведень в соєво-казеїновому бульйоні, мікробіологічне навантаження становить 5000 клітин тест-мікроорганізму на 1 мл. Інкують протягом 24 годин при 35 °С для бактерій та протягом 48 годин при 25 °С.

Таблиця 4

Результати дослідження антимікробної дії екстракту методом розведень в соєво-казеїновому бульйоні

№	Тест-мікроорганізм	Розведення при якому спостерігався бактерицидний ефект
1	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	1:80
2	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538-P	1:80
3	<i>Staphylococcus aureus</i> клінічний ізолят Н	1:80
4	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	1:40
5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	1:40
6	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	1:40

Аналіз даних з таблиці 4 свідчить, що досліджуваний екстракт виявляє антибактеріальну дію, а саме бактерицидну щодо грам-позитивних та до грам-негативних бактерій, а також до грибів роду *Candida*.

Таким чином, запропонований спосіб одержання екстракту з трави *Scorzonera purpurea* з протимікробною та антиоксидантною активністю, що дозволяє отримати екстракт з високим вмістом фенолів. Використання етилового спирту як екстрагенту дозволяє екстрагувати максимальну кількість біологічно активних сполук, зокрема фенолів. Спосіб є простий у виконанні, економічно доступний та може бути здійснений на стандартному обладнанні. Одержаний екстракт з трави *Scorzonera purpurea* представляє інтерес для подальшого вивчення його фармакологічних властивостей та безпечності на предмет створення на його основі нових лікарських засобів з протимікробною та антиоксидантною діями.