

Н. Є. Стадницька, Н. Я. Монька, С. В. Василюк, Г. М. Шиян, В. І. Лубенець

Національний університет “Львівська політехніка”,  
кафедра технології біологічно активних сполук, фармації та біотехнології  
nataliia.y.stadnytska@lpnu.ua

## ДОСЛІДЖЕННЯ СПИРТОВО-ВОДНИХ ЕКСТРАКТІВ *GENISTELLA SAGITTALIS*, ОДЕРЖАНИХ МЕТОДОМ УЛЬТРАЗВУКОВОЇ ЕКСТРАКЦІЇ

<https://doi.org/10.23939/ctas2022.02.100>

Наведено результати аналізу спиртово-водних екстрактів *Genistella sagittalis*, одержаних методом ультразвукової екстракції. Визначено залежність кількісного вмісту екстрактивних речовин, фенольних сполук та флавоноїдів від часу екстрагування. Одержані екстракти перевірено на наявність антиоксидантної активності. Найвищий вміст екстрактивних речовин та поліфенолів одержано у разі 40 хв екстракції ультразвуком, тоді як найвищий вміст флавоноїдів та найкращі показники антиоксидантної активності продемонстрували екстракти, одержані за витримки 60 хв.

**Ключові слова:** поліфенольні сполуки; флавоноїди; антиоксидантна активність; DPPH; ABTS; FRAP.

### Вступ

Сьогодні одним із основних питань під час одержання екстрактивних препаратів є вибір методу екстрагування, котрий би забезпечив максимальне вилучення очікуваних біологічно активних речовин (БАР). Ефективність технології істотно залежить від рівня апаратурно-технологічного забезпечення процесу. Новітні розробки (ультразвукова екстракція, екстракція зрідженими газами, динамічна екстракція) забезпечують повноту екстракції діючих речовин із рослинної сировини, а також зменшують затрати робочої сили [1–4].

Залежно від типу БАР, які необхідно виділити із природної сировини, використовують різні методи екстрагування: мацерацію, рематерацію, перколяцію, реперколяцію, методи протічній та циркуляційної екстрагування [3, 5]. Більшість із цих методів передбачає використання підвищених температур, тому, вибираючи метод екстрагування, потрібно звертати увагу на термостабільність речовин, що вилучаються. Часто найефективнішими залишаються класичні методи екстрагування (мацерація, рематерація), які полягають у вилученні БАР за кімнатної температури [6].

На сучасному етапі розвитку науки особливого значення набувають технології так званих

“холодних” екстрактів, які, на відміну від “гарячих” екстрактів, містять повний спектр біологічно активних речовин у природному незмінному вигляді [5].

Для прискорення екстракційних процесів альтернативною температурі в сучасних технологіях може бути ультразвук. Основою цього методу екстрагування є те, що процес проходить під дією ультразвукових хвиль певної сили, які сприяють руйнуванню клітинних стінок і швидшому вивільненню БАР із внутрішньоклітинного простору. Ультразвукові хвилі спричиняють додаткову механічну деформацію частинок, що може призводити до швидшого просочування рослинної сировини екстрагентом. Під дією ультразвуку спостерігаються явища, які не притаманні іншим фізичним факторам або ж за інтенсивністю перевищують їх. Під впливом ультразвуку в рідині її частинки можуть переміщуватись десятки тисяч разів на секунду навколо частинок сировини, тим самим “струшуючи” поверхневу рідину з частинок твердої фази як під впливом перемінного потужного ультразвукового тиску, так і гідравлічних ударів у мить схлопування кавітаційних каверн [7].

Перевагою ультразвукової екстракції над іншими методами екстракції є насамперед висока проникність клітинних стінок у рослинній си-

ровині для екстрагенту, внаслідок чого відбувається повніше розчинення вмісту БАР клітини та їх вивільнення в екстрагент. Також вагомою перевагою є можливість точного контролювання усіх параметрів ультразвукової обробки (температури, тиску, амплітуди). Це гарантує, що екстраговані сполуки не деградують під час екстракції [7, 8].

Як об'єкт для вивчення впливу ультразвуку на вихід БАР вибрано сировину представника родини Бобових дрічка крилатого *Genistella sagittalis* (L.) Gams. Представників роду *Genista* широко застосовують у медичній практиці, а також в інших сферах людської діяльності, вони є об'єктами дослідження вчених різних наукових напрямів [9–15]. *Genistella sagittalis* – це багаторічна трав'яниста рослина, поширена на Балканському півострові, Піренейх, Альпах, деяких територіях Франції та Румунії, Молдови і Польщі [5]. В Україні дрічок крилатий можна знайти на територіях Закарпатської, Івано-Франківської, Чернівецької та Волинської областей на сонячних ділянках та високогірних луках. Рослина маловиблаглива до ґрунту та пристосована до сухих умов зростання [17]. Дрічок крилатий формує щільні куртини із трав'янистих, прямостоячих заввишки 10–50 см стебел з еліптичними, сидячими завдовжки 5–20 мм та завширшки 4–7 мм листками, що звужуються у вузли. Форма країв рівнокрая, верхівка тупа або загострена. Молоді листки опушені, а старі голі. Жовті метеликоподібні квітки зібрані по 3–16 штук у верхівковій суцвіття-колоски завдовжки 10–12 мм. Плід – стручок із блискучим, коричневого кольору насінням. Хімічний склад сировини *Genistella sagittalis* (L.) Gams малодосліджений. Вчені Румунії ідентифікували в траві дрічка крилатого хлорогенову, п-кумаринову кислоти, ізокверцитин, кверцитин та апігенін [18].

**Мета роботи.** Дослідити вплив часу екстрагування за допомогою ультразвуку трави дрічка крилатого *Genistella sagittalis* (L.) Gams. на вихід екстрактивних речовин, фенольних сполук та флавоноїдів. Визначити антиоксидантну активність одержаних екстрактів.

#### Матеріали та методи досліджень

##### Сировина для досліджень

Для досліджень вибрано нативну сировину *Genistella sagittalis* (L.) Gams, зібрану в околицях

селища Славське Львівської області в період цвітіння. Сировину висушували на повітрі, після чого зберігали в герметичних посудинах.

##### Приготування екстрактів

Наважки по 5 г подрібненої трави дрічка крилатого поміщали у три колби, заливали 70 % спиртом етиловим у співвідношенні 1:20 та залишали для набухання сировини на 24 год за кімнатної температури  $20 \pm 2 - 3$  °С. Після завершення часу колби ставили в ультразвукову ванну та витримували із увімкненим ультразвуком протягом 20 (екстракт-1 (Е-1)), 40 (екстракт-2 (Е-2)) та 60 (екстракт-3 (Е-3)) хв. Екстракти зливали і доводили 70 % спиртом етиловим до 100 мл, після цього фільтрували через змочений чистим екстрагентом фільтр у суху посудину, витримували в холодильнику за 2 °С для кращої коагуляції частинок та центрифугували.

##### Визначення сумарного вмісту екстрактивних речовин

По 1 мл досліджуваного екстракту поміщали у зважені й доведені до постійної маси бюкси. Випаровували розчинник на водяній бані та висушували бюкси в сушильній шафі за 105 °С до постійної маси.

##### Кількісне визначення вмісту поліфенольних сполук

Для визначення кількісного вмісту поліфенольних сполук використовували спектрофотометричний метод [19] із використання реактиву Фоліна – Чокалтеу. Визначення виконували на спектрофотометрі *Hitachi U-2810*.

Досліджувані екстракти розбавляли 70 % спиртом етиловим до вмісту діючих речовин 1 мг/мл. Для визначення змішували 0,1 мл екстракту з 2,9 мл води та 0,5 мл реактиву Фоліна – Чокалтеу, протягом 3 хв витримували в темному місці за кімнатної температури, потім додавали 1,5 мл 20 % розчину  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  та 5 мл води. Залишали на 2 год в темному місці за кімнатної температури. Оптичну густину вимірювали за 760 нм у кюветах із товщиною шару 10 мм. Склад розчину-порівняння: 70 % спирт етиловий – 0,1 мл, вода дистильована – 7,9 мл, реактив Фоліна – Чокалтеу – 0,5 мл, 20 % розчин  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  – 1,5 мл. Кількісний вміст поліфенольних сполук обчислювали в мг еквівалентах галоїдної кислоти (ГК) на грам екстракту (мгГК/г). Для цього будували криву залежності показника оптичної густини від

концентрації стандартного зразка галової кислоти. Вимірювання повторювали тричі.

#### **Кількісне визначення вмісту флавоноїдів**

Кількісне визначення вмісту флавоноїдів виконували методом спектрофотометричного аналізу [19] із використанням спектрофотометра марки *Hitachi U-2810*. До 0,8 мл екстрактів із вмістом екстрактивних речовин 1 мг/мл додавали по 8,4 мл 70 % спирту етилового і по 0,8 мл розчину алюмінію хлориду 2 % та залишали на 40 хв за кімнатної температури в темному місці. Оптичну густину вимірювали по 420 нм у кюветах з товщиною шару 10 мм. Склад розчину-порівняння: екстракт – 0,8 мл, спирт етиловий 70 % – 9,2 мл. Паралельно готували стандартний розчин кверцетину. Кількісний вміст флавоноїдів обчислювали у мг еквівалентах кверцетину (К) на грам екстракту (мгК/г), для цього будували криву залежності показника оптичної густини від концентрації стандартного зразка кверцетину. Вимірювання здійснювали тричі.

#### **Визначення радикалпоглинальної активності екстрактів методом DPPH**

Для визначення радикалпоглинальної здатності досліджуваних екстрактів використовували взаємодію із 2,2-дифеніл-1-пікрилгідразилом (реактив DPPH – 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) [19, 20]. Цей спосіб належить до спектрофотометричних методів аналізу й ґрунтується на визначенні оптичної густини забарвлених робочих розчинів, його переваги – швидкість проведення та точність під час повторень.

Для дослідження змішували 1 мл екстракту з 9 мл (0,04 мг/мл) розчину DPPH в етиловому спирті. Час витримки – 30 хв у темному місці. Контрольний розчин містив 1 мл спирту етилового 70 % та 9 мл розчину DPPH. Оптичну густину вимірювали за довжини хвилі 517 нм в кюветах із шаром завтовшки 10 мм. Вимірювання повторяли тричі.

Антиоксидантну активність обчислювали за формулою:

$$AOA (\%) = (A_0 - A)/A_0 \times 100,$$

де  $A_0$  – оптична густина розчину DPPH;  $A$  – оптична густина розчину досліджуваного екстракту.

Розчин тролоксу використовували для порівняння антиоксидантної активності досліджуваних екстрактів.

#### **Визначення антирадикальної активності екстрактів із використанням реактиву ABTS**

Для визначення антирадикальної активності екстрактів лікарських рослин також використовують метод із застосуванням реактиву 2,2'-азинобіс (3-етилбензтіазолін-6-сульфоніану) ( $ABTS^{•+}$  – 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) [20]. Цей метод дає можливість визначати антиоксидантні властивості гідрофобних та гідрофільних сполук.

Для досліду в мірних колбах ємкістю 10 мл змішували по 5 мл розчину ABTS та 0,5 мл досліджуваного екстракту і витримували 30 с. Контрольний розчин містив: спирт етиловий 70 % – 0,5 мл, ABTS розчин – 5 мл. Оптичну густину вимірювали за довжини хвилі 734 нм у кюветах з товщиною шару 10 мм. Вимірювання виконували тричі.

Антиоксидантну активність обчислювали за формулою:

$$AOA (\%) = (A_0 - A)/A_0 \times 100,$$

де  $A_0$  – оптична густина розчину ABTS;  $A$  – оптична густина розчину досліджуваного екстракту.

#### **Визначення антиоксидантної активності екстрактів методом FRAP**

Для визначення антиоксидантної активності застосовують метод із використанням реактиву FRAP (ferric reducing antioxidant power) як відновлювального субстрату [20].

Для досліду в мірних колбах ємкістю 10 мл змішували по 7,5 мл розчину FRAP, 0,75 мл води та 0,25 мл досліджуваного екстракту і витримували 4 хв. Контрольний розчин містив: спирт етиловий 70 % – 0,25 мл, FRAP розчин – 8,25 мл. Оптичну густину вимірювали за довжини хвилі 593 нм в кюветах із шаром завтовшки 10 мм. Вимірювання здійснювали тричі.

#### **Результати досліджень та їх обговорення**

У результаті дослідів встановлено, що найвищий вміст екстрактивних речовин спостерігається в екстракті Е-40, одержаному в результаті оброблення ультразвуком протягом 40 хв. У разі тривалішої витримки в цих умовах вміст екстрактивних речовин зменшувався. Цей факт, ймовірно, зумовлений руйнуванням біоло-

гічно активних компонентів і утворенням летких сполук. Аналогічні дані одержано під час визначення суми поліфенольних сполук (рис. 1).

Згідно із експериментальними даними вміст екстрактивних речовин у відповідних екстрактах становив: E-20 – 7,6 мг/мл, E-40 – 8,4 мг/мл, E-60 – 8,0 мг/мл. Відповідно вміст суми поліфенольних речовин у перерахунку на галову кисло-

ту (рівняння кривої залежності значення оптичної густини від концентрації розчинів стандартного зразка галової кислоти  $y = 1,662x - 0,000$ ,  $R^2 = 0,999$ ): E-20 – 0,207 мг/мл, E-40 – 0,280 мг/мл, E-60 – 0,217 мг/мл).

На відміну від поліфенольних сполук, вміст флавоноїдів у разі тривалішої витримки під дією ультразвуку збільшувався (рис. 2).

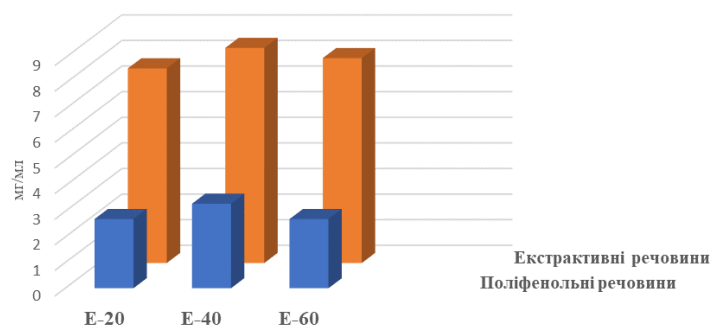


Рис. 1. Вміст екстрактивних та поліфенольних речовин в естрактах *Genistella sagittalis*, одержаних за різного часу оброблення ультразвуком, мг/мл

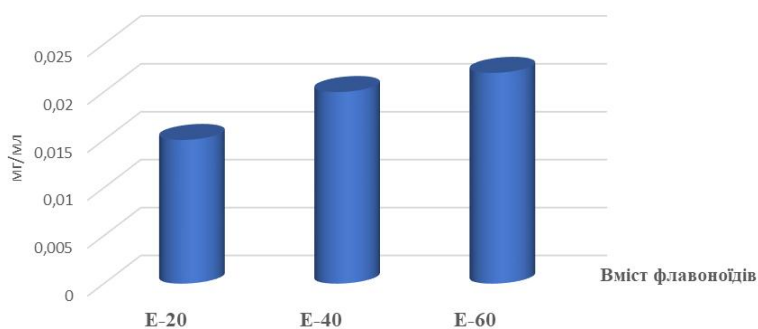


Рис. 2. Вміст флавоноїдів у екстрактах *Genistella sagittalis*, одержаних за різної тривалості оброблення ультразвуком, мг/мл

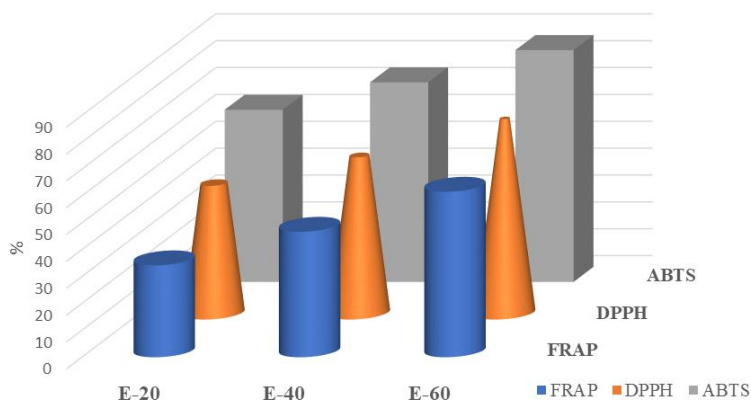


Рис. 3. Антиоксидантна активність екстрактів *Genistella sagittalis*, одержаних за різної тривалості оброблення ультразвуком

Вміст флавоноїдів у перерахунку на кверцетин (рівняння кривої залежності значення оптичної густини від концентрації розчинів стандартного зразка кверцетину  $y = 10,01x - 0,008$ ,  $R^2=0,999$ ) в екстрактах становив: Е-20 – 0,015 мг/мл, Е-40 – 0,020 мг/мл, Е-60 – 0,022 мг/мл.

Результати дослідження антиоксидантних властивостей екстрактів Е-20, Е-40 та Е-60 із вмістом екстрактивних речовин 1 мг/мл за допомогою методів DPPH, ABTS та FRAP підтвердили їх ефективність як радикалпоглинальних та відновлювальних засобів (рис. 3).

Найвищі значення АОА одержано для Е-60 трьома використаними методами. За методом DPPH відсоток радикалпоглинальної активності становив – 72,3 %, ABTS – 86,3 %, а методом FRAP – 61,6 %, що свідчить про достатньо високий показник антиоксидантної активності екстракту *Genistella sagittalis*, одержаного у результаті екстрагування у цьому часовому режимі.

### Висновки

Проведене експериментальне дослідження свідчить про доцільність одержання екстракту *Genistella sagittalis* (L.) Gams, з метою вилучення комплексу біологічно активних речовин (флавоноїдів та поліфенолів) методом ультразвукової екстракції. Отримані результати дослідження антиоксидантної активності різними методами підтверджують перспективу використання трави *Genistella sagittalis* для виготовлення екстрактів та створення на їх основі фармацевтичних та косметологічних засобів.

### References

1. Bryda, O., Stadnytska, N. (2021). Extraction methods of extractive substances from medicinal plant raw materials: advantages and limitations. *Annals of the Romanian Society for Cell Biology*, 25(5), 1737–1751.
2. Bryda, O. R., Stadnytska, N. Ye., Mylianych, A. O., Maltz, I. S., Shalata, V. Ia. (2020). Perevaha metodu ekstraktsii z postiinym rukhom ekstrahenta na prykladi oderzhannia ekstraktu korenna pelarhonii ochyt-kovoi (Pelargonium sidoides). *Chemistry, Technology and Application of Substances = Khimiia, tekhnolohiia re-chovyn ta yikh zastosuvannia*, 3(1), 110–116. doi.org/10.23939/ctas2020.01.110 (in Ukrainian).
3. Pavliuk, I. V., Stadnytska, N. Ye., Novikov, V. P. (2015). Doslidzhennia kinetyky ekstrahuvannia flavo-noidiv zi shrotu shyshok khmeliu. *Skhidno-Yevropeiskyi*

*zhurnal peredovykh tekhnolohii*, 5/11(77), 36–41. DOI: 10.15587/1729-4061.2015.50965 (in Ukrainian).

4. Boiko, M. M., Zaitsev, O. I. (2008). Vyvchennia vplyvu ultrazvuku na kinetyku vyluchennia biolohichno aktyvnykh rehovyn z roslynnoi syrovyny. *Ukrainskyi zhurna klinichnoi ta laboratornoi medytyny*, 3(3), 53–55 (in Ukrainian).

5. Sydorov, Yu. I., Hubytska, I. I., Konechna, R. T., Novikov, V. P. (2008). Ekstraktsiia roslynnoi syrovyny. Lviv: Vydavnytstvo Natsionalnoho universytetu “Lvivska politehnika”, 334 s. (in Ukrainian).

6. Pavliuk, I. V., Stadnytska, N. Ye. (2015). Optymizatsiia umov tekhnolohichnoho protsesu pererobky shrotu *Origanum vulgare*, *Daucus carota*, *Humulus lupulus*. Visnyk Natsionalnoho universytetu “Lvivska politehnika”. *Khimiia tekhnolohiia rehovyn ta yikh zastosuvannia*, 812, 251–255 (in Ukrainian).

7. Starchevsky, V., Kislenco, V., Maksymiv, N., Oliynyk, L. (2014). Investigation of kinetics conformities with a law of decomposition of agglomerates of microorganisms in the condition of acoustic cavitation. *Eastern-European Journal of Enterprise Technologies*, 1(10), 8–11.

8. Bernatska, N., Starchevsky, V. (2014). Oxidation kinetics of organic disintegration products of yeast in cavitation conditions. *Eastern-European Journal of Enterprise Technologies*, 4(10), 63–66.

9. Rigano, D., Cardile, V., Formisano, C., Maldini, M. T., Piacente, S., Bevilacqua, J., Russo, A., & Senatore, F. (2009). Genista sessilifolia DC. and Genista tinctoria L. inhibit UV light and nitric oxide-induced DNA damage and human melanoma cell growth. *Chemico-Biological Interactions*, 180(2), 211–219. https://doi.org/10.1016/j.cbi.2009.02.010.

10. Venditti, A., Frezza, C., Foddai, S., Serafini, M., & Bianco, A. (2019). A rare bis-rhamnopyranosyl-aromadendrin derivative and other flavonoids from the flowers of Genista cilentina Vals. an endemic species of Southern Italy. *Arabian Journal of Chemistry*, 12(8), 3921–3926. https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2016.02.012.

11. Luczkiewicz, M., & Kokotkiewicz, A. (2005). Co-cultures of shoots and hairy roots of Genista tinctoria L. for synthesis and biotransformation of large amounts of phytoestrogens. *Plant Science*, 169(5), 862–871. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2005.06.005.

12. Luczkiewicz M., & Głód D. (2003). Callus cultures of Genista plants – in vitro material producing high amounts of isoflavones of phytoestrogenic activity. *Plant Science*, 165(5), 1101–1108. https://doi.org/10.1016/s0168-9452(03)00305-4.

13. Fujimoto, K., Toyoshi, T., Doi, Y., & Inouye, M. (2007). Synthesis and molecular recognition properties of a self-assembling molecule consisted of a porphyrin core and two hydrogen-bonding moieties. *Materials Science and Engineering: C*, 27(1), 142–147. https://doi.org/10.1016/j.msec.2006.04.002.

14. Mouri, C., Mozaffarian, V., Zhang, X., & Laursen, R. (2014). Characterization of flavonols in plants used for textile dyeing and the significance of flavonol conjugates. *Dyes and Pigments*, 100, 135–141. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2013.08.025>.
15. Ganai, A. A., & Farooqi, H. (2015). Bioactivity of genistein: A review of in vitro and in vivo studies. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 76, 30–38. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2015.10.026>.
16. Sentkowska, A., Biesaga, M., & Pyrzynska, K. (2016). Application of Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography for the Quantification of Flavonoids in *Genista tinctoria* Extract. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2016/3789348>.
17. Hrodzynskyi, A. M. (Ed.). (1991). *Likarski roslyny: Entsyklopedychnyi dovidnyk*. Kyiv: “Ukrainska entsyklopediia” imeni M. P. Bazhana, Ukrainskyi vyrobnycho-komertsiiyny tsentr “Olimp”.
18. Hanganu, D., Olah, N.-K., Benedec, D., Mocan, A., Crisan, G., Vlase, L., Popica, I. & Oniga, I. (2016). Comparative polyphenolic content and antioxidant activities of *Genista tinctoria* (L.) and *Genistella sagittalis* (L.) Gams (Fabaceae). *Pak. J. Pharm. Sci.*, 29(1), 301–307.
19. Pavlyuk, I., Stadnytska, N., Jasicka-Misiak, I., Gorka, B., Wieczorek, 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.
20. Stadnytska, N., Fito, I., Novikov, V., Jasicka-Misiak, I., Wieczorek, P. (2020). Effect of extraction solvent on total phenolic content, total flavonoid content and antioxidant activity of *Cetraria islandica*. *International Journal of Pharm Tech Research*, 13(03), 198–205. <http://dx.doi.org/10.20902/IJPTR.2019.130310>.

N. Ye. Stadnytska, N. Ya. Monka, S. V. Vasylyuk, H. M. Shyian, V. I. Lubenets

Lviv Polytechnic National University,

Department of Technology of Biologically Active Compounds, Pharmacy and Biotechnology

#### INVESTIGATION OF ALCOHOL-WATER EXTRACTS OF *GENISTELLA SAGITTALIS* OBTAINED BY ULTRASONIC EXTRACTION

Alcohol-water extracts of *Genistella sagittalis* have obtained by ultrasonic extraction method for different times extraction. The obtained extracts have been tested for the quantitative content of extractive substances, phenolic compounds and flavonoids and for the presence antioxidant activity. The best studied indicators were found in extract obtained by ultrasound extraction for 40 minutes (content of extractive substances 25 mg/ml, sum of polyphenolic compounds 30 mg/ml, flavonoids content 45 mg/ml).

**Key words:** polyphenolic compounds; flavonoids; antioxidant activity; DPPH; ABTS; FRAP.