

## ОПТИМІЗАЦІЯ ЕКСТРАКЦІЇ ПОЛІ ФЕНОЛЬНИХ СПОЛУК З ТРАВИ *ORIGANUM VULGARE L.*, СТАНДАРТИЗАЦІЯ ЕКСТРАКТУ ТА ВСТАНОВЛЕННЯ ЙОГО АНКСІОЛІТИЧНОЇ АКТИВНОСТІ *IN VIVO*

Еберле Л. В., Цісак А. О.

### ВСТУП

Останнім часом зростає попит серед населення України на седативні препарати. Особливо це просліджується впродовж останнього року, коли військовий стан в країні негативним чином впливає на психоемоційне здоров'я громадян різних вікових категорій.

Незважаючи на великий асортимент лікарських засобів на фармацевтичному ринку України найбільшим попитом користуються саме препарати рослинного походження, які, по-перше, є економічно-доступними для населення, по-друге, у порівнянні з синтетичними є більш безпечними та мають менш виразні побічні прояви та по-третє, проявляють виражені анксиолітичні властивості. Тому, пошук та дослідження нових рослинних субстанцій для створення ефективних седативних засобів є актуальним та перспективним завданням сьогодення.

Серед лікарських рослин, які проростають на території України та відомі в народній медицині своїми заспокійливими та седативними властивостями є материнка звичайна (*Origanum vulgare L.*). Основна цінність рослини полягає в тому, що до її складу входять такі сполуки поліфенольної природи, як катехіни та катехіноподібні речовини, вважають, що саме ці речовини володіють антидепресивними властивостями<sup>15, 16, 17, 18, 19</sup>.

---

<sup>15</sup> Котюк Л. А., Рахметов Д. Б. Біологічно активні речовини *Origanum vulgare L.* *Фізіологія рослин та генетика*. 2016. Т. 48. № 1.

<sup>16</sup> Kryvtsova M., Hrytsyna M. Chemical composition and antimicrobial properties of essential oil from *Origanum vulgare L.* in different habitats. *Biotechnologiaacta*. 2020. V. 13, № 3. P. 64–72.

<sup>17</sup> Shafiee-Hajjabad M., Novak J., Honermeier B. Characterization of glandular trichomes in four *Origanum vulgare L.* accessions influenced by light reduction. *J. Appl. Botany and Food Quality*. 2015. V. 88. P. 300–307.

<sup>18</sup> Lukas B., Schmiderer C., Novak J. Essential oil diversity of European *Origanum vulgare L.* (Lamiaceae). *Phytochem*. 2015. V. 119. P. 32–40.

<sup>19</sup> De Martino L., De Feo V., Formisano C., Mignola E., Senatore F. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils from Three Chemotypes of *Origanum vulgare L.* ssp. *hirtum* (Link) Ietswaart Growing Wild in Campania (Southern Italy). *Molecules*. 2009. V. 14. P. 2735–2746.

Депресивний розлад – один із найбільшпоширених психічних захворювань із надзвичайно високим рівнемзахворюваності та негативним епідеміологічним прогнозом. Близько 50 % людей, які звертаються за лікарською допомогою, не отримують необхідноголікування внаслідок труднощів діагностики та заперечення існуванняпроблеми самим пацієнтом. Крім того, депресивний розлад важко піддається лікуванню: після фармакотерапії ремісії вдається досягти лише у 50 % випадків, у 33 % пацієнтів зберігається депресивна симптоматика, у 12 % – захворювання набуває хронічного характеру<sup>20, 21</sup>.

Вивчення патогенезу депресивних розладів та механізмів діїанти-депресантів дозволило виявити новіпотенційні терапевтичні мішені в ГАМК-ергічній та глутаматергічній системи, а також розширити уявлення про участь нейротрофічного фактора мозку та серотонінергічної системи в реалізації антидепресивних ефектів та механізмів розвитку захворювання. З'являється все більше даних про механізми взаємодії різних нейромедіаторних систем та їх рецепторів, що відкриває більше можливостей для розуміння та лікування депресії<sup>22</sup>.

## **1. Анатомічна характеристика та хімічний склад *Origanum vulgare*. Арсенал розповсюдження**

*Origanum vulgare* (материнка звичайна) належить до роду *Origanum* L. сімейства *Lamiaceae* Lindl. відділу *Magnoliophyta*.

Материнка звичайна – є поліморфним видом і являє собою багаторічну трав'янисту полікарпічну рослину, підземна частина якої представлена гіллястим повзучим корінням, розташованим у поверхневому шарі ґрунту. Рослина злегка опушена або майже гола; прямостоячі стебла монокарпічного та моноциклічного трав'янистого типу, 20–60 см заввишки, чотиригранні, іноді пурпурно забарвлені та опушені. Розташування листя на головному стеблі супротивне, черешкове<sup>23, 24</sup>.

---

<sup>20</sup> Karolewicz, B. Reduced level of glutamic acid decarboxylase-67 kDa in the prefrontal cortex in major depression / B. Karolewicz, D. Maciag, G. O'Dwyer, C. A. Stockmeier, A. M. Feyissa, G. Rajkowska. *International Journal of Neuropsychopharmacology*. 2010. Vol. 13. № 4. P. 411–420.

<sup>21</sup> Jeon, S. W. The role of neuroinflammation and neurovascular dysfunction in major depressive disorder /S. W. Jeon, Y. K. Kim. *Journal of Inflammation Research*. 2018. Vol. 11. P. 179–192.

<sup>22</sup> Ibid.

<sup>23</sup> Котюк Л. А., Рахметов Д. Б. Біологічно активні речовини *Origanum vulgare* L. *Фізіологія рослин та генетика*. 2016. Т. 48. № 1.

<sup>24</sup> Kryvtsova M., Hrytyna M. Chemical composition and antimicrobial properties of essential oil from *Origanum vulgare* L. in different habitats. *Biotechnologiaacta*. V. 13. № 3. 2020. P. 64–72.

Довжина черешка в середній частині пагона становить приблизно 0,4 см, у нижній – досягає 1 см. Листя яйцеподібні, довгасті та гострі 1–5 см завдовжки, зверху темно зелені, а знизу світлі зі мізерними залозками.

Квітки дрібні, численні на коротких квітконіжках, зібрані в округліколоски, що подовжуються при плодах, що утворюють на кінцях гілок розлогі багатоквіткові суцвіття до 10 см завширшки і до 15 см завдовжки. Віночок забарвлений в пурпуровий, світло-пурпуровий колір, з трубкою, що видається з чашечки. Плід утворений чотирма сухими, округлими, коричневими горішками завдовжки від 0,5 до 1 мм<sup>25, 26</sup>.

Лікарська рослина *Origanum vulgare* входить до фармакопеї багатьох країн. Лікарською сировиною служить трава материнки – верхня частина пагонів із квітками та листям. У ній міститься ефірна олія, дубильні (до 20 %) тагіркі речовини, флавоноїди, алкалоїди, кумарини, каротиноїди, вітаміни, пігменти, фітонциди, мікроелементи (молібден, кобальт, цинк та ін.)<sup>27</sup>.

Широке використання материнки в медицині обумовлено тим, що основними діючими речовинами є ефірна олія, дубильні речовини та гіркоти.

Більшість дослідників стверджують, що основними компонентами ефірної олії материнки є феноли – тимол (до 60 %) та карвакрол (до 10 %), бі- та трициклічні сесквітерпени (до 5 %), терпенові спирти (до 5 %), метилкарвакрол (20 %) при цьому тимол є основним носієм запаху<sup>28</sup>.

Експериментально доведено, що препарати материнки мають заспокійливу дію на центральну нервову систему, а також посилюють секрецію травних та бронхіальних залоз, перистальтику кишечника<sup>29</sup>. Настій трави *Origanum vulgare* покращує функцію всіх травних та видільних органів, що в цілому сприяє відновленню порушених обмінних

---

<sup>25</sup> Shafiee-Hajabad M., Novak J., Honermeier B. Characterization of glandular trichomes in four *Origanum vulgare* L. accessions influenced by light reduction. *J. Appl. Botany and Food Quality*. 2015. V. 88. P. 300–307.

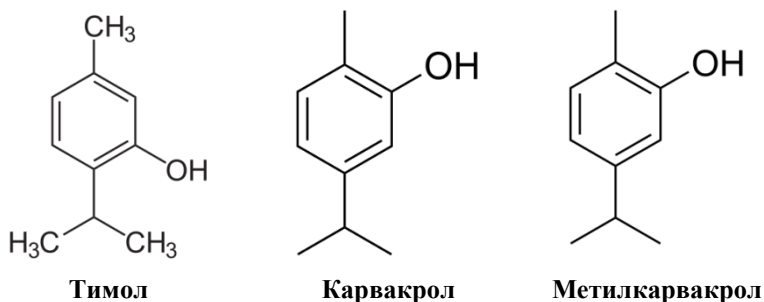
<sup>26</sup> Lukas B., Schmiderer C., Novak J. Essential oil diversity of European *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae). *Phytochem*. 2015. V. 119. P. 32–40.

<sup>27</sup> Shafiee-Hajabad M., Novak J., Honermeier B. Characterization of glandular trichomes in four *Origanum vulgare* L. accessions influenced by light reduction. *J. Appl. Botany and Food Quality*. 2015. V. 88. P. 300–307.

<sup>28</sup> Lukas B., Schmiderer C., Novak J. Essential oil diversity of European *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae). *Phytochem*. 2015. V. 119. P. 32–40.

<sup>29</sup> De Martino L., De Feo V., Formisano C., Mignola E., Senatore F. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils from Three Chemotypes of *Origanum vulgare* L. Ssp. *hirtum* (Link) Ietswaart Growing Wild in Campania (Southern Italy). *Molecules*. 2009. V. 14. P. 2735–2746.

процесів та очищення організму відрізних канцерогенів, діабетогенів, атерогенів та алергенів<sup>30, 31, 32</sup>.



**Рис. 1. Структурні формули домінуючих компонентів ефірної олії *Origanum vulgare***

У наукових публікаціях зустрічаються дані про широкий спектр сполук флавоноїдної та сесквітерпенової<sup>33</sup>, а також тритерпенової<sup>34</sup> структури, що містяться в надземних частинах *Origanum vulgare*.

Незважаючи на широкий фармакологічний спектр дії та застосування в народній медицині *Origanum vulgare* хімічний склад вивчений не в повній мірі, тому актуальним залишається дослідження та ідентифікації фіто-хімічного складу рослинної сировини.

Батьківщиною *Origanum vulgare* є Середземномор'я. Вона широко поширена по всій Європі (крім середземноморських островів), у Казахстані, Туркменії, на Кавказі, у Вірменії та Грузії, у гірських

<sup>30</sup> De Martino L., De Feo V., Formisano C., Mignola E., Senatore F. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils from Three Chemotypes of *Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum* (Link) Ietswaart Growing Wild in Campania (Southern Italy). *Molecules*. 2009. V. 14. P. 2735–2746.

<sup>31</sup> Karolewicz, B. Reduced level of glutamic acid decarboxylase-67 kDa in the prefrontal cortex in major depression / B. Karolewicz, D. Maciag, G. O'Dwyer, C. A. Stockmeier, A. M. Feyissa, G. Rajkowska // *International Journal of Neuropsychopharmacology*. 2010. Vol. 13. № 4. P. 411–420.

<sup>32</sup> Jeon, S. W. The role of neuroinflammation and neurovascular dysfunction in major depressive disorder / S. W. Jeon, Y. K. Kim. *Journal of Inflammation Research*. 2018. Vol. 11. P. 179–192.

<sup>33</sup> Jerković I., Mastelić J., Miloš M. The impact of both the season of collection and drying on the volatile constituents of *Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum* grown wild in Croatia. *Inter. J. Food Sci. Technol.* 2001. V. 36. P. 649–654.

<sup>34</sup> Carrasco A., Perez E., Cutillas A.-B., Martinez-Gutierrez R., Tomas V., Tudela J. *Origanum vulgare* and *Thymbra capitata* Essential Oils from Spain: Determination of Aromatic Profile and Bioactivities. *Natural Product Communications*. 2016. V. 11. P. 113–120.

районах Середньої та Малої Азії, у Гімалаях, Західному Китаї, Монголії, Ірані, Північній Америці, Африці<sup>35</sup>.

В Україні материнка звичайна поширена майже по всій території, крім південних степових районів та високогір'я Карпат. Вона зустрічається на узбіччях доріг, іноді в садах із глинястим ґрунтом, на пагорбах, натрав'янистих сонячних схилах, а також на сухих відкритих місцях, схилах ярів, на лісових галявинах і узліссях та ін. Материнка є лісостеповою рослиною. Росте одиночними рослинами та групами, суцільних чагарників зазвичай не утворює<sup>36</sup>.

## 2. Матеріали та методи дослідження екстракту *Origanum vulgare* L.

### 2.1. Дослідження вмісту полі фенольних сполук методом Фоліна – Чокальтео

Сумарний вміст фенольних сполук визначали методом Фоліна-Чокальтеу. Спектрометричний метод визначення загального вмісту фенольних речовин заснований на застосуванні реактиву Фоліна-Чокальтеу, що складається із суміші фосфорно-вольфрамової й фосфорно-молібденової кислот, які відновлюються при окисненні фенолів до суміші оксидів. При цьому утворюється блакитне забарвлення, інтенсивність якого пропорційна кількості фенольних речовин. Метод Фоліна-Чокальтеу зазвичай застосовують для визначення фенольних сполук у лікарських рослинах та плодах. Вміст суми полі фенольних сполук визначали в перерахунку на галову кислоту.

Побудування калібрувальної кривої.

1.1 Приготували сток-розчин галової кислоти (5 мг галової кислоти розчиняли в 10 мл 80 % етанолу).

1.2 Відповідно до таблиці в пробірці водили певні об'єми сток – розчину галової кислоти і добавляли 80 % розчин етанолу в об'ємах, необхідних для отримання потрібної концентрації. Перша пробірка – контроль на реактиви (див. таблиця 1).

1.3 В кожному із пробірок водили 2,5 мл розведеного реактиву Фоліна-Чокальтео. Через 3 хвилини добавляли 2 мл 7,5 % розчину  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Після додавання розчину  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  реакційна суміш набувала синього забарвлення інтенсивність якого була пропорційна концентрації галової кислоти в розчині. Будівання калібрувальної кривої виконували в трьох

---

<sup>35</sup> Carrasco A., Perez E., Cutillas A.-B., Martinez-Gutierrez R., Tomas V., Tudela J. *Origanum vulgare* and *Thymbra Capitata* Essential Oils from Spain: Determination of Aromatic Profile and Bioactivities. *Natural Product Communications*. 2016. V. 11. P. 113–120.

<sup>36</sup> Kotyuk L. A., Rakhmeto D. B. *Bioloichno aktyvni rechovyny Origanum vulgare* L. Plant *physiol. genetics*. 2016. № 48 (1). P. 20–25 (in Ukrainian).

послідовностях. Пробірки з реакційною сумішшю добре струшували і залишали на 2 години.

Таблиця 1

**Співвідношення реактивів для побудування калібрувальної кривої по флавоноїдам методом Фоліна – Чокальтео.**

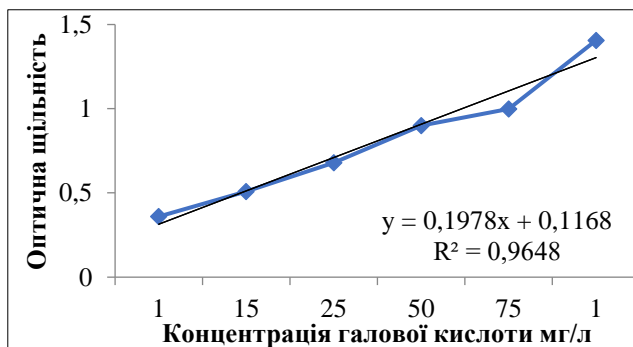
Концентрація, мг/л	Об'єм сток-розчину галової кислоти для приготування проби, мкл	Об'єм 80 % етанолу для приготування проби, мкл
Контроль	0,0	250
25	12,5	237,5
50	25	225
100	50	200
150	75	175
200	125	125

1.4 По закінченню часу екстенції вимірювали оптичну щільність на спектрофотометрі при довжині хвилі 765нм.

1.5 За результатами вимірювання оптичної щільності розчинів побудували калібрувальний графік, відкладаючи по осі абсцис концентрацію галової кислоти в мг/л, по осі ординат – оптичну щільність розчину.

*1 Вимірювання концентрації поліфенольнихсполук в екстрактах:*

В пробірки вносили 0,4мл 80 % етанолу і 0,1мл екстракту та додавали по 2,5мл розведеного реактиву Фоліна-Чокальтео, а через 3 хвилини по 2мл Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.



**Рис. 2.** Градуирований графік залежності оптичної густини від концентрації галової кислоти (концентрація галової, мкг/мл)

Пробірки з реактивною сумішшю добре струшували і залишали на 2 години, після чого проводили вимірювання оптичної щільності на спектрофотометрі при довжині хвилі 765нм. В якості стандартного розчину використовувати пробу «контроль».

Вміст фенольних сполук в екстракті визначали за допомогою калібрувальної кривої: графік проходить через початок координат і відображає залежність оптичної щільності (ось ординат) отриманих реакційних сполук від концентрації (ось абсцис) в них галової кислоти.

## **2.2. Дослідження високоефективної рідинної хроматографії в зразках екстракту *Origanum vulgare*.**

Аналіз полі фенольних сполук здійснювали методом високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) на системі “Shimadzu” (Японія) з модулем автоматичної подачі проб Autosampler SIL-20A/20AC, модулем рухомої фази LC-20 AD, колонним модулем СТО-20А / 20АС, дегазатором DGU-20А<sub>3</sub> / DGU-20А<sub>5</sub> та ультрафіолетовим детектором SPD-20А / SPD-20АV. Хроматографічне розділення виконували на зворотно-фазовій колонці Microsorb-MV C18 (150 × 4,6 мм, зерно сорбенту 5 мкм). В роботі використовували реактиви, розчинники і чисті речовини фірм “Fluka”, “Merck”, “Lab-Scan”.

В якості рухомої фази використовували систему компонентів «метанол – 0,9 % -й розчин ортофосфорної кислоти» при їх початковому співвідношенні 1:9. Вибір даної системи проводили згідно методичних рекомендацій, які дозволяють отримати бездоганні піки стандартних речовин, що відрізняються за часом виходу та є показовими для більш точного розрахунку сумарного вмісту окремих представників ПФС. В ході відпрацювання умов хроматографування був розроблений оптимальний режим градієнтного елюювання. Схема зміни градієнта по метанолу:

- перші 13 хвилин: підвищення концентрації з 10 до 40 %;
- з 13 по 20 хвилину: підвищення концентрації з 40 до 53 %;
- з 20 по 26 хвилину: підвищення концентрації з 53 до 55 %;
- з 26 по 40 хвилину: постійна концентрація 55 %;
- з 40 по 41 хвилину: зниження концентрації до 10 %;
- з 41 по 56 хвилину: постійна концентрація 10 %.

Усі зміни концентрацій лінійні.

Швидкість подачі елюенту – 0,5 мл/хв. Температура колонки +40 °С.

Об’єм проб для аналізу – 5 мкл.

Ідентифікацію речовин в досліджуваних екстрактах проводили шляхом порівняння часу утримання та спектральних характеристик

досліджуваних речовин з аналогічними характеристиками стандартів відповідно з способом ідентифікації виглядувань. Для точної ідентифікації або визначення приналежності досліджуваних речовин до конкретних груп використовували наступні стандарти: хлорогенова і кавова кислоти, катехін, флаванолі, кверцетин, рутин і мірцетин, флаванонинарингенін, нарингін і гесперидин, флавони лютеолін і апигенін, ізофлавоноїди, даїдзєїн, генистеїн і глядуван, антоціанін-ціанідин (Sigma-Aldrich, Німеччина). Ідентифікацію кемпферола проводили на основі даних про присутність цього флаваноїду в коріннях чорного горіху, схожості його спектральних характеристик з характеристиками кверцетину і послідовності виходу його з колонки.

Екстракти перед аналізом фільтрували з використанням фільтрів SupelcoIso-DiscFilters PTFE 25-4 (25 mm x 0,45µm).

### **2.3. Дослідження гострої токсичності екстракту *Origanum vulgare***

Дослідження токсичності екстракту *Origanum vulgare* проводили на здорових статевозрілих білих щурах масою тіла 170–190 г, які пройшли карантин в умовах віварію протягом 14 діб. Кожна експериментальна група складалася з 5 тварин.

Гостру токсичність досліджуваного екстракту проводили при одноразовому пероральному введенні в дозах 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 мг/кг маси тіла. Введення екстракту проводили один раз на добу (вранці). Спостереження за загальним станом і поведінкою тварин проводили протягом двох тижнів, враховували зовнішній стан тварин, особливості поведінки, інтенсивність і характер рухів, стан волосяного покриву і слизових оболонок.

Для обробки отриманих результатів та визначення середньої летальної дози (ЛД<sub>50</sub>) використовували метод Спірмена-Кербера.

### **2.4. Методика дослідження антидепресивної дії екстракту *Origanum vulgare* в тесті «Чорно-біла камера»**

Досліди проводилися на білих безпородних мишах, самцях масою 18–20 г, які були отримані з віварію Одеського національного університету імені І. І. Мечникова. Під час досліду тварини утримувалися в умовах віварію на стандартному раціоні при вільному доступі до води та їжі. Експериментальні дослідження проводилися відповідно до методичних рекомендацій Державного фармакологічного центру МОЗ України.

При переміщенні тварини в темний відсік, реєструється його дослідницька активність, спрямована на вивчення світлої частини



камери. При перебуванні тварини в світлому відсіку проявляється норкову рефлекс – втікання в бажаний «захищений» темний відсік.

Традиційними показниками дослідницької активності є латентність першого виходу, кількість виходів в освітлений відсік (або число переходів між відсіками) і загальний час, проведений твариною в світлому відсіку, а також кількість виглядувань з відкритого відсіку камери. Саме число виглядувань є найбільш адекватним надійним і відтвореним індексом тривожності в даній моделі. Тварини зазвичай вважають за краще знаходитися в темному відсіку, проте анксиолітики збільшують число виходів і час, проведений в світлому відсіку, тоді як анксиогенні агенти або маніпуляції призводять до зворотних ефектів.

У ряді випадків пропонується реєструвати також стійки, зроблені тваринами в світлому відсіку. Більш того, обговорюється виявлена кореляція між кількістю стійок і числом виходів в освітлений відсік, хоча стійки рідко зустрічаються в даному тесті в його найбільш використовуваному 3-хвилинному варіанті.

Чорно-біла камера вважається однією з чутливих моделей гострої, «ситуативної» тривожності тварин, в якій свою активність здатна проявити більшість з відомих класів анксиотропних препаратів та в якій підкреслюється залежність етологічних індексів даного тесту від загального локомоторного рівня, що вимагає певної обережності в інтерпретації отриманих результатів в даній моделі.

Апарат являє собою прозорий закритий ящик з оргскла з центральною перегородкою посередині. Відсіки сполучалися між собою через отвір. Один з відсіків був повністю обклеєний світлонепроникним папером.

При проведенні експерименту тварин поміщали в темний відсік камери. Власне, тестування тривало 3 хв. В ході яких візуально реєстрували поведінку тварини. В ході експерименту були використані наступні поведінкові показники: число і латентність (с) виглядувань з темного відсіку в світлий через отвір в перегородці, а також кількість виходів в світлий відсік.

## **2.5. Методика визначення антидепресивної дії екстракту *Organum vulgare* в тесті «Порсолт»**

Тест «Порсолт» («Вимушене плавання») дозволяє вивчити вираженість депресивного стану експериментальних тварин і антидепресивні властивості досліджуваного екстракту.

Тест «Порсолт» – тест вимушеного плавання щурів в замкнутому просторі. У дослідах на щурах використовували циліндричний скляний бак висотою 50 см, з внутрішнім діаметром 38 см, заповнений водою на

висоту 38 см, температура води  $22 \pm 1$  °С. Кожній тварині прикріплювали вантаж загальною вагою 10 % від маси тіла. Частестування 3 хвилини.

У дослідах реєстрували: латентний період допершого руху, часактивного і час пасивного плавання, відмова від активного плавання – іммобілізація або «зависання» (розглядається як експериментальнона модель депресії поведінки або «поведінка відчаю»), пірнання на дно експериментального басейну.

### 3. Результати дослідження екстракту *Origanum vulgare* L.

#### 3.1. Дослідження оптимальних умов екстрагування *Origanum vulgare*

Екстракція є першим кроком в аналізі лікарських рослин, оскільки для подальшого розподілу та характеристики необхідно вилучити бажані хімічні компоненти з рослинних матеріалів.

Основна операція включає етапи, такі як сушіння рослинних матеріалів, подрібнення для отримання гомогенного зразка і часто поліпшення кінетики аналітичної екстракції, а також збільшення контакту поверхні зразка з системою розчинників. Необхідно вжити правильних дій, щоб гарантувати, що потенційні активні речовини не будуть втрачені, спотворені чи зруйновані під час підготовки екстракту з рослинної сировини.

Для кожного рослинного матеріалу є оптимальний ступінь подрібнення, де його характер залежать від анатомічної будови та хімічного складу сировини, що екстрагується. Характер подрібнення рослинної сировини дуже впливає на процес екстракції та якість витяжки. Ступінь подрібнення визначає поверхню зіткнення фаз, чим вона більша, тим швидше протікає дифузія.

Оскільки досліджувана сировина *Origanum vulgare* є багаторічною трав'янистою полікарпічною рослиною і стінки рослинних клітин мають міцну будову, тому для екстракції цільового продукту було обрано чотири ступеня подрібнення, а саме 2, 5, 8, 10 мм.

За результатами дослідження показано, що серед обраних величин подрібнення найбільших вихід фенольних речовин відзначався у зразку з розміром частинок 5мм, а найменших вихід активних речовин при розмірі – 10 мм (табл. 2).

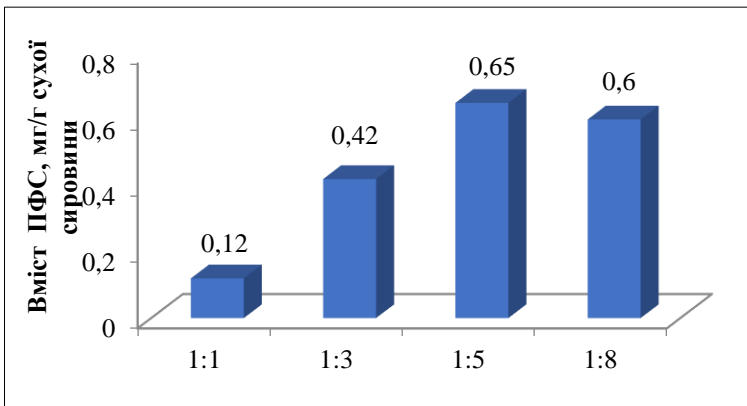
Дрібні частинки рослини *Origanum vulgare* (розміром до 2 мм) для екстрагування не підходили, так як дрібні частки містять багато зруйнованих клітин, з яких у екстрагент переходить велика кількість баластних речовин, нерозчинних частинок і колоїдів. В результаті виходить каламутна рідина, що важко очищається і містить незначну кількість цільового продукту.

Таблиця 2

**Вміст фенольних сполук в екстракті *Origanum vulgare* в залежності від ступеня подрібнення рослинної сировини**

Концентрація водно-етанольної суміші	Розмір подрібнення рослинного матеріалу			
	2 мм	5 мм	8 мм	10 мм
30 %	0,45	0,65	0,63	0,58
50 %	0,42	0,61	0,57	0,43
70 %	0,34	0,55	0,49	0,32

Не менш важливим при екстракції рослинної сировини є вибір розчинників. Існують різні системи розчинників для отримання біологічно активної речовини з натуральних продуктів. При екстракції гідрофільних сполук використовують полярні розчинники, такі як метанол, етанол або етилацетат. Для екстракції ліпофільних сполук використовують дихлорметан або суміш дихлорметан / метанол за різних співвідношень рослинної сировини до екстрагенту.

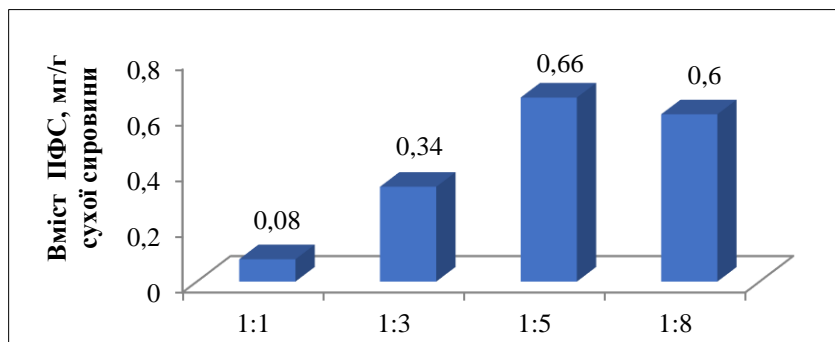


**Рис. 3. Вміст полі фенольних сполук в *Origanum vulgare* при екстрагуванні 30 % водно-етанольним екстрагентом за різних гідромодулів**

Згідно літературних даних, до складу *Origanum vulgare* входять переважно гідрофільні сполуки, тому для максимального вилучення ПФС з рослинної сировини було обрано в якості розчинника водно-етанольну суміш різної концентрації (30 %, 50 %, 70 %).

Встановлено, що серед обраних концентрацій розчинника, за екстракції сухого матеріалу *Origanum vulgare* методом мацерації,

найбільший вихід сполук фенольної природи відзначався у зразку з 30 % водно-етанольною сумішшю.



**Рис. 4. Вміст полі фенольних сполук в *Origanum vulgare* при екстрагуванні 50 % водно-етанольним екстрагентом за різних гідромодулів**

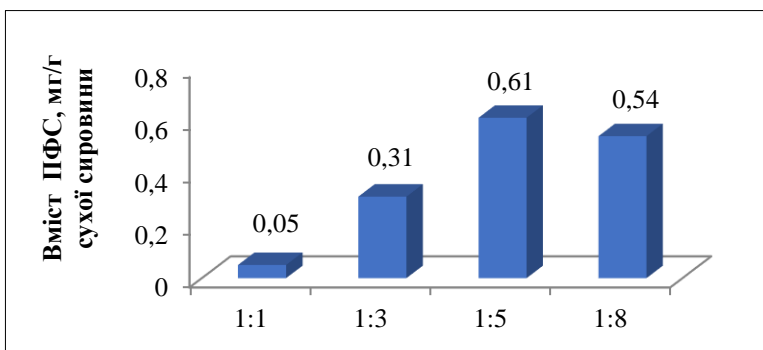
Слід відмітити, що збільшення концентрації розчинника до 50 % не призводило до збільшення накопичення цільового продукту в екстрагенті. Вихід полі фенольних сполук, як у зразках з 30 % та і у зразках з 50 % розчинником був майже однаковим та становив 0,65 мг/г сухої сировини (рис. 3 та рис 4).

Збільшення концентрації розчинника до 70 % не призводило до збільшення екстракції фенольних сполук, а навпаки пригнічувало вилучення біологічно активних речовин. Вміст ПФС становив 0,54 мг/г сухої сировини.

Результати дослідження вмісту полі фенольних сполук при екстрагуванні 70 % водно-етанольною сумішшю представлені на рис. 5.

Важливим етапом при екстрагуванні рослинної матеріалу та вилученні конкретних сполук є встановлення співвідношення між сировинною та екстрагентом. Різниця концентрацій є основою рушійної силою дифузійного процесу. Дифузійний процес при екстракції протікає до встановлення динамічної рівноваги концентрації у системі тверде тіло – рідина.

На графіках 3, 4, 5 представлені результати залежності виходу екстрактивних речовин від співвідношення сировина-екстрагент.



**Рис. 5. Вміст полі фенольних сполук в *Origanum vulgare* при екстрагуванні 70 % водно-етанольним екстрагентом за різних гідромодулів**

Встановлено, що при співвідношенні рослинного матеріалу до екстрагенту 1:5 вихід фенольних сполук мав найвище значення та становив 0,65 мг/г сухої сировини.

Таким чином, показано, що максимальне вилучення полі фенольних сполук з рослинної сировини *Origanum vulgare* відзначалося при екстракції 30 % водно-етанольною сумішшю, співвідношенні рослинної сировини до розчинника 1:5 та подрібненні матеріалу розміром до 5 мм.

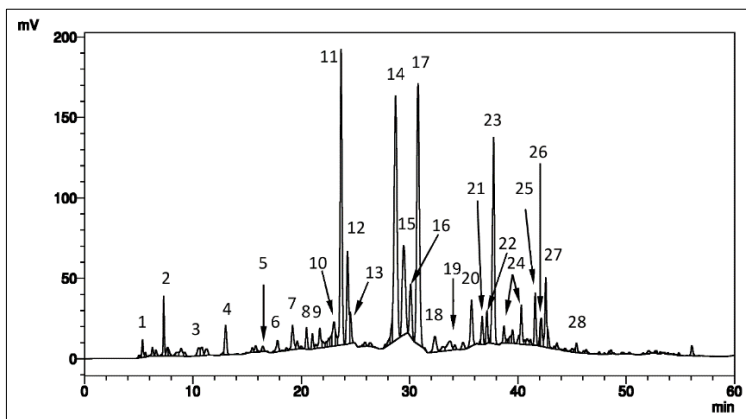
### **2.3.2. Дослідження полі фенольних сполук в екстракті *Origanum vulgare* методом вискоєфективної рідинної хроматографії**

Для максимального вилучення полі фенольних сполук з рослинного матеріалу *Origanum vulgare* були попередньо підібрані оптимальні умови екстрагування, які забезпечували повне вилучення цільового продукту.

Відібраний зразок екстракту в подальшому досліджували методом вискоєфективної рідинної хроматографії на наявність окремих груп поліфенолів та їх кількісного вмісту (мкг/мл).

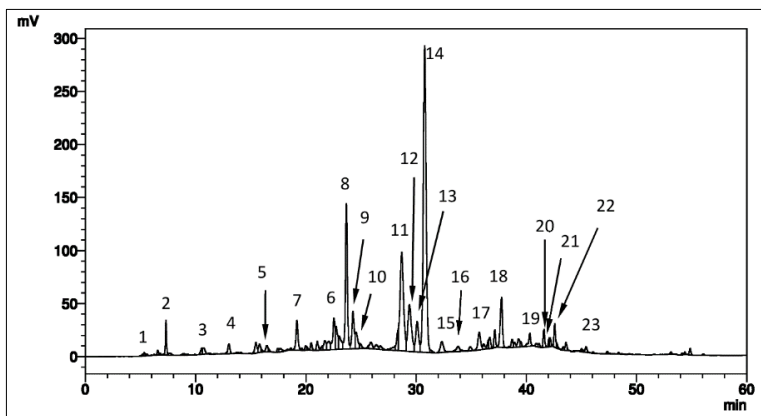
Результати дослідження вмісту полі фенольних сполук та інтерпретація деяких речовин фенольної природи в екстракті *Origanum vulgare* за різних довжин хвилі (255 та 286 нм) представлено на рис. 6 та рис. 7.

За результатами дослідження показано, що в водно-етанольному екстракті *Origanum vulgare* при довжині хвилі 255 нм перебували такі речовини, як: катехіноподібні, фенольні кислоти, хлорогенова такавова кислоти, катехіни, флавоноли (глікозиди), глікозиди міріцетина, глікозиди лютеоліна, флаванони (глікозиди), лютеолін, флавоноли (аглікони).



**Рис. 6. Хроматограма водно-етанольного екстракту *Origanum vulgare* при довжині хвилі 255 нм**

**Примітка:** 1 – катехіноподібні; 2, 3, 4, 9, 10, 11, 12, 16, 17, 18, 21 – фенольні кислоти; 5 – хлорогенова кислота; 6 – катехіни; 7 – кавава кислота; 8, 15, 19, 22, 23, 24 – флавоноли (глікозиди); 13 – глікозиди мірицетина; 14, 25, 27 – глікозиди лутеоліна; 20 – флаванони (глікозиди); 26 – лутеолін; 28 – флавоноли (аглікони).



**Рис. 7. Хроматограма водно-етанольного екстракту *Origanum vulgare* при довжині хвилі 286 нм**

**Примітка:** 1, 3, 5, 6 – катехіноподібні; 2, 4, 8, 9, 13, 14, 15 – фенольні кислоти; 10 – глікозиди мірицетина; 7 – кавава кислота; 11, 17, 20, 22 – глікозиди лутеоліна; 12, 16, 18, 19 – флавоноли (глікозиди); 21 – лутеолін; 23 – флавоноли (аглікони).

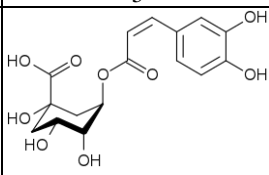
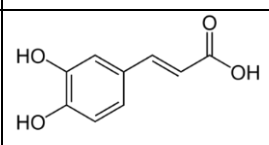
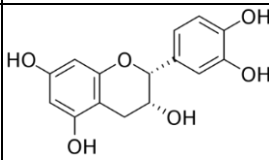
Результати ВЕРХ-аналізу екстракту *Origanum vulgare* при довжині хвилі 286 нм відображали наявність в рослинному матеріалі катехіноподібних речовин, фенольних кислот, глікозидівмірицетину, глікозидів лютеоліну, флавонолів (глікозиди), лютеолін, флавоноли (аглікони).

Дослідження водно-етанольного екстракту *Origanum vulgare* методом високоефективної рідинної хроматографії свідчить, що до складу рослинної сировини входять сім груп поліфенольнихсполук (фенольні кислоти, катехіни, катехіноподібні, флаваноли, флаванони, флавоноли, флавоноподібні речовини) із сумарним вмістом речовин 866,03 мкг/мл. На долю не ідентифікованих фенольних сполук приходитьсья 58,07 мкг/мл.

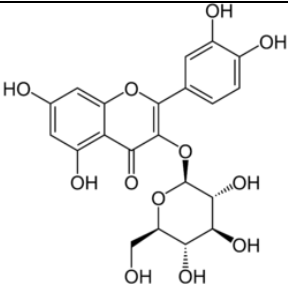
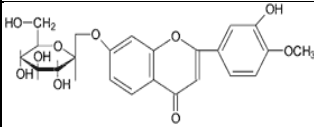
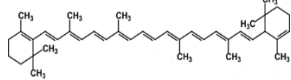
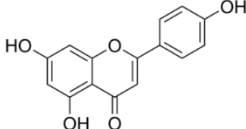
Результати дослідження сумарного вмісту фенольних сполук в екстракті *Origanum vulgare* представлені в таблиці 3 та додатку 1.

Таблиця 3

**Сумарний вміст фенольних сполук в екстракті *Origanum vulgare***

Група поліфенолов	Вміст, мкг/мл	Окремі речовини	Вміст, мкг/мл	Структурна формула
1	2	3	4	5
Фенольні кислоти	377,86	хлорогенова кислота	3,84	
		кавова кислота	9,21	
Катехіни	13,73	(+)катехін	1,04	
Катехіноподібні*	58,14	-	-	-

## Закінчення таблиці 3

1	2	3	4	5
Флавоноли	210,38	рутин	0	Не виявлені
		кверцетин	0	Не виявлені
		глікозиди мірицитина	13,45	
Флаванони	4,62	нарінгін	0	Не виявлені
		нарингенін	0	Не виявлені
		гесперидин	0	Не виявлені
		гесперетин	0	Не виявлені
Флаваноно-подібні*	55,28	-	-	-
Флаволи	87,95	глікозидилнотеоліна	80,42	
		лютеолін	2,65	
		глікозиди апігеніна	7,53	
		апігенін	0	Не виявлені
Ізофлаволи	0	-	-	Не виявлені
Антоциани	0	-	-	Не виявлені
Сумарний вміст флавоноїди				322,18
Не ідентифіковані речовини				58,07
Сумарний вміст поліфенольних сполук				866,03

**Примітка:** \* – катехіноподібні, флаваноподібні – поліфеноли, піки яких розташовані поза області піків катехінів і флаванонів на хроматограмі, але зі спектральними характеристиками катехінів і флаванонів.



Серед досліджуваних фенольних речовин *Origanum vulgare* в найбільшій кількості в екстракті знаходились фенольні кислоти (377,86 мкг/мл), дещо в меншій кількості були флаваноли (210,38 мкг/мл) і флавони (87,95 мкг/мл) та в незначній мірі катехіноподібні речовини (58,14 мкг/мл).

Слід відмітити, що такі речовини, як рутин, кверцетин, нарінгін, нарингенін, гесперидин, гесперетин та апігенін в екстракті материнки звичайної не зареєстровано.

Таким чином, згідно хроматографічних досліджень показано, що екстракт *Origanum vulgare* є цінним джерелом біологічно активних речовин для виготовлення фітопрепаратів на його основі.

### 2.3.3. Дослідження гострої токсичності екстракту *Origanum vulgare*

Основною характеристикою досліджуваних лікарських рослин, які вивчаються з метою створення на їх основі нових фітопрепаратів, поряд з високою фармакологічною активністю повинна бути їх безпечність. У зв'язку з цим, у завдання досліджень входило вивчення гострої токсичності (ЛД<sub>50</sub>) екстракту *Origanum vulgare*.

Таблиця 4

#### Гостра токсичність (ЛД<sub>50</sub>) екстракту *Origanum vulgare* за умов перорального введення

Токсична характеристика	ЛД <sub>50</sub> , мг/кг маси тіла						
	150	200	250	300	350	400	450
Вижило	5	5	5	5	5	5	5
Загибло	0	0	0	0	0	0	0

Пероральне ведення піддослідним мишам екстракту *Origanum vulgare* у дозі від 100 до 450 мг/кг маси тіла тварин не викликало ознак інтоксикації чи летальних випадків. Усі тварини були активними, мали гарний апетит, гладку шерсть без випадіння, нормально реагували на зовнішні подразники, судом та порушення дихання не відзначалось (табл. 4).

Таким чином, значення напівлетальної дози (ЛД<sub>50</sub>) за умов перорального ведення дозволяє віднести екстракт *Origanum vulgare* за класифікацією Стефанова О. В. до IV класу токсичності – малотоксичні речовини.

#### **2.3.4. Дослідження антидепресивної дії екстракту *Origanum vulgare* в тесті «Чорно-біла камера»**

Для встановлення антидепресивної дії екстракту було обрано тест чорно-біла камера (ЧБК). Використовувана процедура тестування поведінки в ЧБК надає тварині можливість вибору: або активно досліджувати нову ситуацію (світлий відсік), або залишатися в межах темного обмеженого простору (характерна для гризунів форма захисної поведінки).

Дослідницька активність ініціюється потребою в новій інформації так само, як і інші потреби організму (наприклад, потреби в харчі, воді, особин протилежного полу та ін.). У той же час потреба в самозбереженні в умовах розділеної камери відкритого і освітленого простору (світлий відсік) спонукає тварину до очікування потенційної загрози, викликаючи реакцію тривоги.

Для експерименту було відібрано три групи тварин. Перша група була контрольною (без терапії), друга група отримувала екстракт *Origanum vulgare* в дозі 5 мг/кг/добу, третя – 10 % водно-етанольну суміш.

Піддослідним тваринам екстракт *Origanum vulgare* ввели перорально при попередньому розведенні в 10 % водно-етанольній суміші. Для детального встановлення антидепресивної дії досліджуваного екстракту експеримент проводили за умов однократного ведення, при веденні екстракту щоденно впродовж одного тижня, а також впродовж двох тижнів.

За результатами дослідження показано, що однократне ведення фітопрепарату не сприяло зменшенню стресової ситуації у піддослідних тварин. Про що свідчать поведінкові показники, а саме незначний період перебування в білому відсіку, часті дефекації та незначні вглядювання з темного відсіку. Показникові характеристики усіх груп мали схожі тенденції.

Щоденне ведення екстракту впродовж одного тижня сприяло зменшенню депресивного стану та появи дослідницької активності у мишей. Відзначалося збільшення латентного періоду першого заходу тварин в темний відсік установки ( $15 \pm 1,1$  с), зменшились дефекації та суттєво збільшився час перебування тварин в світлому відділі камери, а натомість час перебування в темному зменшився майже на 20 % у порівнянні з контрольною групою та на 17 % у порівнянні з групою, яка отримувала 10 % водно-етанольну суміш (табл. 5).

Найкращий антидепресивний ефект відзначався при застосуванні екстракту материнки (в дозі 5 мг/кг маси тварин) впродовж двох тижнів. Час перебування тварин в світлому відсіку достовірно збільшився на

102 %, а латентний період першого заходу тварин в темний відсік установки на 400 % у порівнянні з контролем (табл. 5).

Таблиця 5

**Показники антидепресивної дії екстракту *Origanum vulgare* в тесті «Чорно-біла камера»**

Групи	Латентний період першого заходу тварин в темний відсік установки	Дефекація	Час перебування в кожному відсіку		Кількість вглядувань з темного відсіку в світлий
			Темний відсік	Світлий відсік	
<i>Однократне ведення</i>					
Контроль	5 ± 0,4	6 ± 0,4	152 ± 2,3	28 ± 1,8	3 ± 0,2
Екстракт <i>O. vulgare</i>	3 ± 0,2	5 ± 0,6	157 ± 4,5	23 ± 1,5	4 ± 0,4
10 % етанол	4 ± 0,3	4 ± 0,3	153 ± 5,7	27 ± 1,3	5 ± 0,3
<i>Введення щоденно впродовж одного тижня</i>					
Контроль	7 ± 0,6	5 ± 0,7	155 ± 2,6	25 ± 2,1	4 ± 0,3
Екстракт <i>O. vulgare</i>	15 ± 1,1*	2 ± 0,1	123 ± 5,8*	57 ± 3,7*	2 ± 0,2
10 % етанол	6 ± 0,4	2 ± 0,2	144 ± 3,7	36 ± 2,8	4 ± 0,2
<i>Введення щоденно впродовж двох тижнів</i>					
Контроль	6 ± 0,4	7 ± 0,6	143 ± 12,5	37 ± 2,8	6 ± 0,5
Екстракт <i>O. vulgare</i>	25 ± 2,3*	-	105 ± 6,3*	75 ± 6,5*	2 ± 0,2
10 % етанол	5 ± 0,4	2 ± 0,1	145 ± 4,9	35 ± 2,4	5 ± 0,4

**Примітка:** \* достовірна відмінність з показника контрольної групи

Як видно з таблиці, у тварини контрольної групи антидепресивні показники характеризуються відповідно мінімальним ступенем дослідницької активності, стосовно новизни (світлий відсік), демонструючи таким чином стан стресу.

Отже, показано, що найбільш максимальний антидепресивний ефект екстракту *Origanum vulgare* відзначається при щоденному систематизованому прийомі впродовж двох тижнів.

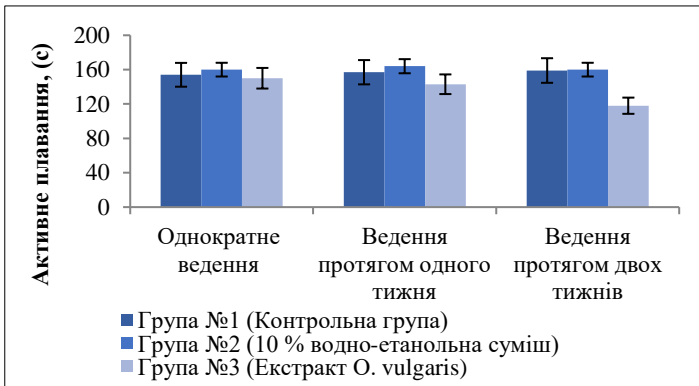
### 2.3.5. Дослідження антидепресивної дії екстракту *Origanum vulgare* в тесті «Порсолт»

Тест «Порсолт» є найбільш розповсюдженим лабораторним тестом на дію антидепресантів, що оцінює здатність препаратів зменшувати час нерухомості тварини (імобілізації), яка занурена в скляний посуд з водою. Опираючись на отримані результати щодо нерухомості тварин в тесті вимушеного плавання, можна стверджувати про наявність антидепресивного ефекту.

Дослідження антидепресивних властивостей екстракту *Origanum vulgare* в тесті «Порсолт» за умов однократного ведення екстракту свідчить про відсутність змін у поведінці тварин. У всіх групах тварин відзначалось активне плавання з елементами пірнання. В середньому у групі контролю дані показники становили  $154 \pm 6,8$  с, у тварин, яким перорально вводили 10 % водно-етанольну суміш  $158 \pm 9,4$  с, а у тварин, яким ввели екстракт *Origanum vulgare* –  $152 \pm 13,4$ с.

Імобілізація у тварин спостерігалась в незначній мірі, деякі тварини не здатні були утримувати власне тіло на поверхні води і постійно занурювались під воду.

Результати дослідження активного плавання в тесті «Порсолт» представлені на рис. 8.



**Рис. 8. Тривалість активного плавання (с) в тесті «Порсолт» для визначення рівня антидепресивної активності.**

Як видно з рисунку 4, пероральне ведення екстракту материнки впродовж двох тижнів сприяло зменшенню стресової ситуації при вимушеному плаванні у піддослідних тваринах. Спостерігалось зменшення плавання на 15 % та збільшення часу імобілізації на 60 % по відношенню до контролю.

Слід відмітити, що в групі тварин, яким ввели 10 % водно-етанольну суміш зменшення тривалості активного плавання не відзначалось, що свідчить про відсутні антидепресивних властивостей у 10 % розчиннику.

Пероральне ведення екстракту материнки звичайної протягом двох тижнів ефективно знижувала депресивний стан у тварин.

На рис. 9 представлені результати тривалості іммобілізації тварин під час експерименту.

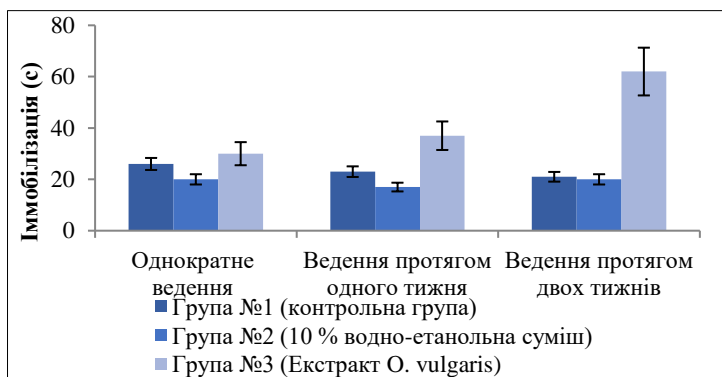


Рис. 9. Тривалість іммобілізації (с) в тесті «Порсолт»

Згідно результатів дослідження, показано, що антидепресивний ефект у екстракту *Origanum vulgare* залежить від тривалості застосування та має ефект накопичення в організмі. Оскільки, після закінчення експерименту у тварин залишається даний антидепресивний ефект ще на два тижні.

Таким чином, згідно проведених досліджень було показано, що екстракт *Origanum vulgare* в дозі 5 мг/кг при застосуванні впродовж двох тижнів здатний ефективно зменшувати депресивний стан та пригнічувати стрес у піддослідних тварин.

## ВИСНОВКИ

1. Показано, що максимальне вилучення фенольних сполук з рослинної сировини *Origanum vulgare* відзначалось при екстрагуванні 30 % водно-етанольною сумішшю у співвідношенні сировини до розчинника 1:5 та подрібненні матеріалу розміром до 5 мм.

2. За методом Фоліна-Чокальтео встановлено, що вміст поліфенольних сполук в екстракті *Origanum vulgare* за оптимальних умов екстракції становив  $0,65 \pm 0,05$  мг/г сухої сировини.

3. Методом високоефективної рідинної хроматографії доведено, що до складу екстракту *Origanum vulgare* входять такі речовини, як: катехіни, катехіноподібні, фенольні кислоти, хлорогенова такавова кислоти, флавоноли (глікозиди), глікозиди міріцетина, глікозиди лутеоліна, флаванони (глікозиди), лутеолін, флавоноли (аглікони).

4. Встановлено, що пероральне ведення екстракту *Origanum vulgare* в діапазоні від 100 до 450 мг/кг маси тіла тварин не призводило до летальних випадків та побічних дій ( $LD_{50}=0$ ).

5. Встановлено, що із збільшенням тривалості застосування екстракту *Origanum vulgare* (в дозі 5 мг/кг/добу) зростає антидепресивний ефект в стресовій ситуації, як в тесті «Порсолт» так і в тесті «Чорно-біла камера».

## АНОТАЦІЯ

Протягом останнього року в Україні зріс попит на анксиолітичні засоби рослинного походження. Основними вимогами споживачів до таких ліків є доступність ліків, ефективність дії та безпечність за умов тривалого застосування. Це, в свою чергу, формує запит на пошук нової сировини для створення седативних фітопрепаратів на їх основі.

В якості дослідного зразку була обрана *Origanum vulgare* L, що проростає на території України та в народній медицині використовується в якості седативного засобу.

Першим етапом роботи було фармакогностичне дослідження сировини *Origanum vulgare* L. з встановленням оптимальних умов екстракції, які забезпечували б максимальне вилучення активних речовин. Другим етапом було фармакологічне вивчення дослідного зразку екстракту.

Згідно результатів дослідження показано, що екстракт *Origanum vulgare* за умов перорального ведення відноситься за класифікацією Стефанова О. В. до IV класу токсичності – малотоксичні речовини. Встановлено, що екстракт *Origanum vulgare* проявляє виражені анксиолітичні властивості, із збільшенням тривалості застосування екстракту *Origanum vulgare* зростає антидепресивний ефект в стресовій ситуації, як в тесті «Порсолт» так і в тесті «Чорно-біла камера».

## Література

1. Котюк Л. А., Рахметов Д. Б. Біологічно активні речовини *Origanum vulgare* L. *Фізіологія рослин та генетика*. 2016. Т. 48. № 1.
2. Kryvtsova M., Hrytsyna M. Chemical composition and antimicrobial properties of essential oil from *Origanum vulgare* L. in different habitats. *Biotechnologia acta*. 2020. V. 13. No 3. P. 64–72.
3. Shafiee-Hajjabad M., Novak J., Honermeier B. Characterization of glandular trichomes in four *Origanum vulgare* L. accessions influenced by light reduction. *J. Appl. Botany and Food Quality*. 2015. V. 88. P. 300–307.

4. Lukas B., Schmiderer C., Novak J. Essential oil diversity of European *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae). *Phytochem.* 2015. V. 119. P. 32–40.

5. De Martino L., De Feo V., Formisano C., Mignola E., Senatore F. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils from Three Chemotypes of *Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum* (Link) Ietswaart Growing Wild in Campania (Southern Italy). *Molecules.* 2009. V. 14. P. 2735–2746.

6. Karolewicz, B. Reduced level of glutamic acid decarboxylase-67 kDa in the prefrontal cortex in major depression / B. Karolewicz, D. Maciag, G. O'Dwyer, C. A. Stockmeier, A. M. Feyissa, G. Rajkowska. *International Journal of Neuropsychopharmacology.* 2010. Vol. 13. № 4. P. 411–420.

7. Jeon, S. W. The role of neuroinflammation and neurovascular dysfunction in major depressive disorder /S. W. Jeon, Y. K. Kim. *Journal of Inflammation Research.* 2018. Vol. 11. P. 179–192.

8. Jerković I., Mastelić J., Miloš M. The impact of both the season of collection and drying on the volatile constituents of *Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum* grown wild in Croatia. *Inter. J. Food Sci. Technol.* 2001. V. 36. P. 649–654.

9. Carrasco A., Perez E., Cutillas A.-B., Martinez-Gutierrez R., Tomas V., Tudela J. *Origanum Vulgare* and *Thymbra Capitata* Essential Oils from Spain: Determination of Aromatic Profile and Bioactivities. *Natural Product Communications.* 2016. V. 11. P. 113–120.

10. Kotyuk L. A., Rakhmeto D. B. Bioloichno aktyvni rečovyny *Origanum vulgare* L. Plant physiol. genetics. 2016, 48 (1), 20–25. (In Ukrainian).

**Information about the authors:**

**Eberle Lidiia Viktorivna,**

<https://orcid.org/0000-0002-3466-8653>

Candidate of Biological Sciences,

Associate Professor at the Department of Pharmacology  
and Drug Technology

Odesa I. I. Mechnikov National University

14, Yelisavetynska str., Odesa, 65082, Ukraine

**Tsisak Alona Oleksandrivna,**

<https://orcid.org/0000-0003-3766-5156>

Candidate of Biological Sciences,

Associate Professor at the Department of Pharmacology  
and Drug Technology

Odesa I. I. Mechnikov National University

14, Yelisavetynska str., Odesa, 65082, Ukraine