УДК 615.281:582.579.2

АНТИМІКРОБНА АКТИВНІСТЬ ЕКСТРАКТІВ IRIS PSEUDACORUS L.

Затильнікова О.О.*, Осолодченко Т.П., Ковальов В.М.***

*** Національний фармацевтичний університет, z_ola07@mail.ru, gnosy@ukrfakharkov.ua**
**** Інститут мікробіології та імунології ім. І.І.Мечникова АМН України**

Антибактеріальна терапія займає одне з провідних місць у клінічній медицині. При лікуванні великої кількості інфекційних захворювань антибактеріальні препарати відіграють вирішальну роль. Застосування антимікробних засобів рослинного походження поряд із синтетичними препаратами, такими як антибіотики, фторхінолони, антисептики, що у порівнянні мають сильнішу активність, обумовлене низькою токсичністю, можливістю тривалого застосування, більшою доступністю та здатністю до біодеградації. До переваг рослинних засобів відносять також відсутність розвитку дисбактеріозів та алергічних реакцій. Рослинні засоби призначають із загальнозміцнювальною метою, та як симптоматичну терапію з метою впливу на метаболічні процеси. До 50-х років XX століття ліки з рослин становили 70-80 % усіх медикаментів. Нині третину препаратів отримують з рослин [1]. Таким чином, створення нових антибактеріальних препаратів рослинного походження є актуальною задачею**.**

Серед великої кількості лікарських рослин півники болотяні широко використовує народна медицина нашої країни при лікуванні запалень верхніх дихальних шляхів [10], шлунково-кишкового тракту, захворювань органів сечовидільної системи [4], онкологічних та гінекологічних хвороб**.** Кореневища проявляють протизапальні, сечогінні, проносні, болезаспокійливі та кровоспинні властивості [7].

При фітохімічному вивченні півників болотяних встановлена наявність дубильних речовин [7], гідроксикоричних кислот, кумаринів [5], ксантонів, флавоноїдів [11], ізофлавоноїдів [6,9,10].

Метою роботи було дослідження антимікробної активності сумарних препаратів з кореневища та листя півників болотяних, а також встановлення відповідності мікробіологічної чистоти препаратів вимогам Державної Фармакопеї України **[**2,3**].**

Матеріали та методи

Методи одержання екстрактів. Об'єктами дослідження було листя та кореневища *Iris pseudacorus* L., зібрані в Харківській обл.

Повітряно-суху сировину (кореневища, листя півників болотяних) подрібнюють та екстрагують дистильованою водою при температурі 90°С при періодичному перемішуванні. Витяг відфільтровують під вакуумом та повторюють процес екстракції двічі. Одержані витяги об'єднують і упарюють у вакуум-ротаційному апараті до отримання сухого продукту.

Методи вивчення протимікробної активності препаратів.

Для проведення первинного мікробіологічного скринінгу екстрактів півників болотяних використовували агар Мюллера-Хінтона, для вирощування мікроорганізмів – живильний агар, для грибів – середовище Сабуро. Вивчення протимікробної активності препаратів проводили методами дифузії в агар та серійних розведень з використанням стандартного набору тест-культур, які знаходяться в музеї лабораторії біохімії мікроорганізмів та поживних середовищ інституту мікробіології та імунології ім. І.І.Мечникова: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Eschericia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Candida ablicans* ATCC 885/653. Мікробне навантаження до музейних штамів становило 10^7 КУО/мл та встановлювалось за оптичним стандартом мутності McFarland за допомогою приладу Dens-la-Metr [2,8].

Для проведення випробувань препаратів на мікробіологічну чистоту використовували тіогліколиве напіврідке середовище, рідке середовище Сабуро, тверді поживні середовища: живильний агар.

Отримані сухі екстракти кореневища та листя півників болотяних розчиняли у воді дистильованій, ДМСО, 40% спирті, 50% спирті. Концентрація препаратів становила 10,0% та 20,0%. В якості контролю використовували чисті розчинники у концентраціях, що відповідають їх вмісту у препаратах. Препаратом порівняння було обрано спиртовий розчин хлорофіліпту, у дозі 10 мг/мл (хлорофіліпт спиртовий розчин 1% 100 мл, "ОЗ"ГНЦЛС").

Експериментальні дані оброблялись статистичними методами аналізу програми Exel [3].

Результати та обговорення

Методом дифузії в агар встановлено, що сухі екстракти з кореневища та листя півників болотяних проявляють антибактеріальну активність по відношенню до всіх тест-штамів мікроорганізмів (Табл.1). Діаметри зон затримки зросту мікроорганізмів знаходяться в межах 14 – 25 мм, що свідчить про чутливість мікроорганізму до дослідних екстрактів.

Препарати кореневища півників болотяних у концентрації 10,0 % проявили більшу антимікробну активність, ніж препарати з листя та препарати з кореневища у концентрації 20,0 %. Найбільш чутливими мікроорганізмами до препаратів з кореневища виявились *Basillus subtilis* ATCC 6633S, діаметр зон затримки зросту 21 – 25 мм, *Staphyloccocus aureus* ATCC 25923, *Staphyloccocus*

aureus ATCC 6538 – 18 – 21 мм, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 – 18 – 19 мм, *Escherichia coli* ATCC 25922 – 16-18 мм. До *Candida ablicans* ATCC 885/653 препарати кореневища проявили меншу чутливість, діаметр зон зросту 15 – 16 мм. Слід відмітити, що зони затримки зросту препаратів кореневища з розчинником вода та 40% спирт перевищили зони з диметилсульфоксидом та 50% спиртом на 0,1-0,2 мм.

Таблиця 1. Антибактеріальна активність екстрактів з кореневища та листя півників болотяних методом дифузії в агар

Розчинник	Діаметр зон затримки росту мікроорганізмів у мм. M±m, p≤0,05						
	Staphylococcus aureus ATCC 25923	Staphylococcus aureus ATCC 6538	Eschericia coli ATCC 25922	Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027	Bacillus subtilis ATCC 6633	Candida ablicans ATCC 885/653
Сумарний препарат листя (10,0%)							
Вода	15,5±2,05***	14,5±0,92	16,5±0,92	зріст	зріст	19,6±2,34	15,0±0,01
ДМСО	18,8±1,30*	18,5±0,92	12,5±0,92	13,5±0,05	12,5±2,05	17,0±0,01	зріст
40%спирт	18,5±0,92**	19,5±0,02	13,5±0,92	12,5±0,92	13,3±1,52	18,0±0,01	12,3±0,02
50%спирт	17,6±0,80**	19,0±0,03	15,2±0,03	12,5±0,92	12,0±0,01	19,5±0,05	12,0±0,01
Сумарний препарат листя (20,0%)							
Вода	14,0±1,30	14,0±0,05	13,5±2,05	зріст	зріст	17,5±0,92	14,0±0,01
ДМСО	14,6±1,50	15,5±0,92	16,5±0,92	15,5±0,92	16,0±0,01	18,3±2,0	13,5±0,05
40%спирт	16,5±0,92	15,6±1,52	12,5±0,92	зріст	зріст	16,5±0,92	зріст
50%спирт	15,5±0,92	15,5±0,92	12,5±0,92	зріст	зріст	15,6±1,52	зріст
Сумарний препарат кореневища (10,0%)							
Вода	22,3±1,52	20,2±0,90	17,0±0,01	21,5±0,92	21,5±0,92	24,5±0,05	14,0±0,01
ДМСО	17,5±0,05	19,0±0,06	17,0±0,03	18,5±0,92	18,5±0,92	22,3±1,52	15,0±0,05
40%спирт	18,5±0,92	19,6±0,05	17,5±0,92	19,1±1,35	18,5±0,05	22,5±0,03	15,5±0,92
50%спирт	19,5±0,05	20,5±0,20	17,3±1,52	18,5±0,92	18,8±0,02	22,3±0,03	15,5±0,92
Сумарний препарат кореневища (20,0%)							
Вода	19,5±0,05	19,0±0,01	17,3±1,52	15,5±0,92	16,0±0,06	21,5±0,92	14,0±0,01
ДМСО	18,5±0,92	18,5±0,92	15,5±0,92	15,0±0,01	14,0±0,01	22,6±0,03	13,5±0,92
40%спирт	18,5±0,05	17,5±0,92	17,5±0,92	зріст	зріст	22,0±0,01	12,5±0,92
50%спирт	19,6±0,52	20,2±0,90	17,3±1,52	зріст	зріст	22,8±1,52	12,5±0,92
Контроль							
Вода	зріст	зріст	зріст	зріст	зріст	зріст	зріст
ДМСО	13,5±0,92	12,5±0,92	11,5±0,92	зріст	12,0±0,01	14,0±0,01	зріст
40%спирт	12,6±0,80	12,0±0,01	12,0±0,01	11,5±0,92	11,5±0,92	12,6±1,52	зріст
50%спирт	14,0±0,01	12,0±0,01	12,5±0,92	12,0±0,01	12,5±0,92	13,5±0,92	11,5±0,92
Препарат порівняння							
Хлорофіліпт 10 мг/кг	22,5±0,25**	19,5±0,02	12,5±0,01	зріст	зріст	зріст	зріст

Примітка: * - достовірна різниця між зазначеними показниками діаметри зон затримки зросту ($p < 0,05$); ** - $p < 0,01$; *** - не достовірно.

Для препаратів з листя півників болотяних у концентрації 10,0 % чутливими виявились S. aureus діаметр зон зросту мікроорганізмів 14 – 20 мм, E. coli – 13 – 17 мм та B. subtilis 17 – 21 мм. До C. ablicans та P. aeruginosa препарати проявили слабку активність (12 – 15 мм). Найбільш виражена антибактеріальна дія спостерігалась у препаратів, що були розведені у ДМСО та спирті, ніж у водних розчинах.

Таким чином, дослідження показало, що сумарні препарати з кореневища та листя півників болотяних проявляють антибактеріальну активність та перевищують показники контролю та препарату порівняння. Хлорофіліпт проявляє виражену антимікробну дію по відношенню до S.aureus, яка перевищує дослідні екстракти, але на відміну від хлорофіліпту, чутливими до препаратів півників болотяних виявились усі штами мікроогранізмів.

Антибактеріальну активність досліджуємих субстанцій підтверджено методом серійних розведень. На діаграмі (Рис.1) видно, що МПК 10,0 та 20,0 % сумарних препаратів з кореневища півників болотяних по відношенню до S.aureus та B.subtilis складає 5,0 мг/мл, до P.aeruginosa МПК досягає 10 мг/мл.

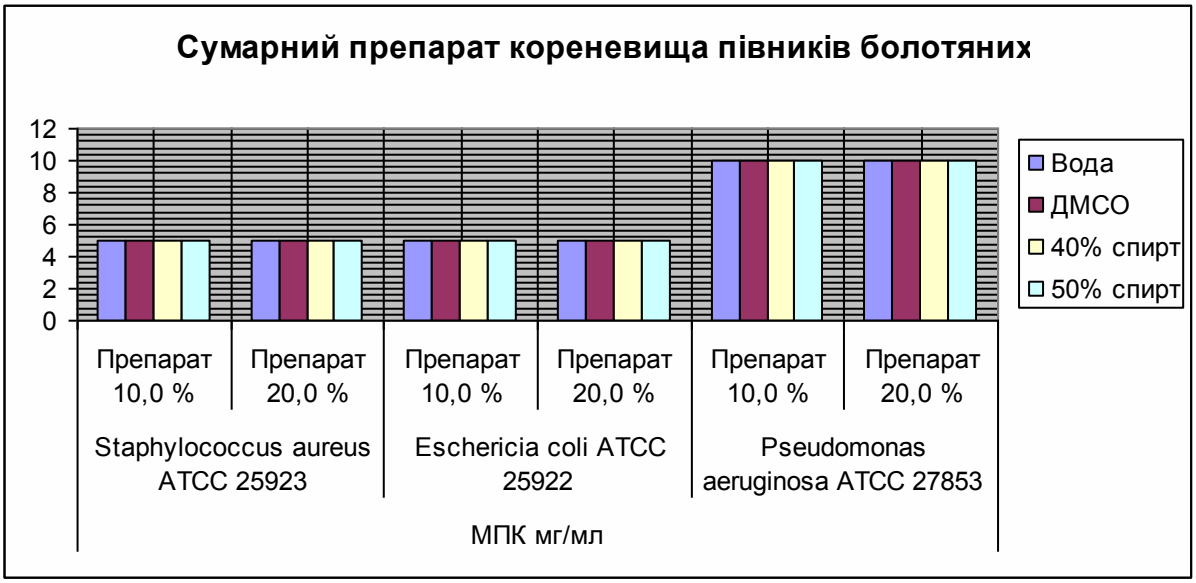

Рис. 1.- Антибактеріальна активність екстрактів з кореневища півників болотяних методом серійних розведень

Для листя півників болотяних тільки 20,0 % препарат має МПК 5,0 мг/мл по відношенню лише до S.aureus, 10,0 % та 20,0 % препарати мають мінімальну подавляючу концентрацію 10 мг/мл по відношенню до B.subtilis та P.aeruginosa (Рис. 2).

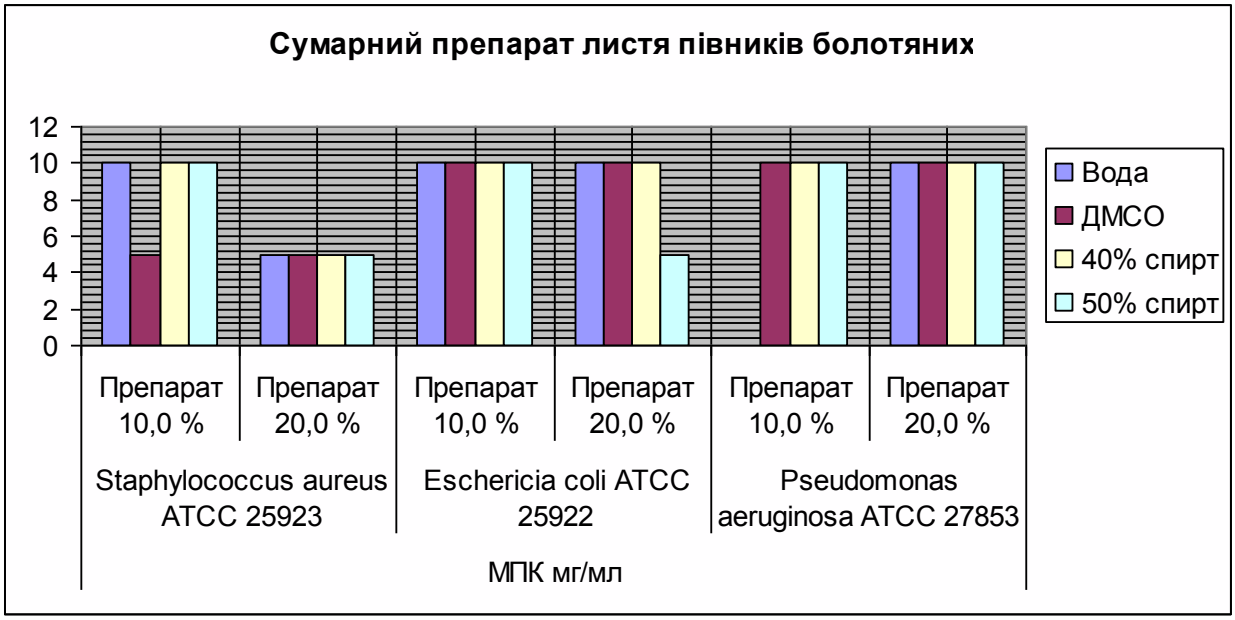

Рис. 2. Антибактеріальна активність екстрактів з листя півників болотяних методом серійних розведень

Дослідження мікробіологічної чистоти показало, що після 28 днів інкубації при культивуванні на тіогліколевому середовищі, у препаратів з кореневища та листя півників болотяних зріст мікроорганізмів був відсутній, грибкова флора не регєструвалася. Проведення методу поверхневого та глубокого посіву також показало відсутність зростання грибів та мікроорганізмів у сумарних препаратів листя та кореневища.

Результати дослідження антимікробної активності сухих екстрактів кореневища та листя півників болотяних свідчать про доцільність розробки нових лікарських засобів рослинного походження на їх основі. Ефективність одночасного застосування синтетичних препаратів разом з фітопрепаратами підтверджується клінічною практикою. Синтетичні препарати поряд із високою терапевтичною дією, мають ряд протипоказань, а їх тривале застосування може супроводжуватись розвитком негативних побічних ефектів, чого позбавлені рослинні засоби. Таким чином, розробка нових антибактеріальних препаратів на основі кореневища чи листя півників болотяних є актуальним та перспективним завданням.

Висновки:

1. Сумарні препарати з кореневища та листя півників болотяних виявили антибактеріальні

властивості по відношенню до всіх штамів тест-культур мікроорганізмів.
2. Препарати відповідають вимогам Фармакопеї України при дослідженні на мікробіологічну чистоту.
3. Препарати з кореневища півників болотяних мають більш виражену антибактеріальну дію до *Staphylococcus aureus* (МПК 5,0 мг/мл), *Escherichia coli* (МПК 5,0 мг/мл), *Pseudomonas aeruginosa* (МПК 10,0 мг/мл) та *Bacillus subtilis*, ніж препарати з листя.
4. Проведені дослідження показали перспективність застосування півників болотяних у якості сировини для створення антимікробних препаратів рослинного походження.

Список літератури:

1. Гарник Т.П. Сучасні технології виробництва фітозасобів та перспективи фітотерапії [текст] / Т. П. Гарник // Фітотерапія. Часопис. – 2008. - №1. – С.59 – 63.
2. Державна фармакопея України / Держ. п-во “Науково-експертний фармакопейний центр”. – 1-е вид. – Х.: РІРЕГ, 2001.- 556 с.
3. Державна Фармакопея України / Держ. п-во «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-е вид. – Доповнення 2. – Х.: Держ. п-во «Науково-експертний фармакопейний центр» , 2008. – 620 с.
4. Ефремов А.П. Травник для мужчин / А.П. Ефремов, Шретер А.И. – М.:Асадаль, 1996. – 352 с.
5. Затильнікова О.О., Ковальов С.В. Фитохимическое изучение Iris pseudacorus / О.О. Затильнікова, С.В. Ковальов // Мат. Междунар. научно-практической конференции «Фармация Казахстана: интеграция науки, образования и производства». – Казахстан, ЮКГМА, 2009. – с. 225-228.
6. Ковалев В.Н., Затыльникова О.А., Ковалев С.В. Фенольные соединения корневища ириса болотного / В.Н. Ковалев, О.А. Затыльникова, С.В. Ковалев // VII Международный симпозиум по фенольным соединениям: «Фундаментальные и прикладные аспекты» (г. Москва, 19-23 октября 2009 г.). - Москва, Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, 2009. – с.115.
7. Лікарські рослини: Енциклопедичний довінник [текст] /За ред. акад. АН УРСР А.М. Гродзінського. - К.: Українська енциклопедія ім. М.П. Бажана, 1992. – 544 с.
8. Методичні рекомендації «Вивчення специфічної активності протимікробних лікарських засобів». – Київ, 2004. – 38 с.
9. Gerard M. Boland, Dervilla M. X. Donnelly. Isoflavonoids and related compounds / M. Boland Gerard , M. X. Donnelly Dervilla // Natural Product Reports. – 1998. - P. 241-260.
10. Khare C.P. Indian medicinal plants [text] / C.P. Khare. — Berlin, Heidelberg: Springer- Verlag, 2007. – 836 p.
11. Tsukasa I., Ootani S. Flavonoids of the genus Iris; structures, distribution and function [review] / I. Tsukasa, S. Ootani // Ann. Tsukuba Bot. Gard. – 1998. – Vol.17. – P. 147-183.

УДК 615.281:582.579.2
АНТИМІКРОБНА АКТИВНІСТЬ ЕКСТРАКТІВ IRIS PSEUDACORUS L.
Затильнікова О.О., Осолодченко Т.П., Ковальов В.М.
Методами дифузії в агар і серійних розведень встановлена антибактеріальна активність сумарних препаратів з кореневища та листя півників болотяних. Сухі екстракти кореневища та листя розчиняли у воді, ДМСО, 40% та 50% спирті. Концентрація становила 10,0% та 20,0%. Препарати кореневища (10,0%) мають більш виражену антибактеріальну активність, ніж препарати з листя. Чутливими мікроорганізмами виявились B.subtilis, S.aureus, P.aeruginosa, E.coli, до C. ablicans препарати проявили меншу чутливість Методом серійних розведень підтверджено антибактеріальну дію препаратів з кореневища по відношенню до S.aureus (МПК 5,0 мг/мл), E.coli (МПК 5,0 мг/мл), P.aeruginosa (МПК 10,0 мг/мл). Для препартів листя МПК сягає 20,0 мг/мл. Препарати відповідають вимогам Фармакопеї України при дослідженні на мікробіологічну чистоту.
Ключові слова: протимікробні властивості, екстракти кореневища та листя, півники болотяні

УДК 615.281:582.579.2
АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ ЭКСТРАКТОВ IRIS PSEUDACORUS L.
Затыльникова О.А., Осолодченко Т.П., Ковалев В.Н.
Методами диффузии в агар и серийных разведений установлена антибактериальная активность суммарных препаратов из корневищ и листьев ириса болотного. Сухие экстракты корневищ и листьев растворяли в воде, ДМСО, 40% и 50% спирте. Концентрация составляла 10,0% и 20,0%. Препараты из корневища (10,0%) имеют более выраженую антибактериальную активность, чем препараты из листьев. Чувствительными микроогранизмами являются B.subtilis, S.aureus, P.aeruginosa, E.coli, к C. ablicans препараты проявили более слабую чувствительность. Методом серийных разведений подтверждено антибактериальное действие препаратов корневища по отношению к S.aureus (МПК 5,0 мг/мл), E.coli (МПК 5,0 мг/мл), P.aeruginosa (МПК 10,0 мг/мл). Для препартов из листья МПК составляет 20,0 мг/мл. Препараты отвечают требованиям Фармакопеї Украины при исследовании на микробиологическую чистоту.
Ключевые слова: противомикробные свойства, экстракты корневищ и листьев, ирис болотный.

UDC 615.281:582.579.2
ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF EXTRACTS OF IRIS PSEUDACORUS L.
Zatylnikova O.A., Osolodchenko T.P., Kovalev V.N.
The bactericidal activity of total preparations from the rhizomes and leaves of Yellow Iris by agar diffusion and dilution technique was established. The dry extracts of rhizome and leaves dissolved in water, DMSO, 40% and

50% alcohol. A concentration presented 10,0% and 20,0%. Preparations of rhizome (10,0%) have more expressed antibacterial activity, than preparations are from leaves. The more sensible of microorganisms appeared B.subtilis, S.aureus, P.aeruginosa, E.coli, preparations showed a less sensitiveness to C.ablicans. The antibacterial activity of preparations from the rhizome was confirmed of method of dilution technique in relation to S.aureus (MRC of 5,0 mg/ml), E. of coli (MRC of 5,0 mg/ml), P.aeruginosa (MRC of 10,0 mg/ml). For preparations of leaves MRC arrives at 20,0 mg/ml. Preparations answer the requirements of Pharmacopoeia of Ukraine at research on a microbiological cleanness.
Keywords: antimicrobial properties, rhizomes, leaves, Yellow Iris.