

УДК 615.281:615.451.1:582.632.1:581.45

АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ СУБСТАНЦИЙ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ СЫРЬЯ РАСТЕНИЙ СЕМЕЙСТВА БЕРЕЗОВЫЕ

Федченкова Ю.А.¹, Савинова Е.М.²

¹Национальный фармацевтический университет
e-mail: fja_fja@ukr.net

²Харьковская медицинская академия
последипломного образования

В данной статье мы привели результаты исследований антимикробной активности ряда субстанций листьев лещины обыкновенной и ольхи клейкой. В результате проведенных исследований установлено, что липофильные и спиртовые фракции листьев лещины обыкновенной и листьев ольхи клейкой, настойки из данных видов сырья проявляли антимикробную активность в отношении *P. aeruginosa* ATCC 9027, *S. albicans* ATCC 885-653, липофильная фракция листьев лещины обыкновенной, спиртовая фракция и настойка листьев ольхи клейкой – также в отношении *E. coli* ATCC 25922. Полисахаридная фракция листьев ольхи клейкой не обладает антимикробным действием, а полисахаридная фракция листьев лещины обыкновенной проявила себя лишь в отношении *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 6538-R и *P. aeruginosa* ATCC 9027.

Ключевые слова: антимикробная активность, лист, ольха, лещина, субстанции.

Введение. В свете событий последнего времени в Украине (учитывая военные действия в антитеррористической операции на территории Луганской и Донецкой областей) можно сделать вывод, что отечественная медицина остро нуждается в препаратах с антимикробной активностью [1]. В качестве источников получения биологически активных веществ с антимикробной, наше внимание привлекли растения семейства Березовые *Betulaceae* - лещина обыкновенная *Corylus avellana* L. и ольха клейкая *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. Известно, что в медицине листья лещины обыкновенной применяют как антисептическое, противовоспалительное, сосудотонизирующее средство, а листья ольхи клейкой проявляют противовоспалительное, вяжущее, ранозаживляющее, спазмолитическое и желчегонное действие [2]. Однако, препараты с антимикробным действием из листьев этих растений на рынке Украины отсутствуют. Нами из листьев лещины обыкновенной и ольхи клейкой получены настойки, спиртовые, липофильные и полисахаридные фракции. Изучение антимикробной активности полученных субстанций из листьев лещины обыкновенной и ольхи клейкой с последующей возможностью создания новых лекарственных препаратов является актуальной задачей фармации. Новизна исследований заключается в том, что системно изучены на наличие антимикробной активности впервые полученные настойки из листьев лещины обыкновенной и ольхи

клейкой, а также полученные в результате комплексной переработки этих видов сырья фракции (липофильные, спиртовые и полисахаридные).

Цель работы - изучение антимикробной активности полученных субстанций из листьев ольхи клейкой и листьев лещины обыкновенной.

Материалы и методы. Сырье для получения субстанций - листья лещины обыкновенной и ольхи клейкой заготавливали в июне 2015 года в Харьковской области (Ольшанский район, окрестности села Протопоповка). В этой серии лист лещины (в пересчете на абсолютно сухое сырье) определено количественное содержание суммы фенольных веществ (в пересчете на кислоту галловую) - $9,41 \pm 0,04$ %, суммы оксикоричных кислот (в пересчете на кислоту хлорогеновую) - $2,57 \pm 0,04$, суммы флавоноидов (в пересчете на рутин) - $2,71 \pm 0,03$.

В серии листа ольхи (в пересчете на абсолютно сухое сырье) определено количественное содержание суммы фенольных веществ (в пересчете на кислоту галловую) - $8,39 \pm 0,02$ %, суммы оксикоричных кислот (в пересчете на кислоту хлорогеновую) - $2,61 \pm 0,02$, суммы флавоноидов (в пересчете на рутин) - $2,40 \pm 0,02$.

Для получения настоек использовали метод мацерации (соотношение сырье-готовый продукт 1:5), в качестве экстрагента использовали 50 % спирт этиловый [3]. Полученные жидкости были НЛ – бурозеленого цвета со специфическим запахом и горьковатым вкусом НО – темно-зеленого цвета со специфическим запахом и горьким вкусом.

Липофильные фракции получали в аппарате Сокслета [4]. В качестве экстрагента использовали хлороформ. Из полученных извлечений в вакууме удаляли экстрагент. Липофильные фракции представляли собой стеклоподобные субстанции черно-зеленого цвета с характерными ароматными запахами.

Для получения спиртовых фракций из шрота после получения липофильных фракций использовали также метод мацерации при общем соотношении сырье-экстрагент 1:15, экстрагентом служил 50 % спирт этиловый. Экстракцию проводили трижды. Объединенные вытяжки концентрировали в вакууме [5]. После полного удаления экстрагента и сушки получили гигроскопичные порошки зелено-коричневого цвета со специфическими вкусами и запахами.

Из шрота, оставшегося после получения настойки, выделяли полисахаридную фракцию, представляющую собой водорастворимые полисахариды [6]. Это были сыпучие порошки светлого цвета.

Исследовались настойка листьев лещины (НЛ), настойка листьев ольхи (НО), липофильная фракция листьев лещины (ЛЛ), липофильная фракция листьев ольхи (ЛО), спиртовая фракция листьев лещины (СЛ), спиртовая фракция листьев ольхи (СО), полисахаридная фракция листьев лещины (ПЛ), полисахаридная фракция листьев ольхи (ПО).

Испытание антимикробного действия субстанций проводилось методом серийных разведений (на ДМСО) в отношении следующих шести эталонных тест-штаммов культур: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P, *Candida albicans* ATCC 885-653, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus subtilis* ATCC 6833, *Bacillus cereus* ATCC 10702, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, в соответствии с Государственной Фармакопеей Украины 1 издания, на базе кафедры микробиологии и иммунологии ХМАПО [7,8]. В основу приготовления питательных сред были взяты агар-агар микробиологический, произведен 04.2013, срок использования 3 года (производитель Испания, импортер 192236 Санкт-Петербург, НИЦФ), питательная среда культивирования микроорганизмов (ТУУ 24.6 - 24367280-014:2011, № партии 64, 10.2014, срок использования 2 года) и среда Эндо - питательная, сухая, для выделения и дифференциации энтеробактерий (ТУУ 246-24367290-014:2011, № партии 114, 10.2014, срок использования 2 года (производитель – Государственное научно-исследовательское предприятие бактериальных заквасок, Технологический институт молока и мяса Национальной Академии аграрных наук Украины, Киев. Остальные питательные среды изготавливались на бакухне Государственного предприятия «Институт микробиологии и иммунологии им. И.И. Мечникова НАМН Украины»). Для эксперимента готовили десятикратные разведения субстанций (настойки использовали без разведений) на мясо-пептонном бульоне 1:10 и 1:100, к которым добавляли референтные культуры, выращенные на соответствующих дифференциально-диагностических средах в зависимости от вида культур. Посевы инкубировали в термостате при $t = 35-37\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 24-48 часов. Для выявления роста тест-штамма *E. coli* использовали среду Эндо, для *S. aureus* - среду Чистовича, для *B. subtilis* и *B. cereus* - мясо-пептонный агар, для *P. aeruginosa* - 5% кровяной агар и для *C. albicans* – среду Сабуро. Так как после инкубации растворы оставались мутными, то для оценки антимикробного действия полученных фракций, делали высевы на дифференциально-диагностические среды.

Результаты и обсуждение

В таблице приведены данные проведенных исследований антимикробной активности НЛ, НО, ЛЛ, ЛО, СЛ, СО, ПЛ и ПО.

Полученные данные свидетельствуют о том, что НЛ и НО проявили антимикробную активность в отношении *C. albicans* и *P. aeruginosa*. Кроме того, НО проявила активность в отношении штамма *E. coli*.

Так, ЛО и ЛО обладали бактерицидной активностью в разведениях 1:10 и 1:100 в отношении *P. aeruginosa* и *E. coli*. Этим же фракциям присуща и антимикотическая активность в отношении *C. albicans*.

В отношении *E. coli* выявлено, что бактерицидной активностью обладала СО, а в отношении *P. aeruginosa* и *C. albicans* – СЛ и СЛ в разведениях 1:10 и 1:100.

Из полисахаридных фракций антимикробная активность выявлена лишь для ПЛ в обоих разведениях в отношении *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*.

Что касается *B. subtilis* и *B. cereus*, то бактерии этих штаммов оказались резистентными ко всем исследуемым фракциям.

Выводы

Изучена антимикробная активность ряда субстанций листьев лещины обыкновенной и ольхи клейкой. В результате проведенных исследований установлено, что ЛЛ, ЛО, СЛ, СО, НЛ и НО, проявляли антимикробную активность в отношении *P. aeruginosa*, *C. albicans*, ЛЛ, СО и НО – также в отношении *E. coli*. ПО не обладает антимикробным действием, а ПЛ проявила себя лишь в отношении *E. coli*, *S. aureus* и *P. aeruginosa*.

References

1. The Ministry of Defense of Ukraine. Official site. News of the antiterrorist operation. [Electronic resource]. – Access mode: <http://www.mil.gov.ua/ato-news/>
2. Wild Useful Plants Russia [Text] / ex. ed. of A. L. Budantsev, E. E. Lesiovskaya. – SPb. : SPHFA, 2001. – 663 p.
3. Burlaka, I. S., The pigments of *Calamagrostis epigeios* and *Deschampsia caespitosa* herbs / I. S. Burlaka, V. S. Kyslychenko // Ukrainian Journal of Clinical and Laboratory Medicine. – 2012. – V. 7, № 2. – P. 14 – 16.
4. Demeshko O.V. Chemical study of lipophilic fraction from the leaves of *Robinia pseudoacacia* / O.V. Demeshko, I. O. Zhuravel', A.M. Komisarenko // News of Pharmacy. — 2004 — V. - 38, №2. — P. 23-25.
5. Preliminary phytochemical study of flowers, leaves and stems of *Verbascum phlomoides* [Text] / A. A. Voloshyna, V. S. Kyslychenko, I. O. Zhuravel', N. Ye. Burda // Achievements and prospects of the pharmaceutical and healthcare industry in the world today : Mat. II All-Ukrainian scientific conference of young scientists and students, Lugansk, March 29, 2012 - Lugansk, 2012. – P. 80-81.
6. Bubenchikova, V. N. The investigation polysaccharide complexes isolated from above-ground part of *Veronica austriaca* L. / V. N. Bubenchikova, Yu. A. Kondratova // The journal "Belgorod State University Scientific Bulletin. – 2012. – № 10 (129). – P. 43 – 45.
7. State Pharmacopoeia of Ukraine / State Enterprise "Scientific and Expert Pharmacopoeial Center". – 1 st Ed., – Kharkiv, 2001. – 556 p.
8. Studying the specific activity of antimicrobial drugs: Methodical Recommendations [Text] : methodical recommendations / Yu. L. Volyans'kyy, I. S. Hrytsenko, V. P. Shyrobokov ta in. – K., 2004. – 38 p.

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF THE SUBSTANCES RECEIVED FROM RAW MATERIALS OF BIRCH FAMILY PLANTS
Fedchenkova Yu.A., Savinova E.M.

Introduction. In accordance with the last events in Ukraine (considering military operations in anti-terrorist operation in the Luhansk and Donetsk regions) the domestic medicine is in great need in preparations with antimicrobial activity. Our attention as the sources of receiving biologically active substances with antimicrobial activity was drawn with birch *Betulaceae* family plants – hazel ordinary *Corylus avellana L.* and black alder *Alnus glutinosa (L.) Gaertn.* It is known that in medicine the leaves of hazel ordinary are used as antiseptic, anti-inflammatory, vesselrestorative drug, and the leaves of black alder reveal the antiinflammatory, astringent, wound healing, spasmolytic and choleric action. However, the drugs with antimicrobial action received from the leaves of these plants are absent on the market of Ukraine. Therefore the studying of antimicrobial activity of this type of raw materials received from hazel ordinary and black alder, for creation of new medicines, is now one of the main directions in pharmacy. For this purpose we have revealed tinctures, spirit, lipophilic and polysacharid fractions received from the leaves of hazel ordinary and black alder. **The purpose of our research** is studying of antimicrobial activity of revealed substance received from the leaves of black alder and hazel ordinary. **Materials and methods.** There were being examined tinctures, lipophilic, spirit and polysacharid fractions received from the leaves of hazel ordinary and black alder. The test of antimicrobial effect of substances was carried out by means of serial dilution concerning the following six reference cultures: Staphylococcus aureus ATCC 6538-P, Candida albicans ATCC 885-653, Escherichia coli ATCC 25922, Bacillus subtilis ATCC 6833, Bacillus cereus ATCC 10702, Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027, according to the State Pharmacopoeia of Ukraine, in the Department of Microbiology and Immunology of KMAPE. For the experiment there was prepared tenfold dilution of extracts on meat-peptone broth 1:10 and 1:100 to which there were added the referential cultures which are grown up on appropriate differential diagnostic medium depending on a type of cultures. The crops were incubated in the thermostat at t - 35-37 °C within 24-48 hours. For identification of test-strain growth of E. coli there was used Endo medium, for S. aureus – Chistovich medium, for B. subtilis and B. cereus - meat-peptone agar, for P. aeruginosa - 5% blood agar and for C. albicans – Saburo medium. As the solutions remained muddy after incubation, for the assessment of antimicrobial action of the received fractions, there were being made the cloning on differential and diagnostic mediums. **Results and discussion.** Data of the conducted researches of antimicrobial activity of various substances of hazel ordinary and black alder leaves – tinctures, lipophilic, spirit and polysacharide fractions are given in the table. The obtained data demonstrate that lipophilic fractions of hazel ordinary and black alder leaves possessed the bactericidal activity when it was diluted in the ratio of 1:10 and 1:100 concerning P. aeruginosa and E. coli. These fractions also have antimycotic activity concerning C. albicans. Concerning E. coli it is revealed that the spirit fractions from black alder leaves had the bactericidal activity, and concerning P. aeruginosa and C.

albicans – all studied spirit fractions possessed. Among polysacharide fractions the antimicrobial activity is revealed only for this substance of hazel ordinary leaves in both dilutions concerning E. coli, S. aureus, P. aeruginosa. As concerning B. subtilis and B. cereus, bacteria of these strains were resistant to all studied fractions.

Conclusions. Antimicrobial activity of a number of substances of hazel ordinary and black alder leaves is studied. As a result of the conducted researches it is established that lipophilic and spirit fractions of hazel ordinary and black alder leaves, tinctures from these types of raw materials revealed antimicrobial activity concerning P. aeruginosa, C. albicans, lipophilic fraction of hazel ordinary leaves, spirit fraction and tincture of black alder leaves – also concerning E. coli. The polysacharide fraction of black alder leaves doesn't possess antimicrobial action, and the polysacharide fraction of hazel ordinary leaves has shown the activity only concerning E. coli, S. aureus and P. aeruginosa.

Таблица. Антимикробная активность субстанций из листьев лещины обыкновенной и ольхи клейкой

Эталон культуры	ЛЛ		ЛО		СЛ		СО		ПЛ		ПО		НЛ	НО	Культура
	1:10	1:100	1:10	1:100	1:10	1:100	1:10	1:100	1:10	1:100	1:10	1:100			
<i>E. coli</i>	○	○	○	○	●	●	○	○	○	○	●	●	●	○	●
<i>C. albicans</i>	○	○	○	○	○	○	○	○	●	●	●	●	○	○	●
<i>S. aureus</i>	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○	●	●	●	●	●
<i>B. subtilis</i>	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
<i>B. cereus</i>	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
<i>P. aeruginosa</i>	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	●	●	○	○	●

Примечание: ● - рост культуры, ○ - отсутствие роста культуры.