

Н.Є. Стадницька, І.В. Павлюк¹, В.В. Швець, І.І. Губицька, В.І. Лубенець, В.П. Новіков
 Національний університет “Львівська політехніка”,
 кафедра технології біологічно активних сполук, фармації та біотехнології,
¹Корпорація “Артеріум”, АТ “Галичфарм”

ВИБІР ОПТИМАЛЬНИХ ТЕХНОЛОГІЧНИХ ПАРАМЕТРІВ ОТРИМАННЯ АНТИМІКРОБНОЇ НАСТОЯНКИ

© Стадницька Н.Є., Павлюк І.В., Швець В.В., Губицька І.І., Лубенець В.І., Новіков В.П., 2012

Експериментально обґрунтовано вплив технологічних параметрів (вид та розмір частинок сировини, співвідношення сировина–екстрагент, час настоювання) на показники антимікробної активності настоянки із звіробою звичайного (*Hypericum perforatum*).

Ключові слова: звіробій звичайний, антимікробна активність, настоянки.

The article experimentally proved the influence of technological parameters (species and size of particles of raw, ratio of raw-extractant, time of infusion) on parameters of antimicrobial activity of tincture (*Hypericum perforatum*).

Keywords: *Hypericum perforatum*, antimicrobial activity, tinctures.

Постановка проблеми та аналіз публікацій

Технологічні параметри рослинної сировини є вирішальними чинниками в досягненні терапевтичного ефекту фітозасобу [1]. Це стосується виду рослинної сировини (трава, листя, квіти, тощо), вибору методу екстрагування, розчинника та співвідношення сировина-екстрагент, ступеня подрібнення сировини, який є дуже важливим технологічним параметром, оскільки від нього залежить процес масоперенесення при екстрагуванні, а також часу екстрагування. Кінцевою метою розпочатого нами дослідження є розроблення фітозасобу з антимікробною дією, для досягнення якої на першому етапі перед нами постало завдання з вибору об'єкта дослідження.

Підвищений попит на лікарські засоби природного походження стимулює пошук нових рослин із певним спектром фармакологічної дії, а також до оптимізації використання і до поглибленого вивчення сировини, що традиційно використовується в медицині. Однією з таких рослин є звіробій звичайний (*Hypericum perforatum*) родини звіробійні (*Clusiaceae*), який внесений до Фармакопеї України.

Трава рослини містить дубильні речовини (10–12 %), флавоноїди (гіперозид, рутин, кверцитрин, мірицетин, лейкоантоціани), сапоніни, барвники (гіперіцин – 0,1–0,4 %, псевдогіперіцин, гіперин, франгулаемодинантранол), ефірну олію (0,2–0,3 %), смолисті речовини (17 %), каротин і аскорбінову кислоту [2].

Препарати звіробою звичайного проявляють в'язучу і протимікробну дію, зменшують спазми кишок та жовчних шляхів, нормалізують видільну функцію шлункових залоз, розширюють і знімають спазм кровоносних судин (особливо капілярів), поліпшують венозний кровообіг і кровопостачання деяких внутрішніх органів, виявляють капіляророзміцнюючу дію, виявляють протизапальну дію на слизові оболонки травного тракту, сприяють регенерації тканин, зокрема, їх приймають при опіках II і III ступеня. Антибактеріальний препарат трави звіробою новоіманін (*Novoimaninum*) використовують для лікування опіків і різних гнійних процесів в оториноларингології. В Болгарії із звіробою звичайного виробляють препарат пefлавіт (*Pe flavit C*), який використовують при капіляротоксикозах, гострих гломерулонефритах, атеросклерозі тощо.

Внутрішньо звіробій використовують при хворобах травного тракту [3], зокрема при гіпоацидному гастриті, метеоризмі, гострих і хронічних колітах, простих і кривавих проносах та

геморої, водночас він рекомендований при дискінезіях жовчних шляхів, гепатитах, застої жовчі в жовчному міхурі, холециститах, жовчнокам'яній хворобі (у початковій стадії), при нирковокам'яній хворобі (у початковій стадії) та при зниженні фільтраційної здатності нирок. Він показав ефективність при інвазії гостриками (гіменолепідоз і ентеробіоз), в ряді випадків звіробиї призначають при порушеннях периферійного кровообігу з явищами застою, при мікроциркуляторних розладах. Препарати звіробою ефективні й при розладах нервової системи, нейродистонії, мігрени та при нічному нетриманні сечі у дітей [4].

Зовнішньо звіробиї застосовують при atopічних дерматитах у дітей [4], що супроводжуються дисбактеріозом стафілококової етіології, при пітириазі обличчя (*Pityriasis simplex faciei*), виразці гомілки та для загоєння ран [5]. Звіробиї має фотосенсибілізуючі властивості – підвищує чутливість шкіри до ультрафіолетового проміння (наявність в ньому гіперіцину), що використовується при лікуванні вітиліго.

У стоматології препарати з трави звіробою використовують для полоскання ротової порожнини і змазувань десен при гінгівітах і стоматитах, при неприємному запаху з ротової порожнини. У гінекологічній практиці настій трави використовують для спринцювань при запальних захворюваннях піхви, а звіробиїну олію (у вигляді тампонів) – для лікування ерозії шийки матки [6].

У народній медицині, крім усіх вищезазначених випадків, звіробиї використовують при поліартриті, ішіасі, подагрі, туберкульозі легень з кровохарканням, мастопатії, різних запальних процесах, фурункулах тощо.

Траву звіробою використовують у вигляді водного настою, спиртової настоянки, екстракту, тому другим етапом дослідження був вибір методу екстрагування. Для вивчення впливу діючих речовин лікарських рослин на різні види мікроорганізмів використовують переважно їх спиртово-водні витяжки, які одержують різними видами екстракції. Однією із розповсюджених лікарських форм препаратів з рослинної сировини є настоянки, які одержують без нагрівання та без видалення екстрагенту, що дозволяє практично в незмінному стані одержувати комплекс діючих речовини з рослинної сировини [7]. Проаналізувавши асортимент фітопрепаратів, представлених на українському фармацевтичному ринку, можна стверджувати, що саме настоянки (23,46 %) є домінуючою лікарською формою серед препаратів з протимікробною дією; суха лікарська рослинна сировина складає 15,43 %; розчини для зовнішнього застосування – 12,96 %; спреї – 11,11 %; лініменти – 9,88 %; мазі – 8,64 %; шампуні – 6,79 %; таблетки – 3,7 % та інші (8,03 %) (див. діаграма 1).

Діаграма 1

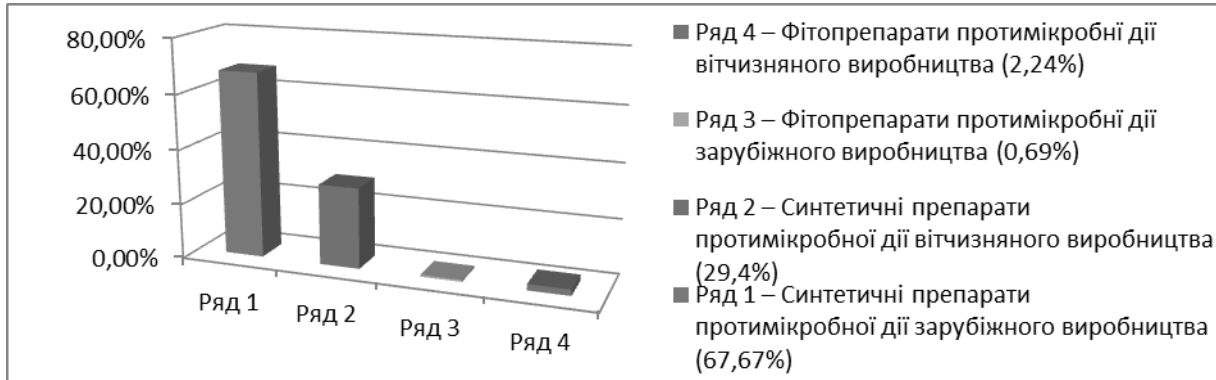


Велика кількість захворювань сьогодення викликана різною патогенною мікрофлорою. Для їх профілактики та лікування широко використовуються протимікробні, противірусні і протипаразитарні засоби, здатні проявляти бактеріостатичну чи бактерицидну дію залежно від концентрації діючої речовини. Такі препарати займають значне місце серед лікарських засобів на фармацевтичному ринку і найчастіше застосовуються при таких групах захворювань: ГРВІ (36 %), туберкульоз (4 %), ниркові та сечостатевої інфекції (16 %), інфекції ШКТ (4 %), інфекційні захворювання порожнини рота (8 %), пошкодження шкіри (20 %) та інші захворювання (12 %) [8].

Сучасний фармацевтичний ринок пропонує великий асортимент синтетичних лікарських засобів, але їх використання в багатьох випадках призводить до розвитку резистентності

мікроорганізмів до них, а також часто супроводжується побічною дією на організм людини, зокрема, появою алергічних реакцій. Цих негативних моментів можна уникнути, використовуючи рослинні препарати. Сьогодні, згідно з нормативно-директивними документами МОЗ України, на фармацевтичному ринку нашої країни представлено близько 5600 найменувань протимікробних, протівірусних і протипаразитарних препаратів вітчизняного та закордонного виробництва, співвідношення яких можна зобразити у вигляді наступної діаграми.

Діаграма 2



Представлені дані наочно підтверджують доцільність проведення досліджень з розроблення технології одержання нових протимікробних фітопрепаратів вітчизняними виробниками із власних сировинних джерел, зокрема з такої доступної і поширеної в Україні рослини, як звіробій звичайний, що проявляє широкий спектр фармакологічної дії.

Експериментальна частина та обговорення результатів

Вихідною сировиною для досліджень нами було вибрано висушені квітучі верхівки трави звіробою звичайного (*Hypericum perforatum*), зібрані в липні 2011 року в с. Славське Львівської області, висушені при температурі 20–25 °С та відносній вологості повітря 30–70 %.

Вихідну сировину стандартизували згідно з вимогами ДФУ 1.2 ст. 443(2) [9]. Результати макроскопічного і мікроскопічного аналізу були позитивними. Втрата в масі при висушуванні становила менше <10 %, вміст золи <7 %, вміст сторонніх домішок – у межах норми. Ідентифікацію проводили методом тонкошарової хроматографії (ТШХ) з використанням розпилювального пристрою, хроматографічна пластинка силікагелю, як елюент використовували суміш розчинників: кислота мурашина–вода–етилацетат у співвідношенні 6:9:90. Результати ТШХ підтверджують наявність рутину, гіперозиду, псевдогіперіцину та гіперіцину.

Кількісний вміст флавоноїдів визначали на спектрофотометрі, для порівняння використовували стандартний зразок рутину. Кількісний вміст флавоноїдів в перерахунку на рутин в карпатській сировині становив 5,45 %, що є дуже високим показником порівняно з вимогами ТУ на траву звіробою, де регламентований кількісний вміст флавоноїдів в перерахунку на рутин має становити $\geq 1,5$ % [9].

Стандартизовану сировину ділили на три групи: 1) трава; 2) листя і квіти; 3) стебла. Кожну з них використовували для одержання настоянок на 70 % етанолі. Їх склад ідентифікували методом рідинної хроматографії. Хроматографію проводили на рідинному хроматографі:

- колонка “ХТетра С 18”, розміром 4,6 x 250 мм, заповнена сорбентом з розміром частинок 5 мкм.
- рухома фаза А: 0,6 г натрію дигідрофосфату моногідрату розчиняють у 1000 мл води для хроматографії, доводять рН розчину кислотою фосфорною до 2,5 (потенціометрично; ДФУ, 2.2.3).
- рухома фаза В: ацетонітрил;
- швидкість рухомої фази – 1,0 мл/хв.;
- детектування за довжини хвилі 330 нм
- температура колонки 25 °С;
- час хроматографування 60 хв.

Зокрема, в хроматограмі (рис. 1) настоянки трави звіробію (1:10) на 70% етиловому спирті при настоюванні протягом 2-х годин присутні смуги поглинання хлорогенової, кавової, ферулової, цикорієвої, розмаринової кислот, рутину, гіперозиду, лутеоліну, лутеолін-7-глікозиду, апігенін-7-глікозиду, кверцитину. Для їх ідентифікації використовували стандартні зразки

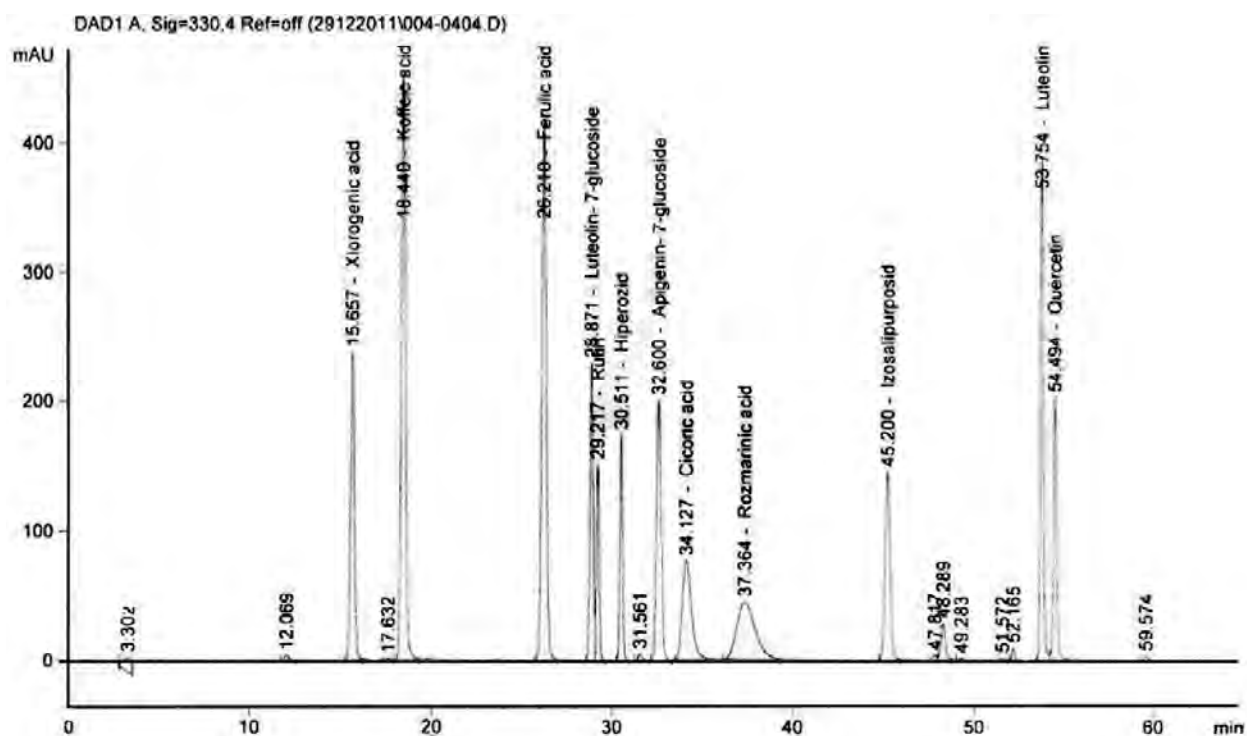


Рис. 1. Хроматограма настоянки трави звіробію: етиловий спирт 70% (1:10), час настоювання -2 години

Спектрофотометрично визначали кількісний вміст суми флавоноїдів в настоянці звіробію 1:10 в етиловому спирті 70% з часом настоювання 2-ї години, він склав 0,14 % в перерахунку на рутин.

Для дослідження антимікробної активності настоянок звіробію звичайного ми обрали тест культури *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 902, *Escherichia coli* ATCC, *Candida albicans* ATCC 10231. *Staphylococcus aureus* є збудником шкірних гнійничкових інфекцій, раневих інфекцій, очних інфекцій, бактеріємії, пневмонії, ендокардиту, інфекцій сечостатевої системи, слизових. *Bacillus subtilis* викликає очні інфекції, бактеріємії та септицемії, пневмонії, менінгіти, ендокардити. *Pseudomonas aeruginosa*, що викликає 20 % внутрішньолікарняних інфекцій, є одним з основних збудників нозокоміальних пневмоній, а також викликає третину всіх уражень сечостатевої системи. Основний збудник раневих інфекцій, отитів, синуситів, септицемії, має виражений фатальний характер. *Escherichia coli* викликає кишкові інфекції, ураження сечовивідних шляхів, бактеріємії, менінгіти. *Candida albicans* входить в склад нормальної мікрофлори організму людини. Сьогодні кандиди – одні з найпоширеніших збудників опортуністичних мікозів.

Антимікробну активність досліджували методом дифузії в агар відповідно до вимог ДФУ 1.4 пункт 2.7. Інокулювали весь об'єм середовища (20 мл соєво-казеїнового агару на одну чашку Петрі), при мікробному навантаженні 10^6 КУО/мл середовища з використанням добових культур тест-штамів мікроорганізмів, вирощених на соєво-казеїновому бульйоні. Об'єм зразків, що вносили в лунки (діаметр 6 мм), становив 0,09 мл. Час інкубації 18 години при 32–35 °С. Величину зон затримки росту вимірювали з точністю до 0,1 мм. Паралельно проводили контроль екстрагенту – 70 % розчину етилового спирту, для якого затримки росту тест-штамів мікроорганізмів не спостерігали. Найбільш чутливою стосовно досліджуваних настоянок виявилася культура *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, яка належить до антибіотикостійких штамів, що є дуже важливим в перспективі практичного використання, також чутливою виявилась культура *Bacillus subtilis*

ATCC 6633. Для тест-штамів мікроорганізмів *Escherichia coli* ATCC та *Candida albicans* ATCC 10231 затримки росту не спостерігали.

Для встановлення оптимального кількісного складу настоянки звіробою звичайного нами досліджено зразки настоянок з різним співвідношення рослинна сировина-екстрагент (1:100, 1:50, 1:10). Для цього траву звіробою подрібнювали до розміру частинок 0,2–2 мм і настоювали дві години при кімнатній температурі в 70 %-му етанолі. Для всіх досліджуваних тест-культур найбільш ефективним виявилось співвідношення 1:10 (див. табл. 1).

Таблиця 1

№ з/п	Співвідношення трава:етанол	Діаметр зон затримки росту тест-мікроорганізмів, мм		
		<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027
1	1:100	25±0,01	18±0,01	8±0,01
2	1:50	26±0,01	19±0,01	9±0,01
3	1:10	28±0,01	24±0,01	10±0,01

Ступінь вивільнення активних речовин залежить від часу настоювання. Для встановлення залежності показників антимікробної активності від терміну настоювання траву звіробою звичайного подрібнювали до розміру частинок 1–2 мм і настоювали у співвідношенні 1:10 на 70 % етанолі протягом 2-х і 24-х годин при кімнатній температурі. Одержані результати показали, що для досягнення антимікробної дії досліджуваних настоянок достатньо двогодинного терміну настоювання, що, без сумніву, є дуже позитивним фактом з економічного погляду (див. табл. 2).

Таблиця 2

№ з/п	Час настоювання	Діаметр зон затримки росту тест-мікроорганізмів, мм		
		<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027
1	2 год.	28±0,01	24±0,01	10±0,01
2	24 год.	28,5±0,01	23±0,01	10±0,01

Важливим критерієм при екстрагуванні є розмір подрібнених частинок. В зв'язку з цим ми дослідили вплив ступеня подрібнення сировини на показники антимікробної дії (табл. 3). Траву звіробою звичайного подрібнювали до розміру частинок від 0,2 мм до 5 мм і ділили на фракції за допомогою сит, настоювали у співвідношенні 1:10 на 70 %-му етанолі протягом 2-х годин при кімнатній температурі. Діаметри зон затримки росту тест культур для зразків з розміром частинок 0,2–1 мм і 1–2 мм виявилися однаковими, тому з технологічного погляду оптимальнішим є подрібнення сировини до розміру частинок 1–2 мм.

Таблиця 3

№ з/п	Розмір частинок сировини	Діаметр зон затримки росту тест-мікроорганізмів, мм		
		<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027
1	0,2–1 мм	28±0,01	24±0,01	10±0,01
2	1–2 мм	28±0,01	24±0,01	10±0,01
3	2–5 мм	24±0,01	18±0,01	10±0,01

Для визначення оптимальної по антимікробній дії морфологічної частини звіробою нами досліджено окремо траву звіробою (верхня частина рослини 10–15 см в період цвітіння), листя і квіти, а також самі стебла. Сировину подрібнювали до розміру частинок 1–2 мм, настоювали у співвідношенні 1:10 на 70 % етанолі протягом 2-х годин при кімнатній температурі. Одержані дані

(див. табл. 4) свідчать про можливість розділення сировини на окремі групи: стебла; листя і квіти; трава. Діаметри зон затримки росту тест-культур *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 та *Bacillus subtilis* ATCC 6633 більшими є для виду сировини стебла.

Таблиця 4

№ з/п	Вид сировини	Діаметр зон затримки росту тест-мікроорганізмів, мм		
		<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027
1	стебла	23±0,01	16,5±0,01	10±0,01
2	листя+квіти	20,5±0,01	14±0,01	10±0,01
3	трава	24±0,01	18±0,01	10±0,01

Висновки

Отже, експериментально визначено оптимальні технологічні показники, які забезпечують найкращі значення антимікробної активності настоянки звіробою звичайного – це розмір частинок 1–2 мм, співвідношення сировина:етанол 1:10, час настоювання 2 год. Одержані результати свідчать про те, що з метою раціонального використання сировини *Hypericum perforatum* трава, її доцільно розділити на дві морфологічні групи: листя і квіти та стебла. Це на практиці дасть змогу використовувати першу для виготовлення фізіологічно активних добавок, а стебла використовувати для одержання антимікробної настоянки.

1. Гриценко О.М. Технологічні аспекти ефективності фітозасобів // Фітотерапія: Часопис. – 2008. – № 2. – С. 53–57. 2. Лікарські рослини: Енциклопедичний довідник / Відп. ред. А.М. Гродзінський. – К.: Видавництво «Українська Енциклопедія» ім. М. П. Бажана, Український виробничо-комерційний центр «Олімп», 1992. – 544 с. 3. Omar M.E.Abdel-Sabam, Anti-Informatory, Antinociceptive, and Gastric Effects of *Hypericum perforatum* The Scientific Word Journal (2005)5. 4. Меньшикова М.Л. Зелена аптека дітям Фітотерапія в педіатрії – Челябінськ : Лілія 1993. – С.207–233. 5. J. Reichling, A. Weseler and R.Saller, A current review of the antimicrobial activity of *Hypericum perforatum* L., *Pharmacopsychiatry* 34 (2001) 116-118. 6. A. Branter and E. grein, Antibacterial activity of plant extract used externally in traditional medicine, *J. Ethnopharmacol.* 44 (1994) 35-40. 7. Тернинко І.І., Вітохіна Н.В., Шмена С.Ю.: Створення комплексної настоянки з лікарської рослинної сировини і вивчення її антимікробної активності // Український журнал клінічної та лабораторної медицини. – 2008. – Т. 3. – № 2. 8. Кіщак Х.Я., Стадницька Н.С., Конечна Р.Т. Дослідження асортименту лікарських препаратів протимікробної дії, представлених на фармацевтичному ринку України // Наукові розробки молоді на сучасному етапі: X Всеукраїнська наукова конференція молодих учених та студентів: Тези доповідей. – К., 2011. – С. 391–392. 9. Державна Фармакопея України, перше видання, Доповнення 2. – Харків: Науково-експертний Фармакопейний центр, 2001. – 443 с.