

Рекомендована д. мед. наук, проф. С. І. Климнюком

УДК 615.28 : 615.322 : 615.451.16 : 57.083.1

МІКРОБІОЛОГІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ ЗРІДЖЕНОГАЗОВИХ І НАДКРИТИЧНОГО ЕКСТРАКТІВ СУЦВІТЬ ЛИПИ

© Д. В. Дем'яненко, Є. М. Бабич, Н. І. Скляр

Національний фармацевтичний університет, Харків

ДУ «Інститут мікробіології та імунології імені І. І. Мечникова АМН України», Харків

Резюме: вивчено мікробіологічну чистоту та антимікробну активність екстрактів із суцвіть липи серцелистої, одержаних за допомогою зріджених газів та надкритичного CO₂. Досліджувані зразки за мікробною чистотою відповідали вимогам ДФУ щодо нестерильних пероральних та ректальних лікарських засобів. Дифторхлорметанові екстракти та етилацетатна фаза фреоно-аміачної витяжки мали широкий спектр антимікробної дії. Зразки, отримані фреоном-32 та надкритичним CO₂, селективно діяли на грамнегативну флору, а гідрофільна фаза фреоно-аміачного екстракту – на грампозитивну.

Ключові слова: екстракція, суцвіття липи, ефірні олії, зріджені гази, антимікробна активність, мікробна контамінація.

Вступ. Принцип лікування захворювань мікробного генезису, який передбачає застосування тільки природних засобів або їх комбінацій із синтетичними, на сьогодні є одним із найперспективніших. Це стосується, передусім, препаратів рослинного походження, які діють переважно за двома різними напрямками: чинять прямий ефект на мікроби так само, як антибіотики й антисептики та/або підвищують захисні властивості макроорганізму. Можливий також третій механізм впливу фітопрепаратів, який поєднує вищезазначені напрямки та є найефективнішим у лікувальній практиці.

Перспективність рослинних екстрактів зумовлена тим, що серед них часто зустрічаються біологічно активні речовини (БАР), які вибірково діють на певні групи патогенних бактерій, тобто належать до антимікробних засобів вузького спектра дії. Це дає можливість уникнути або знизити до мінімуму побічні ефекти, пов'язані із дисбактеріозом, які характерні для більшості антибіотиків. Крім того, у бактерій рідше виникає резистентність до рослинних БАР порівняно із синтетичними [6, 15]. Так, наприклад, в дослідженнях [14] показана відсутність перехресної резистентності до ефірної олії *Pneumus boldus* між чутливими та стійкими до бета-лактамів штамми *S. pneumoniae*, що пояснюється різними механізмами дії пеніцилінів та ефірних олій.

За даними [6], зазначені БАР посідають одне з провідних місць серед класів речовин рослинного походження, які мають антимікробну активність, а наукові розробки присвячені дослідженню ефірних олій, вказують на їх антибактеріальні та/або фунгіцидні ефекти.

Характерною особливістю механізму дії даних БАР є те, що через багатоконпонентний склад вони (на відміну від антибіотиків) не атакують певну специфічну «мішень» у клітинній структурі, але завдяки ліпофільним властивостям проникають через цитоплазматичну мембрану або накопичуються в ній, порушуючи її головну функцію – напівпроникність, що призводить до втрати фосфоліпідів, полісахаридів та інших макромолекул [7, 9].

Ефірні олії здатні також потенціювати дію антибіотиків та антисептиків, зокрема нітрофурантоїну, за рахунок підвищення проникності мікробних мембран [13].

Відомо [5, 8, 10–12], що основними групами БАР в суцвіттях липи є флавоноїди, полісахариди, дубильні речовини, сапоніни та ефірна олія, причому хімічний склад останньої значно варіює залежно від технології її одержання та ботанічного виду липи [5, 11, 12]. Як наслідок, літературні дані відносно антимікробної активності екстрактів із суцвіть липи, зокрема тих, що містять ефіроолійні компоненти, дуже суперечливі.

Так, автори [8] досліджували водні екстракти, одержані з різних рослин народної медицини, методом кип'ятіння протягом 5 хв при співвідношенні сировина : вода 1:10 з наступним сушінням при температурі 105 °С та встановили, що сухий екстракт із суцвіть *T. cordata* виявляв помітну активність відносно тестових штамів *S. aureus*, *B. subtilis* та *E. coli*: мінімальні інгібуючі концентрації (МІК) зразків були рівні 1–3 мг/мл, нечутливим виявився лише ентерокок. Дані одержані методом серійних розведень у рідкому середовищі, не корелювали із результатами,

виявленими при дифузії екстракту в агар: зони затримки росту були дуже незначні, що вказує на погану дифузію діючих компонентів у твердому середовищі.

З іншого боку, в роботі [10] не встановлено жодного антимікробного ефекту водного екстракту із суцвіть *T. argentea*, виділеного кип'ятінням протягом 30 хв при співвідношенні сировина : вода 1:20 з наступним ліофільним сушінням при – 50 °С, але антиоксидантна активність екстракту була високою. Автори пояснюють це захисним ефектом екстрагованих антиоксидантів, які запобігають руйнуванню мікробних клітин прооксидантами.

Із досліджень [11] видно, що ефірні олії, одержані із суцвіть *T. tomentosa* та *T. cordata* гідродистиляцією, містили переважно аліфатичні вуглеводні (до 60 %), головним з яких був трикозан, кисневмісні монотерпени – ізоциклоцитраль (15 %) і хотрієнол (11,5 %), та мали антимікробну активність.

Проте CO₂-екстракт, виділений із суцвіть *T. tomentosa* при параметрах, наближених до критичних, складався переважно з ароматичних й аліфатичних альдегідів і спиртів, причому домінуючими сполуками були бензальдегід і фенілетанол, та не впливав на жодні з досліджуваних тест-мікроорганізмів – грам-позитивні, грам-негативні та гриби [5]. Автори [12] з аналогічної сировини одержували зрідженим фреоном-134а екстракт, що містив в основному ароматичні кисневмісні сполуки – спирти та естери (36,8 %), аліфатичні алкани (33,6 %) та кисневмісні монотерпени (9,25 %), але й він був також неактивним щодо тестових штамів мікробів.

Отже, враховуючи вищезазначені суперечливі дані, а також те, що нами вперше були одержані екстракти із суцвіть липи *T. cordata* з використанням різних зріджених газів, їх сумішей та надкритичного CO₂, метою даної роботи було дослідження мікробіологічної чистоти й антимікробної активності вказаних екстрактів.

Методи дослідження. Мікробіологічним дослідженням підлягали такі зразки:

А – дифторхлорметановий (фреоновий-22) екстракт із суцвіть липи, В – дифторхлорметановий витяг зі шроту, одержаного після попередньої екстракції сировини тетрафторетаном (фреоном-134а); С – дифторметановий (фреоновий-32) екстракт зі шроту суцвіть липи після одержання зразка А; D – екстракт, виділений із сировини надкритичним CO₂ при температурі 60 °С та тиску 400 атм.

Зразки Е, F, G, H одержували так.

Шрот після попередньої обробки азеотропною сумішшю зріджених пентафторетану і дифторметану (фреоном-410а) екстрагували цим

розчинником з додаванням рідкого аміаку у співвідношенні 1:1 за масою. Після випарювання екстрагента кубовий залишок розчиняли у 70 % етанолі. Спиртовий розчин переносили у ділильну лійку, розводили водою очищеною до концентрації спирту близько 50 % та вичерпно екстрагували гексаном. Органічну фазу фільтрували та випарювали насухо (зразок F). Аналогічно проводили послідовну рідинну екстракцію водно-спиртового шару хлороформом, а потім етилацетатом з наступним висушуванням органічних фаз та одержанням зразків G і H відповідно. Водно-спиртовий маточник також сушили до постійної ваги (зразок E).

Зразки А–D, F, G для забезпечення належних технологічних властивостей та зручності дозування розвели з інертним наповнювачем (лактозою), а зразки E, H – розчинені у водно-пропіленгліколевій суміші.

Досліджували також мікробну контамінацію допоміжних речовин – лактози, твіну-80 та пропіленгліколю.

Як препарати порівняння використовували таблетки «Хлорофіліп» по 25 мг (виробник ТОВ «ДЗ ДНЦЛЗ», м. Харків) і таблетки «Септефрил-Дарниця» по 0,2 мг декаметоксину (виробник ФФ «Дарниця», м. Київ).

Еталонними тест-культурами були референштами бактерій *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (F-49), *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 P (209-P), *Escherichia coli* ATCC 25922 (F-50), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Candida albicans* ATCC 885-653, а також циркулюючі клінічні ізоляти *Staphylococcus aureus* (n=4), *Escherichia coli* (n=4), *Citrobacter freundii*, вилучені при гнійно-запальних захворюваннях сечостатевої системи та верхніх дихальних шляхів.

Випробування мікробіологічної чистоти досліджуваних зразків проводилось згідно з ДФУ 2001, р. 2.6.12 та 2.6.13 [3].

Приготування суспензій мікроорганізмів із визначеною концентрацією мікробних клітин проводили за допомогою електронного приладу Densi-La-Meter (PLIVA-Lachema, Чехія) за шкалою McFarland згідно з інструкцією до приладу та нормативним документом [4]. Синхронізацію культур перед проведенням дослідів досягали одноразовим впливом низької температури (+4 °С) впродовж 30 хв [1].

Визначення протимікробної активності зразків проводили методами дифузії в агар, серійних розведень у рідкому та твердому живильних середовищах згідно з методичними рекомендаціями [2] і ДФУ, р. 2.7 [3].

Результати й обговорення. Результати визначення мікробіологічної чистоти екстрактів липи, одержаних різними зрідженими газами,

а також допоміжних речовин, наведено у таблиці 1.

Як видно з одержаних даних, більшість досліджених зразків, крім екстрактів липи, одержаних із нативної сировини фреоном-22 та надкритичним CO₂ (зразків А, D), за мікробіологічною чистотою належали до 3-ї та навіть до 2-ї (зразки В, Е, F) категорій згідно з ДФУ 2001, р. 5.1.4. Екстракт А можна класифікувати як рослинний лікарський засіб, до якого перед вживанням не потрібно додавати киплячу воду (кате-

горія 4В). Найконтамінованим аеробними мікроорганізмами виявився надкритичний CO₂-екстракт (зразок D), хоча за умов його одержання він теоретично мав бути стерильним. Дуже позитивним є факт повної відсутності грибів та ентеробактерій в усіх досліджуваних зразках, що підтверджує необхідність використання зріджених газів та надкритичних флюїдів у фітохімічному виробництві для вирішення найболючішої проблеми в даній галузі – мікробної контамінації рослинних препаратів.

Таблиця 1. Мікробіологічна чистота досліджуваних зразків та допоміжних речовин

Назва зразка	Загальне число життєздатних аеробних мікроорганізмів (КУО*/г)	Загальне число пліснявих та дріжджових грибів (КУО/г)	Наявність ентеробактерій, у т.ч. кишкової палички в 1 г зразка
Зразок А	9,5 · 10 ⁴	0	Не виявлено
Зразок В	2 · 10 ¹	0	Не виявлено
Зразок С	2 · 10 ²	0	Не виявлено
Зразок D	4 · 10 ⁵	0	Не виявлено
Зразок Е	1 · 10 ¹	0	Не виявлено
Зразок F	2 · 10 ²	0	Не виявлено
Зразок G	7 · 10 ²	0	Не виявлено
Зразок H	2 · 10 ²	0	Не виявлено
Лактоза	1 · 10 ¹	0	Не виявлено
Твін	1,8 · 10 ²	0	Не виявлено
Пропіленгліколь	2 · 10 ¹	0	Не виявлено

Примітка. * – КУО – колонієутворювальна одиниця.

Експериментальні дані стосовно антимікробної активності досліджуваних зразків порівняно з референс-препаратами наведено в таблиці 2.

Одержані результати свідчать, що дифторхлорметанові (фреонові-22) екстракти із суцвіть липи мають широкий спектр антимікробної дії в діапазоні концентрацій, характерних для анти-

Таблиця 2. Антимікробна активність екстрактів липи, одержаних різними зрідженими газами та надкритичним CO₂

Назва зразка	Межі досліджених концентрацій (мг/мл)	Наявність /відсутність протимікробної активності до тест-штамів					
		Золотисті стафілококи (n=6)		Ентеробактерії		P.aeruginosa ATCC 27853	C.albicans ATCC 885-653
		S.aureus ATCC 25923, 6538 P (209-P)	Клінічні штами (n=4)	E.coli ATCC 25922	Клінічні штами (n=5)		
Зразок А	0,63–20,00	+	+	+	+	+	+
Зразок В	0,32–10,00	+	н/в	+	н/в	+	+
Зразок С	0,50–10,00	–	н/в	+	+	н/в	–
Зразок D	0,50–10,00	–	н/в	+	+	н/в	–
Зразок Е	0,13–5,00	+	+ (чутливі 80 %)	–	н/в	н/в	–
Зразок F	0,50–10,00	–	н/в	–	н/в	н/в	–
Зразок G	0,50–10,00	–	н/в	–	н/в	н/в	–
Зразок H	0,13–5,00	+	+	+	+	+	–
Хлоро-філіпт	0,32–5,00	+	+	н/в	н/в	н/в	н/в
Септе-фріл	0,0025–0,1000	+	+	+	+	-	+

Примітки: + – має антимікробну активність; – – не має антимікробну активність; н/в – не визначали.

септиків. Чутливими до зазначених зразків виявилися музейні та клінічні штами основних представників граммпозитивної і грамнегативної мікрофлори *S.aureus* та *E.coli* відповідно, й навіть *P.aeruginosa*, яка, як відомо, є дуже стійкою до багатьох антисептиків та антибіотиків. Характерним для зразків А і В, на відміну від інших досліджуваних нами, є їх активність проти грибів *C.albicans*. Крім того, вказані зразки практично не відрізнялися один від одного за своєю антимікробною дією. Отже, сполуки, які були вилучені фреоном-134а при одержанні екстракту В, не відповідають за протимікробну активність, що цілком узгоджується з даними [12].

Дифторметановий (фреоновий-32) та надкритичний CO₂-екстракти (зразки С і D відповідно) виявилися селективними до грамнегативної флори. Очевидно, що фреон-32 додатково екстрагує класи БАР, які були в незначній кількості у витягах, одержаних фреоном-22. Гідрофільна фаза фреоно-аміачного екстракту (зразок Е), навпаки, була селективною до граммпозитивної флори. Стійкість грамнегативних штамів до БАР даного зразка можна пояснити наявністю зовнішньої мембрани в клітинах представників даного класу мікрофлори, яка є бар'єром для багатьох БАР [15]. Гексанові та хлороформні фази фреоно-аміачного екстракту (зразки F, G) зовсім не виявляли ані антибактеріальної, ані антигрибкової активності. Найефективнішим був зразок Н, який впливав на усі досліджувані штами бактерій в діапазоні концентрацій 0,125–5,0 мг/мл, проте на відміну від дифторхлорметанових екстрактів він не мав протигрибкової активності.

При порівнянні досліджуваних зразків з існуючими антисептиками рослинного та синтетичного походження встановлено, що за діапазоном ефективних концентрацій зрідженогазові екстракти суцвіть липи практично не відрізняються від референс-препарату хлорофіліпту, але поступаються синтетичному антисептику декаметоксину. Головною перевагою останнього є активність одних зразків проти синьогнійної палички та селективність дії інших. Ефективність

екстрактів А–D, Н проти грамнегативної мікрофлори вигідно відрізняє їх від рослинного препарату – хлорофіліпту.

Таким чином, на основі проведених досліджень можна зробити висновок про перспективність використання зрідженогазових та надкритичних екстрактів суцвіть липи серцелистої в терапії інфекційних захворювань. Крім того, розроблена нами технологія комплексної переробки даної сировини з послідовним екстрагуванням різними зрідженими газами та їх сумішами дозволяє одержувати субстанції із заданим спектром антимікробної активності.

Висновки. 1. Проведено дослідження мікробіологічної чистоти й антимікробної активності екстрактів із суцвіть липи серцелистої, одержаних з використанням різних зріджених газів, їх сумішей та надкритичного CO₂.

2. Встановлено, що більшість досліджених екстрактів за показником загального числа аеробів належали до 2-ї та 3-ї категорій згідно з вимогами ДФУ, лише зразки, одержані з нативної сировини надкритичним CO₂ та фреоном-22, підпадали під категорії 4А та 4В відповідно. Гриби та ентеробактерії не були знайдені в жодному зі зразків.

3. Антимікробна активність більшості з досліджуваних зразків за показниками мінімальної інгібувальної та бактерицидної концентрацій була на рівні референс-препарату хлорофіліпту.

4. Дифторхлорметанові екстракти та етилацетатна фаза фреоно-аміачного екстракту мали широкий спектр дії проти граммпозитивної і грамнегативної мікрофлори, у тому числі й *P.aeruginosa*. Дифторхлорметанові витяги були також активні відносно *C.albicans*. Зразки, одержані фреоном-32 та надкритичним CO₂, селективно діяли на грамнегативну флору, а гідрофільна фаза фреоно-аміачного екстракта – на граммпозитивну.

5. Комплексна переробка суцвіть липи з послідовним екстрагуванням різними зрідженими газами та їх сумішами дозволяє одержувати субстанції із заданим спектром антимікробної активності.

Література

1. Баснакьян И. А. Культивирование микроорганизмов с заданными свойствами / И. А. Баснакьян. – М. : Медицина, 1992. – С. 29–59.
2. Вивчення специфічної активності протимікробних лікарських засобів : метод. реком. / Ю.Л. Волянський, І.С. Гриценко, В.П. Ширококов [та ін.]. – К., 2004. – 40 с.
3. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». - 1-ше вид. – Харків : Ріпег, 2001. – 556 с.
4. Стандартизація приготування мікробних суспензій :

Інформаційний лист про нововведення в системі охорони здоров'я №163-2006. – К. : Укрмедпатентінформ, 2006. – 10 с.

5. Atanasova T. Chemical composition and antimicrobial activity of linden (*Tilia tomentosa* Moench.) CO₂ extract / T. Atanasova, V. Gochev, A. Stoyanova // Plovdiv University „Paisii Hilendarski” – Bulgaria Scientific Papers. - 2008. – Vol. 36, N 5. – P. 91–96.
6. Biological activity of essential oils and their constituents / T. Nakatsu, A. T. Lupo Jr., J. W. Chinn Jr., R. K. L. Kang

- // Studies in Natural Products Chemistry. – 2000. – Vol. 21. – P. 571–631.
7. Biological effects of essential oils – A review / F. Bakkali, S. Averbeck, D. Averbeck, M. Idaomar // Food and Chem. Toxicol. – 2008. – Vol. 46. – P. 446–475.
8. Brantner A. Antibacterial activity of plant extracts used externally in traditional medicine / A. Brantner, E. Grein // J. of Ethnopharmacol. – 1994. – Vol. 44. – P. 35–40.
9. Carson C. F. Mechanism of action of Melaleuca alternifolia (tea tree) oil on Staphylococcus aureus determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy / C. F. Carson, B. J. Mee, T. V. Riley // Antimicrob. Agents Chemother. – 2002. – Vol. 46. – P. 1914–1920.
10. Comparison of antioxidant and antimicrobial activities of Tilia (Tilia argentea Desf Ex DC), sage (Salvia triloba L.), and black tea (Camellia sinensis) extracts / A. Yildirim, A. Mavi, M. Oktay [et al.] // J. Agric. Food Chem. – 2000. – Vol. 48. – P. 5030–5034.
11. Fitsiou I. Volatile constituents and antimicrobial activity of Tilia tomentosa Moench and Tilia cordata Mill. oils / I. Fitsiou, O. Tzakou, M. Hancianu // J. of Essential Oil Res. – 2007. – Vol. 19, N2. – P. 183–185.
12. Low temperature extraction of essential oil bearing plants by liquifacate gases. 2. Flowers of linden (Tilia tomentosa Moench.) [Електронний ресурс] / Т. Atanasova, N. Nenov, Т. Girova [et al.]. – Режим доступу: // www.e-xtracts.com/ ExtractumScientific6.pdf.
13. Rafii F. Comparison of essential oils from three plants for enhancement of antimicrobial activity of nitrofurantoin against enterobacteria / F. Rafii, A. R. Shahverdi // Chemotherapy. – 2007. – Vol. 53. – P. 21–25.
14. Savino A. Antimicrobial activity of the essential oil of Pneumus boldus (bold). Aromatogram and electron microscopy observations / A. Savino, M. N. Lollini, A. Menghini // Bollettino di Microbiologia e Indagini di Laboratorio. – 1994. – Vol. 14. – P. 5–12.
15. Shigeharu Inouye. Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact / Inouye Shigeharu, Takizawa Toshio, Yamaguchi Hideyo // J. of Antimicrob. Chemother. – 2001. – Vol. 47. – P. 565–573.

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ СЖИЖЕННОГАЗОВЫХ И СВЕРХКРИТИЧЕСКОГО ЭКСТРАКТОВ СОЦВЕТИЙ ЛИПЫ

Д. В. Демьяненко, Е. М. Бабич, Н. И. Скляр

Национальный фармацевтический университет, Харьков

ГУ «Институт микробиологии и иммунологии имени И. И. Мечникова АМН Украины», Харьков

Резюме: изучена микробиологическая чистота и антимикробная активность экстрактов из соцветий липы сердцевидной, полученных различными сжиженными газами и сверхкритическим CO₂. Исследуемые образцы по микробной чистоте соответствовали требованиям ГФУ к нестерильным пероральным и ректальным лекарственным средствам. Дифторхлорметановые экстракты и этилацетатная фаза фреоно-аммиачных извлечений обладали широким спектром антимикробного действия. Образцы, полученные фреоном-32 и сверхкритическим CO₂, селективно действовали на грамотрицательную флору, а гидрофильная фаза фреоно-аммиачного экстракта – на грамположительную.

Ключевые слова: экстракция, соцветия липы, эфирные масла, сжиженные газы, антимикробная активность, микробная контаминация.

MICROBIOLOGICAL STUDY OF LIQUEFIED GAS AND SUPERCRITICAL EXTRACTS FROM LIME FLOWERS

D. V. Demyanenko, Ye. M. Babych, N. I. Sklyar

National University of Pharmacy, I. I. Mechnykov Institute of Microbiology and Immunology of the Ukrainian AMS, Kharkiv

Summary: microbiological purity and antimicrobial activity of extracts from lime (Tilia cordata) flowers, obtained with various liquefied gases and supercritical CO₂ have been studied. Microbial purity of the researched samples conformed to the SPhU requirements stated for non-sterile oral and rectal pharmaceuticals. The difluorochloromethane (Freon-22) extracts and ethylacetate phase of the Freon-ammonia showed a wide spectrum of antimicrobial activity. The samples obtained with Freon-32 and supercritical CO₂ selectively affected gram-negative microflora and hydrophilic phase of the Freon-ammonia extract did gram-positive one.

Key words: extraction, lime flowers, essential oils, liquefied gases, antimicrobial activity, microbial contamination.