

УДК 615.281.9:615.451.1:582.916.21:579.84/.86

А. М. КОВАЛЬОВА<sup>1</sup>, А. П. ОСЬМАЧКО<sup>1</sup>, Н. В. КАШПУР<sup>2</sup>, І. В. ГРУДЬКО<sup>1</sup><sup>1</sup>Національний фармацевтичний університет<sup>2</sup>Харківський НДІ мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова

## АНТИБАКТЕРІАЛЬНА АКТИВНІСТЬ КОМПЛЕКСІВ З ТРАВИ ВЕРОНІКИ ДОВГОЛИСТОЇ

Досліджено антибактеріальну активність двох комплексів біологічно активних речовин з трави вероніки довголистої «Blaubart» (*Veronica longifolia* L. «Blaubart»), отриманих послідовно хлороформом та етилацетатом, по відношенню до грамнегативних (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*) та грампозитивних (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*) мікроорганізмів, а також до *Candida albicans*. У комплексах виявлені іридоїди, фенольні сполуки; в ліпофільному комплексі визначено вміст каротиноїдів та хлорофілів; у фенольному комплексі визначено вміст флавоноїдів та гідроксикоричних кислот. Встановлено високу антибактеріальну активність комплексів по відношенню до Грам(-) та помірну до Грам(+) бактерій, мінімальну бактеріостатичну та бактерицидну дію в дозі, яка вдвічі нижча, ніж препарат порівняння (2 % розчин «Хлорофіліпту»).

**Ключові слова:** Вероніка довголиста; антибактеріальна активність; комплекси біологічно активних речовин; грамнегативні мікроорганізми

### ВСТУП

Потреба у нових антибактеріальних засобах залишається актуальною протягом багатьох років. Перспективний напрямок у фармації – пошук нових антибактеріальних препаратів з лікарських рослин та отриманих з них субстанцій.

Представники роду Вероніка здавна широко використовувались у народній медицині як відхаркувальні, протизапальні, фунгіцидні, ранозагоювальні та кровоспинні засоби при захворюваннях шкіри, знеболювальні та протисудомні засоби. Проте в офіційній медицині рослини роду *Veronica* L. не застосовуються. Експериментально досліджувались антимікробна [1, 5, 10], протизапальна та цитотоксична [7], антирадикальна [6], антиоксидантна [9, 11] активність різних екстрактів з видів роду Вероніка. Раніше нами було одержано ліпофільний комплекс з антибактеріальною дією з трави вероніки широколистої, що містить терпеноїди [3]. Вероніка довголиста (*Veronica longifolia* L.) – багаторічна трав'яниста рослина роду подорожникові (*Plantaginaceae* L.), має значну сировинну базу на території України: росте переважно на лісових галявинах, луках біля річок, на добре освітлюваних ділянках. Існують численні сорти вероніки довголистої, зокрема таксон цього виду «Blaubart» широко вирощують як декоративну рослину [8].

Метою нашої роботи стало вивчення антибактеріальної активності комплексів з трави вероніки довголистої «Blaubart».

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Об'єкти дослідження – комплекси біологічно активних речовин (БАР), отримані з повітряно-сухої трави вероніки довголистої «Blaubart», заготовленої у фазу цвітіння влітку 2014 р. методом багаторазової вичерпної циркуляційної екстракції в апараті Соклета шляхом послідовної обробки сировини розчинниками – хлороформом та етилацетатом до повного виснаження сировини. В результаті отримали два комплекси, що містять ліпофільні речовини і фенольні речовини.

Маса сухого ліпофільного комплексу (ЛК), отриманого хлороформом, складала 2,07 г, вихід – 4,88 %. Отриманий залишок – темно-зелена в'язка маса з ароматним трав'яним запахом; розчинний у хлороформі, 96° спирті етиловому, гексані. Раніше нами хромато-мас-спектрометричним методом у ЛК були ідентифіковані альдегіди, кетони, карбонові кислоти та терпеноїди; встановлено вміст карбонових кислот, який в ЛК складає 5,6 %, серед них жирні і аліфатичні кислоти – 49,9 % і 40,6 % відповідно, ароматичні кислоти – 9,5 %. Представляють інтерес бензойна, ванілінова, саліцилова, *n*-гідроксibenзойна, цинамова та ферулова кислоти як ефективні фармакологічно активні речовини, що входять до ЛК [2].

© Ковальова А. М., Осьмачко А. П., Кашпур Н. В., Грудько І. В., 2016

Таблиця 1

**АНТИМІКРОБНА АКТИВНІСТЬ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН У ЛК ТА ФК,  
ОТРИМАНИХ З ТРАВИ ВЕРОНІКИ ДОВГОЛИСТОЇ**

Комплекс	Діаметр зон затримки росту мікроорганізмів, мм (M ± m)					
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Candida albicans</i>
ЛК (2 % спирт. р-н)	14,4 ± 0,1	27,2 ± 0,2	31,2 ± 0,3	14,6 ± 0,3	24,5 ± 0,2	12,0 ± 0,1
ФК (2 % спирт. р-н)	14,0 ± 0,1	26,6 ± 0,3	30,6 ± 0,3	12,8 ± 0,2	22,3 ± 0,2	10,0 ± 0,1

В ЛК хроматографічно (ТШХ) досліджували терпеноїди, іридоїди: сорбент «Sorbfil», система розчинників етилацетат – оцтова кислота – мурашина кислота – вода (100:11:11:27), УФ-світло (354 нм), хромогенні реактиви: Шталя, Трим-Хілла та ваніліновий реактив; температурний режим висушування хроматограми – 80 °С. Кількісний вміст хлорофілів та каротиноїдів визначали методом абсорбційної спектрофотометрії на спектрофотометрі СФ-46 при  $\lambda = 640$  та  $\lambda = 440$ , відповідно.

Із шроту трави вероніки після обробки хлороформом отримували комплекс фенольних сполук (ФК), маса якого становила 1,59 г; вихід склав 3,87 %. ФК – субстанція жовто-зеленого кольору з характерним запахом, має смолоподібну консистенцію, розчиняється в етилацетаті та 96° спирті етилового. В ФК хроматографічно досліджували фенольні сполуки: флавоноїди та гідроксикоричні кислоти: «Filtrak» (FN-12); система розчинників етилацетат – мурашина кислота – вода (10 : 2 : 3); хромогенний проявник – 10 % спиртовий розчин КОН та свіжоприготовлений розчин діазованої сульфанілової кислоти. Кількісний вміст флавоноїдів визначали методом диференційної спектрофотометрії, гідроксикоричних кислот – прямої спектрофотометрії на спектрофотометрі Evolution 60 S при  $\lambda = 402$  та  $\lambda = 327$ , відповідно.

Визначення антибактеріальної активності субстанцій, отриманих з трави вероніки довголистої, проводилось на базі Харківського НДІ мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова. Для дослідження антибактеріальної активності використовували 2 % розчини ЛК та ЛФ в 96 % спирті етилового.

Антибактеріальну активність комплексів з трави вероніки довголистої, досліджували *in vitro* методом дифузії в агар (метод «колодязів») [4]. Ступінь чутливості мікроорганізмів оцінювали за розміром зон затримки росту. Мікробне навантаження складало  $10^7$  мікробних клітин на 1 мл середовища і визначалось візуально за оптичним стандартом каламутності McFarland.

Для оцінки активності одержаних комплексів використовували референс-штами мікроорганізмів, регламентовані ВООЗ для визначення антимікробної активності препаратів: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Proteus vulgaris* ATCC 4636, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Candida albicans* 885-663. Для визначення антимікробної дії комплексів культури мікроорганізмів

вирощували на м'ясо-пептонному агарі при  $t = 37$  °С протягом 24 годин. Для кількісної оцінки антимікробної дії ЛК та ФК та визначення мінімальної концентрації пригнічувальної дії на ріст мікроорганізмів використовували метод серійних розведень. Визначення активності антибактеріальних препаратів проводили на двох шарах щільного поживного середовища, розлитого в чашки Петрі. У нижньому шарі використовували «голодні» середовища, що не засівали (агар-агар, вода, солі). Результати досліджень обробляли статистично.

#### РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У результаті хроматографічного дослідження в ЛК виявлено 12 терпеноїдних сполук, з яких 10 є іридоїдами. Хроматографічно ідентифіковано аукубін та каталпол на основі порівняння їх хроматографічної поведінки з достовірними зразками.

Кількісний вміст хлорофілів у ЛК складає  $1,00 \pm 0,03$  %, каротиноїдів –  $0,89 \pm 0,02$  %.

У ФК хроматографічно виявлено 12 фенольних сполук: 4 флавоноїди, 1 гідроксикумарин, 2 фенолкарбонів та 5 гідроксикоричні кислоти, серед них ідентифіковано 7 сполук – рутин, ескулетин, ванілінову, саліцилову, кофейну, хлорогенову та ферулову кислоти.

Кількісний вміст флавоноїдів у перерахунку на цинарозид складає  $4,16 \pm 0,03$  %, гідроксикоричних кислот у перерахунку на хлорогенову кислоту –  $16,29 \pm 0,02$  %.

Діаметри зон затримки росту від 12-30 мм вказують на чутливість мікроорганізмів до комплексів. ЛК проявляє виражену антибактеріальну дію до грамнегативних *E. coli*, *P. aeruginosa*, *P. vulgaris* та помірну антибактеріальну дію по відношенню до грампозитивних *S. aureus* та *B. subtilis*. ЛК проявляє мінімальні бактеріостатичну та бактерицидну дію у дозі вдвічі нижчій, проте є мало активним по відношенню до *C. albicans*. ФК має виражену антибактеріальну дію до грамнегативних *E. coli* та *P. aeruginosa*, достатню активність до *P. vulgaris* та незначну до грампозитивних *S. aureus* та *B. subtilis*, не активний до *C. albicans* (табл. 1.).

Результати визначення ступеня антибактеріальної та протигрибкової активності ЛК та ЛФ з трави вероніки довголистої «Blaubart» наведені в табл. 2 та 3. Препарат порівняння: 2 % спиртовий розчин хлорофіліпту.

Таблиця 2

## СТУПІНЬ АНТИБАКТЕРІАЛЬНОЇ АКТИВНОСТІ ЛК ТА ФК З ТРАВИ ВЕРОНІКИ ДОВГОЛИСТОЇ

Комплекс	*МБстК, мкг/мл					
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Candida albicans</i>
ЛК (2 % спирт. р-н)	250	62,5	31,25	250	125	250
ФК (2 % спирт. р-н)	250	62,5	31,25	250	125	250
2 % спирт. р-н хлорофіліпту	31,25	250	125	125	125	>1000

Примітка: \*МБстК – мінімальна бактеріостатична концентрація.

Таблиця 3

## СТУПІНЬ АНТИБАКТЕРІАЛЬНОЇ АКТИВНОСТІ ЛК ТА ФК З ТРАВИ ВЕРОНІКИ ДОВГОЛИСТОЇ

Комплекс	*МБцК, мкг/мл					
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Candida albicans</i>
ЛК (2 % спирт. р-н)	500	125	62,5	500	250	500
ФК (2 % спирт. р-н)	500	125	62,5	500	250	500
2 % спирт. р-н хлорофіліпту	125	500	250	250	250	>2000

Примітка: \*МБцК – мінімальна бактерицидна концентрація.

Порівнюючи показники МБстК «Хлорофіліпту», ЛК та ФК, було встановлено, що показники МБстК 2 % спиртових розчинів ЛК та ФК вищі в 4 рази для *E. coli*, *P. aeruginosa* та *C. albicans*, ніж показник МБстК «Хлорофіліпту» та еквівалентні для *P. vulgaris*, відповідно.

Порівнюючи показники МБцК «Хлорофіліпту» та ліпофільних комплексів, встановлено, що показники МБцК 2 % спиртових розчинів сухих ліпофільних комплексів у 4 рази вищі для *E. coli*, *P. aeruginosa*, *C. albicans* та еквівалентні для *P. vulgaris* у порівнянні з показниками МБцК «Хлорофіліпту».

Отже, ЛК та ФК трави вероніки довголистої «Vlaubart» є новими субстанціями антимікробної дії. Отримані комплекси можуть бути використані як лікарські субстанції для створення антибактеріальних препаратів у різних лікарських формах, активних переважно щодо грамнегативних мікроорганізмів.

## ВИСНОВКИ

Встановлено якісний склад ЛК та ФК з трави вероніки довголистої «Vlaubart». В отриманих субстанціях виявлені іридоїди, гідроксикумарин, фенолкарбонів та гідроксикоричні кислоти, флавоноїди; в ЛК визначено вміст каротиноїдів та хлорофілів; у ФК визначено вміст флавоноїдів та гідроксикоричних кислот.

Вперше проведено дослідження антибактеріальної активності комплексів трави вероніки довголистої «Vlaubart», отриманих хлороформом та етилацетатом, по відношенню до штамів грамнегативних, грампозитивних мікроорганізмів та до штаму гриба роду *Candida*.

В результаті проведених досліджень встановлено, що ЛК та ФК з трави вероніки довголистої «Vlaubart» проявляють високу антибактеріальну активність по відношенню до грамнегативних *Pseudomonas*

*aeruginosa* та *Escherichia coli* мікроорганізмів, виражену процистоцидну активність по відношенню до *Proteus vulgaris*. По відношенню до *Candida albicans* досліджувані субстанції не активні.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ  
ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ

1. Гусев Н. Ф. Антимікробные свойства сухих экстрактов из сырья видов рода *Veronica* L. / Н. Ф. Гусев, О. Н. Немерешина, А. В. Филиппова, М. В. Сычева // Успехи современного естествознания. – 2012. – № 8. – С. 57-58.
2. Изучение кислот липофильной фракции *Veronica longifolia* L. / А. П. Осьмачко, А. М. Ковалева, О. М. Кошевой, А. Н. Комиссаренко // Сб. матер. XXI Рос. нац. конгр. [«Человек и лекарство»] (7-11 апреля, 2014 г., г. Москва): сб. матер. конгр.: [тез. докл.]. – М.: Изд. Рос. нац. конгр., 2014. – С. 304.
3. Изучение терпеноидных компонентов в составе липофильного комплекса травы *Veronica longifolia* L. / А. П. Осьмачко, А. М. Ковалева // Сб. матер. XXII Рос. нац. конгр. [«Человек и лекарство»] (6-10 апреля, 2015 г., г. Москва): сб. матер. конгр.: [тез. докл.]. – М.: Изд. Рос. нац. конгр., 2015. – С. 243.
4. Калиниченко Н. Ф. Методические рекомендации определения активности антибактериальных средств наружного применения для лечения гнойно-воспалительных инфекций: [метод. рекоменд.] / [Н. Ф. Калиниченко, Ю. Л. Волянский, З. Г. Старобинец и соавт.]. – Х., 1991. – 16 с.
5. Ковязина Н. А. Антимікробная активность лекарственных пленок с экстрактом вероніки дубравной / Н. А. Ковязина, Т. С. Шестакова, Н. С. Тяпугина // Вестник ПГФА. – 2010. – № 6. – С. 88-89.

6. Harput U. S. Radical scavenging effects of different *Veronica* L. species / U. S. Harput, Y. Genc, N. Khan // Records of Natural Product. – 2011. – Vol. 5, № 2 – P. 100-107.
7. Harput U. Anti-inflammatory and cytotoxic activities of five *Veronica* L. species / U. Harput, S. Saracoglu, M. Inoue, Y. Ogihara // Biol. Pharm. Bull. – 2002. – № 25. – P. 483-486.
8. Hawke G. R. Comparative Studies of *Veronica* and *Veronicastrum*. / G. R. Hawke // Plant Evaluation Notes. – 2010. – Issue 33. – 8 p.
9. Jensen S. R. Chlorinated iridoid glucosides from *Veronica longifolia* L. and their antioxidant activity / S. R. Jensen, C. H. Gotfredsen, U. S. Harput, I. Saracoglu // J. of Natural Products (Lloydia). – 2010. – T. 73, № 9. – P. 1593-1596.
10. Stojkovic D. S. Antibacterial activity of *Veronica montana* L. extract and of protocatechuic acid incorporated in a food system / [D. S. Stojkovic, J. Zivkovic, M. Sokovic et al.] // Food Chem. Toxicol. – 2013. – № 55. – P. 209-213.
11. Zivkovic J. *In vivo* and *in vitro* antioxidant effects of three *Veronica* species / J. Zivkovic, T. Cebovic, Z. Maksimovic // Central Eur. J. of Biol. – 2012. – Vol. 7 (3). – P. 559-568.

**УДК 615.281.9:615.451.1:582.916.21:579.84/.86****А. М. Ковалева, А. П. Осьмачко, Н. В. Кашпур, И. В. Грудько****АНТИБАКТЕРИАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ КОМПЛЕКСОВ ИЗ ТРАВЫ ВЕРОНИКИ ДЛИННОЛИСТНОЙ**

Проведено исследование антибактериальной активности двоих комплексов биологически активных веществ из травы вероники длиннолистной «Blaubart» (*Veronica longifolia* «Blaubart»), полученных последовательно хлороформом и этилацетатом, по отношению к грамотрицательным (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*) и грамположительным (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*) микроорганизмам, а также к *Candida albicans*. В комплексах выявлены иридоиды, фенольные соединения; в липофильном комплексе установлено количественное содержание каротиноидов и хлорофиллов; в фенольном комплексе установлено количественное содержание флавоноидов и гидроксикоричных кислот. Установлена высокая антибактериальная активность комплексов по отношению к Грам(-) и умеренную к Грам(+) бактериям, минимальное бактериостатическое и бактерицидное действие в дозе вдвое ниже, чем препарат сравнения (2 % раствор «Хлорофиллипта»).

**Ключевые слова:** Вероника длиннолистная; антибактериальная активность; комплексы биологически активных веществ; грамотрицательные микроорганизмы

**UDC 615.281.9:615.451.1:582.916.21:579.84/.86****A. M. Kovaleva, A. P. Osmachko, N. V. Kashpur, I. V. Grudko****THE ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF COMPLEXES OF VERONICA LONGIFOLIA HERB**

The screening of antibacterial activity of two complexes of biologically active substances from *Veronica longifolia* "Blaubart" herb, obtained successively by means of chloroform and ethyl acetate were conducted respect to gram-negative (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*) and gram-positive (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*) microorganisms, and as well as to *Candida albicans*. In obtained complexes iridoids, phenolic compounds had been identified, and carotenoids and chlorophylls had been quantified in lipophilic complex, in phenolic complex – flavonoids and hydrocinnamic acids had been quantified. Complexes have shown potent antibacterial activity against Gram- and moderate activity against Gram+ bacteria, and complexes have shown minimal bacteriostatic and bactericidal effect at a dose twice lower than the comparison remedy (2 % solution of Chlorophylliptum).

**Key words:** *Veronica longifolia*; antibacterial activity; complexes of biologically active substances; gram-negative microorganisms

Адреса для листування:

E-mail: osmachkoalina5@gmail.com.

Тел. +38-066-071-91-53, +38-097-497-397-5.

Осьмачко А. П.

Надійшла до редакції 26.11.2015 р.