Primula veris L. kivonatok fitokémiai és antimikróbás hatásának vizsgálata

Varga Erzsébet¹, Lieb Dorottya¹, Maráz Anna²

¹Marosvásárhelyi George Emil Palade Orvosi, Gyógyszerészeti, Tudomány és Technológiai Egyetem, Farmakognózia és Fitoterápia tanszék,

²Szent István Egyetem, Élelmiszertudományi Kar, Mikrobiológia és Biotechnológia tanszék

AUTHOR AFFILIATION

¹George Emil Palade University of Medicine, Pharmacy, Science and Technology of Tîrgu Mureş, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmacognosy and phytotherapy,
²Szent István University, Faculty of Food Science, Department of Microbiology and Biotechnology

CORRESPONDING AUTHOR

Varga Erzsébet

Marosvásárhelyi George Emil Palade Orvosi, Gyógyszerészeti, Tudomány és Technológiai Egyetem, Farmakognóziai Tanszék,
Postai cím (magyarul): Marosvásárhely, Gheorghe Marinsecu 38
Email: verzsebet@yahoo.com

Investigation of the phytochemical and antimicrobial activity of *Primula veris* L. extracts

ABSTRACT

Methanol, ethanol (50%) and aqueous extracts were prepared from the roots, leaves and flowers of *Primula veris* collected and dried under natural conditions in meadows near Marosludas in April 2018. The polyphenol contents of the plant parts, as well as the antioxidant capacity were measured by ABTS spectrophotometric methods. For the microbiology section, aqueous and ethanolic extracts (100 mg/ml) were prepared from the roots, leaves and flowers of *Primula veris* followed by testing of their antimicrobial activity against human pathogenic yeasts (*Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*) and bacteria (Gram negatives; *Escherichia coli*, *Acinetobacter* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*; Gram-positive: *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*) by agar well diffusion method.

Ethanol proved to be the most effective solvent for all three drugs to determine the polyphenol content. The flower drug contains the highest amounts of polyphenols. With the ABTS method of antioxidant measurement, ethanolic extracts are more effective than aqueous extracts.

Agar well diffusion studies showed that all extracts caused complete inhibition within the inhibition zone in the yeasts tested. The inhibitory effect of aqueous extracts was stronger than that of ethanolic extracts in the case of all three plant parts. The greatest inhibition was caused by extracts of the roots with ethanol. The three yeasts tested showed similarly high sensitivity to roots extracts, while the inhibitory effect was weaker for leaf extracts. *Candida parapsilosis* was resistant to leaf and flower extracts. *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus*, like fungi, showed good sensitivity to extracts, while other bacteria showed little or no inhibitory effect.

Keywords: *Primula* sp. polyphenol, antioxidant, antimicrobial effect

KIVONAT

Marosludashoz közeli réteken, 2018 áprilisában gyűjtött és természetes körülmények között szárított tavaszi kankalin gyöktörzséből, leveléből és virágából metanolos, etanolos (50%) és vizes kivonatokat készítettünk. A növényi részek polifenol tartalmát, valamint az antioxidáns kapacitás (ABTS) mérését végeztük spektrofotometriás módszerekkel. A mikrobiológiai részhez a tavaszi kankalin gyöktörzséből, leveléből és virágából vizes és etanolos kivonatokat készítettünk (100 mg/ml), majd humánpatogén élesztőgombák-

DOI: 10.2478/orvtudert-2020-0013

kal (*Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*) és baktériumokkal (Gram-negatívok: *Escherichia coli*, *Acinetobacter* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*; Gram-pozitívok: *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*) szembeni antimikrobás hatását vizsgáltuk agarlyuk-diffúziós módszerrel. A polifenol tartalom meghatározására a leghatékonyabb kivonószerek az etanol bizonyult mindhárom drog esetében. A legnagyobb mennyiségben a virágdrog tartalmaz polifenolokat. Az antioxidáns mérés ABTS módszerével az etanolos kivonatok hatásosabbak, mint a vizes kivonatok. Az agarlyuk-diffúziós vizsgálatok eredményei szerint valamennyi kivonat teljes gátlást okozott a gátlózónán belül a vizsgált élesztőgombáknál. A növényi részekből készült

vizes kivonatok erősebb gátló hatást mutattak az etanolos kivonatokéhoz képest. Az etanolos extraktumok közül a legnagyobb gátlást a gyöktörzs mutatta. A három vizsgált élesztőgomba a gyöktörzs kivonatokkal szemben hasonlóan nagyfokú érzékenységet mutatott, míg a levélkivonatok esetében a gátló hatás gyengébb volt, a *Candida parapsilosis* pedig ellenálló volt a levél és virág kivonatokkal szemben. A *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* és a *Staphylococcus aureus* a gombákhoz hasonlóan jó érzékenységet mutatott a kivonatokkal szemben, míg a többi baktérium esetében gyenge vagy semmilyen gátló hatás nem volt kimutatható.

Kulcsszavak: *Primula* sp., polifenol, antioxidáns, antimikrobás hatás

Bevezető

A *Primula veris* L. (tavaszi kankalin) a Primulaceae családhoz tartozó, jól ismert gyógynövény. Élő, lágyszárú, kora tavasszal (március végétől májusig) virágzó Eurázsiai növény. Hazánkban a két legelterjedtebb faj a *Primula veris* L. és a *Primula elatior* (L.) Hill, melyek a „*Primulae rhizoma cum radicibus*” monográfiában szerepelnek a Román Gyógyszerkönyvben (X. kiadás). A növény minden része, főleg a droként alkalmazott gyökeres gyöktörzse szaponinban gazdag, a föld feletti részei, virága és levele polifenolos vegyületekben, flavonoidokban bővelkedik [1,2,3,4]. A múltban a *Primula* leveleit és virágait nyersen vagy főzve is fogyasztották vitamin- és mikroelem forrásként. A népgyógyászatban a *Primula veris* gyöktörzsét és földfeletti részét megfázással társuló köhögésben, számarköhögésben és asztmában használják. Az EMA (European Medicine Agency) is beszámol a *P. radix* és a *P. flos* drogok légúti megbetegedések esetén bizonyított jótékony hatásairól. Nyúlacon végzett kísérletekkel bizonyították a hörgőkben felhalmozott váladék eltávolítását elősegítő hatását, mely hatás egyes esetekben egyenértékű volt a bromhexin és az acetilcisztein nyákoldó hatásaival. Szintén az EMA szerint a *Primulae flos* nyugtató, fájdalomcsillapító, izzasztó, diuretikus, reuma és köszvény ellenes hatással is rendelkezik [5,6]. Jelen kísérletes munkánk során célul tűztük ki a *Primula veris* L. gyöktörzséből, leveléből, virágából nyert kivonatok hatóanyag tartalmának mennyiségi meghatározását, melynek során az összpolicenol tartalmat vizsgáltuk, valamint az „*in vitro*” antioxidáns kapacitást határoztuk meg ABTS módszerrel. További célunk volt a növényi részekből nyert kivonatok antimikrobás hatásának vizsgálata három fakultatív patogén élesztőgomba, négy Gram-negatív és három Gram-pozitív baktérium

törzssel szemben Kísérleteinkhez a Marosludashoz közeli réteken, 2018 áprilisában gyűjtött és természetes körülmények között szárított tavaszi kankalin gyöktörzsét, levelét és virágát használtuk.

Anyag és módszer

A *Primula veris* L. (tavaszi kankalin) gyöktörzsének, levelének és virágának metanolos és 50%-os etanolos kivonatainak fitokémiai összetételét, a vizes és az 50%-os etanolos kivonatok szabadgyökfogó képességeit és antimikrobás hatásait vizsgáltuk. A tavaszi kankalin begyűjtését 2018. április közepén, virágzáskor végeztük, Maros megyében. Szárításuk természetes körülmények között, naptól védve valósult meg.

Felhasznált növényi kivonatok

A *P. veris* megszáritott növényi részeit (gyöktörzs, levél, virág) porítottuk, melyekből rendre 5 g mennyiséget analitikai mérlegen mértünk ki és a növényi részekhez 50 mL oldószert, (desztillált vizet vagy metanolt vagy 50 %-os vizes etanolos oldatot) adtunk. A fitokémiai vizsgálatokhoz az extraktumokat 30 percig extraháltuk 30°C-on ultrahangos vízfürdőben, majd szűrőpapíron szűrtük. Az antimikrobás vizsgálatra szánt kivonatok extrahálását 60 °C-n végeztük 3 órán át, majd a kivonatok centrifugálással ülepítettük (20 perc, 4000 rpm), a felülúszót pipetta segítségével leszívtuk és 0,45 µm pórusméretű membránszűrőn szűrtük. Az elkészített növényi kivonatok felhasználásig hűtőszekrényben (4°C-on) tároltuk.

Fitokémiai vizsgálatok

Reagensok és műszerek

A használt reagensok: metanol (VWR Chemicals, US),

etanol (Chemical Company, Romania), desztillált víz, Folin-Ciocalteu reagens (Scharlau, Spain), nátrium karbonát (Lach-ner, Czech Republic), galluszsav (Sigma), ABTS szabadgyök (2, 2'-azino-bisz- (3-etil-benzotiazolin-6-szulfonsav) diammónium só) (Sigma), kálium-perszulfát (Sigma). Spektrofotometriás mérésekhez alkalmazott műszer Specord 210 (Analytic Jena) UV/VIS spektrofotométer:

Összpolifenol tartalom meghatározása Folin-Ciocalteu reagenssel

Az összpolifenol koncentrációkat a kivonatokból a Folin-Ciocalteu reagenssel határoztuk meg, Waterhouse publikációja alapján [7]. Ez egy gyakran alkalmazott kolorimetriás módszer az összpolifenol tartalom meghatározására, amely megmutatja a fenolos hidroxilcsoportok teljes mennyiségét a növényi kivonatban. A növényi extraktumban lévő polifenolok a Folin-Ciocalteu reagenssel (nátrium 1,2-naftokinon-4-szulfonát) reagálva kék komplexet képeznek, amelyet spektrofotometriás módszerrel határoztunk meg. A karbonát-puffer alkalmazása lúgos pH-érték elérését teszi lehetővé, amely növeli a reakció sebességét, vagyis a kék komplex képződését. A karbonát-puffer szerepét a 20%-os nátrium karbonát oldat tölti be.

A kivonatokból 40 µL mennyiséget pipettáztunk egy kémcsőbe, majd minden mintához 3160 µL vizet, 200 µL Folin-Ciocalteu reagenst adtunk és homogenizáltuk. 8 perc után minden kémcsőbe 600 µL nátrium karbonát oldatot mértünk, majd összeráztuk. Az így nyert mintákat 2 óráig szobahőmérsékleten (20 °C) tartottuk, majd leolvastuk az abszorbanciájukat a vak mintával szemben 765 nm hullámhosszon. A vak minta tartalmazta az összes reagenst, kivéve a növényi kivonatot, amelynek térfogatát a megfelelő oldószerrel (metanol vagy 50%-os etanolos oldat) helyettesítettük. Méréseink során három párhuzamost használtunk.

A összpolifenol koncentráció kiszámításánál használt kalibrációs görbe megszerkesztéséhez referencia oldatként galluszsavat alkalmaztunk. A referencia oldat előállításához egy 100 mL-es mérőlombikban 0,5 g száraz galluszsavat 10 mL etanolban oldottunk, majd desztillált vízzel 10-szeresre hígítottuk. Így az oldat koncentrációja 5 mg/ml lett, amelyből hígítási sort készítettünk. A galluszsav törzsoldatból desztillált vízzel 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 mg/L koncentrációjú hígítási sort készítettünk, amelyekből 40 µL oldatot használtunk a kalibrációs görbe elkészítéséhez. A hígítási sor minden tagjának abszorbancia értékét a koncentráció függ-

vényében ábrázoltuk. Az így kapott kalibrációs egyenes egyenletének segítségével kiszámoltuk a kivonatok összpolifenol tartalmát, melyet 100 g növényi szárazanyagban lévő mg galluszsav ekvivalensben (GAE) fejeztünk ki.

In vitro antioxidáns kapacitás vizsgálata ABTS módszerrel

Az ABTS módszerrel történő antioxidáns kapacitás vizsgálatot a P. veris vizes és 50%-os etanolos kivonataiból vizsgáltuk, amelyet Re és munkatársai munkája alapján végeztünk [8], kisebb változtatással. Az ABTS (3-etil-benzotiazolin-6-szulfonsav) kálium-perszulfáttal történő oxidációja révén 2, 2'-azino-bisz- (3-etil-benzotiazolin-6-szulfonsav) (ABTS•+) szabadgyökök képződnek, amelynek koncentrációja a H+ donorként viselkedő antioxidáns vegyületek hatására csökken.

Első lépésben a 16,5 mg/25 ml kálium-perszulfát oldatot állítottuk elő, majd egy 10 mg-os ABTS tablettát feloldottunk 2,6 mL kálium-perszulfát oldatban. Így kaptuk meg az ABTS törzsoldatot, melyet metanollal hígítottunk úgy, hogy abszorbanciája 734 nm hullámhosszon 0,80 – 0,90 ± 0,05 között legyen, metanollal szemben leolvastva az értékeket. Az így kapott 80X-os hígítású törzsoldat 2,6 ml-éhez a kivonatokból 25, 30, 35, 40 és 50 µL-t pipettáztunk, majd mindegyiket metanollal 2650 µL-re egészítettük ki. A méréseket 6 perc állás után végeztük. Egy adott koncentrációjú minta gátlási százalékát az alábbi egyenlet segítségével számoltuk ki:

$$\text{Gátlási \%} = (A_0 - A_t / A_0) \cdot 100,$$

ahol A_0 = ABTS oldat abszorbanciája 0 időpontban,

A_t = a mintát tartalmazó ABTS oldat abszorbancia értéke a 6. perc végén

A gátlást grafikusan határoztuk meg úgy, hogy a minták gátlási %-át a kivonat koncentrációjának függvényében ábrázoltuk.

Mikrobiológiai vizsgálatok

A *Primula veris* L. gyöktörzséből, leveléből és virágából nyert kivonatok antimikrobás hatását az **1. táblázatban** bemutatott opportunistáknak, valamint Gram-negatív és Gram-pozitív baktérium törzseken vizsgáltuk agardiffúziós módszerrel.

A baktérium izolátumok fentartása PGY ferde agaron, míg a gombatörzseké YEPD ferde agaron, 4°C-on történt. Táptalajok

Agar-lyuk diffúziós módszerhez használt táptalajok: PGY agar (pepton 0,5%, glükóz 0,1%, élesztő kivonat (YE) 0,25%, agar 1,5%) és YEPD agar (pepton 0,5%, élesztőki-

1. táblázat. Vizsgálatokhoz felhasznált törzsek

Mikroorganizmus törzsek	Eredet
ÉLESZTŐGOMBÁK	
Candida albicans MVH 1	Marosvásárhelyi Megyei Kórház
Candida parapsilosis MVH 1	
Candida glabrata MVH 1	
BAKTÉRIUMOK	
Gram-pozitív	
Listeria monocytogenes CCM 4699	Czech Collection of Microorganisms
Staphylococcus aureus NCAIM B 2174	National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms
Enterococcus faecalis NCAIM B 1312	
Gram-negatív	
Escherichia coli ATCC 8739	American Type Culture Collection
Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027	
Acinetobacter sp. DSM 14960	German Collection of Microorganisms and Cell Cultures
Enterobacter cloacae DMB T1	Szent István University, Department of Microbiology and Biotechnology

vonat (YE) 0,5%, glükóz 1%, agar 1,5%).

Oldatok és tiszta hatóanyagok

Hígító folyadék: pepton 0,01%; NaCl 0,085%.

Chloramphenicol antibiotikum oldat: Kontrollként szolgált a Gram-pozitív és Gram-negatív baktériumtörzseknel és ezen célból 100 µg/mL koncentrációjú antibiotikum oldatot állítottunk elő.

Szaponin oldat: 10 mg szaponint (Saponin weiß rein, Merck) feloldottunk 10 mL steril desztillált vízben, így a kapott szaponin oldat koncentrációja 1 mg/mL lett. Hűtőszekrényben tároltuk 4°C-on.

Urzolsav: Az urzolsavat (ROTICHRONR HPLC) etanolban oldottuk (0,1 mg/ml), majd vízzel hígítottuk úgy hogy a végső koncentráció 0,1 mg/mL. Az oldat tárolása hűtőszekrényben történt 4°C-on.

Tenyésztési körülmények

Antimikrobás hatás vizsgálata agar-diffúziós módszerrel

A vizsgálandó mikroorganizmust a megszilárdult tápagar (PGY és YEPD) lemez felületére szélesztettük és a lemezbe steril lyukfúróval vágott lyukakba a vizsgálandó mintát bemértük. Miután a minta hűtőszekrényben bediffundált a beoltott táptalajba, az adott mikroorganizmusoknak megfelelő hőmérsékleten 48 órán keresztül inkubáltuk. A lyukak körül kialakult gátlási zónák átmérőjéből következtethetünk a vizsgált minta gátló hatásának erősségére.

Az etanolos kivonatokat 10X-re hígítottuk, így 10 mg/mL szárazanyagtartalmú, 5 %-os etanolos extraktumokat

nyertünk. A hígításhoz steril desztillált vizet használtunk. A vizes kivonatokat nem hígítottuk, az eredeti koncentrációban dolgoztunk velük.

9 cm átmérőjű Petri-csészében 20 mL tápközzel lemezt öntöttünk. A megszilárdult PGY lemezek felületén 1 mL 109 sejt/mL baktérium, a YEPD lemezekeken pedig 1 mL 108 sejt/mL gomba sejtuszpenziókat szélesztettünk. A felesleget pipettával leszívtuk és a felületet steril fülke alatt leszárítottuk. A tápközzegbe 8 mm átmérőjű lyukakat fúrtunk, amelyekbe 100 µL mintákat pipettáztunk. Kontrollként 100 µg/mL koncentrációjú chloramphenicol oldatot és 5%-os etanolt alkalmaztunk. A Petri-csészéket egy éjszakára hűtőszekrénybe (4°C) tettük, hogy a lyukakból a minták bediffundáljanak a táptalajba. Ezt követően a Petri-csészéket 48 órán keresztül 30 °C-on inkubáltuk. A lyukak körül kialakult gátlási zónák szélességét lemértük, amiből az anyag gátló hatásának erősségére következtettünk.

Eredmények

Összpolifenol tartalom meghatározása

A *P. veris* szárított növényi részeitől (gyöktörzs, levél, virág) készített kivonatok összpolifenol tartalmát az anyag és módszernél leírtakkal határoztuk meg.

A kalibrációs görbe elkészítése során a mért abszorbancia értékeket a galluszsav koncentráció függvényében ábrázoltuk. A kapott egyenes egyenlete

1. ábra. Összpolifenol meghatározáshoz használt kalibrációs görbe

2. táblázat. Primula kivonatok összpolifenol tartalma

KIVONATOK	Összpolifenol tartalom mg GAE/100 g	
	Metanol	50%-os etanol
Primulae flos	420,26±13,47	481,57±31,41
Primulae folium	243,42±17,12	339,47±30,98
Primulae radix	236,57±11,98	256,05±27,45

($y=0,0019x+0,0455$, $r^2=0,9958$) (1. ábra). Az egyenes egyenlete segítségével kiszámítottuk az összpolifenol koncentrációt, amit mg galluszsav ekvivalens (GAE)/100 g növényi szárazanyag tartalomra számítottunk át.

A kapott összpolifenol koncentrációkat a 2. táblázatban foglaltuk össze.

A galluszsavban kifejezett összpolifenol tartalom a virágdrog 50%-os etanolos oldatában volt a legnagyobb. A levél- és a gyökérdrogok esetében szintén az etanolos kivonatok bővelkedtek nagyobb polifenol tartalommal a metanolos kivonatokhoz képest. A legkisebb polifenol tartalmat a gyökértörzs kivonataiban mértünk. A polifenolok kivonására használt oldószerek közül (metanol és 50%-os etanol) mindhárom növényi drog esetében az etanol bizonyult hatékonyabbnak.

Az antioxidáns kapacitás vizsgálatának eredményei

A *P. veris* szárított növényi részeiből (gyökértörzs, levél, virág) készített kivonatok *in vitro* antioxidáns kapacitását ABTS (3-etilbenzotiazolin-6-szulfonsav) módszerrel határoztuk meg az anyag és módszernél leírtak szerint. A mért abszorbancia értékek segítségével kiszámoltuk az %-os gátlást a megadott képlet alapján, majd a kapott értékeket ábrázoltuk a kivonatok koncentrációinak függvényében ($\mu\text{L/mL}$). Az így kapott egyenesek egyenleteit felhasználva kiszámoltuk az 50%-os gátlási (IC_{50} , inhibition concent-

ration) értékeket ($\mu\text{L/mL}$), mind a vizes kivonatok, mind pedig az etanolos kivonatok esetében. A kapott eredményeket a 3. táblázatban összegeztük.

A kapott IC_{50} eredmények alapján mindhárom növényi rész etanolos kivonatainak antioxidáns kapacitása nagyobb volt, mint a vizes kivonatoké. Ennek alapján elmondható, hogy a *P. veris*-ből nyert etanolos kivonatok kitűnő szabadgyökfogó tulajdonsággal bírnak. A legjobb antioxidáns kapacitása a gyökérdrog etanolos kivonatának volt, amelyet a virágdrog etanolos kivonata követett, míg leggyengébb szabadgyökfogó hatással a levéldrog illetve virágdrog vizes kivonata rendelkezett.

A Primula kivonatok antimikrobás hatása

A *Primula veris* gyökértörzs, virág és levél drogok 100 mg/mL-es vizes, valamint 10 mg/mL koncentrációjú 50%-os etanolos kivonatainak antimikrobás hatását vizsgáltuk agarlyuk diffúziós módszerrel, fakultatív humánpatogén mikroorganizmusok bevonásával. A teszt mikroorganizmusok között három élesztőgomba faj, négy Gram-negatív baktérium és a három Gram-pozitív baktérium egy-egy törzsét vizsgáltuk.

A *Primula veris* L. extraktumok hatása a vizsgált *Candida* fajokkal szemben

A 2., 3. ábrákon és 4. táblázatban bemutatott eredmények szerint mindhárom vizsgált *Candida* törzs (*C. albicans* MVH 1, *C. parapsilosis* MVH 1, *C. glabrata* MVH 1) esetében a 24 órás, 30°C-on történő inkubálást követően teljes és részleges gátlási zónák alakultak ki a különböző extraktumok hatására. A megjelent gátlási zónák mérete további 24 óra inkubálás során nem változott.

Mindhárom élesztőfaj esetében megfigyelhető volt, hogy a vizes kivonatok hatására kialakult gátlási zónák átmérője nagyobb, így a gátló hatása erősebb volt az etanolos kivonatokhoz képest. Ez a 10-szer töményebb kivonattartalommal is összefüggésben lehetett, mivel a vizes mintákat az eredeti koncentrációban alkalmaztuk,

3. táblázat. Primula kivonatok ABTS antioxidáns kapacitása

Növényi rész	Kivonat	IC_{50} ($\mu\text{L/mL}$)
Primulae flos	50%-os etanolos	36,0
	vizes	75,4
Primulae folium	50%-os etanolos	47,6
	vizes	59,3
Primulae radix	50%-os etanolos	17,2
	vizes	60,0

2. ábra. *Candida albicans*-ra gyakorolt etanolos (bal oldal) és vizes (jobb oldal) kivonatok, kontroll oldatok és tiszta hatóanyagok gátlási zónái 48 h inkubálás után

3. ábra. *Candida glabrata*-ra gyakorolt etanolos (bal oldal) és vizes (jobb oldal) kivonatok, kontroll oldatok és tiszta hatóanyagok gátlási zónái 48 h inkubálás után

míg az etanolos kivonatokat 10X-re hígítottuk az etanol koncentráció csökkentése céljából. A legnagyobb gátlási zónák a gyöktörzs extraktumok hatására alakultak ki. Az etanolos kivonatok számára kontrollként alkalmazott 5%-os etanol nem befolyásolta a gombák szaporodását, így elmondhatjuk, hogy az alkoholos kivonatok gátló hatása teljes mértékben a növényi hatóanyagoknak tulajdonítható, és nem az oldószernek.

A gyöktörzs etanolos és vizes kivonatai egyaránt teljes gátlást gyakoroltak a vizsgált gombákra, melyek közül a *C. albicans* volt a legkevésbé érzékeny, míg a legérzékenyebbnek a *C. glabrata* bizonyult. A *C. parapsilosis* érzéketlen volt a levél és virág kivonatokkal szemben, csak a gyöktörzs kivonatai hatottak a szaporodására. A levél és virág kivonatok csak részlegesen gátolták a *C. albicans* és *C. glabrata* szaporodását. A levél vizes kivonata mindkét említett élesztőt gátolta, míg az etanolos kivonatnak csak a *C. glabrata*-ra volt hatása. A virág vizes kivonata a *C. albicans* szaporodására csak csekély gátlást gyakorolt.

A tiszta hatóanyagként alkalmazott szaponin 1 mg/mL, míg az urzolsav 0,1 mg/mL koncentrációban részleges gátló hatást mutatott *C. albicans* esetén. A *C. glabrata*-nál csak az 1 mg/mL koncentrációjú szaponin okozott részleges gátlást.

A *Primula veris* L. drog extraktumok antibakteriális hatása

A *Primula veris* L. drog extraktumok hatása Gram-negatív baktériumokkal szemben

A *Primula* drog extraktumok hatását a következő négy Gram-negatív baktérium törzsszel szemben vizsgáltuk: *Escherichia coli* ATCC 8739, *Enterobacter cloacae* DMB T1, *Acinetobacter* sp. DSM 14960, és *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.

A 5. táblázatban bemutatott eredményeink szerint a gyöktörzs, a virág és a levél kivonatok gátló hatást fejtettek ki a *Pseudomonas aeruginosa*-ra. A vizes kivonatoknak egy kivétellel (levél kivonat) erősebb gátló hatásuk

4. táblázat. *Primula veris* L. drog kivonatok antimikotikus hatása *Candida* törzsekkel szemben, agarlyuk-diffúziós módszerrel vizsgálva. A számok a gátlási zónák szélességét mutatják mm-ben, míg „T” - teljes gátlást, „R” - részleges gátlást, „-” - nincs hatást jelöli

Törzsek	Kivonatok / Hatóanyagok							
	Primulae radix		Primulae folium		Primulae flos		Urzolsav	Szaponin
	vizes	etanolos	vizes	etanolos	vizes	etanolos	etanolosEtOH	vizes
<i>Candida albicans</i> MVH	8	6,25	1	-	1,5	-	1	1,25
	T	T	R	-	R	-	R	R
<i>Candida parapsilosis</i> MVH	9,5	7,75	-	-	-	-	-	-
	T	T	-	-	-	-	-	-
<i>Candida glabrata</i> MVH	9,5	8,75	1,5	1,75	-	-	-	1,5
	T	T	R	R	-	-	-	R

5. táblázat. *Primula veris* L. kivonatok antimikrobás hatása a vizsgált baktériumokkal szemben, agarlyuk-diffúziós módszerrel vizsgálva. A számok a gátlási zónák szélességét mutatják mm-ben, míg „T” - teljes gátlást, „R” - részleges gátlást, „-” - nincs hatást jelöli

Törzsek	Kivonatok / Hatóanyagok									
	Primulae radix		Primulae folium		Primulae flos		Urzolsav	Szaponin	Chloramphenicol	5% etanol
	vizes	etanolos	vizes	etanolos	vizes	etanolos	etanolosEtOH	vizes	vizes	vizes
<i>Enterobacter cloacae</i> DMB T1	0	0	0	0	0	0	0	0	2,5T 11R	0
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	0	0	0	0	0	0	0	0	3,5 R	0
<i>Acinetobacter</i> sp. DSM 14960	0	0	0	0	1,5 T	0	0	0	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	6,25 R	3,75 T	1,5 R	7 R	2 R	1 R	1 R	1,25 R	0	0
<i>Listeria monocytogenes</i> CCM 4699 (C1)	3,25 R		0	4 R	2 R	0	0	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i> NCAIM B 2174	4 R	3,25 T	0	5,5 R	0	1,75 R	0	0	2,25 T	0
<i>Enterococcus faecalis</i> NCAIM B 1312	5,5 R	3,5 R	0	4,75 R	1,75 R	0	0	0	9,5 R	0

volt, mint az etanolos kivonatoknak, amihez valószínűleg hozzájárult az is, hogy a vizes kivonatok koncentrációja 10-szerese volt az etanolosoknak. A *P. aeruginosa* szaporodását a virág és a levél extraktumok részlegesen gátolták a gyöktörzs etanolos kivonata kivételével, ami teljes gátlást okozott. A tiszta hatóanyagok (primula és urzolsav) ugyancsak részleges gátlást okoztak ennél a baktériumnál. A kontrollként alkalmazott 5%-os etanol nem gátolta a baktériumok szaporodását, így következtethető, hogy az etanolos kivonatok antimikrobás hatása független volt a kivonószerként alkalmazott etanoltól.

Az *E. coli* és az *Enterobacter cloacae* nem volt érzékeny a *P. veris* egyik kivonatra sem. Az *Acinetobacter* sp. szaporodását a virág vizes kivonata kismértékben gátolta, teljes feltisztulási zónát eredményezve.

A *Primula veris* L. drog extraktumok hatása Gram-pozitív baktériumokkal szemben

A *Primula* kivonatok antibakteriális hatását a következő Gram-pozitív baktérium törzsekkel szemben vizsgáltuk: *Enterococcus faecalis* NCAIM B 1312, *Listeria monocytogenes* CCM 4699 és *Staphylococcus aureus* NCAIM B

2174 törzssel szemben vizsgáltuk.

A kivonatok többnyire részleges gátló hatást gyakoroltak a vizsgált kórokozókkal szemben, amit az **4. ábra** és az **5. táblázat** eredményei mutatnak. Egy esetben, a gyöktörzs etanolos kivonatanál jelentkezett teljes gátlás a *Staphylococcus aureus* esetében, míg a gyöktörzs vizes kivonata, a levél és a virág etanolos kivonatai csak részleges gátlást okoztak.

4. ábra. *Staphylococcus aureus*-ra gyakorolt etanolos (bal oldal) és vizes (jobb oldal) kivonatok, kontroll oldatok és tiszta hatóanyagok gátlási zónái 48 h inkubálás után (minták elhelyezése mint a 3.ábrán)

Legerősebb gátló hatást a gyöktörzs kivonatok fejtettek ki, ebben az esetben a 10-szeresre hígított etanolos kivonatoknál közel azonos méretű gátló zóna alakult ki, mint a vizes kivonatok esetében, a levél kivonatok közül pedig csak az etanolos eredményezett gátlást valamennyi vizsgált törzsnél. A virág kivonatok esetében változó volt a vizes és etanolos kivonatok hatása.

Az 5%-os etanol kontroll a Gram-pozitív kórokozók esetében sem mutatott gátlást, tehát nem befolyásolta a kivonatok antimikrobás hatását.

Megbeszélés és következtetés

A *Primula veris* drogok polifenoljai esetében az etanol bizonyult a leghatékonyabb kivonószernek mindhárom drog esetében. A kapott eredmények alapján legnagyobb mennyiségben a virágdrog etanolos kivonata tartalmaz polifenolokat (481,57 mg GAE/100 g), hasonlóan a szakirodalmi adatokhoz, melyek szintén a virágban lévő kiemelkedő polifenol tartalmat bizonyítják [3,9,10]. A virág polifenol tartalmát (481,57 mg GAE/100 g) a levéldrog etanolos kivonata követi (339,47 mg GAE/100 g) koncentrációval, míg a gyökér etanolos kivonata tartalmazza a legkevesebb hatóanyagot 256,05 mg/100 g.

Az „*in vitro*” ABTS antioxidáns kapacitás vizsgálat eredményei szerint az etanolos kivonatok bizonyultak jobbnak a vizes kivonatokhoz képest. A legjobb szabadgyökfogó képességgel a gyökér 50 %-os etanolos kivonatai rendelkeznek, ellentétben a szakirodalmi adatokkal, ahol a virágdrog antioxidáns hatása kiemelkedő [3,9].

A mikrobiológiai vizsgálatok eredményei alapján bebizonyosodott a *P. veris* drogokból nyert vizes és etanolos kivonatok antimikotikus és antibakteriális hatása, ami korábbi kutatások szerint a növényi részekben nagy mennyiségben fellelhető triterpén-szaponin és flavonoid komponenseknek tulajdonítható [11].

Az agar-diffúziós vizsgálat eredményei alapján a gyöktörzs, virág és levél kivonatok gátló hatát fejtettek ki a *Candida* nemzetség mindhárom vizsgált fajával szemben (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*). A vizes kivonatok 100 mg/mL koncentrációban erősebb gátló hatást mutattak, mint az etanolosok, amihez hozzájárult az is, hogy 10-szer töményebbek voltak az etanolos kivonatokhoz képest. A nagyfokú hígítás ellenére az etanolos kivonatok gátlási zónái hasonlóak voltak a vizes extraktu-

mokéhoz, ami a hatóanyagok jobb vízdoldhatóságára utal. Korábbi kutatások szerint a *Primula* fajokból kivont szaponinok már 80-97 µg/mL koncentrációban gátló hatást fejtenek ki a *C. albicans* szaporodására. A gyöktörzs vizes kivonata 10 mg/mL koncentrációban okozta a legerősebb gátlást a *C. glabrata* törzssel szemben, az etanolos kivonatoknak már 1,25 mg/mL koncentrációban is kiváló antimikotikus hatásuk jelentkezett [12,13].

Az agarlyuk-diffúziós vizsgálatok eredményei szerint a vizsgált Gram-negatív baktériumok közül a gyöktörzs kivonatok a *P. aeruginosa* szaporodását teljes feltisztulási zóna kialakításával gátolták. Jaderian és munkatársai által végzett agar-diffúziós vizsgálatok alapján, a *P. aeruginosa* szaporodására a *Primula* fajok levelének és virágának vizes kivonata csak 120 mg/mL koncentrációtól fejt ki gátló hatást [9], a mi eredményeink alapján a 100 mg/mL koncentrációjú vizes és a 10 mg/mL koncentrációjú etanolos kivonatok részleges gátlást mutattak. Az agarlyuk-diffúziós módszerrel történő vizsgálat eredményei alapján az *E. coli* és az *Enterobacter cloacae* szaporodását egyáltalán nem gátolták a *P. veris* kivonatai, az *Acinetobacter sp.* esetében a virág vizes kivonata teljes gátlást okozott.

Az általunk vizsgált Gram-pozitív baktériumok közül az *Enterococcus faecalis* és a *L. monocytogenes* szaporodására a kivonatok csak részleges gátlással hatottak. A szakirodalomban agar-diffúziós módszerrel vizsgált eredmények szerint a *S. aureus* szaporodására a *Primula* fajok levelének és virágának vizes kivonatai 15 mg/mL koncentrációban gátlást fejtenek ki [9], amit eredményeink is megerősítenek, azonban mi magasabb koncentrációjú kivonatok hatását vizsgáltuk csak. Eredményeink szerint a *S. aureus* esetében a gyöktörzs kivonatok teljes vagy részleges gátlást okoztak.

Összefoglalva elmondható, hogy a leghatásosabb antimikrobás növényi résznek a tavaszi kankalin gyöktörzse (*Primulae radix*) bizonyult, úgy a vizsgált élesztőgombákkal, mint a Gram-pozitív és Gram-negatív baktériumokkal szemben. A *P. veris* kivonatok a *Candida* fajokkal szemben mutatták a legjobb gátló hatást, így kedvező terápiás jelentőségük lehet a kandidózis elleni kezelésben más készítményekkel kombinálva, vagy akár új gyógyszerek kifejlesztésében. Ennek aktualitását az is erősíti, hogy az élesztőgombák antimikotikumokkal szembeni rezisztenciája folyamatos nő.

Köszönetnyilvánítás

Köszönetünket fejezzük ki a cikkben felsorolt intézményeknek a rendelkezésünkre bocsájtott mikroorganizmusokért.

Irodalom

- Colombo PS, Flamini G, Rodondi G, et al. Phytochemistry of European *Primula* species. *Phytochemistry*. 2017;143:132-144
- *****Farmacopeea Română. Ediția a X-a. București. Editura Medicală; 1993; 787-789, 1043-1046, 334-335
- Baczek K, Przybyl JL, Mirgos M et al. Phenolics in *Primula veris* L. and *P. elatior* (L.) Hill Raw Materials. *Int. J. Anal. Chem.* 2017; ID 2871579: 7
- Rápóti J, Romványi V. Gyógyító növények. Medicina Könyvkiadó Rt. Budapest. 1999; 184-185
- EMA - Assessment report on *Primula veris* L. and/or *Primula elatior* (L.) Hill, radix. Elérhető: https://www.ema.europa.eu/en/documents/herbal-report/final-assessment-report-primula-veris-l/primula-elatior-l-hill-radix_en.pdf. Megtekintés dátuma: 12.11.2019.
- https://www.ema.europa.eu/en/documents/herbal-report/final-assessment-report-primula-veris-l/primula-elatior-l-hill-flos_en.pdf
- Waterhouse A. Determination of total phenolics, in *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. R.E. Wiley. 2001
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Rad. Biol. Med.* 1999;26(9-10):1231-1237
- Jaberian H, Piri K, Nazari J. Phytochemical composition and in vitro antimicrobial and antioxidant activities of some medicinal plants. *Food Chem.* 2013;136(1): 237-244
- Apel L, Kammerer DR, Stintzing FC, et al. Comparative Metabolite Profiling of Triterpenoid Saponins and Flavonoids in Flower Color Mutations of *Primula veris* L. *Int. J. Mol. Sci.* 2017;18:153
- Szőke É, Balázs A, Blázovics A, Kéry Á, Kursinszki L, Lemberkovics É, Then M, Alberti-Dér Á, Balogh Gy, Bányai P, Blazics B, Böszörményi A, Kalász H, Könczöl Á, Lugasi A, Szarka Sz, Szentmihályi K, Vasas G. Gyógynövény és Drogismeret Farmakognózia – Fitokémia, gyógynövények alkalmazása. Semmelweis Egyetem; 2012; Digitális tankönyvtár
- https://www.ema.europa.eu/en/documents/herbal-report/final-assessment-report-primula-veris-l/primula-elatior-l-hill-radix_en.pdf, Megtekintés dátuma: 2019.04.08.
- Sriphannam C, Nuanmuang N, Saengsawang K, et al. Antifungal susceptibility and virulence factors of *Candida* spp. isolated from blood cultures. *J Mycol Med.* 2019;29(4):325-330