

© Коллектив авторов, 2017

В. О. Пластун, С. В. Райкова, Н. А. Дурнова, Н. В. Зараева, А. Г. Голиков

## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ПРОТИВОМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ ИЗВЛЕЧЕНИЙ ИЗ НАДЗЕМНЫХ ЧАСТЕЙ 2 ВИДОВ ОЧИТКОВ — *SEDUM MAXIMUM* (L.) HOFFM. И *S. TELEPHIUM* L.

ГБОУ ВПО Саратовский государственный медицинский университет им. В. И. Разумовского, Россия, Саратов, Саратовская область; e-mail: foggy\_morning@mail.ru

Установлена противомикробная активность экстрактов *S. maximum* и *S. telephium* в отношении *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27835, *Escherichia coli* ATCC 25922. Наиболее эффективен спиртовой экстракт *S. maximum*, не очищенный хлороформом. Прослеживается корреляция между содержанием флавоноидов в экстракте и его противомикробным действием.

**Ключевые слова:** трава очитков; противомикробная активность; экстракция.

Изучение химического состава и биологического действия растений, используемых в народной медицине, является актуальной задачей современной науки [1]. Растения семейства Толстянковые (*Crassulaceae* J. St.-Hill.) привлекли внимание исследователей еще во второй половине прошлого века в связи с разнообразием химического состава и частым применением в народной медицине. К этому семейству, например, относится родиола розовая (*Rhodiola rosea* L.), широко используемая не только в народной, но и в официальной медицине [2]. Представители рода очитков (*Sedum* L.) применяются преимущественно в народной медицине и изучены в меньшей степени. Из представителей данного рода только сырье очитка большого является официальным сырьем и используется для получения лекарственного препарата “Биосед”. Установлено, что очитки богаты фенольными соединениями, органическими кислотами, углеводами [3, 4]. Биологические эффекты средств из сырья очитков обусловлены, прежде всего, содержанием флавоноидов: кверцетина, кемпферола, изорамнетина и их гликозидов. Эти соединения обладают широким спектром действия: гепато- и ангиопротекторным, антиоксидантным, противомикробным и др. [5, 6].

Согласно проведенному ранее сравнительному изучению химического состава представителей рода *Sedum*, наиболее перспективными для медицины следует считать виды из секции *Telephium*, в частности, очиток большой (*Sedum maximum* (L.) Hoffm.) и очиток пурпурный (*Sedum telephium* L.) [7]. Биологическая активность веществ этих видов изучена в значительно меньшей степени. Ранее установлено тонизирующее и ранозаживляющее действие настоя и сока о. большого [2, 3], а также антиоксидантное действие отвара о. пурпурного [8] и спиртового экстракта о. большого [9]. Противомикробная активность БАВ очитков почти не изучена, получены только предварительные сведения о бактерицидном действии спиртовых экс-

трактов *S. maximum* и *S. telephium* [10]. Так как состав получаемых из растительного сырья экстрактов и, следовательно, их свойства в значительной мере зависят от технологических параметров экстракции [11], важную роль играет выбор способа экстрагирования, позволяющий получить наиболее эффективное извлечение.

Целью нашего исследования являлось изучение противомикробной активности полученных различными способами экстрактов *S. maximum* и *S. telephium* и ее взаимосвязи с общим содержанием флавоноидов в этих экстрактах.

### Экспериментальная химическая часть

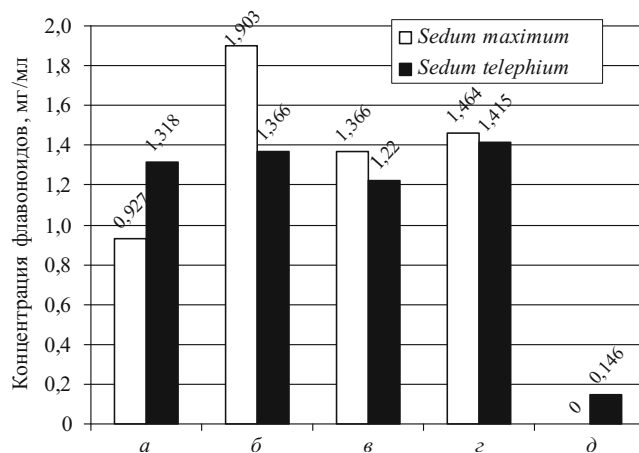
В качестве сырья использовали измельченную и фиксированную в 95 % этиловом спирте надземную часть растений, собранную в августе 2012 г. в окрестностях с. Репное Балашовского района Саратовской области, содержащую листья, стебли и соцветия в приблизительно равной пропорции. Сбор растений проводили в фазу цветения. Для получения исследуемых спиртовых (1, 2, 6, 7) и спирто-водных (3, 4, 8, 9) экстрактов навеску сырья массой 10 г измельчали в ступке, помещали в круглодонные колбы, заливали экстрагентом в соотношении 1:4 и нагревали на кипящей водяной бане. Настои (5, 10) готовили по стандартной методике (ГФ XII). Обработку спиртовых извлечений хлороформом проводили по методике [12]. Параметры экстракции представлены в табл. 1.

Для определения содержания экстрактивных веществ (ЭВ) в экстрактах полученные извлечения помещали в предварительно высушенные и взвешенные чашки Петри и упаривали на водяной бане ( $t$  50 °С) до постоянной массы, после чего повторно взвешивали. Количество ЭВ выражали в процентах. Суммарное содержание флавоноидов в экстрактах в пересчете на рутин определяли по градуировочному графику. Для это-

го в 7 мерных колб объемом по 25 мл вносили по 0,500, 0,625, 0,750, 0,875, 1,000 и 1,250 мл раствора государственного стандартного образца (ГСО) рутина с концентрацией 0,01 мг/мл, приготовленного по методике [13], доводили до метки 95 % этанолом и фотометрировали полученные растворы на спектрофотометре “Shimadzu” СФ-UV 1800 в кюветках с толщиной поглощающего слоя 1 см при 362 нм относительно чистого растворителя. Оптическую плотность каждого раствора измеряли трижды для исключения случайных результатов. При построении градуировочного графика в координатах оптическая плотность — концентрация рутина использовали средние значения оптической плотности, полученные для каждого образца. Исследуемые экстракты разбавляли 95 % этанолом таким образом, чтобы измеряемая оптическая плотность попадала в интервал градуировки, определяли ее для каждого экстракта трижды и, усредняя полученные значения, находили концентрации флавоноидов в этих экстрактах по градуировочному графику (в пересчете на рутин).

#### Экспериментальная биологическая часть

Изучение противомикробной активности полученных извлечений проводили методом двукратных серийных разведений в среде Мюллер — Хинтона в отношении эталонных штаммов *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27835, *Escherichia coli* ATCC 25922. Серийные разведения экстрактивных веществ готовили по следующей методике. Сухой остаток экстрактивных веществ разводили стерильной дистиллированной водой из расчета 100 мг/мл (рабочий раствор). Из рабочего раствора готовили ряд последовательных разведений, содержащих от 50 до 0,3 мг экстрактивных веществ в 1 мл питательной среды. Суточные культуры тестируемых штаммов суспензировали в стерильном физиологическом растворе, доводя концентрацию микроорганизмов до  $3 \cdot 10^8$  КОЕ/мл (по стандарту мутности McFarland 1), затем доводили концентрацию бактерий до  $2 \cdot 10^6$  КОЕ/мл. В каждую опытную и контрольную пробирку с экстрактом вносили по 0,1 мл бактериальной взвеси. Опыт сопровождался контрольным посевом тест-культур в среды без добавления растительного экстракта. Перед инкубированием из контрольных пробирок производили мерные высевы на плотные питательные среды (агар Мюллер — Хинтона). Посевы



Концентрация флавоноидов в экстрактах, мг/мл: а — спиртовые экстракты, очищенные хлороформом (1, б), б — спиртовые экстракты, не очищенные хлороформом (2, 7), в — спирто-водные экстракты, очищенные хлороформом (3, 8), г — спирто-водные экстракты, не очищенные хлороформом (4, 9), д — настой (5, 10).

инкубировали в термостате при температуре 37 °С в течение 18 – 24 ч, после чего учитывали результаты опыта, отмечая пробирки с отсутствием и наличием роста бактерий. Из пробирок с концентрацией экстрактивных веществ, принятых за минимальную подавляющую концентрацию (МПК), производили мерные высевы на плотные питательные среды для подсчета выросших колоний и оценки эффекта противомикробного действия. Эффект противомикробного действия оценивали по процентному соотношению количества колоний, выросших на чашках с высевом из опытных пробирок, в сравнении с контролем.

Анализ зависимости содержания флавоноидов в исследуемых экстрактах и их противомикробной активности проводили с помощью коэффициента ранговой корреляции Спирмена. Статистическую обработку выполняли в программе Statistica 6.1.

#### Результаты и их обсуждение

Общее содержание ЭВ по отношению к массе сырья для всех спиртовых и спирто-водных экстрактов о. пурпурного (5,1 – 5,9 %) превышало таковое для извлечений о. большого (3,4 – 4,6 %). Количество ЭВ в настоях наиболее высоко по сравнению с другими типами извлечений и составило 6,3 % для *S. maximum* и 6,9 % для *S. telephium*.

Таблица 1

Условия получения экстрактов из надземной части очитков

№ экстракта		Тип экстракта	Экстрагент	Время экстракции, мин	Очистка хлороформом
<i>S. maximum</i>	<i>S. telephium</i>				
1	6	спиртовый	этанол 95 % (I, II экстракция)	30 (I), 30 (II)	+
2	7	спиртовый	этанол 95 % (I, II экстракция)	30 (I), 30 (II)	–
3	8	спирто-водный	этанол 95 % (I экстракция), вода очищенная (II экстракция)	30 (I), 30 (II)	+
4	9	спирто-водный	этанол 95 % (I экстракция), вода очищенная (II экстракция)	30 (I), 30 (II)	–
5	10	настой	вода очищенная	15 (I), 45 (II)	–

Для всех 10 экстрактов определена концентрация флавоноидов (рисунок).

При сравнении экстрактов из 2 видов очитков нами установлено, что среди спиртовых извлечений наиболее высока концентрация флавоноидов в экстракте *S. maximum*, не очищенном хлороформом — 1,903 мг/мл (рисунок, б). В спиртовом экстракте из этого же сырья, подвергнувшись обработке хлороформом, концентрация флавоноидов была на 51,9 % ниже и составила 0,927 мг/мл (рисунок, а). В спиртовых извлечениях из *S. telephium* разница в количестве флавоноидов между очищенным (1,318 мг/мл) и неочищенным (1,366 мг/мл) экстрактами была менее выражена и составила 3,6 %.

В спирто-водных извлечениях, полученных из травы обоих видов, концентрация флавоноидов варьировала незначительно, но в извлечениях из *S. maximum* была несколько выше, чем из *S. telephium*: 1,415 мг/мл и 1,220 мг/мл соответственно (рисунок, в, г). Для обоих видов суммарное содержание флавоноидов в неочищенных хлороформом экстрактах ((рисунок, з) было выше, чем в очищенных (рисунок, в).

В настое из сырья *S. maximum* флавоноиды не обнаружены, в настое *S. telephium* они выявлены в незначительном количестве — 0,146 мг/мл (рисунок, д).

Противомикробное действие изученных экстрактов установлено в отношении всех взятых в эксперимент тест-культур микроорганизмов. В табл. 2 представлены минимальные подавляющие концентрации (МПК) и значения коэффициента Спирмена для 3 тест-культур, на основании которых судили о зависимости противомикробного действия от концентрации флавоноидов в экстрактах.

Из всех изученных нами типов извлечений в отношении *S. aureus* наиболее активны были спиртовые и спирто-водные экстракты обоих видов трав очитков, не подвергшиеся очистке хлороформом (2, 4 и 7, 9 соответственно). При воздействии этих экстрактов в

концентрации 1,5 мг/мл на культуру стафилококка наблюдалось снижение количества колониеобразующих единиц (КОЕ) в мерном высеве на плотную питательную среду на 99 %. Спиртовые и спирто-водные извлечения из травы *S. telephium*, очищенные хлороформом (6, 8), подавляли рост стафилококка на 79 % при МПК 3,1 мг/мл, экстракты этого типа из сырья *S. maximum* (1, 3) полностью подавляли бактериальный рост при МПК 6,2 мг/мл. Настои (5, 10) проявили наименее выраженную активность в отношении *S. aureus*, их МПК составила 12,5 мг/мл. Следует отметить, что суммарное содержание флавоноидов в экстрактах этого типа было минимальным (рисунок). В целом экстракты из надземной части *S. telephium* оказывали более заметное бактерицидное действие на *S. aureus* по сравнению с извлечениями из травы *S. maximum* (табл. 2).

Максимальный противомикробный эффект в отношении *E. coli* показали спиртовые экстракты трав обоих видов очитков, не очищенные хлороформом (2 и 7). Они полностью подавляли рост кишечной палочки при концентрации экстракта 12,5 мг/мл. Действие остальных экстрактов проявлялось лишь при высоких концентрациях (25 мг/мл и выше), при этом количество КОЕ в мерном высеве снижалось на 80 – 100 %. Наименьший эффект показал настоей травы *S. maximum* (5), снижавший число КОЕ лишь на 20 % при концентрации ЭВ 50 мг/мл.

При воздействии на *P. aeruginosa* извлечений из травы *S. maximum* наблюдалось наиболее выраженное противомикробное действие спиртовых и спирто-водных экстрактов, не обработанных хлороформом. Так, экстракты 2 и 4 подавляли рост бактерий на 70 % уже при концентрации действующих веществ 1,5 мг/мл, а при концентрации 3,1 мг/мл наблюдалось полное отсутствие роста бактерий на питательном агаре. Для приготовленных аналогичным способом экстрактов травы *S. telephium* (6, 8) МПК составила 3,1 мг/мл, при этом наблюдался единичный рост микроорганизмов. Спиртовые и водно-спиртовые экстракты обоих видов очитков, подвергшиеся очистке хлороформом (1, 3, 6, 8), подавляли рост синегнойной палочки при концентрации действующих веществ 6,2 мг/мл. Настоей травы *S. maximum* также проявил выраженное бактерицидное действие в концентрации 6,2 мг/мл, настоей травы *S. telephium* — только в дозе 12,5 мг/мл. В целом активность спиртовых и спирто-водных экстрактов травы *S. maximum* в отношении *P. aeruginosa* была выше, чем аналогичных экстрактов травы *S. telephium*.

В отношении *S. aureus* и *P. aeruginosa* полученные значения рангового коэффициента корреляции Спирмена свидетельствуют о наличии сильной статистически достоверной обратной связи между содержанием флавоноидов в исследуемых экстрактах и их МПК, (в то же время связь между содержанием флавоноидов и противомикробным действием экстрактов прямая). В отношении *E. coli* подобная корреляция не прослеживается, что указывает на низкую чувствительность этого штамма к экстрактам травы очитков.

Таблица 2  
МПК экстрактов трав очитков в отношении 3 тест-культур микроорганизмов и их связь с концентрацией флавоноидов в этих извлечениях

№ экстракта	МПК, мг/мл		
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
1	6,2	25	6,2
2	1,5	12,5	1,5
3	12,5	25	6,2
4	1,5	25	1,5
5	12,5	25	6,2
6	3,1	25	6,2
7	1,5	12,5	3,1
8	3,1	25	6,2
9	1,5	25	3,1
10	12,5	25	12,5
Коэффициент Спирмена	-0,8*	-0,5	-0,9*

\* Значимо при  $p \leq 0,05$ .

Для всех исследованных экстрактов установлена противомикробная активность в отношении 3 взятых в эксперимент тест-культур микроорганизмов. Наиболее эффективны спиртовые экстракты трав обоих видов очитков, не очищенные хлороформом, максимально активным являлся соответствующий экстракт травы *S. taxitum* (2). Суммарное содержание флавоноидов в этом экстракте было наиболее высоко (1,903 мг/мл). Количество флавоноидов в спирто-водных экстрактах обоих видов, не очищенных хлороформом (4, 9), составило 1,464 и 1,415 мг/мл соответственно. Эти извлечения продемонстрировали высокую противомикробную активность в отношении стафилококка и синегнойной палочки. Наименьшее противомикробное действие показали настои, полученные из травы обоих видов. Несмотря на то, что общее количество экстрактивных веществ в настоях было самым высоким, они содержали наименьшее количество флавоноидов по сравнению со всеми остальными экстрактами.

Таким образом, прослеживается корреляция между содержанием флавоноидов в экстрактах *S. taxitum* и *S. telephium* и их противомикробным действием. Полученные данные позволяют сделать вывод о перспективности использования спиртовых и спирто-водных экстрактов *S. taxitum*, а также спирто-водных экстрактов *S. telephium* при разработке растительных препаратов с противомикробным действием.

## ЛИТЕРАТУРА

1. А. И. Левента, А. Л. Усов, И. Ж. Семинский и др., *Сиб. мед. ж.*, 1, 105 – 110 (2012).

2. Г. П. Шнякина, Е. А. Краснов, *Растит. рес.*, 10(1), 130 – 135 (1973).
3. Е. А. Краснов, Л. В. Петрова, В. В. Зайцева, *Флавоноиды очитков пурпурного и гибридного*, Изд-во Томского ун-та, Томск (1973), сс. 60 – 63.
4. Г. П. Шнякина, *Растит. рес.*, 15(2), 280 – 291 (1979).
5. В. А. Куркин, *Фармакогнозия: Учебник для студентов фармацевтических вузов*, ООО “Офорг”, Самара (2007), сс. 842 – 843.
6. В. А. Бандюкова, В. С. Череватый, И. И. Озиминова и др., *Растит. рес.*, 23(4), 607 – 611 (1987).
7. П. А. Гнедков, А. И. Шретер, *Растит. рес.*, 13(3), 548 – 559 (1977).
8. О. Д. Барнаулов, Т. В. Сергеева, Л. А. Александрова и др., *Матер. X конф. “Нейроиммунология”*, Т. 2 (2001), сс. 223 – 297.
9. Е. П. Меркулова, Е. Э. Комарова, В. О. Пластун и др., *Матер. II междунар. науч.-практ. конф. “Современные проблемы отечественной медико-биологической и фармацевтической промышленности. Развитие инновационного и кадрового потенциала Пензенской области”*: электронное научн. издание, ФГУП НТЦ “Информрегистр”, Депозитарий электронных изданий, Пенза (2012), сс. 484 – 486.
10. В. О. Пластун, С. В. Райкова, Н. А. Дурнова и др., *Сарат. науч.-мед. ж.*, 9(4), 640 – 643 (2013).
11. Т. В. Сухина, Т. С. Шестакова, В. М. Петриченко и др., *Хим.-фарм. журн.*, 44(12), 35 – 39 (2010); *Pharm. Chem. J.*, 44(12), 683 – 686 (2010).
12. Н. В. Машурчак, *Автореф. дис. ... канд. биол. наук*, Саратов (2010), сс. 6 – 7.
13. С. С. Ломбоева, Л. М. Танхаева, Д. Н. Оленников, *Химия растит. сырья*, 2, 65 – 68 (2008).

Поступила 15.05.14

## COMPARATIVE ANALYSIS OF THE ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF EXTRACTS FROM TWO STONECROP SPECIES (*SEDUM MAXIMUM* L. HOFFM. AND *SEDUM TELEPHIUM* L.)

V. O. Plastun, S. V. Raikova, N. A. Durnova, N. V. Zараeva, and A. G. Golikov

V. I. Razumovsky Saratov State Medical University, Saratov, 410049 Russia;

e-mail: foggy\_morning@mail.ru

Antimicrobial activity of two stonecrop species (*Sedum maximum* L. Hoffm. and *Sedum telephium* L.) was established with respect to *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27835, and *Escherichia coli* ATCC 25922 strains. The most pronounced effect was observed for *S. maximum* ethanol extract not purified with chloroform. Correlation was traced between the flavonoid content in extracts and their antimicrobial effect.

**Keywords:** stonecrop herbs; extraction; antimicrobial activity.