

УДК 615.322:582. 579.2:581.192

ПОЛУЧЕНИЕ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ С ЗАДАНЫМ ХИМИЧЕСКИМ СОСТАВОМ И АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТЬЮ

© Л.И. Тихомирова^{1*}, Л.В. Щербакова¹, Т.Н. Ильичёва², Н.Г. Базарнова¹, Д.А. Карпицкий¹

¹ Алтайский государственный университет, пр. Ленина, 61, Барнаул, 656049 (Россия), e-mail: L-tichomirova@yandex.ru

² ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», р.п. Кольцово, Новосибирская область, 630559, (Россия)

Существенное влияние на величину суммы гидроксикоричных кислот оказывало не повышение содержания БАП от 1.0 до 10.0 мкМ, а введение ауксинов 1.0 мкМ НУК + 0.1 мкМ ИМК. Ауксины в сочетании с цитокинином БАП увеличивали сумму кислот в среднем на 20% в этанольных (1.9±0.2%) и в водных (1.46±0.06%) извлечениях из сырья *Iris sibirica*. Максимальный выход экстрактивных веществ, в том числе дубильных (4.4±0.3%), наблюдали при выращивании сырья на средах с содержанием БАП 2.5–5.0 мкМ, наименьшее значение получали при БАП 10.0 мкМ. Введение ауксинов (1.0 мкМ НУК + 0.1 мкМ ИМК) значительного влияния на динамику накопления дубильных веществ не оказывало.

Скрининг химического состава лекарственного растительного сырья *Origanum vulgare* и *Salvia officinalis*, полученного методами биотехнологии, показал наличие флавоноидов 1.6±0.1% и 3.2±0.04%, гидроксикоричных кислот 7.4% и 13.4% на а.с.с. соответственно.

Противобактериальная активность с минимальной ингибирующей концентрацией 0.02–0.04 мг/мл в отношении *Sporosarcina ureae*, *Bacillus pumilus*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* была ярко выражена у гексанового извлечения *Salvia officinalis*. Этанольный экстракт шалфея был активен против *Salmonella typhimurium*. Этанольные экстракты *Iris sibirica* и *Salvia officinalis* показали антибактериальную активность в отношении *Salmonella typhimurium*, MIC – 0.35 и 0.16 мг/мл соответственно. Ирис сибирский подавлял *Bacillus pumilus* при MIC – 0.7 мг/мл. Водно-глицериновой смесью наибольшее количество экстрактивных веществ извлекалось из сырья *Origanum vulgare* – 21.5±0.2% на а.с.с. В отношении *Salmonella typhimurium* экстракты проявляли антибиотическую активность с MIC – 1.2 мг/мл.

Ключевые слова: *Iris sibirica* L., вторичные метаболиты, растения-регенеранты, биотехнология получения лекарственного растительного сырья, методы экстракции.

Введение

Российская Федерация обладает мощным потенциалом для производства фитопрепаратов. Флора России насчитывает 12 тыс. видов высших растений, из которых 2000 видов используется в народной медицине,

326 – в традиционной медицине [1].

Тихомирова Людмила Ивановна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник ЮСБС, e-mail: L-tichomirova@yandex.ru

Щербакова Людмила Владимировна – кандидат химических наук, доцент кафедры техносферной безопасности и аналитической химии, e-mail: L-tichomirova@yandex.ru

Ильчёва Татьяна Николаевна – доктор биологических наук, заведующая лабораторией серодиагностики гриппа, e-mail: L-tichomirova@yandex.ru

Базарнова Наталья Григорьевна – доктор химических наук, заведующая кафедрой органической химии, e-mail: bazarnova@chem.asu.ru

Карпицкий Дмитрий Алексеевич – студент, e-mail: L-tichomirova@yandex.ru

Биологически активные вещества в течение многих десятилетий получали преимущественно из дикорастущих растений. Однако такой подход со временем приводит к исчерпанию их природных популяций и ставит отдельные виды лекарственных растений на грань исчезновения. Нельзя забывать и о том, что многие лекарственные растения относятся к исчезающим видам, имеющим узкий ареал распространения. Продовольственная и сельскохозяйственная организация (ФАО) при Органи-

* Автор, с которым следует вести переписку.

зации Объединенных Наций (ООН) ежегодно публикует списки безвозвратных потерь видов растений, в том числе лекарственных, в связи с варварскими методами их заготовки [2, 3].

Биотехнологическое производство растительного сырья является привлекательной альтернативой, но на сегодняшний день имеет лишь ограниченный коммерческий успех из-за отсутствия разработанных методов регуляции накопления и извлечения фармацевтически значимых вторичных метаболитов.

Антибиотикорезистентность – одна из мировых проблем XXI века, возникающая в результате активации приспособительных механизмов в структурах бактериальных клеток. Вторичные метаболиты растений – химически неоднородная группа веществ, оказывающих специфическое действие на микроорганизмы в зависимости от структуры конкретного класса соединений. Исследования показали, что различные вторичные метаболиты растений, подобно антибиотикам, способны: нарушать целостность клеточной стенки и цитоплазматической мембраны бактерий и грибов; ингибировать работу системы эффлюкса; нарушать синтез РНК и ДНК в клетке бактерии; вызывать коагуляцию компонентов цитоплазмы; угнетать метаболизм клетки путем инактивации ферментов бактерий [4–7].

Флавоноиды показывают высокую антибактериальную активность в отношении как грамположительных, так и грамотрицательных изолятов, вероятно, из-за их способности ингибировать ДНК-гиразу, нарушать целостность клеточной мембраны и влиять на энергетический метаболизм бактерий. Такие флавоноиды, как кверцетин, галангин, кемпферол и мирецетин показали антимикробную активность против грамотрицательных и грамположительных бактерий. Танины – полифенолы, обладающие способностью к ингибированию роста бактерий посредством блокирования ферментов метаболизма [8–12].

Наземные части шалфея содержат большое разнообразие производных кофейной кислоты (гликозидов, олигомеров и др.), к числу которых относится, например, розмариновая кислота. Розмариновая кислота (Rosemarinic acid) – сложный эфир кофейной и 3,4-дигидроксифенилмолочной кислоты. Кроме шалфея обнаружена в листьях розмарина лекарственного (*Rosemarinus officinalis* L.), в подсем. *Nepetoideae* сем. *Lamiaceae* и у некоторых представителей сем. *Umbelliferae*. Она обладает рядом фармакологических свойств, присущих шалфею и розмарину: антибактериального, противовоспалительного, антиоксидантного и противовирусного [13].

В связи с этим поиски новых природных источников БАВ, обладающих антибактериальной активностью, как и расширение уже существующей базы фармакопейных лекарственных растений, в настоящее время по-прежнему актуальны. Детальное изучение химического состава, испытание на антибактериальную активность экстрактов из растений объектов данного исследования позволят в перспективе разработать новые эффективные растительные антисептики.

Экспериментальная часть

Растительный материал. В качестве объектов исследования использовали растения ириса сибирского (*Iris sibirica* L.), душицы обыкновенной (*Origanum vulgare* L.), шалфея лекарственного (*Salvia officinalis* L.), размноженные микроклонально (растения-регенеранты), которые далее выращивали в условиях аэропоники (аэропонная трава, аэропонные корни) в отделе биотехнологии растений Алтайского государственного университета.

Работу проводили на основе общепринятых в биотехнологии растений методов [14].

Растения-регенеранты *Iris sibirica* L. сорт Cambridge и сорт Стерх размножали микроклонально, используя агаровые питательные среды на минеральной основе по прописи Мурасиге-Скуга (MS) [15]. В качестве фитогормонов в среды вводили цитокинин 6-бензиламинопурин (БАП 1.0–10.0 мкМ) и ауксины: НУК (α -нафтилуксусную кислоту 1.0 мкМ), ИМК (3-индолилуксусную кислоту 0.1 мкМ). Сырье выращивали в условиях аэропоники на жидкой среде MS (1/4 концентрации) без содержания гормонов [16, 17].

Интактные растения (траву и корневища с корнями) *I. sibirica* сорт Cambridge заготавливали в Алтайском крае, Новоалтайск, весной и осенью 2015 г. Сырье сушили до воздушно-сухого состояния, упаковывали в полиэтиленовые мешки и хранили в эксикаторе.

Сушка и измельчение растительного сырья. Перед сушкой растительное сырье сортировали и очищали от инородных примесей и сгнивших частей. Для сушки растительное сырье, в соответствии с рекомендациями Р.А. Музычкиной [18], сразу же после сбора рассыпали тонким слоем. Хорошо высушенное лекарственное сырье содержало гигроскопической влаги не более 12–15%. Воздушно-сухие образцы листьев и корневищ перемалывали до размера частиц 2–4 мм.

Методы исследования. Циркуляционную экстракцию осуществляли в установке типа «Соклет» последовательной обработкой растительного сырья растворителями: гексаном, 70% этанолом, водно-глицериновой смесью (30%), от менее полярных к более полярным при соотношении по массе сырье : экстрагент – 1 : 50. Время каждой экстракции составляло 6 ч.

Для количественного определения содержания флавоноидов в экстрактах использована методика, основанная на их способности образовывать окрашенный комплекс с раствором $AlCl_3$ [18]. Количественное определение дубильных веществ проводили спектрофотометрическим методом. Определение суммы гидрокси-коричных кислот осуществляли методом прямой спектрофотометрии [19].

Исследование противобактериальной активности. В мясоептонный бульон (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболensk, Россия) засеивали бактериальные культуры и инкубировали при 37 °С на качалке при 400 об./мин в течение 18–24 ч. Затем по оптической плотности определяли концентрацию бактериальных суспензий и каждый посевной материал разводили до конечной концентрации 10^6 клеток в мл. Готовили двукратные разведения экспериментальных препаратов и распределяли в 96-луночный планшет по 100 мкл на лунку, после чего вносили бактериальные суспензии. Планшеты инкубировали в течение 24 ч при 37 °С. Антибиотик широкого спектра действия линкомицин в концентрации 4 мкг/мл использовали в качестве положительного контроля при исследовании антибактериальной активности против грамположительных бактерий. Штамм *Salmonella typhimurium*, использованный в данной работе, – это аттенуированный штамм с множественной резистентностью к антимикробным препаратам. В связи с этим положительный контроль в экспериментах с *Salmonella typhimurium* не использовался. После 24 ч инкубации мутность бактериальной суспензии оценивали визуально как показатель роста бактерий. Самая низкая концентрация, которая подавляла видимый рост бактерий, была зарегистрирована как МИС – минимальная ингибирующая концентрация. Методика описана в МУК 4.2.190-04 «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам» [20].

Статистическая обработка. Все измерения проведены не менее чем в трехкратной повторности. Статистическую обработку результатов измерений проводили с помощью программы SigmaPlot 12.5.

Обсуждение результатов

Научные исследования по разработке технологии клонального микроразмножения *Iris sibirica* в отделе биотехнологии растений ЮСБС АлтГУ проводят в течение ряда лет. В результате исследования определено содержание 6-бензиламинопурина в питательных средах на этапе собственно микроразмножения для формирования наибольшего количества адвентивных побегов оптимальной длины. Необходимым количеством БАП для *I. sibirica* является 2.5–5.0 мкМ. Введение в питательные среды цитокининов совместно с ауксинами, L-глутамином и аденин сульфатом 100 мг/л, а также чередование низких и высоких концентраций цитокинина усиливало регенерационный эффект БАП. При круглогодичном выращивании растений-регенерантов в условиях аэропоники количество биомассы растительного сырья *I. sibirica* по данному способу составляло примерно 31.2 кг/м² по сырой массе за один год [16].

Водные и этанольные экстракты *I. sibirica* сорт Cambridge проявляли противовирусную активность в отношении вируса герпеса. При невысокой токсичности экстракты интактных растений и растений-регенерантов имели относительно высокий индекс селективности [16].

Задачей настоящего исследования мы ставили изучение влияния гормонального состава питательных сред на накопление основных групп вторичных метаболитов, ответственных за противомикробный эффект: флавоноидов, дубильных веществ, гидроксикоричных кислот.

Таблица 1. Токсичность и противовирусная активность экстрактов растительного сырья *I. sibirica* сорт Cambridge [16]

Исследуемое сырье	Время сбора	Растворитель	Токсичность, CD_{50} , мкг/мл	Противовирусная активность, ED_{50} , мкг/мл	Индекс селективности, IS
Корневища с корнями	весна	95% этанол	500	7.8	64
Корневища с корнями	весна	вода	3450	431	8
Трава	весна	вода	375	94	4
Трава	осень	вода	725	30	24
Растения-регенеранты		вода	4450	278	16

Синтез и накопление вторичных метаболитов зависит от стадии развития растения. В то же время общих закономерностей изменений вторичного метаболизма в онтогенезе, по-видимому, не существует. Разворачивание вторичного метаболизма во времени зависит от вида растения, типа вторичного метаболита, его физиологической роли для растения и во многом от внешних факторов. В нашем эксперименте сравнивали содержание суммы флавоноидов, дубильных веществ и гидроксикоричных кислот в сырье интактных растений *I. sibirica* сорт Cambridge, выращенном в условиях аэропоники. Необходимо отметить тот факт, что аэропонные растения выращивали в течение 6 месяцев, а интактные заготавливали в пятилетнем возрасте. Флавоноиды в траве интактных растений накапливались в три раза больше, чем у аэропонных растений, дубильные вещества и гидроксикоричные кислоты, извлекаемые 70% этиловым спиртом, находились в сопоставимых количествах. Водой извлекалось в два раза больше гидроксикоричных кислот из аэропонного сырья, в сравнении с травой интактных растений. Корни аэропонных растений очень молодые (6 мес.), корневища еще не образуются в данном возрасте, соответственно, дубильных веществ накапливается в 2 раза меньше, чем у интактных (табл. 2).

Для выращивания растительного сырья ириса сибирского с заданным химическим составом выявляли зависимость накопления БАВ от содержания гормональных стимуляторов роста (БАП, НУК и ИМК) в питательных средах при клональном микроразмножении. Среды готовили с разной концентрацией БАП, добавляя ауксины (НУК и ИМК) и без добавок. Так как на агаровых средах без гормонов растения не растут, в качестве контроля (К) брали аэропонную траву. В аэропонике использовали питательный раствор на основе MS, не содержащий фитогормоны, влияние данных стимуляторов роста на накопление вторичных метаболитов отсутствовало. Проведен сравнительный анализ БАВ в траве растений-регенерантов и аэропонной траве. В отношении флавоноидов прослеживалась зависимость биосинтез данной группы веществ от концентрации 6-бензиламинопурина. Введение в питательные среды ауксинов незначительно увеличивало содержание флавоноидов.

Таким образом, для накопления флавоноидов у *I. sibirica* сорт Cambridge мы рекомендуем готовить среды с 2.5 мкМ БАП, дополненные ауксинами, так как использовать среды, содержащие 7.5–10.0 мкМ БАП, экономически не выгодно при высокой стоимости фитогормонов.

Содержание суммы гидроксикоричных кислот определяли в пересчете на хлорогеновую кислоту с удельным показателем поглощения хлорогеновой кислоты – 504. На первом этапе подбирали экстрагент. В результате проведенной работы получены извлечения из сырья *Iris sibirica* 70% этанолом и водой. Максимумы поглощения исследуемых извлечений находились при длине волны 325–330 нм и совпадали с максимумом поглощения гидроксикоричных кислот, что позволило сделать вывод о том, что характер кривой поглощения спирто-водного и водного извлечений из сырья определяется гидрооксикоричными кислотами и позволяет использовать длину волны $\lambda=328$ нм для спектрофотометрического определения их суммы. Максимальное содержание суммы гидроксикоричных кислот наблюдали при использовании в качестве экстрагента спирт этиловый. Водой извлекали в 1.4 раза меньше веществ, чем 70% этанолом.

Нами выявлена зависимость накопления гидроксикоричных кислот от гормонального состава питательных сред при выращивании в культуре *in vitro*. На безгормональной питательной среде в условиях аэропоники листья (ЛА) накапливали минимальное количество кислот – 0.95%. При введении в среды цитокинина БАП содержание гидроксикоричных кислот в сырье возрастало и останавливалось на определенном уровне 1.73 – 1.6 – 1.42 – 1.5 – 1.57. Существенное влияние на величину суммы кислот оказывало не повышение содержания БАП от 1.0 до 10.0 мкМ, а введение ауксинов 1.0 мкМ НУК + 0.1 мкМ ИМК. Ауксины в сочетании с цитокинином БАП увеличивали сумму гидроксикоричных кислот в среднем на 20% в этанольном и в водном извлечении из сырья *I. sibirica* сорт Cambridge (табл. 2).

Дубильные вещества широко встречаются у представителей высших растений. В больших количествах накапливаются в подземных органах, коре, но могут быть в листьях и побегах. Важно понять, какое влияние оказывает культивирование в искусственных условиях не только на накопление биомассы, но и на синтез вторичных метаболитов растений.

В нашем эксперименте получены водные извлечения из сырья растений – регенерантов, выращенных на средах с различным содержанием фитогормонов, а также из аэропонного сырья – листья аэропонные. Извлечения анализировали на содержание экстрактивных веществ, в том числе дубильных (осаждаемых и общего содержания), в качестве контроля использовали значения для листьев аэропонных, так как сырье выращивали на безгормональной среде.

Таблица 2. Зависимость их накопления БАВ в растительном сырье *I. sibirica* сорт Cambridge от содержания фитогормонов в питательных средах (% на а.с.с.)

№ опыта	Гормональный состав питательной среды, мкМ	Флавоноиды	Дубильные вещества	Гидроксикоричные кислоты	
				спиртовой (70%) экстракт	водный экстракт
1	БАП 1.0	4.3±0.1	4.4±0.3	1.73±0.03	1.34±0.06
2/1	БАП 2.5	3.4±0.3	5.1±0.2	1.6±0.1	1.18±0.08
2/2	БАП 2.5+А	3.9±0.1	4.0±0.1	1.9±0.2	1.46±0.06
3/1	БАП 5.0	3.7±0.2	4.5±0.1	1.42±0.03	1.17±0.02
3/2	БАП 5.0+А	3.7±0.4	4.1±0.2	1.8±0.2	1.27±0.01
4/1	БАП 7.5	4.0±0.1	3.2±0.3	1.5±0.2	0.93±0.05
4/2	БАП 7.5+А	4.5±0.2	2.7±0.1	1.75±0.03	1.21±0.01
5/1	БАП 10.0	3.9±0.1	3.5±0.2	1.57±0.01	0.94±0.01
5/2	БАП 10.0+А	4.9±0.1	3.7±0.1	1.7±0.1	1.28±0.01
Аэр. трава (К)	без гормонов	1.89±0.06	1.8±0.1	0.63±0.03	0.95±0.03
Аэр. корни	без гормонов	–	0.63±0.01	0.89±0.04	0.28±0.04
Интактные, трава	без гормонов	5.74±0.06	2.0±0.1	0.78±0.07	0.47±0.05
Интактные, корневища с корнями	без гормонов	не обнаружено	1.3±0.1	0.29±0.02	0.55±0.02

Примечание: А – дополнены ауксинами 1.0 мкМ НУК + 0.1 мкМ ИМК.

Максимальный выход экстрактивных веществ из сырья *I. sibirica* L. сорт Стерх, в том числе дубильных, наблюдали при выращивании на средах с содержанием БАП 2.5–5.0 мкМ, наименьшее значение получали при БАП 10.0 мкМ (рис. 1). На графике видна четкая зависимость накопления вторичных метаболитов от содержания цитокинина БАП. До 5.0 мкМ наблюдается положительная корреляция между увеличением концентрации фитогормона и содержанием анализируемых веществ, далее с 7.5 мкМ – корреляция отрицательная. Введение ауксинов (1.0 мкМ НУК + 0.1 мкМ ИМК) значительного влияния на динамику накопления веществ не оказывало.

Отработанные на объекте *I. sibirica* методические приемы выращивания и химического анализа сырья мы использовали для работы с новыми видами растений, ранее нами не изученными. Ниже представлены данные фитохимического изучения и исследование противобактериальной активности, размноженных микрорационально, *Origanum vulgare* и *Salvia officinalis*. Сырье *Origanum vulgare* далее выращивали в условиях аэропоники.

Степень биологической активности фитопрепаратов, как известно, во многом зависит от технологии их производства. Основная задача фитохимии – правильный выбор методов извлечения и подбор высокоэффективных растворителей. Для полноты извлечения биологически активных соединений мы использовали циркуляционную экстракцию в установке типа «Соклет» с последовательной обработкой растительного сырья растворителями: гексаном, 70% этанолом, водно-глицериновой смесью (30%).

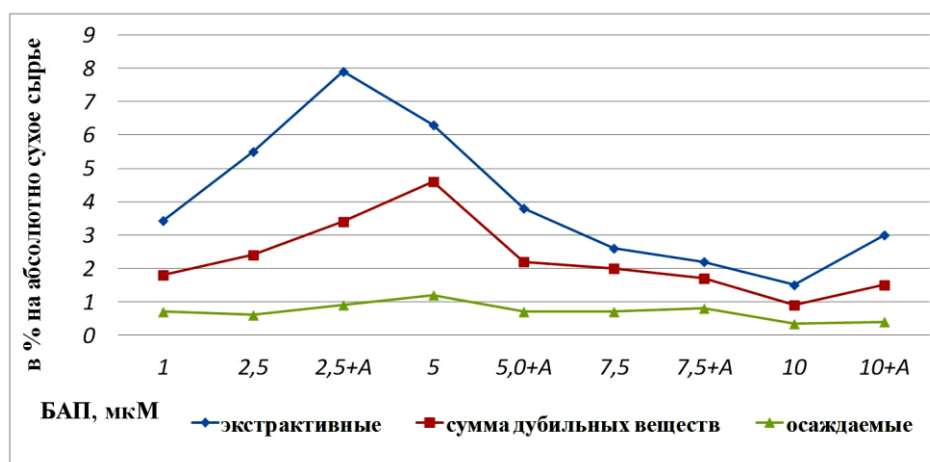


Рис. 1. Зависимость накопления экстрактивных, в том числе дубильных веществ от состава питательных сред при водной экстракции сырья *I. sibirica* L. сорт Стерх. А – ауксины (1.0 мкМ НУК + 0.1 мкМ ИМК)

В качестве одного из критериев оценки эффективности процесса экстракции может быть использован такой показатель, как «Экстрактивные вещества». Сумма экстрактивных веществ для травы аэропонной *Iris sibirica* сорт Cambridge составляла 11.5%, для *Origanum vulgare* – 30.0%, для растений-регенерантов *Salvia officinalis* – 31.5% на а.с.с. (табл. 3).

Неполярные растворители (хлороформ, гексан) хорошо извлекают агликоны сердечных гликозидов, основания большинства алкалоидов, сапогенины, флавоны, эфирные масла, жиры, воски, смолы и т.п., но не растворяют белки, пектины, сахара, минеральные вещества и др. гидрофильные вещества. Наименьшей фракцией по сумме экстрактивных веществ для объектов данного исследования являлись гексановые экстракты, тем не менее извлечения из сырья растений-регенерантов *Salvia officinalis* показали очень высокую антибиотическую активность в отношении *Sporosarcina ureae* (MIC – 0.02 мг/мл), *Bacillus pumilus* (MIC – 0.02 мг/мл), *Salmonella typhimurium* (MIC – 0.04 мг/мл), *Staphylococcus aureus* (MIC – 0.04 мг/мл). Экстракт *Iris sibirica* проявлял биологическую активность в отношении *Bacillus pumilus* (MIC – 0.04 мг/мл) и *Salmonella typhimurium* (MIC – 0.08 мг/мл) (табл. 4). В работе Pierozan M.K. и коллег [21] представлены данные об антибиотической активности эфирных масел некоторых видов шалфея. Масло *Salvia officinalis* подавляет рост гр(+) кокковую микрофлору *Staphylococcus aureus* в минимальной ингибирующей дозе (MIC) 2.83–3.42 мг/мл, а рост гр(-) палочковой флоры *Salmonella typhimurium* в MIC – 6.93 мг/мл.

Этанольные экстракты объектов исследования в нашей работе изучены на содержание суммы флавоноидов и гидроксикоричных кислот. Необходимо сказать о том, что этанольная фракция для всех изученных видов являлась наибольшей по содержанию экстрактивных веществ (табл. 3).

Для расчета суммы флавоноидов в аэропонной траве *Origanum vulgare* использовали экспресс-метод, предложенный в работе [22]. Согласно данным, сумма флавоноидов в интактном сырье «Душицы обыкновенной трава» составляет $1.8 \pm 0.1\%$, что сопоставимо с нашими исследованиями – $1.6 \pm 0.1\%$ на а.с.с.

В методике фармакопейной статьи в качестве референтного флавоноида, в пересчете на который производится определение суммы флавоноидов травы душицы, выбран лютеолин. Как считает Р.Ш. Хазиев и его коллеги, лютеолин является агликоном, в отличие от гликозидных форм флавоноидов, а агликоны редко накапливаются в значительных количествах в растениях и еще реже являются доминирующими соединениями в сумме флавоноидов. Из-за значительной разницы в молекулярных весах агликонов и гликозидов флавоноидов у них существенно различаются значения удельных показателей поглощения, которые используются в расчетных формулах, что при соответствующем неверном выборе референтного соединения приведет к большой ошибке в конечных результатах. В работе при определении суммарного содержания флавоноидов в траве душицы предлагается в качестве референтного соединения использовать не лютеолин, а его 7-гликозид – цинарозид, разработан экспресс метод [22].

Сумму флавоноидов растений-регенерантов *Salvia officinalis* определяли в пересчете на апигенин, что составило $3.2 \pm 0.04\%$ на а.с.с.

Этанольные экстракты *Iris sibirica* и *Salvia officinalis* показали антибактериальную активность в отношении *Salmonella typhimurium*, MIC – 0.35 и 0.16 мг/мл соответственно. Ирис сибирский подавлял *Bacillus pumilus* при MIC – 0.7 мг/мл (табл. 4, рис. 2).

Таблица 3. Скрининг химического состава лекарственного растительного сырья, полученного методами биотехнологии, % на абсолютно сухое сырье (а.с.с.)

Вид растений (сырье)	Растворитель	Экстрактивные вещества	Флавоноиды	Гидроксикоричные кислоты
<i>Iris sibirica</i> (трава аэропонная)	гексан	0.67±0.03	–	–
	70% этанол	6.2±0.1	1.89±0.06	2.83±0.08
	водно-глицериновый	4.6±0.1	–	0.80±0.04
<i>Origanum vulgare</i> (трава аэропонная)	гексан	0.59±0.01	–	–
	70% этанол	7.9±0.2	1.6±0.1	3.0±0.1
	водно-глицериновый	21.5±0.2	–	4.4±0.2
<i>Salvia officinalis</i> (растения-регенеранты)	гексан	1.3±0.2	–	–
	70% этанол	15.55±0.04	3.2±0.04	10.2±0.1
	водно-глицериновый	14.7±0.9	–	3.2±0.2

Таблица 4. Противобактериальная активность растительных экстрактов

№ образца	Экстракты	Исходная концентрация, мг/мл	МИС минимальная ингибирующая концентрация, мг/мл			
			<i>Sporosarcina ureae</i>	<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
1	Ирис сибирский – гексан	0.3	нет	0.04	0.08	нет
2	Ирис сибирский – этанол 70%	2.8	нет	0.7	0.35	нет
3	Ирис сибирский – водно-глицериновый 30%.	1.0	нет	нет	нет	нет
4	Душица – гексан	0.29	нет	нет	нет	нет
5	Душица – этанол	3.5	нет	нет	нет	нет
6	Душица – водно-глицериновый	9.7	нет	нет	1.2	нет
7	Шалфей – гексан	0.57	0.02	0.02	0.04	0.04
8	Шалфей – этанол	5.24	нет	нет	0.16	нет
9	Шалфей – водно-глицериновый	6.7	нет	нет	нет	нет
Контроль	Линкомицин	4 мкг/мл	роста нет	Роста нет	–	роста нет

Примечание: штамм *Salmonella typhimurium* имеет множественную резистентность к антимикробным препаратам. В связи с этим положительный контроль в экспериментах с *Salmonella typhimurium* не использовался.

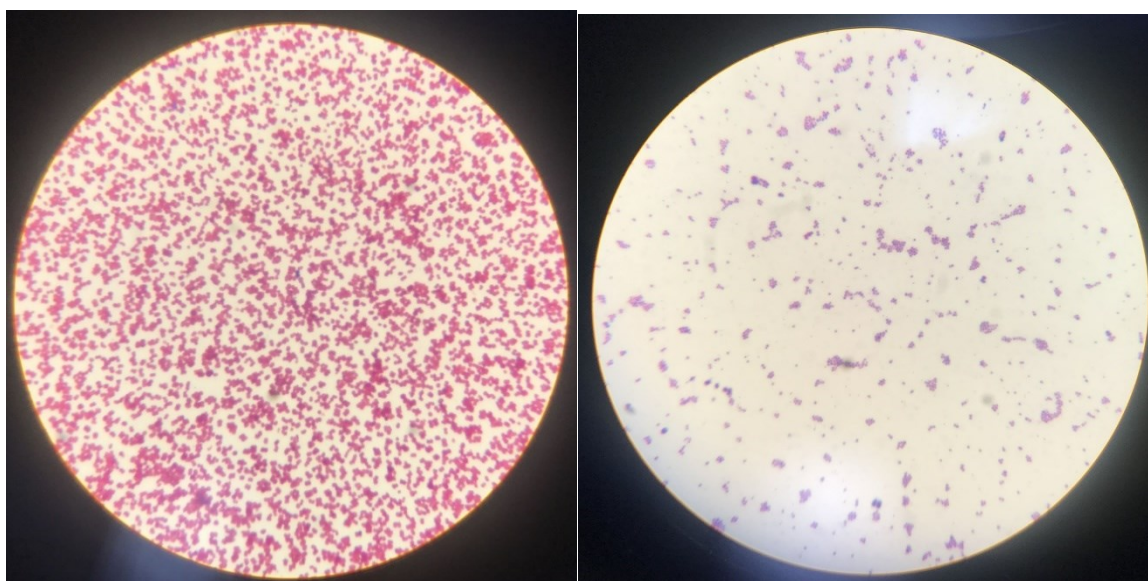


Рис. 2. *Salmonella typhimurium* ($\times 1000$). Слева контроль (бактериальная суспензия росла без добавления растительных экстрактов), справа – бактериальная суспензия росла при добавлении этанольного экстракта *Salvia officinalis*

Водно-глицериновой смесью наибольшее количество экстрактивных веществ извлекалось из сырья *Origanum vulgare* – $21.5 \pm 0.2\%$ на а.с.с. В отношении *Salmonella typhimurium* экстракты проявляли антибиотическую активность с МИС – 1.2 мг/мл. Бактерии *S. typhimurium* относятся к числу наиболее опасных микроорганизмов, вызывающих серьезные кишечные расстройства у людей. Многие штаммы сальмонелл устойчивы к современным антибиотикам и поэтому распространяются по всему миру. Так, внутрибольничный сальмонеллез – серьезная проблема в настоящее время. А в 80% случаев возбудитель нозокомиального (внутрибольничного) сальмонеллеза – это *S. typhimurium*. В связи с этим водно-глицериновые экстракты аэропонной травы *Origanum vulgare* можно рекомендовать вводить в состав кремов для рук.

Заключение

Задачей настоящего исследования являлось изучение влияния гормонального состава питательных сред на накопление основных групп вторичных метаболитов, ответственных за противомикробный эффект: флавоноидов, дубильных веществ и гидроксикоричных кислот у *Iris sibirica*, *Origanum vulgare* и *Salvia officinalis*, выращенных методами биотехнологии.

Для накопления флавоноидов $4.4 \pm 0.1\%$ у *I. sibirica* сорт Cambridge мы рекомендуем готовить среды с 2.5 мкМ БАП, дополненные ауксинами, так как использовать среды, содержащие 7.5–10.0 мкМ БАП, экономически не выгодно при высокой стоимости фитогормонов. Существенное влияние на величину суммы гидроксикоричных кислот оказывало не повышение содержания БАП от 1.0 до 10.0 мкМ, а введение ауксинов 1.0 мкМ НУК + 0.1 мкМ ИМК. Ауксины в сочетании с цитокинином БАП увеличивали сумму кислот в среднем на 20% в этанольных ($1.9 \pm 0.2\%$) и в водных ($1.46 \pm 0.06\%$) извлечениях из сырья *Iris sibirica*. Максимальный выход экстрактивных веществ, в том числе дубильных ($4.4 \pm 0.3\%$), наблюдали при выращивании сырья на средах с содержанием БАП 2.5–5.0 мкМ, наименьшее значение получали при БАП 10.0 мкМ. Введение ауксинов (1.0 мкМ НУК + 0.1 мкМ ИМК) значительного влияния на динамику накопления дубильных веществ не оказывало.

Скрининг химического состава лекарственного растительного сырья *Origanum vulgare* и *Salvia officinalis*, полученного методами биотехнологии, показал наличие флавоноидов $1.6 \pm 0.1\%$ и $3.2 \pm 0.04\%$, гидроксикоричных кислот 7.4% и 13.4% на а.с.с. соответственно.

Противобактериальная активность с минимальной ингибирующей концентрацией 0.02–0.04 мг/мл в отношении *Sporosarcina ureae*, *Bacillus pumilus*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* была ярко выражена у гексанового извлечения *Salvia officinalis*. Этанольный экстракт шалфея был активен против *Salmonella typhimurium*. Этанольные экстракты *Iris sibirica* и *Salvia officinalis* показали антибактериальную активность в отношении *Salmonella typhimurium*, МИС – 0.35 и 0.16 мг/мл соответственно. Ирис сибирский подавлял *Bacillus pumilus* при МИС – 0.7 мг/мл. Водно-глицериновой смесью наибольшее количество экстрактивных веществ извлекалось из сырья *Origanum vulgare* – $21.5 \pm 0.2\%$ на а.с.с. В отношении *Salmonella typhimurium* экстракты проявляли антибиотическую активность с МИС – 1.2 мг/мл.

Список литературы

1. Савченко И.В., Зайко Л.Н., Хазиева Ф.М., Цицилин А.Н. Масляков В.Ю. Научные основы создания устойчивой сырьевой базы для лекарственных фитопрепаратов // Зернобобовые и крупяные культуры. 2016. №2(18). С. 32–36.
2. Medicinal Plants Industry 2017 [Электронный ресурс]. URL: <http://tejasblog.blogspot.ru/2017/05/medicinal-plants-industry-2017.html>
3. Food and Agriculture Organization of the United Nations [Электронный ресурс]. URL: <http://www.fao.org/biodiversity/2010-international-year-of-biodiversity/en/>
4. Crozier A., Jaganath I.B., Clifford M.N. Phenols, polyphenols and tannins: an overview // Plant Second Metab Occur Struct Role Hum Diet. 2007. Pp. 1–24. DOI: 10.1002/9780470988558.ch1.
5. González-Lamothe R., Gabriel M., Mariza G., Moussa S.D., François M., Kamal B. Plant Antimicrobial Agents and Their Effects on Plant and Human Pathogens // Int. J. Mol. Sci. 2009. Vol. 10. Pp. 3400–3419. DOI: 10.3390/ijms10083400.
6. Radulovic N.S., Blagojevic P.D., Stojanovic-Radic Z.Z., Stojanovic N.M. Antimicrobial plant metabolites: structural diversity and mechanism of action // Curr. Med. Chem. 2013. Vol. 20. Pp. 932–952.
7. Буданова Е.В., Горленко К.Л., Киселев Г.Ю. Вторичные метаболиты растений: механизмы антибактериального действия и перспективы применения в фармакологии // Антибиотики и химиотерапия. 2019. Т. 64. С. 5–6. DOI: 10.24411/0235-2990-2019-100034.
8. Garvey M.I., Rahman M.M., Gibbons S., Piddock L.J.V. Medicinal plant extracts with efflux inhibitory activity against Gram-negative bacteria. Intern // J. Antimicrob. Agents. 2010. Vol. 37 (2). Pp. 145–151. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2010.10.027.
9. Paiva P.M.G., Gomes F.S., Napoleão Th. Antimicrobial activity of secondary metabolites and lectins from plants // Curr. Res. Technol. Educ. Top Appl. Microbiol. Microb. Biotechnol. 2010. Pp. 396–406.
10. Borges A., Ferreira C., Saavedra M.J., Simões M. Antibacterial Activity and Mode of Action of Ferulic and Gallic Acids Against Pathogenic Bacteria // Microb Drug Resist. 2013. Vol. 19. Pp. 256–265. DOI: 10.1089/mdr.2012.0244.
11. Omojate G.C., Enwa F.O., Jewo A.O., Eze C.O. Mechanisms of antimicrobial actions of phytochemicals against enteric pathogens-a review // J. Pharm. Chem. Biol. Sci. 2014. Vol. 2. Pp. 77–85.
12. Roger T., Pierre-Marie M., Igor V., Patrick V. Phytochemical screening and antibacterial activity of medicinal plants used to treat typhoid fever in Bamboutos division, West Cameroon // J. Appl. Pharm. Sci. 2015. Vol. 5 (06). Pp. 034–049. DOI: 10.7324/JAPS.2015.50606.
13. Зилфикаров И.Н., Жилин А.В. Определение дитерпеновых кислот в сырье и препаратах шалфея лекарственного // Фармация. 2007. №2. С. 7–9.
14. Калинин Ф.Л., Сарицацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. Киев, 1980. 488 с.
15. Murashige T., Skoog F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassaya with Tobacco Tissue cultures // Physiol. Plant. 1962. Vol. 15. N4. P. 473.

16. Тихомирова Л.И., Базарнова Н.Г., Ильичева Т.Н., Мартиросян Ю.Ц., Синицына А.А. Получение растительного сырья ириса сибирского (*Iris sibirica* L.) методами биотехнологии // Химия растительного сырья. 2018. №4. С. 235–245. DOI: 10.14258/jcrpm.2018043887.
17. Тихомирова Л.И., Щербакова Л.В., Пономарёва Я.В., Дробышева Е.А., Чукубаева А.Н. Перспективы получения сырья методами биотехнологии и анализ химического состава биомассы *Iris spuria* L. (Art And Soul) // Химия растительного сырья. 2019. №4. С. 315–326. DOI: 10.14258/jcrpm.2019046322.
18. Музычкина Р.А. Технология производства и анализ фитопрепаратов. Алматы, 2011. 360 с.
19. Гуляев Д.К., Белоногова В.Д. Машенко П.С. Разработка методики определения содержания гидроксикоричных кислот в корнях ели обыкновенной // Вестник ВГУ. Серия: химия, биология, фармация. 2019. №2. С. 80–86.
20. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам: методические указания. М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004. 91 с.
21. Pierozan M.K., Pauletti G.F., Rota L., Santos A.S.A., Lerin L., Di Luccio M., Mossi A.J., Atti-serafini. L., Cansian R.L., Oliveira J.A. Chemical characterization and antimicrobial activity of essential oils of *salvia* L. species // Ciência e Tecnologia de Alimentos. 2009. Vol. 29(4). Pp. 764–770.
22. Хазиев Р.Ш., Петрова Д.Н., Ситенков А.Ю. Новые подходы к стандартизации травы душицы // Бутлеровские сообщения. 2015. Т. 41. №3. С. 115–118.

Поступила в редакцию 21 декабря 2020 г.

После переработки 24 января 2021 г.

Принята к публикации 27 января 2021 г.

Для цитирования: Тихомирова Л.И., Щербакова Л.В., Ильичёва Т.Н., Базарнова Н.Г., Карпицкий Д.А. Получение лекарственного растительного сырья с заданным химическим составом и антибактериальной активностью // Химия растительного сырья. 2021. №2. С. 309–318. DOI: 10.14258/jcrpm.2021029043.

Tikhomirova L.I.^{1}, Shcherbakova L.V.¹, Ilyicheva T.N.², Bazarnova N.G.¹, Karpitsky D.A.¹* PREPARATION OF MEDICINAL PLANT RAW MATERIALS WITH A GIVEN CHEMICAL COMPOSITION AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY

¹ Altai State University, pr. Lenina, 61, Barnaul, 656049 (Russia), e-mail: L-tikhomirova@yandex.ru

² State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Koltsovo, Novosibirsk Region, 630559 (Russia)

A significant effect on the amount of hydroxycinnamic acids was not an increase in the content of bap from BA 1.0 to 10.0 μM , but the introduction of auxins of NAA 1.0 μM + IBA 0.1 μM . Auxins in combination with cytokinin BA increased the amount of acids by an average of 20% in alcoholic (1.9 \pm 0.2%) and aqueous (1.46 \pm 0.06%) extracts from *Iris sibirica* raw materials. The maximum yield of extractive substances, including tannins (4.4 \pm 0.3%) was observed when growing raw materials on media with a BA content of 2.5–5.0 μM , the lowest value was obtained with a BA of 10.0 μM . The introduction of auxins (NAA 1.0 μM + IBA 0.1 μM) did not significantly affect the dynamics of the accumulation of tannins.

Screening of the chemical composition of medicinal plant raw materials *Origanum vulgare* and *Salvia officinalis* obtained by biotechnology methods showed the presence of flavonoids of 1.6 \pm 0.1% and 3.2 \pm 0.04%, hydroxycinnamic acids of 7.4% and 13.4% at a.s.s., respectively.

Antibacterial activity with a minimum inhibitory concentration of 0.02–0.04 mg/ml against *Sporosarcina ureae*, *Bacillus pumilus*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* was pronounced in the hexane extract of *Salvia officinalis*. Ethanol extract of sage was active against *Salmonella typhimurium*. Ethanol extracts of *Iris sibirica* and *Salvia officinalis* showed antibacterial activity against *Salmonella typhimurium*, MIC-0.35 and 0.16 mg / ml, respectively. *Siberian iris* suppressed *Bacillus pumilus* at MIC-0.7 mg / ml. The largest amount of extractive substances was extracted from the raw materials of *Origanum vulgare* with an aqueous-glycerol mixture – 21.5 \pm 0.2 % per a. s. Against *Salmonella typhimurium*, the extracts showed antibiotic activity with MIC – 1.2 mg/ml.

Keywords: *Iris sibirica* L., secondary metabolites, regenerated plants, biotechnology for the production of medicinal plants, extraction method.

* Corresponding author.

References

1. Savchenko I.V., Zayko L.N., Khaziyeva F.M., Tsitsilin A.N. Maslyakov V.Yu. *Zernobobovyye i krupyanyye kul'tury*, 2016, no. 2(18), pp. 32–36. (in Russ.).
2. *Medicinal Plants Industry 2017*. URL: <http://tejasiblog.blogspot.ru/2017/05/medicinal-plants-industry-2017.html>
3. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*. URL: <http://www.fao.org/biodiversity/2010-international-year-of-biodiversity/en/>
4. Crozier A., Jaganath I.B., Clifford M.N. *Plant Second Metab Occur Struct Role Hum Diet.*, 2007, pp. 1–24. DOI: 10.1002/9780470988558.ch1.
5. González-Lamothe R., Gabriel M., Mariza G., Moussa S.D., François M., Kamal B. *Int. J. Mol. Sci.*, 2009, vol. 10, pp. 3400–3419. DOI: 10.3390/ijms10083400.
6. Radulovic N.S., Blagojevic P.D., Stojanovic-Radic Z.Z., Stojanovic N.M. *Curr. Med. Chem.*, 2013, vol. 20, pp. 932–952.
7. Budanova Ye.V., Gorlenko K.L., Kiselev G.Yu. *Antibiotiki i khimioterapiya*, 2019, vol. 64, pp. 5–6. DOI: 10.24411/0235-2990-2019-100034. (in Russ.).
8. Garvey M.I., Rahman M.M., Gibbons S., Piddock L.J.V. *J. Antimicrob. Agents*, 2010, vol. 37 (2), pp. 145–151. DOI: 10.1016/j.jantimicag.2010.10.027.
9. Paiva P.M.G., Gomes F.S., Napoleão Th. *Curr. Res. Technol. Educ. Top Appl. Microbiol. Microb. Biotechnol.*, 2010, pp. 396–406.
10. Borges A., Ferreira C., Saavedra M.J., Simões M. *Microb Drug Resist.*, 2013, vol. 19, pp. 256–265. DOI: 10.1089/mdr.2012.0244.
11. Omojate G.C., Enwa F.O., Jewo A.O., Eze C.O. *J. Pharm. Chem. Biol. Sci.*, 2014, vol. 2, pp. 77–85.
12. Roger T., Pierre-Marie M., Igor V., Patrick V. *J. Appl. Pharm. Sci.*, 2015, vol. 5 (06), pp. 034–049. DOI: 10.7324/JAPS.2015.50606.
13. Zil'fkarov I.N., Zhilin A.V. *Farmatsiya*, 2007, no. 2, pp. 7–9. (in Russ.).
14. Kalinin F.L., Sariatskaya V.V., Polishchuk V.Ye. *Metody kul'tury tkaney v fiziologii i biokhimii rasteniy*. [Tissue culture methods in plant physiology and biochemistry]. Kiev, 1980, 488 p. (in Russ.).
15. Murashige T., Skoog F. *Physiol. Plant.*, 1962, vol. 15, no. 4, p. 473.
16. Tikhomirova L.I., Bazarnova N.G., Il'icheva T.N., Martirosyan Yu.Ts., Sinitsyna A.A. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2018, no. 4, pp. 235–245. DOI: 10.14258/jcprm.2018043887. (in Russ.).
17. Tikhomirova L.I., Shcherbakova L.V., Ponomarova Ya.V., Drobysheva Ye.A., Chukubayeva A.N. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2019, no. 4, pp. 315–326. DOI: 10.14258/jcprm.2019046322. (in Russ.).
18. Muzychkina R.A. *Tekhnologiya proizvodstva i analiz fitopreparatov*. [Production technology and analysis of phyto-preparations]. Almaty, 2011, 360 p. (in Russ.).
19. Gulyayev D.K., Belonogova V.D. Mashchenko P.S. *Vestnik VGU, seriya: khimiya, biologiya, farmatsiya*, 2019, no. 2, pp. 80–86. (in Russ.).
20. *Opredeleniye chuvstvitel'nosti mikroorganizmov k antibakterial'nym preparatam: metodicheskiye ukazaniya*. [Determination of the sensitivity of microorganisms to antibacterial drugs: Guidelines]. Moscow, 2004, 91 p. (in Russ.).
21. Pierozan M.K., Pauletti G.F., Rota L., Santos A.S.A., Lerin L., Di Luccio M., Mossi A.J., Atti-serafini L., Cansian R.L., Oliveira J.A. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 2009, vol. 29(4), pp. 764–770.
22. Khaziyev R.Sh., Petrova D.N., Sitenkov A.Yu. *Butlerovskiye soobshcheniya*, 2015, vol. 41, no. 3, pp. 115–118. (in Russ.).

Received December 21, 2020

Revised January 24, 2021

Accepted January 27, 2021

For citing: Tikhomirova L.I., Shcherbakova L.V., Ilicheva T.N., Bazarnova N.G., Karpitsky D.A. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2021, no. 2, pp. 309–318. (in Russ.). DOI: 10.14258/jcprm.2021029043.