

ИЗУЧЕНИЕ АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ ЭКСТРАКТОВ ЛУКА МЕДВЕЖЬЕГО (*ALLIUM URSINUM* L.) (ЧЕРЕМШИ)

Манукян К.А.¹, Компанцева Е.В.¹, Шаталова Т.А.¹, Мазурина М.В.¹, Айрапетова А.Ю.¹

¹Пятигорский медико-фармацевтический институт - филиал ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения России, Пятигорск, Россия (357532, г. Пятигорск, пр. Калинина, 11), e-mail: asgood@mail.ru

Разработан способ получения средства (экстракта) из надземной части свежесобранной черемши (лука медвежьего - *Allium ursinum* L., семейство луковые - *Alliaceae*), собранной на Северном Кавказе в марте 2011 года. Предварительно изучали числовые показатели и количественное содержание органических серосодержащих соединений в исследуемом сырье. Температурный режим, продолжительность экстракции и экстрагент выявлены экспериментально и гарантируют оптимальность технологического процесса. Оценку качества полученных экстрактов проводили по показателям: описание, подлинность и количественное определение серосодержащих соединений, концентрация спирта, сухой остаток. Эффективность антимикробного действия оценивали по методу, основанному на способности биологически активных соединений лука медвежьего диффундировать в агар, зараженный тест-культурами микроорганизмов, с подавлением роста последних. Выявлено выраженное антимикробное действие разработанного экстракта в отношении *St. aureus*, *St. epidermidis* Wood-46, *Shigella sonnei*, *Bacillus anthracoides* – 96, *Pseudomonas aeruginosa* и др.

Ключевые слова: лук медвежий (черемша), экстракты, числовые показатели экстракта, антимикробная активность.

STUDY OF ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF BEARISH ONION EXTRACT (*ALLIUM URSINUM* L.)

Manukyan K.A.¹, Kompantseva E.V.¹, Shatalova T.A.¹, Mazurina M.V.¹, Ayrapetova A.Y.¹

¹Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute, a branch of GBOU VPO "Volgograd State Medical University" of the Ministry of Health of Russia, Pyatigorsk, Russia (357,532, Pyatigorsk, pr.Kalinina, 11), e-mail: asgood@mail.ru

A method of obtaining medicine (extract) from the aerial parts of fresh ramson (bear's garlic-*Allium ursinum* L., onion family-*Alliaceae*), collected in the North Caucasus in March of 2011 is developed. Quality parameters and quantity of organic sulfur-containing compounds and flavonoids in the test material were previously determined. Temperature, duration of extraction and the extractant are identified experimentally and guarantee optimal technological process. The quality of the obtained extracts is assessed. Antimicrobial effect is evaluated by the method based on the ability of biologically active compounds of bear's garlic to diffuse into agar infected with the test cultures of microorganisms, watching the growth suppression of the latter. A pronounced antimicrobial activity of the extract against the developed sort *St. aureus*, *St. epidermidis* Wood-46, *Shigella sonnei*, *Bacillus anthracoides* - 96, *Pseudomonas aeruginosa* and other is found.

Keywords: onions bear-*Allium ursinum*, extracts, the amounts extract antimicrobial activity.

Введение

Черемша, или лук медвежий - дикорастущий вид лука, многолетнее травянистое растение семейства лилейных. Известны два вида дикого лука, называемые черемшой: лук победный (*Allium victoralis* L.), произрастающий в Сибири и на Дальнем Востоке, а также лук медвежий (*Allium ursinum* L.), который распространен в Прибалтике, Полесье, Карпатах, Молдавии, а также на Кавказе. Как лекарственное растение черемшу применяют в России только в народной медицине, однако за рубежом препараты лука медвежьего широко используются для профилактики и в комплексном лечении атеросклероза, различных кишечных инфекционных заболеваний, как противоглистное, противогрибковое

и антимикробное средство [3; 7; 8]. Надземная часть растения содержит эфирное масло, витамин С (до 150 мг%), органические серосодержащие соединения, основными среди которых являются S-алкилпроизводные цистеина, липиды и высшие жирные кислоты, фитонциды.

Из немногочисленных фитонцидных антибактериальных средств, полученных на основе растительного сырья, известны спиртовая настойка из репчатого лука («Аллилчеп»), таблетки с порошком чеснока «АлисаТ», жидкий спиртовой экстракт чеснока «Аллилсат» и некоторые другие [5].

Для расширения ассортимента препаратов антимикробного действия были разработаны технологии экстрактов из надземной части лука медвежьего.

Целью настоящей работы явилась разработка технологии и анализа лука медвежьего (черемши) надземной части экстрактов жидких с использованием спирта этилового различной концентрации, определение их антимикробной активности.

Материалы и методика. Для исследований были использованы образец сырья – свежие надземные части лука медвежьего (*Allium ursinum* L.), собранные в 2011 г. на Северном Кавказе.

Предварительно нами был проведен выбор концентрации экстрагента. Для этого нами были получены извлечения из свежего сырья черемши с использованием 40, 70, 90%-ного спирта этилового. Надземную часть черемши измельчали, свежеполученную кашицу помещали в герметически закрывающийся перколятор, заливали спиртом этиловым соответствующей концентрации в соотношении 1:50 и настаивали 3 часа при комнатной температуре. Полученную вытяжку сливали.

Извлечения анализировали на содержание сухого остатка [1], суммы органических серосодержащих соединений и флавоноидов.

Оценку суммы органических сульфидов проводили в извлечениях с использованием спирта этилового 40, 70 и 96%-ного, по методике анализа, основанной на взаимодействии неорганических сульфидов с n-амино-NN-диэтиланилин-сульфатом в присутствии ионов железа (III), с образованием красителя, спектр поглощения которого должен иметь максимум при длине волны 670 ± 2 нм [4].

Количественное определение флавоноидов в полученных извлечениях проводили методом дифференциальной спектрофотометрии, основанной на реакции комплексообразования флавоноидов с алюминия хлоридом. Происходит батохромный сдвиг полосы поглощения флавоноидов от 330-350 до 390-450 нм, что дает возможность исключить влияние сопутствующих компонентов [2].

В качестве способа получения экстрактов была выбрана трехступенчатая экстракция (ремацерация), используемая для получения экстрактов из свежего сырья чеснока посевного [6]. Экстракт готовили с использованием спирта этилового (40, 70, 90%) в соотношении 1:3. Черемшу измельчали, свежеполученную кашицу помещали в герметически закрывающийся перколятор, заливали спиртом этиловым соответствующей концентрации в соотношении 1:1,5 и настаивали 1 час при комнатной температуре. Полученную вытяжку сливали, в перколятор наливали вторую порцию спирта в количестве 75 мл и настаивание повторяли еще раз. По истечении 2-х часов вытяжку сливали и настаивание повторяли в третий раз с 75 мл экстрагента. По истечении 3-х часов и слива вытяжки мезгу отжимали в прессе и отжим присоединяли к вытяжкам, собранным в общий отстойник. Экстракт отстаивали в течение 48 ч и проверяли содержание сухого остатка и серосодержащих веществ.

Полученные экстракты исследовали на противомикробную активность. При изучении антимикробных свойств целевого продукта изучали: экстракты черемши (лука медвежьего - *Allium ursinum* L.) спиртовые жидкие, полученные с использованием 40, 70, 90%-ного спирта этилового, экстракт чеснока жидкий спиртовый «Аллилсат». При исследовании антимикробной активности целевого продукта использовали метод, основанный на способности лекарственных веществ диффундировать в агар, зараженный тест-культурами микроорганизмов, и подавлять рост последних [1]. Определение активности изучаемых экстрактов проводили в 3-х чашках Петри одинакового диаметра с плоским дном. В чашки, устанавливаемые горизонтально, наливали по 15 мл расплавленного питательного агара. Слой агара в чашке Петри заливали 1-2 мл взвеси испытуемого микроба в физиологическом растворе. Затем излишек взвеси полностью удаляли, подсушивали поверхность агара в течение 30 минут. Затем сверлом (6 мм диаметром) пробурывали 6 отверстий («колодцев») на расстоянии 2,5 см от центра и на одинаковом расстоянии друг от друга, «колодцы» заполняли образцами экстрактов и растворителем в соответствующей концентрации (контроль). Чашки оставляли при комнатной температуре на 30 минут, после чего их ставили в термостат при температуре 37 °С, не переворачивая, строго горизонтально, чтобы получить круглые зоны. Под крышки чашки Петри помещали стерильный фильтр во избежание попадания конденсата на лунки. Зоны угнетения измеряли через 16 часов. Оценка результатов проводилась по диаметру зон задержки роста вокруг «колодца», включая диаметр самого «колодца»: отсутствие зоны задержки роста – испытуемая культура не чувствительна к данной концентрации препарата; диаметр зоны задержки роста 10 мм – умеренная чувствительность культуры к данной концентрации препарата; диаметр зоны

задержки роста более 10 мм – высокая чувствительность испытуемой культуры к данной концентрации препарата.

После выбора экстрагента экстракт черемши надземной части готовили с использованием спирта этилового (40%) в соотношении 1:3. Черемшу измельчали, свежеполученную кашицу помещали в герметически закрывающийся перколятор, заливали спиртом этиловым соответствующей концентрации в соотношении 1:1,5 и настаивали 1 час при комнатной температуре. Полученную вытяжку сливали, в перколятор наливали вторую порцию спирта в количестве 75 мл и настаивание повторяли еще раз. По истечении 2-х часов вытяжку сливали и настаивание повторяли в третий раз с 75 мл экстрагента. По истечении 3-х часов и слива вытяжки мезгу отжимали в прессе и отжим присоединяли к вытяжкам, собранным в общий отстойник. Экстракт отстаивали в течение 48 ч и анализировали на содержание сухого остатка, серосодержащих веществ, спирта этилового.

Результаты. Спектры поглощения органических сульфидов лука медвежьего в извлечениях (спирт этиловый 40, 70 и 96%) с *n*-амино-*N,N*-диэтиланилин-сульфатом в присутствии ионов железа (III) представлены на рисунке 1.

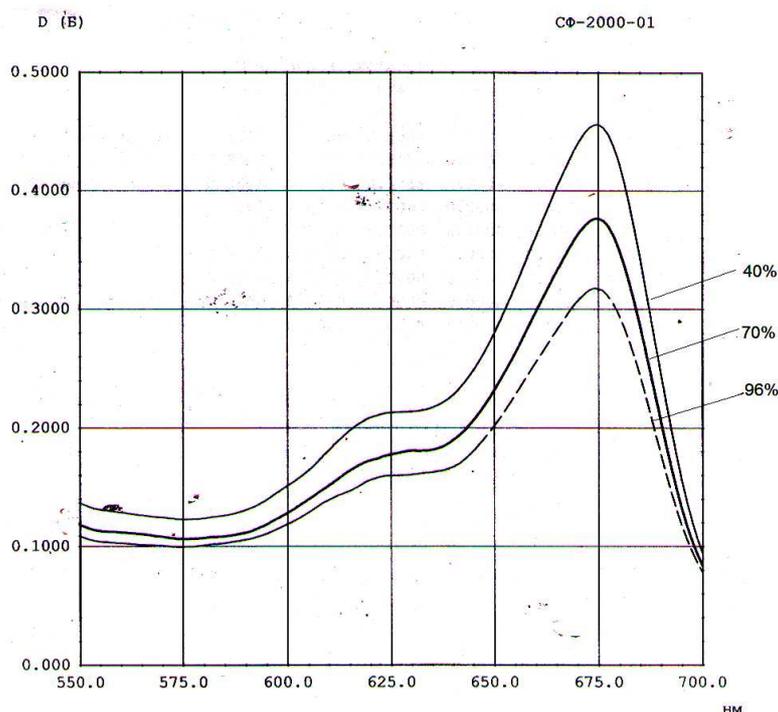


Рисунок 1 – Спектры поглощения органических сульфидов лука медвежьего в извлечениях (спирт этиловый 40, 70 и 96%) с *n*-амино-*N,N*-диэтиланилин-сульфатом в присутствии ионов железа (III)

Дифференциальный спектр поглощения флавоноидов лука медвежьего с алюминия хлоридом представлен на рисунке 2.

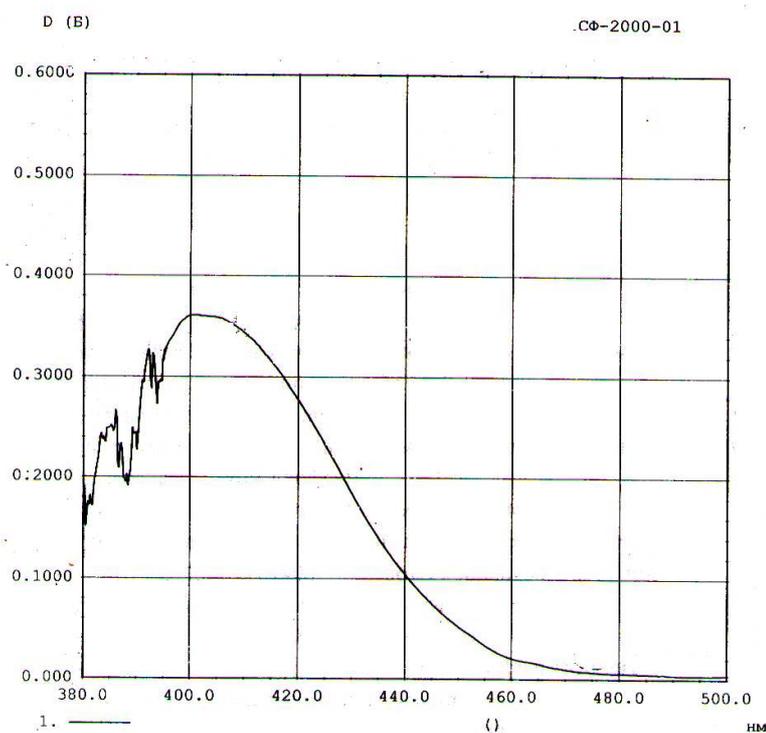


Рисунок 2 – Дифференциальный спектр поглощения флавоноидов лука медвежьего с алюминия хлоридом

Итоговые результаты по анализу извлечений представлены в таблице 1.

Таблица 1 - Результаты анализа извлечений, полученных со спиртом разной концентрации

№ п/п	Концентрация экстрагента, %	Сухой остаток, %	Сумма органических сульфидов, %	Сумма флавоноидов, %
1	40	11,41	6,08	0,046
2	70	10,63	5,79	0,048
3	96	5,65	4,67	0,026

Результаты эксперимента, представленные в таблице 1, показывают, что применение в качестве экстрагента спирта этилового 40%-ного гарантирует максимальную экстракцию действующих веществ. Температурный режим, продолжительность экстракции и экстрагент выявлены экспериментально и позволяют оптимизировать технологический процесс. Таким образом, в качестве способа экстрагирования была выбрана ремацерация [6], в качестве условий экстрагирования выбрано соотношение фаз 1:3, время экстрагирования 1 час на каждой ступени экстракции.

Исследования показали, что водно-спиртовые экстракты черемши представляли собой прозрачные жидкости от светло- до темно-зеленого цветов, с характерным чесночным запахом и жгучим вкусом. Содержание суммы органических сульфидов в экстракте

составило $6,08 \pm 0,21\%$; сухих веществ – $11,41 \pm 0,23\%$; спирта этилового – $30 \pm 1\%$; флавоноидов, в пересчете на рутин – $0,046 \pm 0,001\%$.

Результаты изучения антимикробности активности полученного экстракта черемши представлены в таблице 2.

Таблица 2 - Результаты антибактериального действия экстрактов черемши*

Спирт этиловый	Диаметр зоны задержки роста тест-культур микроорганизмов, мм										
	1*	2*	3*	4*	5*	6*	7*	8*	9*	10*	11*
Экстракт черемши (лук медвежий)											
40%	32	30	33	32	28	25	28	29	32	28	29
70%	22	18	12	14	13	12	15	14	19	12	14
90%	10	10	10	10	12	13	17	15	17	11	13
Контроль (экстракт чеснока «Аллилсат»)											
90%	9	9	9	9	9	9	10	10	10	10	10

Примечание: *- используемые тест-культуры:

1. *Staphylococcus aureus* (209);
2. *Staphylococcus aureus* (Макаров);
3. *Staphylococcus aureus* (Type);
4. *Staphylococcus epidermidis* Wood-46;
5. *Escherichia coli* 675;
6. *Escherichia coli* 055;
7. *Salmonella galenarum*;
8. *Bacillus subtilis* L₂;
9. *Bacillus anthracoides* – 1;
10. *Bacillus anthracoides* –96;
11. *Proteus vulgaris*.

Результаты исследований, представленные в таблице 2, показывают, что экстракт черемши, полученный с использованием 40%-ного спирта этилового, обладает выраженным антимикробным действием в отношении грамположительных кокков рода *Staphylococcus*; *Escherichia coli* и *Salmonella galenarum*; спорообразующих микроорганизмов рода *Bacillus*: *Bacillus anthracoides* – 96; *Bacillus anthracoides*; *Bacillus subtilis*, а также *Proteus vulgaris*. Активность 40%-ного экстракта черемши превышает активность экстрактов черемши, полученных экстрагированием сырья 70 и 90%-ным спиртом этиловым.

Выводы

1. Изучены оптимальные условия экстракции основных биологически активных соединений (органических сульфидов и флавоноидов) с использованием спирта этилового различной концентрации (40, 70 и 96%).
2. Разработан способ получения экстракта лука медвежьего с использованием спирта этилового 40%-ного.
3. Проведена оценка качества полученных экстрактов по показателям: описание, содержание спирта и сухого остатка, количественное содержание серосодержащих органических соединений и флавоноидов.
4. Изучена сравнительная антимикробная активность экстрактов лука медвежьего с использованием спирта этилового 40, 70 и 90%-ного. Установлено, что все экстракты обладают выраженным антимикробным действием в отношении грамположительных кокков рода *Staphylococcus*; *Escherichia coli* и *Salmonella galenarum*; спорообразующих микроорганизмов рода *Bacillus*: *Bacillus anthracoides* – 96; *Bacillus anthracoides*; *Bacillus subtilis*, а также *Proteus vulgaris*.

Список литературы

1. Государственная фармакопея Российской Федерации. – 12-е изд. - М. : Научный центр экспертизы средств медицинского применения. - 2008. - Ч. 1. - С. 160-180.
2. Беликов В.В. Избирательный метод анализа флавоноидов в фитохимических препаратах / В.В. Беликов, Т.В. Точкова, Л.Г. Колесник // Проблемы стандартизации и контроля качества лекарственных средств : материалы докл. Всесоюз. конф. - М., 1991. – Т. 2. Ч 2. – С. 13-14.
3. Жирнокислотный состав липидов лука медвежьего (*Allium ursinum* L.) / Л.С. Ушакова [и др.] // Пути и формы совершенствования фармацевтического образования. Поиск новых физиологически активных веществ : материалы 4-й Всерос. с междунар. участием научно-метод. конф. «Фармобразование-2010» (20-21 апреля 2010 г.). - Воронеж, 2010. - Ч. 2.- С. 383-385.
4. Косян А.М. Спектрофотометрический метод определения органических сульфидов чеснока // Хим-фармац. журнал. - 1985. - № 2. - С. 1463-1465.
5. Машковский М.Д. Лекарственные средства : справочное издание. - 15-е изд., перераб., испр. и доп. – М. : Новая волна, 2006. – С. 962.
6. Муравьев И.А. Технология лекарств : учебник. В 2-х т. - М. : Медицина, 1980. - Т. 1. - С. 212-213.

7. Селютина И.Ю. Биологически активные вещества видов рода *Allium* L. (Alliaceae) // Сибирский ботанический вестник : электронный журнал. - 2007. - Т. 2. - Вып. 2. - С. 79-86.
8. Block E. The organosulfur chemistry of the genus *Allium* - implications for the organic chemistry of sulfur // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* – 1992. - № 31. – P. 11-12.

Рецензенты:

Василенко Ю.К., д.м.н., профессор, профессор кафедры биохимии и микробиологии, Пятигорский медико-фармацевтический институт, филиал ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г.Пятигорск.

Конониди И.П., д.фарм.н., доцент, доцент кафедры органической химии Пятигорского медико-фармацевтического института филиала ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г.Пятигорск.