

ИЗУЧЕНИЕ АНТИМИКРОБНОЙ И АНТИМИКОТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ВИТАМИННЫХ СБОРОВ И ПРЕПАРАТОВ НА ИХ ОСНОВЕ

Жилкина В.Ю.¹, Сачивкина Н.П.¹, Марахова А.И.¹, Романова Е.В.¹, Жилкина В.И.²,
Шацких Е.Н.², Станишевский Я.М.¹

¹ФГАОУ ВО Российский университет дружбы народов, Москва, e-mail: vera20891@mail.ru;

²Медицинский университет "Реавиз", Москва

Изучена антимикробная и антимикотическая активность витаминных сборов № 1 и № 2. Анализу подверглись суммарные водные и спиртовые извлечения из сборов – витаминного сбора № 1 (плоды шиповника и плоды черной смородины 1:1) и витаминного сбора № 2 (плоды шиповника и плоды рябины 1:1). Было установлено содержание суммы органических кислот, поддерживающих рост нормальной микрофлоры кишечника, и содержание кислоты аскорбиновой, стимулирующей неспецифический иммунитет. Определено содержание суммы дубильных веществ. Оценку антимикробной и антимикотической активности проводили методом диффузии в агар в отношении микроорганизмов *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* и дрожжевых грибов *Candida albicans*. В качестве препарата сравнения для оценки антимикробной активности был выбран бензилпенициллин. Установлено, что водные и спиртовые извлечения сборов витаминных № 1 и № 2 оказывают антимикробную и антимикотическую активность в отношении *Staphylococcus aureus* и *Candida albicans*. В отношении *Escherichia coli* ингибирующую активность проявляют только спиртовые извлечения.

Ключевые слова: антимикробная активность, антимикотическая активность, антибиотикорезистентность, витаминные сборы, плоды шиповника, плоды рябины, плоды черной смородины, органические кислоты, кислота аскорбиновая, дубильные вещества.

ANALYSIS OF ANTIMICROBIAL AND ANTIFUNGAL ACTIVITIES IN MIXTURES OF VITAMIN RAW MATERIAL AND THEIR DRUGS

Zhilkina V. Yu.¹, Sachivkina N. P.¹, Marakhova A. I.¹, Romanova E. V.¹, Zhilkina V. I.²,
Shatskikh E. N.², Stanishevskii Ya. M.¹

¹Peoples' Friendship University, Moscow, e-mail: vera20891@mail.ru;

²Medical university "REAVIZ", Moscow

The antimicrobial and antimycotic activities of mixtures of vitamin raw material № 1 and № 2 were studied. Analysis were conducted on both total aqueous and alcoholic extracts of species - mixture of vitamin raw material №1 (fructus rosae and fructus ribis nigri, 1:1) and mixture of vitamin raw material №2 (fructus rosae and fructus sorbi, 1:1). The concentrations of organic acids, which support the growth of normal intestinal microflora, and ascorbic acid, which stimulate nonspecific immunity were found. The content of total tannins was also found. The assessment of antimicrobial and antimycotic activity was conducted by the method of diffusion on agar against microorganisms *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and yeast fungi *Candida albicans*. As a comparison, the drug used for the evaluation of antimicrobial activity, was benzylpenicillin. It was found that water and alcohol extractions of mixtures of vitamin raw material №1 and №2 have antimicrobial and antimycotic activity against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. Regarding *Escherichia coli*, the inhibitory activity was shown only in alcohol extractions.

Keywords: antimicrobial activity, antimycotic activity, antibiotic resistance, of mixture of vitamin raw material, fructus rosae, fructus sorbi, fructus ribis nigri, organic acids, ascorbic acid, tannins.

По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), поиск новых средств, обладающих антибактериальной активностью, является актуальной задачей современной медицины. Проблема появления резистентных к антибиотикам штаммов микроорганизмов представляет собой серьезную опасность в каждом регионе мира. В феврале 2017 года ВОЗ опубликовала список устойчивых к действию антибиотиков микроорганизмов, разделив их на категории приоритетности. К первой категории отнесен стафилококк золотистый,

проявляющий резистентность ко многим видам антибиотиков, в том числе бензилпенициллинового ряда. Этот список призван стать ориентиром и стимулом для научных исследований и разработок по борьбе с набирающей масштаб проблемой резистентности к антимикробным препаратам [1].

В настоящее время для лечения бактериальных инфекций используют антибиотики, применение которых сопряжено с широким спектром побочных эффектов, ограничением применения у детей и беременных. Решением проблемы повышения эффективности лечения бактериальных инфекций может стать применение средств на основе растительных биологически активных соединений (БАС). Часто БАС комплексно влияют на патологию, устраняя не один, а сразу несколько симптомов, например, оказывают дополнительно противовоспалительное, витаминное, иммуномодулирующее действие. Растительные средства, содержащие комплекс БАС, не позволяют бактериям приобрести резистентность, так как фармацевтическую активность имеет не одно соединение, а их комплекс, потенцирующий действие основных компонентов.

Авторами было установлено, что настойки на основе витаминных сборов № 1 и № 2 содержат фенольные соединения, обладающие антимикробными свойствами. Также спиртовые и водные извлечения богаты органическими кислотами, в том числе яблочной, лимонной и другими кислотами, стимулирующими клеточное дыхание и рост нормальной кишечной микрофлоры, отвечающей за иммунитет [2]. Аскорбиновая кислота, присутствующая в значительных количествах в компонентах сборов, способствует коррекции иммунитета и снижает проницаемость стенок сосудов [3].

Материалы и методы. Объектами исследования служили настои и настойки из витаминных сборов № 1 и № 2. Витаминный сбор № 1 состоит из плодов шиповника и плодов черной смородины 1:1, витаминный сбор № 2 состоит из плодов шиповника и плодов рябины обыкновенной 1:1. Настои готовили согласно методике общей фармакопейной статьи ГФХIII «Настои и отвары» [4]. Настойки получали методом перколяции с использованием в качестве экстрагента спирта этилового с различными концентрациями – 70 %, 50 % и 40 %. Соотношение «сырье : экстрагент» составило 1:5, продолжительность экстракции – от 24 до 48 ч. Настойки получали в соответствии со следующей методикой. Измельченное сырье витаминного сбора № 1 или № 2 массой 20 г (точная навеска) помещали в экстрактор. Отмеряли 100 мл 70 % (50 %, 40 %) этанола. Навеску сырья в экстракторе заливали небольшим количеством экстрагента на 1 час для набухания. Переносили содержимое экстрактора в перколятор и заливали экстрагентом «до зеркала», настаивали в течение 24 часов. 1/3 часть извлечения сливали, к содержимому перколятора добавляли оставшееся количество экстрагента «до зеркала», настаивали 24 часа. Извлечение сливали.

Вытяжки объединяли, и полученное извлечение оставляли на 1 сутки при температуре 8 °С. Затем фильтровали через воронку с 3-ым слоем марли.

Сумму органических кислот в настоях и настойках определяли титриметрическим методом с применением индикаторов по методике ГФ XI издания (ФС 38 «Шиповника плоды»). На титрование брали 10 мл извлечения, добавляли смесь индикаторов и титровали раствором едкого натра до появления в пене лилово-красной окраски. Для определения содержания кислоты аскорбиновой в анализируемых образцах применяли титриметрический метод со смесью индикаторов по методике, представленной в частной фармакопейной статье ФС 38 «Шиповника плоды» [3, 5]. Результаты определения представлены в таблице 1.

Таблица 1

Содержание суммы органических кислот и кислоты аскорбиновой в препаратах из витаминных сборов № 1 и № 2, установленное методом индикаторного титрования

$n = 5; p = 0,95$

Объект исследования	Лекарственная форма	Сумма органических кислот, в пересчете на яблочную кислоту, %	Содержание кислоты аскорбиновой, мг/мл
Витаминный сбор №1	настой	0,28±0,01	--
	настойка 40 %	5,67±0,03	0,24±0,01
	настойка 50 %	5,61±0,03	0,17±0,02
	настойка 70 %	4,59±0,05	0,13±0,02
Витаминный сбор №2	настой	0,26±0,01	--
	настойка 40 %	3,75±0,03	0,11±0,01
	настойка 50 %	3,52±0,05	0,15±0,01
	настойка 70 %	3,48±0,05	0,08±0,02

Сумму дубильных веществ (фенольных соединений) определяли по методике ГФ XIII изд. ОФС «Определение содержания дубильных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах», метод 1[6]. Полученные данные представлены в таблице 2.

Таблица 2

Содержание суммы дубильных веществ в препаратах из витаминных сборов № 1 и № 2, установленное методом индикаторного титрования $n = 5; p = 0,95$

Объект исследования	Лекарственная форма	Сумма дубильных веществ, в пересчете на танин, %
Витаминный сбор №1	настой	1,17±0,06
	настойка 40 %	2,08±0,05
	настойка 50 %	1,41±0,03
	настойка 70 %	0,95±0,09
Витаминный сбор №2	настой	1,38±0,01
	настойка 40 %	1,78±0,07
	настойка 50 %	1,58±0,04
	настойка 70 %	1,89±0,03

Была разработана методика потенциметрического титрования суммы органических кислот в настоях и настойках, полученных из витаминных сборов № 1 и № 2. В соответствии с методикой, в мерный стакан с помощью пипетки отмеряли 25 мл извлечения, опускали стеклянный электрод, присоединенный к соответствующему входу на рН-метре. Титровали 0,1 М раствором натрия гидроксида микробюреткой, при постоянном перемешивании с помощью магнитной мешалки. По показаниям потенциметра строили кривые титрования в координатах рН(V) для определения точки эквивалентности [3, 6]. Результаты эксперимента представлены в таблице 3.

Таблица 3

Содержание суммы органических кислот в препаратах из витаминных сборов № 1 и № 2, установленное методом потенциметрического титрования $n = 5$; $p = 0,95$

Объект исследования	Лекарственная форма	Сумма органических кислот, в пересчете на яблочную кислоту, %
Витаминный сбор №1	настой	0,27±0,06
	настойка 40 %	2,08±0,05
	настойка 50 %	3,75±0,03
	настойка 70 %	5,61±0,09
Витаминный сбор №2	настой	0,23±0,01
	настойка 40 %	2,09±0,07
	настойка 50 %	1,75±0,04
	настойка 70 %	1,55±0,03

Из представленных данных в таблицах 1 и 3 можно заключить, что методы потенциметрии и ГФ дают сходимые результаты в анализе настоев из витаминных сборов № 1 и № 2. Сравнение данных о сумме органических кислот в настойках, полученных индикаторным и потенциметрическим титрованием, показало преимущество потенциметрического детектирования конечной точки титрования (к.т.т.). Визуальная индикация к.т.т., в силу различных характеристик глаза человека и вследствие собственной окраски извлечения, затруднена, в связи с этим индикаторное титрование дает завышенные результаты.

При изучении антимикробной и антимикотической активности препаратов на основе витаминных сборов № 1 и № 2 использовали штаммы микроорганизмов *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* и дрожжевых грибов *Candida albicans*. Посев производили «газоном». Антимикробную и антимикотическую активность растительных препаратов определяли методом Кирби-Бауэра, диффузией пропитанных препаратами дисков фильтровальной бумаги в твердые питательные среды.

Определение антимикробной активности настоев и настоек витаминных сборов № 1 и № 2, в отношении штамма *Staphylococcus aureus*, осуществляли по следующей методике. На

пластину мясопептонного агара толщиной 5 мм с помощью шпателя высевали «газоном» штамм *Staphylococcus aureus*, затем диффундировали в агар диски, пропитанные настойками с различной концентрацией экстрагента. По такому же принципу диффундировали в агар диски, пропитанные настоями витаминных сборов. В качестве сравнения на агар с этой же культурой микроорганизмов помещали диски, пропитанные антибиотиком бензилпенициллином [7].

Антимикробную активность препаратов на основе витаминных сборов, в отношении штамма *Escherichia coli*, определяли на твердой питательной среде «Эндо». На пластину «Эндо» толщиной 5 мм с помощью шпателя высевали «газоном» штамм *Escherichia coli*, затем диффундировали в агар диски, пропитанные настойками с различной концентрацией экстрагента, и диски, пропитанные настоями витаминных сборов № 1 и № 2.

Антимикотическую активность анализируемых фитопрепаратов, в отношении штамма *Candida albicans*, определяли на твердой питательной среде «Сабуро». Для этого на пластину среды «Сабуро» толщиной 5 мм с помощью шпателя высевали «газоном» *Candida albicans*, затем помещали в среду диски, пропитанные настойками с различной концентрацией экстрагента. Также диффундировали диски, пропитанные настоями витаминных сборов.

Чашки Петри со средами ставили в термостат при температуре 37 °С. Через 24 часа определяли антимикробную и антимикотическую активность по зоне задержки роста тест-культур в миллиметрах. Единицы действия (ЕД) анализируемых настоев и настоек в пересчете на бензилпенициллин определяли по калибровочному графику действия бензилпенициллина на *Staphylococcus aureus*, на котором по оси абсцисс отмечали диаметр зоны задержки роста микроорганизмов, по оси ординат – единицы действия бензилпенициллина (табл. 4).

Экспериментально было установлено, что настои и предлагаемые нами настойки на основе витаминных сборов № 1 и № 2 обладают ингибирующей активностью по отношению к штаммам *Staphylococcus aureus* и *Candida albicans*. Данные по антимикробной и антимикотической активности представлены в таблицах 4 и 5, соответственно.

Таблица 4

Результаты установления антимикробной активности препаратов витаминных сборов по отношению к штамму *Staphylococcus aureus*

Объект исследования	Лекарственная форма	Зона задержки роста <i>St. aur.</i> , мм	ЕД настойки, в пересчете на бензилпенициллин
Витаминный сбор №1	настой	15	375
	настойка 40 %	15	375
	настойка 50 %	15	375
	настойка 70 %	15	375
Витаминный	настой	12	280

сбор №2	настойка 40 %	12	280
	настойка 50 %	12	280
	настойка 70 %	12	280

Таблица 5

Результаты установления антимикотической активности препаратов витаминных сборов по отношению к штамму *Candida albicans*

Объект исследования	Лекарственная форма	Зона задержки роста <i>C. alb.</i> , мм
Витаминный сбор № 1	настой	9
	настойка 40 %	9
	настойка 50 %	10
	настойка 70 %	10
Витаминный сбор № 2	настой	9
	настойка 40 %	9
	настойка 50 %	10
	настойка 70 %	10

В ходе эксперимента было установлено, что ингибирующее действие настоек витаминных сборов № 1 и № 2 по отношению к штамму *Escherichia coli* проявляется за счет действия этилового спирта. Этот вывод был сделан на основе анализа зависимости увеличения диаметра зоны задержки роста микроорганизма с ростом концентрации спирта этилового. Данные представлены в таблице 6.

Таблица 6

Результаты установления антимикробной активности препаратов витаминных сборов по отношению к штамму *Escherichia coli*

Объект исследования	Лекарственная форма	Зона задержки роста <i>E.coli</i> , мм
Витаминный сбор №1	настой	--
	настойка 40 %	15
	настойка 50 %	16
	настойка 70 %	19
Витаминный сбор №2	настой	--
	настойка 40 %	15
	настойка 50 %	16
	настойка 70 %	19

Заключение

В ходе исследования в настойках было установлено содержание кислоты аскорбиновой, переходящей в данную лекарственную форму. Определено содержание суммы органических кислот и дубильных веществ в настоях из витаминных сборов и в настойках, полученных с помощью экстрагента различной концентрации. Было установлено, что оптимальная концентрация этилового спирта для экстракции суммы органических кислот и дубильных веществ из сборов витаминных № 1 и № 2 составляет 40 %. При данной

концентрации в настойки выходит наибольшее количество БАС. Была разработана методика потенциометрического титрования суммы органических кислот в настоях и настойках из витаминных сборов № 1 и № 2. Потенциометрическое детектирование к.т.т. может обеспечить точные результаты при определении органических кислот в анализируемых препаратах и может применяться для их стандартизации по показателю «сумма органических кислот».

Также было установлено, что водные и спиртовые извлечения сборов витаминных № 1 и № 2 оказывают антимикробную активность в отношении *Staphylococcus aureus* и антимикотическую активность в отношении *Candida albicans*. Активность настоя и настоек витаминного сбора № 1 вне зависимости от концентрации спирта этилового в пересчете на бензилпенициллин составила 375 единиц действия. Активность настоя и настоек витаминного сбора № 2, также не зависела от концентрации спирта этилового и составила 280 единиц действия в пересчете на бензилпенициллин. Полученные данные подтверждают активность БАС компонентов сборов против тестируемых штаммов. В отношении *Escherichia coli* ингибирующую активность проявляют только спиртовые извлечения, причем наблюдается прямая зависимость между диаметром зоны задержки роста микроорганизма и увеличением концентрации спирта этилового. Это позволяет сделать вывод о том, что задержка роста кишечной палочки обусловлена действием спирта этилового.

Список литературы

1. Всероссийская организация здравоохранения [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.antibiotic.ru/> (дата обращения: 17.07.2017).
2. Марахова А.И. Унификация физико-химических методов анализа лекарственного растительного сырья и комплексных препаратов на растительной основе: дис. ... д-ра фарм. наук (14.04.02) / Марахова Анна Игоревна; Первый МГМУ им. И.М. Сеченова. – Москва, 2016. – 26 с.
3. Марахова А.И. Изучение качественного и количественного содержания органических кислот в витаминных сборах различными физико-химическими методами / А.И. Марахова, В.Ю. Жилкина, Е.В. Сергунова [и др.] // Известия Академии наук. Серия химическая. – 2016. – № 11. – С. 2779–2782.
4. Государственная Фармакопея Российской Федерации // МЗ РФ. 13-е изд. – М., 2015. – 3768 с.
5. Государственная Фармакопея СССР: Вып. 2. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье // МЗ СССР. – 11-е изд., доп. – М.: Медицина, 1987. – 400 с.

6. Жилкина В.Ю. Стандартизация настоек из витаминных сборов по основным группам действующих веществ /В.Ю. Жилкина, А.И. Марахова // Тезисы VII Всероссийской конференции с международным участием «Новые достижения химии и химической технологии растительного сырья». – Барнаул, 2017. – С. 255–257.
7. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / ред. Р.У. Хабриев. – 2-изд., перераб. и доп. – М.: Медицина, 2005. – 832 с.