

ИССЛЕДОВАНИЕ ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА И ПРОТИВОМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ ЭКСТРАКТОВ ИЗ СОЦВЕТИЙ *TAGETES PATULA* L.

Астафьева О.В.¹, Жаркова З.В.¹, Якимец М.В.¹, Арнаудова К.Ш.¹, Генатуллина Г.Н.¹,
Ростошвили Г.А.¹

¹ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет» Минздрава России, Астрахань, e-mail: rescenter@bk.ru

Объектом работы служат соцветия бархатцев распростертых *Tagetes patula* L., которые культивируются как декоративное растение. Бархатцы распростертые являются травянистыми однолетниками и относятся к семейству сложноцветных. С помощью подобранных методик было получено четыре типа экстрактов с целью изучения состава и свойств полученных комплексов биологически активных веществ. Методом качественных реакций определены основные классы содержащихся в экстрактах веществ. Методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ) установлено содержание кверцетина в полученных экстрактах. Противомикробную активность исследовали методом диффузии препарата в питательную среду. В качестве тест-культур были выбраны *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pythium ultimum*. Установлено, что все исследуемые экстракты обладали противомикробной активностью в отношении выбранных тест-культур, но выраженной в разной степени. Результаты исследования демонстрируют высокую противомикробную активность исследуемых экстрактов, которая обусловлена содержанием флавоноидных соединений, один из которых определен как кверцетин. Наличие флавоноидных компонентов в высокой концентрации в полученных экстрактах определяет возможность использования экстрактов соцветий *T. patula*, а также выделенных индивидуальных компонентов в качестве составляющих частей биопрепаратов с противомикробными свойствами.

Ключевые слова: *Tagetes patula*, качественные реакции, флавоноиды, противомикробная активность, ВЭТСХ.

STUDY OF THE CHEMICAL COMPOSITION AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF EXTRACTS FROM *TAGETES PATULA* L.

Astafyeva O.V.¹, Zharkova Z.V.¹, Yakimets M.V.¹, Arnaudova K.SH.¹, Genatullina G.N.¹,
Rostoshvili G.A.¹

¹Federal State Budgetary Educational Institution of Professional Education «Astrakhan State Medical University» of the Ministry of Pub. Health of Russia, Astrakhan, e-mail: rescenter@bk.ru

The object of the work is the inflorescence of marigold *Tagetes patula* L., that are cultivated as an ornamental plant. African marigolds stretched out are grassy annual plants and relate to the family of Compositae. Using chosen techniques, we obtained four types of extracts in order to study the composition and properties of the biologically active substance complexes. Using qualitative reactions, we identified key classes of substances that were contained in extracts. We used the method of high performance thin layer chromatography (HPTLC) and found out the quercetin content in the obtained extracts. The antimicrobial activity was studied by diffusion method in the growth medium. *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pythium ultimum* were selected as testing cultures. It was found that all studied extracts possess the antimicrobial activity as to selected testing cultures, but the antimicrobial activity is expressed to varying degrees. The findings show a high antimicrobial activity of examined extracts that depends on the content of flavonoid compounds, one of which is defined as Quercetin. The presence of flavonoid compounds in a high concentration in the obtained extracts determines the possibility of using the extracts itself and identified individual components as an integral parts of biopharmaceuticals with antimicrobial properties.

Keywords: *Tagetes patula*, qualitative reactions, flavonoids, antimicrobial activity, HPTLC.

Бархатцы распростертые *Tagetes patula* L. относятся к группе пряноароматических (или пряновкусовых) растений.

T. patula (сем. астровые – *Asteraceae*) – многолетние растения высотой 30–80 см. В разных частях растения концентрация эфирных масла неодинакова: в надземной части в фазе

цветения – 0,30–0,55%, в фазе бутонизации – 0,22–0,30%. Максимальное содержание эфирного масла отмечается в соцветиях (0,45%) и листьях (0,28%). Основными компонентами являются оцимен (50%), а также D-пинен, D-терпинен, п-цимол, мерцен, лимонен, цитраль, линалоол, сабинен и др. [1]. Наличие данных компонентов обуславливает консервирующие, антисептические и бактерицидные свойства растения.

Эфирное масло соцветий *T. patula* применяют в пищевой, мыловаренной и парфюмерно-косметической промышленности. В народной медицине водный настой соцветий используют в качестве мочегонного, потогонного и противоглистного средства. Бархатцы применяют для борьбы с нематодами земляники, картофеля и других культур, высаживая их совместно. Также *T. patula* культивируются как декоративные растения [1].

Окраску соцветий бархатцев обуславливает наличие таких биологически активных соединений, как флавоноиды, которые благодаря широкому спектру активности представляют особый интерес для изучения. Флавоноиды относятся к классу полифенольных соединений, а также к вторичным продуктам метаболизма растений [1]. Во многих случаях флавоноиды содержатся в виде гликозидов с остатком глюкозы, галактозы, рамнозы, рибозы или арабинозы, хотя встречаются и в виде агликонов [2-4].

Поиск новых источников биологически активных веществ, в том числе флавоноидных соединений, остается актуальным направлением современной фармакологии и биотехнологии. Растения являются одним из основных видов сырья для получения ценных для человека компонентов.

Флавоноиды играют огромную роль в защите растений от бактериальной, вирусной и грибковой инфекций, от проникновения паразитов и повреждения насекомыми. На сегодняшний день широко изучаются антиоксидантная активность экстрактов соцветий бархатцев [5, 6] и их участие в защите растений от окислительного стресса [4, 7]. Однако противомикробная активность экстрактов соцветий *T. patula* в нашей стране изучена недостаточно [3]. Исследуются в основном водно-спиртовые экстракты, которые не всегда обладают высокой антибактериальной активностью в отношении ряда грамположительных и грамотрицательных бактериальных культур. При этом вода в качестве экстрагента, имеющая существенные преимущества, такие как безопасность при использовании, дешевизна и фармакологическая индифферентность, практически не применяется. Предложенные способы экстрагирования направлены на выделение как полярных, так и неполярных и неполярных компонентов из соцветий *T. patula* с выраженной противомикробной активностью. Вышеперечисленное обуславливает актуальность поиска не только новых источников биологически активных веществ, но и легких, безопасных и дешевых способов их извлечения.

В связи с этим целью данной работы являлось исследование химического состава и противомикробной активности экстрактов из соцветий *T. patula*.

Материал и методы исследования

Объектом исследования являлись соцветия *T. patula*, собранные в период цветения в августе 2014 г. Соцветия высушили, измельчили и использовали для приготовления экстрактов согласно подобранным методикам [8].

Экстракты из соцветий *T. patula* готовили с использованием двух видов экстрагентов (70%-ного этанольного спирта и воды) двумя методами. Экстракт № 1 (водно-спиртовой) и экстракт № 3 (водный) готовили следующим образом: 10 г измельченного растительного сырья помещали в колбу вместимостью 200 мл, добавляли 150 мл экстрагента и пятикратно кипятили в течение 1 ч. Извлечение фильтровали через несколько слоев марли, отжимая частицы сырья. Для приготовления экстракта № 2 (водно-спиртового) и экстракта № 4 (водного) 10 г измельченного растительного сырья помещали в емкость из темного стекла объемом 200 мл, добавляли 150 мл 70%-ного этанола и оставляли при периодическом перемешивании на 3 суток. Извлечение фильтровали через несколько слоев марли, отжимая частицы сырья [9].

Исследование содержания в экстрактах основных групп биологически активных веществ проводили с использованием качественных реакций: реакции для определения флавоноидов (реакция с хлоридом железа (III), реакции с аммиаком, борно-лимонная реакция), для определения гликозидов (реакция Келлер-Килиани); реакции осаждения для определения алкалоидов (реакция Вагнера–Бушарда, реакция Марки) [9,10].

Определение кверцетина проводили методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ) на пластинах Sorbfil ПТСХ-П-В-УФ размером 10x15 см [11].

Для приготовления стандартных образцов кверцетина 1 мг стандартного образца растворяли в 5 мл метанола в пикнометре вместимостью 10 мл. Объем пикнометра доводили до метки метанолом и тщательно перемешивали. Полученный раствор содержал 100 мг/л кверцетина. Из этого раствора готовили стандартные растворы в метаноле с концентрациями 25 мг/л; 50 мг/л и 75 мг/л.

Для нанесения образцов использовали автосамплер SAMAG ATS4. Наносимый объем стандартных образцов и исследуемых экстрактов составляет 4 мкл. Пластинку помещали в предварительно насыщенную хроматографическую камеру и элюировали, длина пробега составляла 4,5 см. Пластинку высушивали при комнатной температуре в течение 5–10 мин в вытяжном шкафу, а затем – в сушильном шкафу при температуре 85⁰С в течение 5 мин. Далее пластинки оставляли на 6–12 ч при комнатной температуре в темном месте.

Для количественной обработки хроматограмм использовали сканирующий денситометр CAMAG TLC Scanner 3 при длине волны 410 нм и размером щели 2,00 x 0,2 мм. Прием данных и количественную обработку полученных результатов проводили на компьютере с использованием программы WinCATS.

Антибактериальную активность определяли методом прямой диффузии исследуемых образцов в питательную среду [3]. Проводили замеры диаметра задержки роста бактерий. В качестве тест-штаммов были выбраны условно-патогенные штаммы бактерий *Escherichia coli* Migula СК ВКПМ В-1911, *Bacillus subtilis* Ehrenberg ВКПМ В-1919 и *Staphylococcus aureus* Rosenbach ВКПМ В-1899, полученные из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов ФГУП ГосНИИ генетики [12].

Фунгицидную активность экстрактов исследовали методом диффузии препаратов в питательную среду с использованием лунок в отношении культуры *Pythium ultimum* Trow. Экстракты объемом 20 мкл вносили в лунки, сделанные в питательной среде (бобовый агар), засеянной «газоном» выбранной культуры микромицета. Степень антагонистической активности оценивали по диаметру зоны ингибирования роста микромицета вокруг лунки с исследуемым веществом [4]. Все опыты проводили в трехкратной повторности.

Результаты исследования и их обсуждение

Предварительно химический состав полученных экстрактов изучали методом качественных реакций на определение веществ фенольной природы (табл. 1). Появление зеленой окраски в результате реакции компонентов экстрактов с хлоридом железа (III) свидетельствует о присутствии флавонолов, коричневой – флавононов и халконов, красноватой или бурой – флавонов. Борно-лимонная реакция позволяет обнаружить 5-оксифлавоны и 5-оксифлавонолы, которые взаимодействуют с борной кислотой в присутствии лимонной кислоты, давая желтую окраску. При взаимодействии с аммиаком такие вещества, как флавоны, флавонолы, флавононы и флавононолы, растворяются с образованием желтой окраски, которая при нагревании изменяется до оранжевой или коричневой.

Таблица 1

Результаты проведения качественных реакций на определение фенольных компонентов

Образцы водных и спиртовых экстрактов	Реакции		
	С хлоридом железа (III) (цвет окрашивания)	С аммиаком (цвет окрашивания)	Борно-лимонная (цвет окрашивания)
Экстракт № 1	Зеленый	Красный	Красновато-желтый
Экстракт № 2	Зеленый	Красный	Красновато-желтый

Экстракт № 3	Коричневый	Красный	Желтый
Экстракт № 4	Коричневый	Красный	Желтый

Следующим этапом работы было проведение ВЭТСХ, результаты которой свидетельствуют о содержании в опытных образцах кверцетина и его гликозида рутина (рис. 1).

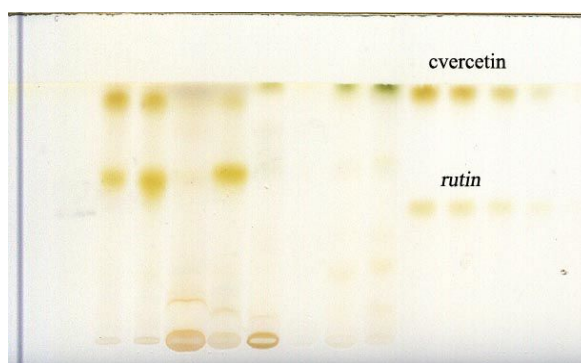


Рис. 1. ВЭТСХ определения кверцетина в экстрактах соцветий *T. patula*

Показатели Rf контроля кверцетина и опытных образцов совпадают (табл. 2).

Таблица 2

Результаты определения содержания кверцетина в соцветиях *T. patula* методом ВЭТСХ

Образец, № экстракта	Rf кверцетина	Среднее содержание кверцетина, мг
Экстракт № 1	0,72	62,52
Экстракт № 2	0,72	60,04
Экстракт № 3	0,74	40,40
Экстракт № 4	0,73	43,57

Как следует из таблицы 2, большее содержание кверцетина наблюдается в водно-спиртовых экстрактах, полученных методом настаивания с нагреванием и без нагревания. Достоверной разницы по содержанию кверцетина в этих видах экстрактов не отмечается. Водная экстракция в результате применения только полярного растворителя – воды (как с нагреванием, так и без него) – позволяет выделить из соцветий *T. patula* в 1,5–2 раза меньше кверцетина, чем экстракция менее полярными растворителями, подходящими для извлечения таких соединений, как флавоноиды.

Далее проводили исследования антибактериальной активности полученных экстрактов соцветий *T. patula*, результаты которых представлены в таблице 3.

Антибактериальная активность экстрактов соцветий *T. patula*

Экстракт	ДЗЗР ¹ , мм					
	Через 48 ч			Через 7 дней		
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>
№ 1 (10,1 мг/мл)	14,0±1,5*	15,0±3,0	20,0±2,3*	19,8±4,9*	0,0±0,0	20,0±5,7*
№ 2 (12,5 мг/мл)	11,5±1,7*	16,0±3,0	22,5±2,8*	12,0±2,0*	21,1±0,8*	28,0±1,2*
№ 3 (2,8 мг/мл)	12,1±2,4*	23,0±3,7*	10,8±0,8*	10,0±1,0*	0,0±0,0	0,0±0,0
№ 4 (2 мг/мл)	11,3±1,5*	35,0±6,4*	15,0±2,3	9,0±1,2*	0,0±0,0	0,0±0,0
Контроль Спирт 70%	5,0±1,5	16,5±3,0	8,3±1,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
Контроль Вода	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0

Примечание: ¹ДЗЗР (M±m) – диаметр зоны задержки роста бактериальной культуры, мм;

0 – отсутствие антибактериального действия;

* – различия с контролем достоверны при $p \leq 0,05$.

Как следует из таблицы 3, все исследуемые экстракты через 48 ч обладали выраженной в разной степени антибактериальной активностью. Причем водно-спиртовой экстракт № 2 проявил пролонгированное ингибирующее действие в отношении всех трех тест-культур бактерий. Наряду с этим процентное содержание кверцетина в нем меньше, чем в экстракте № 1, который обладал пролонгированным антибактериальным действием в отношении только грамположительных бактерий *S. aureus* и *B. subtilis*. Общее содержание экстрактивных веществ в водно-спиртовых экстрактах, обладающих антибактериальной активностью, составляло 10,1 и 12,5 мг/мл, что значительно меньше минимальных ингибирующих концентраций (625, 312,5 и 1250 кг/мл), установленных другими авторами [3].

Водные экстракты, хотя и обладали высокой ингибирующей активностью, особенно в отношении грамотрицательной культуры *E. coli*, но уже через неделю утрачивали свои свойства. Это может быть связано как с низким содержанием флавоноидного компонента, так и с невысокой концентрацией выделенного комплекса биологически активных соединений (сухой вес 2,8 и 2,0 мг/мл). Водно-спиртовая экстракция позволила получить из соцветий *T. patula* экстракты и с высоким содержанием кверцетина, и с большим в сравнении с водной экстракцией содержанием суммарного количества выделенных соединений (сухой вес 10,1 и 12,5 мг/мл). По данным других авторов, в отношении *E. coli* водно-спиртовые экстракты соцветий *T. patula* не оказывали ингибирующего влияния [3], что, скорее всего, связано с

наличием более полярных компонентов, обуславливающих антибактериальную активность экстрактов.

Кверцетин – самый распространенный флавоноид растительного происхождения. Нетрудно предположить, что достаточно выраженные противомикробные свойства экстрактов обусловлены содержанием в них веществ флавоноидной природы. Помимо этого, интересным является изучение состава данных экстрактов на наличие других соединений, в том числе и нефенольной природы, которые также могут обуславливать противомикробную активность.

Проведено исследование влияния экстрактов на рост и развитие микромицетов на примере тест-культуры *P. ultimum* (табл. 4).

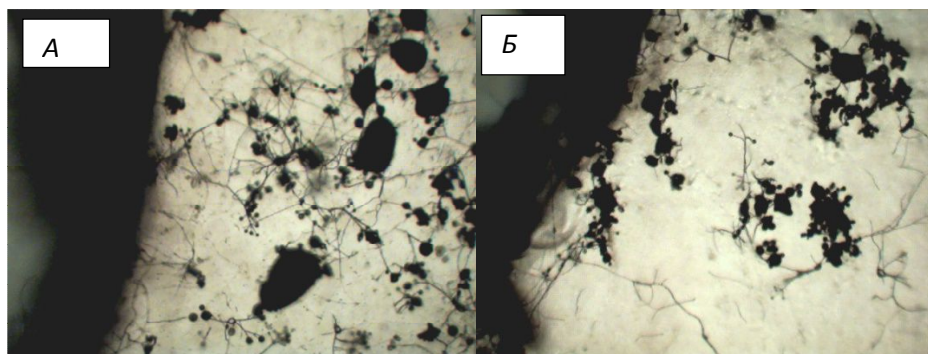
Таблица 4

Результаты определения фунгицидной активности экстрактов

Экстракт	ДЗЗР ¹ , мм
№ 1 Спиртовой (10,1 мг/мл)	10,0±5,0*
№ 2 Спиртовой (12,5 мг/мл)	15,0±5,0*
№ 3 Водный (2,8 мг/мл)	0,0±0,0
№ 4 Водный (2,0 мг/мл)	0,0±0,0
Контроль Спирт 70%-ный	0,0±0,0
Контроль Вода	0,0±0,0

Примечание: ¹ДЗЗР (M±m) – диаметры зоны задержки роста микроорганизмов, мм; 0 – отсутствие противомикробного действия; * – различия с контролем достоверны при p≤0,05.

Водные экстракты не обладали ингибирующим действием в отношении *P. ultimum*. Водно-спиртовые экстракты, особенно экстракт № 2, показали относительно высокое подавляющее рост и развитие действие. Также экстракты снижали развитие спор на гифах микромицетов (рис. 2).



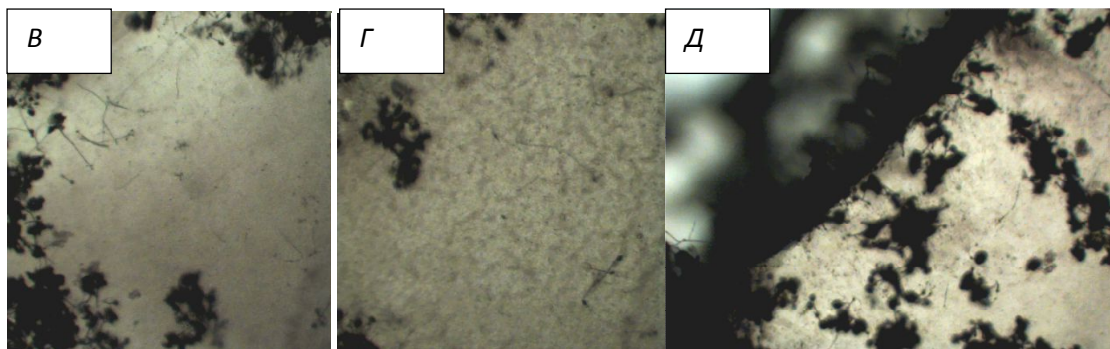


Рис. 2. Фунгицидная активность экстрактов (18x10)
 А – экстракт № 1, Б – экстракт № 2, В – экстракт № 3, Г – экстракт № 4,
 Д – контроль

В качестве контрольных растворов были выбраны экстрагенты – вода и 70%-ный этиловый спирт, которые не обладали антибактериальной (табл. 3) и фунгицидной (табл. 4) активностью. Полученные результаты демонстрируют отсутствие влияния экстрагентов на действие выделенных биологически активных веществ. Спиртовой раствор благодаря высокой летучести не диффундируется в питательную среду, в отличие от компонентов экстрактов, и, соответственно, почти не оказывает влияния на рост и развитие бактериальной культуры.

Высокая активность водно-спиртовых экстрактов в отношении как бактерий, так и микромицетов, возможно, связана как с высокой концентрацией выделенных компонентов, так и с большим содержанием флавоноидного соединения – кверцетина. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности дальнейшего изучения химического состава комплексных и индивидуальных соединений соцветий *T. patula* и их свойств.

Выводы

1. Водно-спиртовая экстракция позволяет выделять из соцветий *T. patula* большее количество компонентов с противомикробными свойствами, в том числе флавоноидных компонентов (кверцетин). Содержание кверцетина в водно-спиртовых экстрактах (62,52 и 60,04 мг/кг) в 1,5 раза превышало его содержание в водных экстрактах (40,4 и 43,57 мг/кг).
2. Методами качественных реакций и ВЭТСХ были определены компоненты фенольной природы, в частности флавоноид кверцетин.
3. Компоненты, выделенные спиртовой экстракцией, обладали более выраженной противомикробной активностью (антибактериальной и фунгицидной). Выявленные эффекты обусловлены наличием именно флавоноидных компонентов, в частности кверцетина.
4. На рост и развитие грамположительной спорообразующей культуры *B. subtilis* большее ингибирующее влияние оказали водно-спиртовые экстракты, причем они обладали пролонгированным действием. В отношении грамотрицательной культуры *E. coli*

антибактериальной активностью обладали только водные экстракты (ДЗЗР=23,0 и 35,0 мм для экстрактов № 3 и № 4 соответственно). На развитие грамположительной тест-культуры *S. aureus* все исследуемые экстракты оказали почти одинаковое ингибирующее действие.

На основе полученных результатов планируется проведение дальнейших исследований по разделению и идентификации флавоноидов с целью определения формулы действующего вещества с антибиотической активностью, а также изучения механизма воздействия выделенных компонентов на бактериальную клетку.

Список литературы

1. Gupta P., Vasudeva N. Marigold A Potential Ornamental Plant Drug. Hamdard Medicus. 2012. Vol. 55, №1. P. 45-59.
2. Тырков А.Г., Лужнова С.А., Габитова Н.М., Юртаева Е.А. // 5-(арилметилен)-2,4,6-пиримидин-2,4,6(1н,3н,5н)-трионы. Синтез и противомикробная активность. // Современные проблемы химической науки и фармации: сборник материалов VI Всероссийской конференции с международным участием (к 50-летию Чувашского государственного университета им. И.Н. Ульянова). 2017. С. 228-229.
3. Папаяни О.И., Духанина И.В., Сергеева Е.О. Изучение химического состава и антимикробной активности сухого экстракта из цветков бархатцев распростертых (*Tagetes patula* L.) // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2012. Т.14, №5(3). С. 742-744.
4. Бурас Н., Слауи С., Хатим М., Ясенявская А.Л. Определение биологически активных веществ в траве марены красильной // Молодежь и медицинская наука: материалы V Межвузовской научно-практической конференции молодых ученых. 2018. С. 102-104.
5. Червонная Н.М., Андреева О.А. Об антиоксидантной активности спиртоводных извлечений из цветков бархатцев распростертых // Современные проблемы науки и образования. 2015. № 2-3. URL: <http://science-education.ru/ru/article/view?id=23713> (дата обращения: 11.12.2020).
6. Папаяни О.И., Доркина Е.Г., Терехова А.Ю., Сергеева Е.О., Духанина И.В., Тираспольская С.Г. Изучение химического состава и влияния сухого экстракта из цветков бархатцев распростертых на про/антиоксидантное равновесие в желудке крыс при вольтареновой гастропатии // Современные проблемы науки и образования. 2012. №1. URL: <https://www.science-education.ru/ru/article/view?id=5618> (дата обращения: 11.12.2020).
7. Машковский М.Д. Лекарственные средства. М.: Новая волна, 2019. 1216 с.
8. Попко К.В., Вилкова Д.Д., Астафьева О.В. Определение некоторых биологически активных компонентов соцветий бархатцев отклоненных *Tagetes patula* L. //

Фундаментальные и прикладные аспекты биотехнологии. Иркутск: Издательство ИРНИТУ. 2015. С. 378-381.

9. Reena Jain, Nadhi Katare, Vijay Kumara, Amit Kumar Samanta, Swati Goswami, C.K. Shrotri *In vitro* antibacterial potential of different extracts of *Tagetes erecta* and *Tagetes patula*. Journal of Natural Sciences Research. 2012. Vol.2, №5. P. 84-91.

10. Yasukawa K., Yoshimasa K. Effects of Flavonoids from French Marigold (Florets of *Tagetes patula* L.) on Acute Inflammation Model. International Journal of Inflammation. 2013. P. 263–272.

11. Батаева Ю.В., Саткалиева М.С., Антонова С.В., Синетова М.А., Козлова А.Ю., Астафьева О.В., Баймухамбетова А.С. Исследование антиоксидантной активности и состава метаболитов цианобактерий методами ТСХ, ВЭТСХ, ВЭЖХ с целью поиска экологически безопасных агентов очистки // Экологическая химия. 2018. Т. 27, №4. С. 175-181.

12. Корягин Ю.В. Микробиология. Лабораторный практикум: учебное пособие. Пенза: РИО ПГСХА, 2014. 185 с.