

Новая область применения флавоноидов лекарственных растений

Резюме. Настоящая работа посвящена идентификации флавоноидов в экстрактах лекарственных растений и определению их антимикробной активности по отношению к бактериям рода *Pseudomonas*, вызывающим порчу пищевых продуктов. Хроматографическими методами установлено, что в вытяжке из ладанника шалфеелистного *Cistus salviifolius* содержится кемпферол-3-β-D-глюкопиранозид, обладающий выраженной антибактериальной активностью. На образцах говядины, свинины, мяса птицы и рыбы, инфицированных бактериями *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens* или спонтанно развивающейся микробиотой, продемонстрирована активность экстракта ладанника шалфеелистного *Cistus salviifolius*, что свидетельствует о возможности защиты пищевых продуктов от микробной контаминации.

УДК 581.192.2

Ключевые слова: флавоноиды, лекарственные растения, ладанник шалфеелистный, кемпферол-3-β-D-глюкопиранозид, хромато-масс-спектрометрия, антибактериальная активность, пищевые продукты.



Хоссам Элькаиб,
стажер кафедры
биотехнологии и
биоэкологии Белорусского
государственного
технологического
университета, магистр
биологических наук;
hucam83@mail.ru



Виктор Леонтьев,
заведующий кафедрой
биотехнологии и
биоэкологии Белорусского
государственного
технологического
университета, кандидат
химических наук, доцент;
leontiev@belstu.by

Лекарственные растения являются ценным источником биологически активных веществ (полифенолов, эфирных масел, алкалоидов, дубильных веществ и др.) и широко применяются как в народной, так и в официальной медицине, особенно в Китае, на Ближнем Востоке и в Северной Африке [1–6]. Флавоноиды, входящие в группу полифенольных соединений, благодаря широкому спектру свойств находят применение в пищевой и парфюмерно-косметической индустрии [7, 8].

В пищевой промышленности используют в основном пряно-ароматические растения – для придания продуктам приятного запаха, вкуса, сохранения цвета, а также

для антиоксидантной и антимикробной защиты [9, 10]. В последние годы появились работы, посвященные изучению способности лекарственных растений предупреждать контаминацию пищевых продуктов [11]. В развитии этого направления в первую очередь заинтересованы страны с жарким климатом в связи с порчей рыбных и мясных изделий, обусловленной микроорганизмами, среди которых доминируют бактерии рода *Pseudomonas* [12, 13]. Поскольку содержание и состав флавоноидов существенно зависят как от вида растения, так и от климатических условий их выращивания [14, 15], в настоящей работе использовалось сырье из Ливии – пажитник греческий (*Trigonella foenum-graecum* L.), чабрец головчатый (*Thymus capitatus* L.), ромашка

аптечная (*Matricaria chamomilla* L.), шалфей лекарственный (*Salvia officinalis* L.) и ладанник шалфеелистный (*Cistus salviifolius*). Из литературных источников известно, что такие флавоноиды, как лютеолин-7-О-глюкуронид и кемпферол-3-β-D-глюкопиранозид, ингибируют рост бактерий рода *Pseudomonas* [16, 17]. Цель настоящего исследования – поиск содержащих эти флавоноиды растений и определение антибактериальной активности их экстрактов.

В предварительных экспериментах было установлено, что для экстракции флавоноидов из лекарственного растительного сырья необходимы 50%-ный этиловый спирт, температура – 20 °С, время – 24 ч.

Для идентификации флавоноидов в водно-спиртовых вытяжках из растений применяли хромато-масс-спектрометрический анализ [18, 19], который осуществляли с помощью хромато-масс-спектрометра (США) с диодно-матричным детектором в диапазоне длин волн 200–700 нм и масс-детектором с электроспрей-ионизацией (ESI) на колонке BDS HYPERSIL C₁₈, 250×4,6 мм, 5 мкм (США). В качестве подвижной фазы использовали смесь ацетонитрил: 1%-ный водный раствор муравьиной кислоты в соотношении 20:80 в изократическом режиме при скорости элюирования 1 мл/мин.

Исследования водно-спиртовых экстрактов пажитника греческого (*Trigonella foenum-graecum* L.), чабреца головчатого (*Thymus capitatus* L.), ромашки аптечной (*Matricaria chamomilla* L.), шалфея лекарственного (*Salvia officinalis* L.), ладанника шалфеелистного (*Cistus salviifolius*) по значениям m/z молекулярных ионов

Лекарственное растение	Время удерживания, мин	Ионы, m/z	Идентифицированные флавоноиды
Пажитник греческий (<i>Trigonella foenum-graecum</i> L.)	7,10	[M+H] ⁺ , 449,49	Ориентин
	6,33	[M-H ₂ O+H] ⁺ , 431,54	Изоориентин
	9,56	[M+H] ⁺ , 433,52	Витексин
	10,23	[M-H ₂ O+H] ⁺ , 415,51	Изовитексин
Чабрец головчатый (<i>Thymus capitatus</i> L.)	21,98	[M+H] ⁺ , 447,58; [M-glu+H] ⁺ , 271,68	Байкалин
	12,41	[M+H] ⁺ , 463,54	Скутелларин
	41,66	[M+H] ⁺ , 289,62	Эриодиктиол
Ромашка аптечная (<i>Matricaria chamomilla</i> L.)	9,40	[M+H] ⁺ , 465,65	Кверцимеритрин
	34,63	[M+H] ⁺ , 177,53	Герниарин
Шалфей лекарственный (<i>Salvia officinalis</i> L.)	11,26	[M+H] ⁺ , 463,61	Лютеолин-7-О-глюкуронид
	19,89	[M+H] ⁺ , 609,62; [M-2glu+H] ⁺ , 301,70	Диосмин
	21,98	[M+H] ⁺ , 447,58; [M-glu+H] ⁺ , 271,68	Байкалин
Ладанник шалфеелистный (<i>Cistus salviifolius</i>)	15,58	[M+H] ⁺ , 449,82; [M-glu+H] ⁺ , 287,78	Кемпферол-3-β-D-глюкопиранозид

Таблица. Идентификация флавоноидов в экстрактах исследуемых лекарственных растений

и фрагментов молекул позволили идентифицировать основные флавоноиды. Лютеолин-7-О-глюкуронид и кемпферол-3-β-D-глюкопиранозид обнаружены только в вытяжках из шалфея лекарственного и ладанника шалфеелистного соответственно (таблица).

Для определения антибактериальной активности водно-спиртовых экстрактов растений применяли метод лунок. Появление прозрачных зон вокруг лунок в питательной агаризованной среде, засеянной суточными культурами *Pseudomonas aeruginosa* или

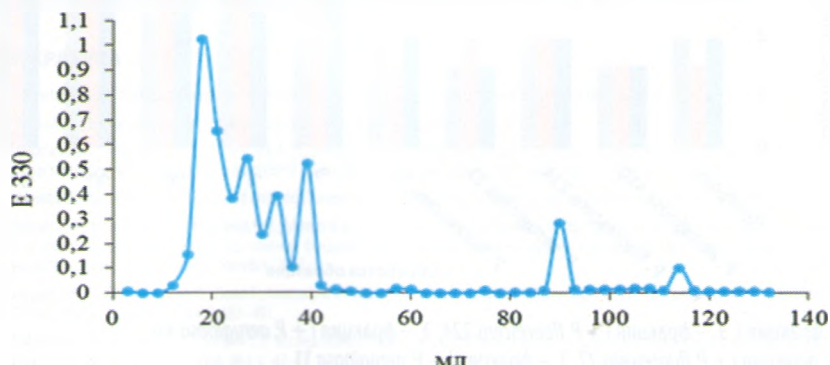


Рис. 1. Профиль элюирования компонентов активной фракции I водно-спиртового экстракта ладанника шалфеелистного (*Cistus salviifolius*)

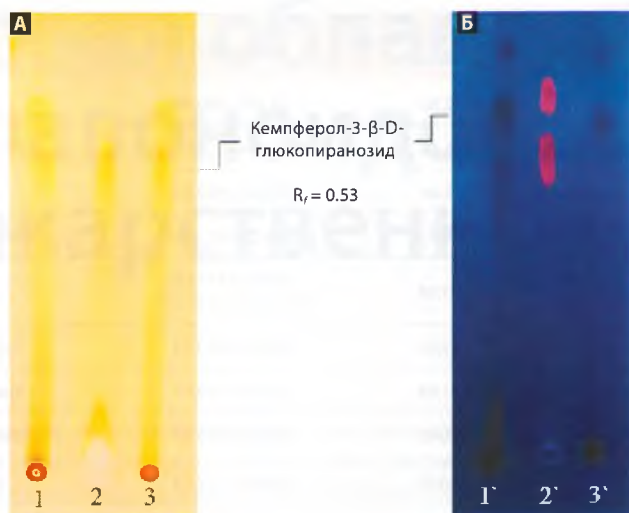


Рис. 2. Хроматограммы компонентов ладанника шалфеелистного и кемпферол-3-β-D-глюкопиранозид: А – в парах йода; Б – в УФ-свете; 1 и 1' – исходный экстракт ладанника шалфеелистного; 2 – кемпферол-3-β-D-глюкопиранозид (А); 2' – фракция II (Б); 3 и 3' – фракция I

Pseudomonas fluorescens, свидетельствовало об антибактериальной активности экстракта. По среднему диаметру зон делали вывод о ее уровне.

Согласно результатам исследования, наибольшей антибактериальной активностью по отношению к псевдомонадам обладала водно-спиртовая вытяжка из ла-

данника шалфеелистного, поэтому все дальнейшие работы проводили с ним. Для фракционирования и последующей гидрофобной гель-хроматографии экстракта растения использовали гель Sephadex LH60 [20]. Водно-спиртовую вытяжку разделяли на фильтре Шотта с гелем на две фракции. Фракция I свободно проходила через

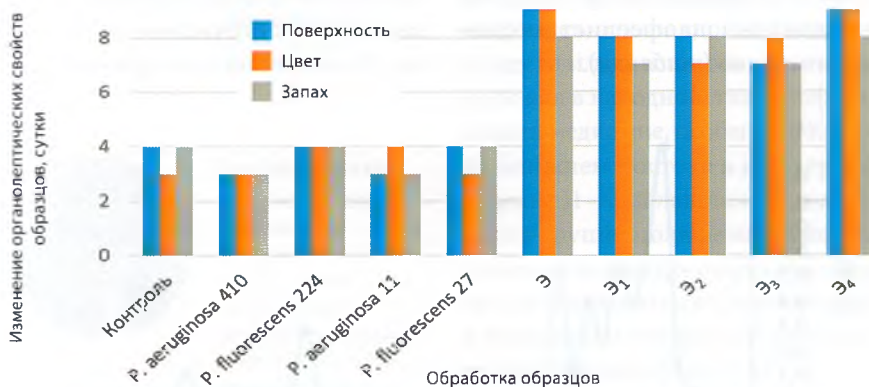
гель, а фракцию II элюировали 96%-ным этиловым спиртом. Анализ показал, что антибактериальной активностью обладает только фракция I. Для определения наличия в ней кемпферол-3-β-D-глюкопиранозид проводили гель-хроматографию на колонке 2,5×40 см с Sephadex-LH60 при скорости элюирования 0,2 мл/мин. Профиль элюирования представлен на рис. 1.

Используя стандартный образец, установили, что хроматографический пик с объемом выхода 90 мл принадлежит кемпферол-3-β-D-глюкопиранозиду. Пик на хроматограмме хорошо разрешен, что позволяет использовать данный подход для препаративного выделения этого флавоноида из фракции I экстракта ладанника шалфеелистного.

С целью экспрессной идентификации кемпферол-3-β-D-глюкопиранозид в исходном экстракте и во фракции I *Cistus salviifolius* использовали метод тонкослойной хроматографии (ТСХ) на пластинках с силикагелем (TLC Silica gel 60) в элюирующей системе «изопропиловый спирт – гексан – уксусная кислота» в соотношении 10:1:0,5. Результаты представлены на рис. 2: кемпферол-3-β-D-глюкопиранозид имеет пятно с $R_f = 0,53$, которое присутствует на хроматограмме фракции I, является слабо выраженным на хроматограмме исходного экстракта ладанника шалфеелистного, а на хроматограмме фракции II отсутствует.

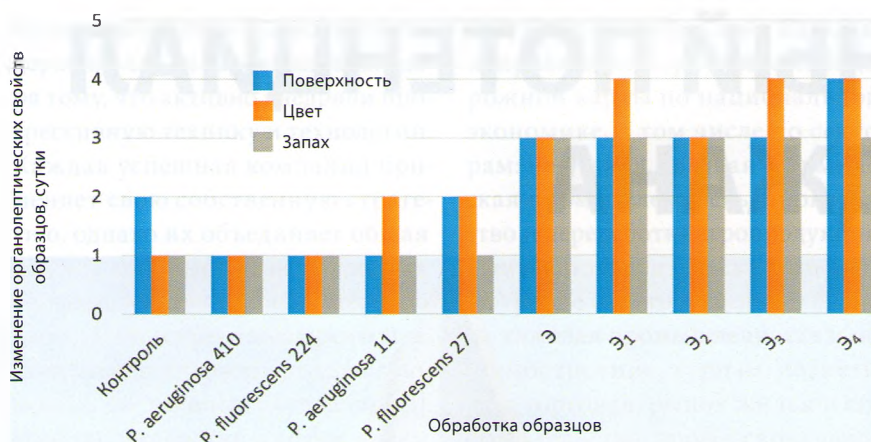
Экспериментально показано, что ТСХ может быть использована для идентификации кемпферол-3-β-D-глюкопиранозид в вытяжках из лекарственных растений.

Эффективность защиты пищевых продуктов от микробной



Э – фракция I, Э₁ – фракция I + *P. fluorescens* 224, Э₂ – фракция I + *P. aeruginosa* 410, Э₃ – фракция I + *P. fluorescens* 27, Э₄ – фракция I + *P. aeruginosa* 11

Рис. 3. Изменение органолептических свойств образцов говядины после обработки суспензиями бактерий и активной фракцией I экстракта ладанника шалфеелистного при 4 °C



Э – фракция I, Э₁ – фракция I + *P. fluorescens* 224, Э₂ – фракция I + *P. aeruginosa* 410, Э₃ – фракция I + *P. fluorescens* 27, Э₄ – фракция I + *P. aeruginosa* 11

Рис. 4. Изменение органолептических свойств образцов говядины после обработки суспензиями бактерий и раствором активной фракции I экстракта ладанника шалфеелистного при 30 °C

контаминации активной фракцией I экстракта ладанника шалфеелистного определяли, используя штаммы бактерий рода *Pseudomonas*, выделенные нами из испорченных пищевых продуктов [21]. Кусочки рыбы, говядины, свинины и мяса птицы помещали в чашки Петри, инфицировали бактериями *Pseudomonas aeruginosa* 11, *Pseudomonas aeruginosa* 410, *Pseudomonas fluorescens* 27 и *Pseudomonas fluorescens* 224 и обрабатывали активной фракцией I экстракта *Cistus salviifolius*. Затем чашки Петри с образцами инкубировали при 4 °C в течение 9 суток и при 30 °C в течение 5 суток.

Контроль осуществляли ежедневно по характеру поверхности, цвету и запаху. Результаты, отражающие изменение органолептических свойств образцов говядины после обработки суспензиями бактерий и активной фракцией I экстракта ладанника шалфеелистного (*Cistus salviifolius*) при 4 °C и 30 °C, представлены на рис. 3 и 4 соответственно.

Так, при инфицировании образцов говядины бактериями *P. fluorescens*, *P. aeruginosa* или спонтанно развивающейся микробиотой (контроль) изменения состояния поверхности наблюдали на третьи сутки при инкубировании при 4 °C

и на первые – вторые сутки при 30 °C. Изменения цвета образцов наблюдали на третьи – четвертые сутки при 4 °C и на первые – вторые сутки при 30 °C. Запах у образцов появлялся на третьи сутки при 4 °C и на первые сутки при 30 °C.

Аналогичные зависимости получены и для образцов свинины, мяса птицы и рыбы. Выполненные исследования показали высокую эффективность активной фракции I экстракта ладанника шалфеелистного (*Cistus salviifolius*) в защите белоксодержащих продуктов от микробной порчи: в 1,75–4 раза при 4 °C и в 1,5–4 раза при 30 °C.

Таким образом, ладанник шалфеелистный (*Cistus salviifolius*) может быть использован для создания препарата, предназначенного для защиты пищевых продуктов от микробной контаминации. ■

Статья поступила в редакцию 05.07.2018 г.

SUMMARY

The presented study has been performed to identify flavonoids from the medicinal plants extracts and their antimicrobial activity against bacteria from the genus *Pseudomonas* determined food spoilage. Chromatographic methods have established that Sage-leaved Rockrose (*Cistus salviifolius*) extract contains kaempferol-3-β-D-glucopyranoside, which possesses significant antimicrobial activity. In beef, pork, poultry and fish samples infected with *Pseudomonas aeruginosa* bacteria, *Pseudomonas fluorescens* or spontaneously developed microbiota the activity of Sage-leaved Rockrose (*Cistus salviifolius*) extract has been demonstrated, which indicates the ability to protect food products from microbial contamination.

Keywords: flavonoids, medicinal plants, Sage-leaved Rockrose, kaempferol-3-β-D-glucopyranoside, chromat-mass spectrometry, antimicrobial activity, food products.

ЛИТЕРАТУРА

1. Пастушков Л. В. Лекарственные растения. Использование в народной медицине и быту. – СПб., 2012.
2. Носов А. М. Лекарственные растения официальной и народной медицины. – М., 2005.
3. Никитина В. С., Кузьмина Л. Ю., Мелентьев А. И., Шендель Г. В. Антибактериальная активность полифенольных соединений, выделенных из растений семейств *Geraniaceae* и *Rosaceae* // Прикладная биохимия и микробиология. 2007. Т. 43, № 6. С. 705–712.
4. Kalembe D., Kunicka A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils // Current medicinal chemistry. 2003. Vol. 10, N10. P. 813–829.
5. Харько И. А., Моисеева А. М., Железняк Н. В., Моисеев Д. В. Антимикробная активность лекарственного растительного сырья, содержащего изохинолиновые алкалоиды // Достижения фундаментальной, клинической медицины и фармации: материалы 72-й науч. сес. соот. ун-та, 25–26 янв. 2017 г. / ВГМУ – Витебск, 2017.
6. Akiyama H., Fujii K., Yamasaki O., Oono T., Iwatsuki K. Antibacterial action of several tannins against *Staphylococcus aureus* // J. Antimicrobial Chemotherapy. 2001. Vol. 48, N4. P. 487–491.
7. Лобанова А. А., Будаева В. В., Сакович Г. В. Исследование биологически активных флавоноидов в экстрактах из растительного сырья // Химия растительного сырья. 2004. № 1. С. 47–52.

Полный список литературы размещен на сайте

SEE <http://innosfera.by/2018/08/flavonoids>