

УДК: 57.069.4:582.263

Т.С. Кустова*¹, Т.А. Карпенюк¹, А.В. Гончарова¹, Л.К. Мамонов²

¹Казахский национальный университет им. аль-Фараби, г. Алматы, Казахстан,

²Институт биологии и биотехнологии растений, г. Алматы, Казахстан

*e-mail: kus_talya@yahoo.com

Противомикробные свойства суммарных экстрактов *Epilobium hirsutum*

Исследованы антимикробные свойства суммарных экстрактов, выделенных из надземной части *Epilobium hirsutum*. Установлено синергетическое действие биологически активных веществ в составе дихлорметанового экстракта по отношению к *Candida glabrata* и антагонистическое действие по отношению к *Staphylococcus aureus* и *Methicillin-resistant S. aureus*.

Ключевые слова: суммарные экстракты, фракция, антимикробная активность.

T.S. Kustova, T.A. Karpenyuk, A.V. Goncharova, L.K. Mamonov

Epilobium hirsutum-ның жалпы экстрактілердің антимикробты қасиеттері

Epilobium hirsutum-ның үстінгі бөлігінен алынған жалпы экстрактілердің антимикробты қасиеттері зерттелген. Дихлорметан экстрактінің құрамындағы биологиялық белсенді заттардың *Candida glabrata*-ға қатысты синергетикалық әрекеті және *Staphylococcus aureus*-қа, *Methicillin-resistant S. aureus*-қа қарсы антагонистикалық әсері анықталған.

Түйін сөздер: өсімдік экстрактылары, фракция, антимикробты белсенділік.

T.S. Kustova, T.A. Karpenyuk, A.V. Goncharova, L.K. Mamonov

Antimicrobial activity of crude extracts from *Epilobium hirsutum*

This study was carried out to determine the antimicrobial properties of crude extracts isolated from aerial parts of *Epilobium hirsutum*. Synergistic effect of biologically active substances were found in the dichloromethane extract relative to the *Candida glabrata* and antagonistic effect with respect to *Staphylococcus aureus* and *Methicillin-resistant S. aureus*.

Keywords: crude extracts, fraction, antimicrobial activity.

В последнее время растет интерес к исследованию дикорастущих лекарственных растений, в том числе представителям рода Кипрейных *Epilobium sp.* (семейство *Onagraceae*), насчитывающим почти 200 видов по всему миру. Чай или спиртовые экстракты из свежих надземных частей растений этого рода используются в народной медицине для лечения расстройств предстательной железы, лихорадки, ревматических и головной боли [1]. Механизм действия растительных препаратов, полученных из Кипрея до конца не изучен, но сообщалось, что они имеют антипролиферативную, антиандрогенную и антиэстрогенную активности [2-3], ингибируют пролиферацию клеток [4-6] оказывают противо-

воспалительное [7-9], антимикробное [10-12], и антиоксидантное действие [13].

На основе фитохимического анализа экстрактов листьев, масла из семян представителей *Epilobium sp.* установлено наличие флавоноидов, дубильных веществ, стероидов, жирных кислот. Флавоноиды оказывают капилляроукрепляющее действие, что лежит в основе спазмолитического, противоопухолевого эффектов. Кумарины придают кипрею болеутоляющее, жаропонижающее, сосудорасширяющее, антимикробное действие [14]. Из соцветий кипрея узколистного был получен препарат «Ханерол», обладающий противоопухолевой активностью [15-17]. Вследствие высокого содержания ви-

тамина С кипрей узколистный входит в состав биологически активной добавки «Нейростабил» [18].

Знание биологически активных соединений в *Epilobium sp* и их активности может быть особенно необходимо при проектировании новых безопасных и эффективных составов нутрицевтических и фитотерапевтических препаратов, содержащих лекарственные части этих растений.

Материалы и методы

Объектом исследования являлось дикорастущее растение флоры Казахстана *Epilobium hirsutum* (Onagraceae). Растение было собрано в фазу цветения в 2013 г. в Алматинской области (5-9 км от поселка Узын-Агаш). Идентификация растения проводилась в сравнении с коллекционным материалом Гербария Института ботаники и фитоинтродукции МОН РК и по определителям [4, 5].

Суммарный экстракт получали последовательной двухступенчатой экстракцией (дихлорметан, спирт). Надземную часть (100 г) *Epilobium hirsutum* экстрагировали с помощью 1,8 л дихлорметана при комнатной температуре 24 часа, количество полученного экстракта составило 2,9 г. Высушенный жмых позднее экстрагировали используя 1,7 л 95 % этанола, количество полученного экстракта составило 4,4 г после выпаривания растворителя на роторном испарителе фирмы Cole-Parmer.

Для поиска соединений с антимикробной активностью, часть суммарного экстракта 1,2 г было разделено с помощью колоночной хроматографии на приборе Biotage Isolera, используя 100 г SNAP картридж (40-63µм, 60Å, 39 x 157 мм) при потоке элюентов 40 мл/мин используя гексан и ацетон, при ступенчатом градиенте (первая ступень в соотношении 0:30 (v/v), 2000 мл, вторая ступень в соотношении 30: 100 (v/v), 400 мл, и завершающая ступень промывка метанолом 300 мл. Сбор фракций контролирова-

ли при длине волны 254 нм и 220 нм. Порции фракции в объеме 25 мл собирали в пробирки 16x150 мм. Все фракции были оценены на тонкослойной хроматограмме (ТСХ) используя гексан/ацетон в качестве растворителя (75:25) на Anal Tech Silica Gel GF 250 µм пластине. Было собрано 112 фракции по 25 мл каждая. Полученные фракции анализировали методом ТСХ, хроматографически одинаковые фракции объединяли, концентрировали досуха и подвергали повторному хроматографированию. Всего было собрано 13 фракций (А – М), которые использовали для исследования их антимикробного потенциала.

Антимикробную активность суммарных экстрактов определяли методом серийных разведений в бульоне [6, 7] с использованием следующих штаммов патогенных и условно патогенных микроорганизмов: бактерии *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Methicillin-resistant S. aureus* ATCC 43300, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, дрожжеподобные грибы *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida krusei* ATCC 6258, *Candida glabrata* ATCC 90030. Препаратами сравнения были антибиотики «Ципрофлоксацин» и «Амфотерицин В».

Результаты и их обсуждение

Первичный скрининг на антимикробную активность проводили для этанольного и дихлорметанового экстрактов в двух повторностях. Если исследуемый образец демонстрировал зону ингибирования роста тест-объектов, превышающую 50 %, то данный экстракт повторно исследовался для установления концентрации полумаксимального ингибирования (IC_{50}). Полученные данные (таблица 1) показали, что только дихлорметановый экстракт, выделенный из надземной части *Epilobium hirsutum* обладал противогрибковой активностью, процент ингибирования роста составил 69 %, по отношению к другим штаммам активность не наблюдалась.

Таблица 1 – Первичный скрининг экстрактов *Epilobium hirsutum* на антимикробную активность

Исследуемый экстракт <i>E. hirsutum</i>	Ингибирование роста, % (исследуемая концентрация образца 50 мкг / мл)					
	<i>C. glabrata</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. krusei</i>	<i>S. aureus</i>	MRS	<i>P. aeruginosa</i>
этанол	13	24	0	14	0	6
дихлорметан	69	0	48	21	4	42

Для подтверждения полученных данных, провели повторное исследование антимикробной активности экстрактов для установления концентрации полумаксимального ингибирования (IC_{50}).

Результаты вторичного скрининга (таблица 2) показали, что суммарный экстракт *Epilobium hirsutum*, выделенный из надземной части дихлорметановым растворителем, показал хорошую активность по отношению к *Candida glabrata* (IC_{50} составила 2 мкг / мл).

Для идентификации и поиска, биологически активных веществ суммарного экстракта *Epilobium hirsutum*, выделенную из надземной части кипрея мохнатого субстанцию разделили хроматографированием на колонке на 13 фракций. Все 13 фракций были исследованы на антибактериальную и противогрибковую активности (таблица 2).

Среди 13 фракций, только фракции Е, F и М обладали антимикробными свойствами по отношению к *Staphylococcus aureus* и *Methicillin-resistant S. aureus*. Из данных таблицы 2 видно, наибольшей антибактериальной активностью обладает фракция М в отношении *Staphylococcus aureus* (IC_{50} 4,68 мкг / мл) и *Methicillin-resistant S. aureus* (IC_{50} 5,4 мкг / мл).

Данные по антимикробной активности суммарного экстракта *Epilobium hirsutum* и после фракционирования говорят о синергетическом действии биологически активных веществ в составе данного экстракта, в связи с тем, что наблюдается хорошая активность по отношению к *Candida glabrata* (2 мкг / мл) в суммарном экстракте, но не наблюдается данной активности после фракционирования. Также наблюдается антагонистическое действие биологически активных веществ в составе данного экстракта по

Таблица 2 – Скрининг дихлорметанового экстракта *Epilobium hirsutum* и его фракций на антимикробную активность

Исследуемый экстракт	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Methicillin-resistant S. aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Candida glabrata</i>	<i>Candida krusei</i>	<i>Candida albicans</i>
IC_{50} *(мкг/мл)**						
Суммарный экстракт						
<i>E. hirsutum</i> (надзем. часть) дихлорметан	>200	>200	>200	2,0±0,80	>200	>200
Фракции						
Фракция А	>20	>20	>20	>20	>20	>20
Фракция В	>20	>20	>20	>20	>20	>20
Фракция С	>20	>20	>20	>20	>20	>20
Фракция D	>20	>20	>20	>20	>20	>20
Фракция Е	12,43±1,7	7,09±0,80	>20	>20	>20	>20
Фракция F	12,30±2,1	6,43±1,03	>20	>20	>20	>20
Фракция G	>20	>20	>20	>20	>20	>20
Фракция H	>20	>20	>20	>20	>20	>20
Фракция I	>20	>20	>20	>20	>20	>20
Фракция J	>20	>20	>20	>20	>20	>20
Фракция K	>20	>20	>20	>20	>20	>20
Фракция L	>20	>20	>20	>20	>20	>20
Фракция М	4,68±0,6	5,40±1,4	>20	>20	>20	>20
Ципрофлоксацин (контроль)	0,1±0,02	0,1±0,01	0,1±0,01	-	-	-
Амфотерицин В (контроль)	-	-	-	0,14±0,03	0,55±0,05	0,28±0,07

Примечание: * IC_{50} , концентрации полумаксимального ингибирования,
 ** в таблице представлены среднее значение ± стандартное отклонение (n=3)

отношению к *Staphylococcus aureus* и *Methicillin-resistant S. aureus*.

Таким образом, полученные данные по антимикробной активности представляют боль-

шой интерес для дальнейших исследований по идентификации биологически активных веществ суммарного экстракта, выделенного из надземной части *Epilobium hirsutum*.

Литература

- 1 PDR (Physicians Desk Reference) for Herbal Medicines, 4th Edition, 2007. – 1244 p.
- 2 Lesuisse D, Berjonneau J, Ciot C, Devaux P, Doucet B, Gourvest JF, Khemis B, Lang C, Legrand R, Lowinski M, Maquin P, Parent A, Schoot B, Teutsch G. Determination of Oenothien B as the Active 5- α -Reductase-Inhibiting Principle of the Folk Medicine *Epilobium parviflorum*. // Journal Natural Products. – 1996. – V 59. – P. 490-492.
- 3 Ducrey B, Marston A, Gohring S, Hartmann RW, Hostettmann K. Inhibition of 5 α -Reductase and Aromatase by the Ellagitannins Oenothien A and Oenothien B from *Epilobium* Species. // Planta Medica. – 1997. – V63. – P. 111-114.]
- 4 Vitalone A, Bordi F, Baldazzi C, Mazzanti G, Saso L, Tita B. Anti-proliferative effect on a prostatic epithelial cell line (PZ-HPV-7) by *Epilobium angustifolium* L II. // Farmaco. – 2001. – V56. – P. 483-489.
- 5 Vitalone A, Guizzetti M, Costa LG, Tita B. Extracts of various species of *Epilobium* inhibit proliferation of human prostate cells. // J Pharm Pharmacol. – 2003. – V 55(5). – P. 683-690.
- 6 Kiss A, Kowalski J, Melzig MF. Effect of *Epilobium angustifolium* L extracts and polyphenols on cell proliferation and neutral endopeptidase activity in selected cell lines. // Pharmazie. – 2006. – 61(1). – P. 66-9.
- 7 Hiermann A, Juan H, Sametz W. Influence of *Epilobium* extracts on prostaglandin biosynthesis and carrageenin induced oedema of the rat paw. // J Ethnopharmacol. – 1986. – 17(2). – P. 161-9.
- 8 Schepetkin IA, Kirpotina LN, Jakiw L, Khlebnikov AI, Blaskovich CL, Jutila MA, Quinn MT. Immunomodulatory Activity of Oenothien B Isolated from *Epilobium angustifolium*. // J immunol. – 2009. – 183(10). – P. 6754-66.
- 9 Kiss A, Bazylo A, Filipek A, Granica S, Jaszewska E, Kiarszys U, Kośmider A, Piwowarski J. Oenothien B's contribution to the anti-inflammatory and antioxidant activity of *Epilobium* sp. // Phytomedicine. – 2010. – 18(7). – P. 557-560.
- 10 Ivancheva S, Manolova N, Serkedjieva J, Dimov V, Ivanovska N. Polyphenols from Bulgarian medicinal plants with anti-infectious activity. // Basic Life Sci. – 1992. – V 59. – P. 717-728.
- 11 Battinelli L, Tita B, Evandri MG, Mazzantu G. Antimicrobial activity of *Epilobium* spp Extracts. // Farmaco. – 2001. – 56(5-7). – P. 345-348.
- 12 Steenkamp V, Gouws MC, Gulumian M, Elgorashi EE, van Staden J. Studies on antibacterial, anti-inflammatory and antioxidant activity of herbal remedies used in the treatment of benign prostatic hyperplasia and prostatitis. // J Ethnopharmacol. – 2006. – 103(1). – P. 71-75.
- 13 Hevesi BT, Houghton PJ, Habtemariam S, Kery A. Antioxidant and anti-inflammatory effect of *Epilobium parviflorum*. Schreb. // Phytother Res. – 2009. – V 23(5). – P. 719-724.
- 14 Махов А.А. Зеленая аптека: Лекарственные растения Красноярского края. Красноярск, 1986. – 352 с.
- 15 Сыркин А.Б., Коняева О.И. Фармацевтические исследования некоторых новых противоопухолевых средств // Химико-фармацевтический журнал. – 1984. – №10. – С. 1172–1180.
- 16 Киселева Т. Л., Ермакова В. А. К вопросу стандартизации сырья соцветия кипрея узколистного // Фармация. -1984. – №5. – С. 12–13.
- 17 Рабинович А. М. Фитотерапия против рака // Экология и жизнь. – 2001. – №5. – С. 78–81.
- 18 Пищевые добавки Арт лайф (БАД). <http://artlife-msk.ru>.