

Биохимические особенности и антибактериальное действие препаратов *Fragaria viridis*

Н.Ф. Гусев, д.б.н., профессор, Ю.А. Докучаева, методист, М.В. Сычёва, к.б.н., ФГБОУ ВО Оренбургский ГАУ; О.Н. Немешина, к.б.н., ГБОУ ВПО ОрГМУ

Появление лекарственно-устойчивых форм многих патогенных и условно-патогенных микроорганизмов делает актуальным поиск новых антибактериальных средств растительного происхождения [1]. Источником новых лекарственных средств может стать флора России, где возможна эксплуатация зарослей лекарственных растений и выявление перспективных видов лекарственного растительного сырья для использования в современной фитотерапии [2].

Территория Южного Урала и в частности оренбургское Предуралье является одним из регионов, обладающих значительным разнообразием лекарственных растений [3]. В настоящее время фитопрепараты занимают важное место среди средств профилактики и лечения многих заболеваний. Поэтому поиск новых видов лекарственного растительного сырья (ЛРС) является актуальной проблемой современной биологической и медицинской науки. Особый интерес представляют лекарственные растения, препараты которых обладают мягким комплексным действием и не проявляют побочных эффектов.

К таким растениям следует отнести виды рода *Fragaria* L. – земляника, занимающие обширный ареал в Евразии. В регионе Южного Урала род *Fragaria* представлен двумя дикорастущими видами: *Fragaria vesca* L. – земляника лесная и *Fragaria viridis* Duch. (Weston.) – земляника зелёная (клубника). Земляника лесная в Оренбургской области имеет ограниченный ареал и встречается в основном в лесах северных и северо-западных

районов лесостепной зоны региона [4]. Земляника зелёная встречается во всех районах области и может в перспективе пополнить ресурсную базу лекарственных растений Волго-Уральского региона [4].

В Государственный реестр лекарственных растений (2001) включена на сегодняшний день лишь земляника лесная [5]. Листья земляники лесной содержат витамины, дубильные вещества, органические кислоты, флавоноиды [5]. Плоды и листья растения применяются как витаминное, желчегонное, диуретическое, спазмолитическое и гипогликемическое средство.

Листья и плоды земляники зелёной (клубники) в народной медицине Волго-Уральского региона используются наравне с земляникой лесной в чайных смесях и различных сборах из растительного сырья. Препараты из листьев и плодов *Fragaria viridis* в Оренбургской области применяются как витаминное, желчегонное и противовоспалительное средство при заболеваниях желудочно-кишечного тракта. Ранее нами в листьях *Fragaria viridis*, произрастающей в степной зоне оренбургского Предуралья, обнаружены витамины: токоферолы, каротиноиды, витамин С, таниды [4].

В связи с использованием препаратов *Fragaria viridis* в фитотерапии в качестве противовоспалительных средств **целью** настоящего исследования является:

1. Определение содержания в сырье растения действующих веществ, обладающих биологической активностью и терапевтическим действием.
2. Исследование антимикробного действия водных извлечений (настои) из листьев земляники зелёной в отношении грамотрицательных микроорганизмов.

Материал и методы исследования. Растительное сырьё (листья) *Fragaria viridis* было собрано в период цветения растений в различных зонах и местообитаниях растения на территории Оренбургского Предуралья (табл. 1).

Опираясь на методы, принятые для исследования лекарственного растительного сырья, изучали содержащиеся в нём группы действующих веществ [6]. Для определения антимикробной активности сырья земляники зелёной готовили водные извлечения в соотношении 1:10. Антимикробную активность (чувствительность) кишечной палочки *Escherichia coli* к фитопрепаратам изучали по методу, описанному в отечественной литературе [7].

Результаты исследования. Исследование основной группы биологически активных веществ показало, что основными соединениями в сырье растения являются флавоноиды и таниды, относящиеся к группе полифенольных соединений (табл. 1). Для определения наличия флавоноидов в растительном сырье были использованы наиболее характерные реакции: проба Синода, проба Брианта и реакция со спиртовым раствором натрия гидроксида [6]. Для определения наличия танидов в сырье *Fragaria viridis* были использованы реакции осаждения веществ растворами желатина, солями алкалоидов и реакции окрашивания с раствором железоаммонийных квасцов [6].

Характерные реакции на флавоноиды и таниды наблюдались во всех образцах экстрактов из растительного сырья (табл. 1).

Флавоноиды, фенолкарбоновые кислоты и таниды представляют обширную группу полифенольных растений, содержащихся во всех высших растениях [5]. Флавоноиды принимают участие в окислительно-восстановительных процессах в клетках растений, проявляют защитное действие при повышенной инсоляции и низких температурах, в целом повышают толерантность видов к неблагоприятным факторам окружающей среды [6]. Флавоноиды и фенолокислоты характеризуются высшей антиоксидантной активностью и служат донором водорода при торможении перекисного окисления липидов, выполняют роль поглотителей свободных радикалов, предотвращая тем

самым гибель клеток [1, 2]. Фармакологическое действие флавоноидов характеризуется высоким разнообразием, поэтому диапазон их терапевтического действия довольно широк. Они проявляют желчегонное и спазмолитическое действие, способствуют накоплению в организме аскорбиновой кислоты, вместе с которой участвуют в процессах метаболизма [2]. Таниды оказывают вяжущее, противовоспалительное и бактерицидное действие, а фенолокислоты проявляют антибактериальное и туберкулостатическое действие [8].

Для выявления индивидуальных веществ полифенольной природы нами применён метод двумерной хроматографии на бумаге. Разделение суммы флавоноидов проводили на бумаге марки FN-1 «Filtrak» (Германия) восходящим способом в двух системах растворителей:

1. Н-бутанол – уксусная кислота – вода 4:1:5 (БУВ 4:1:5);

2. Уксусная кислота – вода (15:85).

После просмотра хроматограмм в УФ-свете, УФ-свете и парах аммиака, а также после проявления хромогенными реактивами, характерными для флавоноидов и фенолокислот [6], на хроматограммах обнаружено 16 соединений полифенольной природы (табл. 2). При этом 13 веществ по значению Rf, флюоресценции в УФ-свете и по результатам проявления хромогенными реактивами отнесены к флавоноидам, а три вещества представлены фенолокислотами (табл. 2). На хроматограмме «со свидетелями» идентифицированы: рутин (Rf 0,38/0,47), кверцетин (Rf 0,39/0,05), кверцитрин (Rf 0,39/0,47), гиперозид (Rf 0,51/0,39). Фенолокислоты идентифицированы как кофейная кислота (Rf 0,81/0,72), хлорогеновая (Rf 0,61/0,79) и неохлорогеновая (Rf 0,44/0,82), идентичные указанным в литературных источниках [9].

Количественное определение флавоноидов в сырье *Fragaria viridis* проводили фотоколориметрическим методом, основанным на реакции комплексообразования с раствором хлорида аммония и ацетата натрия, дающей окрашенные комплексы [9, 10]. Расчёт концентрации флавоноидов в сырье проводили по чистому цинарозиду. По результатам исследования установлено, что суммарное содер-

1. Биологически активные вещества в листьях *Fragaria viridis* Duch. (Weston.) степной зоны Оренбургского Предуралья

Местообитание растений	Действующие вещества				
	азотистые вещества	флавоноиды	таниды	кумарины	гликозиды
Степь – западина. Заповедник «Оренбургский» (Акбулакский район, 2014)	+	+++	+	сл.	+
Остепнённые луга. Полигон Оренбургского ГПЗ, 2014	+	++	+	сл.	сл.
Лесостепь. Опушка берёзового леса (Асекеевский район, 2014)	сл.	++	++	сл.	сл.

Примечание: сл. – следы, едва заметная реакция; + – наличие, заметная реакция; ++ – выраженная реакция, значительное количество; +++ – ярко выраженная реакция, высокое содержание веществ

2. Результаты хроматографии фенольного комплекса земляники зелёной

Значение Rf		Окраска				Класс соединения
БУВ 4:1:2	15% CH ₃ COOH	УФ-свет	УФ-свет + NH ₃	AlCl ₃	Р-в Гепфнера	
0,39	0,05	фиолетовая	жёлтая	бледно-жёлтая	–	флавоноиды
0,39	0,11	голубая	–	бледно-жёлтая	–	флавоноиды
0,14	0,21	фиолетовая	жёлтая	бледно-жёлтая	–	флавоноиды
0,06	0,34	фиолетовая	бледно-жёлтая	бледно-жёлтая	–	флавоноиды
0,13	0,45	голубая	–	бледно-жёлтая	–	флавоноиды
0,05	0,49	фиолетовая	бледно-жёлтая	бледно-жёлтая	–	флавоноиды
0,17	0,65	фиолетовая	бледно-жёлтая	бледно-жёлтая	–	флавоноиды
0,38	0,47	–	жёлтая	бледно-жёлтая	–	флавоноиды
0,51	0,39	тёмно-фиолетовая	жёлтая	ярко-жёлтая	–	флавоноиды
0,62	0,42	тёмно-фиолетовая	жёлтая	ярко-жёлтая	–	флавоноиды
0,81	0,33	–	жёлтая	жёлтая	–	флавоноиды
0,72	0,49	фиолетовая	–	жёлтая	–	флавоноиды
0,55	0,64	фиолетовая	жёлтая	жёлтая	–	флавоноиды
0,81	0,72	–	голубая	–	оранжево-коричневая	фенолокислоты
0,61	0,79	–	ярко-голубая	–	оранжево-коричневая	фенолокислоты
0,44	0,82	–	ярко-голубая	–	оранжево-коричневая	фенолокислоты

3. Суммарное содержание флавоноидов в листьях *Fragaria viridis* лесостепной и степной зон Оренбургского Предуралья, % на абс. сух. вес (X±Sx)

Зона и местообитание растений	Флавоноиды	Таниды
Степь – западина. Заповедник «Оренбургский» (Акбулакский район)	2,43±0,01	3,87±0,06
Остепнённые луга. Полигон Оренбургского ГПЗ – зона влияния промышленных выбросов (Оренбургский район, 2014)	2,16±0,02	4,02±0,01
Лесостепь. Опушка берёзового леса (Асекеевский район, 2014)	2,04±0,01	5,56±0,09

жание флавоноидов несколько выше в образцах сырья, собранного в степной зоне Оренбургского Предуралья, имеющей ГТК, равный 0,6–0,8 и характеризующейся как засушливая территория (табл. 3), [18].

Количественное определение танидов основано на их окисляемости раствором перманганата калия в присутствии индигосульфокислоты. Максимальное количество танидов отмечено в растениях, произрастающих в лесостепной зоне – на территории с достаточным увлажнением почвы (табл. 3).

Полифенолы (флавоноиды, фенолоксислоты, таниды) обладают антибактериальным действием и активны в отношении *Escherichia coli* [1]. Поэтому был проведён тест для определения влияния препаратов земляники зелёной, содержащих полифенолы, на рост и антибактериальную активность *Escherichia coli*. Кишечная палочка (*Escherichia coli*) – вид грамотрицательных палочковидных бактерий, факультативных анаэробов, входящий в состав нормальной микрофлоры желудочно-кишечного тракта человека и играющий важнейшую роль в функционировании желудочно-кишечного тракта. *Escherichia coli* относится к условно-патогенной микрофлоре и при неблагоприятных условиях принимает участие в развитии острых бактериальных диарей. Отмечается участие *Escherichia coli* в процессе порчи продуктов питания [2].

Определение чувствительности *Escherichia coli* к фитопрепаратам проводилось согласно методике, изложенной в отечественной литературе [7].

При этом готовили взвесь микроорганизмов с использованием суточной агаровой культуры по стандарту мутности (БАК 10). Далее в эксперименте использовали взвесь, разведённую в 10 раз. Полученную взвесь микроорганизмов в соотношении 1:1 инкубировали в течение часа в условиях термостата с цельным и разбавленными настоями растительного сырья. Далее взвесь высевали на плотную питательную среду секторным посевом, чашки инкубировали в течение 18–24 час. в условиях термостата.

Внесение извлечений (настоев) листа *Fragaria viridis* в питательную среду во всех трёх исследуемых образцах показало отрицательное влияние на рост кишечной палочки (табл. 4). При воздействии настоя отмечено снижение скорости роста колоний *Escherichia coli* в 2–10 раз.

Настой *Fragaria viridis*, разведённый в два раза, также снижает скорость роста *Escherichia coli* в 2–10 раз. Препараты, разбавленные в четыре раза, уменьшили оптическую плотность бактериальной культуры *Escherichia coli* в 2–10 раз по сравнению с контролем, а образец, собранный в Асекеевском районе, в такой концентрации не влиял на скорость роста *Escherichia coli*. Настой земляники зелёной, разбавленный в 8 раз, не снижал количество *Escherichia coli* по сравнению с контролем либо снижал рост колоний в 2 раза (образец, собранный на территории Оренбургского ГРЗ).

Полученные данные указывают на определённую антибактериальную активность настоя листа

4. Влияние настоев листа *Fragaria viridis* на развитие *Escherichia coli*, 2014 г.

Препарат	Кишечная палочка, количество		
	место сбора		
	степь – западина, заповедник «Оренбургский» (Акбулакский район)	остепнённые луга, полигон Оренбургского ГПЗ – зона влияния промышленных выбросов (Оренбургский район, 2014)	лесостепь, опушка берёзового леса (Аскеевский район, 2014)
Контроль (вода дист.)	1000000	1000000	1000000
Цельный настой листа земляники зелёной	500000	100000	500000
1/2 настоя	500000	100000	500000
1/4 настоя	500000	100000	1000000
1/8 настоя	1000000	500000	1000000

Fragaria viridis в отношении *Escherichia coli*. Достоверное снижение прироста бактериальной биомассы установлено для цельного и разбавленного в два раза настоя листьев земляники зелёной. Максимальный антибактериальный эффект проявили извлечения из сырья *Fragaria viridis*, собранного на остепнённых, а минимальный – препараты из сырья, заготовленного в лесостепной зоне (табл. 4). Исследование антибактериальных свойств извлечений из сырья (лист) *Fragaria viridis* позволяет считать данный вид сырья перспективным как для разработки биологически активных добавок, так и для увеличения срока годности товаров косметической и пищевой промышленности.

Выводы.

1. В растительном сырье (листья) *Fragaria viridis* идентифицированы флавоноиды: кверцетин, рутин, кверцитрин, гиперозид, а из фенолоксилов – кофейная, хлорогеновая и неохлорогеновая.

2. Накопление полифенолов – флавоноидов и танидов в *Fragaria viridis* зависит от экологических условий и местообитания растений. Максимальное количество флавоноидов обнаружено в растениях земляники зелёной, встречающейся в южных сухостепных районах Оренбургского Предуралья, а танидов – в северных лесостепных районах региона.

3. Антибактериальные показатели водных извлечений из лекарственного растительного сырья земляники зелёной позволяют отнести данный

вид к лекарственным растениям, перспективным для использования в современной фитотерапии, а также для увеличения срока годности товаров косметической и пищевой индустрии.

Литература

1. Тиньков А.А. и др. Сравнительный анализ влияния растений семейства подорожниковые на рост *Escherichia coli* in vitro // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН. 2014. № 2. С. 1–16.
2. Немерешина О.Н., Гусев Н.Ф., Малкова Т.Л. Изучение биологически активных веществ и антимикробной активности листьев *Plantago lanceolata* L. // Башкирский химический журнал. 2014. Т. 21. № 4. С. 133–142.
3. Гусев Н.Ф. Биологические особенности и перспективы использования растений рода *Veronica* L. (сем. *Scrophulariaceae* Juss.) лесостепного и степного Предуралья: автореф. дисс. ... докт. биол. наук. Оренбург. 2010. 42 с.
4. Докучаева Ю.А., Немерешина О.Н., Гусев Н.Ф. Содержание витаминов в листьях *Fragaria viridis* Duch. (Weston.) степной зоны оренбургского Предуралья // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. 2015. № 1 (51). С. 140–142.
5. Петухова О.В., Иванова Г.А. Флавоноиды листьев земляники лесной и садовых сортов региона Урала // Фармация. 2003. № 5. С. 19–20.
6. Решетникова М.Д., Левикова В.Ф., Хлебников А.В. Химический анализ биологически активных веществ лекарственного растительного сырья и продуктов животного происхождения. Пермь, 2004. 335 с.
7. Биргер М.О. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам. М.: Медицина, 1982. 462 с.
8. Шкарина Е.Н., Максимова Т.В., Никулина И.Н. О влиянии биологически активных веществ на антиоксидантную активность фитопрепаратов // Химико-фармацевтический журнал. 2001. Т. 35. Вып. 6. С. 40–47.
9. Петриченко В.М., Сухинина Т.В. Очанки Западного Урала. Пермь, 2006. 146 с.
10. Бандюкова В.А. Фенолоксиловы растений, их эфиры и гликозиды // Химия природных соединений. 1983. Т. 2. С. 271–275.