

УДК 582.573.16:547.918

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ СТЕРОИДНЫХ ГЛИКОЗИДОВ СОЦВЕТИЙ *ALLIUM CYRILLII* (ALLIACEAE)

Толкачева Н.В.¹, Ежов В.Н.¹, Бондарчук О.П.², Комаровская-Порохнявец Е.З.²,
Винницкая Р.Б.², Новиков В.П.², Чирва В.Я.³

¹Никитский ботанический сад – Национальный научный центр, пгт. Никита, Ялта, Украина

²Национальный университет «Львовская политехника», Львов, Украина

³Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, Симферополь, Украина
E-mail: tolkacheva_n@mail.ru

В результате исследования стероидных гликозидов соцветий лука Кирилла (увеличенного) *Allium cyrillii* Ten. выделена сумма сапонинов и основной спиростаноловый гликозид – 3-*O*- β -D-ксилопиранозил-(1 \rightarrow 3)-[*O*- β -D-глюкопиранозил-(1 \rightarrow 2)]-*O*- β -D-глюкопиранозил-(1 \rightarrow 4)-*O*- β -D-галактопиранозид-(25*R*)-5 α -спиростан-2 α ,3 β ,6 β -триол. Изучена биологическая активность суммы стероидных гликозидов и основного стероидного сапонины соцветий данного лука. Показано, что они не обладают бактерицидными свойствами, но проявляют высокую фунгицидную и рострегулирующую активность.

Ключевые слова: *Allium cyrillii* Ten., стероидные гликозиды, биологическая активность.

ВВЕДЕНИЕ

Стероидные гликозиды являются обширным классом природных соединений из группы сапонинов, которые в последнее время привлекают все больше внимания исследователей, благодаря широкому спектру биологической активности и экологической безопасности [1].

Известно, что экстракты разных растений, принадлежащих к семействам *Amaryllidaceae*, *Dioscoreaceae*, *Alliaceae*, *Scrophulariaceae*, *Solanaceae*, которые содержат стероидные гликозиды, используются в традиционной медицине как противоопухолевые, фунгицидные, контрацептивные, антивирусные и цитотоксические средства [2–6]. Известно также, что данные соединения снижают уровень холестерина в крови и обладают антиоксидантным действием [7, 8]. Кроме того, стимуляция роста и фитоиммунитета растений стероидными гликозидами позволяет рассматривать эти вещества как природные адаптогены [9].

Перспективными в плане поиска сапониноносных видов являются растения рода *Allium*, произрастающие в Крыму, тем более что в литературе данные о стероидных гликозидах большинства крымских луков отсутствуют. Именно поэтому изучение химической структуры и биологической активности стероидных гликозидов представителей семейства *Alliaceae* является актуальным.

Целью настоящей работы является изучение бактерицидной, фунгицидной и рострегулирующей активности стероидных сапонинов соцветий *Allium cyrillii* для возможности их дальнейшего практического использования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объектов исследования взяты сумма стероидных гликозидов и основной сапонин, выделенные из соцветий лука Кирилла (увеличенного) *Allium cyrillii* Ten., собранного на северо-восточном склоне горы Парагильмен (Южный берег Крыма) в 2010 г.

Антимикробную активность изучали методом диффузии в агар и методом серийных разбавлений исследуемого соединения по стандартным методикам [10]. В опытах использовались следующие тестовые культуры: бактерии *Escherichia coli* 67, *Staphylococcus aureus* 209-p, *Mycobacterium luteum* ВКМ В-868 и грибы *Candida tenuis* ВКМ Y-70, *Aspergillus niger* ВКМ F-1119. Степень активности исследуемых соединений оценивали по величине зон угнетения роста тестовых культур микроорганизмов. Повторность опыта трехкратная.

Минимальную бактерицидную (МБцК), бактериостатическую (МБсК) и фунгицидную (МФцК), фунгистатическую (МФсК) концентрации определяли методом серийных разбавлений в пределах 0.9–500 мкг/см³. Для этого исследуемые вещества растворяли в ДМСО, достигая необходимой концентрации.

Определение МБсК (МФсК). Определенный объем раствора вещества вносили в питательную среду (МПБ – для бактерий; неохмеленное пивное сусло 6-8 Б⁰ – для грибов). В питательную среду инокулировали посевной материал бактерий (10⁶ клеток/см³) или (10⁵ спор/см³) грибов. Засеянные пробирки выдерживали в термостате при соответствующей температуре (37 °С – для бактерий; 30 °С – для грибов) в течение 24–72 часов. Результаты оценивали по наличию или отсутствию роста микроорганизмов (по степени микробной мутности питательной среды).

Определение МБцК (МФцК). Растворы среды, оказавшиеся визуально прозрачными, высевали на стерильный 2% МПА (для бактерий) или 2% СА (для грибов) и инкубировали в термостате при оптимальных для роста микроорганизмов температурных режимах. Оценивание результатов осуществляли для тестовых бактерий через 24 час., для тестовых грибов – 48–72 час. По отсутствию роста колоний микроорганизмов на инкубируемых чашках Петри определяли МБцК или МФцК исследуемого вещества. Повторность опыта трехкратная.

Рострегулирующую активность изучали по стандартной методике в модификации Сергеевой [11] на агаризованой среде следующего состава (г/дм³): MgSO₄ · 7H₂O – 1; K₂HPO₄ – 1; FeSO₄ · 7H₂O – 0.02; агар-агар – 8, в которую вносили раствор препарата в концентрации 1, 10, 100 мг/дм³ среды и разливали в чашки Петри; в контрольные чашки вносили эквивалентное количество ДМСО. В опыте использовали семена однодольных (овес) и двудольных (кресс-салат) растений, которые проращивали на агаризованой среде 72 часа в термостате при температуре 22 °С с последующим доращиванием проростков в течение 96 час. в вытяжном шкафу с искусственным освещением при 19–20 °С. В конце опыта определяли всхожесть семян и линейные размеры частей растений. Результаты

представлены в процентах сравнительно с контролем. При показателе, превышающем 100%, фиксировали стимуляцию роста, а при показателе менее 100% – его угнетение. Повторность опытов трехкратная.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

С целью первичной оценки антимикробной активности суммы стероидных гликозидов и основного сапонина соцветий *A. cyrillii* проведено тестирование этих веществ методом диффузии в агар при их концентрациях 0.1; 0.5; 1.0 и 2.5%. Анализ полученных результатов свидетельствует о том, что в исследуемых пределах концентраций веществ зон угнетения роста микроорганизмов не наблюдалось. Метод серийных разбавлений веществ позволяет установить количественные показатели минимальной ингибирующей концентрации и минимальной биоцидной концентрации относительно тестовых культур бактерий и грибов. В результате экспериментов установлено, что тестовые культуры бактерий оказались нечувствительными как к действию суммы стероидных гликозидов, так и к индивидуальному сапонину в диапазоне концентраций 0.9–2000 мкг/см³.

Предварительная оценка противогрибковой активности образцов (табл. 1) показала, что они обладают фунгицидными свойствами относительно дрожжевой культуры *C. tenuis*, а тестовая культура плесневого гриба *A. niger* оказалась резистентной к действию исследуемых соединений в изученных концентрациях, о чем свидетельствует активный рост этого гриба в присутствии гликозидов на уровне контрольного образца.

Таблица 1
Фунгицидная активность соединений методом диффузии веществ в агар

№ п/п	Соединение	Концентрация, %	Диаметр зон угнетения роста микроорганизмов, мм	
			<i>Candida tenuis</i>	<i>Aspergillus niger</i>
1.	Гликозид	2.5	27	0
		1.0	23	0
		0.5	20	0
		0.1	15	0
2.	Сумма СГ	2.5	22	0
		1.0	18	0
		0.5	13	0
		0.1	10	0

В Таблицах 2 и 3 представлены результаты изучения фунгицидных свойств гликозидов. На основе полученных данных установлено, что гликозид в концентрации 2000 мкг/см³ обладает фунгистатическими свойствами относительно тестовой культуры плесневого гриба *A. niger*. Кроме того, выявлено, что оба изучаемых соединения обладают высокой фунгицидной активностью по отношению

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ СТЕРОИДНЫХ ГЛИКОЗИДОВ...

к *C. tenuis*. Так, для гликозида МФсК составляет 1.9, МФцК – 3.9 мкг/см³. Сумма стероидных гликозидов также проявляет достаточно сильные фунгицидные свойства: МФсК 31.2, МФцК – 62.5 мкг/см³.

Таблица 2

Установления МФцК и МФсК соединений методом серийных разбавлений

Код	Культуры грибов	Концентрация вещества, мкг/см ³																		
		2000	1800	1600	1400	1200	1000	800	600	500	250	125	62.5	31.2	15.6	7.8	3.9	1.9	0.9	0 (К)
Гликозид	<i>C. tenuis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	+	+
	<i>A. niger</i>	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Сумма СГ	<i>C. tenuis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	+	+	+	+	+	+
	<i>A. niger</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Примечание:

- + рост культуры микроорганизма
- ± угнетение роста микроорганизма
- отсутствие роста микроорганизма

Таблица 3

Показатели МФцК и МФсК соединений методом серийных разбавлений

№ п/п	Соединение	Культуры грибов			
		<i>Candida tenuis</i>		<i>Aspergillus niger</i>	
		МФсК мкг/см ³	МФцК мкг/см ³	МФсК мкг/см ³	МФцК мкг/см ³
1.	Гликозид	1.9	3.9	2000	>2000
2.	Сумма СГ	31.2	62.5	+	+

Примечание: «+» – в исследуемых концентрациях биоцидного эффекта не наблюдалось (наблюдался рост микроорганизма).

Следующим этапом наших исследований было изучение потенциальной рострегулирующей активности веществ. Результаты исследований, приведенные в Табл. 4, характеризуют сумму стероидных гликозидов как препарат с хорошо выраженными ростстимулирующими эффектами даже в минимальной концентрации 1 мг/дм³. Так, в концентрации 1 и 10 мг/дм³ исследуемый образец стимулирует рост корня и стебля овса на 38–41% и 21–31%, соответственно. В концентрации 100 мг/дм³ наблюдается существенный ингибирующий эффект роста корня овса, всхожесть данного тест-растения ухудшается на 30%. Кроме того, сумма стероидных гликозидов в концентрации 100 мг/дм³ достаточно сильно ингибирует рост корня и стебля кресс-салата (на 64 и 36%, соответственно).

Таблица 4
Количественные показатели рострегулирующей активности суммы СГ

Соединение	Концентрация соединения, мг/дм ³	Линейные размеры частей растения и всхожесть, % к контролю					
		Овес			Кресс-салат		
		корень	стебель	всхожесть	корень	стебель	всхожесть
Сумма СГ	100	79	102	70	36	64	83
	10	141	131	95	103	97	87
	1	138	121	97	100	94	90

ВЫВОДЫ

1. Методом диффузии в агар индивидуального сапонина и суммы стероидных гликозидов *Allium cyrillii* Тен. выявлены зоны задержки роста культуры *Candida tenuis*, параметры которых свидетельствуют о высокой чувствительности данного вида дрожжей к действию этих веществ.
2. На основе метода серийных разбавлений для суммы гликозидов и чистого сапонина в исследуемых концентрациях бактерицидные показатели не установлены.
3. Определена минимальная фунгистатическая концентрация чистого гликозида относительно культуры гриба *Aspergillus niger*, которая составляет 2000 мкг/см³.
4. Метод серийных разбавлений позволил обнаружить высокие показатели фунгицидных свойств как индивидуального сапонина, так и суммы стероидных гликозидов по отношению к культуре *Candida tenuis*, а именно: МФсК 1.9–31.2 мкг/см³; МФцК 3.9–62.5 мкг/см³.
5. Исследование рострегулирующей активности суммы стероидных гликозидов соцветий *A. cyrillii* показало, что в пределах концентрации 1 и 10 мг/дм³ она стимулирует рост стебля и корня у овса, а при концентрации 100 мг/дм³ достаточно сильно ингибирует рост корня и стебля кресс-салата.

Список литературы

1. Строение и биологическая активность стероидных гликозидов ряда спиростана и фуростана / [П.К. Кинтя, Г.В. Лазурьевский, Н.Н. Балашова и др.]. – Кишинев: Штиинца, 1987. – 142 с.
2. Васильева И.С. Состав и биологическая активность стероидных гликозидов из суспензионной культуры клеток *Dioscorea deltoidea* Wall. / И.С. Васильева, В.А. Пасешниченко // Прикл. биохим. и микробиол. – 1995. – Т. 31. – С. 238–242.
3. Antifungal activity of C-27 steroidal saponins / C.-R. Yang, Y.M.R. Zhang, Jacob [et al.] // Antimicrobial Agents and Chemotherapy – 2006. – Vol. 50– № 5. – P. 1710–1714.
4. Корреляция между строением и противоопухолевой активностью в ряду стероидных гликозидов / И.Б. Берсукер, А.С. Димогло, И.Н. Чобан [и др.] // Хим.-фарм. журн. – 1983. – № 12. – С. 1467–1471.
5. Cytotoxic steroidal saponins from the flowers of *Allium leucanthum* / L. Mskhiladze, J. Legault, S. Lavoie [et al.] // Molecules – 2008. – Vol. 13. – P. 2925–2934.

6. Oleszek W. Saponins in food, feedstuffs and medicinal plants / W. Oleszek, A. Marston // Phytochemical Society of Europe. – 2000. – Vol. 45. – P. 241–254.
7. Steroid saponins from fenugreek and some of their biological properties / Y. Sauvaire, Y. Baissac, O. Leconte [et al.] // Adv. in Exp. Med. and Biol. N.Y. – London: Plenum Press. – 1996. – Vol. 405. – P. 37–46.
8. Кинтя П.К. Поиск антиоксидантов в ряду стероидных гликозидов / П.К. Кинтя, Л.П. Ковальчук, С.А. Бурцева // Хим. фарм. журнал. – 1982. – № 1. – С. 95–97.
9. Стероидные фураностаноловые гликозиды – новый класс природных адаптогенов / И.С. Васильева, Ж.В. Удалова, С.В. Зиновьева [и др.] // Прикладная биохимия и микробиология. – 2009. – Т. 45. – № 5. – С. 517–526.
10. Лабинская А.С. Микробиология с техникой микробиологических исследований / А.С. Лабинская // М.: Медицина, 1972. – С. 91–93.
11. Сергеева Т.А. Методика лабораторных испытаний гербицидов / Т.А. Сергеева // Защита растений – 1963. – №2. – С. 42–44.

Толкачова Н.В. Біологічна активність стероїдних глікозидів суми *Allium cyrililii* (Alliaceae) / Н.В. Толкачова, В.М. Єжов, О.П. Бондарчук, О.З. Комаровська-Порохнявець, Р.Б. Вінницька, В.П. Новіков, В.Я. Чирва // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2012. – Т. 25 (64), № 1. – С. 224-229.

Вивчена біологічна активність суми сапонінів і основного стероїдного глікозиду суми *Allium cyrililii* Ten. – 3-*O*-β-*D*-ксилопіранозил-(1→3)-[*O*-β-*D*-глюкопіранозил-(1→2)]-*O*-β-*D*-глюкопіранозил-(1→4)-*O*-β-*D*-галактопіранозид-(25*R*)-5α-спіростан-2α,3β,6β-тріола. Показано, що вони не володіють бактерицидними властивостями, але проявляють високу фунгіцидну і рістрегулюючу активність.

Ключові слова: *Allium cyrililii* Ten., стероїдні глікозиди, біологічна активність.

Tolkachova N.V. Biological activity of steroidal glycosides of raceme of *Allium cyrililii* (Alliaceae) / N.V. Tolkachova, V.N. Ezhov, O.P. Bondarchuk, E.Z. Komarovskaya-Porokhnyavets, R.B. Vinnitskaya, V.P. Novikov, V.Ya. Chirva // Scientific Notes OF Taurida V.Vernadsky National University. – Series: Biology, chemistry. – 2012. – Vol. 25 (64), No 1. – P. 224-229.

Biological activity of saponins sum and basic steroidal glycoside of raceme of *Allium cyrililii* Ten. – 3-*O*-β-*D*-xylopyranosyl-(1→3)-[*O*-β-*D*-glucopyranosyl-(1→2)]-*O*-β-*D*-glucopyranosyl-(1→4)-*O*-β-*D*-galactopyranoside-(25*R*)-5α-spirostan-2α,3β,6β-triol have been studied. It is shown that they have not possess bactericidal properties, but have high fungicidal and growth-regulatory activity.

Keywords: *Allium cyrililii* Ten., steroidal glycosides, biological activity.

Поступила в редакцію 11.02.2012 г.