

УДК 634.51; 615

ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИБИОТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЮГЛОНА, ВЫДЕЛЕННОГО ИЗ ОКОЛОПЛОДНИКА *JUGLANS NIGRA* L.

О.В. Тушканова^{1*}, И.Е. Бойко¹

Резюме. В статье представлены результаты экспериментов по выделению юглона из околоплодника ореха черного (*Juglans nigra* L.) и изучению его антибиотической активности в отношении штаммов *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli* как наиболее характерных представителей грамположительных и грамотрицательных бактерий.

Ключевые слова: фитоэкстракт, хроматография, юглон, тест-объекты, инокулят, ингибция, антибактериальный эффект.

INVESTIGATION OF ANTIBIOTIC ACTIVITY JUGLONE ISOLATED FROM PERICARP *JUGLANS NIGRA* L.

O.V. Tushkanova^{1*}, I.E. Boyko¹

Abstract. The article presents the results of experiments in selection of juglone pericarp *Juglans nigra* L. and the study of its antibiotic activity against strains of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* as the most characteristic typical representatives of gram-positive and gram-negative bacteria.

Keywords: phytoextract, chromatography, juglone, testobjects, inoculum, inhibition, anti-bacterial effect.

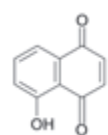
1 – ФГБОУ ВО «Майкопский государственный технологический университет», 385000, Россия, г. Майкоп, ул. Советская, д. 197/а

1 – FSBEU HE «Maikop State Tehnology University», 197/a, Sovetskaya str., Maikop, 385000, Russia

* адресат для переписки:

E-mail: olia.tushkanova@yandex.ru

ВВЕДЕНИЕ



Юглон (5-гидрокси-1,4-нафтохинон) и его производные – природные соединения из группы нафтохинонов, содержащиеся в разных частях растений рода ореха *Juglans* L., обладают широким спектром биологического действия, включая антибиотическое, фитотоксическое, инсектицидное, фунгицидное и др. [2]. Хиноидная структура широко распространена в природе. Согласно данным из природных источников выделено около 1500 соединений с хиноидным ядром [6]. Хиноны являются важным классом природных и синтетических соединений с большим разнообразием функций. Хорошо известна их роль в биохимии живых клеток. Есть данные о том, что юглон угнетает активность такого фермента, как фосфатидилинозитол-3-киназа, с чем связывают его антиканцерогенные свойства, при этом не отмечается токсичность, свойственная другим цитостатикам [5]. Юглон получают в основном из различных частей грецкого ореха (чаще из околоплодника). Однако использовать грецкий орех, являющийся ценным пищевым растением, в качестве сырья для получения юглона нерационально. Поэтому изыскание новых источников получения юглона является актуальной задачей. Например, части ореха черного (*Juglans nigra* L.) также содержат юглон, причем

в количествах, превышающих его содержание в грецком орехе [1]. Черный орех является широко распространенным растением, применяется в технических целях для лесозащитных полос, как источник ценной древесины и др. Плоды черного ореха не используются как пищевой продукт. Поэтому выделение юглона из частей черного ореха (околоплодника, плодов, цветков) экономически более целесообразно.

Многие хиноны, например 5-гидрокси-1,4-нафтохинон (юглон) и его 2-метилгомолог плюмбагин, выделенные из различных высших растений, ингибируют рост бактерий и грибов и используются растениями как защитные вещества [2]. Хиноидное ядро входит в структуру различных, практически важных противоопухолевых препаратов (антрациклиновых цитостатиков и гетероциклических хинонов). К настоящему времени принято считать, что цитотоксический эффект хинонов обусловлен: а) их способностью продуцировать кислородсодержащие свободные радикалы, б) электрофильностью хиноидного ядра, легко образующего аддукты с различными бионуклеофилами [6].

Целью данной работы явилось выделение юглона из околоплодника ореха черного и подтверждение его антибиотической активности в отношении штаммов *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования

Тест-объекты – музейные типичные представители (Γ^+ и Γ^-) бактерий – *Staphylococcus aureus* (стафилококк золотистый) и *Escherichia coli* (кишечная палочка).

Реактивы:

- Стандарт Sigma-Aldrich (5-гидрокси-1,4-нафтохинон – юглон 97%, стандартный образец, № 481-39-0, производитель Acros).
- Диметилкетон (ацетон, 1 л, ч.д.а., ГОСТ 2603-79).
- Этоксизтан (эфир диэтиловый, х.ч., ТУ 2600-001-45682126-13).
- Железа (III) хлорид, раствор с массовой долей 10% (ГОСТ 4517-87).
- Кислота хлористоводородная 8,3% (ГОСТ 4517-87).
- Натрия сульфат безводный, массовая доля сернокислого натрия Na_2SO_4 (%) – не менее 99,5%, ГОСТ 4166-76).
- Гидроксид калия (КОН), раствор с массовой долей 10% (ГОСТ 4517-87).
- Приготовление реактива Драгендорфа строго по ГФ XI, Т. 2, С. 125. Поставщик: ЗАО «Вектон», Санкт-Петербург. Химреактивы и техническая химия.

Лабораторная посуда и оборудование

- Химическая посуда: флаконы, воронки, делительные воронки, мерные пипетки, химические стаканы, чашки Петри.
- Наборы для тонкослойной хроматографии (пластинки марки Sorbfil ПТСХ-П-В-УФ, ТУ 26-11-17-89, Краснодар, Россия).
- Спектрофотометр СФ-2000, соответствует требованиям ГОСТ 15150-69, ЗАО «ОКБ Спектр», Санкт-Петербург, Россия.
- Инкубатор/термостат микробиологический BD 240 BINDER (Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Получение фитоэкстракта из околоплодника ореха черного (*Juglans nigra* L.) проводили по ранее предложенной методике [3]. Выделение юглона проводили по разработанной нами методике: 5,0 г (точная навеска) помещали в коническую колбу вместимостью 250 мл, прибавляли 100 мл воды, 10 мл 10% водного раствора железа (III) хлорида, 40 мл кислоты хлористоводородной 8,3%, перемешивали, нагревали на водяной бане с обратным холодильником в



Инкубатор/термостат микробиологический BD 240 BINDER

течение 1 ч. Смесь охлаждали, количественно переносили в делительную воронку вместимостью 250 мл и проводили экстракцию хлороформом дважды по 40 мл в течение 2 мин. Хлороформную фазу отделяли, фильтровали через бумажный фильтр с 2 г безводного натрия сульфата, и полученный фильтрат упаривали при температуре 40 °С досуха. К сухому остатку добавляли 10 мл 0,1 н раствора гидроксида натрия, тщательно перемешивали и фильтровали. Фильтрат (рН 11-12) экстрагировали равной порцией диэтилового эфира, водную фазу отделяли, подкисляли раствором хлористоводородной кислоты до рН 2-3 и проводили экстракцию хлороформом. Органическую фазу отделяли, фильтровали через сухой фильтр, содержащий безводный сульфат натрия, и упаривали досуха при 40 °С. Полученный сухой остаток с помощью нескольких капель хлороформа наносили в виде полосы на стартовую линию пластин Sorbfil, покрытых силикагелем, размером 10×10 см и хроматографировали параллельно с раствором государственного стандартного образца юглон (Sigma-Aldrich) в системе растворителей диэтиловый эфир – бензол – муравьиная кислота (50:50:1) до продвижения фронта растворителя на 5,74 см. В результате на хроматограмме (рисунок 1) наблюдали полосу (исследуемый объект) и пятно (стандартный образец юглона), окрашенные в желтый цвет и имеющие одинаковые значения R_f (0,82).

Окрашенную полосу счищали и юглон элюировали этанолом, доводя объём элюата до 15 мл. Половину полученного раствора разбавляли в 100 раз этиловым спиртом и спектрофотометрировали в диапазоне волн 200–400 нм спектральная кривая исследуемого раствора полностью совпадает со спектром этанольного раствора стандартного образца юглона и имеет максимум поглощения при 248,9 нм (рисунок 2).

Таким образом, из околоплодника ореха черного по описанной методике выделен и идентифицирован юглон.



Рисунок 1. Хроматограмма экстракта, полученного из околоплодника ореха черного (*Juglans nigra* L.): 1, 1' – пятно стандартного образца юглона, 2 – полоса нанесенного экстракта

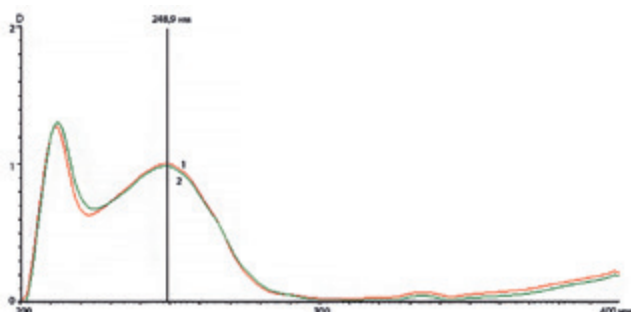


Рисунок 2. Спектры стандартного образца (1) и абсорбции юглона, выделенного из околоплодника ореха черного (*Juglans nigra* L.) (2)

Другую половину исследуемого раствора разбавляли очищенной водой в 100 раз и подвергали микробиологическому анализу. В качестве тест-объектов были выбраны музейные типичные представители (Γ^+) и (Γ^-) бактерий – *Staphylococcus aureus* (стафилококк золотистый) и *Escherichia coli* (кишечная палочка). Степень чувствительности тест-объектов к юглону определялась с помощью диффузного метода, основанного на логарифмической зависимости размеров зон угнетения роста тест-микробов от концентрации юглона.

Инокулят готовили из 18–20-часовой агаровой культуры в мясо-пептонном бульоне, доводя по мутности до 0,5 стандарта McFarland. Полученную бульонную культуру разводили ещё в 10 раз стерильным изотоническим раствором хлорида натрия, что соответствовало конечной концентрации $(1-2) \cdot 10^8$ КОЕ/мл. Оптимальное количество посевной дозы было выбрано таким, чтобы диаметр зон угнетения для минимальной концентрации был не менее 14 мм.

Для нанесения инокулята на чашки Петри с плотной питательной средой использовали бактери-

ологическую петлю. Петлю погружали в суспензию микроорганизмов и инокуляцию на поверхность агаровой среды проводили методом сплошного газона, периодически поворачивая чашку Петри на 60° . Культуры (*St. aureus* и *E. coli*) инкубировались в течение суток в термостате при 37°C . Концентрация активной фракции колебалась в зависимости от эксперимента от 0,7 до 7,0%. В качестве объектов сравнения использовали среду без активной фракции (плацебо). После нанесения тест-культур чашки помещали в термостат и инкубировали 18–20 ч при 37°C . По окончании инкубации проводили подсчет задержки зоны роста. При измерении зоны ориентировались на полную ингибицию видимого роста. Диаметры зон угнетения роста тест-микробов при помощи соответствующих приборов измеряли с точностью до 0,1 мм.

Результаты микробиологической оценки свойств тестовых микроорганизмов показали, что исследуемые штаммы *St. aureus* и *E. coli*, обладая типичными для данных видов морфолого-культуральными и биохимическими свойствами, проявили выраженную чувствительность к юглону.

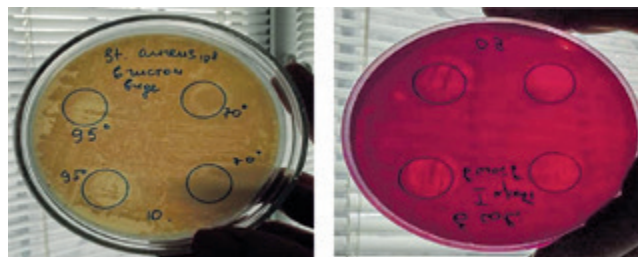


Рисунок 3. Исследуемые штаммы *St. aureus* и *E. coli*

Мы наблюдали зоны задержки роста золотистого стафилококка и кишечной палочки вокруг участков, пропитанных исследуемым раствором определенных концентраций, причем размеры зон угнетения были больше по сравнению с контролем (различия были статистически значимыми). Следует отметить, что юглон проявил выраженный эффект в отношении обоих исследуемых видов микроорганизмов, однако кишечная палочка проявила большую чувствительность к юглону, чем золотистый стафилококк. Нами найдено, что между размерами зон угнетения роста микроорганизмов и концентрацией юглона имеется прямая зависимость. С этой целью использовали спиртовой раствор юглона после спектрофотометрического анализа, определенные объемы которого (0,5–3,0 мл) разбавляли в 100 раз очищенной водой и определяли антибиотическую активность по описанной выше методике. Для

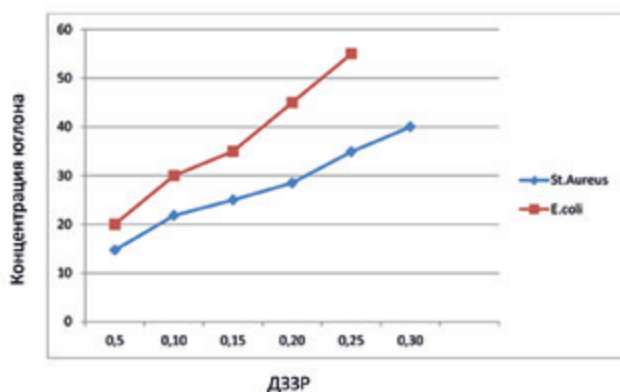


Рисунок 4. Зависимость ДЗЗР *St. aureus* и *E. coli* от концентрации юглона: V (мл) – объёмы основного раствора юглона, взятые для разведения

примера на рисунке 4 приведен график зависимости диаметра зон задержки роста (ДЗЗР) *St. aureus* от концентрации юглона.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований из околоплодника ореха черного был выделен и идентифицирован юглон. Показано, что юглон проявляет выраженный бактериостатический эффект в отношении *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli*, что подтверждается литературными данными [2].

ЛИТЕРАТУРА

1. Ж.В. Дайронас, И.Н. Зилфикаров. Природные нафтохиноны: перспективы медицинского применения. – Щелково. 2011. 252 с.
2. Г.И. Жунгиету, Л.А. Влад. Юглон и родственные 1,4-нафтохиноны. – Кишинев: Штиинца, 1978. 94 с.
3. Ж.В. Дайронас, И.Н. Зилфикаров, А.В. Корочинский, В.В. Корочинская. Определение нафтохинонов в сырье и препарате ореха черного // Фармация. 2013. № 4. С. 12–14.
4. С.Г. Полоник. Противоопухолевая и иммуностимулирующая активность О- и S-ацетилгликозидов 5-гидрокси-1,4-нафтохинона (юглона) // Химико-фармацевтический журнал. 2003. Т. 37. № 8. С. 3–4.
5. С.М. Ходжибаева, О.Ф. Филатова, А.А. Тыщенко. Новые аспекты получения и контроля юглона // Химия природных соединений. 2000. № 3. С. 227–229.
6. C. Ashe. Antitumor quinones Mini Rev // Med. Chem. 2005. V. 5. № 5. P. 449–467.
7. R.H. Thomson. Naturally Occurring Quinones III. – London-New York: Chapman & Hall. 1987.
8. J.S. Driscoll, G.F. Hazard, H.B. Wood, et al. Structure-Antitumor Activity Relationships Among Quinone Derivatives // Cancer Chemother. Repts. 1974. Part 2. V. 4. № 2. P. 1–35.
9. F. Pax. Grundzüge der Pflanzenverbreitung in den Karpaten // Die Vegetation der Erde. Bd.2. – Leipzig. 1908. 321 p.
10. J. Segura-Aguilar, K. Junsson, U. Tidifelt et al. The cytotoxic effects of 5-OH-1,4-naphthoquinone and 5,8-diOH-1,4-naphthoquinone on doxorubicin-resistant human leukemia cells (HK-60) // Leuk. Res. 1992. V. 16. № 6–7. P. 631–637.

Miele
PROFESSIONAL

Новая серия посудомоечных машин
для лабораторий **Miele Professional PG 85**

Почему стоит выбрать лабораторные автоматы для мойки и дезинфекции от Miele Professional?

- потребляют меньше воды, электроэнергии и моющих средств
- на 400% увеличено количество обрабатываемых за один цикл круглодонных колб и флаконов (объемом 50–100 мл)
- модульная система загрузочных устройств для обработки лабораторной посуды различной формы
- новый стандарт в области гигиены: все нагревательные элементы интегрированы в насос, что снижает вероятность образования отложений в моечной камере
- валидирование всех процессов, протекающих в машине

Машины Miele Professional для мойки лабораторного стекла - гибкость, комфорт и увеличенное рабочее пространство!

