

Влияние способа получения экстрактов цветков бархатцев распростертых (*Tagetes patula* L.) на содержание биологически активных веществ и антимикробную активность

О. В. Кригер^{1,2}, Е. И. Шепель¹

¹ Балтийский федеральный университет им. И. Канта, г. Калининград, Российская Федерация

² Университет ИТМО, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация

АННОТАЦИЯ

Введение: Поиск новых источников биологически активных веществ с антимикробными свойствами представляет собой важное направление в современной биотехнологии и фармакологии. Перспективным источником таких веществ является *Tagetes patula* L. (бархатцы распростертые). Водные экстракты *T. patula*, обладая значительным потенциалом биологической активности, остаются недостаточно изученными по сравнению с экстрактами, полученными с использованием других экстрагентов и методов экстракции.

Цель: Исследование влияния методов экстракции на содержание биологически активных веществ и антимикробную активность водных экстрактов цветков *Tagetes patula* L. Определение зависимости между способом экстракции и содержанием биологически активных веществ, а также антибактериальными свойствами водных экстрактов для создания на их основе антимикробных препаратов. В рамках исследования выполнены задачи по определению суммарного содержания фенольных соединений и флавоноидов в водных экстрактах бархатцев распростертых, полученных различными методами экстракции, и тестированию экстрактов на антибактериальную активность по отношению к бактериям *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli*, выделенным из клинического материала.

Материалы и методы: Объектами исследования выступали водные экстракты цветков *Tagetes patula* L. с гидромодулем 1:10, полученные кипячением, настаиванием с перемешиванием, микроволновой и ультразвуковой экстракцией. Суммарное содержание фенольных соединений и флавоноидов определялось на планшетном ридере BMG Labtech. Антибактериальный эффект всех полученных экстрактов оценивался стандартным диско-диффузионным методом.

Результаты: Метод экстракции значительно влияет на содержание биологически активных веществ и антибактериальную активность водных экстрактов бархатцев распростертых. Наибольшее содержание фенольных соединений наблюдалось в экстрактах, полученных микроволновой экстракцией (0,34 мг/см³), а максимальная концентрация флавоноидов была достигнута при кипячении в течение 300 секунд (0,98 мг/см³). Водные экстракты продемонстрировали антибактериальную активность против грамположительных и грамотрицательных бактерий *S. aureus* и *E. coli*, причем зона задержки роста культуры увеличивалась с продолжительностью экстракции.

Выводы: Изучено влияние различных методов экстракции на содержание фенольных соединений и флавоноидов в водных экстрактах цветков бархатцев распростертых. Доказана антибактериальная активность экстрактов против грамположительных и грамотрицательных бактерий. Полученные данные подтверждают перспективность дальнейшего исследования водных экстрактов бархатцев распростертых, их состава и свойств для создания антимикробных препаратов, применяемых в медицине, ветеринарии и сельском хозяйстве.

Ключевые слова: бархатцы распростертые, водные экстракты, биологическая активность, противомикробные препараты

Корреспонденция:
Кригер Ольга Владимировна
E-mail: OKriger@kantiana.ru

Конфликт интересов:
авторы сообщают
об отсутствии конфликта
интересов.

Поступила: 05.01.2023
Доработана: 29.05.2024
Принята: 15.06.2024
Опубликована: 30.06.2024

Copyright: © 2024 Авторы



Для цитирования: Кригер, О.В., & Шепель, Е.И. (2024). Влияние способа получения экстрактов цветков бархатцев распростертых (*Tagetes patula* L.) на содержание биологически активных веществ и антимикробную активность. *FOOD METAENGINEERING*, 2(2), 22-34. <https://doi.org/10.37442/fme.2024.2.49>

The Effect of the Preparation Method on the Content of Biologically Active Substances and Antimicrobial Activity of Extracts of Marigold Flowers (*Tagetes patula* L.)

Olga V. Kriger^{1,2}, Ekaterina I. Shepel¹

¹ Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

² ITMO University, St. Petersburg, Russian Federation

ABSTRACT

Introduction: The search for new sources of biologically active substances with antimicrobial properties represents a significant direction in modern biotechnology and pharmacology. A promising source of such substances is *Tagetes patula* L. (French marigold). Despite the high potential biological activity of aqueous extracts of *T. patula*, they remain insufficiently studied compared to extracts obtained using other solvents and extraction methods.

Purpose: The aim of this study is to investigate the influence of extraction methods on the content of biologically active substances and the antimicrobial activity of aqueous extracts of *Tagetes patula* L. flowers. The study aims to determine the relationship between the extraction method and the content of biologically active substances, as well as the antibacterial properties of the aqueous extracts to create antimicrobial agents based on them. The research objectives included determining the total content of phenolic compounds and flavonoids in aqueous extracts of French marigolds obtained by various extraction methods, and testing the extracts for antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* bacteria isolated from clinical material.

Materials and Methods: The objects of the study were aqueous extracts of *Tagetes patula* L. flowers with a hydromodule of 1:10, obtained by boiling, infusing with stirring, microwave, and ultrasonic extraction. The total content of phenolic compounds and flavonoids was determined using a BMG Labtech plate reader. The antibacterial effect of all obtained plant extracts was assessed using the standard disk diffusion method.

Results: The extraction method significantly influences the content of biologically active substances and the antibacterial activity of aqueous extracts of French marigolds. The highest phenolic compound content was observed in extracts obtained by microwave extraction (0.34 mg/cm³), while the maximum flavonoid concentration was achieved by boiling for 300 seconds (0.98 mg/cm³). The aqueous extracts demonstrated antibacterial activity against both gram-positive and gram-negative bacteria *S. aureus* and *E. coli*, with an increasing trend in the inhibition zone diameter proportional to the extraction duration.

Conclusion: The study examined the impact of various extraction methods on the total content of phenolic compounds and flavonoids in aqueous extracts of French marigold flowers. The antibacterial activity of the extracts against gram-positive and gram-negative bacteria was confirmed. The obtained data indicate the potential for further research into the composition and properties of aqueous extracts of French marigolds for the development of antimicrobial agents for use in medicine, veterinary science, and agriculture.

Keywords: French marigold, aqueous extracts, biological activity, antimicrobial agents *Tagetes patula* L., aqueous extracts, biological activity

Correspondence:

Kruger Olga

E-mail: OKruger@kantiana.ru

Conflict of interest:

The authors report the absence of a conflict of interest.

Received: 05.01.2023

Revised: 29.05.2024

Accepted: 15.06.2024

Published: 30.06.2024

Copyright: © 2024 The Authors



To cite: Kriger, O.V., & Shepel, E.I. (2024). The effect of the preparation method on the content of biologically active substances and antimicrobial activity of extracts of marigold flowers (*Tagetes patula* L.). *FOOD METAENGINEERING*, 2(2), 22-34. <https://doi.org/10.37442/fme.2024.2.49>

ВВЕДЕНИЕ

Издавна традиционные растительные препараты играли важную роль в жизни человека и являлись природными источниками здоровья. Однако, большой объем производства и широкое использование синтетических средств и антибиотиков наносит существенный ущерб окружающей среде и здоровью человека. Так, в 2022 г. проведено наиболее полное исследование загрязнений водоемов остатками фармацевтических средств (исследовано 1052 места отбора проб вдоль 258 рек в 104 странах), которое показало, что более чем в четверти исследуемых местностей концентрация выявленных загрязнений представляет опасность для окружающей среды и здоровья человека (Wilkinson, 2022).

Поэтому активно ведутся поиски новых источников биологически активных веществ (БАВ) и способов получения безопасных противомикробных растительных препаратов, используемых в медицине, ветеринарии, сельском хозяйстве, что является актуальным направлением современной биотехнологии и фармакологии (Кацев, 2023).

Перспективным источником биологически активных веществ является *Tagetes patula* L. (бархатцы распростертые), которое используется в народной медицине и сельском хозяйстве благодаря наличию широкого спектра полезных свойств. Растение обладает антибактериальными, антипаразитарными, противовирусными и антиоксидантными свойствами (Папаяни, 2012). Кроме того, бархатцы имеют фунгицидные и инсектицидные свойства, поэтому они успешно применяются для борьбы с вредителями сельскохозяйственных культур, например, нематодами земляники, картофеля и др. (Астафьева, 2020). Антисептические, бактерицидные, консервирующие свойства бархатцев обусловлены наличием в их составе алифатического углеводорода лимонена, смеси ациклических монотерпеновых углеводородов: α -оцимена, β -оцимена, бициклического терпена пинена и других биологически активных веществ (Gupta, 2012).

Флавоноиды являются вторичными метаболитами растений и придают окраску цветкам бархатцев. Они обладают широким спектром биологической активности. В настоящее время получены сведения об антиоксидантной активности экстрактов бархатцев (Червонная, 2015), изучалась их роль в защите растений от окислительного стресса (Машковский, 2019). Однако антимикробные свойства бархатцев распростертых, обуславливающих устойчивость растений к бактериальным, грибковым и вирусным инфекциям, изучены недостаточно.

Качественные и количественные исследования биологически активных соединений из растительного сырья в основном основаны на выборе эффективного метода экстракции. Экстракция является первым этапом исследования любого лекарственного растения, играет значительную и решающую роль в конечном результате. Основными проблемами традиционной экстракции являются более длительное время экстракции, необходимость использования дорогостоящего растворителя высокой чистоты, испарение больших количеств растворителя, низкая селективность экстракции и термическое разложение термолабильных соединений (Croteau et al., 2000). Чтобы преодолеть эти ограничения внедряются новые методы извлечения биологически активных веществ из растительного сырья. Одними из таких методов являются ультразвуковая и микроволновая экстракция.

Эффективность процесса ультразвуковой экстракции объясняется кавитационным эффектом, при котором происходит разрушение клеточных стенок растительного сырья и образование диффузионных микроканалов, обеспечивающих выход клеточного сока, содержащего биологически активные вещества и растворение его в экстрагенте (Поверин, 2006). Вероятным механизмом ультразвукового воздействия является интенсификация массопереноса и ускоренный доступ растворителя к клеточным материалам частей растения. Содержание влаги в образце, степень измельчения, размер частиц и растворитель являются очень важными факторами для эффективной экстракции (Салова, 2016). Кроме того, температура, давление, частота и продолжительность также оказывают влияние на эффективность процесса ультразвуковой обработки (Елапов, 2021). Ультразвуковую экстракцию используют для извлечения биологически активных веществ из растительного сырья наряду с различными классическими методами, поскольку она позволяет повысить эффективность процесса. Её преимущества включают сокращение времени экстракции, энергии и растворителя (Chemat, 2008).

Экстракция с использованием микроволновой энергии также рассматривается как современный метод извлечения растворимых продуктов в жидкость из широкого

спектра материалов (Маркин, 2014). Принцип нагрева с использованием микроволновой энергии основан на ее прямом воздействии на полярные материалы. Электромагнитная энергия преобразуется в тепло в соответствии с механизмами ионной проводимости и вращения диполей (Jain, 2009). Предполагается, что механизм экстракции с помощью микроволн включает три последовательных этапа: (1) отделение растворенных веществ от активных центров матрицы образца при повышенной температуре и давлении; (2) диффузия растворителя в матрицу образца; (3) высвобождение растворенных веществ из матрицы образца в растворитель (Alupului, 2012). Микроволновая экстракция обладает такими преимуществами как простота, селективность и эффективность. Она также признана экологически чистой технологией, поскольку сокращает использование органических растворителей. Более того, данный метод уменьшает продолжительность экстрагирования (Pan, 2003).

Водная экстракция является одним из дешевых и безопасных способов извлечения биологически активных веществ из цветков *Tagetes patula* L. У воды, как экстрагента, есть неоспоримые положительные свойства — доступность, безопасность, фармакологическая индифферентность и бюджетность. Водные экстракты *T. patula* могут проявлять заметную биологическую активность, причем она зависит от способа экстрагирования, в результате которого они были получены. Так, например, горячий водный экстракт цветков *T. patula*, полученный кипячением, оказался наиболее эффективным по сравнению с холодным водным экстрактом (Астафьева, 2020).

В исследованиях Munhoz (2017) изучено влияние горячего водного экстракта цветков *T. patula*, полученного кипячением, на рост, урожайность и болезни растений томатов. Применение экстракта обусловило значительное увеличение высоты побега, количества ветвей, листьев, бутонов, цветков и плодов томата, при значительном снижении различных заболеваний томата по сравнению с контролем. Тем не менее, биологическая активность водных экстрактов цветков *T. patula* изучена недостаточно в отличие от водно-спиртовых экстрактов. Актуальным является рассмотрение водной экстракции БАВ из цветков бархатцев. Кроме того, мало внимания уделяется изучению зависимости выхода БАВ и биологической активности экстрактов в зависимости от различных способов экстракции и их параметров.

Целью данного исследования является установление влияния способа экстракции на содержание биологически активных веществ и антимикробную активность получаемых водных экстрактов цветков *Tagetes patula* L. В рамках проведенных исследований выполнены задачи по определению суммарного содержания фенольных соединений и флавоноидов, обладающих антимикробными свойствами в водных экстрактах бархатцев распростертых, получаемых различными методами экстракции, тестированию экстрактов на антибактериальную активность по отношению к выделенным из клинического материала бактериям *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования

Объектами исследования на разных этапах работы являлись водные экстракты цветков *Tagetes patula* L., собранных в период цветения в августе 2023 г. в г. Калининграде с гидромодулем 1:10, полученные разными способами.

Материалы

На различных этапах исследования для приготовления и изучения биологической активности экстрактов бархатцев распростёртых использовали воду дистиллированную (ГОСТ 6709–72); нитрит натрия, $\geq 97.0\%$ (Sigma-Aldrich); алюминий хлористый 6-водный, ч.д.а. (ГОСТ 3759–75); гидроокись натрия, х.ч. (ГОСТ 4328–77); рутина гидрат, $\geq 94\%$ (Sigma-Aldrich); реактив Фолина-Чокальтеу, 2Н (ЛенРеактив); натрий углекислый, ч.д.а. (ГОСТ 83–79); галловую кислоту (Русхим); агар Мюллера-Хинтона II (Оболенск, ТУ 9385–227-78095326–2015); питательную среду №1 ГРМ (Оболенск, ТУ 9398–001-78095326–2006); питательную среду №2 ГРМ (Сабура) (Оболенск, ТУ 9398–002-78095326–2006); антибиотики дисковые (НИЦФ).

Оборудование

Аппаратура и материалы, используемые в работе: ультразвуковая ванна Bandelin RK 102 H, Sonorex Super, с нагревом (частота колебаний ультразвукового воз-

действия 20–22 кГц и интенсивность 1–70 Вт/см²); весы аналитические AND GH-252; весы электронные технические ГОСМЕТР ВЛТЭ-5100Т; нагревательная лабораторная плитка SCHOTT SLH 230; микроволновая печь OASIS MW-70MW (частота электромагнитного излучения 2450 МГц, мощность 700 Вт); высокоскоростная центрифуга для микропробирок Eppendorf 5424; магнитная мешалка с подогревом, Atomic Lab Prime; сушильный шкаф Binder FD53; рефрактометр автоматический HI96801; микропланшетный ридер CLARIOstar BMG Labtech; бокс микробиологической безопасности-II «Ламинар-С»-1,2 NEOTERIC; автоклав Melag Euroklav 23 VS.

Методы

Определение суммарного содержания фенольных соединений в водных экстрактах цветков *T. patula*

Сумма фенольных соединений определялась по следующей методике. Реакционную смесь готовили путем смешивания 20 мкл экстракта, 100 мкл реагента Фолина-Чокальтеу (10 %) и 80 мкл 7,5%-го водного раствора Na₂CO₃.

Смесь растворов помещали в темное место при комнатной температуре на 30 мин после чего измеряли поглощение при 765 нм на планшетном ридере BMG Labtech.

Общую концентрацию фенольных соединений рассчитывали по калибровочной кривой, полученной с

использованием стандартного раствора галловой кислоты (100–4000 мкг/мл). Данные были выражены в мг эквивалентов галловой кислоты на мл экстракта (Рисунок 1).

Затем проводился сравнительный анализ содержания фенольных соединений в исследуемых экстрактах с использованием однофакторного и двухфакторного анализов.

Определение суммарного содержания флавоноидов в водных экстрактах цветков *T. patula*

Сумма флавоноидов в экстрактах определялась с помощью методики [10]. В лунки 96-луночного планшета наливали 25 мкл экстракта, 100 мкл дистиллированной воды и 7,5 мкл 5%-ного нитрита натрия.

Через 6 минут в каждую лунку добавляли 7,5 мкл 10%-ного хлорида алюминия, 100 мкл 4%-ного гидроксида натрия и 10 мкл дистиллированной воды.

Планшет выдерживали в темноте, через 15 минут измеряли поглощение растворов с помощью планшетного ридера BMG Labtech при 510 нм и регистрировали среднее значение поглощения.

Та же процедура была проведена для стандартного раствора рутина для построения калибровочной кривой.

Содержание флавоноидов в экстрактах выражалось в мг эквивалентов рутина на мл экстракта (Рисунок 2).

Затем проводился сравнительный анализ содержания флавоноидов в исследуемых экстрактах с использованием однофакторного и двухфакторного эксперимента.

Рисунок 1

Градуировочный график зависимости оптической плотности от концентрации галловой кислоты

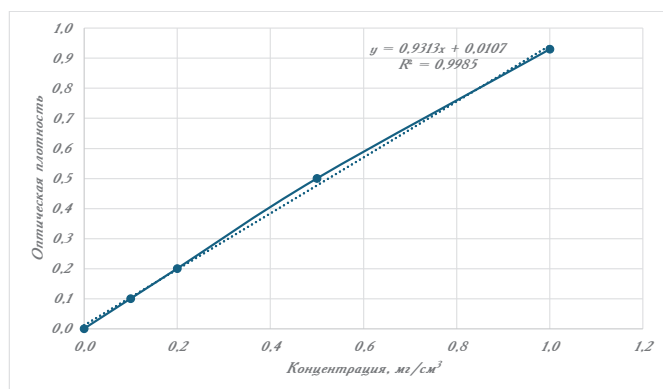
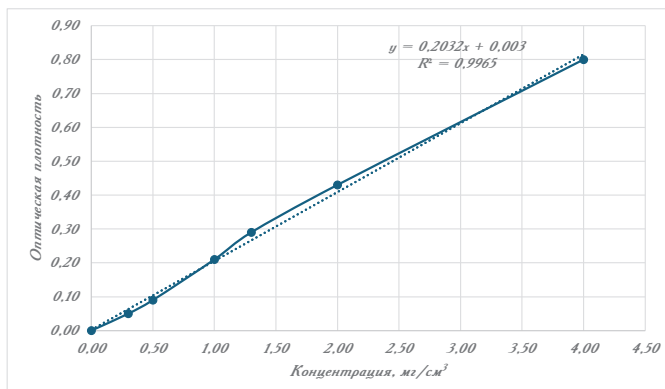


Рисунок 2

Градуировочный график зависимости оптической плотности от концентрации рутина



О.В. Кригер, Е.И. Шепель

Определение антибактериальной активности экстрактов цветков *T. patula*

Определение антибактериального эффекта всех полученных растительных экстрактов проводилось стандартным диско-диффузным методом.

В тестировании использовались выделенные из клинических образцов чистые культуры бактерий: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*.

Для определения чувствительности микроорганизмов к дискам была использована стерильная питательная среда Мюллера-Хинтона II. Среда предварительно стерилизовалась при 1,5 атм в течение 15 минут.

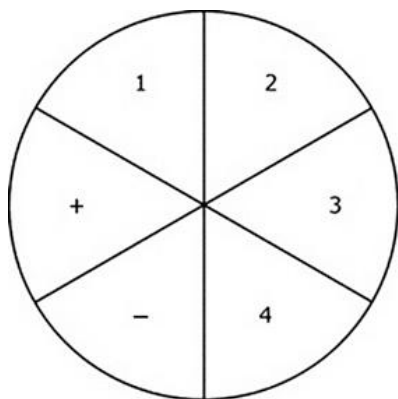
Для сравнительной оценки антимикробной активности растительных экстрактов в качестве положительного контроля использовался диск со следующим антибиотиком: для *Staphylococcus aureus* — клиндамицин (2 мкг), для *Escherichia coli* — амоксициллин/клавулановая кислота (20/10 мкг), а в качестве отрицательного — дистиллированная вода.

Посев микроорганизмов проводился в стерильных условиях в ламинарном боксе LAMSYSTEMS.

Суспензии бактерий получали путём взбивания тампоном со взятой культурой в физрастворе, мутность составляла 0,5 по шкале МакФарланда.

Рисунок 3

Схематическое изображение расположения дисков



Примечания. «+» – положительный контроль;
«-» – отрицательный контроль;
1–4 – испытуемый водный экстракт

Тампоном производился рассев суспензии на твердые среды в чашках Петри в технике сплошного газона по всей поверхности агара до впитывания в агар.

Заранее подготовленные бумажные диски, опущенные в экстракты, а также диски с антибиотиком и дистиллированной водой, после посева микроорганизмов размещались по одному на каждую зону чашки Петри с соответствующим штаммом. Схема расположения дисков показана на Рисунке 3. Далее чашки помещались в термостат с температурой 37 °С на 16 ч. По окончании времени инкубации чашки вынимались из термостата и измерялся диаметр зон лизиса вокруг дисков.

Процедура исследования

Исследование состояло из нескольких последовательных этапов, включающих в себя определение суммарного содержания фенольных соединений и флавоноидов в зависимости от продолжительности экстракции при воздействии высоких температур, ультразвука и микроволновой энергии. На следующем этапе исследований изучалась антибактериальная активность полученных экстрактов с применением диско-диффузионного метода по отношению к грамположительным и грамотрицательным бактериям, изолированным из клинического материала.

Для приготовления экстрактов сухое сырье измельчали ножницами. Размер частиц не более 2 мм (сырье пропускали через сито с размером ячеек 2 мм).

К 2 г измельченного сырья добавляется 20 см³ воды. Колбы закрывали сверху фольгой, после чего экстракционный материал настаивали в течение 60 минут при комнатной температуре для набухания сырья. Далее проводили экстракцию по каждому из четырех способов (Таблица 1).

Таблица 1

Способы экстракции бархатцев распротёртых

Кипячение на плитке	Настаивание с перемешиванием 70 °С, 1000 об/мин	Ультразвуковая экстракция, 20 кГц, 30 Вт/см ²	Микроволновая экстракция, 2450 МГц, 350 Вт
300 с	300 с	30 с	30 с
900 с	900 с	90 с	60 с
1800 с	1800 с	180 с	
3600 с	3600 с	300 с	

После экстракции по способу материал отфильтровывали через фильтр и центрифугировали со скоростью 7000 об/мин в течение 3 мин для удаления балластных веществ. Для предотвращения биологической порчи водных экстрактов их хранили в холодильнике при температуре 1 °С. С момента приготовления экстракта до его полного исследования должно пройти не более суток. Далее определяли суммарное содержание фенольных соединений и флавоноидов с помощью микропланшетного ридера.

Анализ данных

Статистическая обработка осуществлялась с помощью IBM SPSS Statistics 22. Измерения проводились в трех повторностях, для полученных результатов находилось среднее $\pm$ стандартное отклонение. Сравнительный анализ содержания биологически активных веществ в исследуемых экстрактах проводился с помощью однофакторного и двухфакторного анализов с использованием критерия Шапиро-Уилка и Тьюки (при уровне значимости $p < 0,05$).

Для выполнения однофакторного дисперсионного анализа необходимо выполнение следующих условий: 1) имеется количественный непрерывный тип данных, 2) выборки независимые между собой, 3) нормальность распределения признаков «сумма фенольных соединений» и «сумма флавоноидов»; 4) равенство дисперсий исследуемых

признаков. Первые два условия выполняются, необходимо проверить остальные, для каждого способа экстракции отдельно. Каждая последующая операция осуществлялась с помощью программы IBM SPSS Statistics 27.

РЕЗУЛЬТАТЫ

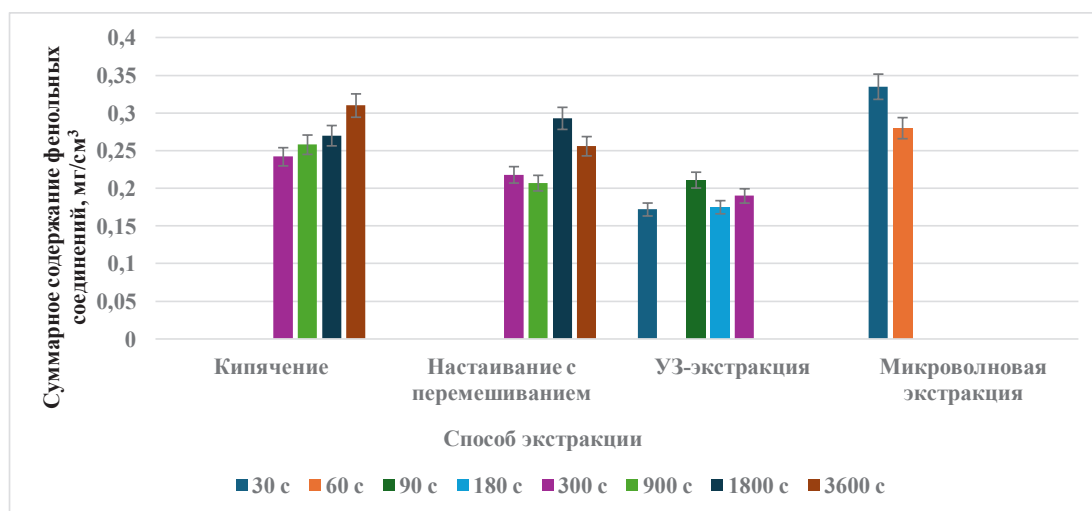
Представлены результаты исследования суммарного количества фенольных соединений и флавоноидов в водных экстрактах бархатцев расprostертых, полученных различными способами в зависимости от продолжительности экстракции, проведена статистическая обработка результатов и изучены антимикробные свойства экстрактов.

Суммарное содержание фенольных соединений в водных экстрактах цветков *T. patula*

Концентрацию фенольных соединений в экстрактах, полученных кипячением, настаиванием, ультразвуковой и микроволновой экстракцией находили по уравнению градуировочного графика (Рисунок 1). На Рисунке 4 приведены результаты содержания суммарного количества фенольных соединений в зависимости от способа получения экстрактов и продолжительности процесса.

Рисунок 4

Суммарное содержание фенольных соединений в экстрактах *T. patula* в зависимости от продолжительности экстракции



Результаты однофакторного дисперсионного анализа свидетельствуют о наличии достоверных различий по средней сумме фенольных соединений при разном времени экстракции, за исключением УЗ-экстракции ($F = 2,643$; $p \geq 0,05$) и микроволновой экстракции ($F = 4,344$; $p \geq 0,05$). Так как рассчитанные уровни значимости во всех градациях переменной «продолжительность экстракции» превышают уровень значимости $\alpha = 0,05$, это дает основание принять нулевую гипотезу об отсутствующем влиянии фактора на признак. Продолжительность экстракции достоверно влияет на содержание фенольных соединений лишь в экстрактах, получаемых кипячением и экстракцией настаиванием с перемешиванием.

Апостериорный критерий Тьюки (HSD) показал отсутствие ($p > 0,05$) достоверных различий средней суммы фенольных соединений при кипячении в течении 300 с, 900 с и 1800 с (0,242, 0,258 и 0,270 мг/см³ соответственно), а также 1800 с и 3600 с (0,270 и 0,310 мг/см³ соответственно).

При экстракции настаиванием с перемешиванием достоверное различие средней суммы фенольных соединений отсутствует при длительности 300 с и 900 с (0,218 и 0,207 мг/см³ соответственно), 300 с и 3600 с (0,218 и 0,256 мг/см³) и 1800 с и 3600 с (0,292 и 0,256 мг/см³).

Для выявления насколько сильно способ получения влияет на содержание фенольных соединений в экстрактах использовали двухфакторный дисперсионный анализ. Установлено, что фактор «способ получения» имеет частичную эта-квадрат (88,3 %) большую, чем фактор «продолжительность экстракции» (44,6%). Это значит, что данный фактор оказывает наибольший эффект на сумму фенольных соединений, чем фактор «продолжительность экстракции», а также взаимодействие этих двух факторов.

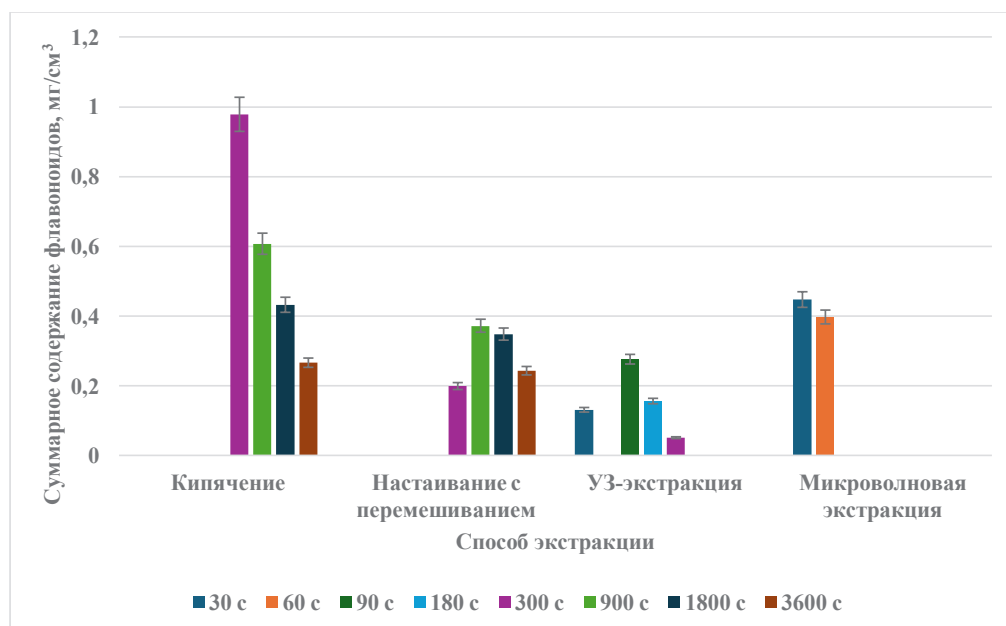
Суммарное содержание флавоноидов в водных экстрактах цветков *T. patula*

Концентрацию флавоноидов находили по уравнению градуировочного графика в соответствии с известной концентрацией рутина (Рисунок 2). На Рисунке 5 представлен график, демонстрирующий динамику выхода флавоноидов в зависимости от продолжительности для всех способов экстракции.

Результаты однофакторного дисперсионного анализа результатов проведенных исследований свидетельствуют о наличии достоверных различий по средней сумме флавоноидов при разной продолжительности экстракции, за исключением микроволновой экстракции ($F = 0,482$;

Рисунок 5

Суммарное содержание флавоноидов в экстрактах *T. patula* в зависимости от продолжительности экстракции



О.В. Кригер, Е.И. Шепель

$p \geq 0,05$). Рассчитанный уровень значимости превышает $\alpha = 0,05$, что дает основание принять нулевую гипотезу об отсутствующем влиянии фактора на признак. Продолжительность экстракции достоверно влияет на содержание флавоноидов в экстрактах, получаемых кипячением, настаиванием с перемешиванием и УЗ-экстракцией.

Апостериорный критерий Тьюки (HSD) показал отсутствие ($p > 0,05$) достоверных различий средней суммы флавоноидов при обычном кипячении в течении 1800 с и 3600 с (0,432 и 0,266 мг/см³ соответственно), а также 15 и 30 мин (0,607 и 0,432 мг/мл соответственно). При экстракции настаиванием с перемешиванием достоверное различие средней суммы флавоноидов отсутствует при длительности 300 с и 3600 с (0,199 и 0,243 мг/см³ соответственно), 1800 с и 3600 с (0,348 и 0,243 мг/см³), и 900 с и 1800 с (0,372 и 0,348 мг/см³). При УЗ-экстракции достоверно отличаются только 30 с и 90 с.

Результаты двухфакторного дисперсионного анализа по отношению к суммарному содержанию флавоноидов в экстрактах показали, что фактор «способ получения» имеет частичную эта-квадрат (87,7 %) большую, чем фактор «продолжительность экстракции» (70,3 %). Это значит, что данный фактор оказывает наибольший эффект на сумму флавоноидов, чем фактор «продолжительность экстракции», а также взаимодействие этих двух факторов. Таким образом, выход флавоноидов в экстрактах сильно зависит от способа их получения.

Результаты определения антибактериальной активности водных экстрактов цветков *T. patula*

В данной серии экспериментов тестирование антимикробных свойств экстрактов *T. patula* в зависимости от продолжительности экстрагирования осуществляли на примере экстрактов, полученных настаиванием с перемешиванием на магнитной мешалке.

Результаты исследований показали, что экстракты наиболее эффективны по отношению к *E. coli* из кожи, при этом наблюдается тенденция увеличения зоны лизиса от продолжительности экстракции. Это подтверждает антибактериальную активность входящих в состав экстрактов биологически активных веществ. При использовании других клинических образцов экстракты действовали выборочно, выраженных зависимостей не выявлено.

Обсуждение результатов

По результатам проведенных экспериментов и их сравнительного статистического анализа установлено, что способ получения оказывает значительное влияние на содержание биологически активных веществ, таких как полифенольные соединения и флавоноиды в водных экстрактах цветков бархатцев распротёртых. Определено, что наибольшая сумма фенольных соеди-

Таблица 2

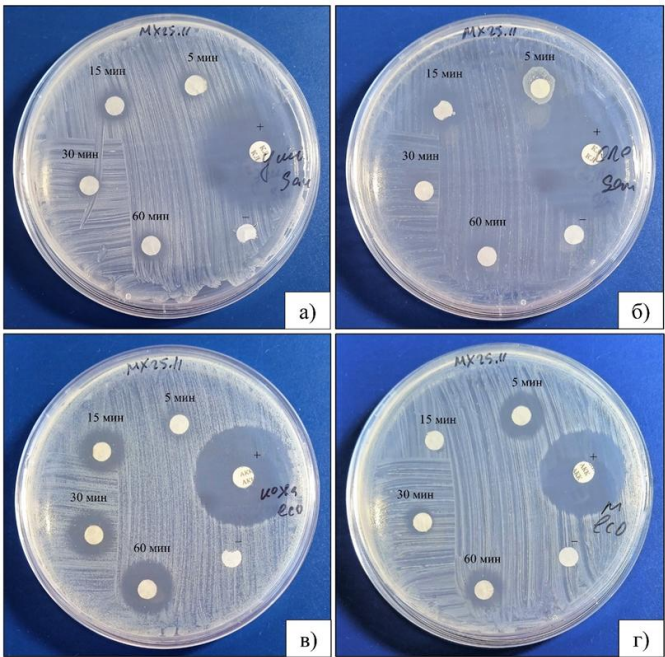
Диаметр зон задержки роста, мм

Клинический изоллят	Продолжительность экстракции				«+»	«-»
	5 мин	15 мин	30 мин	60 мин		
<i>S. aureus</i> (уши)	8,0	10,9	8,1	9,7	32,5	-
<i>S. aureus</i> (опо*)	14,1	12,8	-	9,8	34,8	-
<i>E. coli</i> (кожа)	8,2	14,3	15,0	16,9	29,6	-
<i>E. coli</i> (моча)	14,3	-	9,2	12,4	24,2	-

Примечание. *отделяемое половых органов

Рисунок 6

Антибактериальная активность водных экстрактов *T. patula*, полученных с помощью магнитной мешалки, по отношению к: (а) *S. aureus* из ушей, (б) *S. aureus* из опо, (в) *E. coli* из кожи, (г) *E. coli* из мочи



нений (0,34 мг/см³) приходится на экстракты, полученные с помощью микроволновой экстракции в течение 30 с при мощности 350 Вт и частоте 2450 МГц. Это подтверждает эффективность применения микроволновой экстракции в качестве альтернативного метода для извлечения биологически активных веществ из бархатцев распротёртых, характеризующегося низкой продолжительностью воздействия на компонентный состав сырья и способствующий большему выходу соединений, обладающих высокой биологической активностью.

В отношении флавоноидов оптимальным методом оказалось кипячение в течение 300 с. Дальнейшее кипячение характеризовалось набуханием сырья, уменьшением количества воды и снижением концентрации флавоноидов, что свидетельствует о недостаточности используемого в работе гидромодуля.

Наименьшие результаты выхода как фенольных соединений, так и флавоноидов наблюдались при УЗ-экстракции. Очевидно, это связано с низкой амплитудой и недостаточной продолжительностью применяемого ультразвукового воздействия. При этом многие исследователи отмечают, что УЗ-экстракция является перспективным подходом для извлечения комплексов биологически активных веществ из лекарственного и растительного сырья и может повысить выход биологически активных соединений при водной экстракции свежего сырья (Petkova, 2017; Sukhikh, 2022).

Основными параметрами, влияющими на выход биологически активных веществ и их активность, при ультразвуковой экстракции являются мощность и частота ультразвука, а также температура и продолжительность процесса (Dzah, 2020). Кроме того, помимо увеличения выхода БАВ УЗ-экстракция способствует увеличению сроков хранения водных экстрактов за счет асептического действия. В исследованиях Madhu (2019) установлено снижение количества бактерий группы кишечной палочки, сальмонелл, дрожжей и плесневых грибов в ультразвуковых экстрактах в зависимости от параметров проведения процесса.

В этой связи в дальнейших исследованиях планируется осуществление оптимизации параметров ультразвуковой водной экстракции биологически активных веществ из цветков бархатцев распротёртых и изучения их антимикробной активности.

В ходе тестирования антибактериальной активности водных экстрактов цветков бархатцев распротер-

тых установлено, что экстракты проявляли бактерицидное действие в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, выделенных из различного клинического материала. Зона лизиса по отношению к *S. aureus* (уши) составляла 9,7 мм; *S. aureus* (опо) — 9,8 мм. Относительно грамотрицательных бактерий также установлен бактерицидный эффект. Зона подавления роста *E. coli* (кожа) — 16,9 мм, *E. coli* (моча) — 12,4 мм.

Выявлена корреляция между продолжительностью экстрагирования и зоной ингибирования роста *E. coli* (кожа). В случае других клинических образцов экстракты действовали выборочно. Это возможно связано с тем, что экстракты с разной продолжительностью экстракции и разным способом получения имеют индивидуальный состав входящих компонентов (БАВ), которые могут быть избирательно активны по отношению к определенному штамму. Это требует дополнительных исследований, связанных с изучением подробного химического состава водных экстрактов *T. patula*.

Антимикробные свойства водных экстрактов соцветий бархатцев распротёртых подтверждаются в исследованиях Астафьевой (2020). Водные экстракты соцветий *T. patula*, полученные путем пятикратного кипячения в течение 1 часа или настаиванием при комнатной температуре в течение 3 суток проявляли выраженную антибактериальную активность. При этом, в отношении грамотрицательной культуры *E. coli* водные экстракты проявляли большую активность по сравнению с водно-спиртовыми экстрактами. Диаметр зоны ингибирования у горячих водных экстрактов составлял 23,0 мм; у экстрактов, полученных настаиванием — 35,0 мм. По сравнению с ними у водно-спиртовых экстрактов зона ингибирования достигала значений 15,0 мм и 16,0 мм у горячих и холодных экстрактов соответственно. Несмотря на высокую биологическую активность водных экстрактов с увеличением продолжительности хранения они утрачивали свои антимикробные свойства.

Антимикробные свойства водных экстрактов цветков бархатцев распротёртых обуславливаются наличием в их составе соединений фенольной природы и флавоноидов. Представляет интерес изучение биологически активных соединений не фенольной природы, оказывающих влияние на противомикробную активность водных экстрактов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучено влияние традиционных и альтернативных способов получения водных экстрактов цветков бархатцев распротертых на суммарное содержание фенольных соединений и флавоноидов, доказана антибактериальная активность экстрактов в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий.

Полученные данные свидетельствуют о перспективности изучения водных экстрактов бархатцев распротертых, их состава и свойств для создания противомикробных препаратов различного назначения для использования в медицине, ветеринарии и сельском хозяйстве.

Научный и практический интерес представляет изучение фунгицидной активности водных экстрактов цветков бархатцев распротертых и создание на их основе биопрепаратов для борьбы с возбудителями болезней и порчи сельскохозяйственных растений.

АВТОРСКИЙ ВКЛАД

Кригер Ольга Владимировна: концептуализация, курирование данных, рецензирование и редактирование рукописи.

Шепель Екатерина Игоревна: визуализация, проведение исследования, подготовка черновика рукописи.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Астафьева, О. В., Жаркова, З. В., & Якимец М. В. (2020). Исследование химического состава и противомикробной активности экстрактов из соцветий *Tagetes patula* L. *Современные проблемы науки и образования*, 6, 10. <https://doi.org/10.17513/spno.30430>
- Astafyeva, O. V., Zharkova, Z. V., & Yakimets M. V. (2020). Investigation of the chemical composition and antimicrobial activity of extracts from inflorescences of *Tagetes patula* L. *Modern Problems of Science and Education*, 6, 10. <https://doi.org/10.17513/spno.30430>
- Васильев, А. С., & Громова, Ю. В. (2018). Краткий анализ современных технологий экстракции и основных факторов, влияющих на процесс экстракции. *Экономическая наука сегодня: теория и практика* (с. 28–31). Чебоксары: Центр научного сотрудничества "Интерактив плюс".
- Vasiliev, A. S., & Gromova, Yu. V. (2018). A brief analysis of modern extraction technologies and the main factors influencing the extraction process. *Economics Today: Theory and Practice* (pp. 28–31). Cheboksary: Center for Scientific Collaboration "Interactive Plus". <https://doi.org/10.21661/a-537>
- Елапов, А. А., Кузнецов, Н. Н., & Марахова, А. И. (2021). Применение ультразвука в экстракции биологически активных соединений из растительного сырья, применяемого или перспективного для применения в медицине. *Разработка и регистрация лекарственных средств*, 10(4), 96–116. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4-96-116>
- Elapov, A. A., Kuznetsov, N. N., & Marakhova, A. I. (2021). The use of ultrasound in the extraction of biologically active compounds from plant raw materials used or promising for use in medicine. *Razrabotka i Registraciâ Lekarstvennyh Sredstv*, 10(4), 96–116. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4-96-116>
- Кацев, А.М., Сафронюк, С.Л., Бурцева Е. В., & Османова С. Я. (2023). Могут ли биолуминесцентные бактерии быть использованы для поиска новых антибактериальных веществ растительного происхождения? *Разработка и регистрация лекарственных средств*, 12(4), 63–70. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-4-1592>
- Katsev, A.M., Safronyuk, S.L., Burtseva, E.V., & Osmanova, S.Ya. (2023). Can bioluminescent bacteria be used to search for new antibacterial substances of plant origin? *DRazrabotka i Registraciâ Lekarstvennyh Sredstv*, 12(4), 63–70. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-4-1592>
- Максименко, Н. В. (2019). Аллелопатическая активность растений рода *Tagetes* L. *Сельское хозяйство-проблемы и перспективы* (с. 79–85). Гродно: ГТАУ.
- Maksimenko, N. V. (2019). Allelopathic activity of plants of the genus *Tagetes* L. *Agriculture—problems and prospects* (p. 79–85). Grodno: GGAU.
- Маркин, В.И., Чепрасова, М.Ю., & Базарнова, Н.Г. (2014). Основные направления использования микроволнового излучения при переработке растительного сырья (обзор). *Химия растительного сырья*, (4), 21–42. <https://doi.org/10.14258/jcprm.201404597>

- Markin, V.I., Cheprasova, M.Yu., Bazarnova, N.G. (2014) The main directions of using microwave radiation in the processing of plant raw materials (review). *Chemistry of Plant Raw Material*, (4), 21–42. <https://doi.org/10.14258/jcprm.201404597>
- Машковский, М.Д. (2019). *Лекарственные средства*. Москва: Новая волна.
- Mashkovsky, M.D. (2019). *Medicines*. Moscow: New wave.
- Салова, Т. Ю., & Громова, Н. Ю. (2016). Теоретические аспекты получения биологически активных веществ из растительного и животного сырья. *Успехи современного естествознания*, (3), 39–43.
- Salova, T. Y., Gromova, N. Y. (2016). Theoretical aspects of obtaining biologically active substances from plant and animal raw materials. *Advances in Current Natural Sciences*, (3), 39–43.
- Папаяни, О. И., Духанина, И.В., & Сергеева, Е. О. (2012) Изучение химического состава и антимикробной активности сухого экстракта из цветков бархатцев распротертых (*Tagetes patula* L.). *Известия Самарского научного центра Российской академии наук*, 14(3), 742–744.
- Papayani, O. I., Dukhanina, I.V., & Sergeeva, E. O. (2012) Study of the chemical composition and antimicrobial activity of a dry extract from marigold flowers (*Tagetes patula* L.). *Izvestia of Samara Scientific Center of the Russian Academy of Sciences*, 14(3), 742–744.
- Поверин, Д.И., & Поверин, А.Д. (2006) Ультразвуковая экстракция в промышленном производстве инстантных форм растительных субстратов. *Пиво и напитки*, (1), 18–20.
- Poverin, D.I., & Poverin, A.D. (2006) Ultrasonic extraction in the industrial production of instant forms of plant substrates. *Beer and Beverages*, (1), 18–20.
- Червонная, Н.М., & Андреева, О. А. (2015). Об антиоксидантной активности спиртоводных извлечений из цветков бархатцев распротертых. *Современные проблемы науки и образования*, 2(часть 3).
- Chervonnaya, N.M., & Andreeva, O. A. (2015) On the antioxidant activity of alcoholic extracts from marigold flowers. *Modern Problems of Science and Education*, 2(part 3).
- Alupului, A., Calinescu, I. & Lavric, V. (2012). Microwave extraction of active principles from medicinal plants. *UPB Science Bulletin, Series B*, 74(2), 129–142.
- Bernhoft, A. (2010). A brief review on bioactive compounds in plants. *Bioactive Compounds in Plants-Benefits and Risks for Man and Animals*, 50, 11–17.
- Chemat, F., Tomao, V., & Viot, M. (2008). Ultrasound-assisted extraction in food analysis. *Handbook of food analysis instruments*, 11, 85–103. <https://doi.org/10.1201/9781420045673.ch5>
- Chookalali, H., Riahi, H., Shariatmadari, Z., Mazarei, Z., & Seyed Hashtroudi, M. (2020). Enhancement of total flavonoid and phenolic contents in *Plantago major* L. with plant growth promoting cyanobacteria. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 22(2), 505–518.
- Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4), 564–582. <https://doi.org/10.1128/CMR.12.4.564>
- Croteau, R. Kutchan, T.M., & Lewis, N.G. (2000). Natural products (secondary metabolites). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, 24, 1250–1319.
- De Castro, M. D. L. & Garcia-Ayuso L.E. (1998). Soxhlet extraction of solid materials: An outdated technique with a promising innovative future. *Analytica Chimica Acta*, 369(1–2), 1–10. [http://dx.doi.org/10.1016/S0003-2670\(98\)00233-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0003-2670(98)00233-5)
- Dudareva, N., & Pichersky, E. (2000). Biochemical and molecular genetic aspects of floral scents. *Plant Physiology*, 122(3), 627–634. <https://doi.org/10.1104/pp.122.3.627>
- Dzah, C. S., Duan, Y., Zhang, H., Wen, C., Zhang, J., Chen, G., & Ma, H. (2020). The effects of ultrasound assisted extraction on yield, antioxidant, anticancer and antimicrobial activity of polyphenol extracts: A review. *Food Bioscience*, 35, 100547. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100547>
- Gupta, P., Vasudeva, N., & Marigold, A. (2012). Potential ornamental plant drug. *Hamdard Medicus*, 55(1), 45–59.
- Hernández, Y., Lobo M. G., & González, M. (2009). Factors affecting sample extraction in the liquid chromatographic determination of organic acids in papaya and pineapple. *Food Chemistry*, 114(2), 734–741. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.10.021>
- Herrera, M.C., & De Castro, M.D.L. (2005). Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from strawberries prior to liquid chromatographic separation and photodiode array ultraviolet detection. *Journal of Chromatography A*, 1100(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.09.021>
- Jain, R., Katare, N., Kumar, V., Samanta, A.K., Goswami, S., & Shrotri S. (2012). In vitro antibacterial potential of different extracts of *Tagetes erecta* and *Tagetes patula*. *Journal of Natural Sciences Research*, 2(5), 84–90.
- Jain, T., Jain, V., Pandey, R., Vyas A., & Shukla, S.S. (2009). Microwave assisted extraction for phytoconstituents—an overview. *Asian Journal of Research in Chemistry*, 2(1), 19–25.
- Madhu, B., Srinivas, M. S., Srinivas, G., & Jain S. K. (2019). Ultrasonic technology and its applications in quality control, processing and preservation of food: A review. *Current Journal of Applied Science and Technology*, 32(5), 1–11. <https://doi.org/10.9734/CJAST/2019/46909>

- Mahfuz, S., Shang, Q., & Piao X. (2021). Phenolic compounds as natural feed additives in poultry and swine diets. *Biotechnol*, 12, 48. <https://doi.org/10.1186/s40104-021-00565-3>
- Martínez, R., Diaz, B., Vásquez, L., Compagnone, R., Tillett, S.S., Canelon, D., Torrico, F., & Suarez A. (2009). Chemical composition of essential oils and toxicological evaluation of *Tagetes erecta* and *Tagetes patula* from Venezuela. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, 12(4), 476–481. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2009.10643747>
- Munhoz, V.M., Baida, F.C., Lopes, G.C., Santiago, D.C., de Souza, J.R.P., & de Mello, J.C.P. (2017). Extracts and semi-purified fractions of *Tagetes patula* flowers in the control of root-knot nematodes. *Semina: Ciências Agrárias*, 38(6), 3529–3538. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2017v38n6p3529>
- Nahak, G., & Sahu, K. (2017). Bio-controlling effect of leaf extract of *Tagetes patula* L. (Marigold) on growth parameters and diseases of tomato. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 20(1), 12–19. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2017.12.19>
- Pan, X., Niu G., & Liu, H. (2003). Microwave-assisted extraction of tea polyphenols and tea caffeine from green tea leaves. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 42(2), 129–133. [https://doi.org/10.1016/s0255-2701\(02\)00037-5](https://doi.org/10.1016/s0255-2701(02)00037-5)
- Ondua, M., Njoya, E. M., & Abdalla M. A. (2019). Anti-inflammatory and antioxidant properties of leaf extracts of eleven South African medicinal plants used traditionally to treat inflammation. *Journal of Ethnopharmacology*, 234, 27–35. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.12.030>
- Smith, R. M. (2003). Before the injection—Modern methods of sample preparation for separation techniques. *Journal of Chromatography*, 1000(1–2), 3–27. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(03\)00511-9](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(03)00511-9)
- Sukhikh, S., Babich, O., Larina, V., Krol O., Popov, A., Kriger, O., Ivanova S., & Prosekov, A. (2022). Antimicrobial screening and fungicidal properties of eucalyptus globulus ultrasonic extracts. *Plants*, 11. <https://doi.org/10.3390/plants11111441>
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2006). Secondary metabolites and plant defense. *Plant Physiology*, 4, 315–344. https://doi.org/10.1007/978-94-007-1933-0_5
- Vankar, P. S. (2004). Essential oils and fragrances from natural sources. *Resonance*, 9, 30–41. <https://doi.org/10.1007/BF02834854>
- Wilkinson, J.L., Boxall, A.B.A., Kolpin, D.W., Leung, K.M.Y., Lai, R.W.S., Galbán-Malagón, C., Adell, A.D., Mondon, J., Metian, M., Marchant, R.A., Bouzas-Monroy, A., Cuni-Sanchez, A., Coors, A., Carriquiriborde, P., Rojo, M., Gordon, C., Cara, M., Moermond, M., Duarte, T., Petrosyan, V., Perikhanyan, Y., Mahon, C.S., McGurk, C.J., Hofmann, T., Kormoker, T., Iniguez, V., Guzman-Otazo, J., Tavares, J.L., Gildasio De Figueiredo, F., Razzolini, M.T.P., Dounon, V., Gbaguidi, G., Traoré, O., Blais, J.M., Kimpe, L.E., Wong, M., Wong, D., Ntchantcho, R., Pizarro, J., Ying, G.G., Chen, C.E., Páez, M., Martínez-Lara, J., Otamonga, J.P., Poté, J., Ifo, S.A., Wilson, P., Echeverría-Sáenz, S., Udikovic-Kolic, N., Milakovic, M., Fatta-Kassinos, D., Ioannou-Ttofa, L., Belušová, V., Vymazal, J., Cárdenas-Bustamante, M., Kassa, B.A., Garric, J., Chaumot, A., Gibba, P., Kunchulia, I., Seidensticker, S., Lyberatos, G., Halldórsson, H.P., Melling, M., Shashidhar, T., Lamba, M., Nastiti, A., Supriatin, A., Pourang, N., Abedini, A., Abdullah, O., Gharbia, S.S., Pilla, F., Chefetz, B., Topaz, T., Yao, K.M., Aubakirova, B., Beisenova, R., Olaka, L., Mulu, J.K., Chatanga, P., Ntuli, V., Blama, N.T., Sherif, S., Aris, A.Z., Looi, L.J., Niang, M., Traore, S.T., Oldenkamp, R., Ogunbanwo, O., Ashfaq, M., Iqbal, M., Abdeen, Z., O'Dea, A., Morales-Saldaña, J.M., Custodio, M., de la Cruz, H., Navarrete, I., Carvalho, F., Gogra, A.B., Koroma, B.M., Cerkenik-Flajs, V., Gombač, M., Thwala, M., Choi, K., Kang, H., Ladu, J.L.C., Rico, A., Amerasinghe, P., Sobek, A., Horlitz, G., Zenker, A.K., King, A.C., Jiang, J.J., Kariuki, R., Tumbo, M., Tezel, U., Onay, T.T., Lejju, J.B., Vystavna, Y., Vergeles, Y., Heinzen, H., Pérez-Parada, A., Sims, D.B., Figy, M., Good, D., Teta, C. (2022). Pharmaceutical pollution of the world's rivers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 119(8). <https://doi.org/10.1073/pnas.2113947119>