

УДК 543.61:581.135.51:665.52:582.475

Д. С. Владыкина, магистр биологических наук, аспирант (БГТУ);

С. А. Ламоткин, кандидат химических наук, доцент (БГТУ);

Е. В. Литвинова, заведующая отделом биологических испытаний

РУП «Белмедпрепараты», кандидат биологических наук;

О. Г. Выглазов, главный консультант ООО «Тереза-интер», кандидат химических наук

ВЛИЯНИЕ КОМПОНЕНТНОГО СОСТАВА НА АНТИМИКРОБНЫЕ И ПАРФЮМЕРНЫЕ СВОЙСТВА ЭФИРНЫХ МАСЕЛ ЕЛЕЙ

Методом гидродистилляции получены эфирные масла 7 видов елей. Изучен качественный и количественный состав полученных эфирных масел методом газо-жидкостной хроматографии. Определено антимикробное действие эфирных масел на *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Candida albicans* ATCC 885-653. Выполнена дегустационная парфюмерная оценка полученных эфирных масел.

The essential oils of 7 kinds of spruces by the method of steam distillation were obtained. The qualitative and quantitative composition of the received essential oils was studied by gas-liquid chromatography. Antimicrobial activity of essential oils on substances *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 P, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Candida albicans* ATSS 885-653 was defined. Perfume tasting evaluation of the essential oils was made.

Введение. Растительные препараты обладают уникальными свойствами, которые не присущи синтетически полученным препаратам в связи с тем, что растения содержат все вещества, необходимые для жизни и здоровья человека. Препараты на основе растительного сырья представляют собой различные сложные вещества, комплексы биологически активных веществ (БАВ), обеспечивающих не только терапевтическую активность, но и профилактические качества.

Примерно 25% отпускаемых по рецепту лекарств содержит, по меньшей мере, один компонент, который получают или один раз был получен из растений [1].

Кроме того, фитопрепараты реже, чем традиционные противомикробные средства, вызывают формирование резистентных штаммов микроорганизмов. БАВ растений могут быть эффективным дополнением в комплексной терапии инфекционных заболеваний.

В настоящее время разрешено использовать в медицинской практике около 320 видов лекарственных растений – это очень малая доля из всего биоразнообразия высших растений [2].

Одной из причин необходимости развития биохимии растений в Республике Беларусь является поиск новых перспективных фитопрепаратов.

Антимикробная активность различных хвойных растений широко изучается учеными России, Латвии, Турции, Румынии, Канады. Наибольший интерес вызывают сосна обыкновенная (*Pinus sylvestris* L.), ель европейская (*Picea abies* (L) Karst) и пихта сибирская (*Abies sibirica* L.) [1, 3, 4]. На базе эфирных масел хвойных растений получены препараты для

лечебной и профилактической медицины, товаров бытовой химии и сельского хозяйства.

Ель (*Picea*) – род из семейства сосновые (*Pinaceae*) – одна из основных лесообразующих и наиболее культивируемых пород в лесном фонде Беларуси. В роде насчитывают 36 видов, из которых 27 распространены в Евразии, 9 – в Северной Америке.

По статистическим данным инвентаризации леса на 01.01.2012 года общий запас ели оценивался в 184 млн. м³. Еловые леса занимают 9,8% от лесопокрытой площади страны, или 750 тыс. га [5].

В связи с этим объектом наших исследований были эфирные масла растений рода *Picea*: колючей, канадской, аянской, европейской, сибирской, сербской, черной.

Целью исследований являлось изучение биологической активности и парфюмерной ценности эфирных масел представителей рода *Picea*, определение возможностей их использования в медицинской практике и парфюмерно-косметической промышленности.

Для осуществления цели были поставлены следующие задачи:

1. Изучить химический состав эфирных масел древесной зелени видов елей, произрастающих в различных условиях техногенной нагрузки на территории Республики Беларусь.

2. Провести исследования биологической активности эфирных масел. Определить минимальную подавляющую концентрацию.

3. Провести дегустационную оценку парфюмерных свойств эфирных масел.

4. Выявить ресурсные возможности использования древесной зелени елей для получения биологически активных веществ.

Основная часть. Древесная зелень отбиралась с нескольких деревьев, произрастающих в условиях различной антропогенной нагрузки. Эфирные масла получали в насадке Клевенд-жера методом гидродистилляции из 200 г хвои.

Компонентный состав эфирных масел исследован методом газо-жидкостной хроматографии на хроматографе Кристалл 5000.1.

Колонка кварцевая капиллярная неполярная, (нанесенная фаза – 100% диметилсилоксан) длина составляет 60 м. Условия хроматографирования позволяют максимально разделить индивидуальные компоненты эфирного масла. Идентифицировано 59 компонентов эфирного масла ели, что составляет 95–97 мас. % от общего количества компонентов.

Основные компоненты эфирных масел (содержание больше 1 мас. %) представлены в табл. 1.

Компонентный состав эфирных масел различных видов елей остается постоянным, в то время как количественный вклад индивидуальных компонентов не только отличается в различных видах, но и варьируется в зависимости от условий произрастания.

Ель канадская характеризуется увеличением содержания α -пинена, камфена, мирцена и 1,8-цинеола на фоне снижения вклада лимонена, камфары, борнеола и борнилацетата.

У ели колючей, напротив, отмечается снижение содержания α -пинена, камфена мирцена и 1,8-цинеола при увеличении борнеола и камфары.

Ель европейская содержит максимальное количество цис-3-гексенола («запах свежей травы») – 4,20 мас. %. Влияние условий произрастания наиболее заметно в увеличении содержания борнеола и борнилацетата.

Изучение отдельных компонентов не выявило однозначной зависимости состава эфирного масла от условий произрастания, что вызвало необходимость проанализировать фракционный состав образцов эфирных масел (рисунк).

Исследования изменений фракционного состава также не имеют однозначного характера. Снижение вклада монотерпеновых соединений ели колючей и европейской с одновременным увеличением терпеноидов вследствие каталитических окислительных реакций под действием тяжелых металлов хорошо согласуется с данными работы [6].

Растворы эфирных масел в 10%-ном этиловом спирте были представлены на органолептическую оценку дегустационному совету парфюмеров. Дегустация осуществлялась на тест-полосках фильтровальной бумаги.

Запах оценивался в три этапа:

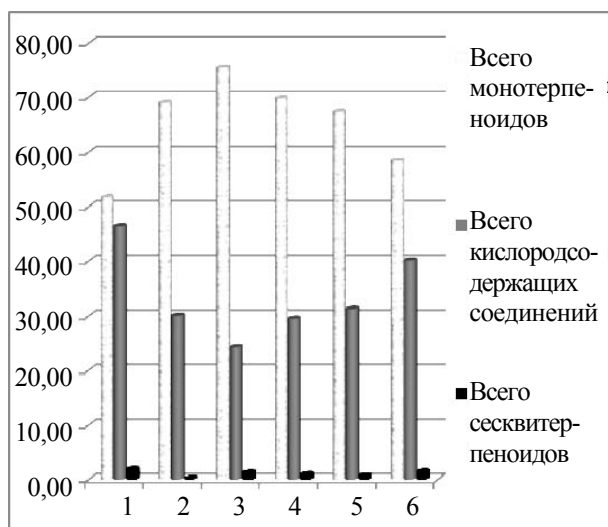
- в течение первых 2–5 мин (топ-нота);
- через 20 мин после испарения образца с полоски фильтровальной бумаги (сердце);
- через 45 мин после испарения (база).

Советом было отмечено высокое качество представленных образцов: отсутствие посторонних примесей, технических запахов и прозрачность.

Таблица 1

Компонентный состав эфирных масел елей, мас. %

Соединение	Вид ели					
	канадская		колючая		европейская	
	1	2	3	4	5	6
цис-3-Гексенол	0,05	0,10	0,10	2,10	4,20	0,06
Трициклен	1,01	1,27	1,57	1,28	1,29	1,61
α -Пинен	8,97	12,23	10,33	9,61	7,11	11,97
Камфен	18,00	25,50	16,58	15,84	18,60	19,12
β -Пинен	2,66	2,33	1,13	1,58	1,27	2,66
Мирцен	2,57	4,27	8,55	5,17	4,03	3,53
Δ^3 -Карен	0,27	0,09	0,65	1,00	0,25	0,17
Лимонен	6,15	2,35	12,52	11,90	8,76	14,73
1,8-Цинеол	9,04	18,53	20,50	19,06	20,85	4,43
Терпинолен	1,38	1,11	0,62	0,95	0,40	0,65
Камфара	12,02	4,85	5,86	8,64	5,52	4,46
Цитронеллаль	0,79	0,23	2,97	2,21	2,17	2,01
Борнеол	2,70	0,72	1,46	2,11	3,76	5,99
Терпинен-4-ол	0,66	0,26	0,65	0,69	1,02	0,99
α -Терпинеол	1,06	0,52	1,59	1,57	2,94	3,07
Борнилацетат	26,21	19,97	8,45	8,50	8,67	15,17
Всего идентифицированных	96,67	96,50	97,21	96,36	96,54	96,93



Фракционный состав эфирных масел елей

Представленные образцы эфирных масел черной, канадской и европейской елей заслужили высшие оценки (5) и были рекомендованы для создания парфюмерных композиций. Эфирные масла ели колючей (4, 5) и сербской (4) предложено использовать для создания косметических отдушек.

Ароматы эфирных масел елей в основном были охарактеризованы как древесно-хвойные или травянисто-хвойные. Однако следует отметить, что для ели канадской присутствовала яркая нота корня айры, для ели колючей – цветочная нота (сирени и ландыша), ель европейская характеризовалась наличием цитрусовой ноты.

Испытания образцов эфирных масел на антимикробную активность проводились в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи Республики Беларусь с использованием тест-культур грамположительных *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 и грамотрицательных бактерий *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, а также грибов *Candida albicans* ATCC 885-653.

Все образцы эфирных масел обладают антимикробным действием в отношении *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P. В разведении 1 : 10 эфирные масла елей обладают активностью в отношении грамотрицательных бактерий *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027. Эфирные масла елей колючей и европейской обладают также активностью в отношении грибов.

Для подтверждения полученных результатов предварительной оценки антимикробной активности еловых эфирных масел в лаборатории промышленных микроорганизмов ОБИ РУП «Белмедпрепараты» были проведены исследования по определению антибактериальной активности.

В качестве объектов исследования были выбраны эфирные масла, демонстрировавшие лучшие результаты в предыдущих испытаниях. Часть образцов получены из древесной зелени елей, произрастающих с минимальной антропогенной нагрузкой (1 – ель канадская, 3 – ель колючая, 5 – ель европейская), часть – из древесной зелени елей, произрастающих в условиях города (2 – ель канадская, 4 – ель колючая, 6 – ель европейская).

Испытание проводили методом серийных разведений, основанном на определении количественного показателя, характеризующего микробиологическую активность антибактериального препарата – величины его минимальной подавляющей концентрации (МПК). Для оценки чувствительности микроорганизмов использовали питательную среду – бульон Хоттингера, содержащую 110–130 мг азота. Бактериальную суспензию готовили из агаровой культуры и добавляли в питательную среду в количестве 0,2 мл до конечной концентрации 10^3 – 10^4 ОЕ в 1 мл. Основные растворы образцов эфирных масел готовили на воде очищенной с добавлением твина-80 в количестве 1,5% для достижения равномерного суспендирования. Основные растворы масел готовили в концентрации 200 000 мкг/мл для *Bacillus subtilis* ATCC 6633 и *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027; 160 000 мкг/мл для *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P.

Из основных растворов готовили рабочие растворы методом двукратных последовательных разведений в бульоне Хоттингера. В качестве контроля использовали суспензии микроорганизмов в питательной среде без добавления эфирных масел. Приготовленные инокулянты в пробирках инкубировали в течение 48 ч при $(35 \pm 1)^\circ\text{C}$. Результаты оценивали визуально, определяя наличие или отсутствие роста в среде, содержащей различные концентрации испытуемых образцов масел. Последняя пробирка с задержкой роста (прозрачный бульон) свидетельствует о минимальной подавляющей концентрации в отношении данного штамма.

Результаты представлены в табл. 2.

Из приведенных результатов следует, что наиболее чувствительны к действию масел елей тест-микроорганизмы *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P, *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Тест-культура *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 проявила наименьшую чувствительность к действию исследованных масел.

Наилучшую бактериальную активность в отношении *Bacillus subtilis* показали масла ели канадской (1) и колючей (4), а в отношении *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P – только колючая ель (4).

Таблица 2

Экспериментальные значения минимальной подавляющей концентрации эфирного масла елей

Тест-культура	МПК, мкг/мл					
	1	2	3	4	5	6
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	100 000	100 000	–	100 000	100 000	–
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	781,25	6250	50 000	781,25	3125	12 500
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538-P	10 000	10 000	10 000	625	5000	5000

Примечание. «–» обозначает отсутствие задержки роста штамма-микроорганизмов в пробирке

Резистентность грамотрицательных микроорганизмов, возможно, обусловлена особенностями их строения, а именно наличием двойной мембраны, которая препятствует проникновению эфирного масла.

Согласно данным работы [4], основными компонентами, обуславливающими антимикробную активность ели европейской, являются α и β -пинен, Δ^3 -карен, р-цимен, оцимен, лимонен, γ -терпинен, камфен, 1,8-цинеол, линалоол, борнилацетат и неролидол. Суммарная составляющая данных компонентов максимальна у ели канадской (2) и составляет 84,39 мас. % от суммы идентифицированных компонентов. Для других эфирных масел эта величина составляет 74,54 (1); 73,78 (3); 71,96 (4); 69,59 (5); 72,59 (6) мас. %. Полученные результаты не выявляют четкой закономерности, что обуславливает необходимость последующих исследований.

Заключение. Получены эфирные масла елей, произрастающие в естественных условиях, а также в условиях техногенного загрязнения.

Подобраны условия хроматографического анализа еловых масел, обеспечивающие максимальное разделение компонентов с содержанием $\leq 0,01$ мас. %.

Изучен терпеноидный состав эфирных масел семи видов елей. Определено отсутствие межвидовой зависимости в изменении фракционного состава. Установлено, что наибольшее содержание монотерпеновой фракции (75,42%) наблюдается у ели колючей, произрастающей в естественных условиях. Наибольшим содержанием терпеноидов (46,40%) характеризуется эфирное масло ели канадской чистой.

Наибольшей ценностью для парфюмерно-косметической промышленности обладают ели черная, канадская и европейская, возможно, благодаря высокому содержанию в своем составе лимонена, линалоола и цитронеллаля (от 9 до 20%), обеспечивающих цитрусовую ноту в данных маслах.

Эфирные масла обладают различной антимикробной активностью в зависимости от вида ели. Наибольшую активность эфирные масла елей демонстрируют в отношении грамположительных бактерий.

Минимальная подавляющая концентрация эфирного масла ели колючей в отношении *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P составила 625 мкг/мл, что позволяет его рассматривать в качестве сырья для производства лекарственных препаратов против данного штамма микроорганизмов.

Литература

1. Coniferous greenery – valuable natural raw material of biologically active substances / S. Siksnia [et al.] // Medicines teorija ir praktika. – 2012. – Vol. 18, No. 2. – P. 146–148.
2. Антимикробная активность эфирных масел и водных извлечений из лекарственных растений Хакасии / С. В. Водолазова [и др.] // Сибирский медицинский журнал. – 2011. – Т. 26, № 2. – С. 54–58.
3. Antimicrobial activity of essential oils of some Abies (Fir) Species from Turkey / Eyup Bagci, Metin Digrak // Flavor and fragrance Journal. – 1996. – Vol. 11, issue 4. – P. 251–256.
4. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil from shoots spruce (*Picea abies* L) / V. Radulescu [et al.] // Revista de chimie. – 2011. – Vol. 62, No. 1. – P. 69–74.
5. Изучаем Беларусь. Леса // Сайт Национального статистического комитета Республики Беларусь [Электронный ресурс]. – Минск, 1998. – Режим доступа: http://belstat.gov.by/homer/ru/indicators/statistics_for_schoolers/02.pdf. – Дата доступа: 22.02.2013.
6. Есякова, О. А. Индикация загрязнения атмосферы Красноярска по морфометрическим и химическим показателям хвои ели сибирской / О. А. Есякова, Р. А. Степень // Химия растительного сырья. – 2008. – № 1. – С. 143–148.

Поступила 27.02.2013