

4. Методические рекомендации по реализации кластерной политики в субъектах Российской Федерации / утв. Минэкономразвития РФ от 26.12.2008 г. № 20615-ак/д 19. – Доступ из справ.-правовой системы «Консультант Плюс».
5. Загора И.П., Поклонова Е.В. Региональный кластер: теория формирования и мониторинг состояния. – Красноярск: Изд-во СФУ, 2012. – 190 с.
6. Красноярский край вошел в десятку самых инновационных регионов России. – URL: <http://www.newslab.ru/news/408465>.
7. Отчет об итогах социально-экономического развития Красноярского края за 2012 год. – URL: http://econ.krskstate.ru/ser_kray/itog.
8. Регионы России. Основные характеристики субъектов Российской Федерации. Данные Федеральной службы государственной статистики: справ. – 2010 г. – 786 с.



УДК 547.913: 57.083.33

Н.С. Коростелева, А.А. Ефремов

КОМПОНЕНТНЫЙ СОСТАВ И АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ ЭФИРНОГО МАСЛА ЗИМНЕЙ ДРЕВЕСНОЙ ЗЕЛЕНИ СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ

*Методом хромато-масс-спектрометрии определен компонентный состав эфирного масла и его отдельных фракций зимней древесины зеленой сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris*). Исследована антимикробная активность полученных образцов масла, которая уменьшается с увеличением времени его выделения.*

Ключевые слова: *компонентный состав, фракции эфирного масла, сосна обыкновенная (*Pinus sylvestris*), антимикробная активность.*

N.S. Korosteleva, A.A. Efremov

THE ESSENTIAL OIL COMPONENT COMPOSITION AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF SCOTCH PINE WINTER ARBOREOUS VERDURE

*The essential oil component composition and its particular fractions of Scotch pine (*Pinus sylvestris*) winter arboreous verdure is determined by the chromatography-mass spectrometry method use. The antimicrobial activity of the received essential oil samples that decreases with its elution time increase is researched.*

Key words: *component composition, essential oil fractions, Scotch pine (*Pinus sylvestris*), antimicrobial activity.*

Введение. Древесная зелень (ДЗ) – это смесь хвои, коры, ветвей и побегов древесины. Она представляет собой покрытые хвоей ветви диаметром не более 8 мм, заготовленные со свежесрубленных деревьев [1, 2]. Механический состав ДЗ зависит от породы дерева, однако, независимо от породы, она на 65–80 % представлена хвоей; на долю коры приходится 10–13 % [3, 4].

Установлено, что ДЗ содержит комплекс веществ, обладающих высокой биологической активностью и представляющих практически все классы органических соединений, встречаемых в растениях [5].

Эфирные масла хвойных пород деревьев – ценное сырье для производства ряда химических продуктов, находящихся свое применение в парфюмерии, косметике, производстве различных отдушек, дезодорантов, освежителей воздуха [6, 7]. Компонентный состав эфирного масла хвойных пород деревьев во многом определяется видом сырьевого источника и природно-климатическими условиями его произрастания. Исследования компонентного состава эфирного масла ДЗ пихты сибирской показали, что содержание и состав заметно изменяются в зависимости от периода заготовки [8–10].

В связи с этим следовало предположить, что изменения в составе и содержании масла могут наблюдаться и в случае эфирного масла сосны обыкновенной, компонентный состав которого в случае летней ДЗ описан в [11–12].

Цель работы. Исследование компонентного состава и содержания эфирного масла ДЗ сосны обыкновенной в зимний период, когда хвойные находятся в состоянии покоя, а также определение антимикробной активности полученных фракций эфирного масла.

Задачи исследования:

- 1) получить различные фракции эфирного масла и ДЗ сосны обыкновенной, определить их компонентный состав и физико-химические показатели;
- 2) определить антимикробную активность различных фракций эфирного масла из ДЗ сосны обыкновенной.

Методы исследования. Исходное сырье – ДЗ сосны обыкновенной, согласно [1, 2], собирали в декабре 2012 года с 55 деревьев, проба усреднялась методом квартования и подвергалась исследованиям как в свежем виде, так и после высушивания в тени при 20–25 °С. Эфирное масло получали методом исчерпывающей гидропародистилляции исходя из навески сырья более 2 кг, с использованием цельнометаллической установки с насадкой Клевенджера. Влажность исходного сырья определяли согласно ГОСТ 24027.0-80 [13]. Полученное эфирное масло количественно собирали в процессе отгонки до полного выделения всех компонентов эфирного масла в течение 20 часов, взвешивали и тем самым определяли его выход. Плотность и показатель преломления полученного масла и его отдельных фракций определяли с использованием высокоточных приборов фирмы Mettler Toledo 40 Density Meter и Mettler Toledo 40 D Refractometer при 20 °С. Состав эфирного масла определяли на хроматографе Agilent Technologies 7890 GC System с квадрупольным масс-спектрометром 5975 С в качестве детектора аналогично [8–10]. Содержание компонентов вычисляли по площадям пиков, идентификацию отдельных компонентов проводили сравнением времени удерживания и полных масс-спектров с соответствующими данными компонентов эталонных масел и чистых соединений, а также с использованием линейных индексов удерживания [14, 15].

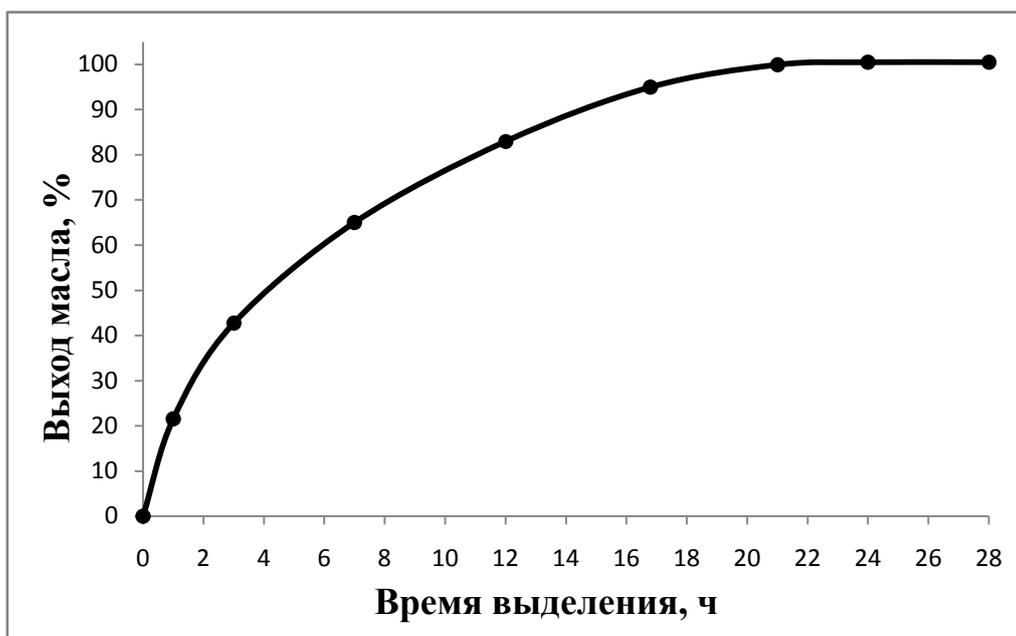
Антимикробную активность определяли методом серийных разведений в 0,5 мл питательного бульона [16, 17]. В качестве тест-культур использовали штаммы условно-патогенных микроорганизмов: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* 209p, *MRSA*, *Proteus vulgaris*. Чистую культуру выращивали на скошенном питательном агаре, в течение 24 часов при 37 °С. Затем готовили взвесь из смыва выращенной культуры 0,85%-м раствором хлорида натрия, по стандарту мутности $1 \cdot 10^9$ мкл/мл. После определения «рабочей дозы» тест-культуры титровали эфирное масло путем двукратных разведений в объеме 0,5 мл мясо-пептонного бульона, затем во все пробирки вносили по 0,5 мл «рабочей дозы» тест-культуры. Пробирки с эфирным маслом и тест-культурой ставили на три часа на экспозицию при 37 °С, потом вносили индикатор метиленовый синий с глюкозой и мясо-пептонным агаром, содержимое пробирок вновь смешивали и инкубировали в течение часа при температуре 37 °С. Результат учитывали по цвету питательной среды: если индикатор обесцвечивался – подавления роста тест-культуры нет, если не изменился – свидетельствует о блокировке дыхательных ферментов бактериальных клеток тест-культур и вызывает их гибель.

Результаты исследования. Отдельно проведенными экспериментами установлено, что эфирное масло из зимней ДЗ сосны обыкновенной количественно отгоняется в течение не менее 20 часов от начала его выделения. Результаты пяти экспериментов показали, что содержание эфирного масла в ДЗ составляет $0,92 \pm 0,04$ % в пересчете на абсолютно сухое сырье (влажность зимней ДЗ составляла 50,90 %).

Исследование динамики выделения эфирного масла в условиях гидропародистилляции с непрерывным отбором отдельных фракций позволило описать процесс выделения масла экспоненциальной зависимостью от времени и определить физико-химические характеристики полученных фракций. Из рисунка видно, что в данном случае процесс выделения эфирного масла из зимней ДЗ сосны обыкновенной аналогичен процессу в случае ДЗ пихты сибирской и сосны обыкновенной [8–10, 12]. А количество выделенного масла экспоненциально зависит от времени его выделения и описывается следующим уравнением:

$$P=f(\text{time})=(1-e^{-\tau \cdot \text{time}}),$$

где P – количество выделявшегося масла в относительных единицах; time – время отгонки, час; τ – переменная, определяющая наклон модели (для данного процесса $\tau=0,026$).



Динамика выделения эфирного масла из зимней ДЗ сосны обыкновенной в условиях гидропародистилляции

В таблице 1 приведены условия отбора отдельных фракций эфирного масла по мере его выделения и приведены показатель преломления и плотность полученных фракций.

Таблица 1

Динамика выделения и физико-химические показатели отдельных фракций эфирного масла сосны обыкновенной

Время выделения, ч	Количество выделившегося масла, %	n_d^{20}	Плотность, г/см ³
1,2	21,55	1,4726	0,8596
2,0	21,22	1,4741	0,8616
4,0	22,89	1,4766	0,8621
5,0	13,67	1,4865	0,8850
8,0	20,67	1,4913	0,8938
Цельное масло	100,0	1,4810	0,8812

Изменение плотности и показателя преломления полученных фракций эфирного масла свидетельствует об изменении компонентного состава. Тем не менее интегральные величины цельного масла зимней ДЗ близки к таковым в случае летней ДЗ сосны обыкновенной и сосны пицундской (см. табл. 2) [12].

Таблица 2

Физико-химические показатели эфирного масла сосны обыкновенной и сосны пицундской

Исходное сырье	n_d^{20}	Плотность, г/см ³
Хвоя сосны обыкновенной	1,4790	0,8772
Летняя ДЗ сосны обыкновенной	1,4824	0,8893
Зимняя ДЗ сосны обыкновенной	1,4810	0,8812
Летняя ДЗ сосны пицундской	1,4767	0,8728

Компонентный состав цельного эфирного масла и его фракций из зимней ДЗ сосны обыкновенной, полученного методом исчерпывающей гидропародистилляции, установленный с использованием хромато-масс-спектрометрии, приведен в таблице 3.

Таблица 3

Компонентный состав эфирного масла различных фракций сосны обыкновенной

RI	Компонент	Содержание от цельного масла, %					
		Цельное масло	Ф 1*	Ф 2	Ф 3	Ф 4	Ф 5
1	2	3	4	5	6	7	8
921	трициклен	0.67	1.79	0.88	1.53	0.34	0.64
928	3-туйен	0.94	2.23	0.20	1.93	0.11	1.88
932	α-пинен	27.48	36.06	41.85	34.60	18.45	8.82
952	камфен	2.06	11.21	3.47	5.79	0.80	5.12
957	вербенен	1.11	2.22	-	1.24	-	1.61
963	бензальдегид	0.54	0.84	-	1.60	-	0.64
974	сабинен	0.20	0.53	0.23	-	-	-
977	β-пинен	1.92	3.46	2.03	1.93	1.34	0.77
992	β-мирцен	2.40	3.33	2.73	1.99	1.98	1.53
1003	α-фелландрин	0.16	0.14	0.13	0.13	0.21	0.25
1010	3-карен	9.84	12.51	12.01	8.32	6.98	3.70
1015	α-терпинен	0.15	0.17	0.20	0.17	0.21	0.18
1023	пара-цимен	0.20	0.17	0.11	-	-	-
1028	β-фелландрин	8.20	10.66	8.68	6.70	8.02	5.88
1048	транс-β-оцимен	0.55	0.86	1.00	0.55	0.25	-
1057	γ-терпинен	0.25	0.31	0.36	0.27	0.26	0.19
1087	терпинолен	1.23	1.80	1.86	1.18	1.00	0.75
1175	терпинен-4-ол	0.30	0.14	0.34	0.33	0.31	0.17
1189	α-терпинеол	0.45	-	0.20	0.31	0.68	0.70
1234	тимол метиловый эфир	0.16	0.19	0.20	0.17	0.18	0.16
1285	борнил ацетат	0.96	1.18	1.69	0.86	0.39	0.13
1349	α-терпинеол ацетат	0.47	0.36	0.57	0.48	0.53	0.41
1375	α-копаен	0.42	0.16	0.17	0.35	0.72	0.79
1384	β-бурбонен	0.10	-	-	-	0.14	0.16
1391	β-элемен	0.64	-	0.22	0.52	1.07	1.17
1403	цис-селина-4(15),6-диен	0.16	0.37	0.24	0.13	0.12	-
1418	кариофиллен	2.75	0.70	1.15	2.02	5.43	5.76
1428	β - копаен	0.13	0.13	-	0.10	0.23	0.31
1438	аромадендрен	0.35	-	0.10	0.22	0.68	1.06
1443	гвайя-6,9-диен	0.14	0.22	0.14	-	-	-
1449	цис-муурола-3,5-диен	0.20	0.11	0.35	0.38	0.56	0.59
1452	хумулен	0.52	0.12	0.30	0.48	1.01	1.10
1462	цис-муурола-4(14),5-диен	0.34	0.12	0.28	0.31	0.54	0.57
1473	транс-кадина-1,6,4-диен	0.38	0.14	0.38	0.46	0.71	0.87
1477	γ-мууролен	0.87	0.29	0.52	0.71	1.54	2.12
1481	D-гермакрен	0.69	0.42	0.80	1.03	1.32	0.69
1485	β-селинен	0.76	0.14	0.34	0.65	1.48	1.85

1	2	3	4	5	6	7	8
1491	бицикросесквифландрен	0.41	0.24	0.55	0.52	0.61	0.43
1494	α-селинен	1.48	-	1.26	-	3.09	2.97
1496	бициклогермакрен	0.26	0.56	-	1.82	-	-
1500	α-мууролен	1.18	0.59	1.01	1.05	1.82	2.29
1515	γ-кадинен	3.93	1.02	1.77	2.33	6.09	7.45
1525	δ-кадинен	6.57	2.43	5.00	6.03	10.44	14.41
1532	транс-кадина-1,4-диен	0.29	0.10	0.26	0.31	0.48	0.54
1538	α-кадинен	0.29	0.13	0.23	0.24	0.44	0.55
1543	α-калакорен	0.16	-	-	0.12	0.21	0.20
1566	не идентиф.	0.15	-	-	0.15	0.32	0.22
1577	спатуленол	0.94	-	0.48	0.67	1.23	0.94
1583	глобулол	0.60	-	0.27	-	-	0.83
1591	виридифлорол	0.11	-	-	-	-	0.31
1609	β-олофенон	0.13	-	-	0.14	0.25	0.16
1615	1,10-ди-эпи-кубенол	0.35	-	0.17	0.40	0.63	0.53
1622	эремолигнол	0.10	-	-	-	0.16	0.18
1628	1-эпи-кубенол	0.80	-	0.38	0.74	1.42	1.27
1642	τ-кадинол	0,15	0.50	2.10	-	-	-
1644	Т-мууролол	5.66	-	-	3.81	7.78	8.63
1647	δ-кадинол	0.61	-	0.27	0.46	1.02	1.01
1656	α-кадинол	3.33	0.36	1.73	2.30	5.17	5.46
1728	хамазулен	0.16	-	-	-	0.16	0.16
Идентифицировано:		98,7%	99.1%	99,21%	98.38%	98.59%	98.89%

* – номер фракции в данной таблице соответствует номеру фракций в таблице 1.

Анализ полученных данных позволяет заключить, что эфирное масло зимней ДЗ сосны обыкновенной содержит не менее 59 индивидуальных компонентов, которые идентифицируются по полным масс-спектрам и линейным индексам удерживания, за исключением компонента с индексом удерживания 1566.

Основными компонентами цельного эфирного масла ДЗ сосны обыкновенной являются: α-пинен, 3-карен, β-фелландрен, δ-кадинен, τ-мууролол, α-кадинол и другие.

Практически аналогичные данные по компонентному составу эфирного масла августовской ДЗ сосны обыкновенной были получены нами ранее [12].

Анализ компонентного состава полученных отдельных фракций эфирного масла показал, что по мере увеличения продолжительности процесса гидропародистилляции доля высококипящих компонентов возрастает, а доля легколетучих компонентов уменьшается.

Из имеющихся литературных данных известно, что практически все эфирные масла обладают антимикробным действием [18–19]. Очевидно, что антимикробным действием будет обладать как само цельное масло, так и его отдельные фракции. Учитывая тот факт, что компонентный состав полученных фракций несколько различается, следует ожидать, что эти фракции масла могут различаться по антимикробной активности.

В таблице 4 приведены данные по антимикробной активности полученных фракций и цельного масла в отношении некоторых микробных сообществ.

Антимикробная активность эфирного масла сосны обыкновенной, мкг/мл

Эфирное масло	<i>MRSA</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Фракция 1	0,66	5,31	21,25	10,62	0,66	21,25
Фракция 2	1,32	5,31	21,25	10,62	0,66	42,5
Фракция 3	1,32	10,62	21,25	21,25	1,32	42,5
Фракция 4	2,65	21,25	21,25	21,25	1,32	85
Фракция 5	5,31	21,25	42,5	42,5	2,65	85
Цельное	1,32	10,62	21,25	10,62	1,32	42,5

Естественно, что на различные микроорганизмы цельное эфирное масло действует по-разному, причем наибольшая активность его проявляется к грамположительным *MRSA* и *Staphylococcus aureus*. Но наибольший интерес в этом плане представляет тот факт, что антимикробная активность всех фракций эфирного масла заметно снижается с увеличением номера фракции. Иными словами, наибольшую антимикробную активность будет иметь первая фракция эфирного масла зимней ДЗ сосны обыкновенной.

Выводы

1. Определен компонентный состав различных фракций эфирного масла сосны обыкновенной. С использованием хромато-масс-спектрометрии установлено, что в состав эфирного масла сосны обыкновенной входит не менее 59 компонентов, 58 из которых идентифицировано.

2. Изучена антимикробная активность различных фракций эфирного масла сосны обыкновенной, которая заметно снижается с увеличением времени выделения масла. Установлено более интенсивное воздействие на грамположительные микроорганизмы.

Литература

- ГОСТ 21769-84. Зелень древесная. – М.: Изд-во стандартов, 1984. – 5 с.
- Химическая технология древесины / А.К. Славянский, В.И. Шарков, А.А. Ливеровский [и др.]. – М.: Гослесбумиздат, 1962. – 577 с.
- Ягодин В.И. Основы химии и технологии переработки древесной зелени. – Л.: Изд-во ЛГУ, 1981. – 244 с.
- Репях С.М., Чупрова Н.А., Величко Н.А. Состав древесной зелени хвойных // Химия древесины. – 1982. – № 3. – С.92–95.
- Андерсон П.П., Репях С.М., Полис О.Р. Основы классификации химических веществ, входящих в состав древесной зелени // Изучение химического состава древесной зелени. – Рига: Зинатне, 1983. – С. 5–10.
- Войткевич С.А., Хейфиц Л.А. От древних благовоний к современным парфюмерии и косметике // Пищ. пром-сть. – М., 1997. – 215 с.
- Лоулес Д. Энциклопедия ароматических масел. – М.: Крон-пресс, 2000. – 287 с.
- Ефремов Е.А., Ефремов А.А. Компонентный состав эфирного масла июльской лапки пихты сибирской Красноярского края // Химия растительного сырья. – 2010. – № 2. – С. 135–138.
- Ефремов Е.А., Ефремов А.А. Компонентный состав эфирного масла октябрьской лапки пихты сибирской Красноярского края // Химия растительного сырья. – 2010. – № 3. – С. 121–124.
- Ефремов Е.А., Ефремов А.А. Компонентный состав эфирного масла зимней лапки пихты сибирской Красноярского края // Химия растительного сырья. – 2012. – № 4. – С. 113–117.
- Чекушкина Н.В., Невзорова Т.В., Ефремов А.А. Фракционный состав эфирного масла сосны обыкновенной // Химия растительного сырья. – 2008. – № 2. – С. 87–90.

12. Зыкова И.Д., Ефремов А.А. Сравнительный анализ компонентного состава эфирных масел *Pinus Pithuusa* и *Pinus Silvestris* // Химия растительного сырья. – 2012. – № 2. – С. 105–110.
13. ГОСТ 24027.2-80. Сырье лекарственное растительное. – М.: Изд-во стандартов, 1980. – 27 с.
14. Ткачев А.В. Исследование летучих веществ растений. – Новосибирск, 2008. – 969 с.
15. Adams R.P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy // 4th ed. Allured Publishing Corporation. – Illinois, USA, 2007. – 804 p.
16. Леви М.И., Горожанкина И.А., Сагатовская Л.А. Быстрый метод определения чувствительности бактериальных культур к различным антибиотикам в жидкой среде // Антибиотики. – 1967. – № 1. – С. 57–65.
17. Дьяков С.И., Лебедева И.К., Сидоренко С.В. Современные методы и средства быстрого определения чувствительности возбудителей опасных инфекционных заболеваний к антибиотикам и химиопрепаратам // Военно-мед. журн. – 1996. – № 3. – С. 44–47.
18. Воздействие эфирных масел Сибирского региона на условно-патогенные микроорганизмы / Е.Г. Струкова, А.А. Ефремов, А.А. Гонтова [и др.] // Химия растительного сырья. – 2009. – № 4. – С. 57–62.
19. Определение микробиологического статуса и диагностика инфекций организма человека с использованием метода хромато-масс-спектрометрии / Е.Г. Струкова, А.А. Ефремов, А.А. Гонтова [и др.] // Журнал Сибирского федерального университета. Химия. – 2009. – № 4. – С. 351–358.

