

УДК 665.3+615:322

ИССЛЕДОВАНИЕ ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА И АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ ЭКСТРАКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ИЗ СЕМЯН *ROBINIA PSEUDAACACIA L.*

© А.Г. Тырков*, Л.Т. Сухенко, Э.Р. Акмаев

Астраханский государственный университет, пл. Шаумяна, 1, Астрахань, 414000 (Россия), e-mail: tyrkov@rambler.ru

Методом экстракции получены образцы биологически активных веществ из эндемичного растения Астраханской области *Robinia pseudoacacia L.* и изучена сезонная динамика накопления экстрактивных веществ в соцветиях и семенах по фазам вегетации. Определены пределы изменения удельного веса и показателя преломления. Методом газожидкостной хроматографии осуществлен количественный анализ основных экстрактивных веществ *Robinia pseudoacacia L.* и обнаружено, что они обладают антимикробной активностью в отношении *Pseudomonas aeruginosa 165*, *Klebsiella pneumoniae, B-1919 Bacillus mesentericum-3*, *Staphylococcus aureus 209*, *Staphylococcus aureus MRSA*.

Ключевые слова: робиния псевдоакация, экстракция, экстрактивные вещества, гелиотропин, метилантранилат, бензилсалицилат, антимикробная активность.

Введение

В последние годы в России возрос интерес к лекарственным растениям, из-за наличия в них большого количества биологически активных веществ. Они используются для оздоровления организма человека, в пищевой, парфюмерной промышленности, фармации и ветеринарии [1].

Робиния псевдоакация является эндемичным растением Астраханской области и широко распространена в этом регионе, относится к лекарственным растениям, однако химический состав экстрактивных веществ изучен недостаточно, слабо освещен в литературе и поэтому нуждается в дополнительном исследовании. Известно только, что в листьях обнаружены флавоноиды и их гликозиды робинин, акацетин, акацин, апагенин, робленин [2, 3]. Имеются данные о содержании в коре молодых побегов танинов, полициклических спиртов фитостерина, стигмастерина, а в различных частях неповрежденных растений пектинов и слизей – продуктов нормального метаболизма [4, 5]. В семенах присутствует комплекс низкомолекулярных биологически активных веществ, в их состав входит метилантранилат, гелиотропин, линалоол, бензиловый спирт и α -терпинеол, причем без указания их количественного содержания [6]. Робиния псевдоакация – техническое, декоративное, лекарственное растение, медонос, относится к семейству бобовых. Деревья могут достигать 30–35 м в высоту, а диаметр ствола – 1 м, листья непарноперистые 18–20 см длиной. Отдельные листочки продолговато-овальные, цельнокрайние. Соцветие — многоцветковая поникающая кисть длиной 10–25 см, цветки робинии белые или бледно-розовые, очень пахучие. Плод продолговато-линейный плоский стручок длиной 5–12 см. Цветет робиния в мае-июне, плоды созревают в сентябре-октябре. Растение засухоустойчивое, солевыносливое.

Тырков Алексей Георгиевич – заведующий кафедрой неорганической и биоорганической химии, доктор химических наук, доцент, e-mail: tyrkov@rambler.ru

Сухенко Людмила Тимофеевна – доцент кафедры биотехнологии и биоэкологии, кандидат биологических наук, e-mail: sukhenko@list.ru

Акмаев Эльдар Рашидович – студент химического факультета, e-mail: tyrkov@rambler.ru

В народной медицине цветки *Robinia pseudoacacia L.* применяют как жаропонижающее и спазмолитическое средство [7]. Водно-спиртовые экстракты из листьев и молодых побегов используют при обострении гастритов и язвенной болезни, а отвар коры молодых ветвей рекомендуют при по-

* Автор, с которым следует вести переписку.

вышенной кислотности желудочного сока [8]. Однако при использовании робинии необходимо знать о токсических веществах, содержащихся в различных частях растения, особенно алкалоида робинина, и поэтому обращаться с ней нужно осторожно, строго соблюдая дозировку и рекомендации по приготовлению препаратов. Учитывая тот факт, что содержание отдельных биологически активных веществ в эндемичных растениях определяется природно-климатическими условиями их произрастания, важно знать, какие биологически активные соединения содержатся в робинии псевдоакации Астраханского региона.

Цель настоящей работы – исследование сезонной динамики накопления экстрактивных веществ в *Robinia pseudoacacia* L. в соцветиях и семенах по фазам вегетации, изучение качественного и количественного химического состава и антимикробной активности образцов экстрактивных веществ из семян робинии псевдоакации.

Экспериментальные условия

Сырье. *Robinia pseudoacacia* L. собрана в Приволжском районе Астраханской области: соцветия – с мая по июль, семена – с сентября по декабрь 2011 г., сырье анализировалось в свежем и сухом виде. Сухое сырье получено согласно правилам сбора и сушки лекарственных растений [9]. Во избежание разрушения биологически активных веществ и для удаления излишней влаги его подвергали высушиванию сразу после сбора методом воздушной сушки, основанной на свободном доступе воздуха к растительному материалу, разложенному в затемненном месте.

Выделение экстрактивных веществ из измельченных наземных частей (соцветий, семян) осуществляли методом экстракции из воздушно-сухого сырья массой 2 кг, в качестве растворителя применяли петролейный эфир (марка х.ч.) при соотношении растворителя к массе сырья 5 : 1, экстракцию проводили трехкратно при нагревании в течение 45 мин. После удаления растворителя под вакуумом (температура 50 °С, остаточное давление 5 мм) остаток обрабатывали этанолом, охлаждали до –10 °С и отфильтровывали, растворитель удаляли под вакуумом. Продолжительность процесса экстракции установлена экспериментально на основании изучения динамики изменения выхода целевого продукта во времени. Выход экстрактивных веществ определяли в % в пересчете на вес абсолютного сухого сырья. Физико-химические показатели экстрактивных веществ установлены по общепринятым методикам [10]. Попытки выделить биологически активные вещества из этих наземных частей методом пародистилляции к успеху не привели.

Качественный и количественный состав образцов экстрактивных веществ проводили на хроматографе с масс-селективным детектором Shimadzu QP 2010. Для идентификации компонентов использовали библиотеку масс-спектров NIST 02.

Образец экстрактивного вещества, полученного из семян, растворяли в бензоле до концентрации 0,1% по объему. Колонка MDN-1 (метилсиликон, твердосвязанный) 30 м, диаметр 0,25 мм. Режим хроматографирования: инжектор – 180 °С; детектор – 200 °С; интерфейс – 210 °С; газ-носитель – гелий (99,99999%), 1 мл/мин при делении потока 1 : 10; термостат – 60° 1 мин, 2 град/мин до 70 °С, 5 град/мин до 90 °С, 10 град/мин до 180 °С, 20 град/мин до 280 °С, далее изотерма 1 мин. Режим регистрации масс-спектров 39–350 m/z. Для определения линейных индексов экстрактивное вещество и нормальные парафины (нонан, ундекан, тридекан и пентадекан) растворяли в бензоле, *n*-парафины разбавляли до концентрации 0,007% по объему, экстрактивные вещества робинии псевдоакации – 1 : 30000 по объему. Количественное содержание компонентов экстрактивных веществ вычислялось по площадям газохроматографических пиков без использования корректирующих коэффициентов. Качественный анализ проводили путем сравнения линейных индексов удерживания [11] и полных масс-спектров компонентов с соответствующими данными чистых соединений.

Линейные индексы удерживания (RI_x) рассчитывали по формуле:

$$RI_x = 100n + 100k (t_{Rx} - t_{Rn}) / (t_{R_{(n+k)}} - t_{Rn}),$$

где n – число атомов углерода *n*-парафина; k – разность числа атомов углерода двух *n*-парафинов; t_{Rx} – время удерживания вещества; t_{Rn} – время удерживания *n*-парафина с n атомами углерода; $t_{R_{(n+k)}}$ – время удерживания *n*-парафина с $n+k$ атомами углерода.

Изучение антимикробной активности экстрактивных веществ. В основе метода изучения антимикробной активности лежало исследование влияния активных веществ, содержащихся в экстрактах, на

дыхательную систему микроорганизмов. Уровень дыхания или его подавления наблюдали по степени потребления глюкозы с индикатором метиленовой синью. Антимикробную активность определяли методом серийных разведений в 0,5 мл питательного бульона [12]. В качестве тест-культур использовали штаммы возбудителей госпитальных инфекций: *Escherichia coli* CK, B-1919 *Bacillus mesentericum*-3, *Pseudomonas aeruginosa* 165, *Staphylococcus aureus* 209, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Staphylococcus aureus* MRSA. Исследование состояло из 5 серий экспериментов, чистые бактериальные культуры выращивали на питательной агаровой среде, помещенной в термостат при 37 ± 1 °С. Микробные клетки со среды смывали через 18–20 ч 0,89% раствором хлорида натрия, взвесь готовили по стандарту мутности $1 \cdot 10^9$ кл/мл (10 ед. мутности). Для получения соответствующего разведения микробной взвеси готовили ряд последовательных семикратных разведений. После определения «рабочей дозы» тест-культуры титровали экстрактивные вещества путем двукратных разведений в объеме 0,5 мл мясо-пептонного бульона. Последняя пробирка в контрольном ряду не содержала экстрактивных веществ и служила контролем дигидрогеназной активности клеток тест-культуры. В результате микробная нагрузка в пробирке соответствовала «рабочей дозе» тест-культуры. Пробирки с экстрактивными веществами и тест-культурой ставили на 24 ч на экспозицию при 37 °С, а затем вносили индикатор метиленовой сини с глюкозой и мясо-пептонным агаром, содержимое пробирок перемешивали и инкубировали в течение часа при температуре 37 ± 1 °С. Результат учитывали по цвету питательной среды, если индикатор обесцвел, то это свидетельствовало об отсутствии подавления, если цвет не менялся, то это свидетельствовало о блокировании дыхательных ферментов клеток тест-культур активными компонентами экстрактов. В качестве препарата сравнения использовали гентамицина сульфат. Результаты подвергали статистической обработке с использованием t-критерия Стьюдента.

Обсуждение результатов

Изучение зависимости выхода экстрактивных веществ от фазы вегетации и вида наземной части робинии псевдоакакии показало, что наибольший выход целевого вещества наблюдается из семян, собранных в октябре, поэтому для исследования химического состава и изучения биологической активности были выбраны именно эти вегетативные части изучаемого растения. Попытка осуществить хроматографическое разделение летучих и нелетучих фракций экстрактивных веществ нами не удалась. Образцы экстрактивных веществ подвергали определению удельного веса при 20 °С и показателю преломления (табл. 1).

Методом хромато-масс-спектрометрии обнаружено, что в состав экстрактивных веществ семян робинии псевдоакакии входит более 16 летучих и нелетучих компонентов (табл. 2). Указанные 16 компонентов идентифицированы нами и определена концентрация каждого. Как следует из данных таблицы 2, основными компонентами экстрактивных веществ являются гелиотропин (42,18%), метилантранилат (26,05%) и бензилсалицилат (18,61%), их содержание превышает 10% от цельного вещества. Три компонента присутствуют в концентрациях более 1% и 10 компонентов в концентрации менее 1%.

Результаты исследования противомикробной активности экстрактивных веществ приведены в таблицах 3 и 4. Из приведенных данных следует, что экстрактивные вещества робинии псевдоакакии проявляют заметную антимикробную активность к широкому ряду как грамотрицательных, так и грамположительных микроорганизмов.

Таблица 1. Выход, удельный вес и показатель преломления образцов экстрактивных веществ из соцветий и семян в разные сроки вегетации робинии псевдоакакии

Наземные вегетативные части робинии псевдоакакии	Срок вегетации	Выход экстрактивных веществ, %*	d, г/см ³	η_D^{20}
Соцветия	май-начало июня	0,45 0,37	0,9435	1,4855
	конец июня – начало июля	0,31 0,22	0,9430	1,4810
Семена	сентябрь	8,42	0,9520	1,4965
	октябрь	11,35	0,9524	1,4982
	декабрь	7,25	0,9550	1,5035

* в числителе и знаменателе указан выход экстрактивных веществ соответственно из свежего и высушенного растительного материала.

Таблица 2. Количественный состав экстрактивных веществ из семян робинии псевдоакации

Наименование компонента	Индекс удерживания, RI	Содержание, в % от цельного вещества
β -мирцен	991	0,46
D-лимонен	1014	0,37
Бензиловый спирт	1033	0,97
цис-оцимен	1038	1,26
Салициловый альдегид	1041	0,65
Линалоол	1086	3,12
Терпинен-4-ол	1177	0,50
α -терпинеол	1191	1,53
Неидентифицированные компоненты * M=162	1217	2,21
Гелиотропин	1320	42,18
Метилантранилат	1334	26,05
α -терпинилацетат	1351	0,59
Додеканаль	1409	0,32
1,4-метано-1H-инден	1548	0,76
Бензилсалицилат	1870	18,61
ди-н-бутилфталат	1962	0,20
Диизооктилфталат	1971	0,22

Таблица 3. Антимикробная активность экстрактивных веществ робинии псевдоакации по отношению к штаммам грамотрицательных бактерий

Исследуемый образец	МПК (мкг/мл) по отношению к				
	<i>E.coli</i> CK	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 165	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Робиния псевдоакация	20	5*	20	5*	10
Гентамицина сульфат	2,5	0,63*	2,5	1,25	1,25

* Различия между повторами достоверны при $p = 0,95$.

Таблица 4. Антимикробная активность экстрактивных веществ робинии псевдоакации по отношению к штаммам грамположительных бактерий

Исследуемый образец	МПК (мкг/мл) по отношению к		
	<i>Bacillus B-1919 mesentericum-3</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> 209	<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA
Робиния псевдоакация	5*	0,63*	5
Гентамицина сульфат	1,25	0,63*	0,63

* Различия между повторами достоверны при $p = 0,95$.

Заключение

Таким образом, проведенные исследования позволили изучить сезонную динамику накопления экстрактивных веществ в соцветиях и семенах по фазам вегетации, выявить качественный и количественный химический состав экстрактивных веществ из семян эндемичного растения Астраханского региона *Robinia pseudoacacia* L., собранных в октябре. Робиния псевдоакация может служить сырьем для получения биологически активных веществ, основными компонентами которого являются гелиотропин, метилантранилат, бензилсалицилат. Исследование антимикробной активности показало, что экстрактивные вещества, выделенные из робинии псевдоакации, проявляют антимикробную активность в отношении *Pseudomonas aeruginosa* 165, *Klebsiella pneumoniae*, B-1919 *Bacillus mesentericum-3*, *Staphylococcus aureus* 209, *Staphylococcus aureus* MRSA.

Список литературы

1. Гуринович Л.К., Пучкова Т.В. Эфирные масла. Химия, технология, анализ и применение. М., 2005. 192 с.
2. Ладыгина Е.Я., Сафронич Л.Е., Отрященко В.Э. и др. Химический анализ лекарственных растений. М., 1983. 176 с.
3. Соколов С.Я. Деревья и кустарники СССР. Дикорастущие, культивируемые и перспективные для интродукции. М., 1958. С. 148–152.
4. Краснов Е.А., Березовская Т.П., Алексеюк Н.В. и др. Выделение и анализ природных биологически активных веществ. Томск, 1987. 184 с.

5. Георгиевский В.П., Комиссаранко Н.Ф., Дмитрук С.Е. Биологически активные вещества лекарственных растений. Новосибирск, 1990. 333 с.
6. Артамонов В. Робиния // Наука и жизнь. 1991. №6. С. 158–160.
7. Леснов П.А. Акация ложная и настоящая // Наука и жизнь. 1980. №4. С. 40–41.
8. Дудченко Л.Г., Козьяков А.С., Кривенко В.В. Пряно-ароматические и пряно-вкусовые растения. Киев, 1989. С. 10–11.
9. Правила сборки и сушки лекарственных растений. М., 1985. 321 с.
10. Горяев М.И., Плива И. Методы исследования эфирных масел. Алма-Ата, 1962. 751 с.
11. Ткачев А.В. Исследование летучих веществ растений. Новосибирск, 2008. 969 с.
12. Герхард Ф. Методы общей бактериологии. М., 1983. 612 с.

Поступило в редакцию 28 октября 2011 г.

После переработки 20 февраля 2012 г.

Tyrkov A.G.*, Sukhenko L.T., Akmaev E.R. STUDY OF CHEMICAL COMPOSITION AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF EXTRACTED COMPOUNDS SEEDS *ROBINIA PSEUDAACACIA L.*

Astrakhan State University, pl. Shaumyana, 1, Astrakhan, 414000 (Russia), e-mail: tyrkov@rambler.ru

Samples obtained by extraction of extracted compounds of the endemic plants of the Astrakhan region *Robinia pseudoacacia L.* and the dependence of its release on the type of ground part, the period of plant vegetation, determine the scope of changes in specific gravity and refractive index. By gas-liquid chromatography carried out a quantitative analysis of the major components of extracted compounds *Robinia pseudoacacia L.* We found that the locust tree extracted compounds has antimicrobial activity against *Pseudomonas aeruginosa 165*, *Klebsiella pneumoniae*, *B-1919 Bacillus mesentericum-3*, *Staphylococcus aureus 209*, *Staphylococcus aureus MRSA*.

Keywords: *robinia pseudoacacia L.*, extraction, extracted compounds, geliotropin, metilantranilat, benzilsalitsilat, antimicrobial activity.

References

1. Gurinovich L.K., Puchkova T.V. *Efirnye masla. Khimiia, tekhnologiia, analiz i primeneniie*. [Essential oils. Chemistry, technology, analysis and application]. Moscow, 2005, 192 p. (in Russ.).
2. Ladygina E.Ia., Safronich L.E., Otrishenkova V.E. et al. *Khimicheskii analiz lekarstvennykh rastenii*. [Chemical analysis of medicinal plants]. Moscow, 1983, 176 p. (in Russ.).
3. Sokolov S.Ia. *Derev'ia i kustarniki SSSR. Dikorastushchie, kul'tiviruemye i perspektivnye dlia introduktsii*. [Trees and shrubs of the USSR. Wild, cultivated, and promising to be introduced]. Moscow, 1958, pp. 148–152. (in Russ.).
4. Krasnov E.A., Berezovskaia T.P., Alekseiuk N.V. et al. *Vydelenie i analiz prirodnykh biologicheskii aktivnykh veshchestv*. [Isolation and analysis of natural biologically active substances]. Tomsk, 1987, 184 p. (in Russ.).
5. Georgievskii V.P., Komissaranko N.F., Dmitruk S.E. *Biologicheskii aktivnye veshchestva lekarstvennykh rastenii*. [Biologically active substances of medicinal plants]. Novosibirsk, 1990, 333 p. (in Russ.).
6. Artamonov V. *Nauka i zhizn'*, 1991, no. 6, pp. 158–160. (in Russ.).
7. Lesnov P.A. *Nauka i zhizn'*, 1980, no. 4, pp. 40–41. (in Russ.).
8. Dudchenko L.G., Koz'iaikov A.S., Krivenko V.V. *Priano-aromaticheskie i priano-vkusovye rasteniia*. [Aromatic and spicy flavor plants]. Kiev, 1989, pp. 10–11. (in Russ.).
9. *Pravila sborki i sushki lekarstvennykh rastenii*. [Build rules and drying herbs]. Moscow, 1985, 321 p. (in Russ.).
10. Gorjaev M.I., Pliva I. *Metody issledovaniia efirnykh masel*. [Research methods of essential oils] Alma-Ata, 1962, 751 p. (in Russ.).
11. Tkachev A.V. *Issledovanie letuchikh veshchestv rastenii*. [The study of plant volatiles]. Novosibirsk, 2008, 969 p. (in Russ.).
12. Gerkhart F. *Metody obshchei bakteriologii*. [Metody obshchei bakteriologii]. Moscow, 1983, 612 p. (in Russ.).

Received October 28, 2011

Revised February 20, 2012

* Corresponding author.