УДК 615.281.9+66.061+ 665.53

СОСТАВ И АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ ЭФИРНОГО МАСЛА И СВЕРХКРИТИЧЕСКИХ ЭКСТРАКТОВ ДРЕВЕСНОЙ ЗЕЛЕНИ *PÍNUS SYLVÉSTRIS*

©2020 г. [1]**Н. В. Селиванова,** [1]**А. А. Красикова*,**
[1]**М. А. Гусакова,**[1,2]**К. Г. Боголицын,** [1,2]**А. Д. Ивахнов**

[1] *ФГБУН ФИЦКИА УрО РАН, Архангельск, Россия*

[2] *Северный (Арктический) федеральный университет им. Ломоносова, Архангельск, Россия*

*ann.krasikova@gmail.com

Поступила в редакцию 22.01.2020 г. Прошла рецензирование 09.02.2020 г.
Принята к публикации 09.02.2020 г.

Проведен сопоставительный анализ влияния способов экстракции, отвечающих принципам «зеленой химии», на степень выделения компонентов из древесной зелени сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris*). Методом ГХ-МС при анализе спиртового экстракта, эфирного масла и сверхкритических экстрактов показаны их различия, как в количественном, так и качественном составе. Установлена наибольшая селективность выделения фракции дитерпенов, а также расширение спектра извлекаемых индивидуальных компонентов из древесной зелени методом сверхкритической флюидной экстракции диоксидом углерода (по сравнению с традиционными методами экстракции) при сохранении высокой антимикробной активности полученного экстракта на подавление штаммов *Escherichia coli*.

Ключевые слова: сосна обыкновенная, сверхкритическая флюидная экстракция, эфирное масло, терпены, антибактериальная активность.

ВВЕДЕНИЕ

Арктические и субарктические территории РФ охватывают несколько природных зон (арктические пустыни, тундра, лесотундра, тайга), каждая из которых обладает характерными особенностями климатических воздействий, которые оказывают влияние на процессы биосинтеза растительных матриц [1]. В хвойных растениях биологические процессы наиболее активно протекают в древесной зелени, где происходит синтез и накопление широкого спектра соединений, расходуемых в течение многолетних циклов на построение вегетативной массы растения. Особенности процессов биосинтеза с учетом специфики климатических условий арктического региона находят отражение в формировании индивидуального состава и содержания компонентов древесной зелени хвойных пород.

Сосна обыкновенная — древесная порода, встречающаяся не только в лесной зоне европейской части России, но и в условиях высоких широт. Это один из основных видов лесообразующих пород Севера, а древесная зелень сосны является отходом лесопереработки, образующимся в больших количествах. Поэтому, с точки зрения комплексной переработки древесины, утилизация древесной зелени с использованием принципов «зеленой химии» и современных экологичных технологий

является актуальным вопросом. Древесная зелень сосны богата витаминами, хлорофиллами и каротиноидами, а по фитонцидной активности она превосходит многие виды хвойных пород [2]. Однако в литературе имеется очень мало данных по исследованию эффективных способов извлечения компонентов из древесной зелени сосны [3]. В то же время, анализ литературных источников демонстрирует активный рост количества работ, посвященных поиску лекарственных препаратов растительного происхождения, обладающих широким спектром биологического действия, что позволяет использовать их для профилактики и лечения многих заболеваний [4, 5]. Так, в качестве противоопухолевых средств весьма эффективными оказались дитерпеноиды сложного строения — таксаны, выделяемые из коры тихоокеанского тиссового дерева. Полученный на их основе препарат паклитаксел (таксол) и полусинтетический аналог доцетаксел (таксотер) из европейского тисса широко используются при лечении различных видов опухолей [6—10]. В связи с дефицитом исходного сырья для получения противоопухолевых препаратов с таксоловым кольцом актуален поиск новых таксолсодержащих субстанций, перспективным источником которых является живица хвойных пород деревьев [11], из которой выделяют фракцию лабданоидо-дитерпеновых кислот.

Традиционными методами извлечения компонентов из древесной зелени являются метод настаивания с этанолом, а также перегонка с водяным паром. При разработке современных способов выделения экстрактивных веществ большой интерес представляет сверхкритическая флюидная экстракция (СКФЭ) диоксидом углерода, как экологичный способ, обеспечивающий их мягкое извлечение [12—14]. Для повышения эффективности экстракции часто используют бинарный растворитель СК-CO_2 с органическим сорастворителем, имеющим сродство к извлекаемым компонентам; часто с этой целью применяется этанол [3].

Сопоставление традиционных и современных методов извлечения экстрактивных веществ сосны позволит получить новые сведения о химическом составе и содержании биологически активных компонентов древесной зелени с учетом влияния климатических условий северных широт. Оценка чувствительности микроорганизмов различных таксономических групп к действию полученных экстрактов будет способствовать определению спектра их антимикробного действия, фармакологических свойств и, как следствие, обоснованию перспективности их использования в композиции фитопрепаратов, обеспечивающих сохранение здоровья населения в условиях Арктики.

Таким образом, целью настоящей работы является сравнительное исследование компонентного состава и антибактериальной активности экстрактов, полученных из древесной зелени сосны обыкновенной как традиционными методами (перегонкой с водяным паром, настаиванием со спиртом), так и экстракцией диоксидом углерода в сверхкритическом состоянии.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Объект исследования. Исходное сырье (древесная зелень сосны обыкновенной) заготавливали в естественных биоценозах, находящихся в субарктических территориях Европейского севера РФ (Приморский район Архангельской области). Отбор и усреднение проб древесной зелени сосны проводили согласно ГОСТ 21769-84 Зелень древесная [15]. Перед проведением анализов сырье измельчали на лабораторной мельнице ЛМ 201 до размеров 2—3 мм. Для проведения каждой обработки использовали навеску исходного сырья естественной влажности массой 50 г.

Настаивание с этанолом (96 %) проводили в статическом режиме при 45—50 °С в течение 6—8 ч; полученный спиртовый экстракт древесной зелени сосны имел темно-зеленый цвет.

Получение эфирного масла методом гидродистиляции. Выделение эфирного масла из древесной зелени сосны проводили перегонкой с водяным паром в аппарате Гинзбурга. После окончания перегонки (6—8 ч) и охлаждения колбы до комнатной температуры измеряли объем выделившегося эфирного масла. Объемно-массовую долю отстоявшегося слоя эфирного масла выражали в процентах по отношению к абсолютно сухому сырью [16]. Эфирное масло сосны представляло собой подвижную, практически бесцветную жидкость с характерным запахом хвои.

Сверхкритическую флюидную экстракцию (СКФЭ) древесной зелени сосны сверхкритическим диоксидом углерода (СК-CO_2) и бинарным растворителем (СК-CO_2 с сорастворителем — этанолом) проводили с применением установки SFE-5000 (Thar Process, USA) в ячейке объемом 250 мл в динамическом режиме. Параметры обработки были подобраны на основе анализа литературы [2, 3, 11, 14] и имели следующие значения: температура 45 °С, давление 15 МПа, продолжительность обработки 1 ч. Как показано в работе [3], более мягкие условия СК-экстракции способствуют повышению селективности выделения летучих веществ. Скорость подачи CO_2 — 20 мл/мин, сорастворителя — 2 мл/мин; гидромодуль обработки — 24; объемные скорости определены при давлении обработки 15 МПа; температура головок углекислотного насоса и измерителя скорости потока CO_2 — 2,5 °С. Экстракт СК-CO_2 сосны — жидкость светло-желтого цвета, практически не растворяется в воде; экстракт, полученный при экстракции СК-CO_2 с этанолом, — жидкость светло-зеленого цвета.

Анализ СК экстрактов древесины после обработок. Идентификацию индивидуальных летучих соединений в полученных образцах проводили методом ГХ-МС с использованием прибора GS-MS QP-2010Ultra. Непосредственно перед проведением анализа эфирное масло разбавляли дихлорметаном в соотношении 1 : 100 (об.), остальные экстракты анализировали без дополнительной пробоподготовки. Условия хроматографического анализа: колонка Rtx-5 MS (длина 30 м, внутренний диаметр 0,25 мм), изотермический режим при 40 °С в течение 5 мин, затем программированный подъем температуры со скоростью 10 °С/мин до 250 °С с выдержкой при конечной температуре 20 мин. Температура испарителя 230 °С, температура ионизационной камеры — 230 °С, энергия ионизации — 70 эВ. Идентификацию соединений осуществляли по библиотекам масс-спектров NIST 2011 и Wiley 2010 со степенью достоверности выше 80 %. Относительное содержание компонентов в экстрактах определяли по площади пиков на хроматограммах. Дополнительным параметром, принимаемым во внимание при идентификации соединений с близкими спектрами, служила величина индекса удерживания.

Количественное определение хлорофиллов *а* и *б*, α- и β-каротинов проводили методом ВЭЖХ с использованием системы Nexera X2 LC30AD для сверхбыстрой хроматографии (Shimadzu, Япония) с диодно-матричным детектором. Разделение осуществляли на колонке Phenomenex (250 × 4,6 мм, 5 мкм), в качестве элюента использовали смесь ацетонитрила с изопропиловым спиртом в соотношении 80 : 20 (об.), содержащим ацетат аммония концентрацией 50 ммоль/л. Температура термостата 35 °С, объем инжекции составлял 20 мкл при скорости потока 1,0 мл/мин. Разделение проводили в изократическом режиме. Запись хроматограмм вели по поглощению при 450 нм. Время анализа составляло 35 мин.

Хроматографическая система была откалибрована по индивидуальным веществам: хлорофилл *а*, хлорофилл *б*, α- и β-каротины (Sigma-Aldrich).

Определение антибактериальной активности экстрактов. Антибактериальную активность спиртового экстракта и СК-CO_2-экстракта определяли диско-диффузионным методом [17], основанном на визуальном обнаружении зон угнетения роста микроорганизмов. В качестве тест-культур использовали культуры из коллекции Всероссийской коллекции промышленных организмов (ВКПМ): штаммы грамотрицательных и грамположительных бактерий: *Escherichia coli* ATCC 25922; *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027. Инокулянт-тест микроорганизмов соответствовал по плотности 0,5 по стандарту Мак-Фарланда, которая соответствует концентрации примерно $1{,}5 \cdot 10^8$ КОЕ/мл. Для получения бактериального газона проводили посев 1 мл инокулянта на чашку Петри со средой агар Гивенталя—Ведьминой (АГВ). Сверху стерильными инструментами накладывали бумажный диск диаметром 6,0 мм, на который с помощью автоматической микропипетки равномерно распределяли 25 мкл экстракта. Чашки Петри с исследуемыми образцами инкубировали при 37 °С в течение 24 ч. Степень антибактериальной активности оценивали по диаметру зоны задержки роста тест-культуры: очень высокая чувствительность — 20 мм; умеренная — 15—19 мм, слабая — 9—14, отсутствие чувствительности — менее 8 мм [18]. Аналогично исследовали антибактериальную активность растворителя для исключения его влияния на антибактериальную активность образца.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Поскольку комплекс экстрактивных веществ древесной зелени сосны обыкновенной включает в себя химические соединения с различными свойствами, для изучения влияния растворителя на состав извлекаемых компонентов разных классов применяли как традиционные, так и современные методы с растворителями, отличающимися по параметру полярности.

В случае бинарного растворителя сольватационные свойства исходного соединения изменяются за счет введения в его состав сорастворителя. В качестве чистых полярных растворителей были выбраны вода (гидродистилляция) и этанол (метод настаивания), дипольные моменты которых 1,85 и 1,65 Д, соответственно. Поскольку чистый СК-CO_2 является неполярным растворителем с нулевым дипольным моментом (табл. 1), то для повышения полярности его модифицируют путем введения полярных сорастворителей, таких как этанол [3, 19].

Экстракты, полученные обработкой сырья сжиженным CO_2 или СК-CO_2, обладают олеофильными (гидрофобными) свойствами и помимо эфирного масла содержат в своем составе сопутствующие нелетучие соединения [3]. Так, для

Таблица 1

Характеристика растворителей

Растворитель	Параметр	
	дипольный момент, Д	диэлектрическая проницаемость
СК-CO_2	0	1,6
Этанол	1,69	24,3
Вода	1,85	80,0

Таблица 2

Групповой состав исследуемых экстрактов

Выход экстрактов	Эфирное масло (гидродистилляция)	Экстракт, полученный настаиванием с этанолом	Экстракт, полученный методом СКФЭ CO_2	Экстракт, полученный методом СКФЭ CO_2 + этанол
Выход экстрактивных веществ, % (абс.)	2,4 %	10,3 %	4,3 %	8,5 %
Групповой состав экстрактов	количество компонентов/содержание, % (отн.) от суммы всех компонентов*			
монотерпены	8 / 22,15	2/0,7	3 / 0,85	1/ 0,28
сексвитерпены	9/ 22,11	4/3,8	4/ 4,68	4/ 5,56
дитерпены	1 / 34,69	1/39,9	1 / 61,12	1 / 49,55

бинарного растворителя (СК-CO_2 + этанол) имеет место синергетический эффект, что позволяет расширить спектр извлекаемых соединений и приводит к повышению их выхода в 2 раза (табл. 2).

Метод гидродистилляции позволяет извлекать из древесной зелени летучие с паром соединения, не все из которых относятся к полярным. Это обуславливает более низкий выход компонентов в данном случае (2,4 %) по сравнению с методом настаивания с полярным этанолом (10,3 %) (табл. 2).

На рис. 1 и 2 приведены типичные хроматограммы эфирного масла и СК-экстракта древесной зелени сосны, которые имеют схожий набор характеристических пиков. Результаты анализа представлены в табл. 2 и 3.

Согласно результатам, представленным в табл. 2, качественный и количественный состав полученных экстрактов различен, что можно объяснить отсутствием воздействия высоких температур, кислорода воздуха и горячей воды при проведении СКФЭ.

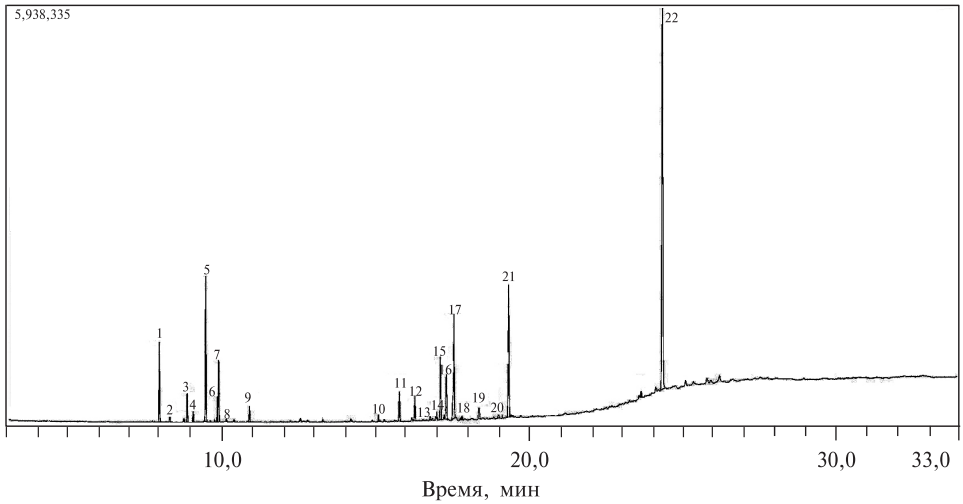


Рис. 1. Хроматограмма эфирного масла древесной зелени сосны обыкновенной:

1 — α-пинен; *2* — камфен; *3* — β-пинен; *4* — β-мирцен; *5* — Δ^3карен; *6* — диметилциклогексадиен; *7* — β-фелландрен; *8* — β-оцимен; *9* — терпинолен; *10* — терпенилацетат; *11* — β-элемен; *12* — кариофиллен; *13* — α-гумулен; *14* — γ-мууролен; *15* — гермакрен Д; *16* — гермакрен В; *17* — Δ-кадинен; *18* — α-мууролен; 19 — гермакрен-4-ол; *20* — α-цедрен; *21* — α-кадинол; *22* — 13(16),14-лабдиен-8-ол

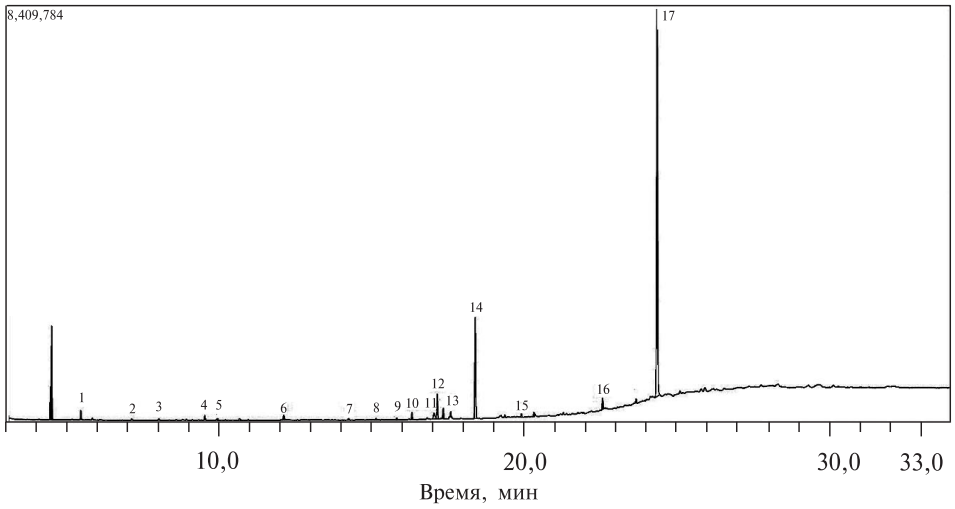


Рис. 2. Хроматограмма СК-экстракта древесной зелени сосны обыкновенной:

1 — бутилацетет; *2* — ксилол; *3* — α-пинен; *4* — Δ^3карен; *5* — β-фелландрен; *6* — бензойная кислота; *7* — фенхил ацетат-эндо; *8* — терпенилацетат; *9* — β-элемен; *10* — кариофиллен; *11* — левоглюкозан; *12* — гермакрен Д; *13* — Δ-кадинен; *14* — гермакрен-4-ол; *15* — пентадеканаль; *16* — пальмитиновая кислота; *17* — 13(16),14-лабдиен-8-ол

Методом ГХ-МС в эфирном масле обнаружено 26 компонентов терпенового ряда (табл. 2, рис. 1), из которых со степенью достоверности выше 80 % идентифицировано 22 соединения. Основную часть компонентов, выделяемых методом перегонки с водяным паром, составляют моно- (22,15 %) и сесквитерпены (22,11 %): 3-карен — 9,27 %, α-пинен — 4,95 %, β-фелландрен — 4,01 %, β-пинен — 1,84 %, кариофиллен — 1,75 %, Δ-кадинен — 8,73 %, гермакрен Д — 4,54 %, β-элемен — 2,04 %, а также кислородсодержащие производные терпенов (18,58 %): α-кадинол — 17,15 %, гермакрен-4-ол — 1,01 % и дитерпены (34,69 %) (табл. 3).

Метод настаивания с этанолом — растворителем высокой полярности позволяет дополнительно извлекать группы соединений, содержащих полярные фрагменты (—OH-, —COOH-группы), таких как карбоновые кислоты (бензойная — 1,43 %, пальмитиновая — 1,47 %) и сахара (левоглюкозан — 14,92 %).

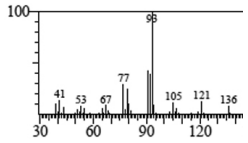
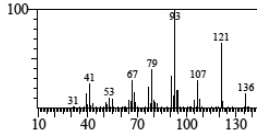
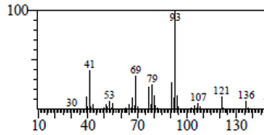
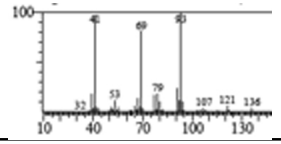
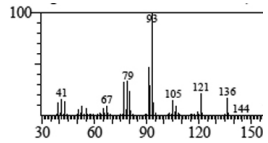
СКФЭ чистым CO_2 позволяет преимущественно извлекать с большей эффективностью и селективностью неполярные дитерпены (13(16),14-лабдиен-8-ол — 61 %) ввиду неполярной природы CO_2 (табл. 2, рис. 2). Также необходимо принимать во внимание, что при проведении сверхкритической экстракции изменение состава сжиженного CO_2 в присутствии остаточной влаги сырья может выступать как фактор, способный влиять на состав экстракта [20].

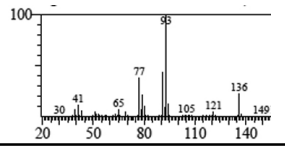
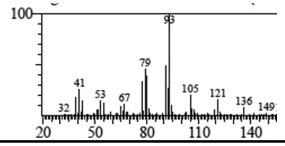
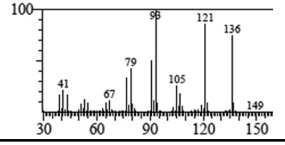
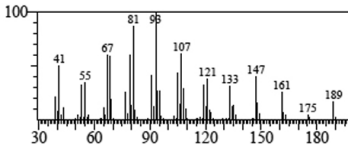
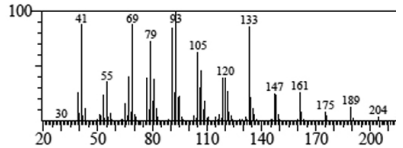
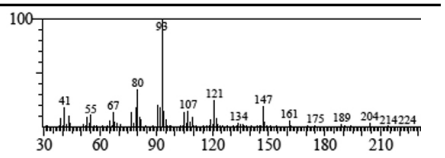
Добавление органического сорастворителя (этилового спирта) повышает полярность бинарного растворителя и приводит к увеличению выхода [3] и расширению спектра извлекаемых веществ за счет дополнительной экстракции соединений, имеющих в своем составе полярные группы.

В составе СК-CO_2- и СК-CO_2+ этанол-экстрактов, по сравнению с экстрактами, полученными традиционными методами, содержание моно- и сесквитерпенов незначительно (табл. 2). Таким образом, полученные СК-CO_2-экстракты могут применяться в качестве лабдиен-содержащих субстанций, используемых для синтеза препаратов-онкопротекторов. Большая эффективность метода СКФЭ для извлечения дитерпенов и кислородсодержащих производных терпенов, а также

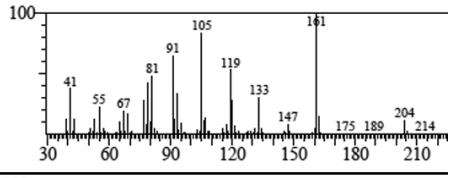
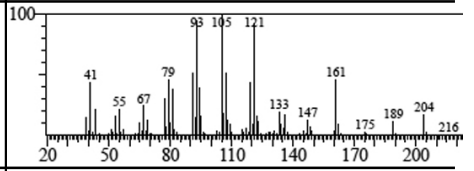
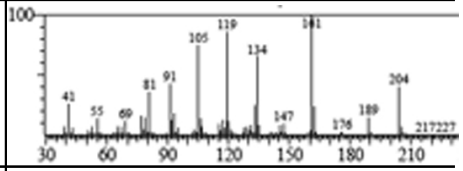
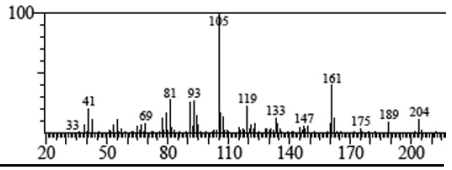
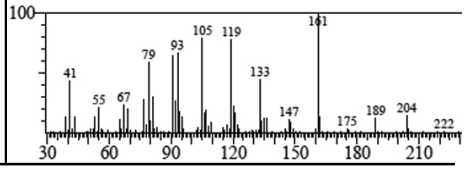
Таблица 3

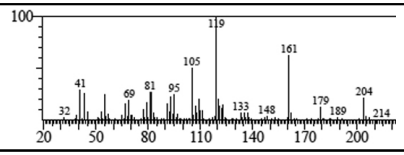
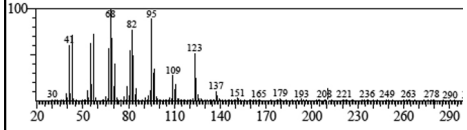
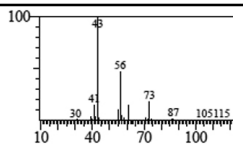
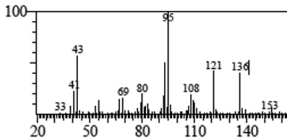
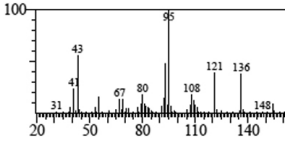
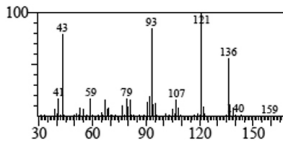
Индивидуальный состав исследуемых экстрактов (относительная доля в экстракте, %)

Индивидуальный состав экстрактов	Эфирное масло (гидродистилляция)	Экстракт, полученный настаиванием с этанолом	Экстракт, полученный методом СКФЭ CO_2	Экстракт, полученный методом СКФЭ CO_2 + этанол	Масс-спектр соединения
			Монотерпены		
α-Пинен	4,95	0,31	0,20	—	
Камфен	0,30	—	—	—	
β-Пинен	1,84	—	—	—	
β-Мирцен	0,62	—	—	—	
Δ^3-Карен	9,27	0,39	0,43	0,28	

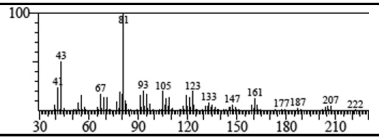
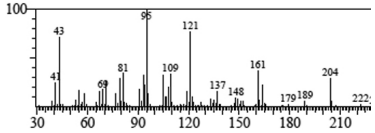
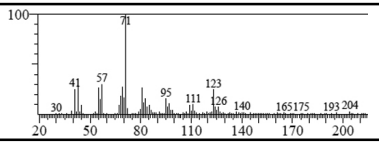
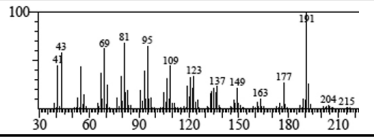
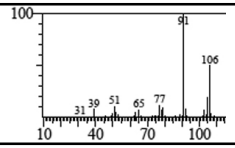
β-Фелландрен	4,01	—	0,22	—	
β-Оцимен	0,18	—	—	—	
Терпинолен	0,98	—	—	—	
Сумма	**22,15**	**0,7**	**0,85**	**0,28**	
			Сесквитерпены		
β-Элемен	2,04	—	0,26	—	
Кариофиллен	1,75	0,39	0,79	0,29	
α-Гумулен	0,25	—	—	—	

Продолжение таблицы 3

Индивидуальный состав экстрактов	Эфирное масло (гидродистилляция)	Экстракт, полученный настаиванием с этанолом	Экстракт, полученный методом СКФЭ CO_2	Экстракт, полученный методом СКФЭ CO_2 +этанол	Масс-спектр соединения
Гермакрен D	4,54	—	3,14	2,32	
Гермакрен B	3,96	—	—	—	
Δ-Кадинен	8,73	1,05	0,49	0,38	
α —Муролен	0,22	—	—	—	
γ —Муролен	0,34	0,30	—	—	

α-Цедрен	0,28	—	—	—	
Неофитодиен	—	2,06	—	2,57	
Сумма	**22,11**	**3,8**	**4,68**	**5,56**	
		Кислородсодержащие производные терпенов			
Бутилацетат	—	—	0,95	0,42	
Фенхилацетат-эндо	—	—	0,16	0,25	
Борнилацетат	-	0,25	—	—	
Терпинил-ацетат	0,42	—	0,20	—	

Продолжение таблицы 3

Индивидуальный состав экстрактов	Эфирное масло (гидродистилляция)	Экстракт, полученный настаиванием с этанолом	Экстракт, полученный методом СКФЭ CO_2	Экстракт, полученный методом СКФЭ CO_2 + этанол	Масс-спектр соединения
Гермакрен-4-ол	1,01	5,54	12,91	7,79	
α-Кадинол	17,15	—	—	—	
Сумма	**18,58**	**5,79**	**14,22**	**8,46**	
Дитерпены					
Фитол	—	0,63/0,68	—	0,54/0,76	
13(16),14-Лаб-диен-8-ол	34,69	39,9	61,12	49,55	
Сумма	**34,69**	**40,51**	**61,12**	**50,04**	
Углеводороды, сахара					
Ксилол	—	—	0,22	—	

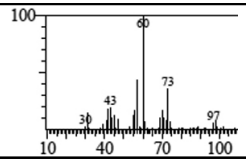
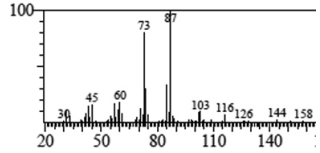
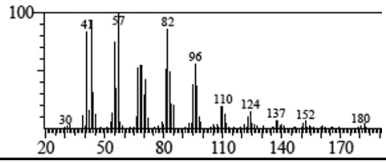
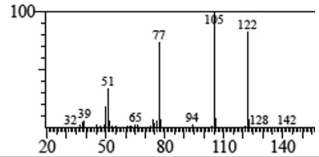
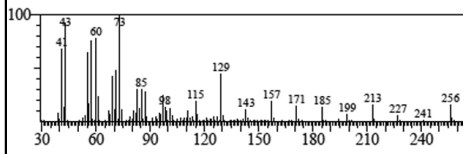
Левоглюкозан	—	14,92	1,43	3,74	
Момеинозитол	—	19,57	—	5,92	
Пентадеканаль	—	—	0,48	0,39	
Сумма	**0**	**34,49**	**2,13**	**10,05**	
			Карбоновые кислоты		
Бензойная кислота	—	1,43	0,86	1,35	
Пальмитиновая кислота	—	1,47	1,35	1,5	
Идентифицировано всего		**97,5**	**88,19**	**84,91**	**77,24**

Таблица 4

Содержание пигментов в полученных экстрактах

Метод выделения	Концентрация пигментов, мкг/г			
	хлорофилл *а*	хлорофилл *б*	α-каротин	β-каротин
Экстракт, полученный методом СКФЭ CO_2	0,63	1,2	7,5	25,0
Экстракт, полученный методом СКФЭ CO_2+этанол	84,0	588,6	7,02	43,0
Экстракт, полученный настаиванием с этанолом	94,0	224,0	5,2	26,0

более высокое содержание монотерпенов в эфирном масле, полученном методом гидродистилляции, сопоставимы с данными, полученными ранее авторами [3].

Помимо терпенов, в качестве компонентов, используемых в композиции фитопрепаратов, могут выступать хлорофиллы и каротиноиды. Каротиноиды выполняют функции антиоксидантов в организме человека. Хлорофилл обладает эффективными антимикробными и сильными антиоксидантными свойствами, ускоряет процессы регенерации тканей, способен нейтрализовать вредное воздействие свободных радикалов вследствие окислительного стресса и помогает защитить организм от развития различных заболеваний, что является особенно актуальным для сохранения здоровья населения в условиях Арктики. Результаты извлечения хлорофиллов и каротиноидов из исследуемого сырья (образцов древесной зелени сосны обыкновенной) представлены в табл. 4.

Как видно из представленных данных, СК-CO_2, являясь неполярным растворителем (табл. 1), не способен извлекать значительное количество полярных веществ — хлорофиллов. Так, добавка этанола в качестве сорастворителя позволяет повысить полярность бинарного растворителя и увеличить выход извлекаемых хлорофиллов *а* и *б* в несколько раз по сравнению с экстракцией чистым СК-CO_2. Применение бинарного растворителя позволяет извлекать в 2 раза больше хлорофилла *б*, чем традиционный метод настаивания, поскольку, с одной стороны, бинарный растворитель имеет высокую проникающую способность в поры растительного сырья за счет СК-CO_2, с другой стороны, растворяющая способность бинарного растворителя выше, чем у чистого этанола за счет синергетического эффекта двух растворителей.

Отмечено, что α-каротин в условиях СКФЭ диоксидом углерода извлекается достаточно полно, и повышение полярности бинарного растворителя за счет введения этанола не требуется, в то время как для лучшего извлечения α-каротина рекомендуется применение бинарного растворителя [21].

Таким образом, в зависимости от дальнейшего назначения экстрактов, варьируя способ экстракции и состав растворителя, можно направленно регулировать селективность извлечения тех или иных компонентов, и получать продукты, в большей степени насыщенные одним из пигментов.

Особенности экстракции и свойства экстрагента приводят к различиям, как составов полученных экстрактов, так и величины их антимикробной активности. Согласно [22], практически все эфирные масла обладают антимикробным действием, что обусловлено составом их терпеновой фракции [23]. Вы-

Таблица 5

Антибактериальная активность спиртового и СК CO_2 экстрактов древесной зелени сосны обыкновенной

Наименование образца	Зона подавления роста, мм				
	Escherichia coli ATCC25922	*Staphylococcus aureus* ATCC6538	*Pseudomonasae ruginosa* ATCC27853	*Bacillus subtilis* ATCC6633	*Proteus mirabilis* ATCC 3177
Экстракт, полученный методом СКФЭ CO_2	++* 16±2	++ 18±1	+ 13±2	+ 12±1	—
Экстракт, полученный настаиванием с этанолом	+ 11±1 21±1—11 (этанол)	+++ 20±3	+ 11±2 17±2—6 (этанол)	+ 11±1	—

* Очень высокая чувствительность — (+++); умеренная — (++); слабая — (+); отсутствие чувствительности — (—).

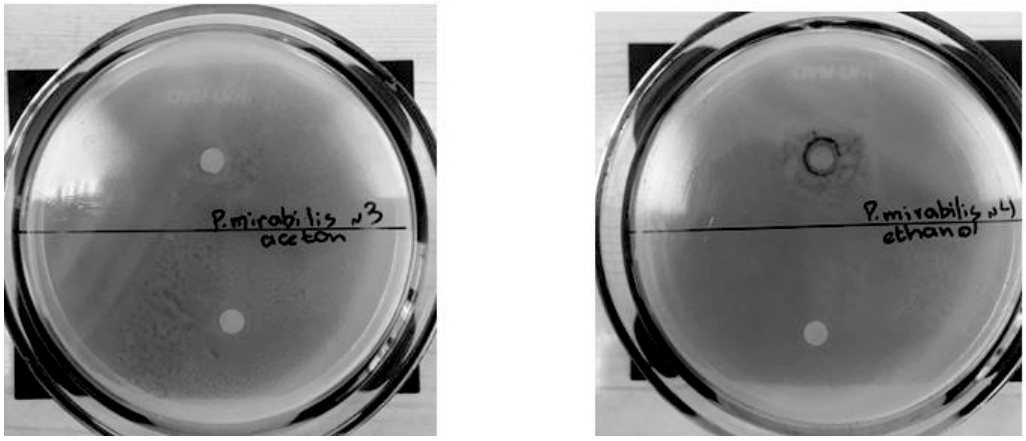
сокая антисептическая активность эфирных масел распространяется практически на все группы микроорганизмов: бактерии, вибрионы, грибы, вирусы, простейшие [24].

Для дополнения существующих данных по антибактериальной активности, помимо эфирных масел были исследованы спиртовой и СК-CO_2-экстракты. Данные, представленные в табл. 5, демонстрируют примерно одинаковую активность обоих экстрактов в отношении пяти тестируемых штаммов.

Результаты эксперимента показывают, что при использовании дисков наибольшая чувствительность к полученным экстрактам выявляется, в основном, в отношении грамположительных бактерий *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (рис. 3).

а *б*

Рис. 3. Зоны ингибирования бактериального роста бактерий *Staphylococcus aureus* вокруг бумажных дисков, пропитанных экстрактами:
а — сверхкритическим (внизу — контроль: отсутствие зоны ингибирования), *б* — спиртовым (внизу — контроль: отсутствие зоны ингибирования)



а *б*

Рис. 4. Зоны ингибирования бактериального роста бактерий *Proteus mirabilis* вокруг бумажных дисков, пропитанных экстрактами:
а — сверхкритическим (внизу — контроль), *б* — спиртовым (внизу — контроль)

Известно, что грам-положительные бактерии более чувствительны к эфирным маслам, чем грам-отрицательные [25, 26]. Наименьший ингибирующий эффект наблюдался для бактерий *Bacillus subtilis* (зона отсутствия роста тест-культур находится в диапазоне 11—13 мм). На штамм *Proteus mirabilis* АТСС 3177 образцы не оказали антибактериального действия (зона подавления роста отсутствует) (рис. 4). Установлена более высокая активность СК-экстракта на подавление штаммов *Escherichia coli* и *Pseudomonas aeruginosa* по сравнению со спиртовым экстрактом.

Изучение компонентов экстрактов показывает, что их антимикробное действие обусловлено терпенами [27]. Согласно [28], антиокислительная активность терпенов обусловлена содержанием как минимум двух активных групп, выступающих в качестве ингибиторов свободных радикалов. Механизм антимикробного действия терпенов до настоящего времени до конца не изучен, но предполагается [29], что липофильная природа терпеноидов приводит к разрушению цитоплазматической мембраны микроорганизмов.

Показана не только антибактериальная активность полученных экстрактов в качестве натуральных противомикробных добавок, но и использование экстрактов в качестве антиоксидантов, позволяющих стабилизировать окислительные процессы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, сравнительный анализ составов эфирного масла и сверхкритических экстрактов показал эффективность применения метода СКФЭ с точки зрения увеличения выхода и повышения селективности выделения фракции дитерпенов из древесной зелени, а также сокращения времени обработки сырья. Повышение эффективности метода СКФЭ достигается путем применения бинарного растворителя, что способствует получению экстрактов с высоким содержанием хлорофилла *б* и β-каротина. Исследование антимикробной активности

спиртового и СК-CO_2-экстрактов древесной зелени сосны обыкновенной продемонстрировало более высокую активность СК-CO_2-экстракта на подавление штаммов *Escherichia coli* и *Pseudomonas aeruginosa* по сравнению со спиртовым экстрактом.

Исследования проведены в рамках государственного задания ФГБУН ФИЦКИА УрО РАН ФНИ 2018-2020 г. (тема № АААА-А18-118012390231-9) с использованием оборудования ЦКП НО «Арктика» (САФУ) и ЦКП НО КТ РФ-Арктика (ФГБУН ФИЦКИА УрО РАН).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Лунин В.В., Карманов А.П., Косяков Д.С., Горбова Н.С., Скребец Т.Э., Попова Н.Р., Шкаев А.Н., Иванченко Н.Л., Пряхин А.Н., Малков А.В., Боголицын К.Г.* Физическая химия лигнина. М.: Академкнига, 2010. 492 с.
2. *Урьяш В.Ф., Груздева А.Е., Кокурина Н.Ю., Гришатова Н.В., Урьяш А.В., Карпова И.Г.* // Сверхкритические Флюиды: Теория и Практика. 2008. Т. 3. № 4. С. 35.
3. *Orav A., Kallas T., Koel M.* // J. of essential oil research. 1998. Vol. 10. No 4. P. 387.
4. *Валь Е.В.* // Ремедиум. 2001. № 1—2. С. 38.
5. *Багирова В.А., Баландина И.А., Сокольская Т.А., Воробьева О.Н., Алехина Л.Г.* // Новая аптека. 2004. № 2. С. 57.
6. *Божок А.А., Семиглазов В.Ф., Клецель А.Е., Мельникова А.С., Палтуев Р.М., Иванова О.А., Семиглазов В.В.* // Вопросы онкологии. 2006. Т. 52. № 1. С. 7.
7. *Bonneterre J., Spielman M., Guastalla J.P. et al.* // Europ. J. Cancer. 1999. Vol. 35. No 10. P. 1431.
8. *Holmes F.A., Walterrs R.S., Theriault R.L. et al.* // J. Natl. Cancer Inst. 1991. Vol. 83. P. 1797.
9. *Nabholtiz J.M., Senn H.J., Bezwoda W.R. et al* // J. Clin. Oncol. 1999. Vol. 17. P. 1413.
10. *Sendman A.D., Reicman B.S., Crown J.P. et al.* // J. Clin. Oncol. 1995. Vol. 13. P. 1152.
11. Патент РФ. № 2196581. 2000.
12. *Zabot G.L., MoraesM.N., Meireles M.A.A.* // Recent Patents on Engineering. 2012. Vol. 6. No 3. P. 182.
13. *Pereira C.G., Meireles M.A.A.* // Food and Bioprocess Technology. 2010. Vol. 3. No 3. P. 340.
14. *Aliev A.M., Radjabov G.K., Musaev A.M.* // J. of supercritical fluids. 2015. Vol. 102. P. 66.
15. ГОСТ 21769-84. Зелень древесная.
16. *Кутакова Н.А., Селянина Л.И., Селянина С.Б.* Анализ БАВ и древесной зелени. Архангельск: Изд-воАГТУ, 2003. 31с.
17. МУК 12.1890-04. М.: Фед. центр госсанэпиднадзора Минздрава России. 2004. 74 с.
18. *Zeraib A., Ramdani M., Boudjedjou L., Chalard P., FiguredoG.* // J. BioSciBiotech. 2014. Vol. 3. No 2. P. 147.
19. *Зилфикаров И.Н., Челомбитько В.А., Алиев А.М.* Обработка лекарственного растительного сырья сжиженными газами и сверхкритическими флюидами. Пятигорск: Пятигорская государственная фармацевтическая академия. 2007. 244 с.
20. *Marcus Y.* // J. of Physical Organic Chemistry. 2005. Vol. 18. P. 373.
21. *Попова А.С., Ивахнов А.Д., Скребец Т.Э., Боголицын К.Г.* // Химия растительного сырья. 2018. № 1. С. 61.
22. *Коростелева Н.С., Ефремов А.А.* // Вестник КрасГАУ. 2013. № 12. С. 258.
23. *Мишарина Т.А., Теренина М.Б., Крикунова Н.И.* // Прикладная биохимия и микробиология. 2009. № 6. С. 710.
24. *Сульдина А.Ф., Ефремов А.А., Рябков И.А., Некрасова В.Д.* Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья. Материалы II Всероссийской конференции. Барнаул: Изд-во АГУ. 2005. Кн. 2. С. 482.
25. *Farag R.S., Daw Z.Y., Hewedi F.M., El-Baroty G.S.A.* // J. of Food Protection. 1989. Vol. 52. P. 665.
26. *Smith-Palmer A., Stewart J., Fyfe L.* // Letters in Applied Microbiology. 1998. Vol. 26. P. 118.
27. *Никонович С.Н., Тимофеенко Т.И., Котельников Д.А., Лобода А.В.* // Пищевая технология. 2006. № 6. С. 27.

28. *Ефимов А.Д.* // Масла и жиры. 2005. № 1. С. 8.
29. *Марьин А.А., Коломиец Н.Э.* // Фундаментальная и клиническая медицина. 2017. Т. 2. № 4. С. 45.

COMPOSITION AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF ESSENTIAL OIL AND SUPERCRITICAL EXTRACTS OF *PINUS SYLVESTRIS* WOOD GREENERY

[1] N.V. Selivanova, [1]A.A. Krasikova, [1,2]K.G. Bogolitsyn, [1]M.A. Gusakova, [1,2]A.D. Ivakhnov

[1] *FCIARctic, Arkhangelsk, Russia*

[2] *Northern (Arctic) Federal University named after Lomonosov, Arkhangelsk, Russia*

The paper presents a comparative analysis of influence of extraction methods that meet the principles of «green chemistry» on the extraction degree of components from the wood greenery of *Pinus sylvestris.* Analysis of the obtained alcohol extract, essential oil and supercritical extracts by GC-MS method showed that differences are observed in both the quantitative and qualitative composition of the studied objects. The highest selectivity of the diterpene fraction extraction and the expansion of the spectrum of individual components extracted from wood greenery by supercritical fluid extraction with carbon dioxide compared to traditional extraction methods while maintaining a high antimicrobial activity of the resulting extract to suppress *Escherichia coli* strains is shown.

K e y w o r d s: Scots pine, supercritical fluid extraction, essential oil, terpenes, antibacterial activity.