

© Коллектив авторов, 2014

Н. А. Поляков¹, В. А. Дубинская¹, А. А. Ефремов², Е. А. Ефремов²

ВЛИЯНИЕ ЭФИРНОГО МАСЛА ПИХТЫ СИБИРСКОЙ (*ABIES SIBIRICA*) И ЕГО ОТДЕЛЬНЫХ КОМПОНЕНТОВ НА АКТИВНОСТЬ НЕКОТОРЫХ ФЕРМЕНТОВ *IN VITRO*

¹ ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений, 123056, Россия, Москва, ул. Красина, д. 2;

² ФГАОУ ВПО "Сибирский федеральный университет" Россия, 660041, г. Красноярск, пр. Свободный, 79.

Определен состав эфирного масла, выделенного из древесной зелени пихты сибирской (*Abies Sibirica*). Кроме того, исследован состав различных фракций, получаемых в процессе отгонки эфирного масла пихты сибирской. Из 31 компонента, обнаруженного в эфирном масле, наибольшее количество приходится на борнилацетат — 34, 21 %, камфен — 17,47 %, α -терпинен — 6,72 %. В процессе получения эфирного масла содержание компонентов в различных фракциях меняется в зависимости от времени отгонки. Проведено тестирование различных фракций эфирного масла на биологическую активность, которую оценивали с помощью тест-систем *in vitro*. Установлено, что биологическая активность эфирного масла пихты сибирской в значительной степени зависит от содержания в нем основных компонентов, таких как борнилацетат и камфен.

Ключевые слова: пихта сибирская (*Abies Sibirica*); эфирное масло; ферментные тест-системы *in vitro*; биологическая активность.

Пихта сибирская является одним из самых распространенных эфирносонов в России, при переработки хвои которой можно получать высококачественное эфирное масло. Наиболее значительные ареалы произрастания пихты относятся к низкогорьям и среднегорьям Красноярского края (7 млн. га), Иркутской области (1,6 млн га), Кемеровской области (2,2 млн га), Алтайского края (660 тыс. га), Екатеринбургской области (180 тыс. га) [1].

Эфирное масло пихты сибирской состоит из компонентов, регулирующих увеличение концентрации легких отрицательных ионов, благоприятно действующих на человека и выполняющих функцию по "обеспечению" атмосферного воздуха биологически активным кислородом и оказывающих благоприятное действие на эмоциональное состояние человека [2 – 4].

Выявление биологической активности эфирных масел должно сопровождаться детальным исследованием их состава, выделением и изучением свойств отдельных компонентов, которые обуславливают полезные свойства растений [5].

Использование высокочувствительных ферментных тест-систем *in vitro* позволяет контролировать наличие биологической активности в многокомпонентных эфирных маслах, что является важным, т. к. не всегда известно совместное действие компонентов и направленность их биологического действия [6, 7]. Учитывая огромную роль в метаболизме различных растений свободнорадикального окисления и возможности наличия антиоксидантных свойств в эфирном масле, вы-

деленном из древесной зелени пихты сибирской, в работе применяли ферменты системы антиоксидантной защиты: каталазу и глутатионредуктазу, а также тест-систему на основе фермента ацетилхолинэстеразы, позволяющей *in vitro* выявлять соединения холинергического действия.

Целью данной работы являлось изучение компонентного состава и биологической активности эфирного масла и отдельных его фракций, полученных из древесной зелени пихты сибирской.

Экспериментальная часть

Эфирное масло получали из древесной зелени пихты сибирской методом исчерпывающей гидропародистилляции в течение 20 ч с использованием цельнометаллической установки с насадкой Клевенджера [8]. Разовая загрузка воздушно сухого исходного сырья составляла не менее 1,00 кг. Фракции эфирного масла отбирали в процессе получения эфирного масла следующим образом: первую фракцию получали в течение 30 мин от начала выделения масла; вторую — после 2 ч; третью — через 4 ч; четвертую — после 5 ч; пятую — через 8 ч.

Состав эфирного масла и его отдельных фракций определяли методом хроматомасс-спектрометрии на приборе Agilent Technologies 6890 с квадрупольным масс-спектрометром 5975 С в качестве детектора с использованием капиллярной колонки длиной 30 м с фазой 5 % дифенил — 95 % диметилсилоксан с внутренним диаметром 0,25 мм. Условия хроматографирова-

ния: изотермический режим при 50 °С в течение 3 мин, затем программированный подъем температуры со скоростью 4 °С/мин до 270 °С с выдержкой при конечной температуре 30 мин. Температура испарителя — 280 °С, температура ионизационной камеры — 170 °С, энергия ионизации — 70 эВ. Содержание компонентов вычисляли по площадям пиков, идентификацию отдельных компонентов проводили сравнением времен удерживания и полных масс-спектров с соответствующими данными компонентов эталонных масел и чистых соединений, а также с использованием линейных индексов удерживания [9].

Биологическую активность исследуемого эфирного масла определяли с помощью молекулярных тест-систем *in vitro*, в которых в качестве тест-объектов использовали ферменты системы антиоксидантной защиты: глутатионредуктазу [ГР] и каталазу [КАТ], а также фермент ацетилхолинэстеразу [АХЭ] [10].

В работе были использованы лиофилизированные коммерческие препараты ферментов — КАТ, ГР, АХЭ фирмы “Sigma”; субстраты — глутатион окисленный (G-SS-G) “Sigma”, ацетилтиохолина иодид фирмы “Merck”, а также реактив Элмана — 5,5'-дитиобис-(2-нитробензойная кислота) (DTNB) фирмы “Sigma”; кофермент — β-НАДФН фирмы “Sigma”. Кроме того, в работе использовали: *трис*(гидроксиметил)аминометан, аммоний молибденовокислый — (NH₄)₆Mo₇O₂₄ · 4H₂O, гидроксид натрия — NaOH, двухзамещенный фосфат калия — KН₂PO₄, перекись водорода — H₂O₂ российского производства.

Каталитическую активность каталазы определяли по скорости разложения субстрата — перекиси водорода (H₂O₂). В состав реакционной смеси входил фосфатный буфер (рН 7,8), H₂O₂ в концентрации — 0,03 %, концентрация фермента составляла 0,2 мг/мл. Продолжительность реакции разложения субстрата (H₂O₂) ферментом составляла 5 – 10 мин. Реакцию останавливали добавлением в реакционную смесь аммония молибденовокислого ((NH₄)₆Mo₇O₂₄ · 4H₂O). Оставшуюся перекись водорода измеряли в виде комплекса с (NH₄)₆Mo₇O₂₄ · 4H₂O на спектрофотометре Shimadzu MPS-2000 при λ = 410 нм.

Скорость глутатионредуктазной реакции (ГР) определяли по методу [11] в кварцевых кюветах при спектрофотометрической регистрации убыли НАДФН при λ = 340 нм. Инкубационная среда состояла из буфера 0,05 М *трис*(оксиметил)аминометан — HCl, содержа-

Таблица 1
Компонентный состав эфирного масла пихты сибирской

Компонент	Концентрация, %
Борнилацетат	34,2 ± 1,1
Камфен	17,5 ± 0,5
α-Терпинен	6,7 ± 0,2
α-Пинен	5,9 ± 0,2
Лимонен	5,5 ± 0,9
Борнеол	2,9 ± 0,1
α-Кариофиллен	1,2 ± 0,0
Трициклен	1,3 ± 0,0
Сантен	1,3 ± 0,0
β-Пинен	1,0 ± 0,0
α-Терпинолен	0,9 ± 0,0
4-Терпинеол	0,1 ± 0,0
α-Терпинеол	0,1 ± 0,0
α-Бизаболен	2,3 ± 0,1
<i>транс</i> -Кариофиллен	1,9 ± 0,1
β-Бизаболен	0,5 ± 0,0
Лонгифолен	0,3 ± 0,0

щего 0,25 мМ ЭДТА-Na (рН = 7,4) и 0,033 М глутатиона окисленного (G-SS-G). Реакцию запускали добавлением 2 мМ НАДФН. Продолжительность записи реакции — 1 – 1,5 мин.

Скорость ацетилхолинэстеразной реакции определяли по модифицированному методу с использованием реактива Элмана [11] с автоматической регистрацией образующегося в результате реакции соединения 5-тио-2-нитробензойной кислоты при λ = 412 нм.

Эфирное масло, борнилацетат и камфен растворяли в ДМСО в соотношении 1:1 и добавляли в пробу в количестве 10 мкл/мл.

Результаты определений скорости ферментативных реакций в таблицах представлены в процентах от контроля.

В таблицах приводятся средние арифметические значения 2 – 3 параллельных определений и стандартные отклонения среднего результата ($M \pm m$).

Результаты и их обсуждение

При определении компонентного состава эфирного масла пихты методом хроматомасс-спектрометрии идентифицирован 31 компонент, при этом доминирующими компонентами являются борнилацетат

Таблица 2
Влияние эфирного масла пихты сибирской на скорость ферментативных реакций

Эфирное масло		Скорость ферментативной реакции, %		
		ГР	КАТ	АХЭ
Контроль (без добавления эфирного масла),	%	100,0	100,0	100,0
	мкмоль/мин · мг	7,3 ± 0,2*	3,6 ± 0,2*	513,7 ± 16,7*
Цельное эфирное масло пихты сибирской,	%	873,9	231,6	26,9
	мкмоль/мин · мг	63,8 ± 1,6*	8,3 ± 0,5*	138,2 ± 5,7*

* — Достоверность отличий от контроля при $p < 0,05$.

Состав отдельных фракций эфирного масла пихты сибирской

Компонент	Компонентный состав, %				
	Фракция 1	Фракция 2	Фракция 3	Фракция 4	Фракция 5
Борнилацетат	50,1 ± 1,5	55,0 ± 2,0	53,9 ± 1,7	44,2 ± 1,1	25,6 ± 0,8
Камфен	18,3 ± 0,6	18,2 ± 0,8	17,2 ± 0,3	13,1 ± 0,1	5,4 ± 0,2
α-Терпинен	6,6 ± 0,2	6,5 ± 0,3	7,2 ± 0,2	7,8 ± 0,1	6,3 ± 0,1
Лимонен	7,1 ± 0,2	5,7 ± 0,4	5,9 ± 0,3	7,5 ± 0,2	0,3 ± 0,0
α-Пинен	5,3 ± 0,2	5,7 ± 0,3	6,6 ± 0,5	6,5 ± 0,5	2,5 ± 0,1
Борнеол	5,9 ± 0,3	2,9 ± 0,2	1,4 ± 0,1	1,4 ± 0,1	–
α-Кариофиллен	–	–	0,3 ± 0,0	1,3 ± 0,1	4,1 ± 0,2
Трициклен	1,2 ± 0,0	1,3 ± 0,0	1,5 ± 0,1	1,4 ± 0,1	0,5 ± 0,0
Сантен	1,2 ± 0,0	1,0 ± 0,0	1,1 ± 0,0	1,7 ± 0,1	1,0 ± 0,0
β-Пинен	0,7 ± 0,0	0,5 ± 0,0	0,6 ± 0,0	1,0 ± 0,0	1,1 ± 0,0
α-Терпинолен	0,9 ± 0,0	1,0 ± 0,0	0,9 ± 0,0	0,9 ± 0,0	0,9 ± 0,0
4-Терпинеол	0,2 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	–	–
α-Терпинеол	–	–	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,7 ± 0,0
α-Бизаболен	–	0,2 ± 0,0	0,8 ± 0,0	5,3 ± 0,2	17,9 ± 0,4
транс-Кариофиллен	0,3 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,4 ± 0,0	2,1 ± 0,1	6,7 ± 0,2
β-Бизаболен	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,5 ± 0,0	2,3 ± 0,1
Лонгифолен	0,2 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,9 ± 0,0	0,1 ± 0,0

(34,21 %), камфен (17,47 %), α-терпинен (6,72 %) (табл. 1).

Результаты определения биологической активности эфирного масла пихты сибирской с использованием биотест-систем *in vitro* приведены в табл. 2.

Как следует из полученных данных, эфирное масло пихты сибирской обладает высокой биологической активностью. При добавлении в инкубационную пробу эфирного масла скорость реакции ферментов системы антиоксидантной защиты КАТ и ГР, играющих ключевую роль в обеспечении регуляции свободного радикального окисления клетки, увеличивается в 2,5 и в 8 раз соответственно.

Поскольку активация ферментов КАТ и ГР при действии БАВ коррелирует с наличием антиоксидантных

свойств [6], следовательно, эфирное масло пихты сибирской обладает ярко выраженными антиоксидантными свойствами и может способствовать как обезвреживанию свободных радикалов еще до развития эффекта повреждения, так и репарации биомолекул в организме.

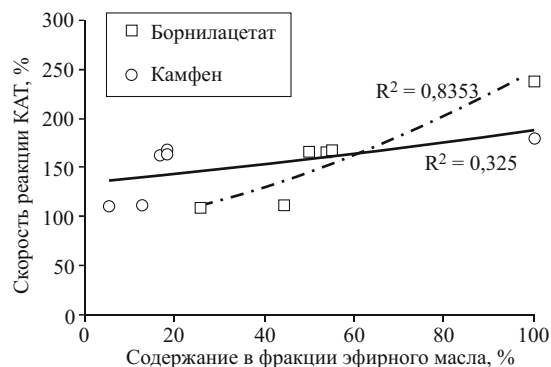
АХЭ — фермент, катализирующий реакцию гидролиза природного нейромедиатора ацетилхолина. Блокирование или ингибирование АХЭ в организме человека препятствует гидролизу ацетилхолина, что проявляется в более выраженном и продолжительном его действии на холинорецепторы глаз, желудочно-кишечного тракта, мочевого пузыря, нервно-мышечных контактов и ЦНС. Ингибиторы АХЭ широко используют при лечении мышечных дистрофий [12].

Таблица 4

Основные компоненты отдельных фракций эфирного масла пихты сибирской и их влияние на скорость ферментативных реакций

Компонент		Компонентный состав, %					Цельное масло
		Фракция 1	Фракция 2	Фракция 3	Фракция 4	Фракция 5	
Борнилацетат		50,1 ± 1,5	55,0 ± 2,0	53,9 ± 1,7	44,2 ± 1,1	25,6 ± 0,8	34,2 ± 1,1
Камфен		18,3 ± 0,6	18,2 ± 0,8	17,2 ± 0,3	13,1 ± 0,1	5,4 ± 0,2	17,5 ± 0,5
α-Терпинен		6,6 ± 0,2	6,5 ± 0,3	7,2 ± 0,2	7,8 ± 0,1	6,3 ± 0,1	6,7 ± 0,2
Лимонен		7,1 ± 0,2	5,7 ± 0,4	5,9 ± 0,3	7,5 ± 0,2	0,3 ± 0,0	5,5 ± 0,9
α-Пинен		5,3 ± 0,2	5,7 ± 0,3	6,6 ± 0,5	6,5 ± 0,5	2,5 ± 0,1	5,9 ± 0,2
Скорость ферментативных реакций, %							
Скорость реакции КАТ	мкмоль/мин · мг	5,9 ± 0,2*	5,7 ± 0,2*	5,9 ± 0,2*	4,1 ± 0,1*	3,9 ± 0,1*	8,3 ± 0,5*
	%	165,7	167,8	164,8	113,5	111,4	231,6
Скорость реакции ГР	мкмоль/мин · мг	66,3 ± 1,7*	63,1 ± 1,7*	22,7 ± 0,7*	22,4 ± 0,6*	14,0 ± 0,4*	63,8 ± 1,6*
	%	908,0	864,4	310,2	306,1	191,4	873,9
Скорость реакции АХЭ	мкмоль/мин · мг	–	71,4 ± 2,1*	66,0 ± 2,5*	353,4 ± 11,3*	275 ± 11,3*	138,2 ± 5,7*
	%	–	13,9	12,9	68,8	53,7	26,9

* — Достоверность отличий от контроля при $p < 0,05$.



Исследование влияния полученных фракций эфирного масла на активность фермента КАТ в зависимости от содержания борнилацетата и камфена.

Пихтовое эфирное масло замедляет скорость реакции АХЭ и ингибирует этот фермент практически на 73 % (табл. 2). За счет низкой молекулярной массы жирорастворимые молекулы эфирных масел могут проникать через гематоэнцефалический барьер [13]. Таким образом, эфирное масло может стимулировать деятельность нервной системы человека, в частности, улучшать концентрацию внимания, ускорять восстановление после стресса, заболеваний, снимать напряжение.

Концентрация различных соединений в процессе отгонки эфирного масла может меняться [14]. Поэтому проводили анализ компонентного состава фракций эфирного масла, отобранных в процессе получения из древесного растительного сырья пихты сибирской (табл. 3).

Результаты определения компонентного состава показывают, что в основное время получения эфирного масла концентрация химических соединений практически не меняется и уменьшается только в последних фракциях. Например, содержание борнилацетата и камфена в начале получения эфирного масла составляло соответственно, 50,0 и 18,3 %, а к концу времени отгонки снизилось до 25,6 и 5,4 %. В то же время содержание таких компонентов, как α -кариофиллен, α -бизаболен, в последующих фракциях значительно возрастает.

Сопоставляя полученные данные химического состава фракций эфирного масла и их биологической активности, можно определить основные соединения,

влияющие на фармакологическое действие эфирного масла пихты сибирской. В табл. 4 приведены результаты определения биологической активности фракций исследуемого эфирного масла с использованием биотест-систем *in vitro*. Абсолютные значения скорости ферментативных реакций для контроля являются следующими: для КАТ — 3,6 мкмоль/мин · мг, для ГР — 7,3 мкмоль/мин · мг, для АХЭ — 513,3 мкмоль/мин · мг (табл. 2).

При добавлении в инкубационную среду первых 3 фракций эфирного масла активность ферментов является наивысшей, постепенно снижаясь в 4-й и 5-й фракциях. Максимально высокая скорость ферментативных реакций КАТ и ГР составляет соответственно 165,7 и 908,0 % и по мере процесса отгонки эфирного масла снижается незначительно, в то время как последние отобранные фракции резко снижают активацию ферментов до 111,4 % (КАТ) и 191,4 % (ГР). Скорость реакции АХЭ также указывает на снижение биологического действия пихтового эфирного масла в процессе отгонки, что выражается в снижении способности ингибировать фермент при добавлении каждой последующей фракции эфирного масла. Если сопоставить эти данные с составом фракций эфирного масла, то, вероятно, снижение биологической активности связано с уменьшением содержания основных компонентов борнилацетата и камфена (табл. 4).

С целью подтверждения полученных данных о биологической активности борнилацетата и камфена в инкубационной среде ферментной реакции КАТ использовали отдельно каждое из этих веществ в тех же концентрациях, что и эфирные масла (табл. 5). Абсолютные значения скорости ферментативной реакции КАТ для контроля — 3,6 мкмоль/мин · мг.

Как показано в табл. 5, такие компоненты эфирного масла пихты сибирской, как борнилацетат и камфен, увеличивают активность фермента. Содержание борнилацетата влияет на биологическую активность фракций. Борнилацетат является компонентом, который в наибольшей степени определяет активность фракций эфирного масла. На рисунке построен график зависимости между содержанием борнилацетата и биологической активностью фракций, который является экспоненциальным со степенью достоверности 0,84, в то время как для камфена такая зависимость недостоверна.

Таблица 5

Сравнение влияния чистых веществ борнилацетата и камфена, а также фракций эфирного масла пихты сибирской на скорость ферментативной реакции КАТ

Показатель	Борнилацетат	Камфен	Фракция 1	Фракция 2	Фракция 3	Фракция 4	Фракция 5
Скорость реакции КАТ мкмоль/мин · мг	8,6 ± 0,6*	6,6 ± 0,3*	5,9 ± 0,2*	5,7 ± 0,2*	5,9 ± 0,2*	4,1 ± 0,1*	3,9 ± 0,1*
Скорость реакции КАТ %	239,2	182,3	165,7	167,8	164,8	113,5	111,4
Содержание, %	100	-	50,1 ± 1,5	55,0 ± 2,0	53,9 ± 1,7	44,2 ± 1,1	25,6 ± 0,8
Борнилацетат							
Камфен	-	100	18,3 ± 0,6	18,2 ± 0,8	17,2 ± 0,3	13,1 ± 0,1	5,4 ± 0,2

* — Достоверность отличий от контроля при $p < 0,05$.

Полученные результаты указывают на способность камфена и борнилацетата влиять на активность изученных ферментов *in vitro* и дают возможность предположения о существенной роли борнилацетата в биологическом действии эфирного масла пихты сибирской.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Лесная энциклопедия*, Москва (1986), т. 2, с. 216.
2. С. А. Вичканова, *Состояние и перспективы исследований биологически активных веществ из растений и создание на их основе новых лекарственных препаратов*, Москва (1983), сс. 107 – 118.
3. В. П. Георгиевский, Н. Ф. Комисаренко, С. Е. Дмитрук, *Биологические активные вещества лекарственных растений*, Новосибирск (1990).
4. В. В. Николаевский, А. Е. Еременко, И. К. Иванов, *Биологическая активность эфирных масел*, Москва (1987).
5. Н. И. Белоусова, В. А. Хан, А. В. Ткачев, *Химия растительного сырья*, **3**, 5 – 38 (1999).
6. В. А. Дубинская, В. А. Быков, М. Ф. Минеева и др., *Способ выявления веществ, обладающих антиоксидантными свойствами, in vitro*, Патент РФ № 2181892 (2001); *Chem. Abstr.*, **137**, 379959(2003).
7. В. А. Дубинская, М. Ф. Минеева, Е. В. Вахнина и др., *Вопр. биол., мед. и фарм. химии*, **2**, 32 – 37 (2007).
8. O. S. Shchipitsyna, A. A. Efremov, *Rus. J. Bioorgan. Chem.*, **37**(7), 888 – 889 (2011).
9. А. В. Ткачев, *Исследование летучих веществ растений*, Новосибирск (2008).
10. В. А. Быков, В. А. Дубинская, Л. Б. Ребров и др., *Хим.-фарм. журн.*, **42**(3), 3 – 8 (2008); *Pharm. Chem. J.*, **42**(3), 105 – 110 (2008).
11. E. Beutler, *Red cell metabolism*, Churchill. Livingston, New York (1986), сс. 60 – 69.
12. В. Г. Граник, *Основы медицинской химии*, Вузовская книга, Москва (2006).
13. T. Betts, *Br. Med. J.*, **15**(8), 27 – 30 (1992).
14. Е. А. Ефремов, А. А. Ефремов, *Химия растит. сырья*, № 3, 121 – 124 (2010).

Поступила 03.07.13

BIOLOGICAL ACTIVITY OF ESSENTIAL OIL OF *ABIES SIBIRICA* AND ITS MAJOR COMPONENTS

N. A. Polyakov¹, V. A. Dubinskaya¹, A. A. Efremov², and E. A. Efremov²

¹ Scientific Center for Biomedical Technologies, State Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants (VILAR), Moscow, 123056 Russia;

² Siberian Federal University, Krasnoyarsk, 660041 Russia

Components of the essential oil isolated from needles of *Abies sibirica* were determined. The composition of fractions obtained during fractional distillation of the essential oil was studied. Among 31 compounds determined in the essential oil, the main are bornyl acetate (34.21%), camphene (17.47%), and terpinene (6.72%). In the process of essential oil isolation, the content of components in different fractions varies depending on the time of distillation. Various fractions of the essential oil were tested for their biological activity by enzymatic test systems *in vitro*. It was found that biological activity of the essential oil of *Abies sibirica* depends on the content of main components, in particular, bornyl acetate and camphene.

Keywords: Siberian fir *Abies sibirica*, essential oil; enzymatic *in vitro* test systems; biological activity