

На правах рукописи



СТРУКОВА ЕЛЕНА ГЕННАДЬЕВНА

**КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ
ПОЛОСТИ РТА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ХРОМАТО-МАСС-
СПЕКТРОМЕТРИИ МИКРОБНЫХ МАРКЕРОВ**

02.00.02 - аналитическая химия

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Томск 2011

Работа выполнена на кафедре аналитической и органической химии Института цветных металлов и материаловедения Сибирского федерального университета и в лаборатории хроматографических методов анализа Центра коллективного пользования

Научный руководитель: доктор химических наук, профессор
Ефремов Александр Алексеевич

Официальные оппоненты: доктор химических наук, доцент
Короткова Елена Ивановна

доктор химических наук, профессор
Сидельников Владимир Николаевич

Ведущая организация: Химический факультет Московского
Государственного Университета им. М. В. Ломоносова

Защита состоится 9 февраля 2011 г. в 14.30 на заседании совета по защите докторских и кандидатских диссертаций Д 212.269.04 при Национальном исследовательском Томском политехническом университете по адресу: 634050 г. Томск, пр. Ленина, 30, ТПУ, 2 корпус, химико-технологический факультет.

С диссертацией можно ознакомиться в Научно-технической библиотеке Национального Исследовательского Томского политехнического университета по адресу:

Томск, ул. Белинского, 53.

Автореферат разослан 15 декабря 2010 г.

Ученый секретарь совета,
канд. хим. наук



Гиндуллина Т.М.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность. Применение газовой хроматографии в биохимических целях сравнительно долго не получало должной оценки. Считалось, что биологические объекты недостаточно летучи и малоустойчивы к различным физико–химическим воздействиям, применяемым в газохроматографическом анализе. Успехи в разработке методов расщепления липидов, углеводов и белков до более простых компонентов и превращение их в летучие соединения открыли широкую область применения метода в биохимическом анализе.

Известно, что в процессе метаболизма микробные клетки производят низшие карбоновые кислоты, причем набор кислот является как бы «визитной карточкой» того или иного микроорганизма. Это способствовало появлению экспресс-метода на основе метода хромато-масс-спектрометрии (ХМС) определения микроорганизмов в биологических объектах. В основе метода лежит высокоточное определение специфических маркерных молекул, входящих в состав клеточных липидов микроорганизмов. Метод представляет собой идентификацию микроорганизмов по специфическим жирным кислотам в биологических объектах: крови, моче, биоптатах и других биологических жидкостях и тканях. К несомненным достоинствам метода относятся: информативность, чувствительность, определение труднокультивируемых микроорганизмов, возможность расширять перечень определяемых химических маркеров.

В данной работе проведен ряд исследований по созданию методики определения химических маркеров микроорганизмов в слизистой оболочке полости рта. Полость рта населена определенной микробиотой, которая несет защитные функции. Микробиота ротовой полости первой встречается с микроорганизмами и вирусами, попадающими в ротовую полость извне, и не пропускает их во внутреннюю среду, является показателем уровня «защитного порога» организма человека. Таким образом, слизистая оболочка ротовой полости является доступным объектом исследования и может использоваться для экспресс-диагностики ряда заболеваний.

Цель работы - создание методики хромато-масс-спектрометрического определения микроорганизмов по химическим маркерам в биологическом объекте с возможностью контроля подавления роста микроорганизмов эфирными маслами.

Задачи исследования:

1. Исследовать химические продукты метаболизма микроорганизмов (карбоновые кислоты, альдегиды, стерины, стеролы) населяющих слизистую оболочку полости рта и оценить возможности их использования в качестве специфичных маркеров микроорганизмов.
2. Разработать методику хромато-масс-спектрометрического определения состава микроорганизмов слизистой оболочки полости рта по количественному

содержанию специфичных химических микробных маркеров и провести оценку ее метрологических характеристик.

3. Определить химический состав эфирных масел растений Сибирского региона по данным хромато-масс-спектрометрического анализа с целью прогнозирования их бактерицидных свойств и выявления в них потенциально токсичных компонентов.

4. Оценить бактерицидную активность исследуемых эфирных масел при их прямом воздействии на чистые тест-культуры некоторых условно-патогенных микроорганизмов с использованием классического биохимического метода.

5. Оценить антиоксидантную активность исследуемых эфирных масел по продуктам реакции ингибирования автоокисления низших альдегидов с использованием метода хромато-масс-спектрометрии.

6. Исследовать возможности разработанной методики хромато-масс-спектрометрического определения состава микроорганизмов на слизистой оболочки полости рта, для контроля подавления роста микроорганизмов эфирными маслами (оценки их бактерицидной активности).

Научная новизна полученных в работе результатов заключается в следующем:

1. Предложен способ определения микроорганизмов слизистой оболочки полости рта по количественному содержанию химических микробных маркеров с использованием данных хромато-масс-спектрометрического анализа.
2. Установлена специфичная взаимосвязь между наличием определенных микроорганизмов, населяющих слизистую оболочку полости рта, и количественным составом выбранных химических маркеров.
3. Установлено влияние химического состава эфирных масел ряда дикорастущих растений Сибирского региона на их бактерицидную и антиоксидантную активность.
4. Предложено использование разработанного способа хромато-масс-спектрометрического определения микроорганизмов по количественному содержанию химических маркеров для контроля подавления роста микроорганизмов эфирными маслами.

Практическая значимость

- Разработана методика, позволяющая определить состав микробного сообщества слизистой оболочки полости рта по количественному содержанию специфичных химических микробных маркеров с возможностью последующей оценки бактерицидной активности эфирных масел методом хромато-масс-спектрометрии, и оценены ее метрологические характеристики.
- Создан электронный банк аналитических данных, содержащий масс-спектры электронного удара и хроматографические индексы удерживания по 157 соединениям - основным компонентам эфирных масел.
- Получены данные по антиоксидантной активности эфирных масел ряда дикорастущих растений Сибирского региона.

- Определена минимальная бактерицидная концентрация этих эфирных масел по отношению к грамотрицательным и грамположительным условно-патогенным микроорганизмам.
- Показана эффективность бактерицидного воздействия эфирного масла пихты сибирской на микрофлору слизистой оболочки полости рта лиц с хроническими заболеваниями верхних дыхательных путей, оцененная по результатам хромато-масс-спектрометрического анализа химических маркеров микроорганизмов.

Все данные, полученные в работе, имеют многоцелевой характер и могут быть востребованы для прогноза воздействия эфирных масел на здоровье человека.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Специфические химические маркеры микроорганизмов населяющих слизистую оболочку полости рта.
2. Методику хромато-масс-спектрометрического определения состава микроорганизмов микробного сообщества слизистой оболочки полости рта по количественному содержанию специфичных химических микробных маркеров и ее метрологические характеристики.
2. Компонентный химический состав эфирных масел дикорастущих растений Сибирского региона: пихты сибирской, сосны сибирской, дягиля лекарственного, мяты перечной, мелиссы лекарственной, укропа пахучего, тимьяна енисейского.
3. Бактерицидная активность эфирных масел дикорастущих растений Сибирского региона к чистым тест-культурам некоторых условно-патогенных микроорганизмов.
4. Антиоксидантная активность исследованных эфирных масел дикорастущих растений Сибирского региона, оцененная по продуктам реакции ингибирования автоокисления транс-2-гексеналя с использованием метода хромато-масс-спектрометрии.
5. Бактерицидное действие эфирного масла пихты сибирской на микроорганизмы слизистой оболочки полости рта путем отслеживания содержания химических маркеров микроорганизмов по хромато-масс-спектрометрическим данным.

Апробация работы.

Материалы диссертации были представлены на научных конференциях: на IV Всероссийской научной конференции «Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья» (2009 г., г. Барнаул), на III и IV научно-практической конференции «Химическая наука и образование Красноярья» (2009 г. и 2010 г., г. Красноярск), на Международной конференции «Экологии Южной Сибири и сопредельных территорий» (2009 г., г. Абакан), на симпозиуме с международным участием «Питание в профилактике социально-значимых заболеваний» (2009 г., г. Красноярск), на Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2010» (2010 г., г. Москва, Съезд аналитиков России «Аналитическая химия – новые

методы и возможности», (2010 г., г. Москва), на Всероссийской конференции «Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез» (2010 г., г. Краснодар).

Публикации.

По материалам диссертации опубликовано 16 работ, в том числе – 3 в изданиях, рекомендованных ВАК РФ.

Структура и объем работы.

Диссертация состоит из введения, литературного обзора, 3 глав, выводов, приложения и списка использованных литературных источников. Материалы диссертации изложены на 184 страницах, включают 22 таблицы и 57 рисунков и 19 приложений. Список использованных источников включает 166 наименований.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **введении** обоснована актуальность темы, научная новизна и практическая значимость, сформулированы основные положения, выносимые на защиту. Приведены данные об апробации и публикации результатов исследования, а также о структуре и объеме диссертации.

Глава 1. Литературный обзор. Для изучения обмена веществ и химического состава микроорганизмов получили распространение различные способы хроматографии, масс-спектрометрия, метод изотопных индикаторов, электрофорез, электронная микроскопия и др. физические и физико-химические методы. Представлены данные об определении химических маркеров микроорганизмов методами хроматографии. Рассмотрены имеющиеся литературные данные в области хемодифференциации микроорганизмов, в частности, химические маркеры клеточных жирных кислот клеток микроорганизмов, история развития хемодифференциации в данной области. Приведена характеристика современного метода хромато-масс-спектрометрии микробных маркеров и возможности оценки воздействия антимикробных препаратов в биологических объектах. Представлены данные об эфирных маслах, как о природных антимикробных средствах, приведены методы определения их бактерицидных свойств в модельных системах, определения химического состава и антиоксидантной активности. Предложен объект для исследования бактерицидной активности эфирных масел методом хромато-масс-спектрометрии микробных маркеров на реальном объекте, обоснована актуальность проведения исследований в этой области.

Глава 2. Методическая часть. Представлены основные этапы разработки методики оценки и идентификации химических маркеров микроорганизмов слизистой оболочки полости рта, условия пробоподготовки, проведения анализа, а также, основные материалы и реагенты, используемые в данной работе. Подробно освещены методы определения бактерицидной активности эфирных масел методом серийных разведений в бульоне, антиоксидантной активности и установления химического состава эфирных масел методом хромато-масс-спектрометрии. Подробно описаны метрологические характеристики данной методики.

В работе использовали газо-жидкостный хроматограф Agilent Technologies 7890 А (США) с квадрупольным масс-спектрометром Agilent Technologies 5975 С в качестве детектора. Дано описание приемов работы с программными пакетами Chemstation и AMDIS.

Глава 3. Результаты и обсуждение. Анализ микробных сообществ слизистой оболочки полости рта человека методом хромато-масс-спектрометрии микробных маркеров.

Известно, что микроорганизмы можно идентифицировать путем определения продуктов их метаболизма по входящим в их состав маркерам – жирным кислотам, альдегидам, стеринам. На основе имеющейся методики определения химических маркеров микроорганизмов методом хромато-масс-спектрометрии предложено разработать методику оценки химических маркеров слизистой оболочки полости рта человека.

Материал забора пробы. Показано, что наиболее универсальным зондом для отбора материала со слизистой оболочки полости рта является стерильный вязкозный зонд, не имеющий мешающих примесей при дальнейшей пробоподготовке.

Отбор проб. Биологический материал слизистой оболочки полости рта отбирался квалифицированными медицинскими работниками с защечных пазух, так как по литературным данным, именно в этих точках локализуется наибольшее количество и видовое разнообразие микроорганизмов.

Пробоподготовка и анализ. Отобранный на стерильные зонды биологический материал подвергали серии химических превращений, в результате которых анализировали лишь метиловые эфиры жирных кислот, спирты и альдегиды. Пробу на зонде высушивали с добавлением 80 мкл метанола и подвергали кислому метанолизу в 1,2 н HCl в метаноле. Метанолиз проводили в 0,4 мл 1,2 н кислого раствора метанола в течение 45 мин при 80 °С. На этой стадии происходит освобождение жирных кислот и альдегидов из сложных липидов микроорганизмов и других клеток жидкости в виде метиловых эфиров и диметилацеталей. Для получения триметилсилильных эфиров оксикислот и стеролов сухой остаток обрабатывали – N,O-бис(триметил-силил)-трифторацетамидом в течение 9 мин при 80 °С. В качестве внутреннего стандарта использовали дейтерометиловый эфир тридекановой кислоты.

Условия хроматографического разделения: начальная температура 130 °С, выдержка при начальной температуре 0,5 мин, нагрев температуры со скоростью 70°/мин до 320 °С, выдержка при конечной температуре 6 мин. Газ-носитель гелий, поток 1,2 мл/мин в режиме без деления потока.

Для количественного определения химических маркеров микроорганизмов со слизистой оболочки полости рта предложено использовать режим регистрации селективных ионов (SIM), так как в результате проведенных исследований в сканирующем режиме по полному ионному току (SCAN) установлено, что в биологическом материале полости рта находится большое количество мешающих анализу примесей. Это хорошо заметно на

фрагментах хроматограмм одной пробы слизистой оболочки полости рта, записанной в разных режимах и представленной на рисунке 1.

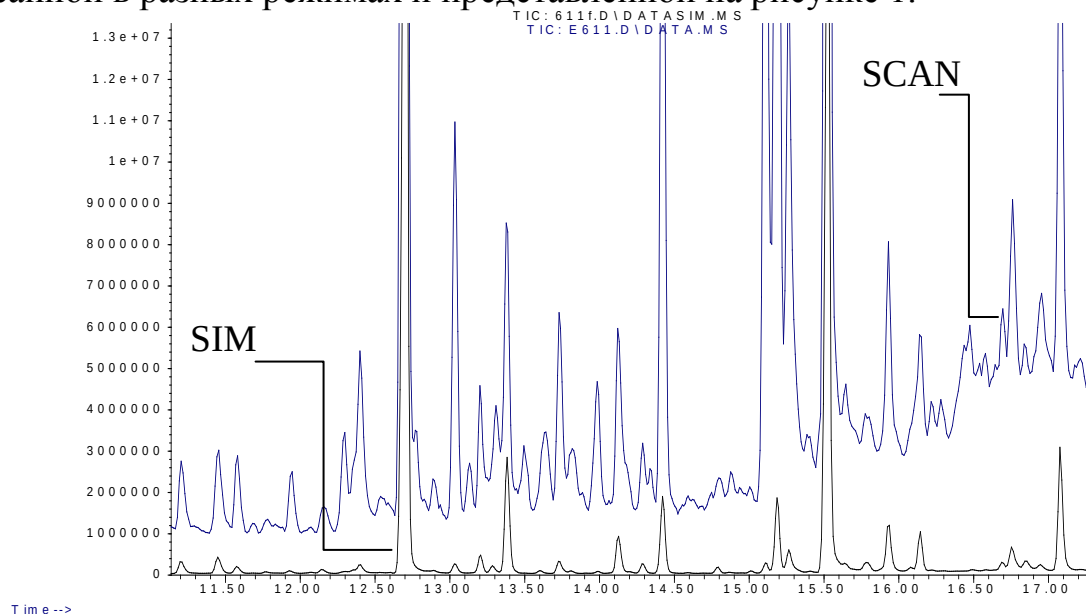


Рисунок 1 – Фрагменты хроматограмм одной пробы, записанной при регистрации по полному ионному току (SCAN), и в режиме регистрации выделенных ионов (SIM)

Хроматограммы записывали в режиме регистрации выделенных ионов (SIM), при периодическом сканировании до тридцати ионов в пяти интервалах времени. Интервалы и ионы выбирали таким образом, чтобы селективно детектировать маркеры определяемых видов микроорганизмов. В том числе использовали характерный ион $m/z = 87$ в спектрах жирных кислот для детектирования малых количеств микробных кислот C12-C15, C17, C19. Ион 175 включают в каждый интервал, кроме пятого, для детектирования β -оксикислот, для которых он специфичен и интенсивен в спектре. Также использование режима регистрации выделенных ионов позволяет значительно снизить «шум».

При хромато-масс-спектрометрическом исследовании фракций метиловых эфиров жирных кислот, альдегидов, стеринов в пробах слизистой оболочки полости рта найдены основные компоненты (на уровне содержания более 1% от максимального пика в хроматограмме) - кислоты с четным количеством атомов углерода: C16:0, C18:0, C20:0 (в порядке уменьшения содержания в профиле жирных кислот), а также полиненасыщенные жирные кислоты: C20:n, C22:n, холестерин, ситестерол, насыщенные прямоцепочечные альдегиды и 2-гидроксикислоты. Кислоты с нечетным количеством C15:0 и C17:0 составляют около 1% каждая.

Перечисленные выше вещества являются липидными компонентами клеток организма человека и составляют естественный фон, на котором в исследованных пробах выявлены компоненты, специфичные для микробных клеток. На рисунке 2 представлен фрагмент хроматограммы, типичной для материала слизистой оболочки полости рта.

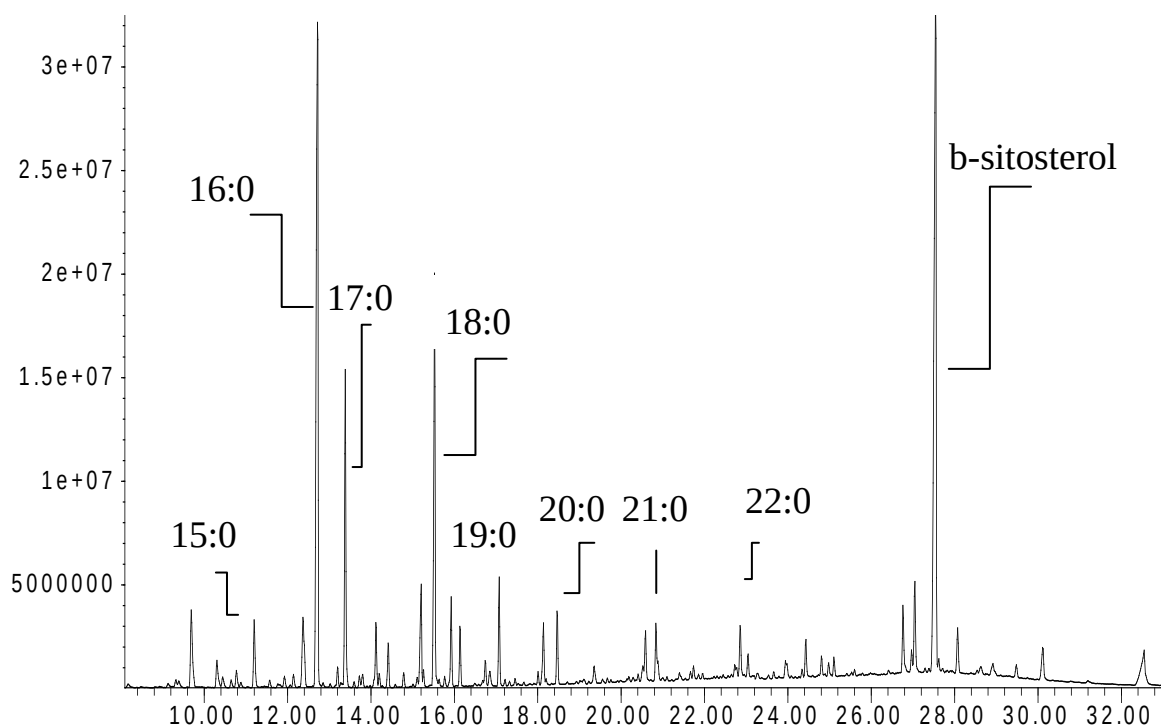


Рисунок 2 – Типичная хроматограмма химических маркеров микроорганизмов слизистой оболочки полости рта по выделенным ионам

В результате проведенных исследований в пробах биологического материала слизистой оболочки полости рта идентифицировано 32 химических маркера микроорганизмов, в таблице 1 представлен качественный и количественный состав химических маркеров, соотнесенных с соответствующим типом микроорганизмов, приведены время удерживания и характерный ион, по которому вели регистрацию определяемых веществ.

Таблица 1 – Качественный и количественный состав химических маркеров микроорганизмов (n=20)

№	Химические маркеры, (микроорганизм)	Время удерживания	Ион	С, мкг/мл	Проба, кл/гх10*5
1	Декановая кислота (<i>Streptococcus</i>)	4,36	87	0,92	212
2	Изолауриновая кислота (<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>)	6,30	87	0,23	74
3	Антеизотридекановая кислота (<i>Bacillus cereus</i>)	7,79	87	1,78	296
4	Изомиристиновая кислота (<i>Streptomyces</i>)	9,21	87, 270	7,31	296
5	Изотетрадеценновая кислота (<i>Clostridium/Str. pneumonia</i>)	9,32	87	0,64	48
6	Тетрадекановый альдегид (<i>E.lentum</i> 7741 (<i>группа В</i>))	10,46	75	0,51	95
7	10-метил-тетрадекановая кислота (<i>Actinomycetes</i>)	10,46	87	0,13	22

Продолжение таблицы 1

8	Пентадеценовая кислота (<i>Clostridium propionicum</i>)	10,78	87	0,44	329
9	Антеизогептадекановый альдегид (<i>Propionibacterium freudenreichii</i>)	11,58	75	1,76	111
10	10-метилпентадекановая кислота (<i>Актиномицеты</i>)	11,93	87	0,87	61
11	Изогексадеценовая кислота (<i>Pseudonocardia</i>)	11,82	87	0,73	43
12	7,8-гексадеценовая кислота (<i>Clostridium ramosum</i>)	12,37	87	1,29	698
13	9,10-гексадеценовая (<i>Nocardia asteroides</i>)	12,47	87	0,50	48
14	3-гидроксимиристиновая кислота (<i>Fusobacterium/Haemophilus</i>)	12,74	175, 315	0,09	33
15	10-метилгексадекановая кислота (<i>Rhodococcus</i>)	13,40	87	1,07	123
16	Изогептадекановая кислота (<i>Staphylococcus intermedius</i>)	13,60	87	1,41	356
17	Антеизогептадекановая кислота (<i>Corineform CDC-group XX</i>)	13,73	87	0,48	112
18	Гептадеценовая кислота (<i>Mycobacterium/Candida</i>)	13,81	87, 250	1,45	225
19	Гидроксипентадекановая кислота (<i>Actinomyces viscosus</i>)	14,18	175	0,16	129
20	Изооктадекановая кислота (<i>Clostridium difficile</i>)	14,99	298, 87	0,09	57
21	Цис-вакценовая кислота (<i>Lactobacillus</i>)	15,26	87	2,13	871
22	Гидроксипальмитиновая кислота (<i>Prevotella</i>)	15,54	175	0,70	51
23	Октадеценовый альдегид (<i>Bifidobacterium</i>)	15,80	75, 281	1,17	371
24	11,12-октадеценовый альдегид (<i>Eubacterium moniliforme</i> , <i>E.nodatum</i> , <i>E.sabureum</i>)	15,93	75, 281	2,58	1278
25	Антеизотридекановая кислота (<i>Staphylococcus</i>)	16,49	87	0,07	35
26	11-эйкозеновая кислота (<i>Streptococcus mutans</i>)	17,96	87	0,77	113

Продолжение таблицы 1

27	Гидроксистеариновая кислота (<i>Helicobacter pylori</i>)	18,15	175, 273	0,05	51
28	10-гидроксистеариновая кислота (<i>Clostridium perfringens</i>)	18,11	273	0,09	32
29	Холестендиол (<i>Herpes</i>)	27,78	456	0,66	67
30	Кампестерол (<i>Микр грибы,</i> <i>кампестерол</i>)	27,87	343	1,15	323
31	Холестадиенон (<i>Цитомегаловирус</i>)	28,10	382	0,27	60
32	Ситостерол-β (<i>Микр грибы, ситостерол</i>)	29,45	396	16,9	7979

Предложенная методика была опробована на 20 здоровых добровольцах мужского пола, проживающих в Красноярске, в возрасте 18 - 20 лет, которая показала, что «среднестатистическая» микробиота выглядит следующим образом: преобладают такие химические маркеры микроорганизмов как *Streptococcus*, *Eubacterium lentum* (*группа А*), *Clostridium propionicum*, *Staphylococcus intermedius*, микроскопические грибы, ситостерол.

Существенно то, что некоторые микроорганизмы присутствуют в значительных количествах. К таким микроорганизмам относятся: *Streptococci spp*, *Clostridium propionicum*, *Lactobacillus spp*, *Corineform CDC-group XX*, *Mycobacterium/Candida*, *Eubacterium moniliforme*, *E.nodatum*, *E.sabureum*, *Staphylococcus spp*, *Bifidobacterium spp*, *Streptococcus mutans*, *Микр. грибы*, *ситостерол*, *Actinomyces viscosus*. Самый опасный обитатель ротовой полости *Streptococcus mutans*, вызывающий кариес.

Метрологические характеристики методики определения химических маркеров микроорганизмов

Подтверждением линейной зависимости между концентрацией определяемого соединения и площадью его хроматографического пика является близость по модулю к 1 коэффициентов корреляций соответствующих градуировочных графиков. Линейная зависимость сохраняется в диапазоне концентраций определяемых соединений 1 – 200 мкг/мл. В связи со спецификой определяемых компонентов (химические маркеры микроорганизмов) верхняя граница диапазона в определяемых метрологических характеристиках методики не является критической величиной. Так как количество микробных клеток, из которых непосредственно идет извлечение жирных кислот, альдегидов, оксикислот, стероидов в биологических материалах лимитируется общим числом клеток, химические маркеры которых локализируются в липидной оболочке в количестве 3-10%, не представляется возможным установить верхнюю границу диапазона.

Основные метрологические характеристики представлены в нижеприведенных таблицах.

Таблица 2 – Уравнения регрессии и значения коэффициентов корреляций градуировочных графиков для определения химических маркеров в МЭЖК (n = 10, P = 0,95)

Определяемое соединение	Уравнение регрессии	Коэффициент корреляции
Стеариновая кислота МЭ	$y=1,80 \cdot 10^5 x$	0,998
Нанодекановая кислота МЭ	$y=2,42 \cdot 10^5 x$	0,998
Арахидовая кислота МЭ	$y=2,59 \cdot 10^5 x$	0,998
Генейкозановая кислота МЭ	$y=2,61 \cdot 10^5 x$	0,998
Бегеновая кислота МЭ	$y=2,40 \cdot 10^5 x$	0,997

Таблица 3 – Предел обнаружения и ошибка определения метиловых эфиров (МЭ) жирных кислот

Определяемое соединение	Предел обнаружения (S/N=3), мкг/мл	E, %
Стеариновая кислота МЭ	0,05	1,86
Нанодекановая кислота МЭ	0,05	2,83
Арахидовая кислота МЭ	0,05	3,14
Генейкозановая кислота МЭ	0,05	2,46
Бегеновая кислота МЭ	0,05	2,3

Таблица 4 – Контроль правильности количественного определения МЭЖК методом добавки определяемого компонента (n=5, P = 0,95)

Определяемое соединение	Содержание (x), мкг/мл		S
	введено	найденно $x \pm \delta$	
Стеариновая кислота МЭ	5,0	$5,0 \pm 0,2$	0,16
	20,0	$20,0 \pm 0,1$	0,08
Нанодекановая кислота МЭ	5,0	$5,1 \pm 0,2$	0,16
	20,0	$20,0 \pm 0,1$	0,08
Арахидовая кислота МЭ	5,0	$5,0 \pm 0,3$	0,24
	20,0	$20,1 \pm 0,3$	0,24
Генейкозановая кислота МЭ	5,0	$5,0 \pm 0,3$	0,24
	20,0	$20,0 \pm 0,2$	0,16
Бегеновая кислота МЭ	5,0	$5,0 \pm 0,2$	0,16
	20,0	$20,2 \pm 0,1$	0,08

Для оценки систематической составляющей погрешности методики был использован метод добавок. Для проверки правильности результатов анализа готовили холостые пробы с зондом пробоотбора и вводили известное количество модельной смеси и проводили анализ в соответствии с прописью методики ($n=5$) в условиях повторяемости.

Получение и изучение химического состава некоторых эфирных масел Сибирского региона

Для успешного применения эфирных масел в качестве антимикробных средств необходимо устанавливать их химический состав и особенно наличие или отсутствие ядовитых для организма человека веществ. В работе исследованы эфирные масла следующих дикорастущих растений Сибирского региона: пихты сибирской, сосны сибирской, можжевельника сибирского, дягиля лекарственного, Melissa лекарственной, мяты перечной, укропа пахучего, тимьяна енисейского. Компонентный состав полученных масел установлен методом хромато-масс-спектрометрии по линейным индексам удерживания и масс-спектрам, а сами масла использованы для изучения их бактерицидной и антиоксидантной активности.

Для идентификации компонентов использовали стандартный алгоритм расчета индексов удерживания с использованием *n*-алканов в качестве внутреннего стандарта. Расчет индексов удерживания производили с использованием двух программных пакетов ChemStation и AMDIS. Программный пакет, выпускаемый фирмой Agilent Technologies, позволяет осуществлять поиск в базах масс-спектрометрических данных (в работе использовали коммерческие библиотеки NIST08 и wiley07), выполнять расчеты соотношений компонентов в смеси, осуществлять количественный анализ и выполнять серии различных обработок.

В результате проведенных экспериментов создана библиотека масс-спектров электронного удара, содержащая 157 веществ, основных компонентов эфирных масел, проведено сравнение со справочными данными и определены индексы удерживания. Библиотека составлена в формате .MSL, позволяет использовать в программе AMDIS для расчета индексов удерживания, а также, идентифицировать компоненты сложных смесей эфирных масел.

С использованием электронной библиотеки исследован компонентный состав 8 эфирных масел Сибирского региона (компонент определялся при его содержании более 0,1% от цельного масла):

- пихты сибирской – 53 компонента;
- сосны сибирской – 90 компонентов;
- можжевельника сибирского – 67 компонентов;
- дягиль лекарственный – 54 компонента;
- Melissa лекарственная – 26 компонентов;
- листья мяты перечной – 44 компонента;
- укроп пахучий – 21 компонент;
- тимьян енисейский – 59 компонентов.

Изучение бактерицидной активности эфирных масел на чистых тест-культурах условно-патогенных микроорганизмов методом серийных разведений

В результате проведенных исследований определена минимальная бактерицидная концентрация эфирных масел по отношению к тест-культурам *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella* 204, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Staphylococcus aureus* 209, *Staphylococcus aureus* MRSA, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus*. Для упрощенной оценки антисептической активности использовали фенольный коэффициент, который показывает, во сколько раз бактерицидность эфирного масла сильнее бактерицидности фенола, показатель последнего принят за единицу.

В результате проведенных исследований установлено, что различные эфирные масла обладают различной бактерицидной активностью по отношению к выбранным тест-культурам. Например, можжевельник сибирский проявляет бактерицидную активность к *Acinetobacter calcoaceticus* – 0,2 фенольного коэффициента, а по отношению к *Escherichia coli* фенольный коэффициент равен 10, таким образом бактерицидная активность изменяется в 50 раз. Установлено, что наибольшую активность эфирные масла проявляют к грамположительным микроорганизмам.

Следует отметить малые значения фенольного коэффициента эфирных масел, что свидетельствует о высокой бактерицидной активности в минимальных концентрациях.

Представляло интерес изучить воздействие эфирных масел в реальной модели (в слизистой оболочке ротовой полости человека), где существуют различные виды микроорганизмов в биопленке и определить тип воздействия эфирного масла на микроорганизмы. Для этой цели использовали эфирное масло пихты сибирской, бактерицидная активность которого варьируется в интервале 0,12 – 4 единиц фенольного коэффициента.

Хроматографическое исследование антиоксидантной активности эфирных масел

Зная химический состав масел и их бактерицидную активность, представляет интерес оценить антиоксидантную активность исследуемых эфирных масел дикорастущих растений Сибирского региона, получить наиболее полную информацию о влиянии вещества на процессы в организме.

Из существующего многообразия методов оценки антиоксидантной активности, нами выбран наиболее оптимальный, применимый для оценки эфирных масел - метод ингибирования автоокисления низшего альдегида в присутствии веществ – антиоксидантов.

Транс-2-гексеналь самоокисляется кислородом воздуха в течение 96 суток в соответствующую кислоту. При внесении в реакционную смесь с транс-2-гексеналем эфирного масла, можно оценивать антиоксидантную активность масла по замедлению процесса его самоокисления.

При оценке антиоксидантной активности эфирных масел тимьяна енисейского, мяты перечной и дягиля лекарственного обнаруживалось

появление спирта 2-гексенола, что может свидетельствовать о протекании также реакции восстановления транс-2-гексеналя.

Это свидетельствует о том, что при наличии эфирных масел тимьяна енисейского, мяты перечной и дягиля лекарственного часть альдегида окисляется, в часть восстанавливается:

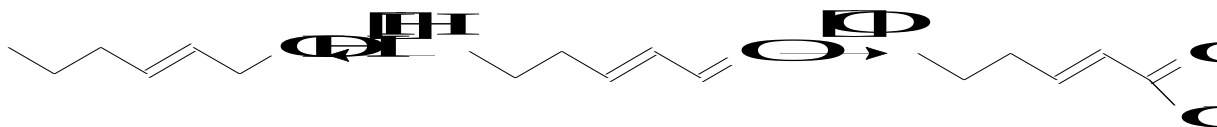


Рисунок 3 – Одновременное окисление транс-2-гексеналя в 2-гексеновую кислоту и восстановление в 2-гексенол

Для оценки ингибирования окисления альдегида транс-2-гексеналя при концентрации 5 мкл/мл после 30 суток построен следующий ряд активности эфирных масел: Melissa лекарственная > мята перечная > дягиль лекарственный > тимьян енисейский > укроп пахучий > пихта сибирская > можжевельник сибирский > сосна сибирская. Окисление замедляется в широком диапазоне от 99,1 до 38%. Сам транс-2-гексеналь окисляется до 50%, таким образом, пихта сибирская, сосна сибирская и можжевельник сибирский выступают прооксидантами. Наивысшей антиоксидантную активность в концентрации 5 мкл/мл обладают масла Melissa лекарственной, мяты перечной, дягиля лекарственного и тимьяна енисейского. На рисунке 5 представлено замедление окисления транс-2-гексеналя в присутствии эфирного масла Melissa лекарственной.

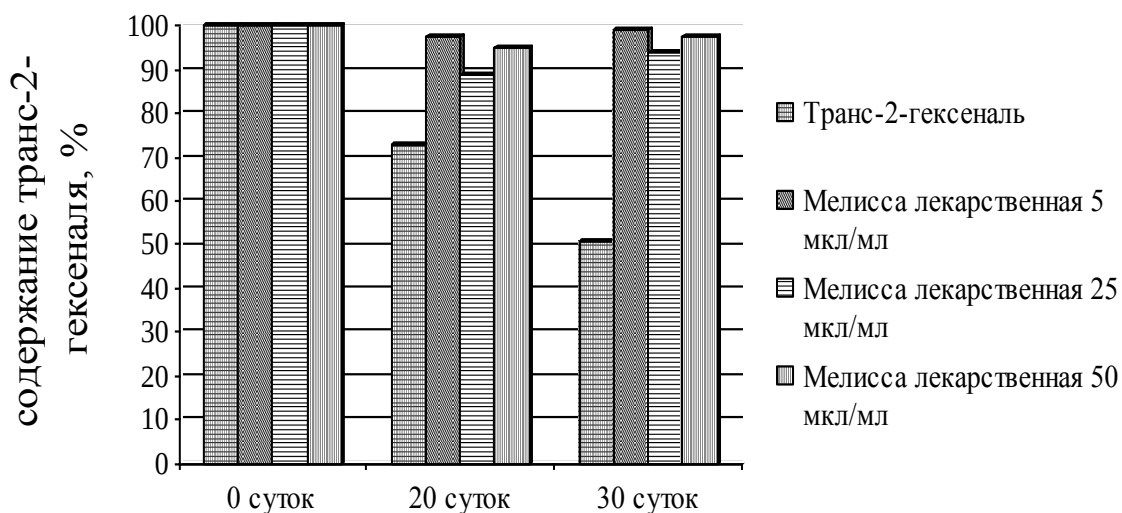


Рисунок 4 – Содержание транс-2-гексеналя в модельных системах в присутствии различных концентраций Melissa лекарственной

Ряд активности эфирных масел после 30 суток в концентрации 25 мкл/мл: тимьян енисейский > Melissa лекарственная = укроп пахучий > мята перечная > можжевельник сибирский > дягиль лекарственный > пихта сибирская > сосна сибирская. Окисление замедляется от 98% до 63,8%. Отмечено, что с

увеличением концентрации антиоксидантная активность возрастает. Максимальную антиоксидантную активность в концентрации 25 мкл/мл проявили эфирные масла тимьяна енисейского, Melissa лекарственной, укропа пахучего и мяты перечной.

Ряд активности эфирных масел после 30 суток в концентрации 50 мкл/мл: Melissa лекарственная > мята перечная > сосна сибирская > укроп пахучий > тимьян енисейский > дягиль лекарственный > пихта сибирская > можжевельник сибирский. Окисление замедляется от 97,4% до 75,7%.

Таким образом, с увеличением концентрации эфирных масел увеличивается их антиоксидантная активность. Отмечена способность ингибировать окисление в минимальных испытуемых концентрациях для эфирных масел Melissa лекарственной, мяты перечной, дягиля лекарственного и тимьяна енисейского.

Оценка бактерицидной активности эфирным масел на слизистую оболочку полости рта методом хромато-масс-спектрометрии микробных маркеров

Предложено оценить бактерицидную активность эфирного масла пихты сибирской на химические маркеры микроорганизмов с применением разработанной методики оценки качественного и количественного состава химических маркеров микроорганизмов на слизистую оболочку полости рта.

Предложено рассматривать бактерицидное действие эфирного масла пихты сибирской на резидентную и условно-патогенную микробиоту полости рта: *Lactobacillus*, *Mycobacterium/Candida*, *Eubacterium moniliforme*, *E.nodatum*, *E.sabureum*, *Nocardia asteroides*, *Actinomycete*, *Streptococcus*, *Clostridium ramosum*, *Rhodococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus mutans*, *Propionibacterium reudenreichii*, *Staphylococcus intermedius*.

На рисунке 5 представлены фрагменты хроматограмм, показывающих бактерицидное действие эфирного масла пихты сибирской на примере 7,8-гексадеценовой кислоты (маркер *Clostridium ramosum*).

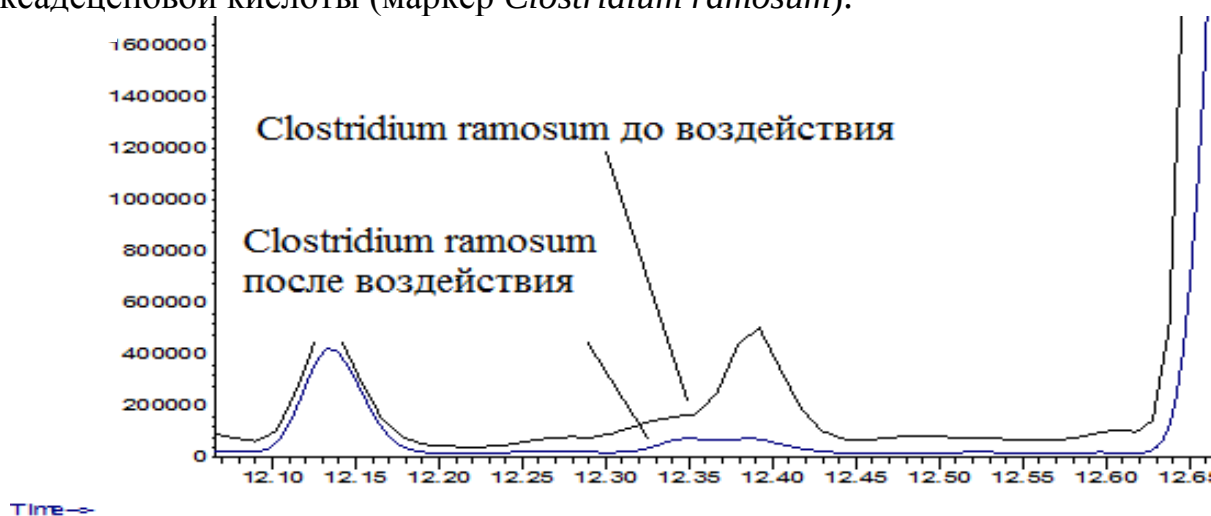


Рисунок 5 – Фрагменты хроматограмм, показывающих уменьшение площади хроматографического пика 7,8-гексадеценовой кислоты химического маркера *Clostridium ramosum*

В результате проведенных исследований установлено, что у некоторых микроорганизмов снизилась концентрация химических маркеров, что свидетельствует о снижении численности микроорганизмов, данные представлены в таблице 5.

Таблица 5 – Оценка бактерицидной активности 1%-го эфирного масла пихты сибирской на химические маркеры слизистой оболочки ротовой полости человека (n=5)

Химический маркер	С, мкг/мл		Микроорганизм	Количество клеток в пробе	
	до $\bar{x} \pm \delta$	после $\bar{x} \pm \delta$		до	после
Цис-вакценовая кислота	2,12±0,01	1,02±0,03	<i>Lactobacillus</i>	867	489
9,10-гексадеценовая кислота	1,13±0,02	1,27±0,02	<i>Nocardia asteroides</i>	138	152
11-эйкозеновая кислота	1,35±0,02	1,12±0,03	<i>Streptococcus mutans</i>	311	256
11,12-октадеценовый альдегид	1,80±0,04	0,65±0,02	<i>Eubacterium moniliforme</i>	786	327
7,8-гексадеценовый альдегид	1,96±0,03	1,72±0,02	<i>Clostridium ramosum</i>	1004	979

Из полученных результатов можно сделать следующие выводы:

- эфирное масло пихты сибирской оказывает бактерицидное действие как на чистые культуры условно-патогенных микроорганизмов, так и на микроорганизмы слизистой оболочки полости рта;
- отмечена закономерность снижения концентрации у химических маркеров: 11-эйкозеновой кислоты (маркер *Streptococcus mutans*), декановой кислоты (маркер *Streptococcus*), 11,12-октадеценовый альдегид (маркер *Eubacterium moniliforme*), антеизогептадеканового альдегида (*Propionibacterium freudenreichii*), цис-вакценовой кислоты (маркер *Lactobacillus*) и 7,8-гексадеценового альдегида (маркер *Clostridium ramosum*);
- эфирное масло не изменяет состав нормальной микрофлоры полости рта и способствует повышению защитного порога организма.

ВЫВОДЫ

1. Исследованы хромато-масс-спектрометрические характеристики (времена удерживания и масс-спектры электронного удара) для специфических химических маркеров микроорганизмов населяющих слизистую оболочку полости рта, установлен качественный и количественный состав микробиоты включающий себя 32 микроорганизма.
2. Разработана методика хромато-масс-спектрометрического определения состава микроорганизмов микробного сообщества слизистой оболочки полости рта по количественному содержанию специфичных химических микробных маркеров (жирных кислот, альдегидов, стеринов) и проведена оценка ее метрологических характеристик (линейный диапазон, повторяемость, точность, предел количественного определения и внутрिलाбораторная прецизионность).
3. Исследован химический состав использованных в работе эфирных масел дикорастущих растений Сибирского региона, создан электронный банк аналитических данных, содержащий масс-спектры электронного удара и хроматографические индексы удерживания по 157 соединениям, являющимся основными компонентами эфирных масел.
4. Изучена бактерицидная активность использованных в работе эфирных масел в зависимости от их концентрации по отношению к тест-культурам условно-патогенных микроорганизмов с использованием биохимического метода (путем) серийных разведений в бульоне. Установлено, что некоторые эфирные масла имеют бактерицидную концентрацию в 6-8 раз ниже значения фенольного коэффициента.
5. Установлено, что в случае модельной реакции автоокисления транс-2-гексеналя использованные в работе эфирные масла при концентрациях выше 25 мкг/мл обладают антиоксидантной активностью, которая достигает 97-98%, что свидетельствует о положительном воздействии эфирного масла при применении в ингаляциях.
6. Показана эффективность разработанной методики на примере изучения бактерицидной активности эфирного масла пихты сибирской к микробиоте слизистой оболочки полости рта, путем отслеживания содержания химических маркеров микроорганизмов по хромато-масс-спектрометрическим данным. Выявлено, что ингаляции эфирным маслом пихты сибирской приводит к снижению концентрации некоторых микроорганизмов (*Streptococcus mutans*, *Streptococcus*, *Eubacterium moniliforme*, *Propionibacterium freudenreichii*, *Lactobacillus*, *Clostridium ramosum*), не изменяя состава нормальной микробиоты полости рта, способствует повышению защитного порога организма.

Основные результаты работы изложены в следующих публикациях:

1. Е.Г. Струкова, А.А. Ефремов, А.А. Гонтова, Л.С. Соколова. Воздействие эфирных масел сибирского региона на условно-патогенные микроорганизмы // Химия растительного сырья. – 2009. – Вып.4. – С. 57 – 62.
2. А.А. Алякин, А.А. Ефремов, Е.Г. Струкова. Динамика выделения и компонентный состав эфирного масла тысячелистника обыкновенного пригорода Красноярска // Химия растительного сырья. – 2009. – Вып.4. – С. 51 – 56.
3. А.А. Ефремов, И.Д. Зыкова, Е.П. Федянина, Е.Г. Терещенко (Струкова). Компонентный состав эфирного масла лепестков роз / Мат. IV Всероссийской конференции «Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья». – Барнаул. – 2009. – кН.2. – С. 115 – 117.
4. Е.Г. Терещенко (Струкова), А.А. Ефремов, С.В. Качин. Исследование бактерицидной активности эфирных масел некоторых дикорастущих растений Сибири / Мат. IV Всероссийской конференции «Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья». – Барнаул. – 2009. – кН.2. – С. 143 – 145.
5. Е.Г. Струкова, А.А. Гонтова, А.А. Ефремов. Определение микрофлоры ротовой полости человека / Мат.международной конференции «Экология южной Сибири и сопредельных территорий». – Абакан. – 2009. – Вып. 13. – Т.2. – С. 157 – 158.
6. А.Н. Нарчуганов, Е.Г. Струкова, А.А. Ефремов. Сравнительное исследование компонентного состава эфирного масла *Pinus Sibirica*, полученного в разное время года / Мат.международной конференции «Экология южной Сибири и сопредельных территорий». – Абакан. – 2009. – Вып. 13. – Т.1. – С. 38.
7. А.Н. Нарчуганов, Е.Г. Терещенко(Струкова), А.А. Ефремов. Идентификация компонентов эфирного масла лапки сосны сибирской методом хромато-масс-спектрометрии / Мат.III научно-практической конференции «Химическая наука и образование Красноярья». – Красноярск. – 2009. – С. 62 – 66.
8. Е.Г. Терещенко(Струкова), А.А. Ефремов, С.В. Качин. Минимальная подавляющая концентрация эфирных масел некоторых дикорастущих растений Сибири по отношению к тест-культурам *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris* / Мат.III научно-практической конференции «Химическая наука и образование Красноярья». – Красноярск. – 2009. – С. 74 – 77.
9. Е.Г. Струкова, А.А. Ефремов. Определение микрoэкологического статуса организма человека и диагностика инфекций с использованием метода масс-спектрометрии микробных маркеров / Мат.симпозиума с

- международным участием «Питание в профилактике социально-значимых заболеваний». – Красноярск. – 2009. – С. 113 – 114.
10. Е.Г. Струкова, А.А. Гонтова. Разработка методики оценки микробных сообществ ротовой полости человека методом масс-спектрометрии микробных маркеров / Мат.ХVII международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов». – Москва. – 2010.
 11. Е.Г. Струкова, А.А. Ефремов, Г.А. Осипов, С.В. Качин. Определение микроэкологического статуса организма человека с использованием метода масс-спектрометрии микробных маркеров / Съезд аналитиков России и Школа молодых Ученых «Аналитическая химия – новые методы и возможности». – Москва. – 2010. – С. 285 – 286.
 12. Е.Г. Струкова, А.А. Ефремов, А.А. Гонтова, Г.А. Осипов, Н.И. Сарматова. Возможности масс-спектрометрии микробных маркеров в определении микроэкологического статуса человека / Мат.IV Региональной научно-практической конференции «Химическая наука и образование Красноярья». – Красноярск. – 2010. – С. 115 – 119.
 13. Е.Г. Струкова, А.А. Ефремов, А.А. Гонтова, Г.А. Осипов, Н.И. Сарматова. Определение микроэкологического статуса и диагностика инфекций организма человека с использованием метода хромато-масс-спектрометрии // Журнал Сибирского Федерального Университета. – Химия. – Т. 2. – Вып. 4. – 2009. – С. 351 – 358.
 14. А.А. Ефремов, Е.Г. Струкова, А.Н. Нарчуганов. Компонентный состав эфирного масла лапки хвойных Сибирского региона по данным хромато-масс-спектрометрии // Журнал Сибирского Федерального Университета. – Химия. – Т. 2. – Вып. 4. – 2009. – С. 335 – 350.
 15. Е.Г. Струкова, А.А. Ефремов. Антиоксидантная активность эфирных масел некоторых дикорастущих растений Сибирского региона / Мат. Всероссийской конференции «Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез». – Краснодар. – 2010. – 154 с.
 16. Е.Г. Струкова, А.А. Ефремов, С.В. Качин. Метрологические характеристики методики хромато-масс-спектрометрического определения химических маркеров микроорганизмов // Журнал Сибирского Федерального Университета. – Химия. – Т. 3. – Вып. 3. – 2010. – С. 278 – 284.

Подписано в печать _____
Формат 60х84/16. Уч.-изд. л. _____
Тираж _____ экз. Заказ № _____

Отпечатано в типографии БИК СФУ
660041, г. Красноярск, пр.Свободный, 82а