

CHEMICAL COMPOSITION AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF LINDEN (*TILIA TOMENTOSA* MOENCH.) CO₂ EXTRACT

*T. Atanasova*¹, *V. Gochev*², *A. Stoyanova*¹, *T. Girova*², *I. Djurdjev*³

¹*University of Food Technologies, Department of Essential Oils, 26 Maritza Blvd,
Plovdiv 4002, Bulgaria*

²*“Paisii Hilendarski” University of Plovdiv, Department “Biochemistry and
microbiology”, 24 Tzar Asen str., Plovdiv 4000, Bulgaria,*

³*Polychim AD, Dimitrograd*

ABSTRACT

The chemical composition of CO₂ extract from the flowers with bracts of linden (*Tilia tomentosa* Moench.) growing in Bulgaria was analyzed using GC and GC/MS. 36 compounds (91,53 % of the extract) were identified and the main components (concentration higher than 3 %) were benzaldehyde (14,20 %), phenylethylalcohol (9,78 %), 2-methylpropenal (7,11 %), n-hexanal (4,81 %), trans-pentenal (4,26 %) ethylalcohol (3,87 %) and nonanal (3,23 %). Antimicrobial activity of CO₂ extract against various pathogenic and provisionally pathogenic bacteria, yeasts and moulds was evaluated, but the extract was antimicrobially inactive.

Keywords: Chemical composition, CO₂ extract of linden, antimicrobial activity.

ВЪВЕДЕНИЕ

Липата (*Tilia* sp.) е многогодишно дърво от сем. *Tiliaceae*, което се среща по паркове и градини в много страни на света. В Европа има около 35 вида липа, но най-често разпространени се следните четири: едролитна (широколитна или холандска) липа (*Tilia grandiflora* Ehrh. = *T. platyphylla* Scop. = *T. macrophylla* Vent.); дребнолитна (сърцевидна или дива) липа (*Tilia europea* L. = *T. cordata* Mill. = *T. parviflora* Ehrh. = *T. sylvestris* Desf. = *T. ulmifolia* Scop.); сребролитна (бяла или унгарска) липа (*Tilia tomentosa* Moench. = *T. argentea* Desf. ex D.C. = *T. alba* L.) и *Tilia intermedia* D.C. = *T. vulgaris* Hayne [6].

В нашата страна из гористите и каменливи склонове, в предпланинския и планинския долен пояс, основно се срещат едролитна (*T. platyphylla* Scop.) и дребнолитна липа (*T. cordata* Mill.). В парковете и градините, като

декоративно дърво, повече е разпространена сребролистната липа (*T. argentea* Desf. ex D.C) [1].

Липовият цвят намира приложение в народната медицина, под формата на отвари и запарки, при възпаления на горните дихателни пътища, което се дължи на съдържащите се етерично масло, флавоноиди, сапонини, дъбилни и др. вещества [1, 3, 5, 6].

Количеството на етерично масло в цветовете е до 0,06 %, като съставът му зависи от различни фактори – биологични, почвено-климатични и технологични. Например, маслото, получено чрез водна дестилация от цветовете и прицветниците на сребролистна липа, отглеждана в Турция, е богато на естери, 34,8 % и 27 %, съответно [16], докато в Гърция - на линалол 13,1 % и хексахидрофарнезил ацетон 17,7 %, и е с доказана антимикробна активност [10].

От цветовете на сребролистната липа, чрез екстракция с петролев етер, е получен и ароматичния продукт конкрет (добив 0,32 %) [11].

Известно е, че втечените газове (бутан, пропан, CO₂ и фреони) са по-селективни разтворители в сравнение с използваните в етеричномаслената промишленост, по отношение на ароматичните компоненти и извличат по-малко баластни вещества [4]. В досъпната литература има само едно съобщение от Vidal и Richard [17], които получават CO₂-екстракт от цвят на дребнолистна липа (*Tilia cordata* Mill.) с основен компонент, от идентифицираните 14 компонента - дибутилфталат (11,8 %).

Няма данни за преработка на цвят от сребролистна липа чрез екстракция с CO₂, което е и цел на настоящото изследване.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Изследвани са цветове с прицветници от сребролистна липа (*Tilia tomentosa* Moench.), брани през м. юни на 2007 г. в района на град Димитровград, като идентификацията на вида на растението по морфологични белези [2]. Преработваната суровина е с влажност 68 %, определена чрез ацеотропна дестилация [7].

Получаване на екстракт от липа: Проведена е екстракция с въглероден диоксид при следните технологични параметри: налягане в екстрактора 68 - 72 atm; температура на процеса – 28 - 32 °C; продължителност 180 min, обем на екстрактора 5 dm³. От ароматичния продукт чрез екстракция с етилов алкохол е получено абсолю [7].

Химичен състав на екстракт от липа

GC анализ: апарат Agilent 7890A с пламъчно-йонизационен детектор; колона HP-INNOWax Polyethylene Glycol (60 mx0,25 mm; филм 0,25 µm); температурни условия: 70 °C – 10 min, 70-240 °C – 5 °C/min, 240 °C – 5 min; 240-250 °C - 10 °C/min, 250 °C – 15 min; газ носител хелий, 1 ml/min constant flow; инжектор: split, 250 °C, split ratio 50 : 1.

MS/GC анализ: апарат Agilent 5975 С, газ носител хелий, колона и температурни условия, както при GC анализа; детектори: FID, 280 °С, MSD, 280 °С transfer line.

Антимикробна активност на екстракт от липа

Тест микроорганизми: Gram-положителни бактерии - *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Bacillus cereus*, *Citrobacter diversus*, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus epidermidis*; Gram-отрицателни бактерии - *Escherichia coli* ATCC 8739, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens* и *Pseudomonas putida*, дрожди - *Candida albicans* и *Candida tropicalis*. Всички използвани микробни култури се съхраняват в микробната културална колекция на катедра „Биохимия и микробиология“ на ПУ „П. Хилендарски“.

Получаване на посевна култура: За получаване на посевна култура от изследваните бактерии, 2 mL МПБ се инокулират с 2-3 колонии от 24 часови култури на съответния бактериален тест микроорганизъм, развит на полегат агар. Епруветките с течна среда се култивират в термостат при 37°C за 18-20 часа до достигане на оптическа плътност, визуално отговаряща на стандарт 0.5 на McFarland ($1.0/1.5 \times 10^8$ CFU/mL). При необходимост, посевната култура се разрежда със стерилен МПБ, до достигане на желания титър клетки. Посевната култура от дрождевите тестове се поучава по аналогичен начин, като се използва среда на Сабуро, а култивирането се провежда при 28°C за 48 часа [8].

Дисков Агар Дифузионен Тест (ДАДТ): ДАДТ се провежда по метода описан от Sacchetti et al. [15], съгласно препоръките на National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) [12].

Метод на серийните разреждания (MCP): MCP се провежда съгласно методиката на Hili et al. [9], в съответствие с препоръките на NCCLS [13, 14].

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

СО₂ екстрактът (добив 1,0 % спрямо абс.с.в. на суровината) представлява светлокафява вискозна маса. Абсолютото (добив 12,2 %, спрямо екстрактът) е тъмно оцветена маса с характерния мирис на липов цвят. Химичният състав на абсолютото е представен на табл. 1. От данните се вижда, че са идентифицирани 36 компонента, което е 91,53 % от общия състав. Основните компоненти (над 3 %) са: benzaldehyde (14,20 %), phenylethylalcohol (9,78 %), 2-methylpropenal (7,11 %), n-hexanal (4,81 %), trans-pentenal (4,26 %) ethylalcohol (3,87 %) and nonanal (3,23 %). Разпределението на идентифицираните компоненти по групи съединения е: алифатни кислородсъдържащи – 50,75 %, ароматни кислородсъдържащи – 25,89 %, карбонови киселини, естери и алдехиди – 9,48 %, монотерпенови въглеводороди – 2,67 %, аминок-алкохоли – 1,16 % и алифатни въглеводороди – 0,61 %.

Известно е, че етеричното масло от липа (*Tilia cordata* Mill.), с основен компонент tricosane (31,3 %), проявява антимикробна активност [10].

Полученото от CO₂ екстракт абсолю, съдържащо предимно алдехиди, не действа върху изследваните тест-микроорганизми. Това се обяснява с химичния състав, който е различен от този на етеричното масло.

Таблица 1. Химичен състав на CO₂-екстракт от цвят с прицветници на сребролистна липа (*Tilia tomentosa* Moench.)

№	Компонент	Съдържание, %
1	Propanal	1,38
2	Acetone	2,11
3	2-Methylpropenal	7,11
4	Ethyl alcohol	3,87
5	Pentanal (Valeraldehyde)	2,83
6	1-Penten-3-one	2,13
7	trans-2-Butenal	1,90
8	n-Hexanal	4,80
9	trans-2-Pentenal	4,26
10	Heptanal	1,01
11	Limonene	2,67
12	trans-2-Hexenal	2,08
13	Octanal	1,36
14	trans-2-Heptenal	1,69
15	6-Methyl-5-heptene-2-one	2,77
16	Hexanol	0,66
17	cis-3-Hexenol	0,98
18	Nonanal	3,23
19	2,6-Dimethyl-2,6-octadiene	0,60
20	trans-2-Octenal	0,74
21	1-Octen-3-ol	0,64
22	Acetic acid	1,62
23	trans-2-trans-4-Heptadienal	1,87
24	2,4-Heptadienal	1,80
25	Benzaldehyde	14,20
26	Octanol	1,51
27	Caryophyllene	0,97
28	2-Methylbutyric acid	0,60
29	Valeric acid	0,44

30	Dimethylmaleic acid anhydride	0,96
31	Hexanoic acid	2,88
32	Benzyl alcohol	1,91
33	Phenyl ethyl alcohol	9,78
34	trans-3-Hexenoic Acid	0,78
35	trans-2-Hexenoic Acid	2,20
36	2-Amino-1-butanol	1,16
Общо		91,53
Алифатни въглеводороди		0,61
Алифатни кислородсъдържащи		50,75
Карбонови киселини, естери и алдехиди		9,48
Монотерпенови въглеводороди		2,67
Сескитерпенови въглеводороди		0,97
Ароматни кислородсъдържащи		25,89
Амино-алкохоли		1,16

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

СО₂-екстрактът от цветовете на сребролистна липа (*Tilia cordata* Mill.) съдържа основно алдехиди и не проявява антимикробна активност спрямо изследваните тест-микроорганизми.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ахтарджиев Х., Й. Бенбасат – Фармакогнозия, София, Изд. „Медицина и физкултура“, 1985.
2. Делипавлов Д., М. Попова, И. Ковачев, Д. Терзийски, И. Чешмеджиев, Д. Граматиков – Определител на растенията в България, София, „Земиздат“, 1983.
3. Иванов И., И. Ланджев, Г. Нешев – Билките в България и използването им, София, „Земиздат“, 1971, 126–127.
4. Ненов Н. – Екстракция на растителни суровини с втечнени газове, Научни трудове УХТ, т. 53, 2006, св. 2, 195–200.
5. Петков В. – Съвременна фитотерапия, София, „Медицина и физкултура“, 1982.
6. Стефанов Г., М. Матев, И. Чакърски, И. Ангелова – Клинично проучване на билковия чай Кратаген при лечение на болни с хипертонични болести, Проблеми на вътрешната медицина, т. 11, 1983, кн. 3, 25–30.
7. Стоянова А., Е. Георгиев, Т. Атанасова – Ръководство за лабораторни упражнения по етерични масла, Пловдив, Акад. Изд. УХТ, 2007.

8. European Committee on Antibiotic Susceptibility. Method for determination of MIC by broth dilution method, ED 7.1, Germany, European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2002.
9. Hili P., Evans, C.S., Veness, R.G, Antimicrobial action of essential oils: effect of DMSO on the activity of cinnamon oil, *Lett Appl Microbiol*, v. 24, 1997, 269–275.
10. Fitsio I., O. Tzakou, M. Hancianu, A. Poiata – Volatile constituents and antimicrobial activity of *Tilia tomentosa* Moench and *Tilia cordata* Miller oils, *Journal of Essential Oil Research*, v. 19, 2007, March/April, 183.
11. Naves Y-R. – Technologie et chimie des parfums naturels, Paris, Masson & Cie, Editeurs, 1974, 219–220
12. National Committee Clinical Laboratory Standards. Performance Standards for Antimicrobial Disc Susceptibility Test. Approved Standard. NCCLS Publication M2-A5, Villanova, PA, USA 1999.
13. National Committee Clinical Laboratory Standards. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically. Approved Standard. NCCLS Publication M7-A2, Villanova, PA, USA 1990.
14. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution and fungal susceptibility testing of yeast. Approved standard, NCCLS Publication M27-A2. Wayne PA, USA 2002.
15. Sacchetti, S. Maietti, M. Muzzoli, M. Scaglianti, S. Manfredini, M. Radice, R. Bruni, Evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chemistry*, v.91, 2005, 621–632.
16. Toker G., K. Baser, M. Kürkçüoğlu, T. Özek – The composition of essential oils from *Tilia* L. species growing in Turkey, *Journal of Essential Oil Research*, v. 11, 1999, May/Jun, 369–374.
17. Vidal J., H. Richard – Characterization of volatile compounds in linden blossoms *Tilia cordata* Mill., *Flavour and Fragrance Journal*, v. 1, 1986, № 2, 57–62.