Химичен състав и антимикробни свойства на ароматични продукти от листа и плодове на два вида глог (*Crataegus* ssp.)

Павел Мерджанов, Mehmet Ergezen, Яна Христова,
Станка Дамянова, Илиана Костова, Теодора Атанасова, Албена Стоянова

Chemical composition and antimicrobial activity of aromatic products from leaves and fruits from two species of hawtorn (Crataegus ssp.): *The content of polyphenols – flavonoids, phenolic acids and quercetin glycosides, in concrete and resinoids obtained from leaves and fruits of two hawthorn species - Crataegus monogyna and C. orientalis* was determined. *It was found that in concrete, irrespective of species and processed plant part, no quercetin glycosides were detected. It was also examined the antimicrobial activity of the two aroma products against Gram-positive and Gram-negative bacteria and yeast. Resinoids obtained from the leaves of both species exhibited poor antimicrobial activity against the investigated test cultures, still more pronounced with respect to Gram-positive bacteria. Those products were also active against the tested yeast cultures. Concretes, with the exception of that obtained from fruit of the species C. orientalis did not reveal any antimicrobial activity.*

Key words: *Crataegus monogyna, C. orientalis, aromatic products, chemical composition, antimicrobial activity.*

ВЪВЕДЕНИЕ

Глогът е растение от сем. Розоцветни (*Rosaceae*) и включва между 140 и 200 вида, хибриди и вариетети [3, 7, 15]. Растенията се срещат из храсталаците и разредените гори на много страни от всички континенти [1].

В РБългария са известни шест вида глог – обикновен (*Crataegus monogyna* Jacq), дребнолистен (*C. microphylla* C. Koch), насеченолистен (*C. rhipidophylla* Gand (*C. curvisepala*)), черен (*C. pentagyna* Walds. and Kit. ex Willd.), източен (*C. orientalis* Pallas ex Bieb. (*C. laciniata*)) и ориенталски (*C. heldreichii* Boiss.). Най-масово разпространен е първият вид. Растенията виреят в цялата страна до 1500 m надморска височина [1, 3].

В РТурция има около 35 вида глог, с много хибриди и популации, но най-често се срещат видовете обикновен и източен. Отделните видове глог се различават по морфологични белези, най-вече по формата и големината на листата, както и по окраската на плодовете, например при вида *C. pentagyna* те са черни или черновиолетови; при *C. tanacetifolia* - жълти, понякога червени; при *C. orientalis* – червеникаво-оранжеви; при *C. pontica* – жълти до оранжеви; при *C. atrosenduinea* – тъмно червени; при *C. curvisepala* – тъмновиолетови; при *C. stevenii* – червени; при *C. monogyna* – червени или кафяво-червени; при *C. microphylla* – светло червени и т.н. [8, 9].

Листата и плодовете на различните видове глог съдържат разнообразни класове биологично-активни вещества [1, 16, 17]. Поради това се използват с лечебна цел в народната и официалната медицина, от тях се приготвят различни екстракционни продукти - тинктура, запарка, отвара и др. [1].

Получени са и различни сухи екстракти, обогатени на биологично-активни вещества за приложение в медицината [4, 6, 12] и в козметиката [5].

В предишни наши изследвания от листа и плодове на двата вида глог – *C. monogyna* и *C. orientalis* са получени екстракционните ароматични продукти конкрет и резиноид, изчислен коефициентът на молекулна дифузия [18, 19], определени са и някои физични показатели [11].

Обект на настоящата работа е определяне на химичния състав и антимикробната активност на тези два ароматични продукта с оглед приложението им козметиката.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Получени са ароматичните продукти конкрет и резиноид от листа и плодове на вида глог, виреещи в Р България и РТурция [10, 11].

Химичен състав на ароматичните продукти

Съдържанието на флавоноиди, фенолни киселини и гликозиди е определено чрез HPLC на апарат Krisi_Lee Et Al 20009 UA1 с UV детектор, колона с обратна фаза (C_{18}) температура 26 ^{O}C, подвижна фаза 2 % оцетна киселина : метилов алкохол = 1 : 1, градиентен режим. Анализът е провеждан при 250 nm дължина на вълната. Идентификацията е извършена чрез използване на стандарти.

Антимикробна активност на ароматичните продукти

Антимикробната активност на изследваните продукти е определена спрямо някои бактериални и дрождеви видове, които са от най-често срещаната микрофлора по кожата, хранителни и козметични продукти [2]. Използвани са Gram-положителните бактерии *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P и *Staphylococcus aureus* (хранителен изолат), Gram-отрицателните бактерии *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027*, Esherichia coli* ATCC 8739, *Salmonella abony* NCTC 6017, *Pseudomonas aeruginosa* (хранителен изолат), *Salmonella abony* (клиничен изолат), дрождите *Candida albicans* ATCC 10231 и *Candida albicans* (клиничен изолат). Референтните тест-култури са получени от Национална банка за промишлени микроорганизми и клетъчни култури, София. Всички култури са депозирани в микробната културална колекция на катедра „Биохимия и микробиология" при Биологическия Факултет на ПУ „П. Хилендарски", Пловдив.

Получаване на посевна култура: Две-три характерни колонии от 24 h култури на съответния бактериален тест-микроорганизъм, развит на полегат агар, са суспендирани инокулирани в 2 cm^3 месо-пептонен бульон. Посевната култури от дрождевите щамове е подготвена по аналогичен начин, но вместо месо-пептонен бульон е използван бульон на Сабуро с хлорамфеникол.

Епруветките с течна среда са култивирани в термостат при 37 ^{O}C за 18 – 20 h до достигане на мътност, визуално отговаряща на стандарт 0,5 на McFarland (1,0/1,5.10^8 cfu/cm^3). При необходимост, посевната култура е разреждана със стерилен месопептонен бульон, до достигане на желания титър клетки.

Дисков Агар Дифузионен Тест: Проведен е съгласно препоръките на National Committee Clinical Laboratory Standards (NCCLS) [13, 14]. В стандартно петриево блюдо са разляти по 15 cm^3 месопептонен агар. Втвърдената и подсушена среда е инокулирана със 100 µL инокулат. Стерилни хартиени дискове (d = 5 mm) са поставени върху инокулираната среда, импрегнирани с 20 µL 1 % (w/v) разтвор от изследваната проба в диеметилсулфоксид. Пробите са култивирани в термостат при 37 ^{O}C за 24 h.

Всички представени резултати са средноаритметична стойност от три паралелни експеримента.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Отделните представители на групите съединения, съдържащи се в конкретите и резиноидите са показани на табл. 1. От данните се вижда, че и при двата продукта, независимо от вида на суровината и преработвания растителен орган, не се открива галова киселина, а количествата на другите представители варира. От групата на фенолните киселини - хлорогенова, ванилинова и кафеена са идентифицирани само в резиноидите, получени от листата и на двата вида. 2-хидроксибензоена и 3,4-дихидрокси бензоена киселина са открити само в резиноида, получен от листата на вида *C. monogyna,* като втората фенолна киселина е открита и в конкрета, получен от плодовете на същия вид. От идентифицираните фенолни киселини най-високо е съдържанието (над 3,5 µg/mg) на хлорогеновата киселина, следвано от синапената,

2-хидроксибензоената, кафеената и 3,4-дихидроксибензоената. Всички те са идентифицирани в резиноид от листа на вида *C. monogyna.*

От групата на флавоноидите апигенин е идентифициран само в конкрет от плодове на вида *C. monogyna.* Във всички продукти, независимо от вида на суровината и преработваната растителна част, съдържанието на мирецетин е най-високо (над 4,0 μg/mg). Количествата на останалите представители от флавоноидите варира.

От групата на кверцетин гликозидите най-високо е съдържанието на рутин в резиноида от листа на вида *C. orientalis,* докато на хиперозид – при вида *C. monogyna.*

Разликата в количеството на идентифицираните съединения с тези, посочени в литературата [4, 15] се дължи на видови особености и произход на суровината, както и на използвана методика за определянето им.

Разпределението на основните полифенолните съединения в конкретите и резиноидите е представено на фиг. 1. От данните се вижда, че при резиноидите, независимо от вида на суровината и преработваната растителна част се срещат и трите групи представители - флавоноиди, фенолни киселини и кверцетин гликозиди, докато при конкретите не е установено наличие на последните.

Таблица 1

Съдържание на полифенолни съединения в ароматични продукти.

Компонент, μg/mg	Конкрет				Резиноид			
	C. monogyna		*C. orientalis*		*C. monogyna*		*C. orientalis*	
	листа	плодове	листа	плодове	листа	плодове	листа	плодове
Gallic acid	-*	-	-	-	-	-	-	-
3,4-diOH Benzoic acid	-	2,26	-	-	3,50	-	-	-
2-OH Benzoic acid	-	-	-	-	6,01	-	-	-
Chlorogenic acid	-	-	-	-	13,19	-	2,68	-
Vanillic acid	-	-	-	-	2,53	-	1,29	-
Cafeeic acid	-	-	-	-	3,81	-	6,23	-
Syringic acid	-	-	-	-	0,96	1,55	0,95	-
p-Coumaric acid	0,25		-	0,28	3,04	0,06	1,66	-
Sinapic acid	1,32	1,65	1,01	1,14	8,14	2,51	6,13	2,25
Ferulic acid	0,48	0,99	0,79	1,33	1,46	0,70	1,33	0,88
Cinnamic acid	0,18	0,83	0,44	0,426	0,45	0,17	0,15	0,40
Myricetin	4,58	4,58	4,72	4,61	5,80	4,52	4,76	4,55
Hesperidine	3,45	3,83	4,43	3,48	3,40	-	2,92	2,90
Quercetin	2,50	2,60	2,65	2,54	3,56	2,52	2,57	2,61
Luteoline	0,69	-	-	1,06	0,50	-	0,37	0,39
Kaempferol	1,52	1,76	1,69	1,06	1,51	-	1,43	1,45
Apigenin	-	0,14	-	-	-	-	-	-
Rutin	-	-	-	-	4,56	1,34	21,97	1,18
Hyperosid	-	-	-	-	10,26	2,76	13,98	1,12

* не е установено наличие.

При конкретите от листата на двата вида съдържанието на флавоноиди и фенолни киселини е близко. Продуктът, получен от плодове на вида *C. monogyna* е по-богат на флавоноиди, като тяхното количество е 1,2 пъти по-високо в сравнение с конкрета, получен от плодове на вида *C. orientalis.*

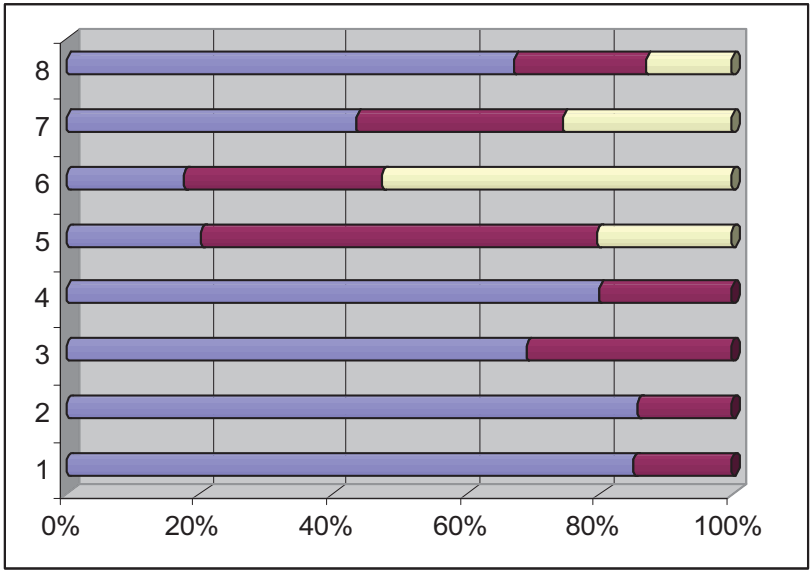
Най-високо е съдържанието на фенолните киселини в резиноида, получен от листа на вида *C. monogyna,* докато при вида *C. orientalis* тяхното количество е два пъти по-ниско. В резиноида от плодове на вида *C. orientalis* установените кверцетин

гликозиди са два пъти повече в сравнение с вида *C. monogyna.* По-голямото разнообразие на отделните групи полифеноли при резиноидите се обяснява със селективността на използвания разтворител – етилов алкохол.

Резултатите за антимикробната активност на конкретите и резиноидите са представени в табл. 2. От данните се вижда, че резиноидите, получени от листата на двата вида проявяват слаба антимикробна активност спрямо изследваните тест-култури, по-силно изразена спрямо Gram-положителните бактерии. Те са активни и спрямо изследваната култура дрожди.

При конкретите не е установена антимикробна активност, с изключение на получения от плодове на вида *C. orientalis*.

Конкретите и резиноидите съдържат багрила, восъци и смоли, които не са активни спрямо тест-микроорганизмите. В тях не е установено наличие на ароматични вещества, които проявяват антимикробна активност.



Фигура 1. Разпределение на полифенолни съединения в ароматични продукти:
1 – конкрет от листа на вида *C. monogyna*
флавоноиди (85,1 %), фенолни киселини (14,9 %)
2 – конкрет от листа на вида *C. orientalis*
флавоноиди (85,8 %), фенолни киселини (14,2 %)
3 – конкрет от плодове на вида *C. monogyna*
флавоноиди (69,0 %), фенолни киселини (31,0 %)
4 – конкрет от плодове на вида *C. orientalis*
флавоноиди (80,1 %), фенолни киселини (19,9 %)
5 – резиноид от листа на вида *C. monogyna*
флавоноиди (20,3 %), фенолни киселини (59,3 %), гликозиди (20,4 %)
6 – резиноид от листа на вида *C. orientalis*
флавоноиди (17,6 %), фенолни киселини (29,9 %), гликозиди (52,5 %)
7 – резиноид от плодове на вида *C. monogyna*
флавоноиди (43,6 %), фенолни киселини (31,0 %), гликозиди (25,4 %)
8 – резиноид от плодове на вида *C. orientalis*
флавоноиди (67,1 %), фенолни киселини (19,9 %), гликозиди (13,0 %)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ароматичните продукти – конкрет и резиноид, получени от листата и плодовете на видовете *C. monogyna* и *C. orientalis* съдържат различни групи полифенолни съединения. В конкретите, независимо от вида на глога и преработвана растителна част липсват кверцетин гликозиди.

Резиноидите са с по-изразена антимикробна активност, поради което представляват интерес като суровина за различни козметични препарати, обект на следващи наши изследвания.

Таблица 2

Антимикробна активност на ароматични продукти.

Тест-култура	Диаметър на инхибиторна зона, mm							
	От вида *C. monogyna*				От вида *C. orientalis*			
	конкрет		резиноид		конкрет		резиноид	
	листа	плодове	листа	плодове	листа	плодове	листа	плодове
E. coli ATCC 8739	-*	-	7,2	-	-	7,0	7,0	-
E. coli - изолат	-	-	7,0	-	-	7,0	7,0	-
S. abony NCTC 6017	-	-	7,0	-	-	7,0	7,0	-
S. abony - изолат	-	-	7,0	-	-	7,0	7,0	-
S. aureus ATCC 6538	-	-	8,5	-	-	8,2	8,0	-
S. aureus - изолат	-	-	8,2	-	-	8,0	8,0	-
P. aeruginosa ATCC 9027	-	-	-	-	-	-	-	-
P. aeruginosa - изолат	-	-	-	-	-	-	-	-
C. albicans ATCC 10231	-	-	7,2	-	-	7,0	7,0	-
C. albicans - изолат	-	-	7,0	-	-	7,0	7,0	-

* - няма зона

ЛИТЕРАТУРА

[1] Ахтарджиев Х., Й. Бенбасат. Фармакогнозия, София, Изд. “Медицина и физкултура”, 1985.

[2] Гирова Т., В. Гочев. Ръководство по микробиологичен контрол на храни, Пловдив, КСИ, 2007.

[3] Делипавлов Д., И. Чешмеджиев, М. Попова, Д. Терзийски, И. Ковачев. Определител на растенията в България, Пловдив, Акад. Изд. АУ, 2003.

[4] Зинченко Л. Изучение промышленных отходов фармацевтического производства как дополнительных источников биологически активных соединений (на примере шрота плодов боярышника и шрота листьев мяты), Автореферат диссертации, к.т.н., Пятигорск, 2007.

[5] Стоянова М. Изследване съдържанието на биологично активни вещества в екстракти от плодове на сем. Розоцветни, Дисертация, д-р, УХТ, Пловдив, 2013.

[6] Arslan R., Z. Bor, N., Bektaş, A. Meriçli, Y. Öztürk. Antithrombotic effects of ethanol extract of *Crataegus orientalis* in the carrageenan-indiced mice tail thrombosis model, Thrombosis Research, v. 127, 2011, № 3: 210 - 213.

[7] Beigmohamadi M., F. Rahmani. Genetic variation in hawthorn (*Crataegus* spp.) using RAPD markers. African Journal of Biotechnology., v. 37, 2011, № 10: 7131 – 7135.

[8] Dönmez A. The genus *Crataegus* L. *(Rosaceae)* with special reference to hybridization and biodiversity in Turkey. Turkish Journal of Botany, v. 28, 2004, 29 – 37.

[9] Ercisli S. A short review of the fruits germplasm resources of Turkey. Genetic Resources and Crop Evolution, v. 51, 2004, 419 – 435.

[10] Ergezen M., П. Мерджанов, М. Стоянова, И. Дюлгерова, С. Дамянова, Н. Начева, А. Стоянова. Сравнително физико-химично изследване на дроги от глог (*Crataegus* L.), Научни трудове УХТ., т. 59, 2012, 119 – 122.

[11] Ergezen M., П. Мерджанов, Н. Начева, А. Стоянова. Получение экстрактов из листьев и плодов боярышника, Сборник материалы Первая международная студенческая научно-практическая конференция "Студенчество в науке – инновационный потенциал будещуго", 12,04.2013, Набережные Челны, Республика Татарстан, 16 – 17.

[12] Li C., W. Han, M.-H. Wang. Antioxidant activity of hawthorn fruit *in vivtro.* Journal of Applied and Biology Chemistry, v. 53, 2010, № 1: 8 – 12.

[13] National Committee Clinical Laboratory Standards, Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved Standard, 1990, NCCLS Publication M7-A2, Villanova, PA, USA.

[14] National Committee Clinical Laboratory Standards, Performance Standards for Antimicrobial Disc Susceptibility Test. Approved Standard, 1999, NCCLS Publication M2-A5, Villanova, PA, USA.

[15] Phipps J. *Crataegus* – a nomenclator for sectional and serial names, Taxonomy, v. 32, 1983, 598 – 604.

[16] Śamec D., J. Piljac-Źegarac. Postharvest stability of antioxidant compounds in hawthorn and cornelian cherries at room and refrigerator, temperatures – Composition with blackberries, white and red crapes. Scientia Horticulturae,, v. 131, 2011, 15 - 21.

[17] Svedström U., H. Vuorela, R. Kostiainen, I. Laakso, R. Hiltunen. Fractionation of polyphenols in hawthorn into polymeric procyanidins, phenolic acids and flavonoids prior to high-oerformance liquid chromatographic analysis. Journal of Chromatography A., v. 1112, 2002, 103 – 111.

[18] Tasheva S., S. Damianiova, M. Ergezen, P. Merdzhanov, A. Stoyanova. Coefficient of diffusion of aromatic extraction products from hawthorn (*Crataegus monogyna* Jaqc.). Journal of EcoAgriTourism., v. 8, 2012, № 2: 255 - 258.

[19] Tasheva S., S. Damianova, M. Ergezen, P. Merdzhanov, A. Stoyanova. Coefficient of diffusion of aromatic products from hawthorn (*Crataegus orientalis* Pall. ex. Bieb.), International Conference "Modern Technologies in the Food Industry – 2012", Chisinau, Republic of Moldova, 1 – 3 November 2012, v. II, 181 - 186.

За контакти:

инж. Павел Атанасов Мерджанов, катедра „Технология на тютюна, захарта, растителните и етерични масла, УХТ-Пловдив, тел.: 032/603-895, e-mail: pmerdzhanov@abv.bg

Mehmet Kaya Ergezen, катедра „Технология на тютюна, захарта, растителните и етерични масла, УХТ-Пловдив, тел.: 032/603-725, e-mail: kimyager_mehmet@mynet.com

Яна Михайлова Христова, катедра „Биохимия и микробиология", ПУ „П. Хилендарски"-Пловдив, тел.: 032-261493, e-mail: ianita_85@abv.bg

доц. д-р Станка Тодорова Дамянова, катедра „Биотехнологии и хранителни технологии", Русенски университет „А. Кънчев" Филиал – Разград, тел. 084 521935, e-mail: sdamianova@uni-ruse.bg

гл. ас. д-р Илиана Иванова Костова, катедра „Биотехнологии и хранителни технологии", Русенски университет „А. Кънчев" Филиал – Разград, тел. 084 520004, e-mail: ikostova@uni-ruse.bg

доц. д-р Теодора Димитрова Атанасова, катедра „Технология на тютюна, захарта, растителните и етерични масла, УХТ-Пловдив, тел.: 032/603-725

проф. дтн Албена Стоянова Стоянова, катедра „Технология на тютюна, захарта, растителните и етерични масла, УХТ-Пловдив, тел.: 032/603-725, e-mail: aastst@abv.bg.

Докладът е рецензиран