

ДОСЛІДЖЕННЯ СКЛАДУ ЛІПОФІЛЬНИХ СПОЛУК В ДИФТОРХЛОРЕТАНОВИХ ЕКСТРАКТАХ СУЦВІТЬ ЛИПИ

Ключові слова: екстракція, суцвіття липи, терпеноїди, ефірні олії, зріджені гази, газорідинна хроматографія

Нині однією з найактуальніших проблем вітчизняної фармації є розробка нормативно-технічної документації на лікарську рослинну сировину (ЛРС) та фітопрепарати на її основі, зокрема введення до Державної фармакопеї України (ДФУ) відповідних монографій. Так, незважаючи на те, що для медичного застосування дозволено понад 200 видів ЛРС, до ДФУ 1.2 й 1.3 увійшло лише 20 та 22 монографії відповідно, у той час, як Європейська фармакопея 4-го видання (EP 4) вже містила понад сто монографій на ЛРС [1, 2, 4, 8]. Основними причинами цього є багато розбіжностей між вимогами до сировини і методиками аналізу, наведеними в EP та нормативній документації (НД), розробленій в Радянському Союзі (ГФ XI, ГОСТи, ТУ). Крім того, в 90-х роках, коли в Україні почався стрімкий спад виробництва фітопрепаратів, наукові дослідження в цьому напрямі майже не проводилися. Однак, нині існує гостра потреба в створенні та впровадженні нової НД на сировину, базуючись на європейських вимогах, з одного боку, та з урахуванням національних особливостей, з другого, хоча це складний, тривалий і коштовний процес [2, 4].

Аналізуючи монографії на ЛРС в Європейській фармакопеї та ДФУ 1.2, 1.3, можна констатувати, що переважна більшість з них містить розділ «Кількісне визначення діючих речовин». Лише в монографії «Липи квітки» методики кількісного визначення зовсім відсутні, а корені алтею та листя бобівника трилистого стандартизуються опосередковано за показниками набухання та гіркоти відповідно [2]. Очевидно, що така ситуація викликана недостатністю даних про речовини, які відповідають за певний фармакологічний ефект, або відсутністю експериментальних досліджень щодо їх кількісного аналізу.

Як відомо, основними групами біологічно активних речовин (БАР) суцвіть липи є фенольні сполуки, сапоніни та ефірні олії; останні, в свою чергу, містять вуглеводні, терпеноїди, фенолоспирти, складні ефіри, карбонільні сполуки і т.д. [3, 6, 9, 11].

При аналізі компонентів ефірних олій найчастіше застосовують газову або газорідинну хроматографію (ГХ та ГРХ), рідше тонкошарову (ТШХ). Так, наприклад, у дослідженнях [10] методом ТШХ на пластині із силікагелем (Fluka) було виявлено 17 кисневмісних терпеноїдів – похідних гераніюлу. Авторами [7] за допомогою ГХ з мас-спектрометричним детектуванням (МСД) виявлено 41 компонент ефірної олії із суцвіть *Galium verum*, серед яких 9 терпеноїдів, 5 ароматичних сполук та 4 жирні кислоти. У роботі [5] доведено ефективність ГРХ з МСД при вивченні складу ефірної олії евкалипту, в якій ідентифіковано 22 терпеноїдні сполуки.

Згідно з даними [3], в ефірній олії суцвіть липи серцелистої міститься 88 компонентів, 16 з яких – у кількості понад 1%, причому останні здебільшого мають терпеноїдну структуру. Автори [6] вказують на значні варіації кількісного складу ефірних олій, одержаних з різних видів лип. Так, аліфатичні алкани становлять 37,4–60%, фенілетанол та його складні ефіри (сумарно) – від 1% до 39%, гераніол – 1,1–9,3%, евгенол – 0,5–5,0%, фарнезол – 0,3–5,2% від маси ефірної олії, а в зразку, виділеному з *Tilia cordata*, домінуючими є алкани (близько 60%), а не терпени.

Слід зазначити, що в усіх вищенаведених дослідженнях ефірні олії та терпеноїди були одержані гідродистиляцією, рідше екстракцією органічним розчинником. Лише єдине серед знайдених нами літературних джерел [9] присвячене вивченню хімічного складу ліпофільних тетрафторетанових (фреонових-134) екстрактів із суцвіть нефармакопейного виду *Tilia tomentosa*.

Отже, враховуючи, що ми вперше одержали за новою технологією дифторхлорметанові екстракти із суцвіть липи серцелистої *Tilia cordata*, метою даної роботи є дослідження складу ліпофільних сполук у зазначених об'єктах.

Матеріали та методи дослідження

Вихідною сировиною в даних дослідженнях були суцвіття липи серцелистої, заготовлені в Рівненській області у 2008 році. Ступінь їх подрібнення становив 0,5–2,0 мм, вологість – 8,2–8,3 %.

Екстрагування зрідженим дифторхлорметаном (фреоном-22) проводили на створеній нами дослідній установці з двома перколяторами в такому технологічному режимі: кількість етапів екстракції – 2, співвідношення сировина : екстрагент на кожному етапі – 1:7,5; перемішування рідкої фази здійснювалося за рахунок поперемінного градієнта температури між перколяторами; температура в одному перколяторі – 30–35 °С, у другому – 40–45 °С; тривалість мацерації – 60 хв, зливу – 50 хв; кількість циклів перемішування – 22 по 5 хв кожний. У результаті одержували екстракт жовто-зеленого кольору з інтенсивним ароматним запахом (зразок № 1), вихід становив 2,56 % у перерахунку на абсолютно суху сировину.

В аналогічних умовах також екстрагували шрот після попередньої обробки вихідної сировини зрідженим тетрафторетаном (фреоном-134), яку здійснювали при температурі 40°С та співвідношенні сировина : екстрагент 1:8 протягом 165 хв. Одержували екстракт (зразок № 2), що за органолептичними характеристиками був близький до зразка № 1. Вихід – 2,45 % від маси сировини.

Точні наважки по 0,25 г вищезазначених зразків № 1 і № 2 розчиняли у 15 мл 96 % етанолу, фільтрували в мірні колби місткістю 25 мл, промивали фільтри спиртом та доводили об'єм розчинів до мітки (зразки 1с та 2с). Залишки на фільтрах змивали хлороформом у мірні колби на 25 мл та доводили об'єм до мітки зазначеним розчинником (зразки 1х та 2х).

По 1 мкл вищезазначених розчинів вводили в інжекторний блок газового хромато-мас-спектрографа фірми «Agilent Technology 6890» (США), який складається з хроматографа марки HP6890-GC та мас-селективного детектора 5973N. Ліпофільні сполуки розділяли на кварцовій капілярній колонці марки HP 19091J-433 HP-5 завдовжки 30 м та внутрішнім діаметром 0,25 мм, заповненій 5% фенілметилсилоксаном.

Температуру термостата програмували від 50°С до 250°С зі швидкістю 4°С/хв. Температура інжектора становила 250°С. Газ носій – гелій зі швидкістю потоку 1 мл/хв. Перенесення від ГРХ до мас-спектрометра відбувалося при температурі 230°С. Температуру детектора та випаровувача підтримували на рівні 200°С.

Електронну іонізацію проводили при 70 eV в діапазоні мас від m/z 29 до 450 а.о.м. Ідентифікацію сполук здійснювали на основі порівняння одержаних мас-спектрів з даними бібліотек NIST 05-Wiley та «Flavor 2» (близько 500 000 мас-спектрів). Як внутрішній стандарт використовували пентадекан.

Кількісний вміст кожної виявленої сполуки у відсотках від маси наважки зразка визначали за площею відповідних піків, враховуючи, що 1000 000 000 одиниць площі відповідав 0,002 мг речовини в пробі (1 мкл 1,00 % розчину фреонового екстракту в спирті з $\rho=0,812$ кг/л або в хлороформі з $\rho=1,478$ кг/л). Крім того, розраховували відносний вміст кожної речовини у виявленій суміші.

Результати дослідження та їх обговорення

На хроматограмах зразків 1с і 1х (рис. 1) було виявлено 47 та 66 сполук відповідно, причому 28 речовин розчинялися переважно у спирті, тобто більша їх кількість містилась у зразку 1с, 47 речовин краще розчинялися у хлороформі (зразок 1х), 19 сполук мали порівняну розчинність у спирті та хлороформі. Загалом у дифторхлорметановому екстракті суцвіть липи (зразок № 1) містилося 85 летких компонентів, з яких 46 було ідентифіковано. Сумарний вміст неідентифікованих речовин у суміші – 8,62 %.

На рис. 1 видно, що сполуки з більшою молекулярною масою і, як наслідок, з часом утримання 25–40 хв, є переважаючими складовими ефірної олії суцвіть липи, особливо це помітно на хроматограмі хлороформного розчину (зразок 1х). У зоні більш летких сполук привертає увагу високий пік з часом утримання $8,05 \pm 0,02$ хв, який відповідає октилацетилену. Враховуючи, що ацетиленові похідні є досить специфічними та високоактивними, дана речовина може бути маркером для ідентифікації ліпофільного комплексу із суцвіть липи.

У літературних джерелах, присвячених дослідженню складу ефірної олії із вказаної сировини [3, 6, 9, 11], відсутня інформація про наявність у ній октилацетилену. Це, ймовірно, пояснюється тим, що при традиційних способах одержання ефірної олії зазначена речовина окиснюється та/або гідратується з утворенням альдегіду або кетону.

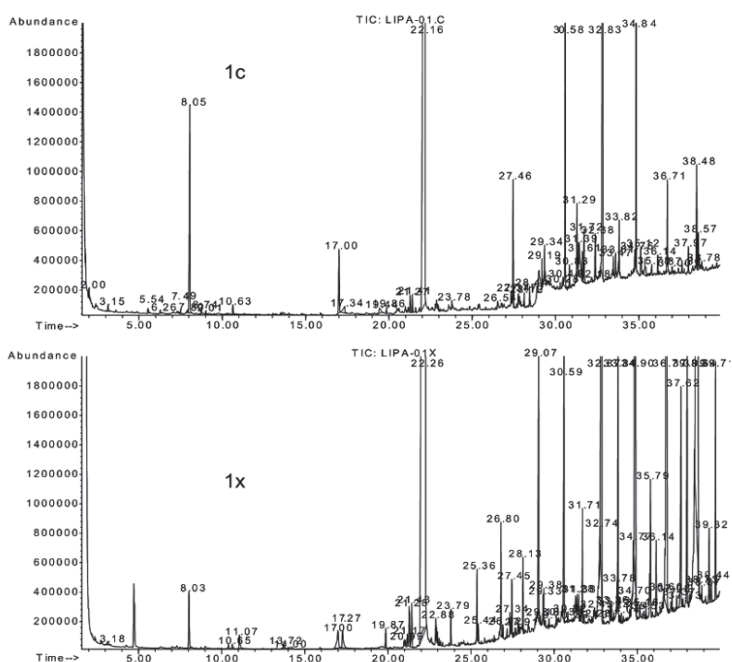


Рис. 1. Хроматограма дифторхлорметанового екстракту суцвіть липи:
1с – спиртовий розчин; 1х – хлороформний розчин

На хроматограмах зразків 2с і 2х (рис. 2) виявлено 51 та 79 речовин відповідно. Загалом в екстракті, одержаному зі шроту суцвіть липи після попередньої обробки сировини фреоном-134 (зразок № 2), містилася 101 речовина, визначена методом ГРХ, з яких 58 було ідентифіковано. Сумарний вміст не-ідентифікованих речовин у суміші – 6,63 %.

Як видно з даних хроматографічного аналізу (рис. 2), у зразках 2с і 2х також домінують сполуки з часом утримання 27–40 хв, але кількість більш летких компонентів помітно збільшується у порівнянні зі зразком № 1, особливо це стосується маркерного компоненту – октилацетилену.

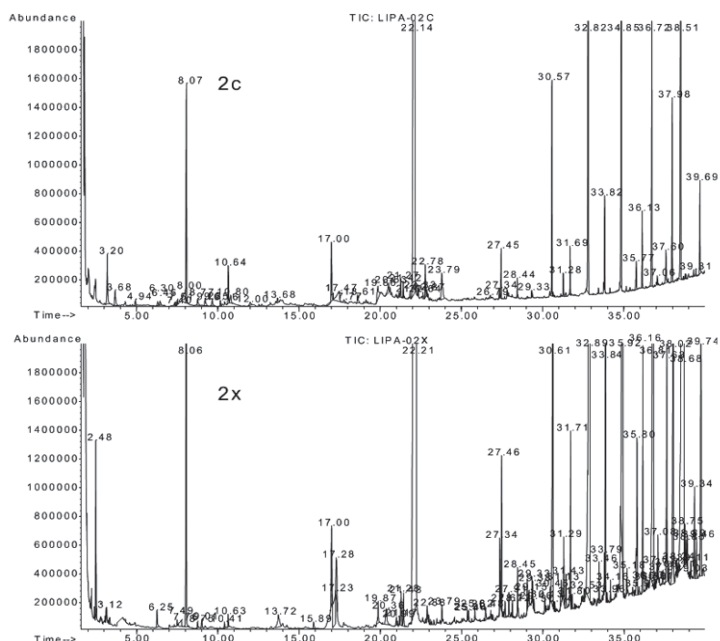


Рис. 2. Хроматограма дифторхлорметанового екстракту зі шроту суцвіть липи після попередньої обробки фреоном-134:
2с – спиртовий розчин; 2х – хлороформний розчин

При кількісному аналізі складових ефірної олії було встановлено (табл.1), що основними компонентами, вміст яких у суміші становив понад 1 %, є такі речовини (у відсотках у зразках № 1 та № 2 відповідно): нанакозан (22,25 і 23,31 %), трикозан (17,60 і 16,36 %), пентакозан (11,55 і 11,10 %), гептакозан (11,22 і 10,14 %), хенейкозан (5,19 і 4,82 %), октилацетилен (3,46 і 4,29 %), гексакозаналь (2,19 і 4,45 %), октакозаналь (1,55 і 2,95 %), тетракозан (1,97 і 1,91 %), гексагідрофарнезилацетон (1,46 і 0,91 %), докозан (1,35 і 1,00 %), етилноаноат (1,31 і 0,98 %). У зразку № 1 також виявлено дві неідентифіковані сполуки в кількості 2,39 % та 1,13 %, октакозан – 1,71 %. Відсутність зазначених речовин у зразку № 2 свідчить про те, що фреон-134 має до них високу селективність.

Проте у зразку № 2 додатково містилися 4 сполуки, які не виявлено в зразку № 1: нонанова кислота – 1,04 %, гексакозан – 1,18 %, тетракозаналь – 1,63 % та неідентифікована речовина в кількості 1,38 %.

Вміст суми мінорних сполук в обох зразках становив близько 13 %.

Т а б л и ц я 1

Основні компоненти ефірної олії, одержаної дифторхлорметановою екстракцією суцвіть липи та шроту після попередньої обробки фреоном-134

Час утримання, хв	Назва речовини	Вміст у фреоновому екстракті, %		Вміст компоненту у суміші, %	Вміст у фреоновому екстракті, %		Вміст компоненту у суміші, %
		спиртовий розчин (зразок 1с)	хлороформний розчин (зр. 1х)		спиртовий розчин (зр. 2с)	хлороформний розчин (зр. 2х)	
8,04	Октилацетилен	0,749	0,152	3,46	0,747	1,159	4,29
17,00	Етилноаноат	0,241	0,101	1,31	0,197	0,238	0,98
17,34	Нонанова кислота	-	-	-	0,177	0,287	1,04
27,45	Гексагідро-фарнезилацетон	0,292	0,087	1,46	0,124	0,280	0,91
29,06	н/і*	-	0,622	2,39	-	-	-
30,58	Хенейкозан	0,750	0,601	5,19	0,572	1,569	4,82
31,28	н/і	0,226	0,068	1,13	-	-	-
31,71	Докозан	0,153	0,198	1,35	0,115	0,329	1,00
32,82	Трикозан	1,896	2,688	17,60	2,220	5,051	16,36
33,82	Тetraкозан	0,117	0,395	1,97	0,219	0,629	1,91
34,84	Пентакозан	0,624	2,384	11,55	1,479	3,453	11,10
35,77	Гексакозан	-	-	-	0,103	0,419	1,18
36,13	Тetraкозаналь	-	-	-	0,200	0,526	1,63
36,71	Гептакозан	0,230	2,691	11,22	0,868	3,639	10,14
37,60	Октакозан	-	0,445	1,71	-	-	-
37,62	н/і	-	-	-	-	0,612	1,38
37,96	Гексакозаналь	0,069	0,500	2,19	0,493	1,486	4,45
38,51	Нонакозан	0,271	5,522	22,25	1,781	8,576	23,31
39,70	Октакозаналь	-	0,404	1,55	0,254	1,059	2,95
	Сума мінорних сполук	1,485	2,077	13,67	2,031	3,548	12,55
	РАЗОМ	7,103	18,935	100,00	11,580	32,860	100,00

*Неідентифікована сполука.

Як видно з даних табл. 1, загальна кількість летких речовин, що визначено методом ГРХ, в абсолютному вираженні становила близько 26 % від маси зразка № 1, причому 7,1 % розчинялися в спирті, а 18,94 % – в хлороформі. Послідовна екстракція суцвіть липи фреонами-134 та 22 вела до значного збагачення (приблизно в 1,7 разу) компонентами ефірної олії зразка № 2, який містив 11,58 % та 32,86 % летких речовин, розчинних відповідно в спирті та хлороформі. Подібне явище можна пояснити тим, що фреон-134 селективно витягав із сировини певні

компоненти, які утруднювали внутрішню дифузію інших БАР та/або утворювали з ними важкорозчинні надмолекулярні комплекси. При детальнішому аналізі всіх компонентів у досліджуваних об'єктах було встановлено, що зразок № 2 у порівнянні зі зразком № 1 був вільний від 36 речовин, в основному, мінорних. Переважна більшість з них мала час утримання понад 26 хв та не була ідентифікована.

В и с н о в к и

1. Хромато-мас-спектрометричним методом досліджено склад ліпофільних сполук в дифторхлорметанових екстрактах суцвіть липи серцелистої.

2. У дифторхлорметановому екстракті із суцвіть липи виявлено 85 компонентів ефірної олії, з яких 46 ідентифіковано. У дифторхлорметановому екстракті зі шроту після попередньої обробки фреоном-134 визначено 101 речовину, з яких 58 ідентифіковано. Сумарний вміст неідентифікованих сполук у першому та другому об'єктах становив 8,62 і 6,63 % відповідно.

3. Уперше виявлено в ефірній олії із суцвіть липи досить специфічну сполуку – октилацетилен з часом утримання $8,05 \pm 0,02$ хв, який може виконувати роль маркера.

4. Встановлено, що при послідовній екстракції суцвіть липи фреонами-134 та 22 загальний вихід компонентів ефірної олії збільшується в 1,7 разу.

1. Державна Фармакопея України / ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». – 1-ше вид. – Доп. 3. – Харків: ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2009. – 280 с.

2. *Котов А.Г.* Дослідження з розробки та введення монографій на лікарську рослину сировину до Державної фармакопеї України / *А.Г.Котов* // Фармаком. – 2009. – № 1. – С. 5–19.

3. *Марчишин С.М.* Дослідження елементного та ефіроолійного складу листків та суцвіття липи серцелистої / *С.М.Марчишин, М.І.Дранак* // Фармац. журн. – 2009. – N 1. – С. 123–126.

4. Проблемы введения монографий на лекарственное растительное сырье в Государственную Фармакопею Украины / *А.И.Гризодуб, Г.В.Георгиевский, Т.М.Тихоненко и др.* // Фармаком. – 2004. – № 4. – С. 3–17.

5. Терпеноїдний склад ефірної олії *Eucalyptus viminalis* / *О.М.Кошовий, А.М.Комісаренко, А.М.Ковальова [та ін.]*. // 36. трудів КМАПО. – 2008. – С. 736–742.

6. *Bernasconi R.* A contribution to the knowledge of the essential oils of linden blossoms and to the chemotaxonomy of the genus *Tilia* / *R.Bernasconi, J.Gebistorf* // *Pharm. Acta Helv.* – 1968. – Vol. 43, N 10. – P. 677–688.

7. Essential Oil from *Galium verum* Flowers / *T.V.Ill'ina, A.M.Kovaleva, O.V.Goryachaya et al.* // *Chemistry of Natural Compounds.* – 2009. – Vol. 45, N 4. – P. 587–588.

8. *European Pharmacopeia.* – 4th ed. – Strasbourg, 2002. – 2416 p.

9. Low temperature extraction of essential oil bearing plants by liquifacate gases. 2. Flowers of linden (*Tilia tomentosa* Moench.) [Електронний ресурс] / *Т.Атанасова, N. Nenov, T.Girova et al.* – Режим доступу: // www.e-xtracts.com/ExtractumScientific6.pdf

10. Separation and Identification of Oxidized Terpenoids by Thin-Layer Chromatography / *A.Romankiewicz, A.Busch, S.Laschat et al.* // *Analytical Letters.* – 2007. – Vol. 40. – P. 1487–1495.

11. The composition of essential oils from *Tilia* L. species growing in Turkey / *G.Toker, K.H.C.Baser, M. Kürkçüoğlu et al.* // *J. Essent. Oil Res.* – 1999. – N 11. – P. 369–374.

Надійшла до редакції 15.08.2011.

Д.В.Демьяненко

ИССЛЕДОВАНИЕ СОСТАВА ЛИПОФИЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В ДИФТОРХЛОРЕТАНОВЫХ ЭКСТРАКТАХ СОЦВЕТИЙ ЛИПЫ

Ключевые слова: экстракция, соцветия липы, терпеноиды, эфирные масла, сжиженные газы, газожидкостная хроматография

Исследован состав липофильных соединений в дифторхлорметановых экстрактах соцветий липы сердцевидной. В экстракте из нативного сырья обнаружено 85 компонентов

эфирного масла, в экстракте из шрота после предварительной обработки фреоном-134 определено 101 вещество. При последовательной экстракции соцветий липы фреонами-134 и -22 общий выход компонентов эфирного масла увеличивается в 1,7 раза. Также впервые обнаружено в эфирном масле специфическое соединение – октилацетилен.

D.V.Demyanenko

STUDY for COMPOSITION of LIPOPHILIC COMPOUNDS in
DIFLUOROCHLOROMETHANE EXTRACTS of LIME FLOWERS

Key words: extraction, lime flowers, terpenoids, essential oils, condensed gases, gas-liquid chromatography

S U M M A R Y

Composition of lipophilic compounds in difluorochloromethane extracts of lime flowers has been studied. In the extract from crude raw material 85 components of essential oil were found, in the extract from cake after pretreatment with freon-134 101 substances were determined. After subsequent extraction of lime flowers with freons-134 and 22 total yield of essential oil components increases 1,7 times. Also specific substance – octylacetylene was discovered for the first time in the essential oil.