

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «САМАРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ  
АЭРОКОСМИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ АКАДЕМИКА С.П. КОРОЛЕВА  
(НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)» (СГАУ)

*На правах рукописи*

ПАВЛОВА ЛАРИСА ВИКТОРОВНА

**ЭКСТРАКЦИОННО-ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ  
ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ-АКТИВНЫХ КОМПОНЕНТОВ ЦВЕТОВ «РОМАШКИ  
АПТЕЧНОЙ» И ЛИСТЬЕВ «ЭВКАЛИПТА ПРУТОВИДНОГО»**

02.00.02 – аналитическая химия

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

Научный руководитель:  
д.т.н., профессор Платонов И.А.

Самара – 2015г.

## СОДЕРЖАНИЕ

<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	4
<b>ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	8
1.1.Фингерпринт как аналитическая характеристика растения.....	8
1.1.1.Методы получения «фингерпринт-хроматограмм».....	10
1.1.2.Методы оценки «фингерпринт-хроматограмм».....	17
1.1.3.Пробоподготовка растительного сырья как важнейший этап получения «фингерпринта».....	18
1.1.3.1.Пробоподготовка растительного сырья для получения характерного хроматографического спектра летучих органических соединений.....	18
1.1.3.2. Методы извлечения нелетучих биологически активных соединений из растительного сырья.....	26
1.2.Современное состояние исследований «эвкалипта прутовидного».....	33
1.3.Современное состояние исследований «ромашки аптечной».....	41
<b>ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ</b> .....	48
2.1.Объекты исследования.....	48
2.2.Последовательность проведения экспериментальной работы.....	48
2.3.Условия выполнения измерений.....	49
2.4.Подготовка лекарственного растительного сырья для выявления оптимального режима проведения ПФА.....	49
2.5.Приготовление концентрационных ловушек для твердофазной микроэкстракции.....	49
2.6.Подготовка лекарственного растительного сырья для проведения ТФМЭ.....	50
2.7.Аналитическая газовая хроматография.....	51
2.7.1. Оборудование.....	51
2.7.2. Режимы работы газовых хроматографов.....	51
2.8.Жидкостная экстракция БАС из растений.....	52
2.9.Установка для экстракции при повышенных температуре и давлении.....	53
2.10.Аналитическая высокоэффективная жидкостная хроматография.....	54
2.10.1.Оборудование.....	54
2.10.2.Подвижная фаза.....	54
2.10.3.Режимы элюирования.....	54
2.11.Аналитическая сверхвысокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием.....	55
2.12.Идентификация БАС.....	55

2.13.Реактивы.....	56
2.14.Обработка данных.....	57
<b>ГЛАВА 3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЛЕТУЧИХ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ КОМПОНЕНТОВ ЦВЕТОВ «РОМАШКИ АПТЕЧНОЙ» И ЛИСТЬЕВ «ЭВКАЛИПТА ПРУТОВИДНОГО» ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ОБЩЕГО ОБРАЗА ОБЪЕКТА МЕТОДОМ ПАРОФАЗНОГО АНАЛИЗА.....</b>	
3.1.Парофазный анализ цветов «ромашки аптечной».....	61
3.2.Применение парофазного анализа для получения общего образа цветов «ромашки аптечной».....	70
3.3.Парофазный анализ листьев «эвкалипта прутовидного».....	78
3.4.Применение парофазного анализа для получения общего образа листьев «эвкалипта прутовидного».....	85
3.5.Образцы состава летучих органических соединений цветов «ромашки аптечной» и листьев «эвкалипта прутовидного».....	89
<b>ГЛАВА 4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ КОМПОНЕНТОВ В ЖИДКИХ ЭКСТРАКТАХ ЛИСТЬЕВ «ЭВКАЛИПТА ПРУТОВИДНОГО» И ЦВЕТОВ «РОМАШКИ АПТЕЧНОЙ» ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ОБЩЕГО ОБРАЗА ОБЪЕКТА .....</b>	
4.1.Оценка сухого остатка.....	109
4.2.Характерные УФ- и ИК-спектры экстрактов цветов «ромашки аптечной» и листьев «эвкалипта прутовидного».....	112
4.3.ВЭЖХ анализ экстрактов листьев «эвкалипта прутовидного».....	115
4.4. ВЭЖХ-МС анализ экстрактов листьев «эвкалипта прутовидного».....	120
4.5.ГХ-МС анализ экстрактов листьев «эвкалипта прутовидного».....	122
4.6.ГХ-МС анализ экстрактов цветов «ромашки аптечной».....	139
4.7.ВЭЖХ анализ экстрактов цветов «ромашки аптечной».....	151
<b>ВЫВОДЫ.....</b>	<b>158</b>
<b>СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ.....</b>	<b>160</b>
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>	<b>163</b>

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы

Развитие новых направлений пищевой промышленности, создание спецпитания для лиц, подвергающихся экстремальным нагрузкам, расширение ассортимента фитопрепаратов, влечет за собой разработку и внедрение прогрессивных химико-технологических процессов переработки лекарственных растений (ЛР). Замена органических растворителей водой при проведении процесса экстракции, а также использование высоких температур и давления, позволяет сократить время экстракции и получить экологически безопасный продукт.

Большинство физиологически или биологически активных соединений (БАС), содержащихся в лекарственных растениях (ЛР), относятся к терпеноидам и ароматическим соединениям, индивидуальную идентификацию и количественную оценку которых зачастую нет возможности провести, в связи с бесконечным разнообразием БАС и отсутствием стандартных образцов [1–3]. Вследствие этого, оценку качества и подлинности ЛР проводят по единичным компонентам [4–6], оставляя без внимания остальные БАС, присутствие которых в ЛР также может влиять на его эффективность. Научный интерес представляет применение спектров, полученных хроматографическими или спектроскопическими методами, для идентификации и контроля качества растений и препаратов на их основе [7, 8]. В различных источниках данный подход к идентификации ЛР называется по-разному «безэталонный метод оценки качества», «фингерпринт» метод, метод распознавания общего образа объекта, который обозначен в числе приоритетных направлений развития аналитической химии [9, 10]. Кроме того незаслуженно мало внимания уделяется применению парофазного анализа (ПФА) для определения терпеноидных и ароматических соединений ЛР, хотя данный метод анализа имеет явные преимущества, по сравнению с анализом экстрактов и эфирных масел, за счет экономии сырья и времени анализа [11].

По имеющимся данным прослеживается консервативное отношение к внедрению в практику контроля растительных лекарственных препаратов методов ГХ-МС и ВЭЖХ-МС [12]. Поэтому очень актуальна задача разработки новых методик идентификации и оценки качества ЛР с применением хроматографических методов.

**Целью** данной диссертационной работы является разработка комплексного подхода к извлечению и определению терпеноидных и ароматических соединений цветов «ромашки аптечной» (*Chamomilla recutita R.*) и листьев «эвкалипта прутовидного» (*Eucalypti viminalis Labill*) для получения общего образа объекта.

### **Задачи исследования.**

1. Определить оптимальные условия пробоподготовки ЛР для проведения парофазного анализа, обеспечивающих эффективное извлечение определяемых компонентов из растительного сырья.

2. Провести качественный и количественный анализ терпеноидных и ароматических соединений экстрактов цветов «ромашки аптечной» и листьев «эвкалипта прутовидного».

3. Оценить возможности применения ПФА для получения общего образа цветов «ромашки аптечной» и общего образа листьев «эвкалипта прутовидного» на основе хроматографического спектра.

4. Провести сравнение различных сорбентов для концентрирования летучих терпеноидных, ароматических и других органических соединений цветов «ромашки аптечной» и листьев «эвкалипта прутовидного» с целью их применения в качестве образцов состава ЛОС.

5. Выявить закономерности извлечения терпеноидных и ароматических соединений из цветов «ромашки аптечной» и листьев «эвкалипта прутовидного» субкритической водой и водно-этанольными смесями в статических и динамических режимах при различных температурах и давлении с целью получения общего образа объекта на основе хроматографического спектра.

### **Научная новизна.**

Впервые на основе хроматографических спектров летучих и нелетучих терпеноидных и ароматических соединений определены ГХ-МС и ВЭЖХ-УФ «фингерпринты» цветов «ромашки аптечной» и листьев «эвкалипта прутовидного».

Впервые разработаны образцы состава терпеноидных и ароматических соединений цветов «ромашки аптечной» и листьев «эвкалипта прутовидного» в виде сорбционных микротрубок, которые могут использоваться также для идентификации органических соединений.

Доказана эффективность и выявлены закономерности использования субкритической воды и водно-этанольных смесей при повышенном давлении и температуре для извлечения терпеноидных и ароматических соединений из цветов «ромашки аптечной» и листьев «эвкалипта прутовидного».

### **Практическая значимость.**

На основании сравнительного анализа хроматографических спектров терпеноидных и ароматических соединений разработана схема идентификации цветов «ромашки аптечной» и листьев «эвкалипта прутовидного».

Предложенные в работе новые методические решения идентификации и анализа цветов «ромашки аптечной» и листьев «эвкалипта прутовидного» внедрены в практику работы следующих предприятий Самарской области: ГБУЗ «Центр контроля качества лекарственных средств Самарской области» (г. Самара), ГБОУ ВПО «Самарский государственный медицинский университет» (г. Самара) Минздрава России, ООО «Центр-Аналитика» (г. Самара), Филиал № 3 ФГКУ «111 Главного Государственного центра судебно-медицинских и криминалистических экспертиз» Минобороны России (г. Самара).

**На защиту выносятся следующие положения.**

1. Результаты определения оптимальных условий пробоподготовки для проведения парофазного анализа цветов «ромашки аптечной» и листьев «эвкалипта прутовидного».

2. Использование хроматографических спектров, полученных методом ПФА, в качестве «фингерпринтов» цветов «ромашки аптечной» и листьев «эвкалипта прутовидного».

3. Применение сорбционных микротрубок в качестве образцов состава ЛОС цветов «ромашки аптечной» и листьев «эвкалипта прутовидного».

4. Закономерности извлечения терпеноидных и ароматических соединений из цветов «ромашки аптечной» и листьев «эвкалипта прутовидного» с помощью воды и водно-этанольных смесей при повышенных температуре и давлении для получения «фингерпринтов» в виде хроматографических спектров.

5. Качественное и количественное определение терпеноидных и ароматических соединений экстрактов цветов «ромашки аптечной» и листьев «эвкалипта прутовидного» хроматографическими методами.

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 11 работ из них 4 статьи в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК.

**Апробация работы.** Основные результаты докладывались на следующих научных конференциях: на Первой зимней молодежной школе-конференции с международным участием «Новые методы аналитической химии» (Санкт-Петербург, 2013), на X Международном Курнаковском совещании по физико-химическому анализу (Самара, 2013), на Втором съезде аналитиков России (Москва 2013), на Втором Всероссийском симпозиуме с участием иностранных ученых «Кинетика и динамика обменных процессов» (Краснодарский край, 2013), на XIV конференция «Иониты -2014» и Третьем симпозиуме «Кинетика и динамика обменных процессов» (Воронеж, 2014), на Всероссийской конференции «Теория и практика хроматографии» (Самара, 2015).

**Структура и объем работы.** Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, обсуждения результатов, списка используемой литературы (171 наименование).

Диссертационная работа изложена на 176 страницах машинописного текста, содержит 44 таблицы и 47 рисунков.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ проект 13-03-97012-р\_поволжье\_a; поддержана Минобрнауки РФ в рамках государственного задания на выполнение работ, проект № 608.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.

### 1.1. «Фингерпринт» как аналитическая характеристика растения.

В течение всей истории человечества БАС, содержащиеся в растениях, являлись основой большинства лекарственных препаратов, что обусловлено огромным их разнообразием, широким спектром действия, а также доступностью по сравнению с химически синтезированными препаратами. Тенденция развития современной химии растительного сырья предусматривает поиск новых методов идентификации растений, обнаружения фальсификатов. В последнее время по отношению к оценке качества и идентификации растительного сырья применяются несколько подходов. Первый подход ориентирован на поиск веществ-маркеров [6]. Традиционно лишь часть БАС растения рассматривалась в качестве веществ-маркеров и использовалась для оценки качества и подлинности лекарственных трав. В данном случае один или несколько характерных компонентов, которые присутствуют в изучаемом растении или растительном сборе в значительном количестве, определяются качественно и количественно документально регламентированными методами анализа, и на основании полученных данных делается вывод о качестве растительного сырья [6].

Второй подход – основан на изучении хроматографических и спектроскопических способов получения так называемых «отпечатков пальцев» – «фингерпринтов», под которыми понимается некая совокупность данных о количестве, интенсивности, характерном расположении, форме пиков, которая принимается за единую характеристическую особенность [11]. Данный подход основан на предварительном получении характерных спектров компонентов растений – «фингерпринтов» – для дальнейшего сравнения их со спектрами растений, подлежащих идентификации и контролю качества. Применение способа оценки исследуемого материала по характерному хроматографическому профилю, получаемому при анализе летучих компонентов, находит широкое применение во многих отраслях науки и техники. В медицине эта техника применяется для выявления заболеваний по парофазному анализу крови или мочи [13]. В пищевой промышленности – оценка качества вин, молока, сыра, меда [14 – 16]. В настоящее время активно развивается направление, связанное с идентификацией растительного сырья по характерному хроматографическому профилю [7, 8, 17 – 19].

Получение «фингерпринтов» рассматривается как один из этапов стандартизации растений и препаратов на их основе [20, 21]. Метод хроматографического или спектроскопического «фингерпринта» рекомендован для идентификации растительного сырья Управлением по продовольствию и медикаментам США в Руководстве по



производству препаратов растительного происхождения (2000 г.), Всемирной организацией здравоохранения в Директиве по контролю лекарственных растений (1996 г.), Британской фармакопеей (1986 г.), Индийской фармакопеей (1998 г.) и Фармакопеей США (1999-2001 гг.) [7, 8]. Целью этих директив было решение проблемы неизвестных активных составляющих в препаратах растительного происхождения, а также решение проблемы контроля происхождения и качества коммерческих продуктов [8]. Был установлен ряд требований к проведению аналитической процедуры методом «фингерпринта». Анализ должен быть воспроизводим в указанных условиях, специфичен, позволял определять широкий круг соединений как по типам (например, белки, углеводы, жирные кислоты), так и индивидуально идентифицировать соединения [7]. В то же время аналитическая процедура должна позволять определять соотношение растительного сырья в различных травяных сборах. При этом все компоненты, обнаруженные спектроскопически или хроматографически, должны качественно и количественно воспроизводиться от партии к партии сырья. Кроме того данная аналитическая процедура должна позволять проследивать стабильность качества растительного сырья, поэтому должна содержать описание продуктов распада компонентов при наложении различных стрессовых воздействий при испытании растительного сырья. При испытании растительного сырья, результаты должны совпадать качественно и количественно со стандартами, приведенными в аналитической процедуре [7, 22]. Кроме того в Китае Государственное управление по медикаментам предусматривает для регистрации инъекционных препаратов, сделанных по рецептам традиционной китайской медицины, наличие характерного хроматографического профиля, характеризующего данный продукт [8, 19].

Растительное сырье содержит множество соединений в сложных матрицах, многие из которых присутствуют в очень малых количествах. Из-за этого при анализе растительных экстрактов возникают трудности идентификации компонентов вследствие отсутствия необходимых стандартов из-за огромного разнообразия форм природных соединений [1]. Поэтому для анализа экстрактов растительного сырья целесообразно применять метод «фингерпринта» в виде «характерного хроматографического спектра». Хроматографические спектры позволяют рассматривать компоненты лекарственного растительного сырья в комплексе, следовательно, могут использоваться в качестве надежной характеристики. Возникает необходимость в создании базы данных характеристических хроматограмм летучих и нелетучих органических соединений для каждого вида растений по принципу базы данных масс-спектров. В связи с этим требуется всестороннее изучение каждого растения для получения как можно большего числа

индивидуальных характеристик с последующим созданием методики получения характерного хроматографического профиля растения. В дополнение к воспроизводимому хроматографическому профилю, необходимо определение хотя бы одного вещества маркера [19].

### 1.1.1. Методы получения характерных хроматографических и спектроскопических профилей

Для получения «фингерпринта» растительного сырья можно использовать любой инструментальный метод анализа: хроматографический, спектроскопический, электрофоретический, главное – получение набора сигналов, характерных только для определенного растения. В публикации [8] приведена классификация «фингерпринтов» в зависимости от используемого метода анализа: химический или биологический «фингерпринт». В свою очередь химический «фингерпринт» также подразделяется на различные типы в зависимости от метода анализа (табл. 1):

Таблица 1 – Классификация химических «фингерпринтов»

Наименование «фингерпринта»	Метод получения «фингерпринта»
ТСХ-«фингерпринт»	тонкослойная хроматография
ГХ-«фингерпринт»	газовая хроматография
ГХ-МС-«фингерпринт»	газовая хроматография с масс-спектрометрическим детектированием
ВЭЖХ-«фингерпринт»	высокоэффективная жидкостная хроматография
ВЭЖХ-МС «фингерпринт»	высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием
ВЭКЭ-«фингерпринт»	высокоэффективный капиллярный электрофорез
СКФХ-«фингерпринт»	сверхкритическая флюидная хроматография
ЖЖХ-«фингерпринт»	противоточная жидкостно-жидкостная хроматография
УФ-«фингерпринт»	ультрафиолетовая спектроскопия
ИК-«фингерпринт»	инфракрасная спектроскопия
ФФ-«фингерпринт»	флуоресцентная фотометрия
ЯМР-«фингерпринт»	ядерного магнитного резонанса
МС-«фингерпринт»	масс-спектрометрия
многомерный-«фингерпринт»	гибридный хроматографический

Биологический «фингерпринт» получают посредством ДНК-анализа, геномного анализа и протеомного анализа. Последние два типа «фингерпринта» объединяются в группу «фингерпринт» биологической активности [8].

Наиболее востребован для получения «фингерпринта» растительного сырья хроматографический метод анализа, поскольку он позволяет совместить несколько методов за счет разнообразия детектирующих устройств: пламенно-ионизационный детектор, масс-селективный детектор (МСД), УФ- и ИК-спектрометрические детекторы,

ЯМР детектор, диодно-матричный детектор (ДМД), вольт-амперометрический детектор. Для получения «фингерпринта» растения широко применяются гибридные методы анализа, представляющие собой комбинацию методов разделения и спектроскопии [21]: газовая хроматография с масс-спектрометрическим детектированием (ГХ-МС, ГХ-МС-МС), газовая хроматография с ИК-Фурье детектированием (ГХ-ИК), газовая хроматографии с атомно-эмиссионным детектированием (ГХ-АЭД), а также более сложные комбинации типа ГХ-МС-ИКФД-АЭД, капиллярный электрофорез с диодно-матричным детектированием, высокоэффективная жидкостная хроматография с диодно-матричным детектированием (ВЭЖХ-ДМД), высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС, ВЭЖХ-МС-МС, ВЭЖХ-ДМД-МС) и высокоэффективная жидкостная хроматография с ЯМР-детектированием (ВЭЖХ-ЯМР), которые могут предоставить дополнительную спектральную информацию, очень полезную для качественного анализа и даже для структурного анализа [8, 22–25].

Требования для получения характерного хроматографического профиля такие же, как и к стандартному химическому анализу [8]:

1. Проба растительного сырья должна быть представительной, так как невозможно рассмотреть образцы, отражающие все факторы влияния на состав БАС растительного сырья: географический, климатический, время сбора, разные условия хранения и т.п.;
2. Пробоподготовка, позволяющая получать воспроизводимые по составу БАС пробы;
3. Методика анализа, дающая возможность получать характеристические хроматограммы, используемые в качестве «фингерпринта», которые должны демонстрировать как много пиков хорошего разрешения, так и возможность достичь воспроизводимости хроматографической модели [8].

На сегодняшний момент большое количество исследователей работают над получением характерных хроматографических профилей растений. Основная масса подобных разработок проводится в Китае и Индии, что объясняется широким использованием в медицинской практике рецептов традиционной китайской медицины и традиционной индийской медицины – Аюрведы, основанных на растительном сырье. В таблице 2 приведены данные по растениям, для которых разработаны методики получения «фингерпринт-хроматограмм» различными методами, при этом характерно то, что в основном изучаются жидкие экстракты растений методом ВЭЖХ и ВЭТСХ. Кроме этого в публикации [8] приведены методики получения характерных хроматографических

профилей методом ВЭЖХ еще для 43 растений, используемых в традиционной китайской медицине.

Таблица 2 – Растения, для которых разработана методика получения «фингерпринт-хроматограмм»

Название растения	Метод	Литературный источник
1	2	3
<i>Arisaematis Rhizoma</i>	ВЭЖХ	[26]
<i>Cimicifugae Rhizoma</i>	ВЭЖХ	[27]
<i>Sinopodophyllum hexandrum</i> плоды и корни	ВЭЖХ	[28]
<i>Chaenomelis Fructus</i>	ВЭЖХ	[29]
<i>Dendranthema indicum</i> L. ( <i>D. indicum</i> ) <i>Dendranthema lavandulae folium</i> (Fish) Mak	ВЭЖХ	[30]
<i>Salvia miltiorrhiza</i> Bge	ВЭЖХ	[31]
Лакрица, Крушина, Куркума, Артишок	ВЭЖХ	[32]
<i>Rumex vesicarius</i> L.	ВЭТСХ	[33]
<i>Acacia catechu</i>	ВЭТСХ	[34]
Солодка уральская ( <i>Glycyrrhiza uralensis</i> ), Солодка вздутая ( <i>Glycyrrhiza inflata</i> ) Солодка гладкая ( <i>Glycyrrhiza glabra</i> )	ВЭТСХ	[35]
Кассия узколистая ( <i>Cassia angustifolia</i> ), Фенхель обыкновенный ( <i>Foeniculum vulgare</i> ), Кантакария ( <i>Solanum xanthocarpum</i> ) Филлантус Нирури ( <i>Phyllanthus amarus</i> ) Базилик священный ( <i>Ocimum sanctum</i> )	ВЭТСХ	[36]
Женьшень белый ( <i>white Panax ginseng</i> ), Женьшень красный ( <i>red Panax ginseng</i> ), Женьшень американский ( <i>Panax quinquefolium</i> ), Женьшень ложный ( <i>Panax noto-ginseng</i> )	ВЭТСХ	[37]
<i>Euphorbia ebracteolata</i> Hayata, <i>Euphorbia fischeriana</i> Steud <i>Stellera chamaejasme</i> L.	ВЭЖХ	[19]
<i>Embelia ribes burm f.</i>	ВЭЖХ	[38]
<i>Phyllostachys pubescens</i>	ВЭЖХ	[39]
<i>Artemisia umbelliformis</i> subsp. <i>eriantha</i>	ПФА-ТФМЭ-ГХ-МС	[40]
<i>Ophrys sphegodes</i> Mill. subsp. <i>sphogodes</i> , <i>Ophrys bertolonii</i> subsp. <i>benacensis</i> (Reisigl) <i>Neotinea tridentata</i> (Scop.)	ПФА-ТФМЭ-ГХ-МС	[41]
Чабер горный ( <i>Satureja Montana</i> )	ПФА-ГХ-МС	[42]
<i>Salvia. Azurea</i> <i>Salvia lavandulifolia</i> <i>Salvia verticillata</i> <i>Salvia pratensis</i>	ВЭЖХ	[43]

1	2	3
<i>Salvia staminea</i> <i>Salvia deserta</i> <i>Salvia cadmica</i> <i>Salvia forskahlei</i> <i>Salvia sclarea</i> <i>Salvia canariensis</i> <i>Salvia hians</i> <i>Salvia triloba</i> <i>Salvia glutinosa</i> <i>Salvia nemorosa</i> <i>Salvia tesquicola</i> <i>Salvia amplexicaulis</i> <i>Salvia atropatana</i> <i>Salvia stepposa</i> <i>Salvia jurisicii</i> <i>Salvia officinalis</i>	ВЭЖХ	[43]

**«Фингерпринт» в тонкослойной хроматографии.** Одним из простейших способов получения «фингерпринтов» растительного сырья является тонкослойная хроматография (ТСХ). ТСХ, как правило, используется как метод первичного скрининга, имея ряд преимуществ перед другими, более сложными в инструментальном отношении методами. Простота исполнения, универсальность, возможность анализа сразу нескольких образцов, высокая скорость, высокая чувствительность делает метод ТСХ наиболее доступным для получения «фингерпринтов» растений. Поэтому ТСХ является удобным методом для определения качества и возможной фальсификации растительной продукции [34, 44]. В «фингерпринтах», полученных методом ТСХ, данные могут быть записаны с помощью высокоэффективного ТСХ (ВЭТСХ) сканера, которые включают хроматограмму, значения фактора удерживания (Rf), цвет отдельных полос, спектры их поглощения, длина волны, при которой производилось детектирование. Все это, вместе с профилями производных после обработки различными реагентами, представляет собой ТСХ-«фингерпринт» образца [20, 25, 33, 35–37,]. Полученная информация может найти потенциальное применение в идентификации происхождения исследуемого сырья, обнаружения фальсификации и поддержания качества растительных препаратов [25].

При использовании метода «ТСХ-фингерпринта», помимо оценки в целом по полученной картине разделения, практически всегда ориентируются еще и на маркерные соединения [36, 37, 44]. Например, в работе [37] для решения вопросов идентификации различных видов женьшеня: женьшень белый (*white Panax ginseng*), женьшень красный (*red Panax ginseng*), женьшень американский (*Panax quinquefolium*), женьшень ложный (*Panax noto-ginseng*), а также стабильности препаратов женьшеня использовался «ВЭТСХ-фингерпринт», но с ориентацией на маркерные соединения, в качестве которых

рассматривались гинзенозиды – это сапониновые составляющие, которые являются общими для трех анализируемых видов женьшеня.

**Высокоэффективная жидкостная хроматография в получении характерных хроматографических профилей ЛР.** Метод ВЭЖХ может быть применен, если в экстракте растительного сырья содержатся алкалоиды, гликозиды, флавоноиды, органические кислоты, фенолы, лигнаны [20].

«ВЭЖХ-фингерпринт» включает хроматограмму, время удерживания отдельных пиков, соответствующих маркерным компонентам, а также при использовании ДМД – высоту (интенсивность) пиков при разных длинах волн [20].

Это наиболее универсальный метод для получения воспроизводимых хроматографических отпечатков при анализе экстрактов ЛР, не ограниченный летучестью и устойчивостью аналитов. Однако в каждом конкретном случае необходимо установить оптимальные условия максимального выявления и хорошего разделения присутствующих компонентов. Необходимо отметить, что оптимальные условия для разделения методом ВЭЖХ включают в себя множество факторов, таких как различные составы подвижных фаз, их рН, давление насоса и скорость потока, условия детектирования, а также способ извлечения биологически активных соединений [17–19, 38].

В последнее время ведется большое количество исследований по поиску оптимальных условий получения воспроизводимых хроматографических профилей [25, 32, 35, 38, 45–54]. Путем варьирования состава подвижной фазы, сорбента, условий хроматографического разделения можно добиться разделения и обнаружения всех исследуемых компонентов. Важен также индивидуальный подход к анализу каждого растения. Как правило, природа не снабжает растения стандартной композицией. Соответственно, стандартизация и оценка особенностей растительного сырья практически подразумевает строгий и детальный качественный контроль, который может дать разумные гарантии его видового соответствия [44], поэтому нельзя рекомендовать методику, успешно себя проявившую на одном растении, к универсальному использованию.

В работе [17] сделана попытка получения «фингерпринт-хроматограмм» метанольных экстрактов листьев некоторых представителей семейства миртовые (*Myrtacea*): гуавы (*Psidium guajava*), джамболана (*Syzygium cumini*) и эвкалипта шаровидного (*Eucalyptus globulus*) методом ВЭЖХ. Представленные в статье хроматограммы, показывают, скорее как не должен выглядеть «фингерпринт» растительного экстракта, поскольку на хроматограммах виден один широкий, сильно зашкаленный пик и несколько плохо разделившихся пиков, что говорит о недоработке методики разделения.

Как правило, для анализа экстрактов растительного сырья используется обращено-фазовый вариант ВЭЖХ на колонках с силикагелем с привитыми группами C18. Однако основные недостатки обращенно-фазной хроматографии с использованием в качестве сорбента фаз C18 заключаются в том, что сильнополярные соединения практически не удерживаются на колонках, а селективность по отношению к изомерам невысока [46], к тому же эти фазы проявляют недостаточную химическую стабильность. При  $\text{pH} < 3$  происходит гидролиз связи  $=\text{Si}-\text{O}-\text{Si}=\text{}$ , а при  $\text{pH} > 10$  растворяется силикагельная основа, особенно при повышенных температурах [55].

Нормально фазовые колонки очень редко используются [7]. Ионообменные колонки используются для разделения водорастворимых соединений. Для разделения некоторых соединений используют амино колонки [7].

В большинстве работ по изучению состава растительных экстрактов и получению воспроизводимых «фингерпринт-хроматограмм» применяются подвижные фазы (ПФ), где в качестве органических модификаторов используют ацетонитрил или метанол, в зависимости от компонентного состава сырья [25, 32, 38, 46 – 48, 56]. В качестве оптимальной ПФ в работе [55] рекомендована смесь ацетонитрил – 0.03М раствор  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – диэтиламин – фосфорная кислота. Раствор диэтиламина в 0.03 М  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  подкисляется фосфорной кислотой до  $\text{pH}$  2.6 – 3.0. Изменение  $\text{pH}$  ПФ позволяет смещать равновесие «диссоциированная форма – молекулярный форма» в нужную сторону [55].  $\text{pH}$  выше 3 ведет к диссоциации фенолкарбоновых и коричных кислот [56].

Оптимизация условий разделения на модельных смесях приближает к стандартизации параметров получения «фингерпринтов» растений. В работе [56] подобраны оптимальные условия разделения фенольных соединений и флавоноидов в лекарственных растениях на примере модельной смеси, состоящей из галловой кислоты, протокатеховой кислоты, миндальной кислоты, 4-гидроксизубной кислоты, дигидрокверцетина, ванилиновой кислоты, транс-кофейной кислоты, сиреневого кислоты, (-)-эпикатехина, п-кумаровой кислоты, синаповой кислоты, рутина, транс-феруловой кислоты, салициловой кислоты, нарингина, гесперидин-7-рутинозида, коричной кислоты, кверцетина, п-анисовой кислоты. Для проведения разделения рекомендована колонка Zorbax SB C18, 150мм x 2мм, 5 мкм, при этом в сравнении участвовали еще колонки Separon SGX(120мм x 2.1мм, 5мкм), Hipersil ODS (200 мм x 2.1 мм, 5 мкм). В качестве ПФ рекомендовано элюэнт А – ацетонитрил, элюэнт Б – 0,04 М водный раствор  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , подкисленный  $\text{H}_3\text{PO}_4$  до  $\text{pH} = 2.8$ . Расход ПФ 0.25 мл/мин. Режим элюирования рекомендован градиентный, четырехступенчатый: элюэнт А 3% – 3 мин, подъем до 5% за 1 мин, 4 мин 5%A; подъем до 20% за 7 мин, 3 мин 20%A; подъем до 40% за 7 мин, 3 мин

40% А. Оптимальное разделение веществ происходит при температуре 30°C. Диапазон детектирования – 190 – 390 нм.

Однако, как уже говорилось выше, каждый вид растений содержит индивидуальный набор БАС, определяющий условия проведения анализа. Поэтому изучение отдельно взятого вида растений, с целью получения воспроизводимых характерных хроматографических спектров является актуальным направлением современной аналитической химии.

Во многих работах помимо определения оптимальных условий разделения, производится поиск параметров для установления сходств и различий полученных характерных хроматографических спектров для межвидовой идентификации растительного сырья [19, 30, 43]. В работе [19] с использованием характерных хроматографических профилей экстрактов были успешно идентифицированы растения *Euphorbia ebracteolata* Hayata, *Euphorbia fischeriana* Steud и *Stellera chamaejasme*, относящихся к семействам *Euphorbia kansui* Liou и *Alocasia macrorrhiza* (L.) Schott, имеющие межвидовое сходство, а также носящие в разных областях произрастания одинаковое тривиальное название, но по-разному используемые в народной медицине.

Таким образом, индивидуальный подход к разработке методик анализа экстрактов различных растений с целью получения характерных хроматографических профилей, позволяет решить важную проблему выявления фальсификатов лекарственного растительного сырья.

#### ***Газовая хроматография в получении характерного хроматографического профиля ЛР.***

Газовая хроматография используется для получения характерных хроматографических профилей, если в ЛР содержится большое количество летучих компонентов. Преимущество этого способа получения воспроизводимых хроматографических спектров в высокой чувствительности метода при использовании универсальных детекторов, таких как пламенно-ионизационный и масс-спектрометрический. К тому же высокая разделяющая способность применяемых кварцевых капиллярных колонок позволяет в короткие сроки провести анализ [3].

Хроматографические спектры, полученные посредством анализа газового экстракта лекарственных растений, продуктов жизнедеятельности животных и т.д. имеют настолько характерный вид, что могут служить «отпечатками пальцев» этих материалов даже без идентификации отдельных пиков [11]. Поэтому имеют достаточно оснований использоваться для дифференциации растений, их таксономических сопоставлений, идентификации. Таким образом, ПФА может быть использована для быстрого скрининга растительного материала для предотвращения подделок при массовой торговле [42].



**Гибридные методы анализа.** Очень часто использование только хроматографического метода анализа недостаточно для получения исчерпывающих идентификационных характеристик. Использование тандемных хроматографических технологий дает возможность получить многомерные «фингерпринты», которые позволяют решить задачу выявления дополнительных характеристических признаков. Хроматограмма, полученная с помощью гибридных методов, содержит в себе не только хроматографические характеристики (индекс удерживания), но и дополнительную информацию, полученную методами молекулярной спектроскопии [3]. Наиболее часто в этом случае используются методы ГЖХ-МС, ГЖХ-ИК, ГЖХ-ИК-МС, ГЖХ-МС-МС, ВЭЖХ-ДМД-МС-МС или ЭФ-ДМД-МС-МС. Полученная хроматограмма или электрофореграмма при этом включает следующие характеристики: время удерживания каждого компонента, УФ- или ИК-спектр и площади пиков каждого компонента на разных длинах волн, массу каждого компонента, характеристические фрагменты молекулы каждого компонента. Дополнительное применение ВЭЖХ-ЯМР позволяет в отсутствие стандартов чистых веществ установить структуру каждого компонента анализируемого экстракта [7].

#### **Выводы к главе 1.1.1.**

При создании методики получения характерных хроматографических профилей необходимо ориентироваться на компонентный состав ЛР и, исходя из этого, выбирать подходящие способы экстракции и получения аналитического сигнала, который будет рассматриваться в качестве «фингерпринта» данного ЛР. Для более надежного результата по идентификации растений необходимо иметь несколько «фингерпринтов», полученных разными методами.

#### **1.1.2. Методы оценки характерных хроматографических профилей.**

До настоящего времени сходство и различие характерных хроматографических профилей часто оценивалось путем визуальной экспертной оценки хроматограмм, однако для целей регулирования и документирования необходима объективная количественная оценка сходства и различия характерных хроматографических профилей. Это необходимо также для создания баз данных сложных образцов. В последние годы активно обсуждаются новые подходы к развитию концепции «фингерпринта» для характеристики образцов сложного состава. Современный подход предполагает использование для этих целей широкого арсенала различных хемометрических методов. [6, 23, 57].

Для сравнения хроматографических «отпечатков пальцев» авторы [35, 49 – 54] используют многомерные методы обработки данных. Наиболее частое применение для анализа принадлежности образца к той или иной группе находит метод главного

компонента (РСА), метод SIMCA, факторный анализ и кластерный анализ, позволяющие графически представить большой массив данных, а также провести группировку данных, определить меру зависимости параметров друг от друга, классифицировать объекты, решить задачу установления различий между отдельными образцами по принципу «более сходен – менее сходен» [58]. Данные методы также называют методами распознавания образов [23]. Другие методы, используемые в хемометрике, приведены в публикации [23].

### **1.1.3. Пробоподготовка растительного сырья как важнейший этап получения характерного хроматографического профиля**

Выделение БАС из растительного сырья является одним из важнейших этапов производства лекарственных препаратов. Эффективность их извлечения во многом влияет на качество и себестоимость полученного продукта. В связи с этим поиск современных, эффективных методов извлечения БАС представляют огромный практический интерес.

Основной проблемой при выделении БАС являются потери за счет разложения компонентов, неполноты их извлечения, а также извлечение сопутствующих природных соединений, находящихся в растительном сырье. Все существующие методы можно разделить на дистилляционные, экстракционные и хроматографические, применяемые для разделения и очистки извлеченных БАС. Выбор метода извлечения обуславливается свойствами выделяемых соединений. Экстракты, получаемые разными методами, имеют не только разные свойства с точки зрения их применения, но и зачастую требуют разных подходов к анализу [3].

#### **1.1.3.1. Пробоподготовка растительного сырья для получения характерного хроматографического профиля летучих органических соединений**

Для получения характерного хроматографического спектра летучих органических соединений (ЛОС) лекарственного растительного сырья подходят далеко не все способы пробоподготовки [3], поскольку не все методы экстракции обеспечивают извлечение только ЛОС. Что касается вклада органов растения в «фингерпринт», следует отметить, что количество ЛОС больше в цветах, чем в других частях растения. Тем не менее, наблюдается корреляция между классом соединений и исследуемым органом растения: окисленные алифатические соединения были хорошо представлены в корнях (44.3%-84.0%), алифатические углеводороды присутствовали в листьях и стеблях (31.3%-88.7%), фенилпропаноиды – в цветах (47.9%-64.2%). К тому же в данном исследовании отмечается подобие качественного состава растений из разных мест произрастания, но наблюдается отличие в количественном соотношении компонентов [59].

**Гидродистилляция или пародистилляция** является способом выделения только ЛОС, однако есть данные о том, что эфирные масла, полученные таким образом, могут содержать некоторое количество нелетучих компонентов, особенно при длительном проведении процесса, связанное с малым количеством ЛОС в растительном сырье [3]. При этом гидродистилляция или пародистилляция наиболее часто используемые способы пробоподготовки для изучения ЛОС лекарственных растений [44, 60 – 69]. Однако при получении эфирного масла данным способом из ранее неизученного сырья, могут возникнуть ряд сложностей, связанных с использованием различных конструкций оборудования в зависимости от свойств получаемого эфирного масла, которое может быть как легче, так и тяжелее воды, либо иметь с водой близкую плотность [3].

**Двойная экстракция** – гидродистилляция с одновременной экстракцией отгоняющихся ЛОС легкокипящим органическим растворителем, позволяет извлечь водорастворимые ЛОС, которые не образуют отдельную фазу при конденсации дистиллята. При аккуратном проведении процедуры полученный экстракт не содержит нелетучих соединений [3].

**Экстракция перегретыми парами органических растворителей.** Данный способ извлечения ЛОС осуществляется по тому же принципу, что и гидродистилляция, только вместо воды используется легкокипящий растворитель. Несмотря на то, что сырье нагревается при проведении экстракции до температуры около 100°C, отсутствуют условия окисления нестабильных компонентов [3].

**Парофазный анализ (ПФА)** – наиболее подходящий метод извлечения ЛОС. Достоинствами этого метода экстракции являются быстрота, простота, отсутствие органических растворителей и минимизация влияния матрицы. Во всех приложениях ПФА важна не столько точность и полнота извлечения летучих компонентов, сколько воспроизведение цельной картины хроматографического профиля [11]. Для этой цели не нужно устанавливать коэффициенты распределения или полностью извлекать летучие компоненты, поэтому нет необходимости соблюдать условия равновесия. Однако должны быть строго регламентированы условия пробоподготовки и хроматографирования.

Одним из применений ПФА является направление исследования запахов. Изучение ароматов пищевых продуктов, цветов привлекает внимание, прежде всего, с целью решения проблем хранения, производства высококачественной продукции, создания заменителей натуральных ароматов [14 – 19, 70]. Для изучения ароматов предпочтительной является именно техника ПФА, поскольку восприятие аромата происходит через газовую фазу и ее анализ может дать конкретное представление о составе аромата, тогда как состав летучей фракции, полученной иными способами – экстракцией, перегонкой, отличается от первоначального.

Анализ литературных источников указал на недостаточное внимание к использованию техники ПФА для исследования и идентификации растительного сырья. Однако рядом исследователей планомерно проводятся работы по сбору «фингерпринтов», полученных с помощью ПФА [42, 43]. В этих работах указано на преимущество ПФА перед исследованием эфирного масла, полученного различными методами, для изучения ЛОС лекарственного растительного сырья. При этом для получения газового экстракта оптимальной признана температура 100°C.

**Твердофазная экстракция (ТФЭ).** Требование большей чувствительности заставляет прибегать к концентрированию летучих соединений на различные носители, причем из минимального количества исследуемого материала, что особенно актуально в медицине, криминалистике. Относительное стандартное отклонение площадей пиков при анализе с применением техники концентрирования составляет примерно 8%, тогда как при обычном парофазном анализе такие отклонения составляют порядка 20-50% [11]. В зависимости от оборудования, применяемого для концентрирования различают ТФЭ и твердофазную микроэкстракцию (ТФМЭ) [71].

Данный метод пробоподготовки обладает всеми достоинствами ПФА, поскольку является его продолжением – это быстрота, простота, отсутствие органических растворителей и минимизация влияния матрицы, возможность сохранения редких видов растений, подверженных риску исчезновения по сравнению с классическим исследованием ЛОС растений путем получения эфирного масла или экстракции растворителем [40, 41, 59, 72]. Существенным плюсом ТФЭ является снижение предела детектирования ЛОС до уровня ppt [73]. Он интегрирует в себе этапы пробоотбора, концентрирования и введение образца в инструментальную систему, к тому же он удобен для полевых условий, когда отобранные образцы могут быть проанализированы в лаборатории позже без существенных потерь [77]. ПФА+ТФМЭ успешно используется для получения «фингерпринтов» растений [17 – 19, 40, 41], различных сортов пива [74].

ТФЭ обычно используется в комбинации с ГХ и ГХ-МС и удачно применяется для широкого диапазона аналитов, особенно при экстракции летучих и полунлетучих органических соединений из окружающей среды, биологических материалов и продуктов питания [14 – 16], извлечения ЛОС из воды [75], остатков взрывчатого вещества из почвы [76], быстрого и надежного получения «фингерпринтов» растений [17 – 19, 40, 41, 59, 78].

**ТФМЭ на кварцевые волокна.** Наибольшее распространение получила ТФМЭ на различные кварцевые волокна, покрытые неподвижной жидкой фазой (НЖФ), поглощающей ЛОС. Кварцевое волокно, обработанное НЖФ, прикрепляется к штоку микрошприца и при его нажатии свободно перемещается внутри стальной иглы шприца,

диаметром около 0.7 мм, что позволяет не использовать дополнительного оборудования при отборе проб и вводе пробы в испаритель хроматографа [71,73, 77].

Виды используемых для ТФМЭ волокон и ЛОС, для сорбции которых они применяются, приведены в таблице 3.

Таблица 3 – Волокна, используемые для ТФМЭ ЛОС [71]

Определяемые соединения	Молекулярная масса	Волокно/НЖФ	Толщина пленки НЖФ, мкм
1	2	3	4
Газы и низкомолекулярные соединения	30-225	Карбоксен/Полидиметилсилоксан (Карбоксен/ПДМС)	75
Летучие органические амины и нитроароматические соединения	50-300	Полидиметилсилоксан/дивинилбензол (ПДМС/ДВБ)	65
Летучие органические соединения	60-275	Полидиметилсилоксан (ПДМС)	100
Полярные малолетучие соединения	80-300	Полиакрилат (ПА)	85
Неполярные высокомолекулярные соединения	125-600	ПДМС	7
Неполярные малолетучие соединения	80-500	ПДМС	30
Спирты и полярные соединения	40-275	Карбовакс/ДВБ	70
Одоранты	40-275	ДВБ и Карбоксен на ПДМС	50/30
Амины и полярные соединения (только для ВЭЖХ)	-	ПДМС/ДВБ	60
Ароматы и запахи (ЛОС и малолетучие соединения, C <sub>3</sub> -C <sub>20</sub> )	40-275	ДВБ и Карбоксен на ПДМС	50/30
СПАВ (только для ВЭЖХ)	-	Карбовакс на поперечно-сшитой термостабильной смоле	50

Относительно наиболее эффективного волокна для применения в ТФМЭ нет единого мнения. Одними исследователями установлено, что наиболее эффективное улавливание летучих соединений осуществляется на волокне карбовакс/ДВБ [79], другими [80] получены данные о предпочтительном использовании ПДМС/ДВБ волокна. В другой работе [81] отмечается универсальность ПДМС волокна и избирательность по отношению к ароматическим соединениям Карбовакс/ДВБ волокна. Относительное содержание данного анализируемого вещества и, следовательно, чувствительность, может кардинально изменяться в зависимости от типа волокна [81]. Таким образом, использование нескольких типов волокон различной полярности является наиболее разумным для скрининга неизвестных образцов. При использовании ТФМЭ для

количественного анализа, полезно предварительное изучение аналитов, присутствующих в образце для того, чтобы выбрать правильную фазу волокна, объем образца, время экстракции, условия экстракции и десорбции.

Многие исследования посвящены выбору наиболее эффективного волокна для пробоотбора ЛОС [59, 72, 74]. Большинство исследователей склоняются к тому, что ДВБ/Карбоксен/ПДМС позволяет отобрать большее число и количество ЛОС по сравнению с другими волокнами. Эффективность концентрирования ЛОС уменьшается в ряду 50/30 мкм ДВБ/Карбоксен/ПДМС > 65 мкм ПДМС/ДВБ > 65 мкм Карбовакс/ДВБ > 85 мкм ПА > 100 мкм ПДМС [74].

Исследования ЛОС, в которых пробоотбор осуществляется методом ПФА в сочетании с ТФМЭ, часто включают в себя поиск оптимальных условий получения газового экстракта [40, 41, 59, 72]. По данным исследований оптимальный температурный интервал – 60 – 70°C. По поводу времени выдержки при заданной температуре нет единого мнения, временной интервал колеблется в пределах 5 – 180 мин, в зависимости от типа изучаемого сырья и условий проведения экстракции. На основании этого можно сказать, что для каждого конкретного растения необходимо подбирать индивидуальные условия анализа для получения стабильных «фингерпринтов».

С помощью метода ТФМЭ успешно осуществляется поиск поддельной парфюмерной продукции. Для этого отбираются пробы подлинных образцов продукции и исследуемые пробы и далее анализируются методом ГХ-МС. При сравнении полученных хроматограмм, делается вывод о принадлежности исследуемых образцов к подлинникам или подделкам. Можно сказать также, что анализ проводится путем сравнения с «фингерпринтом» конкретной парфюмерной продукции. Важно то, что оба анализа проведены в одинаковых условиях, описанных в работе [73].

**Микроловушки.** Техника ТФМЭ не стоит на месте. Сравнительно недавно появились капиллярные ловушки для ГХ определения ЛОС. Они представляют собой короткие капилляры из кварца или боросиликатного стекла длиной 5-100см [71], диаметром 0.3-0.53 мм, на внутреннюю поверхность которых нанесен слой частиц активированного угля размером 10-18 мкм, углеродсодержащих сорбентов или слой НЖФ толщиной 100-150 мкм. НЖФ может быть нанесена в несколько слоев, например: Карботрап и Карбоксены 1003 и 1004 [11, 82]. Микроловушкой может служить короткий отрезок кварцевой капиллярной колонки, помещенный внутри охлаждаемой металлической трубки. Также микроловушка может быть вложена в иглу газового шприца, при этом данная конструкция удобна для отбора пробы и для введения микроловушки в испаритель хроматографа. Этот способ особенно удобен при ПФА.

Для проведения анализа через микроловушку пропускается 2 – 20 см<sup>3</sup> анализируемого воздуха или газового экстракта, далее после термодесорбции и криофокусировки, анализируются методом ГХ с требуемым типом детектирования. Данный вид концентрирования ЛОС позволяет снизить предел обнаружения до 0.2 ppb. Микроловушки используются для обнаружения загрязнений в атмосферном воздухе, ПФА, в выдыхаемом воздухе [77]. На примере извлечения из воздуха следовых количеств ЛОС с помощью микроловушек, показано, что для этого можно использовать как охлаждаемые микроловушки с толстой или сверхтолстой пленкой полимерной жидкости, так и неохлаждаемые – с активированным углем.

**ТФЭ на сорбционные трубки.** Концентрирование примесей на сорбционные трубки – является традиционным способом концентрирования ЛОС из воздушной среды.

Для проведения анализа, воздух с помощью аспиратора прокачивают через сорбционную трубку, заполненную различного рода адсорбентами, далее проводят извлечение сконцентрированных ЛОС посредством термодесорбции или экстракции растворителем и анализируют подходящим методом. Для увеличения чувствительности, используют динамический парофазный анализ, при котором фазовое равновесие системы постоянно нарушается вследствие продувки сосуда с образцом инертным газом. Выдуваемые компоненты собирают на адсорбенте или улавливают в криогенной ловушке и затем вводят в хроматограф после термодесорбции. При статическом ПФА удастся проанализировать образцы, содержащие определяемые компоненты на уровне ppm, то при динамическом ПФА – на уровне ppb [71].

Рекомендации по выбору сорбентов для анализа ЛОС и их характеристики приведены в таблице 4 [83].

Таблица 4 – Сорбенты, используемые для заполнения сорбционных трубок [83]

Сорбент в трубке для отбора проб	Приблизительная область летучести аналитов	Максимальная температура, °С	Удельная поверхность, м <sup>2</sup> /г	Примеры аналитов
1	2	3	4	5
Carbotrap™ С Carbopack™ С  (Графитированный уголь)	От C <sub>8</sub> до C <sub>20</sub>	>400	12	Алкилбензолы и алифатические соединения в пределах летучести от n-C <sub>8</sub> до n-C <sub>16</sub>
Терах™ ТА  (Поли-дифенилоксид)	Температура кипения от 100°С до 400°С. От C <sub>6</sub> до C <sub>26</sub>	350	35	Ароматические неполярные соединения (с температурой кипения более 100°С) и менее летучие полярные соединения

Продолжение таблицы 4

1	2	3	4	5
				(с температурой кипения более 150°C)
Тенах GR (Графитированный полидифенилоксид)	Температура кипения от 100°C до 450°C. От C <sub>7</sub> до C <sub>30</sub>	350	35	Алкилбензолы, ПАУ и полихлорированные бифенилы в парофазном состоянии, а также соединения, указанные для Тенах ТА
Carbotrap Carbopack B Carbograph TD-1  (Графитированный уголь)	От C <sub>4</sub> , C <sub>5</sub> до C <sub>14</sub>	>400	100	Разнообразные ЛОС, включая кетоны, спирты, альдегиды (с температурой кипения более 75°C) и все неполярные соединения в указанном интервале летучести и перфторуглеродные газы, присутствующие в следовых количествах
Chromosorb TM 102  (Стирол/дивинилбензол)	Температура кипения от 50°C до 200°C	250	350	Разнообразные ЛОС, включая кислородсодержащие соединения и галоформы менее летучие, чем метиленхлорид
Chromosorb 106  (Полистирол)	Температура кипения от 50°C до 200°C	250	750	Разнообразные ЛОС, включая углеводороды от n-C <sub>5</sub> до n-C <sub>12</sub> , а также летучие кислородсодержащие соединения
Porapak TM Q  (Этилвинилбензол /дивинилбензол)	Температура кипения от 50°C до 200°C. От C <sub>5</sub> до C <sub>12</sub>	250	550	Разнообразные ЛОС, включая кислородсодержащие соединения
Porapak N  (Винилпирролидон)	Температура кипения от 50°C до 150°C. От C <sub>5</sub> до C <sub>8</sub>	180	300	Особенно пригоден для акрилонитрила, ацетонитрила и пропионитрила, пиридина, а также пригоден для летучих спиртов от EtOH, метилэтилкетона и т.п.
Spherocarb TM  (Углеродное молекулярное сито)	От - 30°C до +150°C. От C <sub>3</sub> до C <sub>8</sub>	>400	1200	Применяется для сверхлетучих соединений, таких как винилхлоридный мономер, этиленоксид, CS <sub>2</sub> и CH <sub>2</sub> C <sub>2</sub> , а также



Продолжение таблицы 4

1	2	3	4	5
				летучие полярные соединения, как MeOH, EtOH и ацетон
Carbosieve™ SIII или Carboxen™ 1000 <sup>a)</sup>  (Углеродное молекулярное сито)	От - 60°C до + 80°C	400	800	Применяется для сверхлетучих соединений, таких как углеводороды C <sub>3</sub> , C <sub>4</sub> , летучие галогенсодержащие соединения и фреоны
Молекулярное сито	От - 60°C до + 80°C	350	-	Используется специально для 1,3-бутадиена и оксидов азота

**Полимерные сорбенты.** Тенакс GC, представляющий собой поли-2,6-дифенил-*n*-фениленоксид, – один из распространенных адсорбентов для концентрирования ЛОС [11]. Используется для концентрирования ЛОС, когда необходимо отделения органических соединений от паров воды. Углеводороды и некоторые кислородные соединения сорбируются на Тенаксе практически полностью, однако простейшие спирты удерживаются плохо – менее 70%, а спирты C<sub>3</sub>-C<sub>5</sub>, альдегиды и эфиры сорбируются на 70-90%. Имеют место потери при дальнейшей термической десорбции. Сопоставление относительных величин удельных удерживаемых объемов полимерных сорбентов показывает, что Тенакс по сорбционным характеристикам уступает Порапаку Q и Полисорбу 10, в особенности, когда речь идет об удерживании полярных и низкомолекулярных соединений. Действительно, он слабо удерживает все соединения с числом атомов углерода в молекуле менее семи, и особенно большие потери наблюдаются при концентрировании полярных примесей [84].

Наиболее распространенными полимерными адсорбентами являются Порапаки Q, P, R, S, T, N, Хромосорбы 101 – 108 и отечественный Полисорб [71]. Порапак Q, Хромосорб 101, 102 и Полисорб-1 являются неполярными адсорбентами, полученными на основе дивинилдибензола и стирола. Другие пористые полимеры содержат различные функциональные группы и обеспечивают полярные взаимодействия с сорбатами. Неполярные пористые полимеры очень эффективны для анализа полярных газов [85]. HaueSep – одна из новых марок полимерных адсорбентов, аналог Порапака, представляет собой макропористые, сферические, сверхчистые смолы. Колонки, заполненные сорбентом Haue Sep, обладают хорошей воспроизводимостью результатов, по сравнению с колонками, заполненными другими полимерными сорбентами, также требуют минимального кондиционирования.

**Активированный уголь.** Для отбора проб неполярных соединений широко используются угли различных марок. Уголь можно использовать для концентрирования и полярных соединений, однако у него есть два существенных недостатка – он хорошо сорбирует влагу, а также десорбция полярных ЛОС с него затруднена [71].

**Графитированные сажи** избавлены от этих недостатков, по свойствам они подобны углям, но имеют гораздо меньшую удельную поверхность и, следовательно, с них легче проходит десорбция аналита. Поэтому их все чаще используют для концентрационных ловушек [71]. Графитированные сажи способны сорбировать широкий круг ЛОС – от малых до больших молекул.

**Углеродные молекулярные сита** применяются для улавливания из воздуха соединений с небольшими молекулами, поскольку имеют большую площадь поверхности (800 – 1000 м<sup>2</sup>/г).

Как альтернатива термической десорбции после завершения концентрирования ЛОС, для экстракции сорбата могут применяться органические растворители. Ограничение в использовании органических растворителей является невозможность детектирования легко летучих соединений, т.к. они экранируются пиком растворителя.

### **1.1.3.2. Методы извлечения нелетучих биологически активных соединений из растительного сырья.**

Для извлечения нелетучих БАС из матрицы наиболее широко используются экстракционные методы. При получении экстрактов важнейшей задачей является – максимальное извлечение целевых продуктов и сохранение их биологической активности. Эффективность извлечения зависит от многих факторов, главным из которых является природа экстрагента, температура и продолжительность проведения процесса. В настоящее время извлечение БАС производится как традиционными способами, такими как мацерация, дробная мацерация, перколяция, а также современными – экстракция в электромагнитном поле СВЧ, экстракция сверхкритическими флюидами, экстракция в субкритических условиях.

**Мацерация.** Метод мацерации представляет собой настаивание растительного сырья в подходящем экстрагенте. Выбор экстрагента зависит от поставленной задачи извлечения целевых компонентов. Это могут быть водно-этанольные смеси, другие органические растворители: гексан, ацетонитрил, метанол, масляные субстанции, а также последовательная комбинация спиртовых и масляных смесей [21, 22, 86 – 88]. Для наилучшего извлечения БАС из матрицы большинство авторов рекомендуют проводить экстракцию при 60 – 70°C при извлечении маслами [86], при температуре кипящей

водяной бани при извлечении водой, при 50°C при извлечении водно-этанольными смесями [87]. В отношении водно-спиртовых растворов установлено, что с увеличением концентрации спирта, увеличивается выход фенольных веществ в экстракт. Оптимальное время продолжительности процесса экстракции с использованием воды оказалось 20 мин, с использованием 50% водно-спиртового раствора 10 мин [87]. Наилучшее соотношение сырье : экстрагент признано 1:10 [87], при использовании последовательной экстракции этанолом и маслом – 1:5–14 [88]. Влияние на состав экстрагированных БАС оказывает изменение pH экстрагента, добавление ПАВ [89].

Мацерация проста в исполнении, не требует дорогостоящего оборудования, однако продолжительна по времени из-за низкой скорости диффузионного процесса, извлечение проходит не полностью, в экстрактах завышено содержание балластных веществ (высокомолекулярные соединения, пектины, слизи, белки и др.) [90].

**Ремацерация** – метод дробной мацерации. Широко применяется для получения густых и сухих экстрактов. Он дает лучшее извлечение БАВ за счет многократной экстракции меньшими порциями растворителя.

**Перколяция** – это метод экстракции, осуществляемый путем непрерывного пропускания экстрагента через растительное сырье, позволяет провести наиболее полное извлечение БАВ из растительного сырья [90].

Постоянно ведутся исследования по совершенствованию процессов экстракции, как за счет модификации растворителей, так и по поиску новых способов экстракции и совершенствованию технического оснащения.

**Экстракция в электромагнитном поле сверх высокой частоты (СВЧ)**. Представляет собой обработку смеси экстрагент – ЛР электромагнитным полем СВЧ. Оптимальные технологические параметры процесса извлечения: удельная мощность 500-700 Вт/кг, гидромодуль 1.25-1.5, продолжительность процесса экстракции 8-10 мин, влажность сырья 6-9%, концентрация спирта в экстрагенте 95-96% [91]. Однако этот способ экстракции улучшает экстракцию не во всех случаях [92], поэтому применим в зависимости от целевого продукта.

**Электроимпульсный способ экстракции**. За счет высоковольтного разряда, при котором за короткий промежуток времени выделяется мощное электромагнитное излучение, осуществляется колебательное движение растворителя. Это создает мощный электрогидравлический эффект, при котором жидкости сообщается скорость колебания в несколько сотен метров в секунду, создавая, т.о. микровзрыв [93]. При магнитоимпульском способе воздействия, с частотой изменения магнитного поля

колеблется электропроводная мембрана, передавая колебательное движение экстрагенту [94].

**Центробежный способ.** При данном способе экстракции растительный сок за счет центробежных сил удаляется из сырья [94].

**Ультразвуковая экстракция.** Обработка ультразвуком смеси ЛР–экстрагент позволяет повысить извлечение БАС. Ультразвук может привести к разрушению БАС. Оптимальные условия обработки ультразвуком: частота  $2 \times 10^4 - 2 \times 10^8 \text{ с}^{-1}$  (мощность 80 Вт), время обработки 7-10 мин [95].

**ТФЭ**, описанная выше для ЛОС, успешно применяется для анализа малолетучих или термолabileльных соединений методом ВЭЖХ или ВЭЖХ-МС. Основана на выделении веществ из растворов путем сорбции на различных твердых носителях. Различаются удерживающие и неудерживающие способы ТФЭ. При удерживающей ТФЭ целевой компонент концентрируется на сорбенте, а примеси не удерживаются на сорбенте. Затем целевой компонент смывается подходящим растворителем. При неудерживающей ТФЭ наоборот – примеси концентрируются, а целевой компонент проходит через сорбент, не удерживаясь. Для концентрирования используются стеклянные колонки, картриджи, патроны, заполненные соответствующими сорбентами. Успешно зарекомендовали себя сорбционные трубки на основе инъекционных игл, которые применимы для извлечения микроколичеств целевых компонентов из небольшого объема пробы [96]. Созданы специальные приставки, совмещенные с жидкостными хроматографами – ТФМЭ-ВЭЖХ интерфейс, оснащенный специальной десорбционной камерой, используемой для десорбции растворителем перед разделением методом ВЭЖХ вместо термической десорбции в инжекторе системы ГХ [77]. Новая ТФМЭ-ВЭЖХ система, известная как «in-tube SPME», была в последнее время разработана с использованием кварцевой капиллярной колонки, в качестве инструмента для ТФМЭ вместо кварцевого волокна для использования в ВЭЖХ. Данная техника подходит для автоматизации анализа, позволяя не только сократить время анализа, но часто обеспечивает аккуратность и точность анализа, по сравнению с ручным вводом образца. Главное преимущество ТФМЭ – хорошая аналитическая производительность в сочетании с простотой и низкой стоимостью. ТФМЭ позволяет получать относительно чистые и концентрированные экстракты, и идеально подходит для применения в технике с МС-детектированием [77].

**Экстракция сверхкритическими флюидами (ЭСКФ).** Широкое распространение получил способ экстракции, использующий критические и докритические состояния растворителей, когда растворители приобретают свойства, нехарактерные для них в нормальных условиях. Изменяются такие параметры как вязкость, диэлектрическая

проницаемость, полярность, в связи с чем, экстрагенты могут извлекать значительно большее количество БАС. В качестве экстрагентов, как правило, используют сжиженные газы: бутан, пропан, азот, аммиак, диоксид углерода, фреоны, аргон и др. (табл. 5). Для экстракции биологически активных веществ из растительного сырья применяют сверхкритический диоксид углерода из-за его высокой растворяющей способности, дешевизны, доступности, не токсичности и невысоких критических параметров. Диоксид углерода в сверхкритическом состоянии способен растворять многие органические вещества [97 – 99].

Таблица 5 – Параметры критических точек для некоторых простейших веществ [98]

Вещество	Критическая температура, °С	Критическое давление, атм
Диоксид углерода	31.1	72.8
Этан	32.3	48.2
Этилен	9.3	49.7
Ксенон	16.6	57.5
Пропан	96.7	41.9
Циклогексан	280.3	40.2
Изопропанол	235.2	47.0
Бензол	289.0	48.3
Толуол	318.6	40.6
Аммиак	132.5	111.3
Вода	374.2	217.6

Экстракцию растительного сырья сжиженным диоксидом углерода проводят при комнатной температуре (не более 28°C) и давлении 65 – 70 атм. Вязкость жидкого диоксида углерода в 14 раз меньше воды, в 65 раз – этилового спирта. Температура кипения сжиженного диоксида углерода в зависимости от давления лежит в пределах от –55.6 до +31°C. Это позволяет быстро удалять газ из вытяжки и сохранять экстрагированные вещества в вытяжке без изменений. При этом не происходит термического и химического разложения БАС [97].

На сегодняшний день в мире известно более 80 областей практического применения сверхкритических флюидных (СКФ) технологий [99]. Необходимо отметить, что наиболее развитой является сверхкритическая флюидная экстракция фармакологически активных компонентов из растительного сырья.

**Экстракция водой в субкритическом состоянии.** Экстракция БАС из растительного сырья с помощью субкритической или перегретой воды является достаточно новой техникой, основанной на использовании воды при температуре от 100°C до 374°C и высоком давлении, чтобы поддерживать жидкое состояние воды [100]. Вода при комнатной температуре является очень полярным растворителем, диэлектрическая

постоянная близка к 80. Тем не менее, этот уровень может быть значительно снижен до значений, близких к 27, при нагреве воды до 250°C под давлением, достаточным для сохранения ее в жидком состоянии. При 200°C плотность воды падает до 0.8 г/см<sup>3</sup>. В этих условиях уменьшается диэлектрической проницаемость воды, вязкость, поверхностное натяжение. Вода в таких условиях приобретает свойства менее полярного растворителя (рис. 1) [98, 101, 102].

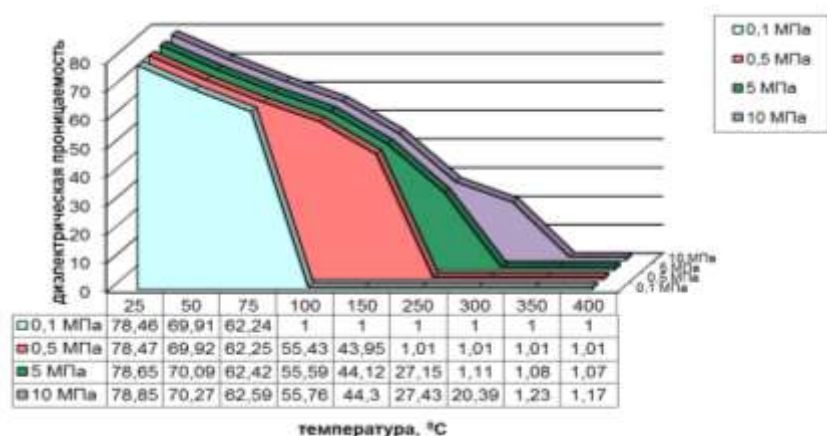


Рисунок 1 – Зависимость диэлектрической проницаемости воды от температуры и давления [103].

Таким образом, варьируя температуру экстракции, тем самым изменяя диэлектрическую проницаемость воды, можно добиться извлечения как полярных, так и неполярных соединений [104]. Наиболее важное преимущество этой техники по сравнению с традиционной экстракцией органическими растворителями заключается в том, что сам процесс требует меньших временных и денежных затрат, более экологичен, полученный экстракт имеет достаточно высокое качество [102,105].

Процесс экстракции водой в субкритическом состоянии включает три этапа. Первый заключается в диффузии экстракционной жидкости в матрицу под давлением, также в этот момент происходит частичная деструкция матрицы. Второй этап – десорбция растворенных веществ из матрицы в экстракционную жидкость. Далее происходит элюирование извлеченных компонентов.

Для получения субкритического экстракта, как правило, используют лабораторные установки собственного изготовления, которые имеют схожую конструкцию, включающую насос, термостат, экстрактор в виде стальной трубки, устройства регулирования потока, давления, температуры, а также емкость для растворителя и приемник экстрактов [100, 101, 106 – 109]. Ранее было установлено, что влияние давления на процесс экстракции имеет второстепенное значение [110]. Повышенное давление необходимо только для поддержания воды в жидком состоянии. В большинстве исследований давление в процессе субкритической экстракции поддерживалось на уровне 10 – 20 bar. Давление оказывает незначительное влияние на диэлектрическую

проницаемость и сольватирующие свойства воды. Если экстракция с паром является предпочтительной, давление следует снизить. Экстракция неполярных соединений является более эффективной и более воспроизводимой с паром, чем жидкой водой при одинаковой температуре [111 – 114].

Определяющими факторами эффективности процесса экстракции субкритической водой являются температура процесса, скорость потока элюента и размер частиц растительного сырья [100, 101, 108, 110, 115].

Одним из важнейших параметров в процессе субкритической экстракции является температура. Выбор температуры процесса во многом зависит от целевого продукта извлечения. Так в работе [100] показано, что для эфирного масла кориандра, где основным компонентом является линалоол, оптимальной температурой процесса экстракции субкритической водой была 125°C. Было установлено, что выход линалоола увеличивался при температуре 100 – 125°C, а при 150 и 175°C – уменьшался, и экстракт приобретал запах гари. Для извлечения кумина [108] рекомендована температура 150°C, для кверцетина – 250°C [101]. При экстракции субкритической водой эфирного масла эвкалипта шаровидного варьировали все параметры процесса: температуру – 50 – 200°C, давление 30 – 100 bar, скорость потока 0.5 – 3 мл/мин. Оптимальными признаны условия: давление 50 bar, температура 150°C, скорость потока 2 мл/мин [116].

С повышением температуры субкритической воды, уменьшаются ионные, диполь-дипольные взаимодействия между молекулами воды, хотя водородные связи в некоторой степени по-прежнему присутствуют [117]. Исходя из теории процесса, очень высокие температуры экстракции могут быть рекомендованы для извлечения неполярных веществ. На практике, некоторые факторы ограничивают применение максимальной температуры: слишком высокая температура может вызвать коррозию в экстракционной системе, разложение целевого соединения и другие возможные реакции [116, 118]. Также при высоких температурах извлекается больше примесей. Кроме того, оборудование, скорее всего, будет протекать при очень высоких температурах [119]. Исходя из вышесказанного для полярных соединений рекомендуется относительно низкие температуры экстракции (100–150°C), тогда как для умеренно и мало полярных аналитов предпочтительными являются температуры 200 – 300°C [120, 121]. Соединения различных классов могут быть получены с программированием температуры [120, 122].

Изучение влияния размера частиц на выход ключевых продуктов экстракции было проведено для частиц размером 0.25мм, 0.5 мм и 1 мм. В результате было установлено, что оптимальным является размер частиц 0.5 мм [100, 109].

Количество подвергаемого субкритической экстракции сырья зависит от строения реактора и составляет, как правило, 1 – 4 г [100, 106, 109].

Экстракцию водой в субкритическом состоянии можно проводить как в статическом, так и в динамическом режиме. В динамическом режиме скорость движения экстрагента является важным фактором оптимизации процесса. Для изучения влияния скорости потока на выход БАС оценивались следующие значения скорости потока: 1 мл/мин, 2 мл/мин и 4 мл/мин и оптимальным признан поток 2 мл/мин [100, 109]. Эффективность экстракции для гидрофобных анализов увеличивается с ростом скорости потока до 1.1 мл/мин [122, 123]. Она зависит от температуры экстракции, характера матрицы и извлекаемых веществ [124]. Экстракция в динамическом режиме позволяет достигнуть большего выхода целевых компонентов, чем в статическом режиме, однако длительное время нахождения при высоких температурах может привести к разрушению экстрагируемых веществ.

Наибольшее применение экстракция субкритической водой находит в процессах обработки твердых образцов. Важнейшими областями применения является экстракция БАС из растительного сырья. ЭСВ была применена для получения таксифолина и силибина расторопши пятнистой [125 – 127], сапонинов плюща вьющегося [128], глицирризиновой кислоты корня солодки [129], фенольных гликозидов луковой шелухи [107], выделения эфирного масла кориандра [100], аралозидов аралии манчжурской [106], кверцетина горца перечного [101], дигидрокверцетина лиственницы сибирской [130], эфирного масла эвкалипта шаровидного [116], БАС ромашки голубой [131], розмарина [132], тимьяна дикого [133], майорана [134], мяты перечной [135], чабера [135], лавра благородного [136], гвоздики [137], соевых продуктов [138], шлемника байкальского [139], укропа [140], сенны, валерианы лекарственной, лимонника китайского, имбиря, астрагала перепончатого [141].

В настоящее время разработаны методики ЭСВ эфирных масел, пектина, дубильных веществ, белков, лигнанов, полисахаридов, антраценовых соединений органических кислот [141]. В ряде работ показано приоритетное применение экстракции субкритической водой для извлечения ЛОС из ЛР по сравнению с методом гидродистилляции [116, 131].

### **Выводы к главе 1.1.3.**

Исходя из вышесказанного, для извлечения БАС из ЛР существует множество способов, выбор которых зависит от поставленной задачи. ЭСВ может рассматриваться в качестве альтернативного метода пробоподготовки для получения характерных хроматографических спектров ЛР, поскольку позволяют извлекать широкий диапазон



веществ. До настоящего времени данный метод экстракции не использовался в качестве пробоподготовки для получения характерного хроматографического спектра. Для экстракции БАС из цветов «ромашки аптечной» и листьев «эвкалипта прутовидного» в субкритических условиях необходимо варьировать температуру процесса, чтобы извлекать вещества с различной полярностью.

## 1.2. Современное состояние исследований «эвкалипта прутовидного» (*Eucalyptus viminalis* L.)

Род эвкалиптов семейства миртовых (*Myrtaceae*) насчитывает около 700 видов, среди которых, наибольшее количество эфирного масла содержится в «эвкалипте шаровидном» (*Eucalyptus globulus*) – 2,5% (цинеола 60%). Однако, предмет нашего исследования – листья «эвкалипта прутовидного» (*Eucalyptus viminalis* Labill) – представляет интерес, как широко используемое в российской фармацевтической практике для получения лекарственных препаратов, так как этот вид эвкалипта наиболее морозостоек, хотя содержание эфирного масла в нем около 1% (цинеола 45%) [142]. Уникальные антибактериальные свойства «эвкалипта прутовидного» связаны с большим содержанием физиологически активных компонентов – терпеноидов: моно-, сескви- и дитерпенов, ароматических соединений: фенолкарбоновых и гидроксикоричных кислот, флавоноидов, флороглюциновых альдегидов [142 – 146].

Идентификация и оценка качества листьев «эвкалипта прутовидного» согласно [99] осуществляется следующим образом:

«Внешние признаки.

Микроскопия.

Числовые показатели. Цельное сырье. Эфирного масла не менее 1%; влажность не более 14%; золы общей не более 5%; потемневших и побуревших листьев не более 3%; других частей эвкалипта (веточек, бутонов, плодов) не более 2%; органической примеси не более 0,5%; минеральной примеси не более 0,5%.

Измельченное сырье. Эфирного масла не менее 0,8%; влажность не более 14%; золы общей не более 5%; потемневших и побуревших кусочков листьев не более 3%; других частей эвкалипта (бутонов, плодов, кусочков веточек) не более 2%; частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 5 мм, не более 5%; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0.5 мм, не более 10%; органической примеси не более 0.5%; минеральной примеси не более 0.5%.

Количественное определение. Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм. Содержание эфирного

масла определяют в 10 г измельченного сырья методами 1 или 2 (ГФ XI, вып. 1, с. 290).  
Время перегонки 1 ч.»

При этом идентификация осуществляется только по внешним признакам, а качество сырья оценивается по содержанию эфирного масла.

Исследование компонентного состава ЛОС «эвкалипта прутовидного» обозначило ряд компонентов, встречающихся у большинства исследователей. К ним относятся соединения терпеновой природы. К тому же было выяснено, что различные методы извлечения БАС из растительного сырья влияют как на соотношение компонентов [60], так и на компонентный состав экстракта. В работе [60] изучался компонентный состав эфирного масла, выход которого составил 2.5 %, а также компонентный состав СКФ CO<sub>2</sub>-экстракта, выход которого составил около 5 %. В составе исследованных образцов идентифицировано 58 соединений. Украинские ученые исследовали густой спиртовой экстракт листьев «эвкалипта прутовидного», предоставленный ООО ОЗ «ГНЦЛС» [147]. Однако в данной работе остались не идентифицированными 20 компонентов из 54 обнаруженных, что затрудняет сравнительную оценку компонентного состава эвкалипта прутовидного, изучаемого разными авторами. Московские исследователи [142] изучали ацетонитрильную вытяжку, но в этом исследовании не представлено соотношение ЛОС.

Результаты идентификации ЛОС листьев «эвкалипта прутовидного» по данным публикаций представлены в таблице 6. Они показывают значительные различия компонентного состава экстрактов из листьев «эвкалипта прутовидного», полученные разными исследователями, в то время как экстракты, полученные из одного растительного сырья [60] продемонстрировали в основном различие в соотношении компонентов. Это говорит о влиянии происхождения растительного сырья на состав экстрактов. В целом можно сказать, что в эфирном масле эвкалипта более 85 % составляют монотерпены. Основным по содержанию является моноциклический монотерпен цинеол (более 71 %). Кроме монотерпенов, в эфирном масле содержится значительное количество сесквитерпенов и насыщенных углеводородов (в сумме более 13 %). В составе СКФ CO<sub>2</sub>-экстракта содержится около 50 % сесквитерпенов и примерно по 25 % монотерпенов и насыщенных углеводородов [60]. Однако можно выделить только несколько ЛОС, встречающихся во всех работах: 4-терпинеол, эвкалиптол, аромадендрен, аллоаромадендрен, изоледен [65-69,142]. Но отнести данные вещества к потенциальным маркерам «эвкалипта прутовидного» нельзя, поскольку они встречаются и в других растениях.

Таблица 6 – Сводная таблица ЛОС «эвкалипта прутовидного» по данным публикаций [60, 142, 147]

Название компонента	Содержание, %			
	[60] СО <sub>2</sub> - экстракт	[60] Эфирное масло	[142] Ацетонитрильный экстракт	[147] Этанольный экстракт
1	2	3	4	5
1-бромо-3,5- диметиладамантан	0.47	0.11	-	-
1-этилиденоктагидро-7а- метил-1Н-инден	1.1	0.12	-	-
2,4,5,6,7,8-гексагидро-1,4,9,9- тетраметил-3Н-3а,7- метаноазулен	2.2	-	-	-
2,7-диметиллоктандион-3,5	0.01	0.02	-	-
3,7-диметил-1,6-октадиен-3- ол	0.19	0.05	-	-
3-карен	-	-	+	-
3-метилбутановая кислота	0.05	0.19	-	-
3,7,11,15-тетраметил-2- гексадецен-1-ол	0.55	-	-	-
4-карен	0.02	-	-	-
4,4,8-Триметилтрицикло [6,3,1,0(1,5)]додекан-2,9-диол	-	-	+	-
4-терпинеол	0.23	0.27	+	0.55
7-изопропенил-1,4а-диметил- 4,4а,5,6,7,8-гексагидро-3Н- нафтален-2-он	0.09	-	-	-
α-аморфен	-	-	+	-
α-гурьюнен	-	-	+	1.604
α-кубебен	-	-	+	-
α-пинен	4.7	7.0	+	-
α-терпинеол	-	-	-	1.382
α-фелландрен	1.0	0.12	-	2.639
α-эудесмол	-	-	-	0.641
β-неокловен	-	-	+	-
β-пинен	0.09	0.12	+	-
β-пинен -изо	0.03	0.05	-	-
β-эудесмол	-	-	-	1.616
β-эудесмен (β- селинен)	-	-	+	-
γ-кадинен	0.38	0.04	+	-
γ-мууролен	-	-	+	-
γ-селинен	-	-	+	-
γ-терпинен	0.07	0.16	-	-
γ-эудесмол	3.9	0.18	+	-
δ-аморфен	-	-	+	-
δ-кадинен	-	-	-	0.251
Δ-аристолен	1.5	2.5	-	-
Δ-селинен	0.97	0.06	-	-

Продолжение таблицы 6

1	2	3	4	5
агароспирол	1.7	0.06	-	-
аллоаромадендрен	18.1	1.9	+	3.287
аллоаромадендреноксид	0.06	-	-	-
аристолен	0.05	-	-	-
аромадендрен	3.1	0.29	+	21.590
бензальдегид	-	-	-	-
бергаптен	0.03	-	-	-
бициклогермакрен	-	-	+	-
борнеол	0.05	0.13	-	0.267
валенсен	0.49	0.83	-	-
вербенилэтиловый эфир	0.02	-	-	-
гвайол	0.12	0.01	-	-
гексадекановая кислота	0.61	0.49	-	-
гептакозан	-	-	+	-
геранилацетат	-	-	-	0.781
гераниол	-	-	-	0.509
гераниол - цис (нерол)	0.89	0.21	-	-
глобулол	-	-	+	8.167
дегидроаромадендрен	0.55	0.02	-	0.23
декагидро- $\alpha,\alpha$ -4а-триметил-8-метилен-2-нафталенметанол	1.1	0.20	-	-
декагидроаромадендрен	-	-	+	-
жасмон	0.03	-	-	-
изоамилацеталь	-	-	-	0.188
изо-карвеол	0.07	0.09	-	-
изоледен	0.51	0.02	+	0.193
изоэвгенол	-	-	+	-
кадинен	0.27	-	-	-
каламенен	0.06	0.02	-	-
каларен	-	-	-	1.002
камфен	0.02	-	+	-
карвакрол	-	-	+	-
карвон	-	-	+	-
кариофиллен	-	-	+	-
копаен	-	-	+	0.184
крезол, -п	-	-	+	-
кубенол	1.1	-	-	0.229
леден	-	-	-	1.438
ледол	-	-	+	-
лимонен	1.7	3.1	-	0.212
линалоол	0.01	0.08	-	-
линоленовая кислота	-	-	+	-
лонгифолен	0.19	0.02	-	-
мууролен	0.08	-	-	-
насыщенные углеводороды	24.5	4.5	+	-
пальмитиновая кислота	-	-	+	0.529
пинокарвеол, транс-	-	-	-	1.121
пинокарвон	-	-	-	0.422

Продолжение таблицы 6

1	2	3	4	5
розифолиол	-	-	-	1.172
скавален	0.73	0.39	-	-
спатуленол	0.41	0.08	+	-
терпенилацетат	-	-	-	0.33
терпинолен	0.01	-	-	-
тимол, п-	-	-	+	-
фенилэтиловый спирт	0.01	0.04	-	-
фитол	-	-	+	0.735
циклогексанкарбоновая кислота	0.03	-	-	-
цимен, -о	1.5	3.2	+	-
цимен, -п	-	-	-	1.669
эвкалиптол	15.6	71.1	+	34.134
элеомол	-	-	+	-
эликсен	1.8	1.7	-	-
эпиглобулол	-	-	+	1.933
эреморфилен	1.0	-	-	-
этилгексадеканонат	0.13	-	-	-
этилгексаноат	0.02	-	-	-
этиллинолеат	-	-	-	0.264
этиллиноленат	-	-	-	0.385
этилоктаноат	0.03	-	-	-
этилпальмитат	-	-	-	0.449
эудесма-4(14),11-диен	-	-	+	-
эудесмол	5.8	0.47	-	-

Соотношение основных классов обнаруженных в исследовании [60] соединений представлено в таблице 7, из которой видно, что при СКФ экстракции CO<sub>2</sub>, извлекается больше неполярных соединений, таких как насыщенные углеводороды, а также соединений с боьшей молекулярной массой, чем при получении эфирного масла, что является закономерным, поскольку состав эфирного масла ограничен летучестью соединений.

Таблица 7 – Основные классы соединений в составе эфирного масла и CO<sub>2</sub>-экстракта «эвкалипта прутовидного» [60]

Класс соединений	Содержание, %	
	Эфирное масло	CO <sub>2</sub> -экстракт
монотерпены	85.700	26.248
сесквитерпены	8.691	47.097
дитерпены	-	0.552
тритерпены	0.391	0.726
сложные эфиры	0.039	0.157
органические кислоты	0.683	0.685
насыщенные углеводороды	4.497	24.502

Одним из направлений идентификации ЛР является идентификация по веществам-маркерам. В публикации [142] указывается на то, что весьма длинный список ЛОС

«эвкалипта прутовидного» предоставляет возможность выбора наиболее подходящих веществ-маркеров. В работах [148,149] был осуществлен поиск потенциальных веществ маркеров для 50 видов фармакопейных трав, в числе которых исследован и «эвкалипт прутовидный». В качестве биохимического маркера «эвкалипта прутовидного» в данной работе предложен эпиглобулол (веридифролол). Также в данной работе показано, что отсутствие характерного для растения вещества в травяном сборе, говорит о возможной видовой вариабельности, а также о низком качестве использованного растительного сырья. Можно не согласиться с выводами авторов, поскольку изучение проводилось на примере этанольного экстракта, полученного следующим образом «Подготовка проб для анализа. Около 1 г (точная навеска) сырья помещают в коническую колбу с притертой пробкой вместимостью 100 мл, прибавляют 20 мл 90% спирта и экстрагируют 60 мин при комнатной температуре с использованием магнитной мешалки. Извлечение отстаивают в течение 30 мин. Затем 1.5 мл извлечения переносят в микропробирку типа Эппендорф объемом 1,5 мл с завинчивающейся крышкой и центрифугируют при 8000 об/мин в течение 10 мин. Затем автоматической пипеткой отбирают 1 мл надосадочной жидкости в стеклянную виалу с завинчивающейся крышкой, которую помещают в барабан автосамплера хромато-масс-спектрометра» [148]. В данных условиях экстракция может пройти не достаточно полно, поскольку контакт сырья с экстрагентом носит непродолжительный характер, при этом нет никаких дополнительных условий, усиливающих эффективность экстракции: повышенная температура, давление, ультразвук. Кроме этого не проводилось варьирование концентраций этанола в экстрагенте, поэтому часть компонентов, возможно, не будет обнаружена при исследовании, в особенности травяных сборов.

Помимо ЛОС в листьях «эвкалипта прутовидного» присутствуют нелетучие органические соединения – органические кислоты, фенольные соединения, аминокислоты, гликозиды. В таблице 8 приведены данные из разных литературных источников по нелетучим соединениям, выделенным из листьев «эвкалипта прутовидного».

Таблица 8 – Нелетучие БАС листьев «эвкалипта прутовидного»

№ п/п	БАС	Класс соединений	Лит.источник
1	2	3	4
1	галловая кислота	фенолкарбоновые кислоты	[150]
2	эллаговая кислота	фенолкарбоновые кислоты	[150]
3	п-кумаровая кислота	фенолкарбоновые кислоты	[150,151]
4	кофейная кислота	фенолкарбоновые кислоты	[150]
5	феруловая кислота	фенолкарбоновые кислоты	[150]
6	хлорогеновая кислота	фенолкарбоновые кислоты	[150]

1	2	3	4
7	неохлорогеновая кислота	фенолкарбоновые кислоты	[150]
8	кумарин	кумарины	[150]
9	умбеллиферон	кумарины	[150]
10	скополетин	кумарины	[150]
11	дафноретин	кумарины	[150]
12	скополин	кумарины	[150]
13	скимин	кумарины	[150]
14	лютеолин	флавоноидные агликоны	[150]
15	кемпферол	флавоноидные агликоны	[150]
16	кверцетин	флавоноидные агликоны	[150, 151]
17	эвкалиптин	флавоноидные агликоны	[152]
18	мирицетин	флавоноидные агликоны	[150]
19	изорамнетин	флавоноидные агликоны	[150]
20	астрагалин	флавоноидные гликозиды	[150]
21	рутин	флавоноидные гликозиды	[150, 151]
22	изокверцитрин	флавоноидные гликозиды	[150]
23	Изорамнетина 3-О-β-D- глюкопиранозид	флавоноидные гликозиды	[150]
24	лецитин	фосфолипиды	[150]
25	урсоловая кислота	агликоны тритерпеноидных сапонинов	[150]
26	олеаноловая кислота	агликоны тритерпеноидных сапонинов	[150]
27	лактон-11,12- дигидроурсуловой кислоты	лактоны	[153]
28	β-ситостерин	стероиды	[150]
29	D-глюкоза	сахара	[150]
30	D-галактоза	сахара	[150]
31	D-ксилоза	сахара	[150]
32	L-рамноза	сахара	[150]
33	цистеин	аминокислоты	[150]
34	таурин	аминокислоты	[150]
35	фосфоэтаноламин	аминокислоты	[150]
36	аспарагинова к-та	аминокислоты	[150]
37	треонин	аминокислоты	[150]
38	серин	аминокислоты	[150]
39	глутаминова к-та	аминокислоты	[150]
40	пролин	аминокислоты	[150]
41	глицин	аминокислоты	[150]
42	аланин	аминокислоты	[150]
43	цитруллин	аминокислоты	[150]
44	α-аминомаслянная кислота (бутирин)	аминокислоты	[150]
45	валин	аминокислоты	[150]
46	цистин	аминокислоты	[150]
47	цистатионин	аминокислоты	[150]
48	метионин	аминокислоты	[150]
49	изолейцин	аминокислоты	[150]
50	тирозин	аминокислоты	[150]
51	фенилаланин	аминокислоты	[150]

1	2	3	4
52	этаноламин	аминокислоты	[150]
53	орнитин	аминокислоты	[150]
54	лизин	аминокислоты	[150]
55	1-метилгистидин	аминокислоты	[150]
56	3-метилгистидин	аминокислоты	[150]
57	аргинин	аминокислоты	[150]
58	алантоин	производные мочевины	[150]
59	лимонная кислота	органические кислоты	[21]
60	щавелевая кислота	органические кислоты	[21]
61	яблочная кислота	органические кислоты	[21, 150]
62	аскорбиновая кислота	органические кислоты	[21]
63	янтарная кислота	органические кислоты	[21]
64	винная кислота	органические кислоты	[150]
65	н-тритриконтан-16,18-диола	$\beta$ -дикетон	[151]
66	эвкалимин	флороглюциды	[146,151, 152, 154]
67	эувималь-1	флороглюциды	[152]

Методом ионэлюзионной хроматографии в «эвкалипте прутовидном» обнаружены органические кислоты [21], содержание которых в % от массы сухого растительного сырья составило: лимонная кислота – 1.2%, щавелевая – 4%, яблочная – 0.9%, аскорбиновая – 6.8%, янтарная – 3.7%.

Одними из характерных нелетучих компонентов «эвкалипта прутовидного», являются эуглобали, в частности эувималь-1 и эувиминаль-2 [146], относящиеся к терпеновым фенолальдегидам [155] группе флороглюцинов [152] и эвкалиптин, относящийся к флавоноидам [152]. Кроме того, интерес представляют дубильные вещества. Обнаруженный в листьях «эвкалипта прутовидного» н-тритриконтан-16,18-дион в количестве 30-50 мкг/г свежего сырья влияет на антиоксидантную активность [151].

### Выводы к главе 1.2.

Исходя из литературных данных, по составу ЛОС «эвкалипта прутовидного» нет единого мнения. Идентификация ЛОС «эвкалипта прутовидного» осуществлялась посредством анализа эфирного масла, спиртовых, ацетонитрильных и СКФ CO<sub>2</sub> экстрактов. Основными компонентами эвкалипта прутовидного являются терпеноиды и ароматические соединения. ПФА и ТФМЭ не применялись для изучения ЛОС эвкалипта прутовидного. Идентификация основной массы нелетучих БАС проводилась методом ТСХ и УФ-спектрометрии [150]. Экстракция БАС из листьев «эвкалипта прутовидного» субкритической водой и водно-этанольными смесями при повышенной температуре и давлении с последующей идентификацией не проводилась. Общий химический анализ БАС «эвкалипта прутовидного» не рассматривается с точки зрения идентификации



данного растения. Идентификация листьев «эвкалипта прутовидного» с помощью характерного хроматографического спектра не изучалась.

### 1.3. Современное состояние исследований «ромашки аптечной» (*Chamomilla recutita R.*)

Ромашек, эфирное масло которых оказывает лечебный эффект достаточно много. В частности, масло ромашки римской содержит в большом количестве эфиры ангеликовой кислоты, что определяет ее более выраженное седативное действие, а масло ромашки марокканской не содержит хамазулена (поэтому оно желтого, а не синего цвета), зато содержит пинен, оказывающий местно раздражающее, антисептическое, отхаркивающее, диуретическое действие. Содержание хамазулена максимально в масле ромашки обыкновенной, или аптечной, также она известна под названием немецкая или мелкая [62], чем и определяется ее выраженное бактерицидное, противовоспалительное, противоотечное, болеутоляющее действие. Однако хамазулен обнаруживается только в масле ромашки аптечной и не содержится в самом растении, т.к. образуется в ходе термической переработки сырья [3, 62]. Найдено много соединений, главным образом сесквитерпеновых лактонов гвайянового ряда, которые при нагревании с водой превращаются в хамазулен. В ромашке аптечной обнаружен прохамазулен – матрицин. Это вещество при перегонке с водяным паром превращается в хамазулен [3, 156].

Согласно XI ГФ РФ цветки «ромашки аптечной» идентифицируется по следующим показателям:

1. Внешние признаки

2. Микроскопия.

3. Числовые показатели. Эфирного масла не менее 0,3%; влажность не более 14%; золы общей не более 12%; золы, нерастворимой в 10% растворе хлористоводородной кислоты, не более 4%; листьев, стеблей, корзинок с остатками цветоносов длиннее 3 см не более 9%; корзинок почерневших и побуревших не более 5%; органической примеси (части других неядовитых растений и корзинок других видов ромашки) не более 3%; минеральной примеси не более 0.5%.

При этом основной акцент по идентификации ЛР делается на внешние признаки и микроскопию, без применения каких либо аналитических методов, хотя в настоящее время имеется достаточно исследований по химическому составу «ромашки аптечной».

Около 120 компонентов было идентифицировано в эфирном масле «ромашки аптечной» [156]. Основными компонентами масла (до 50 %) являются сесквитерпены, в т.ч. кадинен, фарнезен, бисаболон, бисаболон, а также их оксиды, хамазулен [158, 159]. В

таблице 9 приведен компонентный состав ЛОС эфирного масла ромашки аптечной по данным различных литературных источников. Главными составляющими масла являются терпеноиды,  $\alpha$ -бисаболол и его оксиды ( $\leq 78\%$ ) и азулены, включая хамазулен (1-15%). Также встречаются карбоксильные кислоты и проазулены, фарнезены (12-28%), спатуленол, спироэфир, включая цис/транс ин-ен-дициклоэфир (8-20%). В работе [61] показано, что такие вещества как хамазулен, ин-ен-дициклоэфир,  $\alpha$ -бисаболол оксид А,  $\alpha$ -бисаболол оксид Б,  $t$ - $\beta$ -фарнезен и спатуленол являются постоянными компонентами эфирного масла ромашки аптечной. Хамазулен не является нативным компонентом цветков «ромашки аптечной», а образуется из матрицина в процессе термообработки растительного сырья при получении эфирного масла [3]. Другие ЛОС, обнаруженные в эфирном масле, полученном из образцов «ромашки аптечной» различных производителей, могут в значительной степени варьироваться (табл. 9). Химический состав растительного сырья «ромашки аптечной» определяется не только видовой принадлежностью, но условиями произрастания [61, 62, 64]. Максимальное воздействие солнечных лучей на растение увеличивает количество БАС, т.о. улучшая качество эфирного масла, увеличивая при этом содержание в нем хамазулена. Обычно эфирное масло ромашки аптечной имеет синий цвет, который ему придает хамазулен. Однако при исследовании ромашки аптечной, произрастающей в Красноярском крае [63], из нее было получено эфирное масло желто-зеленого цвета, что говорит о небольшом количестве хамазулена, как следствие особых климатических условий.

Таблица 9 – ЛОС эфирного масла ромашки аптечной

Название компонента	Индекс удерживания на колонке OV-101[64]	[62]	[61]	[64]
1	2	3	4	5
изоамилацетат	-	0-0.13	-	-
$\alpha$ -пинен	926	-	0-0.04	0.05
сабинен	964	-	-	0.05-0.1
мирцен	981	0.2	-	0.05-0.1
6-метил-5-гептен-2-он	967	-	0-0.05	0.1
триметилбензол	984	-	-	0.05-0.1
3-октанол	987	-	-	0.05-0.1
<i>n</i> -цимен	1010	-	0-0.30	0.1-0.2
лимонен	1020	-	0-0.12	0.1
1,8-цинеол	1019	0.5	0-0.12	
атемизия кетон	1044	0-0.33	0-0.31	0.2-0.4
артемизия спирт	-	-	0-0.07	-
транс- $\beta$ -оцимен	1038	1.7	-	0.05-0.1
линалоол	-	0.1	-	-
$\gamma$ -терпинен	1047	0-0.13	-	0.05-0.1

Продолжение таблицы 9

1	2	3	4	5
терпинолен	1073	-	-	0.05-0.1
терпинен-4-ол	1161	-	-	0.05-0.1
$\alpha$ -терпинеол	1172	0.3	-	0.05-0.1
$\alpha$ -туйон	-	-	0-0.13	-
L-ментон	-	-	0-0.41	-
изоментон	-	-	0-0.51	-
борнеол	-	0.2	0-0.33	-
карвон	1215			0.05-0.1
пулегон	-	1.0	-	-
$\alpha$ -копаен	-	1.0	-	-
$\gamma$ -элемен	1344	-	-	0.1-0.3
декановая кислота	1371	0-0.14	-	1.1-2.1
$\beta$ -элемен	-	0-0.15	-	-
$\beta$ -кариофиллен	1411	0.11-1.0	-	0.1
транс анетол	-	-	0-1.29	-
беркейарадулен	-	-	0-0.28	-
пиретрин I	-	-	0-0.7	-
$\beta$ -фарнезен	1445	16-27	1.12-14.07	4.3-12.6
аллоаромадендрен	-	-	0-0.76	-
$\beta$ -селинен	-	0-0.32	0-0.62	-
$\alpha$ -куркумен	-	-	0-0.36	-
гермакрен D	1471	0-2.09	0-1.11	0.5-1.7
$\gamma$ -мууролен	1474	1.3	-	
гермакрен B	-	0-1.48	-	-
(E,Z)- $\alpha$ -фарнезен	1485	0-1.0	0-0.51	0.3-0.9
эреморфиллен	-	-	0-0.47	-
бициклогермакрен	-	-	0-0.87	-
цис- $\alpha$ -бисаболен	-	-	0-0.12	-
$\beta$ -бисаболен	1494	-	-	0.05-0.7
$\alpha$ -мууролен	-	3.4	0-0.06	-
$\gamma$ -кадинен	1500	5.2	-	0.05-0.1
$\beta$ -кадинен	-	0-0.34	-	-
$\sigma$ -кадинен	1509	-	-	0.05-0.1
неролидол	1546	2	-	0.1
спатуленол	1558	0-0.67	2.50-10.75	2.3-3.6
веридифлорол	-	0-0.13	-	-
кариофиллен оксид	1562	-	-	0.05-0.2
кариофилленол	1611	-	-	0.2-0.3
$\tau$ -кадинол	1620	-	-	0.2
$\gamma$ -кадинол	-	0-1.25	-	-
(-)- $\alpha$ -бисаболол оксид (B)	1636	11-30	2.69-21.38	7.9-12.4
(-)- $\alpha$ -бисаболол	1670	10	0-1.87	2.9-7.8
бисаболон оксид	1657	-	0-31.53	6.7-13.6
$\beta$ -бисаболен	-	-	0-21.92	-
(-)- $\alpha$ -бисаболол оксид (A)	1730	1-44	7.72-19.76	20.2-33.1
гексагидрофарнезилацетон	-	0-0.31	-	-
хамазулен	1702	2.88-15	0.38-11.48	5.3-7.2
$\beta$ -фарнезол	-	2	-	-

Продолжение таблицы 9

1	2	3	4	5
дициклоэфир	1830	0.71-5.53	0.71-3.13	17.1-21.7
амбретолид	-	-	0-1.36	-

Качественные и количественные химические характеристики эфирного масла «ромашки аптечной» показывают существование четырех различных хемотипов растения. Британская и Европейская фармакопеи описывают только 2 типа эфирного масла ромашки аптечной: 1 тип – с преобладанием бисаболол оксида, 2 тип – с преобладанием (-)- $\alpha$ -бисаболола. Британская фармакопейная статья на ромашку аптечную рекомендует оценивать эфирное масло ромашки качественно с помощью ТСХ и количественно с помощью ГХ на процентное содержание бисаболол оксида, (-)- $\alpha$ -бисаболола и хамазулена, не придавая значения другим составляющим компонентам [44].

Состав масляного экстракта, по данным [86], содержит 41 соединение. Ароматическая фракция представлена четырьмя сесквитерпенами: фарнезеном (0.32%), бисабололом (1.41%), метокси кумарином (0.6%) и дициклоэфиром (1.23%) и составляет 3.56% от всех определенных веществ. Фракция полиненасыщенных жиров представлена кислотами такими, как пальмитиновая, линоленовая, олеиновая, стеариновая и эфирами этих кислот составляет 56.27%. Отмечено значительное содержание токоферолов – 24.37%, стиролов – 17.95%. Не было выявлено высокомолекулярных спиртов, входящих в состав восков.

По данным исследователей [86], наиболее представительным в отношении БАВ является СКФ-СО<sub>2</sub> экстракт, который не содержит каких-либо примесей, за исключением воды. Экстракт представляет собой маслянистую массу с воскообразными включениями, зеленовато-коричневого цвета с ярко выраженным характерным запахом. Состав СКФ-СО<sub>2</sub> экстракта ромашки содержит ароматическую фракцию, которая составила 50.05%, и представлена циклическими сесквитерпенами  $\beta$ - и  $\alpha$ -фарнезеном (10.03%);  $\beta$ -кубененом, гермакреном, лепидозеном (0.7%); неофитодиеном, тетрагидроиононом, миристином,  $\beta$ -сесквифелландреном (0.22%); метоксикумарином (1.6%); нафталиндиолом и спатуленолом (1.74%) и дициклоэфиром (18.58%), бисабололом (13.9%) и хамазуленом (0.3%). Фракция высокоатомных спиртов составляет 25.59% и представлена непредельным фитолом, который входит в состав хлорофилла, а также спиртами восковой фракции (трикозанолом, тетракозанолом и др.). Содержание полиненасыщенных жирных кислот составило 0.66% за счет линоленовой кислоты. Отмечено относительно высокое содержание – 2.8% и стиролов – 20.9%.

В настоящее время экстракты из «ромашки аптечной» производятся в промышленных масштабах [157]. В качестве экстрагентов используются 1,2-

пропиленгликоль, водно-спирто-глицериновые смеси, а также сверхкритический CO<sub>2</sub>. Наибольшее содержание БАС «ромашки аптечной» содержится в сверхкритическом экстракте, полученном по технологии СФ-экстракции диоксидом углерода при рабочих параметрах давления 250 атм. и температуре 50°C [157].

Изучение состава различных экстрактов «ромашки аптечной» позволяет получить представление не только о ЛОС, но и нелетучих БАС. Исследование экстрактов «ромашки аптечной», позволило выявить широкий спектр БАС различных классов (табл. 10).

Таблица 10 – Нелетучие БАС цветов «ромашки аптечной»

Название компонента	Класс соединений	Метод анализа. Литературный источник
1	2	3
герниарин	кумарины	УФ-спектроскопия [63, 156, 158,159]
айапанин (7-метоксикумарин)	кумарины	ГХ-МС [148, 149, 161]
7-метоксикумарин муравьиной кислоты	кумарины	ГХ-МС с дериватизацией [162]
6,7-дигидроксикумарин	кумарины	ГХ-МС с дериватизацией [162]
умбеллиферон	кумарины	УФ-спектроскопия [63,156, 158,159, 162]
апигенин	флавоны	УФ-спектроскопия [63,156] ВЭЖХ [161]
апигенин-7-О-глюкозид	флавоны	ЖХ-МС, ЖХ-МС-МС, ЯМР, УФ-спектроскопия [63,156,160] ВЭЖХ [161]
лютеолин	флавоны	УФ-спектроскопия [63,156] ВЭЖХ [161]
лютеолин-7-О-глюкозид	флавоны	ЖХ-МС, ЖХ-МС-МС, ЯМР, УФ-спектроскопия [63,156,160]
апигенин-7-(6-кафеил-глюкозид)	флавоны	ЖХ-МС, ЖХ-МС-МС, ЯМР [160]
апигенин-7-(6-малонил-глюкозид)	флавоны	ЖХ-МС, ЖХ-МС-МС, ЯМР [160]
апигенин-7-(6-ацетил-глюкозид)	флавоны	ЖХ-МС, ЖХ-МС-МС, ЯМР [160]
апигенин-7-(4-ацетил-глюкозид)	флавоны	ЖХ-МС, ЖХ-МС-МС, ЯМР [160]
апигенин-7-(4-ацетил-1,6-малонил-глюкозид)	флавоны	ЖХ-МС, ЖХ-МС-МС, ЯМР [160]
апигенин-7-(моноацетил/мономалонил-глюкозид) изомер	флавоны	ЖХ-МС, ЖХ-МС-МС, ЯМР [160]
кверцетин	флавонолы	УФ-спектроскопия [63,156] ВЭЖХ [161]
кверцимеритрин	флавонолы	УФ-спектроскопия [63,156, 158,159]

1	2	3
апиин	флавоны	[158,159]
рутин	флавонолы	УФ-спектроскопия [63,156] ВЭЖХ [161]
кемпферол	флавонолы	ВЭЖХ [161]
изорамнетин	флавонолы	ВЭЖХ [161]
патулетин	флавонолы	УФ-спектроскопия [63,156]
нарингенин	флавонон	УФ-спектроскопия [63,156]
катехин	флавоноиды	ГХ-МС с дериватизацией [162]
эпикатехин	флавоноиды	ГХ-МС с дериватизацией [162]
лимонная кислота	органические кислоты	ионэкслюзионной хроматографии [21]
щавелевая кислота	органические кислоты	ионэкслюзионной хроматографии [21]
яблочная кислота	органические кислоты	ионэкслюзионной хроматографии [21]
аскорбиновая кислота	органические кислоты	ионэкслюзионной хроматографии [21]
фумаровая кислота	органические кислоты	ионэкслюзионной хроматографии [21]
протокатеховая кислота	органические кислоты	ВЭЖХ [56]
кофейная кислота	органические кислоты	УФ-спектроскопия [63,156] ВЭЖХ [161]
транс-кофейная кислота	органические кислоты	ГХ-МС с дериватизацией [162]
хлорогеновая кислота	органические кислоты	УФ-спектроскопия [156] ВЭЖХ [161]
<i>n</i> -кумаровая кислота	органические кислоты	ВЭЖХ [161]
салициловая кислота	органические кислоты	ВЭЖХ [161]
2,5-дигидроксибензойная кислота	органические кислоты	ГХ-МС с дериватизацией [162]
ванилиновая кислота	органические кислоты	ГХ-МС с дериватизацией [162]
транс-феруловая кислота	органические кислоты	ГХ-МС с дериватизацией [162]
таннины		УФ-спектроскопия [63]
пектины	полисахариды	УФ-спектроскопия [63]
аминокислоты		УФ-спектроскопия [63]
холин	аминоспирт	УФ-спектроскопия [63]
фитол	спирт	ГХ-МС [86]
токоферолы	витамины	ГХ-МС [86]
стиролы	политерпены	ГХ-МС [86]
тараксастирол	тритерпеновый спирт	[158,159]
каротиноиды		[158,159]

Продолжение таблицы 10

1	2	3
фитостерины		[158,159]
слизи		[158,159]

При идентификации нелетучих БАС существует ряд трудностей, связанных с имеющейся приборной базой. Так в ряде работ для идентификации соединений используется только метод УФ-спектроскопии, который не обладает достаточной селективностью, а является частным методом в совокупности испытаний [63, 156, 163]. Даже при использовании таких методов как ВЭЖХ-УФ и ГХ-МС с дериватизацией компонентов встречаются расхождения в результатах идентификации за счет малой чувствительности приборов и низкого содержания компонентов в пробе [162].

В качестве биохимического маркера для «ромашки аптечной» предложено рассматривать айапанин (7-метоксикумарин) [148,149].

Не осталась без внимания минеральная составляющая «ромашки аптечной». В работе [63] изучено сырье «ромашки аптечной», произрастающей в Красноярском крае, с целью выявления жизненно важных микроэлементов и признаков экологического загрязнения. В данном исследовании содержание макро- и микроэлементов определялось атомно-адсорбционным методом. Обнаружено наличие тяжелых металлов, таких как ртуть, кадмий, мышьяк, свинец, присутствие которых, скорее всего, вызвано экологическими факторами, но их содержание не превышает ПДК. Одновременно выявлено значительное содержание необходимых микроэлементов, таких как натрий – 87 мг/100г, калий – 715 мг/100г, кальций – 597 мг/100г, железо – 30.94 мг/100г, цинк – 2.82 мг/100г, медь – 39 мг/100г. Экспериментально установлено, что степень извлечения некоторых элементов при приготовлении отваров составляет 90-95%.

### **Выводы к главе 1.3.**

Сырье ромашки аптечной достаточно хорошо изучено. Но все описанные выше исследования направлены только на изучение компонентного состава различного рода экстрактов, без привязки к возможности идентификации по полученным хроматографическим спектрам конкретного сырья или использования хроматографического спектра в качестве характеристики «ромашки аптечной» в связи с географическими или климатическими параметрами. ПФА и ТФМЭ не применялись для изучения ЛОС цветов «ромашки аптечной». Экстракция БАС из цветов «ромашки аптечной» водно-этанольными смесями при повышенной температуре и давлении с последующей идентификацией не проводилась.

## ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### 2.1. Объекты исследования

- 1) Цветки «ромашки аптечной (*Chamomilla recutita* R.)», производства ООО «Красногорсклексредства» (КЛС) 2012 и 2014 года выпуска;
- 2) цветки «ромашки аптечной (*Chamomilla recutita* R.)», выращенные в Самарском Ботаническом саду в 2014 г.;
- 3) цветки «ромашки аптечной (*Chamomilla recutita* R.)» ПКФ «Фитофарм» ООО 2012 г.;
- 4) цветки «ромашки аптечной (*Chamomilla recutita* R.)» ООО «Камелия-ЛТ» 2012г.;
- 5) цветки «ромашки аптечной (*Chamomilla recutita* R.)» ООО «Рослекраспром» 2012г.;
- 6) листья «эвкалипта прутовидного (*Eucalypti viminalis* Labill)» ПКФ «Фитофарм» ООО;
- 7) листья «эвкалипта прутовидного (*Eucalypti viminalis* Labill)» ООО «Красногорсклексредства».

Выбор объектов исследования обусловлен их широким применением в медицинской практике, в тоже время они являются недостаточно изученными с хроматографической точки зрения.

### 2.2. Последовательность проведения экспериментальной работы

1. Оптимизация условий получения газового экстракта на примере «ромашки аптечной».
2. Идентификация ЛОС «ромашки аптечной» и «эвкалипта прутовидного».
3. Оценка воспроизводимости хроматографических профилей с целью использования их для получения общего образа изучаемого растительного сырья.
4. Выявление оптимальных условий проведения ТФМЭ на сорбционные микротрубки, заполненные различными сорбентами.
5. Экстракция БАС «ромашки аптечной» и «эвкалипта прутовидного» традиционными способами: приготовление водного отвара и экстракта водно-этанольной смесью согласно ГФ.
6. Экстракция БАС «эвкалипта прутовидного» водой в субкритическом состоянии при температурах 120, 160 и 200°C и давлении 5МПа.
7. Экстракция БАС «эвкалипта прутовидного» водно-этанольными смесями, содержащими 10%, 50% и 70% этанола, при температуре 200°C и давлении 5МПа.



8. Экстракция БАС «ромашки аптечной» водой в субкритическом состоянии при температурах 150 и 200°C и давлении 5МПа.
9. Экстракция БАС «ромашки аптечной» водно-этанольными смесями, содержащими 10%, 50% и 70% этанола, при температурах 150 и 200°C и давлении 5МПа.
10. Анализ полученных экстрактов методом УФ- и ИК-спектрометрии, ГЖХ-МС, ВЭЖХ-УФ.
11. Оценка эффективности извлечения.

### **2.3. Условия выполнения измерений**

- Температура окружающей среды ( $25 \pm 2$ )°С;
- Относительная влажность ( $80 \pm 5$ ) %;
- Атмосферное давление (84 - 106) кПа;
- Частота переменного тока ( $50 \pm 1$ ) Гц;
- Напряжение в сети ( $220 \pm 10$ ) В.

### **2.4. Подготовка лекарственного растительного сырья для выявления оптимального режима проведения ПФА**

Предварительно во всех образцах ромашки определяли содержание влаги гравиметрическим методом. Влажность образцов составила  $5 \pm 1\%$ .

Образец ромашки аптечной массой 1 г помещался в пенициллиновый флакон, который герметично закрывался резиновой пробкой с фторопластовой прокладкой. Флакон с образцом устанавливался в контейнер для парофазного анализа. Затем контейнер с образцом термостатировался при температуре 100°C в течение 20 мин, 30 мин, 40 мин, с последующим вводом пробы паровой фазы в объеме 1 см<sup>3</sup> в испаритель газового хроматографа.

### **2.5. Приготовление концентрационных микротрубок для ТФМЭ**

Для приготовления концентрационных микротрубок использовали инъекционные иглы однократного применения размером 0.8×38 мм, которые предварительно взвешивали на аналитических весах, затем заполняли адсорбентом. Для заполнения сорбционных микротрубок использовали сорбенты, приведенные в таблице 11. Адсорбент заранее кондиционировали при максимальной температуре использования в токе газа-носителя гелия в течение 12 ч. Концентрационную микротрубку, заполненную сорбентом, также взвешивали для определения массы сорбента в капилляре. Далее с использованием приготовленной

концентрационной микротрубки проводился холостой ввод пробы, для установления чистоты сорбента и выявления наличия артефактов.

Таблица 11 – Характеристики сорбентов, используемых в эксперименте [71,83]

Сорбент	Максимальная рабочая температура, °С	Удельная поверхность, м <sup>2</sup> /г	Масса сорбента в трубке, мг	Размер сорбента, меш
Тенах™ ТА (Поли-дифенилоксид)	350	35	3	80/100
Carborack В (графитированный уголь) «Витохром М»	> 400	100	3	80/100
Porapak Q (Этилвинилбензол/ дивинилбензол) «ALLTECHGmbH» CAS № 9043-77-0	250	550	3	80/100
HayeSepN (Дивинил-бензол/ этилен- гликольдиметакрилат)	165	405	3	80/100
MN-202 (Сверхсшитый полистирол)	200	800-1000 бипористый	1.7	40/60

## 2.6. Подготовка лекарственного растительного сырья для проведения ТФМЭ

Для проведения ТФМЭ образец «ромашки аптечной» или образец «эвкалипта прутовидного» массой 1 г помещали в пенициллиновый флакон, который герметично закрывали резиновой пробкой с фторопластовой прокладкой. Флакон с образцом устанавливали в контейнер для ПФА. Затем контейнер с образцом термостатировали при температуре 100°С в течение 30 мин. После термостатирования проводили отбор пробы для ПФА либо проводили ТФМЭ на концентрационную микротрубку газовой фазы над образцом в объеме 100 см<sup>3</sup> – для идентификации компонентов. Для выявления оптимальных условий приготовления стандартных образцов на основе концентрационных микротрубок, объем аспирируемой газовой фазы выбирался в зависимости от объема до проскока для соответствующего сорбента и находился в диапазоне 2 – 10 см<sup>3</sup>. Скорость аспирирования составляла 2 см<sup>3</sup>/мин. Ввод пробы осуществляли, помещая концентрационную микротрубку в испаритель хроматографа при температуре 160°С – при использовании Haye Sep N, 200°С – при использовании MN-202, 250°С – Porapak Q и 270°С – для Carborack В и Тенах™ ТА, с задержкой ввода в течение 4 секунд.

## **2.7. Аналитическая газовая хроматография**

### **2.7.1. Оборудование**

Эксперимент по изучению ЛОС в экстрактах «ромашки аптечной» и «эвкалипта прутовидного» проводился на газовом хроматографе Agilent 7890 GC, совмещенном с масс-селективным детектором 5975С с ионизацией электронным ударом производства Agilent Technologies (США).

Разделение проводилось с использованием колонок:

1. Кварцевая капиллярная колонка с неподвижной фазой на основе сополимера 5%-дифенила 95% диметилсилоксана HP-5ms 30м × 250мкм × 0.25мкм фирмы Agilent;
2. Кварцевая капиллярная колонка Rst Stabilwax DA 60м × 320мкм × 0.5мкм фирмы Restek;

Контейнеры для ПФА термостатировали в термостате газового хроматографа с точностью поддержания температуры 0.1°C.

### **2.7.2. Режимы работы газового хроматографа с масс-селективным детектором**

Температура термостата колонок:

режим № 1 – изотерма 40°C в течение 5мин, нагрев до 80°C со скоростью 2°C/мин, нагрев до 150°C со скоростью 7°C/мин, изотерма 5мин, нагрев до 280°C со скоростью 10°C/мин, изотерма 5мин;

режим № 2 [3] – изотерма 50°C в течение 2 мин – нагрев до 240°C со скоростью 4°C/мин – нагрев до 280°C со скоростью 20°C/мин – изотерма 280°C в течение 5 мин.

Температура испарителя 270°C.

Температура источника ионов 150°C.

Температура квадруполя 230°C.

Температура переходной камеры 280°C.

Поток газа-носителя 1 мл/мин.

Сброс 1:20.

Объем вводимой газовой пробы 1000 мкл.

Объем вводимой жидкой пробы 1 мкл.

Задержка на выход растворителя 5 мин (при анализе жидких проб).

Диапазон сканирования: 45-500 а.е.м.

## 2.8. Жидкостная экстракция БАС из растений.

Извлечение БАС из «ромашки аптечной» и «эвкалипта прутовидный» проводили четырьмя способами, причем во всех случаях соблюдалось одинаковое соотношение растительного сырья и экстрагента:  $1.3 \pm 0.05 \text{ г} : 55 \text{ см}^3$  – для «ромашки аптечной»,  $2.20 \pm 0.05 \text{ г} : 100 \text{ см}^3$  – для «эвкалипта прутовидного».

Для проведения экстракции ЛР измельчали и просеивали через сита для выделения фракции 0.5 мм [100, 109]. Влажность сырья составляла  $5 \pm 1 \%$ .

*Экстракция водой при температуре  $95 \pm 5^\circ\text{C}$  и атмосферном давлении в статическом режиме (ЭВ  $95^\circ\text{C}$  0.1 МПа),* т.е. традиционный способ приготовления отвара согласно Государственной фармакопее XI [4]. ЛР, указанной выше массы, помещали в термостойкий стеклянный стакан, добавляли соответствующее количество горячей дистиллированной воды, накрывали крышкой и нагревали на кипящей водяной бане в течение 15 мин, затем охлаждали при комнатной температуре в течение 45 мин, отфильтровывали, оставшееся на фильтре сырье отжимали. Объем полученного экстракта доводили дистиллированной водой до соответствующего объема.

*Экстракции 50% и 70%-ным раствором этанола в воде при температуре  $25 \pm 5^\circ\text{C}$  и атмосферном давлении в статическом режиме (ЭЭ  $25^\circ\text{C}$  0.1МПа),* т.е. приготовление спиртовой настойки, согласно Государственной фармакопее XI, статья «Настойки» [4]. Образец ЛР указанной выше массы подвергали дробной мацерации, т.е. настаиванию с периодической (1 раз в 2 дня) заменой полученного экстракта на новую порцию экстрагента. Порции экстрактов объединяли, при этом общее количество экстрагента составило  $100 \text{ см}^3$  для «эвкалипта прутовидного» и  $55 \text{ см}^3$  для «ромашки аптечной». Полученный экстракт отстаивали при температуре  $7 \pm 2^\circ\text{C}$  до получения прозрачной жидкости не менее 2 суток и фильтровали.

*Экстракция субкритической водой в динамическом режиме (ЭСВ  $120^\circ\text{C}$ ,  $150^\circ\text{C}$ ,  $160^\circ\text{C}$ ,  $200^\circ\text{C}$ , 5 МПа )* осуществлялась при температурах 120, 160,  $200 \pm 1^\circ\text{C}$  – для «эвкалипта прутовидного», при температурах 150,  $200 \pm 1^\circ\text{C}$  – для «ромашки аптечной», и давлении  $5.0 \pm 0.1 \text{ МПа}$ .

*Экстракция 10%, 50% и 70% растворами этанола в воде (ЭЭ 10%, 50%, 70%,  $200^\circ\text{C}$  5МПа).* Условия экстракции: температура  $200 \pm 1^\circ\text{C}$  и давление  $5.0 \pm 0.1 \text{ МПа}$  – для «эвкалипта прутовидного», температура 150,  $200 \pm 1^\circ\text{C}$  и давление  $5 \pm 0.1 \text{ МПа}$  – для «ромашки аптечной».

Для проведения экстракции при повышенных температуре и давлении, исследуемое ЛР массой  $2.20 \pm 0.05 \text{ г}$  («листья эвкалипта прутовидного») или  $1.30 \pm 0.05 \text{ г}$  («цветы ромашки аптечной») – необходимый заполняемый объем  $10 \text{ см}^3$  – смешивали с

гранулами карбида кремния размером  $2 \times 3$  мм до объема  $20 \text{ см}^3$  и перемешивали для предотвращения слеживания сырья, затем полученную пробу помещали в экстрактор. После подключения экстрактора к нагреваемому капилляру, в систему подавали экстрагент. Когда экстрагент полностью заполнял экстрактор, перекрывался выход из экстрактора, и система выдерживалась 20 мин при давлении  $14.0 \pm 0.1$  МПа. Далее открывали вентиль тонкой регулировки, включали насос высокого давления и начинался нагрев термостата, в котором находится обогреваемый капилляр и экстрактор. Давление поддерживалось на уровне  $5.0 \pm 0.1$  МПа, поток экстрагента составлял  $1.7 \pm 0.1 \text{ см}^3/\text{мин}$ . Порции экстрактов при динамическом режиме экстракции отбирали с момента выхода системы на заданную температуру фракциями по  $5 \text{ см}^3$ .

Объем экстрагента, пропущенного через систему составлял  $100 \text{ см}^3$  при экстракции БАС «эвкалипта прутовидного» и  $55 \text{ см}^3$  при экстракции БАС «ромашки аптечной».

## 2.9. Установка для экстракции при повышенных температуре и давлении

Эксперимент по экстракции БАС из ЛР при повышенной температуре и давлении проводили на оригинальной установке (рис. 2), разработанной коллективом авторов [126]. Принцип работы установки заключается в следующем. Дистиллированная и дегазированная вода из сосуда 1 по капилляру 2 поступает посредством насоса высокого давления 3 в нагреваемый капилляр 4, а затем в экстрактор 5, заполненный растительным сырьем, смешанным с гранулами карбида кремния для предотвращения слеживания. Нагреваемый капилляр и экстрактор находятся в термостате 6. Полученный экстракт поступает в охлаждаемый капилляр 7 и далее в приемник 10. Давление регулируется с помощью вентиля тонкой регулировки 9 и контролируется с помощью манометра 8.

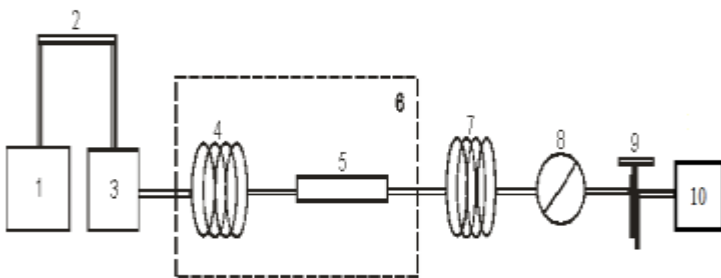


Рисунок 2 – Установка для проведения экстракции при повышенных температуре и давлении.

## **2.10. Аналитическая высокоэффективная жидкостная хроматография.**

### **2.10.1. Оборудование**

Эксперимент по изучению нелетучих БАС проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе «Biotronik» со спектрофотометрическим детектором  $\lambda = 190 - 700\text{нм}$ .

Разделение проводили с использованием колонок:

1. LunaC<sub>18</sub>250мм × 4,6мм × 5мкм фирмы «Phenomenex» (США) – экстракты «эвкалипта прутовидного»;
2. LunaC<sub>18</sub> 250мм × 3мм × 5мкм фирмы «Phenomenex» (США) – экстракты «ромашки аптечной».

### **2.10.2. Подвижная фаза.**

В качестве подвижной фазы использовали смесь ацетонитрила (элюент А) и 0.01 М фосфатного буферного раствора рН=3 (элюент Б).

Приготовление 0.01 М фосфатного буферного раствора рН=3 осуществлялось путем разбавления 0.1М фосфатного буферного раствора в 10 раз: 100 см<sup>3</sup> 0.1М буферного раствора разбавляли водой до 1000 см<sup>3</sup> и добавляли концентрированную фосфорную кислоту Н<sub>3</sub>РО<sub>4</sub> до рН=3.

0.1М фосфатный буферный раствор готовился путем растворения 13.8 г натрия фосфорнокислого однозамещенного (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O) в 900 см<sup>3</sup> бидистиллированной воды, раствор тщательно перемешивали и доводили до 1000 см<sup>3</sup>.

Требуемые объемы ацетонитрила и фосфатного буферного раствора отмеряли мерными цилиндрами.

Готовую подвижную фазу дегазировали на ультразвуковой бане.

### **2.10.3. Режимы элюирования.**

Режим элюирования – градиентный, трехступенчатый (если не указано иначе):

1. При ВЭЖХ анализе экстрактов «эвкалипта прутовидного» на содержание эвкалимина:

Элюент А 20% – 16мин; подъем до 40% за 7 мин, А 40% – 15мин, подъем до 60% за 7 мин, А – 60% 30 мин.

2. При ВЭЖХ анализе экстрактов «ромашки аптечной»:

Элюент А 20% – 27 мин; подъем до 40% за 7 мин, А 40% – 21 мин, подъем до 60% за 7 мин, А – 60% 30 мин.

Детектирование осуществляли при длинах волн 210, 254, 278 нм [164] при ВЭЖХ анализе экстрактов «эвкалипта прутовидного»; 210, 340 нм [161] – при ВЭЖХ анализе экстрактов «ромашки аптечной».

### **2.11. Аналитическая сверхвысокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС)**

ВЭЖХ-МС анализ проводился на хроматографе Agilent G6230 A LC/MSD TOF. Хроматографическое разделение было выполнено на колонке Luna C<sub>18</sub> (50 × 2.1 мм, зерно 2 мкм) «Phenomenex» (США).

Подвижная фаза состояла из Ацетонитрила (А) и 0,5% муравьиной кислоты (Б). Режим элюирования – градиентный: 0-10 мин 0 – 30% (А) в (Б); 10 – 14 мин 30 – 40% (А); 14 – 17 мин 40 – 70% (А) с постоянной скоростью потока 1,5 см<sup>3</sup>/мин.

Способ ионизации – электроспрей. Спектр снимался по отрицательным и положительным ионам. Масс-детектирование выполнялось в режиме полного сканирования в диапазоне 120-1700 m/z. Погрешность определения массы не более 0.001 Да. Напряжение на капилляре – 4000 В. Скимер 65 V. Напряжение фрагментации 175 V. Поток нагретого до 325°C газа азота 8 дм<sup>3</sup>/мин. Давление потока газа в распылителе 3.1 bar.

### **2.12. Идентификация БАС**

Идентификация веществ осуществлялась путем сравнения полученных масс-спектров с библиотечными спектрами WILEY8 и NIST8.

При проведении ВЭЖХ-МС использовали программу обработки данных MassHunter WorkStation.

Для идентификации нелетучих БАС проводилась дериватизация полученных экстрактов по методике, описанной в работе [56]. Для этого к 20-30 мкг сухого остатка полученных экстрактов добавлялось 40 мкл дериватирующего агента – N,O-бис-(триметилсилил)-трифторацетамида (БСТФА) (Chromatographie Service GmbH, Germany), затем 40 мкл ацетонитрила. Флакон герметично закупоривался и помещался в термостат при 80°C на 30 мин. Затем, после охлаждения, 1 мкл полученной смеси вводилось в испаритель хромато-масс-спектрометра.

Экстракты были исследованы на ИК-Фурье спектрометре Nicolet iS50 FT-IR в диапазоне 4000 – 500 см<sup>-1</sup>. Для изготовления образцов с KBr использовали сухой остаток исследуемых экстрактов.

Для исследования полученных экстрактов методом УФ-спектрометрии использовался спектрофотометр СФ-46. Спектр снимался в диапазоне длин волн 190 – 700 нм. Пробы готовились следующим образом: 20 мкл полученных экстрактов разводили в 10 мл 70% спирта.

### 2.13.Реактивы

N,O-бис-(триметилсилил)-трифторацетамид (БСТФА) (Chromatographie Service GmbH, Germany);

$\alpha$ -пинен производства «Fluka»;

$\beta$ -пинен производства «Fluka»;

1,8-цинеол производства «Fluka»;

$\alpha$ -феландрен производства «Sigma-Aldrich»;

раствор *p*-цимена в метаноле производства «Restek», (2 мкг/см<sup>3</sup>);

$\beta$ -фарнезен «Sigma-Aldrich»;

7-метоксикумарин «Sigma-Aldrich»;

бисаболол оксид А «Fluka»;

кислота фосфорная ГОСТ 6552-80;

вода дистиллированная - ГОСТ 6709;

этанол, х.ч. ГОСТ 5963-67;

ацетонитрил «extrapure» фирмы «MERCCK»;

калий фосфорнокислый однозамещенный, ч.д.а. ТУ 6-09-5324-87;

универсальная индикаторная бумага рН=0-12;

гелий (сжатый) баллонный ГОСТ 9093-74.

ЛР цветы «ромашки аптечной», выращенное в Самарском ботаническом саду, ЛР листья «эвкалипта шаровидного», стандартные образцы эвкалимина,  $\beta$ -ситостерола, кверцетина, рутина, лютеолина и апигенина были любезно предоставлены профессором Куркиным В.А. (кафедра фармакогнозии Самарского государственного медицинского университета).

Градуировочные растворы эвкалимина, лютеолина, апигенина, готовили, разведением в 95% растворе этанола в воде; бисаболол оксида А, фарнезена и 7-метоксикумарина – в 70% растворе этанола в воде.



### 2.14. Обработка данных

Количество извлекаемых БАС оценивали следующими способами:

- 1) Относительное содержание БАС  $a$ , мкг/г растительного сырья рассчитывали по формуле:

$$a = \frac{5 \times \sum_{i=1}^n C_i}{m_{\text{pc}}}$$

где

$C_i$  – концентрация компонента, найденная по градуировочному графику, мкг/см<sup>3</sup>;

5 – объем фракции, см<sup>3</sup>;

$n$  – число фракций;

$m_{\text{pc}}$  – масса растительного сырья, г.

- 2) Соотношение интенсивностей пиков на хроматограмме, %, рассчитывали методом внутренней нормализации:

$$A_i = 100 \times \frac{Q_i}{\sum_{i=1}^n Q_i}$$

где

$Q_i$  – площадь пика  $i$  компонента, усл.ед.

$n$  – число компонентов.

- 3) Гравиметрическим методом.

Относительное количество сухого остатка  $w$  % рассчитывалось по формуле:

$$w = \frac{\sum_{i=1}^n m_i}{m_{\text{pc}}} \times 100$$

где

$m_i$  – масса сухого остатка в каждой фракции, г;

$m_{\text{pc}}$  – масса растительного сырья, г.

$n$  – число фракций.

Индексы удерживания летучих компонентов растительного сырья при линейном программировании температуры колонки,  $I_i^T$ , рассчитывали по формуле [3]:

$$I_i^T = 100 \cdot \left( \frac{t_{R_i} - t_{R_z}}{t_{R_{z+1}} - t_{R_z}} \right) + 100z$$

где

$t_{R_i}$  – время удерживания исследуемого  $i$ -го компонента пробы;

$t_{R_z}$  и  $t_{R_{z+1}}$  – время удерживания соседних гомологов  $n$ -алканов с числом углеродных атомов в молекулах  $z$  и  $z+1$  соответственно.

При выполнении расчетов в уравнение подставляют не температуры, а соответствующие времена удерживания, так как численные значения температуры удерживания исследуемого вещества и  $n$ -алканов прямо пропорциональны исправленным временам удерживания, а время удерживания можно измерить с большей точностью, чем температуру. Вносить поправку на мертвое время нет необходимости, поскольку и числитель, и знаменатель содержат разность двух величин.

$\bar{I}_{изм}^T$  – среднее арифметическое значение измеренного индекса  $n$ -гептана, элюирующегося между двумя другими  $n$ -алканами, с числом углеродных атомов в молекулах  $z$  и  $z+n$  соответственно;

Оценку прецизионности определения индексов удерживания при линейном программировании температуры колонки проводили на примере  $n$ -гептана из выборки  $n=10$  измерений в течение десяти дней. На основании экспериментальных данных рассчитывались:

Среднеквадратическое отклонение (СКО) результата измерения линейного индекса удерживания ( $S_x$ ):

$$S_x = \sqrt{\frac{\sum_i^n (I_{ген}^T - \bar{I}_{изм}^T)^2}{n(n-1)}},$$

где

$I_{ген}^T$  – единичное значение измеренного индекса  $n$ -гептана.

$\bar{I}_{изм}^T$  – среднее арифметическое значение измеренного индекса  $n$ -гептана, определяемое по формуле:

$$I_{изм}^T = 100 \cdot n \left( \frac{t_{R_{ген}} - t_{R_z}}{t_{R_{z+n}} - t_{R_z}} \right) + 100z$$

где  $t_{R_{ген}}$  – время удерживания  $n$ -гептана.

Границы доверительного интервала измерения индекса

$$\Delta = \pm S_x \cdot t(P, f),$$

где

$t(P, f)$  – критерий Стьюдента при  $P=0,95$  и  $f=n-1$ .

Расчет среднеквадратичного отклонения (СКО) результатов измерений проводился по формуле:

$$S(x) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{(n-1)}}$$

Расчет относительного среднеквадратичного отклонения (ОСКО), проводился по формуле:

$$S_r(x) = \frac{S(x)}{\bar{X}}$$

Доверительный интервал рассчитывался по формуле при  $n=5$ ,  $P=0.95$ :

$$\Delta = \frac{t(P, f) S(x)}{\sqrt{n}}$$

Систематическая погрешность измерения концентрации веществ оценивалась по растворам стандартных образцов и рассчитывалась по формуле:

$$\delta = \frac{C_{э} - C_{ст.}}{C_{ст.}}$$

где  $C_{э}$  – концентрация раствора стандартного образца, найденная по градуировочному графику;

$C_{ст.}$  – истинная концентрация раствора стандартного образца.

Обработка данных по методу главных компонент (МГК) проводилась с использованием программы Statistika 6.0.

Расчет концентраций компонентов проводился согласно градуировочным зависимостям:

1)  $\alpha$ -пинен:

$$y = (2.017 \pm 0.085) \times 10^3 c + (5.474 \pm 0.023) \times 10^4$$

при  $n = 5$ ,  $P = 0.95$ ,  $r = 0.991$

2)  $\beta$ -пинен:

$$y = (1.191 \pm 0.065) \times 10^3 c + (7.080 \pm 0.196) \times 10^4$$

при  $n = 5$ ,  $P = 0.95$ ,  $r = 0.995$

3)  $\alpha$ -феландрен:

$$y = (2.622 \pm 0.098) \times 10^3 c + (2.172 \pm 0.095) \times 10^4$$

при  $n = 5$ ,  $P = 0.95$ ,  $r = 0.993$

4) *n*-цимен:

$$y = (3.689 \pm 0.109) \times 10^3 c + (7.826 \pm 0.085) \times 10^4$$

при  $n = 5$ ,  $P = 0.95$ ,  $r = 0.998$

5) 1,8-цинеол:

$$y = (5.436 \pm 0.211) \times 10^2 c + (1.608 \pm 0.046) \times 10^5$$

при  $n = 5$ ,  $P = 0.95$ ,  $r = 0.998$

б) эвкалимин:

$$y = (61.57 \pm 1.84)c + (1.54 \pm 0.094) \times 10^{-2}$$

при  $n = 5$ ,  $P = 0.95$ ,  $r = 0.998$

7) хамазулен:

$$y = (2.479 \pm 0.108) \times 10^3 c + (3.774 \pm 0.04) \times 10^4$$

при  $n = 5$ ,  $P = 0.95$ ,  $r = 0.998$

8) бисаболол оксид А:

$$y = (1.277 \pm 0.073) \times 10^3 c$$

при  $n = 5$ ,  $P = 0.95$ ,  $r = 0.997$

9) 7-метоксикумарин:

$$y = (1.955 \pm 0.067) \times 10^3 c$$

при  $n = 5$ ,  $P = 0.95$ ,  $r = 0.989$

10) апигенин:

$$y = (2.374 \pm 0.099) \times 10^3 c + (1.09 \pm 0.05)$$

при  $n = 5$ ,  $P = 0.95$ ,  $r = 0.998$

11) лютеолин:

$$y = (2.961 \pm 0.053) \times 10^3 c + (4.26 \pm 0.032)$$

при  $n = 5$ ,  $P = 0.95$ ,  $r = 0.981$

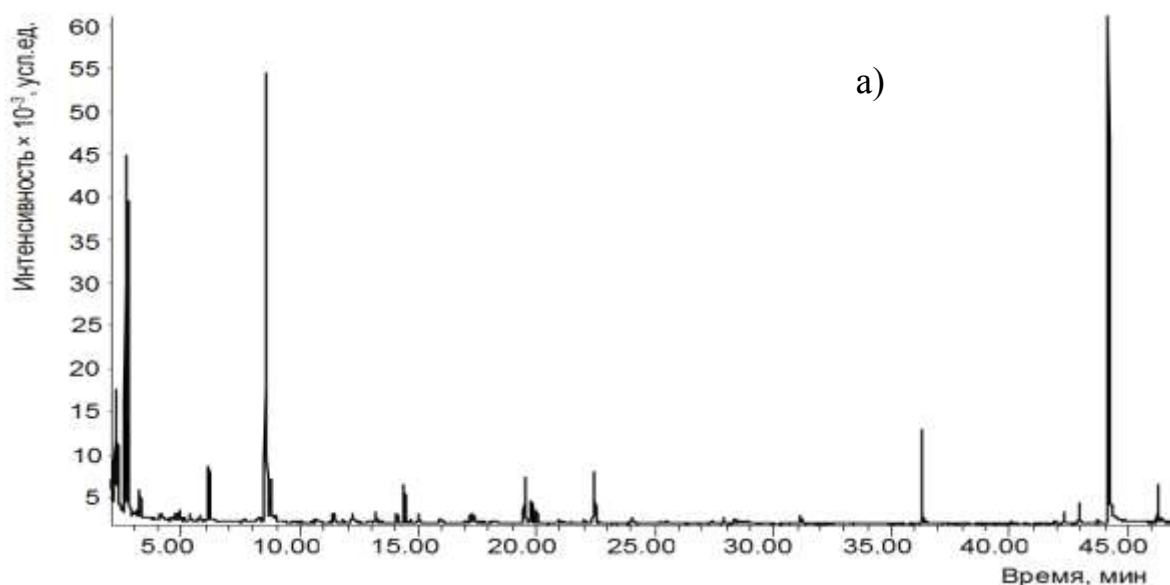
## ГЛАВА 3

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ КОМПОНЕНТОВ  
ЦВЕТОВ «РОМАШКИ АПТЕЧНОЙ» И ЛИСТЬЕВ «ЭВКАЛИПТА  
ПРУТОВИДНОГО» ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ОБЩЕГО ОБРАЗА ОБЪЕКТА МЕТОДОМ  
ПАРОФАЗНОГО АНАЛИЗА**

Метод распознавания общего образа объектов или «фингерпринта» и создание баз данных названы одними из приоритетных направлений аналитической химии [10]. При данном подходе основные задачи состоят в выборе способа пробоподготовки, позволяющего наиболее эффективно извлечь физиологически активные компоненты растения, а также в выборе условий получения представительного аналитического сигнала.

### Глава 3.1. Парофазный анализ цветов «ромашки аптечной»

Для изучения эффективности газовой экстракции, а также оптимизации условий пробоподготовки, была произведена оценка влияния времени термостатирования при  $T = 100^{\circ}\text{C}$  на состав газового экстракта цветов «ромашки аптечной». Этот этап исследования проводили с использованием образца цветов «ромашки аптечной» производства «Красногорсклексредства» выпуска 2012 г. Выбор температуры термостатирования осуществлялся исходя из имеющегося опыта ПФА растительного сырья [42]. На рисунке 3 представлены хроматограммы, полученные при анализе равновесной газовой фазы «ромашки аптечной», где время термостатирования при  $100^{\circ}\text{C}$  составляло 20, 30 и 40 минут. Как видно из рисунка 3, хроматографические профили практически совпадают при всех изучаемых режимах пробоподготовки.



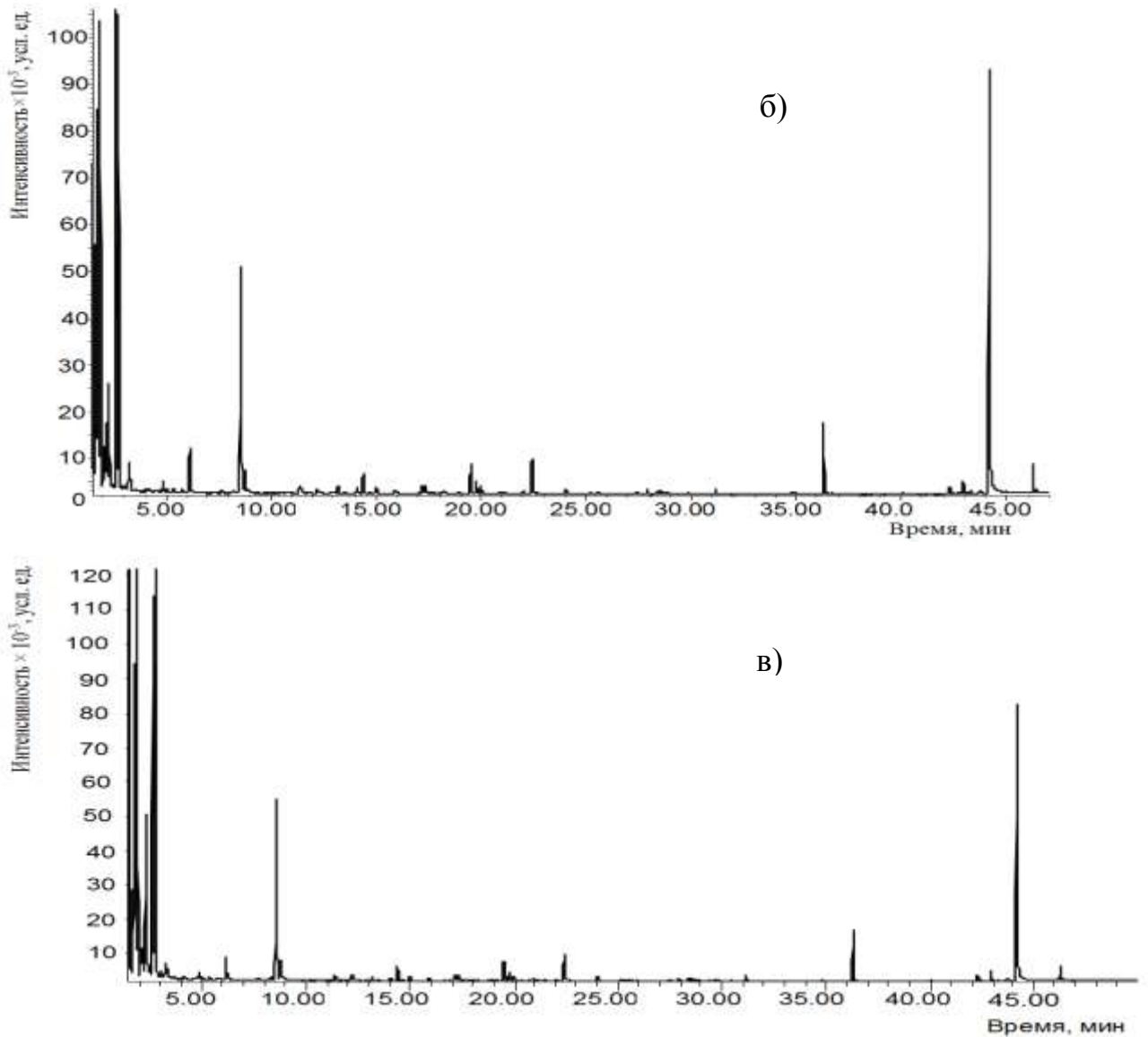


Рисунок 3 – Хроматограммы, полученные при ПФА «ромашки аптечной»: а) при термостатировании в течение 20 минут; б) при термостатировании в течение 30 минут; в) при термостатировании в течение 40 минут.

Одновременно с анализом эффективности газовой экстракции проводили идентификацию ЛОС цветов «ромашки аптечной». При ПФА цветов «ромашки аптечной» было обнаружено 45 ЛОС, большинство из которых относится к терпеноидам (табл. 12). Рассматривались только компоненты с содержанием в паровой фазе более 0.05% и определяемые по библиотеке масс-спектров с вероятностью более 90%. Кроме того, в таблице 12 представлены данные по временам удерживания, интерполяционные характеристики удерживания в виде индексов удерживания при линейном программировании температуры и площади пиков полученных ЛОС.

Таблица 12 – Площади пиков компонентов ромашки аптечной при разных режимах термостатирования

№ п/п	Время удерживани я $t_R$ , мин	Индекс удерживания $I_i^T \pm \Delta$	Определяемый компонент	Площадь пика $(\bar{Q} \pm \Delta) \times 10^{-4}$ . при n = 5, P=0.95 при термостатировании в течении			ОСКО, $S_r(Q)$		
				20 мин	30 мин	40 мин	20 мин	30 мин	40 мин
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	1.65	497±2	пропанон	35.53±9.85	120.68±14.14	138.41±50.47	0.22	0.16	0.29
2	1.74	505±2	диметилсульфид	75.01±27.46	237.53±13.35	306.37±50.62	0.29	0.05	0.13
3	1.89	521±2	2-метилпропаналь	57.72±23.98	285.49±16.37	397.13±108.97	0.33	0.07	0.22
4	2.06	537±2	винилэтанوات	13.81±4.45	30.41±2.07	23.37±6.02	0.26	0.05	0.21
5	2.31	615±2	гепта-4,6-диин-2-ол	30.98±13.71	77.01±3.77	141.68±9.90	0.36	0.04	0.06
6	2.65	644±2	3-метилбутаналь	175.89±106.32	308.92±20.09	379.83±98.55	0.49	0.05	0.21
7	2.77	654±2	2-метилбутаналь	131.49±25.60	310.73±21.11	456.09±90.67	0.16	0.07	0.16
8	3.04	677±2	1-пентен-3-ол	-	3.69±1.54	3.49±1.55	-	0.34	0.36
9	3.26	696±2	пентаналь	9.93±2.98	20.98±2.84	16.85±4.12	0.24	0.11	0.19
10	4.09	727±2	3-метилбутан-1-ол	-	2.49±0.12	2.67±0.19	-	0.04	0.06
11	4.17	729±2	2-метилбутан-1-ол	-	3.72±0.33	3.01±0.32	-	0.07	0.09
12	4.79	750±2	этил-2-метилпропионат	-	2.88±0.33	-	-	0.09	-
13	4.89	754±2	2-пропенилиден-циклобутен	5.63±0.54	9.74±0.74	11.88±1.91	0.08	0.06	0.13
14	5.11	761±2	гексеналь	-	4.29±0.59	-	-	0.11	-
15	5.38	770±2	метил-2-метилбутаноат	3.36±0.39	3.99±0.41	4.04±0.66	0.09	0.08	0.13
16	5.89	790±2	2,3-бутандиол	-	6.98±0.82	-	-	0.09	-
17	6.16	796±2	гексеналь	21.97±3.64	39.07±1.65	32.34±5.72	0.13	0.03	0.14
18	8.34	840±2	3-метилбутановая кислота	-	5.29±1.21	-	-	0.18	-
19	8.58	844±2	этил-2метилбутаноат	158.94±28.06	234.85±29.93	228.96±45.46	0.14	0.09	0.16
20	8.79	848±2	этил-3метилбутаноат	18.39±3.78	28.56±3.53	27.85±5.69	0.17	0.09	0.16

Продолжение таблицы 12

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
21	8.95	852±2	пропилбутаноат	8.01±2.26	6.34±1.13	5.12±1.26	0.23	0.14	0.19
22	12.31	912±2	бутиролактон	8.16±2.57	7.92±2.10	7.19±2.75	0.25	0.21	0.31
23	13.22	926±2	α-пинен	9.87±4.55	7.78±1.91	19.79±16.63	0.37	0.19	0.68
24	14.12	939±2	камфен	6.79±3.28	6.30±1.40	6.02±1.17	0.39	0.18	0.16
25	14.43	943±2	пропил-2-метилбутаноат	16.12±2.71	24.46±3.38	22.85±4.10	0.14	0.11	0.14
26	15.03	952±2	бензальдегид	5.42±0.36	7.67±0.54	9.06±0.79	0.05	0.06	0.07
27	17.24	984±2	6-метил-5-гептен-2-он	5.48±1.43	8.56±0.75	9.06±1.18	0.21	0.07	0.11
28	17.40	987±2	2-пентилфуран	5.97±1.65	8.15±0.53	11.39±1.16	0.22	0.05	0.08
29	19.54	1017±2	п-цимен	22.56±1.73	34.09±4.67	31.56±3.12	0.06	0.11	0.08
30	19.80	1021±2	лимонен	10.11±1.37	14.11±1.46	14.88±1.63	0.11	0.08	0.09
31	20.01	1023±2	1,8-цинеол	6.79±1.08	9.31±1.54	27.79±22.66	0.13	0.13	0.66
32	20.95	1036±2	3-фенилпропаналь	2.69±0.75	3.57±0.54	3.86±0.53	0.23	0.12	0.11
33	22.02	1051±2	γ-терпинен	-	3.16±0.32	3.37±0.29	-	0.08	0.07
34	22.46	1057±2	3,3,6-триметил-1,5-гептадиен-4-он	27.25±2.79	41.42±3.52	51.55±13.89	0.08	0.07	0.22
35	24.05	1079±2	3,3,6-триметил-1,5-гептадиен-4-ол	4.27±0.45	6.21±0.50	5.75±0.24	0.08	0.06	0.03
36	27.94	1153±2	п-ментон	3.08±0.18	4.56±0.29	4.11±0.47	0.05	0.05	0.09
37	28.42	1164±2	борнеол	3.74±0.29	4.64±0.47	4.35±0.61	0.06	0.08	0.11
38	28.77	1172±2	ментол	-	2.55±0.16	3.44±0.62	-	0.05	0.15
39	31.18	1240±2	карвон	3.55±0.54	3.74±0.57	3.76±0.59	0.12	0.12	0.13
40	36.32	1455±2	β-фарнезен	34.37±3.66	48.02±5.05	41.11±5.26	0.09	0.08	0.11
41	42.30	1661±2	α-бисаболол оксид Б	6.59±1.34	7.18±2.02	5.43±0.94	0.16	0.22	0.14
42	42.95	1689±2	бисаболон оксид	11.33±1.37	15.92±4.88	11.49±2.34	0.09	0.25	0.16
43	43.74	1708±2	7-метоксикумарин	3.32±1.18	4.05±1.35	2.81±1.05	0.29	0.27	0.29
44	44.18	1731±2	бисаболол оксид А	245.23±33.87	334.52±83.01	248.49±28.82	0.11	0.19	0.09
45	46.26	1831±2	ен-ин-дициклоэфир (цис- и транс- изомеры)	13.09±2.65	19.15±5.05	12.07±1.64	0.16	0.21	0.11



Следует отметить значительное содержание диметилсульфида в газовом экстракте цветов «ромашки аптечной», который представляет собой в чистом виде жидкость с неприятным запахом, что ставит, казалось бы, под сомнение его присутствие в газовом экстракте. Однако ПФА, проведенный ради этого соединения при начальной температуре термостата колонок 30°C, а также детектирование ионов с массой от 29 а.е.м. показал правомерность идентификации.

По результатам хромато-масс-спектрометрического анализа соединения, имеющие наиболее интенсивные пики на хроматограмме, были выбраны в качестве характерных компонентов цветков «ромашки аптечной», соотношение которых приняли за характерный хроматографический спектр данного ЛР. Они соответствуют пропанону ( $I^T = 497$ ), диметилсульфиду ( $I^T = 505$ ), 2-метилпропаналу ( $I^T = 521$ ), винилэтануату ( $I^T = 537$ ), гепта-4,6-диин-2-олу ( $I^T = 615$ ), 3-метилбутаналу ( $I^T = 644$ ), 2-метилбутаналу ( $I^T = 654$ ), этил-3-метилбутаноату ( $I^T = 844$ ), пропил-2-метилбутаноату ( $I^T = 943$ ), *n*-цимену ( $I^T = 1017$ ), 3,3,6-триметил-1,5-гептадиен-4-ону ( $I^T = 1057$ ),  $\beta$ -фарнезену ( $I^T = 1455$ ), бисаболол оксиду А ( $I^T = 1731$ ) и ен-ин-дициклоэфиру ( $I^T = 1831$ ). Все обнаруженные соединения относятся к физиологически активным веществам [5,152]. Как видно из таблицы 12, изменение времени термостатирования, влияет как на число компонентов в газовой фазе, которая наиболее представительна при термостатировании в течение 30 мин, так и на ОСКО площадей пиков, которое наименьшее также при 30 минутном термостатировании. Это можно объяснить тем, что при термостатировании в течение 20 мин газовая экстракция происходит не полностью, а увеличение времени термостатирования до 40 минут приводит, вероятно, к частичной деструкции некоторых органических соединений. При 40 минутном термостатировании для таких компонентов как пропанон ( $I^T = 497$ ), диметилсульфид ( $I^T = 505$ ), 2-метилпропаналь ( $I^T = 521$ ), гепта-4,6-диин-2-ол ( $I^T = 615$ ), 3-метилбутаналь ( $I^T = 644$ ), 2-метилбутаналь ( $I^T = 654$ ), бензальдегид ( $I^T = 952$ ), 6-метил-5-гептен-2-он ( $I^T = 984$ ), 2-пентилфуран ( $I^T = 987$ ), лимонен ( $I^T = 1021$ ), эвкалиптол ( $I^T = 1023$ ), 3,3,6-триметил-1,5-гептадиен-4-он ( $I^T = 1057$ ), 3-фенилпропаналь ( $I^T = 1036$ ) – наблюдается увеличение площади пиков, причем для 2-метилпропаналя увеличение происходит более чем в 7 раз, а для 2-метилбутанала – в 3.5 раза, для эвкалиптола – в 4 раза. Тогда как для остальных компонентов происходит уменьшение площадей пиков при термостатировании в течение 40 минут. Более наглядно влияние времени термостатирования на площади характерных пиков ромашки аптечной представлено на рисунке 4. Так, для легколетучих компонентов, таких как 2-метилпропаналь ( $I^T = 521$ ), 2-метилбутаналь ( $I^T = 654$ ) максимальное значение площади пиков соответствует 40 минутному термостатированию, в это же время для остальных веществ – пентаналь ( $I^T = 696$ ), гексаналь ( $I^T = 796$ ), этил-2-метилбутаноат ( $I^T = 845$ ), пропил-2-метилбутаноат ( $I^T = 943$ ),  $\beta$ -фарнезен ( $I^T = 1455$ ),  $\alpha$ -

бисаболол оксид Б ( $I^T = 1661$ ), бисаболол оксид А ( $I^T = 1731$ ), ен-ин-дициклоэфир ( $I^T = 1831$ ) – площади пиков максимальны в точке, соответствующей 30 минутному термостатированию. Учитывая значение ОСКО, а также тот факт, что площади пиков характерных для цветов «ромашки аптечной» веществ имеют максимальное значение при термостатировании в течение 30 минут, это время выбрано оптимальным для получения представительного газового экстракта растительного сырья.

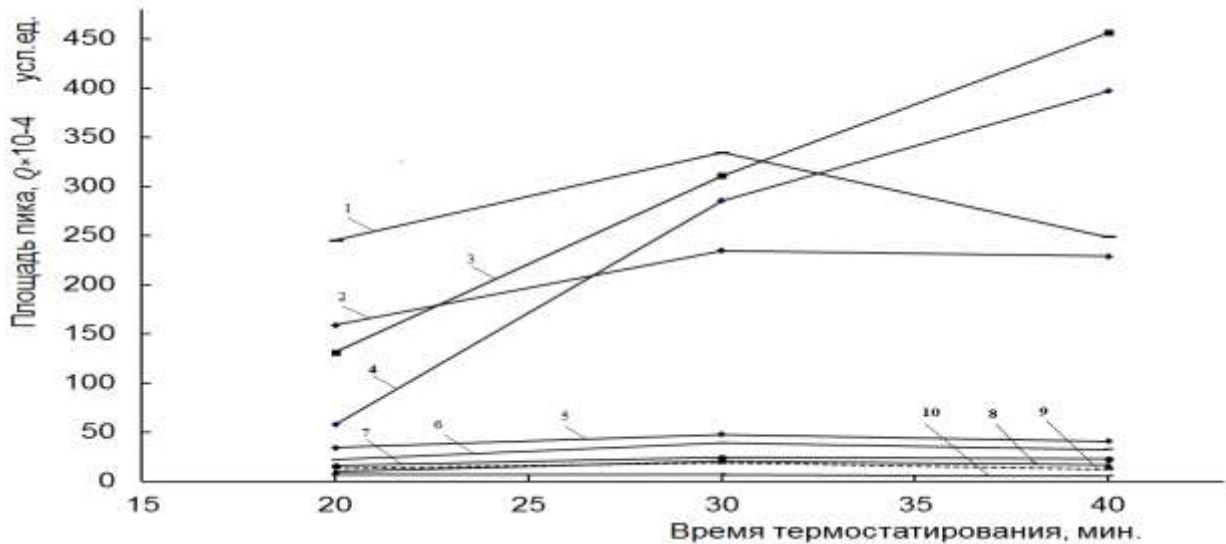


Рисунок 4 – График зависимости площади пиков компонентов газовой экстракта «ромашки аптечной» от времени термостатирования, где: (1) – бисаболол оксид А; (2) – этил-2-метилбутаноат; (3) – 2-метилбутаналь; (4) – 2-метилпропаналь; (5) –  $\beta$ -фарнезен; (6) – гексаналь; (7) – пропил-2-метилбутаноат; (8) – пентаналь; (9) – ен-ин-дициклоэфир; (10) –  $\alpha$  бисаболол оксид Б.

При выбранном режиме получения равновесной газовой фазы была проведена ТФМЭ в объеме 100 мл газовой экстракта на концентрационные микротрубки, заполненные сорбентом Науе Sep N с последующей термодесорбцией. Кратковременность воздействия высокой температуры на компоненты эфирного масла ромашки не дает им разрушиться, о чем свидетельствуют полученные хроматограммы при непосредственном анализе паровой фазы и с использованием концентрационных микротрубок.

На рисунке 5 одном масштабе представлены хроматограммы, полученные при ПФА ромашки аптечной (рис. 5-а) и с использованием сорбционных микротрубок (рис. 5-б). Как видно из рисунка 5, интенсивность пиков и число компонентов, обнаруженное с использованием сорбционных микротрубок, значительно превосходит те количественные и качественные характеристики, которые получены при ПФА. В результате проведения ТФМЭ с последующей термодесорбцией было идентифицировано около 90 компонентов. В таблице 13 приведены результаты ПФА и ПФА+ТФМЭ методом ГХ-МС цветов «ромашки аптечной», рассчитаны индексы удерживания и приведено относительное содержание компонентов в пробе для приблизительной оценки их содержания в газовом экстракте.

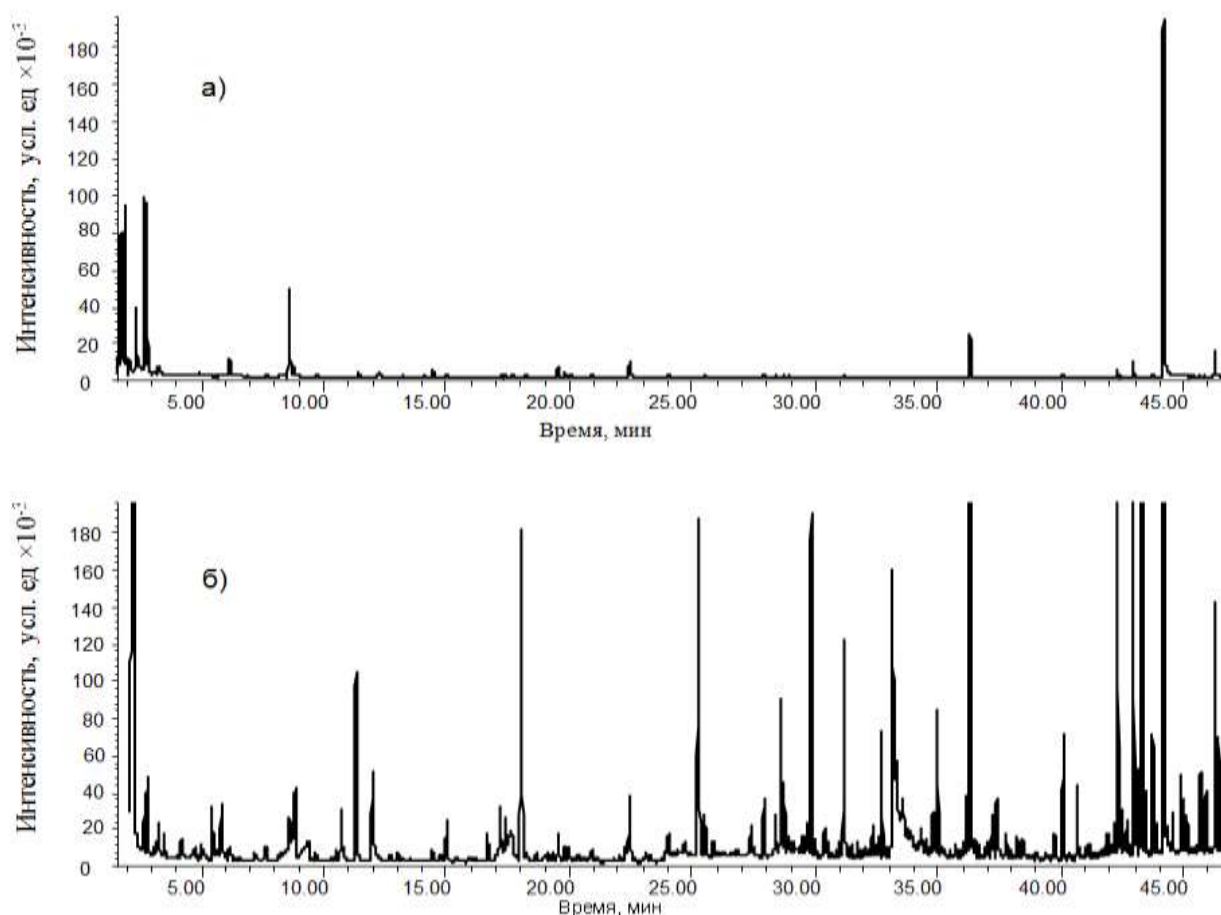


Рисунок 5 – Хроматограммы газового экстракта «ромашки аптечной» в одном масштабе, полученные при использовании ПФА (а) и ПФА с последующей ТФМЭ (б).

Таблица 13 – Относительное содержание ЛОС ромашки аптечной

Название компонента	Индекс удерживания $I_i^T \pm \Delta$ ед.индекса	Относительное содержание ЛОС, %, $\bar{A}_i \pm \Delta, n=5, P=0.95$	
		ПФА	ПФА + ТФМЭ
1	2	3	4
пропанон	497±2	4.80±0.96	-
диметилсульфид	505±2	9.39±0.52	-
2-метилпропаналь	521±2	11.25±1.08	-
винилэтанат	537±2	1.17±0.06	-
гепта-4.6-диин-2-ол	615±2	3.04±0.09	-
3-метилбутаналь	644±2	12.22±0.79	0.54±0.04
2-метилбутаналь	654±2	12.29±1.06	1.14±0.11
1-пентен-3-ол	677±2	0.14±0.06	0.19±0.06
пентаналь	696±2	0.84±0.13	-
3-метилбутан-1-ол	727±2	0.09±0.01	-
2-метилбутан-1-ол	729±2	0.15±0.01	-
этил-2-метилпропионат	750±2	0.11±0.01	0.27±0.02
2- пропенилиденциклобутен	754±2	0.38±0.03	-

Продолжение таблицы 13

1	2	3	4
гексеналь	761±2	0.17±0.02	-
метил-2-метилбутаноат	770±2	0.16±0.02	-
2,3-бутандиол	790±2	0.11±0.01	0.81±0.04
гексаналь	796±2	1.55±0.07	0.28±0.01
2-фурилметаналь	827±2	-	0.22±0.01
3-метилбутановая кислота	840±2	0.21±0.04	-
этил-2-метилбутаноат	844±2	9.29±1.19	0.28±0.01
этил-3-метилбутаноат	848±2	1.13±0.14	0.41±0.02
пропилбутаноат	852±2	0.25±0.04	-
бутиролактон	908±2	0.31±0.08	1.81±0.04
α-пинен	926±2	0.31±0.08	0.05±0.01
камфен	939±2	0.25±0.05	0.21±0.04
пропил-2-метилбутаноат	943±2	0.97±0.14	0.26±0.04
бензальдегид	952±2	0.31±0.01	0.71±0.02
β-пинен	967±2	-	0.28±0.01
1-октен 3-ол	977±2	-	0.43±0.02
6-метил-5-гептен-2-он	979±2	0.34±0.02	1.16±0.04
2-пентилфуран	987±2	0.32±0.01	1.10±0.03
n-цимен	1017±2	1.35±0.17	0.52±0.05
лимонен	1021±2	0.56±0.06	0.29±0.02
1,8-цинеол	1023±2	0.37±0.07	0.26±0.02
3-фенилпропаналь	1036±2	0.14±0.02	0.45±0.03
γ-терпинен	1051±2	0.13±0.01	0.09±0.01
3,3,6-триметил-1,5-гептадиен-4-он	1057±2	1.64±0.13	1.25±0.05
3,3,6-триметил-1,5-гептадиен-4-ол	1079±2	0.24±0.01	0.76±0.04
6-метил-3,5-гептадиен-2-он	1094±2	-	1.11±0.04
камфор	1142±2	-	0.29±0.03
ментон	1153±2	0.18±0.01	0.92±0.05
борнеол	1163±2	0.18±0.01	0.94±0.05
1-Н-нафталин-2-он-3,4,5,6,7-гексагидро-4а,8а-диметил	1165±2	-	2.30±0.11
ментол	1172±2	0.19±0.01	1.14±0.03
n-крезол	1189±2	-	0.24±0.02
эстрагол	1193±2	-	0.51±0.04
1,6-диоксаспиро[4.4]-нон-3-ен-2-он	1217±2	-	0.31±0.03
пулегон	1235±2	-	0.36±0.03
карвон	1240±2	0.15±0.02	3.25±0.02
метилдеcanoат	1329±2	-	3.14±0.04
α-копаен	1378±2	-	0.27±0.04
пиретрон	1390±2	-	0.82±0.03
кариофиллен	1430±2	-	0.52±0.04
кумарин	1436±2	-	0.41±0.03
7-метил-1-нафтол	1450±2	-	0.86±0.07
β фарнезен	1455±2	1.89±0.15	8.77±0.11
гермакрен D	1479±2	-	0.33±0.05
γ мууролен	1480±2	-	0.17±0.02
β селинен	1492±2	-	0.64±0.06
β бисаболен	1510±2	-	0.19±0.03

$\alpha$ аморфен	1518 $\pm$ 2	-	0.19 $\pm$ 0.02
спатуленол	1583 $\pm$ 2	-	2.99 $\pm$ 0.05
$\beta$ -эудесмол	1649 $\pm$ 2	-	0.45 $\pm$ 0.04
бисаболол оксид Б	1661 $\pm$ 2	0.28 $\pm$ 0.07	8.19 $\pm$ 0.15
бисаболол оксид	1668 $\pm$ 2	-	0.91 $\pm$ 0.06
бисаболон	1678 $\pm$ 2	-	0.66 $\pm$ 0.08
1,4-диметил-7(1-метилэтил)азулен	1680 $\pm$ 2	-	0.41 $\pm$ 0.05
бисаболон оксид	1690 $\pm$ 2	0.62 $\pm$ 0.18	6.53 $\pm$ 0.12
7метоксикумарин	1709 $\pm$ 2	0.16 $\pm$ 0.05	2.56 $\pm$ 0.08
хамазулен	1721 $\pm$ 2		0.67 $\pm$ 0.05
бисаболол оксид А	1731 $\pm$ 2	13.15 $\pm$ 3.02	24.20 $\pm$ 0.21
ен-ин-дициклоэфир	1831 $\pm$ 2	0.75 $\pm$ 0.18	4.12 $\pm$ 0.09
6,10,14-триметил-2-пентадеканон	1868 $\pm$ 2	-	0.20 $\pm$ 0.03
гексадекановая кислота	1883 $\pm$ 2	-	1.19 $\pm$ 0.14
октадекановая кислота	1956 $\pm$ 2	-	0.43 $\pm$ 0.05

Так при ПФА в составе газового экстракта «ромашки аптечной» альдегиды занимают доминирующее положение – всего 38.76%: 2-метилпропаналь, 3-метилбутаналь, 2-метилбутаналь, пентаналь, гексаналь, бензальдегид, 3-фенилпропаналь; вторыми по содержанию являются сесквитерпены и их производные – 16.26%:  $\beta$ -фарнезен, аромадендрен, бисаболол оксид Б, бисаболон оксид, 7-метоксикумарин, бисаболол оксид А; далее идут эфиры – 14.65 %; спирты - всего 3.70%: гепта-4,6-диин-2-ол, 1-пентен-3-ол, 2-метилбутан-1-ол, 3-метилбутан-1-ол, 1-пентанол, 2,3-бутандиол; монотерпены и их производные – 2.97%:  $\alpha$ -пинен, *n*-цимен, лимонен, эвкалиптол. При ТФМЭ с последующей термодесорбцией в пробе значительное количество составляют сесквитерпены и их производные – 60.14%, второе место принадлежит эфирам – 11.16%, а также монотерпенам и их производным – 10.57%; производные нафталина составляют – 4.23%, альдегиды – 3.27%, спирты – 1.43%. При проведении ТФМЭ происходит концентрирование компонентов, и увеличивается вероятность обнаружения ЛОС, которые содержатся в следовых количествах и теряются при ПФА. С учетом всех методов пробоподготовки из данных таблицы 13 видно, что основными ЛОС цветов «ромашки аптечной» при ПФА в сочетании ТФМЭ являются: 3-метилбутаналь, 2-метилбутаналь, этил-2-метилбутаноат,  $\beta$  фарнезен,  $\alpha$ -бисаболол оксид Б,  $\alpha$ -бисаболол, бисабол оксид, бисаболол оксид А, хамазулен, ен-ин-дициклоэфир.

При оценке точности определения индексов удерживания при линейном программировании температуры колонки на примере индекса удерживания *n*-гептана установлено, что среднее арифметическое значение измеренного индекса *n*-гептана составило  $\Gamma_{\text{изм}}^T = 698.1$  ед. индекса, границы доверительного интервала измерения индекса удерживания (прецизионность или случайные составляющие погрешности)  $\varepsilon = \pm 0.04$  единицы индекса, в то время как правильность измерения (систематические составляющие погрешности)  $\delta = 2$  ед.индекса. Таким образом, суммарная погрешность определения индексов удерживания при

линейном программировании температуры колонки с учетом правильности и прецизионности не превышает  $\pm 2$  ед.индекса.

### **Выводы.**

Установлены оптимальные условия пробоподготовки ЛР для проведения ПФА.

Изучен компонентный состав газового экстракта «ромашки аптечной» (*Chamomilla recutita* R.) с использованием прямого ПФА и ПФА + ТФМЭ. Основная масса идентифицированных компонентов относится к терпеноидам. Ароматических соединений в газовом экстракте цветов «ромашки аптечной» содержится незначительное количество. По имеющимся данным, все обнаруженные органические соединения являются физиологически активными. При необходимости быстрой оценки растительного сырья с успехом можно использовать ПФА, если требуется более детальное изучение компонентного состава, то необходимо использовать комбинацию из анализа паровой фазы и анализа с использованием ТФМЭ, т.к. ТФМЭ повышает информативность анализа [40, 41, 59, 72, 127].

Установлены основные компоненты характерного хроматографического спектра цветов «ромашки аптечной» методом ПФА: пропанон ( $I^T = 497$ ), диметилсульфид ( $I^T = 505$ ), 2-метилпропаналь ( $I^T = 521$ ), винилэтанойт ( $I^T = 537$ ), гепта-4,6-диин-2-ол ( $I^T = 615$ ), 3-метилбутаналь ( $I^T = 644$ ), 2-метилбутаналь ( $I^T = 654$ ), этил-3-метилбутаноат ( $I^T = 844$ ), пропил-2-метилбутаноат ( $I^T = 943$ ), *n*-цимен ( $I^T = 1017$ ), 3,3,6-триметил-1,5-гептадиен-4-он ( $I^T = 1057$ ),  $\beta$ -фарнезен ( $I^T = 1455$ ), бисаболол оксид А ( $I^T = 1731$ ) и ен-ин-дициклоэфир ( $I^T = 1831$ ). Наличие в газовом экстракте указанных компонентов свидетельствует о вероятности присутствия цветов «ромашки аптечной».

### **3.2. Применение парофазного анализа для получения общего образа цветов «ромашки аптечной»**

Исследование равновесной газовой фазы над сырьем «ромашки аптечной» показало наличие достаточного количества компонентов для получения «фингерпринта» или общего образа данного ЛР [126].

Для оценки возможности использования хроматограмм, полученных при ПФА «ромашки аптечной», в качестве общего образа объекта, была проведена оценка хроматографического профиля, т.е. соотношения компонентов, на воспроизводимость, а также анализ сырья разных производителей. Разброс значений в рамках одной партии ЛР находится в пределах 2 – 31% в зависимости от содержания компонента в газовом экстракте (табл. 14). Если учесть, что оценка проведена не по реперным пикам, а по всем компонентам, а по литературным данным ошибка при ПФА может достигать 50% [11], то это достаточно хороший

результат, т.е. можно сказать что хроматографический спектр можно использовать в качестве «фингерпринта» партии цветов «ромашки аптечной».

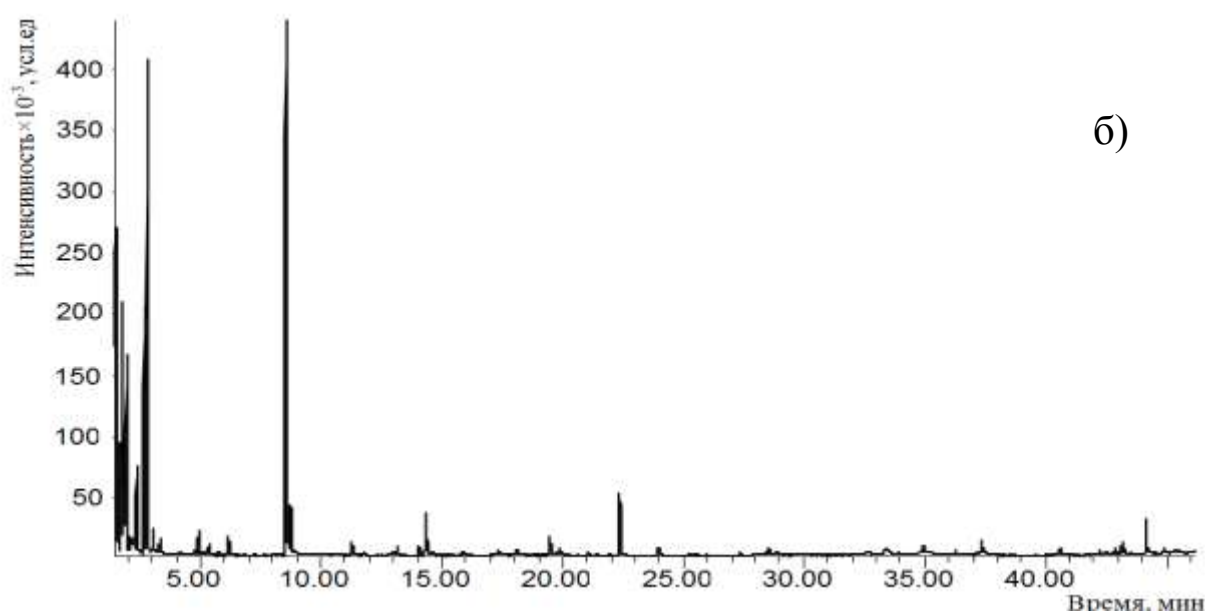
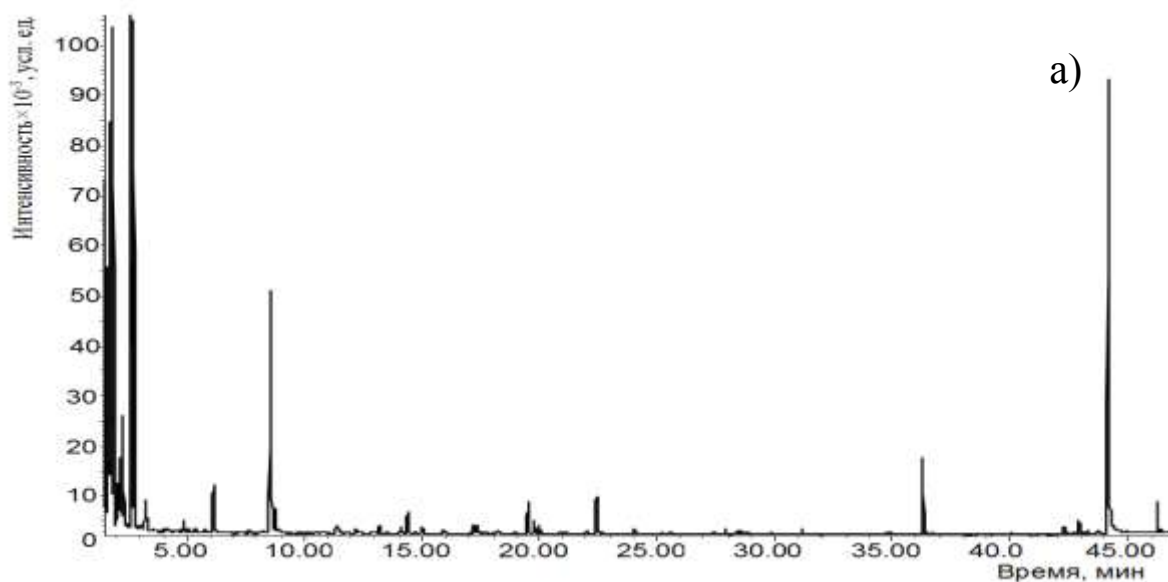
Таблица 14 – Относительное содержание компонентов при термостатировании в течение 30 мин

Время удерживания, мин	Компонент	Относительное содержание ЛОС, $A_i$ , %					$\bar{A} \pm \Delta$ , $n=5$ , $P=0.95$ , %	СКО, $S(A)$ , %	ОСКО $S_r(A)$
		$x_1$	$x_2$	$x_3$	$x_4$	$x_5$			
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1.65	пропанон	4.38	1.96	5.71	5.93	6.00	4.80±0.96	0.77	0.16
1.74	диметилсульфид	9.17	7.92	9.56	10.30	10.03	9.39±0.52	0.42	0.04
1.91	2-метил-пропаналь	9.03	9.34	12.39	13.32	12.18	11.25±1.08	0.87	0.08
2.06	винилэтанойт	1.22	1.02	1.15	1.12	1.32	1.17±0.06	0.05	0.04
2.31	гепта-4,6-диин-2-ол	3.01	3.28	3.13	2.97	2.83	3.04±0.09	0.08	0.03
2.65	3-метил-бутаналь	10.43	11.08	13.16	13.80	12.60	12.22±0.79	0.63	0.05
2.77	2-метил-бутаналь	10.03	10.53	13.58	14.38	12.95	12.29±1.06	0.86	0.07
3.04	1-пентен-3-ол	0.12	0.32	0.08	0.10	0.09	0.14±0.06	0.04	0.31
3.26	пентаналь	1.22	0.59	0.79	0.79	0.79	0.84±0.13	0.10	0.12
4.08	3-метилбутан-1-ол	0.10	0.10	0.09	0.09	0.09	0.09±0.01	0.002	0.02
4.17	2-метилбутан-1-ол	0.19	0.12	0.14	0.14	0.14	0.15±0.01	0.01	0.08
4.79	этил-2-метил-пропионат	0.15	0.11	0.1	0.09	0.11	0.11±0.01	0.01	0.09
4.90	2-пропенилиден-циклобутен	0.34	0.33	0.41	0.42	0.43	0.38±0.03	0.02	0.05
5.11	гексеналь	0.11	0.16	0.19	0.17	0.20	0.17±0.02	0.01	0.10
5.38	метил-2-метил-бутаноат	0.2	0.14	0.14	0.13	0.17	0.16±0.02	0.01	0.08
6.16	гексаналь	1.78	1.48	1.56	1.45	1.48	1.55±0.07	0.06	0.04
8.34	3-метил-бутановая кислота	0.19	0.34	0.15	0.17	0.19	0.21±0.04	0.03	0.16
8.58	этил-2-метилбутаноат	12.51	7.28	8.06	8.17	10.41	9.29±1.19	0.96	0.10
8.79	этил-3-метилбутаноат	1.54	0.9	0.97	1.07	1.22	1.13±0.14	0.12	0.10
8.95	пропилбутаноат	0.18	0.35	0.22	0.22	0.28	0.25±0.04	0.03	0.12
12.31	бутиролактон	0.39	0.47	0.27	0.10	0.31	0.31±0.08	0.06	0.20
13.21	$\alpha$ -пинен	0.49	0.14	0.29	0.24	0.39	0.31±0.08	0.06	0.19
14.12	камфен	0.33	0.12	0.22	0.22	0.35	0.25±0.05	0.04	0.17
14.43	пропил-2-метилбутаноат	1.36	0.76	0.82	0.84	1.06	0.97±0.14	0.11	0.11
15.03	бензальдегид	0.29	0.34	0.28	0.30	0.30	0.30±0.01	0.01	0.03
17.24	6-метил-5-гептен-2-он	0.34	0.39	0.33	0.29	0.34	0.34±0.02	0.02	0.05
17.40	2-пентилфуран	0.29	0.31	0.36	0.30	0.34	0.32±0.01	0.01	0.03
19.54	$\beta$ -цимен	1.71	0.98	1.25	1.16	1.64	1.35±0.17	0.14	0.10
19.80	лимонен	0.74	0.42	0.54	0.53	0.58	0.56±0.06	0.05	9.16
20.01	1,8-цинеол	0.56	0.24	0.39	0.30	0.37	0.37±0.07	0.05	0.14
20.95	3-фенил-пропаналь	0.13	0.18	0.11	0.12	0.16	0.14±0.02	0.01	0.09
22.02	$\gamma$ -терпинен	0.14	0.09	0.14	0.11	0.14	0.13±0.01	0.01	0.08
22.46	3,3,6-триметил-1,5-гептадиен-4-он	1.91	1.37	1.46	1.61	1.83	1.64±0.13	0.11	0.06
24.05	3,3,6триметил-1,5-гептадиен-4-ол	0.23	0.24	0.27	0.22	0.27	0.24±0.01	0.01	0.04
27.94	ментон	0.16	0.18	0.19	0.18	0.19	0.18±0.01	0.01	0.03
28.42	борнеол	0.17	0.22	0.16	0.18	0.19	0.18±0.01	0.01	0.06
31.18	карвон	0.11	0.2	0.13	0.14	0.15	0.15±0.02	0.01	0.10
36.36	$\beta$ -фарнезен	1.60	2.21	1.61	2.03	1.99	1.89±0.15	0.12	0.06
42.30	$\alpha$ -бисаболол оксид Б	0.31	0.49	0.26	0.15	0.19	0.28±0.07	0.06	0.21
42.95	бисаболон оксид	0.74	1.13	0.52	0.39	0.34	0.62±0.18	0.14	0.23
43.74	7-метоксикумарин	0.17	0.3	0.15	0.08	0.09	0.16±0.05	0.04	0.25

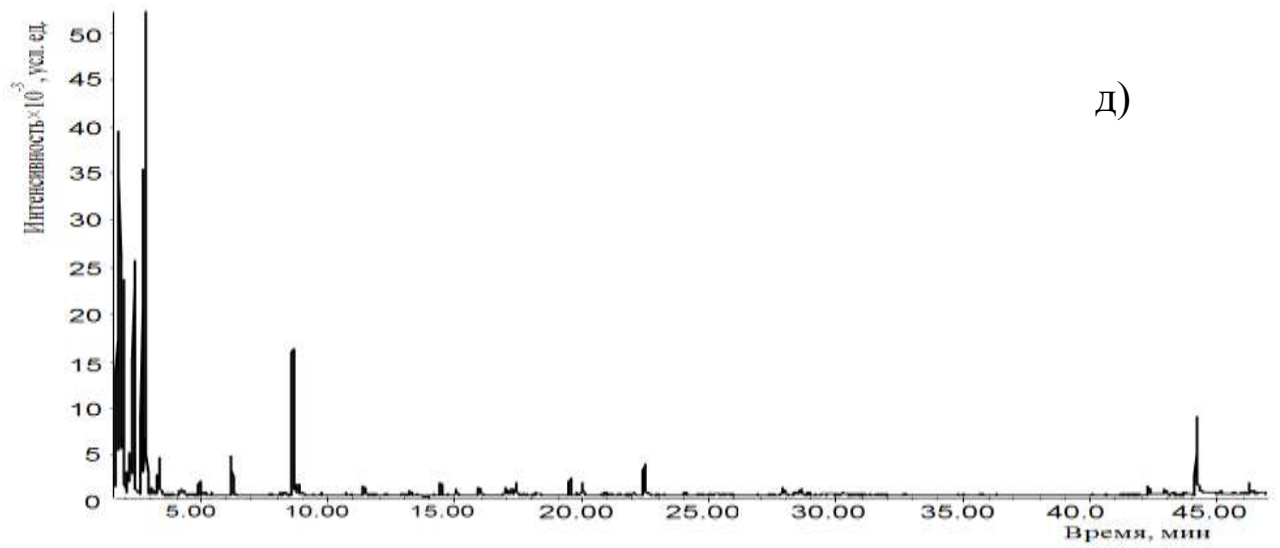
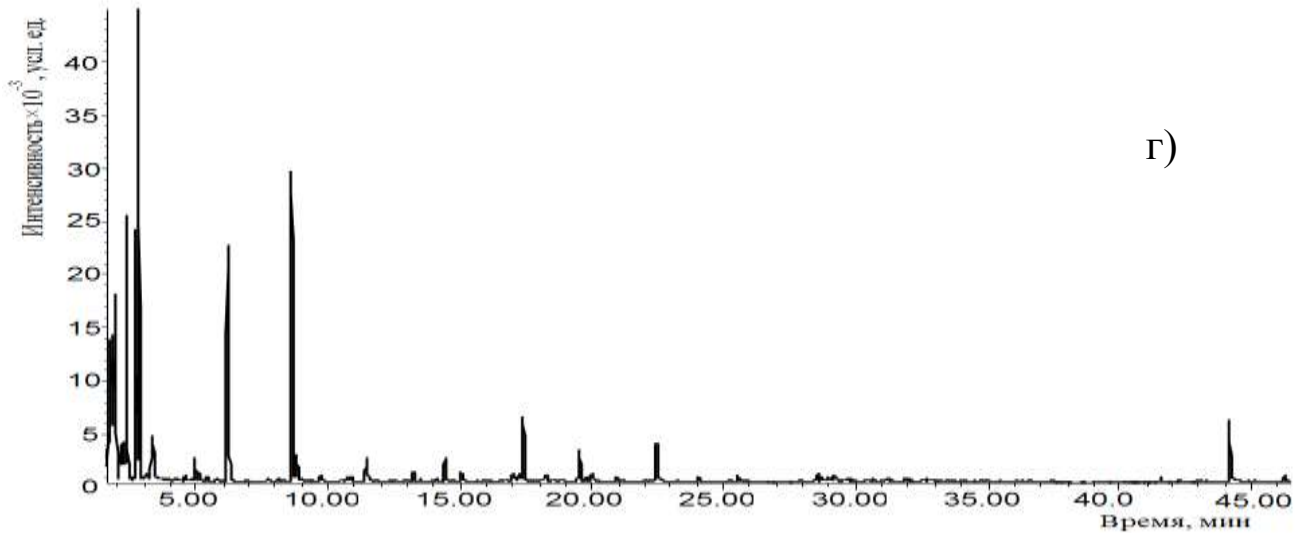
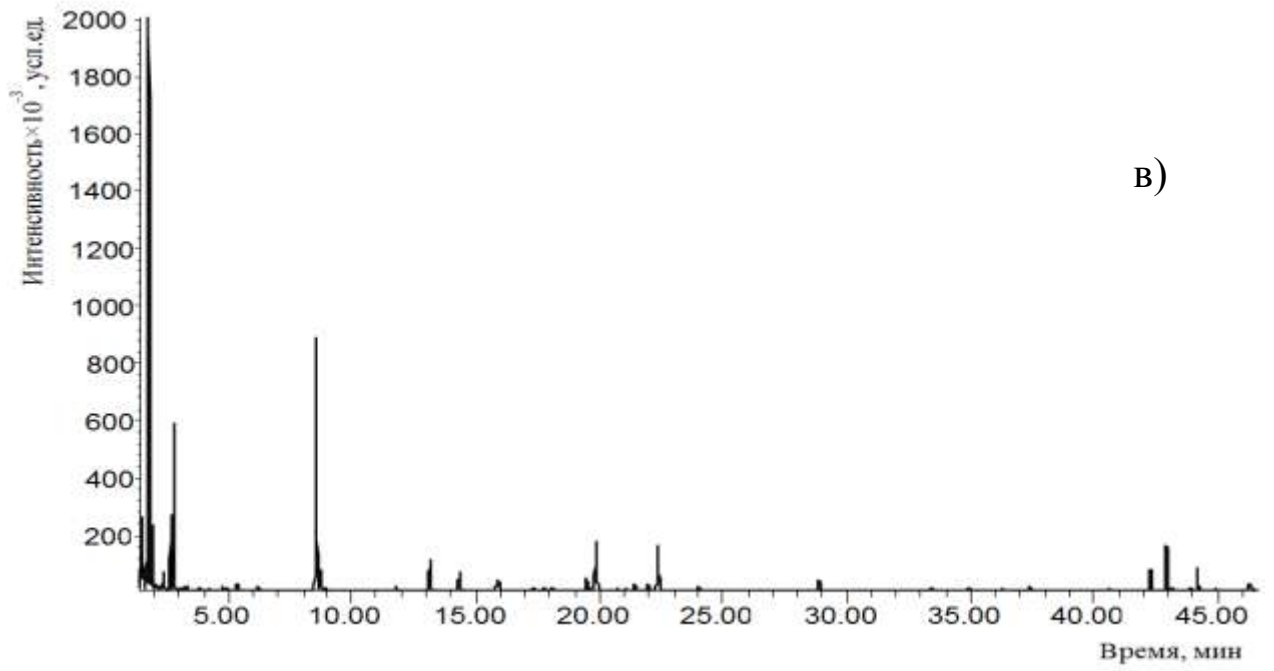
Продолжение таблицы 14

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
44.18	бисаболол оксид А	15.50	21.50	11.27	9.09	8.37	13.15±3.02	2.43	0.19
46.26	ен-ин-дициклоэфир	0.90	1.26	0.65	0.46	0.49	0.75±0.18	0.15	0.19

При ПФА образцов «ромашки аптечной» разных производителей полученные хроматограммы демонстрируют различие интенсивности пиков основных соединений в образцах разных производителей (рис. 6). Наибольшая интенсивность пиков отмечена при анализе образца «ромашки аптечной», выращенной в Самарском ботаническом саду в 2014 г, наименьшая – при анализе образца ООО «Рослекраспром». Вероятно, это зависит от качества ЛР. При визуальном осмотре образца ООО «Рослекраспром» было отмечено наличие фрагментов злаковых трав. Кроме этого на интенсивность пиков может влиять различное содержание влаги в образцах, однако перед началом эксперимента содержание влаги в образцах было примерно одинаковым и составляло  $5 \pm 1\%$ , что не может в значительной степени сказаться на интенсивности пиков определяемых компонентов.







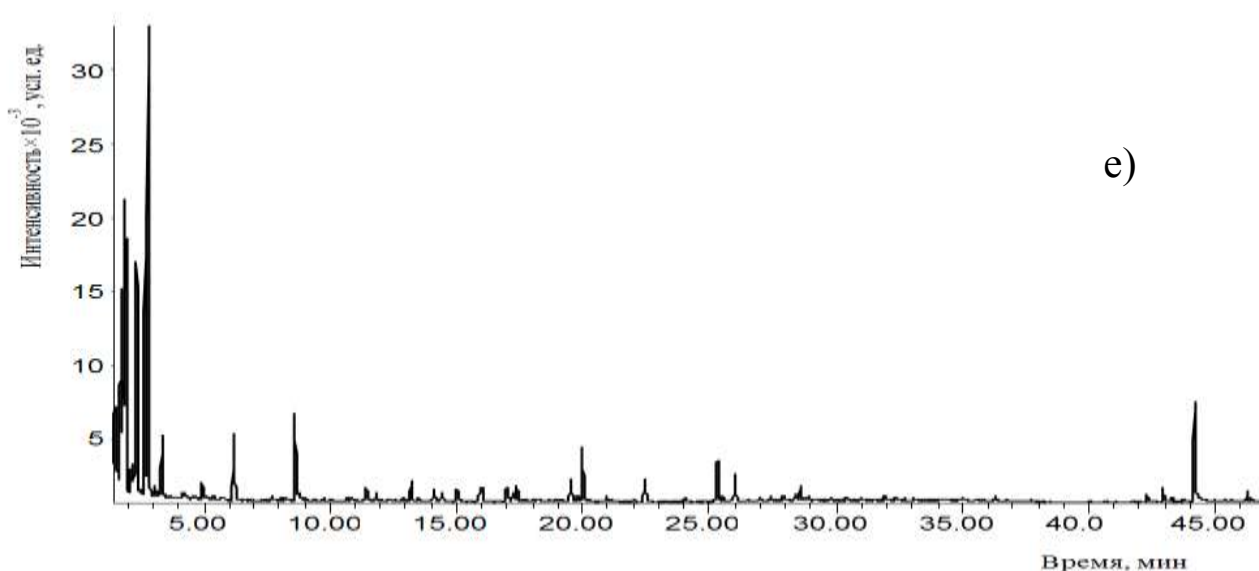


Рисунок 6 – Хроматограммы, полученные при ПФА «ромашки аптечной» разных производителей: а) КЛС – 2012 г.; б) КЛС – 2014 г.; в) Самарский ботанический сад –2014 г. г) ПКФ «Фитофарм» ООО; д) ООО «Камелия-ЛТ»; е) ООО «Рослекраспром».

Таблица 15 – Соотношение основных компонентов газового экстракта «ромашки аптечной»

Производитель	Относительное содержание ЛОС, % $\bar{A}_i \pm \Delta$ , n=5, P=0.95									
	2-пропанон	диметил сульфид	2-метилпропаналь	гепта-4,6-диин-2-ол	3-метилбутаналь	2-метилбутаналь	этил-2-метилбутаноат	пропил-2-метилбутаноат	3,3,6-триметил-1,5-гептадиен-4-он	Бисаболол оксид А
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
«Рослекраспром»	9.78 $\pm 1.58$	13.59 $\pm 0.49$	12.20 $\pm 0.25$	13.17 $\pm 1.80$	11.77 $\pm 0.20$	23.87 $\pm 1.59$	6.24 $\pm 0.69$	0.72 $\pm 0.05$	2.09 $\pm 0.16$	6.57 $\pm 0.98$
$S(A)$	1.27	0.39	0.20	1.45	0.16	1.28	0.56	0.04	0.13	0.79
$S_r(A)$	0.13	0.03	0.02	0.11	0.01	0.05	0.09	0.06	0.06	0.12
«Камелия»	5.84 $\pm 0.19$	15.55 $\pm 0.82$	10.03 $\pm 0.59$	11.97 $\pm 1$	15.53 $\pm 0.18$	24.77 $\pm 0.12$	8.98 $\pm 0.28$	0.78 $\pm 0.21$	2.20 $\pm 0.40$	4.37 $\pm 0.22$
$S(A)$	0.16	0.66	0.48	0.81	0.14	0.10	0.22	0.17	0.32	0.18
$S_r(A)$	0.03	0.04	0.05	0.07	0.01	0.00	0.03	0.22	0.15	0.04
«Фитофарм»	4.70 $\pm 0.52$	7.93 $\pm 0.95$	9.03 $\pm 0.33$	12.98 $\pm 0.13$	10.61 $\pm 0.51$	19.29 $\pm 0.53$	20.42 $\pm 0.96$	1.84 $\pm 0.07$	3.45 $\pm 0.15$	10.94 $\pm 0.59$
$S(A)$	0.42	0.76	0.26	0.10	0.41	0.43	0.77	0.05	0.12	0.48
$S_r(A)$	0.09	0.10	0.03	0.01	0.04	0.02	0.04	0.03	0.03	0.04
КЛС-2012	2.41 $\pm 0.87$	11.39 $\pm 0.80$	13.40 $\pm 0.88$	6.30 $\pm 1.2$	14.54 $\pm 0.25$	16.34 $\pm 1.74$	11.25 $\pm 1.73$	1.08 $\pm 0.12$	2.14 $\pm 0.27$	19.97 $\pm 1.69$
$S(A)$	0.70	0.64	0.71	0.96	0.20	1.40	1.40	0.10	0.22	1.36
$S_r(A)$	0.29	0.06	0.05	0.15	0.01	0.09	0.12	0.09	0.10	0.07
Самара	1.98 $\pm 0.14$	39.27 $\pm 1.46$	5.08 $\pm 0.95$	1.48 $\pm 0.18$	6.23 $\pm 1.13$	12.03 $\pm 0.14$	24.05 $\pm 0.37$	1.92 $\pm 0.18$	4.88 $\pm 0.61$	3.08 $\pm 0.12$
$S(A)$	0.11	1.17	0.76	0.15	0.91	0.12	0.30	0.14	0.49	0.09
$S_r(A)$	0.06	0.03	0.15	0.10	0.15	0.01	0.01	0.07	0.10	0.03
КЛС-2014	3.84 $\pm 1.14$	10.60 $\pm 0.51$	8.67 $\pm 0.99$	4.89 $\pm 1.07$	11.02 $\pm 0.71$	22.44 $\pm 0.64$	29.29 $\pm 3.09$	2.55 $\pm 0.40$	4.25 $\pm 0.43$	2.45 $\pm 0.60$
$S(A)$	0.92	0.41	0.80	0.86	0.57	0.51	2.48	0.32	0.35	0.48
$S_r(A)$	0.24	0.04	0.09	0.18	0.05	0.02	0.08	0.13	0.08	0.20

Продолжение таблицы 15

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
$\mu \pm \Delta, n=30, P=0.95$	<b>4.76</b> $\pm 1.01$	<b>16.39</b> $\pm 3.99$	<b>9.73</b> $\pm 1.03$	<b>8.46</b> $\pm 1.73$	<b>11.62</b> $\pm 1.15$	<b>19.79</b> $\pm 1.72$	<b>16.70</b> $\pm 3.22$	<b>1.48</b> $\pm 0.26$	<b>3.17</b> $\pm 0.43$	<b>7.90</b> $\pm 3.22$
<b>СКО, <math>\sigma(A)</math></b>	<b>2.72</b>	<b>10.70</b>	<b>2.77</b>	<b>4.63</b>	<b>3.09</b>	<b>4.62</b>	<b>8.64</b>	<b>0.70</b>	<b>1.16</b>	<b>6.22</b>
<b>ОСКО, <math>\sigma_r(A)</math></b>	<b>0.57</b>	<b>0.65</b>	<b>0.28</b>	<b>0.55</b>	<b>0.27</b>	<b>0.23</b>	<b>0.52</b>	<b>0.47</b>	<b>0.36</b>	<b>0.79</b>

За основу хроматографического профиля взяты не все основные компоненты, определенные в п. 3.1., поскольку при анализе образцов разного производства выяснилось, что  $\beta$ -фарнезен и ен-ин-дициклоэфир присутствуют в пробах «Красногорсклексредства» – 2014 г., Самара – 2014 г., «Фитофарм» – 2012 г., «Камелия» – 2012 г. и «Рослекраспром» – 2012 г. в количествах  $< 1$  %, поэтому не учитывались в соотношении компонентов характерного хроматографического профиля. Соотношения доминирующих компонентов приведены в таблице 15. Как видно из полученных данных, результаты воспроизводятся в пределах одной партии со средним ОСКО 0.20. При статистической обработке образцов всех производителей как единой выборки установлено, что воспроизводимость очень низкая, ОСКО колеблется в зависимости от компонента от 0.23 до 0.79, воспроизводимость в среднем составляет 0.47. Наиболее стабильное содержание соответствует 2-метилбутаналу, а самой низкой воспроизводимостью характеризуется бисаболол оксид А.

Для выявления связи между образцами, результаты, представленные в таблице 15, были обработаны по методу главных компонент (МГК). Установлено, что наибольшей значимостью характеризуются 1, 2 и 3 главные компонента. Значимость главных компонент определялась по собственным значениям и соответствующих им долям дисперсии (табл. 16). Максимальную долю общей дисперсии описывают три первые компоненты. С точки зрения собственных значений, также три компонента можно считать значимыми, т.к. их значения превышают единицу.

График нагрузок главных компонент показал сильную корреляцию между переменными, в группе этил-2-метилбутаноата и пропил-2-метилбутаноата и 3,3,6-триметил-1,5-гептадиен-4-она, в группе 2-метилбулаль, 2-пропанон и гепта-4,6-диин-2-ол и группе 2-метилбутаналь, 2-метилпропаналь (рис.7). Следовательно, при оценке воспроизводимости хроматографического профиля можно рассматривать только одну переменных из каждой группы. Межгрупповая корреляция данных переменных отсутствует. Кроме того отсутствует корреляция между бисаболол оксидом А и диметилсульфидом и группой 2-метилбутаналь. Переменные из группы этил-2-метилбутаноата показали отрицательную корреляцию с переменными из группы 2-метилпропаналь и 3-метилбутаналь.

Таблица 16 – Собственные значения и соответствующие им доли дисперсии для результатов ПФА «ромашки аптечной»

Главная компонента	Собственное значение	Доля дисперсии, %
1	5.42	54.25
2	2.34	23.36
3	1.34	13.42
4	0.42	4.17
5	0.31	3.05
6	0.11	1.11
7	0.05	0.48
8	0.01	0.15
9	0.001	0.01

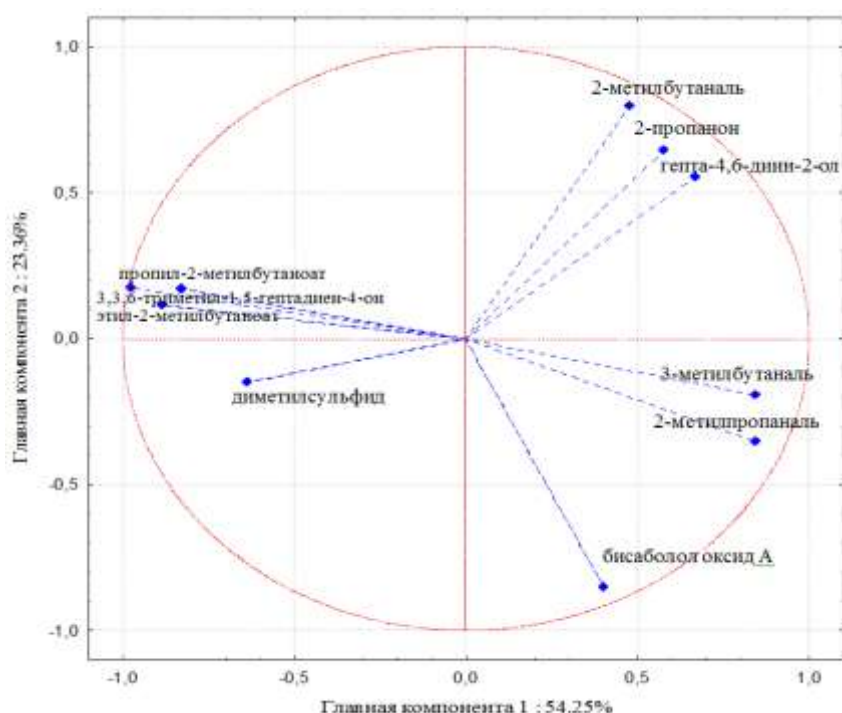


Рисунок 7 – Нагрузки главных компонент для соотношения компонентов газового экстракта «ромашки аптечной».

Обработка результатов по методу главных компонент показала, что данные по соотношению компонентов сгруппировались как по производителям – четко выделяются образцы, выращенные в Самаре, так и, вероятно, по происхождению сырья – сказывается климатический, географический факторы (рис. 8). К сожалению, у производителей продукции, приобретенной в аптечной сети, не удалось выяснить происхождение ЛР. На запросы о происхождении сырья коммерческие службы не отвечают.

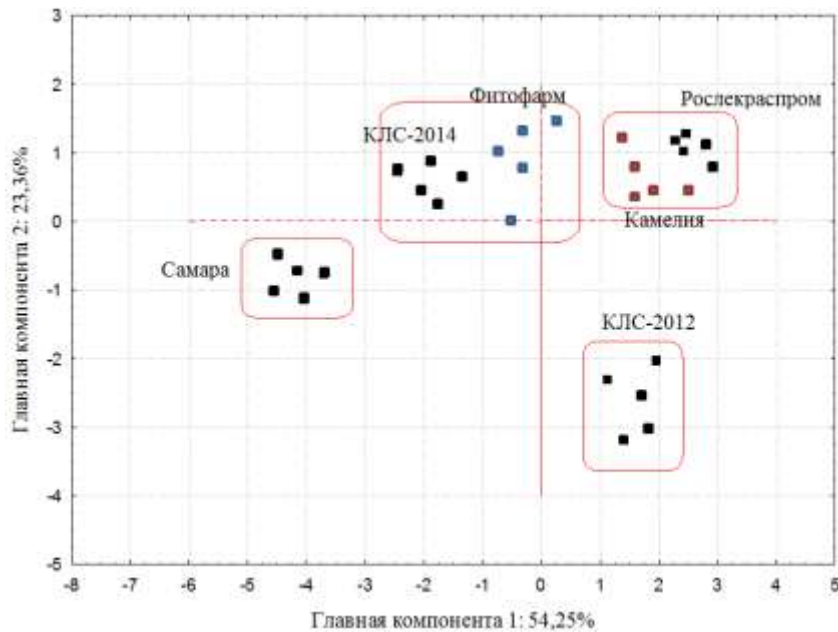


Рисунок 8 – График в координатах главных компонент 1 и 2 для соотношения компонентов на хроматограммах ПФА «ромашки аптечной» разных производителей.

Сравнивая график нагрузок и график в координатах главных компонент, можно определить влияние определяемых компонентов в группе. Так в группе «Рослекраспром» и «Камелия» наибольшее влияние оказывают переменные 2-метилбутаналь, 2-пропанон, гепта-4,6-диин-2-ол. Группу образцов «Самара» отделяет от группы «Рослекраспром» и «Камелия» содержание 2-метилбутанала, а от группы «КЛС-2012» – содержание этил-2-метилбутаноата, пропил-2-метилбутаноата и 3,3,6-триметил-1,5-гептадиен-4-она. В группе «КЛС-2012» наибольшее влияние оказывает относительное содержание диметилсульфида. В группе образцов «Фитофарм» и «КЛС-2014» наибольшее влияние оказывает относительное содержание бисаболол оксида А, отделяя ее от группы «КЛС-2012» и 3-метилбутаналь и 2-метилпропаналь, отделяя группы «КЛС 2014» и «Фитофарм» от группы образцов «Рослекраспром» и «Камелия».

#### **Вывод.**

В результате установлено, что нет единого соотношения компонентов хроматографического профиля при ПФА «ромашки аптечной» разных производителей. Даже у одного производителя, но в разные периоды ПФА ЛР дает разный хроматографический профиль.

Использование ПФА с последующей статистической обработкой методом главных компонент дает возможность классифицировать растительное сырье по производителю, месту происхождения, следовательно, хроматограмма, полученная методом ПФА цветов «ромашки аптечной», может указываться лишь в качестве общего образа или «фингерпринта» партии ЛР. [6, 7, 20, 21].

### 3.3. Парофазный анализ листьев «эвкалипта прутовидного»

По аналогии с цветами «ромашки аптечной» был проведен анализ ЛОС «эвкалипта прутовидного». На рисунке 9 представлены хроматограммы, полученные при различных способах пробоподготовки – при прямом ПФА листьев «эвкалипта прутовидного» (рис. 9-а), при ПФА в сочетании с ТФМЭ (рис. 9-б).

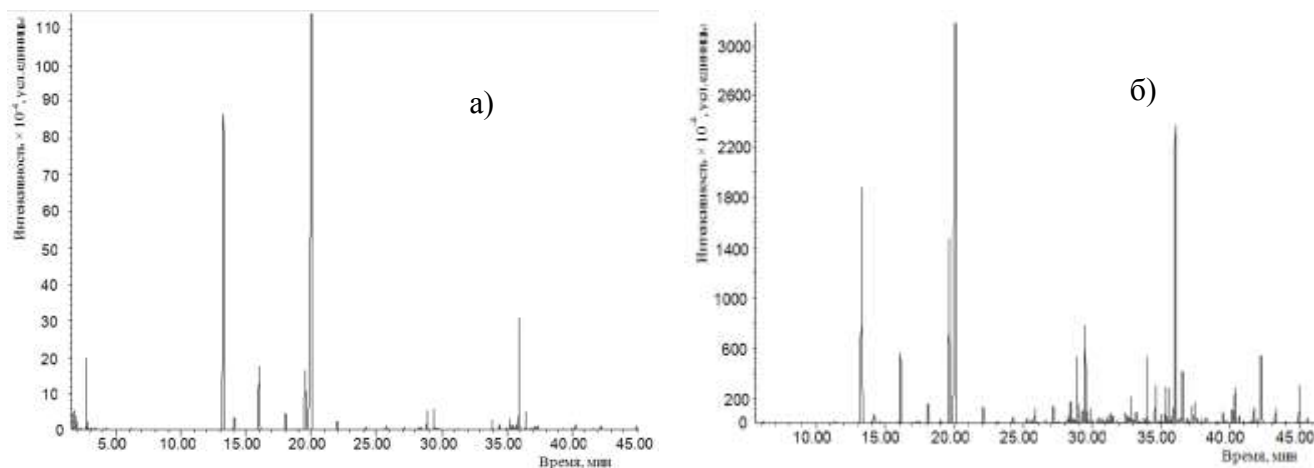


Рисунок 9 – Хроматограммы, полученные при ГХ-МС анализе «эвкалипта прутовидного» при режиме № 1 программирования температуры колонок: а) прямой ПФА; б) ПФА в сочетании с ТФМЭ.

При прямом ПФА «эвкалипта прутовидного» обнаружено 119 компонентов, из которых 76 удалось идентифицировать по масс-спектрам с вероятностью более 90 %. На хроматограмме на рисунке 9-а выделяются 9 характерных пиков, имеющих времена удерживания 13.26, 14.15, 16.05, 18.09, 19.61, 19.9828.94, 36.06 мин. ГХ-МС анализ показал, что это  $\alpha$ -пинен ( $I^T = 926$ ), камфен ( $I^T = 939$ ),  $\beta$ -пинен ( $I^T = 967$ ),  $\alpha$ -филандрен ( $I^T = 997$ ),  $n$ -цимен ( $I^T = 1018$ ), 1,8-цинеол ( $I^T = 1024$ ), 4-терпинеол ( $I^T = 1169$ ),  $\alpha$ -терпинеол ( $I^T = 1181$ ) аромадендрен ( $I^T = 1444$ ) соответственно. Они составляют 92,5 % всех летучих компонентов газовой фазы исследуемого образца. Также среди обнаруженных соединений присутствуют углеводороды, спирты, альдегиды, карбоновые кислоты, сложные эфиры. Все обнаруженные соединения относятся к физиологически активным веществам [5, 151, 152]. Индексы удерживания и относительное количественное содержание идентифицированных компонентов представлено в таблице 17. Суммарное содержание альдегидов в пробе составляет 0.24 %, кетонов – 0.17 %. Общее содержание углеводородов терпеновой природы не представляется возможным определить, поскольку 43 ЛОС не удалось точно идентифицировать, но нужно отметить, что масс-спектры большинства не идентифицированных соединений практически повторяли масс-спектры ранее обнаруженных терпенов и сесквитерпенов. Учитывая только идентифицированные соединения, 88% составляют терпеновые соединения, около 10 % ароматические.

При ПФА «листьев эвкалипта прутовидного» в сочетании с ТФМЭ было обнаружено 132 компонента (рис. 9-б). При сравнении хроматограмм на рисунках 9-а и 9-б видно, что

интенсивность хроматографических сигналов ЛОС при использовании ТФМЭ выше, чем у аналогичных сигналов, полученных в режиме прямого ПФА, примерно в 30 раз, при этом наблюдается значительное увеличение количества обнаруженных ЛОС. С вероятностью более 90% идентифицировано 87 компонентов, причем число компонентов по сравнению с прямым ПФА возросло за счет увеличения числа терпеновых углеводов, появления производных нафталина, новых производных азулена. Необходимо отметить, что на хроматограмме, полученной при ПФА в сочетании ТФМЭ (рис. 9-б), выделяются 19 пиков, в число которых входят компоненты, обозначенные как доминирующие при прямом ПФА, а также пики, соответствующие уксусной кислоте ( $I^T = 619$ ), терпенил ацетату ( $I^T = 1348$ ), копаену ( $I^T = 1379$ ),  $\alpha$ -гурьюнену ( $I^T = 1413$ ), кариофиллену ( $I^T = 1422$ ), аллоаромадендрену ( $I^T = 1465$ ), глобулолу ( $I^T = 1592$ ),  $\beta$ -эудесмолу ( $I^T = 1649$ ),  $\alpha$ -эудесмолу ( $I^T = 1651$ ), что составляет 79.24% от общего количества обнаруженных компонентов.

Соотношение компонентов при использовании ТФМЭ отличается за счет обнаружения новых соединений. В таблице 17 представлены индексы удерживания и относительное количественное содержание идентифицированных ЛОС в газовом экстракте «эвкалипта прутовидного», обнаруженных с применением ТФМЭ. Кроме того, после концентрирования в пробе возросло общее число производных азулена – спатуленол (0.51%), глобулол (1.41 %), леден (0.72 %), изоледен (0.26%),  $\alpha$ -хумулен (0.15 %),  $\alpha$ -гурьюнен (0.78 %),  $\beta$ -гурьюнен (0.38 %), аромадендрен (8.81 %), аллоаромадендрен (1.57%), производных нафталина –  $\gamma$ -мууролен (0.25 %),  $\beta$ -селинен (0.59%),  $\alpha$ -эудесмол (0.78%),  $\beta$ -эудесмол (1.87 %),  $\gamma$ -эудесмол (0.42 %),  $\gamma$ -кадинен (0.15%),  $\alpha$ -калакорен (0.03 %).

В работе [3] указано, что индексы удерживания сильно зависят от температурного режима, даже если анализ проводится на одной и той же колонке. Также отмечено, что индекс удерживания при переходе от «медленного» к «быстрому» режиму программирования температуры у одних соединений меняется мало, у других увеличивается на 30 единиц и более, к тому же может измениться порядок элюирования компонентов с малоразличающимися индексами удерживания. В связи с этим обстоятельством, наряду с анализом газового экстракта «эвкалипта прутовидного» при «медленном» режиме программирования температуры (режим №1), все вышеописанные процедуры были проведены при «быстром» режиме программирования температуры колонок – режиме № 2, «рекомендованном Подкомитетом эфирных масел Комитета аналитических методов для получения воспроизводимых «отпечатков пальцев» эфирных масел с использованием капиллярной газовой хроматографии на неполярных стационарных фазах» [3]. В работе [3] также опубликованы индексы удерживания, полученные при анализе чистых веществ на режиме № 2 с использованием колонки HP-5ms 30 м × 0.25 мм × 0.25 мкм на комплексе Agilent 6890-5973N.

Таблица 17 – ЛОС газового экстракта «эвкалипта прутовидного»

(Примечание: \* – вещества, идентифицированные на разнополярных колонках)

Время удерживания на НР-5ms режим 1	Время Удерживания на Restek Stabilwax-DA	Компонент	Индекс удерживания, $I_i^T$			Относительное содержание ЛОС, % $\bar{A}_i \pm \Delta$ , n=5, P=0.95			
			На колонке НР-5ms, режим 1	[3]	На колонке НР-5ms режим 2	ПФА на колонке НР-5ms	ПФА на колонке Restek Stabilwax-DA	ТФМЭ на колонке НР-5ms	ТФМЭ на колонке Restek Stabilwax-DA
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
2.25	9.81	2-метилфуран*	609±2	-	-	0.11 ±0.02	0.26 ±0.02	-	-
2.35	37.45	уксусная кислота*	619±2	-	602±2	-	-	1.43 ±0.11	2.18 ±0.19
2.73	11,87	3-метилбутаналь*	644±2	-	646±2	0.07 ±0.01	2.32 ±0.18	0.06 ±0.01	-
2.86	11.66	2-метилбутаналь*	654±2	-	656±2	0.03 ±0.01	0.38 ±0.03	-	-
3.41	13.75	2-этилфуран*	704±2	-	701±2	0.18 ±0.01	0.45 ±0.02	-	-
4.38	40.24	пропановая кислота*	745±2	-	788±2	-	-	0.05 ±0.01	0.07 ±0.01
6.23	21.95	гексаналь*	798±2	801	799±2	0.12 ±0.01	0.47 ±0.02	0.04 ±0.01	-
7.72		2-фуральдегид	828±2	829	829±2	-	-	0.02 ±0.01	-
8.57	43.85	3-метилбутановая кислота*	844±2	838	834±2	0.05 ±0.01	-	0.03 ±0.01	0.05 ±0.01
12.93	49.09	α-туйен*	921±2	926	925±2	0.15 ±0.02	-	0.03 ±0.01	0.04 ±0.01
13.26	17.43	α-пинен*	926±2	932	932±2	33.01 ±2.56	40.27 ±3.12	10.31 ±1.15	3.61 ±0.29
14.08	19.75	α-фенчен*	938±2	945	946±2	0.11 ±0.01	-	0.04 ±0.01	0.57 ±0.04
14.15	20.24	камфен*	939±2	947	946±2	2.11 ±0.14	1.82 ±0.22	0.53 ±0.04	0.21 ±0.02
14.59	24.17	вербенен*	945±2	952	952±2	0.21 ±0.02	-	0.02 ±0.01	0.05 ±0.02
15.07	-	бензальдегид	952±2	958	958±2	0.02 ±0.01	-	0.05 ±0.01	-
16.05	22,75	β-пинен*	967±2	975	975±2	6.39 ±0.52	7.85 ±0.84	3.05 ±0.29	1.57 ±0.21
17.23	34.28	6-метил-5-гептен-2он*	984±2	987	986±2	0.06 ±0.01	-	0.06 ±0.01	0.05 ±0.01
17.45	26.83	β-мирцен*	987±2	991	990±2	0.08 ±0.01	-	0.05 ±0.01	-
18.09	27.31	α-феландрен*	997±2	1004	1003±2	0.19 ±0.02	1.25 ±0.16	0.94 ±0.08	1.38 ±0.15
18.27	-	октаналь	1001±2	1003	1004±2	-	-	0.07 ±0.01	-
18.99	27.80	α-терпинен*	1010±2	1017	1015±2	0.19 ±0.02	0.21 ±0.02	0.22 ±0.02	0.24 ±0.03



1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
19.61	32.15	<i>n</i> -цимен*	1017±2	1024	1024±2	9.06 ±0.85	6.88 ±0.74	10.55 ±1.27	10.42 ±1.34
19.83	28.83	лимонен*	1021±2	1028	1028±2	1.06 ±0.13	1.78 ±0.16	0.76 ±0.08	2.21 ±0.16
19.98	29.41	1,8-цинеол*	1023±2	1031	1030±2	39.84 ±4.12	32.03 ±3.27	28.47 ±2.95	20.73 ±2.25
20.97	-	фенилпропаналь	1036±2	1042	1041±2	-	-	0.05 ±0.02	-
22.07	30.98	γ-терпинен*	1051±2	1058	1058±2	0.56 ±0.06	0.47 ±0.05	0.74 ±0.08	0.91 ±0.08
23.11	37.28	линалоол оксид*	1066±2	-	1072±2	0.04 ±0.01	-	0.09 ±0.01	0.22 ±0.02
24.21	32.43	α-терпинолен*	1081±2	1088	1088±2	0.15 ±0.02	-	0.07 ±0.01	0.13 ±0.01
25.23	32.47	линалоол*	1095±2	1100	1099±2	0.02 ±0.01	-	0.14 ±0.02	0.12 ±0.02
25.71	32.63	3-метил-3-метилбутилбутаноат*	1103±2	-	1105±2	0.02 ±0.01	-	0.12 ±0.01	0.23 ±0.02
25.83	41.87	D-фенхол*	1106±2	1113	1112±2	0.32 ±0.03	-	1.01 ±0.12	1.14 ±0.15
26.60	-	камфоленаль	1123±2	1126	1126±2	-	-	0.24 ±0.02	-
27.16	47.29	транс-пинокарвеол*	1133±2	1138	1138±2	0.25 ±0.03	-	0.63 ±0.07	0.15 ±0.02
27.43	-	камфор	1142±2	1144	1144±2	-	-	0.03 ±0.01	-
27.94	-	ментон	1153±2	1154	1153±2	-	-	0.04 ±0.01	-
28.27	42.14	пинокарвон*	1156±2	1162	1162±2	0.09 ±0.02	-	0.25 ±0.03	0.58 ±0.03
28.43	44.92	борнеол*	1159±2	1166	1165±2	0.25 ±0.03	-	0.62 ±0.07	1.12 ±0.13
28.79	43.31	ментол*	1172±2	1175	1172±2	-	-	0.08 ±0.02	0.06 ±0.02
28.94	42.53	4-терпинеол*	1169±2	1177	1177±2	0.41 ±0.05	-	1.81 ±0.21	3.13 ±0.29
29.30	47.53	<i>p</i> -цимен-8-ол*	1177±2	1184	1185±2	0.05 ±0.01	-	0.37 ±0.04	0.65 ±0.06
29.50	44.70	α-терпинеол*	1181±2	1191	1190±2	0.05 ±0.01	-	2.61 ±0.31	5.02 ±0.48
29.62	43.73	миртеналь*	1183±2	1195	1195±2	0.03 ±0.01	0.04 ±0.01	0.12 ±0.02	0.25 ±0.03
29.67	46.66	миртенол*	1184±2	1197	1196±2	0.11 ±0.02	0.05 ±0.01	0.37 ±0.04	0.63 ±0.07
29.85	46.94	α-феландрен эпоксид*	1196±2	-	1202±2	0.05 ±0.01	-	0.89 ±0.09	0.61 ±0.05
30.08	45.58	вербенон*	1201±2	1210	1210±2	0.05 ±0.01	-	0.16 ±0.02	0.09 ±0.01
30.43	47.29	транс-карвеол*	1214±2	1219	1219±2	-	-	0.23 ±0.02	0.15 ±0.02
30.47	48.44	фенчил ацетат*	1219±2	1221	1220±2	0.11 ±0.02	-	0.12 ±0.02	0.34 ±0.04

Продолжение таблицы 17

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
30.60	45.47	екзо-2-гидроксицинеол*	1219±2	1224	1223±2	0.15 ±0.02	-	0.17 ±0.02	0.19 ±0.02
31.05	46.87	2-метил-3-фенилпропаналь*	1235±2	1241	1240±2	0.07 ±0.01	-	0.19 ±0.02	-
31.19	45.95	карвон*	1240±2	1245	1244±2	-	-	0.05 ±0.01	0.14 ±0.01
31.30	-	карвотанацетон	1244±2	1249	1247±2	-	-	0.26 ±0.03	-
31.49	45.88	пиперитон*	1251±2	1255	1254±2	0.09 ±0.02	-	0.21 ±0.03	0.25 ±0.03
32.05	-	феландраль	1271±2	1276	1275±2	-	-	0.12 ±0.02	-
32.43	51.75	тимол*	1284±2	1292	1259±2	0.03 ±0.01	-	0.28 ±0.03	1.11 ±0.19
32.51	-	цуминол	1287±2	1293	1290±2	-	-	0.05 ±0.1	-
32.82	52.05	карвакрол*	1298±2	1302	1302±2	0.07 ±0.02	-	0.57 ±0.06	0.45 ±0.05
33.91	44.84	терпенилацетат*	1348±2	1351	1352±2	0.12 ±0.02	-	2.62 ±0.29	2.37 ±0.28
34.49	38.24	изоледен*	1375±2	-	1378±2	-	-	0.39 ±0.04	0.45 ±0.05
34.56	39.14	копаен*	1379±2	1378	1378±2	0.11 ±0.02	-	0.87 ±0.09	1.15 ±0.16
35.32	40.55	α-гурьюнен*	1413±2	1412	1412±2	0.11 ±0.02	-	1.03 ±0.12	1.31 ±0.16
35.54	42.74	кариофиллен*	1422±2	1422	1422±2	0.05 ±0.01	-	1.57 ±0.19	1.11 ±0.17
35.84	42.62	β-гурьюнен*	1434±2	1433	1435±2	0.05 ±0.01	-	0.47 ±0.06	0.46 ±0.06
36.06	43.03	аромадендрен*	1444±2	1440	1442±2	1.23 ±0.15	-	8.44 ±0.89	12.18 ±1.05
36.36	44.57	α-хумулен*	1456±2	1456	1457±2	-	-	0.16 ±0.03	0.08 ±0.02
36.56	43.99	аллоаромадендрен*	1465±2	1464	1464±2	0.15 ±0.02	-	3.03 ±0.41	3.19 ±0.35
36.83	44.14	γ-гурьюнен*	1476±2	1473	1476±2	-	-	0.25 ±0.03	0.18 ±0.03
36.91	-	γ-мууролен	1480±2	1480	1479±2	-	-	0.29 ±0.04	-
37.22	45.67	β-селинен*	1492±2	1488	1490±2	-	-	0.78 ±0.08	0.79 ±0.09
37.27	-	δ-селинен	1496±2	1492	1492±2	-	-	0.09 ±0.02	-
37.45	45.02	леден*	1501±2	1496	1499±2	0.07 ±0.02	-	0.76 ±0.08	1.02 ±0.15
37.58	-	α-мууролен	1505±2	1502	1503±2	-	-	0.05 ±0.02	-
37.96	46.31	γ-кадинен*	1517±2	1517	1518±2	-	-	0.36 ±0.04	0.07 ±0.02
38.25	46.13	δ-кадинен*	1526±2	1527	1527±2	-	-	0.05 ±0.01	0.06 ±0.01

Продолжение таблицы 17

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
38.89	-	$\alpha$ -калакорен	1542 $\pm$ 2	1546	-	-	-	0.04 $\pm$ 0.01	-
39.07	-	элеомол	1548 $\pm$ 2	1553	1553 $\pm$ 2	-	-	0.08 $\pm$	-
39.48	50.00	неролидол*	1559 $\pm$ 2	1565	1564 $\pm$ 2	0.08 $\pm$ 0.02	-	0.43 $\pm$ 0.05	1.15 $\pm$ 0.13
40.14	51.70	спатуленол*	1583 $\pm$ 2	1580	1582 $\pm$ 2	0.16 $\pm$ 0.03	-	0.49 $\pm$ 0.06	1.67 $\pm$ 0.15
40.32	51.11	глобулол*	1592 $\pm$ 2	1587	1588 $\pm$ 2	0.42 $\pm$ 0.05	-	1.89 $\pm$ 0.19	2.63 $\pm$ 0.25
40.62	51.18	эпиглобулол*	1598 $\pm$ 2	1593	1595 $\pm$ 2	0.06 $\pm$ 0.01	-	0.05 $\pm$ 0.01	0.09 $\pm$ 0.02
40.98	50.61	ледол*	1603 $\pm$ 2	1606	1596 $\pm$ 2	-	-	0.12 $\pm$ 0.02	-
41.52	51.60	розифолиоил*	1631 $\pm$ 2	-	1607 $\pm$ 2	-	-	0.21 $\pm$ 0.03	0.12 $\pm$ 0.02
41.55	51.59	1-этилиденоктагидро-7 $\alpha$ -метил-1H-инден*	1632 $\pm$ 2	-	1627 $\pm$ 2	-	-	0.04 $\pm$ 0.01	0.06 $\pm$ 0.01
41.76	52.28	$\gamma$ -эудесмол*	1637 $\pm$ 2	1633	1636 $\pm$ 2	0.29 $\pm$ 0.03	-	1.21 $\pm$ 0.13	0.82 $\pm$ 0.09
41.96	-	хинезол	1646 $\pm$ 2	-	1644 $\pm$ 2	-	-	0.24 $\pm$ 0.03	-
42.27	53.37	$\beta$ -эудесмол*	1649 $\pm$ 2	1651	1655 $\pm$ 2	0.61 $\pm$ 0.07	-	1.81 $\pm$ 0.19	5.02 $\pm$ 0.59
42.33	53.19	$\alpha$ -эудесмол*	1651 $\pm$ 2	1655	1658 $\pm$ 2	0.29 $\pm$ 0.03	-	0.91 $\pm$ 0.11	2.23 $\pm$ 0.28
45.35	-	эпи-критомеридиоил	1823 $\pm$ 2	-	-	-	-	1.87 $\pm$ 0.19	1.34 $\pm$ 0.16

Анализ результатов, полученных при прямом ПФА и ПФА в сочетании с ТФМЭ показал, что порядок элюирования компонентов газового экстракта не изменился. В таблице 17 приведены линейные индексы удерживания идентифицированных ЛОС, полученные в данном исследовании и в работе [3]. Сравнительная оценка представленных результатов показывает совпадение рассчитанных и опубликованных величин в пределах погрешности определения индексов удерживания, составляющей 2 ед. индекса и 5-10 ед. индекса при межлабораторной воспроизводимости для стандартных неполярных неподвижных фаз ряда полидиметилсилоксанов [3], что подтверждает надежность идентификации ЛОС в газовом экстракте «эвкалипта прутовидного».

Использование для идентификации помимо библиотек масс-спектров еще и индексы удерживания, позволило выявить сомнительные варианты идентификации компонентов. Компонент с временем удерживания 19.61 мин мог быть идентифицирован как орто- или пара-цимен, но определение индекса удерживания позволило отнести его к пара-цимену. Компонент с временем удерживания 39.48 мин идентифицировался системой с вероятностью 99% как эпиглобулол, однако анализ данных библиотек масс-спектров с одновременным сравнением полученного индекса удерживания с приведенным в работе [3], позволило определить данное

вещество как неролидол. Аналогично проведена идентификация аромадендрена и аллоаромадендрена, тимола и карвакрола и других компонентов.

Для дальнейшего уточнения идентификации ЛОС, содержащихся в листьях «эвкалипта прутовидного», все описанные выше анализы повторили на полярной колонке Restek Stabilwax-DA при режиме программирования температуры колонки № 1. В данном случае нагрев останавливали на температуре 230°C из-за нестабильности неподвижной жидкой фазы при более высокой температуре и далее хроматограф работал в изотермическом режиме в течение 20 минут. Расчет относительного содержания идентифицированных соединений представлен в таблице 17. Как видно из приведенных данных, при ПФА на колонке с малополярной неподвижной фазой HP-5ms с высокой надежностью удалось идентифицировать 76 компонентов. Качественный анализ на полярной колонке позволил идентифицировать 33 компонента, 16 из которых, совпадают с компонентами, обнаруженными при использовании колонки HP-5ms, а 4 компонента – пропаналь, 2-пропанон, 2-бутеналь, бутаналь – разделяются только на колонке с полярной неподвижной фазой Restek Stabilwax-DA.

ПФА в сочетании с ТФМЭ на колонке с полярной неподвижной фазой Restek Stabilwax-DA, позволил выявить 141 ЛОС, из которых, только 65 совпадает с компонентами, идентифицированными на малополярной колонке HP-5ms (табл. 17). Данные соединения отмечены «\*». Таким образом, анализ на разнополярных колонках позволил удостовериться в точности идентификации ряда обнаруженных соединений. Нужно обратить внимание на компонент с временем удерживания на HP-5ms 3.94 мин, идентифицируемый как 1-гидрокси-2-пропанон, который не был обнаружен при анализе на колонке HP-5ms при режиме программирования температуры колонки № 2, но идентифицирован при анализе на полярной колонке Restek Stabilwax-DA. Руководствуясь вышесказанным, только те ЛОС, которые были обнаружены при анализах на колонках разной полярности, были успешно идентифицированы как компоненты листьев «эвкалипта прутовидного». Кроме того, при исследовании газового экстракта листьев «эвкалипта прутовидного» с применением ТФМЭ на колонке Restek Stabilwax-DA были идентифицированы компоненты, не обнаруженные на колонке HP-5ms – 2-пропанон, 1-циклогексенилэтанон, нонаналь, изопропилфуран, борнилхлорид, β-элемен, 1-(2-метоксипропокси)-2-пропанол, 2,5-диметил-2,4-гексадиен, эудесма-3,7(11)-диен, селина-5,7-диен, каламенен, гексановая кислота, α-пинен оксид, 1,8-ментadiен-4-ол, куминовый альдегид. Нахождение их в газовом экстракте сомнительно, т.к. не подтверждено анализом на малополярной колонке HP-5ms.

#### **Выводы.**

Анализ ЛОС газового экстракта «эвкалипта прутовидного» (*Eucalyptus viminalis* Labill) методом ГХ-МС с применением прямого ПФА позволило идентифицировать 76 компонентов, а

при ПФА в сочетании с ТФМЭ – 87 компонента. Основную массу идентифицированных соединений составляют терпеновые и сесквитерпеновые углеводороды – около 88 %, ароматические – около 10 %. Все обнаруженные компоненты по имеющимся данным являются физиологически активными.

Повышение информативности при проведении ПФА в сочетании с ТФМЭ указывает на предпочтительное использование данного способа пробоподготовки для наиболее полного изучения ЛОС газового экстракта растительного сырья.

Во всех исследуемых образцах можно выделить 9 ЛОС, которые являются доминирующими:  $\alpha$ -пинен ( $I^T = 926$ ), камфен ( $I^T = 939$ ),  $\beta$ -пинен ( $I^T = 967$ ),  $\alpha$ -филандрен ( $I^T = 997$ ), п-цимен ( $I^T = 1018$ ), 1,8-цинеол ( $I^T = 1024$ ), 4-терпинеол ( $I^T = 1169$ ),  $\alpha$ -терпинеол ( $I^T = 1181$ ) аромадендрен ( $I^T = 1444$ ). Соотношение этих соединений приняли за характерный хроматографический спектр листьев «эвкалипта прутовидного».

#### 3.4. Применение парофазного анализа для получения общего образа листьев «эвкалипта прутовидного»

Для оценки возможности использования хроматографического спектра листьев «эвкалипта прутовидного», полученного методом ПФА в качестве общего образа объекта был проведен анализ образцов ЛР разных производителей: ООО «Красногорсклексредства» (КЛС) 2012 г. и ПКФ «Фитофарм» ООО 2012 г. (рис 10, табл. 18). Полученные хроматограммы практически идентичны.

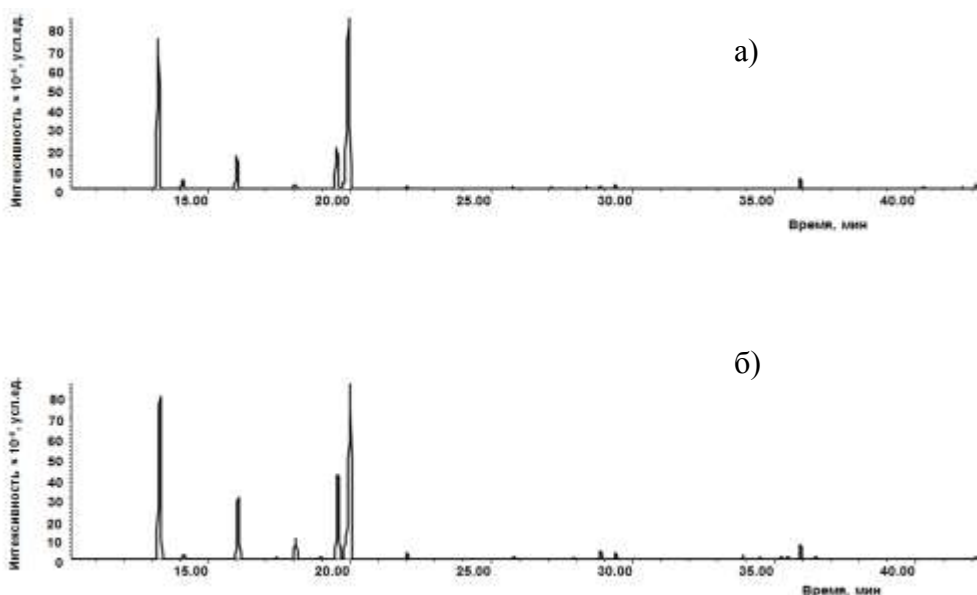


Рисунок 10 – Хроматограммы, полученные при ПФА «эвкалипта прутовидного»: а) производства ПКФ «Фитофарм» ООО; б) производства ООО «Красногорсклексредства».

Данные по соотношению компонентов характерного хроматографического спектра представлены в таблице 18. Статистическая обработка данных показала, что

хроматографический спектр «эвкалипта прутовидного» воспроизводится в пределах одной партии со средним ОСКО 0.09-0.10, а при сравнении образцов разных производителей – 0.11, следовательно, хроматографический спектр «эвкалипта прутовидного», полученный методом ПФА является воспроизводимой характеристикой, независимо от производителя ЛР.

Таблица 18 – Воспроизводимость хроматографического спектра «листьев эвкалипта прутовидного», полученного методом ПФА

Образец	Относительное содержание ЛОС, $A_i$ , %								
	$\alpha$ -Пинен	Камфен	$\beta$ -Пинен	$\alpha$ -Феландрен	$n$ -Цимен	1,8-Цинеол	4-Терпинеол	$\alpha$ -Терпинеол	Аромандрен
КЛС 1	26.30	1.07	7.80	1.24	9.26	48.17	1.04	1.06	4.07
КЛС 2	26.48	1.01	7.73	1.01	11.06	47.60	0.75	0.84	3.52
КЛС 3	27.19	1.06	8.24	1.86	11.17	45.94	0.57	0.57	3.42
КЛС 4	26.74	0.80	7.51	1.40	10.85	48.08	0.79	0.72	3.12
КЛС 5	26.60	0.98	8.96	1.78	11.58	46.04	0.63	0.64	2.80
$\bar{A}_i \pm \Delta$ , $n=5$ , $P=0.95$	26.66 $\pm 0.42$	0.98 $\pm 0.14$	8.05 $\pm 0.72$	1.46 $\pm 0.45$	11.05 $\pm 0.45$	47.08 $\pm 1.26$	0.68 $\pm 0.11$	0.73 $\pm 0.16$	3.30 $\pm 0.42$
СКО, $S(A)$	0.34	0.11	0.58	0.36	0.36	1.02	0.09	0.13	0.34
ОСКО, $S_r(A)$	0.01	0.11	0.07	0.24	0.03	0.02	0.13	0.18	0.10
Фитофарм 1	25.30	1.37	7.73	1.24	11.96	47.01	0.85	0.93	3.61
Фитофарм 2	26.82	1.12	7.83	1.13	10.56	47.21	0.94	0.72	3.67
Фитофарм 3	26.56	1.26	7.85	1.33	10.33	46.94	1.08	0.91	3.74
Фитофарм 4	25.91	0.99	7.38	1.89	11.14	47.57	0.96	0.91	3.75
Фитофарм 5	26.42	1.09	8.11	1.38	11.43	47.08	0.61	0.76	3.12
$\bar{A}_i \pm \Delta$ , $n=5$ , $P=0.95$	26.20 $\pm 0.74$	1.17 $\pm 0.19$	7.78 $\pm 0.32$	1.39 $\pm 0.36$	11.08 $\pm 0.82$	47.16 $\pm 0.31$	0.89 $\pm 0.22$	0.85 $\pm 0.12$	3.58 $\pm 0.32$
СКО, $S(A)$	0.60	0.15	0.26	0.29	0.66	0.25	0.18	0.10	0.26
ОСКО, $S_r(A)$	0.02	0.13	0.03	0.21	0.06	0.01	0.19	0.11	0.07
$\mu \pm \Delta$ , $n=10$ , $P=0.95$	<b>26.43</b> $\pm 0.37$	<b>1.07</b> $\pm 0.11$	<b>7.91</b> $\pm 0.31$	<b>1.43</b> $\pm 0.22$	<b>11.07</b> $\pm 0.35$	<b>47.12</b> $\pm 0.49$	<b>0.79</b> $\pm 0.12$	<b>0.79</b> $\pm 0.09$	<b>3.44</b> $\pm 0.23$
СКО, $\sigma(A)$	<b>0.52</b>	<b>0.16</b>	<b>0.45</b>	<b>0.31</b>	<b>0.50</b>	<b>0.70</b>	<b>0.17</b>	<b>0.13</b>	<b>0.32</b>
ОСКО, $\sigma_r(A)$	<b>0.02</b>	<b>0.15</b>	<b>0.06</b>	<b>0.22</b>	<b>0.05</b>	<b>0.01</b>	<b>0.22</b>	<b>0.16</b>	<b>0.09</b>

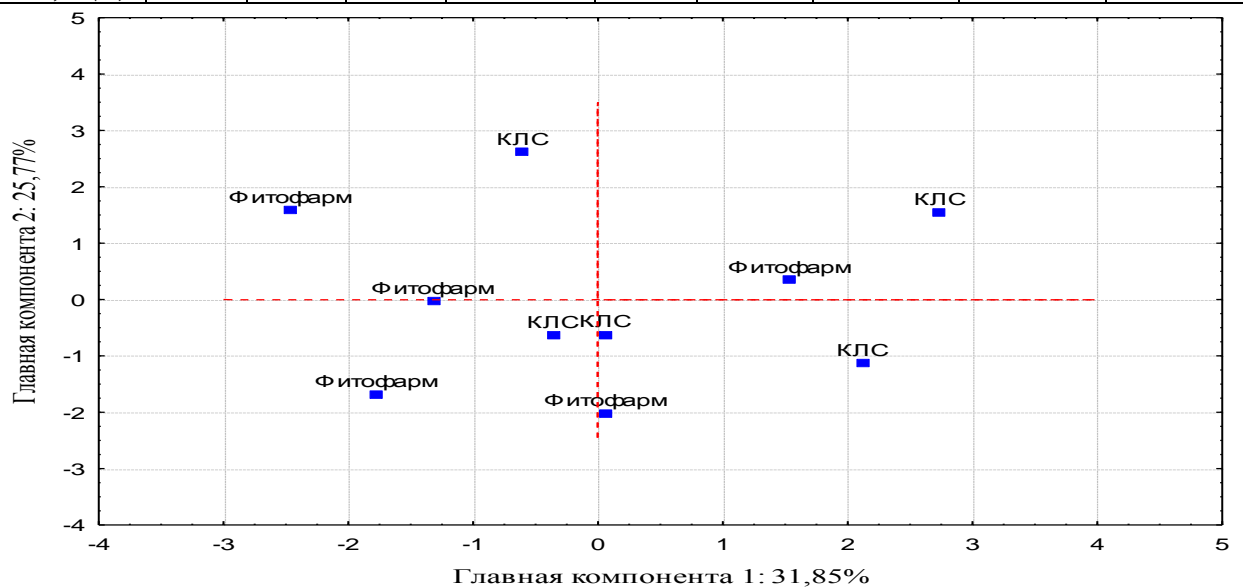


Рисунок 11 – График образцов «эвкалипта прутовидного» в координатах главных компонент (КЛС – ООО «Красногорсклексредства», Фитофарм – ПКФ «Фитофарм» ООО).

Обработка данных МГК показала, что результаты, образуют единую группу (рис. 11). Следовательно, хроматографический спектр, полученный методом ПФА, может использоваться в качестве общего образа листьев «эвкалипта прутовидного».

По имеющимся данным общий образ объекта или «фингерпринт» используется для идентификации ЛР. Для установления этой возможности в отношении листьев «эвкалипта прутовидного», было проведено сравнение хроматографических спектров листьев «эвкалипта прутовидного» (рис. 9-а) и листьев «эвкалипта шаровидного» (рис. 12), полученных методом ПФА.

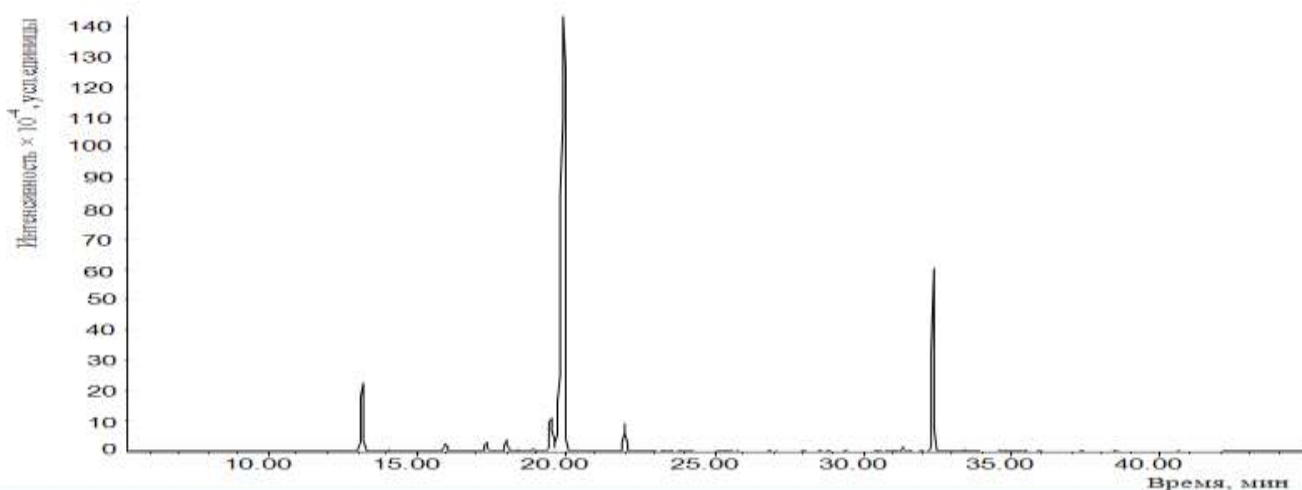


Рисунок 12 – Хроматограмма, полученная при ПФА «эвкалипта шаровидного».

Таблица 19 – Воспроизводимость соотношения компонентов газового экстракта «эвкалипта шаровидного»

	Относительное содержание ЛОС, $A_i$ , %								
	$\alpha$ - Пинен	Камфен	$\beta$ - Пинен	$\alpha$ - Феландрен	$n$ - Цимен	1,8- Цинеол	4- Терпинеол	$\alpha$ - Терпинеол	Аромадендрен
X 1	8.26	0.21	0.20	1.62	5.83	83.84	0.02	0.02	0.004
X 2	8.12	0.29	0.42	1.14	4.82	85.19	0.01	0.01	0.004
X 3	6.30	0.25	0.21	1.19	3.89	88.13	0.02	0.01	0.003
X 4	7.58	0.20	0.50	1.32	4.62	85.76	0.01	0.01	0.002
X 5	6.34	0.11	0.49	1.24	4.51	87.28	0.02	0.01	0.003
$\bar{A} \pm \Delta$ , $n=5$ , $P=0.95$	7.32 $\pm 1.18$	0.21 $\pm 0.08$	0.36 $\pm 0.18$	1.30 $\pm 0.24$	4.73 $\pm 0.88$	86.04 $\pm 2.11$	0.02 $\pm 0.01$	0.01 $\pm 0.01$	0.003 $\pm 0.001$
ОСКО, $S_r(A)$	0.13	0.31	0.41	0.14	0.15	0.02	0.23	0.37	0.26

ОСКО измерения хроматографического спектра «эвкалипта шаровидного» методом ПФА находится в пределах 0.02 – 0.41. Наибольшие значения ОСКО соответствуют компонентам с низким процентным содержанием.

Обработка данных методом главных компонент продемонстрировала четкую группировку хроматографических профилей по видам эвкалипта (рис. 13). В данном случае в качестве переменных были взяты значения процентного соотношения компонентов, приведенные в таблицах 18 и 19. Нужно отметить, что для сравнения хроматографических спектров за основу взяты доминирующие компоненты «эвкалипта прутовидного». Те же

вещества присутствуют и в газовом экстракте «эвкалипта шаровидного», но при этом не все являются доминирующими, а компонент с временем удерживания 32.3 мин, идентифицированный как эндоборнилацетат не учитывался при расчете процентного соотношения компонентов, поскольку не обнаружен в газовом экстракте «эвкалипта прутовидного».

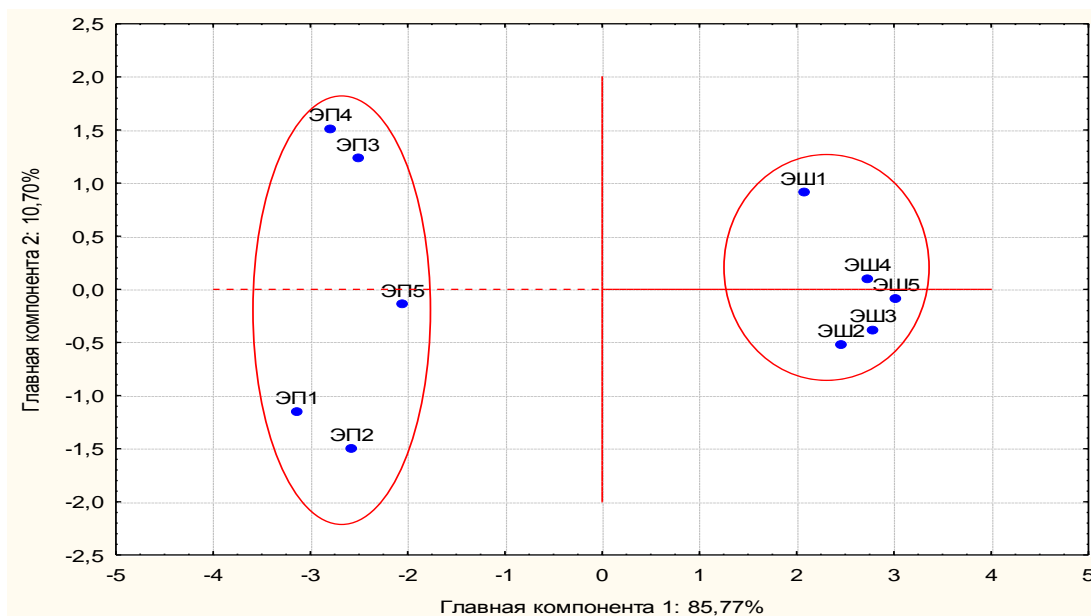


Рисунок 13 – График образцов в координатах главных компонент 1 и 2.

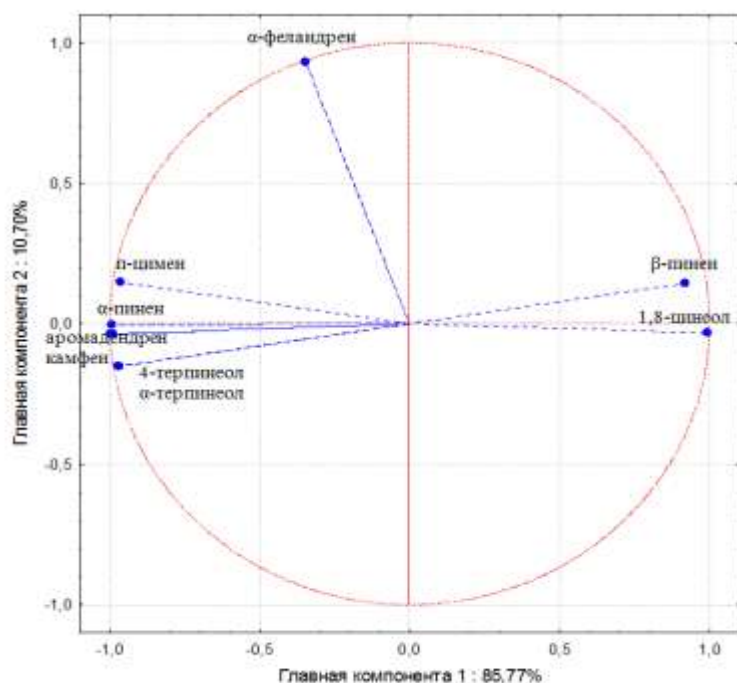


Рисунок 14 – График нагрузок.

Для оценки значимости каждой переменной при обработке данных МГК проведен анализ векторной проекции используемых переменных (рис.14). Переменные соответствующие α-пинену и аромандендрену, а также 4-терпинеолу и α-терпинеолу сильно коррелируют между



собой, поэтому для обработки данных можно использовать например только  $\alpha$ -пинен и 4-терпинеол. В то же время отмечена обратная корреляция между группами переменных « $\beta$ -пинен – 1,8-цинеол» и «*n*-цимен,  $\alpha$ -пинен, аромадендрен, 4-терпинеол,  $\alpha$ -терпинеол». Переменная, соответствующая  $\alpha$ -феландрену не коррелирует с 4-терпинеолом и  $\alpha$ -терпинеолом, а также с  $\beta$ -пиненом (угол между векторами  $\approx 90^\circ$ ). Таким образом, для сравнения хроматографических профилей эвкалиптов шаровидного и прутовидного достаточно оценивать процентное соотношение  $\alpha$ -пинена,  $\beta$ -пинена,  $\alpha$ -феландрена, *p*-цимена, 1,8-цинеола, и 4-терпинеола.

Дополнительно воспроизводимость полученного хроматографического профиля газового экстракта «эвкалипта прутовидного» оценивали по концентрации в газовом экстракте  $\alpha$ -пинена ( $t_R = 13.11$ мин) и 1,8-цинеола ( $t_R = 19.84$ мин) (табл.20). Систематическую погрешность анализа определяли с использованием стандартных образцов  $\alpha$ -пинена и 1,8-цинеола.

Таблица 20 – Воспроизводимость концентраций компонентов газового экстракта эвкалипта прутовидного

Компоненты	Концентрация, $x$ , мкг/см <sup>3</sup>						СКО $S(x)$ , мкг/см <sup>3</sup>	ОСКО $S_r(x)$	Систематическая погрешность, $\delta$
	$x_1$	$x_2$	$x_3$	$x_4$	$x_5$	$\bar{x} \pm \Delta$ , $n=5$ , $P=0.95$			
$\alpha$ -пинен	0.45	0.51	0.59	0.54	0.49	0.52 $\pm$ 0.06	0.05	0.10	0.03
1,8-цинеол	0.98	0.79	0.78	0.72	0.82	0.82 $\pm$ 0.11	0.09	0.12	0.04

Из приведенных выше метрологических характеристик видно, что содержание в газовом  $\alpha$ -пинена и 1,8-цинеола достаточно стабильно.

#### **Вывод:**

Хроматографический профиль листьев «эвкалипта прутовидного», полученный методом прямого ПФА, является воспроизводимым параметром и может использоваться в качестве общего образа листьев «эвкалипта прутовидного», а также позволяет выявить межвидовые различия, поэтому может применяться в качестве идентификационной характеристики «эвкалипта прутовидного».

### **3.5. Образцы состава летучих органических соединений**

#### **цветов «ромашки аптечной» и листьев «эвкалипта прутовидного»**

В целях повышения информативности анализа и достоверности идентификации растений по характерным хроматографическим спектрам проводили ТФМЭ ЛОС изучаемых растений с последующей термодесорбцией. Кроме этого в практике хроматографического анализа представляет интерес использовать этот прием для получения образцов известного качественного состава ЛОС, которые могут быть использованы для идентификации компонентов смесей органических соединений природного и техногенного происхождения.

В данной работе проведена оценка сорбционных микротрубок, заполненных Tenax TA, Carborack B, Porapak Q, Haye Sep N, MN-202 (табл. 11), в качестве вышеописанных образцов состава.

Основная задача данного этапа исследования заключалась в подборе подходящего сорбента для проточной ТФМЭ с целью получения воспроизводимого хроматографического профиля после проведения термодесорбции. В таблице 11 приведены характеристики используемых сорбентов. Выбор сорбентов обусловлен их универсальностью и широтой применения.

Для оценки сорбционных свойств указанных выше сорбентов определяли объем до проскока по соединениям, элюирующимся первыми на хроматограмме газового экстракта, а также имеющим наиболее интенсивные пики: для «эвкалипта прутовидного» – по  $\alpha$ -пинену, 1,8-цинеолу; для «ромашки аптечной» по 2-метилбутанолу, этил-2-метилбутаноату. На хроматограмме газового экстракта «ромашки аптечной» 2-метилбутаналь, этил-2-метилбутаноат не являются первыми соединениями, но 2-метилбутаналь при определении объема до проскока выходит одновременно с первыми компонентами, такими как 2-пентанон, диметилсульфид, 2-метилпропаналь, гепта-4,6-диин-2-ол, 3-метилбутаналь, кроме этого пик 2-метилбутанала имеет большую интенсивность и хорошо разделяется с соседними компонентами газового экстракта, что позволяет в отсутствие ГСО оценить содержание компонента по площади.

Результаты определения объема до проскока первых компонентов приведены в таблице 21. Следует отметить особые условия концентрирования ЛОС растительного сырья: пробоотбор происходит фактически при 100°C. С повышением температуры насыщения, уменьшается сорбционная емкость сорбента [165]. К тому же объем до проскока для пористых полимеров уменьшается в два раза при повышении температуры на 10°C [83].

Таблица 21 – Объем до проскока

Сорбент	«Объем до проскока», $\bar{V} \pm \Delta$ (n=5, P=0.95), см <sup>3</sup>			
	$\alpha$ -пинен	1,8-цинеол	2-метилбутаналь	этил-2-метилбутаноат
Tenax TA	0.3±0.2	0.3±0.2	1.5±0.5	2.3±0.5
Carborack B	3.2±0.2	3.7±0.5	10±1.5	27.3±1.2
Porapak Q	12.2±1.2	30.6±1.4	5.4±0.3	39.2±1.2
Haye Sep N	6±0.8	14±1.2	2.4±0.5	3.2±0.5
MN-202	13±1.2	14±1.2	8.3±0.8	>17.5±2.2

Из представленной таблицы видно, что в отношении ЛОС «эвкалипта прутовидного» самыми эффективными сорбентами оказались MN 202 и Porapak Q. Carborack B слабо удерживает целевые компоненты, а Tenax TA совсем не удерживает  $\alpha$ -пинен и 1,8-цинеол. Газовый экстракт эвкалипта прутовидного проходит через сорбционную микротрубку, заполненную Tenax TA практически без изменений концентрации (рис. 15).

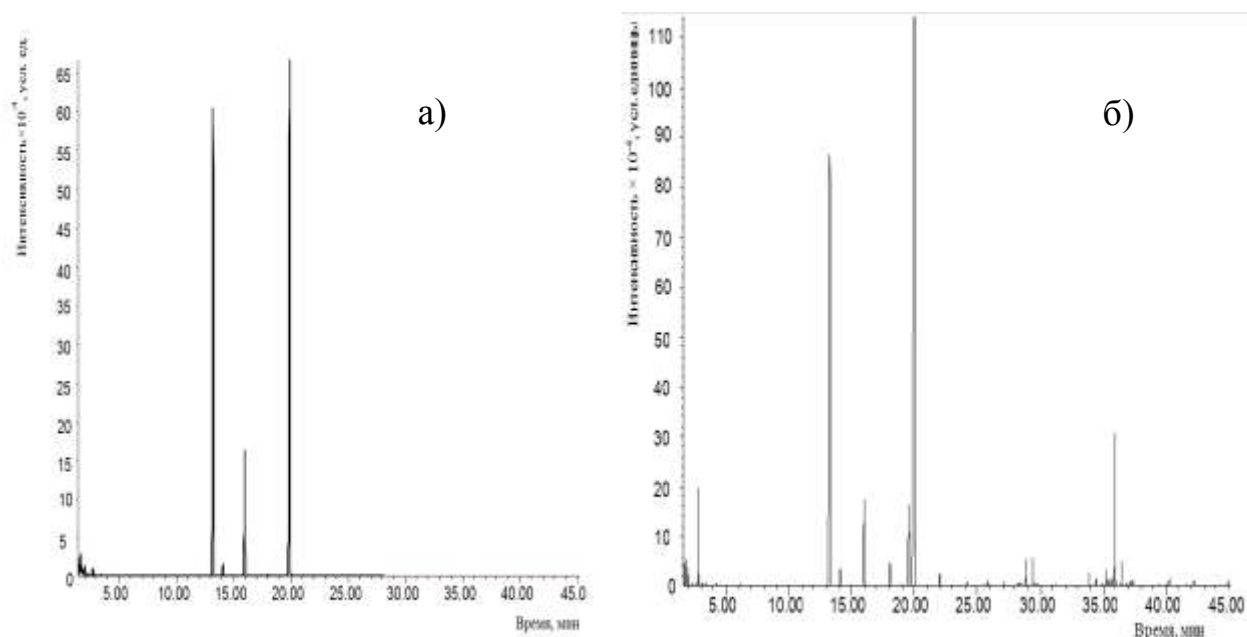


Рисунок 15 – Хроматограмма газового экстракта «эвкалипта прутовидного»: а) после пропускания через сорбционную микротрубку, заполненную Tenax TA б) до пропускания через сорбционную микротрубку, заполненную Tenax TA.

Выходные кривые подтверждают хорошие сорбционные свойства MN 202, Haye Sep N, Порапака Q (рис.16). Для Порапака Q кривая имеет более пологий вид, при этом концентрация компонентов в газовом экстракте, пропущенном через сорбент, так и не достигает концентрации в исходном газовом экстракте, при этом объем газового экстракта эвкалипта прутовидного составил 300 мл. На других выходных кривых наблюдается превышение исходной концентрации, связанное с повторяющимися хромато-десорбционными явлениями, поскольку процесс динамический.

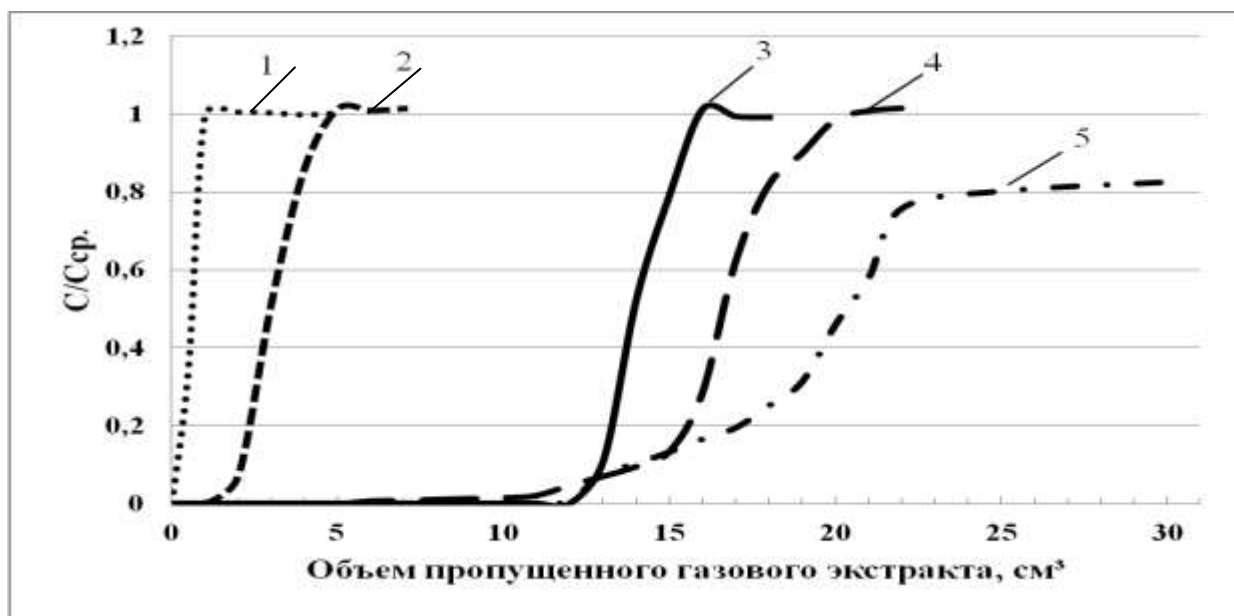


Рисунок 16 – Выходные кривые при концентрировании ЛОС «эвкалипта прутовидного»: 1– TenaxTA, 2 – CarborakB, 3 – MN-202, 4 – HayeSepN, 5 – PorapakQ.

Исходя из полученных результатов, объем газового экстракта «эвкалипта прутовидного» для проведения ТФМЭ на сорбционную микротрубку, заполненную Carborack В, должен находиться в диапазоне – до 3 см<sup>3</sup>, заполненную MN 202 – до 13 см<sup>3</sup>, HayeSep N – до 6 см<sup>3</sup>, Porapak Q – до 12 см<sup>3</sup>.

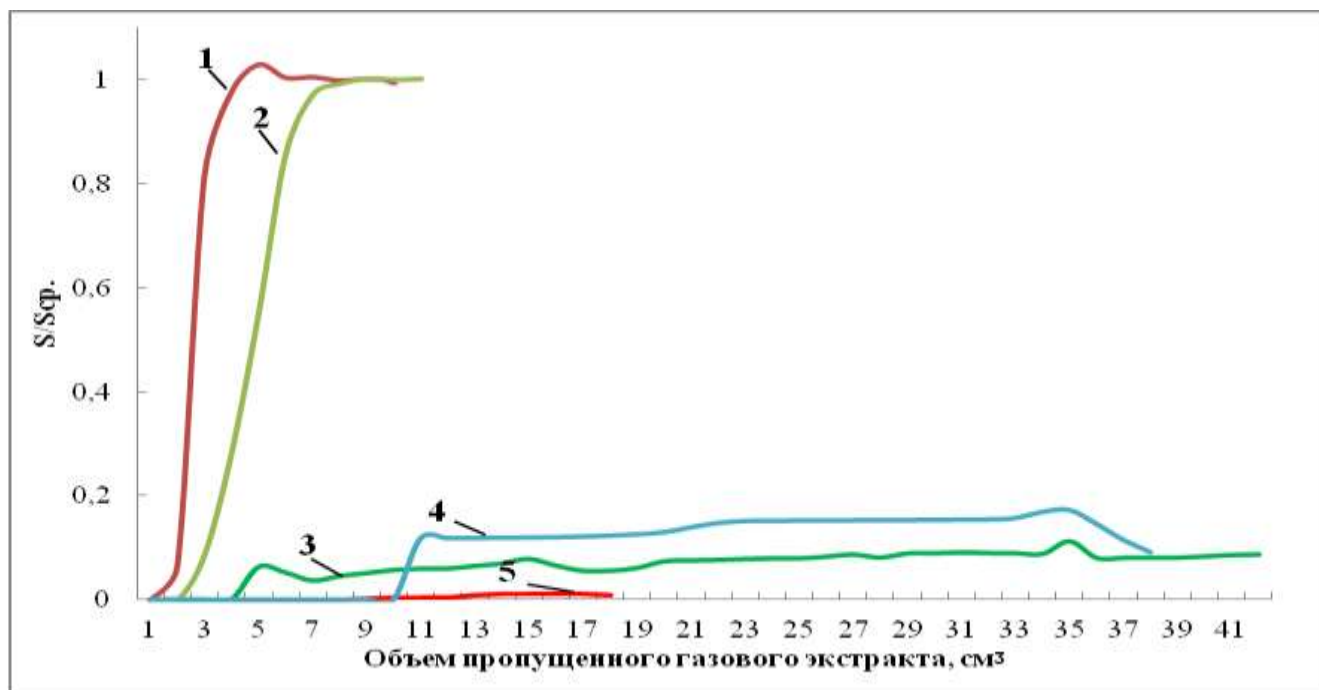


Рисунок 17 – Выходные кривые при концентрировании ЛОС «ромашки аптечной»: 1 – TenaxTA, 2 – HayeSepN, 3 – PorapakQ, 4 – CarborackB, 5 – MN-202. S/Scp. – отношение площади пика 2-метилбутаналю на хроматограмме газового экстракта, пропущенного через сорбент, к площади пика 2-метилбутаналю на хроматограмме ПФА газового экстракта «ромашки аптечной».

Для ЛОС «ромашки аптечной», исходя из данных таблицы 21 и рисунка 17, наиболее эффективными являются сорбенты Carborack В и MN-202. Однако при использовании Carborack В и MN-202 было обнаружено, что после концентрировании газового экстракта «ромашки аптечной» в объеме 11 и 13 см<sup>3</sup>, соответственного для указанных сорбентов, резко ухудшается проходимость сорбционной микротрубки. Этим объясняется постепенное уменьшение отношения S/Scp (рис. 17). После пропускания порядка 37 см<sup>3</sup> газового экстракта сорбционные микротрубки становятся практически непроходимыми для газового экстракта «ромашки аптечной», о чем также свидетельствуют выходные кривые для описываемых сорбентов. Вероятно, на поверхности сорбентов происходит полимеризация компонентов газового экстракта, т.к. он содержит большое количество непредельных углеводородов. Возможными претендентами на полимеризацию могут быть гепта-4,6-диин-2-ол, винилэтанат, 3,3,6-триметил-1,5-гептадиен-4-он, 3,3,6-триметил-1,5-гептадиен-4-ол.

При определении объема до проскока было обнаружено, что помимо Tenax TA, Haye Sep N также плохо удерживает легкие компоненты газового экстракта «ромашки аптечной». Насыщение обоих сорбентов происходит практически мгновенно. Чего нельзя

сказать о Porapak Q, Carborack B, MN-202. Через Porapak Q было пропущено 100 см<sup>3</sup> газового экстракта «ромашки аптечной», но, как и в случае с «эвкалиптом прутовидным», полного насыщения сорбента так и не произошло. Однако для Porapak Q «объем до проскока» оказался очень низким, по-сравнению с ЛОС «эвкалипта прутовидного», что можно объяснить различием в полярности сорбента и 2-метилбутанала.

Таким образом, для ЛОС «ромашки аптечной» объем газового экстракта для концентрирования на сорбционные микротрубки, заполненные TenaxTA должен находиться в пределах до 1 см<sup>3</sup>, Carborack B – до 10 см<sup>3</sup>, Porapak Q – до 5 см<sup>3</sup>, MN-202 – до 8 см<sup>3</sup>, HayeSepN – до 2 см<sup>3</sup>.

Для выбора оптимального объема концентрирования газового экстракта исходили из следующих ограничений: минимальный расход растительного сырья, воспроизводимость хроматографического спектра. Было установлено, что для «эвкалипта прутовидного» концентрирование пробы из одного флакона целесообразно проводить в объеме 3 см<sup>3</sup>. Поскольку такой объем газового экстракта образуется во флаконе для ПФА. Увеличение объема концентрирования газового экстракта из одного флакона практически не приводит к увеличению площадей пиков.

Для увеличения степени извлечения компонентов газового экстракта необходимо после каждых 3 см<sup>3</sup> менять флакон с пробой. В нашем случае концентрирование 3 см<sup>3</sup> газового экстракта, позволяет сэкономить время анализа и растительное сырье, предоставляя при этом воспроизводимые результаты (табл. 22, 23). ОСКО значений концентрации  $\alpha$ -пинена и 1,8-цинеола составляет 0.04 – 0.07 (табл.22).

Таблица 22 – Воспроизводимость концентрации  $\alpha$ -пинена и 1,8-цинеола при ПФА + ТФМЭ 3 см<sup>3</sup> газового экстракта «эвкалипта прутовидного»

Вещество	Проба	Carborack B мкг/см <sup>3</sup>	MN-202 мкг/см <sup>3</sup>	HayeSep N мкг/см <sup>3</sup>	Porapak Q мкг/см <sup>3</sup>
$\alpha$ -Пинен	X 1	0.75	1.06	0.94	1.806
	X 2	0.79	1.12	0.95	2.05
	X 3	0.86	1.09	1.06	1.821
	X 4	0.73	1.07	0.95	1.899
	X 5	0.85	1.17	1.03	2.036
	$\bar{x} \pm \Delta, n=5, P=0.95$	<b>0.80±0.07</b>	<b>1.10±0.06</b>	<b>0.99±0.07</b>	<b>1.92±0.15</b>
	СКО, $S(x)$ , мкг/см <sup>3</sup>	<b>0.06</b>	<b>0.05</b>	<b>0.06</b>	<b>0.12</b>
	ОСКО, $S_r(x)$	<b>0.07</b>	<b>0.04</b>	<b>0.06</b>	<b>0.06</b>
1,8-Цинеол	X 1	4.47	2.59	2.92	4.11
	X 2	4.52	2.45	3.07	4.59
	X 3	4.92	2.42	2.89	4.11
	X 4	4.51	2.24	3.15	4.38
	X 5	4.99	2.29	2.99	4.43
	$\bar{x} \pm \Delta, n=5, P=0.95$	<b>4.68±0.31</b>	<b>2.40±0.17</b>	<b>3.01±0.14</b>	<b>4.33±0.26</b>
	СКО, $S(x)$ , мкг/см <sup>3</sup>	<b>0.25</b>	<b>0.14</b>	<b>0.11</b>	<b>0.21</b>
	ОСКО, $S_r(x)$	<b>0.05</b>	<b>0.06</b>	<b>0.04</b>	<b>0.05</b>

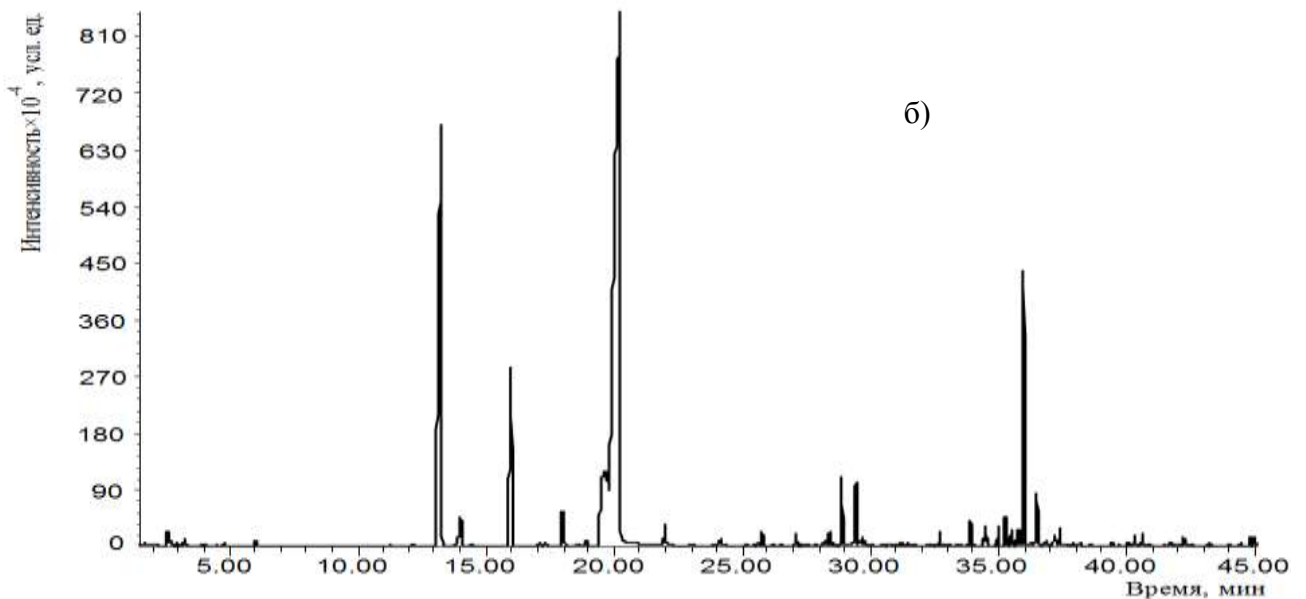
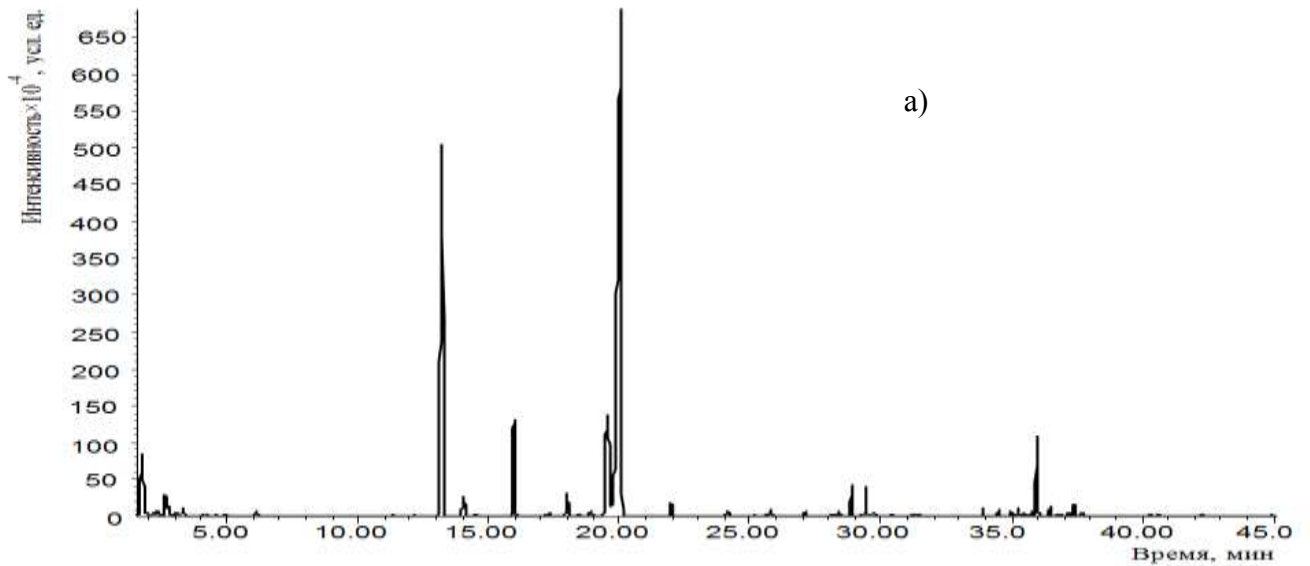
ОСКО соотношения компонентов хроматографического профиля изменяется в зависимости от используемого сорбента TenaxTA 0.008 – 0.64, PorapakQ 0.005 – 0.28, CarbopakB 0.01 – 0.11, MN – 202 0.01 – 0.14, HayeSepN 0.005 – 0.09, а также от интенсивности пика компонента, при малой интенсивности до 1 % разброс значений очень высок до 0.64. В то время как для  $\alpha$ -пинена,  $n$ -цимена и 1,8 цинеола ОСКО находится в пределах 0.07.

Таблица 23 – Характеристики воспроизводимости соотношения компонентов при ТФМЭ газового экстракта «эвкалипта прутовидного» в объеме 3см<sup>3</sup>

Сорбент	Относительное содержание ЛОС, $A_i, \%$								
	$\alpha$ -Пинен	Камфен	$\beta$ -Пинен	$\alpha$ -Феландрен	$n$ -Цимен	1,8-Цинеол	4-Терпинеол	$\alpha$ -Терпинеол	Аромаленден
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Tenax TA	6.89	0.25	2.39	3.47	36.35	35.50	5.59	5.93	3.62
Tenax TA	7.00	0.50	2.30	4.02	37.10	35.65	5.26	4.21	3.96
Tenax TA	6.02	0.14	2.96	3.88	36.99	34.25	6.28	5.47	4.01
Tenax TA	6.52	0.78	2.03	3.35	36.98	35.85	5.61	5.69	3.19
Tenax TA	6.30	0.91	2.58	3.18	37.02	35.04	5.74	4.90	4.33
$\bar{A} \pm \Delta, n=5, P=0.95$	<b>6.55</b> $\pm 0.51$	<b>0.52</b> $\pm 0.41$	<b>2.45</b> $\pm 0.44$	<b>3.58</b> $\pm 0.45$	<b>36.89</b> $\pm 0.37$	<b>35.26</b> $\pm 0.81$	<b>5.70</b> $\pm 0.46$	<b>5.24</b> $\pm 0.86$	<b>3.82</b> $\pm 0.53$
СКО, $S(A), \%$	<b>0.41</b>	<b>0.33</b>	<b>0.35</b>	<b>0.36</b>	<b>0.30</b>	<b>0.64</b>	<b>0.37</b>	<b>0.69</b>	<b>0.43</b>
ОСКО, $S_r(A)$	<b>0.06</b>	<b>0.64</b>	<b>0.14</b>	<b>0.10</b>	<b>0.01</b>	<b>0.01</b>	<b>0.07</b>	<b>0.13</b>	<b>0.11</b>
Porapak Q	21.56	1.08	6.47	1.27	8.87	52.61	1.33	1.23	5.58
Porapak Q	20.96	1.01	6.23	1.05	8.91	52.27	1.95	1.58	6.04
Porapak Q	21.96	1.18	6.58	1.98	8.60	51.99	1.02	1.37	5.32
Porapak Q	21.46	1.18	6.36	1.58	8.30	52.17	1.36	1.56	6.03
Porapak Q	21.92	1.05	6.47	1.19	9.01	52.06	1.06	1.96	5.33
$\bar{A} \pm \Delta, n=5, P=0.95$	<b>21.57</b> $\pm 0.51$	<b>1.10</b> $\pm 0.10$	<b>6.42</b> $\pm 0.16$	<b>1.41</b> $\pm 0.46$	<b>8.74</b> $\pm 0.36$	<b>52.22</b> $\pm 0.30$	<b>1.34</b> $\pm 0.46$	<b>1.54</b> $\pm 0.35$	<b>5.66</b> $\pm 0.45$
СКО, $S(A), \%$	<b>0.41</b>	<b>0.08</b>	<b>0.13</b>	<b>0.37</b>	<b>0.29</b>	<b>0.24</b>	<b>0.37</b>	<b>0.28</b>	<b>0.36</b>
ОСКО, $S_r(A)$	<b>0.02</b>	<b>0.07</b>	<b>0.02</b>	<b>0.26</b>	<b>0.03</b>	<b>0.01</b>	<b>0.27</b>	<b>0.18</b>	<b>0.06</b>
Carbopak B	9.09	1.75	2.15	1.98	14.99	56.88	2.18	2.25	8.73
Carbopak B	8.85	1.82	2.30	2.01	15.62	55.71	2.42	2.65	8.62
Carbopak B	9.21	1.76	2.49	1.95	15.34	56.98	2.35	1.96	7.96
Carbopak B	8.76	1.95	2.69	1.51	14.65	56.95	2.74	2.36	8.39
Carbopak B	9.12	1.73	2.41	1.95	15.21	56.51	2.46	2.55	8.06
$\bar{A} \pm \Delta, n=5, P=0.95$	<b>9.01</b> $\pm 0.24$	<b>1.81</b> $\pm 0.11$	<b>2.41</b> $\pm 0.25$	<b>1.88</b> $\pm 0.26$	<b>15.16</b> $\pm 0.46$	<b>56.61</b> $\pm 0.67$	<b>2.43</b> $\pm 0.25$	<b>2.35</b> $\pm 0.34$	<b>8.35</b> $\pm 0.42$
СКО, $S(A), \%$	<b>0.19</b>	<b>0.09</b>	<b>0.20</b>	<b>0.21</b>	<b>0.37</b>	<b>0.54</b>	<b>0.21</b>	<b>0.27</b>	<b>0.34</b>
ОСКО, $S_r(A)$	<b>0.02</b>	<b>0.05</b>	<b>0.08</b>	<b>0.11</b>	<b>0.02</b>	<b>0.01</b>	<b>0.08</b>	<b>0.11</b>	<b>0.04</b>
MN-202	23.52	1.21	5.11	1.27	10.15	54.42	1.03	0.96	2.35
MN-202	22.95	1.35	6.18	1.19	9.95	53.62	0.95	0.85	2.96
MN-202	23.11	1.19	5.21	1.49	10.12	54.09	1.12	1.21	2.47
MN-202	22.69	1.42	5.29	1.15	10.43	55.00	0.89	0.98	2.15
MN-202	23.39	1.00	5.52	1.32	10.22	54.28	1.15	1.03	2.09
$\bar{A} \pm \Delta, n=5, P=0.95$	<b>23.13</b> $\pm 0.41$	<b>1.23</b> $\pm 0.20$	<b>5.46</b> $\pm 0.53$	<b>1.28</b> $\pm 0.16$	<b>10.17</b> $\pm 0.21$	<b>54.28</b> $\pm 0.62$	<b>1.03</b> $\pm 0.14$	<b>1.01</b> $\pm 0.16$	<b>2.41</b> $\pm 0.44$
СКО, $S(A), \%$	<b>0.33</b>	<b>0.16</b>	<b>0.43</b>	<b>0.13</b>	<b>0.17</b>	<b>0.50</b>	<b>0.11</b>	<b>0.13</b>	<b>0.35</b>
ОСКО, $S_r(A)$	<b>0.01</b>	<b>0.13</b>	<b>0.08</b>	<b>0.10</b>	<b>0.02</b>	<b>0.01</b>	<b>0.11</b>	<b>0.13</b>	<b>0.14</b>

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Haye Sep N	17.33	1.159	5.369	1.606	10.264	57.29	1.308	1.25	4.22
Haye Sep N	16.52	1.06	5.72	1.94	10.16	58.01	1.19	1.32	4.08
Haye Sep N	17.38	1.09	5.24	1.57	9.98	57.96	1.29	1.14	4.35
Haye Sep N	17.09	1.26	5.47	1.62	10.24	57.71	1.17	1.28	4.16
Haye Sep N	16.85	1.12	5.68	1.59	10.21	58.00	1.22	1.31	4.05
$\bar{A} \pm \Delta, n=5, P=0.95$	<b>17.03</b> $\pm 0.45$	<b>1.13</b> $\pm 0.11$	<b>5.50</b> $\pm 0.25$	<b>1.67</b> $\pm 0.19$	<b>10.17</b> $\pm 0.14$	<b>57.79</b> $\pm 0.39$	<b>1.24</b> $\pm 0.07$	<b>1.26</b> $\pm 0.09$	<b>4.17</b> $\pm 0.15$
СКО, $S(A)$ , %	<b>0.36</b>	<b>0.08</b>	<b>0.21</b>	<b>0.15</b>	<b>0.11</b>	<b>0.31</b>	<b>0.06</b>	<b>0.07</b>	<b>0.12</b>
ОСКО, $S_r(A)$	<b>0.02</b>	<b>0.07</b>	<b>0.04</b>	<b>0.09</b>	<b>0.01</b>	<b>0.01</b>	<b>0.05</b>	<b>0.06</b>	<b>0.03</b>

На рисунке 18 представлены хроматограммы, полученные при термодесорбции с концентрационных микротрубок после концентрирования на них 3 см<sup>3</sup> экстракта. При визуальном сравнении полученных после термодесорбции хроматограмм, заметно практически полное совпадение хроматографических спектров за исключением термодесорбции с Tenax TA. В данном случае соотношение компонентов хроматографического спектра сильно отличается.



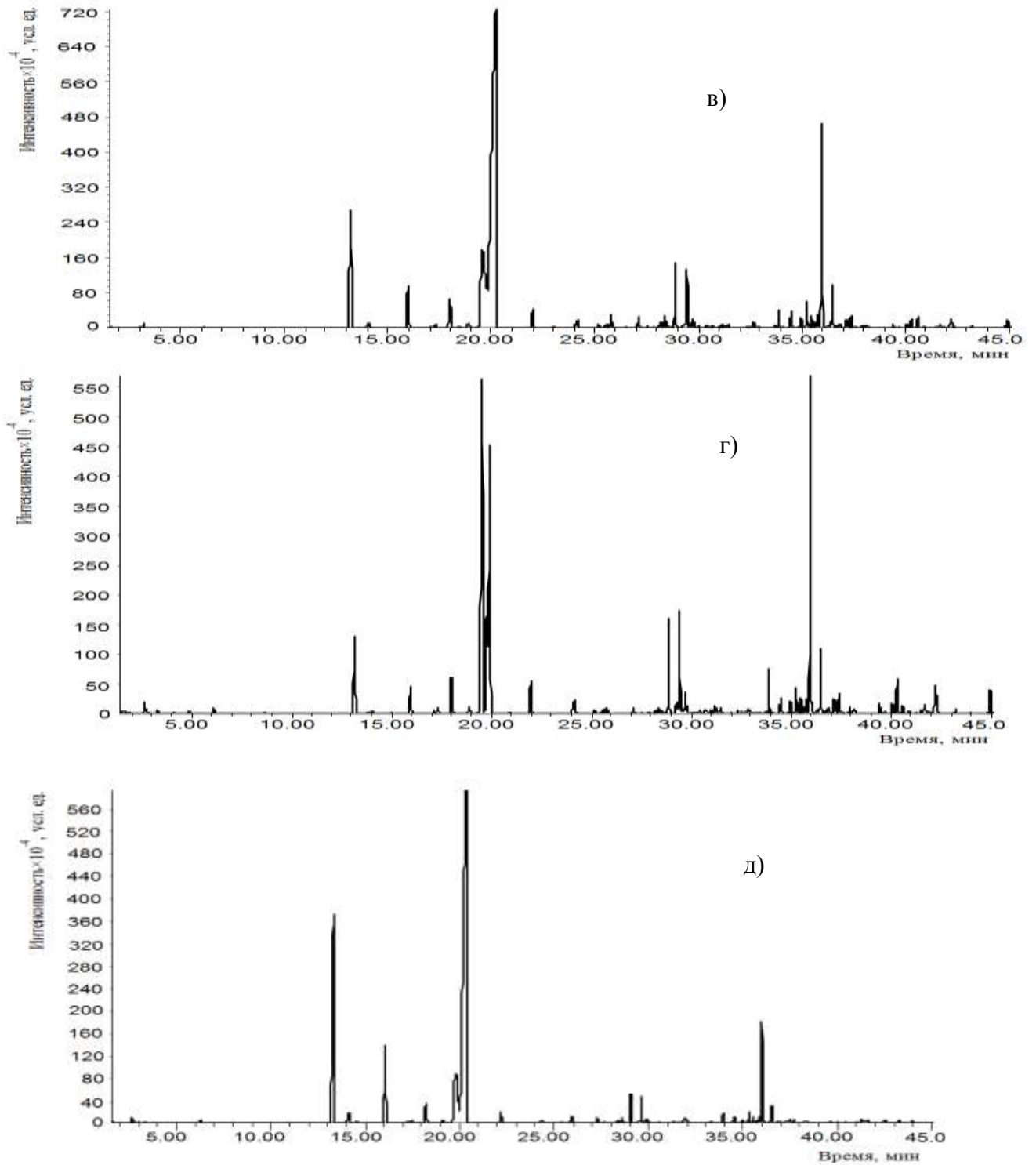


Рисунок 18 – Хроматограммы, полученные при ТФМЭ 3 мл газового экстракта эвкалипта прутовидного: а) MN 202, б) Porapak Q, в) Carborak B, г) Tanax TA, д) Haye Sep N.

Обработка результатов, полученных после термодесорбции с концентрационных микротрубок, на которых сконцентрировано 3 см<sup>3</sup> газового экстракта эвкалипта, МГК демонстрирует (рис. 20) разделение результатов фактически на 3 кластера. Первый включает в себя наиболее обширную группу данных – прямой ПФА «эвкалипта прутовидного», ТФМЭ на концентрационные микротрубки, заполненные MN 202, Porapak Q и Haye Sep N, исходя из этого, данные сорбенты могут быть взаимозаменяемы при использовании в концентрационных



микротрубках. Кроме того сорбционные микротрубки, заполненные данными сорбентами, могут использоваться в качестве образцов хроматографического профиля при ПФА «эвкалипта прутовидного» и для получения общего образа листьев «эвкалипта прутовидного». На рисунке 19 выделяются две группы результатов ТФМЭ на Carborapak B и Tenax TA, гипотетически их использование возможно для ТФМЭ ЛОС «эвкалипта прутовидного», но они не обладают универсальностью MN 202, Porapak Q и Haye Sep N, к тому же слабо удерживают легколетучие компоненты газового экстракта.

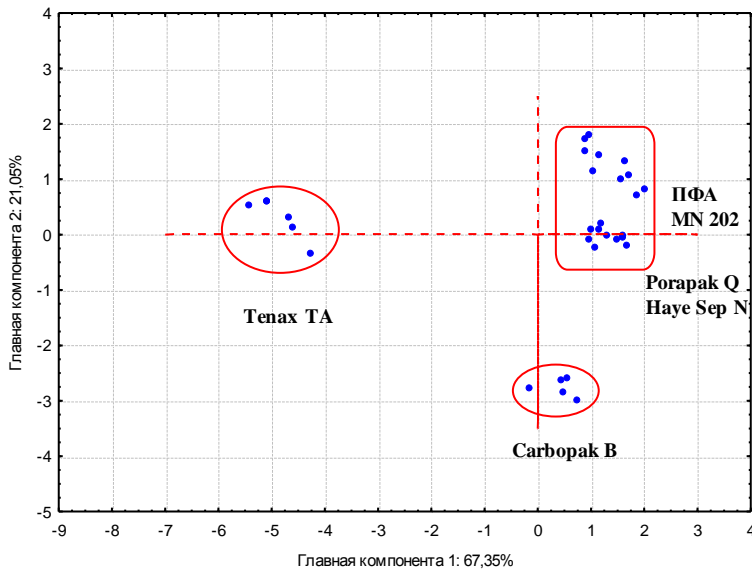


Рисунок 19 – График в координатах главных компонент 1 и 2 результатов ТФМЭ и ПФА газового экстракта «эвкалипта прутовидного».

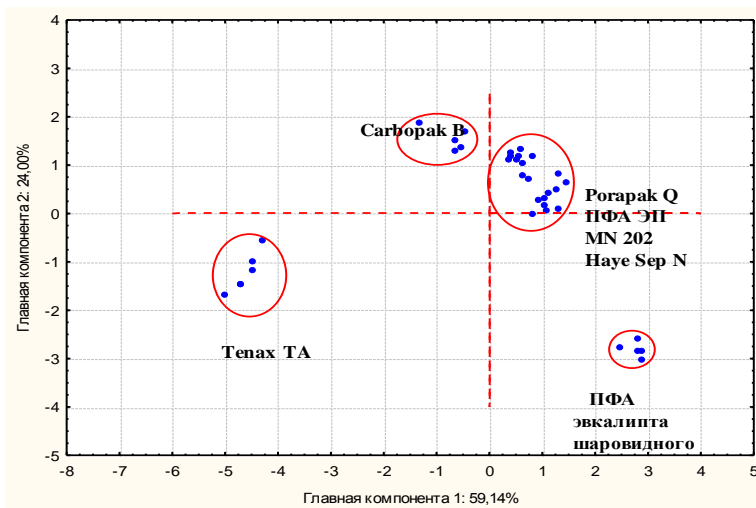


Рисунок 20 – График в координатах главных компонент 1 и 2 результатов ТФМЭ и ПФА газового экстракта «эвкалипта прутовидного» и ПФА «эвкалипта шаровидного».

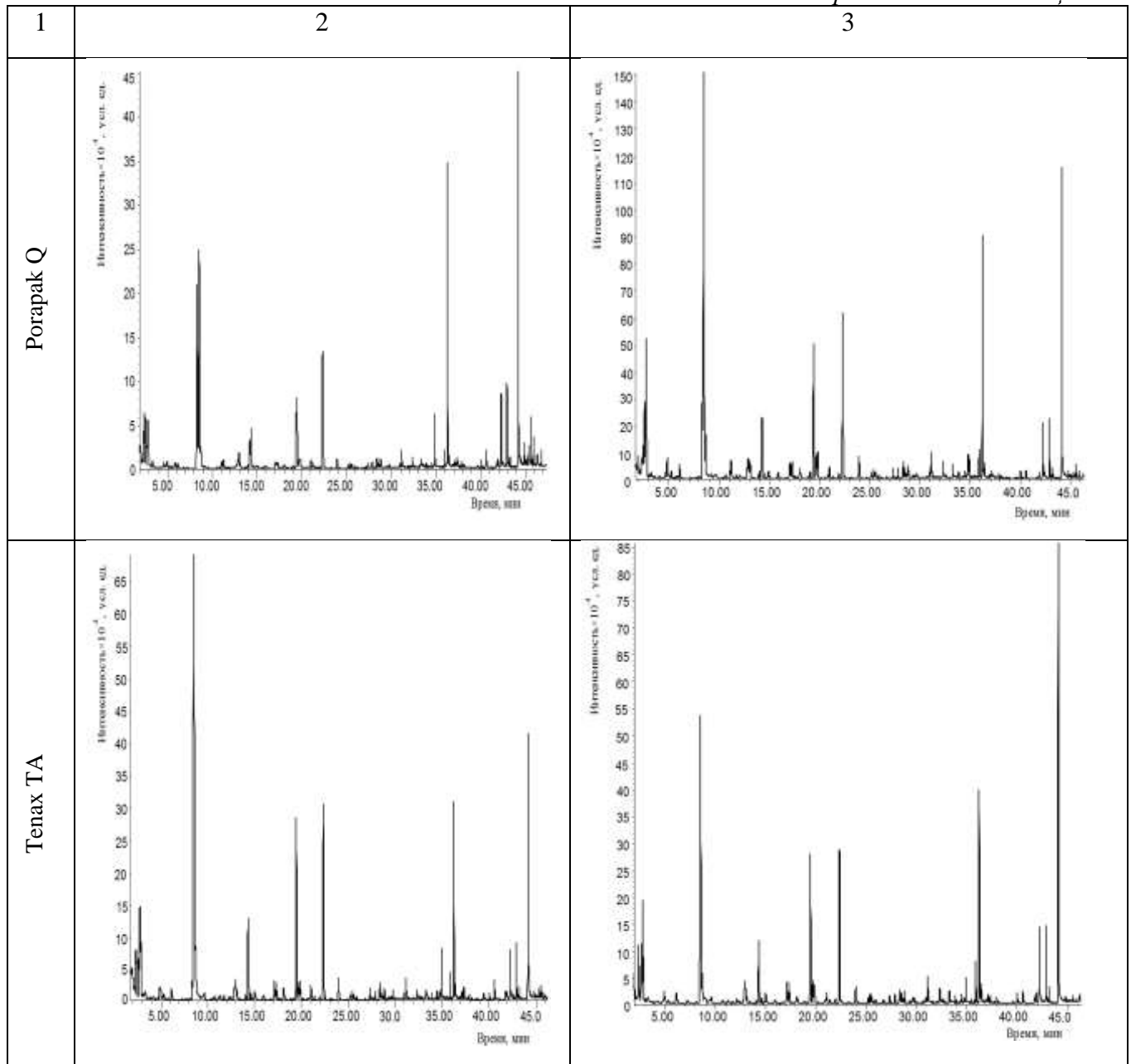
Для изучения возможности идентификации «эвкалипта прутовидного» по хроматографическим спектрам, при обработке данных МГК были добавлены результаты ПФА «эвкалипта шаровидного» (рис. 20). Полученные результаты демонстрируют четкое выделение

группы данных ПФА «эвкалипта шаровидного», доказывая при этом возможность использования хроматографического спектра, полученного при прямом ПФА и ПФА+ТФМЭ на MN 202, Porapak Q и HayeSep N, в качестве общего образа объекта для идентификации «эвкалипта прутовидного».

В отношении ЛОС «ромашки аптечной» проведено концентрирование газового экстракта в объемах 3 и 5 см<sup>3</sup> для оценки полученных после десорбции хроматограмм в качестве общего образа данного ЛР. Было отмечено, что при всех изучаемых объемах концентрирования на все рассматриваемые сорбенты хроматографический спектр ЛОС «ромашки аптечной», полученный при ПФА, не воспроизводится в отличие от спектра «эвкалипта прутовидного» (табл. 24). При визуальном сравнении полученных хроматограмм, прослеживается воспроизводимость хроматографического профиля в рамках одного сорбента. При термодесорбции с концентрационных микротрубок пики, соответствующие 2-пропанону, диметилсульфиду, 2-метилпропанолу, гепта-4,6-диин-2-олу, 3,3,6-триметил-1,5-гептадиен-4-олу, имеют очень низкую интенсивность на хроматограмме, тогда как при ПФА они входят в число доминирующих компонентов. Возможно, на поверхности сорбента происходят химические реакции с участием данных компонентов. Однако, такой компонент как фарнезен, встречающийся в паровой фазе в следовых количествах, при ТФМЭ при любых объемах прокачивания является одним из доминирующих. То же самое можно сказать и про бисаболол оксид А. Поэтому оценивались объемы концентрирования газового экстракта «ромашки аптечной» превышающие объем до проскока для некоторых сорбентов. Доминирующими компонентами при ТФМЭ являются 3-метилбутаналь, 2-метилбутаналь, этил-2-метилбутаноат, пропил-2-метилбутаноат, *n*-цимен, 3,3,6-триметил-1,5-гептадиен-4-он, β-фарнезен, α-бисаболол оксид Б, бисаболон оксид, бисаболол оксид. В качестве характерного хроматографического профиля при использовании ТФМЭ предлагается рассматривать воспроизводимое соотношение компонентов при минимальных объемах концентрирования с привязкой к конкретному сорбенту.

Таблица 24 – Хроматограммы, полученные при 3 и 5 см<sup>3</sup> ТФМЭ ЛОС «ромашки аптечной».

1	Объем ТФМЭ	
	3 см <sup>3</sup> 2	5 см <sup>3</sup> 3
Carborack B		
Haye Sep N		
MN-202		



Соотношение доминирующих компонентов при ТФМЭ 3 и 5 см<sup>3</sup> газового экстракта «ромашки аптечной» представлены в таблице 25.

ОСКО значений составляет для Tenax TA 3 см<sup>3</sup> 0.10 - 0.22, Tenax TA 5 см<sup>3</sup> – 0.02 - 0.09, Porapak Q 3 см<sup>3</sup> – 0.05 - 0.25, Porapak Q 5 см<sup>3</sup> – 0.05-0.27, Carborack B 3 см<sup>3</sup> – 0.07 – 0.32, Carborack B 5 см<sup>3</sup> –0.02 – 0.19, MN – 202 3 см<sup>3</sup> – 0.01 – 0.10, MN-202 5 см<sup>3</sup> – 0.02 – 0.22, Haye Sep N 3 см<sup>3</sup> – 0.02 – 0.11, Haye Sep N 5 см<sup>3</sup> – 0.03 – 0.33. Из полученных данных нельзя дать единой рекомендации по объему газового экстракта для ТФМЭ ЛОС «ромашки аптечной». Для Tenax TA и Carborack B наименьшим ОСКО характеризуются данные, полученные при ТФМЭ 5 см<sup>3</sup> газового экстракта, для Porapak Q ОСКО практически одинаковое для 3 и 5 см<sup>3</sup>, для MN-202 и Haye Sep N наименьшее ОСКО данных соответствует 3 см<sup>3</sup>.

Таблица 25 – Соотношение доминирующих компонентов при ТФМЭ газового экстракта цветков «ромашки аптечной»

Компонент Сорбент	3-Метилбутаналь	2-Метилбутаналь	Этил- 2-метилбутаноат	Пропил-2- метилбутаноат	<i>n</i> -Цимен	3,3,6-триметил-1,5- гептадиен-4-он	$\beta$ -Фарнезен	$\alpha$ -Бисаболол оксид Б	Бисаболон оксид	Бисаболол оксид А
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Haye Sep N 3МЛ	5.50	7.15	46.88	5.84	7.13	13.05	10.87	0.42	0.55	2.61
Haye Sep N 3МЛ	4.90	6.93	44.97	6.47	7.95	13.43	10.99	0.49	0.66	3.21
Haye Sep N 3МЛ	5.30	7.21	45.96	5.94	7.58	12.96	10.44	0.51	0.69	3.41
Haye Sep N 3МЛ	5.20	7.18	45.31	6.15	7.25	13.38	11.02	0.50	0.61	3.40
Haye Sep N 3МЛ	4.96	6.99	45.18	5.79	7.91	13.76	10.89	0.57	0.71	3.24
$\bar{A} \pm \Delta, \%$ $n=5, P=0.95$	<b>5.17</b> $\pm$ <b>0.31</b>	<b>7.09</b> $\pm$ <b>0.15</b>	<b>45.66</b> $\pm$ <b>0.96</b>	<b>6.04</b> $\pm$ <b>0.35</b>	<b>7.56</b> $\pm$ <b>0.46</b>	<b>13.32</b> $\pm$ <b>0.41</b>	<b>10.84</b> $\pm$ <b>0.29</b>	<b>0.50</b> $\pm$ <b>0.07</b>	<b>0.64</b> $\pm$ <b>0.08</b>	<b>3.17</b> $\pm$ <b>0.41</b>
CKO, $S(A), \%$	<b>0.25</b>	<b>0.12</b>	<b>0.78</b>	<b>0.28</b>	<b>0.37</b>	<b>0.32</b>	<b>0.23</b>	<b>0.05</b>	<b>0.06</b>	<b>0.33</b>
OCKO, $S_r(A)$	<b>0.05</b>	<b>0.02</b>	<b>0.02</b>	<b>0.05</b>	<b>0.05</b>	<b>0.02</b>	<b>0.02</b>	<b>0.11</b>	<b>0.10</b>	<b>0.10</b>
Haye Sep N 5МЛ	2.89	2.03	44.73	6.95	8.26	14.77	10.83	0.9	1.29	7.35
Haye Sep N 5МЛ	3.83	3.59	41.75	4.55	6.88	11.78	19.18	0.41	1.68	6.35
Haye Sep N 5МЛ	3.58	3.95	42.15	5.02	6.47	11.24	18.95	1.07	1.45	6.12
Haye Sep N 5МЛ	3.41	2.58	41.52	5.38	6.61	12.98	18.6	1.11	1.56	6.25
Haye Sep N 5МЛ	2.85	3.02	41.62	5.18	6.34	12.85	18.23	1.13	1.62	7.16
$\bar{A} \pm \Delta, \%$ $n=5, P=0.95$	<b>3.31</b> $\pm$ <b>0.54</b>	<b>3.03</b> $\pm$ <b>0.96</b>	<b>42.35</b> $\pm$ <b>1.68</b>	<b>5.42</b> $\pm$ <b>1.13</b>	<b>6.91</b> $\pm$ <b>0.97</b>	<b>12.72</b> $\pm$ <b>1.69</b>	<b>17.16</b> $\pm$ <b>4.42</b>	<b>0.92</b> $\pm$ <b>0.37</b>	<b>1.52</b> $\pm$ <b>0.19</b>	<b>6.65</b> $\pm$ <b>0.70</b>
CKO, $S(A), \%$	<b>0.43</b>	<b>0.77</b>	<b>1.35</b>	<b>0.91</b>	<b>0.78</b>	<b>1.36</b>	<b>3.56</b>	<b>0.30</b>	<b>0.15</b>	<b>0.57</b>
OCKO, $S_r(A)$	<b>0.13</b>	<b>0.25</b>	<b>0.03</b>	<b>0.17</b>	<b>0.11</b>	<b>0.11</b>	<b>0.21</b>	<b>0.32</b>	<b>0.10</b>	<b>0.09</b>
MN-202 3 МЛ	7.97	17.14	28.73	2.82	4.78	6.49	23.41	2.06	1.63	4.97
MN-202 3 МЛ	7.66	16.97	27.96	3.47	4.68	6.95	22.98	2.54	1.76	5.03
MN-202 3 МЛ	7.77	17.29	27.71	2.94	4.78	6.49	23.61	2.36	1.86	5.19
MN-202 3 МЛ	8.61	16.95	28.14	3.02	3.99	6.48	23.13	2.41	1.59	5.68
MN-202 3 МЛ	7.91	17.17	28.33	2.92	4.81	6.56	23.41	2.02	1.66	5.21
$\bar{A} \pm \Delta, \%$ $n=5, P=0.95$	<b>7.98</b> $\pm$ <b>0.46</b>	<b>17.10</b> $\pm$ <b>0.18</b>	<b>28.17</b> $\pm$ <b>0.48</b>	<b>3.03</b> $\pm$ <b>0.32</b>	<b>4.61</b> $\pm$ <b>0.43</b>	<b>6.59</b> $\pm$ <b>0.25</b>	<b>23.31</b> $\pm$ <b>0.31</b>	<b>2.28</b> $\pm$ <b>0.28</b>	<b>1.70</b> $\pm$ <b>0.14</b>	<b>5.22</b> $\pm$ <b>0.35</b>
CKO, $S(A), \%$	<b>0.37</b>	<b>0.14</b>	<b>0.39</b>	<b>0.25</b>	<b>0.35</b>	<b>0.20</b>	<b>0.25</b>	<b>0.23</b>	<b>0.11</b>	<b>0.28</b>
OCKO, $S_r(A)$	<b>0.05</b>	<b>0.01</b>	<b>0.01</b>	<b>0.08</b>	<b>0.08</b>	<b>0.03</b>	<b>0.01</b>	<b>0.10</b>	<b>0.06</b>	<b>0.05</b>
MN-202 5 МЛ	6.91	20.35	36.35	3.6	5.14	6.48	14.08	1.56	1.84	3.69
MN-202 5 МЛ	6.54	19.21	35.52	3.87	5.98	6.64	15.21	2.03	1.81	3.19
MN-202 5 МЛ	6.23	18.25	36.69	3.58	5.54	7.09	14.89	2.25	1.67	3.81
MN-202 5 МЛ	6.17	19.35	36.95	3.98	5.36	6.72	14.69	1.25	1.75	3.78
MN-202 5 МЛ	6.82	19.35	35.35	3.83	6.01	6.26	15.11	1.73	1.97	3.57
$\bar{A} \pm \Delta, \%$ $n=5, P=0.95$	<b>6.53</b> $\pm$ <b>0.42</b>	<b>19.30</b> $\pm$ <b>0.93</b>	<b>36.17</b> $\pm$ <b>0.88</b>	<b>3.77</b> $\pm$ <b>0.22</b>	<b>5.61</b> $\pm$ <b>0.48</b>	<b>6.64</b> $\pm$ <b>0.38</b>	<b>14.80</b> $\pm$ <b>0.56</b>	<b>1.76</b> $\pm$ <b>0.49</b>	<b>1.81</b> $\pm$ <b>0.14</b>	<b>3.61</b> $\pm$ <b>0.31</b>
CKO, $S(A), \%$	<b>0.33</b>	<b>0.74</b>	<b>0.71</b>	<b>0.18</b>	<b>0.38</b>	<b>0.31</b>	<b>0.45</b>	<b>0.39</b>	<b>0.11</b>	<b>0.25</b>
OCKO, $S_r(A)$	<b>0.05</b>	<b>0.04</b>	<b>0.02</b>	<b>0.05</b>	<b>0.07</b>	<b>0.05</b>	<b>0.03</b>	<b>0.22</b>	<b>0.06</b>	<b>0.07</b>

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Carbopack B 3 мЛ	5.6	12.96	19.2	2.67	3.73	7.49	28.86	3.63	2.88	12.98
Carbopack B 3 мЛ	5.12	11.38	19.42	2.54	5.5	8.07	29.5	3.55	2.31	12.61
Carbopack B 3 мЛ	6.29	14.36	23.55	2.92	5.42	8.25	29.04	2.72	2.22	5.23
Carbopack B 3 мЛ	8.89	11.63	27.61	2.25	4.94	6.9	24.56	2.45	2.28	8.49
Carbopack B 3 мЛ	8.34	9.1	23.01	2.26	5.22	7.27	27.54	2.33	2.8	12.13
$\bar{A} \pm \Delta, \%$ n=5, P=0.95	<b>6.85</b> ± <b>2.09</b>	<b>11.89</b> ± <b>2.44</b>	<b>22.56</b> ± <b>4.30</b>	<b>2.53</b> ± <b>0.35</b>	<b>4.96</b> ± <b>0.91</b>	<b>7.60</b> ± <b>0.71</b>	<b>27.91</b> ± <b>2.49</b>	<b>2.94</b> ± <b>0.76</b>	<b>2.50</b> ± <b>0.39</b>	<b>10.29</b> ± <b>4.16</b>
CKO, S(A), %	<b>1.68</b>	<b>1.96</b>	<b>3.46</b>	<b>0.28</b>	<b>0.72</b>	<b>0.56</b>	<b>2.00</b>	<b>0.61</b>	<b>0.32</b>	<b>3.35</b>
OCKO, S <sub>r</sub> (A)	<b>0.24</b>	<b>0.16</b>	<b>0.15</b>	<b>0.11</b>	<b>0.15</b>	<b>0.07</b>	<b>0.07</b>	<b>0.21</b>	<b>0.13</b>	<b>0.33</b>
Carbopack B 5 мЛ	1.97	3.68	21.31	3.61	6.39	9.82	32.98	3.12	3.18	13.94
Carbopack B 5 мЛ	1.2	2.39	17.95	3.22	5.87	9.54	39.59	3.35	3.31	13.58
Carbopack B 5 мЛ	1.51	2.98	18.32	3.44	5.96	10.01	37.54	3.59	3.29	13.36
Carbopack B 5 мЛ	1.64	3.13	17.62	3.51	6.18	9.91	37.65	3.44	3.53	13.39
Carbopack B 5 мЛ	1.33	2.47	18.96	3.64	5.72	9.84	36.42	3.95	3.61	14.06
$\bar{A} \pm \Delta, \%$ n=5, P=0.95	<b>1.53</b> ± <b>0.37</b>	<b>2.93±</b> <b>0.65</b>	<b>18.83±</b> <b>1.83</b>	<b>3.48±</b> <b>0.21</b>	<b>6.02±</b> <b>0.33</b>	<b>9.82±</b> <b>0.22</b>	<b>36.84±</b> <b>3.03</b>	<b>3.49±</b> <b>0.38</b>	<b>3.38±</b> <b>0.22</b>	<b>13.67</b> ± <b>0.41</b>
CKO, S(A), %	<b>0.30</b>	<b>0.53</b>	<b>1.47</b>	<b>0.17</b>	<b>0.26</b>	<b>0.18</b>	<b>2.44</b>	<b>0.31</b>	<b>0.18</b>	<b>0.32</b>
OCKO, S <sub>r</sub> (A)	<b>0.19</b>	<b>0.18</b>	<b>0.08</b>	<b>0.05</b>	<b>0.04</b>	<b>0.02</b>	<b>0.07</b>	<b>0.09</b>	<b>0.05</b>	<b>0.02</b>
Porapak Q 3 мЛ	5.65	6.43	22.68	3.34	5.68	12.84	13.7	4.26	4.12	21.3
Porapak Q 3 мЛ	3.54	4.82	25.09	6.52	8.41	15.23	12.08	3.48	3.24	17.59
Porapak Q 3 мЛ	3.25	5.61	25.86	5.67	7.62	13.54	12.32	3.63	3.94	18.56
Porapak Q 3 мЛ	4.06	5.12	24.63	5.06	6.42	13.58	13.23	3.99	3.57	20.34
Porapak Q 3 мЛ	5.37	6.31	23.14	5.48	6.97	14.29	12.73	3.21	3.17	19.33
$\bar{A} \pm \Delta, \%$ n=5, P=0.95	<b>4.37</b> ± <b>1.34</b>	<b>5.66</b> ± <b>0.88</b>	<b>24.28</b> ± <b>1.66</b>	<b>5.21</b> ± <b>1.46</b>	<b>7.02</b> ± <b>1.31</b>	<b>13.90</b> ± <b>1.13</b>	<b>12.81</b> ± <b>0.82</b>	<b>3.71</b> ± <b>0.52</b>	<b>3.61</b> ± <b>0.52</b>	<b>19.42</b> ± <b>1.81</b>
CKO, S(A), %	<b>1.08</b>	<b>0.71</b>	<b>1.34</b>	<b>1.17</b>	<b>1.05</b>	<b>0.91</b>	<b>0.66</b>	<b>0.42</b>	<b>0.42</b>	<b>1.46</b>
OCKO, S <sub>r</sub> (A)	<b>0.25</b>	<b>0.13</b>	<b>0.06</b>	<b>0.23</b>	<b>0.15</b>	<b>0.07</b>	<b>0.05</b>	<b>0.11</b>	<b>0.12</b>	<b>0.07</b>
Porapak Q 5 мЛ	3.88	8.26	30.61	5.04	10.94	12.69	9.69	2.69	2.59	13.61
Porapak Q 5 мЛ	5.7	11.89	26.83	3.96	10.75	10.65	8.24	3.02	2.92	16.05
Porapak Q 5 мЛ	2.81	6.55	34.28	5.58	8.78	13.59	10.59	2.48	2.64	12.72
Porapak Q 5 мЛ	4.61	7.52	28.99	4.73	9.64	12.78	9.98	2.73	2.77	16.25
Porapak Q 5 мЛ	3.52	7.95	27.64	5.11	10.51	12.21	10.24	2.81	2.86	17.15
$\bar{A} \pm \Delta, \%$ n=5, P=0.95	<b>4.10</b> ± <b>1.37</b>	<b>8.43</b> ± <b>2.53</b>	<b>29.67</b> ± <b>3.67</b>	<b>4.88</b> ± <b>0.75</b>	<b>10.12</b> ± <b>1.12</b>	<b>12.38</b> ± <b>1.35</b>	<b>9.75</b> ± <b>1.13</b>	<b>2.75</b> ± <b>0.24</b>	<b>2.76</b> ± <b>0.17</b>	<b>15.16</b> ± <b>2.35</b>
CKO, S(A), %	<b>1.10</b>	<b>2.04</b>	<b>2.95</b>	<b>0.60</b>	<b>0.90</b>	<b>1.09</b>	<b>0.91</b>	<b>0.20</b>	<b>0.14</b>	<b>1.89</b>
OCKO, S <sub>r</sub> (A)	<b>0.27</b>	<b>0.24</b>	<b>0.10</b>	<b>0.12</b>	<b>0.09</b>	<b>0.09</b>	<b>0.09</b>	<b>0.07</b>	<b>0.05</b>	<b>0.12</b>
Tenax TA 3 мЛ	2.21	3.85	31.66	7.06	19.23	14.97	5.27	3.32	2.56	9.87
Tenax TA 3 мЛ	2.52	5.68	37.74	5.58	11.91	10.6	7.73	2.59	2.57	13.08
Tenax TA 3 мЛ	2.09	5.35	42.6	5.58	11.3	11.59	6.6	2.13	2.13	10.63
Tenax TA 3 мЛ	2.13	4.96	38.55	6.18	15.13	10.58	6.25	2.67	2.04	11.51
Tenax TA 3 мЛ	2.64	5.85	39.17	5.84	14.35	10.37	6.71	2.43	2.28	10.36
$\bar{A} \pm \Delta, \%$ n=5, P=0.95	<b>2.32</b> ± <b>0.31</b>	<b>5.14</b> ± <b>0.99</b>	<b>37.94</b> ± <b>4.94</b>	<b>6.05</b> ± <b>0.77</b>	<b>14.38</b> ± <b>3.92</b>	<b>11.62</b> ± <b>2.40</b>	<b>6.51</b> ± <b>1.10</b>	<b>2.63</b> ± <b>0.55</b>	<b>2.32</b> ± <b>0.30</b>	<b>11.09</b> ± <b>1.57</b>

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<b>СКО, <math>S(A)</math>, %</b>	<b>0.25</b>	<b>0.80</b>	<b>3.97</b>	<b>0.62</b>	<b>3.15</b>	<b>1.93</b>	<b>0.89</b>	<b>0.44</b>	<b>0.24</b>	<b>1.26</b>
<b>ОСКО, <math>S_r(A)</math></b>	<b>0.11</b>	<b>0.16</b>	<b>0.10</b>	<b>0.10</b>	<b>0.22</b>	<b>0.17</b>	<b>0.14</b>	<b>0.17</b>	<b>0.10</b>	<b>0.11</b>
Tenax TA 5 мл	3.22	7.8	23.96	4.69	11.78	11.26	8.99	3.93	3.66	20.71
Tenax TA 5 мл	3.14	6.88	25.74	4.94	11.18	12.55	8.73	3.41	3.41	20.02
Tenax TA 5 мл	3.19	7.25	24.61	4.73	11.56	12.31	8.69	3.99	3.85	19.82
Tenax TA 5 мл	3.69	6.15	24.33	5.01	11.75	12.69	9.01	3.64	4.11	19.62
Tenax TA 5 мл	2.99	6.58	23.96	5.42	11.95	12.83	9.24	3.39	3.81	19.83
$\bar{A} \pm \Delta$ , %	<b>3.25</b>	<b>6.93</b>	<b>24.52</b>	<b>4.96</b>	<b>11.64</b>	<b>12.33</b>	<b>8.93</b>	<b>3.67</b>	<b>3.77</b>	<b>20.01</b>
$n=5, P=0.95$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$
<b>СКО, <math>S(A)</math>, %</b>	<b>0.26</b>	<b>0.63</b>	<b>0.73</b>	<b>0.29</b>	<b>0.29</b>	<b>0.63</b>	<b>0.23</b>	<b>0.28</b>	<b>0.26</b>	<b>0.42</b>
<b>ОСКО, <math>S_r(A)</math></b>	<b>0.08</b>	<b>0.09</b>	<b>0.03</b>	<b>0.06</b>	<b>0.03</b>	<b>0.05</b>	<b>0.03</b>	<b>0.08</b>	<b>0.07</b>	<b>0.02</b>

Для установления связи между хроматографическими профилями, полученными после термодесорбции, данные по соотношению наиболее интенсивных пиков, приведенные в таблице 25, были обработаны методом главных компонент (рис. 21). Как видно из представленного графика, группировки данных наблюдаются по величине объема концентрирования.

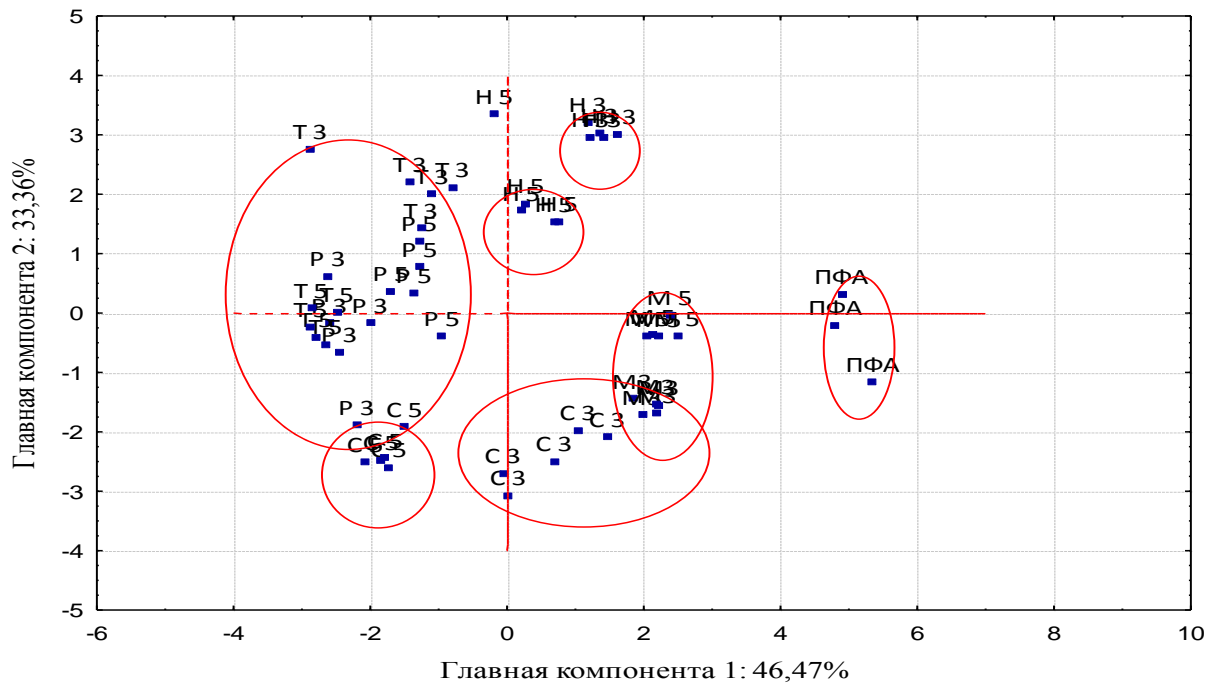


Рисунок 21 – График данных по соотношению компонентов при ТФМЭ ЛОС «ромашки аптечной» в координатах главных компонент 1 и 2. (ПФА – прямой ПФА газового экстракта; С – ТФМЭ на Carborack B; Т – ТФМЭ на Tenax TA; Р – ТФМЭ на Porapak Q; М – ТФМЭ на MN-202; Н – ТФМЭ на Naue Sep N. Цифровое обозначение указывает на величину объема газового экстракта при ТФМЭ).

Группа проб ПФА расположена отдельно от результатов ТФМЭ, что подтверждает выводы, сделанные при визуальном сравнении хроматограмм и оценки соотношения компонентов. Ближе всего к ПФА находятся пробы, полученные при ТФМЭ 3 и 5 см<sup>3</sup> газового экстракта на MN-202 и 3 см<sup>3</sup> на Carborack B. Кроме этого общую группу образуют пробы,

соответствующие концентрированию 3 и 5 см<sup>3</sup> газового экстракта на Tenax TA и Porapak Q. Таким образом, несмотря на то, что объем до проскока для Tenax TA был превышен при проведении ТФМЭ, хроматографический спектр, полученный при ТФМЭ 3 и 5 см<sup>3</sup> газового экстракта «ромашки аптечной» с последующей термодесорбцией, практически совпадает с хроматографическим спектром, полученным при ТФМЭ на Porapak Q, но отличается от хроматографического спектра, полученного при ПФА.

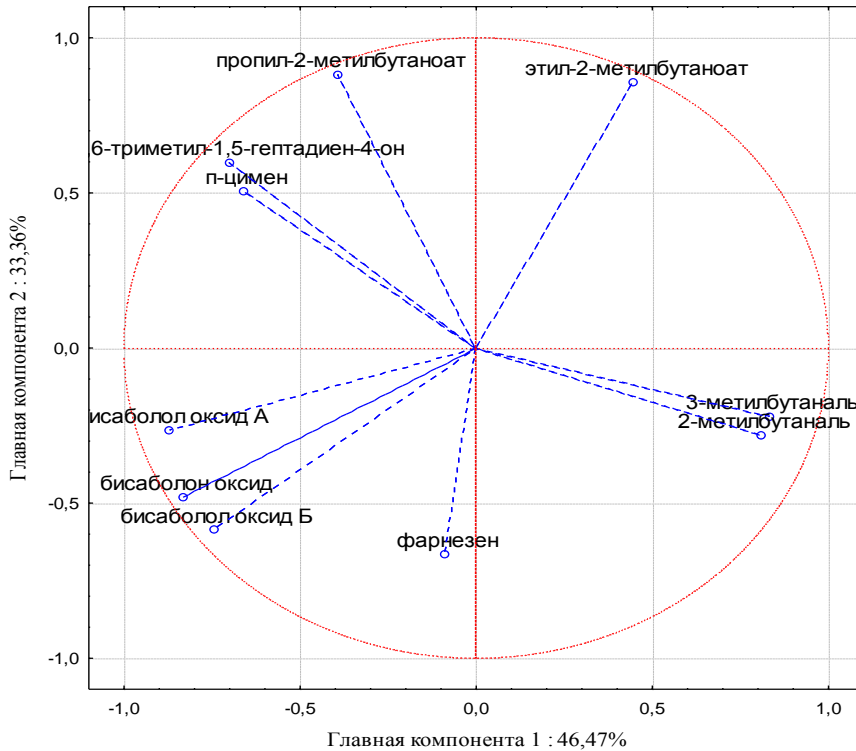


Рисунок 22 – График нагрузок соотношения компонентов при ТФМЭ ЛОС «ромашки аптечной».

График нагрузок (рис. 22) показывает, что на группировку данных М3, М5 и ПФА большое влияние оказывает содержание 3-метилбутанала и 2-метилбутанала, С 3 – содержание фарнезена, С 5 – бисаболон оксидов А и Б, а также бисаболон оксида, Т 3, Т 5, Р 3 и Р 5 – содержание п-цимена, артемизия кетона и пропил-2метилбутаноата.

Поскольку при ТФМЭ ЛОС «ромашки аптечной» не воспроизводится хроматографический спектр, полученный при ПФА, а результаты группируются в зависимости от использованного сорбента и объема концентрирования, то для изготовления образцов состава ЛОС «ромашки аптечной» можно использовать все изучаемые сорбенты: Tenax TA, Porapak Q, Carborack B, MN-202 и HayeSepN, взаимозаменяемыми в случае ЛОС «ромашки аптечной» могут быть Tenax TA и Porapak Q. Учитывая наименьшую величину ОСКО при ТФМЭ для сорбентов MN-202 и Haye Sep N рекомендуемый объем газового экстракта для концентрирования составляет 3 см<sup>3</sup>, а для сорбентов Tenax TA, Porapak Q и Carborack B – 5 см<sup>3</sup>.



Таблица 26 – Оценка срока хранения сорбционных микротрубок с аналитами.

Вид ЛОС	Вещество	Сроки десорбции	Концентрация компонентов в пробе после термодесорбции $\bar{x} \pm \Delta$ , n=5, P=0.95, мкг/см <sup>3</sup>				
			MN-202	HayeSep N	Porapak Q	Tenax TA	Carbopack B
ЛОС «эвкалипта прутовидного»	$\alpha$ -пинен	Сразу после ТФМЭ	1.06±0.07	0.94±0.04	2.11±0.06	-	-
		Через 6 месяцев	1.00±0.05	0.88±0.03	2.04±0.05	-	-
		Через 12 месяцев	0.96±0.05	0.89±0.03	1.96±0.09	-	-
	<i>n</i> -цимен	Сразу после ТФМЭ	0.38±0.03	0.42±0.02	0.41±0.02	-	-
		Через 6 месяцев	0.35±0.02	0.40±0.02	0.39±0.02	-	-
		Через 12 месяцев	0.37±0.02	0.39±0.03	0.40±0.02	-	-
	1,8-цинеол	Сразу после ТФМЭ	2.29±0.05	2.92±0.07	4.01±0.11	-	-
		Через 6 месяцев	2.17±0.06	2.73±0.07	3.95±0.09	-	-
		Через 12 месяцев	2.15±0.05	2.65±0.06	3.99±0.12	-	-
ЛОС «ромашки аптечной»	$\beta$ -фарнезен	Сразу после ТФМЭ	0.71±0.04	1.54±0.03	0.48±0.07	0.21±0.02	3.87±0.08
		Через 6 месяцев	0.72±0.03	1.53±0.05	0.49±0.03	0.21±0.02	3.86±0.08
		Через 12 месяцев	0.69±0.03	1.45±0.03	0.51±0.04	0.22±0.02	3.85±0.07
	Бисаболол оксид А	Сразу после ТФМЭ	0.06±0.01	0.14±0.02	0.21±0.02	0.17±0.02	0.41±0.03
		Через 6 месяцев	0.07±0.01	0.14±0.02	0.22±0.02	0.18±0.02	0.41±0.03
		Через 12 месяцев	0.07±0.01	0.15±0.02	0.20±0.03	0.18±0.03	0.40±0.06

Одним из главных параметров оценки образцов состава ЛОС ЛР на основе сорбционных микротрубок является срок хранения сорбционных микротрубок со сконцентрированными на них ЛОС «эвкалипта прутовидного» и «ромашки аптечной». Для ЛОС «эвкалипта прутовидного» использовали только HayeSepN, MN 202 и Porapak Q, поскольку при их использовании для ТФМЭ воспроизводится характерный хроматографический профиль, а для ЛОС «ромашки аптечной» – все изучаемые сорбенты. В литературе описаны исследования, демонстрирующие удовлетворительные результаты при сроках хранения аналитов на сорбционных трубках до 25 месяцев [83]. Для установления срока хранения сорбционных микротрубок с ЛОС «эвкалипта прутовидного» и «ромашки аптечной» был проведен контроль содержания  $\alpha$ -пинена, *n*-цимена, 1,8-цинеола,  $\beta$ -фарнезена и бисаболол оксида А с периодичностью 3 месяца в течение 1 года (табл. 26). Изменение концентрации  $\alpha$ -пинена, *n*-

цимена, 1,8-цинеола,  $\beta$ -фарнезена и бисаболол оксида А находится в пределах 5-10%, что укладывается в величину ОСКО определения концентрации данных компонентов при ТФМЭ.

### **Выводы.**

В результате исследования подтверждена возможность использования сорбционных микротрубок на основе инъекционных игл в качестве образцов состава ЛОС «эвкалипта прутовидного» и «ромашки аптечной».

ТФМЭ на Haye Sep N, MN-202 и Porapak Q дополняет картину, полученную при ПФА, усиливая достоверность общего образа листьев «эвкалипта прутовидного», поэтому данные сорбенты являются наиболее предпочтительными для ЛОС «эвкалипта прутовидного». Объем газового экстракта для ТФМЭ составляет 3 мл.

Для концентрирования ЛОС «ромашки аптечной» рекомендуется применять Haye Sep N, MN 202, Porapak Q, Carborack B и Tenax TA при объеме концентрирования газового экстракта 3 и 5 см<sup>3</sup>, но предпочтение нужно отдать Porapak Q, поскольку он показывает лучшие результаты по сорбции-десорбции ЛОС. Взаимозаменяемыми могут быть Porapak Q и Tenax TA. Использование рассматриваемых сорбентов для ТФМЭ ЛОС цветов «ромашки аптечной» с последующей термодесорбцией, дает индивидуальный хроматографический спектр, может рассматриваться в качестве общего образа «ромашки аптечной» только с привязкой к конкретному сорбенту и конкретной партии ЛР. На данный момент срок хранения сорбционных микротрубок с ЛОС «ромашки аптечной» и «эвкалипта прутовидного» составляет 12 месяцев.

**ГЛАВА 4.**  
**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ КОМПОНЕНТОВ В ЖИДКИХ**  
**ЭКСТРАКТАХ ЛИСТЬЕВ «ЭВКАЛИПТА ПРУТОВИДНОГО» И ЦВЕТОВ «РОМАШКИ**  
**АПТЕЧНОЙ» ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ОБЩЕГО ОБРАЗА ОБЪЕКТА**

В ряде случаев парофазного анализа недостаточно для получения общего образа объекта растительного происхождения, поэтому для создания набора характеристик рассматриваемых растений были изучены различные способы жидкостной экстракции: традиционные, а также экстракция горячими растворителями при повышенном давлении.

Оценка эффективности экстракции оценивалась по величине сухого остатка, числу и интенсивности зон поглощения на УФ- и ИК-спектре, а также по концентрации некоторых компонентов в полученных экстрактах.

**Внешний вид экстрактов.** Экстракты «л эвкалипта прутовидного», приготовленные традиционными способами – водный отвар и экстракт 70% раствором этанола в воде, были прозрачные, желто-коричневого цвета и имели характерный «цинеольный» запах. Экстракты «эвкалипта прутовидного», полученные при повышенной температуре и давлении имели преимущественно коричневую окраску. В ЭЭ 70% 200°C 5 МПа в первых трех фракциях присутствует коллоидная взвесь зеленого цвета, а первые 6 фракций имели зеленый оттенок (рис. 23).

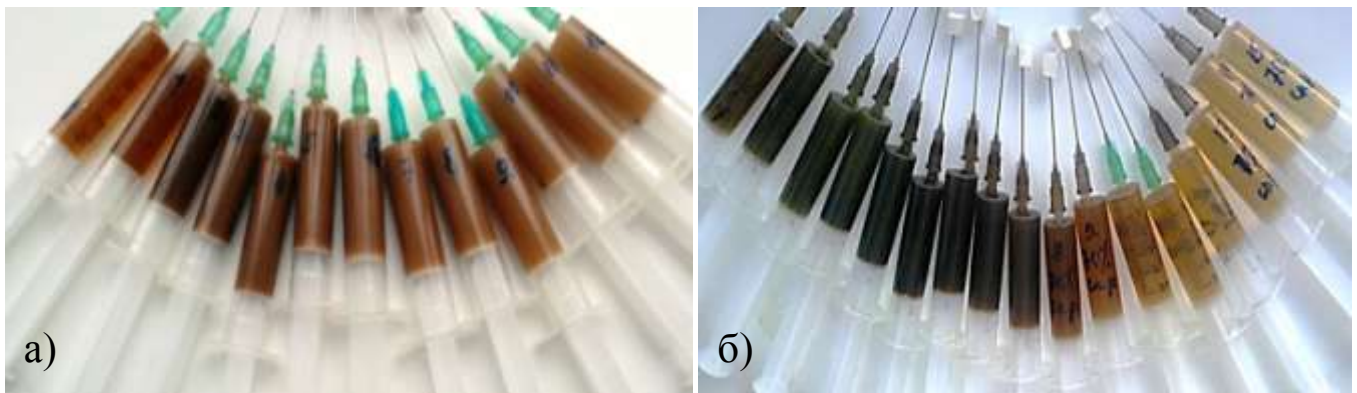


Рисунок 23 – Внешний вид экстрактов «эвкалипта прутовидного»: а) ЭСВ 200°C 5 МПа; б) ЭЭ 70% 200°C 5 МПа.

Экстракты «ромашки аптечной», приготовленные традиционными способами – водный отвар и экстракты 50% и 70% раствором этанола в воде, были прозрачные, желтого цвета и имели характерный «ромашковый» запах. Экстракты, полученные при 150°C и давлении 5 МПа, были ярко желтыми и также имели характерный ромашковый запах, полученные при 200°C имели преимущественно желто-коричневую окраску. В ЭЭ 70% 150 и 200°C 5 МПа присутствует взвесь зеленого цвета. При использовании в качестве экстрагента 50% водно-этанольного раствора при повышенном давлении и температуре после 10 мл пропущенного

экстрагента, экстракты выходят желеобразные, далее после 25 мл экстрагента опять становятся жидкими (рис. 24).

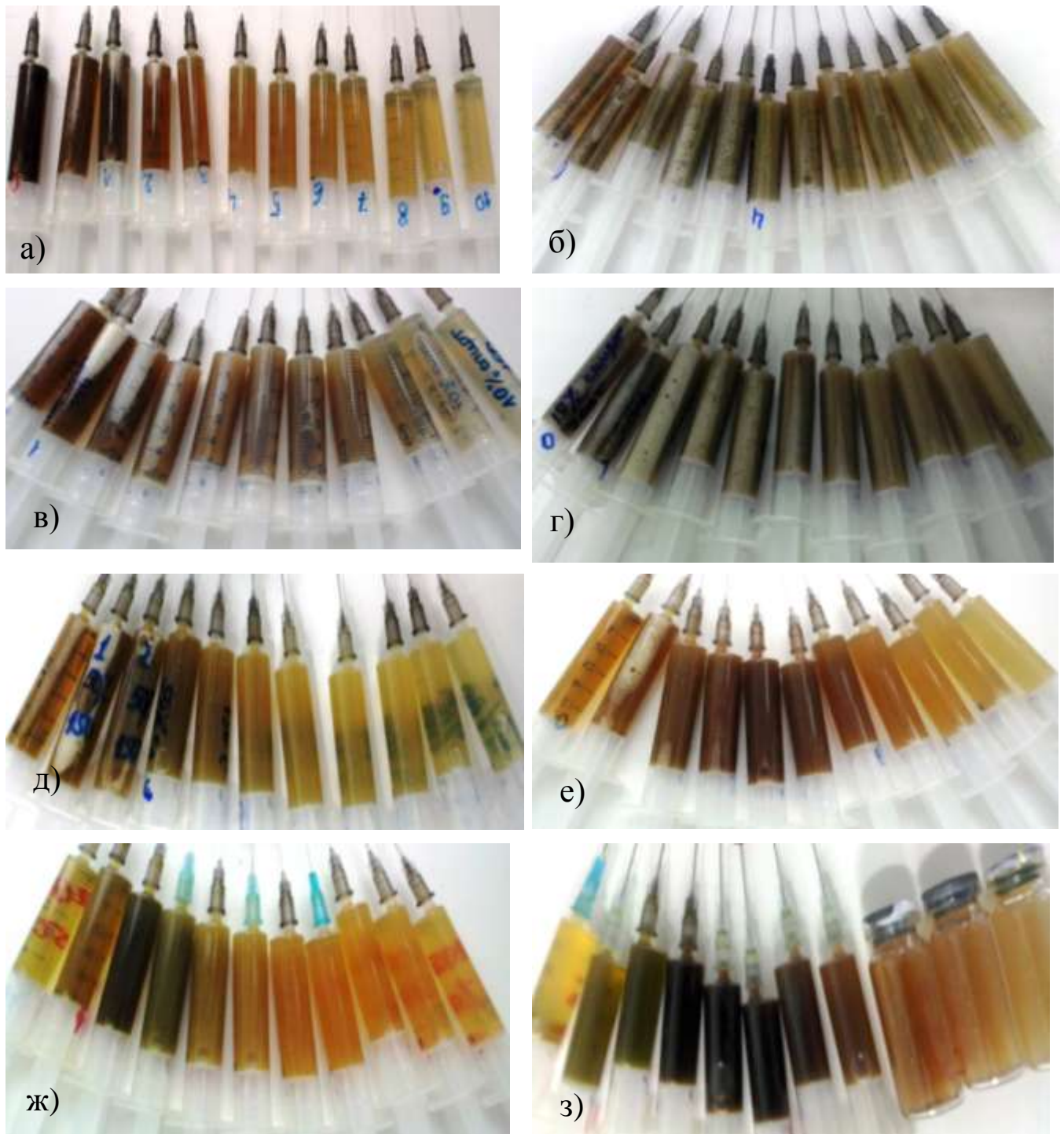


Рисунок 24 – Внешний вид экстрактов «ромашки аптечной»: а) ЭСВ 150°C 5 МПа; б) ЭСВ 200°C 5 МПа; в) ЭЭ 50% 150°C 5 МПа; г) ЭЭ 50% 200°C 5 МПа; д) ЭЭ 10% 150°C 5 МПа; е) ЭЭ 10% 200°C 5 МПа; ж) ЭЭ 70% 150°C 5 МПа; з) ЭЭ 70% 200°C 5 МПа.

При проведении экстракции субкритической водой в динамическом режиме было отмечено, что первые три фракции были прозрачные, а фракция № 4 и последующие – мутные, вероятно представляли собой коллоидные растворы, поскольку фильтрование через

мембранный фильтр с размером пор 0.45 мкм не избавляло от взвеси. Растворы становились прозрачными только при добавлении этилового спирта, что свидетельствует об извлечении органических соединений, нерастворимых в воде при стандартных условиях.

Пробы экстрактов по мере увеличения количества пропущенного экстрагента становились светлее, а после 50 см<sup>3</sup> экстрагента – прозрачными.

#### 4.1. Оценка сухого остатка.

Общее количество нелетучих БАС в полученных экстрактах оценивалось по величине сухого остатка.

Таблица 27 – Содержание сухого остатка в полученных экстрактах «эвкалипта прутовидного»

Вид экстракта	ЭСВ 120 °С 5МПа	ЭСВ 160 °С 5МПа	ЭСВ 200 °С 5МПа	ЭЭ 10% 200°С 5МПа	ЭЭ 50% 200°С 5МПа	ЭЭ 70% 200°С 5МПа	ЭЭ 70% 25 °С 0.1МПа	ЭВ 95 °С 0.1МПа
Абсолютное содержание сухого остатка, $\bar{x} \pm \Delta$ , n=5, P=0.95, г	0.25± 0.01	0.36± 0.01	1.16± 0.03	1.12± 0.03	1.17± 0.03	1.18± 0.03	1.11± 0.02	0.56± 0.01
СКО, $S(x)$ , г	0.01	0.01	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.01
ОСКО, $S_r(x)$	0.04	0.03	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
Относительное содержание сухого остатка, $\bar{w} \pm \Delta$ , n=5, P=0.95, %	11.2± 0.28	16.3± 0.41	52.9± 1.32	51.0± 1.27	53.0± 1.32	53.4± 1.33	44.7± 1.11	25.5± 0.63

В таблице 27 представлены абсолютные значения сухого остатка экстрактов листьев «эвкалипта прутовидного» и относительные – в % относительно воздушно-сухого растительного сырья. Как видно из полученных данных, при использовании воды в субкритическом состоянии в качестве экстрагента значительное увеличение доли экстрагируемых веществ наблюдается с ростом температуры. В интервале температур 120°С – 160°С количество извлекаемых веществ изменяется незначительно, однако при повышении температуры экстракции до 200°С их количество резко возрастает и становится сопоставимо с содержанием в ЭЭ, полученном при температуре 200°С и давлении 5 МПа. Данный факт можно объяснить изменением физико-химических свойств воды в субкритическом состоянии: при повышении температуры и давления у воды изменяется вязкость, диэлектрическая проницаемость и другие физико-химические параметры, при этом вода приобретает свойства, сходные с органическими растворителями. Также видно, что количество экстрагируемого вещества при 120°С и 160°С меньше, чем при экстракции водой при атмосферном давлении и температуре порядка 95°С, что объясняется более продолжительным временем контакта растительного сырья и экстрагента в случае традиционного способа экстракции, чем при

экстракции в динамическом режиме, к тому же, при температурах 120°C и 160°C и повышенном давлении свойства воды незначительно отличаются от показателей при нормальных условиях (рис. 1).

Содержание сухого остатка в экстрактах «ромашки аптечной» в абсолютной величине и в % относительно воздушно-сухого растительного сырья представлено в таблице 28.

Таблица 28 – Содержание сухого остатка в экстрактах «ромашки аптечной»

Вид экстракта	ЭСВ 150°C 5 МПа	ЭСВ 200°C 5 МПа	ЭЭ 10% 150°C 5 МПа	ЭЭ 10% 200°C 5 МПа	ЭЭ 50% 150°C 5 МПа	ЭЭ 50% 200°C 5 МПа	ЭЭ 70% 150°C 5 МПа	ЭЭ 70% 200°C 5 МПа	ЭВ 95°C 0.1 МПа	ЭЭ 50% 25°C 0.1 МПа	ЭЭ 70% 25°C 0.1 МПа
Абсолютное содержание сухого остатка, $\bar{x} \pm \Delta$ , n=5, P=0.95, г	0.60 ± 0.01	0.77 ± 0.02	0.70 ± 0.02	1.05 ± 0.03	0.89 ± 0.02	1.02 ± 0.03	0.75 ± 0.02	1.01 ± 0.03	0.28 ± 0.01	0.43 ± 0.01	0.42 ± 0.01
$S(x)$ , г	0.01	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.01	0.01	0.01
$S_r(x)$	0.01	0.03	0.03	0.02	0.02	0.02	0.03	0.02	0.04	0.02	0.02
Относительное содержание сухого остатка, $\bar{w} \pm \Delta$ , n=5, P=0.95, %	45.41 ± 1.13	57.56 ± 1.43	52.62 ± 1.31	78.76 ± 1.96	67.22 ± 1.67	76.28 ± 1.90	56.09 ± 1.39	76.05 ± 1.89	21.05 ± 0.52	32.33 ± 0.80	31.58 ± 0.79

В случае «ромашки аптечной» увеличение доли нелетучих БАС также наблюдается с ростом температуры. При температуре 150°C количество извлекаемых нелетучих БАС меньше для всех экстрагентов. При этом извлечение нелетучих БАС при ЭСВ 200°C 5 МПа превышает извлечение при ЭЭ 70% 150°C 5 МПа. Интересно, что достаточно 10% этанола, температуры 200°C и давления 5 МПа для максимального экстрагирования нелетучих БАС, дальнейшее увеличение концентрации этанола в экстрагенте не влияет на общее количество извлекаемых БАС. Однако наличие желеобразной составляющей в ЭЭ 50% 150, 200°C 5 МПа, говорит об экстракции новых компонентов, скорее всего полигликозидов. Следовательно, определяющим параметром максимального извлечения нелетучих БАС в является температура и модификация этанолом.

При сравнении доли извлеченных нелетучих БАС «эвкалипта прутовидного» и «ромашки аптечной» заметно, что при экстракции при повышенных температуре и давлении доля извлекаемых веществ выше у «ромашки аптечной», несмотря на то, что масса используемого для экстракции сырья была больше у образцов «эвкалипта прутовидного» (1.3 г против 2.2 г). Это связано со структурой изучаемого растительного сырья. Образцы листьев «эвкалипта прутовидного» представляют из себя плотные пластинки, в то время как цветы «ромашки аптечной» имеет рыхлую консистенцию. Стоит отметить тот факт, что при традиционных видах экстракции доля извлекаемых компонентов практически одинакова.

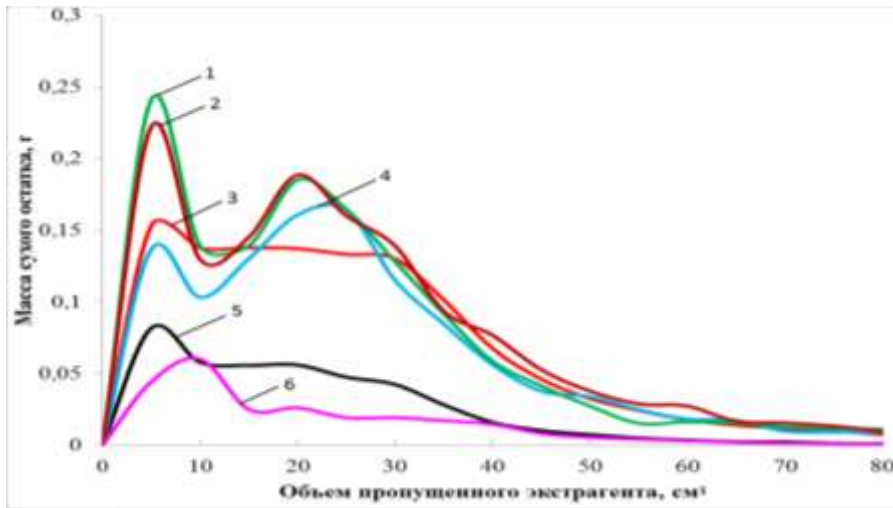


Рисунок 25 – Динамические кривые извлечения нелетучих БАС «эвкалипта прутовидного»: 1 – ЭЭ 50% 200°C 5 МПа; 2 – ЭЭ 70% 200°C 5 МПа; 3 – ЭСВ 200°C 5 МПа; 4 – ЭЭ 10% 200°C 5 МПа; 5 – ЭСВ 160°C 5 МПа; 6 – ЭСВ 120°C 5 МПа.

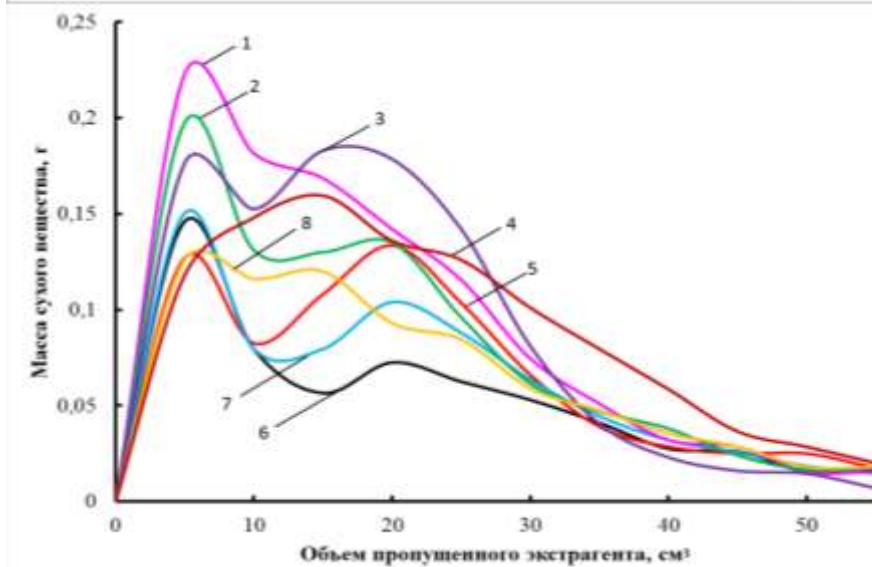


Рисунок 26 – Динамические кривые извлечения нелетучих БАС «ромашки аптечной»: 1 – ЭЭ 10% 200°C 5 МПа, 2 – ЭЭ 50% 150°C 5 МПа, 3 – ЭЭ 50% 200°C 5 МПа, 4 – ЭЭ 70% 200°C 5 МПа, 5 – ЭСВ 200°C 5 МПа, 6 – ЭСВ 150°C 5 МПа, 7 – ЭЭ 10% 150°C 5 МПа, 8 – ЭЭ 70% 150°C 5 МПа.

Сравнительная оценка результатов анализа сухого остатка каждой фракции полученных экстрактов (рис. 25, 26) показала, что практически полное извлечение компонентов наблюдается уже после прохождения 50 см<sup>3</sup> экстрагента, что существенно сокращает объем экстрагента, необходимого для извлечения БАС. Поэтому экстракция БАС «ромашки аптечной» была проведена 55 см<sup>3</sup> экстрагента. Также следует отметить, что извлечение веществ из ЛР происходит неравномерно, о чем свидетельствует наличие двух максимумов на динамических кривых. У экстрактов «эвкалипта прутовидного» второй максимум отмечается в извлечениях, полученных при 200°C. При этом общий вид кривых извлечения очень похож. Вероятно, это связано с качественным изменением извлекаемых БАС. Практически на всех кривых промежуточный минимум наблюдается после прохождения 10 см<sup>3</sup> экстрагента, только в ЭСВ 200°C 5 МПа «эвкалипта прутовидного» и в ЭСВ 150°C 5 МПа «ромашки аптечной» он обнаружен после прохождения 15 см<sup>3</sup> экстрагента, что объясняется свойствами экстрагента и извлекаемых соединений.

**Вывод.**

Исходя из величины сухого остатка полученных экстрактов, наиболее эффективное извлечение БАС «эвкалипта прутовидного» происходит при ЭСВ 200 °С 5 МПа, ЭЭ 50% 200°С 5 МПа, ЭЭ 70% 200°С 5 МПа, а для «ромашки аптечной» – при ЭЭ 10% 200°С 5 МПа, ЭЭ 50% 200°С 5 МПа, ЭЭ 70% 200°С 5 МПа.

#### **4.2. Характерные УФ- и ИК-спектры экстрактов цветов «ромашки аптечной» и листьев «эвкалипта прутовидного».**

Для предварительной оценки качественного состава полученных экстрактов были проведены спектроскопические исследования в УФ и ИК области.

Результаты исследования полученных экстрактов «эвкалипта прутовидного» методом УФ-спектрометрии представлены на рисунке 27, экстрактов «ромашки аптечной» – на рисунке 28. Экстракты «эвкалипта прутовидного» имеют характерные полосы поглощения при 210 нм, 254 нм, 280 нм, 370 нм. Экстракты «ромашки аптечной» имеют характерные полосы поглощения при 205 нм, 254 нм, 340 нм и 370 нм. Общий профиль УФ-спектра экстрактов «эвкалипта прутовидного» и УФ-спектра экстрактов «ромашки аптечной» практически совпадает, следовательно, можно говорить о похожих группах БАС, содержащихся в данных образцах. На УФ спектрах всех экстрактов имеются интенсивные полосы поглощения при длинах волн 205-220 нм, что говорит о присутствии в экстрактах пятичленных лактонов и флороглюциновых производных, ароматических соединений [5]. Также на спектрах присутствуют полосы поглощения в диапазоне 250 – 290 нм, что подтверждает наличие соединений ароматического ряда. Поглощение в области 270-280 нм свидетельствует о присутствии кумаринов и фенолоальдегидов. Также на УФ-спектрах экстрактов «эвкалипта прутовидного» имеется плечо в области 350 и 370 нм, что подтверждает присутствие вышеупомянутых соединений [5]. При анализе ЭЭ 70% 200°С 5МПа «листьев эвкалипта прутовидного» появляется полоса поглощения при 640-670 нм, свидетельствующая об извлечении хлорофилла [166]. При использовании других экстрагентов, поглощение в данной области отсутствует. Нужно отметить, что УФ-спектры этанольного экстракта, полученного при 25°С и давлении 0.1 МПа и экстракта, полученного в условиях субкритической воды при 200°С «эвкалипта прутовидного» практически совпадают, следовательно, состав извлеченных соединений одинаков.

Полученные УФ-спектры можно использовать в качестве дополнительной, а не основной характеристики «эвкалипта прутовидного» и «ромашки аптечной», т.к. существует много совпадений на УФ-спектрах. При этом для получения «УФ-фингерпринта» наиболее предпочтительны следующие виды экстрактов: для «эвкалипта прутовидного» – ЭЭ 70% 200°С



5 МПа; для «ромашки аптечной» – ЭЭ 50% и 70% 200°C 5 МПа, которые дают наиболее интенсивные полосы поглощения.

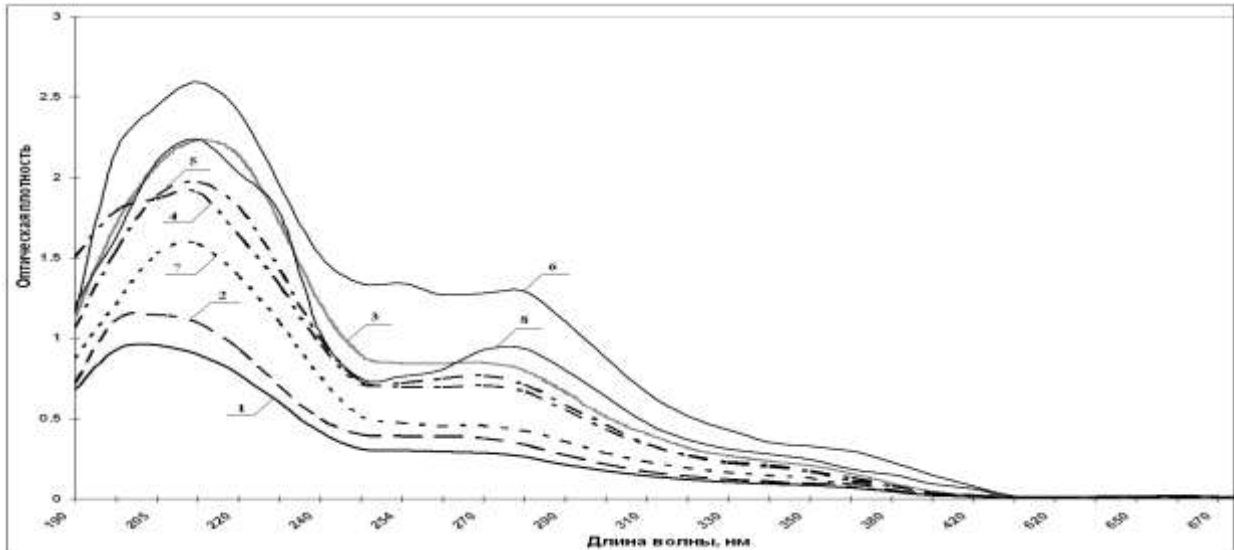


Рисунок 27 – УФ-спектры экстрактов «эвкалипта прутовидного»:

1 – ЭСВ 120°C 5 МПа; 2 – ЭСВ 160°C 5 МПа; 3 – ЭСВ 200°C 5 МПа; 4 – ЭЭ 10% 200°C 5 МПа; 5 – ЭЭ 50% 200°C 5 МПа; 6 – ЭЭ 70% 200°C 5 МПа; 7 – ВЭ 95°C 0.1 МПа; 8 – ЭЭ 70% 25°C 0.1 МПа.

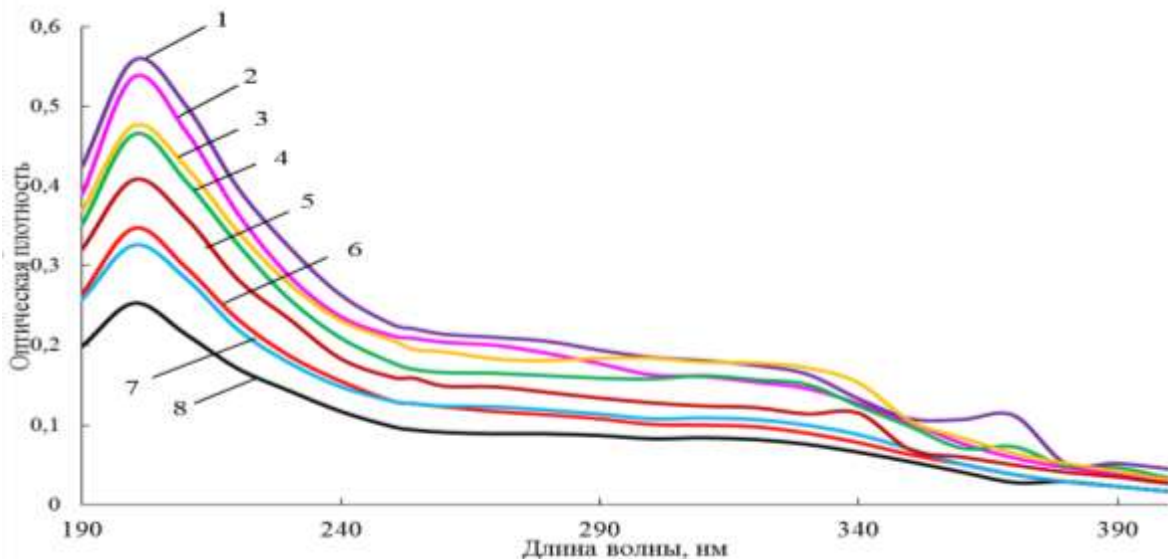


Рисунок 28 – УФ-спектры экстрактов «ромашки аптечной»: 1 – ЭЭ 50% 200°C 5 МПа, 2 – ЭЭ 10% 200°C 5 МПа, 3 – ЭЭ 70% 150°C 5 МПа, 4 – ЭЭ 50% 150°C 5 МПа, 5 – ЭЭ 70% 200°C 5 МПа, 6 – ЭСВ 200°C 5 МПа, 7 – ЭЭ 10% 150°C 5 МПа, 8 – ЭСВ 150°C 5 МПа.

На рисунке 29 представлены ИК-спектры ЭЭ 70% 200°C 5МПа «эвкалипта прутовидного» и ЭЭ 10% 200°C 5МПа «ромашки аптечной», как имеющие наиболее интенсивные полосы поглощения из полученных экстрактов. Спектры проб практически идентичны, за небольшим исключением в области  $1600 - 1300\text{см}^{-1}$ , однако спектр ЭЭ 70% 5 МПа «эвкалипта прутовидного» имеет более выраженные полосы поглощения, что свидетельствует о большей концентрации извлеченных соединений. В обоих пробах имеется

полоса поглощения с максимумом при  $3400\text{ см}^{-1}$ , указывающая на наличие соединений с фенольным гидроксильным. Это подтверждает и полоса поглощения  $1410\text{ см}^{-1}$ , соответствующая деформационным колебаниям связи гидроксильной группы в фенольных соединениях [166, 167]. В спектре ЭЭ присутствует плечо в области  $3010\text{ см}^{-1}$ , обусловленное колебаниями С-Н связи в ароматическом кольце в молекулах с алифатическими цепями. В то же время область поглощения  $3200 - 3500\text{ см}^{-1}$  указывает на содержание флавоноловых гликозидов, производных кверцетина. Это подтверждает область  $1114 - 1062\text{ см}^{-1}$ , в которой поглощают С-О связи гликозидов [168]. Область поглощения  $2950 - 2800\text{ см}^{-1}$  соответствует валентным колебаниям  $\text{CH}_3$ -,  $\text{CH}_2$ -групп [167]. Им соответствуют полосы поглощения  $1453\text{ см}^{-1}$  и  $1366\text{ см}^{-1}$ , которые относятся к деформационным колебаниям алифатических групп. Полосы поглощения  $1616\text{ см}^{-1}$  и  $1517\text{ см}^{-1}$  соответствуют валентным колебаниям связи С=С бензольного кольца. Полосы поглощения при  $1720\text{ см}^{-1}$  и  $1695\text{ см}^{-1}$  свидетельствуют о присутствии карбонильных групп, в области  $1238\text{ см}^{-1}$  – соответствуют деформационным колебаниям карбоксильных групп кислот. К тому же поглощение при  $1700 - 1750\text{ см}^{-1}$  и при  $1620 - 1470\text{ см}^{-1}$  характерно для кумаринов. Область поглощения  $1200 - 900\text{ см}^{-1}$  соответствует валентным колебаниям С-О связи в простых ароматических эфирах, что говорит о наличии в экстрактах соединений с метоксильными группами. Полосу поглощения при  $1645\text{ см}^{-1}$  можно отнести колебаниям карбонильной группы  $\gamma$ -пирона [166,167,168].

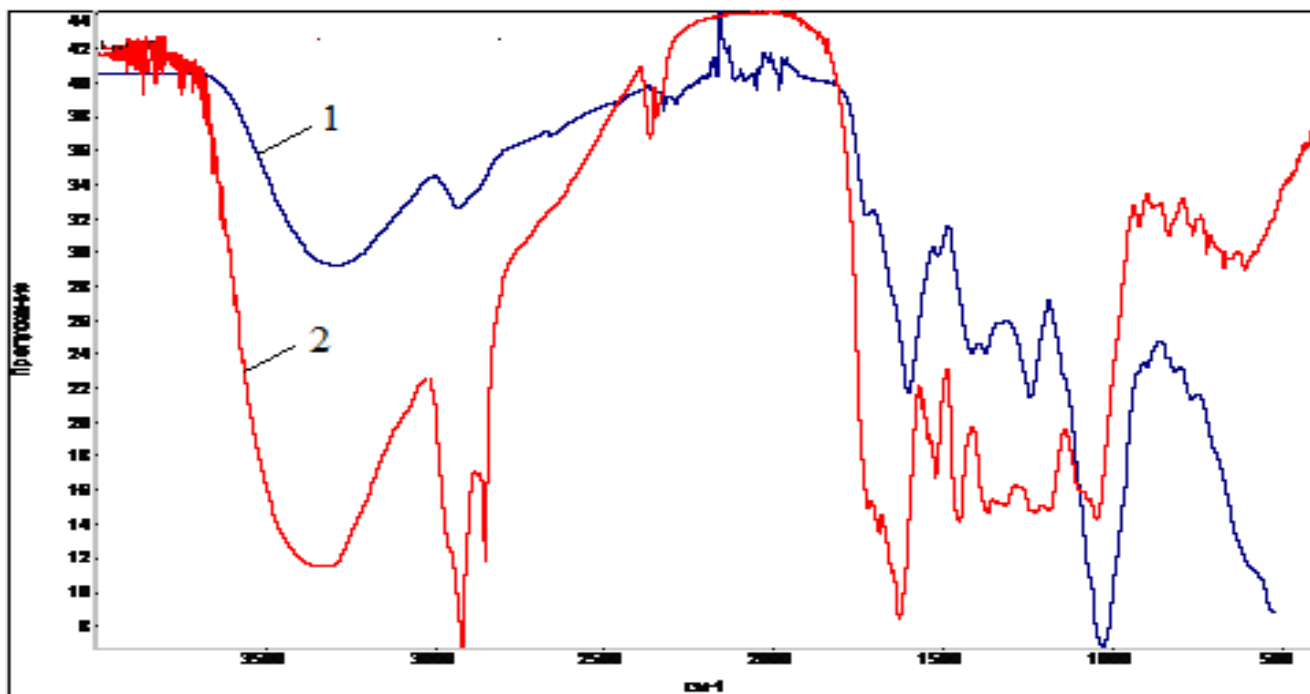


Рисунок 29 – Сравнение ИК-спектров сухого остатка ЭЭ 10%  $200^{\circ}\text{C}$  5 МПа «ромашки аптечной» – 1 и ЭЭ 70%  $200^{\circ}\text{C}$  5 МПа «эвкалипта прутовидного» – 2.

Исходя из представленных данных спектрометрического анализа, в экстрактах присутствуют фенолкарбоновые кислоты и их эфиры, фенолоальдегиды, флавоноиды и их гликозиды, кумарины.

**Вывод.**

ИК-спектры представляют собой «ИК-фингерпринт» «эвкалипта прутовидного» и «ромашки аптечной». ИК-спектры других растений уже входят в соответствующие базы данных, следовательно, давно используются в качестве «ИК-фингерпринта» соответствующего растительного сырья. Однако, из-за множества совпадений полос поглощения, полученные ИК-спектры, как и УФ-спектры, могут использоваться только в качестве дополнительной характеристики изучаемых ЛР.

**4.3. ВЭЖХ анализ экстрактов листьев «эвкалипта прутовидного»**

По результатам спектроскопических исследований экстрактов растительного сырья в УФ области, наиболее интенсивные полосы поглощения наблюдались при следующих длинах волн 210 нм, 254 нм, 278 нм, поэтому детектирование при проведении ВЭЖХ анализа осуществляли именно на этих длинах волн.

ВЭЖХ анализ осуществлялся при различных режимах элюирования. Были опробованы разные соотношения элюентов А и Б с детектирование при 210 нм, т.к. при данной длине волны поглощает наибольшее количество соединений. Установлено, что применение изократического режима элюирования – оптимально элюент А 20% – возможно только для экстрактов, полученных в среде субкритической воды при 120°C, 160 °C и давлении 5МПа (рис.30).

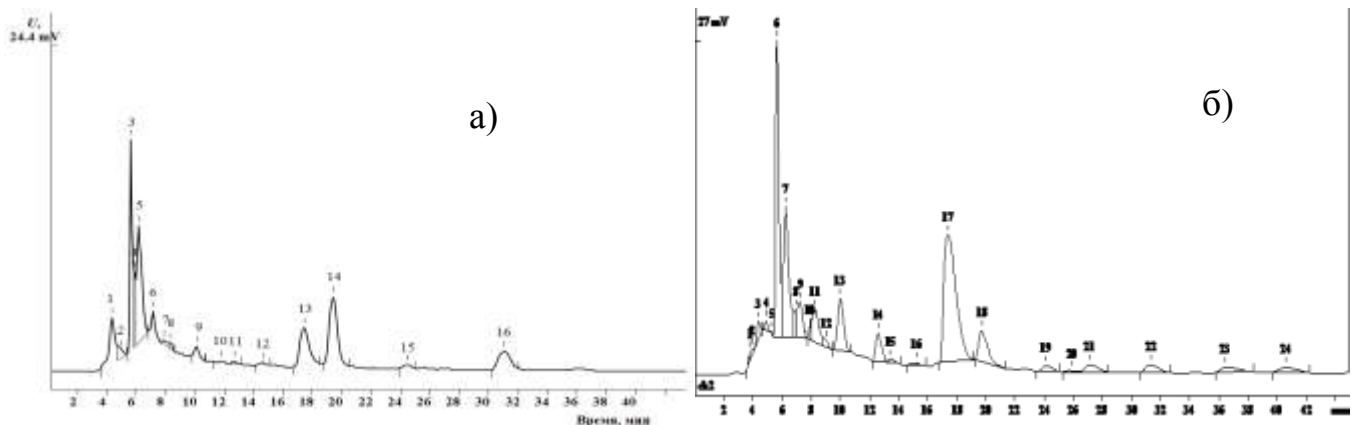


Рисунок 30 – Хроматограммы экстрактов эвкалипта прутовидного при градиентном режиме элюирования элюент А 20%: а) – ЭСВ 120°C 5 МПа; б) – ЭСВ 160°C 5 МПа.

Для разделения компонентов ЭСВ 200°C 5 МПа элюирование в изократическом режиме приводит либо к неполному выходу компонентов экстракта – при малой концентрации ацетонитрила, либо к появлению плохо разрешенных пиков на хроматограмме – при достаточном для элюирования всех компонентов экстракта содержании ацетонитрила в ПФ. Поэтому были опробованы различные режимы градиентного элюирования (рис. 31 – 33):

Режим № 1 – элюент А 20% -15мин; подъем до 40% за 10 мин, А 40% 10мин, подъем до 60% за 10 мин, А 60% 30 мин (рис. 31).

Режим № 2 – элюент А 10% - 5мин, подъем до 20% за 5мин, подъем до 30% за 5мин, подъем до 40% за 10 мин, А 40% - 5 мин, подъем до 60% за 10 мин, А 60% – 30 мин (рис. 32).

Режим № 3 – элюент А 10% - 10 мин, подъем до 20% за 10 мин, А 20% 10 мин, подъем до 30% за 10 мин, А 30% 10мин, подъем до 40% за 10 мин, 40% 10мин, подъем до 60 за 10 мин, 60% 20 мин (рис. 33).

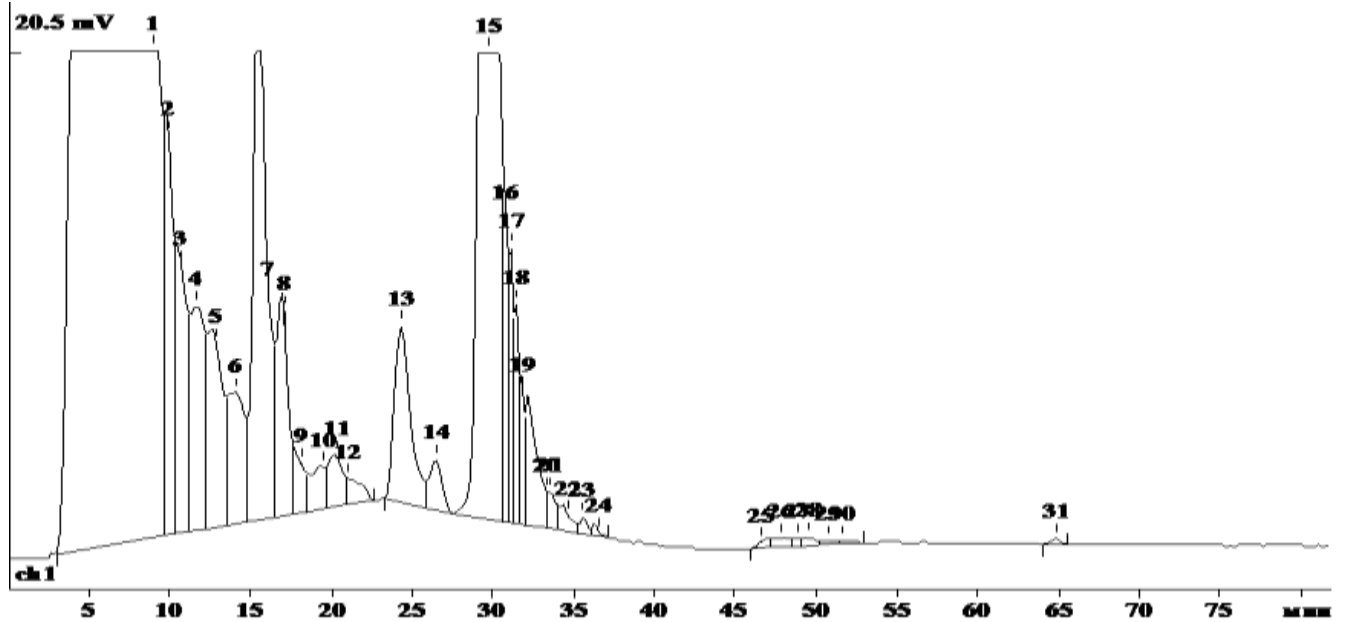


Рисунок 31 – ВЭЖХ анализ ЭСВ 200°С 5 МПа при режиме элюирования №1.

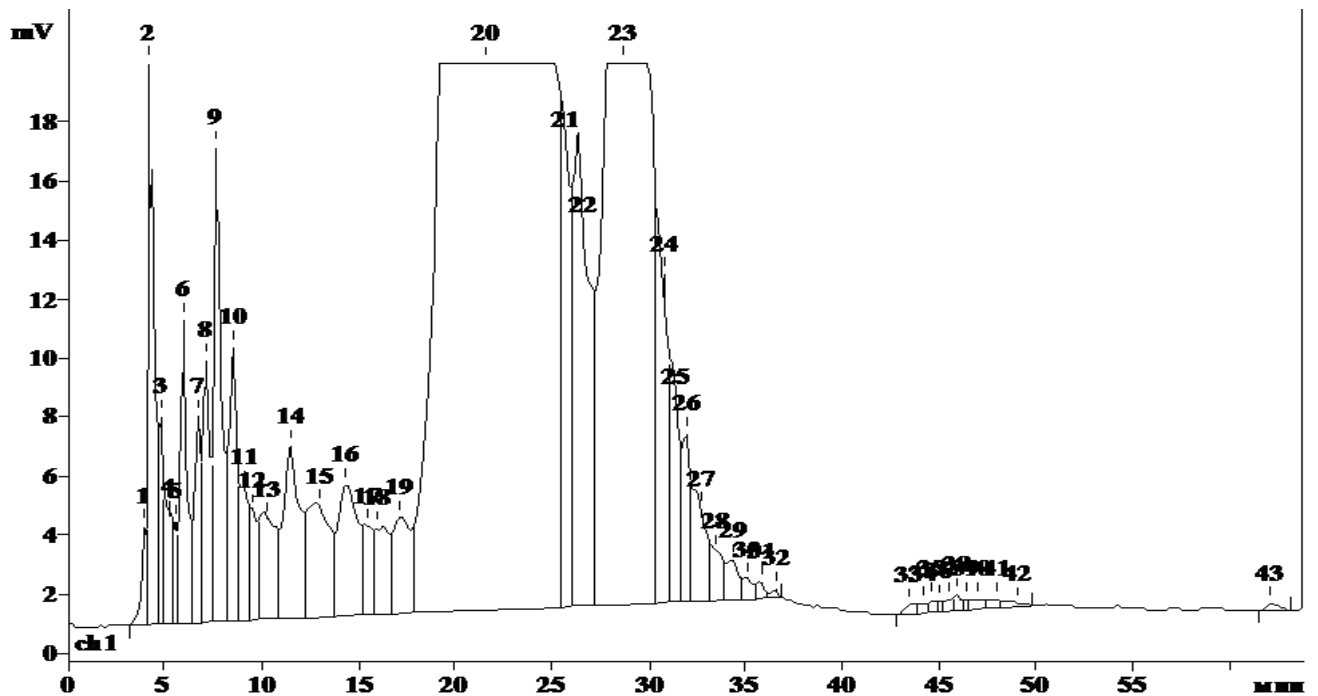


Рисунок 32 – ВЭЖХ анализ ЭСВ 200°С 5 МПа при режиме элюирования № 2

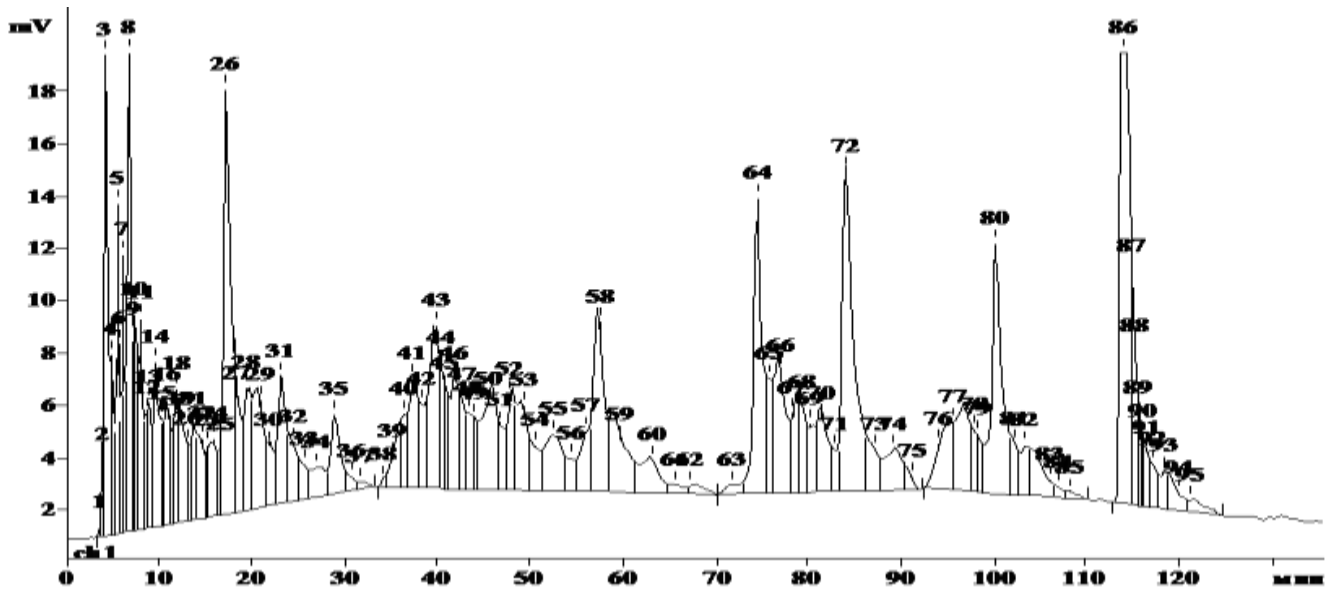


Рисунок 33 – ВЭЖХ анализ ЭСВ 200°C 5 МПа при режиме элюирования №3 при длине волны 210 нм.

В результате изучения различных режимов градиентного элюирования оптимальными признаны условия, представленные на рисунке 33. Однако одним из недостатков применения такого режима элюирования является большая продолжительность анализа – 2.5 часа. При этом, такой компонент, как эвкалимин, который представляет собой сумму фенолоальдегидов, элюируется со 130 по 170 минуты анализа (рис. 34). Повышение концентрации буферного раствора с 0.01 М до 0.03 М позволило добиться лучшего разрешения пиков, но при этом сильно увеличивается продолжительность анализа.

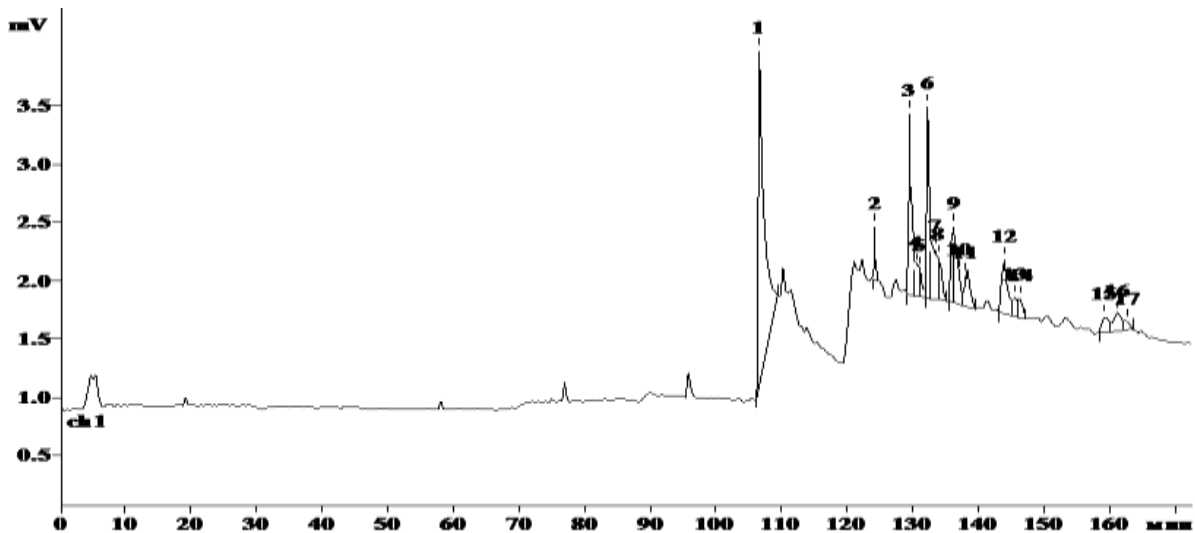


Рисунок 34 – Элюирование стандарта эвкалимина при режиме № 3.

Оценка эффективности извлечения физиологически активных компонентов «эвкалипта прутовидного» проводилась по содержанию эвкалимина, ВЭЖХ-анализ которого проводился при длине волны 278 нм [164] и режиме элюирования № 1, для сокращения времени анализа. При данном режиме элюирования хроматограммы экстрактов «эвкалипта прутовидного»,

полученных при длине волны 278 нм, практически идентичны и отличаются лишь интенсивностью отдельных пиков (рис.35).

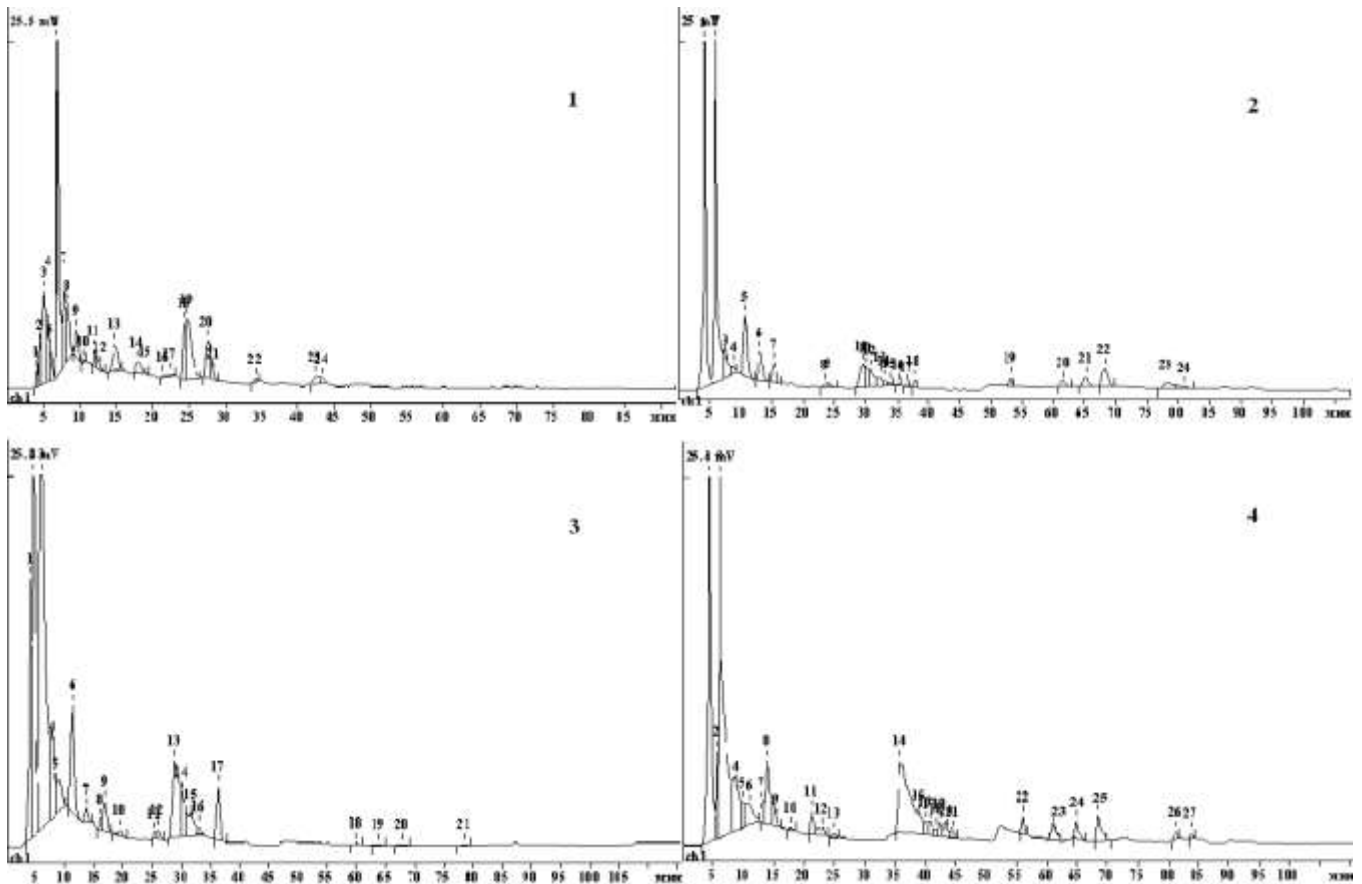


Рисунок 35 – Хроматограммы экстрактов при длине волны 278 нм и режиме элюирования №1: 1 – ВЭ 95°C 0.1 МПа; 2 – ЭЭ 70% 25°C 0.1 МПа; 3 – ЭСВ 200°C 5 МПа; 4 – ЭЭ 70% 200°C 5 МПа.

Стандарт эвкалимина является смесью фенолоадегидов, поэтому на хроматограмме представлено несколько пиков (рис. 34, 36). Для построения градуировочной характеристики использовали суммарную площадь пиков № 2 – 5. Систематическая погрешность определения эвкалимина определялась с использованием стандартного образца и составила 0.02.

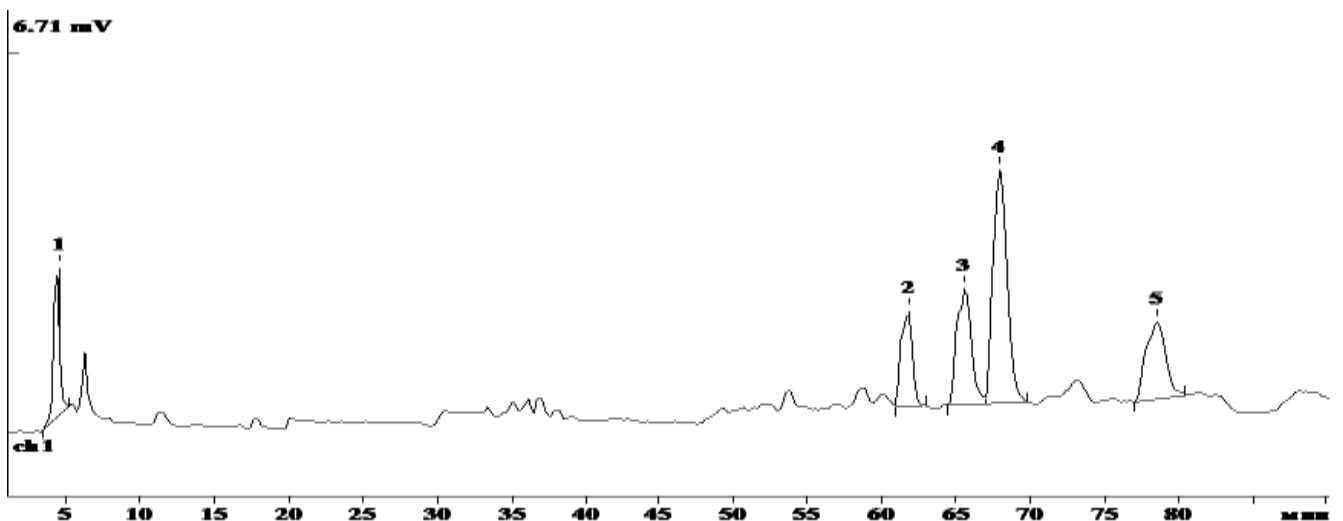


Рисунок 36 – Хроматограмма стандартного раствора эвкалимина при режиме элюирования №1.

Анализ полученных экстрактов показал, что эвкалимин отсутствует в ЭСВ, полученных при 120°C и 160 °C, в ЭВ при 95 °C. Концентрация эвкалимина в объединенных пробах полученных экстрактов эвкалимина представлено в таблице 29. Эвкалимин в обычных условиях не растворим в воде, умеренно растворим в 95% спирте. При повышенной температуре и давлении изменяются физические параметры воды, за счет этого увеличивается растворимость гидрофобных компонентов, что способствовало извлечению эвкалимина с помощью воды при 200°C 5 МПа, в количествах, сопоставимых с его содержанием в ЭЭ 10% 200°C 5 МПа. При повышении концентрации этанола в экстрагенте закономерно и увеличивается концентрация извлекаемого эвкалимина.

Таблица 29 – Содержание эвкалимина в полученных экстрактах

Вид экстракта	ЭСВ 200 °C 5МПа	ЭЭ 10% 200°C 5МПа	ЭЭ 50% 200°C 5МПа	ЭЭ 70% 200°C 5МПа	ЭЭ 70% 25 °C 0.1 МПа
Концентрация эвкалимина, $X \pm \Delta$ , $n=5, P=0.95, \text{мг/см}^3$	0.35±0.04	0.39±0.04	1.14±0.05	2.14±0.08	1.71±0.06
СКО, $S(x)$ , $\text{мг/см}^3$	0.03	0.03	0.04	0.06	0.05
ОСКО, $S_r(x)$	0.09	0.08	0.04	0.03	0.03

Динамические кривые извлечения эвкалимина представленные на рисунке 37, показывают, что при увеличении содержания этанола в экстрагенте максимум извлечения смещается в начало процесса экстракции. При ЭЭ 50%200°C 5 МПа и ЭЭ 70%200°C 5 МПа максимальное извлечения приходится на вторую фракцию, которая соответствует 10 см<sup>3</sup> экстрагента (6 мин экстракции), а при ЭСВ 200°C 5 МПа и ЭЭ 10%200°C 5 МПа максимальное извлечение эвкалимина соответствует 4 фракции (12 мин экстракции). При ЭСВ200°C 5 МПа ЭЭ 10% и 50%200°C 5 МПа практически весь эвкалимин извлекается после прохождения 40 см<sup>3</sup> экстрагента соответственно, в то время как при ЭЭ 70%200°C 5 МПа эвкалимин присутствует в пробах практически до конца экстракции. Такое различие в динамике извлечения эвкалимина связано с изменением экстракционных свойств растворителя при повышенной температуре и давлении.

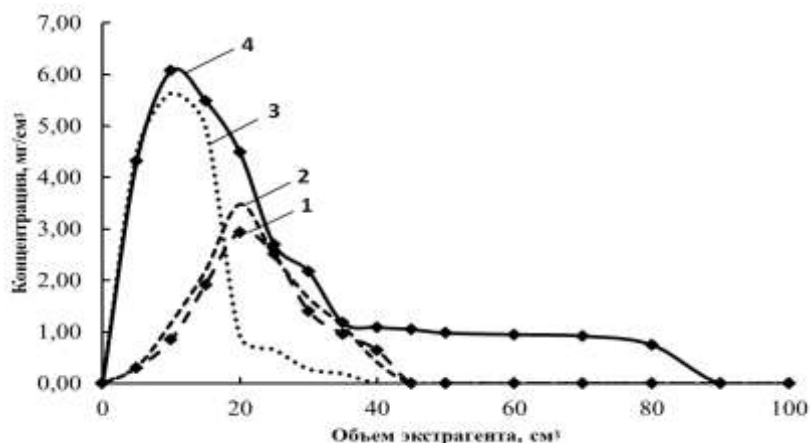


Рисунок 37 – Динамические кривые экстракции эвкалимина:

- 1 – ЭСВ 200°C 5 МПа;
- 2 – ЭЭ 10% 200°C 5 МПа;
- 3 – ЭЭ 50% 200°C 5 МПа;
- 4 – ЭЭ 70% 200°C 5 МПа.

**Вывод.**

Исходя из вышесказанного, для получения общего образа объекта в виде ВЭЖХ-хроматографического спектра «эвкалипта прутовидного» рекомендуются следующий способ:

Экстракция водой или 70% этанолом при температуре 200°C и давлении 5 МПа в динамическом режиме.

Для анализа отбирается первые 5 см<sup>3</sup> экстракта, т.к. по полученным данным (анализ сухого остатка, пофракционный ВЭЖХ-анализ) содержит наибольшее число детектируемых соединений, следовательно, имеет большое число элементов сравнения.

Условия ВЭЖХ-анализа:

Длина волны 210 нм.

Колонка C<sub>18</sub> 250мм×4.6мм, зернение 5 мкм.

Подвижная фаза смесь ацетонитрила (элюент А) и 0,01 М фосфатного буферного раствора рН=3 (элюент Б)

Режим элюирования градиентный – элюент А 10% - 10 мин, подъем до 20% за 10 мин, А 20% 10 мин, подъем до 30% за 10 мин, А 30% 10мин, подъем до 40% за 10 мин, 40% 10мин, подъем до 60 за 10 мин, 60% 20 мин.

#### **4.4. ВЭЖХ-МС анализ экстрактов листьев «эвкалипта прутовидного»**

Анализ методом ВЭЖХ-МС проводили для ЭСВ 200 °С 5 МПа и ЭЭ 70% 200 °С 5 МПа. В результате было обнаружено порядка 200 компонентов в каждом экстракте (рис.38). На приведенных хроматограммах видно, что извлечение компонентов происходит эффективнее при использовании в качестве экстрагента 70% раствор этанола в воде. Идентификация проводилась с помощью программного обеспечения по точной молекулярной массе. Согласно литературным данным [151], если эуглобали имеют структуру ацилфлороглюцинол-монотерпен, молекулярный вес которого составляет 386, пик молекулярного иона имеет значение 387 [М + Н<sup>+</sup>], если структуру ацилфлороглюцин-сесквитерпен, молекулярны вес которого 454, то пик молекулярного иона имеет значение м/z 455[М + Н<sup>+</sup>]. По полученным значениям массы молекулярных ионов удалось идентифицировать только 23 компонента с вероятностью 90-100%, имеющие наиболее интенсивные пики на хроматограммах экстрактов. Идентификация проводилась с учетом данных [150]. Большинство веществ идентифицируется в обоих видах экстрактов, но, как правило, высота пиков компонентов на хроматограмме выше для ЭЭ 70% 200 °С 5 МПа (рис. 38, табл. 30). Такие компоненты как β-ситостерин, урсоловая кислота и эуглобаль сесквитерпен обнаружены только в ЭЭ 70% 200 °С 5 МПа. Аминокислоты, обнаруженные в экстрактах, имеют небольшую высоту пиков и не относятся к доминирующим компонентам. Такие компоненты как эвкалиптин и эуглобали согласно имеющимся данным



являются характерными компонентами листьев «эвкалипта прутовидного» относятся к физиологически активным соединениям [151, 152], поэтому могут использоваться в качестве соединений-маркеров для ЭЭ 70% 200 °С 5 МПа «листьев эвкалипта прутовидного» при идентификации по характерному хроматографическому профилю.

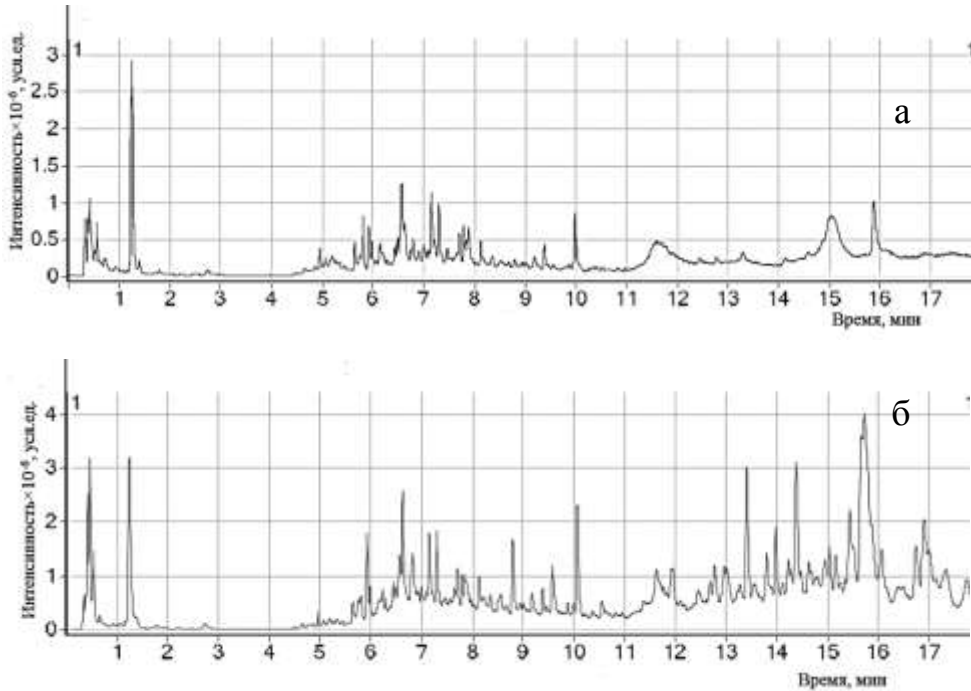


Рисунок 38 – ВЭЖХ-МС хроматограммы: а) ЭСВ 200 °С 5 МПа; б) ЭЭ 70% 200 °С 5 МПа.

Таблица 30 – Компоненты экстрактов «эвкалипта прутовидного», идентифицированные при ВЭЖХ-МС анализе

Время, мин	Определенная молекулярная масса, а.е.м.±0.1		Формула	Вещество	Высота пика	Вид экстракта
	По отрицательным ионам	По положительным ионам				
1	2	3	4	5	6	7
0.368	-	116.0706	$C_5H_{10}NO_2$	пролин	189045	ЭСВ
0.368	-	116.0706	$C_5H_{10}NO_2$	пролин	289045	ЭЭ
0.419	192.1222	-	$C_6H_8O_7$	лимонная кислота	1389022	ЭЭ
0.419	192.1222	-	$C_6H_8O_7$	лимонная кислота	464571	ЭСВ
0.474	134.0874	-	$C_4H_6O_5$	яблочная кислота	273688	ЭЭ
0.481	134.0874	-	$C_4H_6O_5$	яблочная кислота	38492	ЭСВ
1.16	-	76.0393	$C_2H_6NO_2$	глицин	65812	ЭСВ
1.16	-	76.0393	$C_2H_6NO_2$	глицин	34727	ЭЭ
1.236	169.1194	-	$C_7H_6O_5$	галловая кислота	1325132	ЭЭ
1.236	169.1194	-	$C_7H_6O_5$	галловая кислота	1208348	ЭСВ
1.243	125.1411	-	$C_2H_7NO_3S$	таурин	81236	ЭСВ
1.243	125.1411	-	$C_2H_7NO_3S$	таурин	77421	ЭЭ
1.256	-	90.0549	$C_3H_8NO_2$	аланин	114546	ЭСВ
1.256	-	90.0547	$C_3H_8NO_2$	аланин	94546	ЭСВ
1.365	-	106.0499	$C_3H_8NO_3$	серин	65432	ЭСВ
1.364	-	106.0498	$C_3H_8NO_3$	серин	51597	ЭЭ

1	2	3	4	5	6	7
3.321	-	134.0449	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> NO <sub>4</sub>	аспарагиновая кислота	294366	ЭСВ
3.322	-	134.0450	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> NO <sub>4</sub>	аспарагиновая кислота	94662	ЭЭ
4.245	-	132.1019	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> NO <sub>2</sub>	лейцин (изолейцин)	425631	ЭСВ
4.244	-	132.1019	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> NO <sub>2</sub>	лейцин (изолейцин)	129372	ЭЭ
5.74	-	166.0863	C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> NO <sub>2</sub>	фенилаланин	123349	ЭСВ
5.74	-	166.0863	C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> NO <sub>2</sub>	фенилаланин	106151	ЭЭ
5.92	192.1692	-	C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	хинная кислота	600192	ЭЭ
5.92	192.1692	-	C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	хинная кислота	246380	ЭСВ
5.926	-	162.1434	C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	умбеллиферон	430887	ЭЭ
5.926	-	162.1434	C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	умбеллиферон	165134	ЭСВ
5.979	354.1581	-	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	хлорогеновая кислота	209464	ЭСВ
5.981	354.1526	-	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	хлорогеновая кислота	191171	ЭЭ
6.433	192.0661	-	C <sub>10</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	скополетин	47854	ЭСВ
6.438	192.0657	-	C <sub>10</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	скополетин	124684	ЭЭ
6.354	-	340.4568	C <sub>19</sub> H <sub>32</sub> O <sub>5</sub>	эвкалиптин	444507	ЭЭ
6.354	-	340.4568	C <sub>19</sub> H <sub>32</sub> O <sub>5</sub>	эвкалиптин	38008	ЭСВ
6.638	386.1995	-	C <sub>23</sub> H <sub>30</sub> O <sub>5</sub>	эуглобаль монотерпен	100104	ЭЭ
6.638	386.2006	-	C <sub>23</sub> H <sub>30</sub> O <sub>5</sub>	эуглобаль монотерпен	48138	ЭСВ
6.913	-	414.713	C <sub>29</sub> H <sub>50</sub> O	β-ситостерин	1719923	ЭЭ
7.147	302.1974	-	C <sub>14</sub> H <sub>6</sub> O <sub>8</sub>	эллаговая кислота	1054551	ЭЭ
7.151	302.1974	-	C <sub>14</sub> H <sub>6</sub> O <sub>8</sub>	эллаговая кислота	701657	ЭСВ
10.065	-	180.0421	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	кофейная кислота	417440	ЭЭ
10.066	-	180.0421	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	кофейная кислота	35285	ЭЭ
15.681	454.6032	-	C <sub>28</sub> H <sub>38</sub> O <sub>5</sub>	эуглобаль сесквитерпен	1687016	ЭЭ
16.269	-	456.3607	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>3</sub>	урсоловая кислота	161854	ЭЭ

**Вывод.**

ВЭЖХ-МС анализ экстрактов листьев «эвкалипта прутовидного» показал, что доминирующими нелетучими БАС листьев «эвкалипта прутовидного» являются: фенольные кислоты: галловая кислота, хлорогеновая кислота, эллаговая кислота, кофейная кислота; а также хинная кислота, и терпеноиды: эуглобаль монотерпен, эуглобаль сесквитерпен, урсоловая кислота. Все обнаруженные нелетучие компоненты относятся к физиологически активным веществам.

При использовании ЭЭ 70% 200°C 5 МПа «эвкалипта прутовидного» для получения характерного хроматографического профиля, в качестве дополнительной идентификационной характеристики мы рекомендуем определение эвкалиптина, эуглобали монотерпена, эуглобали сесквитерпена.

**4.5. ГХ-МС анализ экстрактов листьев «эвкалипта прутовидного»**

Как показал ВЭЖХ анализ, полученные экстракты содержат множество соединений. Для изучения качественного состава нелетучих БАС в полученных экстрактах методом ГХ-МС была проведена дериватизация с помощью N,O-бис-(триметилсилил)-трифторацетамида (БСТФА). На рисунке 39 представлены хроматограммы, полученные после дериватизации ЭСВ 200°C 5 МПа, ЭЭ 70% 200°C 5 МПа, которые демонстрируют фрагментарное совпадение

анализируемых растворов, а также преобладающую интенсивность пиков на хроматограмме ЭЭ 70% 200°C 5 МПа. На хроматограмме ЭСВ 200°C 5 МПа группа пиков с временем удерживания 33 – 36 мин, соответствующая триконтановой кислоте,  $\beta$ -ситостеролу, а также соединениям подобным урсоловой или олеаноловой кислоте, точнее определить не удалось, присутствует на уровне фона, тогда как у ЭЭ 70% 200°C 5 МПа эти пики имеют значительную интенсивность.

Нужно отметить тот факт, что после дериватизации экстрактов, идентификация компонентов на полученных хроматограммах сильно затруднена присутствием большого количества сахаров, элюирующихся одновременно с фенольными кислотами. При анализе были испробованы различные варианты программирования температуры термостата колонок, но это только увеличивало время анализа, не улучшая разделения, поэтому был взят за основу режим, предложенный в работе [56].

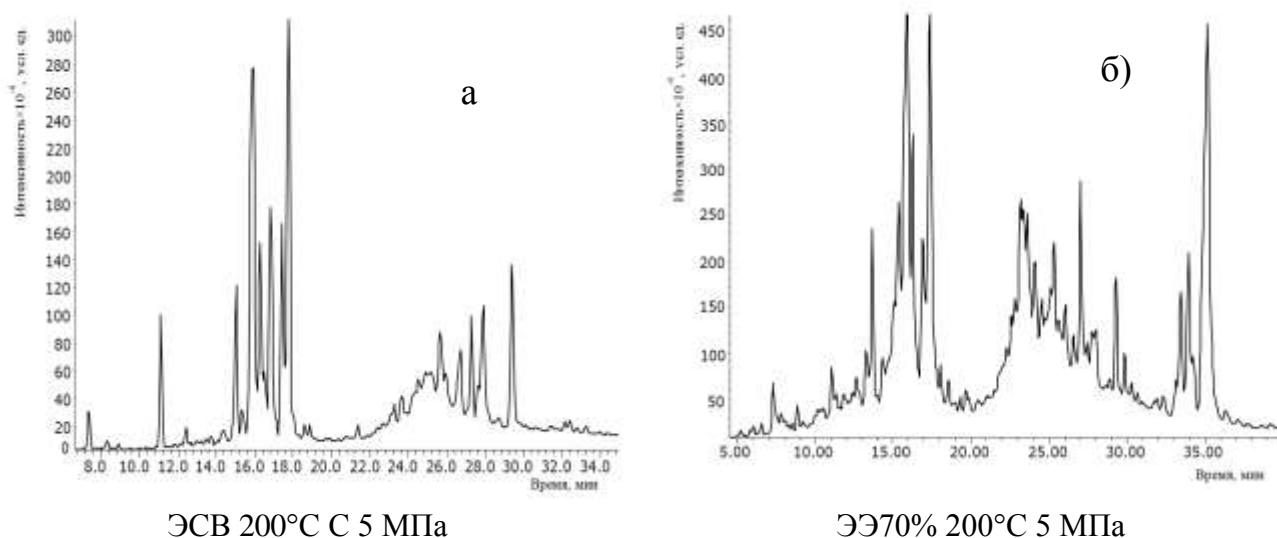


Рисунок 39 – Хроматограммы, полученные при ГХ-МС анализе а) ЭСВ 200°C С 5 МПа; б) ЭЭ70% 200°C 5 МПа после дериватизации с помощью БСТФА.

Идентифицированные БАС приведены в таблице 31. Как видно из представленных данных, экстракты содержат различные виды соединений – двухосновные карбоновые кислоты, непредельные карбоновые кислоты, фенольные кислоты, жирные кислоты, многоатомные спирты, сахара, смоляные кислоты, растительные стероиды. Обнаружено ряд соединений, являющихся продуктами разложения: (2R,3S)-2,3,4-тригидроксибутановая кислота – продукт разложения аскорбиновой кислоты, глюкуроновая кислота – продукт разложения глюкозы. Наличие данных соединений закономерно, поскольку процесс экстракции происходит при повышенных температуре и давлении.

Многие соединения, обнаруженные в полученных экстрактах, ранее не описывались как компоненты листьев «эвкалипта прутовидного». Например, лактоны глюконовой и ксилоновой

кислот, 2-пропеновая кислота и 2-пентеновая кислота, шикимовая кислота, дегидроабиетиновая кислота, триконтановая кислота, бензойная кислота.

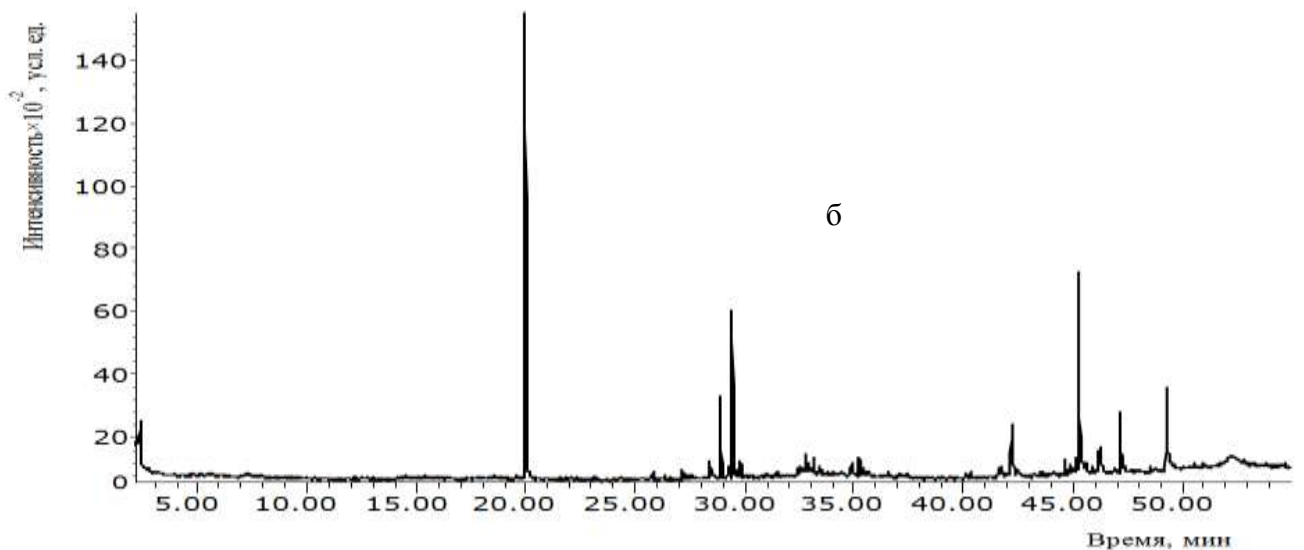
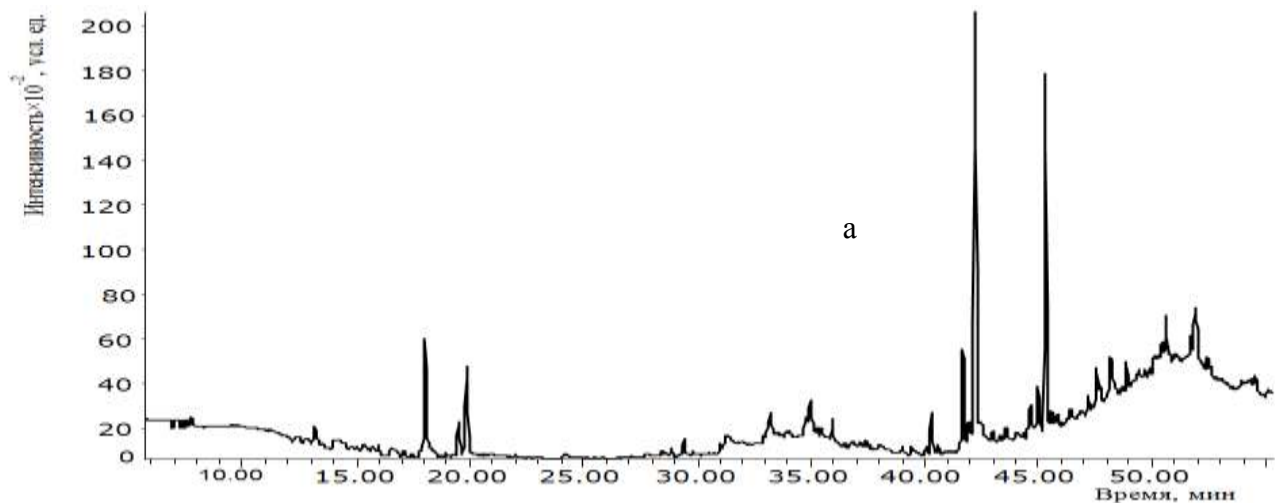
Состав нелетучих БАС эвкалипта прутовидного после проведения дериватизации БСТФА нельзя считать окончательным, поскольку многие БАС плохо подвергаются силилированию.

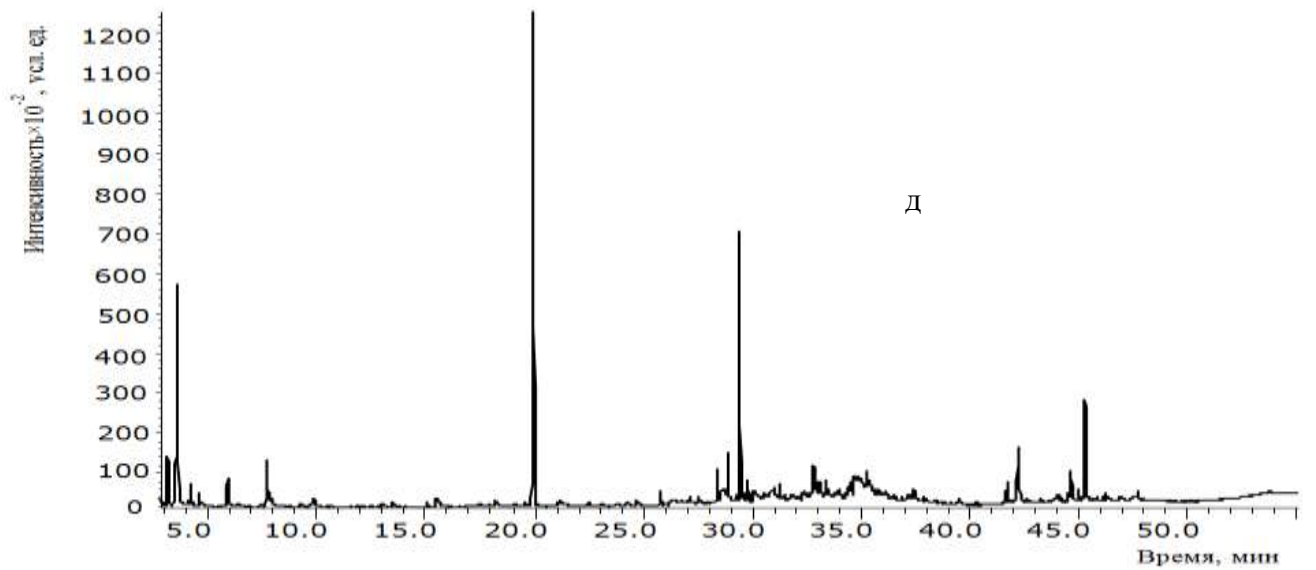
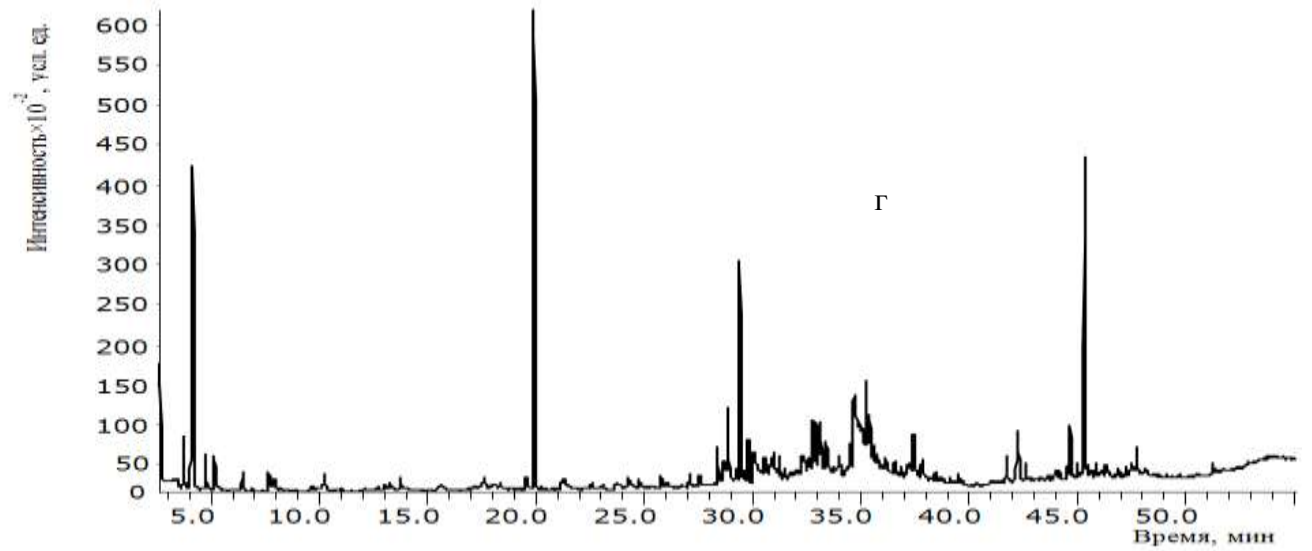
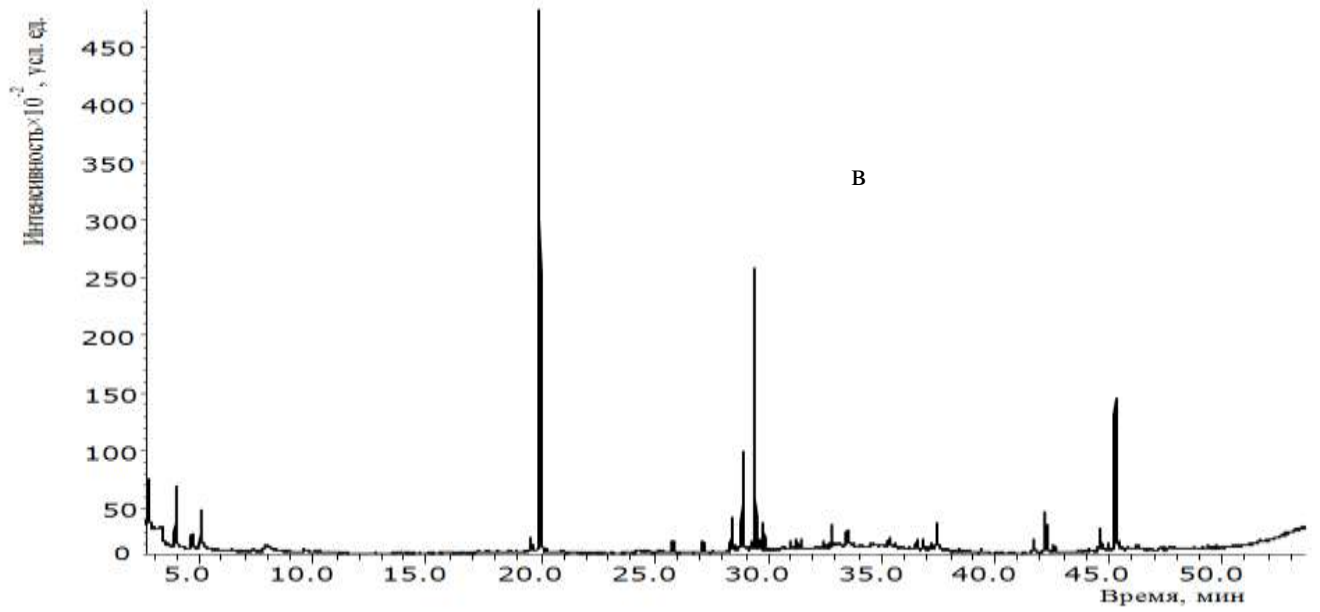
Таблица 31 – Идентификация компонентов экстрактов «эвкалипта прутовидного» после дериватизации

Время удерживания, мин	Компонент	ЭСВ 200 °С 5 МПа	ЭЭ 70% 200 °С 5 МПа
4.45	2-пропеновая кислота (акриловая)	+	+
5.35	пропановая кислота	-	+
6.24	пропандиовая кислота (малоновая)	+	+
7.37	глицерин	+	+
8.33	транс бутандиовая (фумаровая) кислота	+	-
11.06	бутандиовая кислота (янтарная)	+	+
11.11	гидроксидбутандиовая кислота (яблочная)	+	+
12.42	(2R 3S) -2,3,4-тригидроксидбутановая кислота	+	-
12.63	2-пентеновая кислота (β-этилакриловая кислота)	+	+
13.01	бензойная кислота	+	+
14.37	β-L-арабиноза	+	+
15.04	D-рибоза	+	+
15.82	шикимовая кислота	+	+
15.88	фруктоза	+	+
16.01	тетрадекановая кислота (миристиновая)	+	+
16.29	β-галактофураноза	+	+
16.35	D-галофураноза	+	+
16.82	глюкоза	+	-
17.39	галловая кислота	+	+
18.06	гексадекановая кислота (пальмитиновая)	+	+
17.76	D-галактопираноза	+	+
18.65	глюконовой кислоты лактон	+	-
19.06	фитол	+	+
19.69	олеиновая кислота	+	+
19.93	октадекановая кислота (стеариновая)	+	+
21.31	дегидроабиетиновая кислота	+	-
21.39	глюкуроновая кислота	+	-
23.63	ксилоновой кислоты лактон	+	-
25.99	хинная кислота	+	-
27.88	кверцетин	+	+
32.33	триконтановая кислота	-	+
31.82	β-ситостерол	-	+

Для изучения ЛОС был проведен и непосредственный анализ полученных ЭСВ и ЭЭ «эвкалипта прутовидного», который выявил изменение качественного состава извлекаемых ЛОС в зависимости от использованного экстрагента и температуры экстракции (рис. 40, табл.

32). На приведенных хроматограммах заметен рост интенсивностей пиков веществ и числа детектируемых компонентов с повышением температуры экстракции и содержания этанола в экстрагенте. Идентификация ЛОС эвкалипта прутовидного осуществлялась на основе данных ПФА + ТФМЭ. При проведении процесса экстракции субкритической водой при температурах 120°C, 160°C и давлении 5 МПа, было обнаружено порядка 70 соединений, из которых идентифицировано 47 соединений. Повышение температуры процесса до 200°C привело к повышению концентрации (оценка по площади пиков) ранее обнаруженных ЛОС и увеличению числа извлеченных ЛОС до 90 соединений (табл.32). Увеличение числа детектируемых соединений является следствием повышения эффективности экстракции при увеличении температуры, что подтверждается ростом концентрации ранее обнаруженных ЛОС, при этом не зафиксировано уменьшение концентрации соединений, обнаруженных при ЭСВ 120, 160°C. Среди них в составе экстракта появляются соединения, которые в обычных условиях в воде не растворимы: феруловая кислота, хинная кислота, линолевая, пальмитиновая кислота, стеариновая кислота, фенольные соединения.





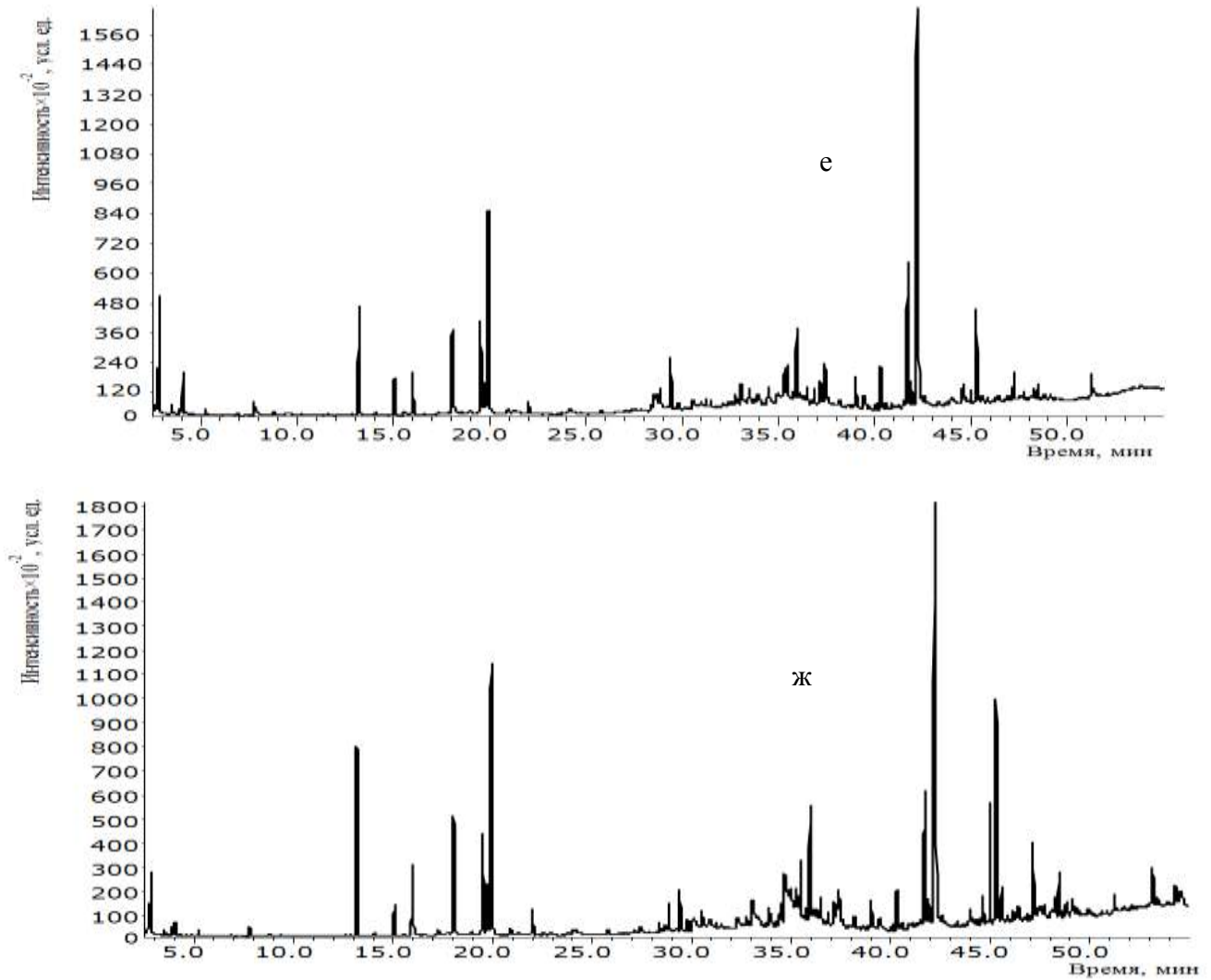


Рисунок 40 – Хроматограммы, полученные при ГХ-МС анализе экстрактов «эвкалипта прутовидного»: а) ЭЭ 70% 25°C 0.1МПа, б) ЭСВ 120°C 5МПа, в) ЭСВ 160°C 5МПа, г) ЭСВ 200°C 5МПа, д) ЭЭ10% 200°C 5МПа, е) ЭЭ50% 200°C 5МПа, ж) ЭЭ70% 200°C 5МПа.

Таблица 32 – Относительное содержание ЛОС в экстрактах «эвкалипта прутовидного»

Время удерживания, мин	Идентифицированный компонент экстракта эвкалипта прутовидного	Относительное содержание компонента, % $\bar{A} \pm \Delta, n=5, P=0.95$					
		ЭСВ 120°C, 5 МПа	ЭСВ 160°C, 5 МПа	ЭСВ 200°C, 5 МПа	10%ЭЭ 200°C, 5 МПа	50%ЭЭ 200°C, 5 МПа	70%ЭЭ 200°C, 5 МПа
1	2	3	4	5	6	7	8
2.81	3-метилбутаналь	0.35 ±0.03	2.22 ±0.21	2.03 ±0.19	0.21 0.18±	0.05 ±0.01	0.07 ±0.01
3.38	этановая кислота	2.29 ±0.19	2.63 ±0.15	9.32 ±0.81	1.19 ±0.11	1.23 ±0.09	0.99 ±0.08
4.14	пропановая кислота	0.34 ±0.03	0.59 0.04±	1.14 ±0.09	0.63 ±0.06	0.08 ±0.01	1.01 ±0.09
5.13	метил-2-пропеонат	-	-	0.38 ±0.04	0.21 ±0.02	0.14 ±0.01	0.21 ±0.02

1	2	3	4	5	6	7	8
6.39	(2H)фуранон	-	-	0.95 ±0.09	0.05 ±0.01	0.14 ±0.02	0.31 ±0.03
7.88	3-фуральдегид	-	-	3.08 ±0.29	0.47 ±0.05	0.51 ±0.05	0.55 ±0.06
7.92	2-фуральдегид	-	-	4.21 ±0.41	0.97 ±0.09	1.76 ±0.15	0.09 ±0.01
9.55	3-метилбутановая кислота	0.22 ±0.02	0.35 ±0.04	0.78 ±0.08	0.21 ±0.02	0.14 ±0.02	0.05 ±0.01
10.12	фурфуриловый спирт	-	-	0.48 ±0.05	0.06 ±0.01	0.09 ±0.01	0.08 ±0.01
13.19	2(3H)дигидрофуранон	-	-	0.05 ±0.01	0.05 ±0.01	0.07 ±0.01	0.05 ±0.01
13.26	α-пинен	-	-	-	-	1.96 ±0.21	2.88 ±0.24
13.65	дегидрометилфуранон	-	-	0.31 ±0.03	0.07 ±0.01	0.11 ±0.01	0.04 ±0.02
13.75	1,2-Циклопентандион	-	-	0.64 ±0.06	0.05 ±0.01	0.18 ±0.02	0.12 ±0.02
15.13	1,1-диэтокси-3-метилбутан	-	-	-	-	-	0.91 ±0.09
15.57	5-метилфурфураль	-	-	1.95 ±0.22	0.24 ±0.02	1.27 ±0.11	0.19 ±0.02
16.06	β-пинен	-	-	-	-	-	1.09 ±0.12
17.28	фенол	0.95 ±0.09	0.12 ±0.02	0.25 ±0.03	0.41 ±0.04	1.11 ±0.13	0.12 ±0.01
18.11	α-феландрен	-	-	-	-	0.42 ±0.04	1.81 ±0.17
18.29	2,4-дигидропиранон	-	-	0.88 ±0.09	0.17 ±0.02	-	-
19.27	3-метил-2,5-фурандион	-	-	-	-	-	0.07 ±0.01
19.58	n-цимен	1.03 ±0.11	1.31 ±0.12	0.37 ±0.04	0.58 ±0.06	2.05 ±0.19	2.24 ±0.21
19.83	лимонен	-	-	-	-	0.18 ±0.02	0.21 ±0.02
19.98	1,8-цинеол	22.06 ±1.84	42.91 ±2.15	11.03 ±1.13	15.77 ±1.21	10.09 ±0.95	11.69 ±1.42
20.89	бензиловый спирт	-	-	0.15 ±0.03	-	-	-
20.92	бензенацетальдегид	-	-	0.09 ±0.02	0.05 ±0.02	0.05 ±0.02	0.24 ±0.02
22.06	γ-терпинен	-	-	-	-	-	0.52 ±0.05
22.58	4-гидрокси-2,5-диметил-3(2P)фуранон	-	-	0.26 ±0.03	0.23 ±0.02	0.26 ±0.03	0.09 ±0.02
22.94	линалоол оксид	-	-	-	-	0.06 ±0.02	0.11 ±0.01



1	2	3	4	5	6	7	8
23.81	диэтилпропандиоат	-	-	-	-	-	0.06 ±0.02
24.10	фуранеол	-	-	-	-	0.25 ±0.03	0.05 ±0.01
24.25	2,3-дигидро-5- гидрокси-6-метил-4Н- пиран-4-он	-	0.47 ±0.05	0.39 ±0.04	0.69 ±0.06	0.36 ±0.04	0.31 ±0.03
25.83	D-фенкол	0.34 ±0.03	0.91 ±0.08	0.65 ±0.05	0.35 ±0.03	0.06 ±0.01	0.07 ±0.01
27.16	пинокарвеол	0.46 ±0.04	0.81 ±0.07	0.41 ±0.04	0.34 ±0.03	0.04 ±0.02	0.12 ±0.01
27.41	2,3дигидро-3,5- дигидрокси-5метил-4Н- пиран-4-он	0.42 ±0.04	0.39 ±0.04	0.57 ±0.05	0.22 ±0.02	1.07 ±0.09	0.09 ±0.01
27.43	эндоборнеол	0.15 ±0.02	0.14 ±0.02	0.19 ±0.02	0.16 ±0.02	0.19 ±0.02	0.19±0.02
28.43	борнеол	1.73 ±0.15	1.92 ±0.18	1.48 ±0.12	0.71 ±0.06	0.57 ±0.06	0.16 ±0.02
28.54	карвенон	0.64 ±0.06	0.69 ±0.07	0.43 ±0.04	0.39 ±0.04	0.59 ±0.06	0.22 ±0.02
28.71	<i>n</i> -мент-4-ен-3-он	0.97 ±0.09	0.95 ±0.09	0.88 ±0.09	2.37 ±0.21	0.63 ±0.06	0.56 ±0.05
28.91	4 терпинеол	7.91 ±0.45	5.91 ±0.34	2.39 ±0.19	2.61 ±0.23	0.76 ±0.07	0.49 ±0.04
29.27	<i>n</i> -цимен-8-ол	0.23 ±0.02	0.43 ±0.04	0.39 ±0.03	0.56 ±0.05	0.18 ±0.02	0.11 ±0.01
29.44	α-терпинеол	0.99 ±0.08	14.10 ±1.12	8.56 ±0.74	4.99 ±0.39	1.45 ±0.12	0.52 ±0.05
29.65	миртенол	0.97 ±0.09	0.82 ±0.08	0.15 ±0.02	0.32 ±0.03	0.25 ±0.03	0.18 ±0.02
29.83	α-феландрен эпоксид	0.58 ±0.05	1.41 ±0.11	1.17 ±0.12	0.72 ±0.07	0.44 ±0.04	0.17 ±0.02
30.27	1,2-бензилдиол	0.26 ±0.02	0.26 ±0.02	0.51 ±0.05	0.96 ±0.09	0.69 ±0.06	0.61 ±0.06
30.44	карвеол	-	-	0.07 ±0.02	0.05 ±0.01	-	-
30.56	4-этенилфенол	-	-	0.83 ±0.08	0.96 ±0.09	0.61 ±0.06	0.71 ±0.07
30.90	5-гидроксиметил- фуранкарбоксияльдегид	-	-	1.43 ±0.15	0.25 ±0.03	0.91 ±0.09	0.11 ±0.02
30.99	карвон	-	0.33 ±0.03	1.34 ±0.12	1.54 ±0.12	0.48 ±0.04	0.13 ±0.01
31.29	карвотанацетон	0.61 ±0.06	0.39 ±0.03	0.69 ±0.06	0.46 ±0.05	1.09 ±0.09	0.09 ±0.02
31.48	пиперитон	0.55 ±0.03	0.44 ±0.03	0.35 ±0.02	0.21 ±0.02	0.11 ±0.01	0.11 ±0.01
31.71	3-метокси-1,2- бензилдиол	-	-	0.06 ±0.01	0.11 ±0.02	-	-

1	2	3	4	5	6	7	8
32.29	1,4 -бензилдиол	-	-	0.29 ±0.03	1.01 ±0.09	0.22 ±0.02	0.18 ±0.02
32.42	тимол	0.15 ±0.02	0.32 ±0.02	0.21 ±0.02	0.46 ±0.03	0.78 ±0.08	0.31 ±0.03
32.58	цуминол	0.21 ±0.02	0.27 ±0.02	0.35 ±0.03	0.39 ±0.03	0.69 ±0.07	0.09 ±0.01
32.81	карвакрол	0.59 ±0.05	1.01 ±0.09	2.21 ±0.15	1.71 ±0.12	1.17 ±0.08	0.42 ±0.03
33.08	2-метокси-4-этилфенол	-	-	0.83 ±0.08	0.81 ±0.08	0.92 ±0.07	1.54 ±0.09
33.16	3-мента-[1(7),8]диен-2-гидропероксид	-	-	2.63 ±0.21	1.72 ±0.11	0.93 ±0.08	-
33.35	4-этил-1-диметоксибензол	-	-	-	-	0.61 ±0.05	0.47 ±0.04
33.83	эндоацетокси-1,8-цинеол	-	-	0.09 ±0.02	0.05 ±0.01	0.09 ±0.02	0.19 ±0.02
33.93	терпенилацетат	-	-	-	-	0.15 ±0.02	0.22 ±0.02
33.99	2,6-диметоксифенол	0.31 ±0.03	0.13 ±0.02	0.28 ±0.03	1.04 ±0.09	0.15 ±0.02	0.13 ±0.02
34.32	эвгенол	0.06 ±0.02	0.09 ±0.02	0.19 ±0.02	0.35 ±0.03	0.38 ±0.03	0.22 ±0.02
34.49	2-пропилфенол	0.11 ±0.02	0.21 ±0.02	0.64 ±0.05	1.81 ±0.08	0.81 ±0.06	0.35 ±0.03
34.72	1,2,3-бензилтриол	0.14 ±0.02	0.98 ±0.09	3.04 ±0.21	7.97 ±0.51	3.36 ±0.24	1.24 ±0.08
35.16	3-гидрокси-4-метоксибензальдегид	-	-	-	-	0.21 ±0.02	0.31 ±0.03
35.26	4-гидрокси-3-метил-6(1-метилэтил)транс-2-циклогексен-1-он	0.09 ±0.02	0.12 ±0.02	1.26 ±0.07	2.31 ±0.18	0.37 ±0.03	0.92 ±0.09
35.41	5-гидрокси- <i>n</i> -мент-6-ен-2-он	0.31 ±0.03	0.62 ±0.06	1.63 ±0.13	2.09 ±0.15	0.37 ±0.03	0.57 ±0.04
35.81	(S)-(-)-изопропенил-1-циклогексен-1-карбоксилловая кислота	-	-	-	-	0.24 ±0.02	0.63 ±0.05
35.97	аромадендрен	-	-	-	-	2.23 ±0.11	1.39 ±0.07
36.17	изоэвгенол	-	-	0.42 ±0.03	0.39 ±0.03	0.55 ±0.04	0.67 ±0.05
36.33	кадинен	-	-	-	-	-	0.21 ±0.02
36.87	2-изопропенил-4а,8диметил1,2,3,4,4а,5,6,7-октагидронафталин	0.27 ±0.03	0.52 ±0.05	0.36 ±0.03	0.43 ±0.04	0.81 ±0.08	0.18 ±0.02
37.19	δ-селинен	0.36 ±0.04	0.19 ±0.02	0.61 ±0.06	0.78 ±0.08	0.93 ±0.11	0.65 ±0.07
37.44	α-селинен	0.18 ±0.02	0.13 ±0.02	0.39 ±0.04	0.91 ±0.08	0.71 ±0.07	0.79 ±0.08

1	2	3	4	5	6	7	8
37.57	2,4-дитертбутилфенол	0.08 ±0.02	0.15 ±0.02	0.16 ±0.02	0.25 ±0.03	-	-
37.86	бутилированный гидрокситолуол	0.23 ±0.02	0.27 ±0.03	0.31 ±0.03	0.22 ±0.02	-	-
38.45	дигидроактинидиолид	-	-	-	0.88 ±0.08	0.07 ±0.02	0.11 ±0.02
38.62	гуайа-3,9-диен	-	-	-	-	0.36 ±0.04	0.13 ±0.02
38.84	эудесма-3,7(11)диен	-	-	0.29 ±0.03	0.25 ±0.03	0.24 ±0.03	0.11 ±0.02
39.53	2,6-диметокси-4- этилфенол	0.05 ±0.02	0.08 ±0.02	0.41 ±0.04	0.34 ±0.04	0.21 ±0.02	0.39 ±0.04
40.09	спатуленол	0.05 ±0.02	0.05 ±0.02	0.05 ±0.02	0.08 ±0.02	0.31 ±0.03	0.44 ±0.04
40.32	глобулол	0.09 ±0.02	0.17 ±0.02	0.16 ±0.02	0.18 ±0.02	1.24 ±0.09	1.93 ±0.08
40.59	эпиглобулол	0.07 ±0.02	0.07 ±0.02	0.11 ±0.02	0.26 ±0.03	0.35 ±0.03	0.38 ±0.04
40.92	2,6-диметокси-4(2- пропенил)фенол	-	-	0.41 ±0.04	0.19 ±0.02	0.38 ±0.04	0.41 ±0.04
41.01	хинная кислота	-	-	3.32 ±0.21	2.71 ±0.15	-	-
41.57	бензофенон	-	-	-	-	0.49 ±0.05	0.32 ±0.03
41.72	γ-эудесмол	1.022 ±0.08	0.95 ±0.08	1.08 ±0.09	1.11 ±0.09	5.31 ±0.38	5.03 ±0.35
41.93	хинезол	-	-	-	0.07 ±0.02	0.65 ±0.05	0.82 ±0.07
42.08	дигидроконифериловы й спирт	-	-	0.21 ±0.02	0.07 ±0.02	-	-
42.21	β-эудесмол	2.32 ±0.16	1.85 ±0.13	1.57 ±0.09	2.19 ±0.16	9.92 ±0.84	13.51 ±1.01
42.28	α-эудесмол	1.79 ±0.09	1.51 ±0.08	1.01 ±0.08	1.53 ±0.07	6.75 ±0.51	9.11 ±0.52
43.27	феруловая кислота	-	-	0.16 ±0.02	0.09 ±0.02	0.41 ±0.02	0.14 ±0.02
43.91	4(1E)3-гидрокси-1- пропенил-2- метоксифенол	-	-	-	-	-	0.16 ±0.02
44.00	конифероловый спирт	-	-	-	-	-	0.61 ±0.06
44.31	миристиновая кислота	-	-	-	-	0.05 ±0.01	0.11 ±0.02
44.54	лолиолид	-	-	0.77 ±0.06	0.52 ±0.04	0.31 ±0.03	0.37 ±0.04
44.66	10-ди-эпи-γ-эудесмол	0.87 ±0.06	0.87 ±0.06	1.16 ±0.08	1.48 ±0.11	1.11 ±0.09	1.11 ±0.09
45.31	эпи-критомеридиол	12.18 ±1.01	6.22 ±0.51	3.61 ±0.28	6.77 ±0.42	6.22 ±0.38	7.84 ±0.42

1	2	3	4	5	6	7	8
45.93	лактаропаллидин	-	-	-	-	-	0.43 ±0.04
46.20	3,7,11,15Тетраметил-2-гексадецен-1-ол	-	-	-	-	0.15 ±0.02	0.39 ±0.04
46.75	метилпальмитат	-	-	-	-	0.11 ±0.02	0.25 ±0.03
46.98	изофитол	-	-	-	-	0.17 ±0.02	0.24 ±0.02
47.17	пальмитиновая кислота	-	-	0.07 ±0.02	0.09 ±0.02	0.34 ±0.04	1.29 ±0.09
47.25	дибутилфталат	-	-	0.08 ±0.02	0.06 ±0.02	0.58 ±0.06	0.39 ±0.04
47.42	норевгенин	-	-	0.05 ±0.02	1.09 ±0.12	0.34 ±0.04	0.72 ±0.08
47.56	3,5-диметокси-4-гидроксикоричный альдегид	-	-	0.05 ±0.02	0.06 ±0.02	0.55 ±0.06	0.25 ±0.03
47.58	этилпальмитат	-	-	-	-	0.28 ±0.03	0.23 ±0.03
47.72	(+)-4,5диоксосоко -γ-эудесмол	-	-	0.56 ±0.06	0.72 ±0.06	0.71 ±0.06	0.84 ±0.08
48.46	кембрен	-	-	-	-	0.54 ±0.06	0.69 ±0.07
48.57	1(2-нафтил)гепт-1-ен-3-он	-	-	-	-		0.23 ±0.03
48.89	фитол	-	-	-	-	0.14 ±0.02	0.43 ±0.05
49.12	линолевая кислота	-	-	0.21 ±0.02	0.09 ±0.02	2.04 ±0.19	0.42 ±0.05
49.34	стеариновая кислота	-	-	0.18 ±0.02	0.15 ±0.02	0.43 ±0.05	0.12 ±0.02
49.45	себаценовой кислоты дибутиловый эфир	-	-	-	-	0.09 ±0.02	0.69 ±0.07
51.23	октадеценамид	-	-	2.23 ±0.19	0.16 ±0.02	0.41 ±0.04	0.54 ±0.05
54.56	β-ситостерол	-	-	-	-	-	1.11 ±0.08

При повышении температуры процесса до 200°C, в ЭСВ детектируются фурановые соединения: (2H)фуранон, 3-фуральдегид, 2-фуральдегид, фурфуроловый спирт, 2(3H)дигидрофуранон, дегидрометилфуранон, 5-метилфурфураль, 4-гидрокси-2,5-диметил-3(2P)фуранон, 5-гидроксиметил-фуранкарбоксияльдегид. Последние исследования ученых университета Нового Южного Уэльса (Австралия) показали, что фураноны, которые они обнаружили в извлечениях австралийской морской водоросли *Deliseapulchra*, могут использоваться в качестве антибиотиков нового поколения для борьбы с холерным вибрионом [169]. Кроме этого было сделано предположение, что фураноны могут воздействовать на другие

инфекции пищеварительной системы, а также бактерии, вызывающие фиброзный кистоз и туберкулез [169]. В ЭСВ 120, 160 °С были обнаружены пирановые соединения: 2,3-Дигидро-5-гидрокси-6-метил-4Н-пиран-4-он, 2,3дигидро-3,5-дигидрокси-5метил-4Н-пиран-4-он, а при ЭСВ 200°С еще и 2,4-дигидропиранон, которые обладают антимикробной и противовирусной активностью [170]. Кроме этого во всех экстрактах присутствует фенол, который давно используется в качестве обеззараживающего средства [171]. На основании этого можно утверждать, что ЭСВ 200 °С 5 МПа обладает бактерицидными свойствами.

Модификация воды 10% этанола практически не изменила ее экстракционных характеристик, о чем свидетельствует качественный состав извлеченных компонентов (табл. 32). Однако, при использовании в качестве экстрагента 50% и 70% раствора этанола в воде при 200°С и давлении 5 МПа, качественный состав извлеченных соединений заметно изменился и достиг 300 компонентов. В таблице 32 приведены только идентифицированные ЛОС, а также их соотношение в полученных экстрактах. Нужно отметить, что большинство соединений в ЭЭ 50,70% не удалось идентифицировать. Соотношение компонентов в полученных экстрактах не позволяет судить об эффективности экстракции и приведено лишь для примерной оценки содержания компонентов в полученных экстрактах.

Состав ЭЭ 50%, 70% 200°С 5 МПа во многом совпадает за исключением некоторых минорных компонентов. Такие ЛОС как  $\alpha$ -пинен,  $\beta$ -пинен,  $\alpha$ -феландрен, лимонен, аромадендрен, изофитол, фитол, кембрен, бензофенон, (S)-(-)-изопропенил-1-циклогексен-1-карбоксилловая кислота, многие сложные эфиры извлекаются из растительного сырья только 50% и 70% раствором этанола при 200°С 5 МПа. А 1,1-диэтокси-3-метилбутан, 3-метил-2,5-фурандион,  $\gamma$ -терпинен, кадинен, кониферилловый спирт, лактаропаллидин, 1(2-нафтил)гепт-1-ен-3-он,  $\beta$ -ситостерол содержатся только в ЭЭ 70% 200°С 5 МПа. При этом в ЭЭ 70% 200°С 5 МПа значительно повышается концентрация остальных соединений (оценка по площадям пиков). Однако ряд веществ, таких как 2,4-дигидропиранон, хинная кислота, дигидрокониферилловый спирт присутствуют только в ЭСВ 200°С и ЭЭ 10% 200°С 5 МПа.

Исходя из полученных данных, наиболее эффективное извлечение ЛОС из «листьев эвкалипта прутовидного» по числу извлекаемых соединений является экстракция 70% раствором этанола в воде при 200°С 5 МПа.

Количественную оценку ЛОС в экстрактах проводили по содержанию  $\alpha$ -пинена,  $\beta$ -пинена,  $\alpha$ -феландрена, *n*-цимена, 1,8-цинеола. Следует отметить, что  $\alpha$ -пинен,  $\beta$ -пинен,  $\alpha$ -феландрен содержатся в ЭСВ 120°С, 160°С, 200°С 5 МПа, ЭЭ 10% 200°С в следовых количествах, не позволяющих провести количественную оценку (табл.33). Как было указано в обзоре литературы, с повышением температуры процесса экстракции полярность воды заметно

уменьшается, но в данном случае 200°C оказалось недостаточно для экстракции таких малополярных соединений как  $\alpha$ -пинен,  $\beta$ -пинен,  $\alpha$ -феландрен [120,121].

Как видно из представленных в таблицах 32 и 33 данных, ЭСВ при температурах 120°C и 160°C содержат наименьшее количество ЛОС относительно других видов экстрактов «эвкалипта прутовидного». Извлечение 1,8-цинеола также эффективно происходит при экстракции субкритической водой при температуре 200°C и давлении 5МПа. Это опять же объясняется именяющимися физическими свойствами воды в субкритических условиях (рис. 1). Поэтому, если целевым продуктом является 1,8-цинеол, то с успехом можно использовать субкритическую воду при 200°C для его извлечения. А для эффективного извлечения всех летучих органических соединений эвкалипта прутовидного необходимо применять в качестве экстрагента 70% раствор этанола в воде при температуре 200°C и давлении 5 МПа.

Таблица 33 – Масса извлекаемых ЛОС «эвкалипта прутовидного» мкг/г растительного сырья

ЛОС	ЛОС, $\bar{w} \pm \Delta, n=5, P=0.95$ мкг/г растительного сырья					
	ЭСВ 120°C 5МПа	ЭСВ 160°C 5МПа	ЭСВ 200°C 5МПа	ЭЭ 10% 200°C 5МПа	ЭЭ 50% 200°C 5МПа	ЭЭ 70% 200°C 5МПа
$\alpha$ -пинен	-	-	-	-	136.32±5.44	501.07±10.05
$S(w)$ , мкг/г	-	-	-	-	4.37	8.08
$S_r(w)$	-	-	-	-	0.03	0.02
$\beta$ -пинен	-	-	-	-	94.91±2.57	257.57±7.88
$S(w)$ , мкг/г	-	-	-	-	2.07	6.34
$S_r(w)$	-	-	-	-	0.02	0.02
$\alpha$ -феландрен	-	-	-	-	301.27±9.62	1318.75±15.96
$S(w)$ , мкг/г	-	-	-	-	7.73	12.83
$S_r(w)$	-	-	-	-	0.03	0.01
<i>n</i> -цимен	3.75±0.25	10.68±0.72	17.45±0.52	18.34±0.56	145.02±3.29	173.71±3.24
$S(w)$ , мкг/г	0.20	0.58	0.42	0.45	2.65	2.61
$S_r(w)$	0.05	0.05	0.02	0.02	0.02	0.01
1,8-цинеол	494.95±8.09	749.98±13.25	1073.36±10.35	1038.55±10.97	1047.57±10.34	1098.57±11.62
$S(w)$ , мкг/г	6.51	10.65	8.32	8.82	8.31	9.34
$S_r(w)$	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01

Использование режима динамической экстракции позволяет селективно отбирать фракции с необходимым содержанием целевых компонентов. На рисунке 41 представлены кривые извлечения 1,8-цинеола, полученные при различных условиях экстракции, которые имеют вид ассиметричного пика, с размытым задним фронтом. При практически одинаковом извлечении 1,8-цинеола за время всего процесса (табл. 33) для ЭСВ 200°C 5МПа и ЭЭ 70% 200°C 5МПа, динамика экстракции неодинакова. Так, при ЭСВ 200°C полное извлечение 1,8-цинеола наблюдается за 44 минуты, при этом затрачивается 75 см<sup>3</sup> экстрагента, максимальное извлечение достигается за 17 минут (объем экстрагента составил 30 см<sup>3</sup>). При ЭЭ 70% 200°C 5МПа, полное извлечение 1,8-цинеола происходит за 23 минуты (объем экстрагента 40 см<sup>3</sup>), максимальное

извлечение соответствует объему  $20 \text{ см}^3$ . Следует отметить, что при ЭСВ  $200^\circ\text{C}$   $5 \text{ МПа}$ , ЭЭ  $10\%$ ,  $50\%$ ,  $70\%$   $200^\circ\text{C}$   $5 \text{ МПа}$  количество фенольных соединений (оценка по площадям пиков) максимально в первых фракциях экстрактов ( $15 \text{ см}^3$  экстрагента), в последующих фракциях их количество значительно снижается, а при пропускании  $40 \text{ см}^3$  экстрагента они не детектируются. Жирные кислоты и хинная кислота при ЭСВ  $200^\circ\text{C}$   $5 \text{ МПа}$  детектируются только в первых трех фракциях (время экстракции 9 минут, объем экстрагента  $15 \text{ см}^3$ ).

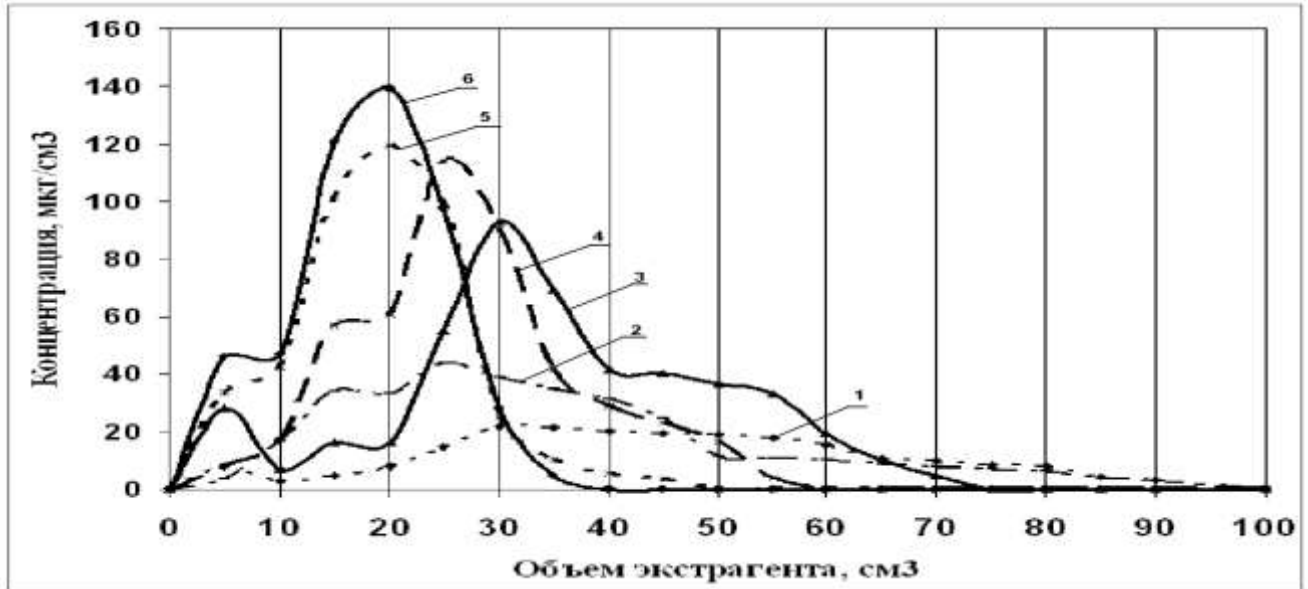


Рисунок 41 – Кривые экстрагирования 1,8-цинеола, полученные в режиме динамической экстракции: 1 – ЭСВ  $120^\circ\text{C}$   $5 \text{ МПа}$ ; 2 – ЭСВ  $160^\circ\text{C}$   $5 \text{ МПа}$ ; 3 – ЭСВ  $200^\circ\text{C}$   $5 \text{ МПа}$ ; 4 – ЭЭ  $10\%$   $200^\circ\text{C}$ ,  $5 \text{ МПа}$ ; 5 – ЭЭ  $50\%$   $200^\circ\text{C}$   $5 \text{ МПа}$ ; 6 – ЭЭ  $70\%$   $200^\circ\text{C}$   $5 \text{ МПа}$ .

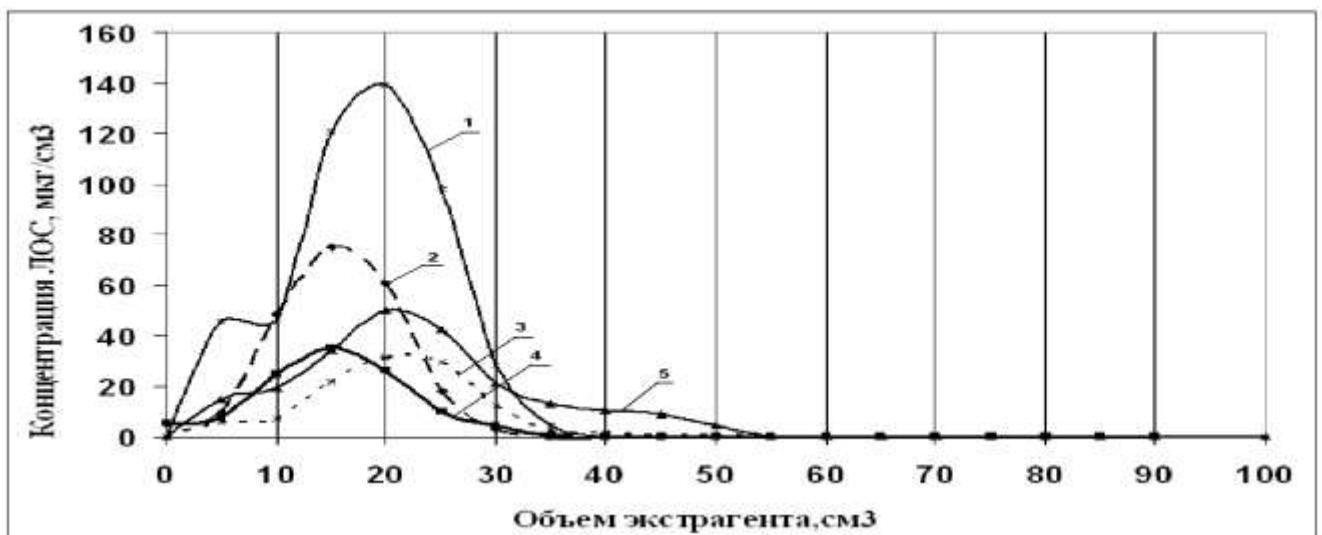


Рисунок 42 – Количество извлекаемых ЛОС «эвкалипта прутовидного» при ЭЭ  $70\%$   $200^\circ\text{C}$ ,  $5 \text{ МПа}$  в зависимости от пропущенного экстрагента: 1 – 1,8-цинеол; 2 – α-пинен; 3 – n-цимен; 4 – β-пинен; 5 – α-феландрен.

При изучении динамики экстракции ЛОС эвкалипта прутовидного  $70\%$  раствором этанола при температуре  $200^\circ\text{C}$  и давлении  $5 \text{ МПа}$  (рис.42) обнаружено, что практически все исследуемые

вещества полностью извлекаются за 23 минуты, объем экстрагента при этом составляет 40 см<sup>3</sup>. Однако для извлечения  $\alpha$ -феландрена требуется 55 см<sup>3</sup> экстрагента. Максимальное количество изученных ЛОС содержится в первых 3-4 фракциях. Время экстракции при этом составляет 12 минут.

Из полученных данных следует, что для получения общего образа объекта в виде ГХ-МС-хроматографического спектра жидкого экстракта листьев «эвкалипта прутовидного» необходимо отбирать пробу при динамическом режиме ЭЭ 70% 200°C 5МПа с 15 по 20 см<sup>3</sup> получаемого экстракта. Доминирующие компоненты ГХ-МС-характерного хроматографического профиля ЭЭ 70% 200°C 5МПа отличаются от компонентов хроматографического профиля, полученного при ПФА, присутствием высококипящих компонентов, однако начальный вид хроматограммы – до 30 мин – практически не изменился (рис. 40-ж, табл. 34). Характерный хроматографический профиль, полученный при анализе ЭЭ 70% 200°C 5МПа методом ГХ-МС, воспроизводится с погрешностью 10 %.

Таблица 34 – Доминирующие компоненты и их соотношение на ГХ-МС-характерном хроматографическом спектре ЭЭ 70% 200°C 5МПа

Время удерживания, мин	Индекс удерживания, $I_i^T$	ЛОС	Относительное содержание ЛОС, % $\bar{A} \pm \Delta$ , n=5, P=0.95
13.23	926±2	$\alpha$ -пинен	9.31±0.85
15.12	953±2	1,1-диэтокси-3-метилбутан	1.56±0.13
16.03	967±2	$\beta$ -пинен	3.98±0.41
18.08	997±2	$\alpha$ -феландрен	7.25±0.69
19.56	1017±2	п-цимен	5.99±0.57
19.81	1021±2	лимонен	3.08±0.44
19.98	1023±2	1,8-цинеол	14.57±1.12
22.05	1051±2	$\gamma$ -терпинен	1.41±0.18
28.91	1169±2	4 терпинеол	1.04±0.15
29.44	1181±2	$\alpha$ -терпинеол	1.44±0.18
35.97	1444±2	аромадендрен	3.72±0.35
40.33	1592±2	глобулол	2.16±0.24
41.73	1637±2	$\gamma$ -эудесмол	4.19±0.39
42.21	1649±2	$\beta$ -эудесмол	15.18±1.12
42.28	1651±2	$\alpha$ -эудесмол	10.38±0.95
44.66	1781±2	10-ди-эпи- $\gamma$ -эудесмол	1.12±0.17
45.31	1823±2	эпи-критомеридиол	6.19±0.62
47.18	1963±2	пальмитиновая кислота	2.12±0.19
48.46	2076±2	кембрен	1.48±0.13
54.56	2731±2	$\beta$ -ситостерол	1.68±0.14

#### Вывод.

Для извлечения БАС «эвкалипта прутовидного» применены новые способы экстрагирования. Идентифицированы БАС полученных экстрактов, которые позволяют объяснить ранее изученные свойства «эвкалипта прутовидного». Полученные результаты



позволят в дальнейшем разработать новые формы лекарственных препаратов на водной основе повышенной биодоступности.

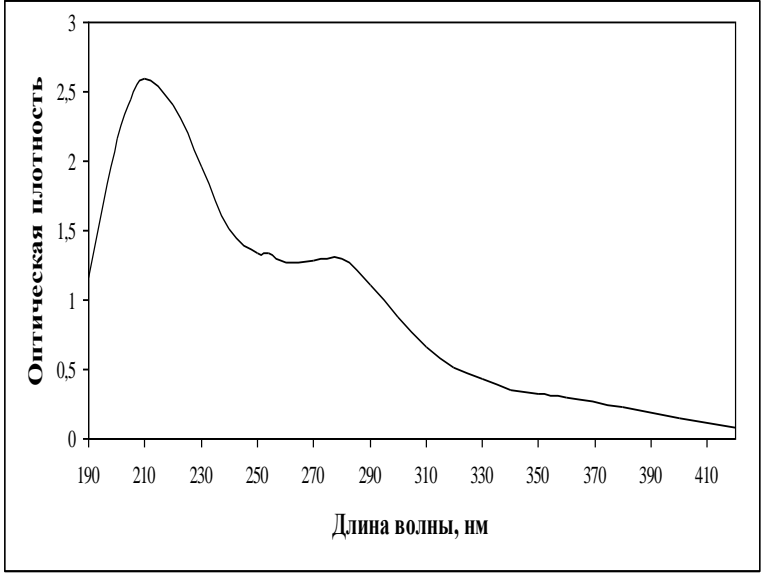
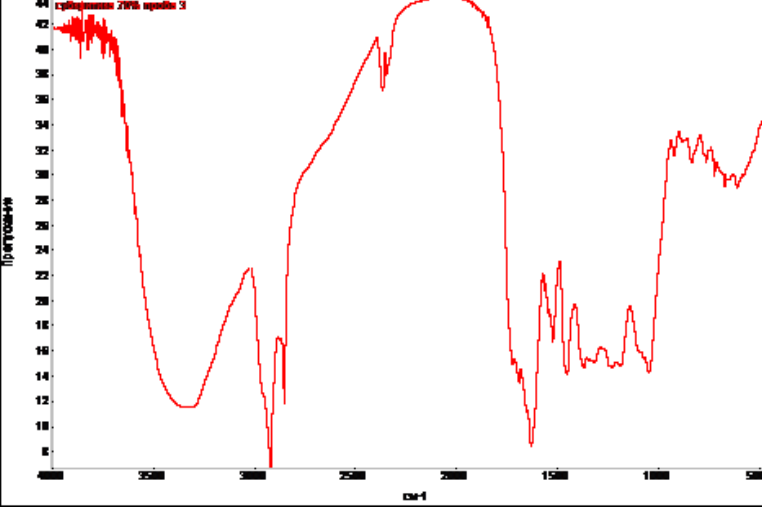
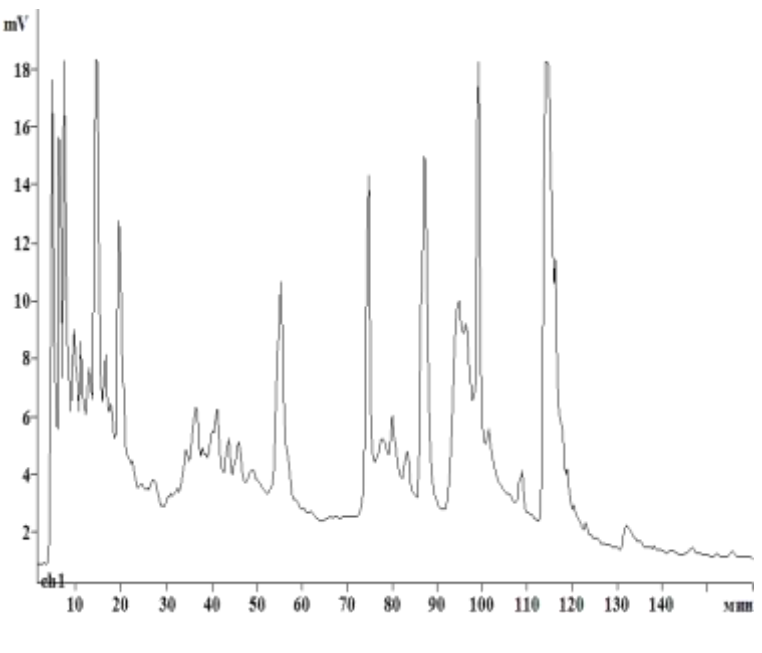
Установлено, что экстракция субкритической водой при температурах 120°C и 160°C давлении 5 МПа малоэффективна по сравнению с другими изученными в данной работе вариантами экстрагирования.

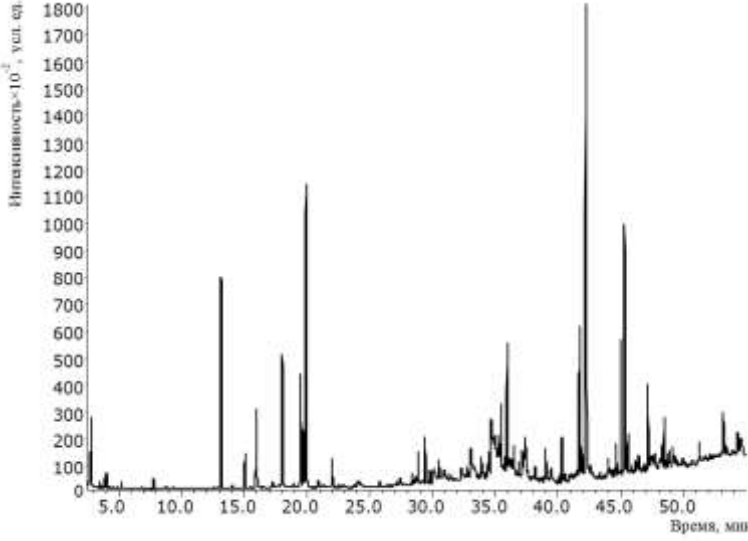
Для получения общего образа объекта в виде ГХ-МС хроматографического профиля жидких экстрактов «эвкалипта прутовидного» необходимо проводить экстракцию 70% раствором этанола в воде при температуре 200°C и давлении 5 МПа в динамическом режиме. Для анализа необходимо отбирать с 15 по 20 см<sup>3</sup> получаемого экстракта. При этом ГХ-МС-характерный хроматографический профиль ЭЭ70% 200°C 5 МПа будет иметь вид, представленный на рисунке 40-ж. Доминирующие компоненты данного вида экстракта и их соотношение приведено в таблице 34. В качестве дополнительного идентификационного параметра мы рекомендуем проводить идентификацию веществ-маркеров «листьев эвкалипта прутовидного»: эвкалиптина, эуглобали монотерпен и эуглобали сесквитерпен.

В таблице 35 приведены полученные разными методами характерные хроматографические и спектроскопические профили «эвкалипта прутовидного», которые могут использоваться в виде общего образа данного растительного сырья. Комплексный подход позволяет повысить достоверность анализа ЛР, кроме этого дает возможность отойти от традиционного ботанического метода установления видовой принадлежности ЛР.

Таблица 35 – Характеристические спектры «эвкалипта прутовидного»

Тип характеристического спектра	Характеристический спектр	Вид экстракта «эвкалипта прутовидного»
1	2	3
ПФА-ГХ-МС		газовый экстракт

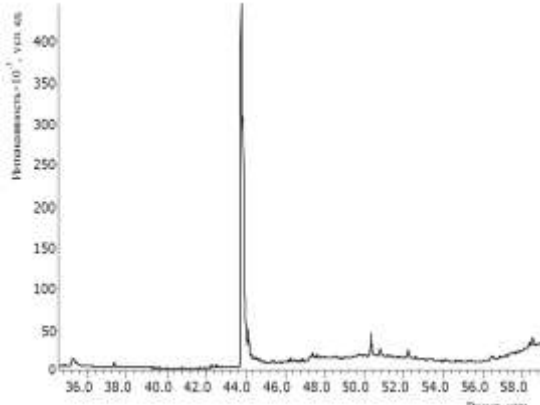
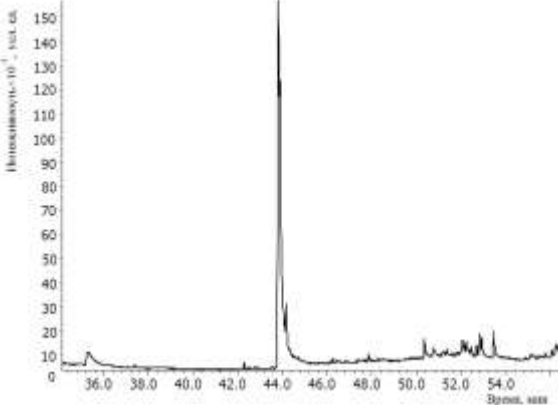
1	2	3
УФ		ЭЭ 70% 200°C 5 МПа
ИК		ЭЭ 70% 200°C 5 МПа
ВЭЖХ		ЭЭ 70% 200°C 5 МПа

1	2	3
ГХ-МС		ЭЭ 70% 200°C 5 МПа

#### 4.6. ГХ-МС анализ экстрактов цветов «ромашки аптечной»

Для изучения содержания ЛОС в экстрактах «ромашки аптечной» был проведен их непосредственный анализ, который выявил изменение качественного и количественного состава извлекаемых ЛОС в зависимости от использованного экстрагента и температуры экстракции (табл. 36, 37). В таблице 36 представлены только фрагменты хроматограмм общих проб полученных экстрактов, содержащие пики, по которым видно, что компонентный состав полученных экстрактов практически идентичен, наблюдается отличие только в интенсивности пиков компонентов в разных экстрактах. Хроматограммы ЭЭ 50 и 70 % 150 и 200°C 5 МПа отличаются интенсивным пиком, соответствующим ен-ин-дициклоэфиру (время удерживания 46.2 мин).

Таблица 36 – ГХ-МС хроматограммы экстрактов «ромашки аптечной»

Экстрагент	Условия экстракции	
	150°C 5 МПа	200°C 5 МПа
1	2	3
Вода		

1	2	3
<p>Этанол 10%</p>		
<p>Этанол 50%</p>		
<p>Этанол 70%</p>		

Экстракты, приготовленные по традиционным технологиям	
Экстрагент	Хроматографический спектр
1	2
ВЭ 95°C 0.1 МПа	
ЭЭ 50% 25°C 0.1 МПа	
ЭЭ 70% 25°C 0.1 МПа	

Идентификация ЛОС в экстрактах «ромашки аптечной» осуществлялась на основе данных ПФА. (табл. 37).

Доминирующим компонентом во всех видах экстрактов, кроме ВЭ 95°C 0.1 МПа, является 7-метоксикумарин (айапанин), относящийся к ароматическим соединениям, который при ПФА и ТФМЭ содержится в следовых количествах. Повышение температуры экстракции незначительно влияет на качественный состав, но модификация воды 50 и 70% этанола увеличивает число извлекаемых соединений. Такие соединения как стигмастерол,  $\beta$ -ситостерол,  $\beta$ -амирин, бетулин и  $3\beta$ -О-цинамоиллулеол появляются в ЭЭ 50% 150°C 5 МПа, ЭЭ 50% 200°C, ЭЭ 70% 150°C 5 МПа, ЭЭ 70% 200 °C. Оценка динамики извлечения данных соединений показала, что они отсутствуют в первых 5 см<sup>3</sup> получаемого экстракта, а максимум извлечения приходится на 5 фракцию (25 см<sup>3</sup> экстракта, 15 мин экстракции). Такой компонент как  $\beta$ -фарнезен, входящий в число доминирующих компонентов при ПФА, встречается только в ЭЭ 10% 200°C 5 МПа, ЭЭ 50% 150°C 5 МПа, ЭЭ 50% 200°C 5 МПа, ЭЭ 70% 150°C 5 МПа, ЭЭ 70% 200°C 5 МПа, а гермакрены D и B – только в экстрактах, полученных с помощью 50% водно-этанольной смеси при повышенных температуре и давлении.

Полученные результаты еще раз продемонстрировали приоритетное применение экстракции при повышенных температуре и давлении для извлечения физиологически активных соединений из ЛР, поскольку традиционные экстракты содержат меньшее число компонентов.

ГХ-МС анализ жидких экстрактов «ромашки аптечной» показал, что доминирующими компонентами полученных экстрактов являются 7-метоксикумарин, хамазулен, бисаболол оксид А и ен-ин-дициклоэфир.

Таблица 37 – ЛОС, содержащиеся в экстрактах «ромашки аптечной»

Время удерживания	Идентифицированный компонент экстракта «ромашки аптечной»	Содержание ЛОС, $\bar{A} \pm \Delta$ , n=5, P=0.95, %										
		ЭСВ 150°C 5 МПа	ЭСВ 200°C 5 МПа	ЭЭ 10% 150°C 5 МПа	ЭЭ 10% 200°C 5 МПа	ЭЭ 50% 150°C 5 МПа	ЭЭ 50% 200°C 5 МПа	ЭЭ 70% 150°C 5 МПа	ЭЭ 70% 200°C 5 МПа	ЭВ 95°C 0.1 МПа	ЭЭ 50% 25°C 0.1 МПа	ЭЭ 70% 25°C 0.1 МПа
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
36.19	кумарин	-	-	-	0.64 ±0.06	-	-	-	-	-	-	-
36.27	β-фарнезен	-	-	-	0.05 ±0.02	0.54 ±0.05	0.62 ±0.06	1.82 ±0.15	0.27 ±0.03	-	-	-
36.99	гермакрен D	-	-	-	-	0.35 ±0.04	0.09 ±0.02	-	-	-	-	-
37.44	гермакрен B	-	-	-	-	0.24 ±0.03	0.07 ±0.02	-	-	-	-	-
42.27	бисаболол оксид B	0.82 ±0.08	1.18 ±0.09	0.96 ±0.11	1.41 ±0.12	3.61 ±0.25	1.88 ±0.13	2.64 ±0.18	3.53 ±0.27	16.45 ±1.02	2.65 ±0.17	0.94 ±0.09
42.92	бисаболон оксид	0.11 ±0.02	0.49 ±0.05	0.25 ±0.03	0.49 ±0.05	5.23 ±0.32	2.07 ±0.16	2.81 ±0.17	3.79 ±0.26	6.74 ±0.52	1.94 ±0.15	0.66 ±0.07
43.86	7-метоксикумарин	49.05 ±1.12	42.13 ±1.58	47.06 ±1.25	46.12 ±1.96	28.80 ±1.95	31.34 ±2.54	35.66 ±2.16	35.16 ±1.98	-	58.12 ±2.96	61.78 ±3.48
43.89	хамазулен	30.03 ±2.59	38.72 ±3.25	39.07 ±3.14	33.88 ±2.52	25.11 ±1.48	22.69 ±1.95	18.84 ±1.24	13.54 ±0.96	-	2.82 ±0.22	12.93 ±0.65
44.16	бисаболол оксид A	12.80 ±1.11	11.55 ±0.98	9.69 ±0.92	11.58 ±0.97	11.58 ±1.12	10.46 ±1.14	13.50 ±1.46	20.87 ±1.95	46.43 ±3.15	7.73 ±0.81	9.05 ±0.76
46.26	ен-ин-дициклоэфир	0.95 ±0.11	0.81 ±0.08	0.54 ±0.05	0.91 ±0.09	16.71 ±1.56	20.20 ±1.95	19.01 ±1.54	14.25 ±0.98	15.32 ±1.18	17.95 ±1.12	8.35 ±0.79
46.44	ен-ин-дициклоэфир - изомер	0.62 ±0.06	0.31 ±0.03	0.24 ±0.03	0.43 ±0.04	3.59 ±0.28	3.59 ±0.31	2.26 ±0.21	3.06 ±0.29	15.06 ±1.43	3.93 ±0.25	2.06 ±0.21
47.21	гексадекановая кислота	0.32 ±0.03	-	0.16 ±0.02	0.08 ±0.02	0.21 ±0.03	0.95 ±0.09	1.93 ±0.16	-	-	-	-
47.55	этилгексадеканоат	-	-	-	0.53 ±0.05	0.08 ±0.02	0.54 ±0.05	0.11± 0.02	-	-	1.29 ±0.11	-
48.86	фитол	-	-	-	0.07 ±0.02	0.07 ±0.02	-	-	-	-	-	-

Продолжение таблицы 37

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
49.12	9,12-октадекандиеновая кислота	-	-	-	-	2.26 ±0.19	-	-	-	-	-	-
49.35	этилоктадекандиеноат	-	-	-	0.91 ±0.09	1.27 ±0.12	0.17 ±0.02	0.26 ±0.03	0.33 ±0.03	-	3.35 ±0.28	1.09 ±0.09
49.64	этилоктадеканат	-	-	0.13±	0.17±	0.41±	0.09±	-	-	-	-	-
50.36	2(1H)октагидро-4а-фенилнафталенон	3.23 ±0.31	3.89 ±0.35	1.91 ±0.17	1.79 ±0.15	2.34 ±0.21	2.94 ±0.27	1.85 ±0.16	1.54 ±0.14	-	-	1.37 ±0.14
52.22	матрикарин	2.09 ±0.19	-	-	1.08 ±0.11	1.02 ±0.85	2.57 ±0.22	1.16 ±0.12	-	-	-	0.96 ±0.09
65.73	стигмастерол	-	-	-	-	0.05 ±0.02	0.85 ±0.09	0.28 ±0.03	0.94 ±0.09	-	-	-
67.25	β-ситостерол	-	-	-	-	0.07 ±0.02	0.41 ±0.04	0.35 ±0.04	0.51 ±0.05	-	-	-
68.15	β-амирин	-	-	-	-	-	0.13 ±0.02	0.26 ±0.03	0.82 ±0.09	-	-	-
72.35	бетулин	-	-	-	-	0.06 ±0.02	0.35 ±0.06	0.86 ±0.09	1.47 ±0.13	-	-	-
72.77	3β-О-цинамоил лупеол	-	-	-	-	-	-	0.92 ±0.09	1.96 ±0.19	-	-	-



Таблица 38 – Масса извлекаемых ЛОС «ромашки аптечной» мкг/г растительного сырья

ЛОС	Содержание ЛОС, $\bar{w} \pm \Delta$ , n=5, P=0.95 мкг/г растительного сырья										
	ЭСВ 150°C 5МПа	ЭСВ 200°C 5МПа	ЭЭ 10% 150°C 5МПа	ЭЭ 10% 200°C 5МПа	ЭЭ 50% 150°C 5МПа	ЭЭ 50% 200°C 5МПа	ЭЭ 70% 150°C 5МПа	ЭЭ 70% 200°C 5МПа	ЭВ 95°C 0.1 МПа	ЭЭ 50% 25°C 0.1 МПа	ЭЭ 70% 25°C 0.1 МПа
хамазулен	157.11 ±1.62	55.41 ±0.91	83.62 ±2.74	158.95 ±6.38	229.81 ±4.62	174.81 ±5.17	156.55 ±3.29	192.24 ±3.92	-	135.93 ±3.51	117.81 ±3.45
$S(w)$ , мкг/г	1.29	0.72	2.20	5.13	3.71	4.16	2.65	3.15	-	2.82	2.77
$S_r(w)$	0.01	0.01	0.03	0.03	0.02	0.02	0.02	0.02	-	0.02	0.02
бисаболол оксид А	184.8 ±1.9	74.25 ±2.62	102.13 ±3.14	142.38 ±5.92	293.16 ±5.32	220.35 ±6.87	262.25 ±4.61	198.16 ±4.18	73.72 ±2.14	119.15 ±3.23	110.15 ±2.96
$S(w)$ , мкг/г	1.53	2.11	2.52	4.76	4.28	5.52	3.71	3.36	1.72	2.59	2.38
$S_r(w)$	0.01	0.03	0.02	0.03	0.01	0.03	0.01	0.02	0.02	0.02	0.02
7- метоксикумарин	2021.9 ±2.6	751.5 ±5.1	802.6 ±6.9	1824.6 ±10.3	3012.2 ±10.5	2492.7 ±10.2	3839.2 ±10.9	3234.5 ±12.9	-	814.7 ±5.8	1859.1 ±7.9
$S(w)$ , мкг/г	2.1	4.1	5.6	8.3	8.4	8.2	8.7	10.4	-	4.7	6.4
$S_r(w)$	0.001	0.005	0.007	0.500	0.003	0.003	0.002	0.003	-	0.006	0.003

Количественный анализ основных ЛОС полученных экстрактов показал, что традиционные способы экстракции менее эффективны по сравнению с экстракцией горячими растворителями под давлением. Также выявлено существенное влияние температуры на выход ЛОС «ромашки аптечной» (табл. 38). Обнаружено, что при использовании воды и 50 и 70% водно-этанольных растворов в качестве экстрагента при повышенной температуре и давлении, количество извлекаемых ЛОС существенно уменьшается при повышении температуры процесса со 150 до 200°C. В работе [131] говорится о деструктивном действии температуры на ЛОС «ромашки аптечной» при проведении экстракции при повышенных температуре и давлении, и оптимальной температурой процесса выбрана температура 150°C, однако в этой работе в качестве экстрагента использовалась только субкритическая вода. Возможность разрушения ЛОС «ромашки аптечной» при температуре процесса 200°C, опровергает тот факт, что при использовании в качестве экстрагента 10% водно-этанольной смеси зависимость приобретает обратный характер, и количество извлекаемых ЛОС увеличивается при 200°C. Следовательно, уменьшение извлечения ЛОС цветов «ромашки аптечной» при повышении температуры процесса является следствием изменения свойств растворителя, а не деструктивным воздействием температуры. Экстракция ЛОС посредством субкритической воды при 150°C и 5 МПа достаточно эффективна. Масса извлекаемого бисаболол оксида А в ЭСВ 150°C 5 МПа сопоставима с его содержанием в ЭЭ 70% 200°C 5МПа и составляет 63% от максимального при ЭЭ 50% 150°C 5 МПа. Масса извлекаемого в ЭСВ150°C 5 МПа хамазулена сопоставима с его содержанием в ЭЭ 10% 200°C 5МПа и ЭЭ 70% 150°C 5МПа, составляет 69% от максимального при ЭЭ 50% 150°C 5 МПа.

Количество извлекаемого 7-метоксикумарина при ЭСВ 150°С 5 МПа значительно выше чем при ЭСВ 200°С 5 МПа, ЭЭ 10% 150°С 5 МПа и ЭЭ 10% 200°С 5 МПа и составляет 53% от максимального извлечения при ЭЭ 70% 150°С 5 МПа. Кроме этого ЭСВ 150°С 5 МПа значительно эффективнее традиционных видов экстракции как с помощью воды, так и посредством водно-этанольных смесей. Это говорит о перспективном использовании субкритической воды при 150°С и давлении 5 МПа для извлечения ЛОС «цветов ромашки аптечной». Систематическая погрешность определения данных компонентов не превышала 0.01.

Для получения общего ораза объекта в виде ГХ-МС-хроматографического профиля необходимо выбрать самый представительный по всем компонентам экстракт. Целесообразнее предпочесть ЭЭ 50% 150°С 5 МПа, хотя количество 7-метоксикумарина в этом экстракте составляет 78.46 % от максимального, однако при этом хамазулена и бисаболол оксида А извлекается больше, чем при других типах экстракции.

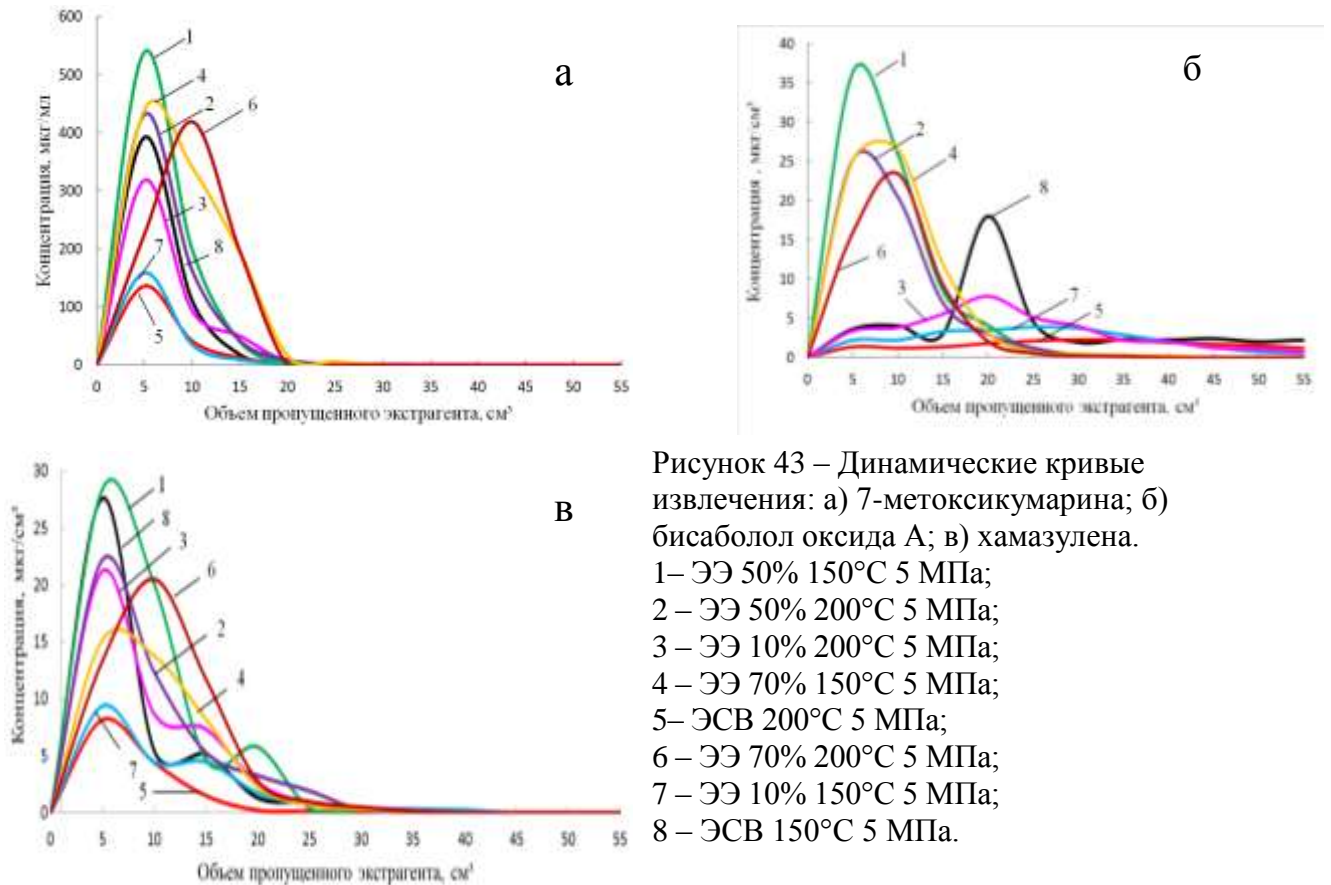


Рисунок 43 – Динамические кривые извлечения: а) 7-метоксикумарина; б) бисаболол оксида А; в) хамазулена.

- 1 – ЭЭ 50% 150°С 5 МПа;
- 2 – ЭЭ 50% 200°С 5 МПа;
- 3 – ЭЭ 10% 200°С 5 МПа;
- 4 – ЭЭ 70% 150°С 5 МПа;
- 5 – ЭСВ 200°С 5 МПа;
- 6 – ЭЭ 70% 200°С 5 МПа;
- 7 – ЭЭ 10% 150°С 5 МПа;
- 8 – ЭСВ 150°С 5 МПа.

При изучении динамики экстракции 7-метоксикумарина установлено, что его максимальная концентрация достигается уже в первых 5 см<sup>3</sup> экстракта (1 фракция, 3 мин экстракции). Но при использовании в качестве экстрагента 70% раствора этанола в воде при 200°С 5 МПа, максимум извлечения смещается во вторую фракцию (6 мин экстракции) (рис. 43-а).

Похожая картина наблюдается при экстракции хамазулена и бисаболол оксида А (рис. 43-б, в). Но при экстракции хамазулена для ЭСВ 150°C 5 МПа, ЭЭ 10% 150°C 5 МПа, ЭЭ 10% 200°C 5 МПа, ЭЭ 50% 150°C 5 МПа на кривых извлечения наблюдается второй максимум, который в зависимости от экстрагента соответствует 15 или 20 см<sup>3</sup> экстрагента (9 или 12 мин экстракции). Для бисаболол оксида А второй максимум наблюдается в ЭСВ 150°C 5 МПа и ЭЭ 10% 200°C, соответствующий 20 см<sup>3</sup> пропущенного экстрагента (12 мин экстракции). Процесс экстракции проходит в довольно агрессивных условиях, при которых разрушается структура растения, и второй максимум на кривых извлечения говорит как раз о разрушении более устойчивых структур растения и выходе в экстракт новой порции ЛОС.

При использовании в качестве экстрагента 50 и 70% водно-этанольных смесей полное извлечение ЛОС «ромашки аптечной» достигается на 12 минуте процесса, в отличие от экстрактов «эвкалипта прутовидного», где практически полное извлечение компонентов достигается на 25 минуте процесса. Таким образом, экстракция при повышенном давлении и температуре водно-этанольными смесями позволяет сократить время экстракции ЛОС «ромашки аптечной» до 12 минут, тогда как при традиционных способах экстракции этот процесс занимает от нескольких часов до нескольких суток.

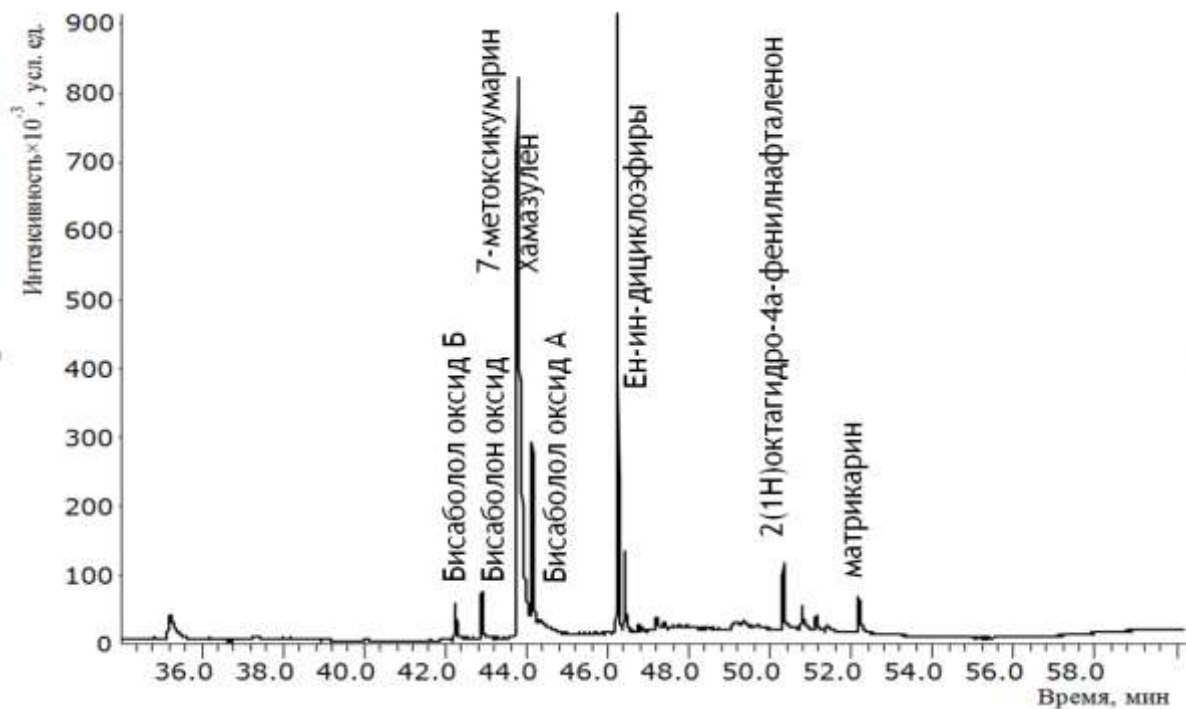


Рисунок 44 – Характерный хроматографический профиль ЭЭ 50% 150°C 5 МПа «ромашки аптечной», полученный методом ГХ-МС.

Таким образом, для получения общего обараза объекта в виде ГХ-МС-хроматографического профиля необходимо отбирать первые 5 см<sup>3</sup> ЭЭ 50% 150°C 5 МПа,

получаемого в динамическом режиме. Характерный хроматографический профиль в данном случае имеет вид, представленный на рисунке 44. На хроматографическом спектре плохо разделяются 7-метоксикумарин, хамазулен и бисаболол оксид А, для устранения этого необходимо использовать более длинную колонку и, вероятно, с другой НФ, потому что варьирование режима программирования температуры не дало никаких результатов.

Соотношение ЛОС «цветов ромашки аптечной» характерного хроматографического профиля представлено в таблице 39. ОСКО соотношения компонентов составляет в среднем 0.05.

Таблица 39 – Соотношение компонентов характерного хроматографического профиля ЭЭ 50% 150°C 5 МПа, полученного методом ГХ-МС

Время удерживания, мин	Индекс удерживания, $I_i^T$	ЛОС	Относительное содержание ЛОС, % $\bar{A}_i \pm \Delta$ , n=5, P=0.95	СКО, S(A), %	ОСКО $S_r(A)$
1	2	3	4	5	6
42.27	1661±2	бисаболол оксид Б	1.93±0.09	0.07	0.04
42.92	1690±2	бисаболон оксид	2.23±0.15	0.12	0.05
43.79	1709±2	7-метоксикумарин	39.23±0.95	0.76	0.02
43.88	1721±2	хамазулен	17.79±1.05	0.84	0.05
44.16	1731±2	бисаболол оксид А	7.90±0.52	0.42	0.05
46.26	1831±2	ен-ин-дициклоэфир	21.94±1.13	0.91	0.04
46.433	1833±2	ен-ин-дициклоэфир-изомер	3.31±0.29	0.23	0.07
50.34	2270±2	2(1H)октагидро-4а-фенилнафталенон	3.05±0.21	0.17	0.06
52.19	2379±2	матрикарин	2.72±0.19	0.15	0.06

В связи с невозможностью использовать для идентификации «ромашки аптечной» хроматографического спектра, полученного методом ПФА, была проведена жидкостная экстракция в оптимизированных условиях образцов «ромашки аптечной» разных производителей: Самарского Ботанического сада (Самара), ООО «Красногорсклексредства» (КЛС 2014), ООО «Фитофарм» ПКФ. При ГХ-МС анализе полученных экстрактов установлено сходство соотношения доминирующих компонентов хроматографического спектра (табл. 40). Статистическая обработка генеральной совокупности показала, что ОСКО находится в пределах 0.04. Обработка полученных результатов методом главных компонент предствила данные единой группой (рис. 45), следовательно, хроматографический профиль ЭЭ 50% 150°C 5 МПа «ромашки аптечной», полученный методом ГХ-МС, может использоваться в качестве общего образа цветов «ромашки аптечной».

Таблица 40 – Соотношение компонентов хроматографических спектров «ромашки аптечной» разных производителей

Образец	Относительное содержание ЛОС, % $A_i \pm \Delta$ , n=5, P=0.95							
	бисаболол оксид Б	бисаболон оксид	7- метоксикумари н	хамазулен	бисаболол оксид А	ен-ин- дициклоэфир	ен-ин- дициклоэфир- изомер	матрикарин
Самара	1.99	2.19	39.72	17.29	7.81	21.98	3.31	2.66
Самара	1.95	2.21	39.56	17.73	7.83	21.87	3.35	2.68
Самара	1.93	2.2	38.99	18.01	8.05	21.89	3.26	2.76
Самара	1.85	2.35	38.72	18.33	7.88	21.95	3.57	2.79
Самара	1.92	2.18	39.14	17.59	7.95	21.99	3.49	2.69
$\bar{A}_i \pm \Delta$ , n=5, P=0.95	1.93 $\pm 0.06$	2.23 $\pm 0.09$	39.23 $\pm 0.51$	17.79 $\pm 0.49$	7.90 $\pm 0.12$	21.94 $\pm 0.06$	3.40 $\pm 0.16$	2.72 $\pm 0.07$
$S(A)$	0.05	0.07	0.41	0.40	0.10	0.05	0.13	0.06
$S_r(A)$	0.03	0.03	0.01	0.02	0.01	0.003	0.04	0.02
КЛС 2014	1.96	2.25	39.25	17.73	7.91	21.91	3.41	2.59
КЛС 2014	1.89	2.28	39.13	17.62	7.79	21.95	3.39	2.69
КЛС 2014	1.92	2.34	38.89	18.02	8.01	21.98	3.58	2.71
КЛС 2014	1.84	2.38	38.88	17.83	7.93	21.92	3.38	2.72
КЛС 2014	1.87	2.45	37.95	18.06	7.89	21.99	3.43	2.75
$\bar{A}_i \pm \Delta$ , n=5, P=0.95	1.90 $\pm 0.06$	2.34 $\pm 0.10$	38.82 $\pm 0.63$	17.85 $\pm 0.24$	7.91 $\pm 0.10$	21.95 $\pm 0.05$	3.44 $\pm 0.10$	2.69 $\pm 0.07$
$S(A)$	0.05	0.08	0.51	0.19	0.08	0.04	0.08	0.06
$S_r(A)$	0.02	0.03	0.01	0.01	0.01	0.002	0.02	0.02
Фитофарм	1.99	2.41	38.92	17.32	8.02	21.87	3.59	2.82
Фитофарм	1.91	2.29	39.18	17.84	7.93	21.96	3.42	2.63
Фитофарм	1.93	2.38	39.05	17.72	7.83	21.99	3.52	2.61
Фитофарм	1.83	2.19	39.05	17.87	7.84	21.93	3.23	2.57
Фитофарм	1.92	2.21	38.99	17.82	7.91	21.91	3.44	2.49
$\bar{A}_i \pm \Delta$ , n=5, P=0.95	1.92 $\pm 0.07$	2.29 $\pm 0.11$	39.04 $\pm 0.11$	17.71 $\pm 0.29$	7.91 $\pm 0.10$	21.93 $\pm 0.06$	3.44 $\pm 0.17$	2.62 $\pm 0.15$
$S(A)$	0.06	0.09	0.09	0.23	0.08	0.05	0.14	0.12
$S_r(A)$	0.03	0.04	0.003	0.01	0.01	0.002	0.04	0.05
$\mu$ , n=15, P=0.95	1.91 $\pm 0.03$	2.29 $\pm 0.05$	39.03 $\pm 0.22$	17.79 $\pm 0.15$	7.91 $\pm 0.04$	21.94 $\pm 0.02$	3.42 $\pm 0.06$	2.68 $\pm 0.05$
$\sigma(A)$	0.05	0.09	0.39	0.27	0.08	0.04	0.11	0.09
$\sigma_r(A)$	0.03	0.04	0.01	0.02	0.01	0.002	0.03	0.03

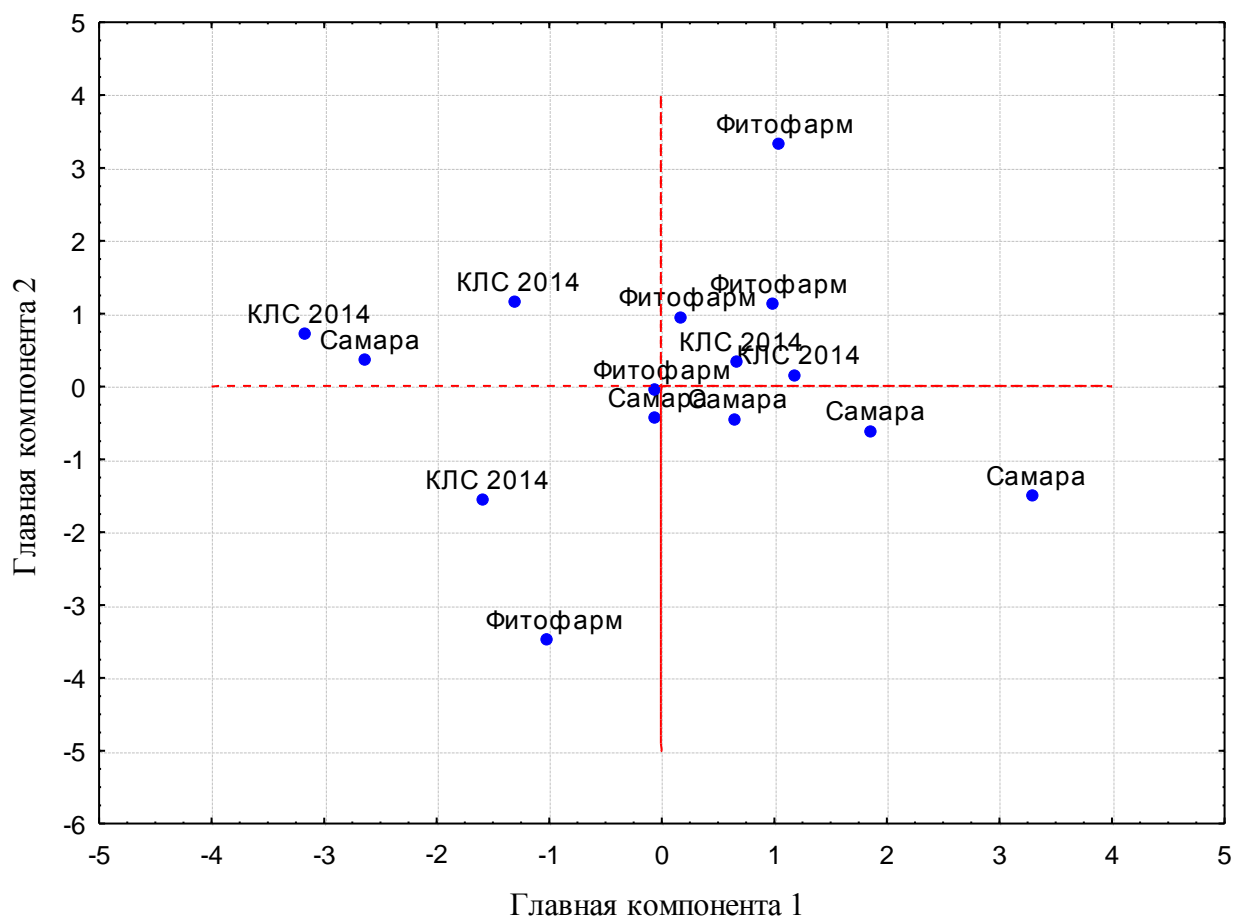


Рисунок 45 – График в координатах главных компонент для ЭЭ 50% 150<sup>0</sup>С 5 МПа «цветов ромашки аптечной» производства Самарского Ботанического сада (Самара), ООО «Красногорсклексредства» (КЛС 2014), ООО «Фитофарм» ПКФ.

#### Выводы.

ГХ-МС анализ жидких экстрактов «ромашки аптечной» показал, что для получения общего образа объекта в виде ГХ-МС-хроматографического профиля целесообразно проводить процесс экстракции при 150<sup>0</sup>С 5 МПа в динамическом режиме, в качестве экстрагента использовать 50 % раствор этанола в воде, а для ГХ-МС анализа отбирать первые 5 см<sup>3</sup> экстракта.

В связи с тем, что наиболее эффективное извлечение ЛОС «ромашки аптечной», происходит при 150<sup>0</sup>С и давлении 5 МПа, но при использовании водно-этанольных смесей с разным содержанием этанола мы рекомендуем проводить экстракцию в градиентном режиме: увеличивая концентрацию этанола в экстрагенте с 50% до 70%.

Хроматографический спектр, полученный при ГХ-МС анализе ЭЭ 50% 150<sup>0</sup>С 5 МПа может использоваться в качестве идентификационной характеристики «ромашки аптечной».

#### 4.7. ВЭЖХ анализ экстрактов цветов «ромашки аптечной»

В результате проведения ВЭЖХ анализа экстрактов «цветы ромашки аптечной» были получены хроматограммы, представленные в таблице 41. Исходя из данных УФ-спектрометрии, наиболее интенсивное поглощение происходит при длинах волн 210 нм, 254, 330 – 340. Учитывая специфичность поглощения экстрактов «ромашки аптечной» в области 330 – 340 нм, а также литературные данные [161], детектирование осуществлялось при длине волны 340 нм.

ВЭЖХ анализ полученных экстрактов «ромашки аптечной» выявил отсутствие рутина и кверцетина, которые по литературным данным являются компонентами данного растения [63,156]. Кроме этого литературный обзор по изучению компонентного состава «ромашки аптечной» показал, что лютеолин и апигенин, а также их гликозиды, являются характерными соединениями данного ЛР, также относятся к физиологически активным веществам [63, 152, 156, 160]. В таблице 42 приведены хроматограммы стандартных растворов лютеолина (время удерживания 40.7 мин) и апигенина (время удерживания 44.0 мин).

Таблица 41 – Хроматограммы, полученные при ВЭЖХ анализе субкритических экстрактов «ромашки аптечной»

Экстрагент	Условия получения экстрактов	
	150°C 5 МПа	200°C 5 МПа
1	2	3
Вода		
10% водно-этанольная смесь		

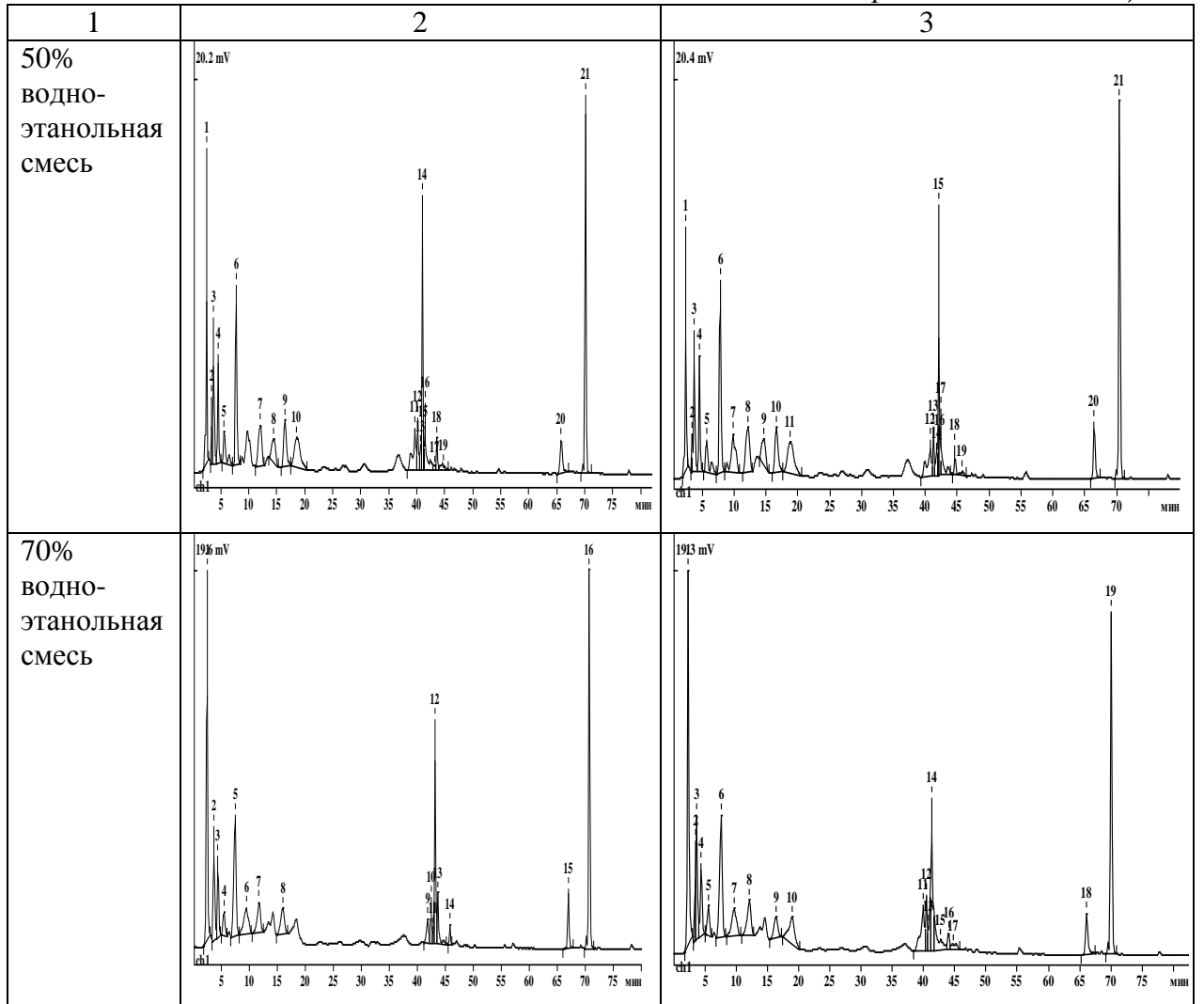
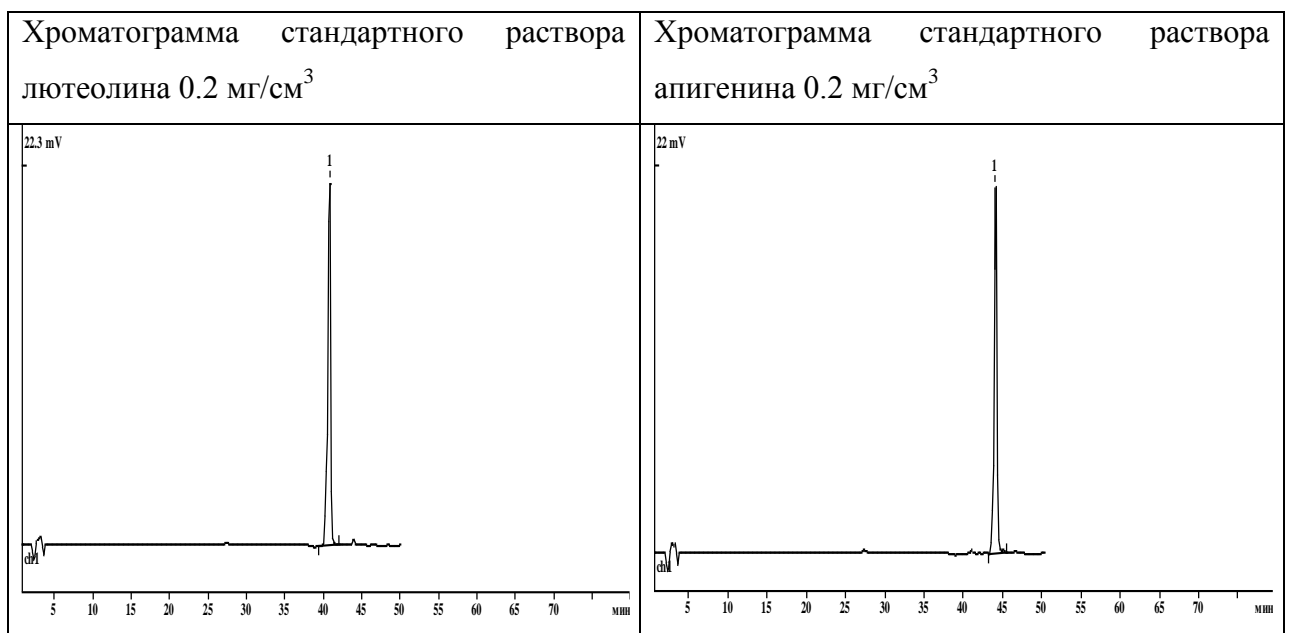


Таблица 42 – Хроматограммы стандартных растворов лютеолина и апигенина





Как показал количественный анализ, в полученных экстрактах «ромашки аптечной» содержание лютеолина максимально в ЭСВ 200°C 5МПа, апигенина – в ЭЭ 10% 200°C 5МПа (табл. 43), при этом содержание данных компонентов в экстрактах, приготовленных традиционными способами – ЭЭ 70% 25°C 0.1МПа, ЭЭ 50% 25°C 0.1МПа, ЭВ 95°C 0.1МПа – на два порядка ниже, чем в экстрактах, полученных при повышенных температуре и давлении. Кроме этого из данных, представленных в таблице 43, видно, что температура при повышенном давлении не приводит к деструкции компонентов, а является фактором изменения свойств растворителя. При использовании субкритической воды и 10% водно-этанольной смеси в качестве экстрагентов при повышении температуры экстракции со 150 до 200°C, количество извлекаемого лютеолина и апигенина увеличивается, в то время как при использовании в качестве экстрагентов 50 % водно-этанольной смеси прослеживается обратная тенденция. Помимо этого нужно отметить, что количество извлекаемого лютеолина при 150°C падает при модификации воды 10% этанола, но повышается при увеличении температуры экстракции 10% раствором этанола в воде до 200°C, для апигенина этой зависимости не наблюдается и при модификации воды 10 % этанола извлечение увеличивается. При экстракции 70% раствором этанола в воде при повышенных температуре и давлении с увеличением температуры количество извлекаемого лютеолина уменьшается, а апигенина – увеличивается. Все это говорит о сильном влиянии на извлечение БАС «цветов ромашки аптечной» свойств растворителя, изменяющихся при повышенных температурах и давлении и при модификации этанолом. Систематическая погрешность определения апигенина составляет 0.01, а лютеолина – 0.02.

Таблица 43 – Общий выход лютеолина и апигенина в полученных экстрактах.

	Масса извлеченных БАС, $\bar{x} \pm \Delta$ , n=5, P=0.95, мг										
	ЭЭ 70% 150°C 5МПа	ЭЭ 70% 200°C 5МПа	ЭЭ 50% 150°C 5МПа	ЭЭ 50% 200°C 5МПа	ЭЭ 10% 150°C 5МПа	ЭЭ 10% 200°C 5МПа	ЭСВ 150°C 5МПа	ЭСВ 200°C 5МПа	ЭЭ 70% 25°C 0.1 МПа	ЭЭ 50% 25°C 0.1 МПа	ЭВ 95°C 0.1 МПа
Лютеолин	1.82 ±0.11	1.66 ±0.12	2.15 ±0.15	2.01 ±0.14	1.44 ±0.06	2.28 ±0.11	2.03 ±0.09	2.38 ±0.13	0.03 ±0.01	0.020 ±0.005	0.010 ±0.005
$S(x)$ , мг	0.09	0.10	0.12	0.11	0.05	0.09	0.07	0.11	0.01	0.004	0.004
$S_r(x)$	0.05	0.06	0.06	0.06	0.03	0.04	0.04	0.04	0.27	0.20	0.40
Апигенин	0.15 ±0.01	0.35 ±0.02	1.08 ±0.05	0.49 ±0.02	1.37 ±0.06	2.26 ±0.12	0.72 ±0.03	1.06 ±0.05	0.004 ±0.001	0.01 ±0.005	0.01 ±0.005
$S(x)$ , мг	0.01	0.02	0.04	0.02	0.05	0.10	0.02	0.04	0.001	0.004	0.004
$S_r(x)$	0.05	0.06	0.04	0.03	0.04	0.04	0.03	0.04	0.20	0.40	0.40

Исходя из данных таблицы 43, наилучшим экстрагентом для одновременного извлечения лютеолина и апигенина является 10% водно-этанольная смесь при температуре 200°C и давлении 5 МПа, при этом лютеолин извлекается на 95 % от максимального при ЭСВ 200°C 5 МПа, следовательно, данный тип экстракции необходимо выбирать для получения характерного ВЭЖХ-хроматографического пспектра.

Изучение динамики извлечения лютеолина и апигенина (рис. 46) показало, что при использовании в качестве экстрагента субкритической воды при 200°C максимум извлечения лютеолина приходится на шестую минуту экстракции (10 см<sup>3</sup> экстрагента), для других экстрагентов максимум извлечения соответствует прохождению 5 см<sup>3</sup> экстрагента, что соответствует третьей минуте экстракции. При рассмотрении динамических кривых апигенина, можно отметить, что для ЭСВ 150°C 5 МПа и ЭЭ 10% 200°C 5 МПа максимум извлечения приходится на третью минуту процесса экстракции, а для остальных растворителей на шестую минуту процесса (10 см<sup>3</sup> экстрагента). Динамические кривые извлечения апигенина демонстрируют непригодность 70% водно-этанольной смеси при повышенных температуре и давлении для его извлечения, поскольку процесс сильно растянут во времени, и по данным таблицы 43 апигенина при этом извлекается меньше всего. Практически полное извлечение апигенина и лютеолина из «ромашки аптечной» происходит в первые 12 минут процесса, т.е. после прохождении 20 см<sup>3</sup> экстрагента.

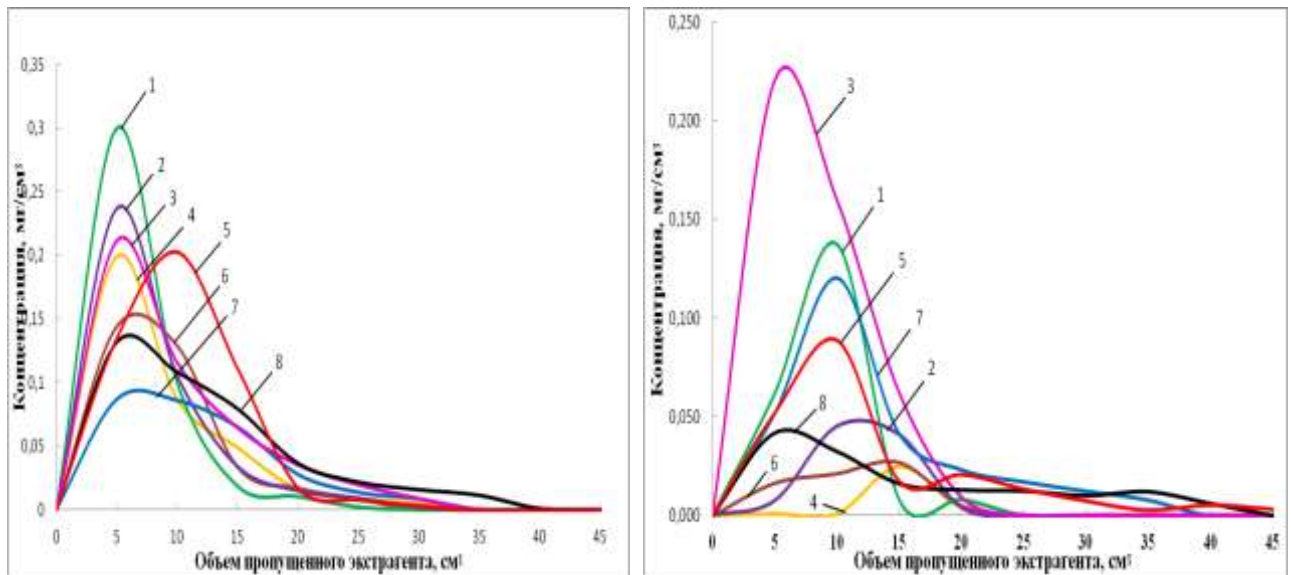


Рисунок 46 – Динамические кривые экстракции: а) лютеолина; б) апигенина. 1– ЭЭ 50% 150°C 5 МПа; 2 – ЭЭ 50% 200°C 5 МПа; 3 – ЭЭ 10% 200°C 5 МПа; 4 – ЭЭ 70% 150°C 5 МПа; 5– ЭСВ 200°C 5 МПа; 6 – ЭЭ 70% 200°C 5 МПа; 7 – ЭЭ 10% 150°C 5 МПа; 8 – ЭСВ 150°C 5 МПа.

**Выводы.** ВЭЖХ анализ экстрактов «ромашки аптечной» показал, что наиболее представительная хроматограмма, а также оптимальное извлечение лютеолина и

апигенина соответствует ЭЭ 10% 200°C 5 МПа, согласясь с результатами определения сухого остатка.

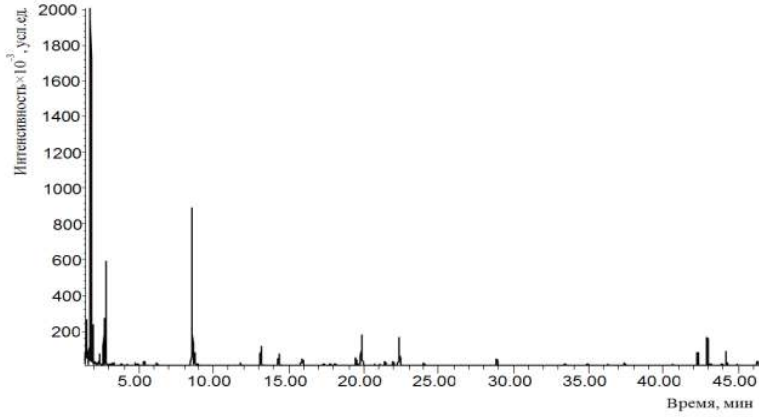

Применение субкритической воды при 200°C 5 МПа оправдано, если целевым продуктом является лютеолин.

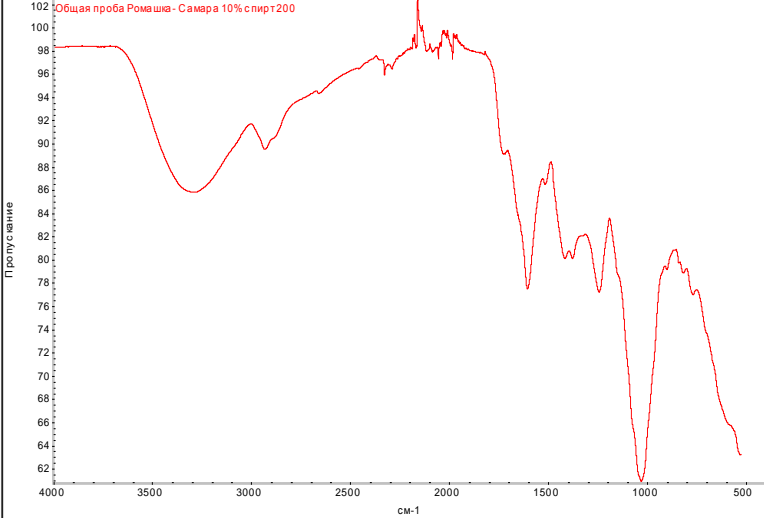
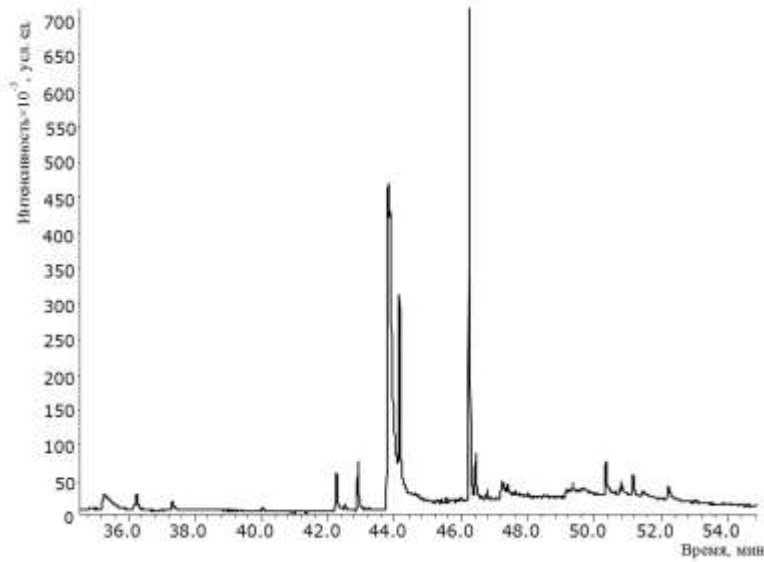
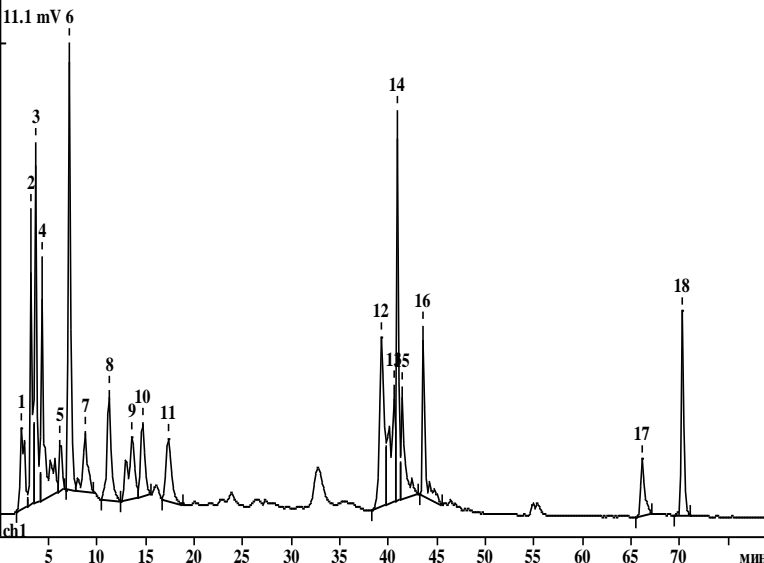
Практически полное извлечение всех БАС наблюдается после прохождения 20 см<sup>3</sup> экстрагента, т.е. на 12 минуте процесса динамической экстракции при повышенных температуре и давлении, максимум извлечения БАС «ромашки аптечной» приходится на первые 5 см<sup>3</sup> получаемого экстракта.

Для получения общего образа объекта в виде ВЭЖХ-хроматографического профиля рекомендуется отбирать начальные 5 см<sup>3</sup> ЭЭ 10% 200°C 5 МПа.

В таблице 44 приведены полученные разными методами характерные хроматографические и спектроскопические профили цветов «ромашки аптечной», выращенной в Ботаническом саду г. Самары, которые могут использоваться в виде общего образа данного растительного сырья.

Таблица 44 – Характеристические спектры «ромашки аптечной»

Тип характеристического спектра	Характеристический спектр	Вид экстракта «ромашки аптечной»
1	2	3
ПФА-ГХ-МС		Газовый экстракт
УФ		ЭЭ 70% 150°C 5 МПа

1	2	3
ИК		ЭЭ 10% 200°C 5 МПа
ГХ-МС		ЭЭ 70% 150°C 5 МПа
ВЭЖХ		ЭЭ 10% 200°C 5 МПа

По имеющимся данным оценка лекарственных растений по характерным хроматографическим спектрам является надежным методом видовой идентификации. На основании этого, а также результатов определения основных терпеноидных и ароматических соединений и оценки воспроизводимости хроматографических спектров различных экстрактов «ромашки аптечной» и «эвкалипта прутовидного», был разработан комплексный подход к идентификации ЛР хроматографическими методами (рис. 47), согласно которому, с использованием различных способов пробоподготовки должны быть получены хроматографические спектры летучих и нелетучих органических соединений цветов «ромашки аптечной» и листьев «эвкалипта прутовидного», а также идентифицированы основные терпеноидные и ароматические соединения изучаемых ЛР. Выше приведены оптимальные условия экстрагирования летучих и нелетучих терпеноидных и ароматических соединений изучаемых ЛР для получения характерных хроматографических спектров. При отсутствии совпадений требуется идентификация другими методами. Для применения данного подхода к идентификации растений необходимо иметь базу данных общих образов объектов в виде характерных хроматографических спектров, как летучих, так и нелетучих БАС. Полученные при исследовании идентификационные характеристики «ромашки аптечной» и «эвкалипта прутовидного» могут использоваться в базе данных характерных хроматографических спектров.

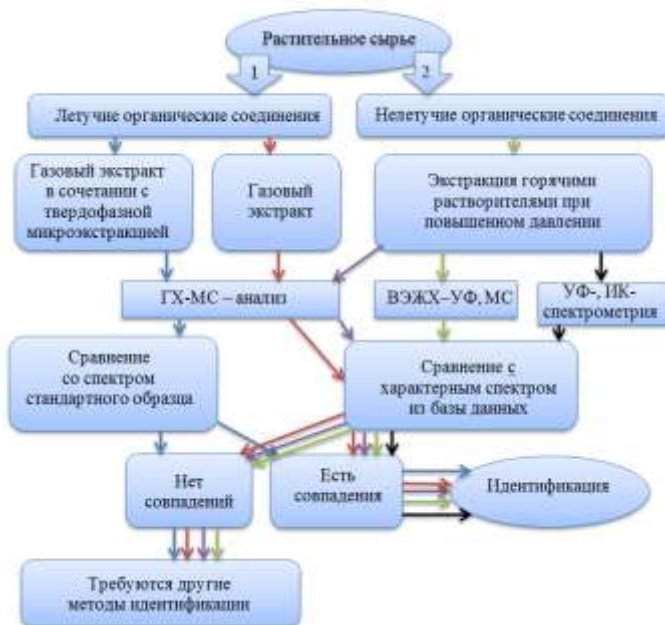


Рисунок 47 – Схема проведения идентификации растений по характерным хроматографическим и спектрометрическим профилям.

**ВЫВОДЫ:**

1. На основании оценки эффективности извлечения компонентов из растительной матрицы установлены оптимальные условия пробоподготовки ЛР для проведения парофазного анализа: масса сухого растительного сырья – 1 г, температура термостатирования пробы – 100°C, время термостатирования – 30 мин.

2. Методом хромато-масс-спектрометрии в газовом экстракте цветов «ромашки аптечной» при прямом ПФА идентифицировано 45 соединений, с применением ТФМЭ – 90 компонентов; в газовом экстракте листьев «эвкалипта прутовидного» при прямом ПФА идентифицировано 76 компонентов, с применением ТФМЭ – 132. Большинство соединений относится к терпеноидам. Установлены терпеноидные и ароматические соединения, определяющие характерный хроматографический спектр исследуемых ЛР.

3. Показано, что характерный хроматографический спектр, полученный при ПФА газового экстракта цветов «ромашки аптечной», является надежной характеристикой партии ЛР, но не может использоваться в качестве общего образа объекта, в то время как в отношении листьев «эвкалипта прутовидного» доказана возможность использования хроматографического спектра ЛОС газового экстракта, в качестве общего образа листьев «эвкалипта прутовидного».

4. Установлено, что сорбционные микротрубки на основе инъекционных игл могут использоваться в качестве образцов состава ЛОС изучаемых ЛР. В качестве сорбентов для концентрирования ЛОС цветов «ромашки аптечной» могут применяться Porapak Q, Carborack B, MN-202, Haye Sep N и Tenax TA, а для ЛОС листьев «эвкалипта прутовидного» – Haye Sep N, MN-202 и Porapak Q. Срок хранения сорбционных микротрубок на основе инъекционных игл с ЛОС составляет на данный момент 12 месяцев.

5. Предложено проводить извлечение терпеноидных и ароматических соединений ЛР водно-этанольными смесями при повышенном давлении и температуре в динамическом режиме. Использование для извлечения субкритической воды при температуре 200°C и давлении 5 МПа оправдано, если целевыми продуктами являются 1,8-цинеол, лютеолин. Установлено, что чем больше этанола содержит экстрагент, тем быстрее происходит извлечение целевых компонентов. Наиболее эффективная экстракция физиологически активных компонентов листьев «эвкалипта прутовидного» осуществляется при ЭЭ 70% 200°C 5 МПа. Максимальное извлечение нелетучих физиологически активных компонентов цветов «ромашки аптечной» наблюдается при экстракции 10% раствором этанола в воде при 200°C и давлении 5 МПа. Оптимальное

извлечение летучих физиологически активных компонентов «ромашки аптечной» происходит при ЭЭ 50% 150°C 5 МПа. При сравнении хроматографических спектров, полученных при ГХ-МС анализе ЭЭ 50% 150°C 5 МПа цветов «ромашки аптечной» разных производителей» установлено, что данная характеристика может использоваться в качестве общего образа цветов «ромашки аптечной».

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ

1. Газохроматографический анализ ромашки аптечной (*Chamomilla recutita R.*) / Л.В. Павлова, И.А. Платонов, В.Г. Архипов, В.А. Куркин, Рощупкина И.Ю. // Аналитика и контроль. – 2013. – Т.17, № 1. – С. 66 – 75.
2. Хромато-масс-спектрометрический анализ эвкалипта прутовидного (*Eucalypti viminalis labill*) с использованием различных способов пробоподготовки / Л.В. Павлова, И.А. Платонов, Е.А. Новикова, Н.В. Никитченко // Аналитика и контроль. – 2013. – Т.17, № 3. – С. 304 – 313.
3. Извлечение биологически-активных соединений растительного происхождения экстрагентами в субкритическом состоянии / И.А. Платонов, Л.В. Павлова, Е.А. Новикова, Н.В. Никитченко, И.Ю. Рощупкина // Физикохимия поверхности и защита материалов. – 2014. – Т.50, №6. – С.633 – 639.
4. Оценка эффективности извлечения летучих органических соединений эвкалипта прутовидного (*Eucalypti viminalis labill*) экстрагентами в субкритическом состоянии / Л.В. Павлова, И.А. Платонов, Н.В. Никитченко, Е.А. Новикова // Сверхкритические флюиды: теория и практика. – 2014. – Т.9, №4. – С. 12 – 21.
5. Субкритическая экстракция листьев эвкалипта прутовидного (*Eucalypti viminalis labill*) / Л.В. Павлова, И.А. Платонов, В.А. Куркин, Н.В. Никитченко, И.И. Демиденко // Новые методы аналитической химии. Первая зимняя молодежная школа-конференция с международным участием. Сборник тезисов. – СПб.: Соло, 2013. – С.83.
6. Газохроматографический анализ подлинности и качества растительного сырья / И.А. Платонов, Л.В. Павлова, Е.А. Новикова, Н.В. Никитченко // [X Международное Курнаковское совещание по физико-химическому анализу: сборник трудов в 2 томах.](#) – Самара: Самар. гос. техн. ун-т. 2013. Т. 2. – С.279 – 283.
7. Извлечение биологически-активных соединений растительного происхождения экстрагентами в субкритическом состоянии / И.А. Платонов, Л.В. Павлова, Н.В. Никитченко, И.Ю. Рощупкина // Второй Всероссийский симпозиум с участием иностранных ученых «Кинетика и динамика обменных процессов» Тезисы докладов. 2 – 9 нояб. 2013 г. Краснодарский край, с. Дивноморское, 2013. – С.67.
8. Сочетание парофазного анализа и твердофазной микроэкстракции для определения летучих компонентов лекарственного растительного сырья и препаратов на его основе / И.А. Платонов, Л.В. Павлова, Н.В. Никитченко, Е.А. Новикова // Второй съезд аналитиков России. Тезисы докладов. Москва. 2013. – С.410.



9. Сорбционное микроконцентрирование летучих компонентов лекарственных растений / И.А. Платонов, Л.В. Павлова, И.С. Долинская, И.Ю. Рощупкина // Физико-химические основы ионообменных и хроматографических процессов: сборник материалов XIV Конференции и Третьего Всероссийского симпозиума с международным участием, г. Воронеж, 9-14 окт. 2014 г. – Воронеж: «Научная книга». 2014. – С. 251.

10. Павлова Л.В. Экстракционно-хроматографический анализ лекарственного растительного сырья / Л.В. Павлова, И.А. Платонов, Н.В. Никитченко // Всероссийская конференция «Теория и практика хроматографии». Самара. 2015. – С 68.

11. Хроматографический профиль как идентификационная характеристика лекарственного растительного сырья / И.А. Платонов, Л.В. Павлова, Н.В. Никитченко, А.Ю. Еменева // Всероссийская конференция «Теория и практика хроматографии». Самара. 2015. – С. 72.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Определение биологически активных фенолов и полифенолов в различных объектах методами хроматографии / М.В.Кочетова [и др.] // Успехи химии.- 2007. – Т.76, №1. – С. 88 – 100.
2. Марахова А.Г. Применение физико-химических методов в анализе настоев из сырья лекарственных растений семейства яснотковых. Автореф.дис. ... канд. фарм. наук: 15.00.02 / Марахова Анна Григорьевна. – Пермь, 2009. – 25 с.
3. Ткачев А.В. исследование летучих веществ растений / А.В.Ткачев – Новосибирск: Офсет. 2008. – 969 с.
4. Фармакопея СССР. Изд.11. Вып.2. М.: Медицина, 1989. – 216 с.
5. Химический анализ лекарственных растений: учебн. пособие для фармацевтических вузов / Е.Я.Ладыгина [и др.] [Под ред. Гринкевич Н.И., Сафронович Л.Н]. – М.: Высшая школа, 1983. – 176 с.
6. Recent advances in the compound-oriented and pattern-oriented approaches to the quality control of herbal medicines / Z. Zeng [et al.] // Chinese Medicine 2008. URL: <http://www.cmjournal.org/content/3/1/9> (дата обращения 20.04.2014).
7. Guidance for Industry Botanical Drug Products. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research (CDER) 2004. URL: <http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm> (дата обращения 23.03.2014).
8. Baochang Cai. High performance liquid chromatography fingerprinting technology of the commonly-used traditional chinese medicine herbs / Baochang Cai, Sheng Poon Hong, Xuan Hong Liu. / World Scientific Publishing Co, 2012. – P.371.
9. Фомина Н.В. Идентификация нефтей Самарской области по многомерному массиву данных. Автореф. дис. ... канд.хим.наук:02.00.02/ Фомина Наталья Валерьевна. – Самара, 2014. – 25с.
10. Золотов Ю.А. О некоторых тенденциях развития аналитической химии. / Ю.А.Золотов // Заводская лаборатория. Диагностика материалов. 2012. – Т. 78, № 9. – С. 5.
11. Виттенберг, А.Г. Газовая экстракция в хроматографическом анализе: парофазный анализ и родственные методы / А.Г.Виттенберг, Б.В. Иоффе – Л.: Химия, 1982. – 280с.
12. Рудакова Л.В. Востребованность хроматографических методов в контроле фармацевтической продукции / Л.В. Рудакова, А.М. Григорьев, О.Б. Рудаков // Всероссийская конференция «Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез». – Краснодар. – 2010 – С.27.

13. Карцова Л.А. Хроматографические и электрофоретические профили биологически активных соединений для диагностики различных заболеваний. / Л.А. Карцова, Е.В. Обьедкова // Журнал аналитической химии. – 2013. – Т.68, № 4. – С.316.
14. Headspace, volatile and semi-volatile organic compounds diversity and radical scavenging activity of ultrasonic solvent extracts from *Amorpha fruticosa* honey samples / I.Jerković [et al.] // *Molecules*. – 2009. – V.14. – P. 2717.
15. Volatile compounds of red and white wines by headspace–solid-phase microextraction using different fibers / J.Torrens [et al.] // *Journal of Chromatographic Science*. – 2004. – Vol. 42(6). – P. 310.
16. Marsili R. T. Shelf-Life Prediction of Processed Milk by Solid-Phase Microextraction, Mass Spectrometry, and Multivariate Analysis /R. T. Marsili // *J. Agric. Food Chem.* – 2000. – V. 48. – P. 3470.
17. HPLC analysis of methanolic extract of some medicinal plant leaves of Myrtaceae family / I.P.Tripathi [et al.] // *International Pharmaceutica Scientia*. – 2012. –V.2, issue 3. – P.49.
18. Chromatographic and spectral fingerprinting standartization of traditional medicines: an overview as modern tools / L. Giri [et al.] // *Research Journal of Phitochemistry*. –2010. –V.4(4). – P. 234.
19. Establishment of characteristic fingerprint chromatogram for the identification of chinese herbal medicines / S.K. Wong [et al.] // *Journal of Food and Drug Analysis*. 2004. – V. 12, №. 2. – P.110.
20. Nikam P.H. Future trends in standardization of herbal drugs / P. H. Nikam, J. Kareparamban, A. Jadhav, V. Kadam. // *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. –2012. – V.02 (06). – P.38.
21. Кузьменко А.Н. Определение карбоновых кислот в фармацевтических препаратах методом ионоэкслюзионной хроматографии. Автореф. дис. ... канд.хим.наук:02.00.02/ Кузьменко Алексей Николаевич. – М., 2004. – 25 с.
22. General Guidelines for Methodologies on Research and Evaluation of Traditional Medicine/ World Health Organization. Geneva. 2000. URL: [http://whqlibdoc.who.int/hq/2000/WHO\\_EDM\\_TRM\\_2000.1.pdf](http://whqlibdoc.who.int/hq/2000/WHO_EDM_TRM_2000.1.pdf) (дата обращения 15.04.2014)
23. Келнер Р. Аналитическая химия. Проблемы и подходы. В 2-х томах. / Р.Келнер, Ж.- М. Мерме, М.Отто, Г.М.Видмер // М.: АСТ. – 2004. Т.2. – с. 518.
24. Liang Y.Z. Quality control of herbal medicines / Y.Z. Liang, P.Xie, K.Chan // *J.Chromatography B*. – 2004. – V.812. – P. 53–70.
25. Future trends in standardization of herbal drugs / P.H. Nikam [et al.] // *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. – 2012. – V.02 (06). – P. 38.

26. Study on HPLC fingerprint chromatograms of *Arisaematis Rhizoma*/ F. Luo [et al.] // *China Journal of Chinese Materia Medica*. – 2011. – V. 36(23). – P. 3302.
27. Study on fingerprint chromatograms of extract of *cimicifugae rhizome* / B.Jin [et al.] // *China Journal of Chinese Materia Medica*. – 2011. – V.36(24). – P. 3475.
28. Research on chemical fingerprint chromatograms of *Sinopodophyllum hexandrum* / A.H. Wang [et al.] // *China Journal of Chinese Materia Medica*. – 2013. – V.38(20). – P.3528.
29. HPLC fingerprint study on *Chaenomelis fructus* and comparative study on different processed products / G.N.Wang [et al.] // *Journal of Chinese Medicinal materials*. – 2013. – V.36(11). – P.1758.
30. Chromatographic Fingerprinting of *Flos Chrysanthema Indici* Using HPLC. Application Note 207. URL: <http://www.dionex.com/en-us/webdocs/71823-AN207-HPLC-Flos%20Chrysanthema-14April09-LPN2092.pdf> (дата обращения 07.04.2014).
31. Study on fingerprint chromatograms of water-soluble constituents of *Salvia miltiorrhiza* Bge. by high performance liquid chromatography / X. Zhou [et al.] // *Chines journal of chromatography*. – 2005. – V. 23(3). – P.292.
32. Chromatographic fingerprint development for herbal extracts: a screening and optimization methodology on monolithic columns / G. Alaerts [et al.] // *J Chromatogr A*. – 2007. – V.1172(1). – P.1-8.
33. Hariprasad P. Chromatographic fingerprint analysis of *Rumex vesicarius* L. by HPTLC technique/ P.Hariprasad, N. Ramakrishnan // *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. – 2012. – №1. – P.57.
34. Lakshmi T. Chromatographic fingerprint analysis of *Acacia Catechu* Ethanolic leaf extract by HPTLC Technique / T.Lakshmi, R. Rajendran, N.Madhusudhanan // *Int. J. Drug Dev. & Res*. – 2012. – V.4, iss.1. – P.180.
35. Application of microemulsion thin layer chromatography for the fingerprinting of licorice (*Glycyrrhiza* spp.) / S. Cui [et al.] // *Journal of Chromatography B*. – 2005. – V. 828. – P. 33.
36. Identification and standardization of some herbal drugs, their extracts and marketed formulations by HPTLC fingerprinting / S. Parul [et al.] // *Journal of pharmaceutical and biomedical sciences*. – 2011. №6. – P. 1.
37. Chromatographic fingerprint analysis — a rational approach for quality assessment of traditional Chinese herbal medicine / P. Xie [et al.] // *Journal of Chromatography A*. – 2006. – №1112. – P. 171.
38. Quantitative and chromatographic fingerprint analysis of *embelia ribes churna* formulations by HPLC method / R.J. Sudani [et al.] // *IJPBA*. – 2011. – Vol. 2, Iss. 2. – P. 657.

39. Yong-Chun J. A novel high-performance liquid chromatography fingerprint approach to discriminate *Phyllostachys pubescens* from China / J. Yong-Chun, Yin Lin, Ke Yuan. // *Pharmacognosy Magazine*. – 2012. – V.8, Iss. 29. – P. 42.
40. Volatiles fingerprint of *Artemisia umbelliformis* subsp. *eriantha* by headspace-solid phase microextraction GC–MS / S. Reale [et al.]  
URL: <http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2013.825912> (дата обращения 19.03.2014).
41. Volatile fingerprint of Italian populations of orchids using solid phase microextraction and gas chromatography coupled with mass spectrometry / A. Manzo [et al.] // *Molecules*. – 2014. – V. 19(6). – P. 7913.
42. A comparison of methodical approaches to fingerprinting of the volatile fraction from Winter Savory (*Satureja Montana*) / J.Rzepa [et al.] // *Chromatography Research International*. – 2012. – V. 2012. – P. 1.
43. Comparative analysis of the chromatographic fingerprints of twenty different sage (*Salvia L.*) species / M. Daszykowski [et al.] // *Acta Chromatographica*. – 2009. – 21(4). – P.513.
44. Hierarchical Clustering of Commercial Chamomile Oil, A Quality Assessment Approach / A.R. Khattab [et al.] // *Egypt.J.Biomed.Sci*. – 2010. – V.34. – P.1.
45. Dejaegher B. Methodology to develop liquid chromatographic fingerprints for the quality control of herbal medicines / B. Dejaegher, G. Alaerts, N. Matthijs. // *Acta Chromatographica*. – 2010. – 22 (2). – P. 237.
46. Яшин Я.И. Высокоэффективная жидкостная хроматография. Состояние и перспективы / Я. И. Яшин, А. Я. Яшин // *Рос. хим. ж. (Ж. Рос. хим. об-ва им. Д.И. Менделеева)*. – 2003. – т.XLVII, № 1. – С.64.
47. Sirikatitham A. Development of the chromatographic fingerprint analysis of dioscorealides and dioscoreanone from *Dioscorea membranacea* Pierre / A.Sirikatitham, T.Chuchom, A.Itharat // *Songklanakarin J. Sci. Technol*. – 2007. – Vol.29 (1). – P.101.
48. Quality assurance for Chinese herbal formulae: standardization of IBS-20, a 20-herb preparation / Siu-Po Ip [et al.] // *Chinese Medicine*. – 2010. – 5:8. – URL: <http://www.cmjournal.org/content/5/1/8> (дата обращения 3.05.2014).
49. Critical value determination on similarity of fingerprints / F.Kai-Tai [et al.] // *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. – 2006. – V. 82. – P.236.
50. Feng Gan. New approach on similarity analysis of chromatographic fingerprint of herbal medicine/ Feng Gan, Runyi Ye // *Journal of Chromatography A*. – 2006. – №1104. – P. 100.

51. Tistaert C. Chromatographic separation techniques and data handling methods for herbal fingerprints: A review / B. Dejaeger, Y. Vander Heyden // *Analytica Chimica Acta*. – 2011. – V.690(2). – P. 148.
52. Chromatographic fingerprint analysis of *macrothelypteris torresiana* and simultaneous determination of several main constituents by LC / C.Xiong [et al.] // *Chromatogr.* – 2009. – V. 70. – P. 117.
53. Development of the chromatographic fingerprint of *Scutellaria barbata* D. Don by GC–MS combined with Chemometrics methods / Ruijing Pan [et al.] // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. –2011. – V. 55. – P. 391.
54. Development of fingerprints for quality control of *acorus* species by gas chromatography/mass spectrometry / Se Mi Yu [et al.] // *Bull. Korean Chem. Soc.* –2011. – V. 32, No. 5. – P.1547.
55. Сычев С.Н. Методы совершенствования хроматографических систем и механизмы удерживания в ВЭЖХ / С.Н. Сычев. – Орел: ОрелГТУ, 2000.– 212 с.
56. Верниковская Н.А. Хроматографическое определение фенольных соединений и флавоноидов в лекарственных растениях. Автореф. дис. ... канд.хим.наук: 02.00.02 / Верниковская Наталья Андреевна. – Краснодар, 2011. – 23 с.
57. Эсбенсен К. Анализ многомерных данных. Избранные главы: пер.с англ. /Ким Эсбенсен; под. ред. О.Е. Родионовой. – Черноголовка: ИПФХ РАН, 2005. –161 с.
58. HPLC determination of catechins and caffeine in tea. Differentiation of green, black and instant teas / P.L.Fernandez [et al.] // *Analyst*. – 2000. – V. 125. – P. 421.
59. Characterization of volatile compounds of *Daucus crinitus* Desf. Headspace Solid Phase Microextraction as alternative technique to Hydrodistillation / M. El Amine Dib [et al.] // *Chemistry Central Journal*. – 2010. – 4:16. –  
URL: <http://journal.chemistrycentral.com/content/4/1/16> (дата обращения 10.03.2014).
60. Зильфикаров И.Н. Сравнительное фитохимическое исследование эфирного масла и сверхкритического флюидного CO<sub>2</sub>-экстракта из листьев эвкалипта прутовидного / И.Н. Зильфикаров, А.М.Алиев // *Сверхкритические флюиды: теория и практика*. – 2008. – Т.3, №2. – С. 43 – 51.
61. Contribution to the study of the pharmaceutical quality of some chamomile commercial samples. Note 1. The analysis of volatile oil / O. Cioancă [et al.] // *Farmacia*. – 2010. – V.58(3). – P. 308 – 314.
62. Виноградов Б.А. Получение, состав, свойства и применение эфирных масел. URL: <http://www.viness.narod.ru/eucalipt> (дата обращения 16.10.2013).

63. К вопросу о содержании биологически активных веществ ромашки аптечной (*Chamomilla recutita*) и ромашки душистой (*Chamomile suaveolens*), произрастающих в Красноярском крае/ Г.Г.Первышина [и др.] // Химия растительного сырья. –2002. – №3. – С.21 – 24.
64. Orav A. Volatile constituents of *Matricaria recutita* L. from Estonia / A. Orav, T.Kailas, K.Ivask // Proc.Estonian Acad.Sci Chem. – 2001. –V. 50(1). – P. 39 – 45.
65. Пушкарева Е.С. Компонентный состав эфирного масла полыни холодной (*Artemisia frigidata*) Красноярского края и его отдельных фракций / Е.С. Пушкарева, А.А.Ефремов // Сорбционные и хроматографические процессы. –2012. – Т.12, вып.4. – С. 619 – 623.
66. Пушкарева Е.С. Компонентный состав эфирного масла полыни Сиверса (*Artemisia Sieversiana*) Сибири и его отдельных фракций / Е.С. Пушкарева, А.А.Ефремов // Сорбционные и хроматографические процессы. –2012. – Т.12, вып.4. – С. 624 – 628.
67. Макарова Д.Л. Изучение состава эфирного масла *Artemisia pontica* L. флоры Сибири / Д.Л.Макарова, М.А.Ханина, В.П.Амельченко // Химия растительного сырья. – 2008. – №2. – С. 55 – 60.
68. Динамика выделения и компонентный состав эфирного масла тысячелистника обыкновенного пригорода Красноярска/ А.А.Алякин [и др.] // Химия растительного сырья. – 2009. – №4. – С.73 – 78.
69. Ефремов Е.А. Компонентный состав июльской лапки пихты сибирской Красноярского края / Е.А.Ефремов, А.А.Ефремов // Химия растительного сырья. – 2010. – №2. – С. 135 – 138.
70. Стрельникова Л. Парфюмер-3 / Л.Стрельникова // Химия и жизнь. – 2007. – №8. – С. 30 – 35.
71. Другов Ю.С. Пробоподготовка в экологическом анализе: практическое руководство/ Ю.С.Другов, А.А.Родин. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2009. – 855 с.
72. Volatile phytochemical composition of rhizome of ginger after extraction by headspace solid-phase microextraction, petroleum ether extraction and steam distillation extraction / Zh. W.Yang [et al.] // Bangladesh J. Pharmacology. – 2009. – V.4. – P.136 – 143.
73. Vu D.-T. Characterization of Volatiles Using Solid-Phase Microextraction /Gas Chromatography-Mass Spectrometry (SPME/GC-MS). Two Customs Applications / D.-T. Vu, P.E. Nicholas, C.M. Erikson. URL: [http://www.cbp.gov/sites/default/files/documents/clb\\_spme\\_3.pdf](http://www.cbp.gov/sites/default/files/documents/clb_spme_3.pdf) (дата обращения 10.01.2014)

74. Cajka T. Recognition of beer brand based on multivariate analysis of volatile fingerprint / T.Cajka, K.Riddellova, M.Tomaniova, J.Hajslova // *Journal of Chromatography A*. – 2010. – V.1217. – P.4195 – 4203.
75. Llompart M. Solid-phase microextraction and headspace solid-phase microextraction for the determination of polychlorinated biphenyls in water samples / M. Llompart, K.Li, M.Fingas // *Anal. Chem.* – 1998. – V.70(13). – P. 2510 – 2515.
76. Solid phase microextraction/capillary GC analysis of drugs, alcohols and organic solvents in biological fluids / A.Namera [et al.] // *J. Anal.Toxicology*. – 1998. – V. 22. – P. 396 – 400.
77. Vas G. Solid-phase microextraction: a powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis / G.Vas, K. Vekey // *J. Mass Spectrometry*. – 2004. – V. 39(3). – P. 233–254.
78. Volatile Compounds of *Baccharis punctulata*, *Baccharis dracunculifolia* and *Eupatorium laevigatum* obtained using Solid Phase Microextraction and Hydrodistillation / P. Schossler [et al.] // *J. Braz. Chem. Soc.* – 2009. – Vol. 20, No. 2. – P. 277 – 287.
79. Sanchez-Palomo E. Rapid determination of volatile compounds in grapes by HS–SPME coupled with GC–MS / E. Sanchez-Palomo, M.C. Diaz-Maroto, M.S. Perez-Coello // *J.Talanta*. – 2005. – V. 66 (5). – P. 1152 – 1157.
80. Microfibers for juice analysis by solid-phase microextraction / R.B.F.Fonseca [et al.] // *Ciênc. Tecnol. Aliment.* – 2008. – V.28. – P. 166 – 169.
81. Solid-phase microextraction (SPME) for rapid field sampling and analysis by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) / G. L. Hook [et al.] // *Trends in analytical chemistry*. – 2002. – V. 21(8). – P. 534 – 543.
82. Automated Gas-Chromatograph Mass-Spectrometer for Routine Atmospheric Field-Measurements of the Cfc Replacement Compounds, the Hydrofluorocarbons and Hydrochlorofluorocarbons / P.G.Simmonds [et al.] // *Anal.Chem.* – 1995. – V.67, №4. – P. 717 – 723.
83. ГОСТ Р ИСО 16017-1-2007 Воздух атмосферный, рабочей зоны и замкнутых помещений. Отбор проб летучих органических соединений при помощи сорбционной трубки с последующей термодесорбцией и газохроматографическим анализом на капиллярных колонках. – М.: Стандартинформ, 2008. – 32 с.
84. Исидоров В.А. Хромато-масс-спектрометрическое определение следов органических веществ в атмосфере / В.А. Исидоров, И.Г.Зенкевич. [под ред. Б.В.Иоффе]. – Л.: Химия. Ленингр. отд-ние, 1982. – 136 с.



85. Гольберт К.А. Введение в газовую хроматографию / К.А.Гольберт, М.С. Вигдергауз – 3-е изд., перераб. и доп. – М.: Химия, 1990. – 352 с.
86. Бережная Т.Е. Сравнительный анализ состава экстракта ромашки аптечной: сб. научн. работ / Т.Е. Бережная, Е.В. Горбунова // Национальный ун-т биоресурсов и природопользования Украины, Южный филиал «Крымский агротехнологический ун-т». Вып.131. – Симферополь : [ПФ НУБіП України "КАТУ"], 2010. – С. 29 – 33.
87. Иванова В.Д. Влияние условий экстрагирования на выход фенольных соединений и антиоксидантные свойства вытяжек из нетрадиционного растительного сырья / В.Д. Иванова, Н.С. Каряка, // Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья: материалы V Всероссийской конференции (24-26 апреля 2012 г) / [Под.ред. Н.Г. Базарновой, В.И.Маркина]. – Барнаул: Изд-во Алт. ун-та, 2012. – С.206 – 208.
88. Пат. 2373266 Российская Федерация МПК С11В 1/00 (2006.01). Способ получения масляных экстрактов биологически активных веществ / Шиков А.Н., Пожарицкая О.Н., Макаров В. Г.; заявитель и патентообладатель Закрытое акционерное общество "Санкт-Петербургский институт фармации" . – Оpubл. 20.11.2009, Бюл. № 32. – 5с.
89. Влияние вповерхностно-активных веществ на извлечение каротиноидов и аскорбиновой кислоты в процессе двухфазной экстракции плодов шиповника / Н.Н.Степанова [и др.] // Успехи современного естествознания. – 2007. – № 3. – С. 18 – 21.
90. Букеева А.Б. Обзор современных методов выделения биоактивных веществ из растений / А.Б.Букеева, С.Ж. Кудайбергенова // Вестник ЕНУ им. Л.Н.Гумилева. – 2012. – №2. – С. 192–197.
91. Бадмацыренов Б.В. Разработка оборудования и процесса экстракции кедрового масла в электромагнитном поле СВЧ: Дис. ... канд.техн.наук: 03.00.23 / Бадмацыренов Баир Владимирович. – Улан-Удэ, 2004. – 147 с.
92. Рамазанова Л.А. Совершенствование технологии получения биологически активных соединений и пищевых красителей из плодов дикорастущего сырья: Автореф. дисс. ... канд. техн. наук: 05.18.01 / Рамазанова Людмила Айвазовна. – М., 2005. – 28 с.
93. Ширетова В.Г. Получение экстрактивных веществ из скорлупы семян сосны сибирской в электромагнитном поле СВЧ / В.Г.Ширетова, А.Г.Хантургаев, Залуцкий А.В. // Экстракция органических соединений: тез. докл. IV межд. конф. «ЭОС-2010» 20-24 сентября 2010 г. – Воронеж, 2010. – С.73.

94. Промышленная технология лекарств / В.И. Чуешов [и др.] // Харьков, Национальный фармацевтический университет, 2010. – URL: <http://ztl.nuph.edu.ua/html/medication/> (дата обращения 24.09.2014)
95. Исследование влияния условий экстракции на извлечение биологически активных веществ с антиоксидантными свойствами / Шубенкова Е.Г. [и др.] // Вестник НГПУ. – 2013. – №5(15). – С.144 – 148.
96. Макаров Е.В. Проточная твердофазная микроэкстракция как новый способ сорбционной пробоподготовки в газовой хроматографии. Автореф. дис. ...канд.хим.наук: 02.00.02/ Макаров Евгений Дементьевич. – С.-Петербург, 2004. – 22с.
97. Леонова М.В. Технология изготовления лекарственных средств из растительного сырья: учебно-методическое пособие/ М.В. Леонова, Ю.Н. Климочкин – Самара: Самар. гос. техн. ун-т. – 2014. – 92 с.
98. Леменовский Д.А. Сверхкритические среды. Новые химические реакции и технологии / Д.А.Леменовский, В.Н.Баграташвили // Соросовский образовательный журнал.–1999. – №10.– С.36 – 41.
99. Водяник А.Р. Сверхкритическая флюидная экстракция природного сырья: мировой опыт и ситуация в России / А.Р.Водяник, Ю.А.Шадрин, М.Ю.Синев // Сверхкритические флюиды: теория и практика. – 2008. – Т.3, №2. – С.58 – 69.
100. Eikani M. H. Subcritical water extraction of essential oils from coriander seeds (*Coriandrum sativum* L.) / M. H. Eikani, F.Golmohammad, S.Rowshanzamir // Journal of Food Engineering. – 2007. – V.80. – P. 735 – 740.
101. Извлечение биофлаваноида – кверцетина из растительного сырья в среде субкритической воды / А.В.Лекарь [и др.] // Сверхкритические флюиды: теория и практика. – 2008. –Т.3, №2. – С.33 – 36.
102. Herrero M. Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: plants, food- byproducts, algae and microalgae.A review / M.Herrero, A.Cifuentes, E.Ibañez // Food Chemistry. – 2006. – 98(1). – P. 136 – 148.
103. Uematsu M. Static Dielectric Constant of Water and Steam / M.Uematsu, E.U.Franck //J.Phys.Chem.ref.Data. –1980. – V.9. № 4. – P. 1291 – 1306.
104. Subcritical water extraction of antioxidant compounds from rosemary plants / E.Ibañez [et al.] //Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2003. – V.51. – P. 375 – 382.
105. Türk M. Comparing the effect of supercritical and sub-critical fluids extraction with conventional extraction methods on the chemical composition of nigella sativa l. seeds / M.

Türk, E. Sultan Giray. URL: <http://www.isasf.net/fileadmin/files/Docs/Arcachon/posters/p168-P70%20Giray.pdf> (дата обращения 18.02.2015)

106. Пат. 2395 515 Российская Федерация МПК 07Н1/08 (2006.01)С07Н15/256 (2006.01) А61К36/25 (2006.01). Способ получения аралозидов аралии / Борисенко С.Н., Максименко Е.В., Борисенко Н. И., Ветрова Е. В.; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Южный федеральный университет". – Оpubл. 27.07.2010, Бюл. № 21. – 4с.

107. Pressurized hot water extraction and enzyme-catalyzed conversion of polyphenolic glycosides in onion waste / С. Turner [et al.] //conference proceedings of the 10th European meeting on Supercritical Fluids in Colmar. – France, 2005.

108. Pressurized hot water extraction of anthraquinones from the roots of *Morinda citrifolia*/ A.Shotipruk [et al.] // Biotechnol. Progress. – 2004. – V.20(6). – P. 1872 – 1875

109. Extraction of volatile oil from cumin (*Cuminum cyminum* L.) with superheated water / M.H.Eikani [et al.] // J. Food Process Eng. –2007. V. 30. – P. 255 – 266.

110. Mustafa A. Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review /A. Mustafa, C.Turner // *Analytica Chimica Acta*. – 2011. – 703(1). – P. 8 – 18.

111. Pressurized hot water extraction (PHWE) of n-alkanes and PAHs (PAHs): Comparison for PAHs with supercritical fluid extraction / K. Hartonen [et al.] // *J. Microcol. Sep.* –2000. – V.12. – P. 412 – 418.

112. Subcritical water extraction of polychlorinated biphenyls from soil and sediments / Y. Yang [et al.] //*Anal. Chem.* – 1995. – V.67. – P. 4571.

113. Pressurised hot water/steam extraction of polychlorinated dibenzofurans and naphthalenes from industrial soil / B. van Bavel [et al.] // *Analyst*. 1999. – V. 124. – P. 1351 – 1354.

114. Pressurised hot water extraction and thermal desorption of polycyclic aromatic hydrocarbons from sediment with use of a novel extraction vessel / T. Andersson [et al.] // *Anal. Chim. Acta*. – 2002. – V.446. – P. 93 – 100.

115. The Effect of Temperature on Pressurised Hot Water Extraction of Pharmacologically Important Metabolites as Analysed by UPLC-qTOF-MS and PCA / B.S.Khoza [et al.] // *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. – 2014. URL: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/914759> (дата обращения 20.02.2015).

116. Jimenez-Carmona M. M. Isolation of eucalyptus essential oil for GC-MS analysis by extraction with subcritical water / M.M.Jimenez-Carmona, M.D.Luque de Castro // *Chromatographia*. – 1999. – V.50, №. 9/10. – P. 578 – 582.

117. Hartonen K. Supercritical Fluid Extraction and Pressurized Hot Water Extraction – Novel Environmentally Friendly Analytical Techniques, Biological and Environmental Applications. Doctoral thesis / Hartonen Kari. – University of Helsinki. – Helsinki, 1999. – 154 p.
118. Stability of polycyclic aromatic hydrocarbons in pressurised hot water/T. Andersson [et al.] // *Analyst*. – 2003. – V.128(2) . – P. 150 – 155.
119. Mokgadi J. Pressurized hot water extraction of nutraceuticals and organic pollutants from medicinal plants / Janes Mokgadi. Doctoral thesis, Rhodes University. – Rhodes, 2011. – 175 p.
120. Ramos L. Current use of pressurised liquid extraction and subcritical water extraction in environmental analysis. Review Article / L. Ramos, E.M. Kristenson, U.A.Th. Brinkman // *J. Chromatogr. A*. – 2002. V975(1). – P. 3 – 29.
121. Smith, R.M. Extractions with superheated water. Review Article / R.M. Smith // *J. Chromatogr. A*. – 2002. – V975(1). – P. 31 – 46.
122. Class-selective extraction of polar, moderately polar and nonpolar organics from hydrocarbon wastes using subcritical water / Y.Yang [et al.]// *Environ. Sci. Technol.* – 1997. – V.31. – P. 430 – 437.
123. Hawthorne S.B. Extraction of organic pollutants from environmental solids with sub- and supercritical water / S.B. Hawthorne, Y. Yang, D.J. Miller // *Anal. Chem.* – 1994. – V.66. – P. 2912.
124. Pressurized hot water extraction (PHWE) / C.C. Teo [et al.] // *J. Chromatogr. A*. – 2010. – V.1217. – P. 2484 – 2494.
125. El-Adawi H. Application of numerical modeling for optimization of selective hot water extraction of taxifolin from “milk thistle” seeds / H.El-Adawi, Y.Abdel-Fattah, A. Abd El-Wahab // *African Journal of Biotechnology*. – 2011.– V. 10(48). – P. 9804 – 9811.
126. Экстракция субкритической водой биологически активных соединений из плодов расторопши пятнистой (*Silybum marianum* L.) / И.А.Платонов [и др.] // *Сверхкритические флюиды: теория и практика*. –2010. – Т.5, №3. – С. 67 – 75.
127. Никитченко Н.В. Определение состава экстрактов «Расторопши пятнистой» хроматографическими методами. Автореф. дис. ...канд. хим. наук: 02.00.02/Никитченко Наталья Викторовна. – Воронеж, 2012. – 18 с.
128. Масс-спектрометрия и ЯМР-спектроскопия экстрактов сапонинов плюща вьющегося, полученных в среде субкритической воды. / С.Р.Борисенко [и др.] // *Материалы V Международной конференции по новым технологиям и приложениям современных физико-химических методов*. 1-5 июня. 2009 г. – Ростов-на-Дону, 2009. – С. 104.

129. Экстракция глицирризиновой кислоты из корня в среде субкритической воды / К.С.Тихомирова [и др.] // *Сверхкритические флюиды: теория и практика.* – 2008. – № 3. – С.71 – 74.
130. Разработка методики экстракции дигидрокверцетина из древесины лиственницы в среде субкритической воды / О.В.Филонова [и др.] // *Сверхкритические флюиды: теория и практика.* –2008.– Т.3.№2. – С.37 – 42.
131. Khajenoori M. Sub-critical water extraction of essential oils from *Matricaria Chamomilla* L. / M. Khajenoori , A. Haghghi Asl, H. Noori Bidgoli // *IJE TRANSACTIONS B: Applications.* – 2013. – V. 26(5). – P. 489 – 494.
132. Basilea A. Extraction of Rosemary by superheated water / A. Basilea, M. M. Jimenez-Carmona, A. A. Clifford // *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* – 1998. – V. 46(12). – P. 5205 – 5209.
133. Ozel M. Z. Sub-critical water extraction of essential oil from *Thymbra Spicata* / M. Z. Ozel, F. Gogus, A. C. Lewis// *Food Chemistry.* – 2003. – V. 82(3). – P. 381 – 386.
134. Jimnez Carmona, M. M. Comparison of continuous sub-critical water extraction and hydrodistillation of Marjoram essential oil / M. M. Jimnez Carmona, J. L. Ubera, M. D. Luque de Castro// *Journal of Chromatography A.* – 1999. – V.855(2) – P. 625 – 632.
135. Selective extraction of oxygenates from Savory and Peppermint using sub-critical water / A. Kubatova [et al.] // *Flavour and Fragrance Journal.* – 2001. – V. 16(1). – P. 64 – 73.
136. Fernandez Pere Z. V. An approach to the static-dynamic sub-critical water extraction of Laurel essential oil comparison with conventional techniques / Z. V. Fernandez Pere, M. M. Jimenez Carmona, M. D. Leque de Castro // *Analyst.* –2000. – V. 125. – P. 481 – 485.
137. Clifford A. A. A comparison of the extraction of Clove Buds with supercritical carbon dioxide and superheated water / A. A. Clifford, A. Basile, R. Ai-Saidish // *Fresenius Journal Analysis Chemistry.* – 1999. –V. 364. – P. 635 – 637.
138. Chang L.H. Extracting and purifying isoflavones from defatted Soybean Flakes using superheated water at elevated pressures / L. H. Chang, Y. C. Cheng, C. M. Chang// *Food Chemistry.* – 2004. – V. 84. – P. 279 – 285.
139. Study on sub-critical water extraction of baicalin from *Radix Scutellariae* coupled to high performance liquid chromatographic analysis / Z. H. Xu [et al.] // *Chinese Journal of Chromatography.* – 2004. – V. 22(1). – P. 44 – 47.
140. Gmiz G. Continuous sub-critical water extraction of medicinal plant essential oil comparison with conventional techniques / G. Gmiz, M. D. Luque de Castro // *Talanta.* – 2000. – V. 51. – P. 1179 – 1185.

141. Liang X. Application of Sub-Critical Water Extraction in Pharmaceutical Industry / X. Liang, Q. Fan // *Journal of Materials Science and Chemical Engineering*. – 2013. – №1. – P. 1 – 6.
142. Изучение состава растительного лекарственного сбора методом газо-жидкостной хроматографии с хромато-масс-спектрометрическим детектированием / А.Н.Кузьменко [и др.] // *Вестник московского ун-та. Сер.2. Химия*. – 2010. – Т.51, №2. – С.132 – 138.
143. Дослідження фенольних сполук листя евкаліпта / О.М. Кошовий [и др.] // *Фармаком*. – 2005. – №2/3. – С. 151 – 161.
144. Мікроелементний, амінокислотний та полісахаридний склад листя евкаліпта / О.М. Кошовий [и др.] // *Фітотерапія. Часопис*. – 2005. – №3. – С. 59 – 62.
145. WHO monographs on selected medicinal plants. – Geneva: World Health Organization, 2002. – V. 2. – 358 p.
146. Phytochemical and pharmacological aspects of eucalyptus genus/ G.Nagpal [et al.] // *IJPSR*. – 2010. – V. 1 (12). – P. 28 – 36.
147. Изопреноидный состав спиртового экстракта листьев *Eucalyptus viminalis* / О.Н. Кошевой [и др.] // *Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики*. – 2011. – вип. XXIV, №2. – С. 23 – 25.
148. Разживин Р.В. Определение веществ-маркеров при исследовании комплексных препаратов из лекарственного растительного сырья: Автореф. дис. ... канд.фарм.наук: 15.00.02 / Разживин, Роман Вячеславович. – М, 2008. – 25 с.
149. Применение хромато-масс-спектрометрии для изучения компонентного состава фармакопейных видов лекарственного растительного сырья/ Р.В.Разживин [и др.] // *Вестник московского ун-та. Сер.2. Химия*. – 2009. – Т.50, №1. – С.67–70.
150. Кошевой О.Н. Создание нового лекарственного средства на основе комплексной переработки эвкалипта прутовидного: Автореф. дис. ... канд.фарм.наук: 15.00.02/ Кошевой, Олег Николаевич. – Киев, 2007. – 23 с.
151. *Eucalyptus: The Genus Eucalyptus* / [Под ред. John J.W. Coppen]. – London: Taylor & France e-Library, 2005 – 450 с.
152. Куркин В.А. Фармакогнозия / В.А. Куркин. – 2-е изд., перераб. и доп. – Самара: Офорт, 2007. – 1239 с.
153. Savina A. A. 11,12-Dehydrousolic acid lactone from leaves of *Eucalyptus viminalis* / A. A. Savina, T. A. Sokolskaya, V. F. Zakharov// *Chemistry of Natural Compounds*. – 1988. – V.24(2). – P.253 – 254.

154. Патент 2410112. Российская Федерация МПК А 61К036/61, А61Р031/00, А61Р031/04 Лекарственное средство для профилактики и лечения нарушений нормальной микрофлоры (дисбактериозы) / Вичканова С.А, Сокольская Т.А., Крутикова Н.М., Бортникова В.В., Крепкова Л.В., Колхир В.К., Быков В.А.; заявитель и патентообладатель Государственное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений ("ВИЛАР"). – Оpubл. 27.01.2011, Бюл. № 3. – 10 с.
155. Savina A.A. Structure of a new phenol aldehyde from the leaves of *Eucalyptus viminalis* / A.A.Savina, V.F.Zakharov, N.S. Tsybul'ko // *Chemistry of Natural Compounds*. – 1991. – V. 27(6). – P. 696 – 701.
156. Pharmacological Potential of *Matricaria recutita*-review / V. Gupta [et al.] // *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research*. – 2010. – V. 2(1). – P. 12 – 16.
157. Сверхкритическая флюидная экстракция. Сайт группы компаний «ГОРО». URL: <http://www.extract.ru/> (дата обращения 24.01.2014).
158. Муравьёва Д.А. Фармакогнозия / Д.А. Муравьёва. – М.: Медицина, 1981. – 656 с.
159. Унификация метода стандартизации сырья и жидкого экстракта ромашки аптечной, произрастающей в условиях вечной мерзлоты / В.И. Погорелов [и др.] // *Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: сб. науч. трудов (Пятигорская государственная фармацевтическая академия)*. – Пятигорск, 2003. – С. 242 – 243.
160. Isolation, identification and stability of acylated derivatives of apigenin 7-O-glucoside from chamomile (*Chamomille recutita* [L.] Rauschert) / V.Svehlicova [et al.] // *Phytochemistry*. – 2004. – V.65(16). – P.2323 – 2332.
161. Naghi G. Analysis of phenolic compounds in *Matricaria chamomilla* and its extracts by UPLC-UV / G.Naghi [et al.] // *Research in Pharmaceutical Sciences*. – 2014. – V.9(1). – P. 31 – 37.
162. Определение фенольных соединений и флавоноидов в водных экстрактах лекарственных растений / З.А.Темердашев [и др.] // *Заводская лаборатория. Диагностика материалов*. – 2011. – № 11, т. 77. – С. 22 – 26.
163. Тыжигирова В.В. Применение ИК- и УФ- спектроскопических методов в фармацевтическом анализе: учебное пособие по фармацевтической химии для студентов фармацевтического факультета / В.В.Тыжигирова, С.Ю.Филиппова. – Иркутск: ГОУ ВПО ИГМУ, 2010 – 74 с.

164. Шагалиева Н.Р. Исследования по разработке и стандартизации комбинированного антимикробного и регенерирующего препарата на основе лекарственного растительного сырья: Автореф. дис. ... канд.фарм.наук:14.04.02 / Шагалиева Наталья Рашидовна. – Самара, 2012. – 24 с.
165. Новикова Е.А. Совершенствование эколого- и технолого-аналитического контроля производств капролактама и нитробензола с использованием сверхсшитых полистирольных сорбентов: Автореф. дис. ...канд. хим. наук: 02.00.02. / Новикова Екатерина Анатольевна. – С.-Петербург, 2011. – 22 с.
166. Дмитрук А. Ф. Антирадикальная активность растительных экстрактов, полученных в среде субкритической воды /А. Ф. Дмитрук, Ю. О. Лесишина, И. И. Володченко //Сверхкритические флюиды:теория и практика. – 2012. – №1. – С. 13 – 20.
167. Анисимова Н.А. Идентификация органических соединений: учебное пособие (для студентов, обучающихся по специальности «химия») / Н.А.Анисимова. – Горно-Алтайск: РИО ГАГУ, 2009 – 95 с.
168. Боначева В.М. Гликозиды флавоноидов *Equisetum Silvaticum* L.Ханты-Мансийского автономного округа / В.М.Боначева, Э.Х.Ботиров // Химия растительного сырья. – 2013. – №1. – С.171 – 174.
169. Водоросль дала медикам новое оружие против микробов. URL: <http://www.membrana.ru/particle/7965> (дата обращения: 17.11.2014)
170. Лечение гепатита С. Руководство, перспективы. / Best clinical practice: русское издание. – М: Рид Елсивер, 2011. – 37 с.
171. Германов Н.И. Микробиология / Н.И.Германов. – М: Просвещение, 1969 – 227 с.