

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САМАРСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ АКАДЕМИКА С.П. КОРОЛЕВА»

На правах рукописи

Парийчук Нина Владимировна

**ПАРОФАЗНЫЙ ГАЗОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЛЕТУЧИХ
КОМПОНЕНТОВ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ И
ФИТОПРЕПАРАТОВ**

Специальность 02.00.02 – аналитическая химия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Научный руководитель:
д.х.н., профессор Онучак Л.А.

Самара – 2018

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	10
1.1 Общая характеристика первичных и вторичных метаболитов лекарственных растений и их классификация по природе биологически активных соединений	10
1.2 Современное состояние исследований по изучению состава биологически активных соединений в лекарственных растениях «пижма обыкновенная», «календула лекарственная» и «боярышник кроваво-красный», «зверобой продырявленный»; определение их качества и стандартизация	19
1.3 Парофазный газохроматографический анализ и его возможности для определения летучих соединений.....	44
1.4 Современные представления об анализе многокомпонентных объектов. Хеометрика	53
1.5 Выводы к Обзору литературы	58
2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	60
2.1 Объекты исследования	60
2.2 Методика проведения парофазного газохроматографического анализа лекарственного растительного сырья и фитопрепаратов	62
2.3 Оценка погрешности измерения определяемых величин	67
3. ПАРОФАЗНЫЙ ГАЗОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЛЕТУЧИХ КОМПОНЕНТОВ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТЕНИЯ «ПИЖМА ОБЫКНОВЕННАЯ» И ФИТОПРЕПАРАТОВ НА ЕЕ ОСНОВЕ	71
3.1 Установление закономерностей перераспределения летучих компонентов из цветков пижмы обыкновенной в газовую фазу	71
3.2 Парофазный газохроматографический анализ летучих компонентов цветков пижмы обыкновенной	75

3.3 Парофазный газохроматографический анализ летучих компонентов фитопрепаратов на основе пижмы обыкновенной	86
3.4 Выводы к главе 3	95
4. ПАРОФАЗНЫЙ ГАЗОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЛЕТУЧИХ КОМПОНЕНТОВ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТЕНИЯ «КАЛЕНДУЛА ЛЕКАРСТВЕННАЯ» И ФИТОПРЕПАРАТОВ НА ЕЕ ОСНОВЕ	96
4.1 Установление закономерностей перераспределения летучих компонентов из цветков календулы лекарственной в газовую фазу	96
4.2 Парофазный газохроматографический анализ летучих компонентов цветков календулы лекарственной	100
4.3 Парофазный газохроматографический анализ летучих компонентов фитопрепаратов на основе календулы лекарственной	108
4.4 Выводы к главе 4	110
5. ПАРОФАЗНЫЙ ГАЗОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЛЕТУЧИХ КОМПОНЕНТОВ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТЕНИЯ «БОЯРЫШНИК КРОВАВО-КРАСНЫЙ» И ФИТОПРЕПАРАТОВ НА ЕГО ОСНОВЕ	112
5.1 Установление закономерностей перераспределения летучих компонентов из плодов боярышника кроваво-красного в газовую фазу	112
5.2 Парофазный газохроматографический анализ летучих компонентов плодов боярышника кроваво-красного	115
5.3 Парофазный газохроматографический анализ летучих компонентов фитопрепаратов на основе боярышника кроваво-красного	123
5.4 Выводы к главе 5	130
6. ПАРОФАЗНЫЙ ГАЗОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЛЕТУЧИХ КОМПОНЕНТОВ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТЕНИЯ «ЗВЕРОБОЙ ПРОДЫРЯВЛЕННЫЙ» И ФИТОПРЕПАРАТОВ НА ЕГО ОСНОВЕ	131
6.1 Установление закономерностей перераспределения летучих компонентов из травы зверобоя продырявленного в газовую фазу	131

6.2 Парофазный газохроматографический анализ летучих компонентов травы зверобоя продырявленного	134
6.3 Парофазный газохроматографический анализ летучих компонентов фитопрепаратов на основе зверобоя продырявленного	145
6.4 Выводы к главе 6	148
ВЫВОДЫ	152
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	154
ПРИЛОЖЕНИЕ	168

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Растительные лекарственные средства, как правило, сочетают широту терапевтического действия и относительную безопасность. В связи с этим фармацевтическая промышленность проявляет все больший интерес к разработке и выпуску фитопрепаратов в виде травяных сборов, эфирных масел, настоек, таблеток и капсул. Определение подлинности и содержания действующих биологически активных соединений в исходном лекарственном растительном сырье и фитопрепаратах представляет сложную аналитическую задачу из-за их многокомпонентного состава. Газо-жидкостную хроматографию с масс-спектрометрическим детектированием (ГХ–МС) в настоящее время широко применяют в практике анализа лекарственного растительного сырья (ЛРС) для определения его подлинности, ареала произрастания, наличия в сырье близкородственных и других примесей. В качестве объектов анализа в методе ГХ–МС традиционно используют жидкие пробы эфирного масла или экстрактов ЛРС, определяя в них органические соединения с достаточно широким диапазоном летучести, включая малолетучие. Вследствие применения различных способов получения эфирного масла и экстрактов их составы могут сильно различаться [1]. Для получения характерного для данного растения газохроматографического профиля, не осложненного способами перегонки и/или экстракции, можно использовать метод прямого статического парофазного анализа (ПФА) в оптимизированных условиях газовой экстракции, обеспечивающих извлечение компонентов, в том числе, наиболее летучих. Закономерности статического и динамического вариантов ПФА подробно рассмотрены в работах [2-4]. Вместе с тем возможности метода ПФА для анализа летучих компонентов ЛРС не до конца раскрыты и представлены в ограниченном числе работ. Практически отсутствуют работы, в которых этот метод применяется для исследования фитопрепаратов. Отсюда вытекает актуальность диссертационной работы, посвященной исследованию границ применимости метода ПФА-ГХ по диапазону летучести определяемых

компонентов и возможности применения этого метода для установления подлинности ЛРС и фитопрепаратов.

Актуальность темы данной работы подтверждается поддержкой грантов №4.110.2014/к и №4.5883.2017/8.9 в рамках выполнения госзадания Министерства образования и науки Российской Федерации.

Цель работы состояла в выявлении возможностей статического парофазного газохроматографического анализа для определения летучих и среднелетучих органических соединений в лекарственном растительном сырье и фитопрепаратах и оценке применимости этого метода для установления их подлинности.

Для достижения данной цели поставлены следующие **задачи**:

1. Изучить закономерности газовой экстракции из осушенного лекарственного растительного сырья (цветки, трава, плоды) и выявить условия формирования равновесной паровой фазы, содержащей летучие и среднелетучие компоненты.

2. Методом статического парофазного газохроматографического анализа определить качественный и количественный состав паровой фазы лекарственного растительного сырья и фитопрепаратов.

3. Установить совокупность основных летучих и среднелетучих компонентов лекарственного растительного сырья и выделить возможные специфические компоненты (маркеры) из всего спектра органических соединений, выделившихся в паровую фазу.

4. Представить газохроматографические профили исследованных образцов лекарственного растительного сырья в виде зависимостей «относительная площадь пика – индекс удерживания» (headspace-спектры) для установления возможности определения их подлинности с использованием общего образа объекта.

5. Провести хемометрическую обработку результатов парофазного анализа лекарственного растительного сырья с целью определения видового различия, фирмы-производителя, партии.

6. Оценить возможности метода статического ПФА для установления подлинности фитопрепаратов.

Научная новизна:

1. Предложены критерии оптимизации условий газовой экстракции летучих и среднелетучих компонентов из осушенного лекарственного растительного сырья, предусматривающие наиболее полное выделение летучих и среднелетучих компонентов из растительной матрицы, достижение равновесного состава паровой фазы (без химических превращений в контактирующих фазах), получение характерного газохроматографического профиля ЛРС в условиях статического парофазного анализа.

2. Установлена совокупность летучих компонентов в равновесной паровой фазе (РПФ) для каждого из лекарственных растений, выявлены основные компоненты и предложены специфические маркеры, характеризующие индивидуальность и подлинность ЛРС.

3. Показано, что headspace-хроматограммы ЛРС и фитопрепаратов отражают наличие наиболее летучих и среднелетучих компонентов растения, тогда как хроматограммы эфирных масел – набор средне- и малолетучих соединений. Эти два хроматографических профиля дополняют друг друга и показывают всю совокупность летучих вторичных метаболитов растения.

4. Предложено в качестве общего образа многокомпонентного объекта анализа (газового экстракта ЛРС) использовать диаграммы «относительная площадь пика – индекс удерживания» (headspace-спектры), демонстрирующие качественный и количественный состав газового экстракта и позволяющие установить подлинность ЛРС.

5. Метод статического парофазного анализа предложен для экспрессного определения подлинности фитопрепаратов с различной лекарственной формой (эфирное масло, спиртовой и масляный экстракты, таблетированные и капсулированные сухие экстракты).

Теоретическая и практическая значимость работы. Выявление закономерностей газовой экстракции летучих органических соединений из сложных растительных матриц способствует развитию парофазного анализа гетерогенных конденсированных фаз. Полученные результаты могут быть

использованы для разработки экспрессных и доступных методов определения подлинности лекарственного растительного сырья и фитопрепаратов по совокупности газохроматографических характеристик удерживания летучих компонентов равновесной паровой фазы. Предлагаемый метод может быть также применен для решения более широкого круга аналитических задач, связанных с определением качества пищевых продуктов, экспертизой многокомпонентных природных и синтетических объектов.

Положения, выносимые на защиту:

1. Выбор условий проведения газовой экстракции из осушенного лекарственного растительного сырья (цветки, трава, плоды), при которых происходит наиболее полное выделение летучих и среднелетучих органических соединений, достигается равновесный состав паровой фазы с характерным для данного растения относительным содержанием компонентов, что позволяет получить специфический газохроматографический профиль ЛРС в условиях парофазного анализа.

2. Результаты идентификации и количественного определения основных и сопутствующих компонентов в равновесной паровой фазе пижмы обыкновенной, календулы лекарственной, боярышника кроваво-красного и зверобоя продырявленного, полученные методами ПФА-ГХ-МС и ПФА-ГХ-ПИД.

3. Способ обработки данных по качественному и количественному составу равновесной паровой фазы в виде headspace-спектров «относительная площадь пика – индекс удерживания» как характеристика индивидуальности и подлинности ЛРС.

4. Результаты хемометрической обработки данных парофазного анализа, позволяющие установить видовое различие, фирму-производителя, партию ЛРС.

5. Результаты апробации подхода, основанного на обнаружении методом ПФА совокупности летучих и среднелетучих органических соединений в фитопрепаратах с различной лекарственной формой для установления их подлинности.

Личный вклад автора заключается в экспериментальном исследовании паровой фазы лекарственного растительного сырья и фитопрепаратов методом

газовой хроматографии в сочетании с пламенно-ионизационным и масс-спектрометрическим детектором, выявлении условий установления равновесия в системе «конденсированная фаза – воздух», идентификации полученных летучих компонентов с привлечением масс-спектров, литературных источников, существующих баз данных, обсуждении результатов, подготовке публикаций.

Степень достоверности и апробация результатов. Степень достоверности приведенных в диссертации результатов подтверждается их сходимостью и воспроизводимостью, согласованностью результатов, полученных при использовании нескольких независимых методов исследования, а также сравнением полученных экспериментальных данных с литературными. Основные результаты работы представлены на XIV конференции «Физико-химические основы ионообменных и хроматографических процессов» (ИОНИТЫ-2014) (Воронеж, 2014), «Теория и практика хроматографии» (Самара, 2015), научно-практической конференции с международным участием «Молодые учёные XXI века - от идеи к практике», посвященной 85-летию Клиник СамГМУ (Самара, 2015), Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Инновационные технологии в Фармации» (Иркутск, 2016), XIX Всероссийская конференция молодых ученых-химиков (Нижний Новгород, 2016), Международной научной конференции «Фундаментальные и прикладные исследования в области химии и экологии» (Курск, 2016), V Всероссийском симпозиуме с международным участием «Кинетика и динамика обменных процессов», (Сочи, 2016), III Всероссийской конференции «Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез» (Краснодар, 2017), третьем съезде аналитиков России (Москва, 2017).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 4 статьи в журналах, рекомендованных ВАК, 14 тезисов докладов, защищено 3 патента РФ.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части и четырех глав, в которых изложены результаты проведенных исследований и их обсуждение, выводов, списка цитируемой литературы (142 наименования). Материалы диссертации изложены на 174 страницах текста, включая 24 таблицы, 44 рисунка.

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Общая характеристика первичных и вторичных метаболитов лекарственных растений и их классификация по природе биологически активных соединений

Вещества, участвующие в процессах обмена веществ живых организмов, называют *метаболитами*. Различают первичные и вторичные метаболиты. К первичным относятся белки, углеводы, жирные масла, нуклеиновые кислоты, ферменты. Вторичными метаболитами (или метаболитами вторичного происхождения) называют терпены, терпеноиды, флавоноиды, витамины, алкалоиды, дубильные вещества. Первичные метаболиты присущи всем видам живых организмов, вторичные присутствуют у растений, грибов, очень редко у животных и отличаются своей специфичностью для одного или нескольких видов растений [5].

Несмотря на то, что среди *первичных метаболитов* самостоятельный статус БАС имеют только полисахариды и жирные масла, другие первичные метаболиты (белки, нуклеиновые кислоты, ферменты) также являются перспективными источниками лекарственных средств.

Жирные (растительные) масла – первичные метаболиты, представляющие собой триглицериды насыщенных и ненасыщенных жирных кислот, представляют собой жидкость (за исключением масла какао, имеющего твердую консистенцию). Жирные масла получают из мякоти и плодов методом прессования. Сопутствующими веществами жиров являются фосфатиды, жирорастворимые витамины (Е, F), каротиноиды (провитамин А), жирные кислоты.

Углеводы – первичные метаболиты, представляющие собой полиоксикарбонильные соединения и их производные. Углеводы подразделяют на моносахариды, олигосахариды, полисахариды. Моносахариды представлены пентозанами (арабиноза, ксилоза, рибоза) и гексозанами (глюкоза, галактоза,

рамноза). *Моносахариды* встречаются в растениях в свободном виде и в качестве производных (дезоксисахара, аминсахара), а также в виде олигосахаридов (например, сахароза). *Полисахариды* встречаются во всех растениях, их выделяют в отдельный класс БАС в тех случаях, если они являются источниками лекарственных средств. Различают гомогликаны и гетерогликаны. Гомогликаны (гомополисахариды) состоят из моносахаридных остатков одного типа, к ним относят клетчатку, крахмал, гликоген. Гетерогликаны (гетерополисахариды) состоят из остатков различных сахаров, примерами гетерополигликанов могут служить пектины, арабиноксиланы). Примерами растений, где полисахариды являются БАС, являются лен посевной, алтей лекарственный, подорожник и др.).

Нуклеиновые кислоты (НК) – биополимеры, имеющие универсальное распространение в живой природе. Биологическая функция НК – хранение и распространение генетической информации. Мономерами для НК служат остатки дезокси- и рибонуклеотидов, в связи с этим различают дезоксирибонуклеиновые кислоты (ДНК) и рибонуклеиновые кислоты (ДНК).

Протеины – простые белки, состоящие из остатков аминокислот.

Протеиды – сложные белки, содержащие небелковый компонент (простетическую группу).

Энзимы (ферменты) были выделены в отдельный класс первичных метаболитов сравнительно недавно, в 2004 году. Ферменты – это сложные белки, содержащиеся в животных и растительных организмах, выполняют функции биологических катализаторов, ускоряющих химические процессы. Растительные ферменты участвуют в образовании всех веществ, включая БАС. Примерами растительных ферментов могут служить папаин, бромелаин, ингедаза [6].

Однако более широко в медицинской практике используются вещества вторичного обмена. Они обладают более выраженным фармакологическим эффектом и богатым спектром биологически активных свойств.

Исследование *вторичных метаболитов* проведено для 10-15% растений от всей флоры Земли (20-30 тысяч видов). Особенностью вторичных метаболитов является неравномерность их распределения в растениях. К примеру, вещества

фенольной природы (фенилпропаноиды и их производные) встречаются в каждом виде растений, тогда как алкалоиды встречаются только у 15% изученных растений, отдельные классы метаболитов встречаются лишь у единичных видов, к примеру, тиофены, ацетогенины или опасные для человека серосодержащие и цианогенные гликозиды. Для растения вторичные метаболиты играют важную роль, выполняя различные *функции* на уровне всего организма растения – обеспечивают процессы жизнедеятельности (контроль над процессами фотосинтеза) и регуляции роста растения, способствуют размножению, привлекая насекомых для опыления и животных для распространения семян, выполняют защитную функцию, защищая растение от возможных вредителей или травоядных животных, обеспечивают взаимодействие растений между собой [7]. Свойства лекарственных и ядовитых растений обусловлены присутствием тех или иных вторичных метаболитов, обладающих биологической активностью [8].

В литературе известны четыре основополагающих признака вторичных метаболитов:

- наличие биологической активности,
- присутствие веществ не во всех растениях,
- относительно низкая молекулярная масса,
- небольшой набор исходных соединений для синтеза разнообразных вторичных метаболитов [9].

Интересно, что выполнение всех четырех признаков не является обязательным для отнесения вещества к вторичным метаболитам. Отметим, что флавоноиды есть у всех растений, а некоторые соединения, например, природные полимеры гута и каучук, обладают высокой молекулярной массой, однако эти вещества относят к соединениям вторичного метаболизма.

Процесс биосинтеза метаболитов происходит в различных частях клетки, тканей, органов растения. В клеточном пространстве растения места осуществления процессов синтеза и накопления вторичных метаболитов не совпадают. Образование вторичных метаболитов происходит в хлоропластах, эндоплазматическом ретикулуме, цитозоле, накопление – в вакуоли, клеточной

стенке, периплазматическом пространстве. Переходя к макрочастям растений в [6] отмечено, что одни вторичные метаболиты синтезируются и накапливаются в одних и тех же частях растения, другие – синтезируются и переходят для накопления в другие части. К примеру, флавоноиды синтезируются во всех клетках растения, а некоторые алкалоиды образуются в корнях, а затем переносятся и запасаются в листьях [8]. Ярким представителем алкалоидов является никотин, вырабатываемый в корнях табака. Выделяются вторичные метаболиты во внешнюю среду при помощи специальной выделительной ткани (железистых волосков – триохом) [9].

Сходство химического строения многих вторичных метаболитов позволяет предположить, что их образование происходит по определенной схеме. Замечено, что существует так называемая «базовая» структура и все возможные варианты строятся на ее основе. В работе [8] описаны пути изменения таких структур:

- *модификация базовой структуры* – присоединение новых функциональных групп или замена уже существующих, часто используются гидроксильные, метильные и метоксильные группы;
- *образование конъюгатов* – присоединение к базовой молекуле сахаров (моно-, олигосахаров, органических кислот или других вторичных метаболитов);
- *конденсация* – объединение нескольких одинаковых или различных базовых структур.

Каждая группа вторичных метаболитов обладает ограниченным набором возможностей для химического изменения структуры. Например, алкалоиды часто подвергаются метоксилированию, в то время как гликозилирование для них не характерно. Изопреноиды, напротив, склонны к гликозилированию, а метоксилирование для них является нетипичным. В то же время оба типа этих изменений характерны для фенольных соединений. Следует отметить, что любые химические процессы, происходящие с молекулой в клетке растения, могут привести к изменению ее биологической активности. Например, присоединение гликозидной группы к молекуле вторичного метаболита может привести к

переводу молекулы в растении из активного состояния в неактивное, другими словами, перевести ее из функциональной формы в запасную.

Разнообразие и уникальность (специфичность) вторичных метаболитов для разных растений обусловлены, в первую очередь, условиями их обитания и связаны с экологическими функциями растения – защитной, репродуктивной, информационной и другими. Продукты вторичного синтеза растений нашли широкое применение в медицине, фармакологии, пищевой промышленности, ветеринарии и других областях. Набор вторичных метаболитов может служить таксономическим признаком растения и быть основой их классификации.

В настоящее время единой классификации вторичных метаболитов не существует, что приводит к некоторым сложностям в их изучении, отнесении к тому или иному типу. Исследуемое соединение может обладать рядом признаков, характерных для разных групп вторичных метаболитов. Например, в фармакогнозии гликозиды выделяют в отдельную группу, как соединения, являющиеся основными действующими веществами, в то же время различия в химическом строении гликозидов позволяют разделить их на фенольные соединения, изопреноиды и другие классы органических соединений. На сегодняшний день в литературе описаны четыре вида классификации вторичных метаболитов [8].

Эмпирическая (тривиальная) классификация основана на свойствах соединений. К примеру, сапонины способны к пенообразованию при встряхивании, горечи обладают горьковатым вкусом, алкалоиды имеют щелочную среду. В отдельный вид веществ выделяют эфирные масла [6, 10], хотя известно, что в состав эфирного масла входит целый спектр различных соединений [11]. Данный вид классификации является устаревшим, однако его элементы встречаются в современной литературе в силу традиции и длительного времени употребления [8].

Функциональная классификация основана на функциях вторичных метаболитов. В эту группу могут входить вещества разного химического строения, относящиеся к разным классам органических соединений. Примером

данной классификации могут служить фитоалексины, вырабатываемые растениями в ответ на воздействие патогена. В качестве фитоалексинов у разных растений могут выступать различные соединения: флавоноиды, изопреноиды (терпеноиды), полиацетилены и др. Разработка функциональной классификации вторичных метаболитов ведется сравнительно недавно, однако она имеет большое значение для изучения физиологии растений [12].

Биохимическая классификация основана на способах синтеза вторичных метаболитов. Например, согласно этой классификации гликоалкалоиды относятся к тритерпеновым псевдоалкалоидам, так как синтезируются, как и стероидные гликозиды, по изопреноидному пути. Очевидно, это наиболее обоснованный вариант классификации. Однако, поскольку биохимия вторичного метаболизма еще недостаточно разработана, то такая классификация находится в периоде становления.

Химическая классификация основана на особенностях химического строения вторичных метаболитов. Этот вариант классификации является наиболее часто используемым в настоящее время. Однако и он имеет ряд недостатков. Например, ряд вторичных метаболитов обладает разнообразными функциональными группами, обуславливающими их свойства. Например, проблема химической классификации коснулась гликоалкалоидов картофеля и томатов, которые по химической структуре могут быть отнесены и к алкалоидам и к изопреноидам.

Изопреноиды (терпены, терпеноиды) – большая группа природных соединений на основе изопрена с общей формулой $(C_5H_8)_n$. Простейшая формула изопреноидов C_5H_8 является структурным фрагментом изопреноидов [13]. Изопреноиды являются производными изопрена. Второе название этих соединений «терпены» является производным от немецкого слова *terpentin* (скипидар), так как скипидар является смесью легколетучих изопреноидов. Кроме обозначенного выше неопределенного углеводородного скелета в состав терпенов входят различные функциональные группы (гидроксильные, карбонильные, кето-группы и др.) [8]. В зависимости от количества структурных изопреновых

фрагментов изопреноиды подразделяют на монотерпены, сесквитерпены, дитерпены, тритерпены, стерины и др.

Эфирные масла – смесь душистых органических веществ преимущественно терпеноидной или ароматической природы. Эфирными они названы за летучесть и способность перегоняться с водяным паром. В состав эфирных масел входят такие компоненты, как монотерпены, сесквитерпены, ароматические соединения, представленные простыми фенолами, углеводородами, фенилпропаноидами. Лекарственные средства на основе эфиромасличного сырья, эфирных масел или получаемых из них компонентов применяются в качестве спазмолитических, седативных, отхаркивающих, противовоспалительных, бактерицидных, отхаркивающих и других лекарственных средств.

Витамины – среди них наиболее распространены каротиноиды (провитамин А). Каротиноиды – жирорастворимые растительные пигменты желтого, оранжевого, красного цвета, относящиеся к тетратерпенам. Широко распространены в растениях α -, β -, γ -каротин, ликопин и другие пигменты.

Сапонины, сапонины – природные органические вещества стероидной или тритерпеноидной природы, обладающие высокой поверхностной и, как правило, гемолитической активностью, а также токсичностью по отношению к холоднокровным животным.

Сердечные гликозиды (кардиотонические гликозиды) – природные производные циклопентан пергидрофенантрена, содержащие при C_{17} ненасыщенное лактонное кольцо и обладающие специфической кардиотонической активностью.

Стерины – спирты класса стероидов животного (холестерин) и растительного происхождения (β -ситостерин, стигмастерин и др.). По своим физическим свойствам кристаллические или аморфные вещества белого цвета, чаще всего липофильной природы, β -ситостерин является наиболее распространенным стеринном, причем наиболее часто встречается в виде глюкозида – даукостерина.

Фенольные соединения. Большинство фенольных соединений являются продуктами вторичного метаболизма растений. Отличительной особенностью фенольных соединений является модификация молекулы и образование конъюгатов с разнообразными веществами. Модификация фенольных соединений происходит за счет гликозилирования (образования гликозидов), метилирования и метоксилирования, кроме того наличие карбоксильных и гидроксильных групп делает возможным присоединение сахаров, органических кислот, растительных аминов, алкалоидов. Фенольные соединения можно разделить на следующие самостоятельные группы БАС.

1) *Простые фенолы.* В растениях они встречаются не часто. Фенол в небольших количествах найден в хвое сосны, эфирном масле смородины и табака. Пирокатехин обнаружен в листьях тополя, чешуе лука, производное гидрохинона – арбутин содержится в листьях толокнянки обыкновенной и брусники обыкновенной [6, 23].

2) *Кумарины* – природные соединения, в основе которых лежит 9,10-бензо- α -пиран.

3) *Фенилпропаноиды.* Данные соединения были введены как самостоятельная группа БАС в 1992 году в результате поиска новых перспективных БАС [6]. Данные соединения с одним ароматическим кольцом и тремя дополнительными атомами углерода (соединения $C_6 - C_3$), они являются наиболее важной и многочисленной группой веществ. Сюда относятся гидроксикоричные кислоты, гидроксикоричные спирты.

4) *Флавоноиды* являются самой важной и многочисленной группой фенольных соединений с двумя ароматическими кольцами являются соединения с тремя дополнительными углеродными атомами (соединения $C_6 - C_3 - C_6$). Молекула флавоноида содержит, кроме двух бензольных колец еще и пирановое (гетероциклическое, в состав которого входит кислород). Флавоноиды встречаются во всех высших растениях [13].

5) *Хиноны* – самостоятельный класс БАС включающий в себя бензохиноны, нафтохиноны, среди которых наиболее известны филлохинон (витамин К) и антрахиноны (антраценпроизводные, антрагликозиды).

6) *Хромоны* – природные фенольные соединения, представляющие собой производные бензо- γ -пирона (хромон). Хромоны встречаются и растениях довольно редко и по своим свойствам близки к кумаринам и флавонондам.

7) *Ксантоны* – класс природных фенольных соединений, имеющих структуру вещества дибензо- γ -пирона. Ксантоны биогенетически близки к таким группам фенольных соединений, как флавоноиды, хромоны, кумарины. Наиболее известный ксантон – мангиферин. Он содержится в коре и листьях манго индийского и в траве копеечника альпийского.

8) *Дубильные вещества (таннины)* – растительные высокомолекулярные фенольные соединения (молекулярная масса от 1000 до 20000), способные связывать белки кожи, осаждать алкалоиды и обладающие вяжущим вкусом. Дубильные вещества с молекулярной массой от 300 до 1000 не способны к дублению, но они обладают вяжущими свойствами, поэтому их часто называют «пищевыми танинами» или «чайным танином».

Алкалоиды. На сегодняшний день известно около 10000 алкалоидов. Согласно эмпирической классификации название этих веществ произошло от арабского *alkali* – щелочь и греческого *eidos* – подобный [7, 14]. По химической классификации алкалоиды – это соединения, в молекулы которых входят один или несколько атомов азота, что и объясняет их щелочные свойства и способность образовывать соли. Выделяют протоалкалоиды (атом азота находится не в цикле), истинные алкалоиды (азот находится в составе гетероцикла) и псевдоалкалоиды (в отличие от предыдущих двух групп синтезированы не из аминокислот). По биохимической классификации алкалоиды подразделяются в зависимости от исходной аминокислоты, лежащей в основе их синтеза [5, 8]. Наиболее широко алкалоиды распространены среди семейств маковых, пасленовых, бобовых, лютиковых, мареновых [8].

Изучение строения и свойств органических соединений первичного и вторичного метаболизма лекарственных растений позволило установить наличие биологической активности многих из них. Эти свойства метаболитов нашли широкое применение в медицине и фармации. На основе ЛРС изготавливают широкий спектр лекарственных препаратов и биологически активных добавок для лечения и профилактики различных заболеваний в форме таблеток, капсул, настоек, отваров, масла и др. Накопленные знания о фармакологической активности лекарственных растений [6] легли в основу их классификации по содержанию основной действующей группы БАС, которая разработана сравнительно недавно [15]. Данная классификация имеет фундаментальное научное значение для таких отраслей как фармакогнозия, фармацевтическая технология, фармацевтическая химия, фармакология и фитотерапия. Введение понятия ведущей группы БАС не отрицает того факта, что общий фармакологический эффект достигается, как правило, благодаря действию сразу нескольких групп БАС лекарственного растения [15, 16].

Таким образом, ЛРС содержит целый спектр соединений, обладающих биологической активностью и отличающихся по фармакологическому действию, химическому строению и свойствам. Поэтому разработка новых методов определения подлинности лекарственных растений и фитопрепаратов на их основе является актуальной задачей.

1.2 Современное состояние исследований по изучению состава биологически активных соединений в лекарственных растениях «пижма обыкновенная», «календула лекарственная» и «боярышник кроваво-красный», «зверобой продырявленный»; определение их качества и стандартизация

В последние годы как в нашей стране, так и за рубежом наблюдается устойчивый рост интереса к применению фитопрепаратов. Широкое применение препаратов на основе растительного сырья требует обеспечения высокого качества культивируемого ЛРС и знания химической природы БАС, которые в

нем содержатся. В связи с этим качественный и количественный анализ БАС лекарственных растений следует проводить не только традиционными методами, но и внедряя весь арсенал современных химических, физико-химических, спектральных методов. Рассмотрим современные методы исследования ЛРС, уделяя особое внимание методу газовой хроматографии в сочетании с масс-спектрометрическим детектором. Данный метод является перспективным для анализа летучих БАС [17]. Анализ литературных источников последних лет по изучению компонентов растений «пижма обыкновенная», «календула лекарственная», «боярышник кроваво-красный», «зверобой продырявленный» представлен в данном параграфе.

Лекарственное растение «пижма обыкновенная» (*Tanacetum vulgare* L.).

Пижма обыкновенная (*Tanacetum vulgare* L.) – многолетнее травянистое растение семейства Астровые (*Compositae*). Растение «пижма обыкновенная» обладает бактерицидными, ранозаживляющими, антигельминтными, желчегонными, противовоспалительными свойствами, а также спазмолитическим действием [6, 18].

Пижма обыкновенная – растение высотой 30 – 150 см. Корневище горизонтальное, ползучее, стебли прямостоячие, листья редковолосистые. Все цветки мелкие, трубчатые, желтого или оранжево-желтого цвета собраны в корзинки. Цветочные корзинки полушаровидной формы, почти плоские сверху, диаметром 5 – 8 мм и высотой 4 – 6 мм, расположенные на верхушке главного стебля, а так же на боковых ответвлениях. Плоды – продолговатые семянки (длиной 1.5 – 3 мм) с короткой мелкозубчатой краем или без нее. Растение цветет с половины июня до второй половины осени (сентябрь-октябрь), плоды пижмы созревают в августе – сентябре. Растение имеет характерный (камфорный) запах [6, 19, 20].

Пижма широко распространена в следующих регионах и странах: Западная Европа, Казахстан, Турция, Китай (северная часть), Монголия, Корея, Япония (северная часть), Северная Америка (преимущественно как заносное растение), заносится в другие государства [19-21]. Пижма обыкновенная – растение с

высокой степенью адаптивности и высокой экологической пластичностью, что позволяет ей произрастать в различных экологических условиях.

В качестве ЛРС используют соцветия пижмы, которые срезают на расстоянии 4 см от верхних соцветий (цветочных корзинок), сырье собирают в начале цветения. В цветках пижмы содержится эфирное масло (около 1.5 – 2.0 %), компоненты которого являются основной группой БАС этого растения. В эфирном масле присутствуют терпены (туйол, камфора, борнеол, 1,8-цинеол, камфен, камфора, α -пинен, β -пинен, лимонен и др.), а также терпеновые кетоны (α -туйон и β -туйон). Второй группой БАС, содержащихся в соцветиях пижмы, являются флавоноиды, из них доминирующим является лютеолин, также в большом количестве содержатся производные апигенина, акацетина, кверцетина и изорамнетина. Сопутствующими веществами являются органические кислоты (лимонная, винная, кофейная). ЛРС пижмы обладает желчегонным, спазмолитическим, антигельминтным и противовоспалительным свойствами.

Соцветия пижмы используют в качестве сырья для производства лекарственного препарата «Танацехол» (таблетированная форма сухого экстракта пижмы). Также ЛРС пижмы входит в состав препаратов «Беллацехол», «Сибектан», желчегонного сбора №3, применяемых при заболеваниях печени и желчных путей. Настой соцветий пижмы применяют в качестве желчегонного и антигельминтного средства [6, 18].

Согласно Государственной фармакопее РФ XIII издания [22] подлинность лекарственного сырья «пижма обыкновенная» определяется:

- по внешним признакам (измельченное сырье и порошок);
- по микроскопическим признакам (цельное сырье, измельченное сырье, порошок).

Основные группы биологически активных веществ определяют методом тонкослойной хроматографии (ТСХ).

Стандартизация сырья «пижма обыкновенная» осуществляется спектрофотометрическим методом по сумме флавоноидов в пересчете на доминирующий флавоноид лютеолин [23].

Стоит отметить, что несмотря на высокую активность зарубежных ученых в исследовании эфирного масла пижмы обыкновенной, Американская травяная [24], Европейская [25] и Британская [26] фармакопеи не содержат информации об этом растении, в то время как Французская фармакопея [27] включает в себя статьи о цветках и цветочных корзинках пижмы обыкновенной. Однако близкородственный вид растения пиретрум девичий (*Tanacetum parthenium* L.) присутствует во всех вышеперечисленных фармакопеях.

Газо-жидкостная хроматография (ГЖХ) является одним из основных методов хроматографического исследования летучих лекарственных веществ, в том числе компонентов ЛРС [28]. Метод ГЖХ применяется для анализа экстрактов и эфирных масел лекарственных растений. Зачастую идентификацию летучих компонентов проводят методом хромато-масс-спектрометрического детектирования.

Ранее на базе зарубежных университетов были проведены работы по изучению компонентного состава ЛРС «пижма обыкновенная» и полученных из него эфирных масел, спиртовых [29], микроволновых [30], сверхкритических флюидных [31, 32] экстрактов. Целью большинства исследователей являлась классификация исследованных образцов пижмы в зависимости от доминирующих компонентов и места произрастания.

В работе [30] проведены исследования эфирных масел, механических и микроволновых экстрактов пижмы (*Tanacetum vulgare* L.), собранной в окрестностях города Квебек (Канада) методом газовой хроматографии с пламенно-ионизационным (ГХ-ПИД) и масс-спектрометрическим (ГХ-МС) детектированием на капиллярной колонке с малополярной стационарной фазой DB-5 при линейном программировании температуры. Целью работы было разделение исследуемых образцов пижмы на хемотипы по доминирующему компоненту. Соединения были идентифицированы по полученным масс-спектрам и значениям индексов удерживания, найденным в существующих базах данных. В каждом объекте было идентифицировано более 30 соединений. Наиболее часто встречающимися в образцах веществами были монотерпены и сесквитерпены.

На основании полученных экспериментальных данных выделено несколько хемотипов: смешанный хемотип камфора – 1,8-цинеол (эвкалиптол) – борнеол, хемотип β -туйона и хемотип хризантенона.

В работе [33] провели исследование компонентного состава экстрактов пижмы (*Tanacetum vulgare* L.) и изменчивости данного ЛРС, связанной с географическими различиями хемотипов. Предварительно все растения пижмы, произрастающие в Финляндии, были разделены на 20 возможных хемотипов. Цветки 20 финских хемотипов пижмы экстрагировали сначала метанолом, а после петролейным эфиром и анализировали методом газовой хроматографии с ПИД и МС детектированием. Всего было обнаружено 55 компонентов, из которых 53 соединения были идентифицированы. Из 20 хемотипов 15 были однозначно определены и 5 оказались смешанными. В 13 хемотипах доминирующим компонентом являлась камфора, были найдены хемотипы, где доминирующими компонентами были артемизия кетон, 1,8-цинеол, давадон-D и другие соединения. Географически большая часть хемотипов с высоким содержанием камфоры произрастала в центральной Финляндии, тогда как другие хемотипы, были собраны на юге и юго-западе страны. Дальнейшая хемометрическая обработка результатов позволила выделить 6 кластеров пижмы, которые коррелировали с местом произрастания растений. Взаимосвязь между географическим происхождением, генетическими, химическими и морфологическими изменениями пижмы показывает, что необходимо учитывать различные факторы, при изучении биоразнообразия ЛРС [19].

В работе [34] исследовалось эфирное масло пижмы, произрастающей в Вильнюсе. Масло получали методом гидродистилляции. Газохроматографический эксперимент проводили с использованием газового хроматографа HP 5890, оборудованного ПИД и МС детекторами. В исследованных эфирных маслах основными компонентами были миртенол, эвкалиптол (1,8-цинеол), камфора, *транс*-пинокарвеол и терпинен-4-ол.

В исследовании [35] изучен компонентный состав эфирного масла дикорастущей норвежской пижмы, собранной в Северной, Средней и Южной

Норвегии. Всего было изучено 40 образцов. Получали эфирное масло из сушеных листьев и цветочных корзинок методом перегонки с водяным паром. Анализ проводили методом ГХ-МС на капиллярной колонке DB-5. Перед вводом в газохроматографическую колонку образцы готовили путем разбавления 10 мкл масла в 1 мл этанола. Компоненты эфирного масла были идентифицированы с использованием библиотеки масс-спектров (IMS Terpene Library) и базы данных (NIST MS, 1992), а также базы данных индексов удерживания (ESO 2000-Database Essential Oils, 1999) и сравнения полученных масс-спектров с литературными данными. На основе данных ГХ-МС можно выделить семь хемотипов: А (α -туйон); В (β -туйон); С (камфора); D (хризантенилацетат / хризантенол) Е (хризантенон), F (артемизия кетон / артемизия спирт), G (1,8-цинеол). Точность хемотипической классификации норвежской пижмы была доказана предварительными исследованиями, проведенными годом ранее, что указывает на генетическую однородность и биохимическую стабильность растений.

В работе [36] исследованы эфирные масла четырех образцов листьев дикорастущей пижмы обыкновенной *Tanacetum vulgare* L., произрастающей в Румынии. Образцы пижмы собраны в двух районах произрастания неподалеку от Трансильвании – Сибиу и Альба. Сбор производили два года подряд (2010, 2011). Эфирные масла получали путем перегонки с водяным паром и затем анализировали методом ГХ-МС (капиллярная колонка SE-52 в режиме линейного программирования температуры). Доминирующими компонентами эфирных масел изученных растений были: β -туйон, α -туйон, камфора, *транс*-хризантенил ацетат, сабинен, 3-туйен-2-он, борнеол, миртенол, 1,8-цинеол (эвкалиптол). Содержание компонентов менялось в зависимости от года сбора. В 2011 году концентрация этих веществ была ниже, чем в 2010. Исследования, представленные в литературе, подтвердили влияние климатических изменений, осадков, факторов окружающей среды на химические компоненты растений [37-39]. Поэтому уровень осадков может влиять на концентрацию компонентов эфирных масел пижмы. Образцы, собранные в районе Альба, показали наибольшее содержание эфирного масла в растении (1.02-1.16%). Образец из

Сибиу показал самую высокую концентрацию основных соединений: хризантенил ацетат (37.13 – 38.96%), α -туйон (12.34 – 26.08%) и β -туйон (4.21– 13.95%).

В работе [40] для изучения эфирного масла цветков пижмы обыкновенной применялись методы газовой хроматографии и хромато-масс-спектрометрии. Целью данной работы являлся анализ эфирного масла, выделенного из цветочных корзинок дикорастущей пижмы Трансильвании в соответствии с Румынской фармакопеей [41]. Полученное эфирное масло анализировали с использованием газового хроматографа в сочетании с МС-детектором на капиллярной колонке HP-5MS. Идентификацию компонентов эфирного масла проводили с использованием индексов удерживания и масс-спектров соединений из библиотеки: удалось обнаружить 160 компонентов, 105 из которых были идентифицированы. 14 соединений имели концентрацию выше 1%.

Газохроматографический анализ эфирного масла пижмы позволил говорить об антибактериальной активности ЛРС пижмы [42]. Изучено эфирное масло пижмы, полученное из ботанического образца ЛРС, выращенного в Польше. Анализ проводили в вариантах ГХ-ПВД и ГХ-МС. Использовали две капиллярные колонки с малополярной неподвижной фазой SLB-5ms и полярной неподвижной фазой Supelcowax-10 в режиме линейного программирования температуры. В испаритель хроматографа вводили 0.4 мкл эфирного масла пижмы, разбавленного гексаном в 10^4 раз. Идентифицировано 76 соединений в интервале индексов удерживания 935 – 2277. Доминирующими компонентами эфирного масла пижмы являлись: артемизия кетон (9.15%), β -туйон (14.28%), *транс*-хризантенил ацетат (18.39%), (E) -дигидрокарвон (11.02%). Исследователи связывают наличие антибактериального эффекта эфирного масла пижмы с присутствием этих компонентов и считают ЛРС пижмы перспективным сырьем для производства антисептиков для медицины и ветеринарии и консервантов для пищевой промышленности.

Пижма обыкновенная российского ареала произрастания исследована в работах [29, 43, 44].

Исследована вегетативная часть пижмы обыкновенной в разные периоды созревания: стеблевание, цветение, плодоношение [43]. Сбор осуществляли в районе г. Дивногорска Красноярского края. Компонентный состав эфирного масла определяли на хроматографе Agilent 7890 с квадрупольным масс-спектрометром 5975С, использовали капиллярную колонку с 5%-дифенил-95%-диметилполисилокановой стационарной фазой в режиме линейного программирования температуры. Идентифицировано 40 компонентов, из которых основными компонентами эфирного масла являются: камфора, борнеол, α -фенхен, *meta*-цимен, карриофилен- β -оксид, α -пинен, β -копаен, борнилацетат, терпинен-4-ол, камфен, 1,8 цинеол, α -терпинен. Сравнение образцов масел показало, что качественный состав остается неизменным, а количественное содержание компонентов подвергается небольшим изменениям. Это свидетельствует о генетически закрепленном свойстве пижмы обыкновенной синтезировать определенный набор вторичных метаболитов. Данное исследование позволяет сделать вывод о возможности использовать в качестве ЛРС пижмы не только соцветия, но и листья.

Важной задачей являлось также изучение изменения состава эфирного масла пижмы обыкновенной, изготовленного из свежего и осушенного ЛРС. Попытка решить эту задачу предпринята в работе [44]. ЛРС пижмы собрано в период цветения в Московской области. Эфирное масло получено из свежих и высушенных цветов методом гидродистилляции. Состав эфирного масла определяли методом ГХ-МС. Использовали капиллярную колонку EliteWax, анализ проводили при линейном программировании температуры. Следует отметить, что компонентный состав эфирного масла осушенного образца пижмы обыкновенной претерпел существенные изменения: резко уменьшилось содержание α - и β -туйона (практически в 4 раза), борнеола (в 3.7 раза), гермакрена-D (в 3.3 раза), снизилась доля монотерпеноидов (α - и β -пиненов, сабинена в 1.1–1.4 раза), увеличилась доля окисленных и кислородсодержащих производных летучих соединений.

Изучен спиртовой экстракт пижмы обыкновенной, полученный методом ремацерации [29]. Анализ проводили методом ГХ-МС, использовали капиллярную колонку HP-5MS в режиме линейного программирования температуры. Отмечено, что несмотря на большое содержание камфоры и эвкалиптола в составе спиртового экстракта пижмы, их нельзя отнести к маркерам пижмы, поскольку они встречаются и в других растениях, например в эвкалипте прутовидном, шалфее лекарственном, тысячелистнике обыкновенном. В качестве маркеров для пижмы предлагается использовать производные туйона, в частности, 3-туйен-2-он. Данное соединение является специфическим для ЛРС пижмы обыкновенной [29].

Лекарственное растение «календула лекарственная». Календула лекарственная (ноготки лекарственные – *Calendula officinalis* L.) – однолетнее травянистое растение семейства Астровые – *Asteraceae* (*Compositae*). Календула лекарственная обладает регенерирующими, ранозаживляющими, желчегонными и иммуномоделирующими свойствами, а так же используется как антисептическое и противовоспалительное средство.

Календула лекарственная – растение родом из Средиземноморья. В качестве ЛРС используют цветки календулы, собранные в крупные корзинки диаметром до 8 см, расположенные на верхушке главного стебля, или на боковых ответвлениях. Цветет растение со второй половины лета до поздней осени [6, 45]. Сбор цветков проводят 10-20 раз за сезон с начала цветения до заморозков по мере распускания новых корзинок. «Календула лекарственная» выращивается в культуре, в дикорастущем виде не встречается. Основные районы промышленного выращивания – Поволжье, Краснодарский край, Украина, Белоруссия, Молдова.

Сырье календулы лекарственной содержит каротиноиды (α - и β -каротин, ликопин, лютеин, виолаксантин, флавоксантин, рубиксантин и др.) в количестве около 30мг%; флавоноиды (гликозиды кемпферола, кверцетина и изорамнетина) в количестве 0.33-0.88%; сапонины (календулозиды – гликозиды олеаноловой кислоты); тритерпеноиды (производные лупеола – арпидиол и фарадиол). Цветки календулы лекарственной содержат так же эфирные масла (до 0.12%), дубильные

вещества (6%), аскорбиновую кислоту, смолы (около 3%), органические кислоты (яблочная кислота до 6%), горечи, слизи (4%), β -ситостерин, стигмастерол, сесквитерпеновый лактон календин, полиацетилены, следы салициловой кислоты, алкалоидов [6, 45].

Препараты, изготавливаемые на основе цветков календулы лекарственной, обладают противовоспалительным, ранозаживляющим, бактерицидным, спазмолитическим, желчегонным, дерматотоническим, болеутоляющим и противозудным действиями. В практической медицине используют *настойку и настой, экстракт жидкий, мазь «Календула», карофилленовая мазь*. Лечебное действие препаратов связано с наличием в цветках календулы каротиноидов, флавоноидов, а так же витаминов. Препараты на основе календулы применяют при ожогах, порезах, ушибах, себорее, фурункулезе.

Для лечения воспалений полости рта применяют препарат *«Ротокан»*, в состав которого входят цветки календулы лекарственной. Календулу применяют для лечения ангин в сочетании с антибиотиками и сульфаниламидными препаратами. *Препарат «Калефлон»* назначают как противоязвенное средство и при хронических гастритах в фазе обострения. Цветки календулы входят в состав *грудного сбора №4, желчегонного сбора № 3, сбора «Элекасол»*. Производят также суппозитории *«Календула»* [6].

При изучении нормативной документации было обнаружено, что фармакопейная статья «Цветки ноготков» Государственной фармакопеи СССР XI издания [23] предусматривает анализ ЛРС только по содержанию экстрактивных веществ, при отсутствии разделов «Качественные реакции» и «Количественное определение». В XIII издании Государственной фармакопеи Российской Федерации было предложено количественное определение сырья календулы методом спектрофотометрии по сумме флавоноидов в пересчете на рутин [22].

Используемые методы имеют свои недостатки. Для проведения опытов необходима длительная пробоподготовка. Свойства, подвергаемые испытаниям, носят косвенный характер и не дают полного представления о подлинности сырья. При количественном определении растения «календула лекарственная»

пересчет на рутин не корректен в связи с тем, что в ЛРС присутствует масса других флавоноидов. В этом случае можно предположить, что более точный результат принесет пересчет на нарциссин, так как этот флавоноид присутствует в растении в наибольшем количестве. Кроме того, объективная стандартизация требует количественного определения каротиноидов, как веществ, вносящих ощутимый вклад в фармакологические свойства ЛРС календулы [46].

Подходы, которые используются в фармакопее Европы и фармакопее Британии, имеют полное совпадение [25, 26]. Идентификационный анализ высушенного сырья производят в соответствии с характерными внешними признаками и микроскопически. Качественный анализ осуществляется с использованием ТСХ. Количественную оценку осуществляют спектрофотометрическим методом по сумме флавоноидов в пересчете на гиперозид. В Американской фармакопее отсутствуют упоминания об ЛРС «Календула лекарственная» [24]. В Немецкой гомеопатической фармакопее [47] в качестве сырья указана вся надземная часть календулы, собранная во время цветения, а не только цветки. Отечественные и зарубежные ученые проводили исследования различных частей растения «календула лекарственная» (стебли, листья, корни) и доказали возможность их использования в качестве ЛРС [46, 48, 49].

В работе [48] представлены газохроматографические характеристики компонентов эфирного масла календулы лекарственной, выращенной в Южной Америке. Анализ масла проводили методом ГХ-МС. Анализ проводили, используя капиллярную колонку с 5%-дифенил-95%-диметилполисилоксановой стационарной фазой Rtx-5MS в режиме линейного программирования температуры. В качестве объектов исследования использовали эфирное масло, изготовленное из свежих цветков, а также свежих и высушенных листьев. Было зарегистрировано 30 компонентов в эфирном масле из свежих листьев, 21 – компонент в эфирном масле из сухих листьев и 24 компонента – в масле из свежих цветков календулы. Интервал индексов удерживания идентифицированных компонентов масел: $I_i^T = 908 - 1659$ ед. инд. Качественный анализ показал, что эфирные масла различных частей растения «календула

лекарственная» содержат большое количество α -туйена (14.8-26.8%), α -пинена (10.9-16.3%), гермакрена-D (7.6-11.6%), γ -кадинена (8.5-15.3%) и δ -кадинена (8.2-16.1%). Результаты анализа показали некоторые качественные и количественные изменения в составе эфирных масел, изготовленных из сухого и свежего ЛРС календулы. Однако такая тенденция наблюдается для эфирных масел календулы и может не сохраняться для других растений [50]. Отмечаются также изменения в качественном и количественном составе изученных масел в зависимости от вида растений и метода его сушки.

Ряд исследований [45, 51, 52] посвящен сравнению методов извлечения летучих компонентов из ЛРС календулы лекарственной. В работе [45] исследованы цветки календулы лекарственной, выращенной в юго-восточной Бразилии. Извлечение компонентов проводили тремя способами: методом перегонки с водяным паром (получение эфирного масла), твердофазной микроэкстракцией паровой фазы цветков календулы и криоконцентрированием летучих компонентов. Анализ полученных образцов проводили методом ГХ-МС с использованием колонки с малополярной стационарной фазой DB-5. Анализ эфирного масла, позволил идентифицировать 22 летучих компонента в интервале индексов удерживания Ковача (K_i) 1365 – 1671 ед. инд, среди которых компонентами с высоким содержанием являлись γ -кадинен (8.9%), δ -кадинен (22.5%), α -муурол (12,9%), α -кадинол (20.4%) и др. ГХ-МС анализ двух других образцов, полученных методом твердофазной микроэкстракции и криоконцентрирования, показали наличие только 11 извлеченных компонентов. По этой причине был сделан вывод, что традиционный метод перегонки с водяным паром является более предпочтительным для аналитической химии, а два других предложенных метода могут быть использованы для других целей.

В работе [51] методом ГХ-МС исследовано эфирное масло календулы лекарственной, выращенной в Египте. Идентификация компонентов эфирного масла проведена на хроматографе Agilent 6890 с масс-спектрометрическим детектором и малополярной неподвижной фазой HP-5MS в режиме линейного программирования температуры. Обнаружено 40 компонентов, основными из

которых являются 2-бурнанон (25.41%), α -мирцен (15.30%), *цис*-миртанол (6.19%) и др. Необходимы дальнейшие исследования по разработке лекарственных препаратов и выяснению взаимного влияния компонентов эфирного масла календулы.

В последние годы широко распространенным методом извлечения БАС из лекарственных растений стала сверхкритическая флюидная экстракция (СФЭ) [31, 52, 53]. В работе [54] в качестве объектов исследования использовали сверхкритический флюидный экстракт цветков календулы лекарственной, собранных в Литве. Сбор ЛРС календулы осуществляли в разные стадии роста растения: 1) образование почек, 2) начало цветения, 3) полное цветение, 4) конец цветения. Экстракцию проводили при разных условиях: часть образцов ЛРС подвергали давлению 9.1 МПа, а часть – давлению 15.1 МПа. Анализ полученных экстрактов проводили на газовом хроматографе с масс-спектрометрическим детектором. При анализе использовали капиллярную колонку из плавленого кварца с 5%-дифенил-95%-диметилполисилоксановой стационарной фазой Rtx-5MS. При давлении 15.1 МПа было извлечено 33 компонента, тогда как при давлении 9.1 МПа – 26 компонентов. Индексы удерживания указанных соединений лежали в интервале 919 – 1655 ед. инд. Доминирующим компонентом во всех исследованных образцах являлся α -туйен (14.8 – 26.8%). Анализ показал, что экстракты цветков календулы в большом количестве содержат α -пинен (10.9 – 16.3%), гермакрен-D (7.6 – 11.6%), γ -кадинен (8.5 – 15.3%) и δ -кадинен (8.2 – 16.1%). Кроме того, проведен статистический анализ полученных данных методом главных компонент (РСА) и иерархический кластерный анализ (НСА) с использованием компьютерных программ MATLAB v7.6 и PASW Statistics 18. Количество эстрагола, α -копаена, β -кубебена, β -копарена, *цис*-кадина-1,1-диена, α -мууролена и α -кадинола увеличивалось до фазы полного цветения (стадия 3). Анализ главных компонент показал сильные различия образцов экстрактов в зависимости от стадии роста растения. Иерархический кластерный анализ выявил наличие нескольких групп соединений, которые влияли на составы экстрактов на определенных стадиях роста растения «календула лекарственная».

В работе [55] объектами исследования являлись цветки календулы лекарственной, собранной в Сербии, из которых было получено эфирное масло методом перегонки с водяным паром и экстракты, где в качестве экстрагента выступал углекислый газ (CO_2). Получение экстракта проходило в сверхкритических и субкритических условиях в течение 3 часов. Анализ эфирного масла проводили на газовом хроматографе с МС детектором и на газовом хроматографе с ПИД. При анализе использовали капиллярные колонки с 5%-дифенил-95%-диметилполисилоксановой стационарной фазой (HP-5ms и DB-5). Полученные результаты свидетельствуют о том, что компонентный состав эфирного масла и полученных экстрактов имеет отличия. На хроматограмме СФЭ присутствуют более высококипящие компоненты, которых нет на хроматограмме эфирного масла. Увеличение давления при изготовлении экстрактов позволило увеличить содержание экстрагированных веществ в сверхкритических условиях. Такая тенденция, вероятно, связана с лучшей растворимостью высокомолекулярных соединений (жирные масла, воски, сложные эфиры) при повышении давления. Анализ показал, что во всех образцах содержится α -кадинол, кадинол и мууролил, γ -кадинен, ледан, леден и γ -мууролен, некоторые углеводороды (гептадекан, октадекан, эйкозан и др.).

При исследовании ЛРС календулы лекарственной часто прибегают к экстракции этанолом [56, 57].

В работе [56] изучен компонентный состав экстрактов растений, входящих в состав сбора для лечения заболевания пародонта. Анализ проводили методом хромато-масс-спектрометрии на хроматографе Agilent с использованием капиллярной колонки с малополярной 5%-дифенил-95%-диметилполисилоксановой неподвижной фазой HP-5MS в режиме линейного программирования температуры. Полученные результаты позволили сделать вывод, что спиртовой экстракт календулы содержит ряд соединений, которые присутствуют только в спиртовом извлечении календулы и отсутствуют в экстрактах других растений, входящих в состав сбора. Этими соединениями

являлись четыре терпеновых углеводорода (α -кубебен, β -кубебен, гермакрен-D и копфен) и производные нафталина (δ -аморфен, γ -селинен и γ -кадинен).

Методом ГХ-МС исследован промышленный образец спиртовой настойки календулы лекарственной [57], использовали малополярную колонку Rxi-5MS. Всего обнаружено 16 соединений, среди которых высоким содержанием обладает виридифлорен (7.53%), γ -кадинен (9.81%), δ -кадинен (21.49%), трет-мууролол (11.32%), α -кадинол (25.03%).

Лекарственное растение «боярышник кроваво-красный». Боярышник кроваво-красный (*Crataegus sanguinea*) – куст или небольшое дерево семейства розоцветных высотой до 5 м. Все виды представляют собой высокие кустарники, реже небольшие деревца с пазушными колючками. Плоды кроваво-красные, яблокообразные, с 2-7 косточками [6, 58-61].

Период цветения боярышника кроваво-красного – май-июнь, плоды созревают в конце августа. Продолжительность жизни до 400 лет. Географически боярышник распространен в Восточной Европе, Казахстане и Западной Сибири. Растение славится не только лекарственными свойствами, но и своей красотой при культивировании в парках и скверах. Находит свое применение боярышник и в народном хозяйстве.

В цветках и плодах содержатся флавоноловые гликозиды – гиперозид (кверцетин-3 галактозид), кверцитрин (кверцетин-3-рамнозид), пинна-тифидин (8-глюкозид гербацетина). Среди флавоноидов характерны также флавоновые гликозиды – витексин (С-глюкозиданигенина) и ацетилвитексин. Из других фенольных соединений в цветках и плодах боярышника содержатся кофейная и хлорогеновая кислоты, а также дубильные вещества, представляющие собой димеры катехина и *L*-эпикатехина (процианидин) [6, 60]

Тритерпеновые соединения представлены уреоловой, олеаноловой и кратеговой кислотами. В плодах содержатся жирное масло, стерины (β -ситостерин), полисахариды (пектины), сахара, сорбит, витамины, в частности, каротиноиды. Найдены также амины (ацетилхолин, холин и триметиламин). Запах цветков обуславливается эфирным маслом и некоторыми летучими соединениями.

Содержание гиперозида в цветках не менее 0.50% и суммы флавоноидов (в пересчете на гиперозид) в плодах не менее 0.06% [59].

Препараты боярышника кроваво-красного обладают кардиотоническим действием, а именно устраняют нарушения сердечного ритма, расширяют сосуды головного мозга, положительно влияют на центральную нервную систему и т.д. Чаще всего боярышник находит применение в виде настоек, настоев, отваров, в таблетированном виде. На основе ЛРС боярышника изготавливают лекарственные препараты «Боярышник Форте», «Кардиоактив Боярышник», «Боярышника настойка», «Боярышник. Таблетки для рассасывания», «Боярышник Премиум», «Кардиовален» и др.

В Фармакопейных статьях «Цветки боярышника» и «Плоды боярышника» Государственной Фармакопеи СССР XI издания [23] предлагается проводить качественное определение подлинности по внешним признакам, микроскопически и методом ТСХ. Количественное определение ЛРС проводят с применением спектрофотометрического метода по сумме флавоноидов в пересчете на гиперозид. Более поздние издания отечественной Фармакопеи не содержат изменений относительно анализа цветков и плодов боярышника.

В Американской травяной и Европейской Фармакопеях [24, 25] в качестве ЛРС боярышника предлагается применять листья с цветками (верхушками цветоносных веточек). В Европейской Фармакопее используются те же методы для определения качества и подлинности листьев и цветков, но в качестве растворителя используется токсичный спирт метанол. Необходимо отметить также, что в Европейской Фармакопее в качестве ЛРС предлагается также использовать плоды боярышника. Следует также отметить, что Российская Фармакопея включает в себя 14 фармакопейных видов боярышника, тогда как в Американской Фармакопее представлено только три вида.

Несмотря на то, что в Государственной Фармакопее РФ [23] в качестве ЛРС предлагается использовать цветки и плоды боярышника, исследователи предпринимают попытки определения БАС и в листьях, как более доступном для сбора материале. Стоит отметить, что летучие компоненты ЛРС боярышника

являются наименее изученными из всех растений, представленных в диссертационном исследовании.

Анализ листьев боярышника кроваво-красного (Республика Башкортостан) проводили методом ГХ-МС. Пробы эфирного масла и экстрактов анализировали с использованием газового хроматографа Agilent 6890 N с масс-спектрометрическим детектором 5973 [62] на капиллярной колонке HP-5MS при линейном программировании температуры. При анализе эфирного масла, полученного методом гидродистилляции обнаружено 44 компонента, 18 из которых идентифицировано. Основные компоненты эфирного масла боярышника представлены соединениями сесквитерпеновой природы: 1-этилиденоктагидро-7α-метил-1H-инден (8.34%), ледол (7.17%), α-фарнезен (2.01%), α-кадинол (1.87%).

Спиртовой экстракт листьев боярышника кроваво-красного изучен в работе [63] методом ГХ-МС. Пробы экстрактов анализировали с использованием газового хроматографа Agilent 6890 N с масс-спектрометрическим детектором 5973. Всего обнаружено 31 соединение, из которых идентифицировано 6, из них 4 вещества фенольной природы: кумаран, α-гидрохинон, пирокатехин и хинная кислота. Для исследования липофильных веществ листьев боярышника кроваво-красного были получены липофильные фракции с использованием неполярных растворителей – хлороформа и гексана. В среднем выход липофильной фракции составил от 1.5 ± 0.07 % до 2.3 ± 0.09 %. В состав липофильной фракции листьев боярышника кроваво-красного входят: монотерпеноиды (*транс*-дигидрокарвон и карвон), сесквитерпеноиды (*транс*-кариофиллен, гермакрин), производные бензофурана (2(4H)-бензофуранон), насыщенные и ненасыщенные углеводороды (*n*-эйкозан, α-октадецилен), ароматические карбоновые кислоты (фталевая кислота), 9 жирных кислот, из которых 5 насыщенных (пальмитиновая, стеариновая, гнейкозановая, бегеновая, лигноцериновая), ненасыщенные (арахидоновая, олеиновая, линолевая, эйкозеновая) и их производные (этиловый эфир пальмитиновой кислоты, линолеиловый спирт). Высшие жирные кислоты в липофильной фракции боярышника преобладают, доминируют из них

лигноцериновая (29.12%), арахионовая (13.37%) и линолевая (7.61%) кислоты [63 - 66].

В ходе исследования [66] был установлен компонентный состав эфирных масел цветов трех видов боярышника. Состав эфирного масла изучали на хроматографе Agilent Technology модели 6890N с масс-спектрометрическим детектором 5973N и малополярной капиллярной колонкой HP-5MS. Было обнаружено 46 соединений, среди которых ациклические, моноциклические и бициклические моно- и сесквитерпеноиды, нортерпеноиды и тритерпеноиды, которые представляют научный интерес как хемотаксономические маркеры для рода *Crataegus*.

Летучие компоненты цветков боярышника однопестичного (*Crataegus monogyna*), собранных в Шотландии, извлекали методом твердофазной экстракции пористыми сорбентами с последующей термодесорбцией [67]. Эксперимент проводили методом газовой хроматографии в сочетании с масс-спектрометрическим детектированием на хроматографе HP 5890 GC с малополярной колонкой DB-1701 в режиме линейного программирования температуры. Высоким содержанием обладали следующие компоненты: бензальдегид, пиридин-3-карбальдегид, 4-метоксибензальдегид, метиловый эфир метоксибензойной кислоты.

В работе [68] изучены листья и цветы боярышника пятипестичного, боярышника восточного, боярышника пижмолистного, боярышника азароля и боярышника однопестичного. Все образцы ЛРС собраны в Турции. Летучие компоненты выделены методом твердофазной экстракции и исследованы методом газохроматографического анализа с масс-спектрометрическим детектированием. Работу проводили на хроматографе Shimadzu QP 5050 с капиллярной колонкой с малополярной неподвижной фазой HP-5 в режиме линейного программирования температуры. В общей сложности обнаружен 81 летучий компонент в интервале индексов удерживания 650 – 2100 ед. инд. Причем основными компонентами для всех исследованных образцов являлись: бензальдегид, бутиральдегид, гексеналь-2, гексанол.

Исследованы водный, спиртовой и метанольный экстракты листьев боярышника азароля, выращенного в Ливане [69]. Исследование проводили методом ГХ-МС на хроматографе Agilent 7890A-GCMS, применяли кварцевую капиллярную колонку с малополярной неподвижной фазой DB-5 в режиме линейного программирования температуры. Анализ метанольного экстракта показал наличие 11 компонентов, среди которых максимальным содержанием обладал плучидиол (33.62%), в этанольном экстракте обнаружено присутствие 7 компонентов, доминирующим являлся γ -токоферол (43.73%), в метанольном экстракте найдено 8 компонентов, среди которых наибольшим содержанием обладает α -токоферол- β -D-маннозид.

Лекарственное растение «зверобой продырявленный». Зверобой (лат. *Hypericum*) – род цветковых растений семейства Зверобойные (*Hypericaceae*). Это многолетнее травянистое растение, высотой 30-80 см. Цветки многочисленные, золотисто-желтые, пятичленные. Представители рода, в основном, встречаются в умеренном климате Северного полушария и под тропиками в южных областях, особенно многочисленны в Средиземноморье [70]. По данным базы The Plant List [71], род включает 458 видов. В Российской Федерации встречаются несколько видов, из которых наиболее распространенными являются зверобой обыкновенный или продырявленный – *Hypericum perforatum* L. и зверобой четырехгранный (пятнистый) – *Hypericum maculatum* C. (*Hypericum quadrangulum*). Оба являются фармакопейными растениями. Зверобой продырявленный имеет прямой, гладкий стебель с двумя продольными нитевидными гранями. Листья овальные, продолговатые, плоские по краю с многочисленными просвечивающимися светлыми и черными точечными железками. Цветки многочисленные, собранные в соцветия [70].

Зверобой пятнистый отличается лишь четырехгранным стеблем и листьями с редкими просвечивающимися и темными железками. Произрастает зверобой пятнистый по опушкам хвойных и смешанных лесов. Имеет меньшие размеры по сравнению со зверобоем продырявленным. Длительное время считался примесным и не подлежал заготовке, однако в настоящее время рассматривается

как равноценный, с точки зрения получения антисептических и вяжущих средств [70]. По последним литературным данным выяснено, что оба фармакопейных вида растения «зверобой» имеют некоторые отличия в химическом составе [72]. Цветение приходится на летние месяцы (июнь-август), а плоды созревают в сентябре-октябре. В лекарственных целях применяют собранную в фазу цветения и высушенную траву дикорастущего и культивируемого зверобоя продырявленного, а именно верхнюю часть стеблей с цветками, листьями, бутонами и частично недозрелыми плодами [70]. Процесс сушки необходимо осуществлять в хорошо проветриваемых и закрытых от солнечных лучей помещениях. При этом температура не должна превышать 40°C для предотвращения потери БАС и трансформации веществ.

Растение обладает антибактериальными, антисептическими, болеутоляющими, ранозаживляющими, регенерирующими действиями. Экстракт растительного сырья используется в косметологии в качестве противовоспалительного, тонизирующего, антивозрастного средства, а также для изготовления антидепрессантов. Эффективность препаратов экстракта зверобоя сопоставима с эффективностью широко применяемых синтетических антидепрессантов, что подтверждено большим количеством клинических испытаний [73]. При этом по показателю переносимости экстракт зверобоя достоверно превосходит синтетические препараты: его побочные эффекты развивались у пациентов значительно реже и имели менее тяжелый характер [74].

На современном фармацевтическом рынке зверобой выпускается в виде таблеток, капсул, фильтр-пакетов, масел, экстрактов, настоек и т.д. Широко распространен таблетированный лекарственный препарат и микстура, содержащая экстракт зверобоя и 0.3 мг чистого гиперидина, Деприм (*Deprim*), который показан при легких формах депрессии, тревожных состояниях и повышенной метеочувствительности. В аптеках представлен препарат Негрустин, представляющий собой сухой экстракт травы зверобоя, помещенный в желатиновые капсулы или микстуру. Применяется при лечении психовегетативных расстройств, депрессии различной тяжести, состояниях страха

и тревоги. Хорошо известный антидепрессант Ново-пассит выпускается в виде микстуры или таблеток, содержит экстракты пассифлоры, зверобоя, валерианы, бузины, хмеля, мелиссы лекарственной. Используется в качестве успокаивающего и анксиолитического средства. В случае разных видов депрессии также показан к применению препарат в виде драже Гелариум Гиперикум [6]. В качестве тонизирующего и общеукрепляющего средства широко применяются эликсиры, представляющие собой водно-спиртовое извлечение из различных растений, среди которых присутствует трава зверобоя. Такими препаратами являются эликсиры «Эвалар», «Алтайский», «Виватон».

В Государственной Фармакопее РФ XIII издания [22] приведены основные методы определения подлинности ЛРС «зверобой продырявленный». Для качественного определения подлинности растения, помимо сопоставления внешних признаков, прибегают к рассмотрению микроскопических особенностей. При установлении основных групп БАС используют метод тонкослойной хроматографии (ТСХ). Испытаниям подвергаются такие свойства как: влажность, содержание золы общей и нерастворимой в хлористоводородной кислоте, измельченность сырья. Для количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин применяют спектрофотометрический метод.

Используемые методы имеют свои недостатки. Для проведения экспериментов необходима длительная пробоподготовка. Свойства, подвергаемые испытаниям, носят косвенный характер и не дают полного представления о подлинности сырья. При количественном определении флавоноидов растения «зверобой продырявленный» определяют их сумму в пересчете на рутин, что не совсем корректно. Это связано с тем, что в данном ЛРС присутствуют и другие флавоноиды, такие как кверцетин, кверцитрин, бисапигенин, гиперозид, причем доминирующим из них является не рутин, а гиперозид.

В Американской травяной фармакопее [24] подлинность травы зверобоя оценивают по внешним и микроскопическим признакам, используют метод ТСХ, применяя для изготовления испытуемого раствора метанол. Количественное определение индивидуальных компонентов гиперфорина, псевдогиперфорина и

гиперицина проводят методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), для приготовления растворов также используют метанол. В Европейской Фармакопее [25] также оценивают внешние и микроскопические признаки надземной части травы зверобоя, качественный анализ проводят методом ТСХ с использованием метанола, количественное определение проводят методом спектрофотометрии по сумме флавоноидов в пересчете на гиперин, для приготовления растворов используют тетрагидрофуран и метанол.

В настоящее время активно развиваются направления исследования ЛРС и эфирного масла на основе зверобоя ввиду широкого спектра применений [75]. Так были изучены эфирные масла зверобоя продырявленного, произрастающего в Индии [76, 77], Ирана [78], Италии [79], Греции [80], Сербии [81], Литве [82]. В Турции [83, 84] было проведено сравнение эфирных масел зверобоя шероховатого и зверобоя продырявленного методом ГХ-МС с использованием кварцевой колонки DB-5, а также с пламенно-ионизационным детектором (ПИД). Было выявлено 29 компонентов в эфирном масле зверобоя шероховатого, среди которых основными являются α -пинен (71.6%), мирцен (3.8%), β -кариофиллен (4.8%), кадален (3.4%), β -пинен (2.9%). В эфирном масле зверобоя продырявленного обнаружено 27 летучих веществ, основные из которых α -пинен (61.7%), 3-карен (7.5%), мирцен (3.6%), β -кариофиллен (5.5%), кадален (3.2%), β -пинен (3.0%). На основе проведенных исследований было выявлено сходство изученных образцов, которое может быть связано с географическими и сезонными условиями, так как оба растения были собраны в одном регионе и на одной высоте. Основным компонентом, найденным в исследуемых образцах, стал α -пинен. Также он был найден в маслах, изученных в Индии [76, 77], Иране [78], Италии [79].

В работе [76] изучали состав эфирного масла зверобоя продырявленного, выращенного в Индии. Для анализа применяли ГХ/МС и ГХ/ПИД в режиме линейного программирования температуры колонки. В результате было выявлено 40 летучих компонентов, которые составили 91.0% от общей массы. Основным компонентом эфирного масла оказался гермакрен-D (22.1%). Среди

других важных составляющих, обнаруженных в образце, были α -пинен (8.6%), β -карофиллен (11.3%), α -кадиол (4.4%), β -пинен (3.8%), 2-метилоктан (3.7%), терпинен-4-ол (3.3%). Стоит отметить, что α -пинен и β -пинен известны как противосудорожные вещества. Присутствующий в эфирном масле зверобоя продырявленного терпинен-4-ол обладает антисептическим действием.

Эфирные масла также были предметом изучения ученых из Греции [80]. Они анализировали химический состав масел зверобоя продырявленного культивируемого и дикорастущего. В хроматограф вводили жидкую пробу масла, разбавленную *n*-пентаном. Анализ проводили на колонке DB-5. Всего было найдено 69 компонентов. Основными компонентами являлись гермакрен-D (18.9% и 22.8% в культивируемом и дикорастущем зверобое соответственно), 2-метилоктан (17.8% и 10.8%), β -карофиллен (10.3% и 6.6%), α -пинен (5.2% и 10.1%), и бициклогермакрен (4.1% и 4.8%). Обнаружено, что сесквитерпеноиды являются основными составляющими в масле зверобоя выращенного (52.4%) и дикорастущего (55.4%). Второй основной группой явились монотерпеновые соединения, которые по результатам исследования содержатся в диком зверобое в большей количестве, чем в культивируемом – 24.1% и 12.3% соответственно. По данным анализа было выяснено, что масло, полученное из дикорастущего растения, содержит в себе больше компонентов, таких как гексеналь, камфен, терпинолен, линалоол, α -терпинеол, деканаль, ундеканаль и другие, которые не были обнаружены в образцах, полученных из культивируемого зверобоя. Однако алифатические углеводороды, наоборот, содержатся в большей степени в выращенных в теплицах (30.4%), чем в дикорастущих образцах (18.1%).

Химические составы эфирных масел зверобоя продырявленного имеют ряд различий, что, несомненно, связано с географией произрастания, природными условиями, временем сбора. Так в образцах эфирного масла зверобоя из Литвы [82] основными компонентами являются кислородсодержащие сесквитерпеноиды, оксид кариофиллена, спатуленол, виридифлорол, в то время как α -пинен – основное вещество масла зверобоя из Турции (67.1%) [83] и из Индии (67.3%) [76]. Некоторые сходства наблюдаются между образцами эфирных масел, из

Греции [80], и маслами зверобоя из Южной Франции [85], а именно высокая доля сесквитерпенов. В частности гермакрен-*D*, содержание которого составило 18.9% и 22.8% в культивируемом и дикорастущем зверобое из Греции соответственно, а в образцах из Франции 6.3%-37.3%.

Разница в количественном содержании компонентов может быть связана с множеством различных факторов, как с экологическими, так и с генетическими. Географическое расположение произрастания растения, климатические условия, влажность, питательные вещества в почве, время сбора оказывают влияние на химический состав сырья. Помимо этого, разные результаты выявляются у дикорастущего и культивируемого зверобоя. Видовое разнообразие растения также оказывает влияние на компонентный состав исследуемых объектов.

В работах [86, 87] изучено эфирное масло зверобоя продырявленного российского ареала произрастания. Исследование эфирного масла зверобоя продырявленного, собранного на территории Башкортостана представлено в работе [86]. Эфирное масло получали методом перегонки с водяным паром, компонентный состав определяли методом ГХ-МС на хроматографе TRIO-100 скапиллярной колонкой DB-5 в режиме линейного программирования температуры. Установлено, что в состав эфирного масла входит 148 соединений, из которых идентифицировано 85. Идентификация компонентов позволила определить, что в составе эфирного масла преобладают сесквитерпеновые углеводороды (69.01%), из которых доминирующим является оксид карриофиллена, на долю монотерпенов приходится 20.53%, из которых в наибольшем количестве присутствует α -пинен.

В работе [87] проведено сравнение эфирного масла травы зверобоя продырявленного и зверобоя пятнистого, выращенных в Республике Коми. Все образцы ЛРС имели одинаковый компонентный состав, а содержание летучих компонентов варьировалось. Доминирующим компонентом эфирного масла этих образцов являлся гермакрен-*D*. В работе [20] изучен спиртовой экстракт травы зверобоя методом ГХ-МС. Отмечено, что в составе летучих экстрагируемых веществ не содержится специфических маркеров зверобоя.

В работе [88] были изучены летучие компоненты зверобоя володушковидного (*Hypericum bupleuroides* G.), произрастающего в Грузии и на северо-востоке Турции, где и был собран исследуемый образец. Эфирное масло зверобоя было получено методом перегонки с водяным паром. Анализ проводили на газовом хроматографе с использованием ПИД и МС детекторов в режиме линейного программирования температуры колонки. В результате было идентифицировано 30 компонентов, среди которых основными являлись β -сесквифиландрен (33,2%), β -карофиллен (20,2%), нафталин (7,0%), γ -элемен (5,6%). Разница в количественном содержании компонентов может быть связана с множеством различных факторов, как с экологическими, так и с генетическими. Место произрастания растения, климатические условия, влажность, питательные вещества в почве, время сбора оказывают влияние на химический состав сырья. Помимо этого, разные результаты выявляются у дикорастущего и культивированного зверобоя. Видовое разнообразие растения также оказывает влияние на компонентный состав исследуемых объектов.

В исследовании [79] впервые применен метод ПФА-ГХ-МС для изучения летучих компонентов «зверобоя продырявленного». Исследования проводили на приборе Carlo Erba Fractovar 2920 с масс-спектрометрическим детектированием и стационарной неполярной фазой OV-1 в режиме линейного программирования температуры колонки. Проведено сравнение хроматограмм, полученных при анализе паровой фазы зверобоя и эфирного масла. Показано, что в состав эфирного масла входят сесквитерпеновые соединения, которые отсутствуют на хроматограммах зверобоя при парофазном анализе ЛРС. Сделан вывод о том, комбинация этих двух наборов данных дает более полную информацию об объекте.

Таким образом, задачу исследования ЛРС методом ГХ-МС ставят перед собой многие ученые по всему миру. Это связано, в первую очередь, с проблемой поиска новых, современных, инструментальных методов исследования ЛРС. Анализ Российской, Американской, Европейской и др. Фармакопей показал, что указанные в них количественные методы определения компонентов ЛРС, имеют

ряд недостатков: применение токсичных растворителей, длительная процедура подготовки пробы, отсутствие Фармакопейных статей на то или иное ЛРС, неточности при расчетах. Для анализа ЛРС методом хромато-масс-спектрометрии используют эфирное масло или экстракты. Но использование различных методик их получения влияет на качественный и количественный состав полученных объектов исследования. Для получения характерного для данного растения хроматографического профиля компонентов РПФ, не осложненного выбором режима перегонки, способа экстракции и/или природы растворителя, можно использовать метод прямого парофазного анализа (ПФА) лекарственного растения. Особенности статического и динамического вариантов ПФА подробно рассмотрены в работах [1-4, 52].

1.3 Парофазный газохроматографический анализ и его возможности для определения летучих соединений

Газовая экстракция – это способ получения качественной и количественной информации о составе твердых и жидких проб путем анализа выделяемых из них летучих компонентов в газовую фазу. В основе метода лежит газовая экстракция летучих компонентов из конденсированной (твердой или жидкой) фазы с последующим анализом равновесного пара (АРП) методом газовой хроматографии. Данный метод называют также анализом равновесного пара (АРП) или парофазным анализом (ПФА). Б.В. Иоффе, А.Г. Витенберг и Б.В. Столяров разработали теорию метода, аппаратное исполнение и основные аналитические приборы [1]. За рубежом над совершенствованием метода парофазного анализа работали: Б. Колб, Л.С. Эттре, Х. Хахенберг, А. Шмидт [2, 3, 89, 90].

Газовый экстракт состоит из летучих компонентов, извлекаемых из конденсированной фазы посредством статического или динамического вариантов парофазного анализа (ПФА). В настоящее время активно применяется метод выдувания и улавливания, при котором выделяемые путем динамической экстракции соединения, концентрируются на адсорбционной ловушке. В

иностранной литературе метод получил название “purge and trap” [89]. ПФА получил широкое распространение в практике газовой хроматографии благодаря легкости выполнения и простоте аппаратного оформления [52]. Ведущие производители газохроматографической аппаратуры выпускают приспособления, подходящие к стандартным хроматографам, для проведения автоматизированного парофазного анализа. А многие разработанные на основе метода ПФА методики являются гостированными и используются во всем мире для анализа различных объектов [91]. Особенности этих методов делают их во многих случаях незаменимыми и весьма эффективными.

Статические варианты анализа равновесного пара и их применение. К статическим вариантам ПФА относят однократную и многократную газовую экстракцию вещества из конденсированной фазы. Простейший вариант *однократной* газовой экстракции состоит в том, что исследуемый объект помещают в замкнутый сосуд и выдерживают при постоянной температуре до установления равновесия между контактирующими фазами в гетерогенной системе «конденсированная фаза – газ». Количество экстрагируемого летучего компонента зависит от объемов контактирующих фаз и значения коэффициента распределения (K), представляющего собой коэффициент пропорциональности между концентрациями определяемого вещества в двух контактирующих фазах. Оба этих параметра определяют чувствительность анализа. Значение степени повышения чувствительности анализа по сравнению с прямым вводом анализируемого вещества (α) определяют из соотношения [1, 52]:

$$\alpha = \frac{10^3}{K + \frac{V_G}{V_L}},$$

где K – коэффициент распределения, V_G – объем газовой фазы, V_L – объем жидкой фазы.

Целесообразность использования АРП зависит от значения K и варьируется в широком интервале значений (от 10^{-2} до 10^4). Уменьшение предела обнаружения при анализе равновесного пара с использованием пламенно-ионизационного детектора до 10^{-6} – $10^{-7}\%$ при $K = 10 - 30$ позволяет считать метод ПФА более

предпочтительным по сравнению с прямым вводом жидкой пробы, где предел обнаружения – 10^{-4} – $10^{-5}\%$ [1, 52]. Статическая многократная газовая экстракция применяется для летучих веществ со значениями K не более сотен единиц. При высоких значениях коэффициента распределения ($K > 10^3$) выигрыш в чувствительности при вводе в газовый хроматограф паровой фазы пропадает по сравнению с прямым вводом жидкости. Оправданность использования метода ПФА в данном случае определена возможным загрязнением колонки нелетучими компонентами при вводе жидкой пробы в хроматограф. Снизить значение K можно за счет увеличения температуры, так как известно, что с ростом температуры водных растворов коэффициенты распределения уменьшаются в 1.5 – 2 раза на каждые 10°C , по крайней мере, до 100°C . Использование высоких температур позволило значительно расширить области применения парофазного анализа [92].

Содержание соединения в исследуемом растворе определяют по уравнению [1, 52]:

$$C_{\text{ж}} = C_{\text{г}}(K+r),$$

где $C_{\text{ж}}$ – концентрация анализируемого вещества в жидкой фазе;

$C_{\text{г}}$ – концентрация анализируемого вещества в газовой фазе;

$$r = V_{\text{г}}/V_{\text{ж}}.$$

Уравнение справедливо при постоянстве объемов жидкой и газовой фаз.

Существуют также системы с неизвестными параметрами фазового распределения. В этом случае применяют метод *многократной* газовой экстракции [1], предложенный впервые в работе [93], данные исследования получили развитие в работах [94, 95]. Этот вариант газовой экстракции применим, если исследуемая гетерогенная система обладает неизвестными параметрами фазового распределения. Сущность его заключается в экстракции анализируемого вещества в газовую фазу с последующей заменой образующейся газовой фазы на чистый воздух (или азот). Первый полученный образец газового экстракта используют для определения концентрации анализируемого вещества в газовой фазе методом газовой хроматографии, а последующие – для определения константы распределения K .

Динамические варианты анализа равновесного пара и их применение.

Объекты с высоким значением коэффициента распределения ($K > 10^3$) требуют существенного увеличения объемов контактирующих фаз, что с успехом реализуется в динамических условиях. В данном варианте АРП через небольшой объем жидкости пропускают большой объем воздуха или инертного газа (до нескольких десятков литров). Пробоподготовку для последующего газохроматографического исследования летучих компонентов паровой фазы проводят двумя способами:

- 1) анализ равновесного пара над раствором, выполняемый в статических условиях, до и после пропускания через него известного объема газа.
- 2) непосредственный анализ потока газа, прошедшего через исследуемый раствор.

Сущность метода заключается в том, что жидкая или твердая проба непрерывно продувается потоком газа, который увлекает ее летучие составные части. Поэтому речь идет о непрерывной газовой экстракции. Если газ в случае жидкой пробы продувается через нее даже в форме мелкодисперсных газовых пузырей, то процесс известен как “purge and trap” (выдувание и улавливание) [96-100].

Летучие вещества могут быть определены в конечном газовом экстракте количественно, если экстракция была полной или известна степень экстракционного извлечения. В результате первоначально получается сильно разбавленная газовая смесь, которая должна повторно концентрироваться. Это может происходить путем абсорбции растворителем или адсорбции на адсорбенте. В последнем случае адсорбционная трубка может заполняться адсорбентами со ступенчатым изменением адсорбционной способности. Затем она нагревается в режиме продувки; при этом десорбированные вещества переводятся газом-носителем в разделительную колонку.

Если в случае капиллярных колонок десорбция происходит недостаточно быстро, то вызванное этим уширение пиков должно быть устранено в дополнительно предусмотренной (после термодесорбера) холодной зоне (-150°C). Холодная зона может также брать на себя задачу адсорбционной трубки, поскольку там вещества конденсируются из газовой фазы [89].

Развитие методов газовой экстракции определило ряд направлений, по которым в настоящее время проводится анализ различных объектов природного и техногенного происхождения.

Непрерывный хроматомембранный метод парофазного анализ (НХПФА), в основе которого лежит мембранная экстракция [101], происходящая за счет различия скоростей проникновения разделяемых смесей через мембраны. Хроматомембранный вариант ПФА основан на хроматомембранном принципе реализации массообменных процессов с движением потоков водной пробы и газа-экстрагента через бипористую гидрофобную матрицу [102]. Мембранная экстракция в сочетании с газовой хроматографией применяется для непрерывного мониторинга летучих соединений водных проб окружающей среды [103] В нашей стране эти методы активно развиваются Л.Н. Москвиным и О.В. Родинковым с сотрудниками [104]. Ими разработаны хроматомембранная газовая экстракция и хроматомембранная жидкостная экстракция. Основными достоинствами метода НХПФА является высокая эффективность массообмена между потоками жидкой и газовой фазы и возможность непрерывного выделения летучих органических соединений из потока анализируемой водной фазы в поток газа-экстрагента. Аналитические возможности НХПФА подробно рассмотрены в обзоре [105].

Изучение комплексов включения с циклодекстринами методом ПФА. Статический парофазный газохроматографический используется в последнее время для изучения комплексов включения циклодекстрина (ЦД) с летучими соединениями [106]. ЦД – соединения, способные образовывать супрамолекулярные системы по типу «гость-хозяин». Инкапсулирование летучих компонентов ЦД позволяет увеличить растворимость молекул «гостя» (летучих органических соединений), уменьшая при этом их летучесть. Применение статического варианта ПФА для изучения комплексов включения позволяет определить константу комплексообразования, получить информацию об эффективности инкапсулирования летучих соединений, провести мониторинг изменения их свойств.

Анализ выдыхаемого воздуха методом ПФА с целью диагностики различных заболеваний. Исследование возможностей применения метода ПФА-ГХ биологических жидкостей с целью выявления маркеров онкологических заболеваний на ранних стадиях развития, проводятся в последнее время как за рубежом [107], так и в нашей стране [108].

Многокомпонентные объекты для ПФА анализа. Классической задачей для ПФА-ГХ является поиск остаточных растворителей или примесей в различных объектах, когда задача заключается в поиске одного или нескольких компонентов. Но существуют объекты, паровая фаза которых содержит десятки или даже сотни летучих компонентов. Проводить идентификацию и количественный анализ каждого компонента в отдельности в данном случае бывает нецелесообразно. В связи с этим тенденции развития аналитической химии, связанные с заменой покомпонентного анализа общим образом объекта [109], определили путь развития парофазного анализа многокомпонентных объектов. Таким образом, получаемые хроматографические характеристики компонентов исследуемых объектов обрабатывают с использованием математических приемов обработки численной информации. Этот подход получил название *хеометрика*, он позволяет выделить основную химическую информацию, избавившись от «шума» [110]. В настоящее время существует ряд компьютерных программ, позволяющих автоматически обрабатывать большие массивы данных.

Гетерогенные конденсированные фазы как объекты для ПФА. В настоящее время в качестве объектов для парофазного анализа могут выступать твердые тела, взвеси, эмульсии [111]. Исследования с участием гетерогенных конденсированных фаз позволяют исследовать кинетику химической реакции в тех случаях, если реакция в системе возможна. Данный подход позволяет следить за ходом химической реакции в конденсированной фазе путем измерения концентраций реагирующих веществ в соответствующей газовой фазе [112]. К гетерогенным конденсированным фазам для ПФА относятся также лекарственные растения, анализ которых рассматривается в данном диссертационном исследовании.

Парофазный газохроматографический анализ находит широкое применение для исследования пищи [113], напитков [114], объектов природного происхождения [115]. Статический АРП зарекомендовал себя в последние годы как перспективный метод исследования ЛРС.

В работе [116] методом статического парофазного анализа исследован запах шишек хмеля. Сухие и свежие шишки хмеля термостатировали в закрытом сосуде, затем паровую фазу анализировали методом ГХ-ДИП. Качественный анализ проводили методом ГХ-МС. На основании проведенных исследований сделан вывод, что линалоол и мирцен составляют основу запаха шишек хмеля, являясь доминирующими компонентами. Кроме того, метод позволил найти новые соединения, входящие в состав паровой фазы шишек хмеля: 4,5-эпокси-(Е)-2-декален, 1,3,5-ундекатриен, 1,3,5,9-ундекатетраен, 1,5-октадиен-3-он. Были определены отличия в компонентном составе сухих и свежих шишек хмеля. В частности, уменьшение содержания (Z)-3-гексенала в сухих шишках связывают с процессами их сушки.

В работе [117] представлены результаты статического парофазного газохроматографического анализа ЛРС «расторопши пятнистой». Объектами исследования являлись: ЛРС (плоды и лужга расторопши) (ЗАО «Самаралектравы»), лекарственные препараты на основе расторопши – «Карсил» (Болгария, г. София «Софарма»), «Силимар» («Фармцентр ВИЛАР»), «Гепабене», (Германия, «МерклеГмбХ»), экстракт расторопши жидкий, предоставленный кафедрой фармакогнозии СамГМУ, а также «Биологически активная добавка к пище» (ООО «Ульяновск-хлебопродукт»). Полученные данные позволяют сделать вывод, о том, что по совокупности индексов удерживания при линейном программировании температуры колонки можно определить принадлежность сырья лекарственному растению «расторопша пятнистая» и с достаточно высокой вероятностью оценивать подлинность лекарственных препаратов и биологически активных добавок на основе этого растения.

В работе [118] показана возможность экспрессной оценки подлинности ЛРС «лаванда колосовая», «мята перечная» «трава тархуна» методом ПФА-ГХ-ПИД на

колонке с неполярной стационарной фазой. Показано, что полученные хроматографические характеристики (индексы удерживания при линейном программировании температуры I_i^T и относительные площади пика $A_{\text{отн}i}$) летучих компонентов трех исследованных растений можно использовать для определения подлинности ЛРС.

В работе [119] представлен и статический, и динамический вариант парофазного анализа. Объектом исследования являлся чеснок (*Allium sativum* L.), который анализировали методом ПФА-ГХ-МС. Пробоподготовку вели тремя способами: измельчением головок чеснока и нагреванием в закрытом сосуде, получением эфирного масла гидродистилляцией для дальнейшего анализа паровой фазы, также измельченный чеснок подвергался жеванию, а выдыхаемый воздух продувался через стеклянную трубку, заполненную адсорбентом Tenax для адсорбции летучих соединений серы. Полученные профили трех исследуемых образцов имеют близкий вид, особенно сильное сходство установлено у образцов измельченного чеснока и масла. Отмечено разложение некоторых компонентов чеснока при попадании в ротовую полость человека и дыхательную систему. Установлены два серосодержащих органических компонента чеснока – 2-пропен-1-тиол и диаллилдисульфид, ответственные за узнаваемый запах чеснока в выдыхаемом воздухе.

Исследовано влияние времени хранения молотого кофе сортов «Робуста» и «Арабика» методом парофазного анализа. [120] Молотый кофе помещали в герметичный флакон, добавляли тетрагидрофуран и дистиллированную воду для коррекции сигнала детектора, встряхивали. Эксперимент проводили на хроматографе Carlo Erba 4120, оснащенный дозатором равновесного пара. Проводили криоконцентрирование. Далее летучие вещества нагревали до 180°C. Основной анализ паровой фазы проводили на малополярной колонке DB-5 в режиме линейного программирования температуры с детектором ионизации пламени. Идентификацию компонентов проводили с использованием колонки DB-Wax с масс-спектрометрическим детектированием. Результаты исследования показали, что метод парофазного анализа позволяет не только оценить свежесть

кофе, но и без точного знания происхождения и степени обжарки позволяет различить сорта «Робуста» и «Арабика».

Изучено содержание летучих компонентов паровой фазы плодов черешни методом динамического парофазного анализа в сочетании с газовой хроматографией [121]. 500 г спелых плодов черешни собирали в банки, закрывали их герметично тefлоновыми крышками, сквозь которые пропускали стеклянные трубки («ловушки»), заполненные сорбентом Tenax. Впоследствии компоненты паровой фазы термически десорбировались. Далее использовали прием криоконцентрирования и последующего нагрева пробы. Отобранную паровую фазу вводили в испаритель газового хроматографа, оснащенного масс-спектрометрическим детектором. Использовали капиллярную колонку с полярной неподвижной фазой DB-Wax в режиме линейного программирования температуры. Всего в паровой фазе плодов черешни обнаружено 28 летучих компонентов нескольких химических классов, включая альдегиды, спирты и сложные эфиры. Доминирующим компонентом паровой фазы плодов черешни являлся пропанол-2. Также высоким содержанием обладали этанол и октан. Интересно, что паровая фаза кислых плодов черешни имела высокое содержание бензальдегида и гексаналя, паровая фаза сладких плодов тоже имела в своем составе данные соединения, но в значительно меньшем количестве.

Таким образом, парофазный газохроматографический анализ является общепризнанным методом определения летучих веществ в самых разнообразных объектах любого агрегатного состояния. Следует отметить, что в последнее время этот метод стал применяться в медицинской практике. В Государственной Фармакопее XIII издания [22] в общей фармакопейной статье «Газовая хроматография» появился метод ПФА. Данный метод используют для анализа биологических жидкостей и выдыхаемого воздуха человека [112, 108], пищевых продуктов, напитков, ЛРС и фитопрепаратов на его основе для определения качества и подлинности. Развитие методов ПФА открывает широкие возможности обнаружения следов примесей в жидкостях и твердых объектах. Эти методы во многих случаях бывают незаменимы ввиду ряда особенностей. К таким

особенностям относится, прежде всего, возможность определения летучих компонентов в объектах, прямой ввод проб которых в газовый хроматограф невозможен или нецелесообразен из-за недостаточной чувствительности детектирующих устройств, присутствия легко разлагающихся веществ, нежелательности загрязнения колонки нелетучим остатком или опасности нарушения в системе химического равновесия. Примером могут служить известные в настоящее время методы анализа крови на содержание алкоголя и токсичных летучих веществ. Эффективность и официальное признание этих методов способствовали совершенствованию техники парофазного газохроматографического анализа и дали возможность для дальнейшего внедрения в экологию, медицину, криминалистику и другие важнейшие отрасли науки и техники.

1.4 Современные представления об анализе многокомпонентных объектов.

Хеометрика

Современный подход к анализу многокомпонентных объектов предполагает обработку данных хеометрическими методами.

Хеометрика – это химическая дисциплина, применяющая математические, статистические и другие методы, основанные на формальной логике, для построения или отбора оптимальных методов измерения и планов эксперимента, а также для извлечения наиболее важной информации при анализе экспериментальных данных. Дисциплина находится на стыке двух наук – химии и математики, она решает задачи получения химически важной информации из химических данных и представления этих данных, а также получения данных, содержащих такую информацию [110, 122].

Основной объект, с которым работает хеометрика – экспериментальные данные. Встречаются *одномерные* данные (к примеру, значение оптической плотности, полученное на монохроматическом фотометре), *многомерные* данные – набор из нескольких измерений, относящихся к одному образцу (спектр,

хроматограмма), *двухмодальные* данные – набор спектров, снятых для I -образцов на J -длинах волн, *трех и более модальные*, – те, которые можно представить в виде параллелепипеда, где каждое ребро соответствует своему типу переменной (применяются для ГХ-МС) [123].

Основная задача хемометрики заключается в извлечении из данных нужной химической информации.

Для иллюстрации рассмотрим следующий идеализированный пример. Пусть есть система, состоящая из смеси трех веществ А, В и С без посторонних примесей, абсолютно точно известны спектры $s_A(\lambda)$, $s_B(\lambda)$, $s_C(\lambda)$ всех компонентов. Причем слово «спектры» употребляется в самом общем смысле. Это могут быть любые многомерные данные, например, хроматограммы, где λ – время удерживания. Требуется определить концентрации по спектру смеси $x(\lambda)$, который так же можно получить без погрешностей. Если каждый спектр содержит значения для 30 времен удерживания, то для решения этой задачи можно составить 30 уравнений относительно трех неизвестных концентраций c_A , c_B и c_C .

$$x(\lambda_1) = c_A s_A(\lambda_1) + c_B s_B(\lambda_1) + c_C s_C(\lambda_1)$$

...

$$x(\lambda_{30}) = c_A s_A(\lambda_{30}) + c_B s_B(\lambda_{30}) + c_C s_C(\lambda_{30})$$

Нужную информацию можно получить, составив только три уравнения, соответствующие любым трем длинам волн. Исходные данные избыточны по отношению к искомой информации.

Если сделать пример более реалистичным, допуская, что все спектры содержат некоторую случайную погрешность, то оценки концентраций по разным тройкам длин волн будут отличаться. Эти оценки можно усреднить и получить концентрации с лучшей точностью. Заметим, что того же можно было бы достичь и с помощью повторных экспериментов. Однако, это путь требует больших затрат сил и времени. Гораздо проще уменьшать неопределенность количественного анализа за счет увеличения числа переменных (каналов, длин волн) в одном единственном эксперименте.

Для выделения полезной информации в хемометрике используются методы сжатия данных. Идея этих методов состоит в том, чтобы представить исходные данные, используя новые скрытые переменные. При этом число новых переменных должно быть существенно меньше, чем число исходных переменных, а потери от такого сжатия должны быть сопоставимы с шумом в данных. Сжатие данных позволяет представить полезную информацию в более компактном виде, удобном для визуализации и интерпретации.

Наиболее популярным способом сжатия данных является метод главных компонент (РСА). С математической точки зрения метод главных компонент – это декомпозиция исходной 2D - матрицы X , т. е. представление ее в виде произведения двух 2D-матриц T и P .

$$X = TP^t + E = \sum_{a=1}^A t_a p_a^t + E,$$

где T – матрица *счетов*; P – матрица *нагрузок*; E – матрица остатков.

Число столбцов t_a в матрице T и p_a в матрице P равно эффективному (химическому) рангу матрицы X . Эта величина A называется *числом главным компонент* (РС).

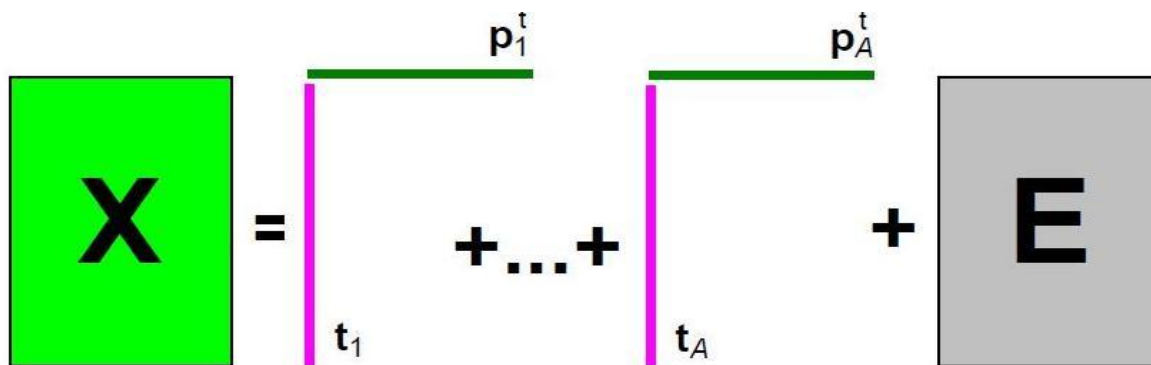


Рисунок 1 – Графическое представление метода главных компонент

Для иллюстрации метода РСА снова вернемся к примеру с системой из трех веществ A , B и C , но их чистые спектры $s_A(\lambda)$, $s_B(\lambda)$, $s_C(\lambda)$ теперь не известны. Матрица спектров смесей X может быть представлена как произведение матрицы концентраций C и матрицы спектров чистых компонентов S .

$$X = CS^t + E$$

Число строк в матрице X соответствует числу образцов (I) и каждая ее строка отвечает спектру одного образца, снятому для J длин волн. Число строк в матрице C так же равно I , а вот число столбцов равно числу компонентов в смеси ($A=3$).

В идеальном варианте расчета Спектры S и концентрации C близки к истинным значениям, хотя точное их восстановление невозможно. Причина этого кроется не только в погрешностях эксперимента, но и в том, что спектры могут частично перекрываться. Разделение данных на химически осмысленные компоненты методом РСА называется *факторным анализом*.

Метод РСА применяется и при исследовательском анализе любых химических данных.

Проиллюстрируем простейший двумерный метод РСА.

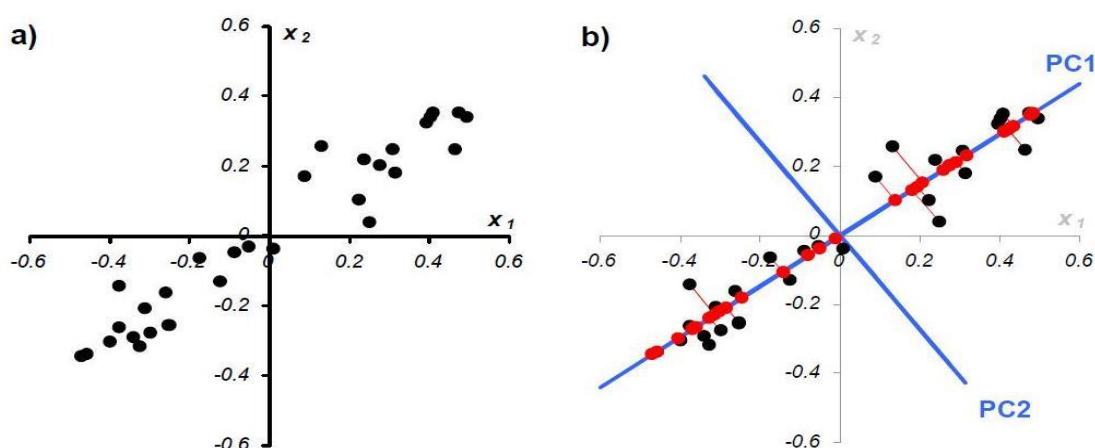


Рисунок 2 – Графическая иллюстрация метода главных компонент

На рисунке 2а представлены данные, состоящие из двух переменных x_1 и x_2 . На рисунке 2б те же данные показаны в новых координатах. Вектор нагрузок p_1 первой главной компоненты PC1 определяет направление новой оси, вдоль которой происходит наибольшее изменение данных. Проекция всех исходных точек на эту ось составляют вектор t_1 . Вторая главная компонента p_2 ортогональна первой и её направление (PC2) соответствует наибольшему изменению в остатках, показанных на рисунке 2б отрезками, перпендикулярными оси p_1 .

Этот пример показывает, что метод главных компонент осуществляется последовательно. Исследуются остатки E_a , среди них выбирается направление

наибольшего изменения, данные проецируются на ось, вычисляются новые остатки [124].

При исследовании данных методом PCA особое внимание уделяется графикам счетов и нагрузок. Они помогают понять, как устроены данные. Близость двух точек означает их схожесть. Точки, расположенные под прямым углом являются некоррелированными, а расположенные диаметрально противоположно – имеют отрицательную корреляцию. Применяя этот подход в задачах хроматографического анализа, можно, например, установить, что линейные участки на графике соответствуют областям чистых компонентов на хроматограмме, искривленные участки представляют области наложения пиков, а число таких участков соответствует числу различных компонентов в сложном кластере [123].

Метод главных компонент можно трактовать как проецирование данных на подпространство меньшей размерности. Возникающие при этом остатки можно считать шумом, не содержащим значимой химической информации. [124]. Активное развитие хемометрики в последние пять-семь лет и включение ее в методологию современного химического анализа значительно расширяет арсенал аналитических методов, делает их более эффективными и быстрыми. В работах [125 – 128] используются приемы хемометрической обработки химической информации.

В исследовании фитопрепаратов на основе лекарственных трав [125] использовался, в частности, метод главных компонент (PCA). Хемометрическую оценку хроматографических данных проводили для нескольких партий лекарственного растительного сырья Комбретума мелкоцветного и *Mitracarpus Scaber*. Эксперимент проводили с использованием газового хроматографа с масс-спектрометрическим детектором. Предварительная подготовка исследуемых объектов состояла в удалении пигментов хлорофилла и экстракции компонентов дихлорметаном. Анализ данных позволил четко дифференцировать два анализируемых объекта в смеси и показал небольшие отличия в компонентном составе лекарственных препаратов в разных партиях. Информация

проиллюстрирована при помощи хемометрической обработки данных, с использованием программного обеспечения SIMCA P-11 .

В работе [126] оценку качества препаратов на основе лекарственного растительного сырья проводили методом газовой хроматографии. Контроль качества фитопрепаратов рекомендуется осуществлять с использованием хемометрических методов обработки данных.

Исследователи из Китая проанализировали фитоператы на основе ЛРС [127] с использованием получения хроматографического «отпечатка пальцев». Хемометрический подход к обработке полученных данных показал себя как сильный инструмент для оценки качества препарата и защиты от фальсификации.

Фитопрепарат с названием Yiqing так же был исследован при помощи хроматографического анализа с последующей хемометрической обработкой данных. В исследовании участвовали препараты девяти изготовителей. Было определено девять основных маркеров этого препарата. Содержание этих девяти маркеров имело существенные отличия при переходе от партии к партии. Данный подход к контролю качества препаратов и исходного растительного сырья является эффективным [128].

В работе [129] обсуждается возможность диагностики различных заболеваний и поиск их биомаркеров на основе характерных хроматографических или электрофоретических профилей биологически активных соединений с последующей хемометрической обработкой.

1.5 Заключение к Обзору литературы

Анализ данных литературы показывает, что проблема изучения компонентов лекарственных растений привлекает внимание исследователей, так как она является актуальной с точки зрения установления подлинности ЛРС и фитопрепаратов. Изучение состава летучих БАС лекарственного растительного сырья методом ГХ-МС проводят, используя в качестве объектов анализа эфирное масло или экстракты. Обработку результатов анализа эфирного масла или экстрактов осуществляют, идентифицируя каждый из компонентов в отдельности.

Следует отметить, что режим перегонки и способ экстракции могут варьироваться, что существенно влияет на качественный и количественный состав пробы. Кроме того, изготовление эфирных масел и экстрактов является длительным трудоемким процессом, что осложняет процедуру анализа. В связи с этим актуальным становится поиск новых подходов к анализу ЛРС. В нашей работе предложено проводить анализ ЛРС «пижма обыкновенная», «календула лекарственная», «боярышник кроваво-красный», «зверобой продырявленный» методом статического парофазного газохроматографического анализа для определения подлинности ЛРС и фитопрепаратов на его основе. Следует отметить, что процесс получения газового экстракта методом статического парофазного анализа является простым и доступным, не требующим использования сложной аппаратуры. Необходимо изучить закономерности выделения летучих компонентов из растительной матрицы в газовую фазу. С теоретической точки зрения предлагаемый подход служит развитию парофазного анализа гетерогенных конденсированных фаз.

Опираясь на тенденции развития современной аналитической химии, покомпонентный анализ удобно заменять общим образом объекта. При этом подходе результаты анализа часто представляют в виде цельных профилей, характеризующих качественный и количественный состав многокомпонентного объекта, а также применяют к полученным данным приемы хемометрики.

На основании проведенного анализа литературных данных поставлена цель и сформулированы задачи диссертационной работы.

2 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1 Объекты исследования

Объектами исследования являлись четыре вида осушенных лекарственных растений – как ботанических, так и промышленных образцов: «пижма обыкновенная» (цветки), «календула лекарственная» (цветки), «боярышник кроваво-красный» (плоды), «зверобой продырявленный» (травя). Ботанические образцы собирали в период с 2013 по 2017 гг. Срок годности промышленных образцов ЛРС – 2 года. В исследовании участвовали фитопрепараты на основе данных видов ЛРС в твердых и жидких лекарственных формах. Срок годности фитопрепаратов – 3 года. Исследуемые образцы ЛРС и фитопрепаратов анализировались не позднее, чем через 5-10 мес. с момента выпуска. Эфирное масло и спиртовые экстракты были изготовлены из ботанических образцов ЛРС в рамках данного исследования по стандартным фармакопейным методикам [22].

В работе использовались следующие ботанические и промышленные образцы ЛРС и фитопрепаратов:

Пижма обыкновенная (*Tanacetum vulgare* L.)

1. Ботанический образец цветков пижмы, собранный на фармакопейном участке Ботанического сада Самарского университета.
2. Промышленные образцы производства Красногорсклексредства (Московская обл., г. Красногорск), Травы Алтая (г. Москва), Фитофарм (г. Анапа), Камелия-ЛТ (г. Пенза) Иван-чай (г. Москва), ВИЛАР (Самарская обл.).
3. Фитопрепараты:
 - таблетированный сухой экстракт пижмы «Танацехол» (ВИЛАР),
 - эфирное масло пижмы, изготовленное из ботанического образца ЛРС.

Календула лекарственная (*Calendula officinalis* L.)

1. Ботанический образец цветков календулы, собранный на фармакопейном участке Ботанического сада Самарского университета,

2. Промышленные образцы производства Фитофарм (г. Анапа), Фарм-продукт (Алтайский край, г. Барнаул), Фиточай календула, ZAMONA RANO, (Республика Узбекистан), Ташкентская обл., п. Номданак.

3. Фитопрепараты:

- календулы спиртовой экстракт, полученный из Ботанического образца цветков.
- масляный экстракт календулы, «Лекус» г. Москва».

Боярышник кроваво-красный (*Crataegus sanguinea*)

1. Ботанический образец плодов боярышника, собранный на фармакопейном участке Ботанического сада Самарского университета,

2. Промышленные образцы производства Красногорсклексредства (Московская обл., г. Красногорск), Фитофарм (г. Анапа).

3. Фитопрепараты:

- капсулы на основе сухого экстракта плодов боярышника «Боярышник форте», «Парафарм», г. Москва,
- таблетки на основе сухого экстракта листьев и цветков боярышника «КардиоАктив боярышник», «Эвалар», Алтайский край, г. Бийск,
- таблетки на основе сухого экстракта боярышника «Боярышник. Таблетки для рассасывания», «NaturProdukt», Нидерланды,
- капсулы на основе сухого экстракта листьев и цветков боярышника «Боярышник Премиум», «Фарм-про», г. Новосибирск,
- спиртовая настойка плодов боярышника «Боярышника Настойка» «Кировская фармацевтическая фабрика», г. Киров.

Зверобой продырявленный (*Hypericum perforatum* L.)

1. Ботанический образец травы зверобоя, собранный на фармакопейном участке Ботанического сада Самарского университета.

2. Промышленные образцы производства Красногорсклексредства (Московская обл., г. Красногорск), Здоровье (г. Москва), Иван-чай (Московская обл, пос. Нахабино).

3. Фитопрепараты:

- капсулы с сухим экстрактом травы зверобоя «Деприм», «Sandoz», Словения, Любляна,
- масляный экстракт зверобоя продырявленного, «Лекус», г. Москва.

2.2 Методика проведения парофазного газохроматографического анализа лекарственного растительного сырья и фитопрепаратов

Пробоподготовка. Газовую экстракцию летучих компонентов из твердых (ЛРС и таблетки) и жидких (эфирное масло, экстракты) образцов проводили в одинаковых условиях в интервале температур 30 – 140°C, варьируя время экстракции от 5 до 50 мин. Для этого пробы осушенных образцов ЛРС массой 3 г, растертые в порошок таблетки массой 3 г, жидкий экстракт или эфирное масло объемом 1 см³ помещали в герметичный стеклянный флакон емк. 10 мл, который устанавливали в металлический контейнер, находящийся в термостате ($\pm 1^\circ\text{C}$) при исследуемой температуре. Для получения информации об оптимальной продолжительности газовой экстракции при выбранной температуре пробу ЛРС нагревали в течение 5, 10, 20, 30, 40 и 50 мин. По окончании процесса газовой экстракции нагретым стеклянным шприцем отбирали газообразную пробу объемом 1 мл и вводили ее в хроматограф с делением потока 1 : 50. В ходе выполнения этих исследований были определены оптимальные условия газовой экстракции для получения хроматографического профиля компонентов РПФ.

При анализе образцов ЛРС и фитопрепаратов методом ПФА-ГХ в выбранных оптимальных условиях получения газовых экстрактов для каждого исследуемого объекта готовили пять отдельных газообразных проб. При анализе жидкой пробы эфирного масла предварительно проводили его разбавление растворителем *n*-пентаном в соотношении 1:100. Раствор эфирного масла в *n*-пентане объемом 0.2 мкл отбирали хроматографическим стеклянным шприцем и вводили в хроматограф с делением потока 1:50.

Газохроматографический эксперимент. Анализ газовых экстрактов проводили с использованием газовых хроматографов с пламенно-ионизационным (ДИП) и масс-спектрометрическим (МС) детекторами. В методе ПФА-ГХ-ДИП использовали газовый хроматограф «Кристалл 5000.2» (г. Йошкар-Ола, Россия) и кварцевую колонку (30 м × 0.32 мм, $d_f = 0.25$ мкм) с малополярной 5 %-дифенил-95%-диметилполисилоксановой неподвижной фазой Rtx-5 (Restek, США). Газ-

носитель – азот, объемная скорость на выходе из колонки 1 см³/мин. Избыточное давление на входе в колонку 35 кПА. Температура испарителя 200°C, температура детектора 200 °С. Программное обеспечение «Хроматэк Аналитк 3.0». В методе ПФА-ГХ-МС применяли хроматограф Agilent 7890 GC (США), совмещенный с масс-селективным детектором (5975 С) с ионизацией электронным ударом. Использовали капиллярную колонку (30 м × 0.25 мм, d_f = 0.25 мм) с 5 %-дифенил-95%-диметилполисилоксановой неподвижной фазой HP-5ms. Газ-носитель – гелий, объемная скорость на выходе из колонки 1 см³/мин. Температура испарителя 270°C, температура детектора 200°C, температура источника ионов 150°C, температура квадруполя 230°C, температура переходной камеры 280°C. Диапазон сканирования: 45-500 а.е.м. Программное обеспечение “AgilentChemStation”. При использовании указанных газовых хроматографов применяли одинаковый режим программирования температуры колонки: изотерма при температуре 40°C в течение 2 минут, далее – линейное программирование температуры со скоростью 4°C/мин до температуры 180°C. Данный режим рекомендован в работе [130] для получения воспроизводимых результатов ГХ анализа эфирных масел с использованием капиллярных колонок с неполярными и малополярными неподвижными фазами.

По результатам газохроматографического эксперимента рассчитывали следующие хроматографические характеристики:

1) индексы удерживания Ван-ден-Доола и Кратса [131, 132]:

$$I_i^T = \left(\frac{t_{Ri} - t_{Rz}}{t_{Rz+1} - t_{Rz}} \right) + 100z \quad (1)$$

где t_{Ri} – время удерживания i -го исследуемого компонента; t_{Rz} и t_{Rz+1} – время удерживания соседних гомологов n -алканов с числом углеродных атомов в молекулах z и $z+1$ соответственно;

2) относительную площадь пиков (выходные сигналы), рассчитанную методом внутренней нормализации [132]:

$$A_{rli} = \frac{A_i}{\sum_1^N A_i} \cdot 100\% \quad (2)$$

где A_i – площадь пика исследуемого i -го компонента пробы; $\sum_1^N A_i$ – сумма площадей пиков всех летучих компонентов пробы; N – число пиков на хроматограмме;

3) отношение абсолютных площадей пиков i -го компонента к площади пика стандартного компонента, в качестве которого использовали один из легколетучих компонентов РПФ:

$$A_{rlst} = \frac{A_i}{A_{st}} \quad (3)$$

где A_i – абсолютное значение площади пика исследуемого i -го компонента паровой фазы; A_{st} – абсолютное значение площади пика стандартного легколетучего компонента паровой фазы.

Идентификация. Для расширения возможностей газовой хроматографии в последние десятилетия используются различные комбинированные методы [52], среди которых исключительное развитие и широкое распространение получила комбинация газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. Возможность проведения одновременно качественного и количественного анализа делает МС детектор наиболее распространенным в ГХ. Для точного определения структуры используются все информационные возможности, предоставляемые методом ГХ-МС: закономерности фрагментации и ионизации соединений разных классов, закономерности удерживания на неподвижной фазе, информация из хроматографических и масс-спектральных баз данных.

На рисунке 3а представлен масс-спектр α -пинена (компонент с $t_R = 13.24$ мин, $I_i^T = 935$), полученный в результате исследования паровой фазы цветков пижмы обыкновенной методом хромато-масс-спектрометрии. Данный компонент встречается в паровой фазе всех исследованных нами объектов. Для сравнения масс-спектр компонента паровой фазы пижмы α -пинена, полученный в рамках диссертационного исследования, приведен вместе с библиотечным масс-спектром [133] (рисунок 3б). Числа над пиками – значения m/z .

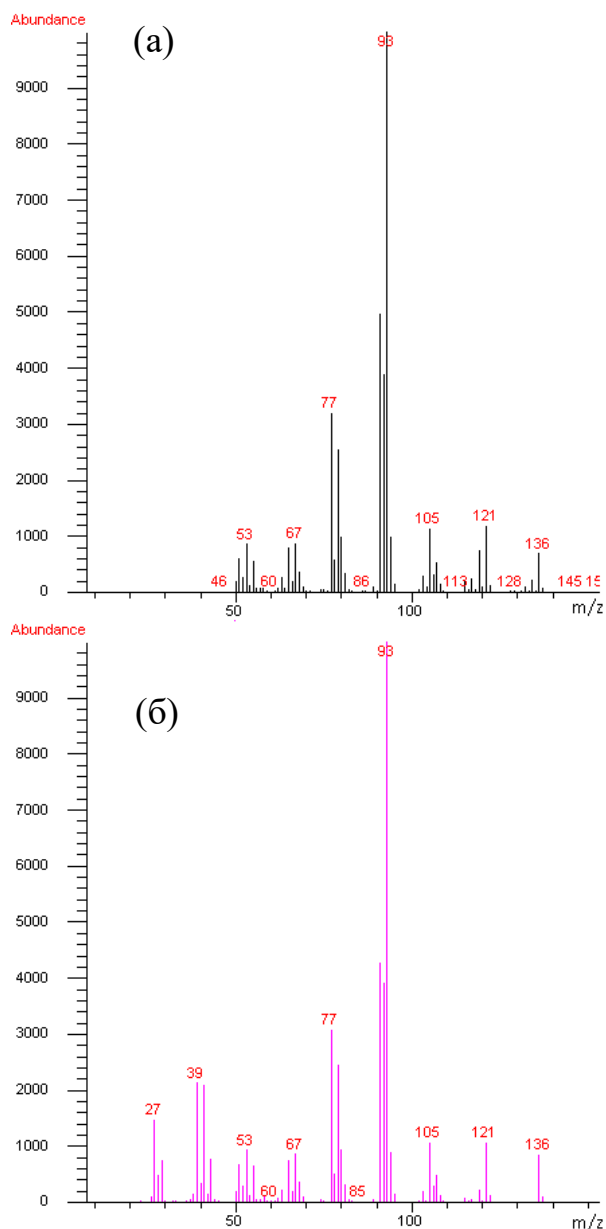


Рисунок 3 – Масс-спектры летучего компонента паровой фазы пихмы обыкновенной α -пинена, полученные: а – экспериментальным путем; б – из библиотеки масс-спектров

Сопоставление полученного масс-спектра α -пинена с библиотечным свидетельствует о 95% совпадении масс-спектров. Сходство масс-спектров хорошо видно из рисунка 3 (а, б).

Поскольку данная работа посвящена исследованию легкокипящих компонентов паровой фазы, то на рисунке 4 (а, б) приведен масс-спектр более низкокипящего компонента – непредельного спирта 2-метил-3-бутен-2-ола (компонент с $t_R = 4.12$ мин, $I_i^T = 617$), полученного в результате исследования ЛРС «зверобой продырявленный». Рисунок 4а иллюстрирует масс-спектр,

полученный экспериментальным путем, рисунок 4б – библиотечный масс-спектр 2-метил-3-бутен-2-ола.

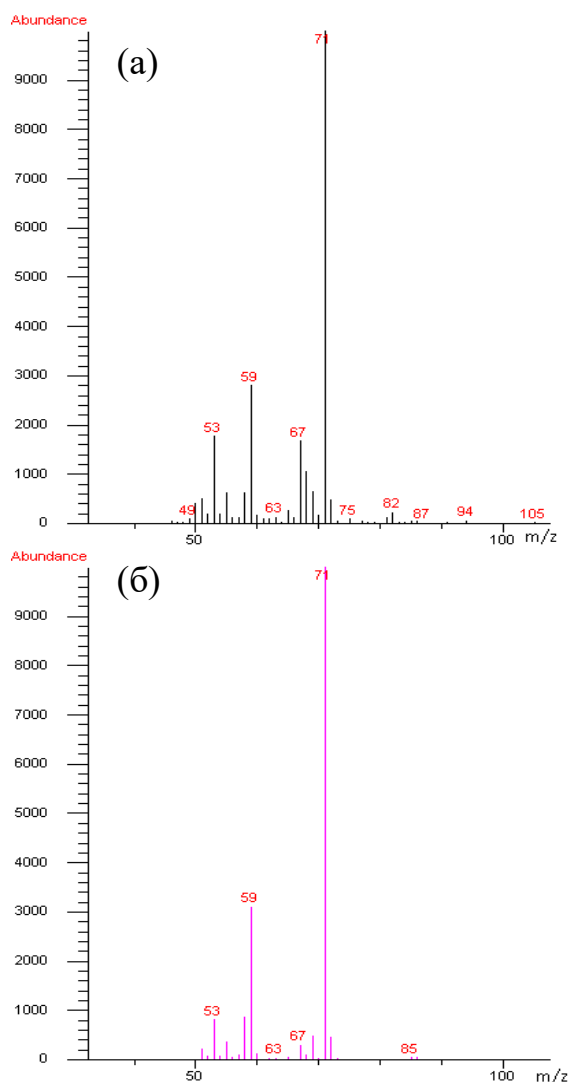


Рисунок 4 – Масс-спектры летучего компонента паровой фазы зверобоя продырявленного 2-метил-3-бутен-2-ола, полученные: а – экспериментальным путем; б – из библиотеки масс-спектров.

Вероятность корректной идентификации данного соединения $Q = 75\%$. Сходство масс-спектров хорошо видно из рисунка 4 а, б.

Для проверки правильности хромато-масс-спектрометрической идентификации летучих компонентов паровой фазы исследованных объектов использовали информацию об индексах удерживания, рассчитанных на основании экспериментально полученных данных при линейном программировании температуры колонки. Информацию о структуре летучих компонентов подтверждали, сопоставляя рассчитанные нами индексы удерживания с

литературными данными по величинам I_i^T эфирных масел и экстрактов исследуемых растений [11] со значениями из атласа масс-спектров эфирных масел [130] и базы данных NIST [133], полученными на капиллярных колонках с 5%-дифенил-95%-диметилполисилоксановой стационарной фазой. Корректность идентификации подтверждали также с использованием зависимости индекса удерживания при линейном программировании температуры (I_i^T) от температуры кипения идентифицированных компонентов (T_b , К) паровой фазы каждого ЛРС. Справочные данные по температурам кипения массива летучих компонентов четырех исследованных растений указаны в таблице 1 Приложения.

Рассмотрим подтверждение правильности идентификации компонента паровой фазы травы зверобоя продырявленного – непредельного спирта 2-метил-3-бутен-2-ола, вероятность масс-спектрометрической идентификации которого (Q) составила 72%. Данный компонент достаточно легколетучий и в литературе встречается довольно редко. Найти присутствие этого компонента в ЛРС зверобоя удалось в работе [79], причем в работе исследована именно паровая фаза зверобоя. Но в рамках исследования индексы удерживания рассчитаны не были. Проверка индекса удерживания 2-метил-3-бутен-2-ола в базе данных NIST [133] показала, что при линейном программировании температуры колонки с малополярной 5%-дифенил-95%-диметилполисилоксановой неподвижной фазой (маркировка SPB-5) значения индексов удерживания лежат в интервале $I_i^T = 611 - 620$ ед. индекса. Таким образом, с учетом всей полученной информации о соединении было установлено, что компонент с индексом удерживания $I_i^T = 617$ является непредельным спиртом 2-метил-3-бутен-2-олом.

2.3 Оценка погрешности измерения определяемых величин

Прецизионность ε определения индексов удерживания n -алканов при линейном программировании температуры колонки оценивали из выборки с $n = 5$ [134]. На основании экспериментальных данных рассчитывались:

1. Стандартное отклонение среднего арифметического результата измерения индекса удерживания $S_{\bar{x}}$

$$S_{\bar{x}} = \sqrt{\frac{\sum_1^n (I^T - \bar{I}_{exp}^T)^2}{n(n-1)}} \quad (4)$$

где I^T – единичное значение измеренного индекса n -алкана в выборке, \bar{I}_{exp}^T – среднее арифметическое значение измеренного значения индекса удерживания n -алкана в выборке, которое рассчитывается по формуле:

$$I_{exp}^T = 100n \times \left(\frac{t_{R_{алк}} - t_{R_z}}{t_{R_{z+n}} - t_{R_z}} \right) + 100z, \quad (5)$$

где $t_{R_{алк}}$ – время удерживания n -алкана, элюирующегося между двумя другими n -алканами с числом углеродных атомов в молекуле z и $z+n$ соответственно.

2. Правильность определения индексов удерживания (δ) при линейном программировании температуры колонки:

$$\delta = I_{exp}^T - I_{алк}, \quad (6)$$

где $I_{алк}$ – умноженное на 100 число углеродных атомов в молекуле анализируемого n -алкана.

3. Границы доверительного интервала измерения индексов удерживания:

$$\varepsilon = \pm s_{\bar{x}} t(P, f), \quad (7)$$

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

4. Точность измерения индексов удерживания:

$$\Delta = \sqrt{\delta^2 + \varepsilon^2} \quad (8)$$

В таблице 1 приведены результаты оценки точности определения индексов удерживания при линейном программировании температуры колонки на примере индекса удерживания трех n -алканов.

Таблица 1 – Оценка точности определения индексов удерживания *n*-алканов при линейном программировании температуры

Соединение	\bar{I}^T_{exp}	s_x	ε	δ	Δ
<i>n</i> -Гексан	598.4	0.154	0.43	1.6	1.7
<i>n</i> -Нонан	898.9	0.046	0.13	1.1	1.1
<i>n</i> -Додекан	1199.1	0.036	0.10	0.9	0.9

Видно, что границы доверительного интервала измерения индексов удерживания (прецизионность или случайные составляющие погрешности) изменяются в пределах $\varepsilon = 0.43 - 0.10$, а правильность измерения (систематические составляющие погрешности) в пределах $\delta = 1.6 - 0.9$. Таким образом, суммарная погрешность определения индексов удерживания при линейном программировании температуры колонки уменьшается от $\Delta = 1.7$ (*n*-гексан) до $\Delta = 0.9$ (*n*-додекан).

Аналогичные результаты получены для идентифицированных компонентов, перераспределившихся в паровую фазу. Для этих соединений в качестве реперных значений I^T использовали средние значения индексов удерживания из базы данных NIST [133], полученные при линейном программировании температуры на колонке с малополярной стационарной фазой. Установлено, что для компонентов, элюирующихся на начальных участках (температурах) линейного программирования температуры, точность определения I_i^T составляет ± 2 ед. индекса и уменьшается до ± 1 ед. индекса с ростом температуры элюирования.

Для относительных площадей пиков, полученных методом внутренней нормализации $A_{r,i}$, рассчитывалось стандартное отклонение s_r среднего арифметического значения площади пика $\bar{A}_{r,i}$ из выборки пяти измерений ($n = 5$):

$$s_{\bar{x}} = \sqrt{\frac{\sum_1^n (A_{r,i} - \bar{A}_{r,i})^2}{n(n-1)}} \quad (9)$$

Результаты расчетов представлены в таблице 2 на примере пяти летучих компонентов, встречающихся в исследуемых объектах ЛРС: пропаналя, 2-метилпропаналя,

α -пинена, β -пинена и камфоры, элюирующихся в начале, в середине и в конце линейного программирования температуры колонки.

Таблица 2 – Оценка воспроизводимости измерения относительной площади пиков летучих компонентов при линейном программировании температуры

<i>Соединение</i>	<i>t_R, мин</i>	<i>I^{exp}</i>	$\bar{A}_{r,i}$	<i>s_r</i>
Пропаналь	3.30	501	8.91	0.107
2-Метилпропаналь	3.67	556	3.32	0.104
α -Пинен	13.24	935	9.04	0.067
β -пинен	15.04	976	13.06	0.040
Камфора	22.15	1152	1.62	0.010

Данные таблицы 2 показывают, что погрешность определения относительных площадей пиков также уменьшается с увеличением времени и соответственно температуры выхода компонента из колонки.

3 ПАРОФАЗНЫЙ ГАЗОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЛЕТУЧИХ КОМПОНЕНТОВ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТЕНИЯ «ПИЖМА ОБЫКНОВЕННАЯ» И ФИТОПРЕПАРАТОВ НА ЕЕ ОСНОВЕ

Анализ литературных данных показал, что определение летучих биологически активных соединений лекарственных растений с достаточно широким диапазоном температур кипения проводят методом ГХ-МС с применением предварительно полученных эфирных масел или экстрактов [30, 33-36, 40, 42]. Так как при этом применяют ввод жидких проб, разбавленных летучим органическим растворителем или экстрагентом, то на хроматограмме практически не определяются наиболее летучие метаболиты растений. Изучение количественных характеристик десорбции летучих БАС из осушенных растений при различных условиях газовой экстракции является важным этапом установления закономерностей статического парофазного анализа ЛРС, так как позволяет оптимизировать процессы извлечения БАС и последующего газохроматографического анализа равновесной паровой фазы.

3.1 Установление закономерностей перераспределения летучих компонентов из цветков пижмы обыкновенной в газовую фазу

Пижма обыкновенная (*Tanacetum vulgare* L.) является эфиромасличным растением, летучие компоненты которого являются основной группой БАС этого растения [6]. Поэтому закономерности перераспределения летучих компонентов из ЛРС в газовую фазу на первом этапе выполнения работы были изучены именно на примере этого растения.

Газовую экстракцию осуществляли в интервале температур 30 – 140°C, варьируя время экстракции от 5 до 60 мин. Газохроматографический эксперимент в условиях ПФА-ГХ-ПВД проводился с применением малополярной неподвижной фазы 5%-дифенил-95%-диметилполисилоксана в режиме линейного программирования температуры. Эксперимент предусматривал определение

времени (температуры) выхода пика i -го соединения и его площади A_i , а также индекса удерживания I_i^T при линейном программировании температуры.

Изучено влияние температуры и продолжительности газовой экстракции на качественный и количественный состав паровой фазы летучих компонентов ЛРС «пижма обыкновенная». Увеличение температуры газовой экстракции приводит к закономерному увеличению числа выделившихся компонентов. Так, число пиков на хроматограмме увеличивается от 29 до 54 при проведении газовой экстракции в интервале температур от 30 до 80°C (продолжительность экстракции 30 минут), рисунок 5.

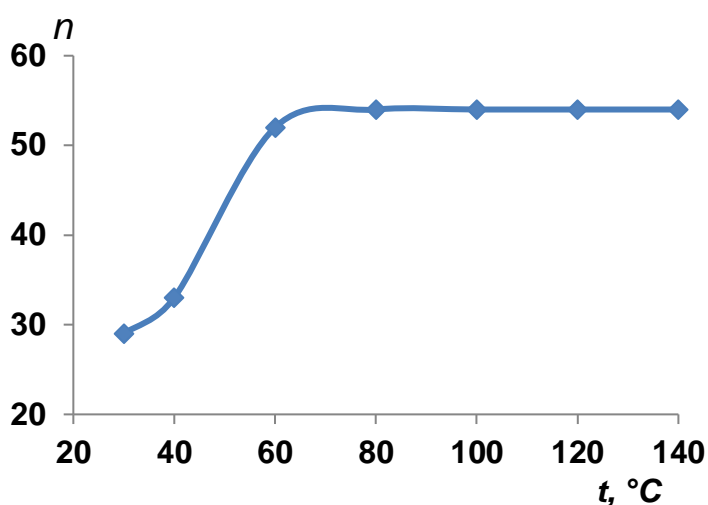


Рисунок 5 – Влияние температуры газовой экстракции ЛРС пижмы обыкновенной на количество выделившихся летучих компонентов в паровую фазу; время экстракции 30 минут

Дальнейшее увеличение температуры в интервале 80 – 140°C не приводит к увеличению числа пиков. Следует также отметить, что в исследованном интервале температур газовой экстракции не происходит химических превращений выделившихся в газовую фазу соединений. Об этом свидетельствует тот факт, что высоты (площади A_i) пиков увеличиваются с ростом температуры, а не уменьшаются, если бы произошла их химическая трансформация.

Установлено, что при проведении газовой экстракции при температуре 30°C интервал индексов удерживания для 29 соединений, выделившихся из цветков пижмы в газовую фазу, составляет 359 – 1190 ед. индекса. С ростом температуры газовой экстракции увеличивается число выделившихся компонентов, особенно с

более высокими индексами удерживания. Однако, в целом, диапазон индексов удерживания сохраняется (359 – 1196 ед. индекса).

Соответственно, суммарное содержание веществ в паровой фазе, пропорциональное величине $\sum A_i$, возрастает наиболее интенсивно в течение первых 20-30 мин экстракции, а затем, в интервале 30-50 мин, увеличивается незначительно. Это свидетельствует о том, что равновесный состав паровой фазы при температуре 100⁰С устанавливается в течение 20-30 мин, рисунок 6.

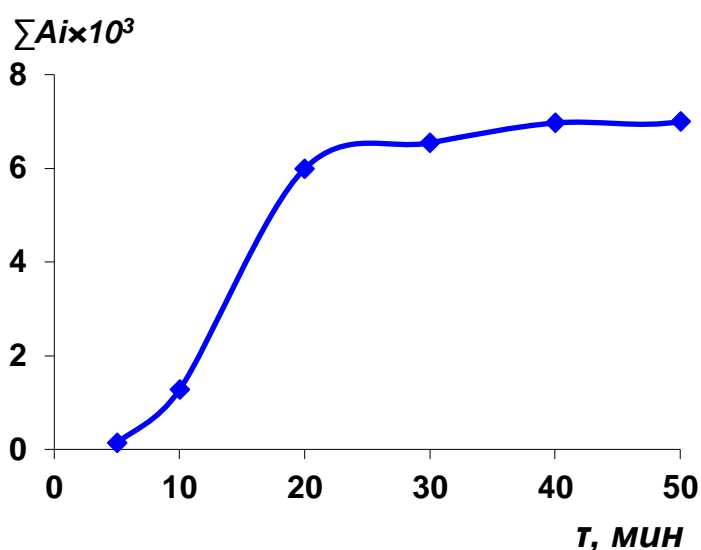


Рисунок 6 – Влияние продолжительности газовой экстракции ЛРС пижмы обыкновенной на общее содержание летучих компонентов в паровой фазе (100⁰С)

Для получения информативного хроматографического образа (профиля) летучих компонентов пижмы необходимо установить тот интервал температур газовой экстракции, в котором относительное содержание компонентов изменяется мало. Для этого изучали зависимость от температуры отношения площадей пиков высококипящего i -го компонента (A_i) и низкокипящего летучего компонента, выбранного в качестве стандарта (A_{st}). В качестве такого стандарта был взят пропаналь ($I_i^T = 501$), который присутствует в паровой фазе уже при температуре газовой экстракции 30⁰С. На примере β -пинена ($I_i^T = 975$), и других веществ установлено, что зависимость (A_i/A_{st}) от температуры газовой экстракции имеет максимум, переходящий при $T > 100^{\circ}\text{C}$ в практически горизонтальный участок. Из рисунка 7 видно, что горизонтальный участок на кривой 1 в интервале

температур 120 – 140°C наблюдается в области сильного повышения суммарной концентрации всех компонентов $\sum A_i$ в паровой фазе (кривая 2).

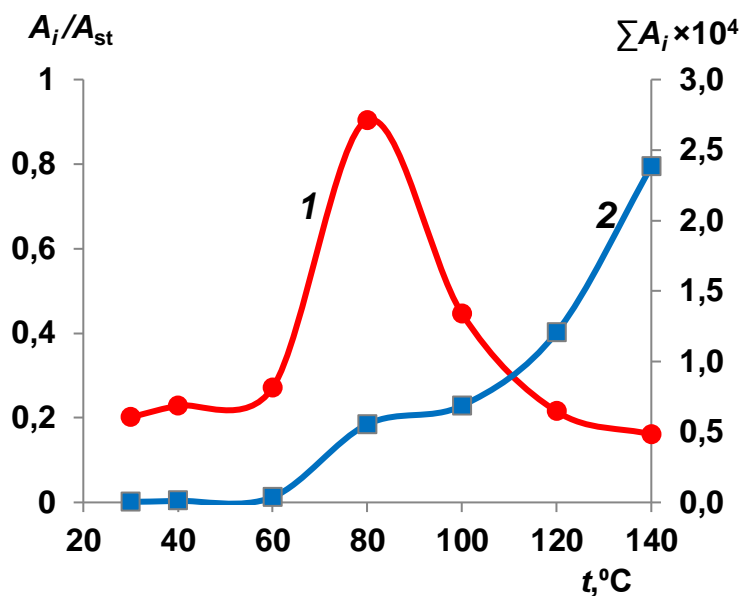


Рисунок 7 – Зависимости отношения площадей пиков ЛРС пижмы обыкновенной β -пинена и пропаналя (A_i / A_{st}) (1) и суммы абсолютных площадей пиков всех компонентов ($\sum A_i$) от температуры газовой экстракции (2); время экстракции 30 мин

Максимум, по-видимому, обусловлен различием в температурных зависимостях констант сорбционного перераспределения i -го компонента и стандартного соединения и влиянием резкого повышения при $T > 100^\circ\text{C}$ общего содержания компонентов в паровой фазе ($\sum A_i$) и, соответственно, общего давления на процесс перераспределения компонентов из осушенного ЛРС. Таким образом, при $T \geq 100^\circ\text{C}$ при сохранении общего числа компонентов относительное содержание низко-, средне- и высококипящих компонентов в равновесной паровой фазе изменяется мало, что является важным для получения информативного хроматографического профиля.

На основании полученных результатов исследования закономерностей газовой экстракции оптимальными условиями для осушенных цветков пижмы являются: температура: 100 – 140°C, время экстракции: 30 – 40 минут. В этих условиях достигается равновесный состав паровой фазы без химических превращений компонентов с их устойчивым относительным содержанием в равновесной паровой

фазе. Для анализа летучих компонентов цветков пижмы обыкновенной и фитопрепаратов на ее основе нами выбраны следующие условия газовой экстракции: температура 100°C, время 40 минут.

3.2 Парофазный газохроматографический анализ летучих компонентов цветков пижмы обыкновенной

Хроматограмма ботанического образца осушенных цветков пижмы, полученная методом ПФА-ГХ-ПВД в выбранных условиях газовой экстракции (100°C, продолжительность экстракции 30 мин, объем вводимой газообразной пробы 1 см³), представлена на рисунке 8.

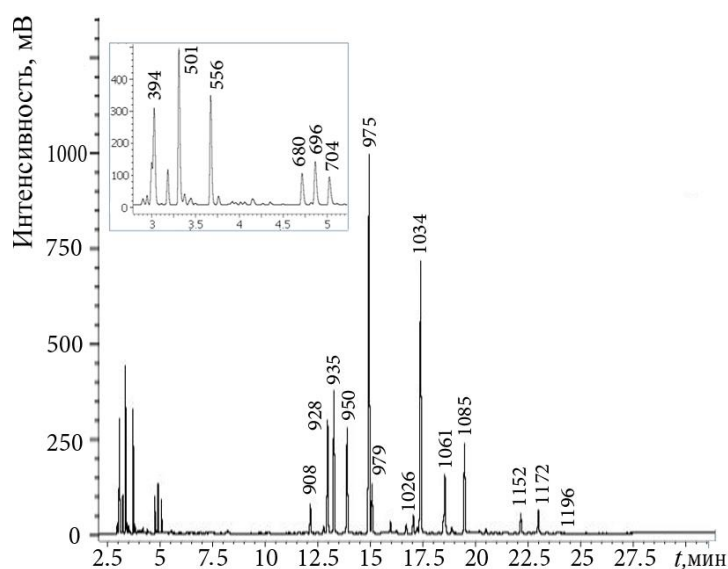


Рисунок 8 – Хроматограмма летучих компонентов цветков ботанического образца пижмы обыкновенной (*Tanacetum vulgare* L.), полученная методом ПФА-ГХ-ПВД: капиллярная колонка из плавленого кварца 30м×0.32мм, 5%-дифенил-95%-диметилполисилоксан, $d_f = 0.25$ мкм, 40°C, 4°/мин, N₂, ПВД, $V_{\text{пробы}} = 1$ см³, деление потока 1:50, $F = 1.0$ см³/мин

На хроматограмме зарегистрировано 54 компонента с временами удерживания t_R от 2.94 до 23.90 мин и рассчитанными величинами индексов удерживания I_i^T от 359 до 1196. Относительное содержание компонентов в паровой фазе $A_{r,i}$ варьируется от ≈ 0.01 до 22.73% (β -пинен). Начальный участок хроматограммы отдельно представлен в верхней части рисунка 8. Аналогичный

вид имела хроматограмма того же ботанического образца пижмы, полученная методом ПФА-ГХ–МС. Различие в рассчитанных значениях I_i^T компонентов в двух лабораториях с использованием ПФА-ГХ-ПИД и ПФА-ГХ–МС составило ± 2 ед. инд. на начальном и ± 1 ед. инд. на конечном участках хроматограмм.

Исследовано также шесть промышленных образцов пижмы из различных регионов России. Для примера на рисунке 9 представлена хроматограмма летучих компонентов промышленного образца пижмы производства «Иван-чай».

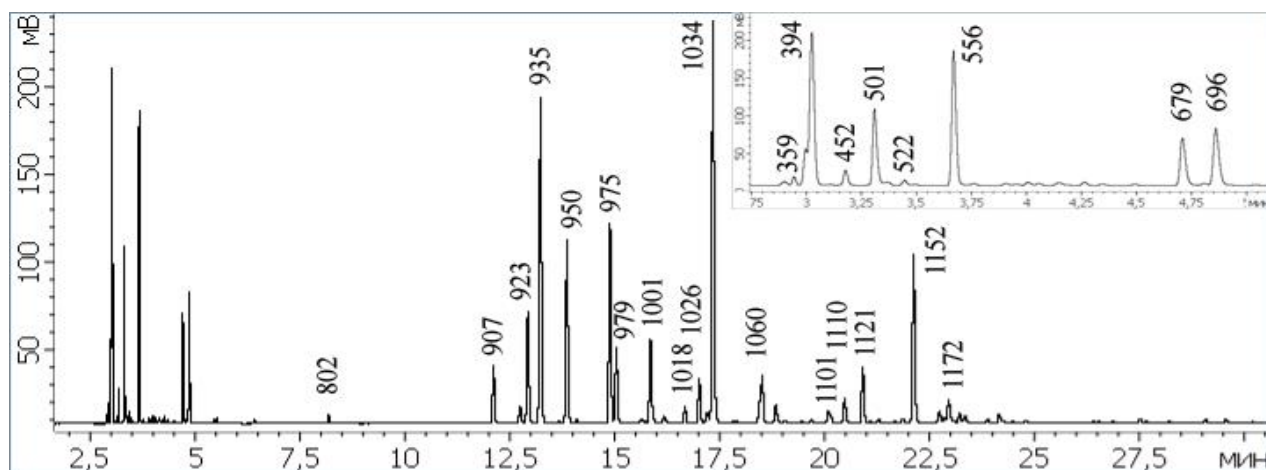


Рисунок 9 – Хроматограмма летучих компонентов цветков промышленного образца пижмы обыкновенной производства Иван-чай, полученная методом ПФА-ГХ-ПИД: капиллярная колонка из плавленного кварца 30м×0.32мм, 5%-дифенил-95%-диметилполисилоксан $d_f=0.25$ мкм, 40°C – 2 мин, 4°/мин, N₂, ПИД, $V_{\text{пробы}} = 1$ см³, деление потока 1:50, $F = 1.0$ см³/мин

На хроматограмме также зарегистрировано 54 компонента в том же интервале индексов удерживания: 359 – 1196. Можно отметить, что хроматограмма летучих компонентов данного промышленного образца и всех остальных исследованных промышленных образцов имеют близкий вид с хроматограммой ботанического образца, различаясь несколько высотами пиков компонентов.

Компоненты паровой фазы идентифицировали с использованием масс-спектральных характеристик, а также на основании сопоставления экспериментально полученных индексов удерживания при линейном программировании температуры с литературными данными по величинам I_i^T эфирных масел и экстрактов пижмы [30, 33-36, 40, 42], а также базы данных NIST

[133], полученными на капиллярных колонках с 5%-дифенил-95%-диметилполисилоксановой стационарной фазой.

Результаты исследования ЛРС пижмы (осушенных цветков) методом парофазного анализа представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Индексы удерживания I_i^T летучих компонентов и их относительное содержание $A_{rl,i}$, % в равновесной паровой фазе лекарственного растения «пижма обыкновенная»

I_i^T	Соединение*	$A_{rl,i}$, %**						
		1	2	3	4	5	6	7
359	Диметилловый эфир ^{а,г}	0.25	0.52	0.67	0.26	0.26	0.26	0.13
394	Этаналь^{а,г}	3.96	8.46	11.72	5.16	5.60	6.74	3.02
423	Метоксиэтен ^{а,г}	0.03	0.06	0.07	0.02	0.02	0.03	0.01
452	3-Метилбутен-1 ^{а,г}	0.71	0.40	0.20	0.27	0.24	0.40	1.27
501	Пропаналь^{а,г}	4.79	7.98	6.42	3.81	2.42	2.81	1.95
511	Изопропанол ^{а,г}	0.24	0.17	0.19	0.11	0.04	0.08	0.04
522	Диметилсульфид ^{а,г}	0.21	0.31	0.79	0.07	0.16	0.16	0.11
529	Пентадиен-1,4 ^{а,г}	0.04	0.10	0.10	0.04	0.04	0.04	0.02
556	2-Метилпропаналь^{а,г}	3.32	8.19	12.64	3.95	5.26	5.48	1.92
570	2-Метилпропеналь-2 ^{а,г}	0.24	0.19	0.08	0.56	0.04	0.05	0.04
592	Пропанол ^{а,г}	0.04	0.12	0.14	0.03	0.07	0.06	0.02
599	Бутаналь ^{а,г}	0.04	0.17	0.16	0.12	0.06	0.04	0.03
610	-	0.06	0.16	0.19	0.24	0.11	0.09	0.04
621	<i>Трет</i> -пентанол ^{б,г}	0.23	0.45	0.21	0.16	0.10	0.13	0.16
632	2,4-гексадиен ^{а,г}	0.04	0.25	0.28	0.07	0.02	0.16	0.02
641	-	0.09	0.10	0.07	0.04	0.04	0.05	0.06
657	<i>н</i> -Бутанол ^{б,г}	0.02	0.06	0.11	0.06	0.03	0.06	0.03
680	3-Метилбутаналь^{а,г}	1.15	3.82	5.76	1.39	1.94	2.33	0.72
690	-	0.06	0.20	0.05	0.07	0.06	0.06	0.07
696	2-Метилбутаналь^{а,г}	1.67	4.13	7.36	1.74	3.63	3.03	0.98
704	2-Этилфуран ^{а,г}	1.97	0.59	0.02	0.02	0.05	0.03	0.01
709	1,1-Диэтоксиэтан ^{а,г}	0.02	0.07	0.06	0.07	0.05	0.03	0.01
717	-	0.10	0.18	0.63	0.78	0.91	0.33	0.02
719	Метилциклогексан ^{б,г}	0.07	0.28	0.22	0.47	0.50	0.12	0.02
745	2-Бутилацетат ^б	0.01	0.05	0.01	0.02	0.01	0.02	0.08
800	<i>н</i> -Октан ^{а,б,г}	0.20	0.16	0.33	0.01	0.01	0.27	0.01
802	Гексаналь ^{а,б,г}	0.13	0.51	0.56	0.43	0.26	0.26	0.05
815	<i>н</i> -Бутилацетат ^{б,г}	0.01	0.18	0.04	0.34	0.01	0.01	0.01
860	2-Метилоктан ^{б,б,г}	0.03	0.08	0.03	0.82	0.27	0.02	0.01
908	Сантолина триен ^{б,г}	1.04	1.05	0.13	6.69	4.51	1.68	0.02

Продолжение таблицы 3

923	Трициклен ^{б,в,г}	0.59	0.82	0.46	0.49	2.13	0.68	1.54
928	α-Туйен^{а,б,в,г}	6.44	3.67	1.45	1.44	1.71	4.72	5.14
935	α-Пинен^{а,б,в,г}	9.04	6.65	15.25	5.27	18.19	13.47	20.38
946	Камфен ^{а,в,г}	0.05	0.12	0.09	0.13	0.02	0.07	0.02
950	Сабинен^{а,б,в,г}	8.26	6.43	4.44	4.81	21.57	7.55	20.47
975	β-Пинен^{а,б,в,г}	22.7	7.03	1.84	2.34	1.16	7.73	9.37
979	Октаналь^{б,в,г}	3.04	2.14	2.38	1.62	3.02	3.22	4.94
1000	β -Мирцен ^{а,в,г}	0.38	1.21	0.77	9.26	0.20	2.76	0.07
1006	α -Фелландрен ^{а,б,в,г}	0.20	0.22	1.94	0.13	0.12	0.41	0.06
1018	α -Терпинен ^{а,в,г}	0.49	1.11	1.09	0.58	0.22	0.85	0.35
1026	<i>n</i>-Цимен^{а,б,в,г}	1.84	2.90	0.84	1.68	1.70	2.11	1.30
1031	2-Метилгексанол-1 ^{а,б,в,г}	0.41	0.47	2.38	0.17	0.33	0.48	0.48
1034	Эвкалиптол^{а,б,в,г}	16.3	11.75	7.79	13.60	4.91	16.86	15.59
1061	Артемизия кетон^{а,б,в,г}	3.25	6.51	0.39	1.01	0.24	3.01	2.01
1085	<i>i</i> -Терпинолен ^{а,б,в,г}	2.98	0.68	0.01	0.03	0.07	0.07	0.01
1091	<i>Транс</i> -сабинен-гидрат ^{в,г}	0.09	0.22	0.09	0.10	0.03	0.14	0.08
1102	α -Туйон ^{б,в,г}	0.14	0.15	0.03	0.24	0.06	0.28	0.14
1110	β -Туйон ^{б,в,г}	0.34	0.18	0.35	5.50	3.85	1.05	0.01
1121	Хризантенон ^{б,в,г}	0.07	2.54	0.06	0.51	1.85	2.28	0.01
1152	Камфора^{а,б,в,г}	1.62	4.83	8.42	2.94	7.69	6.30	6.61
1172	3-Туйен-2-он^{б,в,г}	0.76	1.15	0.36	0.17	3.32	0.80	0.27
1183	1,4-Терпинеол ^{б,в,г}	0.04	0.20	0.31	0.15	0.85	0.24	0.04
1190	<i>Транс</i> -дигидрокарвеол ^{б,в,г}	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.02	0.01
1196	Миртенол ^{б,в,г}	0.07	0.02	0.04	0.03	0.03	0.10	0.28

Примечание: *идентификацию проводили: (а) хромато-масс-спектрометрический анализ, (б) литературные данные по экстрактам и эфирным маслам растения [30, 33-36, 40, 42], (в) атлас масс-спектров эфирных масел [130], (г) база данных NIST [133].

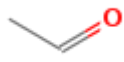
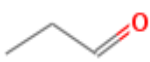
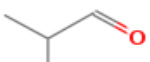
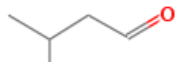
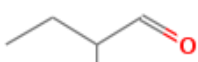
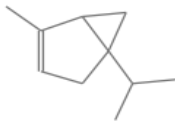
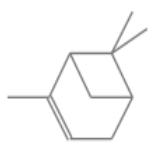

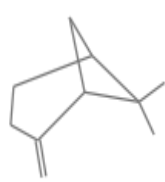

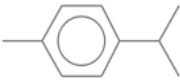
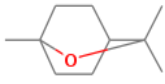
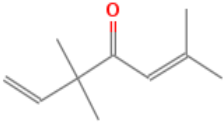
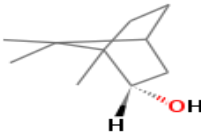
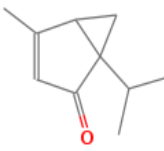
**Образцы: 1 – Ботанический сад, 2 – Красногорск, 3 – Травы Алтая, 4 – Фитофарм, 5 – Камелия-ЛТ, 6 – Иван-чай, 7 – ВИЛАР.

Анализ данных таблицы 3 показывает, что качественный состав РПФ пижмы из различных регионов России совпадает, однако относительные содержания компонентов и компонента с максимальным содержанием (доминирующего компонента) различаются. Установлено, что равновесная паровая фаза пижмы состоит из альдегидов (этаналь, пропаналь, бутаналь, 3-метилбутаналь, 2-метилбутаналь, гексаналь), простых эфиров (метоксиэтен, 1,1-диэтоксиэтан), терпенов (α -туйен, α -пинен, β -пинен, камфен, сабинен), терпеноидов (эвкалиптол, камфора),

предельных углеводородов (2-метилгептан, 2-метилоктан, *n*-нонан), непредельных углеводородов (3-метилбутен, пентадиен-1,4, 2,4-гексадиен) и других классов органических соединений. Доминирующим компонентом равновесной паровой фазы ботанического образца пижмы является β -пинен ($A_{r,i} = 22.73\%$, $I_i^T=975$). Паровая фаза также содержит большое количество эвкалиптола (1,8-цинеола) ($A_{r,i} = 16.39\%$, $I_i^T=1034$). Эвкалиптол является доминирующим в образцах №2 (Краногорсклексредства), №4 (Фитофарм) и №6 (Иван-чай), α -пинен – в образце №3 (Травы Алтай), сабинен – в образце №5 (Камелия-ЛТ). В образце №7 (ВИЛАР) содержание сабинена и α -пинена в равновесной паровой фазе практически одинаково.

При анализе и сопоставлении вида хроматограмм всех исследованных семи образцов пижмы было установлено, что основной вклад в общий вид хроматограммы вносят 15 компонентов, относительное содержание которых в паровой фазе больше или равно 1% ($A_{r,i} \geq 1\%$). В таблице 3 они выделены жирным шрифтом. К этим основным летучим компонентам пижмы относятся (в порядке возрастания индексов удерживания): этаналь (394), пропаналь (501), 2-метилпропаналь (556), 3-метилбутаналь (680), 2-метилбутаналь (696), α -туйен (928), α -пинен (935), сабинен (950), β -пинен (975), октаналь (979), *n*-цимен (1026), эвкалиптол (1034), артемизия кетон (1061), камфора (1152) и *специфический маркер* пижмы 3-туйен-2-он (1172) [29]. В таблице 4 представлены химические формулы этих основных компонентов.

Таблица 4 – Основные летучие компоненты паровой фазы пижмы обыкновенной

Этаналь 394 	Пропаналь 501 	2-метилпропаналь 556 	3-метилбутаналь 680 	2-метилбутаналь 696 
α -Туйен 928 	α -Пинен 935 	Сабинен 950 	β -Пинен 975 	Октаналь 979 
<i>para</i> -Цимен 1026 	Эвкалиптол 1034 	Артемизия кетон 1061 	Камфора 1152 	3-Туйен-2-он 1172 (маркер) 

Следует отметить, что именно основные компоненты создают цельный хроматографический образ (профиль) летучих компонентов пижмы.

Чтобы установить правильность идентификации компонентов в газовой хроматографии при изотермическом режиме элюирования используют зависимости между индексом удерживания Ковача и температурой кипения. Для веществ близкой полярности или членов гомологического ряда вещества элюируются в порядке возрастания температур кипения и зависимость «индекс удерживания – температура кипения» имеет линейный характер [52, 135]. В нашей работе предпринята попытка построения таких зависимостей для совокупности летучих и среднелетучих компонентов пижмы с использованием индексов удерживания Ван-ден-Доола и Кратса I_i^T , полученных в условиях линейного программирования температуры хроматографической колонки. Для

этого из литературных данных [133] находили температуры кипения 50 идентифицированных компонентов. Эти данные представлены в таблице 1 Приложения. Установлен диапазон температур кипения компонентов РПФ пижмы, выделившихся в газовую фазу: от 249 К (диметиловый эфир) до 495 К (миртенол).

На рисунке 10 представлена зависимость индекса удерживания Ван-ден-Доола и Кратса при линейном программировании температуры колонки I_i^T от температуры кипения компонентов паровой фазы T_b .

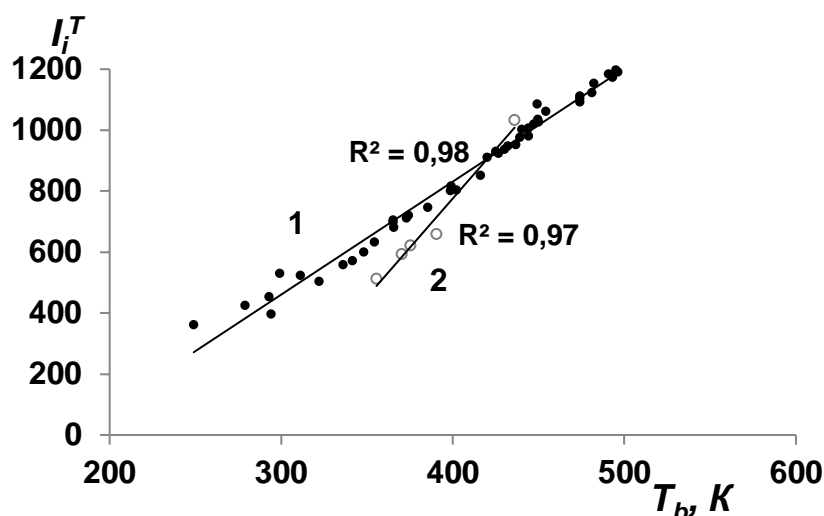


Рисунок 10 – Зависимость индекса удерживания (I_i^T) компонентов РПФ пижмы обыкновенной от температуры кипения (T_b , К): 1 – все компоненты РПФ, кроме спиртов, 2 – спирты

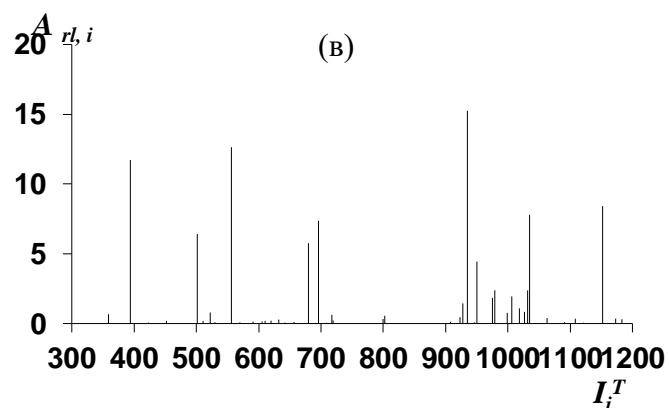
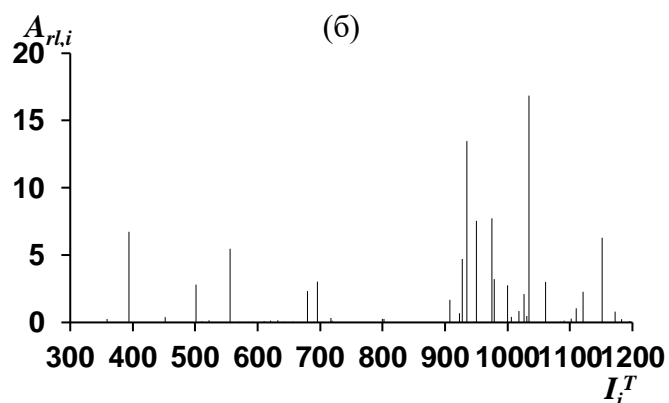
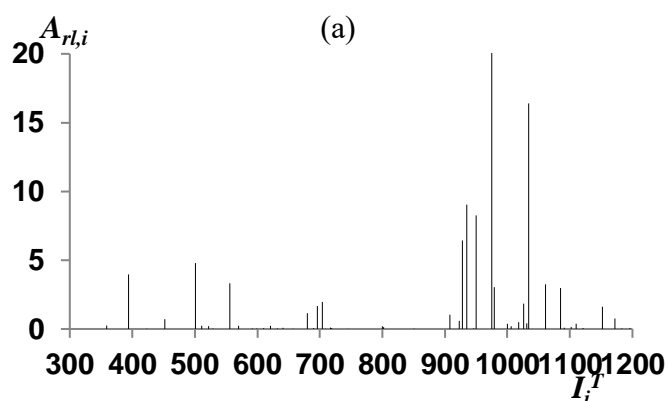
Как видно из рисунка 10, для идентифицированных соединений наблюдаются удовлетворительные линейные зависимости I_i^T от T_b , причем зависимость для спиртов (линия 2) расположена ниже зависимости для всех остальных соединений (линия 1). Расположение линии 2 для спиртов связано, очевидно, с их меньшим взаимодействием с малополярной 5%-дифенил-95%-диметилполисилоксановой неподвижной фазой, особенно в случае короткоцепочечных спиртов. Аналогичное поведение спиртов имеет место и в случае корреляционных зависимостей «индекс Ковача – температура кипения» для неполярных (сквалан) и малополярных неподвижных фаз [52].

Полученные корреляционные зависимости в совокупности с результатами анализа методом ГХ-МС, литературными данными по индексам удерживания компонентов эфирного масла пижмы [30, 33-36, 40, 42], атласа масс-спектров эфирных масел [130] и базой данных NIST [133] позволяют сделать вывод о корректности идентификации летучих компонентов ЛРС пижмы обыкновенной.

Таким образом, в газо-жидкостной хроматографии при линейном программировании температуры колонки зависимость индексов удерживания I_i^T близких по полярности компонентов от температуры их кипения является практически линейной, как и в случае изотермического режима хроматографирования. Полученные данные могут быть использованы для подтверждения правильности идентификации компонентов в случае анализа при линейном программировании температуры колонки.

Литературные данные по ГХ-МС анализу жидких проб эфирных масел и экстрактов содержат компоненты в интервале индексов удерживания $I_i^T = 926 - 1655$ ед. индекса [30, 33-36, 40, 42]. В редких случаях на хроматограмме экстракта пижмы присутствовали компоненты с меньшими значениями ($I_i^T = 909$ [35]), а также с более высокими значениями ($I_i^T = 2277$ [42]). Как показано выше, при использовании метода ПФА диапазон индексов удерживания определяемых в РПФ компонентов ($I_i^T = 359 - 1196$) и соответствующий ему интервал температур кипения ($T_b = 249 - 495$ К) отличаются от определяемых при традиционном ГХ анализе эфирных масел и экстрактов ($I_i^T = 909 - 2277$, $T_b = 420 - 653$ К). На основании вышеизложенного нами предложено относить компоненты с индексами удерживания $I_i^T = 359 - 908$, отсутствующие в эфирном масле или экстрактах пижмы, к *легколетучим* с температурами кипения $T_b = 249 - 420$ К, а компоненты, которые присутствуют и в газовом экстракте пижмы и в составе эфирного масла – к *среднелетучим*. Это компоненты с индексами удерживания $I_i^T = 923 - 1196$ и температурами кипения $T_b = 426.7 - 495$ К. А все остальные компоненты с $I_i^T > 1196$ можно считать *малолетучими* компонентами пижмы, которые определяются только при ГХ анализе эфирного масла или экстрактов [136].

Для установления подлинности и стандартизации ЛРС методом ПФА целесообразно использовать не хроматограммы, а диаграммы типа «относительная площадь пика – индекс удерживания», которые дают информацию о качественном (I_i^T) и количественном ($A_{r,i}$) составах паровой фазы ЛРС. На рисунке 11 представлены такие диаграммы (headspace-спектры) для ботанического и шести промышленных образцов.



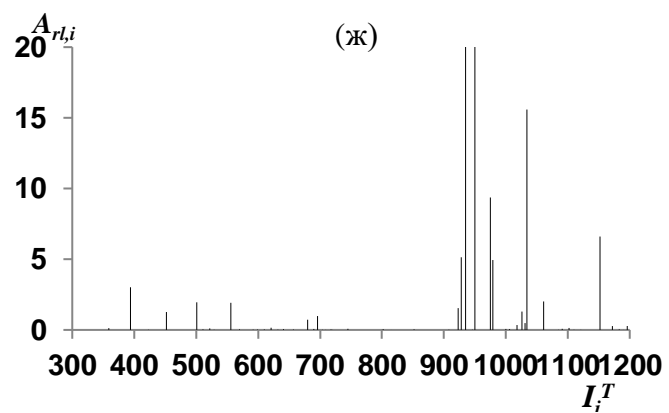
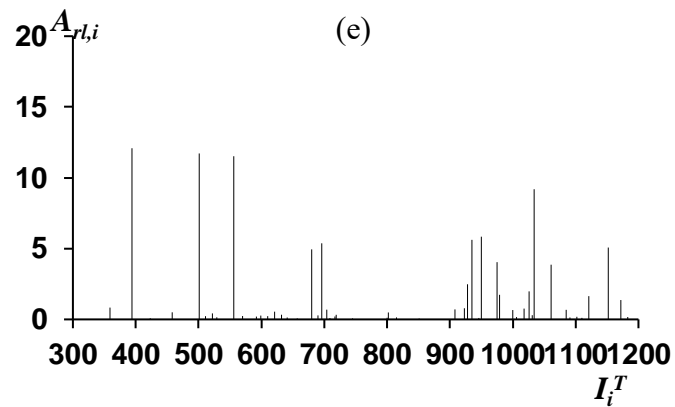
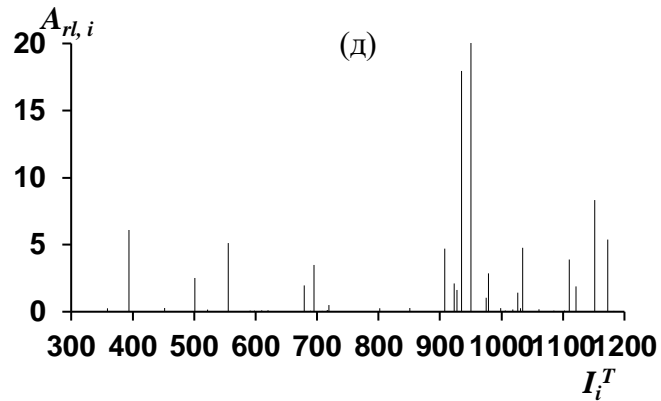
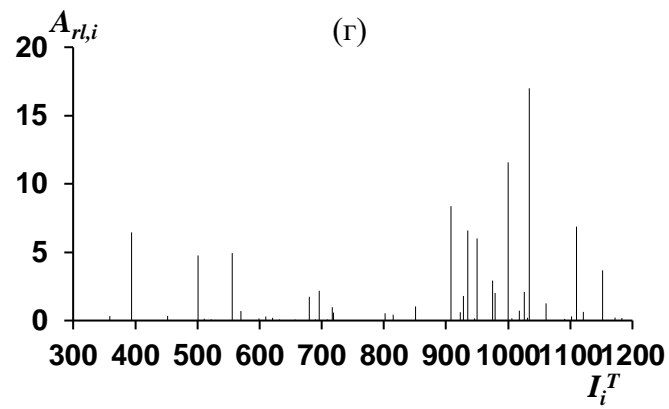


Рисунок 11 – Диаграммы «относительная площадь пика – индекс удерживания» (headspace-спектры) летучих компонентов ЛРС пижмы обыкновенной: а – ботанический образец, б – Красногорск, в – Травы Алтая, г – Фитофарм, д – Камелия-ЛТ, е – Иван-чай, ж – ВИЛАР

Они характеризуются двумя областями. Первая область содержит близкорасположенные компоненты в интервале индексов удерживания от 359 ± 2 до 745 ± 2 , вторая – представлена компонентами с индексами удерживания от 900 ± 1 до 1196 ± 1 . Диаграммы всех образцов пижмы похожи, различаются лишь интенсивности сигналов детектора в диапазонах концентраций компонентов, указанных в таблице 3. Несмотря на то, что равновесная паровая фаза пижмы содержит не слишком специфические вещества, хроматографический спектр ее летучих компонентов специфичен и отличается от спектров других лекарственных растений.

Для установления тонких отличий в количественных характеристиках исследованных многокомпонентных объектов было проведено по пять независимых измерений для каждого образца лекарственного сырья. Полученные результаты обрабатывали по методу главных компонент (PCA – principal components analysis) с использованием программы «Statistica 6.0». Результаты математической обработки результатов представлены на рисунке 12.

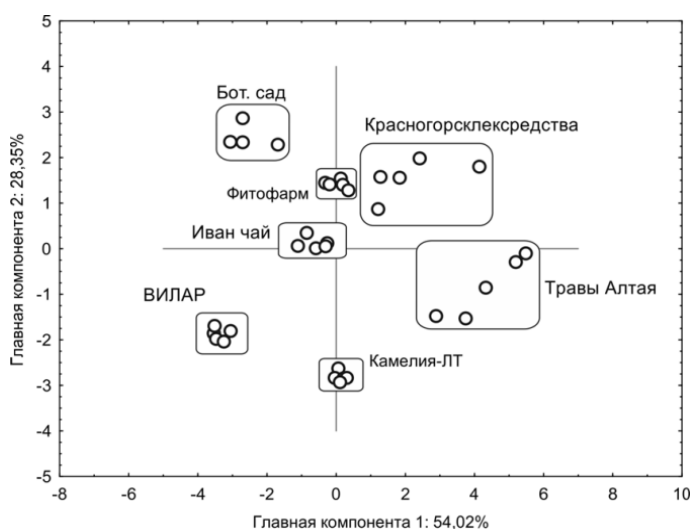


Рисунок 12 – Результаты парофазного анализа ЛРС «пижма обыкновенная» в координатах главных компонент 1 и 2

Обработка данных методом главных компонент продемонстрировала четкую группировку хроматографических данных по образцам ЛРС пижмы, выросших в разных регионах России. В данном случае в качестве переменных были взяты значения процентного содержания компонентов (A_{rli}), приведенные в

таблице 3. Нужно отметить, что для сравнения хроматографических спектров за основу взяты основные компоненты пижмы обыкновенной. Данные о соотношении компонентов сгруппировались по производителям. Использование ПФА-ГХ с последующей математической обработкой методом главных компонент дает возможность классифицировать растительное сырье по производителю или месту произрастания ЛРС.

Следовательно, подлинность ЛРС «пижма обыкновенная» можно оценить и без масс-спектрометрической идентификации компонентов с использованием только хроматографических профилей, полученных методом ПФА-ГХ–ПВД. Достоинствами использования прямого ПФА для установления подлинности и качества ЛРС являются экономичность, снижение трудоемкости (так как отсутствуют стадии получения эфирного масла или экстракта), получение унифицированного и воспроизводимого компонентного состава летучих соединений в паровой фазе растения, не зависящего от способа получения эфирного масла или экстракта.

3.3 Парофазный газохроматографический анализ летучих компонентов фитопрепаратов на основе пижмы обыкновенной

Для изучения аналитических возможностей ПФА важно было сопоставить составы равновесной паровой фазы осушенных образцов пижмы и фитопрепаратов на ее основе – эфирного масла и таблетированной формы экстракта (препарата «Танацехол»).

Эфирное масло пижмы анализировали двумя способами – с помощью парофазного анализа и прямым вводом жидкой пробы масла, разбавленной *n*-пентаном.

Хроматограмма паровой фазы (ПФА-ГХ-ПВД) эфирного масла пижмы, полученного нами из ботанического образца, представлена на рисунке 13.

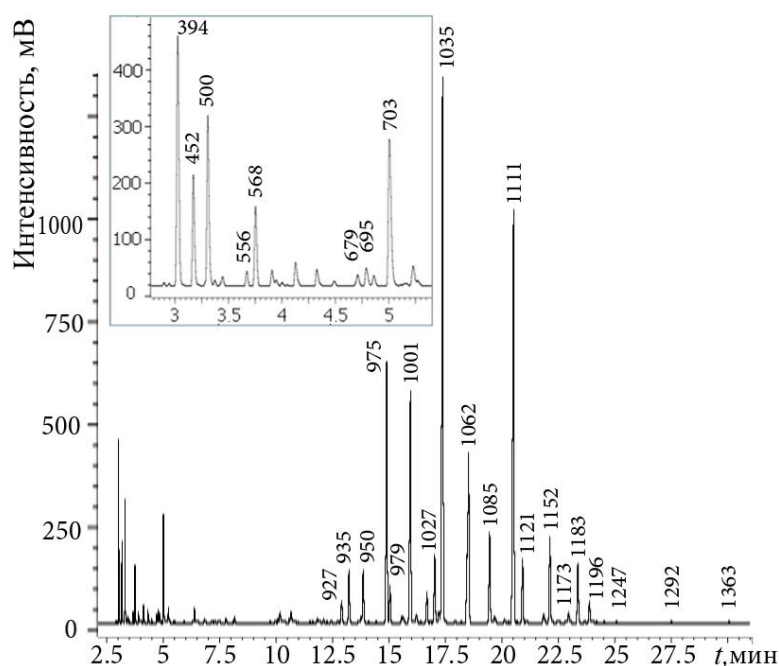


Рисунок 13 – Хроматограмма летучих компонентов эфирного масла пижмы обыкновенной (парофазный анализ), полученная методом ПФА-ГХ-ПВД: капиллярная колонка из плавленного кварца 30м×0.32мм, 5%-дифенил-95%-диметилполисилоксан, $d_f = 0.25$ мкм, 40°C, 4°/мин, N₂, ПВД, $V_{\text{пробы}} = 1$ см³, деление потока 1:50, F = 1.0 см³/мин

На хроматограмме зарегистрировали 101 пик. Качественный и количественный состав паровой фазы представлен в таблице 5.

Таблица 5 – Результаты парофазного газохроматографического анализа эфирного масла пижмы обыкновенной (Ботанический сад г. Самара).

I_i^T	$A_{rl,i}, \%$	I_i^T	$A_{rl,i}, \%$	I_i^T	$A_{rl,i}, \%$	I_i^T	$A_{rl,i}, \%$	I_i^T	$A_{rl,i}, \%$
359	0.02	712	0.01	869	0.25	1085	3.31	1213	0.03
394	2.55	717	0.02	908	0.11	1091	0.22	1218	0.02
452	1.03	719	0.01	923	0.06	1102	0.11	1228	0.01
501	1.65	732	0.05	928	0.83	1106	0.04	1247	0.02
511	0.04	744	0.03	935	1.74	1110	17.31	1292	0.03
522	0.10	745	0.32	946	0.06	1115	0.01	1320	0.01
529	0.01	751	0.04	950	1.92	1121	2.26	1363	0.02
556	0.14	760	0.07	975	9.08	1126	0.08	1384	0.01
570	0.79	762	0.02	979	1.18	1132	0.01	1428	0.08
592	0.13	771	0.05	991	0.08	1139	0.02	1455	0.01
599	0.03	780	0.01	993	0.08	1145	0.35	1467	0.03
610	0.01	782	0.01	1000	8.94	1152	3.18	1486	0.02
621	0.28	790	0.07	1006	0.30	1160	0.02	1493	0.34

Продолжение таблицы 5

641	0.19	800	0.01	1018	1.07	1163	0.02	1511	0.05
657	0.06	802	0.15	1023	0.07	1170	0.04	1523	0.01
680	0.14	815	0.01	1026	2.49	1172	0.37	1539	0.02
690	0.20	851	0.07	1031	0.29	1183	2.21	1550	0.03
696	0.12	854	0.10	1034	20.94	1190	0.06	1583	0.02
704	1.89	856	0.27	1049	0.06	1196	0.77	1597	0.11
708	0.03	867	0.06	1061	8.03	1204	0.02	1621	0.20
709	0.20								

Примечание: 732 – 2-метилбутанол, 760 – *n*-пентанол, 771 – изобутилацетат, 780 – циклопентанол, 782 – 2-метилбутен-2-ол-1, 790 – октен-1, 854 – пропилизобутират, 856 – этилбензол, 867 – *n*-гексанол, 869 – изоамилацетат, 991 – 2,3-дигидро-1,8-цинеол, 993 – мирцен, 1023 – лимонен, 1049 – *транс*- β -оцимен, 1106 – *транс*-*n*-пентен-2-ол-1, 1115 – *транс*-хризантенол, 1126 – 1,2-диметил-3-(1-метилэтилен) - циклопентанол, 1133 – *цис*-лимонен оксид, 1139 – *транс*-пинокарвеол, 1145 – сабинол, 1160 – пинокарвон, 1163 – борнеол, 1170 – терпинен-4-ол, 1204 – α -камфоленол, 1213 – изодигидрокарвеол, 1218 – дигидролиналил формиат, 1228 – нерол, 1247 – карвотанацетон, 1292 – борнилацетат, 1320 – *транс*-карвилацетат, 1363 – эвгенол, 1428 – β -кариофиллен, 1455 – гумулен, 1467 – линалил-2-метилбутират, 1486 – гермакрен-D, 1493 – бициклогермакрен, 1511 – γ -кадинен, 1523 – δ -кадинен, 1550 – фарнезен, 1583 – кариофиллен оксид, 1597 – сальвиаль – 4(14)-ен-1-он, 1621 – кубенол.

Пятьдесят два из пятидесяти четырех летучих компонента осушенных образцов российской пижмы, в том числе маркер 3-туйен-2-он ($I_i^T = 1173 \pm 1$), присутствуют в равновесной паровой фазе эфирного масла. В паровой фазе эфирного масла, в отличие от паровой фазы ЛРС, содержатся также более высококипящие компоненты ($I_i^T = 1196\text{--}1621$, $T_b = 495\text{--}580$ К). Относительное содержание компонентов в паровой фазе эфирного масла и осушенных образцов пижмы различается. Это связано как с влиянием процесса перегонки и увеличением числа менее летучих компонентов в равновесной паровой фазе масла, так и с различием в константах межфазного перераспределения из твердого воздушно-сухого образца и жидкого масла в газовую фазу. Так, доминирующим компонентом эфирного масла является эвкалиптол (20.94%, $I_i^T = 1035 \pm 1$), а не

β -пинен, как в случае ботанического образца пижмы, из которого оно было получено. Все 18 основных компонентов ($A_{r,i} \geq 1\%$) равновесной паровой фазы эфирного масла присутствуют в осушенных образцах пижмы, причем десять из них совпадают для масла и растения. К ним относятся: этаналь (394), пропаналь (501), α -пинен (935), сабинен (950), β -пинен (975), октаналь (979), *n*-цимен (1026), эвкалиптол (1034), артемизия кетон (1061), камфора (1152). Основными компонентами равновесной паровой фазы эфирного масла также являются: 3-метилбутен-1 (452), 2-этилфуран (704), сабинен (950), мирцен (1000), α -терпинен (1018), *i*-терпинолен; 1085, β -туйон (1110), хризантенон (1121), 1,4-терпинеол (1183). Жирным шрифтом в таблице 5 выделены все 15 основных компонентов растения, которые присутствуют в паровой фазе эфирного масла. Несмотря на то, что число компонентов и диапазон их индексов удерживания в равновесной паровой фазе эфирного масла существенно больше, чем в случае осушенных образцов пижмы, общий вид хроматограмм (рисунки 8 и 13) и хроматографические профили похожи. Это связано с тем, что в паровой фазе эфирного масла содержание большинства летучих компонентов, за исключением основных, не превышает 0.01 – 0.03% (таблица 5) и они мало влияют на вид хроматограммы. Следовательно, хроматографические профили, а также диаграммы эфирного масла пижмы можно использовать для установления его подлинности. При сравнении полученных методом ПФА данных о составе компонентов эфирного масла пижмы с результатами работ [30, 33-36, 40, 42] установлено, что в них полностью отсутствует информация о наиболее летучих компонентах с $I_i^T < 900$. Это связано с особенностями ввода в капиллярную колонку жидких проб масла, разбавленного летучим растворителем: наличие большого пика растворителя на начальном участке хроматограммы затрудняет обнаружение, разделение и идентификацию наиболее легкокипящих компонентов эфирного масла. При этом распределение пиков в центральной зоне хроматограммы равновесного пара эфирного масла пижмы практически совпадает с начальным участком хроматограммы масла, полученной традиционным способом.

В отечественных [43, 44] и зарубежных [30, 33-36, 40, 42] источниках представлена информация о том, что анализ летучих компонентов лекарственных растений методом газовой хроматографии проводят, используя прямой ввод жидкой пробы эфирного масла, разбавленного различными растворителями. Поэтому важной задачей являлось сравнение результатов парофазного газохроматографического анализа эфирного масла с результатами анализа при прямом вводе жидкой пробы.

Пробу эфирного масла вводили в испаритель хроматографа, разбавляя ее *n*-пентаном в соотношении 1:100. Объем вводимой пробы – 0.2 мкл. Хроматограмма эфирного масла цветков пижмы обыкновенной, полученного из Ботанического образца ЛРС, представлена на рисунке 14.

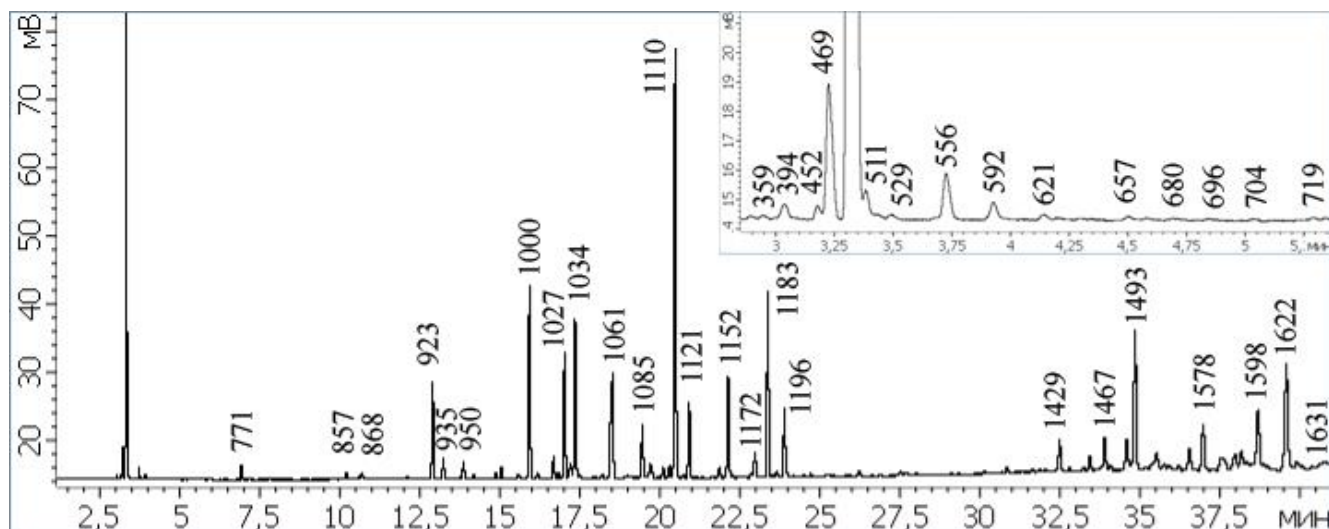


Рисунок 14 – Хроматограмма летучих компонентов эфирного масла пижмы обыкновенной (прямой ввод жидкой пробы), полученная методом ПФА-ГХ-ПИД: капиллярная колонка из плавленого кварца 30м×0.32мм, 5%-дифенил-95%-диметилполисилоксан $d_f=0.25$ мкм, 40°C, 4°/мин, N₂, ПИД, $V_{\text{пробы}} = 1$ см³, деление потока 1:50, $F = 1.0$ см³/мин

На хроматограмме зарегистрировано 84 летучих компонента с временами удерживания t_R от 2.95 до 39.91 мин в интервале индексов удерживания 359 – 1631 ед. индекса. Диапазон надежно определенных компонентов при ГХ анализе жидкой пробы эфирного масла пижмы составил $I_i^T = 851 – 1621$. Газохроматографические

характеристики летучих компонентов эфирного масла при вводе в хроматограф жидкой пробы представлены в таблице 6.

Таблица 6 – Результаты газохроматографического анализа жидкой пробы эфирного масла пижмы обыкновенной (Ботанический сад г. Самара)

I_i^T	$A_{rli}, \%$	I_i^T	$A_{rli}, \%$	I_i^T	$A_{rli}, \%$	I_i^T	$A_{rli}, \%$
359	0.02	868	0.08	1055	0.13	1437	0.13
394	0.07	870	0.21	1061	1.85	1449	0.22
452	0.05	908	0.05	1063	3.86	1455	0.65
469	0.58	923	0.03	1085	1.82	1464	0.06
511	0.08	928	3.28	1091	0.65	1467	1.39
529	0.02	935	0.74	1102	0.36	1472	0.23
556	0.01	946	0.01	1106	0.38	1486	1.43
564	0.23	950	0.62	1110	15.87	1493	6.67
592	0.08	958	0.18	1121	2.76	1512	0.48
621	0.02	975	0.22	1145	0.44	1518	0.22
657	0.02	979	0.39	1152	3.83	1523	0.20
680	0.01	991	0.19	1170	0.10	1530	0.28
696	0.01	1000	6.76	1172	0.99	1539	1.17
704	0.01	1006	0.19	1183	6.96	1551	2.70
709	0.01	1018	0.84	1190	0.16	1559	0.12
717	0.01	1022	0.18	1196	2.39	1578	1.04
732	0.01	1026	4.48	1257	0.17	1584	0.81
745	0.04	1031	0.67	1361	0.19	1588	0.13
771	0.03	1034	5.83	1384	0.21	1598	3.37
782	0.02	1038	0.07	1406	0.11	1621	7.01
851	0.17	1049	0.09	1429	1.57	1631	0.35

Установлено, что 42 летучих компонента из 84 совпадают с компонентами паровой фазы ЛРС «пижма обыкновенная». Четырнадцать из пятнадцати основных компонентов паровой фазы пижмы присутствуют в жидкой пробе эфирного масла. В таблице 6 они выделены жирным шрифтом. Отсутствие на хроматограмме эфирного масла основного компонента ЛРС пижмы с индексом удерживания $I_i^T = 501$ (пропаналь) вероятно связано с его перекрыванием высоким пиком *n*-пентана. Из таблицы 6 видно, что содержание легкокипящих компонентов низкое, в то время как средне- и высококипящие компоненты представлены серией пиков с высоким значением A_{rli} . Тенденция к снижению содержания низкокипящих компонентов, вероятно, привела к потере

некоторых из них по сравнению с результатами анализа ЛРС пижмы, кроме того, часть пиков перекрыта растворителем *n*-пентана, что видно на хроматограмме (рисунок 14).

Диаграмма «относительная площадь пика – индекс удерживания» (headspace-спектр) для анализа жидкой пробы эфирного масла пижмы, представлена на рисунке 15.

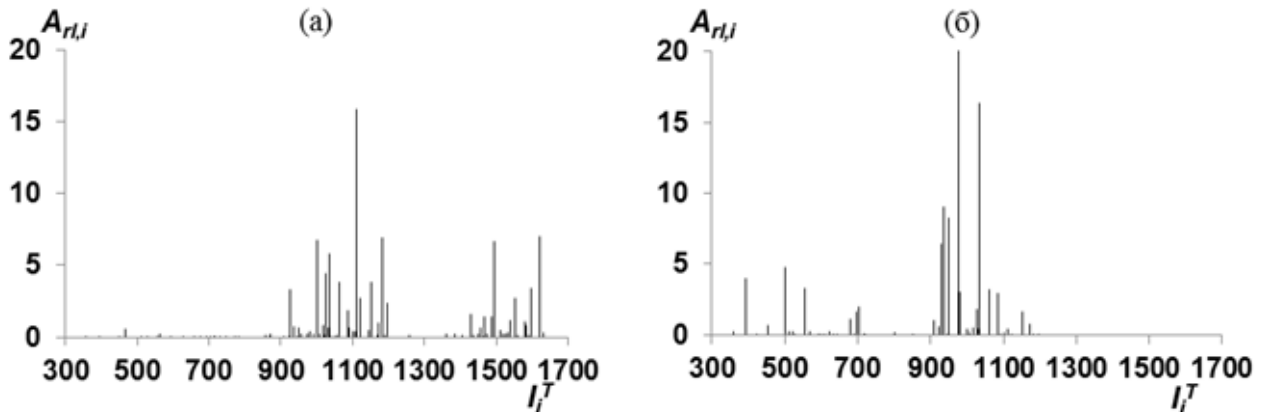


Рисунок 15 – Диаграммы «относительная площадь пика – индекс удерживания» летучих компонентов а – эфирного масла пижмы обыкновенной (жидкая проба масла, разбавленного *n*-пентаном), б – газового экстракта ЛРС пижмы.

Диаграмма для компонентов жидкой пробы эфирного масла (рисунок 15 – а) наглядно иллюстрирует снижение содержания наиболее летучих компонентов и рост высококипящих компонентов по сравнению с результатами анализа ЛРС (рисунок 15 – б), где присутствовали компоненты с величинами индексов удерживания $I_i^T \leq 700$ ед. индекса и относительным содержанием $A_{r,i}$ до 8.50%. Из диаграммы видно, что в интервале индексов удерживания $I_i^T = 1196 - 1631$ ед. индекса присутствуют пики, содержание которых достаточно высокое (до $A_{r,i} = 7.01\%$), эти компоненты полностью отсутствовали в паровой фазе ЛРС пижмы. Наличие малолетучих метаболитов растения ($I_i^T \geq 1200$) при анализе жидкой пробы эфирного масла отличает спектр компонентов масла от спектра ЛРС пижмы. Спектр среднелетучих компонентов пижмы совпадает на обоих типах хроматограмм.

Результаты парофазного газохроматографического анализа препарата Танацехол – таблетированной (измельченной) формы сухого экстракта пижмы – представлены в таблице 8.

Таблица 8 – Результаты парофазного газохроматографического анализа лекарственного препарата «Танацехол»

I_i^T	$A_{rl,i}, \%$	I_i^T	$A_{rl,i}, \%$	I_i^T	$A_{rl,i}, \%$	I_i^T	$A_{rl,i}, \%$
359	0.02	709	0.01	846	0.06	1010	0.08
394	0.75	717	0.01	851	0.01	1018	0.15
452	69.22	719	0.01	854	0.02	1026	2.04
501	1.15	724	0.04	869	0.09	1031	0.23
511	0.30	728	0.08	876	0.04	1034	0.03
522	0.09	745	0.01	912	0.02	1049	0.05
526	0.02	749	0.04	923	0.01	1061	0.09
556	1.71	753	0.05	928	0.07	1077	0.26
570	0.01	760	0.15	935	0.04	1091	0.28
592	0.02	771	2.02	946	0.02	1102	0.03
599	0.07	792	0.14	950	0.03	1110	0.01
606	0.14	797	0.01	956	0.05	1119	0.04
621	4.00	802	0.10	970	0.06	1135	0.06
632	0.17	812	0.02	975	0.02	1141	0.50
641	0.02	815	0.24	979	0.04	1152	0.03
657	0.01	826	0.05	995	0.12	1172	0.02
680	2.17	832	0.04	1000	0.01	1183	0.01
696	12.29	836	0.04	1006	0.02	1196	0.01
704	0.01	843	0.08	-	-	-	-

Примечание: 606 – бутанол-2, 724 – изопентанол, 728 – 2-метилбутанол, 760 – *n*-пентанол, 771 – изобутилацетат, 792 – октен-1, 797 – изопропилизобутират, 812 – *трет*-пентилацетат, 826 – пентилформиат, 836 – изовалерьяновая кислота, 843 – 3-метилциклопентанон, 846 – этил-2-метилбутират, 854 – пропилизобутират, 869 – изоамилацетат, 876 – изопентилацетат, 912 – *n*-пентилацетат, 956 – гептеналь-2, 970 – *n*-гептанол, 993 – мирцен, 1010 – 2,4-гептадиеналь, 1049 – *транс*- β -оцимен, 1077 – дигидромирценол, 1135 – *цис*-лимонен оксид, 1141 – *транс*-пинокарвеол.

В паровой фазе препарата содержится 74 компонента, диапазон индексов удерживания которых совпадает с диапазоном компонентов паровой фазы осушенных цветков пижмы, 46 из 74 компонентов присутствуют в паровой фазе цветков пижмы, а большая часть остальных – в паровой фазе эфирного масла. Относительное содержание большинства компонентов в паровой фазе препарата

Танацехол понижено в связи с большим содержанием этанола ($A_{r,i} = 69.22\%$, $I_i^T = 450$), который, по-видимому, использовали в качестве экстрагента биологически активных соединений из пижмы. Подлинность данного фитопрепарата подтверждается еще и тем, что все 15 основных компонентов российской пижмы, в том числе маркер *3-туйен-2-он*, присутствуют в равновесной паровой фазе препарата «Танацехол». В таблице они выделены жирным шрифтом.

3.4 Заключение к главе 3

Метод парофазного газохроматографического анализа применен для изучения компонентного состава равновесной паровой фазы ЛРС «пижма обыкновенная» и фитопрепаратов на основе этого растения. Установлено, что паровая фаза ЛРС пижмы содержит 54 летучих компонента в интервале индексов удерживания $I_i^T = 359 - 1196$ ед. индекса, что соответствует температурам кипения $T_b = 249 - 495$ К. Основными компонентами паровой фазы пижмы (осушенных цветков) являются (в порядке возрастания индексов удерживания I_i^T): *этаналь*, *пропаналь*, *2-метилпропаналь*, *3-метилбутаналь*, *2-метилбутаналь*, *α -туйен*, *α -пинен*, *сабинен*, *β -пинен*, *октаналь*, *пара-цимен*, *эвкалиптол*, *артемизия кетон*, *камфора*, *3- туйен-2-он* (маркер). Все основные компоненты паровой фазы ЛРС, в том числе маркер *3-туйен-2-он*, присутствуют в паровой фазе фитопрепаратов – эфирном масле и таблетированной форме сухого экстракта пижмы. Установлено, что полученные методом парофазного газохроматографического анализа headspace-хроматограммы ЛРС и фитопрепаратов содержат хорошо разделенные пики наиболее летучих компонентов растений с величинами индексов удерживания $I_i^T = 359 - 909$ ед. индекса, что соответствует температурам кипения $T_b = 249 - 420$ К, и не содержат информацию о малолетучих соединениях с $I_i^T > 1196$. Хроматограммы эфирных масел, полученные традиционным вводом жидкой пробы в колонку, содержат среднелетучие и малолетучие компоненты. Спектр среднелетучих компонентов растения с индексами удерживания ($I_i^T = 923 -$

1196 ед. индекса, $T_b = 426.7 - 495$ К) совпадает на обоих типах хроматограмм. На примере семи образцов пижмы из разных регионов России показано, что газохроматографический профиль (headspace-спектр) можно использовать для оценки подлинности ЛРС «пижма обыкновенная». Математическая обработка полученных результатов методом главных компонент позволила сгруппировать газохроматографические характеристики летучих компонентов пижмы из разных регионов России по месту произрастания или производителю данного вида ЛРС.

4 ПАРОФАЗНЫЙ ГАЗОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЛЕТУЧИХ КОМПОНЕНТОВ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТЕНИЯ «КАЛЕНДУЛА ЛЕКАРСТВЕННАЯ» И ФИТОПРЕПАРАТОВ НА ЕЕ ОСНОВЕ

В литературе представлены примеры исследования летучих компонентов эфирных масел и экстрактов календулы лекарственной методом ГХ-МС [45, 48, 51, 54, 55, 57]. Следует отметить, что данное лекарственное растение, в отличие от пижмы, не является эфиромасличным, а в качестве основной группы БАС календулы выступают нелетучие соединения. Одним из ключевых этапов данной работы являлась оценка возможности применения метода парофазного газохроматографического анализа для неэфиромасличных видов ЛРС. Необходимым условием проведения анализа равновесного пара календулы лекарственной являлось установление закономерностей газовой экстракции в РФП из осушенного ЛРС (цветков).

4.1 Установление закономерностей перераспределения летучих компонентов из цветков календулы лекарственной в газовую фазу

Календула лекарственная (*Calendula officinalis* L.) является растением, основной группой БАС которого являются каротиноиды. Однако растение содержит летучие метаболиты, которые могут быть обнаружены методом газохроматографического анализа равновесного пара.

Оценка влияния условий подготовки пробы на качественный и количественный состав паровой фазы ЛРС «календула лекарственная» проведена методом ПФА-ГХ-ПВД в режиме линейного программирования температуры с использованием промышленного образца осушенного ЛРС календулы производства «Красногорсклексредства».

При всех температурах газовой экстракции число пиков на хроматограмме существенно увеличивается в первые 20-30 минут (рисунок 16).

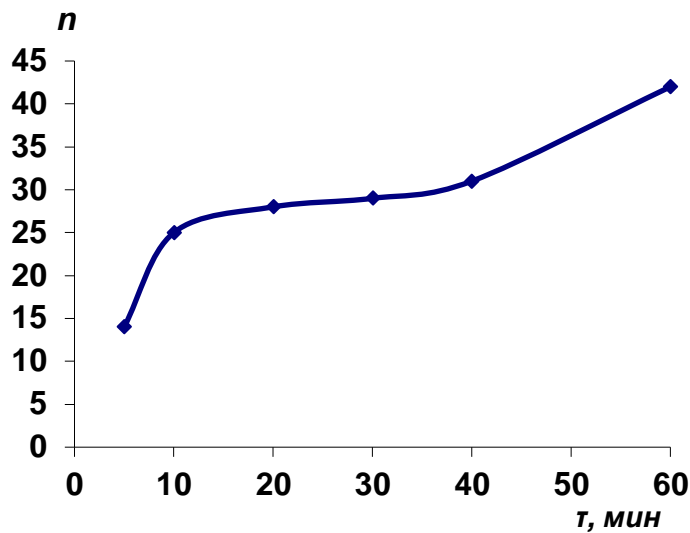


Рисунок 16 – Влияние времени газовой экстракции ЛРС календулы лекарственной на количество выделившихся летучих компонентов в паровую фазу; температура экстракции 80°C

На основании полученной зависимости установлено, что число компонентов и суммарное содержание веществ в паровой фазе, пропорциональное величине $\sum A_i$, наиболее резко возрастают в первые 20 минут экстракции, далее в интервале времени 20-40 минут значение $\sum A_i$ практически не изменяется. Вид полученной зависимости указывает на то, что равновесный состав паровой фазы при температуре 80°C достигается после 30-40 мин газовой экстракции. Близкий вид имела зависимость числа пиков от времени газовой экстракции при температуре 100°C.

Рост температуры газовой экстракции приводит к увеличению числа компонентов, извлекаемых в паровую фазу. Число пиков (компонентов) в интервале температур от 30° до 140°C увеличивается от 13 до 75 (продолжительность экстракции 40 минут), рисунок 17.

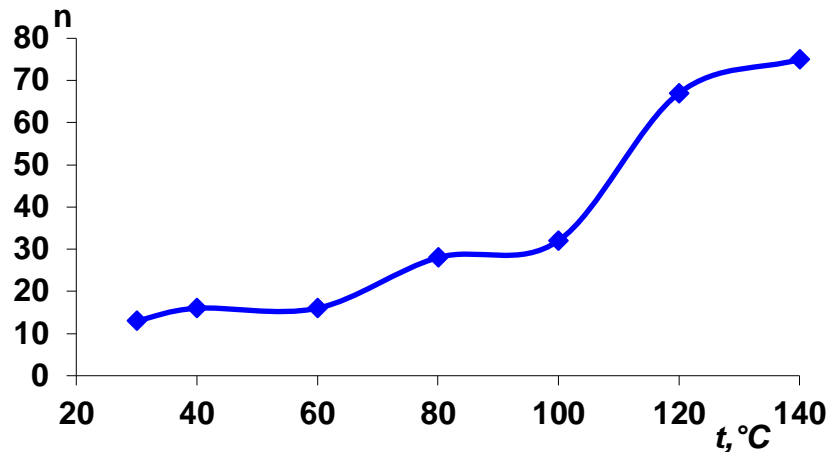


Рисунок 17 – Влияние температуры газовой экстракции ЛРС календулы лекарственной на количество выделившихся летучих компонентов в паровую фазу; время экстракции 40 минут

При температуре 80°C число летучих компонентов в паровой фазе достигает 28, а далее наблюдается тенденция к резкому увеличению числа компонентов – до 75 при температуре 140°C. Относительное содержание появляющихся при $t > 80^{\circ}\text{C}$ в РПФ компонентов мало ($A_{rl,i} \ll 1\%$) и они практически не влияют на общий вид хроматограммы. Кроме того при повышении температуры газовой экстракции не происходит уменьшения абсолютного содержания компонентов, что могло бы косвенно свидетельствовать о протекании химических реакций в воздушной фазе.

Изучена зависимость от температуры отношения площади пика менее летучего i -го компонента (A_i) к аналогичной величине для более летучего компонента (A_{st}), выбранного в качестве стандарта. В качестве такого стандарта был взят пропаналь ($I_{st}^T = 501$), который присутствует в паровой фазе уже при температуре газовой экстракции 30°C. На примере среднелетучего компонента β -пинена ($I_i^T = 975$) и других менее летучих компонентов установлено, что зависимость (A_i / A_{st}) от температуры газовой экстракции имеет максимум при температуре 40°C (рисунок 18, кривая 1).

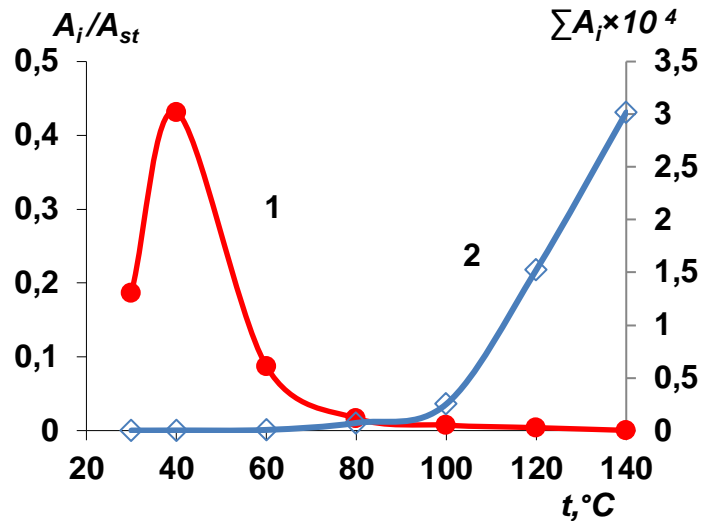


Рисунок 18 – Зависимости отношения абсолютных площадей пиков β -пинена и пропаналя (A_i/A_{st}) (кривая 1) и суммы абсолютных площадей пиков всех компонентов (ΣA_i) от температуры газовой экстракции (кривая 2); время экстракции 40 мин

Анализ зависимости A_i/A_{st} (кривая 1) показывает, что данная величина меньше всего изменяется в интервале температур 80-140⁰С, несмотря на резкое увеличение ΣA_i (кривая 2). Это дает основание полагать, что при температурах 80-140⁰С относительное содержание компонентов не подвержено сильным изменениям и возможно получение общего образа паровой фазы цветков календулы, отличающего качественный и количественный состав РПФ календулы от паровой фазы других растений. В интервале температур 30-140⁰ в присутствии воздуха не происходит трансформации состава пробы как паровой фазы календулы, так и конденсированной фазы (осушенных цветков).

Исходя из установленных закономерностей газовой экстракции (рисунки 16 – 18) найден диапазон оптимальных условий для проведения анализа паровой фазы цветков календулы: температура 80 – 100⁰С, время 30 – 40 минут. Для проведения ПФА анализа образцов ЛРС «календула лекарственная» и фитопрепаратов нами выбраны следующие условия пробоподготовки: температура 80⁰С, время 40 минут.

4.2 Парофазный газохроматографический анализ цветков календулы лекарственной

Согласно методике, описанной в п. 2.3, проведен газохроматографический анализ летучих компонентов равновесной паровой фазы цветков календулы лекарственной российского ареала произрастания.

На рисунке 19 представлена хроматограмма летучих компонентов равновесной паровой фазы календулы лекарственной, выращенной в Ботаническом саду г. Самара.

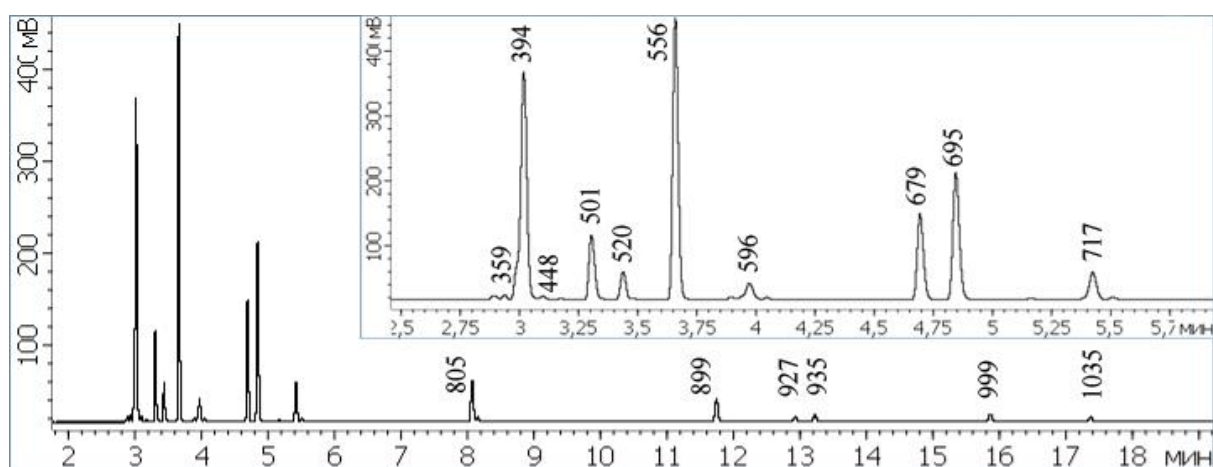


Рисунок 19 –Хроматограмма летучих компонентов ботанического образца ЛРС календулы лекарственной (*Calendula officinalis* L.), полученная методом ПФА-ГХ-ПВД: капиллярная колонка из плавленного кварца 30 м × 0.32 мм, 5%-дифенил-95%-диметилполисилоксан, $d_f = 0.25$ мкм, 40°C, 4 °C/мин, N₂, ПВД, $V_{\text{пробы}} = 1$ см³, деление потока 1:50, $F=1.0$ см³/мин.

На хроматограмме зарегистрировано 28 компонентов с временами удерживания t_R от 2.93 до 17.38 мин и величинами индексов удерживания I_i^T от 359 до 1035 единиц индекса. Относительное содержание летучих компонентов варьируется от 0.01 до 35.36%. На начальном участке хроматограммы присутствует наибольшее число летучих компонентов. Обращает на себя внимание наличие большого числа близкорасположенных пиков на начальном участке хроматограммы с индексами удерживания $I_i^T = 359 - 717$. Второй участок хроматограммы в диапазоне индексов удерживания от 802 до 1035 представлен

компонентами с низким содержанием в паровой фазе. Полученные газохроматографические характеристики (I_i^T и $A_{r,i}$) паровой фазы для ботанического образца календулы лекарственной сравнивали с характеристиками четырех промышленных образцов данного ЛРС. На рисунке 20 представлена хроматограмма для промышленного образца календулы лекарственной производства «Фитофарм».

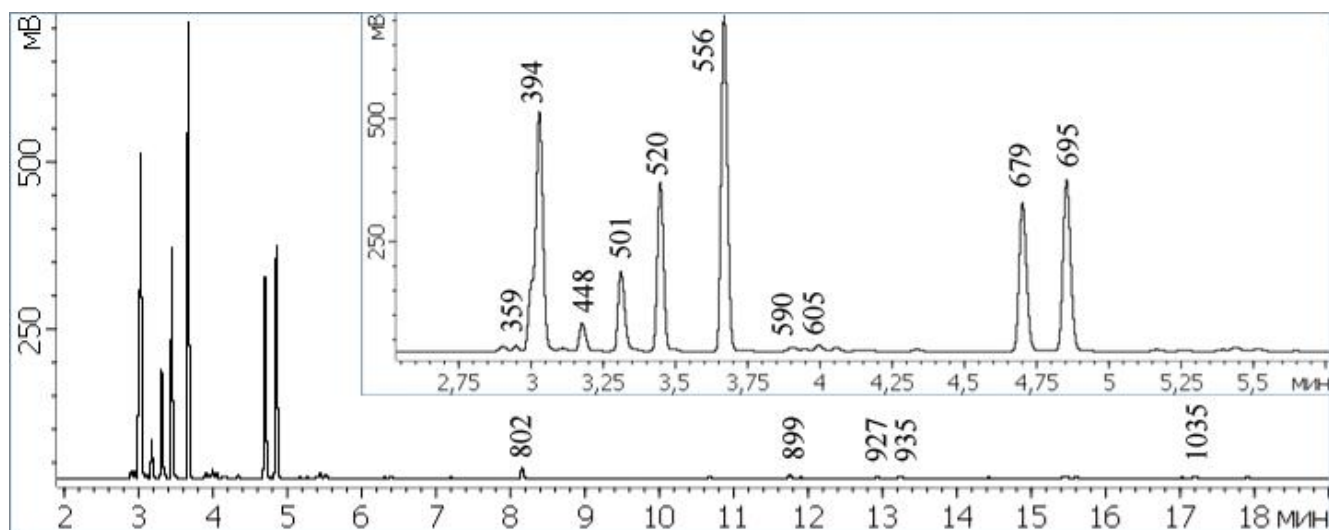


Рисунок 20 –Хроматограмма летучих компонентов промышленного образца ЛРС календулы лекарственной (*Calendula officinalis* L.), полученная методом ПФА-ГХ-ПВД: капиллярная колонка из плавленного кварца (30 м × 0.32 мм), 5%-дифенил-95%-диметилполисилоксан, $d_f = 0.25$ мкм, 40°C, 4°/мин, N₂, ПВД, $V_{\text{пробы}} = 1$ см³, деление потока 1:50, $F = 1.0$ см³/мин

При сравнении хроматограмм летучих компонентов ботанического и промышленных образцов календулы видно, что они имеют близкий вид (рисунки 19 и 20).

Компоненты равновесной паровой фазы календулы были идентифицированы на основании данных хромато-масс-спектрометрического анализа, а также путем сопоставления экспериментально определенных значений индексов удерживания I_i^T с литературными данными по ГХ-МС анализу жидких проб экстрактов и эфирных масел календулы лекарственной [45, 48, 51, 54, 55, 57]. Эти данные представлены в таблице 9.

Таблица 9 – Газохроматографические характеристики летучих компонентов равновесной паровой фазы растительного сырья «календула лекарственная» различного происхождения





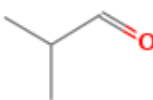
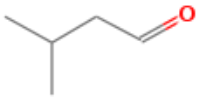
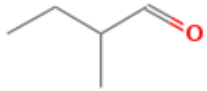

I_i^T	Соединение*	$A_{r,i}$, % **				
		1	2	3	4	5
359	Диметиловый эфир ^{а,г}	0.29	0.35	0.38	0.59	0.50
378	-	2.15	4.40	5.74	6.46	7.25
394	Этаналь ^{а,г}	22.47	16.64	14.56	14.62	14.94
423	Метоксиэтен ^{а,г}	0.21	0.18	0.16	0.17	0.20
448	Этанол ^{а,г}	0.10	1.66	0.73	1.17	0.48
501	Пропаналь ^{а,г}	6.37	5.67	5.62	6.24	6.25
520	Диметилсульфид ^{а,г}	2.45	13.70	1.00	0.43	0.55
556	2-Метилпропаналь ^{а,г}	25.76	26.25	35.36	31.57	29.34
568	Бутеналь-2 ^а	0.03	0.11	0.08	0.13	0.22
590	Пропанол ^{а,г}	0.20	0.28	0.30	0.55	0.46
598	Бутаналь ^{а,г}	2.02	0.14	0.15	0.13	0.27
605	2-Метилфуран ^{а,г}	0.16	0.26	0.27	0.22	0.19
619	2-Метилпентадиен-1,3 ^а	0.09	0.14	0.06	0.09	0.16
679	3-Метилбутаналь ^{а,г}	9.08	12.85	15.67	14.54	16.69
695	2-Метилбутаналь ^а	13.83	15.09	18.55	20.76	19.05
709	2-Этилфуран ^{а,г}	0.20	0.07	0.06	0.07	0.10
713	2,4,4-Триметилпентен-1 ^а	0.10	0.12	0.12	0.14	0.17
717	-	3.51	0.34	0.26	0.33	0.60
719	1,1-Диэтоксиэтан ^{а,г}	0.28	0.23	0.22	0.23	0.20
802	Гексаналь ^{б,г}	4.93	0.81	0.51	0.89	1.84
899	<i>n</i> -Нонан ^{а,в}	2.95	0.21	0.03	0.44	0.08
927	α -Туйен ^{а,б,в}	0.60	0.06	0.02	0.03	0.04
935	α -Пинен ^{а,б,в}	1.03	0.12	0.03	0.04	0.15
950	Камфен ^{а,в,г}	0.04	0.01	0.01	0.03	0.02
975	β -Пинен ^{а,б,в}	0.06	0.03	0.04	0.02	0.02
979	α -Мирцен ^{б,в}	0.04	0.02	0.01	0.02	0.03
999	α -Фелландрен ^{а,б,в}	1.02	0.18	0.04	0.07	0.08
1035	β -Оцимен ^{б,в,г}	0.03	0.08	0.02	0.02	0.12

Примечание: *идентификацию проводили с использованием: (а) хромато-масс-спектрометрического анализа, (б) литературных данных по календуле [45, 48, 51, 54, 55, 57], (в) атласа масс-спектров эфирных масел [130]; (г) базы данных NIST [133]; «-» – компоненты не идентифицированы.

**Образцы: 1 – Ботанический сад, 2 – Красногорск, 3 – Фитофарм, 4 – Фармпродукт, 5 – ZamonaRano.

Данные, представленные в таблице 9, показывают, что качественный состав летучих компонентов остается неизменным для ботанического и промышленных образцов, а содержание летучих компонентов меняется. Жирным шрифтом в таблице выделено девять основных компонентов, относящихся преимущественно к классу альдегидов. Им соответствуют индексы удерживания: 378 (не идентифицирован), 394 (этаналь), 448 (этанол), 501 (пропаналь), 520 (диметилсульфид), 556 (2-метилпропаналь), 679 (3-метилбутаналь), 695 (2-метилбутаналь) и 802 (гексаналь). Доминирующим компонентом паровой фазы всех изученных образцов календулы является 2-метилпропаналь ($I_i^T = 556$, $A_{r,i} = 25.76 - 35.36\%$). Специфические вещества-маркеры в составе РПФ календулы обнаружены не были. Химические формулы основных летучих компонентов газового экстракта ЛРС календулы представлены в таблице 10.

Таблица 10 – Основные летучие компоненты цветков календулы лекарственной

378 -	Этаналь 394 	Этанол 448 
Пропаналь 501 	Диметилсульфид 520 	2-Метилпропаналь 501 
3-Метилбутаналь 679 	2-Метилбутаналь 695 	Гексаналь 802 

Общий вид хроматографического профиля напрямую связан с качественными и количественными характеристиками летучих компонентов календулы.

Установлено, что паровая фаза ЛРС календулы лекарственной состоит из: терпенов (α -туйен, α -пинен, камфен, β -пинен, α -мирцен и др.), спиртов (этанол, пропанол), альдегидов (этаналь, пропаналь, бутеналь-2, 3-метилбутаналь, бутаналь, гексаналь), простых эфиров (метоксиэтен, 1,1-диэтоксиэтан), непредельных углеводородов (2-метилпентадиен-1,3 и 2,4,4-триметилпентен-1).

Для оценки правильности идентификации летучих компонентов паровой фазы календулы лекарственной нами представлена зависимость «индекс удерживания – температура кипения» для совокупности компонентов РПФ календулы. Найденные из литературных данных температуры кипения для 26 идентифицированных компонентов зверобоя представлены в таблице 1 Приложения. Диапазон температур кипения компонентов РПФ календулы, выделившихся в паровую фазу: 249 К (для диметилового эфира) – 450 К (для β -оцимена) На рисунке 21 представлена зависимость индекса удерживания Ван-ден-Доола и Кратса при линейном программировании температуры колонки I_i^T от температуры кипения T_b летучих компонентов паровой фазы цветков календулы лекарственной.

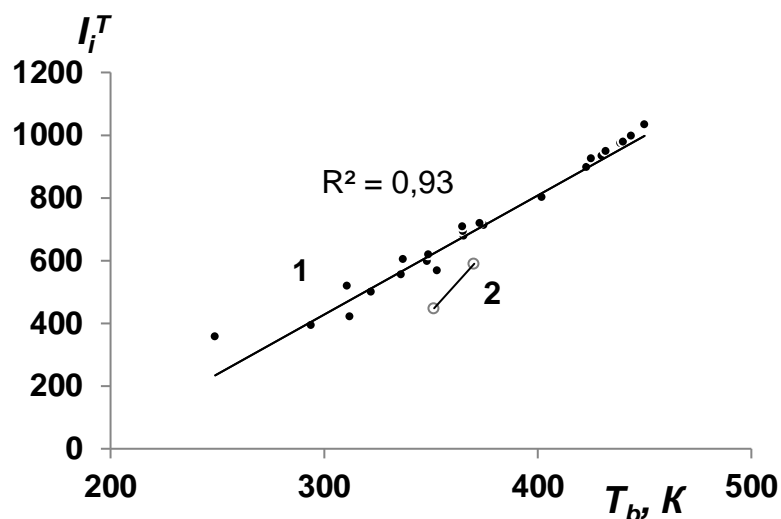
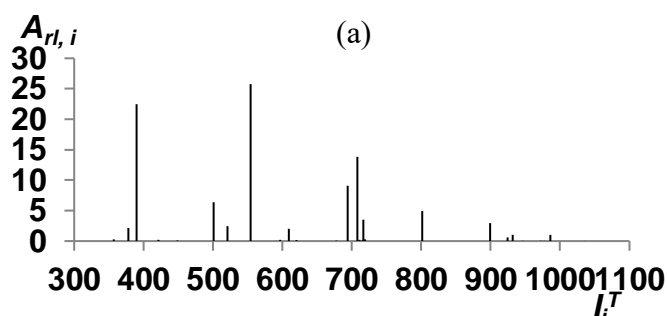


Рисунок 21 – Зависимость индекса удерживания (I_i^T) компонентов РПФ календулы от температуры кипения (T_b , К): 1 – все компоненты, кроме РПФ спиртов, 2 – спирты

Из рисунка 21 видно, что для идентифицированных соединений паровой фазы календулы наблюдается линейный характер зависимости I_i^T от T_b . Зависимость для спиртов (линия 2) расположена ниже зависимости для всех остальных компонентов паровой фазы (кривая 1). Линейный характер полученных зависимостей позволяет сделать вывод о правильности идентификации компонентов при анализе паровой фазы календулы в режиме линейного программирования температуры.

В литературе представлена информация по анализу эфирных масел и экстрактов календулы с диапазоном индексов удерживания $I_i^T = 908 - 1671$ ед. индекса при линейном программировании температуры и традиционном вводе в колонку разбавленных летучим растворителем жидких проб [45, 48, 51, 54, 55, 57]. Диапазон индексов удерживания, полученный в условиях парофазного газохроматографического анализа для РПФ календулы ($I_i^T = 359 - 1035$), существенно отличается от представленного в литературе для эфирных масел и экстрактов. На основании этих данных компоненты с индексами удерживания $I_i^T = 359 - 899$, которые отсутствуют в эфирном масле и экстрактах, можно отнести к *легколетучим* с температурами кипения $T_b = 249 - 423$ К. Компоненты, которые присутствуют и в эфирном масле или экстрактах, и в составе паровой фазы можно отнести к *среднелетучим* ($I_i^T = 928 - 1035$) с температурами кипения $T_b = 425 - 450$ К. Компоненты с индексами удерживания $I_i^T > 1035$ ед. индекса можно считать *малолетучими* компонентами календулы, их можно обнаружить только при анализе экстрактов или эфирного масла.

Диаграммы «относительная площадь пика – индекс удерживания» (хроматографические профили) для летучих компонентов растительного сырья календулы четырех исследуемых образцов представлены на рисунке 22 (а – д).



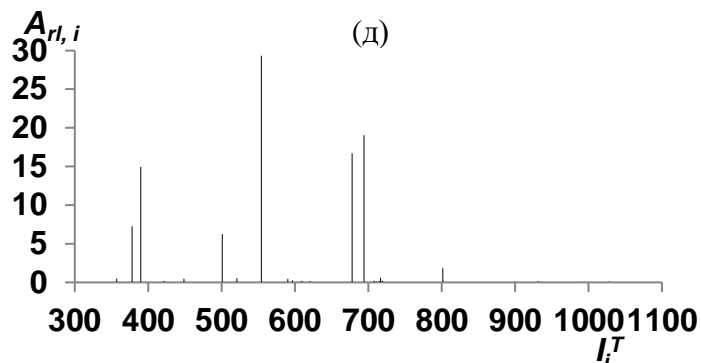
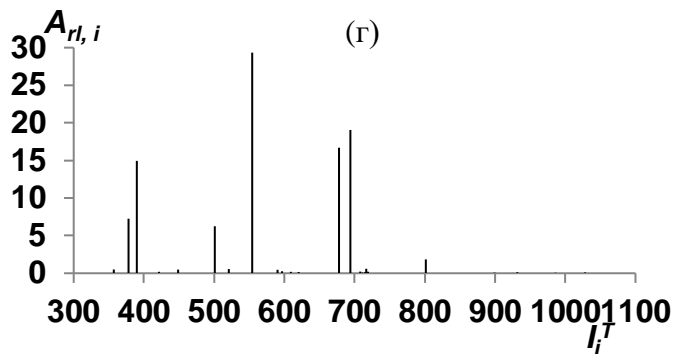
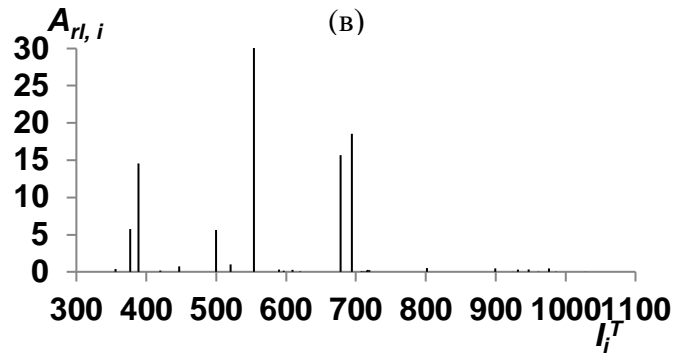
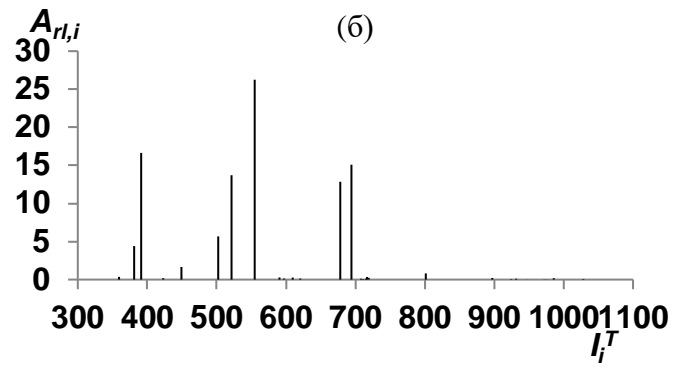


Рисунок 22 – Диаграммы «относительная площадь пика – индекс удерживания» (headspace-спектры) ЛРС «календула лекарственная»: а – ботанический образец, б – Красногорск, в – Фитофарм, г – Фармпродукт, д – Zamona Rapo

Сравнение хроматографических профилей ЛРС «календула лекарственная» свидетельствует о сходстве образцов ЛРС. Видно, что качественный состав паровой фазы исследованных образцов цветков календулы имеет близкий вид, как и в случае диаграмм для образцов цветков пижмы обыкновенной.

Представление газохроматографических характеристик паровой фазы ЛРС в виде диаграмм «относительная площадь пика – индекс удерживания» более наглядно свидетельствует о том, что качественный состав компонентов остается неизменным для образцов, выращенных в Самаре, в Московской области, на Алтае и в Анапе, а их содержание меняется в зависимости от места произрастания, применяемых методов обработки сырья.

Хемометрическая обработка результатов анализа паровой фазы цветков календулы лекарственной ботанического и четырех промышленных образцов методом главных компонент представлена на рисунке 23.

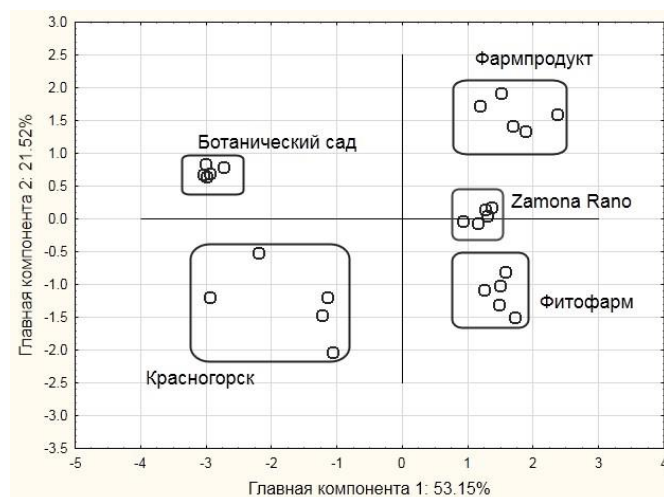


Рисунок 23 – Результаты парофазного анализа ЛРС «пижма обыкновенная» в координатах главных компонент 1 и 2

Обработка методом главных компонент хроматографических характеристик основных летучих компонентов паровой фазы ЛРС календулы показала группировку данных по образцам. Вероятно, это связано с влиянием погодных условий, места сбора, режима сушки ЛРС.

4.3 Парофазный газохроматографический анализ летучих компонентов фитопрепаратов на основе календулы лекарственной

Сравнение составов паровой фазы осушенных образцов ЛРС календулы и фитопрепаратов на ее основе проводилось с целью исследования аналитических возможностей метода ПФА. Для этого газовую экстракцию ЛРС и фитопрепаратов проводили в одинаковых условиях. Методом ПФА-ГХ исследованы лекарственные формы на основе ЛРС календулы: масляный (Лекус, Москва) и спиртовой экстракты. Хроматограмма паровой фазы масляного экстракта календулы представлена на рисунке 24.

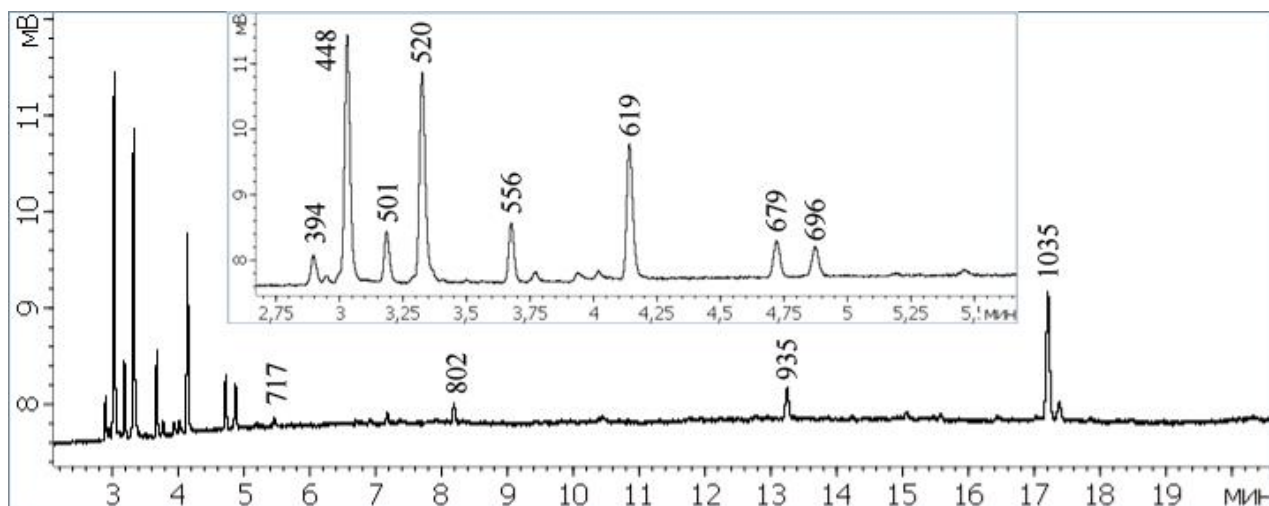


Рисунок 24 – Хроматограмма летучих компонентов масляного экстракта календулы лекарственной: ПФА-ГХ-ПИД капиллярная колонка из плавленного кварца 30 м × 0.32 мм, 5%-дифенил-95%-диметилполисилоксан $d_f = 0.25$ мкм, 40°C, 4°/мин, N₂, ПИД, $V_{\text{пробы}} = 1$ см³, деление потока 1:50, F = 1.0 см³/мин

На хроматограмме зарегистрировано 20 летучих компонентов в интервале индексов удерживания 359 – 1035 ед. инд., относительные площади пиков ($A_{r,i}$) варьируются в интервале 0.29 – 29.83%. Результаты ПФА промышленного образца жидкой лекарственной формы – масляного экстракта цветков календулы, представлены в таблице 11.

Таблица 11 – Результаты парофазного газохроматографического анализа косметического масла календулы

I_i^T	$A_{rli}, \%$	I_i^T	$A_{rli}, \%$
359	0.29	619	8.48
378	1.69	679	2.81
394	13.08	695	2.56
448	29.83	717	0.57
501	14.36	771	0.84
520	0.23	802	1.72
556	3.77	862	1.29
568	0.56	935	3.22
598	0.66	979	1.11
605	0.49	1035	12.43

Семнадцать компонентов паровой фазы масляного экстракта совпадают с компонентами паровой фазы ЛРС календулы. Все девять основных компонентов паровой фазы цветков присутствуют в газовом экстракте фитопрепарата в существенном количестве ($A_{rli} > 1\%$), в таблице эти компоненты выделены жирным шрифтом. Компоненты с индексами удерживания 771 и 862 отсутствуют в паровой фазе ЛРС календулы, но присутствуют в паровой фазе масляного экстракта. Из сопоставления рисунка 19 и рисунка 24 видно, что отклик детектора на хроматограмме РПФ цветков календулы значительно сильнее, чем на хроматограмме РПФ масляного экстракта. Это свидетельствует о том, что концентрация всех компонентов РПФ масла существенно меньше, чем в РПФ воздушно-сухих образцов. Полученные данные указывают на возможность определения подлинности косметического масла календулы методом ПФА-ГХ.

Хроматограмма паровой фазы спиртового (70%) экстракта календулы содержит большой пик этанола ($I_i^T = 448$, $A_{rli} = 99.6\%$) и 24 остальных компонента с небольшим относительным содержанием ($A_{rli} = 0.1469 - 0.0002\%$). Газохроматографические характеристики компонентов паровой фазы спиртового экстракта календулы без учета пика этанола при расчете A_{rli} представлены в таблице 12.

Таблица 12 – Результаты парофазного газохроматографического анализа спиртового экстракта календулы.

I_i^T	$A_{rli}, \%$	I_i^T	$A_{rli}, \%$	I_i^T	$A_{rli}, \%$
378	10.33	679	3.10	927	0.21
394	8.81	695	4.88	935	6.25
501	2.29	717	0.29	950	0.18
520	32.73	725	0.15	954	0.17
556	13.03	740	7.63	956	0.24
605	1.21	802	0.29	979	0.25
619	1.92	859	2.68	999	1.47
628	1.47	899	0.32	1035	0.10

Относительная площадь пиков летучих компонентов A_{rli} варьируется в интервале от 0.10 до 32.73%. Восемнадцать компонентов паровой фазы фитопрепарата совпадают с компонентами паровой фазы ЛРС календулы. Восемь из девяти основных летучих компонентов ЛРС календулы присутствуют в паровой фазе спиртового экстракта, в таблице они выделены жирным шрифтом. Вероятно, это связано с наложением пика экстрагента (этилового спирта) на пик с индексом удерживания $I_i^T=448$. Компоненты с индексами удерживания 628, 725, 740, 859, 954 и 956 не совпадают с компонентами паровой фазы цветков календулы.

4.4 Заключение к главе 4

Таким образом, метод парофазного газохроматографического анализа применен для исследования летучих компонентов ботанического и четырех промышленных образцов ЛРС календулы лекарственной и жидких лекарственных форм на ее основе – масляного и спиртового экстракта. Изучены закономерности газовой экстракции из осушенных образцов ЛРС календулы. Газовую экстракцию предложено проводить при температуре 80°C в течение 40 минут. В отличие от газовой экстракции компонентов пижмы, летучие компоненты календулы лекарственной выделялись в паровую фазу постепенно с увеличением продолжительности газовой экстракции. Показано, что качественный состав паровой фазы ЛРС совпадает для образцов, выращенных в Самаре, в

Московской области, в Анапе, Барнауле и Узбекистане. Определены основные летучие компоненты паровой фазы календулы лекарственной. К ним относятся девять компонентов с индексами удерживания $I_i^T=378$, $I_i^T=394$ (этаналь), $I_i^T=448$ (этанол), $I_i^T=501$ (пропаналь), $I_i^T=520$ (диметилсульфид), $I_i^T=556$ (2-метилпропаналь), $I_i^T=679$ (3-метилбутаналь), $I_i^T=695$ (2-метилбутаналь) и $I_i^T=802$ (гексаналь). Паровая фаза фитопрепаратов содержит большое количество летучих компонентов растительного сырья календулы, причем основные летучие компоненты ЛРС ($A_{r,i} > 1\%$) присутствуют в паровой фазе фитопрепаратов в значительном количестве.

5 ПАРОФАЗНЫЙ ГАЗОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЛЕТУЧИХ КОМПОНЕНТОВ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТЕНИЯ «БОЯРЫШНИК КРОВАВО-КРАСНЫЙ» И ФИТОПРЕПАРАТОВ НА ЕГО ОСНОВЕ

Летучие компоненты плодов боярышника кроваво-красного являются малоизученными по сравнению с другими объектами диссертационного исследования [64-69]. Для изготовления эфирного масла боярышника используют семена и цветы. Плоды применяют в изготовлении экстрактов. Из литературных источников по анализу эфирных масел и экстрактов на основе различных частей растения «боярышник кроваво-красный» известно, что особенностью его компонентного состава является наличие большого числа органических кислот [137]. Присутствие кислот в составе метаболитов свойственно для плодов многих растений. Изучение особенностей парофазного анализа плодов как ЛРС являлось важным этапом исследования для подтверждения универсальности метода парофазного газохроматографического анализа.

5.1 Установление закономерностей перераспределения летучих компонентов из плодов боярышника кроваво-красного в газовую фазу

Боярышник кроваво-красный (*Crataegus sanguinea*) является растением, основной группой БАС которого являются флавоноиды. Чтобы оценить возможные проблемы, возникающие в ходе газовой экстракции летучих компонентов из конденсированной фазы плодов лекарственного растения «боярышник кроваво-красный» в присутствии воздушной фазы, нами было изучены закономерности перераспределения летучих компонентов ЛРС в паровую фазу. Анализ РПФ проводили в варианте ПФА-ГХ-ПВД с использованием промышленного образца «Фитофарм».

Проведена процедура подбора оптимальных условий проведения газовой экстракции (температуры и времени) для ЛРС «боярышник кроваво-красный». Исследовано влияние времени подготовки газового экстракта на общее содержание летучих компонентов в паровой фазе плодов боярышника кроваво-

красного. Обнаружено, что при всех температурах проведения газовой экстракции число пиков на хроматограмме в наибольшей степени возрастает в первые 10 – 20 минут, а далее не меняется в диапазоне времени экстракции 20 – 40 минут (рисунок 25, 100°C). С увеличением продолжительности экстракции до 50 минут число компонентов на хроматограмме резко возрастает, при этом не наблюдается уменьшения высот (площадей) пиков компонентов. Однако содержание компонентов, выделившихся при продолжительности экстракции $\tau > 40$ минут, мало и они не влияют на вид хроматографического образа паровой фазы ЛРС боярышника. Близкие закономерности наблюдались при температуре газовой экстракции 100°C.

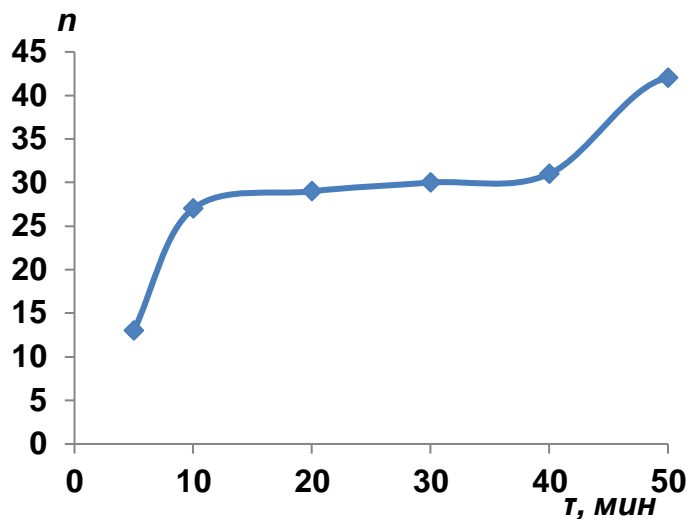


Рисунок 25 – Влияние времени газовой экстракции ЛРС боярышника кроваво-красного на количество выделившихся летучих компонентов в паровую фазу; температура экстракции 100°C

С ростом температуры газовой экстракции наблюдается закономерный рост числа летучих компонентов в паровой фазе. Число компонентов с ростом температуры в интервале от 30° до 140°C увеличивается от 13 до 77 (рисунок 26, время экстракции 40 минут).

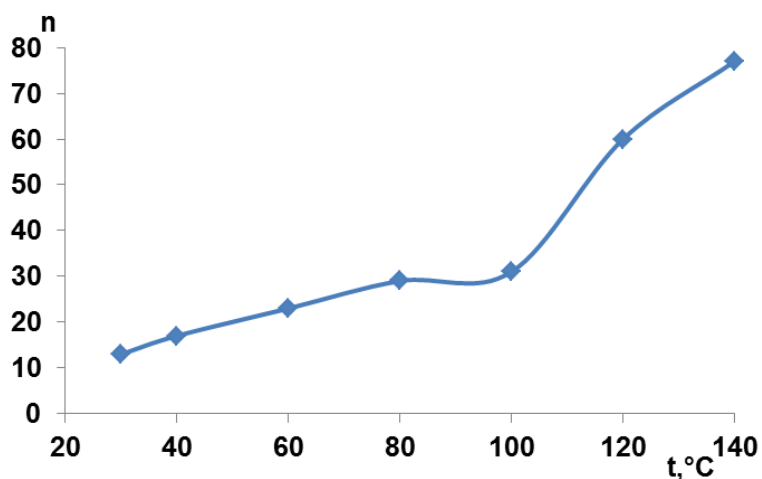


Рисунок 26 – Влияние температуры газовой экстракции ЛРС боярышника кроваво-красного на количество выделившихся летучих компонентов в паровую фазу; время экстракции 40 минут

При температуре газовой экстракции 100°C в паровую фазу выделяется 31 летучий компонент. Дальнейший рост температуры газовой экстракции приводит к резкому увеличению числа пиков до 77 при температуре 140°C. Относительное содержание компонентов, появляющихся при высоких температурах газовой экстракции (120-140°C), мало. Данные компоненты не влияют на вид общего хроматографического профиля боярышника. Увеличение температуры газовой экстракции не сопровождается уменьшением абсолютной площади компонентов паровой фазы, что могло бы свидетельствовать об изменении химического состава пробы.

Получена зависимость от температуры отношения площади пика менее летучего i -го компонента (A_i) к аналогичной величине для более летучего компонента (A_{st}), выбранного в качестве стандарта. За стандартное соединение был принят компонент ($I_i^T = 556$, 2-метилпропаналь), который присутствует в паровой фазе уже при температуре газовой экстракции 30°C. На примере гексаналя ($I_i^T = 802$), одного из наименее летучих компонентов паровой фазы боярышника, и других менее летучих компонентов показано, что зависимость A_i/A_{st} от температуры газовой экстракции имеет максимум при температуре 40°C (рисунок 27, кривая 1).

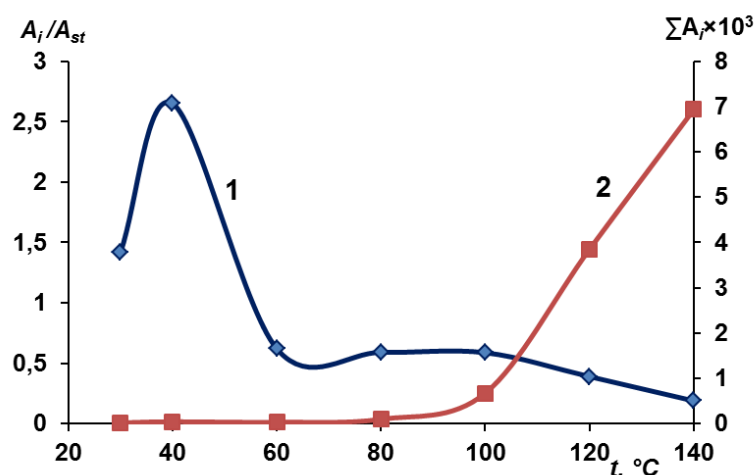


Рисунок 27 – Зависимости отношения абсолютных площадей пиков гексаналя и 2-метилпропаналя (A_i/A_{st}) (кривая 1) и суммы абсолютных площадей пиков всех компонентов (ΣA_i) от температуры газовой экстракции (кривая 2); время экстракции 40 минут

На основании зависимости A_i/A_{st} можно сделать вывод, что данная величина практически не меняется в интервале температур 100 – 140 $^\circ\text{C}$, несмотря на резкое увеличение ΣA_i (кривая 2). Полученные данные позволяют предположить, что в диапазоне температур 100–140 $^\circ\text{C}$ относительное содержание компонентов не претерпевает существенных изменений и возможно получение характерного хроматографического профиля, отображающего качественный и количественный состав газового экстракта плодов боярышника. Соединения, входящие в состав паровой фазы ЛРС «боярышник кроваво-красный», устойчивы при исследованных температурах (30 $^\circ$ – 140 $^\circ\text{C}$), о чем свидетельствуют полученные данные.

Таким образом, анализ паровой фазы ЛРС можно проводить в интервале температур 80 – 140 $^\circ\text{C}$ при продолжительности газовой экстракции 20 – 40 минут. Для изучения качественного и количественного состава газового экстракта плодов боярышника и фитопрепаратов на его основе в нашей работе выбраны следующие условия: температура 100 $^\circ\text{C}$, время 40 минут.

5.2 Парофазный газохроматографический анализ летучих компонентов плодов «боярышник кроваво-красный»

В нашей работе проведен газохроматографический анализ летучих компонентов ботанического и двух промышленных образцов плодов боярышника кроваво-красного. Хроматограмма газового экстракта ботанического образца боярышника, полученная в выбранных условиях (100°C, 40 минут), приведена на рисунке 28.

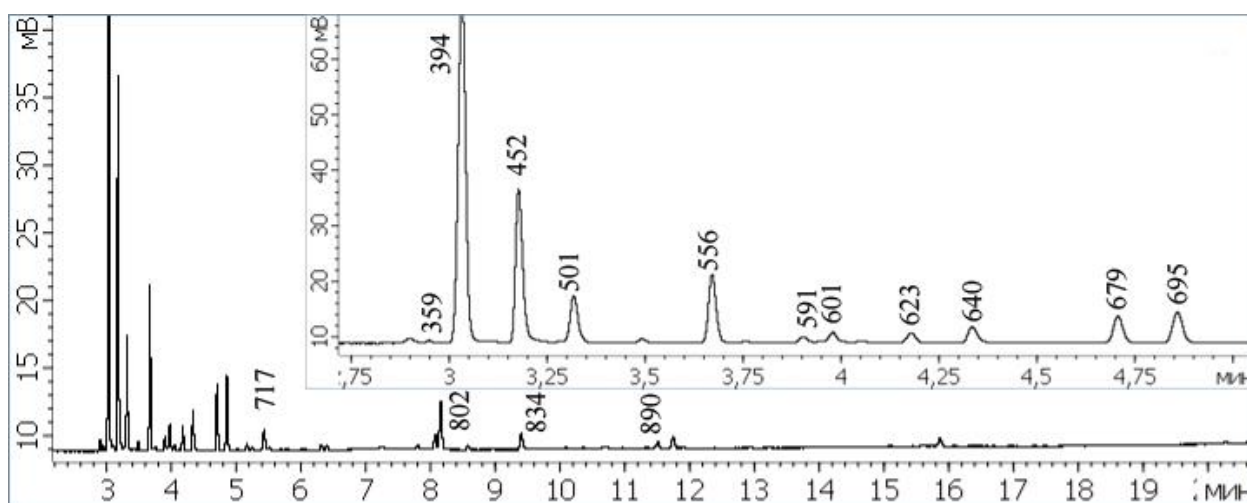


Рисунок 28 – Хроматограмма летучих компонентов ботанического образца плодов боярышника, полученная методом ПФА-ГХ-ПИД: капиллярная колонка из плавленного кварца 30м×0.32мм, 5%-дифенил-95%-диметилполисилоксан, $d_f=0.25$ мкм, 40°C, 4°/мин., N_2 , ПИД, $V_{\text{пробы}} = 1 \text{ см}^3$, деление потока 1:50, $F=1.0 \text{ см}^3/\text{мин}$.

На хроматограмме зарегистрирован 31 летучий компонент с временами удерживания от 2.95 до 19.33 мин и индексами удерживания в интервале $I_i^T = 360 - 1080$. Обращает на себя внимание наличие большого числа близкорасположенных пиков на начальном участке хроматограммы с индексами удерживания $I_i^T = 359 - 717$. Второй участок хроматограммы в диапазоне индексов от 719 до 1080 ед. индекса характеризуется компонентами с небольшим содержанием, расположенными на существенном расстоянии друг от друга.

Определены газохроматографические характеристики (I_i^T и $A_{r,i}$) паровой фазы для двух промышленных образцов ЛРС «боярышник кроваво-красный» («Красногорсклексредства», «Фитофарм»). Для примера хроматограмма летучих

компонентов плодов боярышника производства «Красногорсклексредства» представлена на рисунке 29.

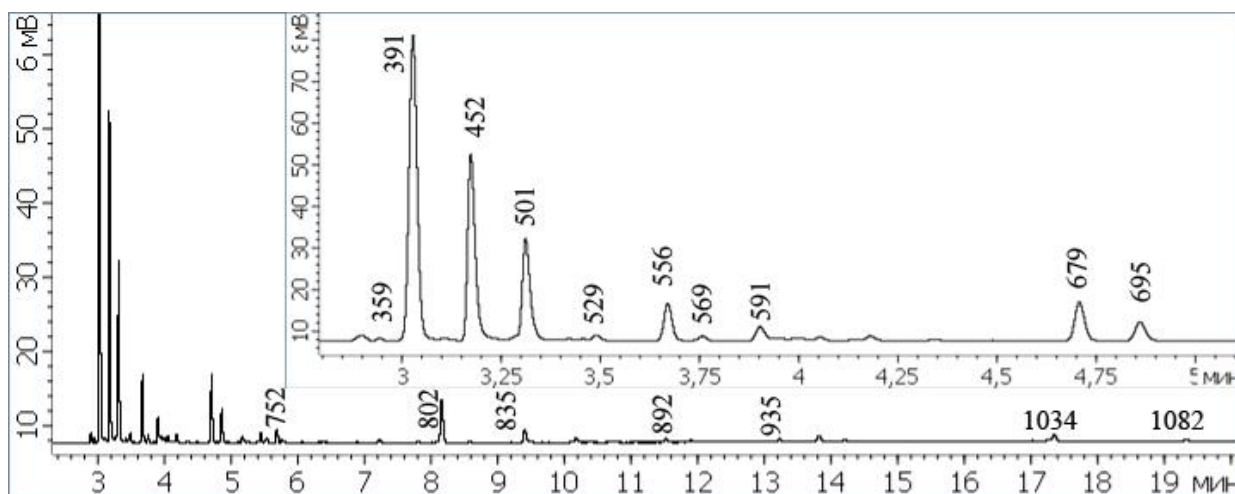


Рисунок 29 – Хроматограмма летучих компонентов промышленного образца плодов боярышника производства Красногорсклексредства, полученная методом ПФА-ГХ-ПИД: капиллярная колонка из плавленного кварца 30м×0.32мм, 5%-дифенил-95%-диметилполисилоксан, $d_f = 0.25$ мкм, 40°C, 4°/мин., N₂, ПИД, $V_{\text{пробы}} = 1 \text{ см}^3$, деление потока 1:50, F=1.0 см³/мин.

Полученные данные о составе паровой фазы ботанического и промышленных образцов ЛРС боярышника представлены в таблице 13.

Таблица 13 – Газохроматографические характеристики летучих компонентов равновесной паровой фазы растительного сырья «боярышник кроваво-красный» различного происхождения

I_i^T	Соединение*	Промышленные образцы		Ботанический сад A_{rli} , %
		Фитофарм	Красногорск	
359	Диметиловый эфир ^{а,г}	0.15	1.01	0.23
392	Этаналь^{а,б,г}	55.55	35.34	41.03
424	Диметиламин ^{а,б,г}	0.23	0.19	0.25
451	3-Метилбутен-1^{а,г}	8.89	19.10	17.32
502	Диметилсульфид^{а,г}	5.76	9.56	5.77
529	Винилацетат ^{а,г}	0.67	0.78	0.41
556	2-Метилпропаналь^{а,г}	3.32	5.90	7.98
569	-	0.22	0.37	0.17
591	Пропанол^{б,в,г}	1.79	2.00	0.64
601	Бутаналь ^{а,г}	1.73	0.12	1.31
610	Этилацетат ^{а,б,в,г}	0.23	0.37	0.25

623	3-Метил-3-бутен-2-он ^{а,г}	0.28	0.76	1.29
640	3-Метилбутанон-2 ^{а,г}	0.18	0.12	2.41
679	3-Метилбутаналь^{а,г}	3.69	7.68	3.98
695	2-Метилбутаналь^{а,г}	2.42	4.19	4.74
708	2-Этилфуран ^{а,г}	0.51	0.53	0.42
711	Пентанон ^{б, г}	0.15	0.20	0.19
717	Этилпропионат^г	1.98	1.10	1.52
719	3-Пентен-2-он ^{а,г}	0.20	0.25	0.16
744	2-Бутилацетат ^{б,в,г}	0.14	0.16	0.47
747	2-Метилбутанол ^{а,б,в,г}	0.15	0.13	0.37
751	Пентеналь ^б	0.13	0.07	0.03
763	<i>n</i> -Пентанол ^{б,в,г}	0.06	0.11	0.12
773	Пентенол-2 ^б	0.55	0.35	0.48
799	<i>n</i> -Октан ^{а,б,в,г}	1.25	0.10	1.34
802	Гексаналь^{а,б,в,г}	7.21	4.14	4.47
835	Изовалериановая	0.76	3.07	1.72
889	Стирен (фенилэтилен) ^{б,г}	0.60	0.92	0.63
932	α -Пинен ^{а,б,в,г}	0.26	0.23	0.27
1031	1,8-Цинеол ^{а,б,в,г}	0.12	0.46	0.03
1080	Гептановая кислота ^{в,г}	0.82	0.67	0.01

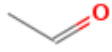
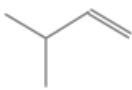

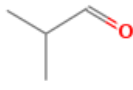
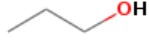
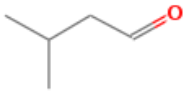
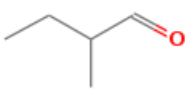
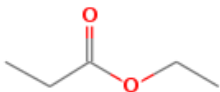

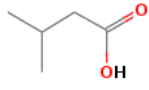
Примечание: *идентификацию проводили с использованием: (а) хромато-масс-спектрометрического анализа, (б) литературных данных по боярышнику [64-69], (в) атласа масс-спектров эфирных масел [130], (г) базы данных NIST [133], «-» – компоненты не идентифицированы.

Всего паровая фаза исследованного образца плодов боярышника, полученная в выбранных условиях, содержит 31 летучий компонент с индексами удерживания от 360 до 1080. Из таблицы 13 видно, что качественный состав летучих компонентов остается постоянным для ботанического и промышленных образцов, а относительное содержание летучих компонентов меняется. Десять летучих компонентов, выделенных жирным шрифтом в таблице, имеют содержание в паровой фазе $A_{ri} \geq 1\%$ для всех исследованных образцов ЛРС, они являются основными летучими компонентами боярышника. Им соответствуют индексы удерживания 392 (этаналь), 451 (3-метилбутен-1), 502 (диметилсульфид), 556

(2-метилпропаналь), 591 (пропанол), 679 (3-метилбутаналь), 695 (2-метилбутаналь), 717 (этилпропионат), 802 (гексаналь) и 835 (изовалериановая кислота).

Химические формулы основных компонентов паровой фазы плодов боярышника кроваво-красного представлены в таблице 14.

Таблица 14 – Основные летучие компоненты плодов боярышника кроваво-красного

<p>Этаналь 392</p> 	<p>3-Метилбутен-1 451</p> 	<p>Диметилсульфид 502</p> 	<p>2-Метилпропаналь 556</p> 	<p>Пропанол 591</p> 
<p>3-Метилбутаналь 679</p> 	<p>2-Метилбутаналь 695</p> 	<p>Этилпропионат 717</p> 	<p>Гексаналь 802</p> 	<p>Изовалериановая кислота 835</p> 

Интересно также отметить, что методом ПФА-ГХ удалось обнаружить органические кислоты – изовалериановую $I_i^T = 835$ и гептановую $I_i^T = 1080$. Из литературы известно, что наличие органических кислот характерно именно для плодов различных растений [5, 137]

Правильность идентификации контролировали, используя зависимость «индекс удерживания – температура кипения» при линейном программировании температуры колонки, рисунок 30.

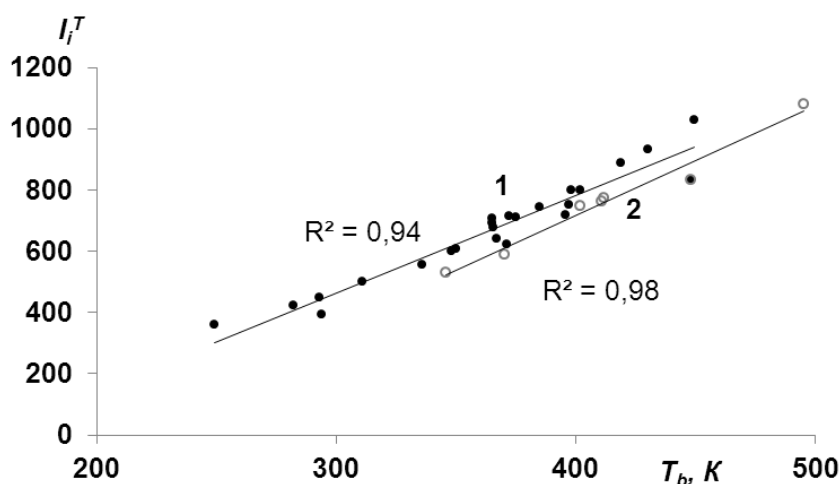


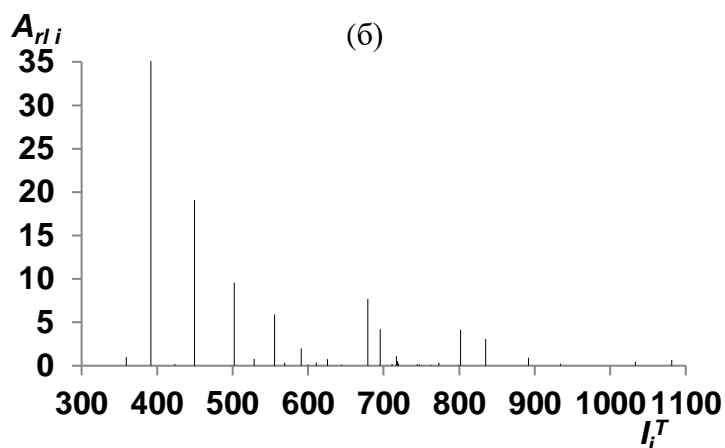
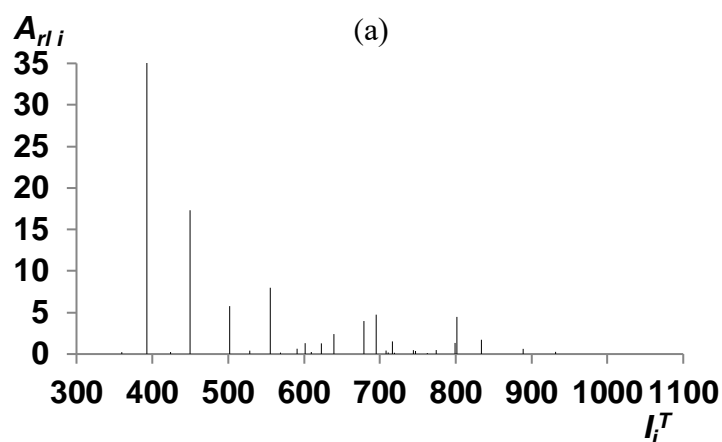
Рисунок 30 – Зависимость индекса удерживания (I_i^T) компонентов РПФ боярышника от температуры кипения (T_b , К): 1 – все компоненты, кроме РПФ спиртов, 2 – спирты и кислоты

Зависимость I_i^T от T_b для идентифицированных соединений паровой фазы боярышника носит линейный характер (рисунок 30). Из рисунка видно, что зависимость для спиртов и органических кислот, входящих в состав паровой фазы боярышника (линия 2), расположена несколько ниже зависимости для всех остальных компонентов паровой фазы (линия 1). Как и в случае спиртов, органические кислоты обладают слабым взаимодействием с малополярной 5%-дифенил-95%-диметилполисилоксановой неподвижной фазой, что напрямую связано с расположением линии 2 (рисунок 30). Общий тренд линейности полученных корреляционных зависимостей свидетельствует о правильности идентификации компонентов газового экстракта боярышника при газохроматографическом анализе в режиме линейного программирования температуры.

Из литературных источников по анализу эфирных масел и экстрактов ЛРС боярышника известно, что индексы летучих компонентов варьируются в интервале $I_i^T = 650 - 2366$ ед. индекса [64-69]. Данные представлены для эфирных масел и экстрактов различных частей боярышника (плоды, листья, семена) при линейном программировании температуры и вводе пробы в колонку жидких проб, разбавленных летучим растворителем. Интервал индексов удерживания

компонентов ($I_i^T = 360 - 1080$ ед. индекса), полученный при парофазном анализе плодов боярышника, отличается от представленного в литературе для анализа эфирных масел и экстрактов. Учитывая литературные и экспериментальные данные по анализу компонентов РПФ боярышника, компоненты с индексами удерживания $I_i^T = 360 - 708$ ед. индекса можно отнести к *легколетучим*; им соответствуют температуры кипения $T_b = 249 - 365$ К. Компоненты, обнаруженные в паровой фазе ЛРС боярышника и в эфирном масле и экстрактах, можно считать *среднелетучими* ($I_i^T = 711 - 1080$ ед. индекса) с температурами кипения $T_b = 375 - 495$ К. Компоненты с индексами удерживания $I_i^T > 1080$ ед. индекса можно считать *малолетучими* компонентами боярышника, их можно зарегистрировать только на хроматограммах эфирных масел или экстрактов.

На рисунке 31 (а-в) представлены диаграммы «относительная площадь пика – индекс удерживания» (headspace-спектры) летучих компонентов растительного сырья боярышника трех исследуемых образцов.



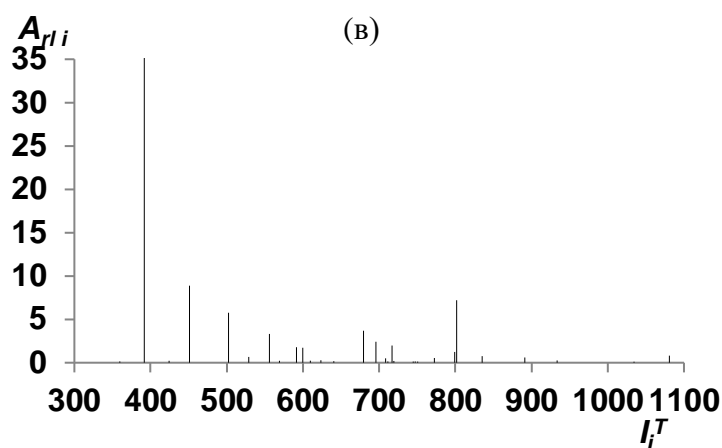


Рисунок 31 – Диаграммы «относительная площадь пика – индекс удерживания» (headspace-спектры) ЛРС «боярышник кроваво-красный»: а – ботанический образец, б – Красногорсклексредства, в – Фитофарм

На начальном участке диаграмм представлены легколетучие компоненты с высоким содержанием в паровой фазе, участок со среднелетучими компонентами представлен серией компонентов с низким содержанием в паровой фазе. Доминирующим компонентом газовых экстрактов всех трех исследованных образцов боярышника является этаналь ($I_i^T = 392$, $A_{rli} = 55.55 - 35.34\%$).

Представление совокупностей газохроматографических характеристик летучих компонентов ЛРС в виде диаграмм «относительная площадь пика – индекс удерживания» показывает сходство исследованных образцов ЛРС боярышника. Кроме того, headspace-спектры наглядно свидетельствует о том, что качественный состав компонентов остается неизменным для образцов, выращенных в Самаре, в Московской области и в Анапе, а их содержание меняется в зависимости от места произрастания сырья.

На рисунке 32 представлены результаты математической обработки хроматографических характеристик паровой фазы плодов боярышника кроваво-красного методом главных компонент.

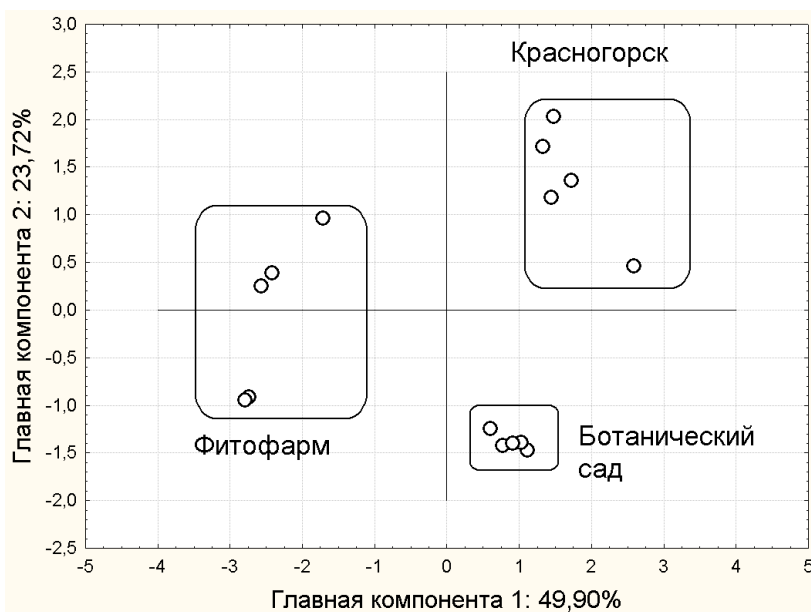


Рисунок 32 – Результаты парофазного анализа ЛРС «боярышник кроваво-красный» в координатах главных компонент 1 и 2

Использование ПФА-ГХ с последующей статистической обработкой результатов дает возможность классифицировать растительное сырье по производителю и/или месту произрастания ЛРС.

5.3 Парофазный газохроматографический анализ летучих компонентов фитопрепаратов на основе боярышника кроваво-красного

Проведено сравнение составов газовых экстрактов исходного ЛРС и фитопрепаратов на его основе, полученных и проанализированных в одинаковых условиях. Исследована паровая фаза спиртовой настойки «Боярышника настойка» (Кировская фармацевтическая фабрика, Киров), содержимого капсул «Боярышник Форте» (Парафарм, Москва) и капсул «Боярышник Премиум» (Фарм-Про, Новосибирск), таблеток на основе сухого экстракта плодов боярышника «Кардиоактив» (Эвалар, Бийск) и «Боярышник. Таблетки для рассасывания» (NaturProdukt, Нидерланды),

Хроматограмма настойки боярышника, полученная методом ПФА-ГХ, представлена на рисунке 33.

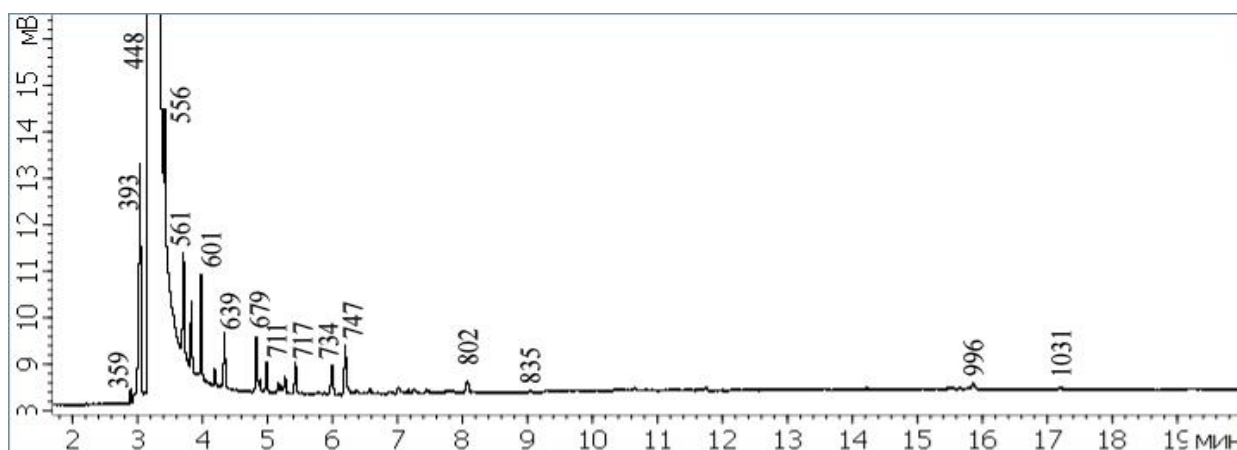


Рисунок 33 – Хроматограмма летучих компонентов спиртовой настойки боярышника, полученная методом ПФА-ГХ-ПИД на колонке с малополярной неподвижной фазой: капиллярная колонка из плавленного кварца 30м×0.32мм, 5%-дифенил-95%-диметилполисилоксан, $d_f = 0.25$ мкм, 40°C, 4°/мин, N₂, ПИД, $V_{\text{пробы}} = 1$ см³, деление потока 1:50, $F = 1.0$ см³/мин

Хроматограмма содержит большой асимметричный пик этанола, который плохо разделен с соседними пиками летучих компонентов. Тем не менее, программа обработки ГХ данных «Хроматэк Аналитик 3.0» зафиксировала 26 компонентов (включая этанол) с временами удерживания $t_R = 2.95 - 17.26$ мин в интервале индексов удерживания $I_i^T = 359 - 1031$. В таблице 15 представлены газохроматографические характеристики летучих компонентов спиртовой настойки боярышника «Боярышника настойка».

Таблица 15 – Результаты парофазного анализа фитопрепарата «Боярышника настойка»

I_i^T	$A_{rli}, \%$	I_i^T	$A_{rli}, \%$	I_i^T	$A_{rli}, \%$
359	0.39	623	1.62	734	4.03
382	4.05	640	5.25	740	7.12
392	23.31	679	0.20	747	0.47
424	0.20	695	7.26	773	0.77
518	7.31	703	3.34	802	1.90
538	0.28	708	0.83	835	0.20
556	10.88	711	1.49	1010	1.34
579	5.73	717	3.46	1031	0.02
601	8.76	-	-	-	-

Относительные площади пиков A_{rli} компонентов паровой фазы настойки варьируются от 0.02 до 23.31%. Семнадцать компонентов фитопрепарата совпадают с летучими компонентами плодов боярышника. Семь компонентов паровой фазы спиртовой настойки совпадают с основными компонентами паровой фазы боярышника: $I_i^T = 392$ (этаналь), $I_i^T = 556$ (2-метилпропаналь), $I_i^T = 679$ (3-метилбутаналь), $I_i^T = 717$ (этилпропионат), $I_i^T = 802$ (гексаналь), $I_i^T = 835$ (изовалериановая кислота). В таблице они выделены жирным шрифтом. На хроматограмме спиртовой настойки боярышника не удалось зарегистрировать два основных компонента ЛРС боярышника, этим компонентам соответствует индексы удерживания $I_i^T = 451$ и $I_i^T = 502$. Вероятно, это связано с перекрыванием данного компонента большим пиком растворителя (этилового спирта). Компоненты с индексами удерживания 382, 518, 538, 579, 703, 734, 740 и 1010 не совпадают с летучими компонентами ЛРС боярышника. Таким образом, совокупность присущих плодам боярышника основных летучих компонентов и отсутствие на хроматограмме паровой фазы настойки метанола может свидетельствовать о подлинности и качестве данного фитопрепарата.

На рисунке 34 представлена хроматограмма РПФ летучих компонентов твердого содержимого капсул «Боярышник Форте».

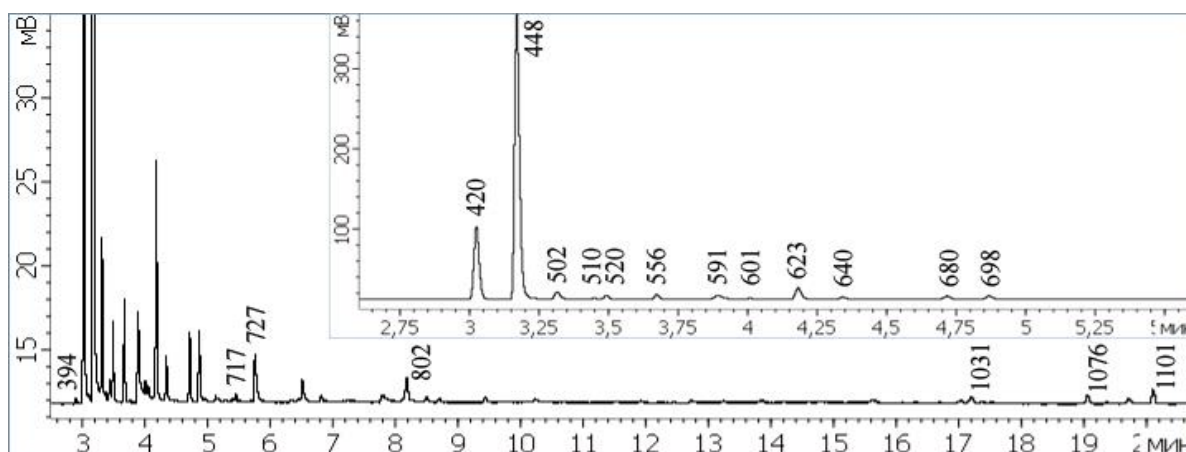


Рисунок 34 – Хроматограмма летучих компонентов капсул «Боярышник Форте», полученная методом ПФА-ГХ-ПВД: капиллярная колонка из плавленного кварца 30м×0,32мм, 5%-дифенил-95%-диметилполисилоксан, $d_f = 0.25$ мкм, 40°C, 4 °/мин, N₂, ПВД, $V_{\text{пробы}} = 1$ см³, деление потока 1:50, F = 1.0 см³/мин

На хроматограмме содержимого капсул «Боярышник Форте» зарегистрировано 38 пиков в интервале индексов удерживания $I_i^T = 359 - 1101$ и значениями относительных площадей пиков A_{rli} от 0.01 до 65.91%. Стоит отметить, что в паровой фазе содержимого капсул «Боярышник Форте» обнаружены компоненты в более широком диапазоне индексов удерживания (до $I_i^T = 1101$ ед. индекса) по сравнению с паровой фазой ЛРС ($I_i^T = 359 - 1080$ ед. индекса), что связано с дополнительным этапом экстракции компонентов ЛРС при изготовлении лекарственного препарата. Газохроматографические характеристики летучих компонентов паровой фазы капсул представлены в таблице 16.

Таблица 16 – Результаты парофазного анализа фитопрепарата «Боярышник Форте»

I_i^T	$A_{rli}, \%$	I_i^T	$A_{rli}, \%$	I_i^T	$A_{rli}, \%$
359	0.01	623	3.05	773	0.04
392	18.12	640	0.63	801	0.06
421	0.14	679	1.04	802	0.58
451	65.91	695	1.14	811	0.13
502	1.87	708	0.06	816	0.08
510	0.04	711	0.04	835	0.12
522	0.16	716	0.04	893	0.05
529	0.84	717	0.10	935	0.05
556	1.24	727	0.98	1032	0.19
569	0.03	744	0.04	1076	0.30
591	1.44	747	0.02	1091	0.19
601	0.14	751	0.47	1101	0.43
610	0.10	760	0.12		

Из 38 зарегистрированных летучих компонентов фитопрепарата 26 совпадают с компонентами паровой фазы ЛРС боярышника. Следует отметить, что все десять основных компонентов ЛРС плодов боярышника присутствуют в паровой фазе фитопрепарата «Боярышник Форте». В таблице они выделены жирным шрифтом. Обращает на себя внимание повышение содержания компонента с индексом удерживания $I_i^T=451$ ед. индекса, идентифицированного нами как 3-метилбутен-1. В паровой фазе ЛРС боярышника площадь пика этого компонента A_{rli} составила 8.89%, тогда как в паровой фазе фитопрепарата «Боярышник Форте» его площадь выросла до $A_{rli} = 65.91\%$. Есть основания полагать, что пик данного компонента перекрыт высоким пиком растворителя –

этанол $I_i^T = 448$, который часто применяется при производстве фитопрепаратов. Компоненты с индексами удерживания 510, 522, 716, 727, 760, 801, 811, 816, 893, 1076, 1091 и 1101 отсутствуют в паровой фазе ЛРС боярышника, но зарегистрированы на хроматограмме препарата «Боярышник Форте».

В таблице 17 представлены газохроматографические характеристики летучих компонентов капсул «Боярышник Премиум».

Таблица 17 – Результаты парофазного анализа фитопрепарата «Боярышник Премиум»

I_i^T	$A_{rli}, \%$	I_i^T	$A_{rli}, \%$	I_i^T	$A_{rli}, \%$
359	0.03	656	0.01	799	0.02
392	42.25	679	3.07	802	0.39
423	0.09	695	4.28	811	0.04
451	0.82	707	0.12	816	0.02
502	30.59	708	0.38	835	0.06
521	1.12	711	0.10	854	0.11
529	0.33	715	0.45	892	0.06
556	5.75	717	0.15	895	0.02
569	0.01	719	3.34	898	0.06
591	0.96	744	0.23	935	0.13
597	0.16	747	0.06	964	0.11
604	1.04	751	0.08	999	0.26
610	0.12	759	0.06	1032	0.64
619	0.05	771	0.14	1035	0.14
623	0.03	773	0.04	1080	0.04
640	1.90	777	0.08	1091	0.07

В паровой фазе капсул «Боярышник Премиум» обнаружено 48 летучих компонентов в интервале индексов удерживания от $I_i^T = 359$ до 1091. Относительные площади пиков A_{rli} варьируются от 0.01 до 42.25%. Двадцать семь летучих компонентов фитопрепарата совпадают с компонентами паровой фазы ЛРС «боярышник кроваво-красный», причем все десять основных компонентов паровой фазы ЛРС боярышника $A_{rli} > 1\%$ присутствуют в паровой фазе фитопрепарата. В таблице они выделены жирным шрифтом. Компоненты с индексами удерживания 521, 597, 604, 619, 656, 707, 715, 719, 759, 771, 777, 811, 816, 854, 892, 895, 898, 964, 999, 1030 и 1091 отсутствуют в паровой фазе газового экстракта ЛРС боярышника.

В таблице 18 представлены газохроматографические характеристики летучих компонентов таблетированного сухого экстракта боярышника «Кардиоактив Боярышник».

Таблица 18 – Результаты парофазного анализа фитопрепарата «Кардиоактив Боярышник»

I_i^T	$A_{rli}, \%$	I_i^T	$A_{rli}, \%$	I_i^T	$A_{rli}, \%$
338	0.37	624	0.51	802	0.72
392	11.09	641	1.10	835	0.15
423	0.05	679	1.34	903	0.54
451	53.37	695	2.57	935	1.32
502	3.04	709	0.30	979	2.18
518	0.19	711	0.12	1032	10.28
529	0.04	716	0.37	1061	0.60
556	3.83	717	0.18	1075	0.25
591	1.34	719	0.17	1080	1.60
606	0.28	752	0.17	1091	0.25
610	0.31	760	0.47	1100	0.81
618	0.07				

В паровой фазе таблетированного сухого экстракта «Кардиоактив боярышник» обнаружено 34 летучих компонента в интервале индексов удерживания I_i^T от 359 до 1100. Относительные площади пиков A_{rli} варьируются от 0.04 до 53.37%. Двадцать два летучих компонента фитопрепарата совпадают с компонентами ЛРС боярышника, причем все десять основных компонентов паровой фазы ЛРС боярышника $A_{rli} > 1\%$ присутствуют в паровой фазе фитопрепарата. В таблице они выделены жирным шрифтом. Обращает на себя внимание рост содержания компонента с индексом удерживания $I_i^T=451$ ед. инд. В паровой фазе ЛРС боярышника площадь пика этого компонента A_{rli} составила 8.89%, тогда как в паровой фазе фитопрепарата «Боярышник Форте» его площадь выросла до $A_{rli} = 53.37\%$. По-видимому, данный компонент подвержен перекрыванию пиком растворителя этанола, индекс которого по сведениям базы данных NIST [133] составляет $I_i^T=448$. Кроме того, это один из наименее токсичных растворителей, который часто применяется при производстве лекарственных препаратов. Компоненты с индексами удерживания 338, 518, 606, 618, 716, 760, 903,

979, 1061, 1075, 1091 и 1100 присутствуют в паровой фазе препарата, но отсутствуют в паровой фазе ЛРС боярышника.

В таблице 19 представлены газохроматографические характеристики летучих компонентов таблетированного сухого экстракта боярышника «Боярышник. Таблетки для рассасывания».

Таблица 19 – Результаты парофазного анализа фитопрепарата «Боярышник. Таблетки для рассасывания»

I_i^T	$A_{rli}, \%$	I_i^T	$A_{rli}, \%$	I_i^T	$A_{rli}, \%$
339	0.86	623	0.41	773	0.47
392	37.18	640	0.21	802	1.32
425	0.04	679	1.21	835	0.26
451	26.01	695	2.81	899	0.37
502	4.80	708	0.22	999	1.20
556	3.66	711	0.45	1082	1.82
570	0.44	717	0.21	1119	1.96
591	0.88	752	7.32	1159	1.94
606	0.80	760	2.05	1170	1.10

В паровой фазе таблетированного сухого экстракта «Боярышник. Таблетки для рассасывания» обнаружено 27 летучих компонентов в интервале индексов удерживания I_i^T от 339 до 1170. При ПФА-ГХ анализе данного объекта зарегистрированы летучие компоненты в более широком диапазоне по сравнению с паровой фазой ЛРС боярышника ($I_i^T = 359 - 1080$ ед. индекса), что связано с экстракцией компонентов при изготовлении таблетированной формы фитопрепарата. Относительные площади пиков A_{rli} варьируются от 0.04 до 37.18%. Восемнадцать летучих компонентов сухого экстракта боярышника совпадают с компонентами паровой фазы ЛРС боярышника, причем все десять основных компонентов паровой фазы ЛРС ($A_{rli} > 1\%$) присутствуют в паровой фазе фитопрепарата. В таблице они выделены жирным шрифтом. Обращает на себя внимание рост содержания компонента с индексом удерживания $I_i^T=451$ ед. индекса. В паровой фазе ЛРС боярышника площадь пика этого компонента A_{rli} составила 8.89%, тогда как в паровой фазе фитопрепарата «Боярышник Форте» его площадь выросла до $A_{rli} = 26.01\%$. Есть основания полагать, что данный компонент подвержен перекрытию пиком растворителя этанола, индекс

которого по сведениям базы данных NIST [133] составляет $I_i^T = 448$. Кроме того, этанол является наименее токсичным растворителем, который часто применяется при производстве лекарственных препаратов. Компоненты с индексами удерживания 339, 606, 759, 899, 999, 1082, 1119, 1159 и 1170 не зарегистрированы на хроматограмме летучих компонентов ЛРС боярышника, но присутствуют в газовом экстракте фитопрепарата.

5.4 Заключение к главе 5

Методом парофазного газохроматографического анализа определены летучие компоненты ботанического и двух промышленных образцов плодов боярышника кроваво-красного. В равновесной паровой фазе обнаружен 31 летучий компонент с индексами удерживания I_i^T от 359 до 1080 ед. индекса. Обнаружено десять основных паровой фазы боярышника (в порядке возрастания индексов удерживания: $I_i^T = 392$ (этаналь), $I_i^T = 451$ (3-метилбутен-1), $I_i^T = 502$ (диметилсульфид), $I_i^T = 556$ (2-метилпропаналь), $I_i^T = 591$ (пропанол), $I_i^T = 679$ (3-метилбутаналь), $I_i^T = 695$ (2-метилбутаналь), $I_i^T = 717$ (этилпропионат), $I_i^T = 802$ (гексаналь) и $I_i^T = 835$ (изовалериановая кислота).

Идентификация летучих компонентов позволила выявить в составе паровой фазы органические кислоты, которые часто присутствуют в плодах различных растений. Равновесная паровая фаза фитопрепаратов «Боярышника Настойка», «Боярышник Форте», «Боярышник Премиум», «Кардиоактив боярышник», «Боярышник. Таблетки для рассасывания» содержит большинство летучих компонентов ЛРС боярышника, причем основные компоненты растения присутствуют в равновесной паровой фазе практически всех исследованных лекарственных препаратов.

6 ПАРОФАЗНЫЙ ГАЗОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЛЕТУЧИХ КОМПОНЕНТОВ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТЕНИЯ «ЗВЕРОБОЙ ПРОДЫРЯВЛЕННЫЙ» И ФИТОПРЕПАРАТОВ НА ЕГО ОСНОВЕ

В литературе широко представлена информация по анализу эфирных масел и экстрактов зверобоя различных видов методом ГХ-МС [75-84, 138 –141]. В качестве ЛРС зверобоя используется вся надземная часть растения (трава, собранная в фазу цветения). Одним из аспектов диссертационной работы являлось определение возможности установления межвидового различия ЛРС методом ПФА-ГХ. Поэтому наряду со зверобоем продырявленным исследован другой фармакопейный вид зверобоя – зверобой четырехгранный.

6.1 Установление закономерностей перераспределения летучих компонентов из травы зверобоя продырявленного в газовую фазу

Зверобой продырявленный (*Hypericum perforatum* L.) является растением, основной группой БАС которого являются нелетучие соединения (флавоноиды). Растение также содержит летучие метаболиты, которые могут быть обнаружены методом газохроматографического анализа РПФ.

Для оценки возможных проблем, возникающих в ходе газовой экстракции компонентов из конденсированной фазы ЛРС «зверобой продырявленный» в присутствии воздушной фазы, целесообразно было выяснить, как температура и время газовой экстракции влияют на качественный и количественный состав паровой фазы. Эксперимент проводили в интервале температур 30 – 140°C, изменяя время экстракции в диапазоне 5 – 50 минут.

Нами изучено влияние времени экстракции на число компонентов в паровой фазе ЛРС (травы зверобоя продырявленного производства «Красногорсклексредства») при всех исследованных температурах. Анализ паровой фазы проводили в варианте ПФА-ГХ-ПЖД. На рисунке 35 представлена зависимость суммарного числа пиков компонентов РПФ на хроматограмме от времени экстракции (температура 80°C).

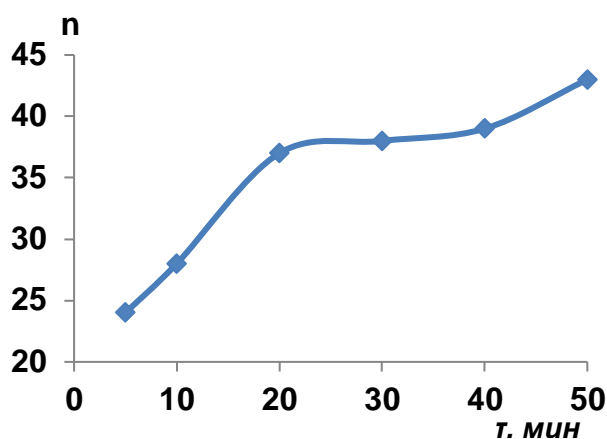


Рисунок 35 – Влияние времени газовой экстракции ЛРС зверобоя продырявленного на количество компонентов, выделившихся в паровую фазу; температура экстракции 80⁰С

Установлено, что число компонентов и суммарное содержание веществ в паровой фазе, пропорциональное величине $\sum A_i$, наиболее сильно возрастают в течение первых 20 минут, а затем в интервале времени 20-40 минут практически не изменяются. Это свидетельствует о том, что равновесный состав паровой фазы (80⁰С) устанавливается в течение 30-40 мин. Близкие закономерности наблюдались при температуре газовой экстракции 100⁰С.

Число пиков (компонентов) в интервале температур от 30⁰ до 140⁰С увеличивается от 13 до 56 (рисунок 36, время экстракции 40 минут).

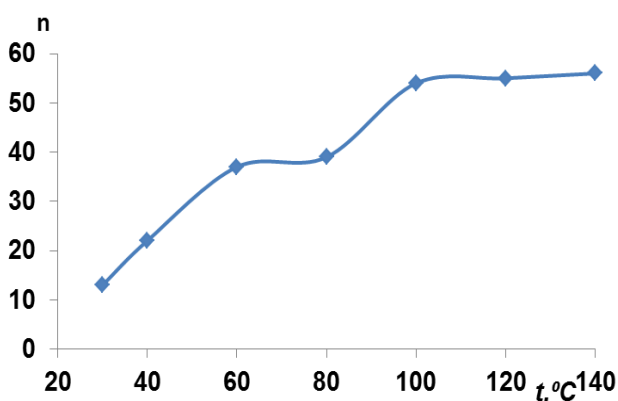


Рисунок 36 – Влияние температуры газовой экстракции ЛРС зверобоя продырявленного на количество летучих компонентов, выделившихся в паровую фазу; время экстракции 40 мин

Наибольшее возрастание числа пиков наблюдается до температуры 80 °С и достигает значения $n = 39$. Относительное содержание появляющихся при $t > 80^{\circ}\text{C}$ в

РПФ менее летучих компонентов мало ($A_{rli} \ll 1\%$) и они практически не влияют на общий вид хроматографического профиля. При увеличении температуры газовой экстракции не наблюдается уменьшения абсолютного содержания компонентов, что могло быть следствием протекания химических процессов в газовой фазе.

Изучена зависимость от температуры отношения абсолютной площади пика менее летучего i -го компонента (A_i) к такой же величине для более летучего компонента (A_{st}), выбранного в качестве стандарта. Для зверобоя в качестве стандарта был взят 2-метилпропаналь ($I_{st}^T = 556$). Этот летучий компонент присутствует в паровой фазе зверобоя при всех исследованных температурах от 30 °С до 140 °С. Среднелетучий компонент паровой фазы травы зверобоя 2-метил-3-бутен-2-ол ($I_i^T = 617$) взят в качестве примера i -го компонента. Зависимость (A_i / A_{st}) от температуры газовой экстракции имеет максимум при температуре 60 °С (рисунок 37, кривая 1).

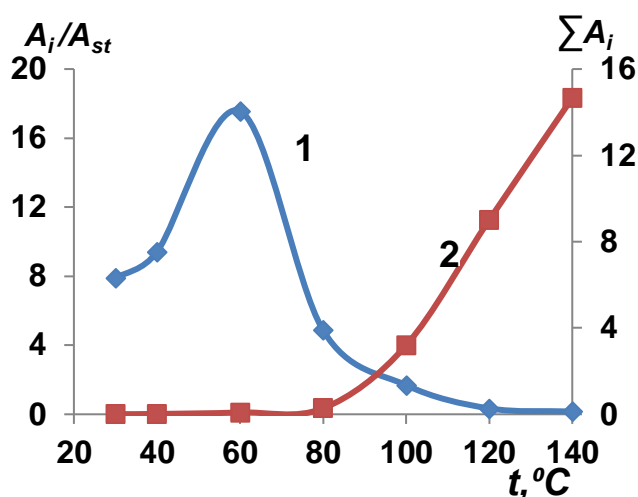


Рисунок 37 – Зависимости отношения абсолютных площадей пиков 2-метил-3-бутен-2-ола и 2-метилпропаналя (A_i / A_{st}) (кривая 1) и суммы абсолютных площадей пиков всех компонентов ($\sum A_i$) от температуры газовой экстракции (кривая 2); время экстракции 40 минут

Вид зависимости зависимости A_i/A_{st} дает основания полагать, что относительная площадь пика, рассчитанная методом внутреннего стандарта, практически не меняется в интервале температур 80-140⁰С, несмотря на резкое увеличение $\sum A_i$ (рисунок 37, кривая 2). Полученные данные указывают на то, что в диапазоне температур 80-140⁰С относительное содержание компонентов практически не изменяется, что делает возможным получение информативного хроматографического профиля, характеризующего качественный и количественный состав РПФ зверобоя. Следует также отметить, что компоненты РПФ зверобоя продырявленного устойчивы в диапазоне температур 30-140⁰С и не подвержены химическим превращениям в присутствии воздуха, находящегося в сосуде для экстракции. Об этом свидетельствует тот экспериментальный факт, что пики всех выделившихся в газовую фазу компонентов при увеличении температуры газовой экстракции от 30 до 140⁰С сохраняются на хроматограмме, а площади пиков увеличиваются.

Представленные результаты позволили сделать вывод, что газовую экстракцию летучих компонентов целесообразно проводить в интервале температур 80 –140⁰С в течение 30 – 40 минут. Для изучения состава паровой фазы ЛРС «зверобой продырявленный», «зверобой четырехгранный» и фитопрепаратов на основе зверобоя использован следующий режим газовой экстракции: температура 80⁰С, время 40 минут.

6.2 Парофазный газохроматографический анализ летучих компонентов травы «зверобой продырявленный»

Хроматограмма ботанического образца травы зверобоя продырявленного, полученная методом ПФА-ГХ-ДИП в оптимизированных условиях газовой экстракции, имеет вид, представленный на рисунке 38.

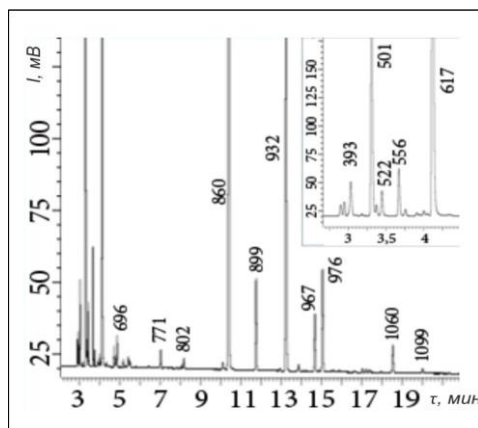


Рисунок 38 – Хроматограмма летучих компонентов травы ботанического образца зверобоя продырявленного (*Hypericum perforatum L.*), полученная методом ПФА-ГХ-ПВД: капиллярная колонка из плавленного кварца $30 \text{ м} \times 0.32 \text{ мм}$, 5%-дифенил-95%-диметилполисилоксан $d_f=0.25 \text{ мкм}$, 40°C , $4^\circ/\text{мин}$, N_2 , $V_{\text{пробы}} = 1 \text{ см}^3$, деление потока 1:50, $F = 1.0 \text{ см}^3/\text{мин}$

На хроматограмме зарегистрировано 39 летучих компонентов с временами удерживания t_R от 2.95 мин до 19.98 мин и рассчитанными величинами индексов удерживания от $I_i^T=360$ до $I_i^T=1099$ ед. индекса. Видно, что при выбранных условиях ГХ анализа пики наиболее летучих компонентов паровой фазы достаточно хорошо разделены. Аналогичный вид имела хроматограмма того же ботанического образца зверобоя, полученная методом ПФА-ГХ-МС. Относительное содержание компонентов в паровой фазе варьируется от $A_{r,i} \approx 0.01\%$ до $A_{r,i} = 46.50\%$ (2-метилоктан, доминирующий компонент, $I_i^T = 860$). Следует отметить, что этот же компонент с индексом удерживания $I_i^T = 860$ указан как доминирующий в работе [79], в которой метод ПФА (headspace analysis) был впервые применен для анализа ЛРС, в том числе зверобоя продырявленного.

Хроматограмма летучих компонентов промышленного образца зверобоя продырявленного производства Красногорсклексредства представлена на рисунке 39.

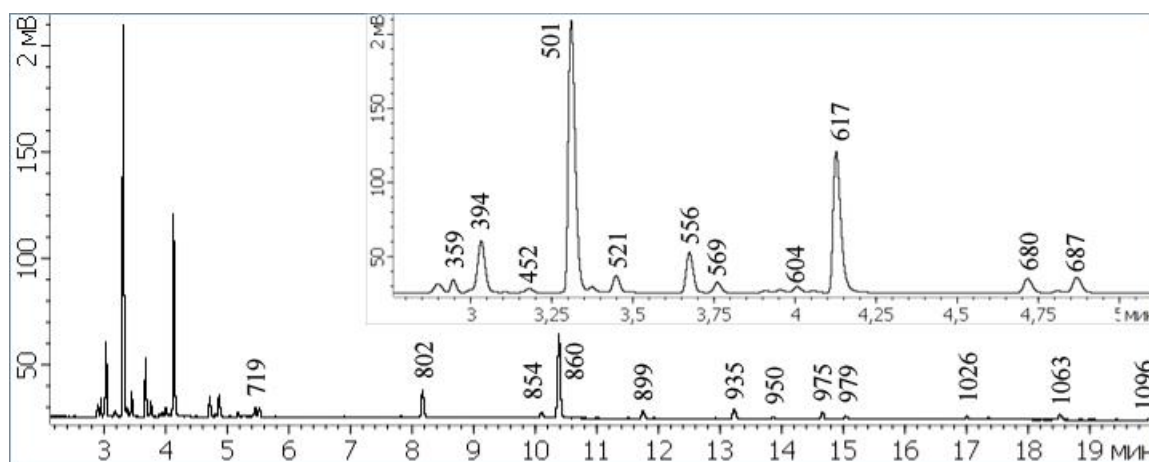


Рисунок 39 – Хроматограмма летучих компонентов промышленного образца травы зверобоя продырявленного производства Красногорсклексредства, полученная методом ПФА-ГХ-ПИД: капиллярная колонка из плавленного кварца 30 м × 0.32 мм, 5%-дифенил-95%-диметилполисилоксан, $d_f=0.25$ мкм, 40°C, 4°/мин, N_2 , $V_{\text{пробы}} = 1 \text{ см}^3$, деление потока 1:50, $F = 1.0 \text{ см}^3/\text{мин}$

На хроматограмме зарегистрировано 39 летучих компонентов в аналогичном интервале индексов удерживания. Следует отметить, что компонентный состав паровой фазы промышленного и ботанического образцов идентичен, в то время как количественное содержание компонентов меняется (рисунки 38 и 39). Особенно сильно это изменение наблюдается в области среднелетучих компонентов с индексами удерживания 860 – 1099. Начальные участки хроматограмм летучих компонентов двух образцов зверобоя близки друг другу.

Компоненты равновесной паровой фазы осушенного ботанического образца зверобоя были идентифицированы на основании масс-спектральных характеристик и путем сопоставления экспериментально определенных значений индексов удерживания I_i^T с литературными данными [75-84, 138, 139]. Эти данные представлены в таблице 20.

Таблица 20 – Индексы удерживания I_i^T летучих компонентов и их относительное содержание $A_{rl,i}$, % в равновесной паровой фазе лекарственного растения «зверобой продырявленный»

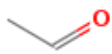
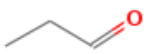

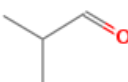
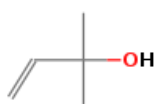
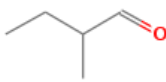
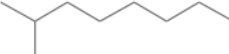
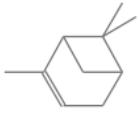

I_i^T	Соединение*	Промышленные образцы, $A_{rl,i}$, %			Ботанический сад, $A_{rl,i}$, %
		Красногорск	Здоровье	Иван-чай	
360	-	1.31	1.27	0.95	0.25
393	Этаналь^{а,г}	6.27	7.14	7.14	1.09
452	Диэтиловый эфир ^{а,г}	0.35	1.16	0.42	0.03
501	Пропаналь^{а,г}	30.41	32.05	34.14	8.91
511	Изопропанол ^{а,г}	0.44	0.45	0.36	0.18
522	Диметилсульфид^{а,г}	2.31	3.37	2.87	0.75
556	2-метилпропаналь^{а,г}	5.56	5.53	3.73	1.38
570	2-метилпропеналь-2 ^а	1.11	2.46	2.21	0.19
592	Пропанол ^{б,г}	0.20	0.28	0.23	0.07
599	Бутаналь ^{а,г}	0.24	0.15	0.09	0.01
604	Бутанон-2 ^г	0.59	0.39	0.45	0.10
610	Этилацетат ^г	0.15	0.14	0.13	0.03
617	2-метил-3-бутен-2-ол^{а,б,г}	19.08	20.75	15.53	16.51
680	3-метилбутаналь ^{а,г}	2.32	2.20	1.35	0.29
696	2-метилбутаналь^{а,г}	2.61	2.93	1.52	0.42
708	2-этилфуран ^{а,г}	0.43	0.35	0.41	0.10
711	2,4,4-триметилпентен-1 ^{а,г}	0.14	0.18	0.13	0.02
719	Метилциклогексан ^{б,г}	0.99	0.77	0.37	0.10
766	Цис-2-пентен-1-ол ^г	0.06	0.06	0.09	0.26
791	-	0.13	0.20	0.25	0.03
799	<i>n</i> -Октан ^{а,б,в}	0.79	0.07	0.06	0.05
802	Гексаналь ^{б,г}	3.76	2.75	1.98	0.21
852	Транс-2-гексеналь ^{а,б,в,г}	0.94	1.20	0.52	0.21
860	2-метилоктан^{а,б,г}	11.61	6.96	18.85	46.50
899	<i>n</i> -Нонан ^{а,б,г}	1.02	0.62	1.24	2.39
924	α -Туйен ^{а,б,в,г}	0.15	0.04	0.04	0.08
932	α-Пинен^{а,б,в,г}	1.55	0.41	0.94	13.06
947	Камфен ^{а,б,в,г}	0.24	0.06	0.11	0.21
953	-	0.06	0.05	0.06	0.02
956	-	0.06	0.10	0.13	0.02
967	3-метилнонан^{а,б,г}	0.91	0.75	1.29	1.72
972	Сабинен ^{б,в,г}	0.09	0.05	0.09	0.06
976	β -Пинен ^{а,б,в,г}	0.48	0.12	0.39	3.04
986	β -Мирцен ^{б,в,г}	0.12	0.08	0.17	0.02
1024	<i>para</i> -Цимен ^{б,в,г}	0.48	0.27	0.16	0.12

1028	Лимонен ^{б,в,г}	0.20	0.07	0.16	0.11
1032	1,8-Цинеол ^{а,б,в,г}	0.35	0.10	0.10	0.13
1061	γ -Терпинен ^{а,б,г}	0.67	0.04	0.55	0.99
1099	<i>n</i> -Ундекан ^{б,в,г}	0.18	3.40	0.48	0.17

Примечание:* – идентификацию проводили с использованием: (а) хромато-масс-спектрометрического анализа, (б) литературных данных по зверобоя [75-84, 138, 139], (в) атласа масс-спектров эфирных масел [130]; (г) базы данных NIST [133]; «-» – компоненты не идентифицированы.

Девять основных компонентов, среднее относительное содержание которых во всех образцах ЛРС зверобоя $A_{r,i} \geq 1\%$, отнесены нами к основным компонентам РПФ этого растения. В таблице 20 они выделены жирным шрифтом. К ним относятся (в порядке возрастания индексов удерживания): этаналь (393), пропаналь (501), диметилсульфид (522), 2-метилпропаналь (556), 2-метил-3-бутен-2-ол (617), 2-метилбутаналь (696), 2-метилоктан (860), α -пинен (932), 3-метилнонан (967). Анализ полученных данных показал, что РПФ зверобоя продырявленного содержит большое количество 2-метил-3-бутен-2-ола ($I_i^T = 617$, $A_{r,i} = 20.75 - 15.53\%$). Данный компонент идентифицирован нами методом ПФА-ГХ-МС с вероятностью 78%, а также по индексам удерживания с использованием базы данных NIST. Из имеющегося опыта ПФА анализа лекарственных растений и опираясь на ряд зарубежных исследований, в том числе методом ПФА-ГХ, нами выдвинуто предположение, что компонент 2-метил-3-бутен-2-ол может являться маркером РПФ «зверобоя продырявленного». Этот непредельный спирт, согласно литературным данным, обладает седативным эффектом [142], что хорошо согласуется с фармакологическими свойствами «зверобоя продырявленного». В таблице 21 представлены химические формулы основных летучих компонентов и маркера паровой фазы травы зверобоя.

Таблица 21 – Основные летучие компоненты паровой фазы зверобоя продырявленного

Этаналь 393 	Пропаналь 501 	Диметилсульфид 522 
2-Метилпропаналь 556 	2-Метил-3-бутен-2-ол 617 (маркер) 	2-Метилбутаналь 696 
2-Метилоктан 860 	α -Пинен 932 	3-Метилнонан 967 

Если для ботанического образца доминирующим компонентом является 2-метилоктан ($I_i^T = 860$, $A_{r,i} = 46.50\%$), то для промышленных образцов – пропаналь ($I_i^T = 501$, $A_{r,i} = 34.14 - 30.41\%$). Сравнение полученных нами headspace-хроматограмм летучих компонентов паровой фазы «зверобоя продырявленного» с результатами работ [75-78, 138, 139], в которых проводился анализ эфирного масла (ГХ-МС), показало, что в этих работах отсутствует информация о летучих компонентах с индексами удерживания $I_i^T < 800$. Отсутствие таких легкокипящих компонентов связано как с их потерями в процессе перегонки, так и с разбавлением жидких проб эфирных масел летучими растворителями при прямом вводе в колонку. Перекрытие пиков легкокипящих компонентов большими пиками растворителей на хроматограмме затрудняет обнаружение и идентификацию наиболее легкокипящих компонентов ЛРС. Следует отметить, что центральный участок полученной нами headspace-хроматограммы совпадает с начальным участком хроматограмм эфирного масла зверобоя, полученных

традиционно прямым вводом жидких проб [75-84, 138, 139]. Анализ литературных источников показал совпадение найденных нами 12 компонентов РПФ и эфирных масел: *n*-октан ($I_i^T=799$), 2-метилоктан ($I_i^T=860$), *n*-октан ($I_i^T=860$), α -пинен ($I_i^T=932$), 3-метилнонан ($I_i^T=967$), сабинен ($I_i^T=972$), β -пинен ($I_i^T=976$), β -мирцен ($I_i^T=986$), *para*-цимен ($I_i^T=1024$), лимонен ($I_i^T=1024$), 1,8-цинеол ($I_i^T=1032$), *n*-ундекан ($I_i^T=1099$).

Правильность идентификации компонентов паровой фазы ЛРС зверобоя контролировали, используя корреляционную зависимость индекса удерживания при линейном программировании температуры колонки I_i^T от температуры кипения компонентов паровой фазы T_b . На рисунке 40 представлена зависимость индексов удерживания компонентов паровой фазы травы зверобоя продырявленного от температуры их кипения.

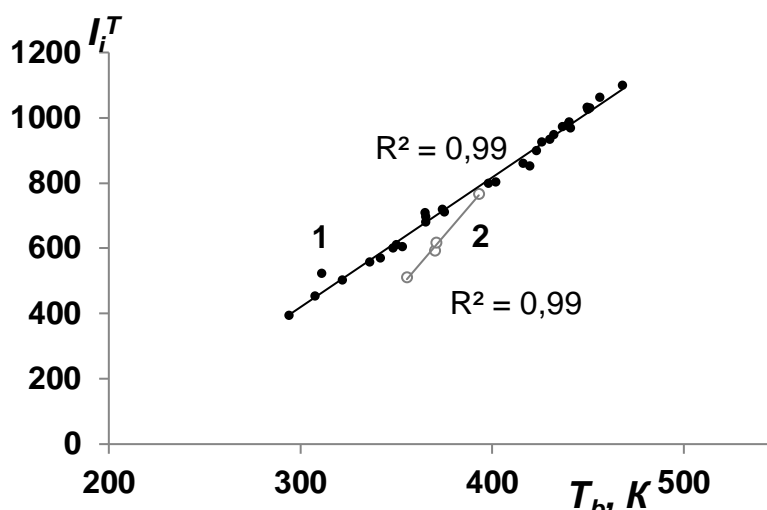


Рисунок 40 – Зависимость индекса удерживания I_i^T компонентов РПФ зверобоя продырявленного от температуры колонки (T_b , K): 1 – все компоненты РПФ, кроме спиртов, 2 – спирты

На рисунке 40 представлены линейные зависимости I_i^T от T_b . Причем зависимость для спиртов (линия 2) расположена ниже зависимости для всех остальных соединений (линия 1). Расположение линии 2 для спиртов связано с их меньшим взаимодействием с малополярной 5%-дифенил-95%-диметилполисилоксановой неподвижной фазой, особенно в случае короткоцепочечных спиртов. Линейный характер полученных зависимостей дает

основания полагать, что идентификация летучих компонентов паровой фазы травы зверобоя продырявленного является правильной.

Анализируя литературу по анализу эфирных масел и экстрактов ЛРС зверобоя продырявленного, мы обнаружили, что индексы удерживания летучих компонентов при линейном программировании температуры варьируются в диапазоне $I_i^T = 850 - 2300$ ед. индекса [75-84, 138, 139]. При анализе паровой фазы травы зверобоя нами получен другой интервал индексов удерживания $I_i^T = 360 - 1099$ ед. индекса. Учитывая данные литературы и полученные нами методом ПФА-ГХ, компоненты с индексами удерживания $I_i^T = 360 - 852$ ед. индекса можно отнести к *легколетучим* с температурами кипения $T_b = 249 - 420$ К. Компоненты, представленные в составе эфирных масел и экстрактов, а также в паровой фазе ЛРС зверобоя можно считать *среднелетучими* ($I_i^T = 860 - 1099$ ед. индекса), им соответствуют температуры кипения $T_b = 416 - 468$ К. Компоненты с индексами удерживания $I_i^T > 1099$ ед. индекса можно отнести к *малолетучим*, они могут быть обнаружены только на хроматограммах эфирных масел или экстрактов зверобоя.

Методом ПФА-ГХ-ПВД исследован также дикорастущий образец другого фармакопейного вида зверобоя – «зверобой четырехгранный» (*Hypericum quadrangulum* L.). Установлено, что в составе паровой фазы данного вида зверобоя присутствует 39 летучих компонентов в аналогичном интервале индексов удерживания от $I_i^T = 360$ до $I_i^T = 1099$ ед. индекса. Газохроматографические характеристики летучих компонентов зверобоя четырехгранного представлены в таблице 22.

Таблица 22 – Индексы удерживания I_i^T летучих компонентов и их относительное содержание $A_{r,i}$, % в равновесной паровой фазе лекарственного растения «зверобой четырехгранный»

I_i^T	Соединение*	$A_{r,i}$, %	I_i^T	Соединение*	$A_{r,i}$, %
360	-	1.23	799	<i>n</i> -октан ^{а,б,в}	0.16
393	Этаналь^{а,г}	1.16	802	Гексаналь ^{б,г}	0.42
452	Диэтиловый эфир ^{а,г}	0.01	852	Транс-2-гексеналь ^{а,б,в,г}	0.44
501	Пропаналь^{а,г}	3.09	860	2-метилоктан^{а,б,г}	11.60

511	Изопропанол ^{а,г}	0.09	895	<i>n</i>-нонан^{а,б,г}	16.34
522	Диметилсульфид^{а,г}	2.72	924	α -туйен ^{а,б,в,г}	0.07
556	2-метилпропаналь^{а,г}	2.21	932	α-пинен^{а,б,в,г}	50.64
570	2-метилпропеналь-2 ^а	0.04	947	Камфен ^{а,б,в,г}	0.10
592	Пропанол ^{б,г}	0.06	953	-	0.02
599	Бутаналь ^{а,г}	0.12	956	-	0.01
604	Бутанон-2 ^г	0.08	967	3-метилнонан^{а,б,г}	3.27
610	Этилацетат ^г	0.10	972	Сабинен ^{б,в,г}	0.11
617	2-метил-3-бутен-2-ол	0.46	976	β-пинен^{а,б,в,г}	1.10
680	3-метилбутаналь ^{а,г}	0.68	986	β -мирцен ^{б,в,г}	0.02
696	2-метилбутаналь^{а,г}	1.24	1024	ρ -цимен ^{б,в,г}	0.07
708	2-этилфуран ^{а,г}	0.20	1028	Лимонен ^{б,в,г}	0.05
711	2,4,4-триметилпентен-1	0.05	1032	1,8-цинеол ^{а,б,в,г}	0.15
719	Метилциклогексан ^{б,г}	0.73	1061	γ -терпинен ^{а,б,г}	0.24
766	Цис-2-пентен-1-ол ^г	0.06	1096	<i>n</i> -ундекан ^{б,в,г}	0.62
791	-	0.03			

Примечание:* – идентификацию проводили с использованием: (а) хромато-масс-спектрометрического анализа, (б) литературных данных по зверобоя [75-84, 138, 139], (в) атласа масс-спектров эфирных масел [130]; (г) базы данных NIST [133]; «-» – компоненты не идентифицированы.

Исследование паровой фазы «зверобоя четырехгранного» показало, что качественный состав летучих компонентов паровой фазы данного вида зверобоя совпадает с паровой фазой «зверобоя продырявленного». Жирным шрифтом в таблице выделены 10 основных компонентов РПФ «зверобой четырехгранный», содержание которых в паровой фазе $A_{r,i} > 1\%$. Из них 7 компонентов совпадают с основными компонентами РПФ зверобоя продырявленного. Доминирующим компонентом РПФ данного вида зверобоя является α -пинен ($A_{r,i} = 50.64\%$, $I_i^T = 932$). Следует отметить, что паровая фаза ботанического образца «зверобоя продырявленного» содержит $A_{r,i} = 11.60\%$ α -пинена. Компонент 2-метил-3-бутен-2-ол содержится в РПФ «зверобоя четырехгранного» в гораздо меньшем количестве ($A_{r,i} = 0.46\%$, $I_i^T = 617$), чем в РПФ «зверобоя продырявленного» и не относится к основным компонентам данного вида зверобоя.

Для получения информации о качественном (I_i^T) и количественном ($A_{r,i}$) составе РПФ целесообразно использовать не хроматограммы, а диаграммы (headspace-спектры) «относительная площадь пика – индекс удерживания». На

рисунке 41 (а-г) представлены такие диаграммы для изученных образцов «зверобоя продырявленного».

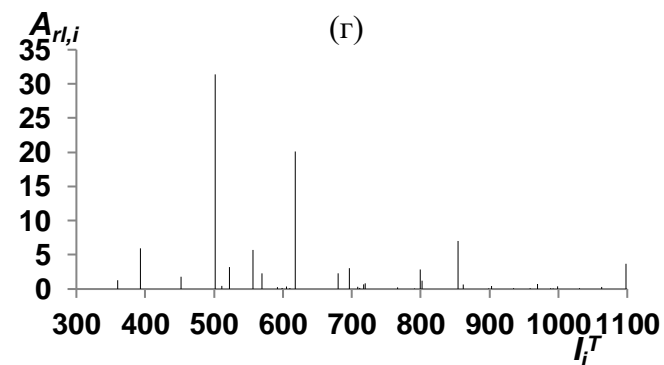
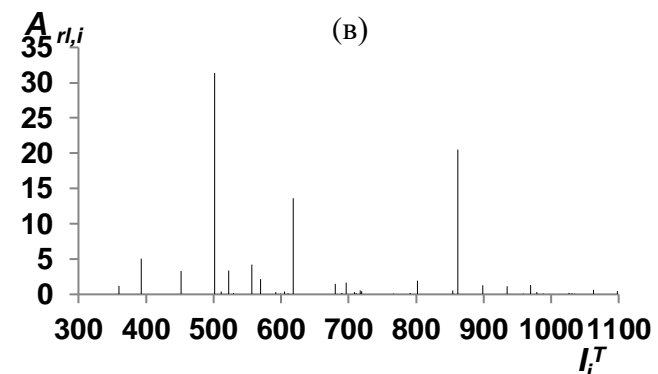
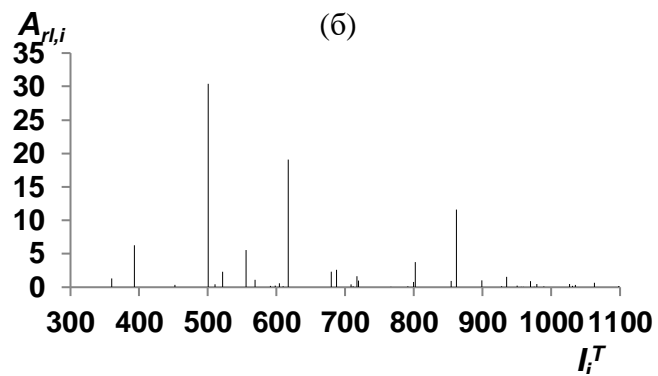
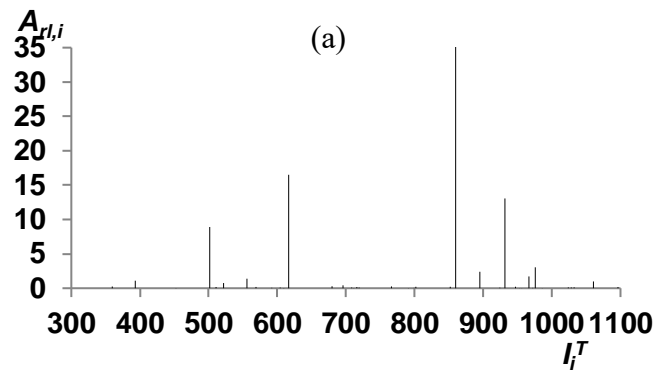


Рисунок 41 – Диаграммы «относительная площадь пика – индекс удерживания» (headspace-спектры) ЛРС «зверобоя продырявленного»: а – ботанический образец, б – Красногорсклексредства, в – Здоровье, г – Иван-чай.

Полученные headspace-спектры наглядно иллюстрируют, что качественный состав летучих компонентов российского ЛРС «зверобой продырявленный» не меняется в зависимости от места произрастания. Количественное содержание летучих компонентов несколько изменяется (таблица 20), однако оно мало влияет на общий вид профилей ЛРС зверобоя (рисунок 41). Сравнивая полученные диаграммы РПФ зверобоя продырявленного с диаграммами других растений, можно сделать вывод о том, что хроматографический headspace-спектр ЛРС зверобоя специфичен и может быть использован для определения его подлинности.

Различие в количественном содержании компонентов в РПФ двух видов зверобоев наглядно продемонстрировано с использованием хемометрической обработки хроматографических характеристик основных летучих компонентов в их газовых экстрактах (рисунок 42).

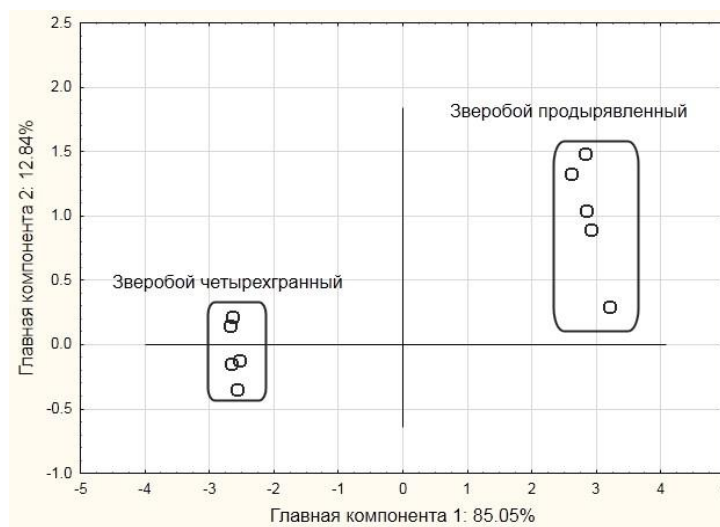


Рисунок 42 – Результаты парового анализа «зверобой продырявленного» и «зверобой четырехгранный» в координатах главных компонент 1 и 2

Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что с помощью хемометрической обработки методом главных компонент можно определить межвидовые различия ЛРС зверобоя.

6.3 Парофазный газохроматографический анализ летучих компонентов фитопрепаратов на основе зверобоя продырявленного

Состав паровой фазы осушенной травы зверобоя сравнивали с паровой фазой фитопрепаратов на основе данного ЛРС – таблетированной формы «Деприм» (Sandoz, Словения) и масляного экстракта (Лекус, Москва). Сопоставление составов паровой фазы ЛРС зверобоя и фитопрепаратов на его основе проводили для определения возможности экспрессного определения подлинности данных объектов методом парофазного газохроматографического анализа.

Хроматограмма таблетированной формы сухого экстракта зверобоя «Деприм» представлена на рисунке 43. Диапазон индексов удерживания $I_i^T = 359 - 1099$ ед. индекса.

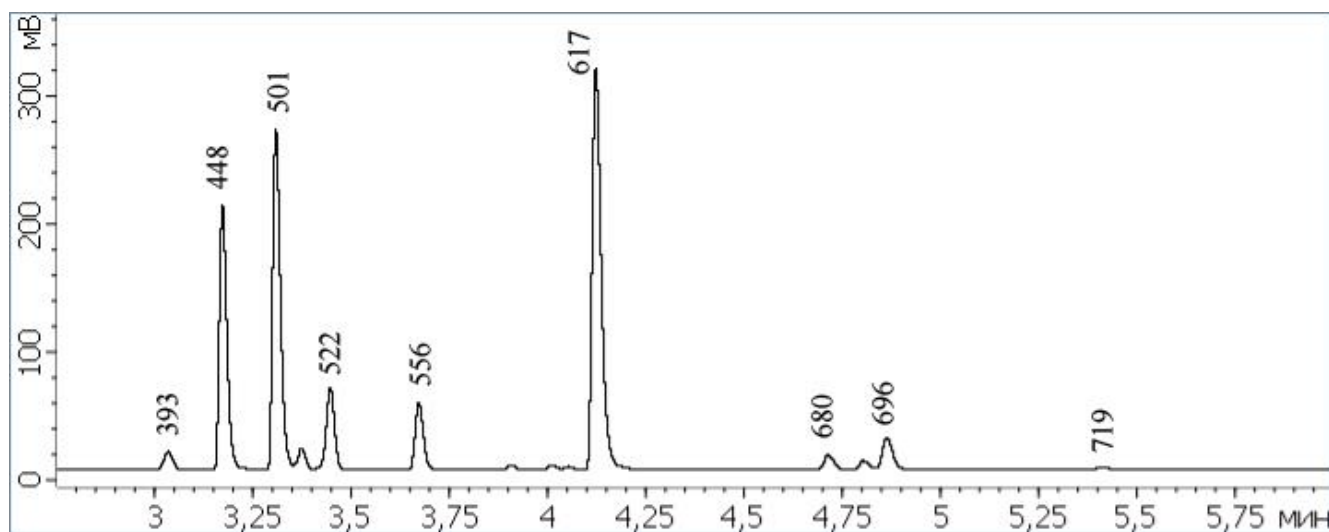


Рисунок 43 – Хроматограмма летучих компонентов лекарственного препарата «Деприм», полученная методом ПФА-ГХ-ПИД: капиллярная колонка из плавленного кварца $30 \text{ м} \times 0.32 \text{ мм}$, 5%-дифенил-95%-диметилполисилоксан $d_f = 0.25 \text{ мкм}$, 40°C , $4^\circ/\text{мин}$, N_2 , ПИД, $V_{\text{пробы}} = 1 \text{ см}^3$, деление потока 1:50, $F=1.0 \text{ см}^3/\text{мин}$

На хроматограмме обнаружено 44 летучих компонента, в том числе пик этанола $A_{r,i} = 18.97\%$. Использование этанола в качестве экстрагента привело к увеличению относительного содержания полярных компонентов РПФ препарата «Деприм», таких как пропаналь ($A_{r,i} = 24.35\%$), диметилсульфид

(A_{rli} = 6.23%), 2-метилпропаналь (A_{rli} = 5.13%), 2-метил-3-бутен-2-ол (A_{rli} = 34.34%) по сравнению с их содержанием в паровой фазе ЛРС. В то же время относительное содержание неполярных летучих компонентов ЛРС, присутствующих в РПФ зверобоя в большом количестве (2-метилоктан, α -пинен), существенно снизилось. В РПФ лекарственного препарата «Деприм» наибольшим содержанием обладают легкокипящие компоненты паровой фазы препарата в интервале индексов удерживания 393 – 719. Газохроматографические характеристики летучих компонентов фитопрепарата «Деприм», полученные методом ПФА-ГХ-ПВД, представлены в таблице 23.

Таблица 23 – Результаты парофазного газохроматографического анализа лекарственного препарата «Деприм»

I_i^T	A_{rli} , %	I_i^T	A_{rli} , %	I_i^T	A_{rli} , %	I_i^T	A_{rli} , %
360	0.08	680	1.37	791	0.03	953	0.04
393	1.59	689	0.63	799	0.02	956	0.11
448	18.97	696	2.94	802	0.13	967	0.03
501	24.35	708	0.08	841	0.11	976	0.02
511	1.20	711	0.05	844	0.07	986	0.07
522	6.24	716	0.24	852	0.04	1010	0.08
556	5.13	719	0.12	860	0.06	1024	0.05
592	0.38	752	0.06	899	0.29	1028	0.05
604	0.27	760	0.07	911	0.05	1061	0.04
610	0.19	766	0.01	932	0.20	1074	0.04
617	34.35	782	0.14	947	0.02	1099	0.01

Примечание: 448 – этанол, 716 – метилциклогексан, 752 – 2-бутилацетат, 760 – пентанол, 782 – циклопентанол, 841 – 2,6-диметилгептан, 844 – 3-метилциклопентан, 911 – пентилацетат, 1010 – α -фелландрен, 1074 – терпинен-4-ол.

Из 44 летучих компонентов препарата 33 совпадают с компонентами ЛРС зверобоя (таблица 20). Отсутствуют в паровой фазе ЛРС зверобоя, но присутствуют в РПФ препарата 11 компонентов с индексами удерживания 448, 689, 716, 752, 760, 782, 841, 844, 911, 1010 и 1074, их названия даны в примечании. Доминирующим компонентом РПФ препарата «Деприм» является предполагаемый маркер зверобоя – непредельный спирт 2-метил-3-бутен-2-ол

($I_i^T = 617$, $A_{H,i} = 34.35\%$). Подлинность данного фитопрепарата подтверждается и тем, что все 9 основных компонентов образцов зверобоя присутствуют в паровой фазе фитопрепарата. В таблице 23 они выделены жирным шрифтом. Полученные экспериментальные данные по исследованию препарата дают возможность для определения его подлинности методом ПФА.

Хроматограмма летучих компонентов масляного экстракта зверобоя представлена на рисунке 44.

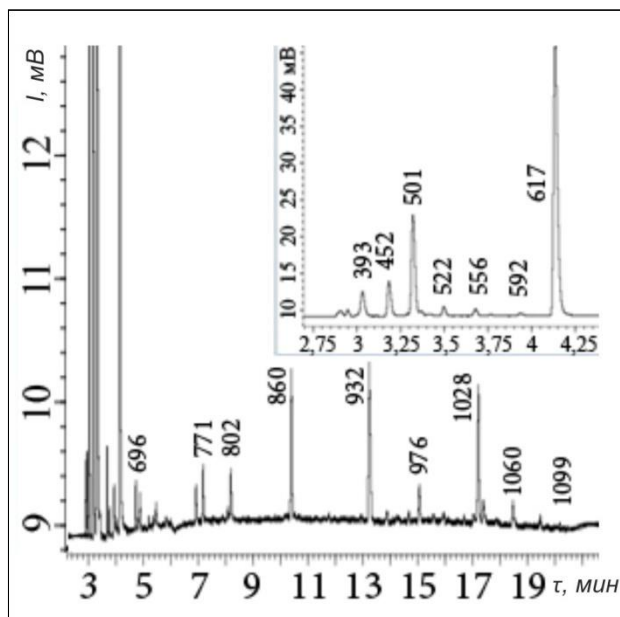


Рисунок 44 – Хроматограмма летучих компонентов масляного экстракта зверобоя, полученная методом ПФА-ГХ-ПИД, капиллярная колонка из плавленого кварца (30 м × 0.32 мм), 5%-дифенил-95%-диметилполисилоксан ($d_f = 0.25$ мкм), 40°C – 2 мин, 4°C/мин, N_2 , $V_{\text{пробы}} = 1$ см³, деление потока 1:50, $F = 1.0$ см³/мин

В паровой фазе масляного экстракта зверобоя присутствуют 27 летучих компонентов в диапазоне индексов удерживания $I_i^T = 359 - 1099$. Диапазоны индексов удерживания масляного экстракта и РПФ зверобоя совпадают. Из 27 компонентов масляного экстракта 25 присутствуют в паровой фазе ЛРС зверобоя. Все девять основных компонентов паровой фазы ЛРС «зверобой продырявленный» присутствуют в РПФ косметического масла. В таблице 24 они выделены жирным шрифтом.

Таблица 24 – Результаты парофазного газохроматографического анализа косметического масла зверобоя

I_i^T	$A_{rli}, \%$	I_i^T	$A_{rli}, \%$	I_i^T	$A_{rli}, \%$	I_i^T	$A_{rli}, \%$
360	0.76	570	0.23	570	0.23	967	0.15
393	4.83	592	0.48	592	0.48	976	0.70
452	6.90	604	0.09	604	0.09	1024	0.22
501	15.02	617	55.29	617	55.29	1028	2.55
511	0.24	680	0.47	680	0.47	1032	0.66
522	0.08	696	0.53	696	0.53	1061	0.41
556	1.04	719	0.27	719	0.27	1099	0.05

Компоненты паровой фазы масляного экстракта с индексами удерживания 763 и 771 не совпадают с летучими компонентами паровой фазы ЛРС зверобоя. Компонент-маркер 2-метил-3-бутен-2-ол является доминирующим в паровой фазе масляного экстракта ($A_{rli,i} = 55.29\%$). Из сопоставления рисунка 38 и рисунка 44 видно, что отклик детектора на хроматограмме РПФ осушенной травы зверобоя значительно сильнее, чем на хроматограмме РПФ масляного экстракта. Это свидетельствует о том, что концентрация всех летучих и среднелетучих компонентов в паровой фазе масла существенно меньше, чем в РПФ воздушно-сухих образцов.

6.4 Выводы к главе 6

Метод парофазного газохроматографического анализа применен для изучения компонентного состава равновесной паровой фазы надземной части (травы) зверобоя продырявленного и препаратов на его основе, а также другого фармакопейного вида зверобоя – зверобоя четырехгранного. Всего паровая фаза исследованных образцов зверобоя содержит 39 одинаковых летучих компонентов с индексами удерживания $I_i^T = 359 - 1099$ ед. индекса, что соответствует температурам кипения $T_b = 249 - 468$ К, однако содержание этих компонентов различается. Установлено, что основными компонентами равновесной паровой фазы зверобоя продырявленного являются девять компонентов (в порядке

возрастания индексов удерживания I_i^T): этаналь, пропаналь, диметилсульфид, 2-метилпропаналь, 2-метил-3-бутен-2-ол (маркер, $I_i^T=617$), 2-метилбутаналь, 2-метилоктан, α -пинен, 3-метилнонан. Основными компонентами зверобоя четырехгранного являются десять компонентов, семь из которых совпадают с основными компонентами зверобоя продырявленного. Стоит отметить, что компонент 2-метил-3-бутен-2-ол (маркер зверобоя) содержится в РПФ зверобоя четырехгранного в гораздо меньшем количестве ($A_{r,i}= 0.46\%$, $I_i^T=617$), чем в РПФ зверобоя продырявленного. На примере двух исследованных видов зверобоя показана возможность определения межвидового различия ЛРС методом ПФА-ГХ с применением хемометрической обработки результатов методом главных компонент. Все основные компоненты паровой фазы ЛРС, в том числе маркер 2-метил-3-бутен-2-ол, присутствуют в паровой фазе препаратов – таблетированной форме сухого экстракта зверобоя «Деприм» и масляном экстракте зверобоя.

Таким образом, в диссертационной работе впервые изучены закономерности газовой экстракции органических соединений из осушенных ЛРС и твердых и жидких лекарственных препаратов на их основе. Выявлены оптимальные условия (температура, время экстракции) для обнаружения в равновесной паровой фазе легколетучих и среднелетучих компонентов. Методами ПФА-ГХ-ПИД и ПФА-ГХ-МС определен качественный и количественный состав РПФ цветков пижмы обыкновенной, цветков календулы лекарственной, плодов боярышника кроваво-красного, травы зверобоя продырявленного. Всего в паровой фазе четырех исследуемых растений обнаружено 90 органических соединений, из которых 80 идентифицировано. Паровая фаза изученных лекарственных растений состоит из терпенов (α -, β -пинены, лимонен, камфен, мирцен, α -фелландрен и др.), терпеноидов (камфора, эвкалиптол и др.), простых и сложных эфиров (метоксиэтен, этилацетат, 1,1-диэтоксиэтан, бутилацетат и др.), спиртов (этанол, изопропанол, пропанол, бутанол, 2-метил-3-бутен-2-ол и др.), альдегидов

(2-метилбутаналь, 3-метилбутаналь, пропаналь, бутаналь, гексаналь и др.) и содержит органические соединения других классов.

Образцы ЛРС, выращенные в разных регионах России, имеют одинаковый набор летучих и среднелетучих компонентов, а содержание этих компонентов несколько меняется. Выявлены основные компоненты изученных ЛРС, формирующие хроматографический профиль равновесной паровой фазы, установлены *специфические летучие маркеры* для ЛРС «пижма обыкновенная» (3-туйен-2-он, $I_i^T = 1172$) и «зверобой продырявленный» (2-метил-3-бутен-2-ол, $I_i^T = 617$).

Анализ индивидуальности компонентов паровой фазы из выборки 80 идентифицированных летучих компонентов (таблица 1 Приложения) позволили установить, что паровая фаза ЛРС пижмы содержит 21 индивидуальный летучий компонент, в том числе маркер 3-туйен-2-он, ЛРС календулы содержит 4 индивидуальных компонента, ЛРС боярышника – 14 индивидуальных компонентов, ЛРС зверобоя – 9 индивидуальных компонентов, в том числе маркер 2-метил-3-бутен-2-ол.

В отличие от ГХ-МС-хроматограмм эфирных масел, полученные методом ПФА-ГХ хроматограммы, содержат хорошо разделенные пики наиболее летучих компонентов растений с величинами индексов удерживания $I_i^T < 850$. Однако ПФА-ГХ не содержат информацию о малолетучих соединениях с $I_i^T > 1196$. Анализ диапазонов индексов удерживания и температур кипения летучих компонентов паровой фазы исследованных ЛРС, а также литературных данных по индексам удерживания компонентов эфирных масел и экстрактов, позволил нам классифицировать компоненты ЛРС по летучести. Компоненты с индексами удерживания $I_i^T = 360 - 850$ ед. индекса и температурами кипения $T_b \approx 249 - 420$ К можно отнести к *легколетучим* компонентам; *среднелетучие* компоненты лежат в интервале $I_i^T = 850 - 1200$ ед. индекса с температурами кипения $T_b \approx 420 - 450$ К. Компоненты с $I_i^T > 1200$ можно считать *малолетучими*; они не могут быть обнаружены в составе РПФ лекарственных растений в условиях парофазного анализа.

Обработка газохроматографических характеристик основных летучих и среднелетучих компонентов с использованием хемометрического подхода (метода главных компонент) позволила сгруппировать ЛРС по производителю, месту произрастания и др.

Исследование жидких и твердых лекарственных форм фитопрепаратов (спиртовой и масляный экстракты, эфирное масло, таблетированные и капсулированные сухие экстракты) методом ПФА-ГХ показало, что качественный состав их паровой фазы практически полностью совпадает с качественным составом паровой фазы исследованных ЛРС, что может быть использовано для определения подлинности исследованных фитопрепаратов.

Оправданность использования прямого ПФА-ГХ анализа для установления подлинности ЛРС и фитопрепаратов обусловлена его экспрессностью и экономичностью, так как отсутствуют трудоемкие стадии получения эфирного масла или экстракта. Кроме того, использование такого метода позволяет получать унифицированный и воспроизводимый компонентный состав летучих и среднелетучих соединений в паровой фазе растения (headspace-спектр), не зависящий от способа получения эфирного масла или экстракта.

ВЫВОДЫ

1. Изучены закономерности газовой экстракции и выявлены условия, при которых происходит наиболее полное извлечение летучих и среднелетучих компонентов из растительной матрицы разных видов (цветки, трава, плоды) и формирование характерного хроматографического профиля при парофазном газохроматографическом анализе.

2. Метод парофазного газохроматографического анализа с пламенно-ионизационным и масс-спектрометрическим детектированием применен для определения качественного и количественного состава равновесной паровой фазы ботанических и промышленных образцов лекарственных растений «пижма обыкновенная», «календула лекарственная», «боярышник кроваво-красный», «зверобой продырявленный». В выбранных условиях газовой экстракции равновесная паровая фаза пижмы обыкновенной содержит 54 компонента, календулы – 28, боярышника – 31, зверобоя – 39 компонентов. Проведена идентификация этих компонентов по масс-спектрам и индексам удерживания I_i^T при линейном программировании температуры колонки с 5%-дифенил-95%-диметилполисилоксановой неподвижной фазой.

3. Выявлены основные летучие и среднелетучие компоненты исследованных растений, относительное содержание которых в равновесной паровой фазе $A_{r,i} \geq 1\%$, и предложены специфические маркеры (3-туйен-2-он – маркер пижмы, 2-метил-3-бутен-2-ол – маркер зверобоя), характеризующие индивидуальность и подлинность ЛРС.

4. Обнаружено, что качественный состав равновесной паровой фазы каждого из исследованных растений российского ареала произрастания совпадает, тогда как содержание компонентов несколько различается. Диаграммы «относительная площадь пика – индекс удерживания» (headspace-спектры) позволяют представить общий образ многокомпонентного газового экстракта данного вида лекарственного растительного сырья и установить его индивидуальность и подлинность. Хемометрическая обработка результатов парофазного газохроматографического по

методу главных компонент позволяет классифицировать растительное сырье по производителю, месту произрастания и виду.

5. Установлено, что полученные методом парофазного газохроматографического анализа headspace-хроматограммы ЛРС и фитопрепаратов содержат хорошо разделенные пики наиболее летучих компонентов растений с величинами индексов удерживания в усредненном диапазоне $I_i^T = 360 - 850$, что соответствует температурам кипения $T_b = 249 - 420$ К, и не содержат информацию о малолетучих компонентах с $I_i^T > 1200$. Хроматограммы эфирных масел, полученные традиционным вводом жидкой пробы в колонку, содержат среднелетучие и малолетучие компоненты. Спектр среднелетучих компонентов растения с индексами удерживания ($I_i^T = 850 - 1200$ ед. индекса, $T_b = 420 - 495$ К) совпадает на обоих типах хроматограмм.

6. Методом парофазного газохроматографического анализа исследованы фитопрепараты в различных лекарственных формах (спиртовой и масляный экстракты, эфирное масло, таблетированные и капсулированные сухие экстракты). Паровая фаза исследованных фитопрепаратов содержала практически весь headspace-спектр летучих и среднелетучих компонентов, соответствующих данному виду растения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Милевская В.В. Способы экстрагирования биологически активных веществ из лекарственных растений на примере компонентов зверобоя / В.В. Милевская, М.А. Статкус, З.А. Темердашев [и др.] // Журнал аналитической химии. – 2015. – Т. 70, №12. – С. 1255-1263.
2. Витенберг А.Г. Газовая экстракция в хроматографическом анализе / А.Г. Витенберг, Б.В. Иоффе. – Л.: Химия, 1982. – 279 с.
3. Хахенберг Х., Газохроматографический анализ равновесной паровой фазы / Х. Хахенберг, А. Шмидт – М.: Мир, 1979. – 160 с.
4. Kolb V. Static Headspace-Gas Chromatography: Theory and Practice / V. Kolb, S. Leslie. – New York.: Wiley VCH, 1997. – 341 p.
5. Хелдт, Г.В. Биохимия растений / Г.В. Хелдт. – М.: БИНОМ, 2011. – 471 с.
6. Куркин В.А. Фармакогнозия: Учебник для студентов фармацевтических вузов / В.А. Куркин. – Самара: Офорт, 2004. – 1180 с.
7. Племенков В.В. Введение в химию природных соединений / В.В. Племенков. – Казань: Б. и., 2001. – 370 с.
8. Физиология растений: учебник для студентов вузов / под ред. И.П. Ермакова. – М.: Изд. центр «Академия», 2005. – 640 с.
9. Ботанико-фармакогностический словарь / под ред. К.Г. Блиновой, Г.П. Яковлевой. – М: Высшая школа, 1990. – 272 с.
10. Филипцова Г.Г. Основы биохимии растений: курс лекций / Г.Г. Филипцова, И.И. Смолич. – Минск: Белорус. гос. ун-т, 2004. – 136 с.
11. Marriot P.J. Gas chromatographic technologies for the analysis of essential oils / P.J. Marriot, R. Shellie, C. Cornwell // J. Chromatogr. A. 2001. – V. 936, № 1-2. – P. 1-22.
12. Основы биохимии вторичного обмена растений / Г.Г. Борисова, А.А. Ермошин, М.Г. Малева, Н.В. Чукина. – Екатеринбург: Уральский ун-т, 2014. – 130 с.
13. Запрометов М.Н. Фенольные соединения / М.Н. Запрометов. – М.: Наука, 1993. – 272 с.
14. Биохимия растений / под ред. В.Л. Кретовича. – М.: Мир, 1968. – 624 с.

15. Куркин В.А. Современные аспекты химической классификации биологически активных соединений лекарственных растений / В.А. Куркин // Фармация. – 2002. – Т. 50, №2. – С. 8-16.
16. Куркин В.А. Химическая классификация фармакопейных растений как методологическая основа стандартизации лекарственного растительного сырья / В.А. Куркин. – Здоровье и образование в XXI веке. – 2016. – Т 18, № 12. – С. 135-137.
17. Практическая газовая и жидкостная хроматография / Б.В. Столяров, И.М. Савинов, А.Г. Витенберг [и др.]. – СПб.: С.-Петербург. ун-т, 1998. – 612 с.
18. Хусаинова А.И. Фармакогностическое исследование цветков пижмы обыкновенной (*Tanacetum vulgare* L.): дисс. ... канд. фарм. наук: 14.04.02 / Хусаинова Алия Ильясовна. – Самара, 2015. – 207 с.
19. Самылина И.А. Атлас лекарственных растений и сырья: Учебное пособие по фармакогнозии / И.А. Самылина, А.А. Сорокина. – М.: Автор. академия. – Товарищество научных изданий КМК, 2008. – 318с.
20. Яковлева Г.П. Растения для нас: Справочное издание / под ред. Г.П. Яковлева, К.Ф. Блиновой – СПб.: Учебная книга, 1996. – 653 с.
21. Балабас Г.М. Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование; Семейство Asteraceae (Compositae) / Г.М. Балабас; под ред. П.Д. Соколова. – СПб.: Наука, 1993. – С. 190-192.
22. Государственная Фармакопея РФ / XIII изд. Т. I-III. Москва: 2015.
23. Государственная фармакопея СССР: Вып. 2. Общие. методы анализа. Лекарственное растительное сырье / МЗ СССР. – XI изд., доп. – М.: Медицина, 1989. – 400 с.
24. American Herbal Pharmacopeia and Therapeutic Compendium / edited by: Roy Upton, 2011.
25. European Pharmacopeia / European Directorate for the quality of medicines and healthcare. – 6-th edition, Supplement 6.5. – Council of Europe, Strasbourg, 2008.
26. British Pharmacopoeia. – Appendix III, – V. 11. – 2001.

27. Pharmacopée française, 11-e edition, ANSM. [Электронный ресурс]. – 2015. Режим доступа: <http://ansm.sante.fr/Mediatheque/Publications/Pharmacopée-française-PlanPreamble-index>.
28. Сенов П.П. Фармацевтическая химия / П.П. Сенов. – М.: Медицина, 1978. – С. 38 - 42.
29. Кузьменко А.Н. Стандартизация лекарственного растительного сырья и растительных сборов методами ионо-экслюзионной и газо-жидкостной хроматографии. Дис. ... докт. хим. наук: 14.04.02 / Кузьменко Алексей Николаевич. – М., 2013. – 319 с.
30. Collin J. Essential oil of tansy (*Tanacetum vulgare* L.) of Canadian origin / J. Colin, H. Deslauriers, N. Pageau, M. Gagnon // J. Essent. Oil Res. – 1993. – №5. – P. 629 - 638.
31. Ревельский И.А. О применении СФЭ для получения экстрактов из лекарственных, сельскохозяйственных растений и фармпрепаратов / И.А. Ревельский, И.Н. Глазков // Сверхкритические Флюиды: Теория и Практика. – 2008. – Т. 3, № 2. – С. 70.
32. Павлова Л.В. Экстракционно-хроматографическое определение физиологически активных компонентов цветов «ромашки аптечной» и «эвкалипта прутовидного»: дис. ... канд. хим. наук: 02.00.02 / Павлова Лариса Викторовна. – Воронеж, 2015. – 176 с.
33. Keskitalo M. Variation in volatile compounds from Tansy (*Tanacetum vulgare* L.) related to genetic and morphological differences of genotypes / M. Keskitalo, E. Pehu, J. E. Simon // Biochem. Syst. Ecol. – 2008. – № 29. – P. 267-285.
34. Mockute D. The myrtenolchemotype of essential oil of *Tanacetum vulgare* L. var. Vulgare (Tansy) growing wild in the Vilnius region / D. Mockute, A. Judzentiene // Chemija J. 2003. – V. 14, №. 2. – P. 103-107.
35. Rohloff J. Chemotypical variation of tansy (*Tanacetum vulgare* L.) from 40 different locations in Norway / J. Rohloff, R. Mordal, S. Dragland // J. Agric. Food Chem. – 2004. – № 52. – P. 1742-1748.
36. Muresun M.L. Antimicrobial effects of the ethanolic extracts and essential oils of *Tanacetum vulgare* L. from Romania / M.L. Muresun // Acta Universitatis Cibiniensis. Series E: Food Technology. – 2015. – V. 19, № 2. – P. 75-80.

37. Water deficit stress induces different monoterpene and sesquiterpene emissions and plant water potential / E. Ormeno, J.P. Mevy, B. Vila [et al.] // *Chemosphere*. – 2006. – № 67. – P. 276-284.
38. Kupcinskiene E. The essential oil qualitative and quantitative composition in the needles of *Pinus sylvestris* L. growing along industrial transects / E. Kupcinskiene, A. Stikliene, A. Judzentiene // *Environmental Pollution*. – 2008. – V. 155, №3. – P. 481-491.
39. Hoepfner S. Interactive responses of old-field plant growth and composition to warming and precipitation / S. Hoepfner, J.S. Dukes // *Global Change Biology*. – 2012. – №18. P. 1754-1768.
40. Muresan M.L. The analysis of essential oils from aerial parts of *Tanacetum vulgare* L. growing wild in Romania / M.L. Muresan // *Bihorean Biologist*. – 2016. – V. 10, №1. – P. 67-68.
41. Farmacopeea Romana, Ed. X a. // Bucuresti: Medicala, 1993. – 658 p.
42. Baczek K.B. Antibacterial and antioxidant activity of essential oils and extracts from costmary (*Tanacetum balsamita* L.) and tansy (*Tanacetum vulgare* L.) / K.B. Baczek, O. Kozakowska, J.L. // *Przybyl Ind Crop Prod*. – V. 102, 2017. – P. 154-163.
43. Сезонная изменчивость состава эфирного масла в вегетативной части пижмы обыкновенной / Л.А. Мильшина, Г.Г. Первышина, А.А. Ефремов [и др.] // *Вестн. КрасГАУ*. – 2012. – №7. – С. 75-78.
44. Влияние хранения сырья на качественный состав эфирного масла некоторых лекарственных растений / О.В. Шелепова, Т.В. Воронкова, В.В. Кондратьева [и др.] // *Науч. ведомости БелГУ. – Естественные науки*. – 2014. – Выпуск 29. – № 23 (194). – С 129-132.
45. Analysis from essential oils from *Calendula officinalis* growing in Brazil using free different extraction procedures. / Z.C. Gazim, C.M. Rezende, S.R. Fraga [et. al.] // *Braz. J. Pharm. Sci*. – 2008. –V. 44, № 3. – P. 391-395.
46. Афанасьева П.В. Комплексное фармакогностическое исследование календулы лекарственной (*Calendula officinalis* L.) дис. ... канд фарм. наук: 14.04.02 / Афанасьева Полина Валериевна. – Самара, 2017. – 198 с.

47. German Homoeopathic Pharmacopoeia, 5th supplement / British homeopaths association. – Stuttgart: Deutscher Apotheker Verlag, 1993. – 401 p.
48. The effects of drying on the chemical components of essential oils *Calendula officinalis* L. / O.O. Okoh, A.P. Sadimenko, O.T. Asekun [et al.]. – 2008. – V.7, №10. – P. 1500-1502.
49. Афанасьева П.В. Перспективы комплексного использования календулы лекарственной (*Calendula officinalis* L.) / П.В. Афанасьева, А.В. Куркина // Известия Самарского научного центра РАН. – 2014. – Т. 14 – № 2. – С. 980 – 982.
50. Supercritical fluid extraction and fractionation of different preprocessed rosemary plants / Ibanez E, Oca A, de Murga G [et. al] // J. Agric. Food. Chem. – 1999. – V. 47. – P. 1400 – 1404.
51. Ali E.M. Antifungal Activity of *Achillea santolina* L. and *Calendula officinalis* L. Essential Oils and Their Constituents Against Fungal Infection of Liver as Complication of Cyclophosphamide Therapy / E.M. Ali, H.A. El-Moaty // ТЕОР. – 2017. – V. 20, №4. – P. 1030-1043.
52. Яшин Я.И. Газовая хроматография / Я.И. Яшин, Е.Я. Яшин, А.Я. Яшин. – М.: ТрансЛит, 2009. – С.451.
53. Сверхкритическая флюидная экстракция и ее применение для определения ультрамалых содержаний органических веществ в различных средах /. И.Н. Глазков, И.А. Ревельский, С.В. Кузякин [и др]. // Сверхкритические флюиды: теория и практика. – 2006. – Т. 1, №1. – С.52-65.
54. Kaskoniene V., Chemical Composition and Chemometric Analysis of Variation in Essential Oils of *Calendula officinalis* L. during Vegetation Stages. / V. Kaskoniene, P. Kaskonas, A. Maruska [et al.] // Chromatographia. – 2011. – V. 73, №1. – P. 163-169.
55. Petrovic L.B. An investigation of CO₂ extraction of marigold (*Calendula officinalis* L.) / L.B. Petrovic, D. Adamovic, V. Tesevic. // J. Serb. Chem. Soc. –2007. – V. 72., №4. – P. 407-413.
56. Доброхотов Д.А. Компонентный состав экстрактов растений, входящих в состав сбора для лечения заболеваний пародонта / Д.А. Доброхотов, А.Н. Кузьменко, О.В. Нестерова // Вестн. Моск. ун-та. – Сер. 2. – Химия. – 2011. – Т. 52, №2.– С. 149-153.

57. Savchenko L.P. Identification of Calendula and Eucalyptus Alcoholic Tinctures Volatile Compounds in the Compounding Ointment by Gas Chromatography–Mass Spectrometry / L.P. Savchenko, L. Ivanauskas, K. A. Uminska // *Asian Journal of Pharmaceutics*. – 2018. – V. 12, №1. – P. 145-150.
58. Куркин В.А. Диуретическая и антидепрессивная активность густого экстракта из плодов боярышника кроваво-красного/ В.А. Куркин, А.В. Куркина, Е.Н. Зайцева [и др.] // *Бюллетень сибирской медицины*. – 2016. – Т. 15, №4. – С. 18-22.
59. Куркина А.В. Новые подходы к стандартизации цветков боярышника / А.В. Куркина // *Химия растительного сырья*. – 2013. – №2. – С. 172-176.
60. Флора СССР / под ред. В.Л. Комарова. – М.: Издательство АН СССР, 1960. – С. 978-1011.
61. Пастушенков Л.В. Лекарственные растения: Использование в народной медицине и быту // Пастушенков Л.В., Пастушенков А.Л., Пастушенков В.Л. – Л.: Лениздат, 1990. – С. 284.
62. С.В. Трофимова. Фармакогностическое изучение листьев боярышника кроваво-красного *Crataegus sanguinea* Pall. из флоры Башкортостана: дисс. канд. фарм. н. / Трофимова Светлана Валерьевна. – Уфа, 2014. – 161 с.
63. Хасанова С.Р. Компонентный состав полисахаридного комплекса листьев *Crataegus sanguinea* (Rosaceae) из флоры республики Башкортостан. / С.Р. Хасанова, С.В. Кривошеков, Н.В. Кудашкина [и др.] // *Растительные ресурсы*. – 2015. – Т. 51, № 3. – С. 397-406.
64. Edwards J.E. A review of the chemistry of the genus *Crataegus* / J. E. Edwards, P. N. Brown, N. Talent [et al.] // *Phytochemistry*. – 2012. – №79. – P. 5-12.
65. Bechkri S. Composition and biological activities of seeds oils of two *Crataegus* species growing in Algeria / S. Bechkri, D. Berrehal, Z. Semra [et al.] // *Journal of Materials and Environmental Sciences*. – 2017. – V. 8. – P. 1023-1028.
66. Kovaleva A.M. GC/MS study of essential oil components from flowers of *Crataegus jackii*, *C. robesoniana* and *C. flabellata*. / A.M. Kovaleva, N.F. Goncharov, A.N. Komissarenko [et al.] // *Chemistry of natural compounds*. – 2009. – V. 45, № 4. – P. 582-584.

67. Robertson G.W. A comparison of the flower volatiles from hawthorn and four raspberry cultivars. / G.W. Robertson, D. W. Griffiths, J. A. T. Woodford [et al.] // *Phytochemistry*. – V. 33, № 5. – 1993. – P. 1047-1053.
68. Ozderin S. Chemical properties of hawthorn (*Crataegus* L. spp.) taxa naturally distributed in western Anatolia part of Turkey / S. Ozderin, H. Fakir, E. Donmez // *Sumarski list*. – 2007. – V. 7–8. – P. 369-376.
69. Kallassy H. Chemical Composition, Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Antiproliferative Activities of the Plant Lebanese *Crataegus azarolus* L. / H. Kallassy, M. F. Kazan, R. Makki [et al.] // *Med. Sci. Monit. Basic Res*. – 2017. – V. 23. – P. 270-284.
70. Куркин В.А. Зверобой: итоги и перспективы создания лекарственных средств / В.А. Куркин, О.Е. Правдивцева. – Самара: ОФОРТ, – 2008. – 128 с.
71. The Plant List. <http://www.theplantlist.org/> (дата обращения: 16.05.2017).
72. Зими́на Л.Н., Сравнительное исследование компонентного состава травы фармакопейных видов зверобоя методом высокоэффективной жидкостной хроматографии / Л.Н. Зими́на, В.А. Куркин, В.М. Рыжов // *Химия растительного сырья*. – 2013. – №1. – С. 205-208.
73. Ушкалова А.В. Эффективность и безопасность антидепрессивных и седативных средств растительного происхождения / А.В. Ушкалова, Т.С. Илларионова // *Фарматека*. – 2007. – № 20. – С. 10-14.
74. Linde K. St John's wort for major depression (Review) / K. Linde, M. M. Berner, L. Kriston // *Cochrane Summaries*. – 2008. – V 3. – 70 p.
75. De la Cruz, G. Essential Oil Composition of Aerial Parts of *Hypericum silenoides* Juss. and *Hypericum philonotis* Cham. & Schlecht. Growing in Central Mexico / Garcia-de la Cruz, L., S. Caballero // *J. of Essent. Oil Bear. Pl.* – 2013. – V. 16. – P. 456-460.
76. Weyerstahl P. Constituents of the leaf essential oil of *Hypericum perforatum* L. from India / P. Weyerstahl, U. Splittgerber, H. Marchall // *Flavour Fragr. J.* – 1995. – №10. – P. 365.

77. Chauhan R.S., Essential oil composition of *Hypericum perforatum* L. from cultivated source / R.S. Chauhan, R.K. Vashistha, M.C. Nautiyal [et al.] // *J. Essent. Oil Res.* – 2011. – V. 23, № 3 – P. 20-25.
78. Morshedloo M. R, Chemical characterization of the essential oil composition from Iranian populations of *Hypericum perforatum* L. / M.R. Morshedloo, A. Ebadi, F. Maggi [et al.] // *Ind. Crops Prod.* – 2015. – V. 76. – P. 565-573.
79. Chialva F. Qualitative evaluation of aromatic herbs by direct headspace GC analysis. Applications of the method and comparison with the traditional analysis of essential oils / F. Chialva, G. Gabri, P. A. P Liddle [et al.] // *J. of high resolution and chromatography communications.* – 1982. – № 5. – P. 182.
80. Chatzopoulou P.S. Chemical composition of the essential oils from cultivated and wild grown St. John's Wort (*Hypericum perforatum*) / P.S. Chatzopoulou, V.K. Koutsos, S.T. Katsiotis // *J. Essent. Oil Res.* – 2006. – V. 18. – P. 643-646.
81. Smelcerovic A.A. Investigation of bioactive component of essential oil of *Hypericum perforatum* L. spp. *angustifolium* (St. John's Wort) by GC-MS / A.A. Smelcerovic, S.M. Dordevic, B.T. Gudzic // *Method. Proc. of the 1st Conf. on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries & 6th Meet. "Days of Medicinal Plants 2000"*. – Serbia, 2000. – P. 619-622.
82. Radusiene J. Essential oil composition and variability of *Hypericum perforatum* L. growing in Lithuania. / J. Radusiene, A. Judzentiene, G. Bernotiene // *J. Essent. Oil Res.* – 2005. – V. 33. – P. 113-124.
83. Comparison of the volatile oils of *Hypericum scabrum* L. and *Hypericum perforatum* L. from Turkey / A. Cakir, M.E. Duru, M. Harmandar [et al.] // *Flavour fragr. J.* – 1997. – V. 12. – P. 285-287.
84. Essential oil composition and variability of *Hypericum perforatum* from wild Populations of Northern Turkey / C. Cirak, A. Bertoli, L. Pistelli [et al.] // *Pharm. Biol.* – 2010. – V. 48, № 8. – P. 906-914.
85. Schwob I. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Hypericum coris* / I. Schwob, J.M. Bessiere, J. Viano // *Compt. Rend.* – 2002. – V. 325. – P. 511-513.

86. Изучение эфирного масла из травы зверобоя продырявленного, произрастающего на территории Башкортостана / Н.В. Кудашкина Р.Р. Файзуллина, В.А. Пушкарев [и др.] // ВНМТ. – 2006. – Т.13, №1. – С. 104-105.
87. Изменчивость содержания эфирного масла и его основных компонентов в фитомассе *Hypericum perforatum* и *Hypericum maculatum* в культуре на севере / В.В. Пунегов, Э.Э. Эчишвили, Н.В. Портнягина [и др.] // Извест. Самарского центра РАН. – 2015. – Т.17, №5. – С. 183-187.
88. Demicri F. Volatiles of *Hypericum bupleuroides* Griseb / F. Demirci, K.H.C. Baser // J. Essent. Oil Res. – 2006. – №18. – P. 650-651.
89. Колб Б. Газовая хроматография с примерами и иллюстрациями. пер. с немецкого Л.А. Онучак, С.Ю. Кудряшов. / Б. Колб. – 2-е изд. перераб и доп. – Самара: Самарский университет, 2007. – 248 с.
90. Headspace analysis in modern gas chromatography. / N.H. Snow, G.C. Slack // Trends in analytical chemistry – 2002. – V. 21. – P. 608-617.
91. Другов Ю.С. Газохроматографический анализ загрязненного воздуха: Практическое руководство / Ю.С. Другов, А.А. Родин. – 4-е изд., перераб и доп. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2006. – 528 с.
92. Lee K.Y. J. Chromatog. Combined headspace and extraction technique for profile analysis by capillary gas chromatography / K.Y. Lee, D. Nurok, A. Zlatkis – 1978. – V.158. – P. 377-386.
93. McAuliffe C. Gas Chromatographic Determination of Solutes by Multiple Phase Equilibrium / C. McAuliffe // Chemical Technology. – 1971. – № 1. – P. 46-51.
94. Витенберг, А.Г. Газохроматографическое определение следов ароматических углеводов и спиртов в воде методом анализа равновесного пара / А.Г. Витенберг, Б.В. Столяров, С.А. Смирнова // Вестн. ЛГУ. Сер. «Физика, химия». – 1977. – №16. – С. 132-139.
95. Ioffe B.V. Application of the headspace analysis to systems with unknown partition coefficients / B.V. Ioffe, A.G. Vitenberg // Chromatographia. –1978, V. 11, № 5. – P. 282-286.

96. Родинков О.В. Парофазный газохроматографический анализ водных растворов с селективным поглощением газа-экстрагента / О.В. Родинков, А.Ю. Писарев, Л.Н. Москвин // Сорбц. и хром. проц. – 2015. – Т. 15, №1. С. 116-127.
97. Critical comparison of automated purge and trap and solid-phase microextraction for routine determination of volatile organic compounds in drinking waters by GC-MS / A.L. Gonzalo, J.E.S. Uribe, E.S. Garcia [et al.] // Talanta. – 2008. – V. 74. – P. 1455-1462.
98. Needle-type extraction device for the purge and trap analysis of 23 volatile organic compounds in tap water / Ueta I., Razaka N.A., Mizuguchia A. [et al.] // J. Chromatogr. A. – 2013. – V. 1317. – P. 211-216.
99. Brown M.A. Online purge and trap gas chromatography for monitoring of trihalomethanes in drinking water distribution systems. / M.A. Brown, S. Miller, G.L. Emmert // Anal. Chem. Acta. – 2007. – V. 592. – P. 154-161.
100. Auer N.R. Development of a purge and trap continuous flow system for the stable carbon isotope analysis of volatile halogenated organic compounds in water / N.R. Auer, B.U. Manzke, D.E. Schulz-Bull // J. Chromatogr. A. – 2006. – V. 1131. – P. 24-36.
101. Cordaro B.M. Analytical Application of membrane extraction in chromatography and electrophoresis / B.M. Cordaro // J. Chromatogr. A. – 2000. – V. 902, №1. – P. 195-204.
102. Moskvin L.N. Chromatomembrane method for the continuous separation of substances / L.N. Moskvin, // J. Chromatogr. A.– 1994. – V. 669. – P. 81-87.
103. Luo Y.Z. Membrane Extraction with a Sorbent Interface for Headspace Monitoring of Aqueous Samples Using a Cap Sampling Device / Y.Z. Luo, J.J. Pawliszyn // Anal Chem. – 2000. – V. 72. – P. 1058-1064.
104. Москвин Л.Н. Хроматомембранные методы разделения веществ. / Л.Н. Москвин, О.В. Родинков // СПб: изд-во С.-Петербур. ун-та, 2014.– 216 с.
105. Moskvin L.N. Chromatomembrane methods: physicochemical principles, analytical and technological possibilities / L.N. Moskvin, O.V. Rodinkov // Russ. Chem. Bull. – 2012. – V. 61. – P. 723-740.
106. Kfoury M. Contribution of headspace to the analysis of cyclodextrin inclusion complexes / M. Kfoury, D. Landy, S. Fourmentin // Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry. – V. 4. – 2018. – P. 1-14.

107. Porto-Figueira, P. Exploring the potential of needle trap microextraction combined with chromatographic and statistical data to discriminate different types of cancer based on urinary volatome biosignature / P. Porto-Figueira, J.A.M. Pereira, J.S. Camara // *Analytica Chimica Acta*. – 2018. – V. 1023. – P. 53-63.
108. Скоморощенко, В.И. Выявление наиболее специфичных летучих метаболитов методом газовой хроматографии в пробах выдыхаемого воздуха больных раком легких и здоровых добровольцев / В.И. Скоморощенко, О.В. Пенкова, Ю.В. Кистенев // *Вестн. Томск. гос. ун-та. Химия*. – 2017. – № 7. – С. 45-54.
109. Золотов Ю.А. О некоторых тенденциях развития аналитической химии / Ю.А. Золотов // *Заводская лаборатория. Диагностика материалов*. – 2012. – Т. 78. – № 9. – С. 5-7.
110. Massart D. L. *Chemometrics: a textbook*. / D.L. Massart // NY.: Elsevier, 1988. – 134с.
111. Romano S.J. Gas chromatographic determination of residual ethylene oxide by headspace analysis / S.J. Romano, J.A. Renner, P.M. Leitner // *Anal. Chem.* – 1973. – V. 45. – P. 2327-2330.
112. Витенберг А.Г. Статический парофазный газохроматографический анализ. Физико-химические основы и области применения / А.Г. Витенберг // *Рос. хим. ж.* 2003. – Т. XLVII. – № 1. – С. 7-22.
113. Mazza G. Headspace volatiles and sensory characteristics earthy, musty, flavoured potatoes / G. Mazza, E.M. Pietrzak // *Food Chem.* – 1990. – V. 36. – P. 97-112.
114. Odor M.-L. R. Analysis of Pinot Noir Wines from Grapes of Different Maturities by a Gas Chromatography-Olfactometry Technique (Osme) / M.-L. R. Odor // *J. Food. – Sci.* – 1992. – V. 57. – P. 985-993.
115. Buchbauer G. Headspace and essential oil analysis of apple flowers / G. Buchbauer, L. Jirovetz, M. Wasicky [et al.] // *J. Agric. Food Chem.* – 1993. – V. 41. – P. 116-118.
116. Schieberle P. Characterization of the Odor-Active Constituents in Fresh and Processed Hops (variety Spalter Select) / P. Schieberle, M. Steinhaus // *Gas Chromatography-Olfactometry. ACS Symp. Series*. – 2001. – V. 782. – P. 23-32.
117. Онучак Л.А., Газохроматографические характеристики летучих веществ в плодах и препаратах расторопши пятнистой (*Silybum marianum* L.) / Л.А. Онучак,

Ю. И. Арутюнов, И. А. Платонов [и др.] // Журн. аналит. химии. – 2012. – Т. 67, № 6. – С. 619.

118. Хроматографические спектры удерживания летучих компонентов равновесной паровой фазы лекарственных растений «лаванда колосовая», «мята перечная», «трава тархуна» / Арутюнов Ю.И., Онучак Л.А., Крупнова Н.А. [и др.] // Вестник СамГУ. Естественнонаучная серия. – 2015. – №3. – С. 153-163.

119. Laakso I. Volatile Garlic Odor Components: Gas Phases and Adsorbed Exhaled Air Analysed by Headspace Gas Chromatography-Mass Spectrometry / I. Laakso, T. Seppanen-Laakso, R. Hiltunen [et al.] // Planta Medica. – 1989. – V. 55, №3. – P. 257-261.

120. Holsher W. Investigation of roasted coffee freshness with an improved headspace technique / W. Holsher, H. Shtainhart // Z Lebensm Unters Forsch. – 1992. – № 195. – P. 33-38.

121. Mattheis J.P. Identification of headspace volatile compounds from “bing” sweet cherry fruit / P. Mattheis, D.A. Buchahan, J. K. Fellman // Phytochemistry. – 1992. – V. 31, №. 3. – P. 771-777.

122. Geladi P. Chemometrics a growing and maturing discipline (Editorial) / P. Geladi, K. Esbensen // Chemom. Intell. Lab. Syst. – 1990. – V. 7. – 197 p.

123. Brereton R.G. Chemometrics: Data analysis for the laboratory and chemical plant / R.G. Brereton. – UK: Chichester, 2003. – 128 p.

124. Родионова О. Е. Хемометрика в аналитической химии / О.Е. Родионова, А.Л. Померанцев. – М.: Институт им. Семенова РАН, 2009. – 61с.

125. Establishing high temperature gas chromatographic profiles of non-polar metabolites for quality assessment of African traditional herbal medicinal products / N. Bony, D. Libonga, A. Solgadi [et al.] // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. – 2014. – V. 88. – P. 542-551.

126. Lianga Y., Quality control of herbal medicines / Y Lianga, P. Xieb, K. Chan // J Chromatogr B. – 2004. – V. 812. – P. 53-70.

127. Fan X. Quality Control Method for Herbal Medicine – Chemical Fingerprint Analysis / X. Fan, Y. Cheng, Z. Ye // Analytica Chimica Acta. – 2006. – V. 555. – P. 217-224.

128. Li Y. Combinative method using HPLC fingerprint and quantitative analyses for quality consistency evaluation of an herbal medicinal preparation produced by different manufacturers / Y. Li, T. Wu, J. Zhu // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. – 2010. – V. 52. – P. 597-602.
129. 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. 316-324.
130. Ткачев А.В. Исследование летучих веществ растений / А.В. Ткачев – Новосибирск: Офсет, 2008. – 969 с.
131. Van den Dool, H. A generalization of the retention index system including liner temperature programmed gas-liquid partition chromatography / H. Van. den Dool, P.D Kratz // *J.Chromatogr.* – 1963. – V. 11, № 4. – P. 463-471.
132. Ettre L.S. Nomenclature for chromatography / L.S. Ettre// *Pure & Appl. Chem.* – 1993. – V. 65, № 4. – P. 819-872.
133. База данных NIST [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://webbook.nist.gov/chemistry/>.
134. Дерффель К. Статистика в аналитической химии. / К. Дерффель. – М.: Мир, 1994. – 267 с.
135. Гольберт К.А. Введение в газовую хроматографию / К.А. Гольберт, М.С. Вигдергауз. – М.: Химия, 1990. – 352 с.
136. Чепелянский Д.А. Новые подходы к анализу смесей летучих и среднелетучих органических соединений методами ГХ и ГХ/МС, основанные на использовании хроматодистилляции: автореф. дис. ...канд хим. наук: 02.00.02 / Чепелянский Дмитрий Александрович. – М., 2014. – 27 с.
137. An Optimized Direct Method for the Determination of Carboxylic Acids in Beverages by HPLC / R.M. Marce, M. Calull, R.M. Manchobas [et al.] // *Chromatographia* – 1990. – V.29. – P. 54-58.

138. Essential oil composition of Serbian *Hypericum perforatum* local population cultivated in different ecological conditions. / P.S. Chatzopoulou, T. Markovic, D. Radanovic [et al.] // *Jeobp.* – 2009. – V. 12, № 6. – P. 666-673.
139. Essential oil composition of *Hypericum perforatum* L. and *Hypericum tomentosum* L. growing in Tunisia. / K. Hosni, K. Msaada, M.B. Taarit [et al.] // *Ind. Crops Prod.* – 2008 –V. 27.– P. 308-314.
140. Volatile Components of *Hypericum humifusum*, *Hypericum perforatum* and *Hypericum ericoides* by HS-SPME-GC and HS-SPME-GCMS using nano scale injection techniques. / Z. Rouis, A. Elaissi, N. Abid [et al.] // *Dig. J. Nanomater. Biostruct.* – 2011. – V. 6, № 4. – P. 1919-1928.
141. Avato P. Determination of major constituents in St. John's Wort under different extraction conditions / P. Avato // *Pharm. Biol.* – 2004. – V. 42, №1. – P. 83-89.
142. Hansel R. Nachweissedativ-hypnotischer Wirkstoffeim Hopfen / R. Hansel, R. Wohlfart, H. Schmidt // *PlantaMed.* – 1982. – V. 45. – P. 224-228.

ПРИЛОЖЕНИЕ

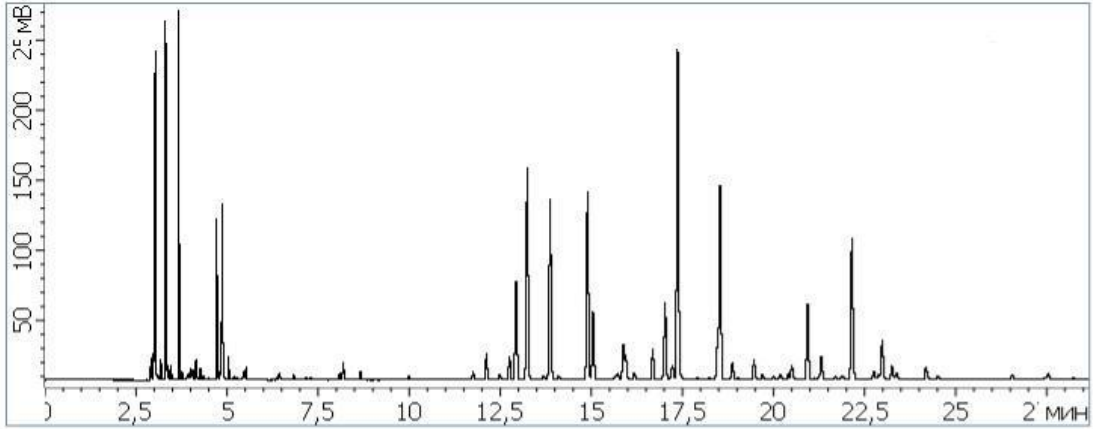
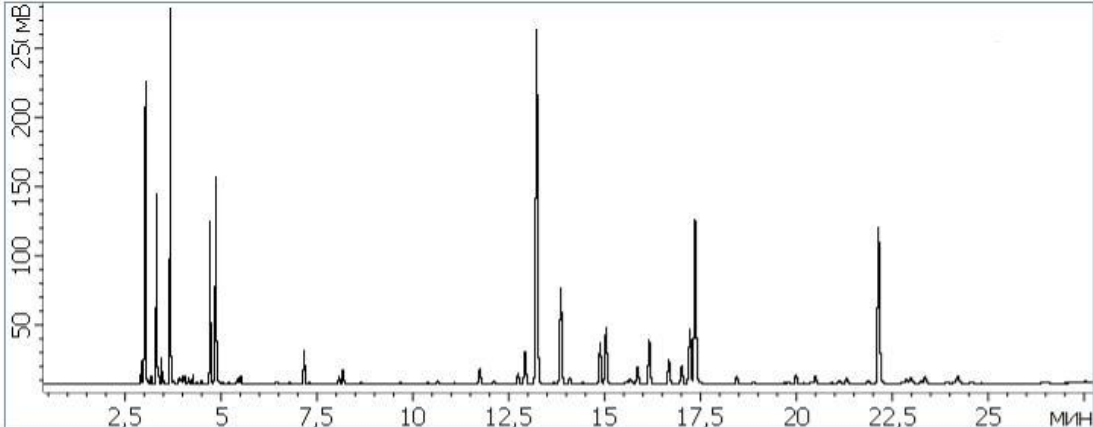
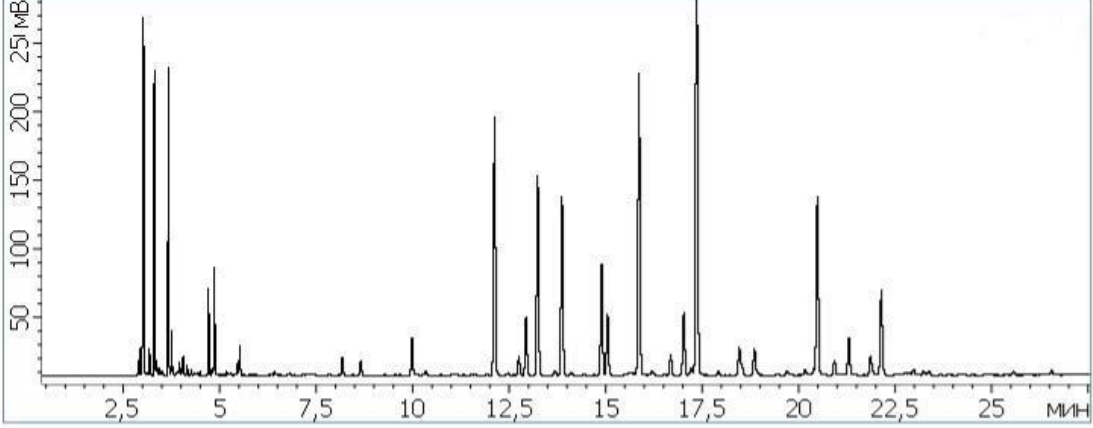
Таблица 1 – Некоторые физико-химические величины летучих органических соединений, входящих в состав паровой фазы исследованных образцов ЛРС

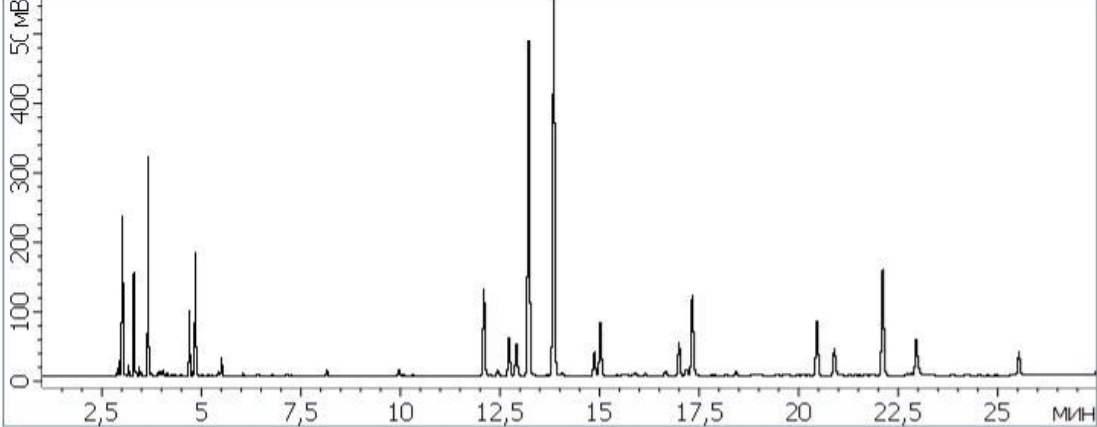
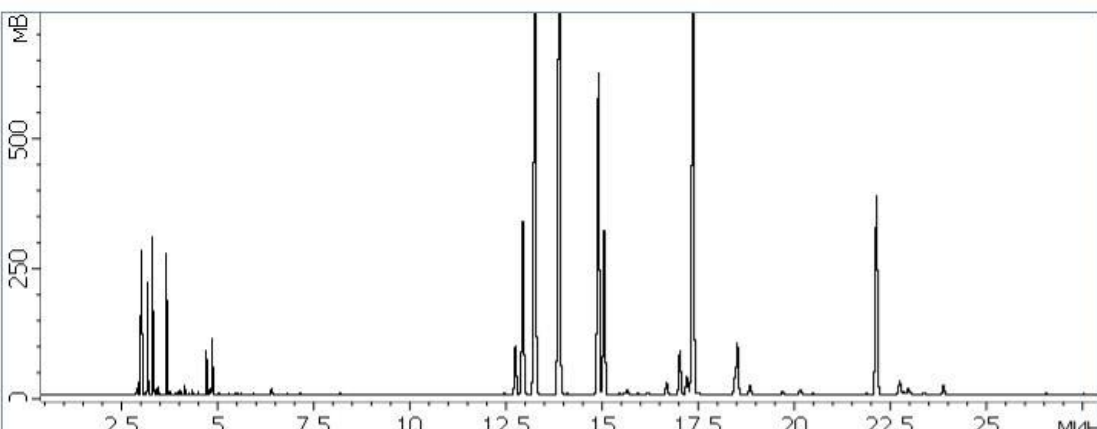
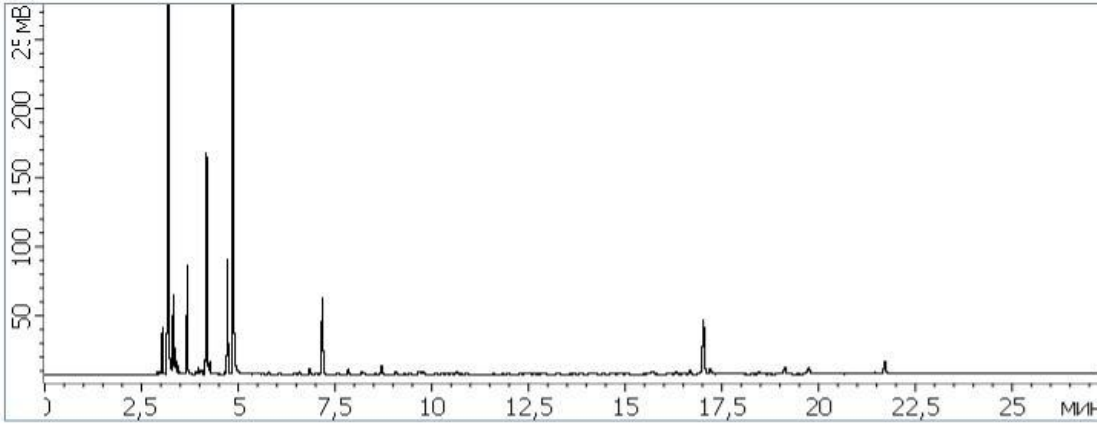
<i>N</i> _н / <i>n</i>	<i>I</i> _г ^T	Соединение	<i>M</i> , г/моль	<i>T</i> _б , К	$\Delta H_{исп}$, кДж/моль	ΔS , Дж/(К·моль)
1	359	Диметиловый эфир	46	249.0	21.51	86.39
2	360	-	-	-	-	
3	378	-	-	-	-	
4	394	Этаналь	44	293.9	25.76	87.65
5	423	Метоксиэтен	56	278.7	26.30	94.37
6	424	Диметиламин	45	282.0	26.40	93.61
7	448	Этанол	46	351.5	42.30	120.34
8	452	Диэтиловый эфир	74	307.7	27.10	88.07
9	452	3-Метилбутен-1	70	293.0	25.50	87.03
10	501	Пропаналь	58	322.0	29.70	92.24
11	511	Изопропанол	60	355.5	45.00	126.58
12	522	Диметилсульфид	62	311.0	27.80	89.39
13	529	Пентадиен-1,4	68	299.2	25.20	84.22
14	529	Винилацетат	86	345.7	37.20	107.61
15	556	2-Метилпропаналь	72	336.0	32.00	95.24
16	568	Бутеналь-2	70	363.0	37.20	102.48
17	569	-	-	-	-	
18	570	2-Метилпропеналь-2	70	341.6	32.20	94.26
19	592	Пропанол	60	370.3	47.00	126.92
20	599	Бутаналь	72	348.2	33.70	96.78
21	604	Бутанон-2	72	353.0	34.00	96.32
22	605	2-Метилфуран	82	337.0	32.20	95.55
23	610	-	-	-	-	
24	610	Этилацетат	88	350.0	31.94	91.26
25	617	2-Метил-3-бутен-2-ол	86	371.0	-	
26	619	2-Метилпентадиен-1,3	82	349.0	-	
27	621	Трет-пентанол	88	375.1	50.00	133.30
28	623	3-Метил-3-бутен-2-он	84	371.2	-	
29	632	2,4-Гексадиен	82	354.3	-	
30	640	3-Метилбутанон-2	86	367.0	36.80	100.27
31	641	-	-	-	-	
32	657	<i>n</i> -Бутанол	74	390.6	52.00	133.13
33	680	3-Метилбутаналь	86	365.4	-	
34	690	-	-	-	-	
35	696	2-Метилбутаналь	86	365.2	-	
36	704	2-Этилфуран	96	365.0	-	
37	709	1,1-Диэтоксидан	118	373.0	36.28	97.26
38	711	Пентанон	86	375.0	38.46	102.56
39	713	2,4,4-Триметилпентен-1	114	375.0	39.00	104.00
40	717	-	-	-	-	
41	717	Этилпропионат	102	372.2	39.00	104.78
42	719	Метилциклогексан	98	374.0	35.30	94.39
43	719	3-Пентен-2-он	84	395.7	-	-

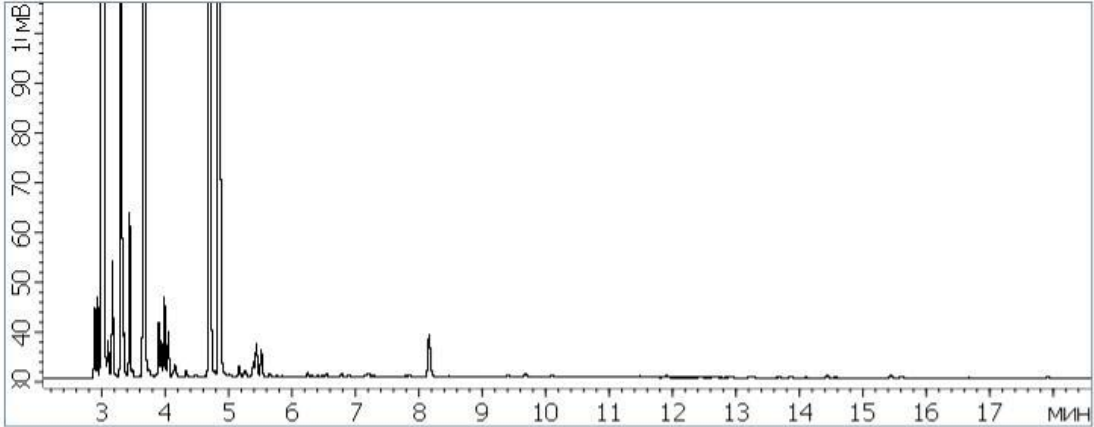
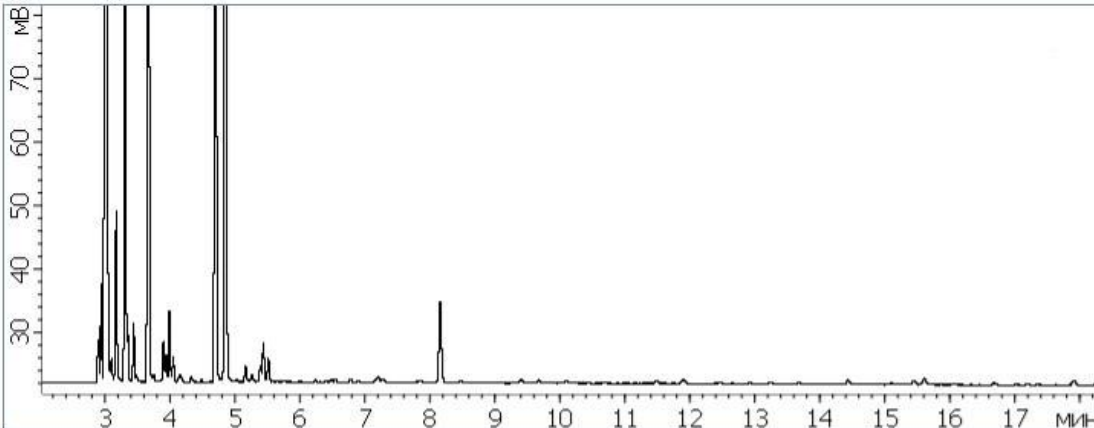
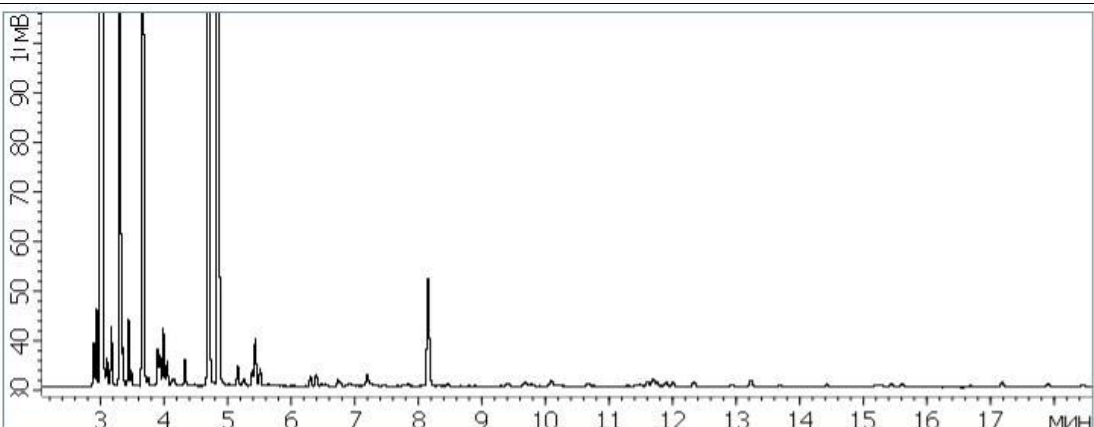
Продолжение таблицы 1

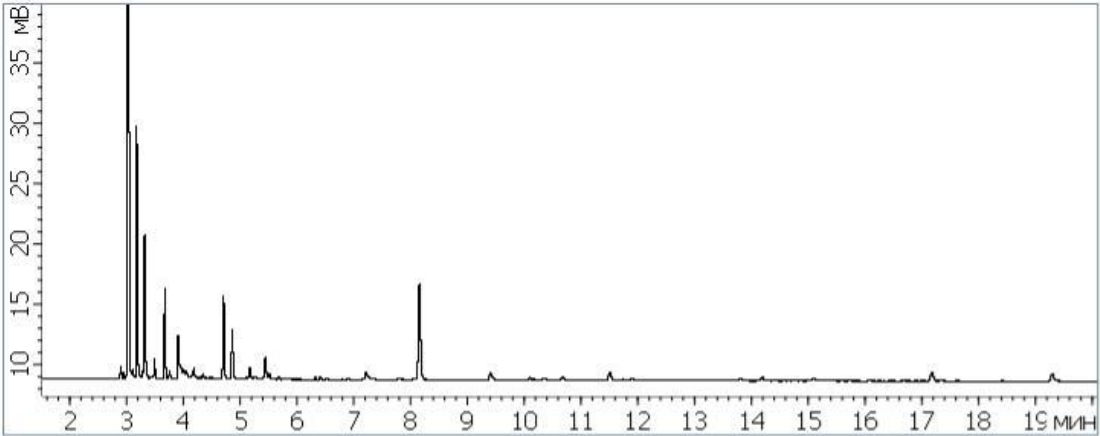
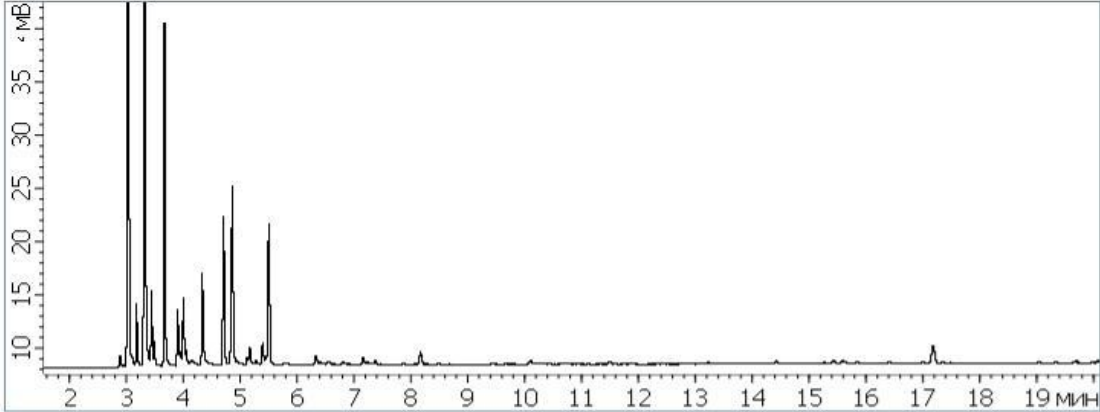
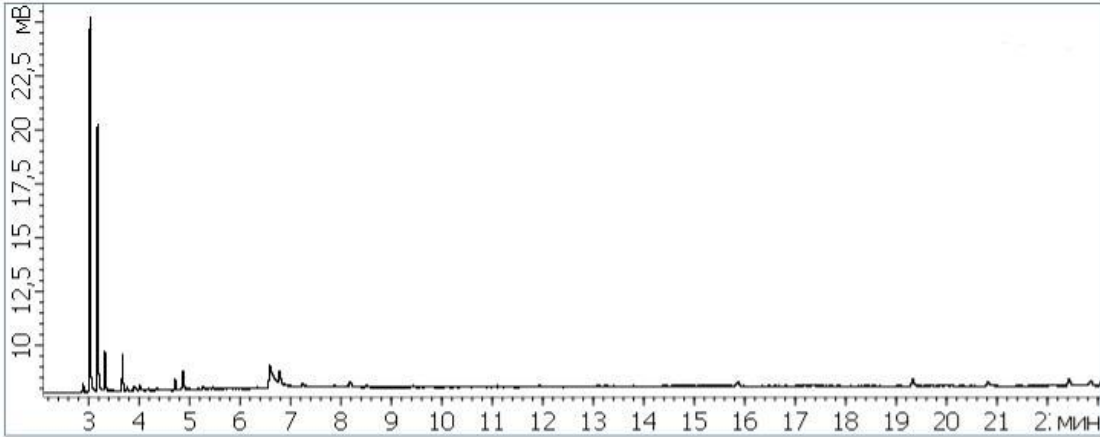
44	745	2-Бутилацетат	116	385.4	39.00	101.19
45	747	2-Метилбутанол	88	402.0	54.60	135.82
46	751	Пентеналь	84	397.0	-	-
47	766	<i>Цис</i> -2-пентен-1-ол	86	393.0	-	-
48	791	-	-	-	-	-
49	800	<i>n</i> -Октан	114	398.7	41.00	102.83
50	802	Гексаналь	100	402.0	42.00	104.48
51	815	<i>n</i> -Бутилацетат	116	399.0	43.00	107.77
52	835	Изовалериановая кислота	102	448.0	58.00	129.46
53	860	2-Метилоктан	128	416.1	44.90	107.91
54	852	Транс-2-гексеналь	98	419.7	-	-
55	889	Стирен	104	419.0	43.93	104.84
56	900	<i>n</i> -Нонан	128	423.0	46.50	109.93
57	908	Сантолина триен	136	420.0	-	-
58	923	Трициклен	136	426.7	-	-
59	928	α -Туйен	136	425.0	44.80	105.41
60	935	α -Пинен ^a	136	430.0	44.60	103.72
61	946	Камфен	136	432.0	44.70	103.47
62	950	Сабинен	136	436.7	-	-
63	953	-	-	-	-	-
64	956	-	-	-	-	-
65	967	3-метилнонан	142	440.9	49.72	112.77
66	975	β -Пинен	136	439.0	45.80	104.33
67	979	Октаналь	128	444.2	48.00	108.06
68	986	β -Мирцен	136	440.2	50.60	114.95
69	1000	α -Мирцен	136	440.2	50.60	114.95
70	1006	α -Фелландрен	136	444.0	-	-
71	1018	α -Терпинен	136	447.2	48.90	109.35
72	1026	<i>n</i> -Цимен	134	450.0	48.90	108.67
73	1028	Лимонен	136	451.0	49.00	108.65
74	1031	2-Метилгексанол-1	116	436.0	-	-
75	1034	Эвкалиптол	154	449.5	49.00	109.01
76	1035	β -Оцимен	134	450.0	50.60	112.44
77	1061	Артемизия кетон	152	454.0	-	-
78	1061	γ -Терпинен	136	456.2	51.40	112.67
79	1080	Гептановая кислота	130	495.0	72.00	145.45
80	1085	<i>i</i> -Терпинолен	136	449.0	-	-
81	1091	<i>Транс</i> -Сабинен-гидрат	154	474.0	-	-
82	1099	<i>n</i> -Ундекан	156	468.0	49.00	104.70
83	1102	α -Туйон	152	474.0	-	-
84	1110	β -Туйон	152	474.0	-	-
85	1121	Хризантенон	150	481.0	-	-
86	1152	Камфора	152	482.3	54.50	113.00
87	1172	3-Туйен-2-он	150	493.0	-	-
88	1183	1,4-Терпинеол	154	490.7	-	-
89	1190	<i>Транс</i> -Дигидрокарвеол	154	496.0	-	-
90	1196	Миртенол	152	495.0	-	-

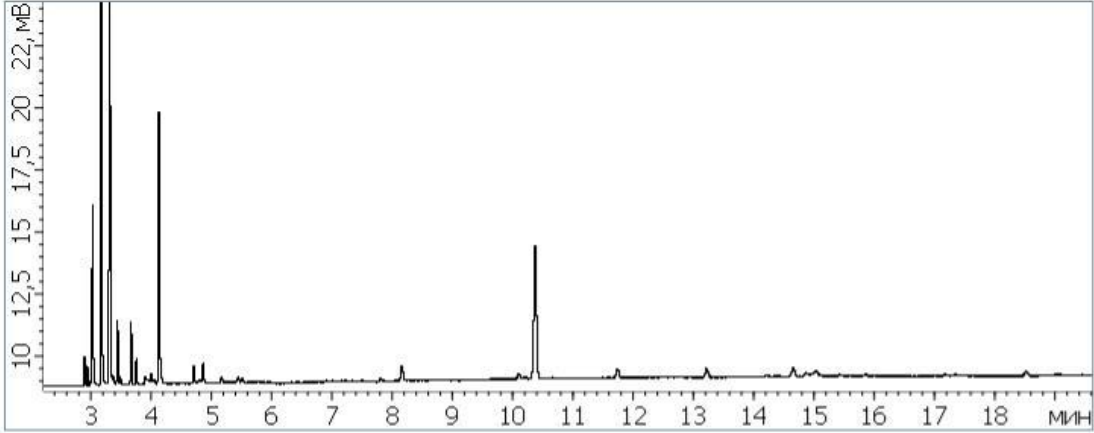
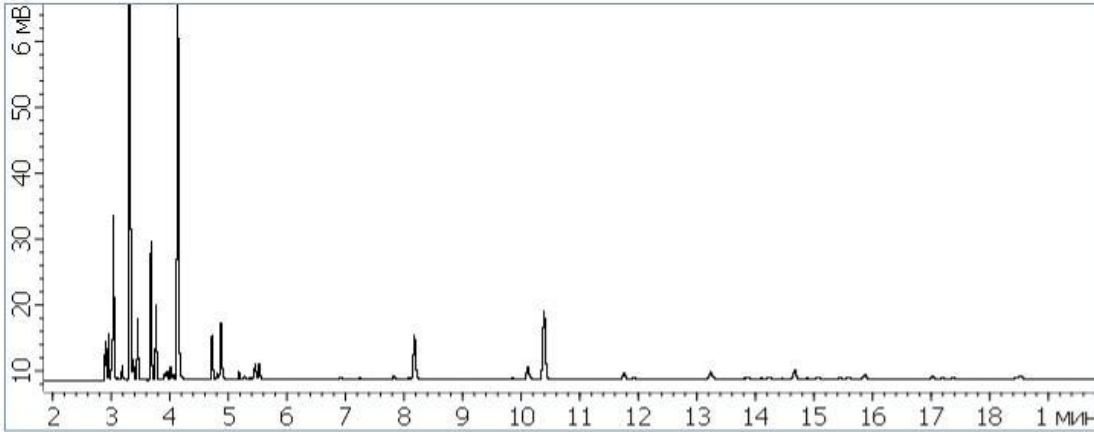
Таблица 2– Хроматограммы ЛРС и фитопрепаратов на его основе, полученные методом ПФА-ГХ-ДИП

Объект	Хроматограмма
Промышленный образец «Красногорсклексредства»	<p style="text-align: center;">Пижма обыкновенная</p> 
Промышленный образец «Травы Алтая»	
Промышленный образец «Фитофарм»	

Промышленный образец «Камелия-ЛТ»	
Промышленный образец «ВИЛАР»	
Таблетированный сухой экстракт «Танацехол»	

Календула лекарственная	
Промыш- ленный образец «Красно- горсклек- средства»	
Промыш- ленный образец «Фармпро- дукт»	
Промыш- ленный образец ZamonaRano	

Боярышник кроваво-красный	
Промыш- ленный образец «Фитофарм»	 <p>Chromatogram showing the separation of components in the industrial sample «Фитофарм». The x-axis represents time in minutes (2 to 19), and the y-axis represents intensity in mV (10 to 35). The chromatogram displays a series of peaks, with the most prominent ones occurring between 2 and 6 minutes, and a significant peak at approximately 8.5 minutes.</p>
Таблетки «Боярышник Премиум»	 <p>Chromatogram showing the separation of components in the «Боярышник Премиум» tablets. The x-axis represents time in minutes (2 to 19), and the y-axis represents intensity in mV (10 to 35). The chromatogram displays a series of peaks, with the most prominent ones occurring between 2 and 6 minutes, and a significant peak at approximately 17.5 minutes.</p>
Боярышник. Таблетки для рассасы- вания	 <p>Chromatogram showing the separation of components in the «Боярышник. Таблетки для рассасывания». The x-axis represents time in minutes (2 to 21.5), and the y-axis represents intensity in mV (10 to 22.5). The chromatogram displays a series of peaks, with the most prominent ones occurring between 2 and 6 minutes, and a significant peak at approximately 6.5 minutes.</p>

Зверобой продырявленный	
Промыш- ленный образец «Здоровье»	 <p>Chromatogram showing peaks at approximately 3.5, 4.5, and 10.5 minutes. The y-axis is labeled '22 мВ' and the x-axis is labeled 'МИН'.</p>
Промыш- ленный образец «Иван-чай»	 <p>Chromatogram showing peaks at approximately 3.5, 4.5, 8.5, and 10.5 minutes. The y-axis is labeled '6 мВ' and the x-axis is labeled '1 МИН'.</p>