

ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЭВКАЛИПТА ПРУТОВИДНОГО (*Eucalypti viminalis* *Labill*) С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РАЗЛИЧНЫХ СПОСОБОВ ПРОБОПОДГОТОВКИ

Л.В. Павлова, И.А. Платонов, Е.А. Новикова, Н.В. Никитченко

Самарский государственный аэрокосмический университет
Российская Федерация, 443086, г. Самара, Московское шоссе, д. 34
lora-pavlova@mail.ru

Поступила в редакцию 16 июля 2013 г.,
после исправления – 3 августа 2013 г.

Проведено исследование состава летучих органических соединений (ЛОС) листьев эвкалипта прутовидного (*Eucalypti viminalis Labill*) методом газо-жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием на колонках различной полярности с использованием трех вариантов пробоподготовки: газовая экстракция (или прямой парофазный анализ), газовая экстракция в сочетании с твердофазной микроэкстракцией с последующей термодесорбцией и жидкостная экстракция этиловым спиртом. Для повышения надежности идентификации при разделении компонентов были применены два разных режима программирования колонок.

Идентификация обнаруженных ЛОС проводилась с использованием библиотек масс-спектров и путем расчета индексов удерживания при линейном программировании температуры колонок и сопоставления их с литературными данными. Определены доминирующие ЛОС листьев эвкалипта прутовидного, которые могут быть использованы для определения подлинности и качества данного растительного сырья: α -пинен, β -пинен, ρ -цимен, лимонен, эвкалиптол, α -терпинеол, аромадендрен, глобулол, β -зудесмол.

Ключевые слова: лекарственное растительное сырье, летучие органические соединения, газо-жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием, парофазный анализ, твердофазная микроэкстракция, этанольный экстракт.

Павлова Лариса Викторовна – ведущий инженер, аспирант кафедры химии Самарского государственного аэрокосмического университета им. С.П. Королева.

Область научных интересов: хроматографический анализ объектов сложного состава природного и техногенного происхождения, методы пробоподготовки.

Соавтор 8 опубликованных работ.

Платонов Игорь Артемьевич – заведующий кафедрой химии Самарского государственного аэрокосмического университета им. С.П.Королева, доктор технических наук.

Область научных интересов: разработка аналитических схем контроля, методы пробоподготовки, приборостроение, разработка капиллярных колонок, газовая и жидкостная хроматография.

Автор/соавтор более 60 опубликованных работ.

Новикова Екатерина Анатольевна – ассистент кафедры химии Самарского государственного аэрокосмического университета им. С.П. Королева.

Область научных интересов – хроматографический анализ объектов сложного состава, методы пробоподготовки, метрологическое обеспечение анализа.

Автор/соавтор 35 опубликованных работ.

Никитченко Наталья Викторовна – научный сотрудник НОЦ «Хроматография» Самарского государственного аэрокосмического университета им. С.П. Королева.

Область научных интересов – хроматографический анализ объектов сложного состава природного и техногенного происхождения, методы пробоподготовки.

Введение

Эвкалипт прутовидный (*Eucalypti viminalis Labill*) является самым зимостойким видом эвкалиптов и самым распространенным в субтропических районах черноморского побережья Кавказа и стран СНГ. Его сырье наиболее доступно для фармации в нашей стране. В качестве сырья используют листья, заготовленные с ноября по апрель, когда накапливается максимальное количество эфирного масла и содержащегося в нем эвкалиптола (около 80 %). По требованиям Российской фармакопеи содержание эфирного масла в цельном сырье должно быть не менее 1 % мас. (цинеола 45 % мас.), в измельченном сырье – не менее 0.8 % мас. [1].

В последнее время эвкалипт прутовидный привлекает к себе внимание многих исследователей как объект для поиска реперных компонентов [2, 3], по которым возможна идентификация его в растительных сборах. Также изучены отходы после переработки растительного сырья эвкалипта прутовидного на предмет повторного извлечения биологически активных веществ в целях более полноценного использования растительного сырья [4]. Содержание летучих компонентов в этих случаях изучалось посредством анализа различных экстрактов и эфирного масла, полученного перегонкой с водяным паром. Оказалось, что качественные составы летучих органических соединений (ЛОС) эвкалипта прутовидного достаточно сильно различаются между собой у разных исследователей [2, 4, 5]. Есть предположение, что в данном случае играет роль происхождение растительного сырья, а также способы извлечения ЛОС [3]. Исследования авторов работы [6] доказали эффективное использование парофазного анализа (ПФА) для изучения летучих органических соединений растительного сырья.

Цель данной работы – изучение компонентного состава листьев эвкалипта прутовидного (*Eucalypti viminalis Labill*) методом ГЖХ-МС с использованием трех способов пробоподготовки: газовая экстракция (или прямой ПФА), газовая экстракция в сочетании с твердофазной микроэкстракцией (ТФМЭ) с последующей термодесорбцией (или ПФА в сочетании с ТФМЭ) и жидкостная экстракция этиловым спиртом.

Экспериментальная часть

Для проведения исследований использовалось растительное сырье (листья эвкалипта прутовидного (*Eucalypti viminalis Labill*) производства ПКФ «Фитофарм» ООО), приобретенное в аптечной сети.

Первый способ пробоподготовки – прямой ПФА листьев эвкалипта прутовидного был проведен согласно условиям, описанным в работе [6] как оптимальные для получения представительного газового экстракта. Образец листьев эвкалипта прутовидного массой 1 г помещали в пеницилли-

новый флакон, который герметично закрывали резиновой пробкой с фторопластовой прокладкой. Флакон с образцом устанавливали в контейнер для ПФА, затем контейнер с образцом термостатировали при температуре 100 °С в течение 30 минут с последующим вводом 1 мл газового экстракта в испаритель хроматографа.

Второй способ пробоподготовки - ПФА в сочетании с ТФМЭ осуществляли с использованием концентрационных микроловушек, заполненных сорбентом HayeSep 80/100 меш. Приготовление микроловушек проводили согласно условиям, описанным в работе [6]. Для концентрирования ЛОС из газовой фазы в контейнер с образцом после 30 минутного термостатирования при температуре 100 °С помещали концентрационную микроловушку, охлаждаемую водой при температуре 20 °С, и проводили аспирацию газовой фазы над образцом в объеме 100 мл. Ввод пробы осуществляли, помещая концентрационную микроловушку в испаритель хроматографа с задержкой ввода в течение 4 с, объем вводимой пробы составлял 1 мл.

Третий способ пробоподготовки - жидкостную экстракцию проводили с использованием этилового спирта в качестве экстрагента по ГФ XI [7]. Для приготовления этанольного экстракта (ЭЭ) 20 г сухих листьев эвкалипта заливали 100 мл 70 % этилового спирта и выдерживали в течение 5 дней при комнатной температуре, затем при температуре 7 ± 3 °С в течение 2 дней. Выпавший осадок отделяли декантированием. 1 мкл полученного ЭЭ вводили в испаритель газового хроматографа.

Анализ полученных экстрактов проводили на газовом хроматографе Agilent 7890 GC, совмещенном с масс-селективным детектором с ионизацией электронным ударом 5975С производства Agilent Technologies, энергия ионизации – 70 эВ. Использовали кварцевые капиллярные колонки: 1) колонка с малополярной неподвижной фазой HP-5ms 30 м × 0.25 мм с толщиной пленки 0.25 мкм (Agilent, США); 2) колонка с полярной неподвижной фазой Restek Stabilwax-DA 60 м × 0.32 мм с толщиной пленки 0.5 мкм. Разделение проводили при следующих режимах программирования температуры: режим № 1 – изотерма 40 °С в течение 5 мин, нагрев до 80 °С со скоростью 2 °С/мин, нагрев до 150 °С со скоростью 7 °С/мин, изотерма 5 мин, нагрев до 250 °С со скоростью 10 °С/мин, изотерма 5 мин; режим № 2 [9] – изотерма 50 °С в течение 2 мин – нагрев до 240 °С со скоростью 4 °С/мин – нагрев до 280 °С со скоростью 20 °С/мин – изотерма 280 °С в течение 5 мин. Температура испарителя при прямом ПФА – 220 °С, при ПФА в сочетании с ТФМЭ и анализе ЭЭ – 270 °С. Температура ионного источника – 230 °С; температура квадруполя – 150 °С; температура переходной линии – 280 °С. В качестве газа-носителя использовали гелий. Поток газа в колонке – 1 мл/мин; режим ввода – Split 1:20. Идентификация компонентов проводилась с

использованием библиотеки спектров WILEY8 и NIST08. Диапазон сканирования 45-500 m/z .

Газохроматографический эксперимент проводили в следующей последовательности:

1. Холостой опыт без растительных объектов в сосуде и в микроловушке;
2. Анализ смеси *n*-алканов C_5-C_{19} при режимах программирования колонки № 1 и № 2 с использованием для разделения малополярной колонки HP-5ms;
3. Прямой ПФА листьев эвкалипта прутовидного при режиме программирования температуры колонки № 1 с использованием для разделения малополярной колонки HP-5ms;
4. ПФА листьев эвкалипта прутовидного в сочетании с ТФМЭ при режиме программирования температуры колонки № 1 с использованием для разделения малополярной колонки HP-5ms;
5. ПФА листьев эвкалипта прутовидного в сочетании с ТФМЭ при режиме программирования температуры колонки № 2 с использованием для разделения малополярной колонки HP-5ms;
6. Прямой ПФА листьев эвкалипта прутовидного при режиме программирования температуры колонки № 1 с использованием для разделения полярной колонки Restek Stabilwax-DA;
7. ПФА листьев эвкалипта прутовидного в сочетании с ТФМЭ при режиме программирования температуры колонки № 1 с использованием для разделения полярной колонки Restek Stabilwax-DA;
8. Анализ ЭЭ эвкалипта прутовидного при режиме программирования температуры колонки № 1 с использованием для разделения малополярной колонки HP-5ms.

Количественную оценку содержания компонентов в пробе проводили методом внутренней нормализации по формуле:

$$C = 100 \frac{Q_i}{\sum_{i=1}^n Q_i}, \quad (1)$$

где C – содержание компонента в смеси, %; Q_i – площадь пика i -го компонента, mV ; n – количество компонентов.

На основании газохроматографического эксперимента рассчитывали индексы удерживания ЛОС растительного сырья при линейном программировании температуры колонки I_i^T по формуле [8]:

$$I_i^T = 100 \cdot \left(\frac{t_{R_i} - t_{R_z}}{t_{R_{z+1}} - t_{R_z}} \right) + 100z, \quad (2)$$

где t_{R_i} – время удерживания исследуемого i -го компонента пробы; t_{R_z} и $t_{R_{z+1}}$ – время удерживания соседних гомологов *n*-алканов (веществ сравнения) с числом углеродных атомов в молекулах z и $(z + 1)$ соответственно. При выполнении расчетов в уравнение подставляют не температуры, а соответствующие времена удерживания, так как численные значения температуры удерживания

исследуемого вещества и *n*-алканов прямо пропорциональны исправленным временам удерживания, а время удерживания можно измерить с большей точностью, чем температуру. Вносить поправку на мертвое время нет необходимости, поскольку и числитель, и знаменатель содержат разность двух величин [8].

Результаты и обсуждения.

На рисунке представлены хроматограммы, полученные при различных способах пробоподготовки – при прямом ПФА листьев эвкалипта прутовидного (рис., а), при ПФА в сочетании с ТФМЭ (рис., б), при анализе ЭЭ (рис., в).

При прямом ПФА листьев эвкалипта прутовидного обнаружено 119 компонентов, из которых

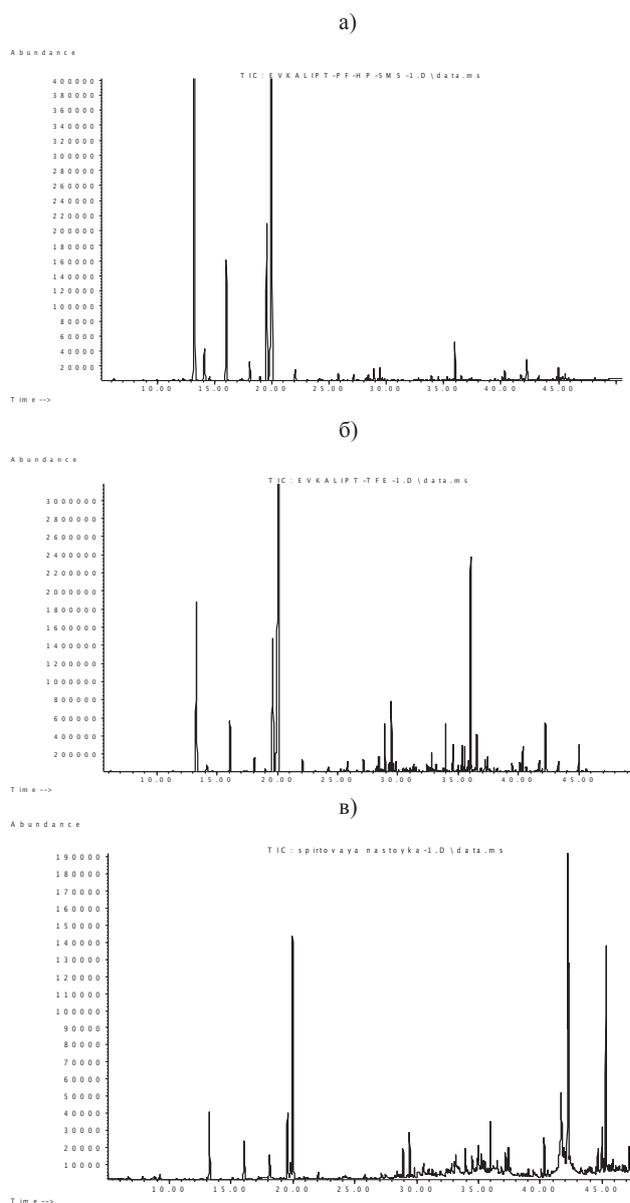


Рис. Хроматограммы, полученные при анализе листьев эвкалипта прутовидного при режиме № 1 программирования колонок: а – прямой ПФА; б – ПФА в сочетании с ТФМЭ, в – этанольный экстракт

76 удалось идентифицировать по масс-спектрам с вероятностью более 90 %. На хроматограмме на рис., а выделяются 10 характерных пиков, имеющих времена удерживания 13.26, 14.15, 16.05, 18.09, 19.61, 19.98, 22.07, 28.94, 36.06, 42.27 мин. Масс-спектрометрический анализ показал, что это α -пинен ($I^r = 926$), камфен (939), β -пинен (967), α -филандрен (997), цимен (1018), эвкалиптол (1024), γ -терпинен (1052), 4-терпинеол (1169), α -терпинеол (1181) аромадендрен (1444) β -зудесмол (1659) соответственно. Они составляют 92.5 % всех летучих компонентов газовой фазы исследуемого образца. Также среди обнаруженных соединений присутствуют углеводороды, спирты, альдегиды, карбоновые кислоты, сложные эфиры. Индексы удерживания и относительное количественное содержание идентифицированных компонентов представлено в табл. 1. Суммарное содержание альдегидов в пробе составляет 0.24, кетонов – 0.17 % мас. Общее содержание углеводов терпеновой природы не представляется возможным определить, поскольку 43 ЛОС не удалось точно идентифицировать, но нужно отметить, что масс-спектры большинства неидентифицированных соединений практически повторяли масс-спектры ранее обнаруженных терпенов и сесквитерпенов.

При ПФА листьев эвкалипта прутовидного в сочетании с ТФМЭ было обнаружено 132 компонента (рис., б). При сравнении хроматограмм на рис., а и на рис., б видно, что интенсивность хроматографических сигналов летучих компонентов при использовании ТФМЭ выше, чем у аналогичных сигналов, полученных в режиме прямого ПФА, примерно в 10 раз, при этом наблюдается значительное увеличение количества обнаруженных ЛОС. С вероятностью более 90 % идентифицировано 87 компонентов, причем количество компонентов по сравнению с прямым ПФА возросло за счет увеличения числа терпеновых углеводородов, появления производных нафталина, новых производных азулена. Необходимо отметить, что на хроматограмме, полученной при ПФА в сочетании ТФМЭ (рис., б), выделяются 19 пиков, в число которых входят компоненты, обозначенные как доминирующие при прямом ПФА, а также пики, соответствующие уксусной кислоте ($I^r = 619$), терпенил ацетату (1348), копаену (1379), α -гурьюнену (1413), кариофиллену (1422), аллоаромадендрену (1465), глобулолу (1592), β -зудесмолу (1649) и α -зудесмолу (1651), что составляет 79.24 % от общего количества обнаруженных компонентов. Количественное соотношение компонентов отличается за счет обнаружения при использовании ТФМЭ новых соединений. В табл. 1 представлены индексы удерживания и относительное количественное содержание идентифицированных ЛОС в газовом экстракте листьев эвкалипта прутовидного, обнаруженных с применением ТФМЭ. Кроме того, после концентрирования в пробе возросло количество произво-

дных азулена – спатуленол (0.51 % мас.), глобулол (1.41), леден (0.72), изоледен (0.26), α -хумулен (0.15), α -гурьюнен (0.78), β -гурьюнен (0.38), аромадендрен (8.81), аллоаромадендрен (1.57), производных нафталина – γ -мууролен (0.25), β -селинен (0.59), α -зудесмол (0.78), β -зудесмол (1.87), γ -зудесмол (0.4), γ -кадинен (0.15), α -калакорен (0.03).

Таким образом, общее количество обнаруженных ЛОС при проведении ПФА в сочетании с ТФМЭ выше, чем при прямом ПФА, что указывает на предпочтительное использование ТФМЭ при ПФА для наиболее полного изучения ЛОС газового экстракта растительного сырья.

В работе [9] указано, что индексы удерживания сильно зависят от температурного режима, даже если анализ проводится на одной и той же колонке. Также отмечено, что индекс удерживания при переходе от «медленного» к «быстрому» режиму программирования температуры у одних соединений меняется мало, у других увеличивается на 30 единиц и более, к тому же может измениться порядок элюирования компонентов с мало различающимися индексами удерживания. В связи с этим обстоятельством, наряду с анализами газового экстракта эвкалипта прутовидного при «медленном» режиме программирования температуры (режим № 1), все вышеописанные процедуры были проведены при «быстром» режиме программирования температуры колонок – режим № 2, рекомендованном Подкомитетом эфирных масел Комитетом аналитических методов для получения воспроизводимых «отпечатков пальцев» эфирных масел с использованием капиллярной газовой хроматографии на неполярных стационарных фазах [9]. В работе [9] также опубликованы линейные индексы удерживания, полученные при анализе чистых веществ на режиме № 2 с использованием колонки HP-5ms 30 м × 0.25 мм × 0,25 мкм на ГХ-МС комплексе Agilent 6890-5973N. Анализ результатов, полученных при прямом ПФА и ПФА в сочетании с ТФМЭ показал, что порядок элюирования компонентов газового экстракта не изменился. В табл. 1 приведены линейные индексы удерживания идентифицированных ЛОС, полученные в данном исследовании и в работе [9]. Сравнительная оценка представленных данных показывает совпадение рассчитанных и опубликованных величин в пределах погрешности определения индексов удерживания, составляющей 2 ед. индекса [6] и 5-10 ед. индекса при межлабораторной воспроизводимости для стандартных неполярных неподвижных фаз ряда полидиметилсилоксанов [9], что подтверждает надежность идентификации ЛОС в газовом экстракте эвкалипта прутовидного.

Анализ данных, представленных в таблице, позволил выявить сомнительные варианты идентификации компонентов. Компонент со временем удерживания 19.61 мин мог быть идентифицирован и как орто-цимен, и как пара-цимен, но определение

Таблица 1

Компонентный состав листьев эвкалипта прутовидного, полученный при различных способах пробоподготовки и условиях анализа

№ п/п	Время удерживания, при режиме № 1, мин		Компонент	Индекс удерживания на малополярной колонке HP-5ms, I_T			Содержание ЛОС, % от общего количества				
	Малополярная колонка HP-5ms	Полярная колонка Restek Stabilwax-DA		Режим № 1	Режим № 2	Литературные данные [9]	Малополярная колонка HP-5ms		Полярная колонка Restek Stabilwax-DA		
							Прямой ПФА	ПФА в сочетании с ТФМЭ	Анализ ЭЭ	Прямой ПФА	ПФА в сочетании с ТФМЭ
1	2.25	9.81	2-метилфуран*	609	-	-	0.05	-	-	0.15	-
2	2.35	37.45	Этановая кислота*	619	602	-	-	1.50	-	-	1.88
3	2.73	11.87	3-метилбутаналь*	644	646	-	0.11	0.06	0.03	1.22	-
4	2.86	11.66	2-метилбутаналь*	654	656	-	0.03	-	0.02	0.22	-
5	3.41	13.75	2-этилфуран*	704	701	-	0.14	-	-	0.24	-
6	3.94	33.35	1-гидрокси-2-пропанол	721	-	-	-	0.04	-	-	0.05
7	4.38	40.24	Пропановая кислота*	745	788	-	0.08	0.05	0.15	-	0.39
8	6.23	21.95	Гексаналь*	798	799	801	0.11	0.11	-	0.24	-
9	7.72	-	2-фуральдегид	828	829	829	-	0.02	0.14	-	-
10	8.57	43.85	3-метилбутановая кислота*	844	834	838	0.04	0.04	0.22	-	0.21
11	12.93	-	α-Туйен	921	925	926	0.05	0.01	0.04	-	-
12	13.26	17.43	α-Пинен*	926	932	932	31.67	11.12	2.63	21.06	3.61
13	14.08	19.75	α-Фенчен*	938	946	945	0.03	0.11	-	-	0.57
14	14.15	20.40	Камфен*	939	946	947	2.06	0.45	0.08	0.97	0.21
15	14.59	24.17	Вербенен*	945	952	952	0.20	0.05	-	-	0.05
16	15.07	-	Бензальдегид	952	958	958	0.02	0.04	-	-	-
17	16.05	22.75	β-Пинен*	967	975	975	6.22	3.22	1.64	4.11	1.31
18	17.23	34.28	6-Метил-5-гептен-2он*	984	986	987	0.05	0.06	-	-	0.05
19	17.45	26.83	β-Мирицен*	987	990	991	0.08	0.08	0.03	-	-
20	18.09	49.09	α-Феландедрен*	997	1003	1004	0.92	0.98	1.14	0.69	1.14

21	18.27	-	Октаналь	1001	1004	1003	-	0.07	-	-	-	-
22	18.99	27.80	α-Терпинен*	1010	1015	1017	0.18	0.20	0.05	0.20	0.20	0.21
23	19.61	32.15	ρ-Цимен*	1017	1024	1024	8.63	11.34	3.09	3.64	3.64	7.98
24	19.83	28.83	Лимонен*	1021	1028	1028	1.06	1.14	0.82	1.78	1.78	1.71
25	19.98	29.41	Эвкалиптол*	1023	1030	1031	39.69	28.66	10.87	16.82	16.82	15.91
26	20.97	-	Фенилпропаналь	1036	1041	1042	-	0.04	-	-	-	-
27	22.07	30.98	γ-Терпинен*	1051	1058	1058	0.53	0.79	0.30	0.12	0.12	0.79
28	23.11	37.28	Линалоол оксид*	1066	1072	-	0.03	0.10	0.08	-	-	0.19
29	24.21	32.43	α-Терпинолен*	1081	1088	1088	0.07	0.44	0.24	-	-	0.14
30	25.23	40.24	Линалоол*	1095	1099	1100	0.02	0.22	0.06	-	-	0.39
31	25.71	32.63	3 - М е т и л - 3 - метилбутилбутаноат*	1103	1105	-	0.02	0.12	0.03	-	-	0.17
32	25.83	41.87	D-Фенхол*	1106	1112	1113	0.32	0.60	0.14	-	-	0.95
33	26.60	-	Камфоленаль	1123	1126	1126	0.04	0.11	-	-	-	-
34	27.16	47.29	транс-Пинокарвеол*	1133	1138	1138	0.24	0.67	0.17	-	-	0.51
35	27.43	-	Камфор	1142	1144	1144	-	0.03	0.14	-	-	-
36	27.94	-	Ментон	1153	1153	1154	-	0.03	0.05	-	-	-
37	28.27	42.14	Пинокарвон*	1156	1162	1162	0.10	0.27	0.08	-	-	0.56
38	28.43	44.92	Борнеол*	1159	1165	1166	0.22	0.66	0.27	-	-	0.97
39	28.79	43.31	Ментол*	1172	1172	1175	0.23	0.07	0.07	-	-	0.14
40	28.94	42.53	4-Терпинеол*	1169	1177	1177	0.40	1.95	0.87	-	-	2.68
41	29.30	47.53	ρ-Цимен-8-ол*	1177	1185	1184	0.06	0.35	0.25	-	-	0.56
42	29.50	44.70	α-Терпинеол*	1181	1190	1191	0.43	2.79	1.35	-	-	4.00
43	29.62	43.73	Миртеналь*	1183	1195	1195	0.02	0.15	0.08	0.04	0.04	0.45
44	29.67	46.66	Миртенол*	1184	1196	1197	0.08	0.31	0.10	0.05	0.05	0.68
45	29.85	48.44	α-Феландрен эпоксид*	1196	1202	-	0.05	0.56	0.26	-	-	0.28
46	30.08	45.58	Вербенон*	1201	1210	1210	0.01	0.11	-	-	-	0.16
47	30.43	47.29	транс-Карвеол*	1214	1219	1219	-	0.19	0.12	-	-	0.51
48	30.47	48.32	Фенчил ацетат*	1219	1220	1221	0.04	0.06	-	-	-	0.05
49	30.60	45.47	Экзо-2-гидроксицинеол*	1219	1223	1224	0.02	0.08	0.16	-	-	0.19
50	31.05	46.87	2-метил-3-фенилпропаналь*	1235	1240	1241	0.02	0.07	-	-	-	0.05
51	31.19	45.95	Карвон*	1240	1244	1245	-	0.05	0.11	-	-	0.18
52	31.30	-	Карвотанациетон	1244	1247	1249	0.03	0.26	0.26	-	-	-
53	31.49	45.88	Пиперитон*	1251	1254	1255	0.02	0.22	0.10	-	-	0.25
54	32.05	-	Феландраль	1271	1275	1276	-	0.03	-	-	-	-
55	32.43	51.75	Тимол*	1284	1259	1292	0.03	0.25	0.39	-	-	0.56

56	32.51	-	Цуминол	1287	1290	1293	0.05	0.02	0.36	-	-
57	32.82	52.05	Карвакрол*	1298	1302	1302	0.06	0.63	0.39	-	0.45
58	33.91	44.84	Терпенилацетат*	1348	1352	1351	0.12	1.30	0.75	-	2.73
59	34.49	52.63	Изоледен*	1375	1378	-	-	0.26	-	-	0.45
60	34.56	39.14	Копаен*	1379	1378	1378	0.15	0.85	0.11	-	1.15
61	35.32	40.55	α-Гурьюнен*	1413	1412	1412	0.11	0.78	-	-	1.31
62	35.54	42.74	Кариофиллен*	1422	1422	1422	0.06	0.84	0.42	-	1.11
63	35.84	42.62	β-Гурьюнен*	1434	1435	1433	0.06	0.38	0.16	-	0.48
64	36.06	43.03	Ароматендрен*	1444	1442	1440	1.24	8.81	1.41	-	10.26
65	36.36	44.57	α-Хумулен*	1456	1457	1456	0.01	0.15	-	-	0.08
66	36.56	43.99	Аллоароматендрен*	1465	1464	1464	0.17	1.57	0.59	-	2.87
67	36.83	44.14	γ-Гурьюнен*	1476	1476	1473	0.01	0.13	0.28	-	0.18
68	36.91	-	γ-Мууролен	1480	1479	1480	0.02	0.25	-	-	-
69	37.22	45.67	β-Селинен*	1492	1490	1488	0.05	0.59	1.13	-	1.11
70	37.27	-	δ-Селинен	1496	1492	1492	-	0.13	-	-	-
71	37.45	45.02	Леден*	1501	1499	1496	0.11	0.72	-	-	0.97
72	37.58	-	α-Мууролен	1505	1503	1502	0.05	0.05	-	-	-
73	37.96	46.31	γ-Кадинен*	1517	1518	1517	0.01	0.15	-	-	0.20
74	38.16	47.13	Дегидроароматендрен*	1523	1523	-	0.03	0.10	-	-	0.19
75	38.25	46.13	δ-Кадинен*	1526	1527	1527	0.03	0.17	-	-	0.27
76	38.89	-	α-Калакорен	1542	-	1546	0.01	0.03	0.10	-	-
77	39.07	-	Элемол	1548	1553	1553	0.01	0.06	0.28	-	-
78	39.48	50.00	Неролидол*	1559	1564	1565	0.09	0.44	0.24	-	0.36
79	40.14	51.70	Спатуленол*	1583	1582	1580	0.15	0.51	0.33	-	0.61
80	40.32	51.12	Глобулол*	1592	1588	1587	0.39	1.41	1.61	-	2.08
81	40.62	51.20	Эпиглобулол*	1598	1595	1593	0.07	0.16	0.31	-	0.39
82	40.98	50.61	Ледол*	1603	1596	1606	0.02	0.07	0.27	-	0.33
83	41.52	51.60	Розифолиол*	1631	1607	-	-	0.06	0.84	-	0.17
84	41.76	52.28	γ-Эудесмол*	1637	1636	1633	0.30	0.42	6.17	-	0.82
85	41.96	52.49	Хинезол*	1646	1644	-	0.05	0.09	0.86	-	0.11
86	42.27	53.37	β-Эудесмол*	1649	1655	1651	0.71	1.87	10.62	-	3.89
87	42.33	53.19	α-Эудесмол*	1651	1658	1655	0.25	0.78	5.63	-	1.76
88	44.66	-	10-ди-эпи-γ-Эудесмол	1781	-	-	0.01	0.04	0.79	-	-
89	45.35	-	Эпи-криптомеридиол	1823	-	-	0.08	0.23	5.41	-	-

Примечание: * – вещества, одинаково идентифицированные на разнополярных колонках.

индекса удерживания позволило отнести его к парациму. Компонент со временем удерживания 39.48 мин идентифицировался системой с вероятностью 99 % как эпиглобулол, однако сравнение полученного индекса удерживания с приведенным в работе [9], позволило определить данное вещество как неролидол. Аналогично проведена идентификация аромадендрена и аллоаромандендрена, тимола и карвакрола и других компонентов.

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

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

оксид, 1,8-ментадиен-4-ол, куминовый альдегид. Нахождение их в газовом экстракте сомнительно, т.к. не подтверждено анализом на малополярной колонке HP-5ms.

Состав ЭЭ, полученного из изучаемого сырья, отличается от состава исследованной газовой фазы листьев эвкалипта прутовидного и содержит 149 компонентов, из которых только 63 компонента совпадают с обнаруженными в газовом экстракте (табл. 1). На рис., в представлена хроматограмма ЭЭ, полученная в режиме программирования температуры колонок № 1. Нужно отметить, что в ЭЭ обнаружено значительное содержание более тяжелых компонентов, которые элюируются при температуре более 200 °С – это β-селинен ($I^T = 1492$), глобулол (1592), γ-эудесмол (1631), хинезол (1646), β-эудесмол (1649), α-эудесмол (1651), 10-эпи-γ-эудесмол (1781), эпи-критомеридол (1823). По сравнению с анализом газового экстракта, в ЭЭ особенно выросло содержание γ-эудесмола (6.17 мас. %), β-эудесмола (10.62), α-эудесмола (5.66), 10-ди-эпи-γ-эудесмола (0.79), эпи-критомеридиола (5.41). В ЭЭ присутствует большое число соединений, имеющих индекс удерживания I^T более 1700, которые не удалось идентифицировать. ГХЖ-МС анализ ЭЭ обнаружил ряд компонентов, которые не были выявлены при прямом ПФА и ПФА сочетании с ТФМЭ: метилэтанат ($I^T = 696$), этенилпропанат (704), 1,1-диэтилэтанат (728), метил-2-пропеноат (767), пентановая кислота (847), этил-3-метилбутанат (851), 1,1-диэтил-2-метилпропанат (857), 2(5H)фуранон (916), 1,1-диэтокси-3метилбутан (954), 5-метил-2-фуральдегид (960), фенол (985), 2-диметил-4-гидрокси-3(2H)-фуранон (1057), диэтилпропандиат (1073), 1-метил-4-(1-метилэтенил)бензол (1082), 2-метилбутил-3-метилбутанат (1103), 2,3-дигидро-3,5-дигидрокси-6-метил-4Нпиран-4-он (1143), 1,2-бензолдиол (1204), 1-этенил-4-гидроксибензол (1218), диэтилгидроксибутандиат (1266), 1,4-бензолдиол (1281), третбутилфенол (1289), 4-этенил-2-метоксифенол (1308), 2,6-диметоксифенол (1352), эвгенол (1357), 4-ацетоксибензальдегид (1368), 2-пропилфенол (1375), бициклогексил-2,3-дион (1690), пальмитиновая кислота (1963), этилпальмитат (1983), фитол (2117), линоленовая кислота (2142), этиллинолеат (2165), этиллиноленат (2173), этилстеарат (2196), 2,4,6-трифенил-1-гексен (2472). Появление данных компонентов может быть объяснено большей проникающей способностью этанола и, как следствие, большей эффективностью экстракции. В целом, в ЭЭ эвкалипта прутовидного присутствуют практически те же ЛОС, что и в газовом экстракте, за исключением вышперечисленных компонентов, однако соотношение ЛОС отличается. Доминирующими компонентами спиртовой настойки являются: 1,1-диэтоксиэтан (1.02 % мас.), α-пинен (2.63), β-пинен (1.64), α-феландрен (1.14), р-цимен (3.09), эвкалиптол (10.87), α-терпинеол (1.35), аромадендрен (1.41), β-селинен (1.13), глобулол (1.61),

γ-эудесмол (6.17), β-эудесмол (10.62), α-эудесмол (5.66), эпи-критомеридол (5.41) этилпальмитат (1.29).

Всестороннее исследование газового и этанольного экстрактов листьев эвкалипта прутовидного позволило идентифицировать ряд ЛОС и выявить компоненты, которые определяют характерный хроматографический профиль изучаемого растения. В табл. 2 представлены ЛОС, содержание которых составляет более 1 % мас. при анализе листьев эвкалипта прутовидного с использованием различных видов пробоподготовки, а также данные из литературных источников [4, 5]. В работе [4] изучено эфирное масло эвкалипта прутовидного, в работе [5] густой спиртовой экстракт. Как видно из представленных данных, количество доминирующих соединений разное, т.е. получить одинаковый хроматографический профиль при использовании разных способов пробоподготовки невозможно. О характерном хроматографическом профиле можно говорить только при использовании единого способа пробоподготовки и режима анализа. Тем не менее, в общих чертах характерный

хроматографический профиль прослеживается даже при разных способах пробоподготовки (рис.), ряд компонентов присутствуют в большинстве случаев (выделены жирным шрифтом в табл. 2): α-пинен, β-пинен, p-цимен, лимонен, эвкалиптол, α-терпинеол, аромадендрен, глобулол, β-эудесмол. Совокупность этих ЛОС можно обозначить как характерный хроматографический профиль листьев эвкалипта прутовидного.

Заключение

Исследование компонентного состава лекарственного растительного сырья листьев эвкалипта прутовидного (*Eucalyptus viminalis Labill*) методом ГХ-МС с применением прямого ПФА позволило идентифицировать 76 компонентов, а при ПФА в сочетании с ТФМЭ – 87 компонента. Основную массу идентифицированных соединений составляют терпеновые и сесквитерпеновые углеводороды – более 90 %. Анализ газового экстракта эвкалипта прутовидного при разных режимах программирования термостата колонок с последую-

Таблица 2

Доминирующие ЛОС, определенные при анализе листьев эвкалипта прутовидного с использованием различных способов пробоподготовки

№ п/п	Компонент	Содержание ЛОС, % от общего количества				
		Прямой ПФА	ПФА в сочетании с ТФМЭ	Анализ ЭЭ	[2]	[4]
1	1,1-Диэтоксиэтан	-	-	1,02	-	-
2	α-Пинен	31.67	11.12	2.63	7.0	-
3	Камфен	2.06	-	-	-	-
4	β-Пинен	6.22	3.22	1.64	-	-
5	α-Феландрен	-	-	1.14	-	2.64
6	p-Цимен	8.63	11.34	3.09	3.2	1.67
7	Лимонен	1.06	1.14	-	3.1	-
8	Эвкалиптол	39.69	28.66	10.87	71.1	34.13
9	транс-Пинокарвеол	-	-	-	-	1.12
10	4-Терпинеол	-	1.95	-	-	-
11	α-Терпинеол	-	2.79	1.35	-	1.38
12	Терпенилацетат	-	1.30	-	-	-
13	Леден	-	-	-	-	1.43
14	Аромадендрен	1.24	8.81	1.41	-	21.59
15	Аллоаромадендрен	-	1.57	-	1.9	3.29
16	Эликсен	-	-	-	1.7	-
17	Эпиглобулол	-	-	-	-	1.93
18	β-Селинен	-	-	1.13	-	-
19	Глобулол	-	1.41	1.61	-	8.17
20	γ-Эудесмол	-	-	6.17	-	-
21	Розифолиол	-	-	-	-	1.17
22	β-Эудесмол	-	1.87	10.62	-	1.62
23	α-Эудесмол	-	-	5.63	-	-
24	Эпи-критомеридиол	-	-	5.41	-	-
25	Этилпальмитат	-	-	1.29	-	-

щим расчетом линейных индексов удерживания и сравнение их с литературными данными [9] внесли коррективы в процесс идентификации. Сравнение результатов ГХ-МС анализа на разнополярных колонках позволило надежно идентифицировать только 65 компонентов летучей фракции эвкалипта прутовидного. Общее количество обнаруженных ЛОС при проведении ПФА в сочетании с ТФМЭ выше, чем при прямом ПФА, что указывает на предпочтительное использование ТФМЭ при ПФА для наиболее полного изучения ЛОС газового экстракта растительного сырья. Анализ состава ЭЭ эвкалипта прутовидного выявил практически полное совпадение с составом летучей фракции растительного сырья, обнаруженного при ПФА в сочетании с ТФМЭ.

Во всех исследуемых образцах можно выделить 10 летучих органических соединений, которые являются доминирующими: α -пинен ($I^T = 926$), β -пинен (967), p -цимен (1018), лимонен (1021), эвкалиптол (1024), α -терпинеол (1181), аромадендрен (1444), аллоаромадендрен (1465), глобулол (1592), β -эудесмол (1649). Данные соединения можно отнести к фингерпринтам («отпечаткам пальцев») данного растения, и, следовательно, по ним можно проводить оценку подлинности данного вида лекарственного растительного сырья, причем получение характерного хроматографического профиля исследуемого сырья следует проводить, используя только тот способ пробоподготовки, посредством которого была получена хроматограмма сравнения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Куркин В.А. Фармакогнозия. Самара: Офорт, 2007. с. 346-348.
2. Изучение состава растительного лекарственного сбора методом газо-жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием / Н.А. Кузьменко и [др.] // Вестн. Моск. Ун-та. Сер.2. Химия. 2010. Т. 51, № 2. С. 132-138.
3. Разживин Р.В. Определение веществ-маркеров при исследовании комплексных препаратов из лекарственного растительного сырья. Автореф. дис. ... канд. фарм. наук. М.: 2008. 28 с.
4. Зильфикаров И.Н., Алиев А.М. Сравнительное фитохимическое исследование эфирного масла и сверхкритического флюидного CO_2 -экстракта из листьев эвкалипта прутовидного // Сверхкритические флюиды: теория и практика. Т. 3, № 2. 2008. С. 43-51.
5. Изопреноидный состав спиртового экстракта листьев *Eucalyptus viminalis* / О.Н. Кошевой и [др.] // Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики. 2011, вип. XXIV, № 2. С. 23-25.
6. Газохроматографический анализ ромашки аптечной / Л.В.Павлова и [др.] // Аналитика и контроль. 2013. Т. 17, № 1. С. 65-79
7. Фармакопея СССР. Изд. 11. Вып. 2. М.: Медицина, 1989. С. 216.
8. Практическая газовая и жидкостная хроматография. Учебное пособие / Б.В. Столяров и [др.]. СПб: Изд-во С.-Петербург. ун-та, 1998. С. 248-249.
9. Ткачев А.В. Исследование летучих веществ растений. Новосибирск: Офсет, 2008. 969 с.

GAS CHROMATOGRAPH-MASS SPECYTROMETRY ANALYSIS EUCALYPTUS VITAMINALIS (*Eucalypti viminalis Labill*), USING VARIOUS METHODS SAMPLING

L.V. Pavlova, I.A. Platonov, E.A. Novikova, N.V. Nikitchenko

Samara State Aerospace University named after academician S.P. Korolyov
(national research university)
Moskovskoye sh., 34, Samara, 443086, Russian Federation
lora-pavlova@mail.ru

In this paper we carried out the GC-MS study on columns of various polarity of volatile organic compounds (VOCs) of the gas phase of eucalyptus *viminalis* (*Eucalypti viminalis Labill*) using three sample preparation techniques: by direct headspace analysis, analysis using solid-phase microextraction with thermal desorption, and extraction with ethyl alcohol. Two different modes of programming of columns were applied to increase of reliability of identification at division of components.

Identification of the detected VOCs was conducted using mass-spectral libraries and by calculating of retention indexes at linear temperature programming columns and comparing them with the literature data. Dominant VOCs of eucalyptus *viminalis* were identified, which can be used to determine the authenticity and quality of plant material: α -pinen, β -pinen, p -cimen, limonen, eucaliptol, α -terpineol, aromadendren, globulol, β -eudesmol.

Key words: plant raw materials, gas chromatography with mass selective detection (GC-MS), volatile organic compounds (VOC), headspace analysis (HS), solid phase microextraction (SPME), ethyl alcohol extract.