

**ВЭЖХ-МЕТОД КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭФИРНЫХ МАСЕЛ
В ЗМЕЕГОЛОВНИКЕ МОЛДАВСКОМ (*DRACOCEPHALUM MOLDAVICA* L.)
ESSENTIAL OILS' HPLC QUANTITATIVE ANALYSIS IN RAW MATERIALS
OF MOLDAVIAN DRAGONHEAD (*DRACOCEPHALUM MOLDAVICA* L.)**

Аннотация: В данной работе представлен усовершенствованный автором подход к оценке концентрации эфирного масла (EOs) в фитомассе методом высоко-эффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ, англ. HPLC), валидированный на свежесобранном лекарственном растительном сырье (ЛРС) змееголовника (*Dracocéphalum moldavica* L.) – он проще, дешевле по затратам, быстрее, чем метод газовой хроматографии (ГХ), при этом позволяет надёжно и точно измерить интегральное содержание EOs в сырье на конвейере, следовательно настоящий подход актуален для внедрения в технологии, поскольку может обеспечить снижение затрат и повысить рентабельность производства.

Abstract: Plants' essential oils (EOs) represent a complex of volatile organic compounds. They are usually analyzed by gas chromatography (GC) on highly selective capillary columns in devices with flame ionization detectors and are relatively expensive to operate. The HPLC method adapted and presented by us in this work for the analysis of EOs is simpler and faster than GC, therefore it can provide a good service when introduced into technologies, since it will assure reliability, reduce the cost of registration and assessment of the integral EOs content in the raw material used on the conveyor, and, accordingly, increase the industrial profitability.

Ключевые слова: змееголовник молдавский (*Dracocéphalum moldavica* L.), эфирные масла, высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ).

Keywords: moldavian dragonhead (*Dracocéphalum moldavica* L.), essential oils, high pressure liquid chromatography (HPLC).

Введение. Эфирные масла растений (essential oils, EOs) представляют собой комплекс летучих органических соединений (состоящий в основном из моно-, сескви- и ди- терпенов), и, как известно, выполняют ряд функций: 1 – EOs являются метаболитами обменных процессов растительного организма (на это указывает высокая реакционная способность терпеноидных и ароматических соединений [основных компонентов EOs]); 2 – EOs при испарении "окутывают" растения уменьшая теплопроницаемость воздуха (предохраняя от чрезмерного нагревания днём и переохлаждения ночью, а также регулируя транспирацию); 3 – EOs (привлекая насекомых запахом) способствуют опылению цветков и увеличению урожая семян; 4 – EOs препятствуют заражению патогенными грибами и бактериями, а также защищают растения от поедания животными. Следует подчеркнуть, что EOs издавна ценятся человеком в кулинарии и фито-(арома)-терапии; кроме того EOs широко используются пищевой промышленностью, а также в медицине, косметике и иных сферах применения [1]. Одним из интересных продуцентов EOs является змееголовник молдавский



(*Dracocephalum moldavica* L.) – травянистое высотой до 80 см растение семейства Яснотковые (*Lamiaceae*), выращиваемое как лекарственная и эфиромасличная культура, так как все части данного персонажа характеризуются наличием ЕОs (максимум синтеза – на стадии цветения). Содержание ЕОs в свежей надземной биомассе (аналог лекарственного растительного сырья, ЛРС) составляет не менее 0,05 %. ЕОs змееголовника – легкоподвижная светло-жёлтая прозрачная жидкость с лимонным запахом, в составе которой преобладают монотерпены – цитраль (25÷70 %), гераниол (~30 %), тимол, нерол (~7 %), причём их соотношение зависит от фазы развития [1, 2]. Учитывая актуальность выведения улучшенных сортов растений в Центральном ботаническом саду Национальной академии наук Республики Беларусь (РБ) ведётся селекция представителей *Lamiaceae* с повышенным синтезом ценных биоактивных веществ, в т. ч. ЕОs, обычно анализируемых в ЛРС методом газовой хроматографии (ГХ) на высокоселективных капиллярных колонках в устройствах с пламенно-ионизационными детекторами, что относительно дорого. В связи с этим перед автором встала цель – провести соответствующие исследования и оптимизировать детекцию интегрального содержания ЕОs у видов образцов ЛРС более удобным методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Естественно, этого удалось добиться путём кропотливого труда. В настоящей работе представлен дайджест усовершенствованного авторского подхода к экспресс-анализу ЕОs в ЛРС и полученные по ВЭЖХ-методике данные измерений.

Материалы и методы исследования. Объект биохимических исследований – змееголовник молдавский (*D. moldavica* L.). Материалы – ЛРС (свежесобранная надземная биомасса, см. рисунок 1: [верхней, "Верх"] и нижней, "Низ"] по 1/2 высоты растений) змееголовника (*D. moldavica* L. сорт Цмок), с заготовкой в фазу цветения 17.07.2019 и 26.07.2019. Приготовление проб для анализа ЕОs в образцах змееголовника осуществляли согласно стандартной процедуре [3-9] в нашей модификации : свежесобранная сырая биомасса взвешивалась в 3-х повторностях по 2 г (сырой вес, с.в.), из которых 10 мл экстрагента извлекали ЕОs. Экстракцию их из ЛРС проводили в герметичных условиях (18°C, 16 ч) с периодическим встряхиванием. Одноименные пробы объединяли и герметично в темноте при 0÷4°C хранили (≤3 ч) до анализа. Состав экстрагента: ацетонитрил (100 мл/л), ацетон (100 мл/л), метанол (100 мл/л), Na-этилендиаминтетраацетат водный (1 г/л), дихлорметан (100 мл/л), изопропанол (100 мл/л), дихлорэтан (100 мл/л), этилацетат (336 мл/л), кислоты – лимонная (4 г/л) и уксусная (64 мл/л). Использовали реактивы марки «х.ч.» или «ос.ч.». ВЭЖХ-анализ ЕОs в пробах проводили хроматографом Agilent-1260 (Agilent, США). Предварительно экстракты образцов ЛРС очищали центрифугированием (15000 g, 10 мин, 20°C) и надсадок пропускали через фильтры PTFE (Agilent, ФРГ) с диаметром пор 0,2 мкм, затем вносили в вials по 100 мкл, добавляли 900 мкл метанола и герметично закрывали крышками. Отбор проб проводился автосэмплером. Анализ компонентов экстрактов с применением калибровочного стандарта ЕОs (20 мкл) проводили на колонке Zorbax Eclipse Plus C18 по методу [4] обращённо-фазовой ВЭЖХ в оптимизации [5-9]. Условия изократического элюирования : 1) инъекционный объём проб = 10 мкл; 2) мобильная фаза: ацетонитрил/100 мМ ацетата аммония (в воде) = 80/20; 3) температура колонки 25°C, 4) скорость элюирования 1,8 мл/мин. Согласно методическим указаниям [4-6] регистрация ЕОs велась при $\lambda_{210\text{ нм}}$ (vs $\lambda_{560\text{ нм}}$)



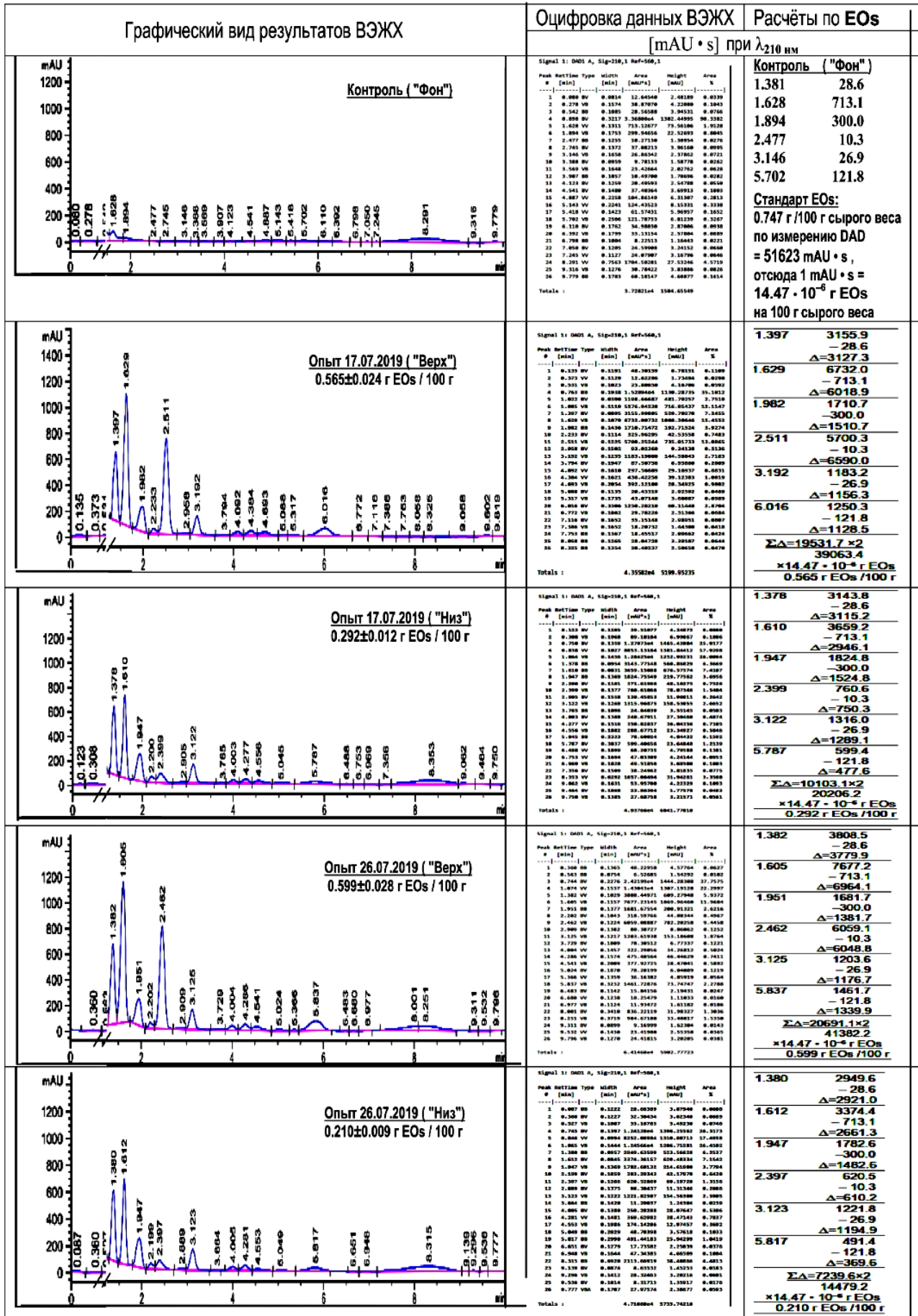
диодно-матричным детектором DAD G4212B (Agilent, США) по площади пиков в milli Absorbance Units [mAU • s], которые пересчитывали (по калибровочному стандарту, КС) в г EOs на 100 г в исходной свежесобранной биомассе растений. Обработка данных проведена программой Agilent OpenLAB CDS ChemStation. В качестве КС использовали EOs *D. moldavica* L. (% EOs [v/m] = 0,830 мл/100 г ЛРС [1] с учётом плотности EOs $\rho=0,925$ г/мл, что соответствует 0,747 г EOs/100 г ЛРС и в стандарт-пробе регистрируется DAD как 51323 mAU • s; отсюда 1 mAU • s = $14,470 \cdot 10^{-6}$ г EOs / 100 г с.в.

Результаты и их обсуждение. В ходе проведения ВЭЖХ-анализов общего содержания эфирных масел (EOs) в свежесобранной (сырой) надземной биомассе *D. moldavica* получены новые данные (рисунок 1), указывающие на эффективность найденного биохимического подхода. Интегрирования (суммации пиков) хроматограмм сделаны за вычетом значений "фона", даваемого компонентами экстрагента (контроль). Можно видеть – контент EOs у змееголовника сорта Цмок на стадии вступления в пору цветения (и начала цветения) в "верхней" части растения (где намечалось распускание цветков) поддерживался в стабильном состоянии и при сравнении на сроках сбора ЛРС 17 и 26 июля 2019 г. – $0,565 \pm 0,024$ и $0,599 \pm 0,028$ г EOs на 100 г сырой биомассы, соответственно, различия составили ~3,4 % (то есть были недостоверны). Однако сравнительное измерение на аналогичных сроках общего содержания эфирных масел в "нижней" части надземной биомассы змееголовника ($0,292 \pm 0,012$ и $0,210 \pm 0,009$ г EOs на 100 г сырой биомассы, соответственно) обнаружило существенную убыль их (примерно на 28,1 %, а это в среднем около 3,5 % в течение одних суток). Судя по результатам измерений *D. moldavica* в период цветения не снижает продукцию эфирных масел в активной "верхней" части своей биомассы, значит, находится в состоянии интенсивного метаболизма, требующего активного расходования энергии. Эти энергетические траты отчасти, видимо, могут покрываться за счёт ранее синтезированных метаболитов, на что указывает и обнаруживаемое постепенное снижение концентрации EOs в "нижней" части надземной биомассы растения.

Заключение. Анализ содержания летучих органических веществ растений, в частности, эфирных масел (EOs), может оказываться затруднительной не дешёвой процедурой, особенно при детекции этих субстанций на дорогостоящих в процессе эксплуатации газовых хроматографах (ГХ). Однако данная работа на примере ЛРС змееголовника *D. moldavica* сорта Цмок раскрывает возможность применения для количественного определения интегрального (общего) содержания EOs более удобного и специально адаптированного метода ВЭЖХ (валидированного вместо расточительной газовой хроматографии). Таким образом, если для анализа EOs внедрить в промышленные технологии метод ВЭЖХ (более простой и ускоренный чем ГХ-подход), то это может оказать добрую услугу, поскольку обеспечит надёжность, удешевит регистрацию и оценку содержания EOs в используемом на конвейере сырьевом материале, а, соответственно, повысит рентабельность производственных процессов.

Работа выполнена в рамках ОНТП РБ «Интродукция, озеленение, экобезопасность», 2016-2020 гг. по заданию 2.1.7 "Создать эффективные сорта лекарственных, пряно-ароматических и биоэнергетических растений".





Список литературы :

1. Kakasy, A.Z. New phytochemical data on *Dracocephalum* species: Theses of the Ph.D. dissertation: 14.04.01 / A.Z. Kakasy. Semmelweis University. – Budapest, 2006. – 14 p.
2. Игнатовец, О.С. Идентификация фенольных соединений змееголовника молдавского (*Dracocephalum moldavica* L.) / О.С. Игнатовец и др. // Труды БГТУ (Минск). – 2020. – Сер. 2, № 1. – С. 5–10.
3. Norsyamimi, H. Solvent selection in extraction of essential oil and bioactive compounds from *Polygonium minus* / H. Norsyamimi, M. Masturah, A. Nurina, N.B. Syarual // J. Applied Sciences. – 2014. – Vol. 14, № 13. – P. 1440–1444.
4. Strack, D. Reversed phase high performance liquid chromatography of essential oils / D. Strack, P.G. Gülz // Z. Naturforsch. – 1980. – Vol. 35, № 9-10. – P. 675–681.
5. Porel, A. Simultaneous HPLC determination of 22 components of essential oils; method robustness with experimental design / A. Porel, Y. Sanyal, A. Kundu // Indian J. Pharm. Sci. – 2014. – Vol. 76, № 1. – P. 19–30.
6. Богатюк, Н.П. Новый способ подготовки растительного сырья для производства эфирных масел / Н.П. Богатюк и др. // Химия и биология. – 2014. – Т. 9, № 9. – С. 14–22.
7. Попов, Е.Г. Фармакологический потенциал растения железница иссополистная (*Sideritis hyssopifolia* L.) из коллекции ЦБС НАНБ / Е.Г. Попов и др. // Вестник Фонда фундаментальных исследований (Минск). – 2019. – № 4. – С. 76–81.
8. Кручонок, А.В. Анализ компонентного состава экстрактов растений рода эхинацеи (*Echinacea* Moench) методами ЯМР и ВЭЖХ / А.В. Кручонок, Е.Г. Попов, Е.Д. Скаковский и др. // Труды БГТУ (Минск). – 2020. – Сер. 2, № 2. – С. 117–124.
9. Попов, Е.Г. Анализ эфирных масел семян чернушки посевной (*Nigella sativa* L.) методом высокоэффективной жидкостной хроматографии / Е.Г. Попов, И.М. Савич, И.Н. Тычина // Лекарственное растениеводство: от опыта прошлого к современным технологиям : материалы IX Международ. научн.-практич. конф. (Полтава, 29-30.06.2021 г.). – Полтава : РВВ "ПГАА", 2021. – 230 с. (С. 142–144).

