

## Вивчення хімічного складу екстракту суцвіть липи, отриманого надкритичним діоксидом вуглецю

Д.В.Дем'яненко, А.М.Комісаренко, О.М.Кошовий

Національний фармацевтичний університет, кафедра товарознавства, кафедра хімії природних сполук  
Харків, Україна

Методом газорідної хроматографії вивчено якісний та кількісний склад екстракту суцвіть липи, отриманого надкритичним діоксидом вуглецю. Виявлено 88 летких компонентів, з яких 35 було ідентифіковано. Сумарна кількість неідентифікованих сполук становила 9,58% від загальної суміші виявлених компонентів. Основними класами речовин у вуглекислотному екстракті були насичені вуглеводні та карбонові кислоти, вміст яких складав 55,40% та 28,53% відповідно. Сумарна кількість альдегідів і кетонів становила 4,10%. Показано, що надкритичний  $\text{CO}_2$  при тиску до 400 атм. є переважно гідрофобним розчинником, але виявляє селективність щодо сполук із карбоксильними та карбонільними групами.

**Ключові слова:** суцвіття липи, екстракція, надкритичні флюїди, діоксид вуглецю, газорідна хроматографія.

### ВСТУП

В останні роки спостерігається стійка тенденція до розширення номенклатури лікарських засобів рослинного походження в Україні й особливо за кордоном. Аналізуючи наявний на даний час асортимент фітопрепаратів, працівники оптової та роздрібно-фармацевтичної мережі разом із споживачами (тобто покупцями) відчувають чітке домінування імпортних препаратів на основі рослинних екстрактів. Отже, для забезпечення конкурентоспроможності вітчизняних підприємств вкрай необхідно впроваджувати у виробництво нові оригінальні препарати з різних видів лікарської рослинної сировини (ЛРС), що використовуються в народній медицині. Особливої уваги

заслужує та ЛРС, що внесена до ДФУ 1.2 [2] і фармакопей інших розвинених країн, але й досі не переробляється в промисловому масштабі з метою отримання лікарських засобів. Яскравим прикладом є суцвіття липи *Tiliae flos*, які, згідно з ДФУ 1.2 [2], можуть заготовлятися з трьох видів лип — *Tilia cordata*, *Tilia platyphyllos*, *Tilia vulgaris* або з їх суміші. Останній вид відомий також як *Tilia europeia*.

У Болгарії суцвіття липи входять до двадцяти найбільш популярних серед 600 видів ЛРС та застосовуються у фітотерапії як протизапальний, жарознижувальний, седативний і відхаркувальний засіб [9].

У дослідженнях, проведених співробітниками НФаУ [4], уперше встановлено противиразкову дію фенольного комплексу, отриманого при комплексній переробці суцвіть *Tilia cordata*, та показано, що за активністю він не поступається референс-препарату альтану.

Автори [5, 6] в експериментах на мишах виявили анксиолітичний та седативний ефекти як гексанових, так і метанольних екстрактів із суцвіть *Tilia americana* L. у дозах від 10 мг/кг, причому незважаючи на порівнянню фармакологічну активність, гостра токсичність метанольних витягів була у 8 разів вища, ніж гексанових. Вказується, що нейротропна дія обумовлена не тільки полярними, але й ліпофільними біологічно активними речовинами (БАР), що містяться в суцвіттях липи. Згідно з даними, наведеними в роботі [11], за седативну активність суцвіть липи відповідають компоненти ефірної олії, незважаючи на її невеликий вміст у сировині. Певні леткі сполуки ліпофільного характеру, виділені в дослідженнях [8] з *T. cordata* та *T. tomentosa*, чинять антимікробну дію.

Основною проблемою розробки препаратів з липи є значні відмінності якісного та кількісного складу ліпофільних БАР, у тому числі ефірних олій, отриманих зі споріднених видів лип або навіть з одного виду, але за різними технологіями [7, 8, 10, 12, 14]. Так, наприклад,

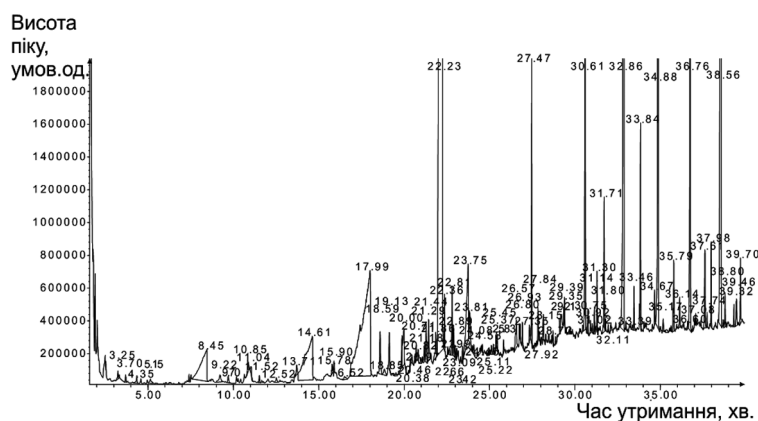


Рис. 1. Хроматограма екстракту, отриманого із суцвіть липи надкритичним  $\text{CO}_2$  при температурі  $35^\circ\text{C}$  та тиску 400 атм.

в дослідженнях [8] після гідродистиляції суцвіть *T. tomentosa* та *T. cordata*, зібраних у Румунії і Греції, отримані ефірні олії містили переважно аліфатичні вуглеводні (32,3% та 60,4% відповідно), головним з яких був трикозан, а також кисневмісні монотерпени — ізоциклоцитраль та хотрієнол. За даними авторів [12], ефірна олія, виділена аналогічним методом із суцвіть *T. platyphyllos* румунської заготовки, складалася переважно з фенілетанолу (понад 26%), фенольних ефірів (близько 23%) та монотерпенових спиртів (18,9%), у той час як сумарний вміст аліфатичних вуглеводнів був великим — 4,5%.

Автори [10] встановили, що в екстракті, отриманому із суцвіть *T. tomentosa* фреоном-134а при температурі  $+15^\circ\text{C}$ , основними класами БАР є ароматичні кисневмісні сполуки (36,8%), з яких домінує фенілетанол (близько 25%), алкани (33,6%) та кисневмісні монотерпени (9,25%). При хімічному аналізі екстрактів, виділених з аналогічної сировини діоксидом вуглецю  $\text{CO}_2$  в умовах, наближених до критичних (тиск  $70 \pm 2$  атм, температура  $30 \pm 2^\circ\text{C}$ ), було виявлено, що більшість виділених речовин відносилася до класу альдегідів, як ароматичних, так і аліфатичних, причому домінуючим був бензальдегід (14,2%), у значній кількості (близько 10%) присутній також фенілетанол, сумарний вміст карбонових кислот та їх ефірів становив 9,5% [7]. При цьому автори [7, 10], на відміну від [8], зазначали, що жоден з екстрактів не мав антимікробної дії щодо тестових штамів.

У дослідженнях [14] зрідженим (докритичним)  $\text{CO}_2$  при тиску 90 атм. та температурі  $+24^\circ\text{C}$  з додаванням до екстрагенту 1,25% етанолу із суцвіть *T. cordata* був отриманий екстракт, який на 14% складався з монотерпенів як домінуючих БАР, але при цьому він зовсім не

містив бензальдегіду та фенілетанолу, які виявлялися основними сполуками в роботах, описаних вище.

З наведених прикладів очевидно, що зріджені гази при наближенні до критичних параметрів, а тим більше в надкритичному (НК) стані, якісно змінюють свою полярність, розчинювальну здатність і селективність відносно певних класів речовин [3]. Завдяки цим унікальним властивостям НК-флюїди, переважно  $\text{CO}_2$ , все ширше застосовуються для екстракції не тільки ліпофільних БАР, а й більш полярних, зокрема флавоноїдів [13].

У попередніх дослідженнях [1] нами був отриманий НК- $\text{CO}_2$  — екстракт із суцвіть *T. cordata*; при його хроматографуванні в тонкому шарі виявлялися ліпофільні сполуки, аналогічні тим, що й у фреоновому екстракті, але їх кількісне співвідношення, яке оцінювалося за інтенсивністю забарвлення плям, залежало від параметрів режиму НК-екстракції.

Мета дослідження полягала в ідентифікації та кількісному визначенні сполук в НК- $\text{CO}_2$  — екстракті суцвіть липи методом газорідинної хроматографії (ГРХ).

## МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Вихідною рослинною сировиною в даних дослідженнях були суцвіття липи серцелистої *Tilia cordata*, заготовлені в Рівненській області в 2008 р. та подрібнені до розмірів часток 0,5–2,0 мм. Вологість сировини складала 8,3%.

Екстрагування проводили на дослідно-промисловій установці УЕ-4-400, розробленій ТОВ «Техарм» (м. Львів), принцип дії якої описано в роботі [1]. Процес здійснювали в статичному режимі мацерації протягом 60 хв. при співвід-

ТАБЛИЦЯ 1  
Кількісний склад НК-СО<sub>2</sub> – екстракту суцвіть липи

Час утримування, хв.	Найменування сполуки	Вміст сполуки в екстракті, %	Відносний вміст сполуки в суміші, %
3,24	гексаналь	0,03	0,11
5,15	валеріанова кислота	0,03	0,12
8,45	капронова кислота*	0,93	3,36
9,69	транс-ліналооксид	0,03	0,11
10,84	хо-трієнол	0,07	0,24
11,04	гептанова кислота	0,03	0,11
14,61	каприлова кислота	1,52	5,50
15,78	анісовий альдегід	0,04	0,14
16,52	тимол	0,03	0,10
17,99	нонанова кислота	4,26	15,41
19,13	дигідро-5-пентил-2(3Н)-фуранон	0,12	0,45
20,00	деканова кислота	0,26	0,93
21,17	4-метилтетрадекан	0,05	0,19
21,28	2-метилтетрадекан	0,13	0,49
21,43	3-метилтетрадекан	0,16	0,57
21,85	транс-в-іонон-5,6-епоксид	0,11	0,41
22,23	внутрішній стандарт	-	-
22,80	дигідроактинідіолід	0,18	0,65
23,41	3-гексен-1-ол-бензоат	0,03	0,13
23,74	додеканова кислота	0,70	2,54
26,57	тетрадеканова кислота	0,16	0,57
27,34	неофітадієн	0,04	0,16
27,47	гексагідрофарнезиллацетон	0,64	2,31
29,38	етилпальмітат	0,05	0,17
30,60	хенейкозан	1,49	5,37
31,71	докозан	0,32	1,16
32,86	трикозан	3,95	14,28
33,84	тетракозан	0,41	1,47
34,87	пентакозан	2,62	9,48
35,79	гексакозан	0,21	0,74
36,14	тетракозаналь	0,08	0,28
36,75	гептакозан	1,78	6,43
37,61	октакозан	0,22	0,79
37,98	гексакозаналь	0,19	0,69
38,56	нонакозан	4,00	14,45
39,69	октакозаналь	0,16	0,58
	неідентифіковані сполуки (сумарно)	2,65	9,58
	РАЗОМ	27,66	100,0

ношенні сировина/екстрагент 1:40 в діапазоні температур 35-70°C та тиску 100-400 атм.

Для ГРХ-аналізу був відібраний зразок, отриманий при температурі 35°C та тиску 400 атм., з огляду на те, що його вихід (1,6% у пере-

рахунку на абсолютно суху сировину) наближувався до максимально можливого (1,77%) серед усіх екстрактів, отриманих у вищезазначених умовах; крім того, температурний режим був досить м'яким, і при цьому досягався збалансований якісний склад ліпофільних сполук, виявлених на тонкошарових хроматограмах [1].

Даний екстракт являв собою аморфну воскоподібну вологу масу світло-жовтого кольору з ароматом, специфічним для липи.

Точну наважку 0,25 г екстракту (у перерахунку на безводний) розчиняли в 15 мл 96% етанолу, фільтрували в мірну колбу місткістю 25 мл, промивали фільтр спиртом та доводили об'єм до позначки.

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

Температура термостата програмувалася від 50°C до 250°C зі швидкістю 4°C/хв. Температура інжектора становила 250°C. Газ-носієй – гелій зі швидкістю потоку 1 мл/хв. Перенесення від ГРХ до мас-спектрометра відбувалося при 230°C. Температура детектора та випаровувача підтримувалася на рівні 200°C.

Електронна іонізація проводилася при 70 eV в діапазоні мас від m/z 29 до 450 а.о.м. Ідентифікація сполук здійснювалася на основі порівняння отриманих мас-спектрів з даними бібліотек NIST 05-Wiley та «Flavor 2» (близько 500000 мас-спектрів). Як внутрішній стандарт використовували пентадекан.

Кількісний вміст кожної виявленої сполуки у відсотках від маси наважки зразка визначали за площею відповідних піків, враховуючи, що 10<sup>9</sup> умовних одиниць площі відповідало 0,002 мг речовини в пробі (1 мкл 1,00% розчину НК-СО<sub>2</sub> – екстракту в спирті з c=0,812 кг/л). Крім того, розраховували відносний вміст кожної речовини у виявленій суміші.

## РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Газорідинна хроматограма НК-СО<sub>2</sub> – екстракту суцвіть липи, виділеного при температурі 35°C та тиску 400 атм., наведена на рис. 1.

На отриманій хроматограмі виявилось 88 речовин, з яких 35 було ідентифіковано. Усі 53

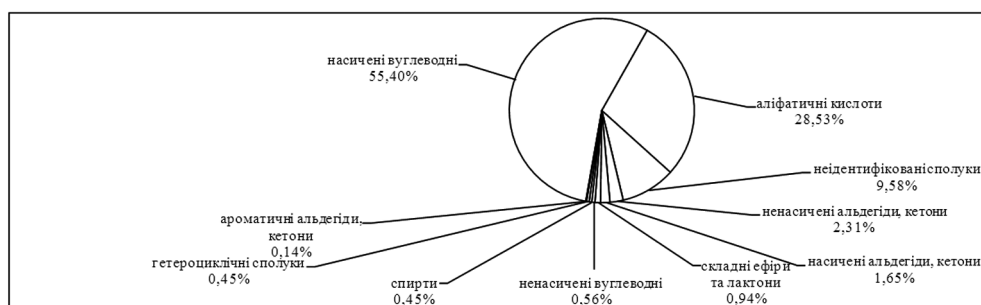


Рис. 2. Вміст сполук у НК-СО<sub>2</sub> – екстракті суцвіть липи за класами.

неідентифікованих сполуки відносилися до мінерних компонентів, їх сумарна кількість становила лише 9,58% від загальної суміші виявлених речовин. На рис. 1 також видно, що у вуглекислотному екстракті містяться переважно сполуки з досить великим часом утримання (понад 17 хв.), що свідчить про їх порівняно високу молекулярну вагу.

У результаті кількісного аналізу НК-СО<sub>2</sub> – екстракту суцвіть липи було встановлено (табл. 1), що до основних компонентів, вміст яких в суміші перевищував 1%, відносилися наступні речовини: нонанова кислота – 15,41%; нонакозан – 14,45%; трикозан – 14,28%; пентакозан – 9,48%; гептакозан – 6,43%; каприлова кислота – 5,50%; хенейкозан – 5,37%; капронова кислота – 3,36%; додеканова кислота – 2,54%; гексагідрофарнезил-ацетон – 2,31%; тетракозан – 1,47%; докозан – 1,16%.

Як видно з рис. 2, домінуючими класами сполук у НК-СО<sub>2</sub> – екстракті суцвіть липи є насичені вуглеводні та карбонові кислоти, вміст яких складає 55,40% та 28,53% відповідно. У помітній кількості присутні також альдегіди й кетони, які в сумі становлять 4,10% від усіх речовин, виявлених методом ГРХ.

Таким чином, на основі отриманих нами експериментальних даних можна зробити висновок, що надкритичний СО<sub>2</sub> навіть при тиску 400 атм. є гідрофобним екстрагентом, у той же час унаслідок здатності створювати кисле середовище в присутності залишкових кількостей води він з достатньою ефективністю екстрагує сполуки, що містять карбоксильну групу. Крім того, НК-СО<sub>2</sub> виявляє розчинювальну здатність до карбонільних сполук, що, очевидно, пояснюється спорідненістю структури їх молекул. Усе це свідчить про перспективність використання НК-СО<sub>2</sub> для фракціонування рослинних екстрактів та отримання максимально очищених («новогаленових») субстанцій.

## ВИСНОВКИ

1. Методом газорідинної хроматографії проведено дослідження якісного та кількісного складу екстракту суцвіть липи, отриманого надкритичним діоксидом вуглецю.

2. В досліджуваному екстракті виявлено 88 летких компонентів, з яких 35 було ідентифіковано. Сумарна кількість неідентифікованих сполук становила 9,58% від загальної суміші виявлених компонентів.

3. Встановлено, що домінуючими класами речовин у вуглекислотному екстракті є насичені вуглеводні та карбонові кислоти, вміст яких складає 55,40% та 28,53% відповідно. Сумарна кількість альдегідів і кетонів становить 4,10%.

4. Показано, що надкритичний СО<sub>2</sub> навіть при тиску 400 атм. є переважно гідрофобним розчинником, у той же час він виявляє селективність щодо сполук із карбоксильними та карбонільними групами.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Дем'яненко Д.В. Дослідження процесу екстракції суцвіть липи надкритичним діоксидом вуглецю / Д.В.Дем'яненко, В.Г.Дем'яненко, Д.І.Дмитрієвський, С.В.Бреусова // Вісник фармації. – 2010. – Т.64, №4. – С. 22-26.
2. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». 1-е вид., доп.2.– Харків: Ріпер, 2008. – 620 с.
3. Добровольний О.О. Перспективи екстрагування лікарської рослинної сировини надкритичними газами / О.О.Добровольний, А.С.Шаламай // Фармаком. – 2005. – №4. – С. 48-52.
4. Позднякова А.Ю. Фармакотерапевтична ефективність поліфенольного комплексу із суцвіть липи серцелистої та сиропу на його основі при експериментальній індометацинової гастропатії / А.Ю.Позднякова, Т.О.Кущенко, Я.О.Бутко // Фармаком. – 2011. – №1/2. – С. 35-38.
5. Aguirre-Hernandez E. Bioactivity-Guided isolation of  $\beta$ -Sitosterol and Some Fatty Acids as Active Compounds in the Anxiolytic and Sedative Effects of Til-

- ia americana var. mexicana / E.Aguirre-Hernandez // *Planta Medica*. — 2007. — Vol. 73. — №11. — P. 1148-1155.
6. Aguirre-Hernández E. Pharmacological evaluation of the anxiolytic and sedative effects of *Tilia americana* L. var. mexicana in mice / E.Aguirre-Hernández, A.L.Martínez, M.E.González-Trujano [et al.] // *Journal of Ethnopharmacol.* — 2007. — Vol. 109. — №1. — P. 140-145.
  7. Atanasova T. Chemical composition and antimicrobial activity of linden (*Tilia tomentosa* Moench.) CO<sub>2</sub> extract / T.Atanasova, V.Gochev, A.Stoyanova [et al.] // *Plovdiv University «Paisii Hilendarski» — Bulgaria Scientific Papers*. — 2008. — Vol. 36. — №5. — P. 91-96.
  8. Fitsiou I. Volatile constituents and antimicrobial activity of *Tilia tomentosa* Moench and *Tilia cordata* Mill. oils / I.Fitsiou, O.Tzakou, M.Hancianu, A.Poiata // *J. of Essential Oil Res.* — 2007. — Vol. 19. — №2. — P. 183-185.
  9. Polyphenols and antioxidant capacity of Bulgarian medicinal plants / D.Ivanova, D.Gerova, T.Chervenkov, T.Yankova // *J. of Ethnopharmacol.* — 2005. — Vol. 96. — P. 145-150.
  10. Low temperature extraction of essential oil bearing plants by liqueficate gases. 2. Flowers of linden (*Tilia tomentosa* Moench.) [Електронний ресурс] / T.Atanasova, N.Nenov, T.Girova [et al.]. — Режим доступу: <http://www.e-xtracts.com/ExtractumScientific6.pdf>.
  11. Newall C.A. Herbal Medicines: A Guide for Health-Care Professionals / C.A.Newall, L.A.Anderson, J.D.Phillipson. — London: The Pharmaceutical Press, 1996. — P. 181.
  12. Rrdulescu V. Analysis of volatile compounds of official *Tiliae flos* by gas-chromatography coupled with mass spectrometry / V.Rrdulescu, E.Oprea // *Farmaacia*. — 2008. — Vol. LVI. — №2. — P. 129-138.
  13. Scalia S. Analytical and preparative supercritical fluid extraction of chamomile flowers and its comparison with conventional methods / S.Scalia, L.Giuffreda, P.Pallado // *J. Pharm. Biomed. Anal.* — 1999. — Vol. 21. — P. 549-558.
  14. Vidal J.P. Characterization of volatile compounds in linden blossoms *Tilia curdata* Mill. / J.P.Vidal, H.Richard // *Flavour and Fragrance J.* — 1986. — Vol. 1. — P. 57-62.

**Д.В.Демьяненко, А.Н.Комиссаренко, О.Н.Кошевой.** *Изучение химического состава экстракта соцветий липы, полученного сверхкритическим диоксидом углерода. Харьков, Украина.*

**Ключевые слова:** соцветия липы, экстракция, сверхкритические флюиды, диоксид углерода, газожидкостная хроматография.

Методом газожидкостной хроматографии изучен качественный и количественный состав экстракта соцветий липы, полученного сверхкритическим диоксидом углерода. Обнаружено 88 летучих компонентов, из которых 35 было идентифицировано. Суммарное количество неидентифицированных соединений составляло 9,58% от общей смеси обнаруженных компонентов. Основными классами веществ в углекислотном экстракте были насыщенные углеводороды и карбоновые кислоты, содержание которых составляло 55,40% и 28,53% соответственно. Общее количество альдегидов и кетонов составляло 4,10%. Показано, что сверхкритический CO<sub>2</sub> при давлении до 400 атм. является преимущественно гидрофобным растворителем, однако проявляет селективность к соединениям с карбоксильными и карбонильными группами.

**D.V.Demyanenko, A.N.Komissarenko, O.N.Koshevoy.** *Study of chemical composition of the lime flowers extract obtained with supercritical carbon dioxide. Kharkiv, Ukraine.*

**Key words:** lime flowers, extraction, supercritical fluids, carbon dioxide, gas-liquid chromatography.

By method of gas-liquid chromatography qualitative and quantitative composition of lime flowers extract obtained with supercritical carbon dioxide has been studied. 88 volatile constituents were found from which 35 ones were identified. Overall amount of unidentified compounds was 9,58% of total mix of the components found. Main classes of substances in the CO<sub>2</sub> extract were saturated hydrocarbons and carboxylic acids which contents were 55,40% and 28,53% respectively. The total of aldehydes and ketones was 4,10%. It was shown, that supercritical CO<sub>2</sub> at pressures up to 400 atm is mostly hydrophobic solvent, however it exhibits selectivity for compounds with carboxylic and carbonyl groups.

Надійшла до редакції 08.10.2011 р.