

РАЗРАБОТКА ПОДХОДА ДЛЯ ЭКСПРЕСС-АНАЛИЗА ПОДЛИННОСТИ И КАЧЕСТВА ЭФИРНЫХ МАСЕЛ НА БАЗЕ ЯМР-СПЕКТРОСКОПИИ ВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ

Е.Д. Скаковский*, В.П. Киселев, Л.Ю. Тычинская*, А.Г. Шутова, Л.В. Гончарова**,
Е.В. Спиридович**, С.А. Ламоткин***, Н.А. Бовдей, П.А. Киселев**

Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

**ГНУ «Институт физико-органической химии НАН Беларуси», Минск, Республика Беларусь*

***ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси», Минск, Республика Беларусь*

****УО «Белорусский государственный технологический университет», Минск, Республика Беларусь*

Введение

Эфирные масла являются важнейшими продуктами для многих отраслей промышленности и медицины. Тем не менее, при практическом применении эфирных масел (ЭМ) остается нерешенным ряд проблем, связанных с их стандартизацией, характеристикой качества и подлинности. В отличие от химических препаратов, которые относительно легко подвергаются стандартизации по количеству и составу фармакологически активных компонентов, качество фитопрепаратов во многом определяется особенностями сезонной динамики накопления физиологически активных веществ в растениях, условиями сбора, сушки, хранения и переработки растительного сырья. Кроме того, растения часто подвержены значительному внутривидовому полиморфизму. В экстремальных случаях комбинация вышеперечисленных факторов может приводить даже к выраженной токсичности эфирных масел за счет чрезмерного накопления отдельных компонентов, одним из примеров которых является пулегон [1–7]. Вместе с тем, по традиции такие сложные извлечения, как эфирные масла во многих случаях оценивают, исходя из индивидуальных требований с учетом лишь способа применения на основании отраслевых норм и стандартов. Так, распространены не специфические, а интегральные характеристики эфирных масел: плотность, угол оптического вращения, растворимость в водно-спиртовых смесях, температура кипения и загустевания, запах, цвет и т.д., которые носят скорее вспомогательный технологический характер, поскольку помогают оценить качество ЭМ при производстве, возможность использовать в парфюмерии. Однако они не обеспечивают полной идентификации компонентов ЭМ, не дают гарантии подлинности и не позволяют оценить влияние отдельных компонентов на свойства ЭМ. Поэтому неудивительно, что образцы ЭМ одного наименования отличаются по составу, а их фармакологическая эффективность часто варьируется в недопустимо широких пределах. Решение проблемы видится в использовании приборных (инструментальных) методов, позволяющих надежно характеризовать сложные по составу системы. Поскольку основные компоненты эфирных масел обладают хорошей летучестью, для их разделения наибольшее распространение получила газовая хроматография (ГХ) [8], которая, однако, не давая информации о содержании в маслах нелетучих или термически лабильных соединений, фактически делает данный тип анализа неполным.

Наиболее универсальным методом с этой точки зрения является высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), которая принципиально способна осуществить определение практически всех компонентов образца. Действительно, ВЭЖХ на обращенных фазах с УФ детектированием является одним из наиболее распространенных методов анализа органических веществ [9]. По типу детектирования этот метод предназначен для определения соединений, имеющих выраженный электронный спектр. Однако возможности ВЭЖХ-УФ при анализе соединений с низким коэффициентом экстинкции из-за малого оптического поглощения заметно ограничены. Это связано с тем, что для достижения приемлемой чувствительности анализа в колонку приходится вводить относительно большое

количество анализируемого вещества, а это, в свою очередь, приводит к заметному уменьшению ее эффективности и, как следствие, к заметному ухудшению разделения компонентов образца. В качестве альтернативы фотометру в ВЭЖХ можно применять и такие детекторы как рефрактометр и масс-спектрометр (МС). Но, являясь по сути "универсальными" детекторами, они тоже не решают все проблемы в полной мере. Так, рефрактометры не допускают изменения состава подвижной фазы в процессе хроматографии, т.е. не пригодны для градиентного элюирования. В силу своей низкой концентрационной чувствительности, они требуют слишком большой нагрузки на колонку, что отрицательно сказывается на ее разделительной способности [10]. МС-детекторы обладают очень высокой чувствительностью, но их цена пока слишком высока. Кроме того, они не допускают введения в состав подвижной фазы солей, а их присутствие иногда необходимо для достижения требуемой эффективности и селективности колонки. И, наконец, МС-детекторы требуют разных методов ионизации для полярных и неполярных веществ, что ограничивает их применимость при одновременном присутствии таких соединений в анализируемом образце [10]. Кроме того ВЭЖХ-анализ связан с большим потреблением дорогостоящих элюентов. Все это требует поиска и введения в практику новых, надежных и, желательно, экспресс-методов для характеристики образцов эфирных масел. В этом плане серьезного внимания заслуживает спектроскопия ЯМР высокого разрешения. Современные спектрометры обладают высокой чувствительностью, позволяют анализировать сложные составы на разных ядрах за короткий (минутный) промежуток времени, давая достоверные результаты. При этом не требуется специальная пробоподготовка, что значительно сокращает время анализа по сравнению с хроматографическими подходами. Целью настоящей работы стала разработка подхода для экспресс-анализа подлинности и качества эфирных масел на базе ЯМР-спектроскопии. В качестве объекта исследования использовали эфирное масло многоколосника морщинистого, относящегося к семейству пряно-ароматических растений *Lamiaceae* (*Agastache rugosa* (Fisch. et Mey) O.Kuntze). Он успешно культивируется в Центральном ботаническом саду НАН Беларуси, содержит в своем составе широкий спектр биологически активных терпеновых и фенольных соединений и потенциально пригоден в качестве сырья для создания отечественных фитопрепаратов и пищевых продуктов с профилактическими и лечебными свойствами.

Основы спектроскопии ядерного магнитного резонанса

Спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР-спектроскопия) физический метод, основанный на регистрации индуцированных радиочастотным полем переходов между ядерными магнитными энергетическими уровнями молекул вещества, помещенного в постоянное магнитное поле. Переходы между ядерными магнитными уровнями возможны для ядер, обладающих магнитным моментом, т.е. имеющих спиновое квантовое число, не равное нулю. Такими свойствами обладают ядра H, C, F, P и др. Совокупность сигналов переходов между энергетическими уровнями ядер молекул составляет спектр ЯМР. Каждый отдельный спектр ЯМР регистрируется для одного типа ядер. Спектр ЯМР специфичен для каждого вещества. Наибольшее распространение в исследовании органических лекарственных веществ имеет спектроскопия протонного магнитного резонанса (ПМР) и ЯМР ¹³C.

Основные параметры спектра ЯМР

Основными характеристиками спектров ЯМР являются химический сдвиг, мультиплетность, константа спин-спинового взаимодействия и площадь сигнала резонанса. Эти характеристики зависят от химического окружения данного ядра или группы ядер, от числа соседних ядер, обладающих магнитным моментом, от их относительного расположения, а также от числа анализируемых ядер в различных структурных фрагментах

молекулы. Химический сдвиг определяет положение сигнала резонанса в спектре ЯМР и зависит от химического окружения данного ядра или группы ядер. Химический сдвиг выражается в миллионных долях (м.д.) и измеряется относительно сигнала резонанса эталонного соединения (эталона измерения химического сдвига), добавляемого к анализируемым растворам (менее 1%).

Области применения

Спектры ЯМР представляют обширную информацию о молекулярной структуре анализируемого вещества. Положение сигналов резонанса в спектре, их тонкая структура и площади позволяют определять число атомов водорода и углерода в отдельных группах, ближайшее химическое окружение, сочленение отдельных структурных фрагментов молекулы, наличие примесей.

Многообразие структурной информации спектров ПМР практически исключает совпадение спектров разных соединений. В связи с этим метод спектроскопии ЯМР применяется для идентификации, в частности, лекарственных веществ. Для этого используют наиболее полный набор спектральных параметров, характеризующих структуру вещества. Если вследствие сложности спектра ЯМР его полная интерпретация затруднена, ограничиваются лишь характерными сигналами спектра анализируемого вещества, по которым и судят о структуре данного соединения или о наличии возможной примеси. В отдельных случаях для подтверждения подлинности вещества (примеси) к анализируемому раствору после первичной регистрации спектра добавляют определенное количество стандартного образца исследуемого вещества (примеси) и проводят повторную запись спектра в аналогичных условиях. Полное совпадение спектров указывает на идентичность анализируемого вещества и стандартного образца. Спектры ЯМР могут быть использованы для количественного определения относительного или абсолютного содержания вещества (примеси) в анализируемом препарате.

При определении относительного содержания вещества (примеси) измеряют площади сигналов резонанса анализируемого вещества (примеси) и вещества, по отношению к которому проводится количественное определение. Для определения абсолютного содержания лекарственного веществ (примеси) анализируемые образцы готовят количественно. К навеске анализируемого вещества добавляют точно взвешенное количество вещества, играющего роль внутреннего стандарта количественных измерений. Дальнейшая процедура приготовления анализируемого раствора и регистрация спектра проводится как было описано выше. По спектру измеряют площади сигналов анализируемого соединения (примеси) и стандарта и вычисляют абсолютное процентное весовое содержание вещества (примеси) в лекарственном средстве. Сигнал резонанса стандарта количественных измерений должен регистрироваться в виде пика, не перекрывающегося другими сигналами. Относительная точность количественных измерений методом ЯМР в основном определяется точностью измерений отношения площадей резонансных сигналов и в общем случае составляет $\pm 2-5\%$.

¹H-ЯМР характеристика эфирного масла многоколосника морщинистого

ЭМ многоколосника морщинистого (*Agastache rugosa*, *Lamiaceae*) получали методом перегонки с водяным паром. Содержание их в высушенном растительном сырье составляло: от $0,43 \pm 0,01$ мл/100г до 1,1 мл/100г.

Спектры записывали на спектрометре AVANCE-500 с рабочими частотами 500 МГц для ¹H в «количественном» режиме. Для записи спектров использовали образцы, содержащие 30 мкл ЭМ, растворенного в 0,6 мл дэтерированного хлороформа, содержащего 0,01% гексаметилдисилоксана. Последний применяется в качестве стандарта для определения химических сдвигов ядер и содержания веществ в исследуемой смеси.

Для контроля компонентов ЭМ были записаны спектры следующих соединений: α -бисаболола, борнеола, борнилацетата, вербанона, изокамфанона, изоментона, камфена, 2-капена, 3-карена, транс-кариофиллена, лимонена, ментона, мирцена, α -пинена, β -пинена, пулегона, сильвистрена, терпинен-4-ола, α -терпинена, γ -терпинена, α -терпинеола, терпинолена, α -фелландрена, β -фелландрена, пара-цимола и эвгенола.

В качестве примера полученный обзорный ^1H -спектр одного из образцов эфирного масла многоколосника морщинистого показан на рисунке 1.

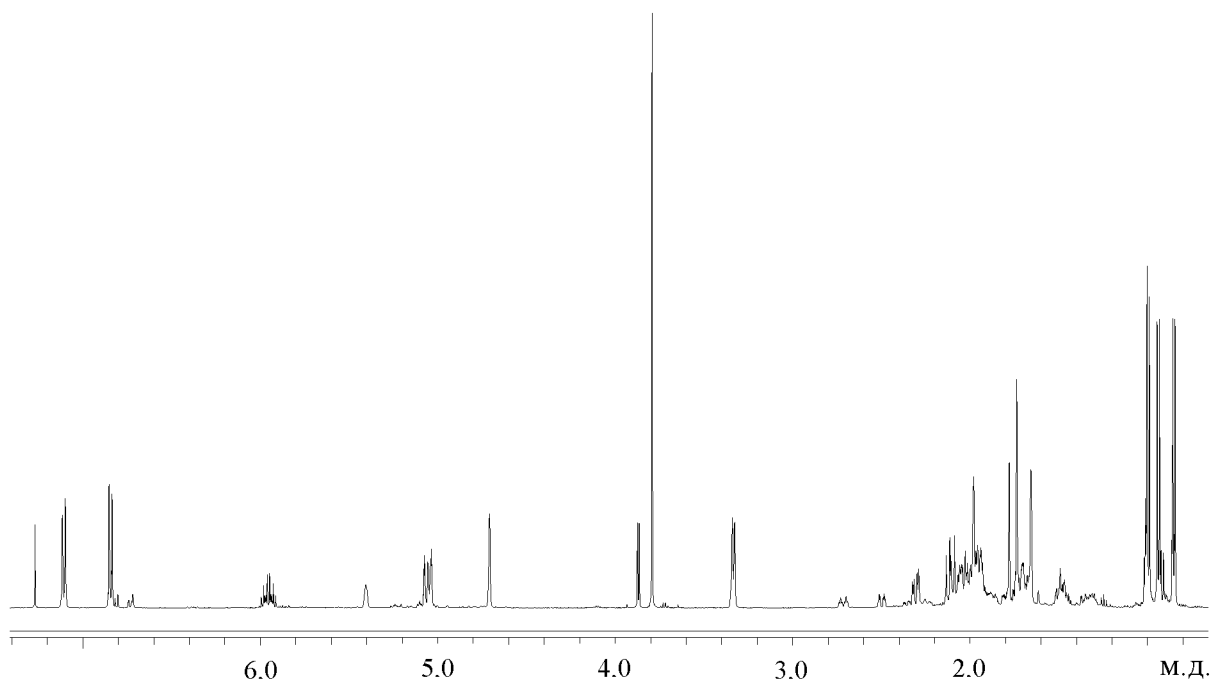


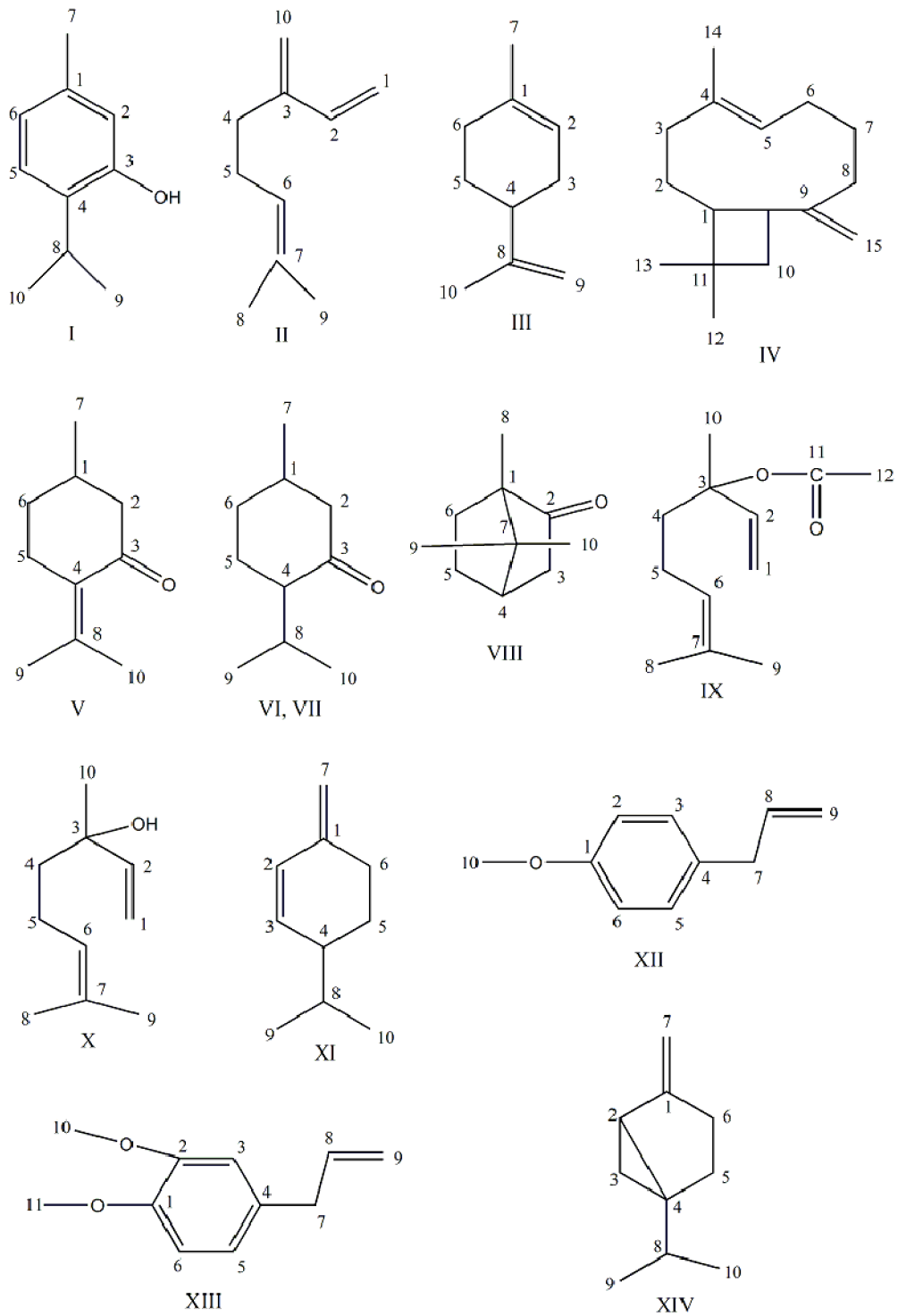
Рисунок 1 – ^1H ЯМР спектр ЭМ многоколосника морщинистого в CDCl_3

Не вдаваясь в детальный анализ спектра, укажем лишь на то, что отдельные линии в ЯМР-спектре хорошо разрешены, что делает возможным его использование для характеристики состава ЭМ многоколосника морщинистого.

В таблице 1 приведены химические сдвиги сигналов протонов соединений, наиболее приемлемые для анализа количественного состава ЭМ, а на рисунке 2 показаны структурные формулы идентифицированных методом ЯМР вещества в составе ЭМ многоколосника морщинистого.

Таблица 1 – Химические сдвиги сигналов протонов соединений, используемые для анализа количественного состава ЭМ (δ , м.д.)

Соединение	Номер атома углерода														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
I		6,62			7,14	6,79	2,32	3,23	1,30	1,30					
II	5,27 5,08	6,40		2,25	2,22	5,18		1,64	1,73	5,04 5,03					
III		5,42	2,07	2,12	1,83 1,48	1,95	1,67		4,73	1,75					
IV					5,31							1,01	0,99	1,62	4,95 4,83
V	1,98	2,47 1,96			2,69 2,22	1,87 1,33	0,98		1,96	1,76					
VI	1,89	2,24 2,03		1,95	1,27	1,80 1,75	0,93	1,98	0,83	0,77					
VII	1,97	2,30 2,11		1,92	1,90 1,70	1,66 1,47	0,99	2,02	0,94	0,85					
VIII			2,29 1,78	2,03	1,89 1,29	1,62 1,34		0,77	0,85	0,90					
IX	5,14 5,12	5,96		1,85 1,76	1,99 1,97	5,08		1,67	1,59	1,54		2,01			
X	5,19 5,03	5,89		1,57 1,53	2,02 1,98	5,10		1,66	1,58	1,25					
XI		6,17	5,77	1,77	1,44 1,40	2,45 2,31	4,78 4,76	1,67	0,94	0,92					
XII		6,84	7,10		7,10	6,84	3,33	5,96	5,06 5,04	3,79					
XIII			6,72		6,73	6,80	3,34	5,96	5,06 5,04	3,87	3,86				
XIV			0,65				4,80 4,62								



I – тимол; II – мирцен; III – лимонен; IV – β -кариофиллен; V – пулегон; VI – ментон; VII – изоментон; VIII – камфора; IX – линалилацетат; X – линалоол; XI – β -фелландрен; XII – метилхавикол; XIII – метилэвгенол; XIV – сабинен

Рисунок 2 – Структурные формулы основных соединений в составе ЭМ многоколосника морщинистого и нумерация их углеродных атомов

Разработка методики оценки подлинности и качества эфирного масла многоколосника морщинистого и определения содержания пулегона на базе ЯМР-спектроскопии

Для разработки методики оценки подлинности и качества эфирного масла на базе ЯМР-спектроскопии использовали несколько образцов эфирного масла многоколосника морщинистого. Для этого анализировали эфирные масла многоколосника морщинистого, выделенные из надземной массы растений: в фазе цветения (2006 г., 2007 г.) и в фазе плодоношения (2008 г., 2009 г.). ЭМ получали методом перегонки с водяным паром. Содержание их в высушенном растительном сырье составляло: в 2006 г. – $0,81 \pm 0,01$, в 2007 г. – $1,1 \pm 0,10$, в 2008 г. – $0,43 \pm 0,01$ мл/100г.

Таблица 2 – Состав ЭМ многоколосника морщинистого в зависимости от года сбора и фазы развития (%)

Соединение	Фаза цветения		Фаза плодоношения	
	2006	2007	2008	2009
I (тимол)	2,9		–	–
II (мирцен)	0,2	0,4	0,7	0,3
III (лимонен)	8,2	8,5	15,4	10,3
IV (β -кариофиллен)	0,8	0,5	0,5	0,2
V (пулегон)	14,5	19,4	11,0	7,7
VI (ментон)	8,4	3,6	5,6	6,7
VII (изоментон)	46,3	21,1	31,7	36,8
VIII (камфора)	0,4	–	0,7	–
IX (линалил-ацетат)	0,2	0,6	0,6	0,4
X (линалоол)	0,4	0,6	0,6	1,0
XI (β -фелландрен)	0,1	0,3	0,4	0,3
XII (метилхавикол)	6,0	26,3	22,9	24,5
XIII (метилэвгенол)	3,7	7,9	3,4	5,4
XIV (сабинен)	–	6,0	0,6	0,2

Данные, приведенные в таблицах 1 и 2 подтверждают наличие в анализируемых ЭМ в качестве основных компонентов изоментона, лимонена, ментона, пулегона, метилхавикола и метилэвгенола. Для препарата 2007 года характерно относительно высокое содержание сабинена. В других образцах сабинен практически не детектируется.

Следует подчеркнуть, что мы не располагали для записи ЯМР-спектров тремя указанными на рисунке 2 соединениями, а именно сабиненом, метилэвгенолом и метилхавиколом. Однако углеродные и протонные спектры метилхавикола и метилэвгенола достаточно легко прогнозируются и эти соединения легко идентифицируются в составе образцов. Поскольку сигналы протонов при двойных связях не накладываются друг на друга, линии при $\delta=4,62$ и $4,80$ м.д. были отнесены к протонам сабинена. Отметим, что возможность идентификации соединений в составе сложных систем даже при отсутствии соответствующих эталонных соединений, по нашему мнению, следует отнести к несомненным достоинствам метода ЯМР.

Количественный состав ЭМ, определенный на основе протонных ЯМР-спектров, приведен в таблице 2. Как видно из таблицы, ЭМ многоколосника морщинистого состоит, главным образом, из перечисленных выше 7-и соединений. Относительное содержание других веществ, спектры которых просматриваются в полных ЯМР-спектрах ЭМ, невелико, их суммарное содержание не превышает 10 моль%.

Характеристика количественного состава ЭМ многоколосника морщинистого методом ГХ

Важным аспектом использования эфирномасличной продукции является контроль ее подлинности и качества. Очевидно, что состав эфирных масел зависит от вида растения, его хемотипа, погодных условий в год сбора, условий хранения сырья, способа извлечения эфирных масел, а также нередко от длительности и условий хранения. К тому же необходимо учитывать возможность фальсификации различными способами. В особенности это касается различных хемотипов, форм и разновидностей растений, типа многоколосника морщинистого, которые относятся к так называемым перспективным и малоиспользуемым источникам эфирных масел. Укажем также, что в зависимости от сферы применения эфирных масел к ним могут применяться различные требования, отражаемые в соответствующих стандартах, технических условиях и др. документах. Для эфирных масел, используемых в производстве лекарств, сборником стандартов является Фармакопея. В то же время, т.н. продукты «therapeutic grade», распространенные на Западе, часто не имеют формального стандартного описания, а декларируется лишь то, что в их производстве не используются синтетические пестициды и удобрения. Поэтому разработка конкретных методических подходов, которые можно использовать при исследовании эфирных масел на качество и подлинность представляет большую трудность.

В настоящее время для этой цели Международной организацией по стандартизации (ISO) рекомендуется применение ГХ с использованием двух типов капиллярных колонок [8]. Одна из них, это колонка с рабочей жидкой фазой на основе полиметилсилоксана, а другая – на основе полиэтиленгликоля с молекулярной массой 20000 Д. Именно на таких колонках получено наибольшее количество результатов (хроматограмм и индексов удерживания компонентов), относящихся к характеристикам эфирных масел.

Поскольку метод газовой хроматографии пользуется наибольшей популярностью при анализе состава эфирных масел и рекомендован для этой цели Международной организацией по стандартизации, нами проведены специальные эксперименты по характеристике состава ЭМ многоколосника морщинистого этим способом. Полученные результаты приведены в таблице 3.

Надо сказать, что получаемые хроматограммы дают исчерпывающую информацию о составе эфирных масел и представляют собой подробную «карту» распределения всех компонентов эфирного масла, изучение которых методом сравнения с типовыми или эталонными хроматограммами может помочь в установлении подлинности и качества эфирного масла.

Вместе с тем использование ГХ связано со значительными временными и трудовыми затратами. Кроме того, количественная характеристика состава эфирных масел требует наличия соответствующих стандартных соединений, а неизбежное «старение» материала колонок может сказываться на точности определения времен удерживания.

Укажем также на тенденцию, направленную на создание рациональных многокомпонентных композиций на основе нескольких растений, что в свою очередь подразумевает разработку новых подходов для проведения достоверных и, желателно, экспресс-анализов количественного и качественного состава фитопрепаратов.

Таблица 3 – Состав ЭМ многоколосника морщинистого в зависимости от года сбора и фазы развития по данным газожидкостной хроматографии (%)

Соединение	Фаза цветения		Фаза плодоношения	
	2006	2007	2008	2009
I (тимол)	–	–	–	–
II (мирцен)	0,2	0,5	0,5	0,4
III (лимонен)	8,4	13,7	16,3	11,7
IV (β -кариофиллен)	0,7	0,2	1,5	0,6
V (пулегон)	17,0	10,3	4,5	7,8
VI (ментон)	7,1	5,4	7,2	5,8
VII (изоментон)	32,1	10,1	39,4	33,1
VIII (камфора)	<0,1	0,2	<0,1	<0,1
IX (линалилацетат)	<0,1	0,3	<0,1	<0,1
X (линалоол)	0,1	0,2	0,1	<0,1
XI (β -фелландрен)	–	–	–	–
XII (метилхавикол)	8,9	25,3	16,3	27,1
XIII (метилэвгенол)	5,7	3,0	6,5	5,5
XIV (сабинен)	0,20	9,6	0,3	0,4
β -пинен	<0,1	0,1	–	<0,1
p-цимен	0,7	0,8	–	<0,1
Эвгенол	–	1,0	–	<0,1
г-кадинен	<0,1	–	–	<0,1
д-кадинен	<0,1	–	–	<0,1

Сопоставление данных по количественному составу ЭМ многоколосника морщинистого, полученных методом ЯМР-спектроскопии и ГХ

В соответствии с полученными данными (таблицы 1 и 2) основными компонентами (суммарное количество которых превышает 90%) являются изоментон, лимонен, метилхавикол, метилэвгенол и пулегон, что в целом хорошо согласуется с результатами исследования эфирного масла многоколосника морщинистого методом ГХ, полученными нами и также авторами [11]. Поэтому можно утверждать, что спектроскопия ЯМР позволяет надежное определение качественного и количественного состава сложных систем, к которым следует отнести эфирное масло многоколосника морщинистого, и тем самым может не только дополнять, но в ряде случаев быть достойной альтернативой традиционно используемых хроматографических подходов. К ее несомненным достоинствам следует отнести небольшие временные затраты на проведение собственно анализа, простоту подготовки анализируемой пробы, надежный контроль подлинности и качества растительного препарата, поскольку во всех случаях необходимым условием анализа является установление химической структуры входящих в состав образца индивидуальных соединений, а также возможность открытия в составе исследуемых систем новых соединений, образцы которых отсутствуют в соответствующих базах данных.

Оценка содержания пулегона в эфирном масле многоколосника морщинистого

Одним из основных компонентов ЭМ (таблицы 2 и 3) является пулегон. Надо сказать, что пулегон является природным монотерпеноидом и входит в состав многих эфирных масел, включая многоколосник морщинистый, а также различные виды мяты. Не вызывает сомнения его высокая биологическая активность, в частности, антиноцицептивная (обезболивающая), антибактериальная, фумигантная и акарицидная (антиклещевая) [12, 13]. Пулегон находит широкое применение в парфюмерии, ароматерапии, а в последнее время в фармакологии для повышения биодоступности ряда лекарственных соединений, таких как фторурацил, пропранолол гидрохлорид, индометацин, кетопрофен и тамоксифен [14].

Вместе с тем, имеется ряд сообщений о выраженной гепатотоксичности пулегона при использовании эфирных масел с высоким содержанием этого монотерпена [12, 13]. В настоящее время существует ряд ограничений на применение растительного сырья, содержащего пулегон, в составе пищевых продуктов, добавок и напитков, в том числе в РФ [5] и странах Евросоюза [6]. В Республике Беларусь, согласно СанПиН 13–10 РБ 2002 [7], максимальное допустимое содержание пулегона в пищевых добавках составляет 25 мг/кг, в напитках – 100 мг/кг, в том числе напитках с использованием мяты – 250 мг/кг, а в кондитерских изделиях – 350 мг/кг. Контроль содержания пулегона традиционно принят для сырья различных видов мят, как наиболее интенсивно используемого в пищевой и фармацевтической промышленности. В связи с расширением в последние годы перечня применяемого растительного сырья актуальной становится проблема контроля содержания токсичных компонентов в перспективных для практического использования пряно-ароматических растениях. К сожалению, следует констатировать, что имеется несомненный дефицит данных по биохимическому составу новых видов растений, в том числе, потенциально опасных из-за токсичности соединений. Так, в последнее время все шире используется растительное сырье многоколосника морщинистого, в том числе в составе пищевых продуктов и биологически активных добавок. Поэтому определение граничных условий его применения представляет значительный интерес.

В странах ЕС в соответствии с Фармакопеей Европы максимальная суточная доза пулегона и его метаболита ментофурана не должна превышать 140 мг, что равноценно 2,3 мг/кг для человека с массой тела 60 кг. Приведенные в таблице 2 данные показывают, что максимальное содержание пулегона в исследованных нами образцах эфирного масла многоколосника морщинистого составляет от 11 до 19 моль % и относительно мало зависит от фазы развития растения и года сбора сырья. Приняв плотность ЭМ за 0,9 г/см³ и проведя несложные подсчеты, можно утверждать, что рекомендованная максимальная суточная доза пулегона для человека с массой тела 60 кг содержится в 0,9–1,5 мл эфирного масла многоколосника морщинистого.

Выводы

1. Методами ¹H-ядерной спектроскопии и газожидкостной хроматографии охарактеризованы эфирные масла многоколосника морщинистого, собранного в разные годы и разные фазы развития.

2. Показано, что спектроскопия ЯМР позволяет надежное определение качественного и количественного состава сложных систем, к которым следует отнести эфирные масла пряно-ароматических растений, и тем самым может не только дополнять, но в ряде случаев быть достойной альтернативой традиционно используемых хроматографических подходов. К несомненным достоинствам ЯМР-спектроскопии следует отнести небольшие временные затраты на проведение собственно анализа, простоту подготовки анализируемой пробы, надежный контроль подлинности и качества растительного препарата, поскольку во всех случаях необходимым условием анализа является установление химической структуры входящих в состав образца индивидуальных соединений, и наконец, возможность открытия в составе исследуемых систем новых соединений, образцы которых отсутствуют в соответствующих базах данных.

3. На базе ЯМР-спектроскопии разработаны новые подходы для качественного и количественного экспресс-анализа состава эфирного масла многоколосника морщинистого, а также содержания гепатотоксичного компонента эфирных масел – пулегона. Полученные результаты стали основой разработанного лабораторного регламента на проведение экспресс-теста качества и подлинности эфирного масла многоколосника морщинистого, перспективного для практического использования в пищевой и фармацевтической промышленности.

Список литературы

1. Guenther, E. The Essential Oils / E. Guenther – Toronto-New York-London: Academic Press, 1952. – 750 p.
2. Горяев, М.И. Эфирные масла флоры СССР / М.И. Горяев. – Алма-Ата: Изд. АН КССР, 1952. – 155 с.
3. Guendez, R. Determination of low molecular weight polyphenolic constituents in grape (*Vitis vinifera* sp.) seed extracts and association with antiradical activity / R. Guendez // Food Chemistry. – 2005. – Vol. 89, № 1. – P. 1–9.
4. Dmidhaigi, R. Essential oil composition of *Agastache* / R. Dmidhaigi // J. Ess. Oil Res. – 2003. – Vol. 15, № 1. – P. 52–53.
5. СанПиН 2.3.2.1293–03. Гигиенические требования по применению пищевых добавок. М.: Минюст РФ, 2003.
6. Council directive of 22 June 1988 on the approximation of the laws of the Member States (88/388/EEC) European commission [Electronic resource]. – Brussel, 1988. – 15 p. http://ec.europa.eu/food/fs/sfp/addit_flavor/flav09_en.pdf.
7. СанПиН 13–10 РБ 2002. Гигиенические требования к качеству и безопасности пищевых добавок и их применению. – Минск, 2004.
8. Пигулевский, Г.В. Химия терпенов / Г.В. Пигулевский. – Ленинград: Изд-во ЛГУ, 1949. – 145 с.
9. 100 лет хроматографии / Отв. ред. Б.А. Руденко. – М.: Наука, 2003. – 739 с.
10. Рудаков, О.Б. Спутник хроматографиста / О.Б. Рудаков. – Воронеж: Водолей, 2004. – 274 с.
11. Коваленко, Н.А. Хроматографические методы анализа органических соединений / Н.А. Коваленко [и др.] // Международная конференция «Методы анализа органических соединений»: Тез. докл. – Киев, 2007. – С. 33.
12. Эфирные масла. Как надо контролировать качество эфиромасличной продукции [Electronic resource]. – 2003. – 18 с. <http://www.leffingwell.com/programs.htm>.
13. Thorup, I. Short term toxicity study in rats dosed with pulegone and menthol / I. Thorup [et al.] // Toxicol. Lett. – 1983. – Vol.19. – P. 207–210.
14. Olsen, P. Neurotoxicity in rats dosed with peppermint oil and pulegone / P.Olsen, I. Thorup // Arch. Toxicol. Suppl. 7 – 1984. – P. 408–409.

DEVELOPMENT OF EXPRESS-ANALYSIS APPROACH OF ESSENTIAL OILS' IDENTITY AND QUALITY ON THE BASIS OF HIGH RESOLUTION NMR SPECTROSCOPY

E.D. Skakovskii*, **V.P. Kiselev**, **L.Yu. Tychinskaya***, **A.G. Schutova****, **L.V. Goncharova****,
A.V. Spirydovish**, **A.I. Lamotkin*****, **N.A. Bovdey**, **P.A. Kiselev**
Institute of Bioorganic Chemistry of NAS of Belarus, Minsk, Belarus
**Institute of Physical Organic Chemistry of NAS of Belarus, Minsk, Belarus*
***Central Botanical Garden of NAS of Belarus, Minsk, Belarus*
****Belarusian State Technological University, Minsk, Belarus*

On the basis of ^1H NMR-spectroscopy an approach enabling carrying out express-analysis of identity and quality of essential oils was elaborated. For this purpose objects of research were samples of essential oils of giant-hyssop (*Agastache rugosa* (Fisch. et Mey) O.Kuntze), collected at different years and on different stages of development. Data of NMR-spectroscopy were matched with the results of samples analysis by gas-liquid chromatography method.