

УДК 615.322:54.061/.062:543.544.5.068.7

## ХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СЖИЖЕННОГАЗОВЫХ ЭКСТРАКТОВ СОЦВЕТИЙ ЛИПЫ

Демьяненко Д.В., Демьяненко В.Г., Дмитриевский Д.И.

Национальный фармацевтический университет

В работе методом высокоэффективной жидкостной хроматографии был проведен анализ фенольных соединений в экстрактах, полученных сжиженными газами из соцветий липы. Установлено, что фреоны-32 и 410А проявляли селективность к производным флавоноидов и оксикоричных кислот. Во фреоно-аммиачных вытяжках обнаружены метоксикумарины, оксикоричные кислоты и глюкозид апигенина. Таким образом, определенные сжиженные газы являются перспективными экстрагентами для ряда фенольных соединений.

**Ключевые слова:** соцветия липы, фреоны, экстракты, высокоэффективная жидкостная хроматография, анализ, фенольные соединения.

В настоящее время цветки липы (*Tiliae flos*) являются одним из шести видов лекарственного растительного сырья (ЛРС), для которых отсутствует раздел „Количественное определение” в монографиях ЕР7, ДФУ, JP XV и ВР 2009 [1, 2, 3, 4, 5]. Только в ГФ Республики Беларусь, с. 370 [6] имеется соответствующая методика, предусматривающая стандартизацию цветков липы по содержанию флавоноидов, которое должно быть не менее 0,5 % от массы абсолютно сухого сырья в пересчете на кверцетин. Качественный и количественный состав липофильных соединений, в частности эфирного масла, не нормируется ни в одной монографии, хотя указанные фракции биологически активных веществ (БАВ) обладают высокой противовоспалительной и антимикробной активностью [7, 8].

Очевидно, что указанная ситуация вызвана недостаточностью данных о веществах, отвечающих за определенный фармакологический эффект, или отсутствием аналитических исследований их количественного содержания.

Таким образом, проблема разработки методик анализа соцветий липы и выделенных из них экстрактов является весьма актуальной.

Согласно имеющимся литературным источникам, качественный и количественный состав липофильных БАВ, в том числе эфирных масел, полученных из родственных видов лип или даже из одного вида, но различными технологиями, сильно варьирует [9, 10, 11, 12]. Так, например, эфирное масло, выделенное методом гидродистилляции из соцветий *T. platy-phyllis* румынской заготовки, содержало преимущественно фенилэтанол (свыше 26%), фенольные эфиры (около 23%) и монотерпеновые спирты (18,9%), в то время как суммарное содержа-

ние алифатических углеводородов было небольшим – 4,5% [11]. Согласно данным [12] в эфирном масле соцветий *T. cordata* содержится 88 компонентов, из которых 16 – в количестве свыше 1%, причем последние в большинстве своем имеют терпеноидную структуру. Следует отметить, что во всех вышеприведенных исследованиях эфирные масла и терпеноиды были получены гидродистилляцией, реже экстракцией органическим растворителем. Всего лишь единственный среди найденных нами литературных источников [10] посвящен изучению химического состава липофильных экстрактов, выделенных сжиженным газом тетрафторэтаном (фреоном-134а) из соцветий нефармакопейного вида *Tilia tomentosa*.

В ходе предыдущих исследований нами впервые были получены путем комплексной переработки соцветий липы [13, 14] сжиженногазовые и сверхкритический экстракты из соцветий липы сердцевидной. Также было установлено, что летучие соединения, которые выявлялись методом газожидкостной хроматографии (ГЖХ), составляли порядка 30-50% от массы экстрактов.

Учитывая, что на определенных стадиях для экстрагирования использовались относительно полярные сжиженные газы или их смеси, можно предполагать переход фенольных соединений (флавоноидов, фенолокислот, кумаринов и др.) в нелетучие фракции экстрактов. Исходя из этого, целью данной работы было проведение качественного и количественного анализа фенольных БАВ методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

### Материалы и методы

Исходным сырьем были соцветия липы сердцевидной *Tilia cordata*, заготовленные в Ровенской области в 2008 г. и измельченные до размера частиц 0,5-2,0 мм.

В результате последовательного экстрагирования сырья и шротов различными сжиженными газами, а также СК-СО<sub>2</sub>, были получены следующие образцы:

№1 – липофильный экстракт из соцветий липы, выделенный дифторхлорметаном (фреоном-22); №2 – дифторхлорметановый экстракт из шрота, полученного после предварительной обработки исходного сырья тетрафторэтаном (фреоном-134а); №3 – дифторметановый экстракт из шрота соцветий липы после получения образца №1; №4 – сверхкритический СО<sub>2</sub>- экстракт исходного сырья, извлеченный при температуре 60°C и давлении 400 атм в течение 120 минут; №5 – экстракт, выделенный из шрота после получения образца №2, азеотропной смесью пентафторэтана и дифторметана (фреоном-410А). Далее указанный экстрагент смешивали с аммиаком и продолжали экстракцию шрота. По окончании отгонки экстрагента из испарителя кубовый остаток растворяли в 70% этаноле и путем последовательной экстракции в системе жидкость-жидкость получали водно-спиртовую, гексановую, хлороформную и этилацетатную фракции (образцы №№

6, 7, 8, 9 соответственно).

С целью идентификации фенольных соединений и их количественного определения экстракты соцветий липы анализировали методом ВЭЖХ с детекцией по УФ-спектрам, заложенным в базу данных программного обеспечения хроматографа. Для данных экспериментов отбирали образцы №№ 1, 3, 5-9, учитывая, что в ходе предварительного хроматографирования на тонкослойных пластинах в трех различных системах растворителей в экстрактах №2 и №4 не было обнаружено ни одного фенольного соединения [14].

Анализ фенольных БАВ осуществляли по следующей методике.

Из точных навесок вышеупомянутых экстрактов готовили 1,00% растворы в 96% спирте, фильтровали их через тefлоновый фильтр с размером пор 0,45 мкм в виалу для анализа. Объем пробы, вводимой в инъекционный блок, составлял 2 мкл.

Определение качественного и количественного состава фенольных соединений проводили на хроматографе Agilent Technologies (модель 1100), укомплектованном проточным вакуумным дегазатором G1379A, четырьмя канальными насосами градиента низкого давления G1311A, автоматическим инжектором G1313A, термостатом колонок G1316A и диодноматричным детектором G1314A. Хроматографическая колонка размером 2,1x150 мм была заполнена октадецилсилильным сорбентом зернистостью 3,5 мкм «ZORBAX-SB C-18». Хроматографи-

рование проводили при следующих условиях: температура термостата – 35°C; скорость потока подвижной фазы – 0,25 мл/мин; рабочее давление элюента – 240-300 кПа; режим – градиентный. В качестве подвижной фазы использовали раствор А (0,1% водную фосфорную кислоту  $H_3PO_4$  с добавлением 180 мкл/л триэтиламина и 3 мл/л тетрагидрофурана) и раствор В (метанол) в соотношении 10:90 (первые 8 мин.), 30:70 (с 8 по 24 мин.), а с 24-й минуты – только раствор А. Параметры детектирования были следующими: масштаб измерения – 1,0; время сканирования – 0,5 с, параметры снятия спектра – каждый пик в диапазоне 190-600 нм. Идентификацию фенольных соединений проводили по времени удержания стандартов кумаринов, оксикоричных кислот, флавоноидов и по спектральным характеристикам. Количественное содержание компонентов определяли по соотношению площадей пиков на хроматограммах исследуемых образцов и стандартов.

### Результаты и обсуждение

Хроматограмма дифторхлорметанового экстракта из соцветий липы (образец № 1) приведена на рис. 1.

Как видно из полученных данных, дифторхлорметан селективно экстрагирует из соцветий липы лишь одно фенольное соединение со временем удержания  $t_r = 31,80$  мин. и максимумами длин волн  $\lambda_{max} = 228, 260, 360$  нм, которое было идентифицировано как рутин.

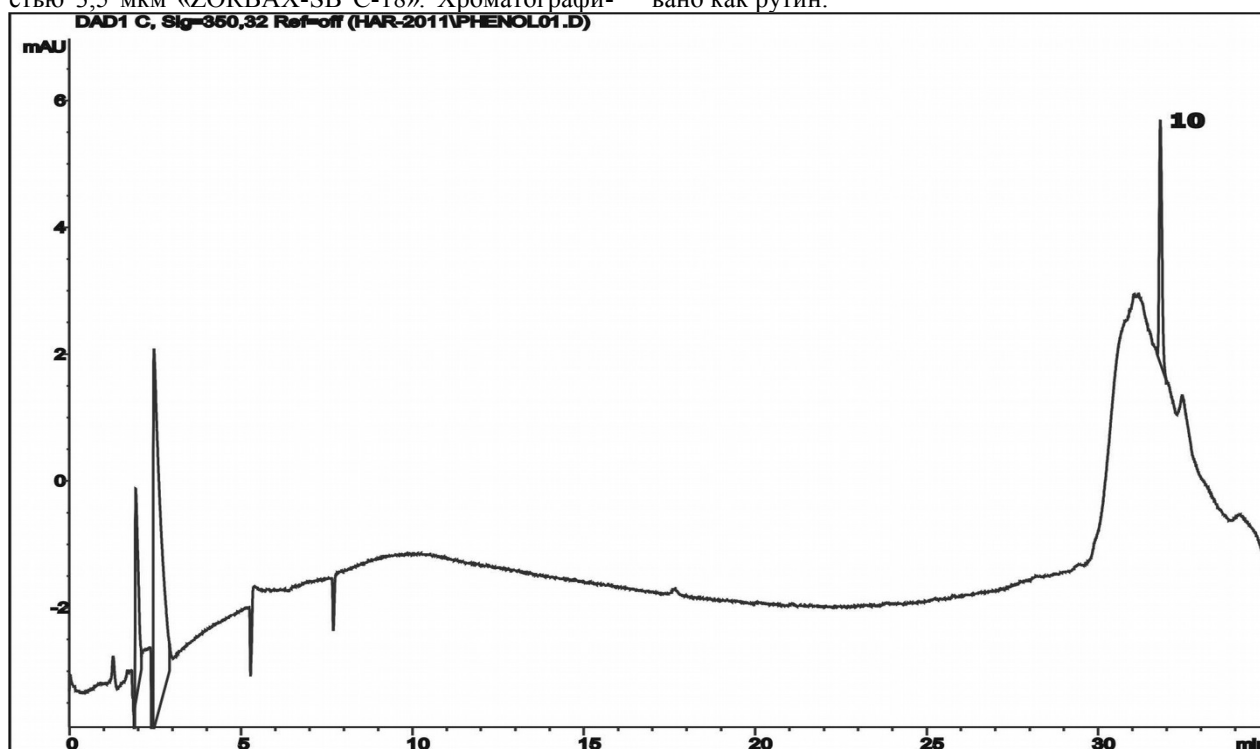


Рис. 1. Хроматограмма дифторхлорметанового экстракта.

На хроматограмме образца №3 (рис. 2) проявлялось 5 соединений фенольной природы, что хорошо согласуется с предыдущими данными анализа методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) [14].

Вещество №6 с  $t_r = 19,56$  мин. и максимумами  $\lambda_{max} = 228, 272$  и  $348$  нм было определено как тилирозид. Соединения № 7 и 8 с  $t_r = 22,94$  мин.,  $\lambda_{max} = 205, 228, 311$  нм и  $t_r = 23,95$  мин.,  $\lambda_{max} = 200, 270, 340$  нм соответственно представляли собой этерифицированное

(гликозидированное) производное *n*-кумаровой кислоты и 7-глюкозид апигенина. Вещество № 9, которое доминировало в данном образце и имело значения  $t_r=31,48$  мин.,  $\lambda_{max}=220, 272, 310$  и слабый максимум при 348 нм, не было идентифицировано.

В экстракте № 5, полученном азеотропной смесью сжиженных дифторметана и пентафторэтана (1:1), методом ВЭЖХ обнаруживалось только 2 фенольных соединения (рис. 3): рутин в небольшом количестве и неидентифицированное вещество № 9, являющееся доминирующим.

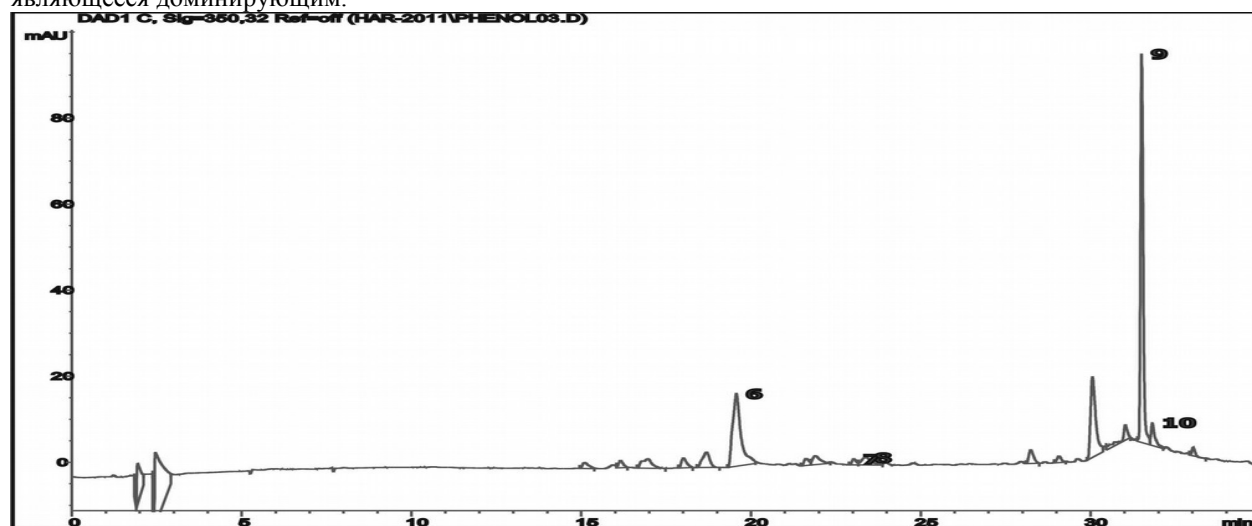


Рис. 2. Хроматограмма дифторметанового экстракта.

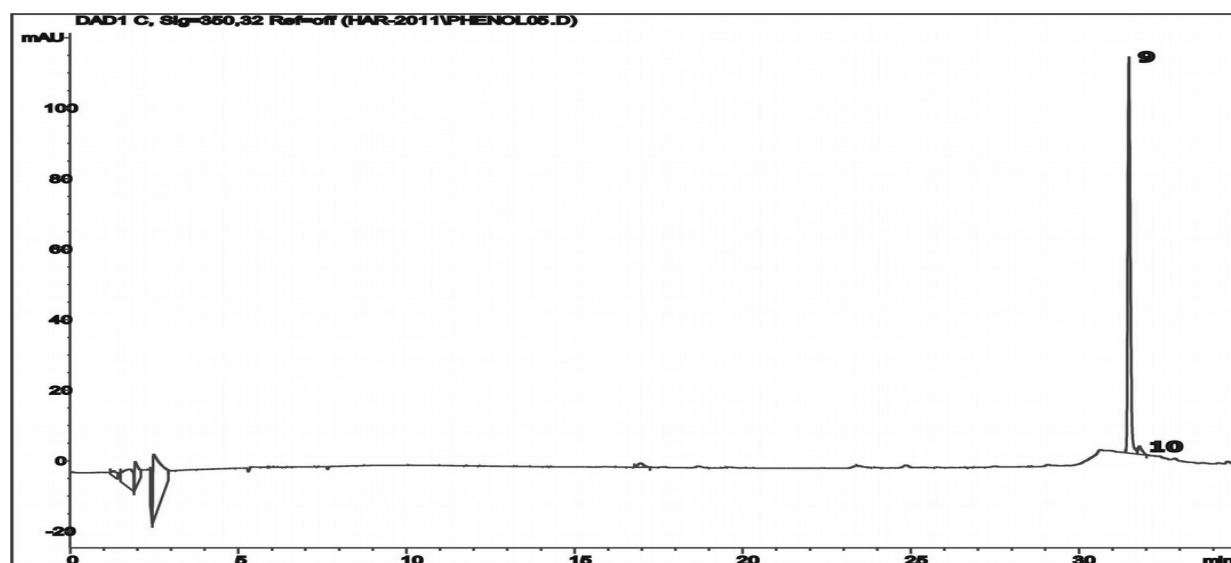


Рис. 3. Хроматограмма экстракта, полученного хладоном- 410А.

В водно-спиртовой фракции фреоно-аммиачного экстракта (образец № 6), полученной после последовательной его очистки органическими растворителями, были обнаружены 4 соединения фенольного характера (рис. 4): производное *n*-кумаровой кислоты, 7-глюкозид апигенина, рутин и

Таким образом, хладон-410А вследствие меньшей полярности по сравнению с хладоном-32 экстрагировал более узкий спектр БАВ из соцветий липы, и данный эффект может использоваться в технологии очистки суммарных экстрактов. С другой стороны, в предыдущих наших исследованиях методом ТСХ в образце № 5 было найдено до 7 веществ фенольной природы. Следовательно, для анализа экстрактов соцветий липы нужно использовать обе методики.

неидентифицированное соединение № 9, являющееся доминирующим, как и в предыдущих образцах, полученных дифторметаном или содержащим его фреоном- 410А. Следовательно, фреоно-аммиачная смесь также способна экстрагировать относительно полярные фенольные БАВ.

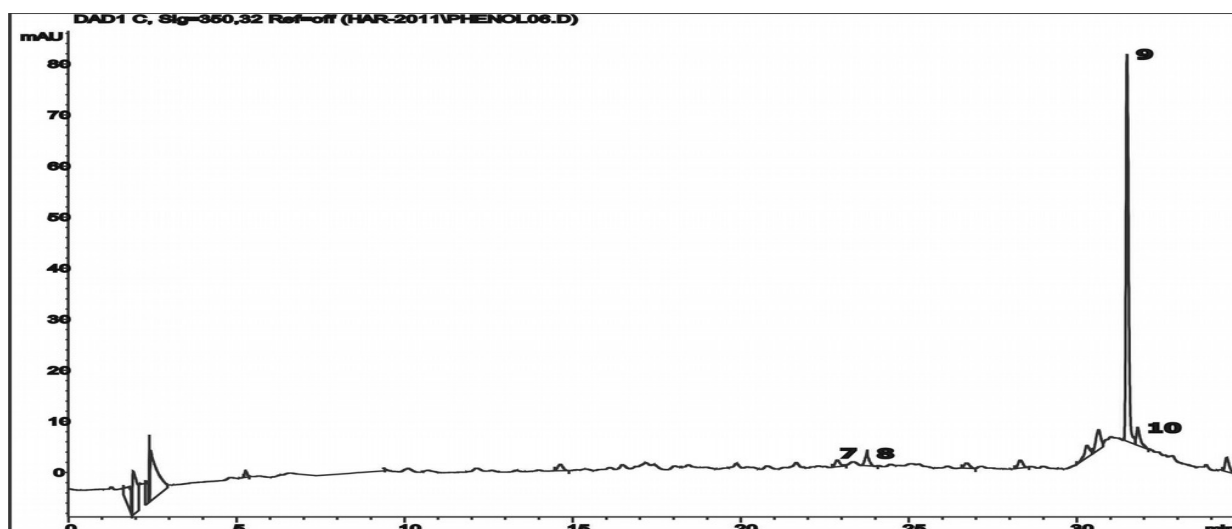


Рис. 4. Хроматограмма водно-спиртовой фракции фреоно-аммиачного экстракта.

На хроматограмме гексановой фракции фреоно-аммиачного экстракта наблюдались два достаточно интенсивных пика со временем удержания  $t_r=7,87$  и  $8,87$  мин. (рис. 5). Данные соединения № 1 и № 2 имели схожие УФ-спектры с максимумами поглощения  $\lambda_{\max}=200-205, 270-272$  и  $340$  нм и были идентифицированы как 7- и 6- метоксикумарины. Эти вещества выявлялись только в образце № 7.

Как видно из рис. 6, хлороформная фракция фреоно-аммиачного экстракта содержала значитель-

ное количество неидентифицированного вещества № 3 со временем удержания  $t_r=10,09$  мин. и дающего УФ- спектр с максимумами поглощения  $\lambda_{\max}=242$  и  $400$  нм и плато в диапазоне  $350-385$  нм, причем это вещество обнаруживалось только в данном образце. Кроме того, присутствовало незначительное количество кофейной кислоты (соединение №5) и производное *n*-кумаровой кислоты (соединение №7).

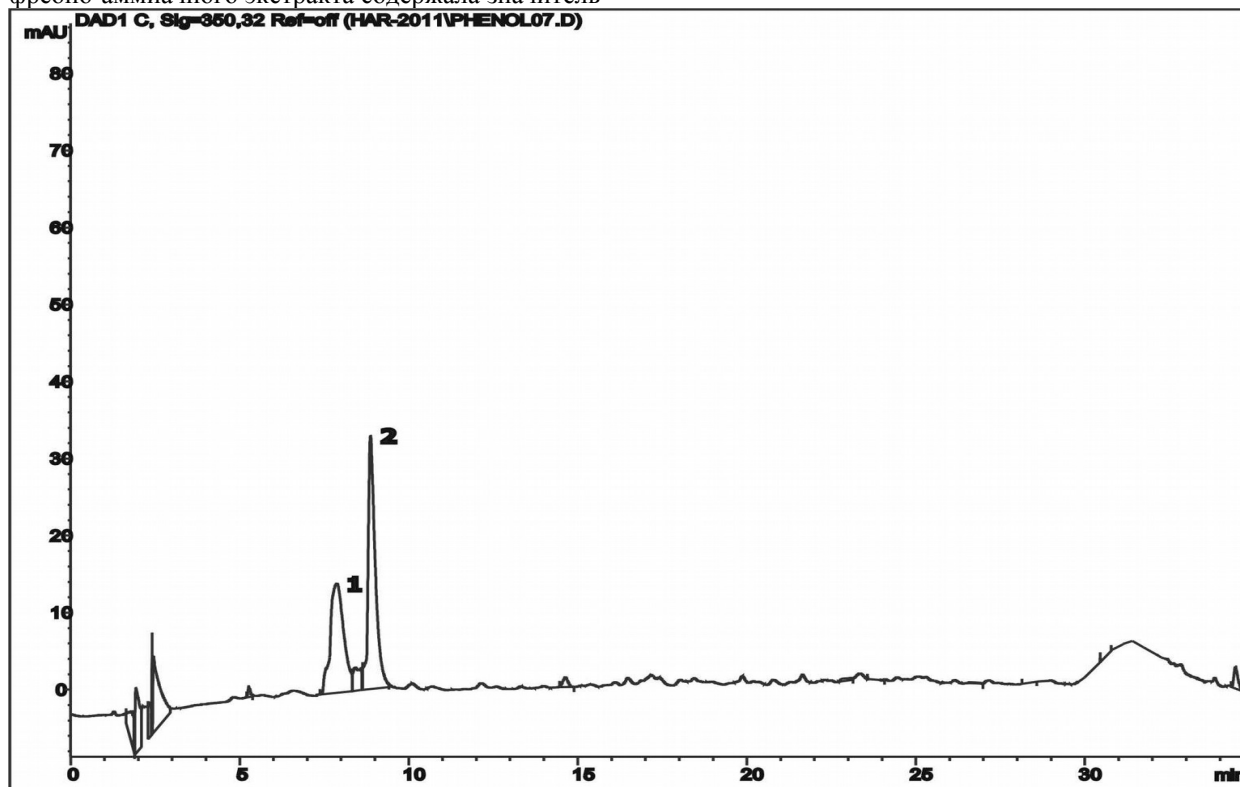


Рис. 5. Хроматограмма гексановой фракции фреоно-аммиачного экстракта.

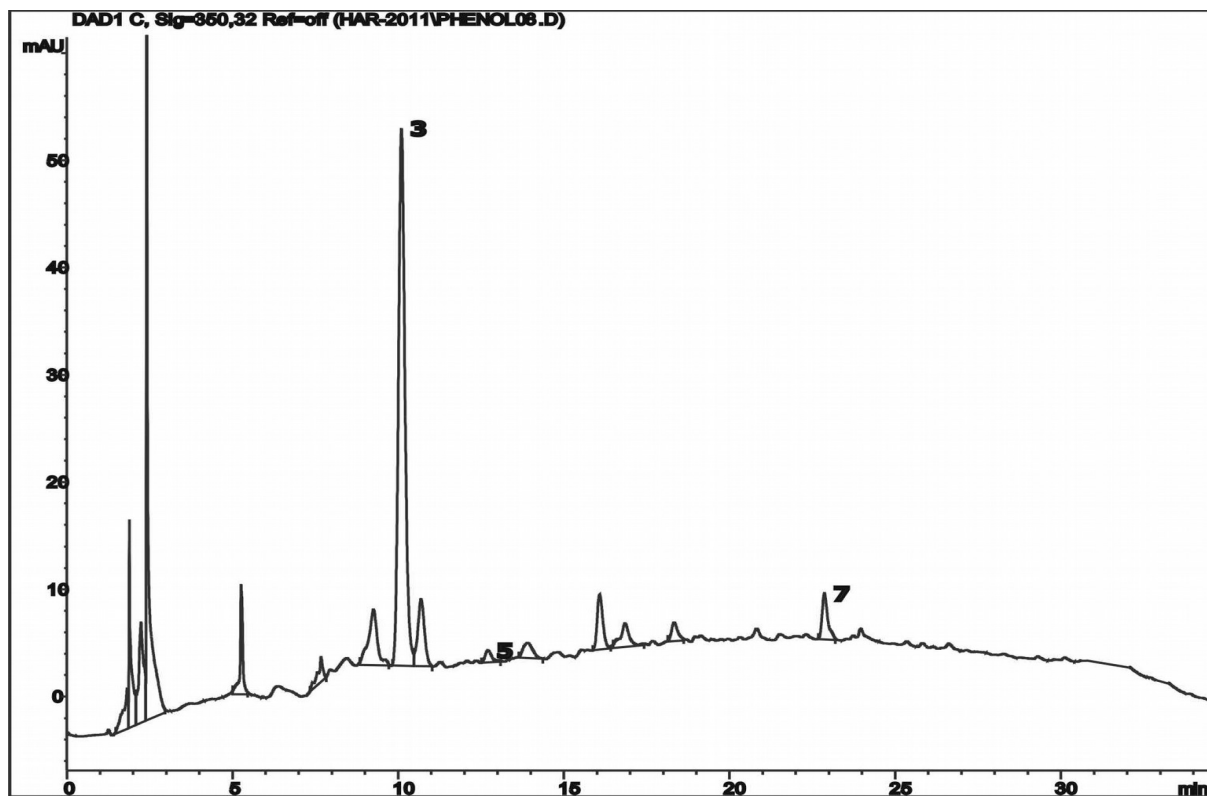


Рис. 6. Хроматограмма хлороформной фракции фреоно-аммиачного экстракта.

При хроматографировании этилацетатной фракции фреоно-аммиачного экстракта (образец № 9) были выявлены в заметных количествах 7-глюкозид апигенина со временем удержания  $t_r=23,95$  мин.

(соединение №8), кофейная кислота (соединение №5 с  $t_r=12,68$  мин.), вещество № 4 с  $t_r=11,38$  мин. и максимумами поглощения УФ- спектра  $\lambda_{max}= 225$  и  $305$  нм, идентифицированное как *n*-кумаровая кислота (рис. 7).

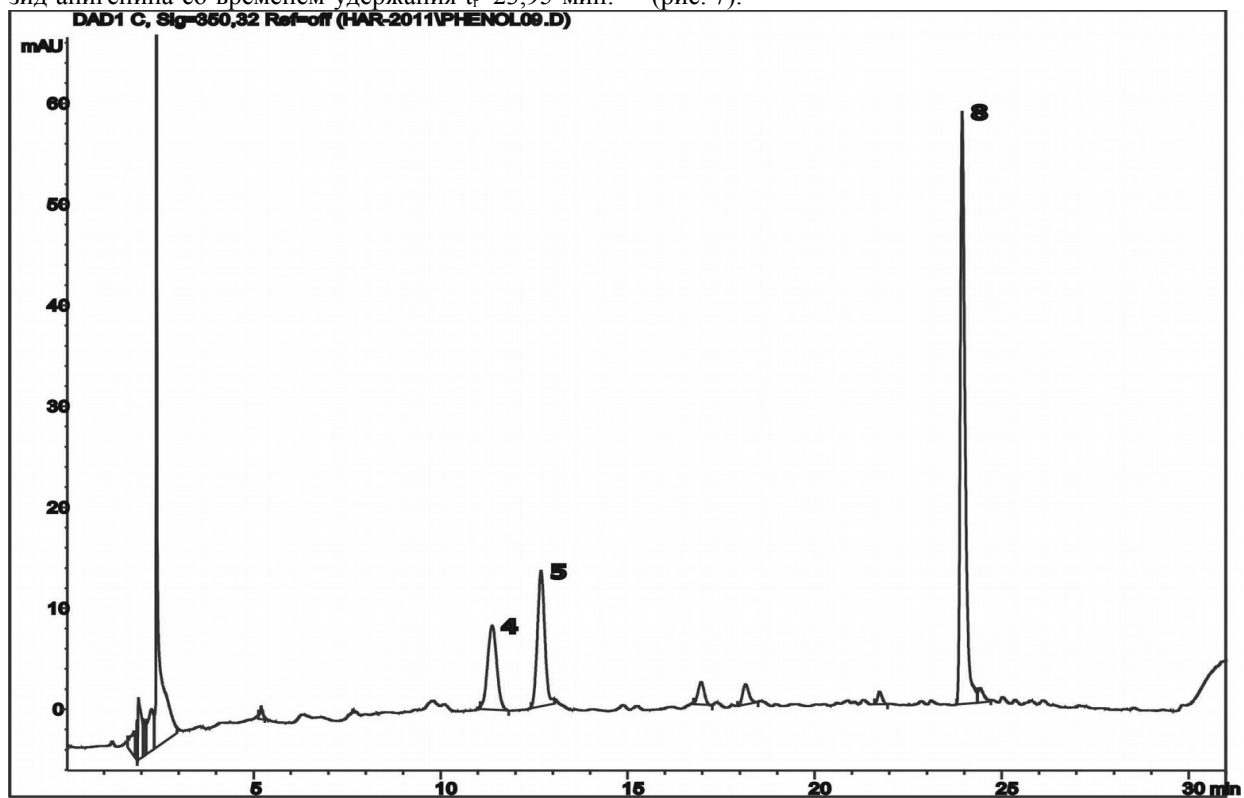


Рис. 7. Хроматограмма этилацетатной фракции фреоно-аммиачного экстракта.

Количественное содержание индивидуальных фенольных соединений в сжиженногазовых экстрактах определяли сравнением площадей пиков

у исследуемых и стандартных образцов с известной концентрацией вещества. Было установлено (табл. 1), что экстракт, полученный хладоном-22, содержит лишь незначительное количество рутина – 0,081 %.

Дифторметановый экстракт был значительно более обогащен фенольными БАВ сравнительно полярного характера – их суммарное количество составляло 1,293% от массы образца № 3, причем это был единственный из исследованных экстрактов,

который содержал характерный для липы флавоноид тилирозид (0,424%). Дифторметан также хорошо экстрагировал из сырья неидентифицированное вещество № 9, доминирующее среди фенольных БАВ в данном экстракте. Аналогично, в образце № 5 это соединение также оказалось основным – его содержание составляло 0,873%; кроме этого, присутствовал рутин в малом количестве – 0,028%.

Таблица 1 – Содержание фенольных соединений в сжиженногазовых экстрактах соцветий липы

№	Название вещества	Содержание фенольных соединений в экстрактах, %							
		№ образца							Всего
		1	3	5	6	7	8	9	
1	7-Метоксикумарин	-	-	-	-	0,588	-	-	0,588
2	6-Метоксикумарин	-	-	-	-	0,726	-	-	0,726
3	Неидентифицированное	-	-	-	-	-	1,015	-	1,015
4	<i>n</i> -Кумаровая кислота	-	-	-	-	-	-	0,213	0,213
5	Кофейная кислота	-	-	-	-	-	0,024	0,274	0,298
6	Тилирозид	-	0,424	-	-	-	-	-	0,424
7	Производное <i>n</i> -кумаровой кислоты	-	0,019	-	0,021	-	0,076	-	0,116
8	Глюкозид апигенина	-	0,054	-	0,087	-	-	0,779	0,920
9	Неидентифицированное	-	0,732	0,873	0,604	-	-	-	2,209
10	Рутин	0,081	0,064	0,028	0,073	-	-	-	0,246
Всего фенольных БАВ в экстрактах		0,081	1,293	0,901	0,785	1,314	1,115	1,266	6,755
Всего во фреоно-аммиачном экстракте		-	-	-	4,480			-	-

Как видно из табл. 1, суммарные фреоно-аммиачные вытяжки (органические и водно-спиртовая фазы) содержали заметное количество фенольных БАВ – всего 4,480%, из которых 1,314% составляли метоксикумарины, переходящие в гексановую фракцию. Модифицированный аммиаком фреон хорошо экстрагировал глюкозид апигенина – его количество в образцах № 6 и 9 суммарно составляло 0,866 %, что в 16 раз превышало содержание этого БАВ в дифторметановом экстракте. Кофейная и *n*-кумаровая кислоты с суммарным содержанием 0,511 % (0,298+0,213%), а также неидентифицированное вещество № 3 в количестве 1,015% обнаруживались только во фреоно-аммиачных вытяжках.

Таким образом, на основе результатов анализа полученных нами экстрактов из соцветий липы можно заключить, что определенные сжиженные газы или их смеси являются перспективными для выделения фенольных соединений из указанного сырья, причем отдельные экстрагенты в результате их селективности к некоторым БАВ могут использоваться для фракционирования первичных экстрактов.

### Выводы

1. Методом ВЭЖХ исследован состав фенольных БАВ в сжиженногазовых экстрактах соцветий липы.
2. В дифторхлорметановом экстракте среди фенольных БАВ найдено незначительное количество рутина – 0,081%.
3. Установлено, что фреоны-32 и 410А выявляли селективность к среднеполярным БАВ (производным флавоноидов и оксикоричных кислот), в частности, фреон-32 экстрагировал заметное количество флавоноида тилирозида, содержание которого в экстракте составляло 0,424%, а суммы фенольных соединений – 1,293%.
4. Во фреоно-аммиачных извлечениях, полученных из шрота липы после предварительной экстракции фреонами - 22 и 410А, обнаружены метоксикумарины, оксикоричные кислоты и глюкозид апигенина в количествах 1,314%, 0,511% и 0,866% соответственно. Суммарное содержание фенольных соединений в указанных экстрактах составляло 4,480%.

### References

1. European Pharmacopoeia. - 7<sup>th</sup> ed. Strasbourg:

- Council of Europe, 2005. - 3310 p.
2. State Pharmacopoeia of Ukraine / State Enterprise "Scientific and Expert Pharmacopoeian Center". - 1<sup>st</sup> Ed.- Suppl. 2.- Kharkiv: RIREG, 2008. - 620 p.
  3. Japanese Pharmacopoeia - 15<sup>th</sup> edition. - Tokio, 2006. - 1788 p.
  4. British Pharmacopoeia 2009. - Bournemouth: Crown Publishers, 2009. - 10952 p.
  5. Gryzodub, A. I. Characteristics of pharmacopoeial approaches to quantifying of raw herbal drugs and combined herbal drugs / A. I. Gryzodub, O. A. Evtifeeva, K. I. Proskurina // Pharmacom.- 2012.- N 3,- P. 7-30.
  6. State Pharmacopoeia of Belarus. Vol. 2. General and Specific Monographs / Committee for Pharmaceutical and Microbiological Industry.- Minsk, 2009. - 471 p.
  7. Demyanenko, D. V. Microbiological study of liquefied-gas and supercritical extracts from lime flowers / D.V. Demyanenko, Ye.M. Babich, N.I. Sklyar // Pharmaceutical review.- 2012.- N 1.- P.119-123.
  8. Pharmacological study of Freon extract from lime flowers in adjuvant-induced arthritis model in rats / S.M. Drogozov, D.V. Demyanenko, G.V. Belik [et al.] // Phytotherapy Review.- 2013.- N3.- P. 41-44.
  9. Chemical composition and antimicrobial activity of linden (*Tilia tomentosa* Moench.) CO<sub>2</sub> extract / T. Atanasova [et al.] // Plovdiv University „Paisii Hilen-darski“ – Bulgaria Scientific Papers.- 2008.- Vol. 36, N 5.- P. 91-96.
  10. Low temperature extraction of essential oil bearing plants by liqueficate gases. 2. Flowers of linden (*Tilia tomentosa* Moench.) [Electronic resource] / T. Atanasova [et al.]– Access mode: <http://www.e-extracts.com/ExtractumScientific6.pdf>.
  11. Rădulescu, V. Analysis of volatile compounds of officinal *Tiliae flos* by gas–chromatography coupled with mass spectrometry / V. Rădulescu, E. Oprea // Farmacia.- 2008.- Vol. LVI, N 2.- P.129-138.
  12. Marchyshyn, S. M. Investigation and elemental composition of volatile oil of leaves and lime blossoms *T. cordata* / S.M. Marchyshyn, M.I. Drapak // Pharm. Journal.- 2009.- № 1.- P. 123-126.
  13. Patent 93003 UA, IPC (2006.01) C07C29/70. Method of complex processing of linden blossom / V.G. Demyanenko, D.V. Demyanenko, S.V. Breusova (Ukraine); National University of Pharmacy (Ukraine). - Appl. 21.05.08; publ. 27.12.10, bull. 24.- 6 p.
  14. Demyanenko, D. V. Study of the qualitative composition of phenolic compounds in condensed gas extracts from linden inflorescences / D.V. Demyanenko // News of Pharmacy.- 2011.- Vol. 67, N 3. P. 54-57.

UDC 615.322:54.061/.062:543.544.5.068.7

#### CHEMICAL ANALYSIS of DENSE-GAS EXTRACTS from LIME FLOWERS

Demyanenko D.V., Demyanenko V.G., Dmitriyevsky D.I.

The purpose of this work was to make qualitative and quantitative analysis of phenolic biologically active sub-

stances (BAS) in the extracts produced from lime flowers with condensed gases, using method of high-performance liquid chromatography (HPLC).

**Materials and methods:** materials for this study were the extracts obtained by consequent processing of the herbal drug and marcs thereof with various condensed gases: difluorochloromethane (Freon R22), difluoromethane (Freon R32), azeotropic mixture of difluoromethane with pentafluoroethane (Freon 410A) and freon-ammonium mixture. Extracts obtained with the latter were subjected to further fractionation by liquid-liquid separation into hexane, chloroform, ethyl acetate and aqueous-alcohol phases. Besides, the supercritical CO<sub>2</sub> extract, obtained from the herbal drug under rather strong conditions (at temperature 60°C and pressure 400 bar), was studied in our previous research. Presence of phenolic BAS and their quantity in the researched samples were determined by method of HPLC with UV-spectrometric detection.

**Results and discussion:** It has been found that Freon R22 extracted trace amounts of rutin from lime flowers – its content was only 0.08% of the total extract weight. On the other hand, Freons R32 and R410A showed good selectivity to moderately polar BAS of lime flowers (derivatives of flavonoids and hydroxycinnamic acids): in particular, the extract obtained with freon R32 contained about 1.3% of the total phenolic substances, and it was the only one of the investigated condensed gases used by us which took the basic flavonoid of lime flowers tiliroside – its content was 0.42% of extract weight. Also Freons R32 and R410A were able to withdraw another compound dominating among phenolic substances in the yielded extracts. Its quantity was rather noticeable – up to 0.87% of extract weight. This substance was not identified by existing database, but its UV-spectrum was similar to those of apigenin glucoside. Total quantities of phenolic compounds in extracts obtained with Freons R32 and R410A were 1.29% and 0.90% respectively. Freon-ammoniac extracts (hexane, chloroform, ethylacetate and aqueous-alcoholic phases in total) contained appreciable quantity of total phenolic BAS – 4.48%, among them 1.31 % was occupied by methoxycoumarins, which came into the hexane fraction. The Freon R410A modified by ammonia successfully extracted apigenin glucoside which was found in ethylacetate fraction in quantity of 0.78% that approximately 15 times exceeded content of this BAS in the extract obtained with non-modified Freon R32. Caffeic and p-cumaric acids with the total content of 0.50% (0.30+0.20% respectively) were revealed only in ethylacetate phase of freon-ammoniac extract. Besides, in chloroform fraction of this extract it was found unidentified substance in quantity of 1.02%. In total after consequent processing of lime flowers with studied condensed gases and their mixtures combined extracts contained 6.75% of phenolic compounds. Supercritical CO<sub>2</sub> was unable to take phenolic substances (this extract was previously analyzed by thin-layer chromatography and therefore was excluded from this work).

**Conclusions:** Thus, some kinds of freons and also their

mixtures modified with ammonia are promising extractive solvents for rather polar BAS of lime flowers, and consecutive infusion with different condensed gases allows to provide full processing of the specified herbal drug and to fractionate the substances different in their chemical composition and polarity.

**Keywords:** lime flowers, freons, extracts, high-performance liquid chromatography, analysis, phenolic compounds.