

УДК 665.527.72

ББК 42.14

И-45

Ильченко Галина Николаевна, заведующая химико-токсикологической лабораторией ГБУ НКЦ ФХМ ФМБА России, г. Москва; e-mail: Galla2810@yandex.ru, тел.: 8(495)5931101;

Кислун Юрий Викторович, врач клинической лабораторной диагностики ГБУ НКЦ ФХМ ФМБА России, кандидат фармацевтических наук, г. Москва; тел.: 8(916)6723385;

Агеева Татьяна Трофимовна, старший научный сотрудник ГБУ МОС ВНИИР им. Н.И. Вавилова, пос. Подгорный, Республика Адыгея; e-mail: Ageta@BK.ru.

**МЕТОДИКА ОЦЕНКИ СОДЕРЖАНИЯ ОСНОВНЫХ КОМПОНЕНТОВ
В ЭФИРНОМ МАСЛЕ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ БАЗИЛИКА (*OCIMUM L.*)**
(рецензирована)

Разработана методика быстрой оценки содержания эфирного масла в растительном сырье видов и разновидностей базилика, позволяющая надежно идентифицировать основные компоненты и количественно определять эвгенол в эфирном масле. Методика позволяет исследовать свежее и сухое растительное сырье.

***Ключевые слова:** экспресс-методика, растительное сырье, эвгенол, эфирное масло, компонентный состав.*

Pichenko Galina Nicolaevna, head of the Chemical and Toxicology Laboratory of SBI SC PHCH FMBA of Russia, Moscow; e-mail: Galla2810@yandex.ru, tel.: 8 (495) 5931101;

Kislun Yuri Victorovich, a doctor of the Clinical Diagnostic laboratory of SBI SC PHCH FMBA of Russia, Candidate of Pharmaceutical Sciences, Moscow; tel.: 8 (916) 6723385;

Ageeva Tatiana Trofimovna, a senior researcher of SBI MOS RSRIP named after N.I. Vavilov, settl. Podgorny, the Republic of Adyghea; e-mail: Ageta@BK.ru.

**METHODS OF ASSESSMENT OF MAJOR COMPONENTS OF THE ESSENTIAL
OIL COMPONENT OF THE PLANT MATERIAL OF BASIL
(*OCIMUM L.*)**
(reviewed)

A method for the rapid assessment of the essential oil content of the plant material of species and varieties of basil, which allows to identify reliably the main components and to quantify the eugenol in the essential oil has been developed. The technique allows to investigate the fresh and dry plant material.

***Keywords:** rapid technique, plant material, eugenol, essential oil component composition.*

Пищевой, парфюмерной и фармацевтической промышленности требуются натуральные эфирные масла, в т.ч. содержащие эвгенол. Одним из источников получения натурального эвгенола на территории РФ может служить базилик эвгенольный. Промышленные сорта, ранее возделываемые на Кубани и странах СНГ, утрачены. При возрождении эфиромасличной отрасли необходимо создать высокопродуктивные сорта базилика эвгенольного, приспособленные к почвенно-климатическим условиям южных регионов России.

В последние годы, с появлением современного приборного оборудования химического анализа, возникла необходимость разработать инструментарий для повышения эффективности селекционных работ с эфирносами. Существующие методики, разработанные для определения эвгенола в эфирных маслах и медицинских препаратах, не подходят для исследований количественного и качественного состава эфирного масла в растительном сырье базилика [1, 2, 3]. Для решения задач в области интродукции, селекции и агротехники базилика эвгенольного, нами разработана экспресс-методика оценки

содержания эвгенола и других компонентов в растительном сырье различных видов и разновидностей базилика (*Ocimum L.*). Методика позволяет надежно идентифицировать основные компоненты и количественно определять эвгенол с целями выбора растительного сырья и оценки оптимальных сроков сбора. Возможна оценка как свежего, так и сухого сырья.

Методика подготовки проб: растительное сырье (листья, стебли, соцветия в количестве 10-15 г) измельчали при помощи ножниц и на аналитических весах (в виалах объемом 4 мл) взвешивали 1 г измельченного сырья. После взвешивания в виалу добавляли 4 мл экстракционной смеси метанол: 25 %-ный водный аммиак в соотношении 9:1 и проводили настаивание в темном месте при комнатной температуре в течение суток. Затем виалы центрифугировали 5 минут при 3000 об/мин. при температуре 24°C, отбирали автоматическим дозатором 80 мкл и переносили в стеклянные вставки в виалы, в которые затем добавляли 100 мкл метанола и 20 мкл метанольного раствора дифениламина (ДФА) в качестве внутреннего стандарта с содержанием 50 мкг/мл. Содержимое вставок перемешивали встряхиванием, вставки переносили в стеклянные виалы на 2 мл и герметично закрывали крышками с тефлонированными септами и помещали виалы в автосамплер хроматографа.

Хромато-масс-спектрометрический анализ проводили при следующих условиях: газовый хроматограф Кристалл 5000, исполнение 2 с масс-селективным детектором DSQ I фирмы Термо, с применением 30-метровой колонки TR-5, внутренний диаметром 0,25 мм и толщиной слоя фазы 0,25 мкм; температурная программа: 70°C (3 мин.), 150°C/мин., 280°C (до 30 мин. общего времени анализа). Газ-носитель гелий в режиме постоянного потока 1 мл/мин. Ввод пробы с делением потока 1:10 (split). Температура испарителя 250°C. Температура масс-селективного детектора 200°C. Исследования проводились в режиме сканирования по полному ионному току. Задержка на растворитель 3 минуты после ввода пробы. Диапазон масс m/z 28-650 а.е.м.

Предварительный поиск веществ проводили в автоматическом режиме с применением программы АМДИС и библиотек в формате АМДИС с обработкой в ручном режиме (вычитание фонового сигнала и поиск по библиотекам). Характеристичные ионы определяемых веществ – базовый ион масс-спектра и молекулярный ион определяемого соединения. При отсутствии в масс-спектре интенсивного молекулярного иона, в качестве дополнительного к базовому, выбирали фрагментарный ион наибольшей интенсивности, который выполняет роль подтверждающего иона. Окончательную идентификацию компонентов пробы осуществляли в ручном поиске с использованием библиотек NIST11.

После проведения хроматографирования масс-спектры, соответствующие вершинам хроматографических пиков, сравнивали с масс-спектрами библиотек «PMW TOX3», «NIST05» и «Wiley7N». Сравнение проводили в режиме регистрации по полному ионному току. Количественную оценку эвгенола производили по методу внутреннего стандарта, с применением капиллярной газовой хроматографии и масс-спектрального детектирования. Определение показателей преломления (n_{D20}) и качественные реакции проводили по ТУ (9336-058-45814830-01).

Предварительно выделенные эвгенол содержащие образцы с хозяйственно-ценными признаками подвергали детальному химическому анализу по разработанной нами экспресс методике. Выход эфирного масла и содержание эвгенола в масле у изучаемых коллекционных образцов базилика (254 образца 12 видов и разновидностей *Ocimum L.*) сильно колеблется в зависимости от генотипических особенностей и от почвенно-климатических условий выращивания. По результатам анализов коллекционные образцы базилика подразделили на четыре группы:

- 1) содержащие следы эвгенола (содержание эвгенола в эфирном масле менее 5%), в изучаемой коллекции – 95 образцов;
- 2) с низким содержанием (5-20 %) эвгенола – 112 образцов;
- 3) со средним (21-50 %) содержанием эвгенола – 32 образца;
- 4) с высоким (более 50 %) содержанием эвгенола в эфирном масле – 15 образцов.

Таблица 1 – Химический состав метанольных экстрактов из растительного сырья *Ocimum L.* (в порядке выхода компонентов на хроматограмме)

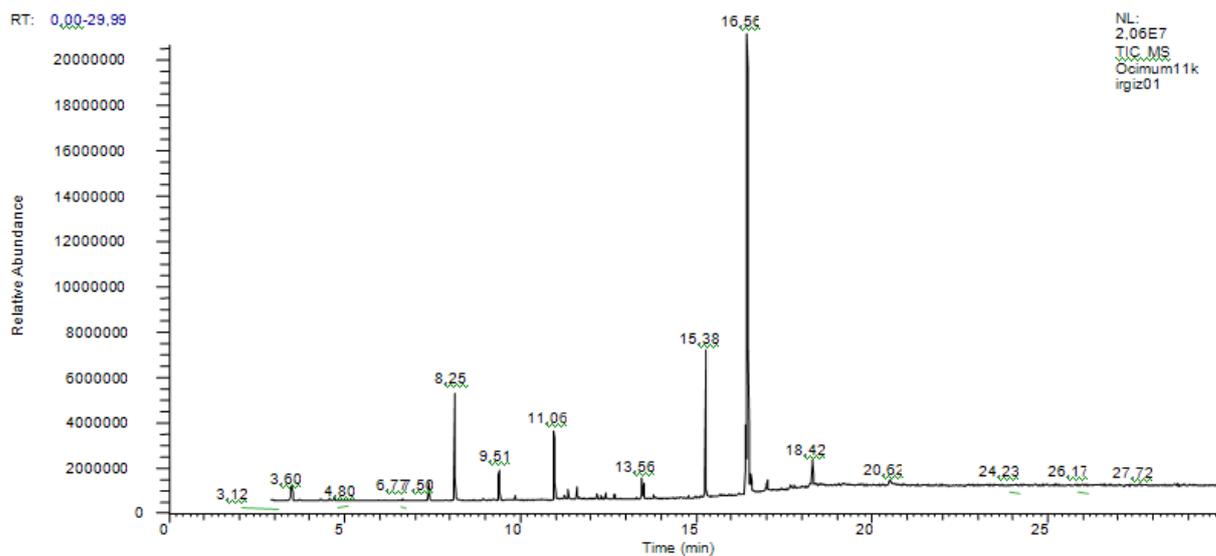
№	Название вещества	Время удерживания RT, мин.
1	2,2-Диметоксибутан	3,58
2	Эвкалиптол	7,50
3	β -Линалол*	8,25
4	Камфора	9,03
5	Эстрагол*	9,50
6	Эвгенол*	11,07
7	транс-Циннамовая кислота, метиловый эфир*	11,44
8	β -элемен	11,38
9	транс- α -Бергамотен	11,74
10	β -Кубебен	12,31
11	β -Селинен	12,43
12	β или γ -Кадинен	12,54
13	Дифениламин (внутренний стандарт)	13,57
14	β -кадинен	13,62
15	П-гидроксициннамовая кислота, метиловый эфир	14,44
16	Пальмитиновая кислота, метиловый эфир*	15,40
17	Линоленовая кислота, метиловый эфир*	16,59
18	Стеариновая кислота, метиловый эфир*	16,66

* основные по содержанию в экстрактах компоненты экстрактов растительного сырья.

Экспресс-методика оценки растительного сырья на компонентный состав эфирного масла образцов эвгенол содержащих видов *O. basilicum L.*, позволила выявить большое разнообразие форм, подтвердила предположение о том, что базилик обыкновенный способен к синтезу эфирных масел по двум направлениям:

- 1) по пути получения смеси линалоол – гераниол;
- 2) по пути образования родственных по структуре соединений ароматического ряда [4].

По результатам детальных анализов, полученных с помощью предложенной методики, можно утверждать, что среди изучаемых нами коллекционных образцов внутри вида *O. basilicum L.* существует, по крайней мере, четыре разновидности (хемотипа, расы): метилэвгенольная (рис. 1); метилциннаматная (рис. 2); метилхавикольная (рис. 3); линалоольная (рис. 4). Встречаются и промежуточные типы, синтезирующие эфирные масла с различным набором составляющих компонентов. Видимо, перекрестно опыляемый вид – *O. basilicum L.* включает несколько разновидностей, гибридов и экотипов, способных к синтезу различных типов эфирных масел с изменённым компонентным составом. Часто два морфологически идентичные образца содержат разное количество эфирного масла, совершенно различное по компонентному составу. Это возможно обусловлено не только генетически, но и влиянием стадии вегетации, климатическими, почвенными и другими условиями [6].



Ocimum11kirgiz01 #551 RT: 11,06 AV: 1 SB: 2 11,02 ,11,17 NL: 6,96E 5
T: + c Full ms [50,00-650,00]

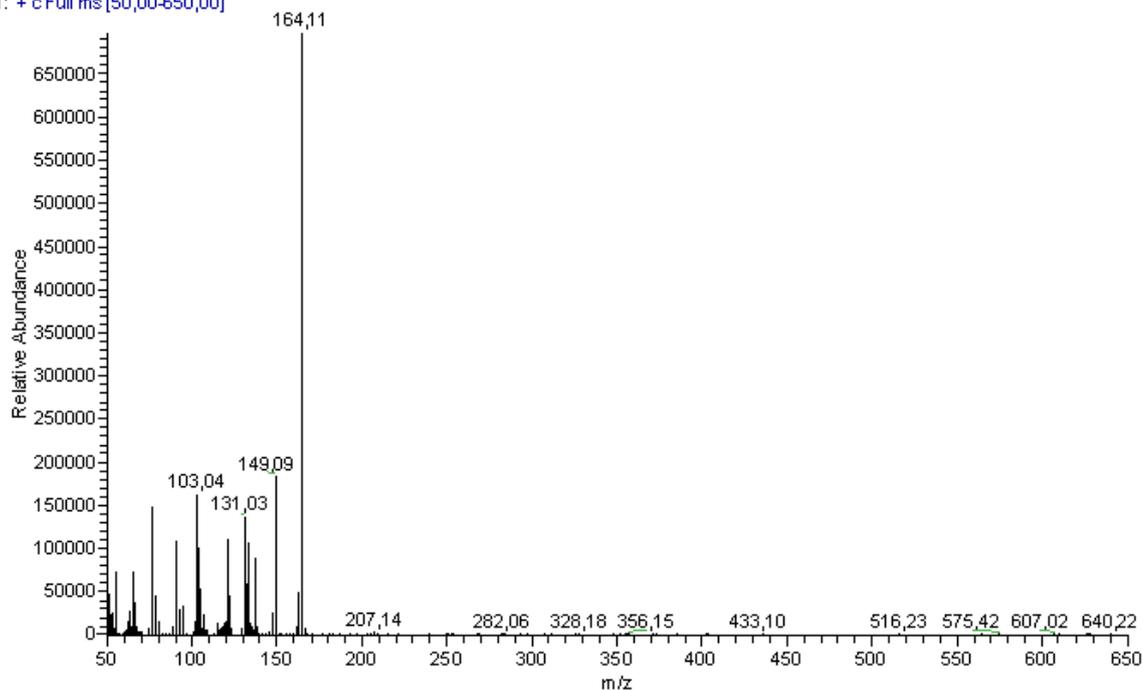
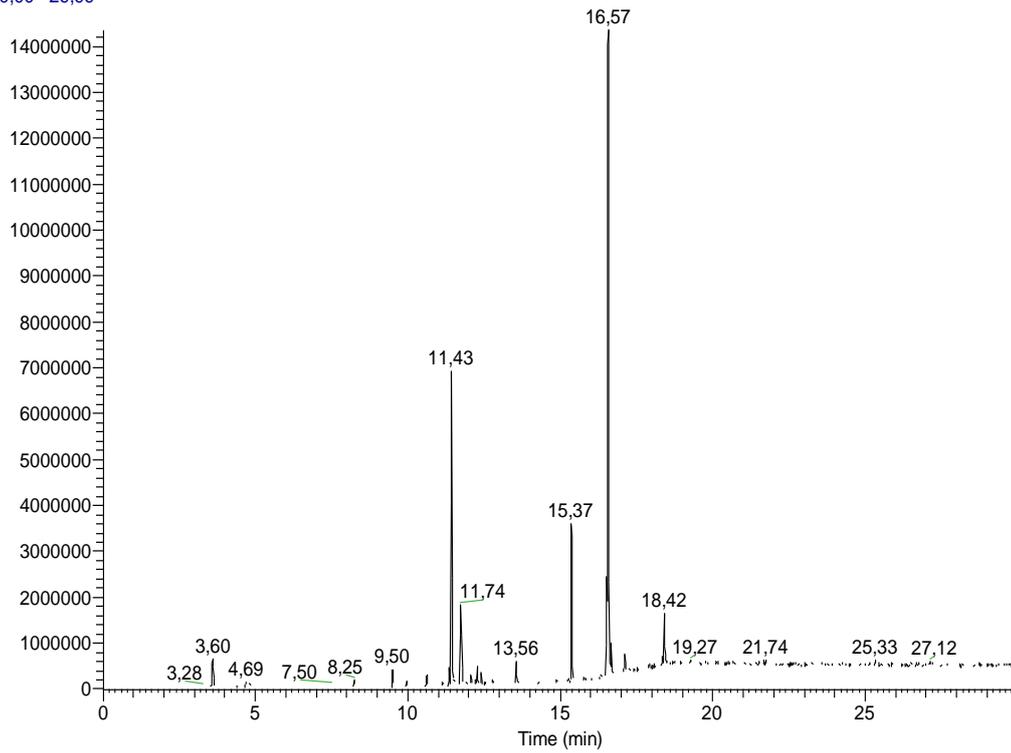


Рис. 1. Метилэвгенольная разновидность *O. basilicum* L. – типичная хроматограмма по полному ионному току и масс-спектр эвгенола (RT 11,06)

RT: 0,00 - 29,99



NL:
1,44E7
TIC MS
OcimumAR
vir1_01

OcimumARvir1_01 #575 RT: 11.42 AV: 1 SB: 2 11.36, 11.52 NL: 8,31E5
T: + c Full ms [50,00-650,00]

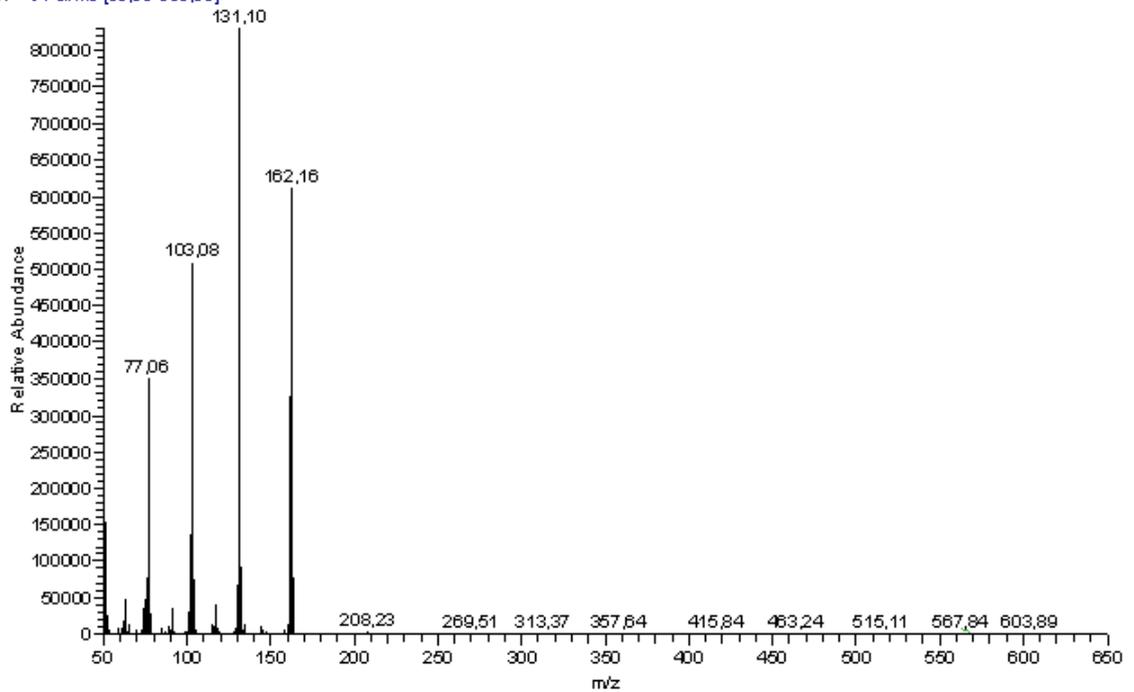
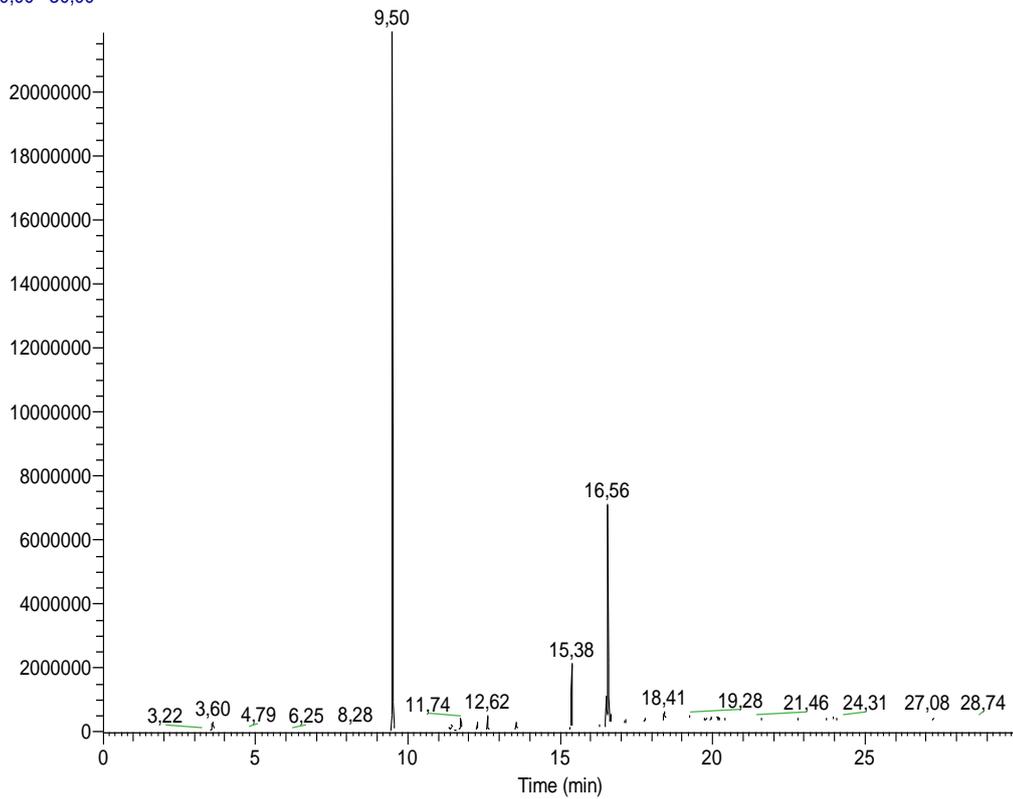


Рис. 2. Метилциннаматная разновидность *O. basilicum* L. – типичная хроматограмма по полному ионному току и масс-спектр метилового эфира циннамовой кислоты (RT 11,43)

RT: 0,00 - 30,00



NL:
2,18E7
TIC MS
OcimumAz
er12_01

OcimumAzer12_01 #443 RT: 9,50 AV: 1 SB: 2 9,44 ,9,56 NL: 3,74E6
T: + c Full ms [50,00-650,00]

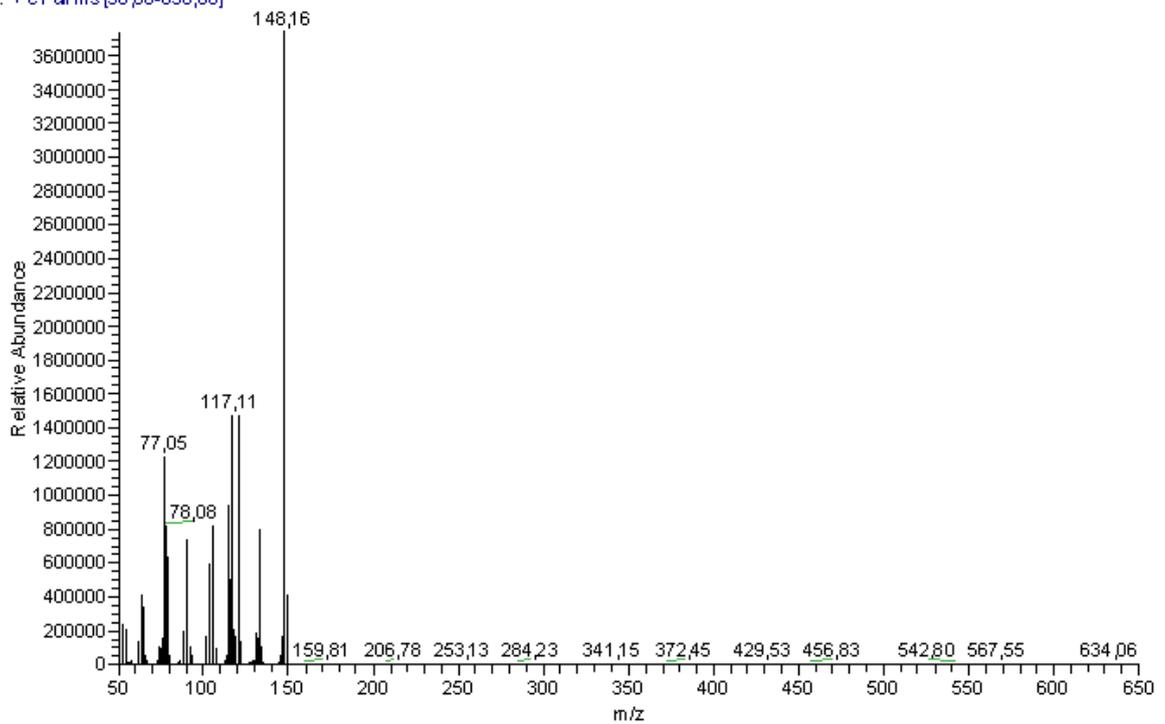
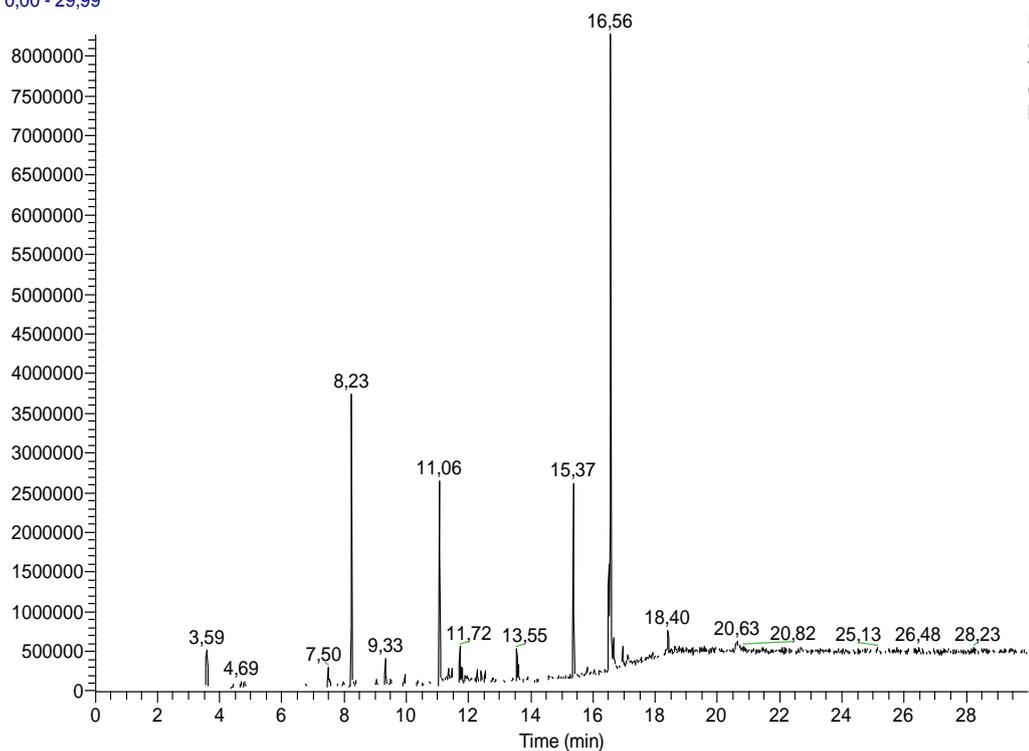


Рис. 3. Метилхавикольная разновидность *O. basilicum* L. – типичная хроматограмма по полному ионному току и масс-спектрагола (RT 9,50)

RT: 0,00 - 29,99



NL:
8,28E6
TIC MS
OcimumBa
by31_01

OcimumBaby31 01 #355 RT: 8,23 AV: 1 SB: 2 8,15, 8,38 NL: 5,83E5
T: + c Fullms [50,00-650,00]

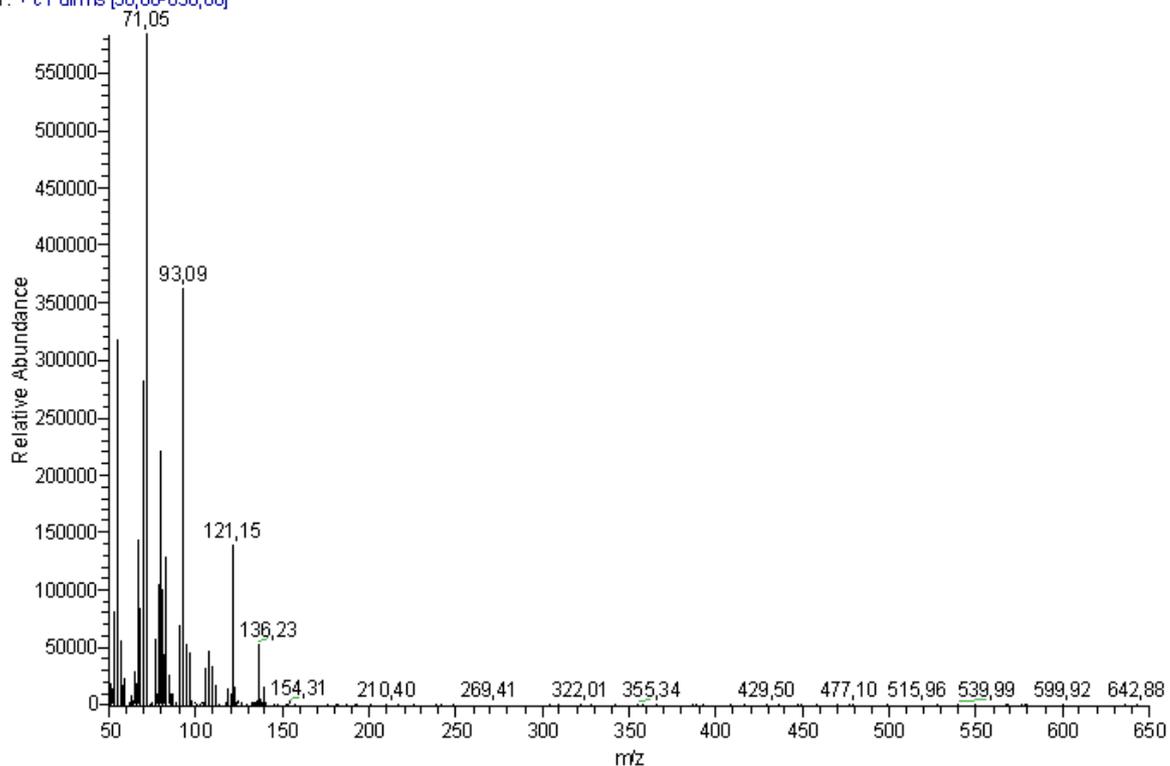


Рис. 4. Линалоольная разновидность *O. basilicum* L. – типичная хроматограмма по полному ионному току и масс-спектр линалоола (RT 8,23 мин.)

Достоинство предложенной методики состоит и в том, что дает возможность использовать для биохимического анализа малой растительной пробы (до 10 г). Это позволило установить динамику накопления эфирного масла и его компонентов в процессе роста и развития базилика [6].

Хроматографический анализ коллекции *O. canum* Sims. на компонентный состав эфирного масла с помощью предложенной методики показал, что среди образцов камфорного базилика имеется две разновидности (возможно и больше), различающиеся содержанием камфары и других компонентов в эфирном масле. Это подтверждает предположения А. Гуйлаумина [4] и П.А. Нестеренко [5] о наличии двух разновидностей у базилика камфорного.

Результаты практического использования экспресс-методики позволили предположить, что разные формы базилика эвгенольного (*Ocimum gratissimum* L.) синтезируют эфирное масло различное по содержанию основных компонентов. Встречаются формы с высоким содержанием эвгенола в эфирном масле (до 70 %), другие морфологически идентичные формы содержат в масле основной компонент цитраль (до 50 %) и третья группа растений содержит до 45 % тимола. Это указывает на наличие, по крайней мере, трёх разновидностей (хемотипов) внутри вида *O. gratissimum* L. Оставляя специалистам вопросы ботанической классификации этого интересного вида, для удобства в практической работе выделили по признаку «Содержание основного компонента в эфирном масле» три разновидности базилика эвгенольного (*O. gratissimum* L.):

1. *O. gratissimum* var. *eugenolnij* – базилик эвгенольный (12 образцов в изучаемой коллекции). Содержание эфирного масла 0,3-0,8 % (на сырьё 70 % влажности). Из-за высокого содержания эвгенола, по сравнению с другими разновидностями базилика эвгенольного, его называют эвгенольный базилик.

2. *O. gratissimum* var. *citralnij* – цитральный базилик (7 образцов), с содержанием в масле до 50 % основного компонента цитраля. Содержит гераниол и метилхавикол, эвгенол, линалоол, цинеол, кетоны и другие компоненты.

3. *O. gratissimum* var. *timolnij* – тимольный базилик (2 образца среди изучаемой нами коллекции). Содержит в эфирном масле 30-45 % тимола.

При детальном анализе установлено, что морфологически трудно различимые разновидности *Ocimum gratissimum* L. имеют разное количество эфирного масла совершенно различного качества. Содержание эвгенола в масле этих разновидностей колеблется от 17,5 до 80 % [7].

Предложенная методика позволяет провести скрининг имеющейся коллекции базилика (*Ocimum* L.), определить содержание и качество эфирного масла в растительном сырье, надежно идентифицировать основные компоненты в масле.

Литература:

1. Войткевич С.А. Эфирные масла для парфюмерии и ароматерапии. М., 1999. 221 с.
2. Шабалина А.Э. Разработка и совершенствование методов стандартизации стоматологических средств и материалов, содержащих эвгенол: автореф. дис. ... канд. хим. наук. М., 2008. 20 с.
3. Христова Ю.П. Исследование компонентного состава эфирного масла представителей рода *Ocimum* L. в условиях Южного берега Крыма // Труды НБС. 2011. Т. 133. С. 236-248.
4. Guillaumin A. Les ocimuma essence. Bull des sciences Pharmacologue., Vol. 38. Paris, 1930. P. 21-37.
5. Нестеренко П.А. Базилик камфорный (*Ocimum canum* Sims.). Ялта, 1934. 56 с.

6. Ильченко Г.Н., Берёзкин Н.Г. Изменение количества и состава эфирного масла по мере роста и развития базилика эвгенольного // Вестник Адыгейского государственного университета. 2013. Вып. 4(125). С. 52-56.

7. Изменчивость хозяйственно-ценных признаков эвгенолсодержащих видов *Ocimum L.* / Г.Н. Ильченко [и др.] // Новые технологии. 2014. Вып. 2. С. 30-36.

References:

1. Voitkevich S.A. *Essential oils for perfumes and aromatherapy*. M.: 1999. 221 p.
2. Shabalina A.E. *Development and improvement of methods of standardization of dental products and materials that contain eugenol: abstract of diss. ... Cand. of Chem. Sciences*. M.: 2008. 20 p.
3. Christova Y.P. *A study of the component composition of the essential oil of the genus *Ocimum L.* in the conditions of Southern coast of Crimea // Proceedings of the NBS*. 2011.V. 133. P. 236-248.
4. Guillaumin A. *Les ocimuma essence*. Bull des sciences Pharmacologues, vol. 38, Paris, 1930. p. 21-37.
5. Nesterenko P.A. *Basils (*Ocimum canum Sims.*)*. Yalta. 1934. 56 p.
6. Ilchenko G.N., Berezkin N.G. *Change in the number and composition of the essential oil on the growth and development of basil eugenol // Bulletin of Adygh State university*. Vol. 4 (125). 2013. P. 52-56.
7. *Variability of agronomic characters of eugenol-containing species of *Ocimum L.* / G.N. Ilchenko [and oth.] // New technologies*. 2014. number 2. P. 30-36.