

ЗАСТОСУВАННЯ ХРОМАТОГРАФІЇ ПРИ ВИВЧЕННІ ЕФІРНИХ ОЛІЙ, ЯКІ ВЖИВАЮТЬСЯ У ФАРМАЦЕВТИЧНІЙ ПРАКТИЦІ

І. М. ПЕРЦЕВ, Г. П. ПІВНЕНКО
(Харківський фармацевтичний інститут)

ПОВІДОМЛЕННЯ II

ВИЗНАЧЕННЯ МЕНТОЛУ, ЙОГО ЕФІРІВ І ЦИНЕОЛУ В ЕФІРНІЙ ОЛІЇ М'ЯТИ ПЕРЦЕВОЇ ЗА ДОПОМОГОЮ ХРОМАТОГРАФІЧНОГО АНАЛІЗУ

Останнім часом у фармацевтичній практиці чимраз ширше використовуються не цільні ефірні олії, а окремі їх складові частини. За приклад може правити застосування ментолу, ліналоолу, тимолу, гераніолу та інших речовин. Цінність тієї чи іншої ефірної олії визначається, головним чином, кількісним вмістом у ній окремих компонентів, які застосовуються в промисловості й медичній практиці.

Метод визначення вмісту вільного ментолу у м'ятній олії вперше розробили Поуер і Клебер (1). За останнє двадцятиріччя в літературі з'явилося багато праць, що викривають хиби й помилки цього методу або пропонують удосконалення його (2—5). Не позбавлені хиб і методи кількісного визначення складних ефірів і цинеолу (6).

Наявні хімічні методи визначення складових частин ефірних олій мають окремі хиби і потребують значної затрати часу і праці.

Успішне застосування хроматографічного адсорбційного методу М. С. Цвета до аналізу різних класів органічних сполук привело дослідників до спроб скористатися аналогічними прийомами при вивченні ефірних олій, їх окремих фракцій або компонентів (7—9).

Ми застосували метод кольорової реакції *n*-диметиламінобензальдегіду з ментолом (10—12) для визначення вільного ментолу, його ефірів і цинеолу в ефірній олії перцевої м'яти, що росте на Україні. Метод хроматографічної адсорбції з наступним колориметричним визначенням речовин позбавлений хиб, що є в наявних методах; крім того, кількість потрібної для експерименту олії скорочується до 0,1 г.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

Для колориметричного визначення вільного ментолу, його ефірів і цинеолу ми готували реактив розчиненням 125 мг *n*-диметиламінобензальдегіду в 100 мл суміші, яка складалася з 36 мл двічі перегнаної води і 64 мл концентрованої сірчаної кислоти (хч), і зберігали на холоді протягом 3 днів.

Для побудови градууювальних кривих ментолу і цинеолу ми готували ряд розчинів з відомими концентраціями в межах можливих вимірювань концентрацій цих речовин у досліджуваних розчинах. Точну наважку речовини (0,05 г) вміщували в мірну колбу на 50 мл і розчиняли в невеликому об'ємі хлороформу, який потім доводили до позначки. З цього розчину готували шість більш розбавлених розчинів, кожний мілілітр яких мав відповідно 10, 20, 40, 60, 80, 120 у чистої речовини. Їх і використовували для побудови градууювальної кривої.

1 мл кожного розчину переносили піпеткою у пробірки об'ємом в 50 мл з старанно притертими пробками, потім з бюретки додавали 5 мл розчину *n*-диметиламінобензальдегіду і струшували протягом 1 хвилини для прискорення кольорової реакції. У кожній пробірці одержували яскраво-червоне забарвлення з фіолетовим відтінком (коли там був ментол) або червоне з жовтуватим відтінком (коли був цинеол). Забарвлені розчини переносили в колориметричну кювету завдовжки 10 мм і вимірювали оптичну густину за допомогою фотоелектроколори-

метра (ФЕК-М) з застосуванням зеленого світлофільтра (500—560 мμ). Для контролю брали суміш з 1 мл хлороформу і 5 мл реактиву, яку обробляли так само, як і пробу речовини. Оскільки інтенсивність забарвлення залежала від концентрації речовини і часу, то для вибору оптимального строку дослідження забарвлених розчинів проведено ряд експериментів. Для цього оптичні густини розчинів вимірювали через

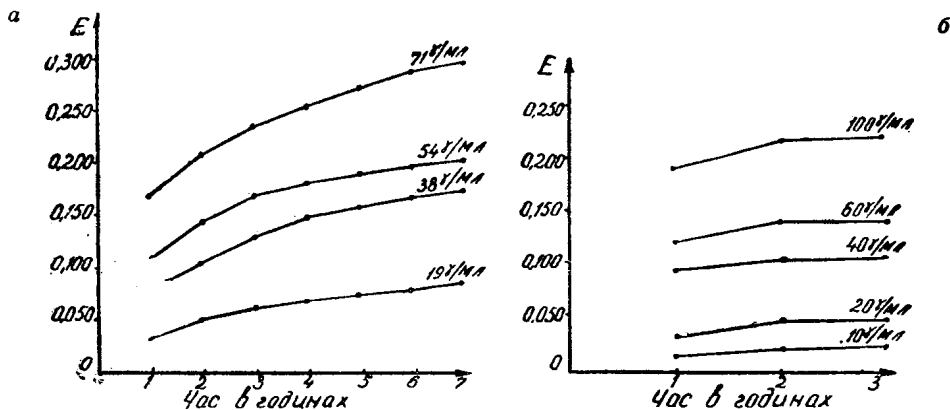


Рис. 1. Залежність інтенсивності забарвлення розчину від часу: а) в реакції між *п*-диметиламінобензальдегідом і ментолом; б) в реакції між *п*-диметиламінобензальдегідом і цинеолом.

кожну годину після першого вимірювання протягом 7 годин. Одержані дані див. на рис. 1.

На підставі цих даних при будіванні градууювальної кривої оптичні густини всіх розчинів вимірювали через 2 години після додавання реактиву і середні результати трьох визначень відкладали по вертикалі; по горизонтальній осі відкладали концентрації вимірюваних розчинів (див. рис. 2 і 3).

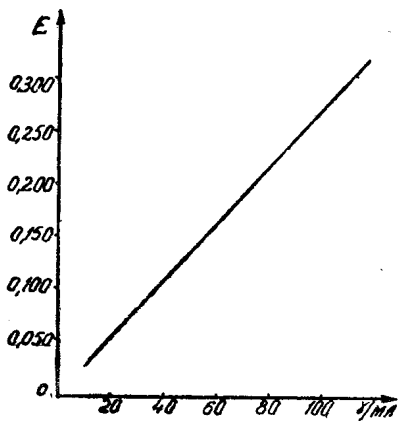


Рис. 2. Градууювальна крива для ментолу.

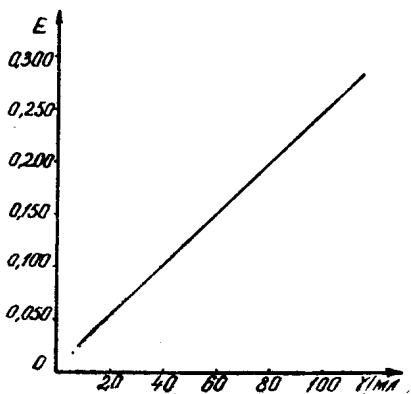


Рис. 3. Градууювальна крива для цинеолу.

При готуванні хроматографічної колонки ми застосували скляну трубку завдовжки 40 см з внутрішнім діаметром 1 см, що закінчувалася пришліфованою пробкою з подвійним дном (рис. 4).

Попередніми дослідженнями встановлено, що для роботи можна використати такі адсорбенти: силікагель марки «КСМ», активоване вугілля, кремнійову кислоту, карбонат кальцію, окис магнію та ін. Для вимивання речовини можна використати чотирихлористий вуглець, пет-

ролейний ефір, хлороформ, сірчаний ефір та інші розчинники. Проте найбільш корисним був хлороформ, а як адсорбент — силікагель марки «КСМ», який попередньо активували, подрібнювали й зберігали в герметично закритій скляній тарі (13).

Оскільки хроматографічну трубку заповнювали «мокрим» методом, адсорбент (9 г) старанно змішували з надлишком розчинника в колбі і одержану суспензію повільно переносили в трубку, наповнену спочатку на $\frac{1}{3}$ тим самим розчинником, стежачи, щоб не утворювалися пухирці повітря. Дальші порції суспензії додавали в міру ущільнення попередньої порції. Після того як весь адсорбент осів, колонку промивали

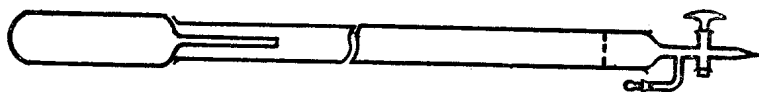


Рис. 4.

10 мл хлороформу. Хроматографічна колонка мала висоту стовпа адсорбенту 24 см і середню швидкість витікання рідини 0,02 мл за 1 хвилину. Олія поділялася краще, коли розчин з колонки витікав повільніше.

Для відбирання фракцій рідини, що витікає з колонки під час хроматографічних досліджень ефірних олій, ми користувалися дуже простим за конструкцією і надійним в експлуатації автоматичним пробовідбірником карусельного типу (рис. 5).

Прилад складається з електромотора M_1 (період обертання — 1 год.), на вісь якого насаджено диск (з одним або кількома вирізами). По ньому ковзає механічний контакт MK_1 , під час замикання якого електричний струм надходить через селенові випрямлячі і створює постійну різницю потенціалів на електроліті C_2 , які знімаються на реле Р. Таким чином, під час замикання механічного контакту MK_1 починає діяти автоматичне реле; воно викликає обертання електромотора M_2 , а останній, в свою чергу, обертає через зубчасту передачу диск Д з втулкою В, на яку насаджено карусель з градуйованими пробірками. Дальший рух електромотора M_2 здійснюється за рахунок замикання механічного контакту MK_2 , що ковзає по диску Д, на якому є стільки вирізів, скільки пробірок у барабані каруселі. Коли виступ механічного контакту MK_2 потрапляє у виріз диска, обертання електромотора M_2 припиняється, а разом з тим перестає рухатися й карусель. Черговий приймач підводиться під колонку через 1 годину, 30 хвилин, 15 хвилин і т. д., тобто залежно від того, скільки вирізів буде на диску.

Карусель складається з 4 дисків діаметром по 25 см кожний, виготовлених з алюмінію або іншого матеріалу. У двох середніх дисках по колу на відстані 7, 9 і 11 см від центра зроблено 24 отвори діаметром 14,5, 16,5 і 16,5 мм, які розташовані на рівній відстані один від одного, що дозволяє відбирати проби рідини з трьох колонок одночасно.

Велика потужність електромотора M_2 дає змогу при аналізі легких рідин застосувати герметизацію приймачів. Це стає можливим при використанні диска з м'якою бавовняною прокладкою, який накладається безпосередньо на пробірки і підтримується нерухомо чотирма стрижнями, прикріпленими до коробки приладу.

Прилад простий за конструкцією, не обмежує експериментатора у виборі розчинника і звільняє його від окремих трудомістких процесів під час аналізу.

Насамперед ми провели серію аналізів відомих проб ментолу і цинеолу. Для вимивання цих речовин застосовували фракцію хлороформу з т. кип. 60°.

Розчин ментолу і цинеолу в хлороформі готували в мірних колбах

на 50 мл. Концентрацію розчинів добирали так, щоб результати, спостережувані за допомогою колориметра, відповідали градуовальній кривій.

Коли розчинник цілком проходив крізь хроматографічну колонку і

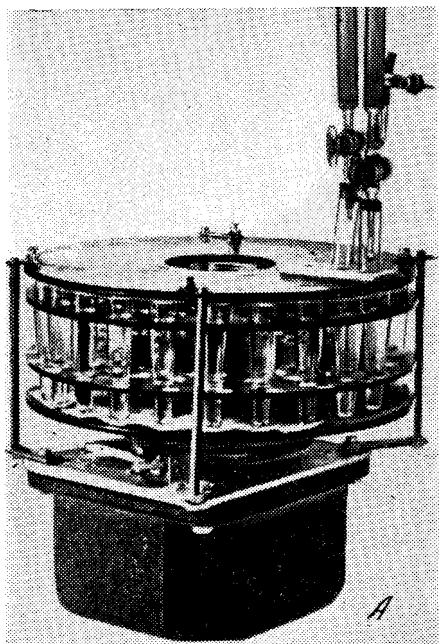
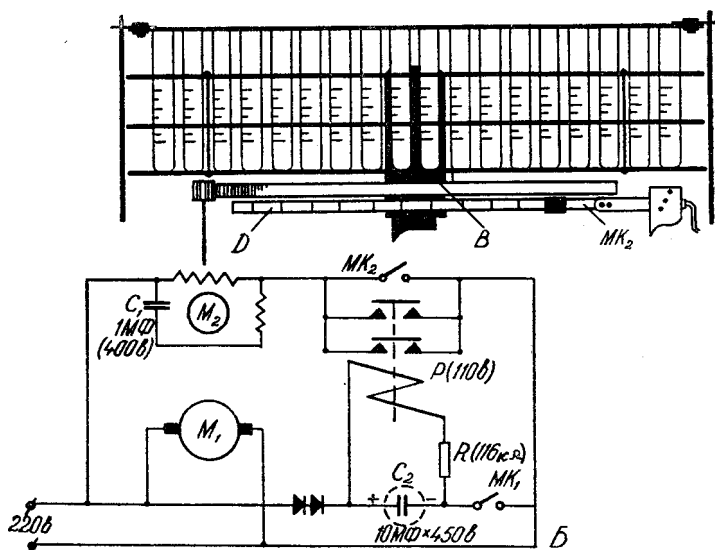


Рис. 5. Автоматичний пробовідбірник: А — зовнішній вигляд; Б — загальна схема приладу.



товщина його над адсорбентом залишалася приблизно 0,5—1 мм, піпеткою додавали досліджуваній розчин. Після того як розчин стікав, колонку промивали чистим розчинником (0,5 мл) і заповнювали хлороформом. Постійний рівень його над шаром адсорбенту підтримувався за допомогою скляної посудини з хлороформом, яка нагадує ампулу з припаяною трубкою.

Елюат збирали автоматичним пробовідбірником порціями по 2,5 мл у герметично закриті пробірки. Кожну пробу (фракцію) спочатку досліджували на вміст ментолу і цинеолу в елюаті. Для цього в пробір-

ках змішували приблизно 0,5 мл кожної фракції елюату з 1 мл кольорового реактиву. Пробірки занурювали у водяний огрівник і через кілька хвилин спостерігали появу рожевого забарвлення.

Фракції, які містили ментол або цинеол, обробляли тим самим способом, що й розчини, використані для побудови градувальних кривих. Пробірки протягом 2 годин витримували в ультратермостаті при температурі $20 \pm 0,5^\circ$.

На підставі цього дослідження зроблено висновок, що цинеол вимивався після того, як через колонку проходило 25 мл хлороформу. Він містився у фракціях 9 і 10. Ментол вимивався після того, як через колонку проходило 42—45 мл, і містився у фракціях 13—17. Найбільш концентрованими були фракції 14 і 15. Фракції 1—8 і 11, 12 не містили аналізованих речовин.

Аналогічні досліди поставлено і для того, щоб пересвідчитися, наскільки ефективно проходить поділ суміші речовин: ментол — цинеол. Концентрацію речовин, вимитих з колонки, визначали порівнянням даних з градувальною кривою. Для цього концентрацію речовин, знайдену в 1 мл, множили на об'єм фракції. Об'єм фракцій, що містять одну речовину, підсумовували (див. табл. 1).

Таблиця 1

Результати визначень відомих проб ментолу і цинеолу

Аналізована речовина	Взята кількість речовини (в γ)	Знайдена кількість речовини (в γ)	Вихід (у %)
Ментол	800,0	798,0	99,75
	800,0	789,0	98,62
	800,0	798,0	99,75
	800,0	792,0	99,00
	800,0	795,6	99,45
	800,0	786,5	98,31
	800,0	799,0	99,87
		Середнє	99,25
		Середнє відхилення	0,52
Цинеол	250,0	248,0	99,20
	250,0	246,5	98,60
	250,0	247,0	98,80
	250,0	249,0	99,60
	250,0	246,5	98,60
		Середнє	98,98
		Середнє відхилення	0,36

Слід зауважити, що кількість цинеолу, нанесеного на колонку, була приблизно вдвоє більша за кількість цинеолу, яка містилася в 1 мл найбільш концентрованого розчину, застосовуваного для складання градувальної кривої, бо для колориметрування використовується лише 1 мл з 2,5 мл фракції. Це саме стосується й до ментолу. При колориметричному аналізі можна з'єднувати фракції, які містять ідентичні речовини, що дає можливість наносити на колонку більше речовини і скоротити кількість визначень на колориметрі.

Дальші аналізи ми проводили над ректифікованою ефірною олією перцевої м'яти (*Mentha piperita* L.), яка являла собою легкорухому прозору рідину дещо зеленкуватого кольору з характерним ароматом перцевої м'яти і мала такі фізико-хімічні властивості: питома вага $d_{20}^{20} = 0,918$; кут обертання $[\alpha]_D^{20} = -31,65$; коефіцієнт заломлення $n_D^{20} = 1,4652$; кислотне число — 0,89. Олія розчинялася в 70° спирті

у співвідношенні 1:3,5 і містила: спиртів вільних — 53,25%, спиртів зв'язаних — 6,46%.

Олію поділяли методом хроматографічної адсорбції подібно до поділу суміші ментолу і цинеолу. Першими вимивалися складні ефіри ментолу (фракції 4 і 6), другим — цинеол (фракція 9) і останнім — ментол (фракції 13—16). Дані аналізу наведені в табл. 2.

Таблиця 2

Результати визначень вільного ментолу, його ефірів і цинеолу в ефірній олії м'яти

№ експерименту	Взято м'ятної олії (в γ)	Знайдено:								загальна кількість ефірів (у %)
		ментолу		цинеолу		ментилацетату		ментилвалеріанату		
		в γ	у %	в γ	у %	в γ	у %	в γ	у %	
1	1000,0	526,8	52,6	35,8	3,5	40,0	4,0	31,8	3,18	7,18
2	1000,0	525,5	52,5	33,7	3,37	—	—	—	—	—
3	1000,0	533,5	53,3	32,9	3,29	—	—	—	—	—
4	2000,0	1067,2	53,3	68,0	3,4	76,8	3,84	73,1	3,65	7,49
5	2000,0	1057,0	52,8	70,6	3,53	81,0	4,05	60,0	3,0	7,05
6	2000,0	1056,8	52,8	—	—	76,8	3,84	66,6	3,3	7,14
7	2000,0									
8	(+ 100 γ цинеолу) 2000,0	1039,4	51,9	70,0	3,5	84,5	4,22	61,5	3,07	7,29
	(+ 100 γ цинеолу)	1049,8	52,4	71,1	3,55	83,6	4,18	66,6	3,3	7,48
	Середнє	—	52,7	—	3,42	—	4,02	—	3,25	7,27
	Середнє відхилення	—	0,35	—	0,08	—	0,13	—	0,16	0,15

Ментол, який міститься в олії у великій кількості, з *n*-диметиламінобензальдегідом забарвлення не дає і в елюаті за допомогою цього реактиву не виявляється. Інші речовини, що є в олії в незначних кількостях (*α*-пінен, лимонен), цілком відділяються на колонці від ментолу.

У деяких випадках для перевірки точності методу визначення речовин, які містяться в м'ятній олії в невеликих кількостях (цинеол), завідомо додавали певну кількість речовини (див. табл. 2, експерименти 7 і 8).

Складні ефіри ментолу в м'ятній олії ми визначали за описаною вище методикою, бо ментол і ментилацетат мають схожі хімічні формули (структури).

Відомо (11), що сильнокисле середовище застосовуваного в цьому визначенні реактиву гідролізує ефір, а вільний ментол, який виділився, при реакції з реактивом утворює забарвлений продукт.

Порівнюючи дані, одержані при використанні описаної методики, з константами, які характеризують ефірну олію, ми прийшли до висновку, що вони чимало занижені; це дозволило припустити, що гідроліз ефіру не закінчується за 2 години. Для прискорення цього процесу ми нагрівали пробу з розбавленою сірчаною кислотою. З цією метою реактив готували так: 125 мг *n*-диметиламінобензальдегіду розчиняли в суміші з 18 мл двічі перегнаної води і 32 мл концентрованої сірчаної кислоти. Потім готували другу частину суміші (18 мл води і 32 мл сірчаної кислоти), 2,5 мл якої додавали до 1 мл досліджуваної фракції для прискорення гідролізу ефірів ментолу. Для цього підкислену фракцію вміщували в товстостінну пробірку з притертою пробкою, струшували і нагрівали в ультратермостаті при температурі 50° протягом 1 години. Після охолодження вміст пробірки струшували протягом 1 хвилини з 2,5 мл реактиву і після 2-годинного стояння вимірювали оптичні

густини забарвлених розчинів за допомогою фотоелектроколориметра.

Результати дослідів були задовільні. Вони наведені в табл. 2.

Використовуючи хроматографічний метод для поділу компонентів ефірної олії м'яти, можна кількісно визначати не тільки суму складних ефірів ментолу, але й кожного ефіру окремо. Складні ефіри ментолу виявлено в 4 фракції (ментилацетат) і в 5 або 6 фракціях. Ефір, виявлений у 5 фракції, не ідентифіковано через відсутність чистого зразка, але за властивостями (тривалість гідролізу, колір забарвлення тощо) можна вважати, що другим складним ефіром ментолу був ментилвалеріанат.

При використанні хроматографічних пластинок для поділу компонентів ефірної олії м'яти не спостерігалось диференціації складних ефірів ментолу.

ВИСНОВКИ

1. Розроблено й показано можливість застосування хроматографічного методу аналізу з наступним колориметруванням для кількісного визначення основних компонентів ректифікованої ефірної олії м'яти (ментолу, його складних ефірів і цинеолу). Показано переваги цього методу для мікроаналізу ефірної олії перед наявними хімічними методами.

2. Запропонований метод дає можливість провести одночасно цілу серію дослідів для кількісного визначення основних складових частин олії в наважці 0,1 г при наявності градуовальних кривих визначуваних компонентів. Його можна також використовувати для кількісного визначення аналогічних компонентів в інших ефірних оліях.

ЛІТЕРАТУРА

1. F. B. Power and C. Kleber, Pharm. Rundschau, 12, 162 (1894). —
2. C. O. Wilson, J. Amer. Pharmac. Assoc. Scient. Ed, 31, 85 (1942). —
3. T. W. Briggall, Ind. End. Chem. Anal. Ed, 13, 166 (1941). —
4. E. L. Elliot, J. Assoc. Official. Agr. Chemists, 12, 300 (1929). —
5. G. Fischer and N. A. Hall, Drug Standards, 21, 183 (1953). —
6. Н. Я. Демьянов, В. И. Нилов, В. В. Вильямс, Эфирные масла, их состав и анализ, М.-Л., 1930, с. 65—70. —
7. Н. Л. Гурвич, Состояние и перспективы изучения растительных ресурсов СССР, изд. АН СССР, М.-Л., 1958, с. 461 —
8. Ю. Г. Борисюк, П. Е. Кривенчук, Фармацевтический журнал, 3, 52 (1959). —
9. H. M. Chang, Iowa State College Journal Science, 26, 2, 181 (1952). —
10. H. Masamune, J. Biochem. (Japan), 18, 277 (1933). —
11. S. K. Hamagren, M. I. Blake, C. E. Miller, J. Amer. Pharmac. Assoc. Scient. Ed., 45, 713 (1956). —
12. V. L. Fibranz, M. J. Blake and C. E. Miller, J. Amer. Pharmac. Assoc. Scient. Ed., 47, 133 (1958). —
13. I. М. Перцев, Г. П. Півненко, Фармацевтический журнал, 5, 28 (1961).

Надійшла 12.VI 1961 р.

ПРИМЕНЕНИЕ ХРОМАТОГРАФИИ ПРИ ИЗУЧЕНИИ ЭФИРНЫХ МАСЕЛ, ПРИМЕНЯЮЩИХСЯ В ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ

И. М. ПЕРЦЕВ, Г. П. ПИВНЕНКО

СООБЩЕНИЕ II

Определение ментола, его эфиров и цинеола в эфирном масле мяты перечной при помощи хроматографического анализа

РЕЗЮМЕ

Показана возможность применения хроматографического метода анализа с последующим колориметрированием для количественного определения основных компонентов ректификованного эфирного масла перечной мяты.

Разделение масла производилось на колонке из силикагеля, а в качестве растворителя использовался хлороформ. Метод применим для количественного определения аналогичных компонентов в других эфирных маслах.