

Парофазный газохроматографический анализ летучих компонентов лекарственного растения «зверобой продырявленный» (*Hypericum perforatum* L.) и препаратов на его основе

**Н.В. Парийчук¹, *Л.А. Онучак¹, Ю.И. Арутюнов¹,
В.А. Куркин², О.Е. Правдивцева²**

¹Самарский национальный исследовательский университет им. академика С.П. Королева, 443086, Российская Федерация, г. Самара, Московское ш., 34

²Самарский государственный медицинский университет, 443099, Российская Федерация, г. Самара, ул. Чапаевская, 89

*Адрес для переписки: Онучак Людмила Артемовна, e-mail: onuchakla@mail.ru

Поступила в редакцию 30 марта 2018 г., после доработки – 23 апреля 2018 г.

Метод прямого парофазного газохроматографического анализа с использованием пламенно-ионизационного и масс-спектрометрического детектирования применен для идентификации и количественного определения летучих органических соединений в равновесной паровой фазе лекарственного растительного сырья (ЛРС) «зверобой продырявленный» (*Hypericum perforatum* L.) и фитопрепаратов на его основе. Изучены закономерности газовой экстракции летучих компонентов из ЛРС (осушенной травы) и определены оптимальные условия (температура, время газовой экстракции), позволяющие получить воспроизводимый и характерный профиль паровой фазы зверобоя. Установлено, что качественный состав летучих компонентов ботанического и трех промышленных образцов зверобоя продырявленного, выращенного в разных регионах России, совпадает, тогда как количественное содержание компонентов несколько различается. Основными компонентами равновесной паровой фазы российского зверобоя продырявленного в условиях headspace-анализа являются (в порядке возрастания индексов удерживания): этаналь, пропаналь, диметилсульфид, 2-метилпропаналь, 2-метил-3-бутен-2-ол, 2-метилбутаналь, 2-метилоктан, α -пинен, 3-метилнонан. Впервые в качестве летучего маркера паровой фазы зверобоя предложен непредельный спирт 2-метил-3-бутен-2-ол с индексом удерживания ($I_T = 617$). Установлено, что все основные компоненты паровой фазы зверобоя, в том числе маркер 2-метил-3-бутен-2-ол, присутствуют в паровой фазе препаратов – таблетированной форме сухого экстракта и масляного экстракта зверобоя.

Ключевые слова: зверобой продырявленный, лекарственное растительное сырье, фитопрепараты, летучие органические соединения, газо-жидкостная хроматография, парофазный анализ, хроматографический профиль.

For citation: *Analitika i kontrol'* [Analytics and Control], 2018, vol. 22, no. 2, pp. 186-196

DOI: 10.15826/analitika.2018.22.2.002

Headspace gas chromatographic analysis of St John's Wort (*Hypericum perforatum* L.) and its medical derivatives

**N.V. Pariichuk¹, *L.A. Onuchak¹, Iu.A. Arutiunov¹,
V.A. Kurkin², O.E. Pravdivtseva²**

¹Samara National Research University, Moskovskoe sh., 34, Samara, 443086, Russian Federation

²Samara State Medical University, Chapaevskaia ul., 89, Samara, 443099, Russian Federation

*Corresponding author: Lyudmila A. Onuchak, e-mail: onuchakla@mail.ru

Submitted 30 March 2018, received in revised form 23 April 2018

Static headspace gas chromatographic analysis method using flame ionization and mass spectrometric detection was applied for the qualitative and quantitative detection of volatile components in the equilibrium vapor phase of the medicinal St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L.) plant. The optimal conditions for the gas extraction, producing repeatable and characterizing chromatographic headspace profiles of the St.

John's Wort, were established. The retention indices (I_i^T) for the linear programming of the column temperature with a low-polar stationary phase and the relative areas of the peaks ($A_{r,i}$) of the St. John's Wort volatile components have been determined. The obtained results were presented in the form of specific headspace-spectra « $A_{r,i} - I_i^T$ » of the plants. It has been demonstrated that the headspace spectra of the botanical sample (Samara) and of the three industrial specimens of St. John's Wort obtained from various regions of Russia were close to each other. Major volatile compounds of the Russian St. John's Wort were: ethanal, propanal, dimethylsulfide, 2-methylpropanal, 2-methyl-3-butene-2-ol (marker), 2-methylbutanal, 2-methyloctane, α -pinene, 3-methylnonane. Current research was the first to suggest using alcohol 2-methyl-3-butene-2-ol ($I_i^T = 617$) as the volatile marker of St. John's Wort. Its relative quantity in the vapor phase of St. John's Wort ($A_{r,i}$) was equal to 15.53 – 20.75%. It has also been discovered that most of the components of the equilibrium phase of St. John's Wort including the 2-methyl-3-butene-2-ol marker were present in the vapor phase of the St. John's Wort medicines, dry tablet extract of St. John's Wort (Deprim, Slovenia) and oil extract of St. John's Wort (Russia).

Keywords: *Hypericum perforatum* L., medical plant raw material, phytomedicines, volatile organic compounds, gas-liquid chromatography, headspace analysis, chromatographic profile.

ВВЕДЕНИЕ

Мировой фармацевтический рынок характеризуется тенденцией к росту использования лекарственных средств и биологически активных добавок растительного происхождения. Это связано с комплексностью терапевтического действия, относительной безопасностью и наличием возобновляемых источников сырья. Регламентированные способы определения подлинности и качества лекарственного растительного сырья (ЛРС) и препаратов на их основе представлены в Фармакопеях разных стран. Большинство способов предусматривает извлечение нелетучих и малолетучих биологически активных соединений (БАС) с помощью различных видов экстракции (жидкостной [1], сверхкритической флюидной [2, 3], микроволновой [4] и др.) с последующим их определением спектрофотометрическими или хроматографическими методами. Существенной проблемой при этом является отсутствие общепринятой стандартной процедуры приготовления экстрактов, что влияет на их качественный и количественный состав [1, 5].

Извлечение летучих БАС из ЛРС осуществляют перегонкой, получая эфирное масло. Определение летучих БАС в эфирном масле или экстрактах осуществляют методом газо-жидкостной хроматографии в сочетании с масс-селективным детектированием [6]. Авторы работ [7-10] предлагают применять этот метод для определения подлинности и стандартизации ЛРС на основании определения компонентного состава эфирного масла и поиска специфических летучих веществ (маркеров). Однако не все лекарственные растения содержат специфические маркеры. Поэтому оценку подлинности таких растений предлагается проводить с использованием общего «хроматографического образа» [10, 11]. Вследствие применения различных режимов перегонки составы эфирных масел, также как и экстрактов, могут сильно различаться. Это затрудняет стандартизацию ЛРС и оценку его подлинности методом ГХ-МС.

Для получения характерного для данного растения хроматографического профиля летучих органических соединений (ЛОС), не осложненного вы-

бором режима перегонки, способа экстракции и/или природы растворителя, можно использовать метод прямого парового анализа (ПФА) лекарственного растения. Закономерности статического и динамического вариантов ПФА подробно рассмотрены в работах [12-14]. Вместе с тем возможности метода ПФА для анализа летучих компонентов ЛРС не до конца раскрыты и представлены в ограниченном числе работ [15, 16]. Практически отсутствуют работы, в которых этот метод применяется для исследования фитопрепаратов.

Лекарственное растение «зверобой продырявленный» (*Hypericum perforatum* L.) и препараты на его основе давно применяются в медицинской практике в качестве противовоспалительных, ранозаживляющих, бактерицидных, желчегонных и вяжущих средств. В последнее время зверобой привлекает к себе внимание своими антидепрессантными и седативными свойствами [17, 18]. За рубежом на основе зверобоя получают такие антидепрессантные средства как «Деприм», «Негрустин» и др. Как отмечается в работах [1, 18] нет единого мнения о конкретных компонентах зверобоя, ответственных за то или иное фармакологическое свойство. Предполагается, что эти свойства связаны с присутствием нелетучих и малолетучих БАС (гиперицин и его аналоги, гиперфорин и его аналоги, флавоноиды и другие фенольные соединения) [18-20]. Согласно Государственной фармакопее Российской Федерации XIII издания подлинность ЛРС зверобоя определяют методом тонкослойной хроматографии путем обнаружения рутина, который широко встречается в растениях, а качество – спектрофотометрическим методом по сумме флавоноидов в пересчете на рутин [21]. Трава зверобой продырявленного также содержит эфирное масло (около 0.01-1.25 % мас.) [17]. Компонентный состав эфирного масла зверобой продырявленного, выращенного в европейских странах [22-26], Турции [27], Индии [28], Тунисе [29-30] изучен методом ГХ-МС. В зависимости от способа получения и условий хроматографического анализа в эфирном масле может быть обнаружено от 40 до 127 ЛОС, относящихся к терпенам, терпеноидам, не-

терпеновым углеводородом и другим классам органических соединений. Компонентом с максимальным содержанием (доминирующим компонентом) в эфирном масле являются: α -пинен [29, 31], 2-метилпентан [25], гермакрен D [22, 28], оксид кариофиллена [23, 24], *n*-ундекан [30] и др. В эфирном масле зверобоя продырявленного, произрастающего на территории Башкортостана, обнаружено 148 летучих соединений, из которых идентифицировано 85 компонентов. Доминирующим компонентом эфирного масла является оксид кариофиллена [32]. В работе [33] проведено сравнение эфирного масла травы зверобоя продырявленного и зверобоя пятилистного, выращенных в Республике Коми из семян ботанических садов России и ближнего зарубежья. Все образцы ЛРС имели одинаковый компонентный состав, а содержание летучих компонентов варьировалось. Доминирующим компонентом эфирного масла этих образцов являлся гермакрен D. В работе [10] изучен спиртовой экстракт травы зверобоя методом ГХ-МС. Отмечено, что в составе летучих экстрагируемых веществ не содержится специфических маркеров зверобоя.

Целью работы являлось определение летучих органических соединений в равновесной паровой фазе лекарственного растительного сырья «зверобой продырявленный» и фитопрепаратов на его основе методом парового газохроматографического анализа; изучение возможности применения этого метода для определения подлинности ЛРС и фитопрепаратов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Объекты исследования. Объектами исследования являлись ботанический (ботанический сад Самарского университета, г. Самара, Россия) и промышленные образцы высушенной травы зверобоя продырявленного (*Hypericum perforatum* L.). Заготовку и сушку ботанического образца травы осуществляли согласно фармакопейным рекомендациям. Производителями промышленных образцов зверобоя являлись фармацевтические предприятия «Красногорсклексредства», «Иван-чай», «Здоровье». Промышленные образцы ЛРС анализировали не позднее, чем через 5-10 месяцев с момента их выпуска. Объектами исследования являлись также фитопрепарат «Деприм» (таблетированный сухой экстракт зверобоя) производства «Sandoz» (Словения) и косметическое масло (масляный экстракт зверобоя) производства «Лекус», г. Москва.

Пробоподготовка. Газовую экстракцию из твердых (воздушно-сухое сырье, таблетки) и жидких (масляный экстракт) объектов проводили в интервале температур 30-140 °С, варьируя время экстракции от 5 до 40 минут. Сухое сырье (3 г), растертые в порошок таблетки (3 г) или масло (1 см³) помещали в герметичный стеклянный сосуд объемом 10 см³ и выдерживали в термостате при заданных значениях температуры и времени экстракции.

После окончания экстракции паровую фазу объемом 1 см³ отбирали нагретым стеклянным шприцем. Ввод газообразной пробы в капиллярную колонку осуществляли с делением потока 1 : 50. Для каждого исследуемого объекта готовили пять отдельных газовых экстрактов ЛРС или фитопрепаратов.

Газохроматографический эксперимент.

Анализ паровой фазы проводили с использованием двух газовых хроматографов с пламенно-ионизационным (ДИП) и масс-спектрометрическим (МС) детекторами. В методе ПФА-ГХ-ДИП использовали газовый хроматограф «Кристалл 5000.2» (г. Йошкар-Ола, Россия) и кварцевую колонку (30 м × 0.32 мм, $d_i = 0.25$ мкм) с малополярной 5 %-дифенил-95 %-диметилполисилоксановой неподвижной фазой. Газ-носитель – азот, объемная скорость на выходе из колонки 1 см³/мин. Избыточное давление на входе в колонку 35 кПа. Температура испарителя 200 °С, температура детектора 200 °С. В методе ПФА-ГХ-МС применяли хроматограф Agilent 7890 GC (США), совмещенный с масс-селективным детектором (5975 С) с ионизацией электронным ударом. Использовали капиллярную колонку (30 м × 0.25 мкм, $d_i = 0.25$ мкм) с 5 %-дифенил-95 %-диметилполисилоксановой неподвижной фазой. Газ-носитель – гелий, объемная скорость на выходе из колонки 1 см³/мин. Температура испарителя 270 °С, температура детектора 200 °С, температура источника ионов 150 °С, температура квадруполя 230 °С, температура переходной камеры 280 °С. Диапазон сканирования: 45-500 а.е.м. При использовании указанных газовых хроматографов применяли одинаковый режим программирования температуры колонки: изотерма при температуре 40 °С в течение 2 минут, далее – линейное программирование температуры со скоростью 4 °С/мин до температуры 180 °С. Данный режим рекомендован в работе [34] для получения воспроизводимых результатов ГХ анализа эфирных масел с использованием капиллярных колонок с неполярными и малополярными неподвижными фазами. Для расчета индексов удерживания I_i^T в аналогичном режиме программирования температуры хроматографировали смесь *n*-алканов C₅-C₁₅ и газообразный бутан. Результаты ГХ эксперимента обрабатывали с использованием программного обеспечения «Хроматэк-Аналитик 3.0» (ПФА-ГХ-ДИП) и «AgilentChemStation» (ПФА-ГХ-МС).

На основании ГХ экспериментов, проведенных методами ПФА-ГХ-ДИП и ПФА-ГХ-МС, для компонентов паровой фазы рассчитывали индексы удерживания Ван-ден-Доола и Кратса при линейном программировании температуры колонки I_i^T [35] и относительные площади пиков $A_{r,i}$ методом внутренней нормализации (%) [36].

Точность определения (Δ) индексов удерживания [37] проводили на примере реперных *n*-алканов, элюирующихся в начале, в середине и в конце линейного программирования температуры

– *n*-гексана ($I^T = 600$), *n*-нонана ($I^T = 900$) и *n*-додекана ($I^T = 1200$). Значения прецизионности определения ε (случайные составляющие погрешности) индексов удерживания *n*-алканов при линейном программировании температуры колонки рассчитывали из выборки пяти измерений ($n = 5$). Установлено, что прецизионность измерения в пределах $\varepsilon = 0.43-0.10$, а правильность измерения (систематические составляющие погрешности) в пределах $\delta = 1.6-0.9$. Таким образом, точность определения индексов удерживания при линейном программировании температуры колонки $\Delta = \sqrt{\delta^2 + \varepsilon^2}$ уменьшается от $\Delta = 1.7$ (*n*-гексан) до $\Delta = 0.9$ (*n*-додекан).

Относительное СКО S_r , (%) среднего арифметического значения относительной площади пика $\bar{A}_{r,i}$ рассчитано из выборки пяти анализов паровой фазы ЛРС зверобоя ($n = 5$). Погрешность определения относительных площадей пиков также уменьшается с увеличением времени, и, соответственно, температуры выхода компонента из колонки и изменяется от $\pm 10.46\%$ (пропаналь, $t_R = 3.30$ мин) до $\pm 4.00\%$ (β -пинен, $t_R = 15.04$ мин).

Идентификацию летучих компонентов в паровой фазе проводили с использованием масс-спектрометрического детектора, а также на основании экспериментально полученных индексов удерживания I_i^T компонентов, которые сопоставляли с литературными данными по величинам I_i^T эфирного масла зверобоя [22-31], атласа масс-спектров эфирных масел [34] и базы данных NIST [38], полученным на капиллярных колонках с 5 %-дифенил-95%-диметилполисилоксановой стационарной фазой.

Результаты и их обсуждение

Для оценки возможных проблем, возникающих в ходе газовой экстракции ЛОС из конденсированной фазы в присутствии воздушной фазы, целесообразно было выяснить, как температура и время газовой экстракции влияют на качественный и количественный состав РПФ.

Нами изучено (при температуре 80 °С) влияние времени экстракции на число компонентов в паровой фазе ЛРС (травы зверобоя продырявленного производства «Красногорсклексредства»). Анализ паровой фазы проводили в варианте ПФА-ГХ-ДИП. На рис. 1 представлена зависимость суммарного числа пиков ЛОС (n) на хроматограмме от времени экстракции (t , мин).

Установлено, что число компонентов и суммарное содержание веществ в паровой фазе, пропорциональное величине $\sum A_i$, наиболее сильно возрастают в течение первых 20 минут, а затем в интервале времени 20-40 минут практически не изменяются. Это свидетельствует о том, что равновесный состав паровой фазы (80 °С) устанавливается в течение 30-40 мин. Близкие закономерности наблюдались при температуре газовой экстракции 100 °С. Для оценки влияния температуры на каче-

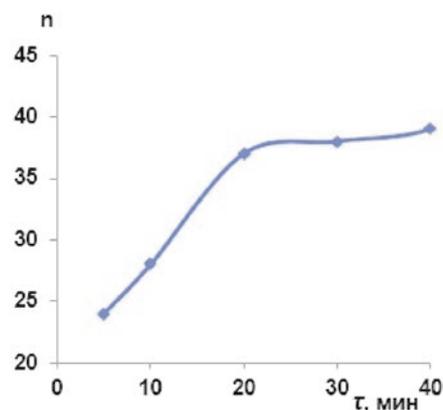


Рис. 1. Зависимость числа пиков летучих компонентов паровой фазы зверобоя (n) от времени газовой экстракции (t , мин); температура экстракции 80 °С

Fig. 1. Dependence of the number of peaks of St. John's Wort (n) volatile components on the time of gas extraction (t , min); extraction temperature 80 °С

ственный и количественный состав равновесной паровой фазы (РПФ) образцы осушенного ЛРС («Красногорсклексредства») выдерживали в течение 40 мин в сосуде для газовой экстракции при температурах 30°, 40°, 60°, 80°, 100°, 120° и 140°С.

Число пиков (компонентов) в интервале температур от 30° до 140°С увеличивается от 13 до 56. Наибольшее возрастание числа пиков наблюдается до температуры $t = 80$ °С и достигает значения $n = 39$. Относительное содержание появляющихся при $t > 80$ °С в РПФ менее летучих компонентов очень мало ($A_{r,i} \ll 1\%$) и они практически не влияют на общий вид хроматограммы. Кроме того при повышении температуры газовой экстракции не происходит уменьшения абсолютного содержания компонентов, что могло бы косвенно свидетельствовать о протекании химических реакций в воздушной фазе. Для получения информативного хроматографического образа (профиля) летучих компонентов зверобоя необходимо установить тот интервал температур газовой экстракции, в котором относительное содержание компонентов изменяется мало. Для этого изучали зависимость от температуры отношения площади пика менее летучего i -го компонента (A_i) к аналогичной величине для более летучего компонента (A_{st}), выбранного в качестве стандарта. В качестве такого стандарта был взят 2-метилпропаналь ($I_{st}^T = 556$), который присутствует в паровой фазе уже при температуре газовой экстракции 30 °С. На примере среднелетучего компонента 2-метил-3-бутен-2-ола ($I_i^T = 617$) и других менее летучих компонентов установлено, что зависимость (A_i/A_{st}) от температуры газовой экстракции имеет максимум при температуре 60 °С (рис. 2, крив. 1).

Есть основания полагать, что максимум обусловлен различием в температурных зависимостях констант десорбционного перераспределения i -го компонента и стандартного соединения и влияни-

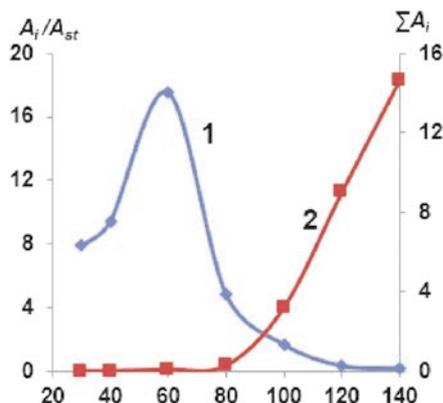


Рис. 2. Зависимость отношения площадей пиков 2-метил-3-бутен-2-ола и 2-метилпропаналя (A_i/A_{st}) (крив. 1) и суммы абсолютных площадей пиков всех компонентов (ΣA_i) от температуры газовой экстракции (крив. 2); время экстракции 40 мин

Fig. 2. Dependences of peak's areas relation between 2-methyl-3-butene-2-ol and 2-methylpropanal (A_i/A_{st}) (line 1) and the sum of absolute peaks areas of all components (ΣA_i) on the gas extraction temperature (line 2); extraction time 40 min

ем резкого повышения при $t > 80^\circ\text{C}$ суммарной концентрации всех компонентов ΣA_i (рис. 2, крив. 2) и, соответственно, общего давления на процесс перераспределения ЛОС из осушенного ЛРС. Анализ зависимости A_i/A_{st} показывает, что данная величина меньше всего изменяется в интервале температур 80-140 °С, несмотря на резкое увеличение ΣA_i . Это дает основание полагать, что при температурах 80-140 °С относительное содержание компонентов изменяется мало и возможно получение информативного хроматографического профиля, характеризующего качественный и количественный состав РПФ зверобоя. Полученные данные показывают, что ЛОС растения «зверобой» достаточно устойчивы при исследованных температурах (30-140 °С) и не происходит химических превращений в присутствии воздуха как в конденсированной фазе (осушенной траве), так и в газовой фазе. На основании вышеописанных результатов мы выбрали следующий режим газовой экстракции: температура 80 °С, время 40 минут.

Хроматограмма ботанического образца травы зверобоя продырявленного, полученная методом ПФА-ГХ-ДИП в выбранных условиях газовой экстракции, представлена на рис. 3. На хроматограмме зарегистрировано 39 компонентов с временами удерживания t_R от 2.95 мин до 19.98 мин и рассчитанными величинами индексов удерживания от $I_i^T = 360$ до $I_i^T = 1099$ единиц индекса. Видно, что при выбранных условиях ГХ анализа пики наиболее летучих компонентов паровой фазы достаточно хорошо разделены. Аналогичный вид имела хроматограмма того же ботанического образца зверобоя, полученная методом ПФА-ГХ-МС. Относительное содержание компонентов в паровой фазе варьируется от $A_{r,i} \approx 0.01\%$ до $A_{r,i} = 46.50\%$ (2-ме-

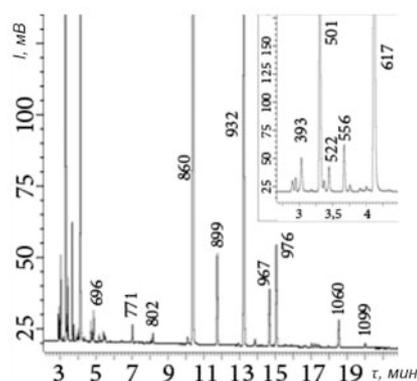


Рис. 3. Хроматограмма летучих компонентов ботанического образца травы зверобоя продырявленного: ПФА/ГХ/ДИП, капиллярная колонка из плавленного кварца (30 м × 0.32 мм), 5 %-дифенил-95 %-диметилполисилоксан ($d_f = 0.25$ мкм), 40 °С – 2 мин, 4 °/мин, N_2 , 1.0 см³/мин, объем газообразной пробы 1 см³, деление потока 1 : 50, начальный участок хроматограммы представлен в правом верхнем углу рисунка

Fig. 3. Chromatogram of the volatile components of the botanical sample of the St. John's Wort obtained by the headspace GC/DIP on the capillary column Rtx-5 (30 m × 0.32 mm, film thickness 0.25 μm), 40 °C – 2 min, 4 °/min, N_2 , 1.0 cm³/min, volume of gas sample 1 cm³

тилоктан, доминирующий компонент, $I_i^T = 860$). Следует отметить, что этот же компонент с индексом удерживания $I_i^T = 860$ указан как доминирующий в работе [11], в которой метод ПФА (headspace analysis) был впервые применен для анализа ЛРС, в том числе зверобоя продырявленного. Компоненты равновесной паровой фазы осушенного ботанического образца зверобоя были идентифицированы на основании масс-спектральных характеристик и путем сопоставления экспериментально определенных значений индексов удерживания I_i^T с литературными данными [22-31]. Эти данные представлены в табл. 1.

Идентифицировано 35 летучих компонентов из 39. Анализируя headspace-хроматограммы ботанического и трех промышленных образцов зверобоя, мы установили, что основной вклад в общий вид хроматограммы вносят 9 компонентов, относительное содержание которых в паровой фазе больше или равно 1 % ($A_{r,i} \geq 1\%$). В табл. 1 они выделены жирным шрифтом. К этим основным летучим компонентам зверобоя относятся (в порядке возрастания индексов удерживания): этаналь (393), пропаналь (501), диметилсульфид (522), 2-метилпропаналь (556), 2-метил-3-бутен-2-ол (617), 2-метилбутаналь (696), 2-метилоктан (860), α-пинен (932), 3-метилнонан (967). Если для ботанического образца доминирующим компонентом является 2-метилоктан, то для промышленных образцов – пропаналь ($I_i^T = 501$, $A_{r,i} = 34.14-30.41\%$). Сравнение полученных нами headspace-хроматограмм летучих компонентов паровой фазы «зверобоя продыряв-

Таблица 1

Индексы удерживания I_i^T летучих компонентов и их относительное содержание $A_{i,i}$, % в равновесной паровой фазе лекарственного растения «зверобой продырявленный»

Table 1

Retention indices I_i^T of volatile components and their relative area $A_{i,i}$, % in the equilibrium vapor phase of medicinal St. John's Wort plant

| I_i^T | Соединение* | Промышленные образцы, | | | Ботанический сад, $A_{i,i}$, % |
|------------|---|-----------------------|--------------|--------------|------------------------------------|
| | | $A_{i,i}$, % | | | |
| | | Красногорск | Здоровье | Иван-чай | |
| 360 | - | 1.31 | 1.27 | 0.95 | 0.25 |
| 393 | Этаналь ^{а,г} | 6.27 | 7.14 | 7.14 | 1.09 |
| 452 | Диэтиловый эфир ^{а,г} | 0.35 | 1.16 | 0.42 | 0.03 |
| 501 | Пропаналь ^{а,г} | 30.41 | 32.05 | 34.14 | 8.91 |
| 511 | Изопропанол ^{а,г} | 0.44 | 0.45 | 0.36 | 0.18 |
| 522 | Диметилсульфид ^{а,г} | 2.31 | 3.37 | 2.87 | 0.75 |
| 556 | 2-метилпропаналь ^{а,г} | 5.56 | 5.53 | 3.73 | 1.38 |
| 570 | 2-метилпропеналь-2 ^а | 1.11 | 2.46 | 2.21 | 0.19 |
| 592 | Пропанол ^{б,г} | 0.20 | 0.28 | 0.23 | 0.07 |
| 599 | Бутаналь ^{а,г} | 0.24 | 0.15 | 0.09 | 0.01 |
| 604 | Бутанон-2 ^г | 0.59 | 0.39 | 0.45 | 0.10 |
| 610 | Этилацетат ^г | 0.15 | 0.14 | 0.13 | 0.03 |
| 617 | 2-метил-3-бутен-2-ол ^{а,б,г} | 19.08 | 20.75 | 15.53 | 16.51 |
| 680 | 3-метилбутаналь ^{а,г} | 2.32 | 2.20 | 1.35 | 0.29 |
| 696 | 2-метилбутаналь ^{а,г} | 2.61 | 2.93 | 1.52 | 0.42 |
| 708 | 2-этилфуран ^{а,г} | 0.43 | 0.35 | 0.41 | 0.10 |
| 711 | 2,4,4-триметилпентен-1 ^{а,г} | 0.14 | 0.18 | 0.13 | 0.02 |
| 719 | Метилциклогексан ^{б,г} | 0.99 | 0.77 | 0.37 | 0.10 |
| 766 | Цис-2-пентен-1-ол ^г | 0.06 | 0.06 | 0.09 | 0.26 |
| 791 | - | 0.13 | 0.20 | 0.25 | 0.03 |
| 799 | <i>n</i> -октан ^{а,б,в} | 0.79 | 0.07 | 0.06 | 0.05 |
| 802 | Гексаналь ^{б,г} | 3.76 | 2.75 | 1.98 | 0.21 |
| 852 | Транс-2-гексеналь ^{а,б,в,г} | 0.94 | 1.20 | 0.52 | 0.21 |
| 860 | 2-метилоктан ^{а,б,г} | 11.61 | 6.96 | 18.85 | 46.50 |
| 899 | <i>n</i> -нонан ^{а,б,г} | 1.02 | 0.62 | 1.24 | 2.39 |
| 924 | α -туйен ^{а,б,в,г} | 0.15 | 0.04 | 0.04 | 0.08 |
| 932 | α-пинен ^{а,б,в,г} | 1.55 | 0.41 | 0.94 | 13.06 |
| 947 | Камфен ^{а,б,в,г} | 0.24 | 0.06 | 0.11 | 0.21 |
| 953 | - | 0.06 | 0.05 | 0.06 | 0.02 |
| 956 | - | 0.06 | 0.10 | 0.13 | 0.02 |
| 967 | 3-метилнонан ^{а,б,г} | 0.91 | 0.75 | 1.29 | 1.72 |
| 972 | Сабинен ^{б,в,г} | 0.09 | 0.05 | 0.09 | 0.06 |
| 976 | β -пинен ^{а,б,в,г} | 0.48 | 0.12 | 0.39 | 3.04 |
| 986 | β -мирцен ^{б,в,г} | 0.12 | 0.08 | 0.17 | 0.02 |
| 1024 | ρ -цимен ^{б,в,г} | 0.48 | 0.27 | 0.16 | 0.12 |
| 1028 | Лимонен ^{б,в,г} | 0.20 | 0.07 | 0.16 | 0.11 |
| 1032 | 1,8-цинеол ^{а,б,в,г} | 0.35 | 0.10 | 0.10 | 0.13 |
| 1061 | γ -терпинен ^{а,б,г} | 0.67 | 0.04 | 0.55 | 0.99 |
| 1099 | <i>n</i> -ундекан ^{б,в,г} | 0.18 | 3.40 | 0.48 | 0.17 |

Примечание: * – идентификацию проводили с использованием: а – хромато-масс-спектрометрического анализа; б – литературных данных по зверобою [22-31]; в – атласа масс-спектров эфирных масел [34]; г – базы данных NIST [38]; «-» – компоненты не идентифицированы.

ленного» с результатами работ [22-31], в которых проводился анализ эфирного масла (ГХ-МС), показало, что в этих работах отсутствует информация о летучих компонентах с индексами удерживания $I_i^T < 800$. Отсутствие таких легкокипящих компонентов связано как с их потерями в процессе перегонки, так и с разбавлением жидких проб эфирных масел летучими растворителями при прямом вводе

в колонку. Перекрытие пиков легкокипящих компонентов большими пиками растворителей на хроматограмме затрудняет обнаружение и идентификацию наиболее легкокипящих компонентов ЛРС. Следует отметить, что центральный участок полученной нами headspace-хроматограммы совпадает с начальным участком хроматограмм эфирного масла зверобоя, полученных традиционно прямым

вводом жидких проб [22-31]. Анализ литературных источников показал совпадение найденных нами 12 компонентов РПФ и эфирных масел: *n*-октан ($I_i^T = 799$), 2-метилоктан ($I_i^T = 860$), *n*-октан ($I_i^T = 860$), α -пинен ($I_i^T = 932$), 3-метилнонан ($I_i^T = 967$), сабинен ($I_i^T = 972$), β -пинен ($I_i^T = 976$), β -мирцен ($I_i^T = 986$), *l*-цимен ($I_i^T = 1024$), лимонен ($I_i^T = 1024$), 1,8-цинеол ($I_i^T = 1032$), ундекан ($I_i^T = 1099$).

Анализ данных, представленных в табл. 1, показывает, что РПФ всех образцов ЛРС зверобоя содержит большое количество 2-метил-3-бутен-2-ола ($I_i^T = 617$). Данный компонент идентифицирован нами методом ПФА-ГХ-МС с вероятностью 78 %, а также по индексам удерживания с использованием базы данных NIST [36]. Присутствие вещества 2-метил-3-бутен-2-ол в паровой фазе травы зверобоя продырявленного отмечено также в работе [25] в условиях ПФА-ГХ анализа. Содержание этого компонента варьируется от $A_{pi,i} = 15.53$ % для промышленного образца «Иван-чай» до 20.75 % для образца «Здоровье». Из имеющегося опыта ПФА анализа лекарственных растений [15, 16] и опираясь на работы [7-10], где для определения качества и подлинности ЛРС рекомендуется использовать поиск веществ-маркеров, нами выдвинуто предположение, что компонент 2-метил-3-бутен-2-ол может являться маркером РПФ «зверобоя продырявленного». Информация об этом летучем соединении представлена в работе [39]. Отмечено, что данный летучий компонент содержится в следовых количествах в шишках хмеля, достигая за первые два года хранения максимального содержания (0.15 % мас.). Этот непредельный спирт 2-метил-3-бутен-2-ол обладает седативным эффектом, что хорошо согласуется с фармакологическими свойствами зверобоя продырявленного.

Для получения информации о качественном (I_i^T) и количественном ($A_{pi,i}$) составе РПФ и для установления подлинности ЛРС целесообразно использовать не хроматограммы, а диаграммы (headspace-спектры) «относительная площадь пика – индекс удерживания». На рис. 4 (а, б) представлены такие диаграммы для двух промышленных образцов «зверобоя продырявленного».

Полученные headspace-спектры иллюстрируют, что качественный состав летучих компонентов российского ЛРС «зверобой продырявленный» не меняется в зависимости от места произрастания. Количественное содержание летучих компонентов несколько изменяется (табл. 1), однако оно мало влияет на общий вид профилей ЛРС зверобоя (рис. 4, а-б). Сравнивая полученные диаграммы РПФ зверобоя с диаграммами других растений [15-16], можно сделать вывод о том, что хроматографический headspace-спектр ЛРС зверобоя специфичен и может быть использован для определения его подлинности.

Оправданность использования прямого ПФА-ГХ анализа для установления подлинности ЛРС

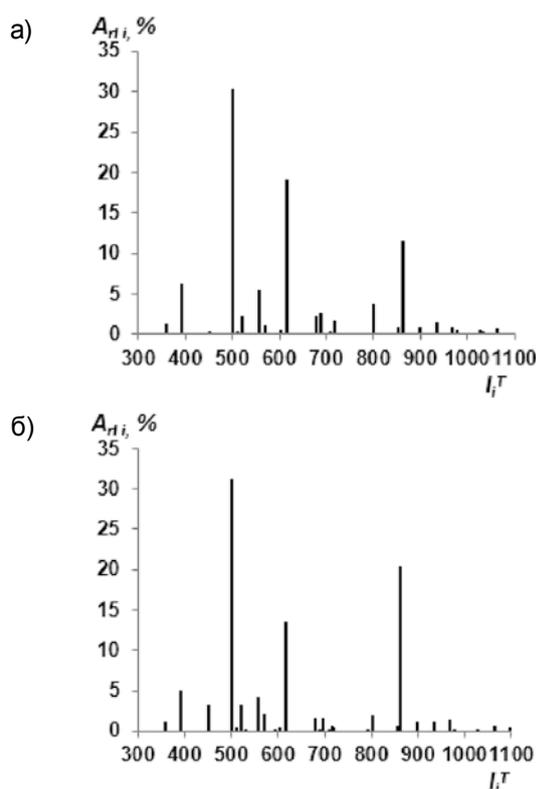


Рис. 4. Диаграммы «относительная площадь пика – индекс удерживания» (headspace-спектры) ЛРС «зверобоя продырявленного»: а – «Красногорсклексредства»; б – «Здоровье»

Fig. 4. “Relative area of peak – retention index” diagrams (headspace-profiles) of St. John’s Wort’s raw material: а – “Krasnogorskleksredstva”; б – “Zdorov’e”

обусловлено его экспрессностью и экономичностью, так как отсутствуют трудоемкие стадии получения эфирного масла или экстракта. Кроме того, использование такого метода позволяет получать унифицированный и воспроизводимый компонентный состав летучих соединений в паровой фазе растения (headspace-спектр), не зависящий от способа получения эфирного масла или экстракта.

Для изучения аналитических возможностей ПФА важно было сопоставить составы РПФ осушенных образцов зверобоя и фитопрепаратов на его основе – таблетированной формы и масляного экстракта. Результаты ПФА лекарственного препарата «Деприм», представлены в табл. 2. Всего в паровой фазе препарата обнаружено 44 летучих компонента в интервале индексов удерживания $I_i^T = 359 \div 1099$. Данный интервал совпадает с интервалом индексов удерживания летучих компонентов ЛРС зверобоя. Наибольшим содержанием обладают легкокипящие компоненты паровой фазы препарата.

Из 44 летучих компонентов препарата 33 совпадают с компонентами ЛРС зверобоя (табл. 2). Отсутствуют в паровой фазе ЛРС зверобоя, но присутствуют в РПФ препарата 11 компонентов с индексами удерживания 448, 689, 716, 752, 760, 782,

Таблица 2

Результаты парового газохроматографического анализа лекарственного препарата «Деприм»

Table 2

Results of "Deprim" medicine headspace gas chromatographic analysis

| I_i^T | $A_{n,i}^T$ % |
|------------|---------------|------------|---------------|------------|---------------|------------|---------------|
| 360 | 0.08 | 680 | 1.37 | 791 | 0.03 | 953 | 0.04 |
| 393 | 1.59 | 689 | 0.63 | 799 | 0.02 | 956 | 0.11 |
| 448 | 18.97 | 696 | 2.94 | 802 | 0.13 | 967 | 0.03 |
| 501 | 24.35 | 708 | 0.08 | 841 | 0.11 | 976 | 0.02 |
| 511 | 1.20 | 711 | 0.05 | 844 | 0.07 | 986 | 0.07 |
| 522 | 6.24 | 716 | 0.24 | 852 | 0.04 | 1010 | 0.08 |
| 556 | 5.13 | 719 | 0.12 | 860 | 0.06 | 1024 | 0.05 |
| 592 | 0.38 | 752 | 0.06 | 899 | 0.29 | 1028 | 0.05 |
| 604 | 0.27 | 760 | 0.07 | 911 | 0.05 | 1061 | 0.04 |
| 610 | 0.19 | 766 | 0.01 | 932 | 0.20 | 1074 | 0.04 |
| 617 | 34.35 | 782 | 0.14 | 947 | 0.02 | 1099 | 0.01 |

Примечание: 448 – этанол; 716 – метилциклогексан; 752 – 2-бутилацетат; 760 – пентанол; 782 – циклопентанол; 841 – 2,6-диметилгептан; 844 – 3-метилциклопентан; 911 – пентилацетат; 1010 – α -фелландрен; 1074 – терпинен-4-ол.

841, 844, 911, 1010 и 1074, в таблице они выделены курсивом, а их названия даны в примечании. Есть основания полагать, что в качестве экстрагента при производстве препарата был использован этиловый спирт ($A_{n,i} = 18.97\%$, $I_i^T = 448$), большой пик которого присутствует на хроматограмме РПФ препарата. Использование полярного растворителя этанола объясняет высокое содержание полярных компонентов в паровой фазе таблеток, таких как пропаналь ($A_{n,i} = 24.35\%$), диметилсульфид ($A_{n,i} = 6.23\%$), 2-метилпропаналь ($A_{n,i} = 5.13\%$), 2-метил-3-бутен-2-ол ($A_{n,i} = 34.34\%$) и уменьшение содержания неполярных веществ, присутствующих в РПФ зверобоя в большом количестве (2-метилоктан, α -пинен) (табл. 2). Доминирующим компонентом РПФ препарата «Деприм» является предполагаемый маркер зверобоя 2-метил-3-бутен-2-ол. Подлинность данного фитопрепарата подтверждается и тем, что все 9 основных компонентов с индексами удерживания 393, 501, 522, 556, 617, 696, 860, 932 и 967 образцов зверобоя присутствуют в этом препарате. В табл. 1 они выделены жирным шрифтом. Полученные экспериментальные данные по исследованию препарата дают возможность для определения его подлинности методом ПФА по наличию основных компонентов зверобоя, в том числе маркера 2-метил-3-бутен-2-ола ($I_i^T = 617$).

Хроматограмма летучих компонентов масляного экстракта зверобоя представлена на рис. 5. В паровой фазе масляного экстракта зверобоя присутствуют 27 летучих компонентов в диапазоне индексов удерживания $I_i^T = 359 \div 1099$. Из этих 27 компонентов 25 присутствуют в паровой фазе ЛРС зверобоя. Все девять основных компонентов паровой фазы ЛРС «зверобой продырявленный» при-

сутствуют в РПФ косметического масла. В табл. 3 они выделены жирным шрифтом.

Компоненты паровой фазы масляного экстракта с индексами удерживания 763 и 771 не совпадают с летучими компонентами паровой фазы ЛРС зверобоя. Компонент-маркер 2-метил-3-бутен-2-ол является доминирующим в паровой фазе масляного экстракта ($A_{n,i} = 55.29\%$). Из сопоставления рис. 3 и рис. 5 видно, что отклик детектора на хроматограмме РПФ осушенной травы зверобоя значительно сильнее, чем на хроматограмме РПФ масляного экстракта. Это свидетельствует о том, что концентрация всех ЛОС в РПФ масла существенно меньше, чем в РПФ воздушно-сухих образцов. Полученные данные указывают на возможность

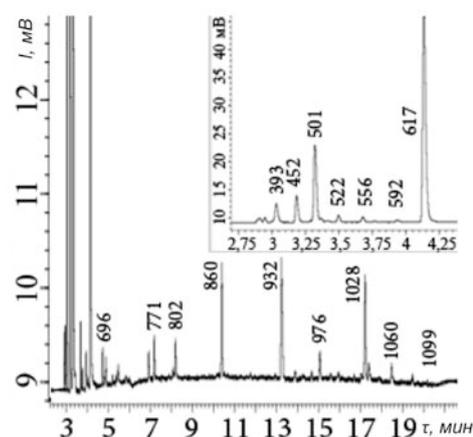


Рис. 5. Хроматограмма летучих компонентов косметического масла зверобоя: ПФА/ГХ/ДИП (условия ГХ анализа представлены в подписи к рис. 3)

Fig. 5. Chromatogram of volatile components of St. John's Wort oil extract: headspace GC/DIP (conditions of GC analysis are presented in the caption to Fig. 3)

Таблица 3

Результаты парофазного газохроматографического анализа косметического масла зверобоя

Table 3

Results of headspace gas chromatographic analysis of the St John's Wort oil extract

| I_i^T | $A_{н.р.} \%$ |
|------------|---------------|------------|---------------|------------|---------------|------------|---------------|
| 360 | 0.76 | 570 | 0.23 | 763 | 0.24 | 967 | 0.15 |
| 393 | 4.83 | 592 | 0.48 | 771 | 0.78 | 976 | 0.70 |
| 452 | 6.90 | 604 | 0.09 | 799 | 0.14 | 1024 | 0.22 |
| 501 | 15.02 | 617 | 55.29 | 802 | 0.67 | 1028 | 2.55 |
| 511 | 0.24 | 680 | 0.47 | 860 | 2.64 | 1032 | 0.66 |
| 522 | 0.08 | 696 | 0.53 | 895 | 0.16 | 1061 | 0.41 |
| 556 | 1.04 | 719 | 0.27 | 932 | 4.40 | 1099 | 0.05 |

Примечание: 771 – изобутилацетат.

определения подлинности косметического масла зверобоя методом ПФА-ГХ.

Заключение

Таким образом, метод парофазного газохроматографического анализа применен для изучения компонентного состава равновесной паровой фазы ЛРС зверобоя продырявленного и препаратов на его основе. Изучены закономерности газовой экстракции летучих компонентов из ЛРС. Определены температурный интервал и время экстракции для получения хроматографического профиля летучих компонентов ЛРС. Установлено, что основными компонентами равновесной паровой фазы зверобоя (осушенной травы) являются (в порядке возрастания индексов удерживания I_i^T): этаналь, пропаналь, диметилсульфид, 2-метилпропаналь, 2-метил-3-бутен-2-ол (маркер, $I_i^T=617$), 2-метилбутаналь, 2-метилоктан, α -пинен, 3-метилнонан. Установлено, что все основные компоненты паровой фазы ЛРС, в том числе маркер 2-метил-3-бутен-2-ол, присутствуют в паровой фазе препаратов – таблетированной форме сухого экстракта зверобоя «Деприм» и масляном экстракте зверобоя.

Благодарности

Работа выполнена при поддержке гранта № 4.5883.2017/8.9 в рамках выполнения госзадания Министерства образования и науки РФ.

Acknowledgements

Current study was sponsored by The Ministry of Education and Science of the Russian Federation (Project no. 4.5883.2017/8.9).

Литература

1. Способы экстрагирования биологически активных веществ из лекарственных растений на примере компонентов зверобоя / В.В. Милевская [и др.] // Журн. аналит. химии. 2015. Т. 70, № 12. С. 1255-1263.

- Ревельский И.А., Глазков И.Н. О применении СФЭ для получения экстрактов из лекарственных, сельскохозяйственных растений и фармпрепаратов // Сверхкритические Флюиды: Теория и Практика. 2008 Т. 3, № 2. С. 70-73.
- Павлова Л.В. Экстракционно-хроматографическое определение физиологически-активных компонентов цветов «ромашки аптечной» и «эвкалипта прутовидного»: дис. ... канд. хим. наук: 02.00.02. Самара, 2015. 176 с.
- Essential oil of tansy (*Tanacetum Vulgare* L.) of Canadian origin / J. Collin [et al.] // J. Essent. Oil Res. 1993. № 5. P. 629-638.
- Avato P. Determination of major constituents in St. John's Wort under different extraction conditions // Pharm. Biol. 2004. V. 42, № 1. P. 83-89.
- Marriot P.J., Shellie R., Cornwell C. Gas chromatographic technologies for the analysis of essential oils // J. chromatogr. A. 2001.V. 936, № 1-2. P. 1-22.
- Кузьменко А.Н. Изучение компонентного состава растительного лекарственного сбора. Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2009. Т. 50, № 3. С. 212-216.
- Сочетание двух хроматографических методов для изучения химического состава лекарственных растений / А.Н. Кузьменко [и др.] // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2011. Т. 52, № 5. С. 394-399.
- Применение хромато-масс-спектрометрии для изучения компонентного состава фармакопейных видов лекарственного растительного сырья / Р.В. Разживин [и др.] // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2009. Т. 50, № 1. С. 67-70.
- Кузьменко А.Н. Стандартизация лекарственного растительного сырья и растительных сборов методами ионо-эксклюзионной и газо-жидкостной хроматографии. Дис. ... докт. хим. наук: 14.04.02. М., 2013. 319 с.
- Золотов Ю.А. О некоторых тенденциях развития аналитической химии // Заводская лаборатория. Диагностика материалов. 2012. Т. 78, № 9. С. 5-7.
- Виттенберг А.Г., Иоффе Б.В. Газовая экстракция в хроматографическом анализе. Л.: Химия, 1982. 279 с.
- Хахенберг Х., Шмидт А. Газохроматографический анализ равновесной паровой фазы. М.: Мир, 1979. 160 с.
- Kolb B., Leslie S. Static Headspace-Gas Chromatography: Theory and Practice, New York.: Wiley VCH, 1997. 341 p.
- Газохроматографические характеристики летучих веществ в плодах и препаратах расторопши пятнистой (*Silybum marianum* L.) / Л.А. Онуцук [и др.] // Журн. аналит. химии. 2012. Т. 67, № 6. С. 619-624.

16. Газохроматографические профили летучих компонентов равновесной паровой фазы лекарственных растений «календула лекарственная», «зверобой продырявленный», «пижма обыкновенная» / Н.В. Ермакова [и др.] // Сорбц. и хром. проц. 2016. Т. 16. № 1. С. 17-28.
17. Куркин. В.А. Фармакогнозия: Учебник для студентов фармацевтических вузов. Самара: Офорт, 2004. 1180 с.
18. Nahrstedt A., Butterweck V. Biologically active and other chemical constituents of the herb of *Hypericum perforatum* L. // *Pharmacopsychiatry*. 1997. V. 30, № SUPPL. 2. P. 129-134.
19. Evaluation of Chemical stability of St. John's Wort Commercial Extract and Some Preparations / A.R. Billia [et al.] // *Int. J. Pharm.* 2001. V. 213, № 1-2. P. 199.
20. Kurkin V.A., Pravdivtseva O.E. Comparative studies of the total flavonoids and anthracene derivatives contents of St. John's Wort preparations // *Pharm. Chem. J.* 2008. V. 42, № 10. P. 589-592.
21. Государственная Фармакопея Российской Федерации. В 3 т.; Изд. XIII. М.: 2015. С. 418-427.
22. Chatzopoulou P.S., Koutsos V.K., Katsiotis S.T. Chemical composition of the essential oils from cultivated and wild grown St. John's Wort (*Hypericum perforatum*) // *J. Essent. Oil Res.* 2006. V. 18. P. 643-646.
23. Radusiene J., Judzentiene A., Bernotiene G. Essential oil composition and variability of *Hypericum Perforatum* L. growing in Lithuania // *Biochem. Syst. Ecol.* 2005. V. 33. P. 113-124.
24. Smelcerovic A.A., Dordevic S.M., Gudzic B.T. Investigation of bioactive component of essential oil of *Hypericum perforatum* L. spp. *angustifolium* (St. John's Wort) by GC-MS Method // *Proceedings of the 1st Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries & 6th Meeting "Days of Medicinal Plants 2000"*. Serbia. 2000. P. 619-622.
25. Qualitative evaluation of aromatic herbs by direct headspace GC analysis. application of the method and comparison with the traditional analysis of the essential oils / F. Chialva [et al.] // *Journal of HRC & CC.* 1982. V. 5. P. 182-188.
26. Essential oil composition of Serbian *Hypericum perforatum* local population cultivated in different ecological conditions / P.S. Chatzopoulou [et al.] // *Jeobp.* V. 12, № 6. P. 666-673.
27. Essential oil composition and variability of *Hypericum perforatum* from wild Populations of Northern Turkey / C. Cirak [et al.] // *Pharm. Biol.* 2010. V. 48, № 8. P. 906-914.
28. Essential oil composition of *Hypericum perforatum* L. from cultivated source / R.S. Chauhan [et al.] // *J. Essent. Oil Res.* 2011. V. 23, № 3. P. 20-25.
29. Essential oil composition of *Hypericum perforatum* L. and *Hypericum tomentosum* L. growing in Tunisia / K. Hosni [et al.] // *Ind Crops Prod.* 2008. V. 27. P. 308-314.
30. Volatile Components of *Hypericum humifusum*, *Hypericum perforatum* and *Hypericum ericoides* by HS-SPME-GC and HS-SPME-GCMS using nano scale injection techniques / Z. Rouis [et al.] // *Dig. J. Nanomater. Biostruct.* 2011. V. 6, № 4, P. 1919-1928.
31. Chemical Characterization of the Essential Oil Composition from Iranian Populations of *Hypericum perforatum* L. / R.M. Morshedloo [et al.] // *Ind. Crops Prod.* 2015. V. 76. P. 565-573.
32. Изучение эфирного масла из травы зверобоя продырявленного, произрастающего на территории Башкортостана / Н.В. Кудашкина [и др.] // *ВНМТ.* 2006. Т. 13, № 1. С. 104-105.
33. Изменчивость содержания эфирного масла и его основных компонентов в фитомассе *Hypericum perforatum* и *Hypericum maculatum* в культуре на севере / В.В. Пунегов [и др.] // *Извест. Самарского центра РАН.* 2015. Т. 17, № 5. С. 183-187.
34. Ткачев А.В. Исследование летучих веществ растений. Новосибирск: Офсет, 2008. 969 с.
35. Van den Dool H., Kratz P.D. A generalization of the retention index system including liner temperature programmed gas-liquid partition chromatography // *J. Chromatogr.* 1963. V. 11, № 4. P. 463-471.
36. Ettore L.S. Nomenclature for chromatography // *Pure & Appl. Chem.* 1993. V. 65. № 4. P. 819-872.
37. Дерффель К. Статистика в аналитической химии. М.: Мир, 1994. 267 с.
38. База данных NIST, <http://webbook.nist.gov/chemistry/> (дата обращения: 12.2017).
39. Hansel R., Wohlfart R., Schmidt H. Nachweis sedativ-hypnotischer Wirkstoffe im Hopfen // *Planta Med.* 1982. V. 45. P. 224-228.

References

- Milevskaia V.V., Statkus M.A., Temerdashev Z.A., Kiseleva N.V., Vernikovskaia N.A. Methods of extracting biologically active substances from medicinal plants by the example of components of St. John's wort. *J. Analyt. Chem.*, 2015, vol. 70, no. 12, pp. 1432-1440. doi: 10.1134/S1061934815120126.
- Revel'skii I.A., Glazkov I.N. [About using superfluid extraction for extracts from medicinal, agricultural plants and pharmaceuticals]. *Supercritical Fluids: Theory and Practice*, 2008, vol. 3, no. 2, pp. 70-73 (in Russian).
- Pavlova L.V. *Ekstraktsionno-khromatograficheskoe opredelenie fiziologicheskii aktivnykh komponentov tsvetov «romashki aptechnoi» i «evkalipta prutovidnogo»*. Diss. kand. khim. nauk [Extraction chromatographic determination of physiologically active components of the flowers *Matricaria chamomilla* and *Eucalyptus viminalis* Labill PhD chem. sci. diss.]. Samara, 2015. 176 p. (in Russian).
- Collin G.J., Deslauriers H., Pageau N, Gagnon M. Essential Oil of Tansy (*Tanacetum vulgare* L.) of Canadian Origin, *J. Essent. Oil Res.*, 1993, no. 5, pp. 629-638. doi: 10.1080/10412905.1993.9698296.
- Avato P. Determination of major constituents in St. John's Wort under different extraction conditions, *Pharm. Biol.*, 2004, vol. 42, no. 1, pp. 83-89.
- Marriot P.J., Shellie R., Cornwell C. Gas chromatographic technologies for the analysis of essential oils, *J. chromatogr. A*, 2001, vol. 936, no.1-2, pp. 1-22.
- Kuz'menko A.N. [The investigation of the composition of medicinal herbal mix]. *Vestnik Moskovskogo Universiteta*. [MSU Vestnik]. Ser. 2. Chemistry, 2009, vol. 50, no. 3, pp. 212-216 (in Russian).
- Kuz'menko A.N., Reshetniak V.Iu., Popkov V.A., Pashkova E.B., Pirogov A.V. [The combination of two chromatographic methods for investigating the chemical composition of medicinal plants]. *Vestnik Moskovskogo Universiteta*. [MSU Vestnik]. Ser. 2. Chemistry, 2011, vol. 52, no. 5, pp. 394-399 (in Russian).
- Razzhivin R.V., Reshetniak V.Iu., Kuz'menko A.N., Nesterova O.V., Popkov V.A. [Application of GC-MS for researching the composition of pharmacopeia species of medicinal plant material]. *Vestnik Moskovskogo Universiteta*. [MSU Vestnik]. Ser. 2. Chemistry, 2009, vol. 50, no. 1, pp. 67-70 (in Russian).
- Kuz'menko A.N. *Standartizatsia lekarstvennogo rastitel'nogo syr'ia i rastitel'nykh sborov metodami iono-ekskliuzionnoi i gazo-zhidkostnoi khromatografii*. Diss. dokt. khim. nauk. [Standardization of medicinal plant raw materials and plant mixes using ion-exclusion and gas-liquid chromatography methods. Dr. chem. sci. diss.]. Moscow, 2013. 319 p. (in Russian).
- Zolotov Iu.A. [About some trends in analytical chemistry]. *Zavodskaya laboratoriya: Diagnostika materialov*. [Indus-

- trial Laboratory. Diagnostics of materials], 2012, vol. 78, no. 9, pp. 5-7. (in Russian).
12. Vittenberg A.G., Ioffe B.V. *Gazovaia ekstraktsiia v khromatograficheskom analize*. [Gas extraction in chromatographic analysis]. Leningrad: Khimiia Publ., 1982. 279 p. (in Russian).
 13. Khakhenberg Kh., Shmidt A. *Gazokhromatograficheskii analiz ravnovesnoi parovoi fazy*. [Gas-chromatographic analysis of the equilibrium vapor phase]. Moscow: Mir Publ., 1979. 160 p. (in Russian).
 14. Kolb B., Leslie S. *Static Headspace-Gas Chromatography: Theory and Practice*, New York.: Wiley VCH, 1997. 341 p.
 15. Onuchak L.A., Arutyunov Iu.I., Nikitchenko N.V., Platonov I.A., Kurkin V.A. Gas chromatography parameters of volatile compounds in growths and pharmaceuticals of Milk Thistle (*Silybum marianum* L.). *J. Analyt. Chem.*, 2012, vol. 67, no. 6, pp. 560-564. doi: 10.1134/S106193481206010X.
 16. Ermakova N.V., Arutyunov Iu.I., Onuchak L.A., Afanas'eva P.V., Kurkina A.V. Gas chromatographic profiles retention of volatile components in the headspace of medical plants "Calendula officinalis L.", "Hypericum perforatum L.", "Tanacetum vulgare L." *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. [Sorption and chromatographic processes], 2016, vol. 16, no. 1. pp. 17-28.
 17. Kurkin V.A. *Farmakognoziia: Uchebnik dlia studentov farmatsevticheskikh vuzov*. [Pharmacognosy: A textbook for students of pharmaceutical universities]. Samara: Ofort Publ., 2004. 1180 p. (in Russian).
 18. Nahrstedt A., Butterweck V. Biologically active and other chemical constituents of the herb of *Hypericum perforatum* L. *Pharmacopsychiatry*, 1997, vol. 30, no. SUPPL. 2. pp. 129-134. doi:10.1055/s-2007-979533
 19. Bilia A.R., Bergonzi M.C., Morgenni F., Mazzi G., Vincieri F.F. Evaluation of chemical stability of St. John's Wort commercial extract and some preparations. *Int. J. Pharm.*, 2001, vol. 213, no. 1-2, pp. 199-208. doi: 10.1016/S0378-5173(00)00660-8.
 20. Kurkin V.A., Pravdivtseva O.E. Comparative studies of the total flavonoids and anthracene derivatives contents of St. John's Wort preparations, *Pharm. Chem. J.*, 2008, vol. 42, no. 10. P. 589-592.
 21. *Gosudarstvennaia Farmakopeia Rossiiskoi Federatsii*. Izd. 13., vol. 3 [Pharmacopoeia of the Russian Federation], Moscow, 2015. pp. 418-427. (in Russian).
 22. Chatzopoulou P.S., Koutsos V.K., Katsiotis S.T. Chemical composition of the essential oils from cultivated and wild grown St. John's Wort (*Hypericum perforatum*), *J. Essent. Oil Res.*, 2006, vol. 18, no. 6, pp. 643-646. doi: 10.1080/10412905.2006.9699192
 23. Radusiene J., Judzentiene A., Bernotiene G. Essential oil composition and variability of *Hypericum Perforatum* L. growing in Lithuania. *J. Essent. Oil Res.*, 2005, vol. 33, pp. 113-124. doi: 10.1016/j.bse.2004.06.010.
 24. Smelcerovic A.A., Dordevic S.M., Gudzic B.T. Investigation of bioactive component of essential oil of *Hypericum perforatum* L. spp. angustifolium (St. John's Wort) by GC-MS Method. *Proc. of the 1st Conf. on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries & 6th Meet. "Days of Medicinal Plants 2000"*. Serbia, 2000, pp. 619-622.
 25. Chialva F., Gabri G., Liddle P. A. P., Ulian F. Qualitative evaluation of aromatic herbs by direct headspace GC analysis. application of the method and comparison with the traditional analysis of the essential oils. *Journal of HRC & CC*, 1982, vol. 5, pp. 182-188. doi: 10.1002/jhrc.1240050403.
 26. Chatzopoulou P.S., Markovic T., Radanovic D., Koutsos T.V., Katsiotis S.T. Essential oil composition of Serbian *Hypericum perforatum* local population cultivated in different ecological conditions. *Jeobp*, 2009, vol. 12, no. 6, pp. 666-673. doi: 10.1080/0972060X.2009.10643772.
 27. Cirak C., Bertoli A., Pistelli L., Seyis F. Essential oil composition and variability of *Hypericum perforatum* from wild Populations of Northern Turkey. *Pharm. Biol.*, 2010, vol. 48, no 8, pp. 906-914. doi: 10.3109/13880200903311136.
 28. Chauhan R.S., Vashistha R.K., Nautiyal M.C., Tava A., Cecotti R. Essential oil composition of *Hypericum perforatum* L. from cultivated source. *J. Essent. Oil Res.*, 2011, vol. 23, no. 3, pp. 20-25. doi: 10.1080/10412905.2011.9700452.
 29. Hosni K., Msaada K., Taarit M.B., Ouchikh O., Kallel M., Marzouk B. Essential oil composition of *Hypericum perforatum* L. and *Hypericum tomentosum* L. growing in Tunisia. *Ind. Crops Prod.*, 2008, vol. 27, pp. 308-314. doi: 10.1016/j.indcrop.2007.11.004.
 30. Rouis Z., Elaissi A., Abid N., Lassoued MA, Cioni P., Flamini G., Aouni M. Volatile Components of *Hypericum humifusum*, *Hypericum perforatum* and *Hypericum ericoides* by HS-SPME-GC and HS-SPME-GCMS using nano scale injection techniques. *Dig. J. Nanomater. Biostruct.*, 2011, vol. 6, no. 4, pp. 1919-1928.
 31. Morshedloo M. R, Ebadi A., Maggi F., Fattahi R., Yazdani D., Jafari M. Chemical characterization of the essential oil composition from Iranian populations of *Hypericum perforatum* L. *Ind. Crops Prod.*, 2015, vol. 76, pp. 565-573. doi: 10.1016/j.indcrop.2015.07.033.
 32. Kudashkina N.V., Faizullina R.R., Pushkarev V.A., R.M. Mukhamedzianov [The investigating of essential oil from the herb of St. John's Wort, perforated, growing in the territory of Bashkortostan]. *Vestnik Novykh Meditsinskikh Tekhnologii*. [Messenger of new medical technologies], 2006, vol. 13, no. 1, pp. 104-105. (in Russian).
 33. Punegov V.V., Echishvili E.E., Portniagina N.V., Zainullina K.S. [Variability of the content of essential oil and its main components in the phytomass *Hypericum perforatum* and *Hypericum maculatum* in the crop in the north]. *Izvestiia Samarskogo tsentra RAN*. [Izvestiya of the Samara Center of the RAS], 2015, vol. 17, no. 5, pp. 183-187. (in Russian).
 34. Tkachev A.V. *Issledovanie letuchikh veshchestv rastenii*. [Study of volatile substances of plants]. Novosibirsk: Ofset Publ., 2008, 969 c. (in Russian).
 35. Van den Dool H., Kratz P.D. A generalization of the retention index system including liner temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *J. Chromatogr. A*, 1963, vol. 11, no. 4. pp. 463-471.
 36. Ettre L.S. Nomenclature for chromatography. *Pure Appl.Chem.*, 1993, vol. 65, no. 4. pp. 819-872. doi: 10.1351/pac199365040819.
 37. Derffel' K. *Statistika v analiticheskoi khimii*. [Statistics in analytical chemistry], Moscow. Mir Publ., 1994, 267 p. (in Russian).
 38. NIST (2017). Available at: <http://webbook.nist.gov/chemistry/> (accessed: December 2017).
 39. Hansel R., Wohlfart R., Schmidt H. Nachweis sedativ-hypnotischer Wirkstoffe im Hopfen. *Planta Med.*, 1982, vol. 45, pp. 224-228. doi: 10.1055/s-2007-971377.