

## ИДЕНТИФИКАЦИЯ ЭФИРНЫХ МАСЕЛ В *LIPPIA JAVANICA*

[https://www.youtube.com/watch?v=Tj\\_20BS0GoM](https://www.youtube.com/watch?v=Tj_20BS0GoM)

### Аннотация

Трава *Lippia Javanica*, приобретённая в аптеке Hilton Harare Zimbabwe, была использована для экстрагирования эфирных масел вторым методом паровой гидродистилляции, Российская Фармакопея, Статья 1.5.3.0010.15. Получена бесцветная мутная эмульсия с сильным ароматом. Для дальнейшего анализа и идентификации эфирных масел в составе *L. javanica*, применен чувствительный метод качественного анализа. Полученные результаты показали, что *L. javanica* состоит из более чем 50 соединений из разных химических групп, таких как терпены, эфиры, альдегиды и т. д. В данной работе будут обсуждаться только результаты влажного метода качественного анализа.

### Ключевые слова

Эфирные масла  
*Lippia Javanica*  
Фитохимикаты  
Фармакогнозия

### Введение

В рамках реализации Государственной стратегии развития фармацевтической отрасли Российской Федерации на период до 2030 года приоритетным направлением является производство лекарственных средств, в том числе растительного происхождения. Интерес к фитопрепаратам остается актуальным и сегодня благодаря их мягкому действию, малой токсичности и возможности длительного применения для профилактики и лечения различных заболеваний. С развитием науки и медицины создаются все более современные лекарства, но лекарственные растения по-прежнему являются основным гарантом будущего в медицине и сфере здравоохранения.

*L. javanica* - многолетнее кустарниковое, травянистое растение высотой до 4,5 м с крепкими ароматными листьями, которые при измельчении источают аромат лимона [15-17]. В природе встречается в центральной, восточной и южной Африке. В южной Африке этот вид произрастает в Ботсване, Малави, Мозамбике, ЮАР, Свазиленде, Замбии, Занзибаре и Зимбабве [15–16].

В течение многих лет кустарник используется в медицинской практике Южной Африки из-за богатого химического состава, а значит, обладает широким спектром фармакологической активности. Основные фармакологические эффекты включают противовоспалительное, антиоксидантное, антисимпластическое, антимикробное, противотуберкулезное и противовирусное действие, что позволит нам производить более качественные и безопасные эфирные масла в отдаленном будущем [23–25].

Исходя из этого, кустарник используют для лечения широкого спектра заболеваний [28-29]. По данным из разных источников, его применяют при лечении следующих заболеваний и их симптомов (табл. 1).

**Таблица 1. Список заболеваний и методы применения *Lippia Javanica* в медицинской практике**

<b>Заболевания</b>	<b>Метод применения <i>Verbena Javanese</i></b>
Простуда	Изготовление настойки из листьев и побегов или приготовление мази на основе листьев
Кашель	Приготовление настойки из листьев /стеблей /побегов, применение отвара в виде ингаляций
Больное горло	Приготовление отвара из листьев и полоскание на основе настойки листьев
Тонзиллит	Приготовление настойки из листьев
Лихорадка	Приготовление отвара из листьев
Инфекционные заболевания легких	Приготовление отвара из корней и листьев
Заложенность носа	Приготовление отвара листьев с добавлением измельченных составов из других лекарственных препаратов
Бронхит	Приготовление настойки из листьев или корней либо приготовление мази на основе листьев с последующим наложением под марлевую повязку на область горла
Боль в груди	Получение сока из листьев и корней

Астма	Приготовление отвара или ингаляций из листьев
Малярия	Приготовление отвара из листьев и корней
Носовое кровотечение	Приготовление отвара из листьев
Мигрень	Ингаляции на основе отвара листьев и стеблей
Анемия	Приготовление отваров на основе корней

На основании данных таблицы можно сделать вывод, что *Lippia javanica* наиболее часто используется при лечении отоларингологических и пульмонологических заболеваний, что делает перспективным ее долговременное использование в медицинской сфере уже в ближайшем будущем, включая получение новых спреев и производство новых пастилок от кашля, для оказания помощи людям.

Отдельно стоит отметить важность препаратов на основе *Lippia Javanica* при комплексном лечении коронавирусной инфекции (COVID-19). Это растение уже много лет широко используется при лечении инфекционных заболеваний, поэтому неудивительно, что местное население Южно-Африканского региона использовало эфирные масла, настойки, ингаляции и отвары *Lippia Javanica* для профилактики, а затем и при комплексной терапии новых штаммов COVID-19 [25]. Отсюда следует простой вывод, что данное лекарственное растение открывает возможность для более широкого исследования, поэтому в ближайшем будущем будет запущено массовое производство препаратов против микробов и вирусов, поскольку растение содержит полифенолы и флавоноиды, которые обладают такими эффектами.

Составы эфирных масел значительно различаются в зависимости от места происхождения, сезона сбора урожая и погоды. Сложный молекулярный состав многих эфирных масел требует сепарации с высоким разрешением, чтобы охарактеризовать ряд соединений, входящих в состав масел. Кроме того, часто бывает необходимо изучить небольшие различия между маслами, которые

соответствуют различиям в географическом или генетическом происхождении растительного материала.

Хроматография, особенно газовая хроматография (ГХ) и масс-спектрометрия (МС), были наиболее применяемыми аналитическими методами анализа эфирных масел. Однако, ограничения ГХ и ГХ-МС подтолкнули хроматографов к глубоким поискам более эффективных методов анализа летучих веществ эфирных масел, таких как улучшение подготовки проб перед инъекцией. Были протестированы такие методы, как перегонка с водяным паром, динамический парофазный метод, статический парофазный метод и ТФМЭ (твердофазная микроэкстракция). В результате теперь передовым методом ввода пробы является статический парофазный метод (ПФГХ).

Важно учитывать, что ГХ-анализ эфирных масел обычно проводится для оценки конкретного растения или травы на предмет процентного содержания масла и компонентов. Однако, аналитические значения, полученные таким образом, не относятся непосредственно к летучим веществам в составе самой травы, и могут некорректно отражать действительное качество травы в зависимости от используемой методики выделения. Однако применение такого метода, как статический парофазный метод в ГХ, позволяет получить только профайл эфирных масел.

Масс-спектрометрию (МС) можно определить как исследование систем путем образования газообразных ионов с фрагментацией или без нее, которые затем характеризуются отношением массы к заряду ( $m/z$ ) и относительными количествами [41]. Аналит может быть ионизирован термическим методом, электрическим полем или воздействием электронов высокой энергии, ионов или фотонов.

Последнее десятилетие ознаменовалось огромным ростом популярности масс-спектрометров в качестве инструментов как для стандартных аналитических экспериментов, так и для фундаментальных исследований. Это связано с рядом особенностей, включая относительно низкую стоимость, простоту конструкции и чрезвычайно высокую скорость сбора данных. И, хотя в процессе образец

разрушается масс-спектрометром, этот метод очень чувствителен, и при анализе используется лишь небольшое количество материала.

Однако, как хорошо известно, такие соединения, как изомеры, при анализе с помощью ГХ-МС могут быть неправильно идентифицированы; этот недостаток часто наблюдается при анализе эфирных масел. Широко известно, что состав эфирных масел в основном представлен терпенами, которые дают весьма схожие масс-спектры; следовательно, благоприятного коэффициента совпадения недостаточно для идентификации, и назначение пиков становится трудной и даже невыполнимой задачей.

С другой стороны, при условии, что данные, содержащиеся в библиотеках масс-спектров, были записаны с использованием подлинных образцов, можно заметить, что масс-спектр отдельно взятого терпена обычно достаточен для обеспечения его идентификации в сочетании с индексом удерживания, полученным при метилсиликоновых стационарных фазах.

### **Материалы и методы**

Объектом исследования была трава *Lippia Javanica*. Для определения оптимальных результатов были проведены фармакогностический анализ, макроскопический анализ, микроскопический анализ, количественный анализ эфирного масла и его качественный анализ. Определение содержания эфирного масла проводили методом паровой дистилляции травы *Verbena Officinalis* и травы *Lippia Javanica* с последующим измерением объема. Массовую долю выражали в процентах отношения массы к объему в расчете на абсолютно сухое сырье или препарат. Для проведения опыта использовали Метод 2 Фармакопеи РФ .1.5.3.0010.15 «Определение содержания эфирного масла в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах». Используемый материал: дистиллированная вода, 10% раствор гидроксида натрия, глицерин, оборудование для измерения содержания эфирных масел, аналитические весы, микроскопия, чашки Петри. На аналитических весах взвешивалось 50 граммов измельченной травы *Verbena Officinalis* и *Lippia Javanica*, соответственно.

Образец помещался в круглодонную колбу, куда добавлялось 500 мл дистиллированной воды. Процесс паровой дистилляции эфирного масла занял два часа.

Все данные были получены с использованием следующего оборудования:

- ПФ-автосамплер TriPlus 500 (Thermo Scientific)
- Газовый хроматограф TRACE 1300 (Thermo Scientific)
- MS-обнаружение с помощью ISQ 7000 (Thermo Scientific)
- Рабочая станция ПК с Chromeleon CDS ver. 7.2.10
- Библиотека MS NIST 16

Сепарацию проводили на капиллярной колонке TraceGold 5 30 м x 0,32 мм x 0,25 мм (Thermo Scientific) в программируемом температурном режиме.

Параметры парофазного метода:

Температура инкубатора (С <sup>0</sup> )	110
Время инкубации (мин)	45
Режим смешивания в пробирках	Быстрый
Режим герметизации пробирок	Под давлением
Давление в пробирке (КПа) (доп. газ – азот)	130
Время балансировки давления (мин)	1
Объем контура (мл)	1
Температура контура/интерфейса (С <sup>0</sup> )	120
Нагрузочное давление в контуре (кПа)	74,2
Время балансировки контура (мин)	1
Режим впрыска	Стандартный
Время впрыска (мин)	1

Параметры ГХ:

Узел впрыска образца	Пневматический контур разъемный/неразъемный
Температура узла впрыска образца (С <sup>0</sup> )	200
Коэффициент разделения	25:1
Газ-носитель	Гелий
Поток газа-носителя (мл/мин)	1,5 (режим постоянного потока)

Капиллярная колонка	Капиллярная колонка TraceGold 5 30 м x 0,32 мм x 0,25 мм (Thermo Scientific)
Температура колонки	Программируемый температурный режим: начиная с 90 <sup>0</sup> С (5 минут) до 260 <sup>0</sup> С (10 <sup>0</sup> в мин), и удержание на 10 минут
Детектор	МС

#### Параметры МС:

Система МС	Детектор МС на базе одиночного квадрупольного масс-анализатора
Интерфейс/источник ионов	Интерфейс воздействия электронов (ВЭ) 70 eV
Температура интерфейса/источника ионов (С <sup>0</sup> )	150
Температура в коллекторе (С <sup>0</sup> )	50
Квадрупольная температура (С <sup>0</sup> )	180
Соотношение сканированных масс (Da)	35 - 450

Идентификация пиков предоставлена библиотекой NIST 16 MS.

### Результаты и обсуждения

Результат фармакогностического анализа представлен микроскопическими признаками, включая устьяца, эфироваскулярные железы и короткие простые одноклеточные волоски, показанные на рис. 1-3.

В результате качественного анализа установлено наличие эфирного масла в траве *L. javanica*. Собраный объем достиг около 20 мл. Он не имел вязкой и маслянистой консистенции, скорее всего, эфирные масла *Lippia Javanica* термолабильны. Получилась водянистая жидкость с характерным сильным запахом и вкусом, рисунок 4.

Качественный анализ на другие активные вещества был проведен в течение 30 минут. Были использованы следующие реагенты: аммиак 10%, гидроксид натрия 10%, сульфат железа аммония, молибдат натрия, хлорид железа.

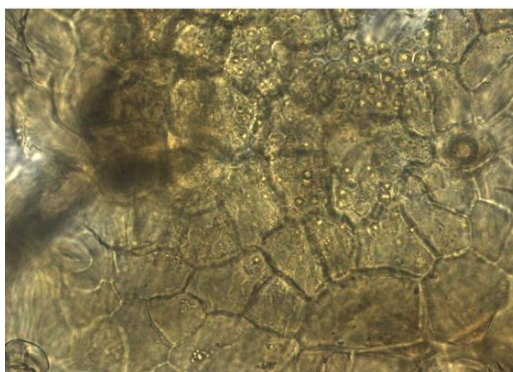


Рисунок 1. Сырьё травы *Lippia javanica* (эфирно-масляные железы) под микроскопом.

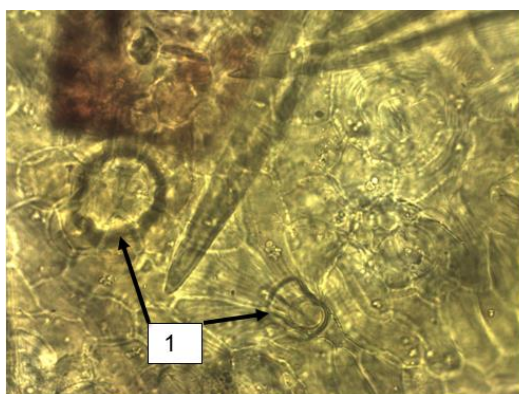


Рисунок 2. Сырьё *Lippia javanica* под микроскопом (1 - Полости эфирного масла)

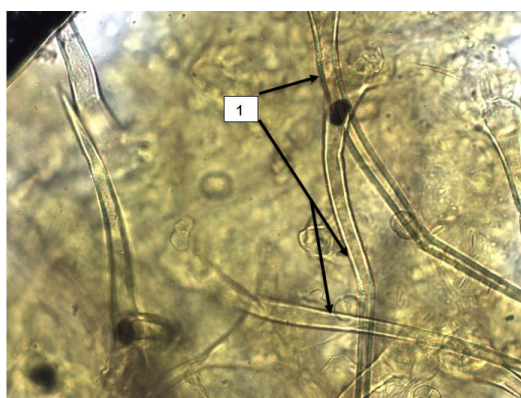


Рисунок 3. Исходный материал *Lippia javanica* под микроскопом (1- Длинные железистые простые одноклеточные волоски).





Рисунок 4. Органолептические испытания эфирных масел *Lippia Javanica*

Также был проведен качественный анализ возможных активных соединений. *L. javanica* показала наличие флавоноидов при реакции с 10%-ным аммиаком, желтую окраску и бледно-желтую окраску с 10%-ным раствором гидроксида натрия. Желтая окраска с сульфатом железа и аммония свидетельствует о наличии танинов. Темно-зеленое окрашивание хлоридом железа показало присутствие фенола и флавоноидов в обоих растениях. *Lippia Javanica* давала бледно-красную окраску с молибдатом натрия, указывающую на присутствие фенолов.

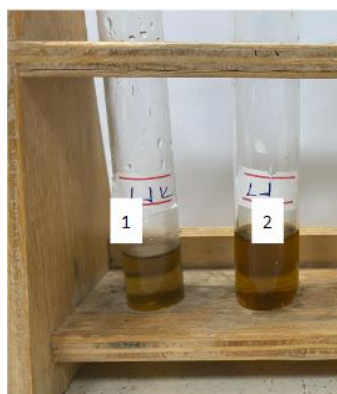


Рисунок 5. Результаты идентификации флавоноидов с 10%-ным раствором аммиака

1) контрольная *Lippia Javanica*, 2) экспериментальная *Lippia Javanica*,

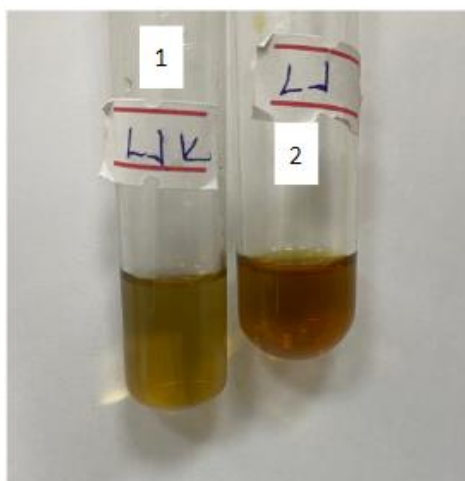


Рисунок 6. Результаты идентификации флавоноидов с 10% раствором гидроксида натрия.

1) контрольная *Lippia Javanica*, 2) экспериментальная *Lippia Javanica*,

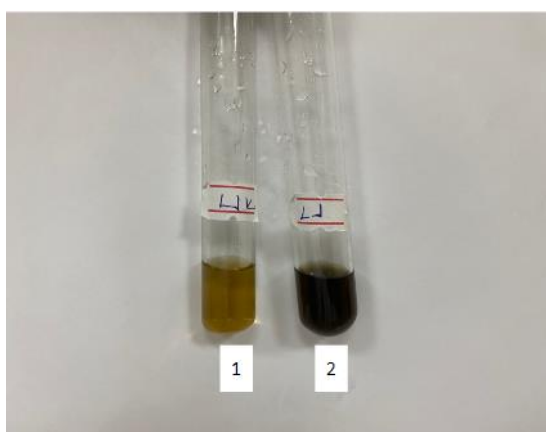


Рисунок 7. Идентификация танина с помощью сульфата железа и аммония  $\text{NH}_4 \text{Fe}(\text{SO}_4)_2$

1) контрольная *Lippia Javanica*, 2) экспериментальная *Lippia Javanica*,

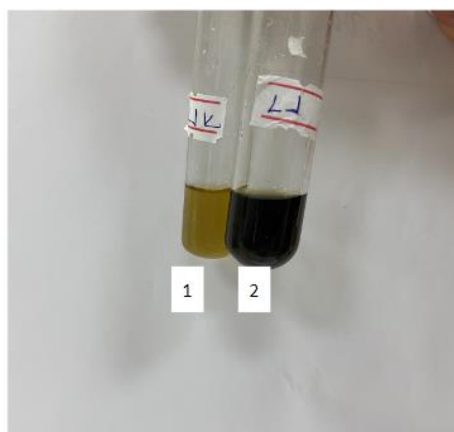


Рисунок 8. Идентификация фенола хлоридом железа  $FeCl_3$   
1) контрольная *Lippia javanica*, 2) экспериментальная *Lippia javanica*,

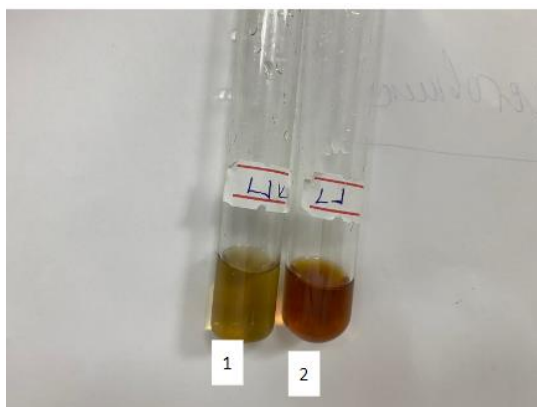
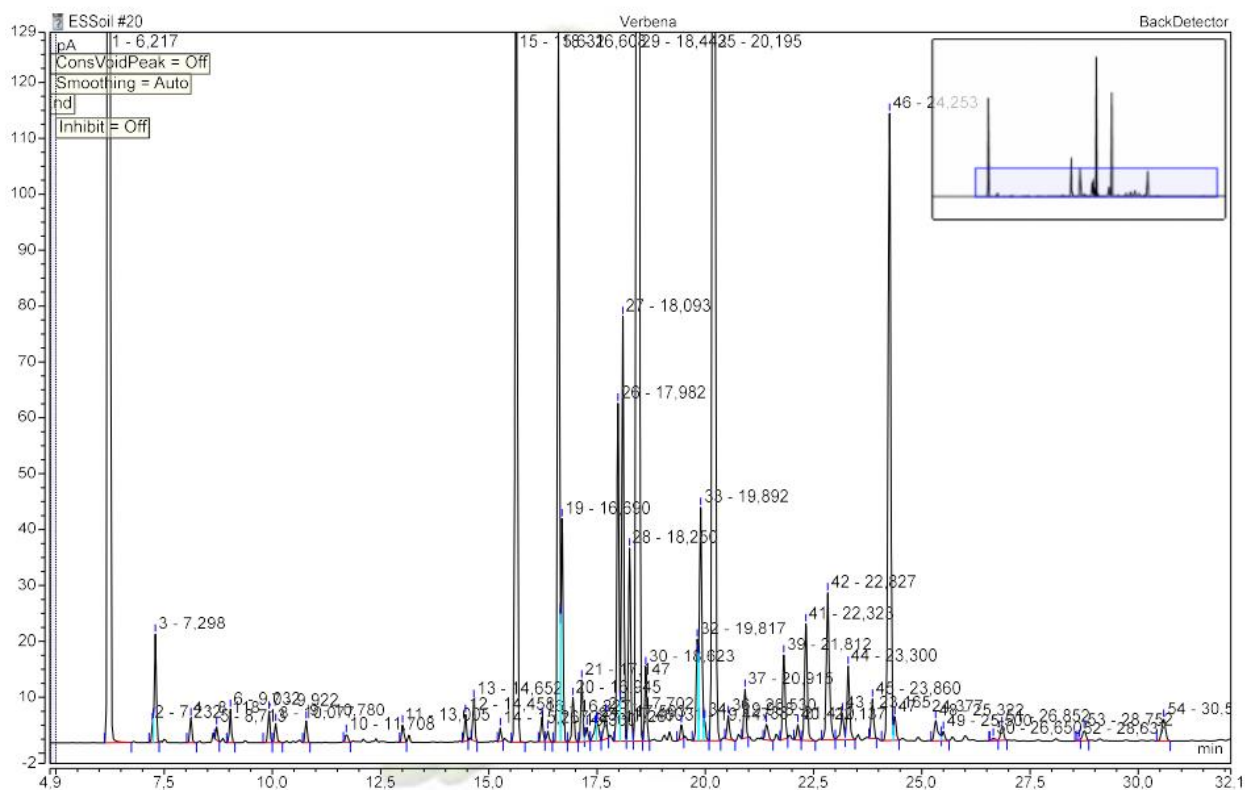


Рисунок 9. Идентификация фенола с молибдатом натрия –  $Na_2MoO_4$   
1) контрольная *Lippia javanica*, 2) экспериментальная *Lippia javanica*,

Сырое эфирное масло из *Lippia javanica* экстрагировали с помощью паровой дистилляции. Сырое масло было помещено в 20-миллилитровую пробирку и закупорено. Суммарная ионная хроматограмма (СИХ), полученная в указанных выше условиях, представлена на рис. 1.



## Рисунок 1. СИХ эфирного масла *Lippia Javanica*

На хроматограмме зарегистрированы сигналы 54 компонентов. Часть пиков, особенно в конце хроматограммы, идентифицированы как компоненты стационарной жидкой фазы. Большинство незначительных компонентов идентифицировано как эфиры спиртов C4-C10 и кислот C2-C5, а также бензойная кислота. Несколько незначительных пиков идентифицированы как простые терпены, такие как гераниол, пинен и цинеол. Основные компоненты были идентифицированы как бензойная кислота (пик при 7,298), фенилметилбензоат (пик при 15,671), этиллинолаол (пик при 16,581) и его цис-изомер (пик при 16,690), мехинол (пик при 18,093), пиперонал (пик при 18,442), изоцитронеол и коримболон (пики 22,827 и 23,300 соответственно). Результаты поиска в библиотеке МС показаны на рис. 2.

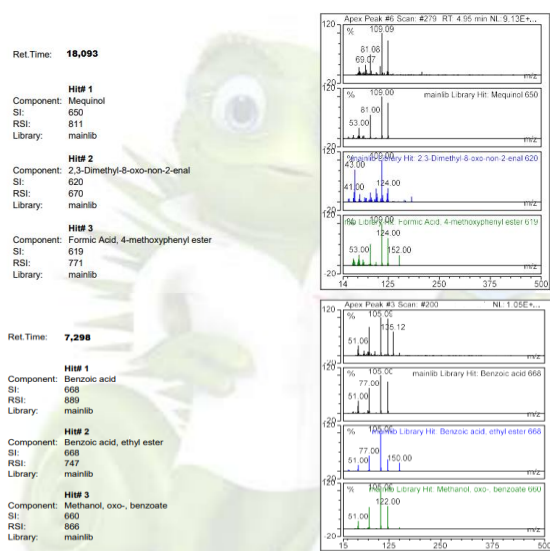


Рисунок 2. Результаты поиска в библиотеке для бензойной кислоты, этиллинолаола и мехинола

## Выводы.

Проведена химическая классификация эфирных масел. Описаны особенности химического строения, и физико-химические свойства эфирных масел.

В литературе отмечалось, что *Lippia Javanica* использовалась в качестве добавки к другим лекарствам для борьбы с коронавирусом (COVID-19) в южноафриканском регионе.

В данном научном исследовании представлен метод определения содержания эфирного масла, описана его количественная оценка и оценка качества сырья. Исследование идеально подходит для применения на практике и поможет в ближайшем будущем расширить сферу медицины и фармацевтики за счет внедрения таких эфирных масел, добываемых наиболее дешевыми и эффективными способами.

В исследовании учитываются внешние особенности, географическое распространение и места обитания *Lippia Javanica*, содержащие эфирные масла. Идея состоит в том, чтобы импортировать лекарственное растение из стран Южной Африки по более низкой цене и производить больше лекарств здесь, в Российской Федерации, или построить фармацевтическую производственную компанию в Зимбабве для производства высококачественных и безопасных

эфирных масел для местного населения. Обнаружено, что *L. javanica* содержит эфирные масла более высокого качества, что дает положительный результат разработки концепции производства лекарственных и косметических эфирных масел более высокого качества и безопасности для населения.

Обзор литературы и практическая часть показали, что в *L. javanica* есть термолабильные эфирные масла, однако им недостает вязкости и маслянистой консистенции, и исследовательские работы будут проводиться с другим способом выделения термолабильных эфирных масел. Можно использовать альтернативный метод, чтобы разработка производства эфирных масел из *Lippia javanica* велась индивидуально или с помощью грантов.

Дополнительно были учтены макро- и микроскопические признаки, а также подтверждены все возможные диагностические признаки на *Lippia Javanica*. Качественный анализ показал, что *L. javanica* содержит флавоноиды, танины, а также фенолы, что проявляется бледно-красной окраской при взаимодействии с молибдатом натрия.

В связи с этим, состав эфирного масла *L. javanica* был изучен методом ПФ-ГХ-МС, который показал, что эфирное масло состоит из более чем 50 соединений терпенов, простых эфиров, альдегидов и ароматических кислот.

Таким образом, *Lippia Javanica* может быть введена в медицинскую практику в качестве источника эфирных масел и других фитохимических веществ по причине ее лечебной ценности. Необходимо провести исследование с последующим получением патента или продажей крупным фармацевтическим компаниям, чтобы они могли производить больше эфирных масел и других лекарств, таких как НПВП<sup>1</sup>, на основе *Lippia javanica*.

### **Дополнительные материалы**

Нет дополнительных материалов.

---

<sup>1</sup> Нестероидные противовоспалительные препараты

## **Финансирование**

Нет финансового обеспечения.

## **Благодарности**

## **Вклад авторов**

Исследование: Ньямукондива Малачи

## **Конфликт интересов**

Авторы не заявляют никаких конфликтов интересов.

## **Дополнительная информация**

## **Список использованной литературы**

1. Государственная фармакопея Российской Федерации XIV. Том 2. 2018. Электронный ресурс. URL: [http://resource.rucml.ru/feml/pharmacopia/14\\_2/HTML/index.html](http://resource.rucml.ru/feml/pharmacopia/14_2/HTML/index.html)
2. ФС Вербены лекарственной трава *herba Verbena officinalis*
3. ОФС.1.5.2.0001.15 Эфирные масла
4. ОФС.1.5.3.0010.15 Определение содержания эфирного масла в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах
5. ОФС.1.5.3.0003.15 Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов [Электронный ресурс] - Режим доступа: [pharmascopeia.ru](http://pharmascopeia.ru)
6. Бойко Н.Н. Эфирные масла. Целебные свойства растительных ароматов. Тверь: Родная страна, 2015 – 335 с.
7. Ботаническая иллюстрация Якоба Штурма из книги «Deutschlands Flora in Abbildungen», 1796.
8. Виноградов Б.А. - сайт для пользования информацией о химическом составе эфирных масел [<http://www.viness.narod.ru>]
9. Губанов И. А. и др. 1074. *Verbena officinalis* L. – Вербена лекарственная // Иллюстрированный определитель растений Средней России.

10. Жубер Л., Гаттефосс М. Бактерицидные свойства эфирных масел в ветеринарной практике // 4-й международный конгресс по ЭМ. - Тбилиси, сент. 1968 г. - т. 1. – с. 99-104.
11. Ирисова О.А. Ароматерапия. Практическое руководство. М.: МГУ, 2002 – 218 с.
12. Пономарева Е.И., Молохова Е.И., Холов А.К. ПРИМЕНЕНИЕ ЭФИРНЫХ МАСЕЛ В ФАРМАЦИИ // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 4.; URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=21156> (дата обращения: 13.04.2021).
13. Шретер А. И., Панасюк В. А. Словарь названий растений = Dictionary of Plant Names / Межд. союз биол. наук, Нац. к-т биологов России, Всерос. ин-т лек. и ароматич. растений Рос. сельскохоз. академии; Под ред. проф. В. А. Быкова. — Кенигштейн/Таунус (Германия): Кельтц Сайентифик букс, 1999. — С. 436. — 1033 с.
14. A. Samie, A. Housein, N. Lall, and J. J. M. Meyer, “Crude extracts of, and purified compounds from, *Pterocarpus angolensis*, and the essential oil of *Lippia javanica*: their in-vitro cytotoxicities and activities against selected bacteria and *Entamoeba histolytica*,” *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, vol. 103, no. 5, pp. 427–439, 2009.
15. B.-E. van Wyk and N. Gericke, *People’s Plants: A Guide to Useful Plants of Southern Africa*, Briza, Pretoria, South Africa, 2000.
16. Chagonda, L.S., Makanda, C. and Chalchat, J.C. (2000). Essential oils of wild and cultivated *Lippia javanica* (Spreng) and *L. oatesii* (Rolfe) from Zimbabwe. *J. Essent. Oil Res.* 12: 1-6
17. R. Fernandes, “Verbenaceae,” in *Flora Zambesiaca*, G. V. Pope and E. S. Martins, Eds., vol. 8, part 7, pp. 6–61, Royal Botanic Gardens, London, UK, 2005.
18. G. Fouche, G. M. Cragg, P. Pillay, N. Kolesnikova, V. J. Maharaj, and J. Senabe, “In vitro anticancer screening of South African plants,” *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 119, no. 3, pp. 455– 461, 2008.
19. N. J. Manenzhe, N. Potgieter, and T. Van Ree, “Composition and antimicrobial activities of volatile components of *Lippia javanica*,” *Phytochemistry*, vol. 65, no. 16, pp. 2333–2336, 2004.
20. W. M. Arika, Y. A. Abdirahman, M. M. Mawia et al., “Hypoglycemic effect of *Lippia javanica* in alloxan induced diabetic mice,” *Journal of Diabetes Metabolism*, vol. 6, article 624, 2015.
21. United States Department of Agriculture (USDA) (2007): Germplasm Resources Information Network — *Verbena officinalis*.
22. [Marvinjs.chemaxon.com/latest/index.html](http://Marvinjs.chemaxon.com/latest/index.html)



23. Kubica P. et al. *Verbena officinalis* (Common Vervain)—a review on the investigations of this medicinally important plant species // *Planta medica*. – 2020. – T. 86. – №. 17. – C. 1241-1257.
24. Kubica P. et al. Phenylpropanoid Glycoside and Phenolic Acid Profiles and Biological Activities of Biomass Extracts from Different Types of *Verbena officinalis* Microshoot Cultures and Soil-Grown Plant // *Antioxidants*. – 2022. – T. 11. – №. 2. – C. 409.
25. Kubica P., Szopa A., Ekiert H. Production of verbascoside and phenolic acids in biomass of *Verbena officinalis* L. (vervain) cultured under different in vitro conditions // *Natural product research*. – 2017. – T. 31. – №. 14. – C. 1663-1668
26. Speroni E. et al. Effects of differential extraction of *Verbena officinalis* on rat models of inflammation, cicatrization and gastric damage // *Planta medica*. – 2007. – T. 73. – №. 03. – C. 227-235.
27. African University Zimbabwe: <https://allafrica.com/stories/202102170328.html>
28. Anti-inflammatory and analgesic activity of the topical preparation of *Verbena officinalis* L // *Journal of ethnopharmacology*. – 2006. – T. 107. – №. 3. – C. 380-382.
29. Deepak M., Handa S. S. Anti-inflammatory activity and chemical composition of extracts of *Verbena officinalis* // *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*. – 2000. – T. 14. – №. 6. – C. 463-465.