



Эфирные масла: методы определения подлинности и выявления фальсификации с помощью газовой хромато-масс-спектрометрической системы «Маэстро-αМС»

***Колунтаев Д. А. к. б. н., научный сотрудник
отдела исследований и разработок,
ООО Интерлаб, Россия, Москва***

Ключевые слова

Эфирные масла, терпены, гидролаты, вторичные метаболиты, аромо-компоненты, статистическая обработка данных, Маэстро-αМС.

Резюме

Качество получаемых эфирных масел во многом зависит от сортовых особенностей культуры, условий возделывания растений, агротехники, особенно используемых защитно-стимулирующих комплексов, методов переработки растений, качества сырья и растворителей. Соблюдение технологии производства также обуславливает ценность масла. Поэтому для определения справедливой рыночной цены и оптимальных доз душистых веществ, проводят оценку качественных показателей эфирного масла.

Вещества, содержащиеся в тканях растений, условно делят на первичные и вторичные метаболиты, также ещё их называют химическими соединениями первичного и вторичного обмена растений. Несмотря на то, что подобные соединения имеют довольно сложную химическую структуру, в настоящее время наблюдается рост исследований и изучения их биологической роли (эфирные масла, фенолы, смолы). В частности, вторичные метаболиты обнаружены в тканях очень многих растений, и не только в наружных и внутренних секреторных структурах, но и в неспециализированных тканях стебля, листа и корня [1].

Вторичные метаболиты представлены в растениях огромным количеством индивидуальных соединений. Согласно литературным данным, к настоящему времени идентифицировано более 100'000 индивидуальных соединений. Также соединения вторичного метаболизма в отличие от первичных метаболитов имеют функциональное значение не на уровне клетки, а на уровне целого растения. Чаще всего эти вещества выполняют «экологические» функции, то есть защищают растение от различных вредителей и патогенов, участвуют в размножении растений, придавая окраску и запах цветам и плодам, обеспечивают взаимодействие растений между собой и с другими организмами в экосистеме.

Одним из важных источников вторичных метаболитов являются эфиромасличные растения [4,5,6], эфирные масла которых как раз и относят к продуктам вторичного метаболизма, поскольку их образование в клетках высших растений обусловлено отвлечением метаболитов от основного обмена [2]. Эфирные масла – это продукты природного, в основном растительного происхождения, являющиеся сложными многокомпонентными смесями летучих душистых веществ. Они относятся к различным классам органических соединений, преимущественно терпеноидам, реже ароматическим или алифатическим соединениям [7-9].

Эфирные масла наиболее часто используют в медицинской практике и такое применение имеет уже давнюю историю. Значительная часть известных лекарственных растений используется, прежде всего, как эфиромасличное сырьё [1–3]. Однако введение в официальную медицинскую практику новых фармацевтических субстанций растительного происхождения возможно только после их стандартизации, а именно, реализации комплекса исследований по выбору критериев и норм, которые характеризуют качество данных продуктов.

Каждое растение вырабатывает то эфирное масло, которое ему необходимо для выживания и размножения. Поэтому свойства эфирных масел разных растений существенно отличаются. Как пример, из хвои древесных растений извлекаются полипrenoлы, стерины, лабдановые спирты, сесквитерпеновые соединения и другие вещества эфирных масел. Специфические свойства подобных веществ позволяют найти применение эфирным маслам не только в медицине, но и в сельском хозяйстве, а также в направлении парфюмерно-косметической промышленности [1].

Также детальный анализ состава эфирных масел позволяет сделать заключение и о возможных подходах в их технологическом применении, анализ же изменений, происходящих в составе и содержании вторичных метаболитов под влиянием различных неблагоприятных факторов внешней среды, позволяет детектировать даже наглядные маркеры оценки загрязнения воздушной среды городов и промышленных зон. Именно по этой причине вещества вторичного метаболизма часто называют «стрессовыми метаболитами» [1]. Для оценки состояния лесных экосистем лучших индикаторов, чем сами лесные породы, не существует. Как пример, сосна обыкновенная, для которой оптимальным физиологическим показателем состояния древостоя в условиях техногенного загрязнения является содержание α -пинена в хвое.

Многим народам известна ароматерапия. Применение эфирных масел в этих областях обусловлено именно их неповторимым ароматом. Ароматерапия играет большую роль в оздоровлении человека, и все запахи эфирных масел способствуют регулятивной и адаптогенной способности на субклеточном, органном, тканевом, системном и организменном уровне, действуя на обменные процессы организма. Очевидно, что в таких направлениях качество эфирных масел имеет очень большое значение. Но, к сожалению, эфирные масла легко фальсифицировать. Фальсифицированные масла, возможно, будут отвечать требованиям только парфюмерной промышленности, но врач или любой человек, который собирается использовать масла для оздоровления, должен быть уверен в том, что использует именно натуральный продукт. Даже масло, на

котором написано, что оно чистое, может иметь низкое качество и, соответственно, меньшую лечебную ценность [3].

Гидролат (душистая вода, вторичный дистиллят) является ещё одним ароматерапевтическим средством для ухода за телом, которое обладает целым рядом достоинств. Для получения гидролата используется метод паровой дистилляции из различных частей эфиромасличных растений. Благодаря многократному прохождению воды через растительный материал, будущая душистая вода обогащается не только водорастворимыми экстрактами растений, но и эфирными маслами и множеством других полезных элементов.

По своим свойствам гидролаты не очень отличаются от эфирных масел, поэтому многие специалисты предлагают считать душистую воду слабым водным раствором эфирных масел - альтернативой концентрированным масляным смесям. Некоторые производители воспринимают данный совет буквально: они просто разбавляют эфирные масла подготовленной очищенной водой и продают полученную смесь как гидролат. Можно предположить, что такое средство обладает всеми свойствами эфирного масла, однако в нём отсутствуют дополнительные полезные вещества, что в значительной степени снижает его ценность и эффективность. Существуют гидролаты, которые готовятся из синтетических компонентов, круг использования которых значительно уже и ограничивается, как правило, имитацией более дорогих ароматов. Такие гидролаты классифицируются как «идентичные натуральным» и не рекомендуются специалистами для косметики и личной гигиены. При этом самой распространённой фальсификацией является изготовление гидролатов из некачественного и ненатурального сырья.

Для установления подлинности и выявления изменений, происходящих при фальсификации эфирных масел и гидролатов, используют различные аналитические приёмы, основанные на применении современных научных и методологических разработок, стандартов, учитывающих технологические, агробиологические факторы, погодные и географические условия выращивания эфиромасличных растений, длительность и условия хранения [10-14]. Всемирно признанными стандартами, регламентирующими высокое качество эфирных масел, являются [15]:

- стандарты ISO Международной организации стандартов, в которой имеется Технический комитет ТК-54 по стандартизации эфирных масел [16];
- нормативы EQA американской ассоциации эфирных масел [17];
- рекомендации по ограничению и запрещению применения некоторых эфирных масел международной ассоциации душистых веществ IFRA (International Fragrance Association), которая контролирует на основе медико-биологических испытаний допустимость использования душистых веществ и эфирных масел в парфюмерии и косметике [18];
- рекомендации RIFM (Research Institute Fragrances Materials, USA) – американского института, осуществляющего медико-биологические испытания душистых веществ и эфирных масел [119];
- нормативы Фармакопеи России или Фармакопеи Великобритании [20].

В нашей стране для оценки качества эфирных масел, предназначенных для применения в парфюмерно-косметической и пищевой промышленности, а также медицине, в 2019 году был введен ГОСТ 31791–2017 [21]. Контролируемые в представленных нормативных документах органолептические и физико-химические показатели носят вспомогательный, технологический характер, так как позволяют оценить качество эфирных масел при производстве, возможность использования в парфюмерии, но не обеспечивают полной идентификации компонентов масел, не позволяют оценить влияние отдельных компонентов на их свойства и не дают гарантии подлинности, позволяя выявлять лишь грубые фальсификации.

Одним из основных методов анализа сложных смесей терпеновых соединений (моно-, сескви-, дитерпенов) является газовая хроматография (ГХ), что обусловлено температурой кипения терпеноидов от 150 до 350°C. Применение комбинированного подхода в виде хромато-масс-спектрометрического комплекса, позволяет значительно расширить возможности исследования сложных многокомпонентных смесей эфирных масел. Так, например, авторами статьи [22], метод газовой хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией (ГХ/МС) был использован для установления фальсификации сандалового масла, маркерным компонентом которого является санталол, путем добавления синтетического материала Sandalore Verdox,

Santaliff, Vertofix Coeur, или Ebanol [23]. Авторами другой статьи [24] с помощью метода ГХ/МС был установлен компонентный состав эфирного масла лаванды (*Lavandula angustifolia* L.), который включал в себя 170 соединений, 15 из которых были использованы для построения дискриминационной модели, позволяющей выявлять фальсификацию лавандового масла дешевым лавандином (искусственный гибрид лаванды - *Lavandula Intermedia*).

Таким образом, выявление фальсификации и установление подлинности эфирных масел является важной задачей, как с нормативной точки зрения, связанной с необходимостью установления качественных показателей, которые определяют компонентный состав каждого масла, так и с экономической, что позволит избежать недобросовестной конкуренции, способствующей дестабилизации рынка. Настоящая работа посвящена подходам к идентификации и количественному определению терпеновых соединений природного эфирного масла сосны обыкновенной, а также изучению отличающихся компонентов в двух различных образцах гидролата с использованием хромато-масс-спектрометрической системы Маэстро-αМС (Интерлаб, Россия) и программного обеспечения Маэстро-Аналитик (Интерлаб, Россия) в совокупности с программным обеспечением AMDIS (NIST, США) и программными средами R и Python.

Экспериментальная часть

Материалы и методы

В качестве объектов исследования использовали образец эфирного масла сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris*), приобретённый в местной аптеке, а также образцы гидролата, полученные при разных технологических условиях в ходе оптимизации процесса их получения. Все используемые в исследовании реагенты имели классификацию как особо чистые, или *HPLC grade*. В качестве набора стандартных веществ использовали калибровочную смесь н-алканов (C10 – C40) (*Supelco, США*), чистота каждого индивидуального вещества не менее 99%.

Для анализа состава чистого эфирного масла в хроматографической вials смешивали 10 мкл исследуемого образца с 1990 мкл гексана. Вialу плотно закрывали, после чего смесь встряхивали на шейкере вортекс в течение 10–15 сек, после чего смесь перемешивали с помощью орбитального шейкера со скоростью 220 оборотов в минуту (rpm) в течение 20 мин. По завершению встряхивания смесь центрифугировали со скоростью 3500 об/мин в течение 5 минут. 1,0 мкл супернатанта вводили в хромато-масс-спектрометрическую систему «Маэстро-αМС» с помощью автоматического дозатора. Параметры работы хроматографической системы и режимы работы масс-детектора представлены в таблице 1.

Табл. 1. Режимы хроматографического разделения

Параметры	Режимы
Хроматографическая колонка	HP-INNOWAX (30 м, 0.32 мм I.D.; 0,5 мкм)
Испаритель	Split/Splitless
Объём инжестируемой пробы	1 мкл
Режим работы испарителя	Splitless (без деления пробы) время работы режима 1.2 мин, далее 50 мл/мин
Температура испарителя	210°C
Градиент температуры печи	40°C/мин – 3,45 мин; 2.2°C/мин до 90°C – 5,2 мин; 2.2°C/мин до 115°C – 13,5 мин; 1.5°C/мин до 140°C – 10,75 мин; 2.2°C/мин до 210°C – 6,8 мин
Тип и скорость газ-носителя	(гелий) 1.3 мл/мин
Температура интерфейса МС	210°C
Температура источника	230°C
Режима работы масс-спектрометрической системы	SCAN, 50 – 300 Да

<i>и диапазон сканирования</i>	
<i>Время задержки на выход растворителя</i>	5.0 мин

Как уже было отмечено ранее, гидролат является слабым водным раствором эфирных масел (около 0,01%), следовательно, для достижения оптимального сигнала в режиме полного сканирования ионов для анализа использовали 8 мл образца гидролата, из которого экстрагировали органические компоненты с помощью 1 мл гексана. Полученную смесь встряхивали на шейкере в течение 30 сек (вортекс), после чего перемешивали с помощью орбитального шейкера со скоростью 220 оборотов в минуту (rpm) в течение 20 мин. По завершению встряхивания смесь центрифугировали со скоростью 3500 об/мин в течение 5 минут. Отбирали 300 мкл супернатанта (гексана) и переносили в коническую вставку виалы, после чего 1 мкл пробы вводили в хромато-масс-спектрометрическую систему «Маэстро-αМС».

Для выполнения анализа использовали высокополярную капиллярную колонку HP-Innowax (Agilent, США), длиной 30 м с внутренним диаметром 0.32 мм, толщиной пленки неподвижной фазы 5%-дифенил-95%-диметилсилоксана (0.5 мкм).

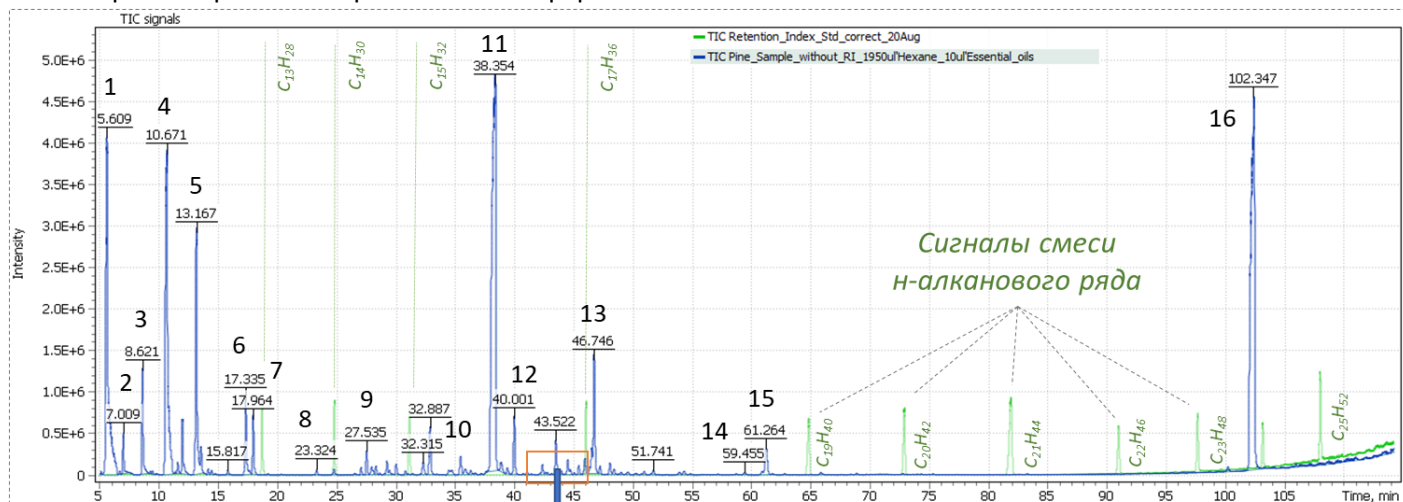
Сигналы масс-детектора записывали в режиме регистрации полного ионного тока (SCAN) в массовом диапазоне от 50 до 300 Дальтон. Идентификацию компонентного состава пробы образца осуществляли по масс-спектрам с использованием библиотеки спектров NIST20 (NIST, США). Для дополнительного контроля идентификации соединений использовали принцип расчёта согласно системе линейных индексов удерживания Ковача. В целом идея систематики индексов Ковача выражается в том, что любому анализируемому соединению ставится в соответствие гипотетический нормальный углеводород, обладающий аналогичными хроматографическими свойствами и содержащий некоторое промежуточное число атомов углерода. Линейные индексы удерживания являются расширением метода Ковача применительно к газовой хроматографии с *программируемой температурой*, где удерживание растворенного вещества зависит не только от жидкой фазы, но и от других рабочих параметров хроматографа. Основанный на аппроксимации, что в программируемых температурных условиях действительное время удерживания членов гомологического ряда увеличивается линейно с увеличением числа атомов углерода, линейный индекс удерживания является безразмерным числом, показывающим (на линейной шкале) удерживание соединений относительно ряда используемой смеси n-алканов.

Метод линейных индексов является весьма информативным и удобным для представления данных по относительному удерживанию органических соединений различных классов на различных газохроматографических системах и в настоящее время широко используется в качественном анализе сложных смесей, в частности, таких как идентификация компонентов нефти, легколетучих и среднелетучих соединений в биогенных образцах, а также в анализе компонентов эфирного масла. На рисунке 1 представлена возможность разделения и определения двух стереоизомеров вербенола (2-пинен-4-ол), который представляет собой группу стереоизомерных бициклических соединений монотерпенспиртов (цис- и транс-изомеры). Для цис-изомера две метильные группы (-CH₃) находятся на той же стороне углеродного кольца, что и гидроксильная группа (-OH), а для транс- изомера они находятся на противоположных сторонах.

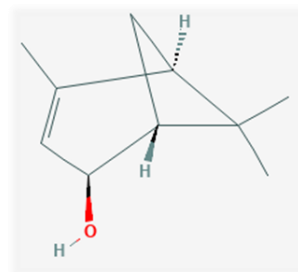
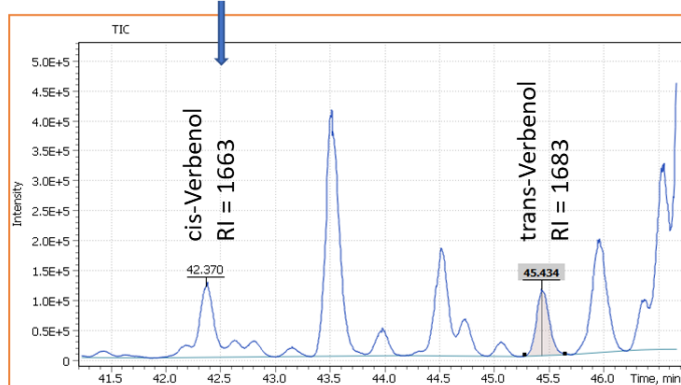
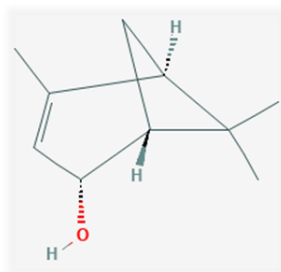
Калибровку линейных индексов удерживания по смеси n-алканов и их расчёт для идентифицированных компонентов проводили в программе AMDIS (NIST, США). Расчет относительного содержания компонентов образца гидролата проводили методом внутренней нормализации, с использованием программного обеспечения Маэстро-Аналитик (Интерлаб, Россия).

Хроматограмма, полученная в условиях программируемого повышения температуры в режиме SCAN и содержащая пики основных терпеновых соединений чистого эфирного масла сосны обыкновенной, представлена на рисунке 1.

Рис. 1. Хроматограмма экстракта чистого эфирного масла сосны обыкновенной



1 – α -Pinene; 2 – Camphene; 3 – β -Pinene; 4 – 3-Carene; 5 – D-Limonene; 6 – p-Cymene; 7 – Terpinolene; 8 – α -Pinene epoxide; 9 – p-Cymenene; 10 – Camphor; 11 – Bornyl acetate; 12 – Terpinen-4-ol; 13 – α -Terpineol; 14 – trans-Carveol; 15 – p-Cymen-8-ol; 16 – Diethyl phthalate.



Результаты и обсуждение

Анализ чистого эфирного масла

Результаты анализа состава компонентов чистого эфирного масла сосны обыкновенной и их идентификация с распознаванием по библиотеке масс-спектров NIST представлены в таблице 2. Пик считался идентифицированным, если степень подобия масс-спектра компонента библиотечному масс-спектру соединения выше 75%, а также совпадение по линейному индексу удерживания не превышало 35 единиц (+/-). В результате исследования образца чистого эфирного масла нами было обнаружено 58 соединений.

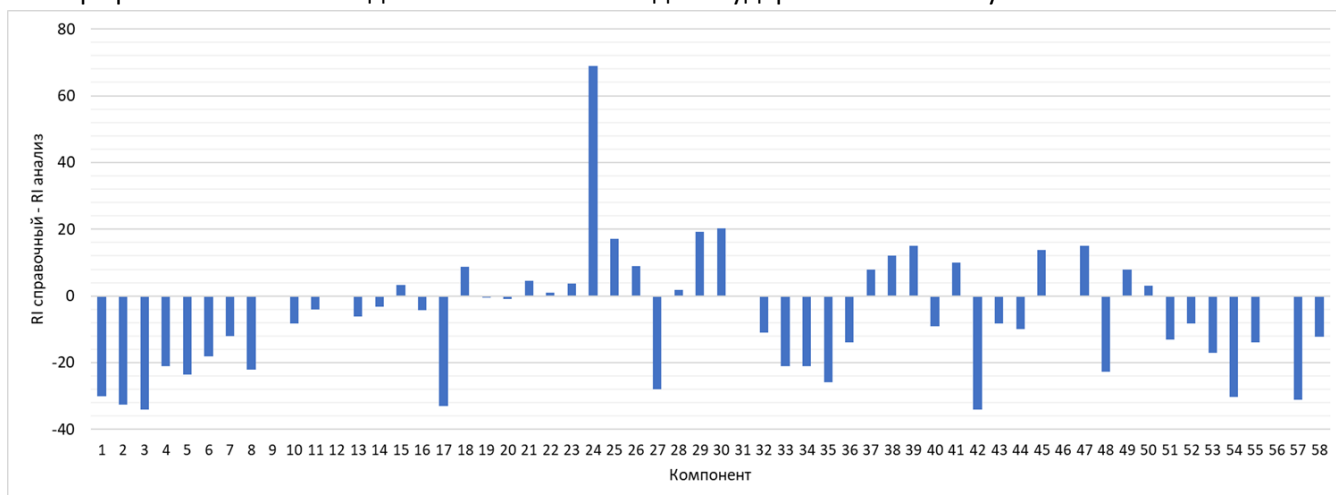
Табл. 2. Результаты анализа состава компонентов чистого эфирного масла сосны обыкновенной.

#	Время, мин	Соединение	Формула	Рейтинг	RI справочн	RI образец	Δ RI (справ-образец)
1	5.6	α -Pinene	$C_{10}H_{16}$	861	1052	1082.1	-30.1
2	7.01	Camphene	$C_{10}H_{16}$	932	1074	1106.6	-32.6
3	8.62	β -Pinene	$C_{10}H_{16}$	916	1099	1133	-34
4	9.32	4(10)-Thujene	$C_{10}H_{16}$	873	1124	1145	-21
5	9.47	2,4(10)-Thujadiene	$C_{10}H_{14}$	907	1124	1147.6	-23.6
6	10.67	3-Carene	$C_{10}H_{16}$	846	1147	1165	-18
7	11.39	α -Phellandrene	$C_{10}H_{16}$	895	1167	1179	-12
8	11.61	β -Myrcene	$C_{10}H_{16}$	930	1161	1183	-22
9	11.99	1,3,5-Cycloheptatriene, 3,7,7-trimethyl-	$C_{10}H_{14}$	920	N/A	1188.9	N/A
10	13.17	L-Limonene	$C_{10}H_{16}$	927	1199	1207.2	-8.2
11	13.58	β -Phellandrene	$C_{10}H_{16}$	914	1211	1215.1	-4.1
12	14.79	Benzene, isobutyl-	$C_{10}H_{14}$	873	1238	1238	0
13	15.82	γ -Terpinene	$C_{10}H_{16}$	927	1246	1252.1	-6.1
14	17.34	p-Cymene	$C_{10}H_{14}$	951	1272	1275.2	-3.2
15	17.67	Isoterpinolene	$C_{10}H_{16}$	924	1286	1282.7	3.3

16	17.95	Terpinolene	C ₁₀ H ₁₆	921	1283	1287.3	-4.3
17	19.23	o-Cymene	C ₁₀ H ₁₄	907	1275	1307.9	-32.9
18	23.33	α-Pinene epoxide	C ₁₀ H ₁₆ O	919	1384	1375.3	8.7
19	24.79	Fenchone	C ₁₀ H ₁₆ O	846	1399	1399.5	-0.5
20	26.69	Perillen	C ₁₀ H ₁₄ O	772	1429	1429.9	-0.9
21	27.07	Benzene, 1-methyl-3-(1-methylethenyl)-	C ₁₀ H ₁₂	936	1440	1435.4	4.6
22	27.54	p-Cymenene	C ₁₀ H ₁₂	949	1444	1443	1
23	27.96	cis-Limonene oxide	C ₁₀ H ₁₆ O	827	1452	1448.3	3.7
24	28.35	α-Longipinene	C ₁₅ H ₂₄	925	1525	1456	69
25	29.48	Ylangene	C ₁₅ H ₂₄	900	1491	1473.8	17.2
26	30.05	Copaene	C ₁₅ H ₂₄	919	1492	1483	9
27	30.82	Fenchyl acetate	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	916	1466	1494	-28
28	32.34	Camphor	C ₁₀ H ₁₆ O	863	1518	1516.2	1.8
29	35.47	Longifolene	C ₁₅ H ₂₄	935	1577	1557.8	19.2
30	36.33	trans-beta-Copaene	C ₁₅ H ₂₄	900	1589	1568.8	20.2
31	37.60	β-Copaene	C ₁₅ H ₂₄	843	1586	1586	0
32	37.99	Bornyl acetate	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	928	1580	1591	-11
33	38.90	Fenchol	C ₁₀ H ₁₈ O	880	1582	1603	-21
34	39.41	Anisole, 2-isopropyl-5-methyl-	C ₁₁ H ₁₆ O	880	1590	1611	-21
35	40.00	Terpinen-4-ol	C ₁₀ H ₁₈ O	928	1593	1618.8	-25.8
36	41.09	Myrtenal	C ₁₀ H ₁₄ O	897	1633	1647	-14
37	42.16	trans-p-Mentha-2,8-dienol'	C ₁₀ H ₁₆ O	824	1647	1639	8
38	42.38	cis-Verbenol'	C ₁₀ H ₁₆ O	804	1663	1651	12
39	43.98	Crypton	C ₉ H ₁₄ O	903	1687	1672	15
40	44.52	Estragole'	C ₁₀ H ₁₂ O	885	1670	1679	-9
41	44.75	γ-Murolene	C ₁₅ H ₂₄	823	1692	1682	10
42	45.07	cis-p-Mentha-2,8-dien-1-ol	C ₁₀ H ₁₆ O	835	1652	1686	-34
43	45.43	trans-Verbenol	C ₁₀ H ₁₆ O	932	1683	1691.3	-8.3
44	46.74	α-Terpineol	C ₁₀ H ₁₈ O	859	1697	1707	-10
45	47.24	α-Murolene	C ₁₅ H ₂₄	938	1726	1712.3	13.7
46	48.09	2-Caren-4-ol	C ₁₀ H ₁₆ O	904	NA	1720.8	N/A
47	48.44	Carvone	C ₁₀ H ₁₄ O	772	1740	1725	15
48	49.03	α-Phellandren-8-ol	C ₁₀ H ₁₆ O	888	1778	1709	-22.0
49	54.35	Myrtenol	C ₁₀ H ₁₆ O	917	1796	1788	8
50	59.41	trans-Carveol	C ₁₀ H ₁₆ O	923	1845	1842	3
51	60.84	m-Cymen-8-ol	C ₁₀ H ₁₄ O	902	1845	1858	-13
52	61.27	p-Cymen-8-ol	C ₁₀ H ₁₄ O	941	1852	1860.2	-8.2
53	62.82	cis-Carveol	C ₁₀ H ₁₆ O	730	1861	1878	-17
54	65.90	(-)-Car-3-en-2-one	C ₁₀ H ₁₄ O	944	1881	1911.2	-30.2
55	75.37	Methyleugenol	C ₁₁ H ₁₄ O ₂	863	2013	2027	-14
56	92.88	p-Cymen-2-ol	C ₁₀ H ₁₄ O	901	2236	NA	N/A
57	100.24	1-Ethyl 2-methyl phthalate	C ₁₁ H ₁₂ O ₄	873	2315	2346	-31
58	102.52	Diethyl phthalate	C ₁₂ H ₁₄ O ₄	879	2366	2378.2	-12.2

В последней колонке таблицы 2 была рассчитана разница между ожидаемым справочным значением линейного индекса удерживания (RI справочн) и полученным (RI образец). Можно отметить, что некоторые компоненты показали довольно точное измерение индекса удерживания (2 – 3 единицы), а ряд соединений показали отклонения в данном исследовании в среднем до 30 единиц. Однако в межлабораторной практике точность и воспроизводимость индексов удерживания встречается довольно редко, обычно воспроизводимость индексов гораздо ниже ожидаемой, что и было получено в настоящей работе (рис. 2). По мнению автора работы [25], такой результат может быть объясним различиями во внутреннем диаметре используемых капиллярных колонок и соответствующими различиями в толщине используемых пленок неподвижной жидкой фазы колонок, что и приводит к разной адсорбции растворенных веществ на границах раздела фаз и, соответственно, отклонениям в полученных значениях индексов. Для некоторых соединений индексы удерживания рассчитать было невозможно в связи с отсутствием справочных значений для полярной колонки в библиотеке масс-спектров NIST20.

Рис. 2. График отклонения ожидаемого линейного индекса удерживания от полученного.

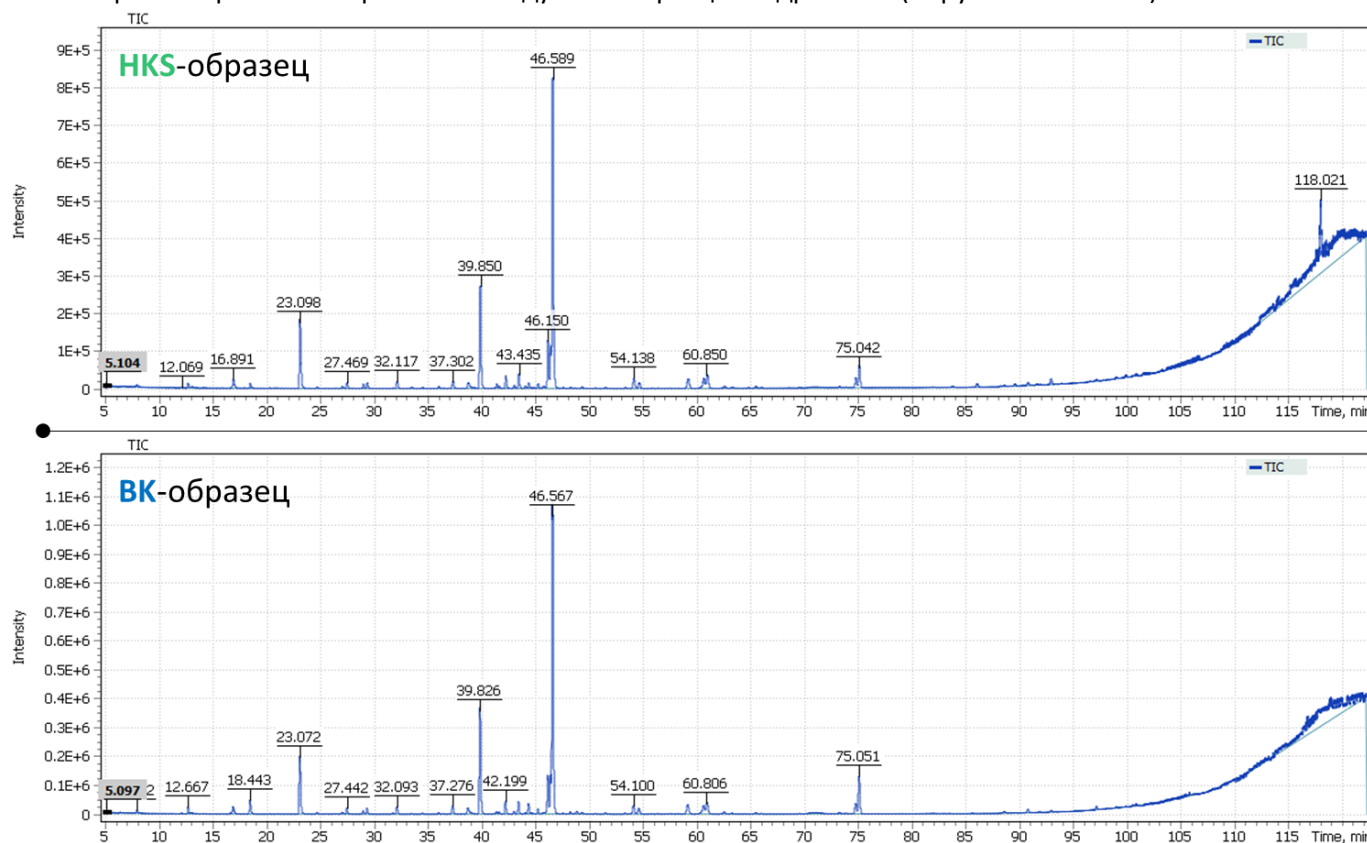


Работа с чистым эфирным маслом позволила разработать и утвердить методические подходы в работе с экстрактами эфирных масел. Одностадийный метод жидко-жидкостной экстракции пробы позволил исключить возможные технические ошибки и потерю образца. Использование линейных индексов удерживания позволили использовать дополнительное количественное измерение корректности интерпретации масс-спектров, а также выявить погрешности получаемых значений на конкретном типе полярной хроматографической колонки.

Анализ гидролатов

Апробированный метод экстракции и анализа полученных данных состава чистого эфирного масла был использован в анализе гидролата хвойного дерева (условные обозначения групп в контексте: **HKC-образец** и **BK-образец**). На рисунке 3 представлены хроматограммы экстрактов, полученных для лабораторных сличительных испытаний. Целью данного исследования являлся поиск различий в биологических маркерах, которые в дальнейшем могли бы быть использованы, как целевые маркеры для их сопоставления и оценки сходимости образцов.

Рис. 3. Хроматограммы экстрактов исследуемых образцов гидролатов (2 группы - HKC и BK)



Как видно из рисунка, профили двух образцов довольно сильно похожи. В составе гидролата типа ВК было идентифицировано 48 компонентов. Основными компонентами являются альфа-терпинол (40,0%), терпинен-4-ол (12,9%), 1-гексано́л (7,1%), метилэвгенол (5,6%), вербенон (4,7%), п(м)-цимен-8-ол (4,3%), карвеол (2%). В составе гидролата типа НКС было идентифицировано 54 компонента. Но основные компоненты гидролата образца НКС также имеют схожие мажорные соединения с образцом ВК: альфа-терпинол (41,0%), терпинен-4-ол (12,2%), 1-гексано́л (8,2%), левовербенон (5,4%), вербенон (3,2%), п(м)-цимен-8-ол (4,5%), карвеол (2%). То есть в обоих образцах гидролатов за счёт высокого содержания альфа-терпинола (40,0%) и терпин-4-ол (12,5%) преобладают кислородные производные монотерпенов - монотерпеноиды. Очевидно, что без глубокого и детального анализа сложно выделить какие-то очевидные отличия между двумя образцами.

Для решения подобного рода задач наиболее часто прибегают к различным методам статистического сличения экспериментов, которые и позволяют выделить возможные (неочевидные) закономерности с рассчитанной статистической значимости.

В статистике подобный метод часто называется, как А/В-тестирование (сплит-тестирование или проверка статистических гипотез), где один из испытуемых объектов именуется контрольным объектом, и он сравнивается с тестируемым объектом по набору признаков, которые в свою очередь выражаются какой-либо количественной метрикой. В результате подобный подход трансформируется в математический алгоритм, помогающий понять, можно ли различия в метрике между сравниваемыми объектами (группами) связать с изменениями именно метрики какого-либо объекта, а не со случайностью. Другими словами, является ли изменение метрики одного объекта статистически значимым или нет.

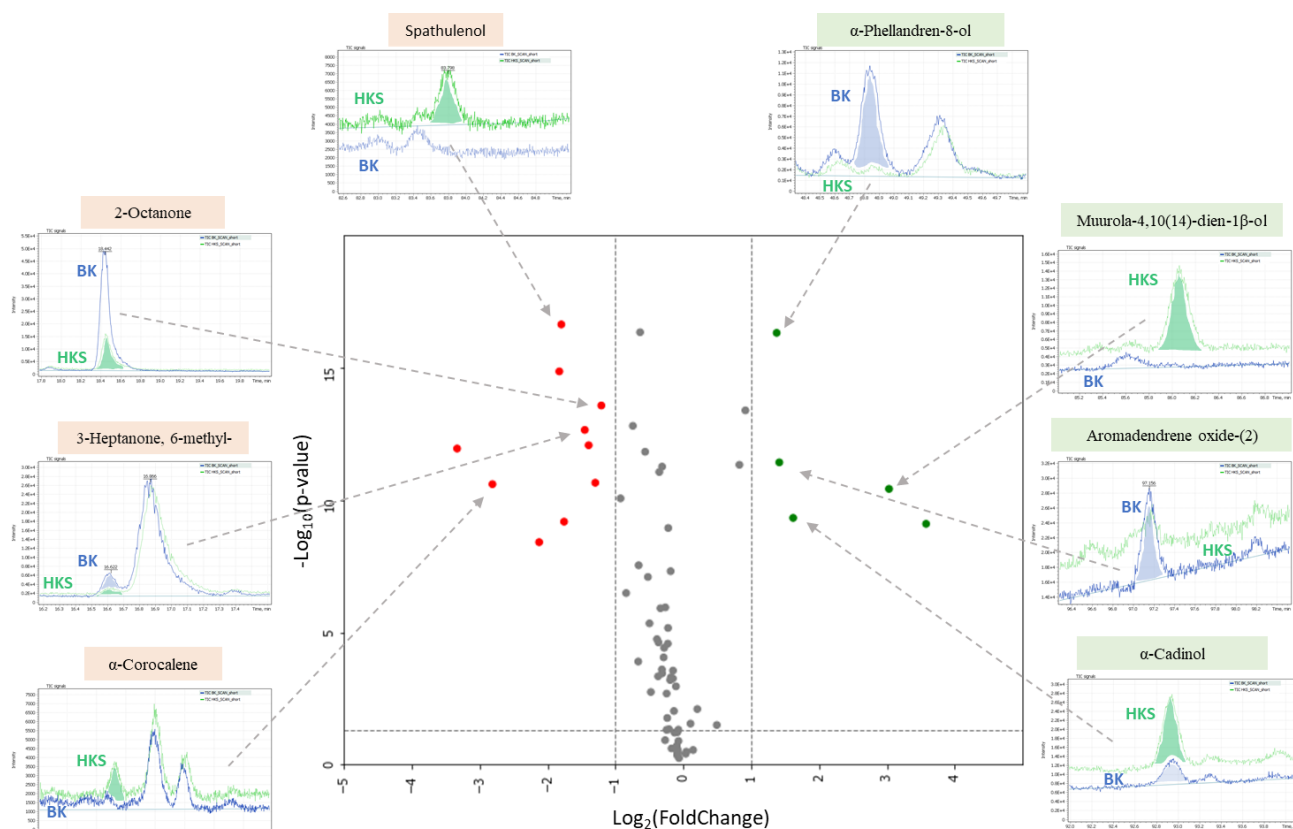
В результатах хромато-масс-спектрометрическом эксперименте объектом подобного тестирования может выступать испытуемый образец, а набор интегрированных пиков в образце, является его признаками. В качестве метрики существует возможность использования интегралов сигналов детектированных соединений, но в таком случае появляется вероятность влияния посторонних факторов на точность анализа (как пример, точность дозирования пробы, работы модуля контроля потоков хроматографа и прочее), вследствие чего лучшим решением является преобразование данных в значения долевого отношения сигналов к максимальному пику в хроматографическом профиле.

Простые и быстрые алгоритмы пакетной обработки данных для последующих статистических анализов, реализованы и в программном обеспечении «Маэстро-Аналитик», где, в частности, обработка полученных скан-данных профилей гидролата выполнялась алгоритмом «автоинтегрирования». Подобный алгоритм автоматически детектировал хроматографические сигналы в профиле хроматограммы выделенных ионов, группировал полученные сигналы по времени их хроматографического выхода и далее формировал уже очищенные от химического фона масс-спектры детектированных компонентов. На финальной стадии алгоритм выполнял опрос множества библиотек масс-спектров на наличие подобных спектров для их последующей интерпретации. Результаты множества найденных соединений импортировали в любое внешнее программное обеспечение, через открытый формат данных *.csv, что, безусловно, очень удобно при написании различных научных статей, публикаций, а также расчёта «сырых» данных в любой другой сторонней программе их обработки. Выравнивание времени удерживания хроматографических пиков выполняли в вычислительной среде R, разработанной специально для математического моделирования и графического представления данных. Заключительную обработку данных и построение результирующих диаграмм проводили в вычислительной среде Python.

В качестве результирующей диаграммы использовали точечную диаграмму (разновидность - volcano plot), которая позволяла бы комбинировать измерение статистической значимости (p-value) и диапазона изменений (Fold Change), позволяя при этом быстро идентифицировать визуально эти изменения посредством большого диапазона различий со статистически значимыми показателями. Стоит отметить, что volcano диаграмма популярна в «омикс»-исследованиях таких, как например, геномика, протеомика и метаболомика, где часто используются повторяемые значения и требуется быстро идентифицировать значимые различия. Полученная точечная диаграмма (volcano plot) сравнения двух образцов представлена на рисунке 4.

По оси ординат диаграммы указана статистическая значимость различия (отрицательный логарифм), по оси абсцисс - диапазон изменений. Как видно, преимущество использования подобного типа диаграммы, именно в комбинации измерений, что позволяет быстро визуально идентифицировать значимые различия между анализируемыми признаками исследуемых объектов.

Рис. 4. Точечная диаграмма (volcano plot) сравнения состава экстрактов двух образцов гидролатов.



Интерпретировать результаты подобной диаграммы достаточно просто. Красные и зелёные точки соответственно показывают большие диапазоны изменения и высокую статистическую значимость, что является надёжными маркерами отличий объектов. Пунктирная линия вдоль оси абсцисс указывает наименьшее значение уровня значимости ($p = 0.05$), точки выше этой линии соответственно имеют $p < 0,05$, точки ниже $p > 0,05$. Серые точки, даже те которые имеют $p < 0,05$, но их диапазон изменений менее чем 2 ($\log_2 = 1$), не рекомендуется считать надёжным маркером отличия.

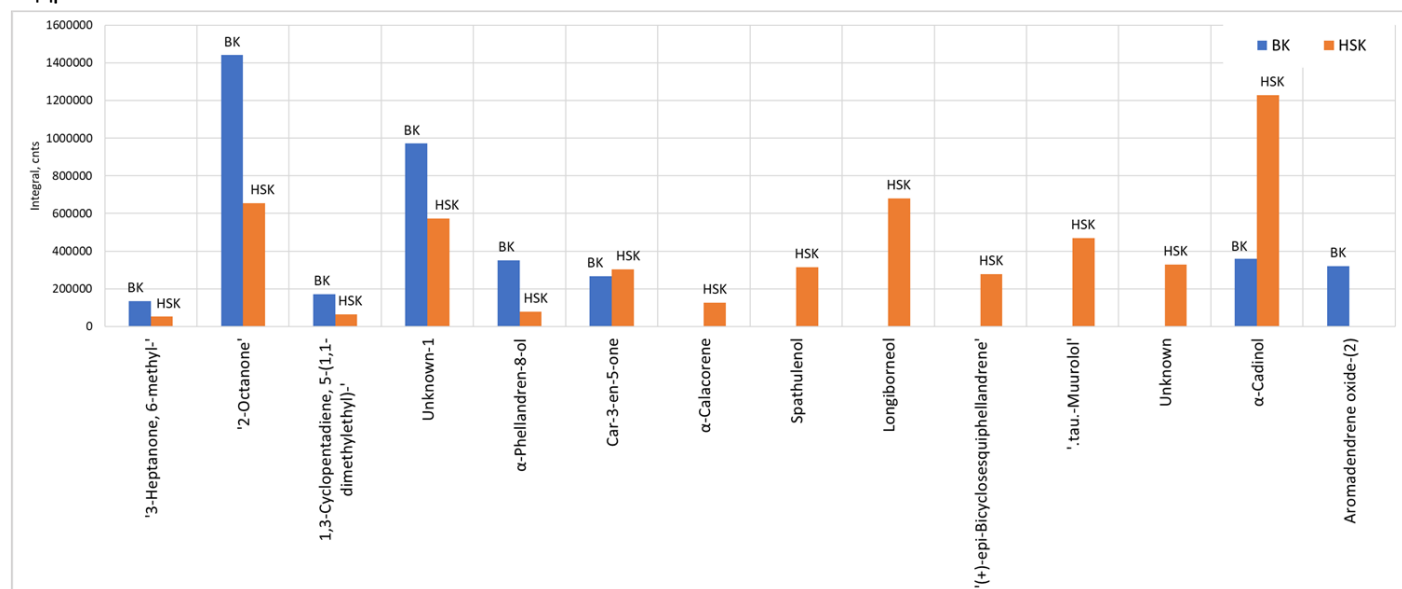
В таблице 3 представлен перечень выделенных маркеров, которые в дальнейшем могли бы быть использованы, как целевые для сопоставления и оценки сходимости объектов. На диаграмме рисунка 5 представлено распределение площадей выделенных маркеров, что демонстрирует существенные различия в их содержании в анализируемых образцах.

Табл. 3. Перечень выделенных маркеров отличия двух образцов гидролатов.

Соединение	Формула	Ср. интеграл сигнала в образце BK	Ср. интеграл сигнала в образце HKS	p-value
3-Heptanone, 6-methyl-	$C_8H_{16}O$	134785.76	51825.00	2.23E-13
2-Octanone	$C_8H_{16}O$	1440331.64	655694.62	2.65E-14
1,3-Cyclopentadiene, 5-(1,1-dimethylethyl)-	C_9H_{14}	171815.72	65634.44	8.43E-13
Unknown-1	-	970968.26	572905.96	1.12E-12
α-Phellandren-8-ol	$C_{10}H_{16}O$	351501.18	79726.64	4.76E-17
Car-3-en-5-one	$C_{10}H_{14}O$	268047.82	304163.12	1.36E-15
α-Calacorene	$C_{15}H_{20}$	-	127524	2.50E-11
Spathulenol	$C_{15}H_{24}O$	-	315011.52	2.28E-17

Longiborneol	C ₁₅ H ₂₆ O	-	679752.08	3.77E-11
(+)-epi-Bicyclosquiphellandrene	C ₁₅ H ₂₄	-	279351.04	3.90E-09
.tau.-Muurolol	C ₁₅ H ₂₆ O	-	470212.82	2.21E-11
Unknown-2	-	-	329890.04	6.54E-10
α-Cadinol	C ₁₅ H ₂₆ O	358731.54	1228785.78	4.72E-10
Aromadendrene oxide-(2)	C ₁₅ H ₂₄ O	319270.18	-	3.74E-12
Unknown-3	-	-	9125047.15	7.91E-10

Рис. 5. Графическое отображение распределения площадей выделенных маркеров в двух образцах гидролатов.



Выводы

Эфирные масла являются важнейшими продуктами многих отраслей промышленности и медицины. Однако при их практическом применении возникает ряд проблем, связанных с выявлением фальсификации и установлением подлинности. Представленные в ходе данной статьи подходы к анализу эфирных масел с помощью газовой хромато-масс-спектрометрии должны позволить определять, как состав чистых эфирных масел, включая минорные компоненты, так и проводить поиск различий в биологических маркерах, которые в дальнейшем могли бы быть использованы, как целевые для их использования в анализе сходимости образцов.

Использование линейных индексов удерживания позволяет минимизировать возможность ошибки в интерпретации масс-спектров. Особенно это важно, при комплексном анализе составляющих эфирного масла с большим количеством изомерных соединений.

Хромато-масс-спектрометрический комплекс «Маэстро-αМС» продемонстрировал надёжность и соответствие аналитическим требованиям, предъявляемым к оборудованию для решения комплексного анализа, не только чистых эфирных масел, где концентрации целевых веществ находятся на высоком уровне, но также и разбавленных объектов, как например, гидролатов, с низкими концентрациями веществ. Инструменты быстрой обработки данных, используемые в программном обеспечении «Маэстро-Аналитик», позволяют проводить надёжное детектирование множества компонентов смеси с возможностью быстрого импорта результатов исследования в любое внешнее программное обеспечение для их дальнейшей обработки.

1. Рощина В. Д., Рощина В. В. Выделительная функция высших растений. М., 1989. 214 с.
2. Лолойко А.А., Невкрытая Н.В., Петришина Н.Н., Марченко М.П. Особенности биосинтеза эфирного масла в семенном потомстве полыни эстрагон (*Artemisia dracunculus* L.).
3. Бордина Г.Е., Лопина Н.П., Некрасова Е.Г., Бууева А.И., Майорова Е.И. Определение качества эфирных масел. DOI: 10.18454/IRJ.2016.49.038., Международный научно-исследовательский журнал, Екатеринбург 2016.
4. Хейфиц Л.А., Дашунин В.М. Душистые вещества и другие продукты для парфюмерии. М.: Химия, 1994. 226 с.
5. Shaaban H.A.E., El-Ghorab A., Shibamoto T. Bioactivity of essential oils and their volatile aroma components: Review // J. Essent. Oil Res. 2012. V. 24, № 2. P. 203–212.
6. Мировое производство эфирных масел
7. Государственная фармакопея Российской Федерации. Т. 2. Общие методы анализа. Изд. XIII-е, доп. М.: Научный центр экспертизы средств медицинского применения, 2018. С. 2284.
8. И.П. Рудакова и др. Методы контроля качества эфирных масел // Фармация. 2005. № 3. С. 3–5.
9. F. Bakkali et al. Biological effects of essential oils - a review // Food Chem. Toxicol. 2008. V. 46. P. 446–475.
10. Аюпова Р.Б., Сакипова З.Б., Дильбарханов Р.Д. Эфирные масла: достижения и перспективы, современные тенденции изучения и применения // Вестник КазНМУ. 2013. Т. 5. С. 74.
11. Sarkis A., Stappten I. Essential Oils and Their Single Compounds in Cosmetics – A Critical Review // Cosmetics. 2018. V. 5, № 11. P. 1-21.
12. Tongnuanchan P., Benjakul S. Essential Oils: Extraction, Bioactivities, and Their Uses for Food Preservation // J. Food Sci. 2014. V. 79, № 7. P. R1231-R1248.
13. A.E. Asbahani et al. Essential oils: From extraction to encapsulation // International Journal of Pharmaceutics. 2015. V. 483. P. 220-243.
14. P. Rubiolo et al. Essential Oils and volatiles: sample preparation and analysis // Flavour Fraagr. J. 2010. V. 25. P. 282-290.
15. В.И. Чуешов и др. Технология лекарств промышленного производства: учеб. для студ. высш. учеб. завед.: перевод с укр.: в 2 ч. Ч.1 / Винница: Нова Книга, 2014. 696 с.
16. Стандарты по ISO/TC 54. Essential oils.
17. EOA Book of Standards and Specification. Essential Oil Association of U.S.A. 1978. 582 p.
18. Setting the standard for safe use of fragrance materials.
19. Research institute for fragrance materials.
20. British Pharmacopoeia: British Pharmacopoeia Commission Laboratory London. 2009.
21. ГОСТ 31791–2017. Эфирные масла и цветочно-травянистое эфиромасличное сырье. Технические условия. М., 2018. 19 с.
22. Howes M.-J.R., Simmonds M.S.J., Kite G.C. Evaluation of the quality of sandalwood essential oils by gas chromatography–mass spectrometry // J. Chromatogr. A. 2004. V. 1028. P. 307–312.
23. D. Sciarrone et al. Application of a multidimensional gas chromatography system with simultaneous mass spectrometric and flame ionization detection to the analysis of sandalwood oil // J. Chromatogr. A. 2011. V. 1218. P. 137–142.
24. D.J. Beale et al. Chemometric Analysis of Lavender Essential Oils Using Targeted and Untargeted GC-MS Acquired Data for the Rapid Identification and Characterization of Oil Quality // Molecules. 2017. V. 22. P. 1339.
25. Л. Сояк. Разделение и идентификация изомерных углеводородов методами капиллярной газовой хроматографии и сочетаниями ее с масс-спектрометрией и ИК-Фурье-спектроскопией. УДК 543.544 (547.31)