

Универзитет „Св. Кирил и Методиј“ – Скопје
Фармацевтски факултет – Скопје
Институт по Фармакогнозија

Проф. д-р Светлана Кулеванова
Доц. д-р Ѓоше Стефков
Асистент м-р Марија Карапанцова

ИСПИТУВАЊЕ НА ЕТЕРИЧНИ МАСЛА И АРОМАТИЧНИ СУРОВИНИ

Студиска програма – лабораториски биоинженер



Содржина

ЕТЕРИЧНИ МАСЛА И АРОМАТИЧНИ СУРОВИНИ

Вовед	3
Хемиски состав на етерични масла	3
Добивање (производство) на етерични масла	8
Фактори што влијаат на квалитетот на етеричните масла	12
Дејство и употреба на етерични масла	13
А) Испитување и анализа на ароматични суровини	14
Определување на содржина на етерично масло	14
Б) Испитување и анализа на етерични масла	15
Идентификација на етерични масла	16
Општи испитувања на етерични масла	17
Определување на физичко-хемиски константи на етерични масла	18
Определување на содржината на компонентите (хемиски состав) на маслото	20
- Гасна хроматографија на етерични масла	20
В) Работни задачи	25

ЕТЕРИЧНИ МАСЛА

Вовед

Етерични масла се сложени смеси на органски испарливи состојки. Претставуваат производи на специјални секреторни структури на тн. ароматични растенија. Соодветно, дрогите што ги содржат се означени како ароматични дроги (ароматични суровини). Се раствораат во неполарни растворувачи (етер, бензен, петролетер, етанол), имаат карактеристичен мирис и на кожата предизвикуваат црвенило. Традиционално, етеричните масла се добиваат со дестилација со водена пареа, што претставува најстар и сè уште најприменуван начин за екстракција. Добиени на овој начин претставуваат лесно подвижни течности, се карактеризираат со определени биолошки и фармаколошки активности и во најголем број случаи имаат терапевтско значење. Покрај нив, од ароматични суровини се добиваат и други ароматични производи (конкре, абсолют, помада, резиноид) што наоѓаат примена во козметичкото и во парфимерското производство, во прехранбената, алкохолната, тутунската и во другите индустрии. Во промет се наоѓаат и обработени етерични масла, од кои се издвоени некои фракции за да се добијат производи со подобрени карактеристики или со поголема ефикасност. Постојат пречистени масла, детерпенизирани масла кај кои се отстранети лесно испарливи терпенски јаглеводороди или масла ослободени од тешко испарливи сесквитерпенски соединенија.

Етеричните масла се среќаваат во голем број растенија. Содржината им варира од минимални количества (траги) до преку 20%. Се натрупуваат (локализираат) во различни органи - листови, плодови, цветови, кори, корени и др. Можат да бидат сместени во надворешни жлезди или внатрешно во жлезди, во клетки, во ходници и во канали.

Особини. – Етеричните масла се бистри, лесно подвижни, безбојни или ретко обоени (жолти, зелени, сини, црвено-кафеави) течности. Имаат својствен и најчесто пријатен мирис и ароматичен вкус, а некои во уста ладат, горчат, лутат и слично.

На собна температура (до 20°C) се во течна состојба, а на температура под 18°C, некои од маслата зацврснуваат, при што доаѓа до одвојување на цврстата состојка – стереоптен (камфор, ментол, анетол, тимол) од течниот дел – елеоптен.

Етеричните масла имаат липофилен карактер, не се раствораат во вода (неколку капки во 1L), а се раствораат во органски растворувачи и во масни масла.

Релативната густина на етеричните масла се движи од 0,8-1,07. Потешки се од масните масла. Температурата на вриење се движи од 150-300°C, а индексот на рефракција од 1,450-1,600. Свежо добиените етерични масла имаат неутрална до слабо кисела реакција. Со стоење, киселоста им се зголемува поради хидролитички промени на естерските соединенија и ослободување на киселини.

Хемиски состав на етерични масла

Етеричните масла се сложени смеси составени од различни органски соединенија и нивниот број може да биде од неколку до преку 100-тина компоненти. Досега се докажани над илјада различни соединенија што влегуваат во составот на различни етерични масла.

Најголемиот дел на маслата го сочинуваат терпенските соединенија, а покрај нив можат да се најдат и други компоненти, кои често пати на етеричните масла им ги определуваат особините, а понекогаш и нивното дејство.

Во составот на етеричните масла можат да се најдат следните класи на компоненти:

- Терпени (монотерпени и сесквитерпени),
- Ароматични соединенија (фенилпропаноиди) и
- Соединенија од различно биосинтетско потекло: разградни продукти на масни киселини, разградни продукти на терпени, соединенија што содржат азот и соединенија што содржат сулфур.

1. Монотерпени. - Монотерпените се најчести состојки на етеричните масла и во голем број случаи, тие го сочинуваат најголемиот дел од маслото. Нивна општа карактеристика е дека претставуваат мошне миризливи состојки, поради што често наоѓаат примена во парфимериското производство. Во поголеми количества се најдени во претставниците од фамилиите Pinaceae, Lamiaceae и Apiaceae (борови, усноцветни и штитоцветни растенија).

Монотерпените можат да бидат:

- ациклични,
- моноциклични и
- бициклични.

Ациклични монотерпени можат да бидат:

- јаглеводороди (мирцен, оцимен, и др.),
- алкохоли (цитронелол, линалол, гераниол, нерол и др.),
- алдехиди (цитрал што се јавува во две изомерни форми како цитрал а (гераниал) и цитрал б (нерал), цитронелал и др.).

Во групата на моноциклични монотерпени припаѓаат различни видови деривати од ментанска класа, меѓу кои најзначајни се следните:

- јаглеводороди: лимонен, терпинен и феландрен,
- алкохоли: ментол, терпинеол и карвеол,
- кетони: ментон, пиперитон, пулегон, карвон и др.,
- оксиди и пероксиди: цинеол (може да се разгледува и како етер) и аскаридол,
- феноли: тимол и карвакрол (главни состојки во етеричните масла на претставниците на родовите на тримјанот и ориганумот, усноцветни растенија (Lamiaceae) и др.

Молекулите на терпенските соединенија се оптички активни. Присуството и односот на оптичките изомери во етеричните масла во најголема мера зависи од карактеристиките на растителниот вид. Некои етерични масла содржат само еден енантиомер, а други масла друг. На пр. (+)-*S*-линалол е главен конституент на етерично масло од кориандер, а (-)-*P*-линалол е доминантна компонента во масло од лаванда.

Бициклични монотерпени се изградени од два кондензирани неароматични прстени, а во зависност од структурата на јаглеводородниот скелет можат да се поделат во неколку групи од кои најзначајни се производе на тујан, каран, пинан и камфан.

- Тујанска група: чист тујан во растенијата досега не е идентификуван. Од неговите деривати најзначајни се јаглеводородот сабинен, од кислородните деривати алкохолите

сабинол и тујол, а од кетоните тујон. Овие состојки се најчести во претставниците од фам. главоцветни растенија (Asteraceae).

- Каранска група: овие состојки се составени од еден 6-член и еден 3-член прстен. Во етерично масло на некои тропски растенија идентификувани се Δ^3 -каран и Δ^4 -каран. Присутни се во етерични масла од бор.
- Пинанска група: соединенија кај кои е присутен дополнителен 4-член прстен, во чие создавање учествува изопропилната група од ментанот. Производите на пинанот се широко распространети во природата, а во поголемо количество се присутни во терпентинското масло. Најбитни пинени се α -пинен и β -пинен, потоа миртенол, вербенол и др.
- Камфанска група: опфаќа соединенија што дополнително содржат 5-член прстен што настанува со поврзување на изопропилната група со C_1 . Во природата чист камфан не е најден. Познати се неговите деривати камфен, борнел (најзначаен), изоборнел, камфор и др.

2. Сесквитерпени. - Во зависност од структурата се делат на ациклични, моноциклични, бициклични и трициклични сесквитерпени.

- Алифатични (ациклични) сесквитерпени претставуваат долги јаглеводородни низи или кислородни деривати алкохоли, алдехиди и др. Најзначајни се јаглеводорот фарнезен и алкохолите фарнезол (мирисот на липата) и неролидол (момина солза).
- Моноциклични сесквитерпени, меѓу кои според распространувањето, најзначајни се бисаболен, α -бисаболон, зингиберен, α -кариофилен и др.
- Бициклични сесквитерпени се кондензирани неаромати. Во природата се најраспространети произведени на кадинен, селинен, азулен и др.

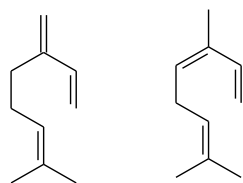
3. Ароматични соединенија. – Фенилпропаноидните компоненти (C_6-C_3) се поретко застапени како конститутивни елементи на етеричните масла. Позначајни соединенија од оваа група се: апиол, анетол, аниз алдехид, естрагол и др., застапени во претставници од *Ariaceae* и еугенол, сафрол, цимет алдехид и др. присутни во етерични масла изолирани од претставниците од *Myrtaceae* и *Lauraceae*. Во групата ароматични соединенија спаѓаат и C_6-C_1 соединенија како што се: ванилин, метил антранилат и др.

4. Други компоненти. - Со разградување на виши масни киселини се создаваат нискомолекуларни алкохоли, алдехиди и естери: хексанол, хексенал, октанал, деканал, хексенилацетат и др. Масните киселини се прекурсори на јасминска киселина и јасмин лактонот, компоненти најдени во цветовите од јасмин.

Со автооксидација на тетратерпенски соединенија (каротени) се создаваат јонони (C_{13} -*nor* изопреноиди), чести компоненти во етеричните масла изолирани од цветови и плодови на овошни растенија. Друга група соединенија се ирони, компоненти присутни во етеричното масло од перуника, што настануваат при пролонгирана оксидација на бициклични тритерпени што се случува во текот на чување на коренот (коренот од перуниката се вредува токму според содржината на овие состојки).

Соединенија со азот или со сулфур се многу поретки компоненти во етеричните масла. Тука спаѓаат некои пиридински соединенија најдени во етерично маслото од кадраво нане (спеараминт масло), изосулфоцијанатни компоненти најдени во етерично масло од синап или деривати на цистеин и метионин, најдени во маслата од лук, кромид и слични растенија.

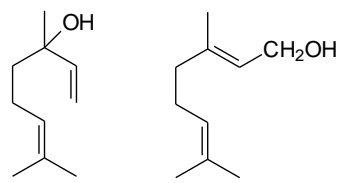
Јаглеводороди



Мирцен

Оцимен

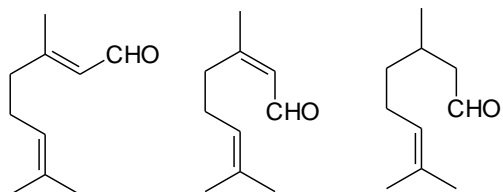
Алифатични алкохоли



Линалол

Гераниол

Алифатични алдехиди

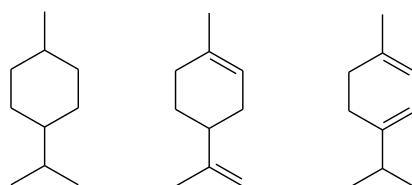


Цитрал а

Цитрал б

Цитронела

Ментански јаглеводороди

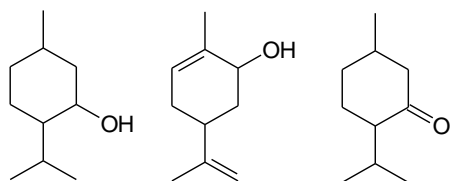


Ментан

Лимонен

α-Терпинен

Ментански алкохоли и кетони

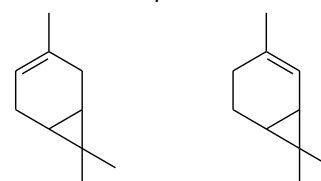


Ментол

Карвеол

Ментон

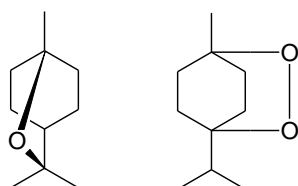
Карани



Δ³-Карен

Δ⁴-Карен

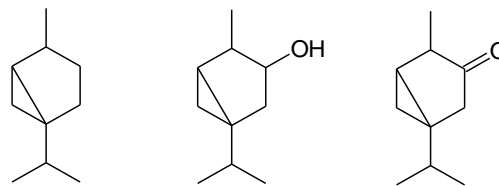
Оксиди и пероксиди



1,8-Цинеол
(Еукалиптол)

Аскаридол

Тујани

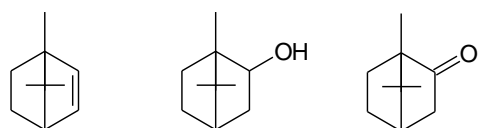


Тујан

Тујол

Тујон

Камфани

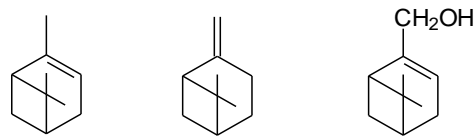


Камфен

Борнеол

Камфор

Борнани



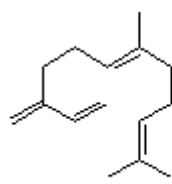
α-Пинен

β-Пинен

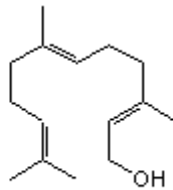
Миртенол

Најзначајни монотерпенски соединенија на етеричните масла

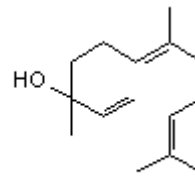
Алифатични сесквитерпени



Фарнезен b

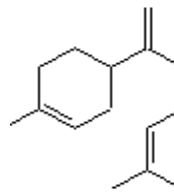


Фарнезол

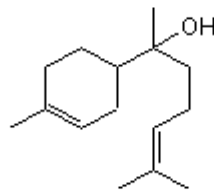


Неролидол

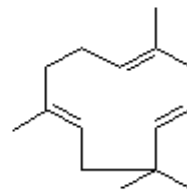
Моноциклични сесквитерпени



Бисаболен

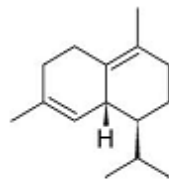


α -Бисаболол

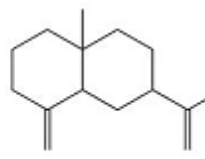


α -Кариофилен

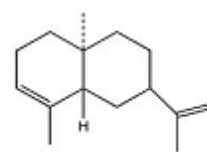
Бициклични монотерпени



α -Кадинен

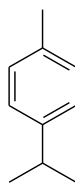


β -Селинен

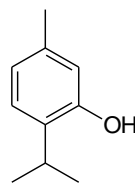


α -Селинен

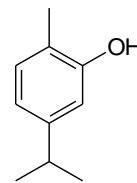
Сесквитерпенски компоненти во етерични масла



p-Цимен

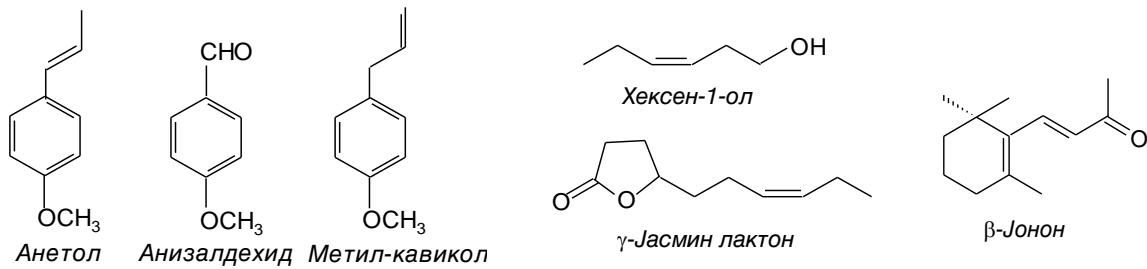


Тимол



Карвакрол

Ароматични монотерпени



Ароматични соединенија и други компоненти што можат да се јават како конституенти на етерични масла

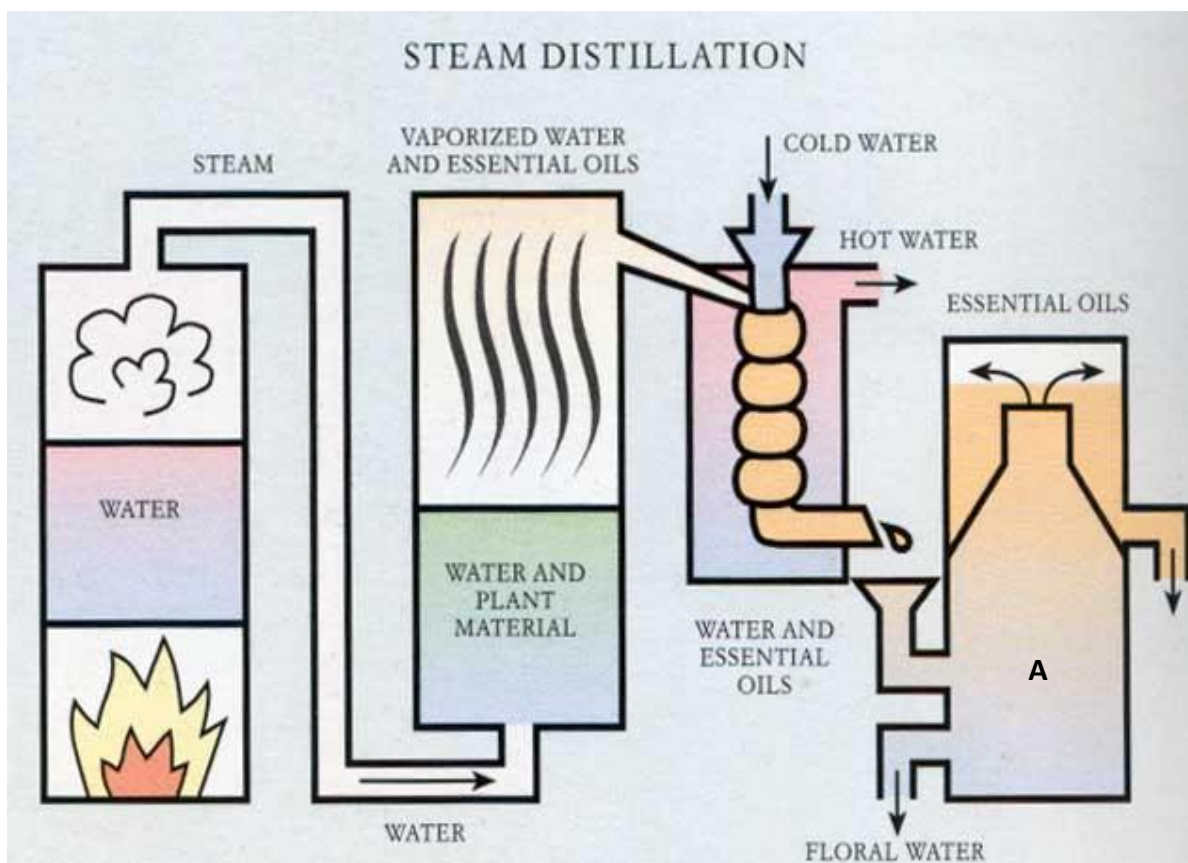
Добивање (производство) на етерични масла

Постојат повеќе начини за добивање на етерични масла. Начинот на нивното добивање влијае на квалитетот на маслата.

1. Дестилација со водена пареа е најстар и најрентабилен начин што се применува за добивање термостабилни етерични масла. Вообичаено се применува за растителни суровини што содржат поголемо количество етерично масло. Индустриската постројка за дестилација се состои од казан во кој се става ароматична суровина со вода и се загрева до вриење или систем каде што водената пареа минува низ суровината, при што ги повлекува со себе испарливите компоненти до ладилникот во кој се кондензира и се слива во прифатен сад од типот на флоретинско шише. Овој сад има два вентили, еден горе за етерични масла полесни од водата и еден долу за етерични масла потешки од водата.



Дестилатори со голем капацитет за производство на поголеми количества етерично масло



Шематски приказ на дестилацијата со водена пареа со реципиентот за етерично масло (флорентинско шише A), со двата вентили

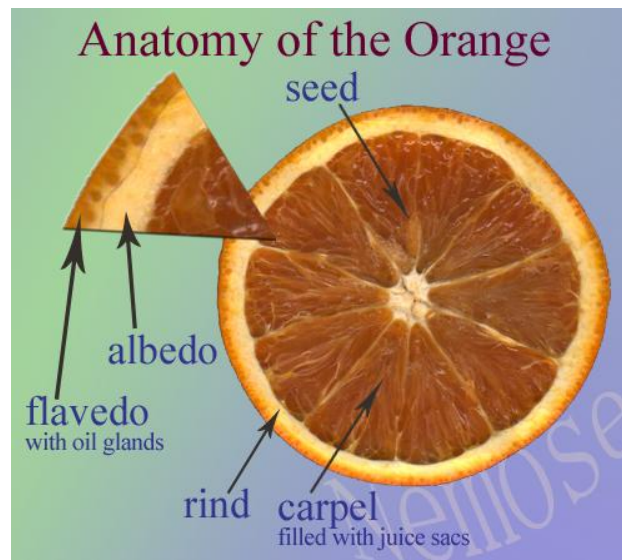
Методот на дестилација со водена пареа се базира на Далтоновиот закон, според кој две течности што не се мешаат ќе провријат кога збирот на нивните парцијални притисоци ќе се изедначи со атмосферскиот. Во случај на етерични масла, течности што не се мешаат со вода, при загревање, истите ќе провријат на температура пониска од $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ (температурите на вриење на етеричните масла се повисоки од $150\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Класичниот метод на дестилација со водена пареа денес се модификува на различни начини и се користи за индустриско производство на етерични масла, при што модификациите се прават со цел што подобро да се искористи растителната сировина, на поедноставен, поевтин и посигурен начин, а добиените етерични масла да го имаат бараниот квалитет. Во случаи кога етеричните масла се осетливи на повисока температура, дестилацијата може да се изведува под намален притисок, за да се добие пониска температура на вриење. Вака се добива етеричното масло од каранфилче. За некои растителни сировини се користи метод на хидродифузија што се состои во пропуштање водена пареа низ дрога поставена на решетка. Времето на оваа екстракција е пократко, секундарните реакции на хидролиза на компонентите од маслото се намалени, а приносите се поголеми. Со хидродифузијата се добиваат масла што се лесно испарливи, како што се масло од лаванда и лавандин.

Треба да се напомене дека една иста ароматична сировина може да даде етерично масло со различен квалитет, ако се применат различни постапки за неговото добивање. Ова

треба да се има впредвид при производство на етеричните масла. Во лабораторски услови, за дестилација на етерично масло се користи посебно направена стаклена апаратура по Клевенџер, што се состои од балон и стаклен дел, со кондензатор и прифатна цевка со мерна скала, каде се одделува етеричното масло и се мери издвоениот волумен.

2. Цедење е постапка за добивање етерични масла од плодовите на лимон, портокал, мандарина и слични овошја агруми. Кај плодови на различни видови агруми, етеричното масло е сместено во перикарпот, во шизо-лизигените шуплини под епидермисот, поради што под притисок лесно излегува на површината.



Цедењето може да се изведува рачно, а истиснатото масло може да се фаќа со сунѓери (спugna процес) или механички со хидраулични преси, при што се добива мешавина од масло, вода и делови од перикарпот, а потоа со центрифугирање, се отстрануваат механичките нечистотии и водата. Заостанатите делови од ткивото и водата се отстрануваат со ферментација.

3. Екстракција со органски растворувач се користи кај ароматични суровини што содржат помал процент термолабилни етерични масла што при дестилацијата се менуваат. Екстракцијата се изведува во посебни екстрактори за континуирана екстракција, со петролетер или со друг погоден органски растворувач (хексан, пропан, течен бутан, хлорни деривати на метан и етан, етанол).

По добивање на екстрактот, растворувачот се отпарува, а остатокот што се добива претставува "конкрет". Составен е од восок, масно масло и етерично масло. Со концентриран етанол, од конкретот се извлекува етеричното масло, а со ладење, восокот се зацврстува и се отстранува со декантирање или со цедење. Понатаму, од етанолниот раствор, етеричното масло се издвојува со дестилација и на соодветен начин се пречистува.

3. Методот анфлераж (enfleurage) се користи за добивање скапоцени етерични масла што се користат во парфимериското производство, како што се маслата од мимозата, јасминот, розата и др. Постапката се состои во тоа што свежо собрани цветови се поставуваат преку

стаклени рамки премачкани со некоја индиферентна маст (ланолин, парафин или др.) во која етеричното масло дифундира од суровината (ладна анфлераж постапка). Рамките со дрогата и масната подлога се редат на посебни сталажи и се оставаат неколку дена. Потоа цветовите, се заменуваат со ново количество суровина и постапката се повторува (40-50 пати), сè додека масната подлога не биде заситена со етеричното масло.



На овој начин се добива мирисна маст "помада", од која етеричното масло се издвојува со етанол со што се добива производ што се означува како "апсолут". Со топла анфлераж постапка, маслата преминуваат во подлогата по пат на дигестија.

Пречистување. – Без оглед на начинот на добивање, суровите етерични масла мора да се пречистат пред да се пакуваат. Сушењето од вода се изведува со безводен натриум сулфат. Со стоене подолго време, се таложат механичките нечистотии и се испаруваат лесно испарливите соединенија што преминале во маслото при дестилацијата, а што не се природни компоненти на етеричните масла (разни алкани, алкени, ацетилени и др.). Некои етерични масла мора да претрпат посериозни третмани на обезбојување, неутрализација и рактификација, додека со фракциона дестилација можат да се издвојат одделни фракции од интерес.

Пречистени масла се пакуваат во стаклени, во алуминиумски или од друг индиферентен материјал направени садови, добро се затвораат и се чуваат на темни, суви и ладни места.



5. Екстракција со суперкритичен CO₂ е современ начин за добивање етерични масла што наоѓа практична примена најмногу во производството на адитиви за прехранбена индустрија (екстракт од ѓумбир, пиперка, целер и др.).

Иако во екстракцијата теоретски можат да се користат и други флуиди, практична примена има само CO₂, поради низа предности: претставува природен производ, хемиски е инертен, незапалив, нетоксичен, лесен за елиминација, селективен, лесно достапен и евтин. Критичните услови за работа при кои CO₂ преоѓа во течна состојба се P=73,8 бар и T=31,1 °C. Постојат можности, со многу мали поместувања во однос на критичните услови за работа, да се постигне саканата селективност и да се добијат точно определени екстракти со барани физичко-хемиски карактеристики. Вака добиените екстракти или етерични масла се многу почисти во споредба со сите други методи за нивно добивање. Екстракција со суперкритичен CO₂ има низа предности во споредба со други методи за добивање на етерични масла и денес станува сè пошироко применуван метод на изолација и покрај значително високата цена на индустриските постројки за суперкритичната екстракција.

Фактори што влијаат на квалитетот на етеричните масла

Квалитетот на етеричните масла може да биде различен во зависност од низа фактори, меѓу кои пред сè се значајни генетските карактеристики на видот (генотип). Биосинтезата на етеричните масла е генетски условен процес и до определени граници е под влијание на ендогени и на егзогени фактори. Познато е дека во рамките на една иста популација, единките од истиот вид продуцираат исти етерични масла, но можат да продуцираат и етерични масла со различен хемиски состав. Кај ароматичните растенија (особено кај тимјанот, ориганумот, сатурејата, и другите претставници од усноцветни растенија), карактеристична е појава на хемиски типови (хемотипови) на етерични масла.

Во производството на етеричните масла голема важност има добро дефинирање на техничката зрелост на растението. Техничката зрелост е фаза во која се врши собирање на растителниот материјал, бидејќи тогаш деловите од растението што се собираат содржат најголемо количество етерично масло. Бидејќи количеството и составот на етеричните масла се многу варијабилни во различните фази од онтогенетскиот развој на единката, т.е. подложни на сезонски варијации, значајно е растителниот материјал да се собере во добро дефинирана фаза од развојот на растението. Еколошките фактори, во кои спаѓаат температурата, влажноста, карактеристиките на земјиштето, надморската височина, инсолацијата, влажноста и струењата на воздухот и низа други услови на надворешната средина можат да придонесат за појава на варијации во содржината и во хемискиот состав на етеричните масла. Така, единки од еден ист вид можат да продуцираат различни етерични масла во различни услови на надворешна средина, поради што, при проценката на квалитетот секогаш е битно да се нагласи географското потекло на суровината од која е добиено маслото.

Во однос на етеричните масла што се добиваат од култивирани растенија, неопходно е да се дефинираат услови на одгледување под кои ќе се добие задоволителен принос на растителната суровина и соодветна содржина и квалитет на етерично масло. Постапките на сушење, ситнење и други манипулации со суровината секогаш условуваат делумно губење на маслото, а можни се и промени во хемискиот состав, поради хидролиза, оксидација и други реакции. Врз

квалитетот на етеричните масла, како што е веќе спомнато, големо влијание има и начинот на добивање на етеричното масло.

Дејство и употреба на етерични масла

Етеричните масла и растителните суровини што ги содржат се користат како ароматични средства. Покрај карактеристичниот мирис и аромата, поседуваат и други карактеристики и покажуваат определени биолошки и фармаколошки дејства, поради што се користат во фармацевцијата и во медицината, како лековити средства. Дејството на етеричното масло и на суровината што го содржи во голем број случаи се разликува, бидејќи кај суровината дејството може да се должи и на присуството на други компоненти. На пр., етеричното масло и листот од рузмарин се две суровини добиени од исто растение, но се разликуваат по дејството. Етеричното масло има антибактериско дејство, а листот традиционално се користи за третман на дигестивни тегоби, како антиспазмодик и холеретик. За дејството на листот најверојатно се одговорни и фенолните компоненти.

Најважни дејства на етерични масла се:

- антисептично и дезинфициентно дејство, карактеристично за етерични масла што содржат поголемо количество фенолни состојки (тимјан, мајчина душица), некои терпенси етери (еукалиптус) и други компоненти (анасон, лаванда, маточина, лимон),
- рубифациентно (загревачко) дејство врз кожата имаат етерични масла што содржат камфор, борнеол, цинеол, пинени и др. Овие масла најчесто се аплицираат во форма на разни масти, креми, линименти, а се користат за лекување на ревматизам, невралгии, настинки и др. Внатрешно се користат за надрознување на слузниците на дигестивниот тракт со што делуваат дигестивно и стомахишно. На овој начин дејствуваат етерични масла што се внесуваат во форма на зачини (цимет, нане, каранфилче и др),
- диуретично дејство (смрека, магданос и др.), (зголемуваат излучување на урина),
- експекторантно дејство (анасон, еукалиптус, бор и др.), (подобруваат искашлување),
- холагогно и холеретично (нане и рузмарин), (подобруваат функционирање на жолчка),
- антхелминтично дејство (етерични масла што содржат тујон), (уништуваат цревни паразити),
- антиинфламаторно дејство (камилица, ајдучка трева и др.), (смируваат воспалителни процеси),
- седативно дејство (валеријана, маточина, лавандула, рузмарин и др.), (го смируваат надрознетиот централен нервен систем).

Ароматичните суровини традиционално се користат за третман на голем број заболувања, многу повеќе во споредба со чистите масла. Најчесто се користат како чаеви (инфузи) и како алкохолни екстракти и тинктури, а дејството се должи на компонентите што се наоѓаат во водените и во алкохолните екстракти. Се користат и како средства за тонизирање и освежување на организмот.

Етеричните масла се користат во фармацевцијата, во парфимерското и во козметичкото производство, во прехранбената индустрија, во алкохолната, во тутунската и во другите индустрии. Во фармацевцијата се користат за производство на дерматолошки препарати со антисептично и рубифациентно дејство. Некои етерични масла се користат за инхалација на органите од

горниот респираторен тракт. Во голема мера се користат за ароматизација на препарати за перорална употреба. Специфичен вид терапија што вклучува и интерна и екстрена примена на етеричните масла и препаратите што ги содржат, се нарекува ароматерапија и во последно време е сè поактуелна.

А) Испитување и анализа на ароматични растителни суровини (ароматични дроги)

Испитување и анализа на ароматични дроги, покрај идентификација на дрогата и определување на параметрите за проценка на степеност на чистота (тестови) на истата, генерално опфаќа следно:

- идентификување на компоненти од етеричното масло,
- определување на содржина на етеричното масло и
- определување на содржина на поединечни компоненти во изолирани етерични масла.

За идентификување на компоненти од етеричното масло најчесто се применува тенкслојна хроматографија на силикагел. Содржината на етеричното масло се определува со дестилација со водена пареа, додека метода од избор за определување на содржината на определени компоненти во маслата е гасната хроматографија.

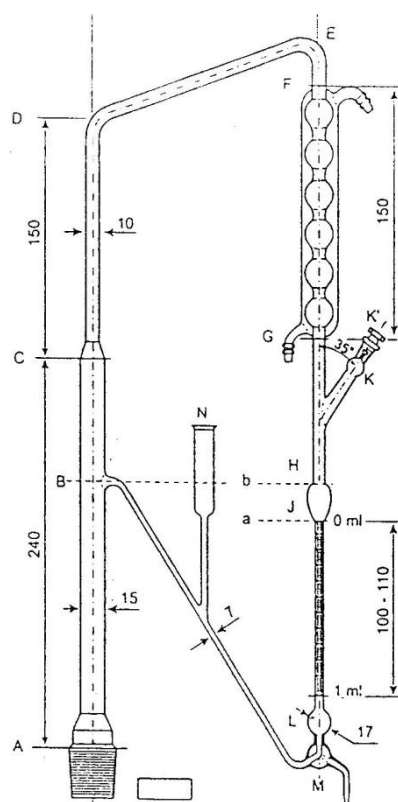
Определување на содржина на етерично масло (Ph. Eur. 7.0., 2.8.12.)

Дестилацијата со водена пареа се базира на Далтоновиот закон за парцијалните притисоци, според кој две течности што не се мешаат и хемиски не реагираат (вода и етерично масло) ќе зовријат во моментот кога збирот на нивните парцијалните притисоци ќе се изедначи со атмосферскиот (101,325 kPa) и тоа на температура пониска од најниската поединечна температура на вриење (во случајот тоа е водата).

Содржината на етеричното масло во растителни дроги се определува со дестилација со водена пареа во специјална апаратура по Клевенџер. Издвоениот дестилат (етеричното масло) се собира во градуирана цевка, користејќи ксилол како растворувач, кој го прифаќа етеричното масло, а водената фаза по системот на врзани садови се враќа во дестилациониот балон.

Апаратурата се состои од следниве делови:

- балон со округло дно и кратко брусено грло, со внатрешен дијаметар од 29 mm,
- специјално конструиран кондензатор и
- погодено грејно тело, со фина регулација на температурата.



Клевенџер апаратура за дестилација на етерични масла

Метод: Појдовното количество дрога, количество вода и волуменот на ксиленот што се користат во постапката, зависат од видот на дрогата и за секоја од официналните дроги се пропишани во монографиите.

Пропишаниот волумен од вода се става во дестилациониот балон, се додаваат неколку парчиња порозен порцелан и се приклучува кондензаторот. Водата се додава преку наставката N до нивото B.

Се отвара вентилот K' и се става пропишаниот волумен од ксилен, користејќи соодветна пипета. Се поставува затварачот на вентилот K', се загрева балонот и се подесува дестилацијата да тече со брзина 2-3 mL /min. Се дестилира 30 минути, а по ладењето од 10 мин, се чита волуменот на ксиленот во градуираниот дел од цевката.

Потоа, во балонот се става пропишаното количество дрога и се дестилира со брзина на дестилација, пропишана во монографијата на дрогата. По истекот на времето предвидено за дестилација (спред монографијата), загревањето се прекинува и по 10 мин се одчитува волуменот на издвоеното етеричното масло во ксиленот.

Разликата на двата волумени на ксиленот го дава волуменот на изолираното етерично масло. Содржината на етеричното масло се изразува во mL/1000 g апсолутно сува дрога (во пресметката се одзема количеството на водата присутна во дрогата). Содржината на етеричното масло може да се изрази и во % (mL/100 g дрога).

Доколку маслото потоа се користи и за некои други испитувања, истото се пречистува од ксиленот со додавање на 0,1 % раствор натриум-флуоресцеинат (0,1 mL) и 0,5 mL вода.

В) Испитување и анализа на етерични масла

Испитување и анализа на етерични масла опфаќа:

- идентификација на маслото,
- испитување на степенот на чистота на маслото, со изведување на општи испитувања и определување на физичко-хемиски константи и
- определување на содржината на компонентите (хемиски состав) на маслото.

Идентификацијата на етеричните масла се прави со анализа на тенок слој од силикагел (ТЛЦ) или со гасна хроматографија (GC). Определување на хемискиот состав на маслата се врши со гасна хроматографија. Испитување на степенот на чистотата на маслата се прави со цел да се утврди евентуалното присуство на фалсификат (присуство на поевтино етерично масло, масно или минерално масло, додавање на чисти супстанции, понекогаш и етанол и др). Стари и несоодветно чувани етерични масла оксидираат, се усмолуваат, добиваат несвојствен мирис, а некои компоненти на маслата полимеризираат. Преку определување на органолептичките особини, физичко-хемиските константи и другите параметри, како и со гаснохроматографската анализа, може да се изврши проценка на квалитетот на етеричното масло.

Идентификација на етерични масла

Идентификација со хемиски реакции и врз база на флуоресценција

Ваквите реакции во идентифицирањата на етеричните масла денес ретко се применуваат, бидејќи со гасно-хроматографската анализа, истовремено се врши и идентификација на маслото преку определување на гасно-хроматографскиот профил. Некои покарактеристични реакции што порано се користеле за идентификација се:

- идентификација на масло од карамфилче (*Caryophylli aetheroleum*) преку реакцијата на еугенолот од маслото со соли на тривалентно железо (железо (III) хлорид),
- идентификација на терпентинско масло (*Terebenthinae aetheroleum*) преку реакцијата на доминантните јаглеводороди со елементарен јод, при што доаѓа до прскање и пукање, пради силната егзотермна реакција во која се создаваат експлозивни пареи. Ова масло може да се докаже и со сулфурна или со азотна киселина, со кои самото се запалува,
- идентификација на етерично масло од црн синап (*Sinapis nigrae aetheroleum*) преку реакцијата на алилизосулфоцијанатот со раствор од сребро нитрат, при што се формира црно обоен сребро сулфид,
- идентификација на етерично масло од цветот на портокал (*Aurantii floris aetheroleum*) под UV светлина на 356 nm, при што се добива интензивна сино-виолетова флуоресценција од присутниот метил антранилат.

Идентификација со тенкослојна хроматографија

Идентифицирањата со тенкослојна хроматографија на слој од силикагел се користи и во идентифицирањата на ароматичните дроги и во идентифицирањата на етеричните масла. Во случај на идентификација на етеричните масла, според Европската фармакопеја идентификација под А секогаш е гаснохроматографската анализа, додека тенкослојната хроматографија е идентификација под В, која во случај на позитивна идентификација под А може да се изостави.

Растворот за анализа се подготвува во толуен при што етерични масла директно се раствораат, додека кај ароматичните дроги, примарниот метиленхлориден екстракт прво се впарува до суво под вакуум, а потоа остатокот се раствора во толуен. Како референтни супстанции (стандарди) се користат чисти изолирани компоненти од етерични масла.

Како стационарната фаза се користи силикагел со флуоресцентен индикатор. Мобилната фаза е мешавина од толуен или од хексан со многу мало количество (5-15%) од некој поларен растворувач (етил ацетат, етанол, метанол). Раздвојувањето на компонентите се врши врз база на нивната поларност: липофилните јаглеводороди имаат помали R_f вредности во споредба со другите терпенски соединенија што содржат кислород. ТЛЦ хроматограмот прво се гледа под UV светлина на 254 nm, при што ароматичните терпени и другите ароматични соединенија, како и оние со коњуирани двојни врски што се карактеризираат со способност за флуоресценција, истата ја гаснат на слој од силикагел со флуоресцентен индикатор.

Надбљудувањето на ТЛЦ плочата под UV светлина на 356 nm овозможува да се регистрира присуство на компоненти што флуоресцираат во тие услови (на пр. кумарини, метил антранилат). На дневна светлина, на ТЛЦ плочата видливи се само петната (со зелена, сина или виолетова боја) што ги даваат азуленските соединенија.

Во втората фаза од анализата на ТЛЦ хроматограмот се врши прскање на плочите со соодветен реагенс за детекција. Најчесто се користат реагенсите аниз алдехид/сулфурна киселина или ванилин/сулфурна киселина. Плочата прво се набљудува на дневна светлина, а потоа се загрева 5-10 мин на 105 °C. Петната на терпенските и фенилпропанските соединенија се обојуваат црвено, виолетово или сиво.

Детекцијата на петната може да се направи и со раствор од фосфор-молибденска кисерлина. По загревање од 5-10 мин на 105 °C, на плочата се јавуваат сино обоени петна од создадениот молибден оксид. Со фосфор-молибденската киселина се докажуваат компонентите од маслото што имаат редуцирачки својства и истите со реагенсот образуваат молибден оксиди.

Идентификација со гасна хроматографија

Идентификација со гасна хроматографија е најсоодветниот, најсигурниот и најсофистицираниот метод за анализа на етеричните масла. Овозможува истовремена идентификација на компонентите преку кои се идентификува и маслото и тоа врз база на определување на релативниот однос на компонентите од маслото (гасно-хроматографски профил). Сите аспекти на оваа анализа се дадени подолу, во анализата на хемискиот состав на етеричните масла.

Општи испитувања на етерични масла (Ph. Eur. 7.0.).

1. Вода во етерично масло: етеричните масла лесно и бистро се раствораат во јаглендисулфид. Ако имаат примеси од вода, доаѓа до заматување. Постапката вклучува мешање на 10 капки од маслото со 1 mL CS₂, при што по стоење од неколку минути, растворот мора да остане бистар. Ако дојде до заматување, во тој случај етеричното масло содржи вода.
2. Страни естри во етерични масла: естрите на фталната киселина и другите страни естри се сапонифицираат со KOH, а настанатите соли на калиум лесно кристализираат. Постапката вклучува загревање на 1 mL етерично масло на водена бања 2 мин, на кое се додадени 3,0 mL свежо припремен раствор од KOH (100 g/L). По стоење од 30 минути, не треба да има формирани кристали, дури ни со ладење. Во спротивно, при позитивна реакција, маслото е фалсификувано со недозволен материјал.
3. Масни масла и усмолено масло: масните и усмолените масла оставаат мрсна трага на филтерна хартија. Постапката вклучува капнување на 1 капка од етерично масло на филтер хартија и набљудување по 24 часа. Во случај на чисто масло, капката треба да биде наполно испарена, без било каква трага.
4. Мирис и вкус на етерични масла: секое етерично масло има својствен (карактеристичен) мирис и вкус. Се испитуваат тако што 3 капки од етеричното масло се мешаат со 5 mL 90 %

етанол и се нанесува на 10 g пулверизирана сахароза. Мирисот и вкусот на етеричното масло мора да бидат слични со мирисот и вкусот на растението од кое потекнува.

5. Остаток по испарување на етеричното масло: претставува остаток што се добива по испарување на маслото на водена бања под посебни услови, во сферични садови со пропишани димензии. Квалитетно и чисто етерично масло треба да остави незначителен и немерлив остаток. За таа цел, садот за впарување се загрева на водена бања 1 час. Се лади во екдикатор и се мери. Се мерат 5,0 g етерично масло, се ставаат во садот и се остава да испарува на добро загреана водена бања, како што е пропишано во монографијата (во текот на тестот, нивото на водата треба да биде 50 mm под капакот на бањата). Садот потоа се лади во екдикатор и се мери. Помеѓу двете мерења на садот, не треба да има мерлива разлика.
6. Растворливост во алкохол: овој параметар се определува кај одредени масла, при што во монографијата е пропишана и концентрацијата на етанолот во која се испитува растворливоста. И овој параметар овозможува утврдување на фалсификат. 1 ml од испитуваното етерично масло треба бистро да се раствори во (n) mL алкохол, но не повеќе од 20 mL. Доколку маслото не се раствора во 20 mL алкохол со пропишана концентрација, испитувањето се повторува со алкохол со поголема концентрација и се определуваат (n_1) mL. При растворањето, растворот може да опалесцира или да се замати, при што се применува постапка за определување на волуменот на алкохолот во кој заматениот раствор бистро ќе се раствори.

Кај некои етерични масла се испитува присуство на етанол. Постапката вклучува идентификација на етанол со реагенс фуксин, при што се развива црвено обојување. Вообичаено 1 ml етерично масло се пренесува во сува епрувета, која се затвора со памук, во кој се замотани неколку кристалчиња фуксин. Епруветата се загрева на водена бања, при што пареите на етеричното масло допираат и поминуваат низ памукот. Памукот не смее да се обои црвено, бидејќи позитивната реакција значи сигурно присуство на етанол.

Определување на физичко-хемиски константи на етерични масла

Физичките константи што се определуваат кај етеричните масла се: релативна густина, индекс на рефракција и агол на оптичка ротација. Кај некои масла, потребно е да се определи температура на стврднување и апсорбанца. Определување на физичките константи се користи за проценка на степенот на чистотата и на квалитетот на маслото. Граничните вредностите за физичките константи, фармакопеите (вклучувајќи ја и Ph.Eur.7.0) ги наведуваат во монографиите на официналните етерични масла.

- **Релативна густина.** Претставува однос на маса на определен волумен на етерично масло со маса на ист волумен на вода, на температура од 20 °C. Се движи во граници од 0,690-1,118. Етеричните масла главно се полесни од вода и релативната густина им е помала од 1. Само во случаи кога во маслото се присутни фенилпропански соединенија, таквите масла се потешки од водата и релативната густина им е поголема од 1. Тука спаѓаат маслото од каранфилче, од цимет, од магданос итн.
- **Индекс на рефракција.** Индексот на рефракција на етеричното масло е односот на синусот на аголот на влезниот зрак на светлината во воздух со синусот на аголот на

прекршениот зрак во етеричното масло. Се мери на температура од 20 °C, со пропуштање на D-линијата на натриумовиот спектар ($\lambda=589,3$ nm). Границите во кои се движи индексот на рефракцијата се од 1,450 до 1,590.

*Вредности на индекс на рефракција на некои етерични масла

Етерично масло	Индекс на рефракција
<i>Aetheroleum Carvi</i>	1,485-1,489
<i>Aetheroleum Caryophylli</i>	1,528-1,537
<i>Aetheroleum Cinnamomi</i>	1,581-1,591
<i>Aetheroleum Citri</i>	1,474-1,476
<i>Aetheroleum Eucalypti</i>	1,458-1,470
<i>Aetheroleum Foeniculi</i>	1,528-1,538
<i>Aetheroleum Lavandulae</i>	1,459-1,470
<i>Aetheroleum Menthae</i>	1,472-1,477
<i>Aetheroleum Rosmarini</i>	1,464-1,476
<i>Aetheroleum Thymi</i>	1,483-1,508

- **Агол на оптичка ротација.** Оптичка активност е способност на определена компонента да ја врти рамнината на линеарно поларизираната светлина. Аголот на оптичката активност е агол на свртување α , за кој етеричното масло ја врти рамнината на поларизиран светлосен зрак од D-линијата на натриумовиот спектар ($\lambda=589,3$ nm), при негово поминување низ слој со дебелина од 1 dm, на температура од 20 °C. Аголот на оптичката ротација се изразува во степени (°). Етеричните масла се оптички активни бидејќи содржат оптички активни компоненти (на пр. (+)-лимонен, (-)-ментол, (+)-карвон, итн.). Аголот на оптичката ротација не е константа во вистинската смисла на зборот, бидејќи неговата вредност зависи од соодност на сите оптички активни компоненти во маслото. Поради тоа, фармакопејите пропишуваат гранични вредности за оваа константа. На пример, за масло од питомо нане, аголот на оптичката ротација треба да биде во границите од -10 до -30°.
- **Температура на стврдување.** Некои етерични масла со ладење оцврстуваат (се стврдуваат). При тоа не се работи за вредности под нулата, туку за температури што може да бидат само неколку степени под амбиенталната. Стврдувањето се должи на присуство на големо количество компоненти, што на тие температури се наоѓаат во цврста агрегатна состојба. Кај таквите етерични масла, фармакопејите пропишуваат параметар температура на стврдување. На пример, етеричното масло од анасон се стврдува на температура од 15-19 °C, поради присуство на *trans*-анетол, кој на 22,5 °C се стврдува.
- **Апсорпција.** Со цел проверка на квалитетот за некои етерични масла што можат да бидат фалсификувани со слични, но поефтини масла, се мери апсорпцијата на маслото, според постаката дадева во монографијата. На пр., етерично масло од лимон (*Citrus limonum*) не содржи компоненти што флуоресцираат под ултравиолетова светлина. Ако се јави флуоресценцијата, маслото веројатно е фалсификувано со етерично масло од други *Citrus* претставници како на пр. масло од портокал и други, што содржат метил антранилат кој флуоресцира.

Хемиски константи кај етеричните масла поретко се определуваат и тоа само кај некои масла кај кои во составот се јавуваат естерски соединенија. Кај такви масла, но и кај многу стари масла, можно е со несоодветно чување да дојде до хидролиза на естрите, поради што се испитуваат **киселинскиот и естерскиот број**. Постапките за нивно определување се наведени во монографиите на официнелните масла, каде определување на овие константи има смисол.

Определување на содржината на компонентите (хемиски состав) на етеричното масло

Хемискиот состав на етеричното масло (квантитативна анализа) се определува со метод на гасна хроматографија. Во некои фармакопеи и во постари изданија од актуелните фармакопеи, можат да се најдат спектрофотометриски и други методи за определување на содржина на определени компоненти од етеричните масла. Така определувањето на содржината на 1,8-цинеолот во етеричното масло од еукалиптус може да се изврши спектрофотометриски, на алдехидот цитрал во етерично масло од лимон титриметриски, на фенолите во етеричното масло од тимјан волуметриски, итн. Современите фармакопеи и Ph.Eur.6.0. пропишуваат определување само со гасна хроматографија.

Гасна хроматографија на етерични масла

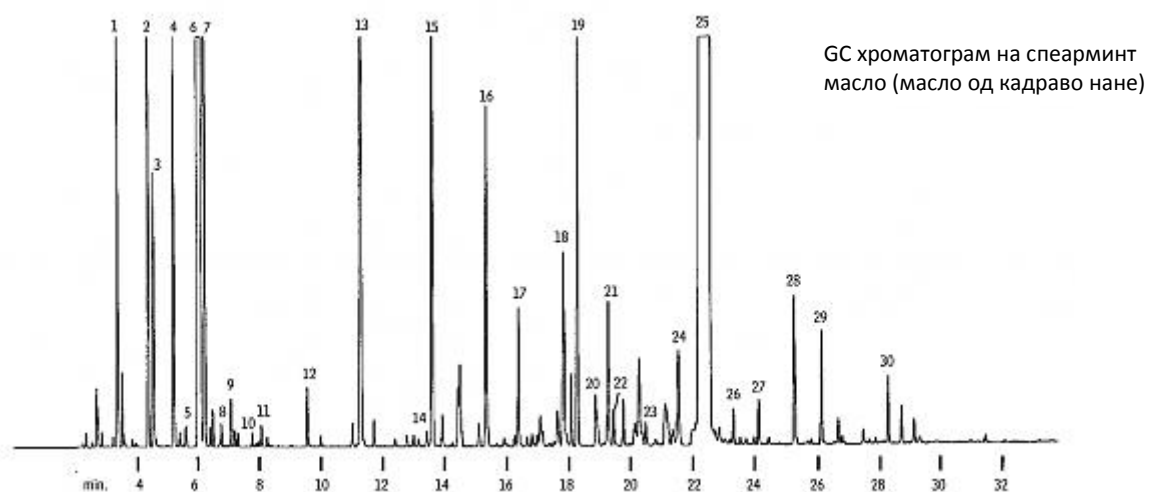
Со оглед на тоа дека етеричните масла претставуваат смеси на голем број испарливи компоненти, метод од избор за нивната анализа е гасната хроматографија. Методот овозможува подобро сепарирање на компонентите во споредба со други хроматографски техники, како и определување на нивниот релативен однос (квантитативна анализа).

Според прописите на современите фармакопеи, вклучувајќи ја и Ph.Eur.6.0., 2.2.28, етеричното масло и стандардните супстанции што се користат како референтни соединенија, се раствораат во хексан.. За раздвојување се користат само капиларни колони со должина од 30-60 m и дијаметар од 0,25 mm со умерено неполарна стационарна фаза од вкрстено врзан 5% фенил метил силоксан најчесто во слој со дебелина од 0,25 μm (HP5, DB5, BP5 итн). Мобилната фаза (гас носач) најчесто е хелиум. Компонентите на етеричното масло се карактеризираат со големи разлики во поларноста и за нивното раздвојување се користи температурен програм најчесто од 60-210 $^{\circ}\text{C}$, со пораст на температурата од 3 $^{\circ}\text{C}$ /минута, што зависи од видот на маслото. Детекцијата се врши со пламенјонизирачки детектор (FID).

Идентификацијата на компонентите на етеричното масло се врши со споредување на R_t на компонентите во маслото со R_t на референтните соединенија. Содржината на компонентите се определува преку површините на пиковите, со метод на нормализација. Во монографиите на официнелните масла, фармакопеите ги даваат границите во кои треба да бидат застапени најбитните компоненти што го карактеризираат етеричното масло.

Во научноистражувачки цели, хемискиот состав на етеричните масла може да се анализира со користење на гасната хроматографија во спрега со масената спектроскопија. И во овој случај, се користат стандардни супстанции како референтни материјали за потврда на

идентификацијата на поединечните компоненти присутни во маслото. Дополнително, идентификацијата се прави врз база на податоците добиени од MS спектарот на анализираната компонента во маслото во споредба со податоците добиени од готовите MS спектри на библиотеките како што е Вајлиевата (Willey library), библиотеката од НИСТ (National Institute of Standards and Technology library), Адамсовата (Adams library) и други библиотеки, како и со употреба на посебен софтвер за идентификација AMDIS (Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System). На сликата подолу прикажан е хроматограмот на спеарминт масло (масло од кадрави нане) и на етерично масло од лаванда со идентификација на компонентите дихидролиналол и дихидролиналол ацетат преку MS спектрите.

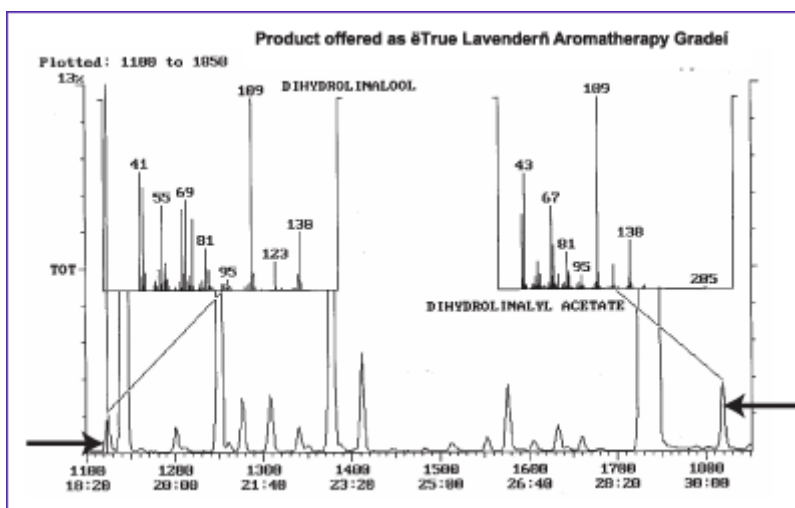


Peaks

1. α -Pinene
2. β -Pinene
3. Sabinene
4. Myrcene
5. α -Terpinene
6. L-Limonene
7. 1,8-Cineole
8. *cis*-Ocimene
9. γ -Terpinene
10. *p*-Cymene
11. Terpinolene
12. 3-Octyl acetate
13. 3-Octanol
14. l-Menthone
15. *trans*-Sabinenehydrate

Peaks

16. β -Bourbonene
17. Linalool
18. Terpinene-4-ol
19. β -Caryophyllene
20. Dihydrocarvone
21. *trans*-Dihydrocarvyl acetate
22. *trans*- β -Farnesene
23. α -Terpineol
24. Germacrene- Δ
25. Carvone
26. *cis*-Carvyl Acetate
27. *trans*-Carveol
28. *cis*-Carveol
29. *cis*-Jasmone
30. Viridiflorol



Идентификација на непознати компоненти со користење на податоци од библиотеката на MS спектри

Работни задачи:

1. Определување на содржина на етерично масло во плод од анасон

Постапка (според прописот даден во монографијата за плод од анасон (Ph.Eur.7.0.). Се поставува дестилација со водена пара, со 100 mL вода во балон од 250 mL и со 0,5 mL ксилол во градуираната цевка. По дестилација од 30 мин и ладење на апаратурата во време од 10 мин, се одчитува волуменот на ксилолот. Дрогата (10,0 g) се меле непосредно пред да се стави во балонот, се пренесува во балонот и се продолжува со дестилацијата. Според напатствијата дадени во монографијата, дестилацијата треба да се одвива со проток од 2,5 до 3,5 ml во мин, 2 часа. По завршетокот на дестилацијата и по ладење од 10 мин, се одчитува волуменот на изолираното масло во ксилолот.

Содржината на етеричното масло во испитуваната дрога соодветно се пресметува и се изразува во ml/1000 g или во %.

Алтернативно, содржината на етеричното масло може да се определува во плод од сладок анасон, во плод од ким, во лист од нане, цвет од лаванда и сл. дроги.

2. Идентификација на етеричното масло од анасон

Тенкослојна хроматографија

Во зависност од етеричното масло што се анализира, се користи монографија на соодветното масло и општиот пропис од Европската фармакопеја.

Раствор за анализа: 0,1 g од изолираното масло се раствара во 10 mL толуен.

Референтен раствор:

- 80 µL анетол R се раствара во 1 mL толуен.
- 3 µL анизалдеhid R се раствара во 1 mL толуен.

Апликација: се нанесуваат по 5 μL од растворот за анализа и од референтните раствори. Хроматограмот се развива во мобилна фаза (фронт 10 cm).

Мобилна фаза: толуен : атилацетат = 93 : 7 (v/v)

Детекција: по развивањето, хроматограмот се суши на воздух и се набљудува под УВ-светлина. Хроматограмот покажува петно од анисалдехид во централниот дел и петно од анетол во горната третина од хроматограмот. Се прска со *ex tempore* припремен раствор од ванилин реагенс R и се загрева на 100 °C во тек од 10 мин. Петното што одговара на анетол се пројавува со портокалово-розова боја на жолта позадина.

Гасна хроматографија

Во зависност од етеричното масло што се анализира, се користи монографија на соодветното масло и општиот пропис од Европската фармакопеја,

Стандарден раствор: во 1 ml хексан се раствораат 20 mg линалол, 20 mg естрагол, 20 mg α -терпинеол, 10 mg *cis*-анетол, 60 mg анетол и 30 mg анисалдехид.

Услови:

- капиларна колона HP5, долга 30-60 m, со внатрешен дијаметер 0,3 mm. Хелиум за хроматографија, како носечки гас, пламен-јонизирачки детектор, температурните услови на инјекторот, колоната и детекторот се поставуваат според условите дадени во монографијата на етерично масло од анасон), се инјектираат 0,2 μL од стандардниот раствор, а по снимањето на хроматограмот, се инјектираат 0,2 μL од растворот за анализа.

Идентификација на компонентите во маслото се прави со споредба на ретенционите времиња на компонентите од маслото со ретенционите времиња на компонентите од стандардниот раствор, додека нивната процентуална застапеност се определува со методот на нормализација, преку површината под кривата добиена од извештајот на снимениот хроматограм на маслото.

Според монографијата дадена во Ph.Eur.6.0., *Anisi aetheroleum* главно го сочинуваат 6 компоненти, чија застапеност се изразува во %, а се определуваат со помош на стандардниот раствор, со метод на нормализација. Според прописот, главните компоненти на маслото мора да бидат застапени во границите:

Линалол	0,1-1,5 %,
Естрагол	0,5-6,0 %,
α -Терпинеол	0,1-1,5 %,
<i>cis</i> -Анетол	помалку од 0,5 %,
<i>trans</i> -Анетол	84,0-93,0 %,
Анисалдехид	0,1-3,5 %,

Гасна хроматографија со масена детекција

Растворот од етеричното масло се хроматографира под исти услови, како кај гасната хроматографија.

И во овој случај, за идентификација на компонентите присутни во етеричното масло се користи приготвениот стандарден раствор, со цел споредба на ретенционите времиња на компонентите од маслото со компонентите од стандардниот раствор. Дополнително, идентификацијата се прави со споредба на добиените MS спектри на компонентите во маслото со готовите MS спектри на некоја од библиотеките (Вајлиевата, Нистовата, Адамсовата и др.), како и со употреба на посебен софтвер за идентификација AMDIS (Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System).

Определување на физички константи

Во зависност од етеричното масло што се анализира, се определуваат физички константи наведени во монографија на соодветното масло и општиот пропис од Европската фармакопеја.

Се определува индекс на рефракција на изолираното етерично масло.

Пресметки и прилози во однос на зададените работни задачи:

Заклучок:

Асистент:
