

Katedra i Zakład Farmakognozji. Wydział Farmaceutyczny. Akademia Medyczna w Lublinie
Kierownik: doc. dr Florentyna Biełoszabska

Florentyna Wanda KUDRZYCKA - BIEŁOSZABSKA,
Kazimierz GŁOWNIAK

**Badanie olejku owoców *Chaerophyllum hirsutum* L. ssp. *cicutaria*
Briq. var. *glabrum*. Cz. II. Chromatografia gazowa**

Исследование эфирного масла фруктов *Chaerophyllum hirsutum* L. ssp. *cicutaria*
Briq. var. *glabrum*. Часть II. Газовая хроматография

Researches into Volatile Oil from Fruits of *Chaerophyllum hirsutum* L. ssp. *cicutaria*
Briq. var. *glabrum*. Part II. Gas Chromatography

W poprzedniej pracy (1) przebadano owoce *Chaerophyllum hirsutum* ssp. *cicutaria* Briq. var. *glabrum*, o różnym stopniu dojrzałości na zawartość olejku oraz przeprowadzono rozdział składników metodą chromatografii cienkowarstwowej uzyskując od 11 do 19 związków, z których 5 zidentyfikowano. Otrzymane wyniki wykazały, że wraz z rozwojem owoców świeżabka zmienia się zawartość procentowa olejku, jak i jego komponentów. Celem potwierdzenia uzyskanych wyników oraz ilościowego uchwycenia tych zmian, posłużono się w pracy obecnej metodą chromatografii gazowej.

MATERIAŁ I METODY

Badaniom poddano olejek otrzymany z tego samego surowca, który był przeanalizowany w cz. I (zebranego ze stanowisk naturalnych w Beskidzie Sądeckim w okresie od 25 VI do 15 VII 1968 r.). Drogą destylacji otrzymano olejek: a) z owoców niedojrzałych dł. 5—7 mm tuż po zbiorze (niedojrzałe, świeże), b) z tych samych owoców po 3-dniowym suszeniu na wolnym powietrzu (niedojrzałe, suche), c) z owoców dojrzałych 7—9 mm dł., wysuszonych jak próbka b (dojrzałe, suche). Uzyskany olejek, przechowywany w szczelnie zamkniętych naczyniach z ciemnego szkła, poddano analizie chromatograficznej.

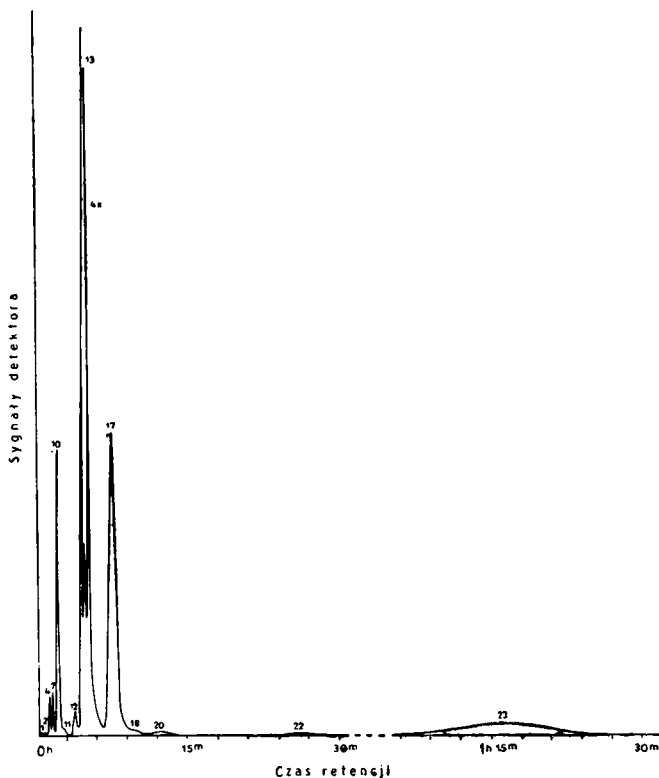
CHROMATOGRRAFIA GAZOWA

W dostępnym piśmiennictwie nie natrafiono na zadowalające warunki rozdziału olejków. Analizę przeprowadzono w chromatografii gazowym typu GCHF 18 firmy Willy Giede, zastosowując następujące

parametry analizy: kolumna chromatograficzna dł. 1 m ϕ 5 mm, wypełnienie Celite 545 100—120 mesh + Reoplex (83:17; temp. kolumny 140°C; ciśnienie gazu nośnego (N₂) — 1 atm; detektor płomieniowo-jonizacyjny; czułość 1/64; przesuw taśmy — 200 mm/h).

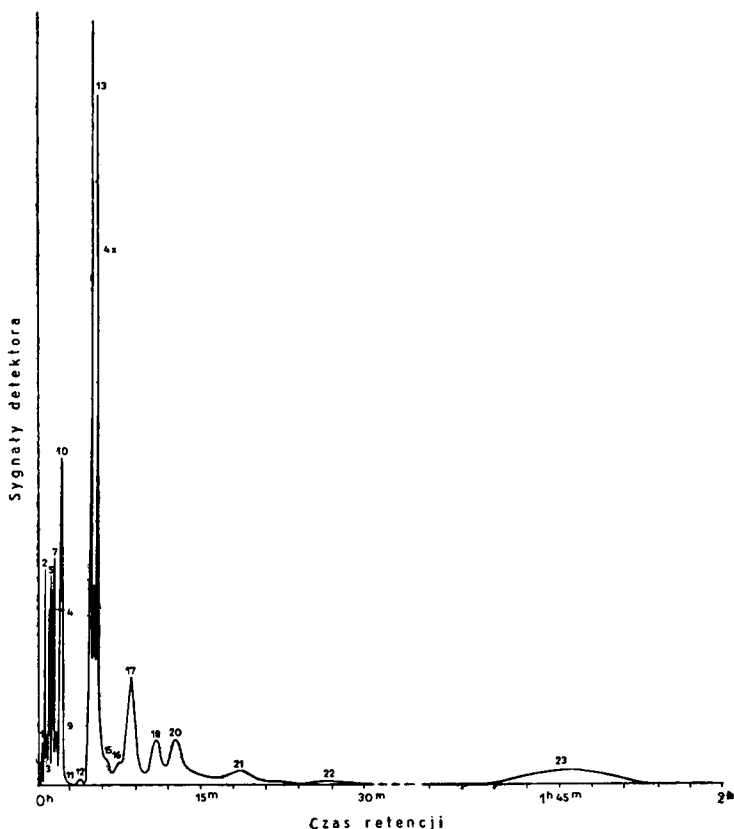
Wielkość wstrzykniętej przy pomocy mikrostrzykawki Hamiltona próbki wyniosła 0,5 μ l. Interpretacja poszczególnych pików (pasm przebiecia) (3) została przeprowadzona na podstawie ich kolejności ukazywania się na chromatogramie, przy czym za odnośnik przyjęto próbkę (c) olejku, zawierającą najwięcej składników. Identyfikację związków przeprowadzono na podstawie porównania ich czasów retencji z czasami retencji wzorców.

Otrzymane wyniki analizy chromatograficznej olejków ilustrują ryciny 1a, 1b,, 1c.



Ryc. 1a. Chromatogram gazowy olejku z owoców niedojrzałych świeżych; warunki — kolumna 1 m, wypełnienie Celite 545 + Reoplex (83:17), temp. 140°C, ciśnienie gazu nośnego (N₂) — 1 atm, detektor płomieniowo-jonizacyjny, czułość 1/64, przesuw taśmy 200 mm/h

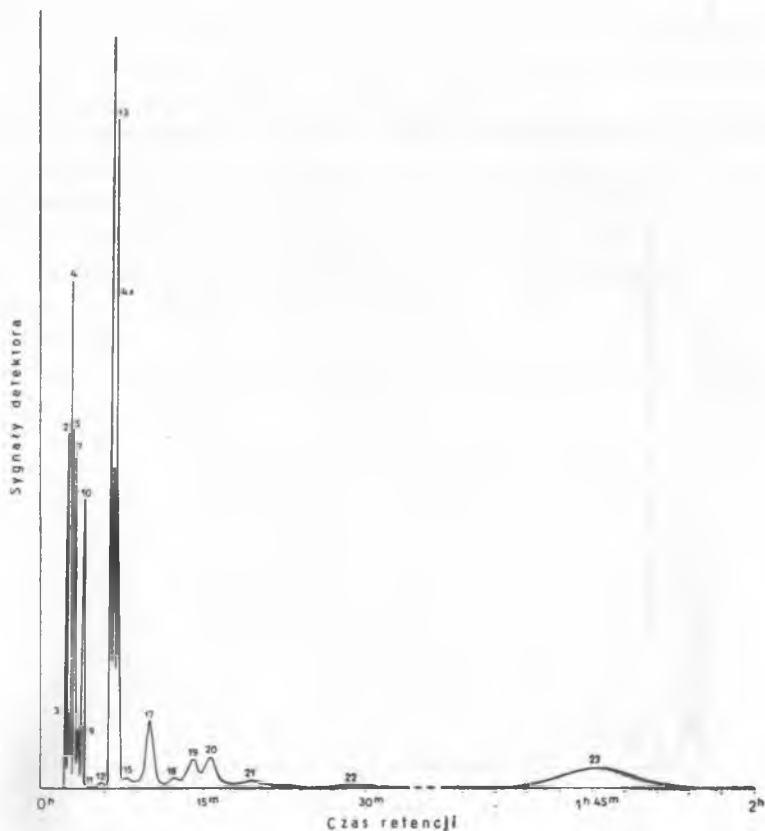
Gas chromatogram of oil from unripe fresh fruit; conditions — 1 m column, filling with Celite 545 + Reoplex (83:17), temp. 140°C, carrier gas pressure (N₂) 1 atmosphere, flame ionization detector, sensitivity 1/64, movement of record sheet 200 mm/hr



Ryc. 1b. Chromatogram gazowy olejku z owoców niedojrzałych suchych; warunki jak na ryc. 1a

Gas chromatogram of oil from unripe dry fruit; conditions as in Fig. 1a

Na chromatogramie olejku z owoców niedojrzałych świeżych (a) otrzymano 12 pików. Pola powierzchni pod pikami nr 13 i 17 są największe. Olejek z tych samych owoców wysuszonych (b) rozdzielił się na 19 składników, a olejek z owoców dojrzałych suchych (c) na 18 składników. We wszystkich próbkach stwierdzono obecność eugenolu, który ma największy czas retencji. Dla przedstawienia go na wykresach skrócono współrzędną czasu. Zidentyfikowano przez porównanie z wzorcami składniki: pik nr 23 jako eugenol, nr 20 jako terpineol, nr 12 jako fenchon, nr 7 jako limonen. Przy zastosowanych parametrach analizy chromatograficznej dobrze rozdzielają się związki tlenowe, natomiast piki składników węglowodorowych układają się zbyt blisko, a niekiedy zachodzą na siebie, co utrudnia identyfikację i oznaczenie ilościowe. Zdecydowano się więc na przedłużenie kolumny chromatograficznej do 4 m, przy



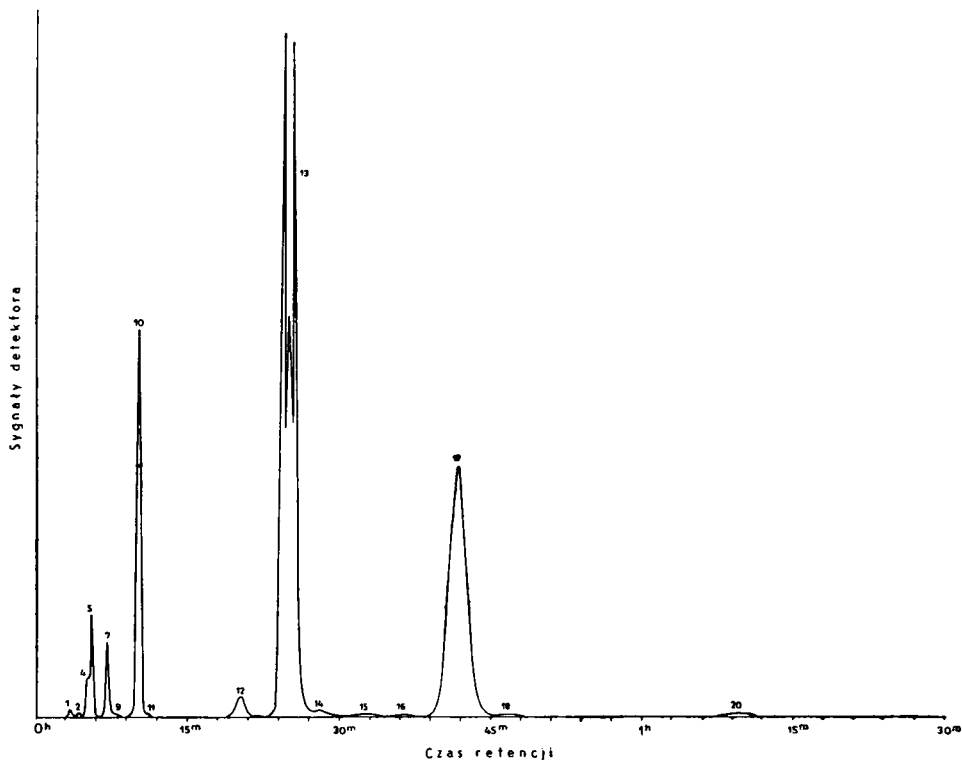
Ryc. 1c. Chromatogram gazowy olejku z owoców dojrzałych suchych; nr 7 — limonen, nr 12 — fenchon, nr 20 — terpineol, nr 23 — eugenol i inne niezidentyfikowane; warunki jak na ryc. 1a

Gas chromatogram of oil from ripe dry fruit; No. 7 — limone, No. 12 — fenchone, No. 20 — terpineol, No. 23 — eugenol and other unidentified components; conditions as in Fig. 1a

zachowaniu pozostałych parametrów. W efekcie analizy na przedłużonej kolumnie uzyskano znacznie lepszy rozdział związków węglowodorowych. Składniki tlenowe rozsunęły się równomiernie, przez co nastąpił wyraźny rozdział pików i zwiększył się przy tym czas retencji związków. Po dwugodzinnym czasie rozwijania otrzymano piki wszystkich związków za wyjątkiem eugenolu, który w tych warunkach wykazał sygnał na detektorze dopiero po 8 godzinach. Ryciny 2a, 2b, 2c przedstawiają chromatogramy olejku, otrzymane przy zastosowaniu kolumny 4-metrowej.

Znacznie lepszy w tych warunkach rozdział składników olejku pozwolił na identyfikację dalszych związków: pik nr 19 określono jako metylo-

chawikol, nr 9 jako cineol, nr 6 jako kamfen, nr 3 jako β -pinen i nr 2 jako α -pinen. Wyłoniły się nowe piki niewidocznych przedtem związków węglowodorowych i tlenowych. Liczba rozdzielonych składników wzrosła do 16 + eugenol w próbce a olejku, do 19 + eugenol w próbce b olejku i do 22 + eugenol w próbce c.



Ryc. 2a. Chromatogram gazowy olejku z owoców niedojrzałych świeżych; warunki — kolumna 4 m, wypełnienie celite 545 + Reoplex (83:17), temp. 140°C, ciśnienie gazu nośnego (N₂) — 1 atm., detektor płomieniowo-jonizacyjny, czułość 1/64, przesuw taśmy 200 mm/hr

Gas chromatogram of oil from unripe fresh fruit; conditions — 4 m column, filling with Celite 545 + Reoplex (83:17), temp. 140°C, carrier gas pressure (N₂) 1 atmosphere, flame ionization detector, sensitivity 1/64, movement of record sheet 200 mm/hr

Na chromatogramach uwidoczniły się zmiany ilościowe składników olejku, związane z suszeniem i dojrzewaniem owoców. Dla lepszego ich zobrazowania obliczono procentowe zawartości związków metodą iloczynu wysokości pasma wymywania i odległości od linii startu (2). Przyjmując za 100% sumę wszystkich pików z ryzykiem 1,25% błędu,

obliczono zawartość poszczególnych składników. Skład ilościowy trzech próbek olejku analizowanych na kolumnach dł. 1 m i 4 m przedstawia tab. 1.

Tab. 1. Procentowa zawartość składników olejku z owoców *Chaerophyllum hirsutum* oznaczona metodą chromatografii gazowej
Per cent content of components of volatile oil from *Chaerophyllum hirsutum* fruit as determined by gas chromatography

Lp.	Składniki	I kolumna dł. 1 m			II kolumna dł. 4 m		
		a	b	c	a	b	c
1.	nieznany	ślady	0,04	—	ślady	0,04	0,29
2.	α -pinen	ślady	2,22	1,92	0,02	2,20	1,93
3.	β -pinen	—	0,52	0,41	—	0,53	0,37
4.	nieznany	0,76	2,28	3,87	0,78	2,28	3,81
5.	nieznany	—	2,86	2,01	1,11	2,84	2,02
6.	kamfen	—	—	—	—	—	0,26
7.	limonen	1,11	3,64	3,69	1,10	3,65	3,45
8.	nieznany	—	—	—	—	—	0,32
9.	cineol	—	0,46	3,01	0,02	0,47	2,89
10.	nieznany	8,12	7,47	2,25	8,10	7,42	2,20
11.	nieznany	0,06	0,21	0,14	0,07	0,20	0,14
12.	fenchon	0,87	0,31	0,13	0,88	0,31	0,13
13.	nieznany	48,01	46,78	52,86	46,62	45,48	52,32
14.	nieznany	—	—	—	0,43	0,35	0,36
15.	nieznany	—	0,32	0,39	0,30	0,32	0,40
16.	nieznany	—	1,08	—	0,23	1,10	0,35
17.	nieznany	21,23	7,71	3,78	20,51	6,65	3,28
18.	nieznany	0,39	3,49	0,78	0,39	3,55	0,77
19.	metylochawikol	—	—	2,47	—	—	2,51
20.	terpineol	0,64	3,05	3,79	0,64	3,03	3,79
21.	nieznany	—	0,96	1,60	—	0,95	1,51
22.	nieznany	—	1,11	0,58	—	1,14	0,58
23.	eugenol	18,80	17,49	16,32	18,80*)	17,49*)	6,32*)

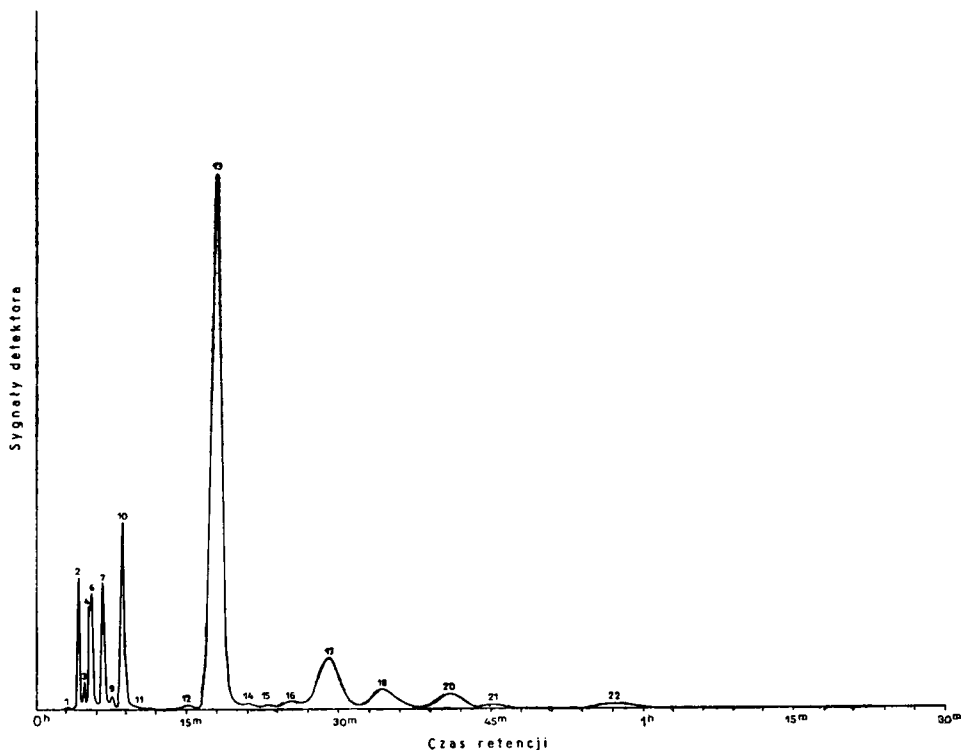
*) Zawartość eugenolu przyjęto na podstawie wyników uzyskanych na kolumnie jednometrowej.

*) Content of eugenol was accepted on the basis of the results obtained on the one-meter column.

WYNIKI I WNIOSKI

Olejek z owoców niedojrzałych otrzymany tuż po zbiorze zawiera 17 związków (ryc. 2a), przy czym główny składnik nr 13 występuje w ilości 46,62%. Poza tym olejek ten zawiera duże ilości związku nr 17 (20,51%) oraz eugenolu (18,80%), natomiast mało związków węglowodo-

rowych. Po wysuszeniu owoców niedojrzałych ilość składników olejku wzrasta do 20 (ryc. 2b), gdyż pojawiają się nowe związki węglowodorowe (β -pinen) i tlenowe (nr 21 i nr 22). Podobnie przedstawia się skład olejku z owoców dojrzałych, liczba składników wzrasta tu do 23 (ryc. 2c), gdyż przybywają nowe związki: kamfen i metylochawikol.



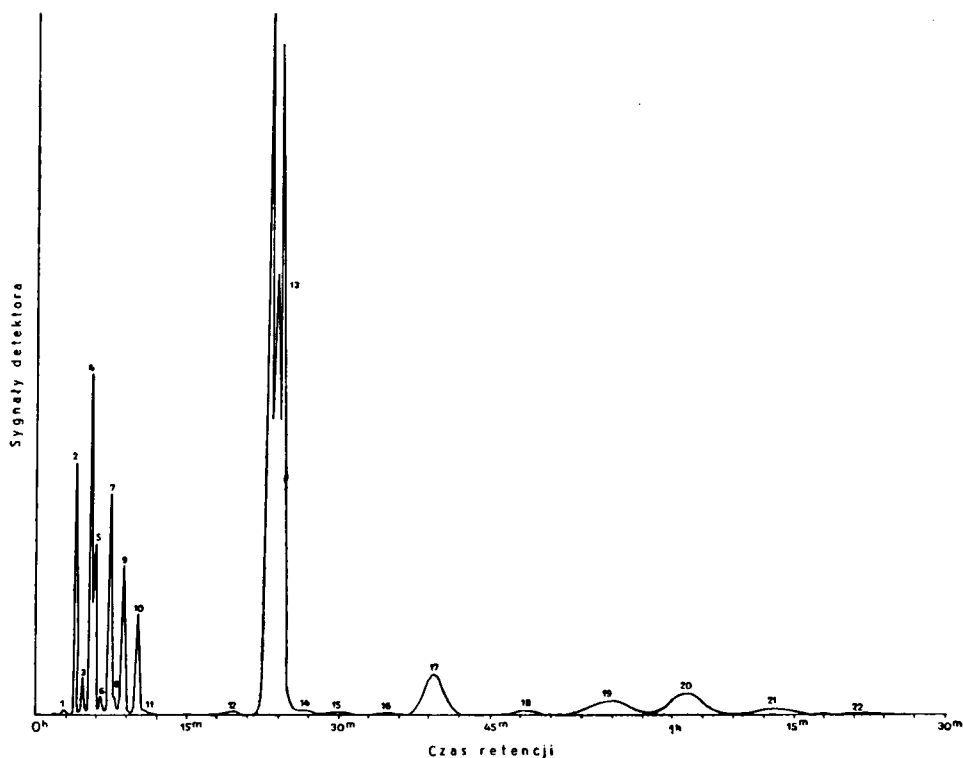
Ryc. 2b. Chromatogram olejku z owoców niedojrzałych suchych; warunki jak na ryc. 2a

Gas chromatogram of oil from unripe dry fruit; conditions as in Fig. 2a

Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono, że podczas suszenia owoców niedojrzałych, a jeszcze bardziej w czasie dojrzewania wzrasta liczba składników olejku. Zwiększa się przy tym procentowa zawartość takich związków jak α -pinen, związek nr 4, nr 5, limonen, cineol, terpineol (tab. 1). Spada natomiast zawartość związków nr 10, nr 17, fenchonu oraz nieznacznie eugenolu. Ilość głównego składnika nr 13, którego nie udało się zidentyfikować, wzrasta przy dojrzewaniu owoców.

Najbogatszym w składniki jest olejek z owoców dojrzałych, gdyż zawiera on takie związki, jak metylochawikol, kamfen i związek nr 8, które nie występują w olejku z owoców niedojrzałych.

Otrzymane wyniki składu jakościowego olejku potwierdzają rezultaty badań przedstawionych w cz. I naszej pracy (1). Analiza chromatograficzna potwierdziła obecność 19 składników, wykrytych przy pomocy chromato-



Ryc. 2c. Chromatogram gazowy olejku z owoców dojrzałych suchych; nr 2 — α -pinen, nr 3 — β -pinen, nr 6 — kamfen, nr 7 — limonen, nr 9 — cineol, nr 12 — fenchon, nr 19 — metylochawikol, nr 20 — terpineol i inne niezidentyfikowane; warunki jak na ryc. 2a

Gas chromatogram of oil from ripe dry fruit; No. 2 — α -pinene, No. 3 — β -pinene, No. 6 — camphene, No. 7 — limone, No. 9 — cineole, No. 12 — fenchone, No. 19 — methylchavicol, No. 20 — terpineol, and other unidentified components; conditions as in Fig. 2a

grafii cienkowarstwowej, i wykazała obecność dalszych czterech oraz pozwoliła zidentyfikować nowe związki. Olejek z owoców dojrzałych zawiera: α -pinen, β -pinen, kamfen, limonen, cineol, fenchon, metylochawikol, terpineol i eugenol oraz 14 związków jeszcze nie określonych. W badaniu olejku niezbędne jest równoczesne stosowanie obu metod chromatograficznych. Należy również dokładnie podać porę zbioru, stopień dojrzałości owoców, oraz zaznaczyć, czy olejek otrzymano ze świeżego, czy też suszonego materiału.

PIŚMIENICTWO

1. Kudrzycka-Biełoszabska F. W., Główniak K.: Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, sec. D, 25, 323—331, 1970.
2. Nogare S. D., Juvet R. S.: Gazo-żydkostnaja chromatografia, NEDRA, Leningrad, 267, 1966.
3. Sikorski Z.: Chromatografia gazowa w analizie żywności, 7, WPL, Warszawa 1964.

Otrzymano 11.IV.1970.

РЕЗЮМЕ

Исследовали *Oleum Chaerophylli* из свежих незрелых фруктов длиной от 5 до 7 мм (а), этих же фруктов, но высушенных в течение 3 дней (b) и из спелых высушенных фруктов (с) методом газовой хроматографии. В результате анализа масло разделили соответственно на 12, 18 и 19 компонентов (рис. 1а, 1b, 1с) при помощи колонны длиной 1 м и 17, 20, 23 компонента при помощи колонны длиной 4 м (рис. 2а, 2b, 2с). Содержание компонентов, часть которых была идентифицирована в зависимости от степени развития и сушки фруктов, было разное: α -пинен — 0,02—2,02%; β -пинен — 0,37—0,53%; камфен — 0,26%; лимонен — 1,10—3,69%; цинеол — 0,02—3,01%; фенхон — 0,13—0,88%; метилхавикол — 2,51%; терпинеол — 0,64—3,79% и эвгенол — 16,32—18,80%. Оставшиеся 14 компонентов не удалось идентифицировать в виду отсутствия стандартов. Главный компонент 13 выступает в количестве 45,48—52,86%. Доказано, что во время дозревания фруктов и последующей их сушки возрастает количество компонентов масла от 17 (незрелые фрукты) до 23 (спелые сушеные фрукты) и процентное содержание таких соединений: α -пинена, лимонена, цинеола и соединений 4 и 5. Зато понижается содержание фенхона, компонента 17 и 10 и незначительно эвгенола. Камфен и метилхавикол присутствуют только в спелых фруктах.

SUMMARY

Oleum Chaerophylli from green fruit of a length of 5—7 mm was examined by means of gas chromatography a) immediately after harvesting, b) after 3 days of drying and c) in ripe dried fruit.

As a result of analysis the volatile oil was separated into 12, 18 and 19 components on the one-meter column (Fig. 1a, 1b, 1c) and into 17, 20 and 23 components on the four-meter column (Fig. 2a, 2b, 2c).

The content of partially identified components varied in relation to the development and dryness of fruit and amounted to: α -pinene from 0.02 to 2.02%, β -pinene 0.37—0.53%, camphene 0.26%, limone 1.10—3.69%, cineole 0.02—3.01%, fenchone 0.13—0.88%, methylchavicol 2.5%, terpineol 0.64—3.79% and eugenol 16.32—18.80%. 14 other oil components were not identified. The unidentified component No. 13 appeared in the amount of 45.48—52.86%.

It was stated that during the ripening of fruit and then during their drying the number of oil components increased from 17 (green fruit) to 23 (dry ripe fruit) as well as the per cent content of such components as: α -pinene, limone, cineole, and the components No. 4 and 5. On the other hand, the content of fenchone, the components No. 17 and 10, and slightly of eugenol decreased. Camphene and methylchavicol appeared only in ripe fruit.