

## КОМПОНЕНТНЫЙ СОСТАВ ЭКСТРАКТА ШИШКОЯГОД МОЖЖЕВЕЛЬНИКА ПРОДОЛГОВАТОГО, ПОЛУЧЕННОГО ЭКСТРАКЦИЕЙ СВЕРХКРИТИЧЕСКИМ ДИОКСИДОМ УГЛЕРОДА

<sup>1,2</sup>А. М. Алиев\*, <sup>1</sup>Г. К. Раджабов, <sup>2</sup>Г. В. Степанов

<sup>1</sup>Горный ботанический сад ДНЦ РАН, Махачкала, Россия

<sup>2</sup>Институт физики ДНЦ РАН, Махачкала, Россия

\*aslan4848@yahoo.com

Поступила в редакцию 16.05.2011 г.

Проведена экстракция сверхкритическим СО<sub>2</sub> компонентов созревших шишкоягод можжевельника продолговатого (*Juniperus oblonga* M. Bieb.), произрастающего в Республике Дагестан (Россия) на высоте 1750 м над уровнем моря. Экстракцию проводили при постоянной температуре 311 К и давлениях 8, 10, 15, 20, 25 и 30 МПа. Полученный при давлении 10 МПа экстракт проанализирован на хромато-масс-спектрометре. Идентифицировано 43 из 44 обнаруженных соединений. Основные соединения в проанализированном экстракте: α-пинен (7,11 %), сабинен (19,47 %), β-мирцен (11,97 %), лимонен (2,64 %), β-элимин (2,31 %), гермакрен-D (20,66 %), гермакрен-D-4-ол (4,90 %), бисаболол (2,78 %), линолевая кислота (5,28 %).

К л ю ч е в ы е с л о в а: можжевельник продолговатый, сверхкритическая экстракция, хромато-масс-спектрометрия, компонентный анализ.

### ВВЕДЕНИЕ

Можжевельник продолговатый — вечнозеленое хвойное кустарниковое растение семейства Кипарисовые (*Cupressaceae*) высотой 1—8 м, произрастает в умеренном климате. Сегодня насчитывается 68 видов и 36 разновидностей можжевельника [1]. На территории России произрастает 14 видов можжевельника, которые встречаются на Урале, в горах Сибири и Дальнего Востока, равнинных лесах севера, европейской и азиатской частей страны. Во флоре Кавказа встречаются 8 видов можжевельника, из них 6 видов в Дагестане, и одним из самых распространенных является можжевельник продолговатый [2—4]. Несмотря на широкое распространение видов можжевельника в настоящее время в медицинской практике применяется только можжевельник обыкновенный (*Juniperus Communis* L.) и только в качестве диуретического средства, но он не обеспечивает сырьем потребности медицинской промышленности [5]. В связи с этим становится актуальной задача поиска дополнительных сырьевых ресурсов и освоения новых, высокотехнологичных, экологичных и перспективных методов, способных повысить эффективность переработки ценного растительного сырья. К их числу относится обработка лекарственного растительного сырья сжиженными газами и сверхкритическими (СК) флюидами, примером которой является экстракция сырья сверхкритическим диоксидом углерода [6, 7].

**Компонентный состав экстракта шишкоягод можжевельника продолговатого, полученного экстракцией сверхкритическим диоксидом углерода**

Сверхкритическая экстракция обладает рядом преимуществ по сравнению с другими способами экстракции: исключается проблема остаточного растворителя в экстракте; обеспечиваются быстрота процесса, экологичность, высокий выход конечного продукта, низкая температура экстракции; процесс экстракции протекает без контакта с кислородом воздуха, что позволяет экстрагировать окисляемые соединения.

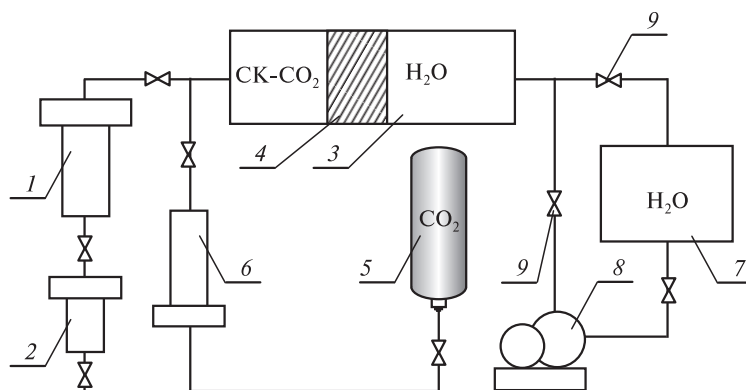
Целью нашей работы является изучение процессов сверхкритической  $\text{CO}_2$  экстракции биологически активных веществ из можжевельника продолговатого и определение компонентного состава полученного экстракта. В литературе нет таких данных, но встречаются результаты исследований эфирных масел плодов и хвои методом хроматомасс-спектрометрии, а также их антиоксидантной активности [8—15].

В данной работе приведены результаты сверхкритической  $\text{CO}_2$  экстракции из созревших шишкоягод можжевельника продолговатого и компонентный состав полученного экстракта. При анализе экстракта методом хроматомасс-спектрометрии было идентифицировано 43 из 44 обнаруженных соединений. Определен выход эфирного масла из можжевельника продолговатого.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Созревшие шишкоягоды можжевельника продолговатого были собраны в ноябре на высоте 1750 м над уровнем моря в Республике Дагестан и высушены в тени в проветриваемом помещении при температуре 308—311 К.

Экстракцию проводили на экспериментальной установке (рис. 1), которая позволяет осуществлять комплексные исследования процессов экстракции при давлениях до 40 МПа, в диапазоне температур 298—373 К. Измельченное до размеров 0,3—0,5 мм сырье загружается в экстрактор 1, куда подается диоксид углерода в СК состоянии из силового цилиндра 3, и настаивается в течение 10 мин. После этого  $\text{CO}_2$  с растворенным экстрактом выводится в сепаратор 2; одновременно в экстрактор из силового цилиндра подается чистый  $\text{CO}_2$ . В сепараторе поддержива-



**Рис. 1.** Принципиальная схема экспериментальной установки для экстракции сверхкритическим  $\text{CO}_2$ :

1 — экстрактор; 2 — сепаратор; 3 — силовой цилиндр; 4 — разделительный поршень; 5 — баллон с  $\text{CO}_2$ ; 6 — фильтр очистки  $\text{CO}_2$ ; 7 — емкость с дистиллированной водой; 8 — дозирующий насос высокого давления; 9 — вентили

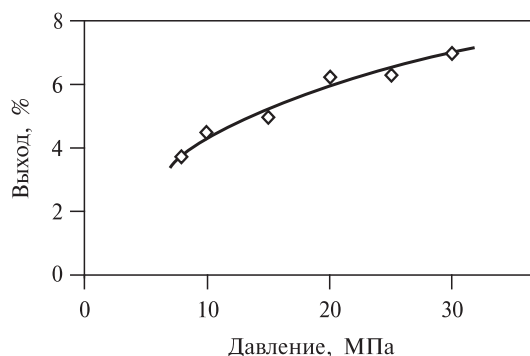
ются температура не выше 243 К и давление 0,5 МПа, при которых происходит разделение экстракта и газообразного  $\text{CO}_2$ . Давление в системе создается насосом 8, который подает дистиллированную воду из резервуара 7 в силовой цилиндр, в котором  $\text{CO}_2$  сжимается и достигается необходимое давление. В силовом цилиндре вода отделена от  $\text{CO}_2$  поршнем 4.

Экстракцию проводили при давлениях 8, 10, 15, 20, 25 и 30 МПа. Для каждого эксперимента использовали новую порцию сырья из одной выборки влажностью 13,1 %. Температура в экстракторе была постоянной и равной 311 К во всех опытах.

Компонентный состав экстракта определяли методом газо-жидкостной хроматографии на приборе Saturn 2000 (Varian, США) с масс-спектрометрическим детектором типа «ионная ловушка» на колонке Stabilwax (длина 30 м, внутренний диаметр 0,32 мм, толщина слоя неподвижной фазы 0,5 мкм). Температуру колонки поднимали от 40 °С (выдержка 2 мин) до 190 °С со скоростью 5 °С/мин, далее до 280 °С со скоростью 3 °С/мин. Температура инжектора и обогреваемого переходника между термостатом хроматографа и масс-спектральным детектором 250 °С. Ионизация электронным ударом с энергией электронов 70 эВ в режиме автоматической установки времени ионизации (AGC). Ток эмиссии катода 10 мкА, диапазон регистрируемых ионов с  $m/z$  45—650. Идентификация компонентов фракции проводилась с использованием алгоритмов поиска по библиотекам масс-спектров NIST и WILEY в режиме стандартного поиска. Идентифицированные соединения имели величину параметра совпадения анализируемого масс-спектра с библиотечным более 700. Калибровка масс-спектрометра (количественная обработка данных) проводилась методом нормализации полного ионного тока детектированных соединений. В качестве стандартов использовались анетол и цимол [16]. Проба перед анализом разводилась в метаноле в 1000 раз. 1 мкл разведенной пробы вводился в хроматограф с делением потока 1:40.

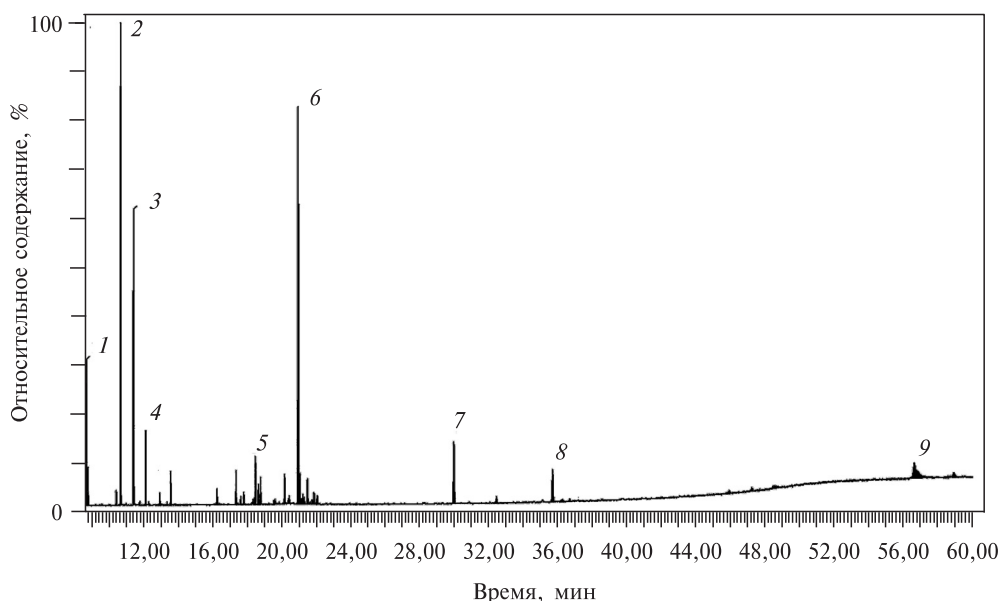
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 2 приведены результаты определения выхода экстрактивных веществ из шишкоягод можжевельника продолговатого при различных давлениях и постоянной температуре 311 К. Максимальный выход 7 % экстрактивных веществ от общей массы сырья был достигнут при давлении 30 МПа. Выход эфирного масла составил 1,54 %.



**Рис. 2.** Зависимость выхода экстрактивных веществ из шишкоягод можжевельника продолговатого от давления при температуре 311 К

**Компонентный состав экстракта шишкоягод можжевельника продолговатого, полученного экстракцией сверхкритическим диоксидом углерода**



**Рис. 3.** Хроматограмма экстракта шишкоягод можжевельника продолговатого:  
1 —  $\alpha$ -пинен; 2 — сабинен; 3 —  $\beta$ -мирцен; 4 — лимонен; 5 —  $\beta$ -элемин; 6 — гермакрен-D; 7 — гермакрен-D-4-ол; 8 — бисаболол; 9 — линолевая кислота

При анализе экстракта, полученного при температуре 311 К и давлении 10 МПа, методом хроматомасс-спектрометрии обнаружено 44 соединения (хроматограмма исследуемого экстракта приведена на рис. 3); из них идентифицировано 43 (см. таблицу). Как основные компоненты в экстракте определены:  $\alpha$ -пинен (7,11 %), сабинен (19,47 %),  $\beta$ -мирцен (11,97 %), лимонен (2,64 %),  $\beta$ -элимин (2,31 %), гермакрен-D (20,66 %), гермакрен-D-4-ол (4,90 %), бисаболол (2,78 %), линолевая

Таблица

**Компонентный состав экстракта шишкоягод можжевельника продолговатого, полученного методом экстракции сверхкритическим CO<sub>2</sub>**

Соединение	Время удерживания	Содержание в экстракте, %
$\alpha$ -Пинен	8,74	7,11
$\alpha$ -Туйен	8,83	1,67
(+)- $\beta$ -Пинен	10,45	0,63
(+)-Сабинен	10,71	19,47
$\beta$ -Мирцен	11,46	11,97
$\alpha$ -Терпинолен	11,82	0,16
Лимонен	12,16	2,64
$\beta$ -Фелландрен	12,34	0,11
$\gamma$ -Терпинен	12,97	0,55
p-Цимол	13,40	0,12
Терпинолен	13,60	1,29

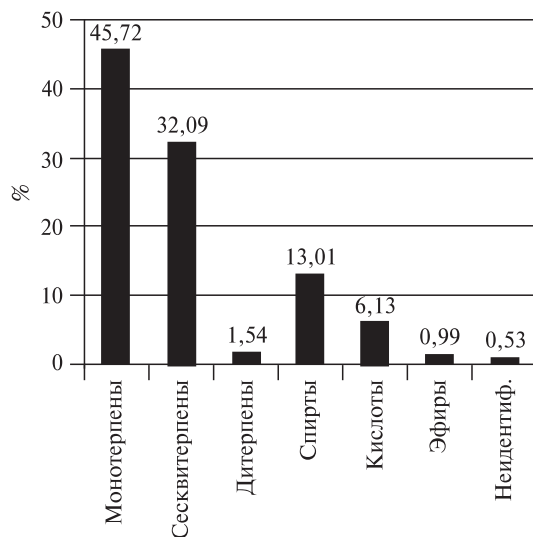
Окончание таблицы

Соединение	Время удерживания	Содержание в экстракте, %
Цис-бета-терпинеол	16,29	0,73
Цис-сабинен гидрат ацетат	17,39	1,45
4-Туянол, стереоизомер	17,65	0,39
Метил цитронеллат	17,83	0,50
Борнилацетат	18,37	0,30
$\beta$ -Элемин	18,50	2,31
4-Терпинеол	18,68	1,01
$\beta$ -Кариофиллен	18,80	1,30
Цитронеллол ацетат	19,57	0,19
$\beta$ -Фернезен	19,64	0,23
$\alpha$ -Кариофиллен	20,20	1,57
$\alpha$ -Терпинеол	20,42	0,25
Копаен	20,46	0,40
Гермакрен-D	20,98	20,66
$\beta$ -Бисаболен	21,08	1,56
$\alpha$ -Мууролен	21,18	0,39
8-Изопропенил-1,5-диметил-циклодека-1,5-диен	21,24	0,60
$\alpha$ -Селинен	21,33	0,44
Бициклогермакрен	21,52	1,46
$\alpha$ -Фарнезин	21,78	0,28
$\Delta$ -Кадинен	21,90	0,66
$\gamma$ -Кадинен	22,04	0,23
Не идентифицировано	22,09	0,53
Гермакрен-D-4-ол	29,98	4,90
Спауленол	32,45	0,68
Бисаболол	35,69	2,78
T-Мууролол	36,27	0,47
19-D-Торулосол	36,68	0,26
Абиетатрин	45,91	0,39
1-(4-гидроокси-7-изопропил-4-метил-октагидро-1h-инден-1-ил)етанола	47,21	0,35
Олеиновая кислота	48,61	0,85
Линолевая кислота	56,61	5,28
Криптоинон	58,90	0,89

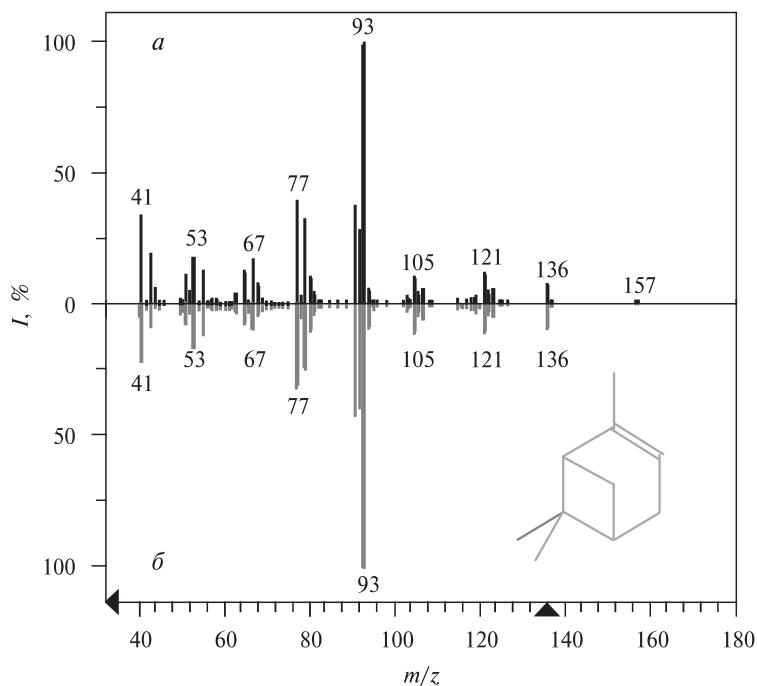
**Компонентный состав экстракта шишкоягод можжевельника продолговатого, полученного экстракцией сверхкритическим диоксидом углерода**

кислота (5,28 %). Процентное содержание соединений, принадлежащих к нескольким основным классам, показано на рис. 4.

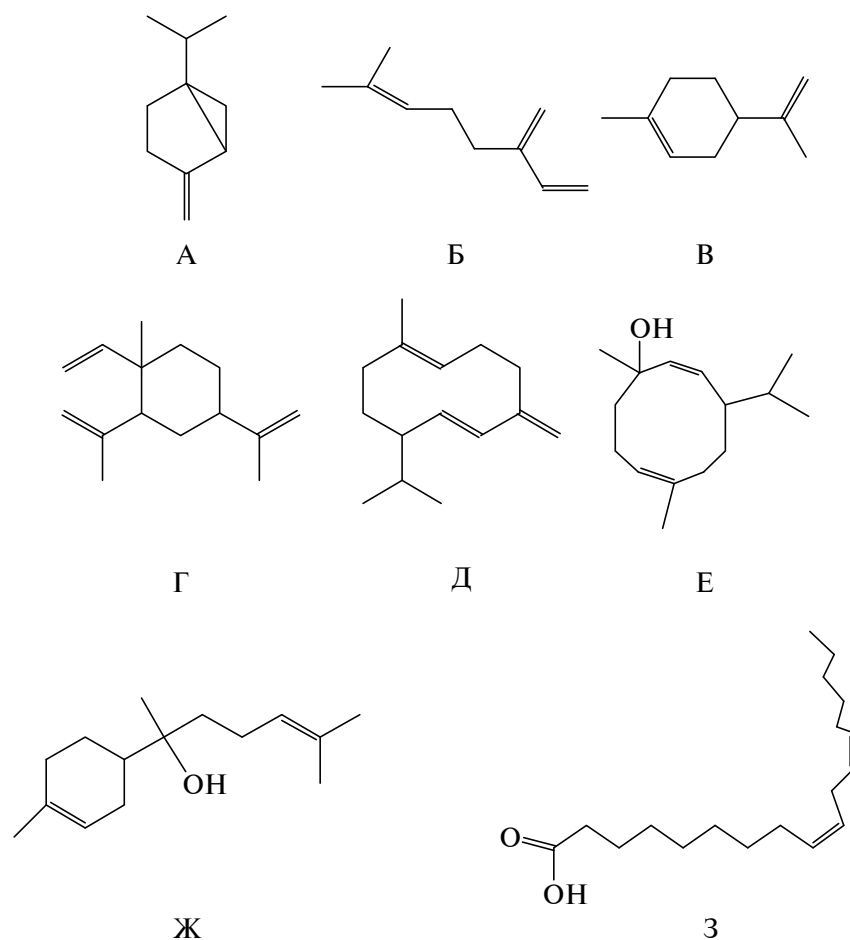
На рис. 5, 6 приведены структурные формулы основных компонентов СК-СО<sub>2</sub> экстракта; также на рис. 5 в качестве примера приведено сравнение масс-спектров



**Рис. 4.** Содержание основных классов соединений в СК-СО<sub>2</sub> экстракте шишкоягод можжевельника продолговатого, полученном при 311 К и 10 МПа



**Рис. 5.** Структурная формула и масс-спектры  $\alpha$ -пинена:  
*a* — полученный в данной работе; *б* — стандартный (воспроизведен из баз данных)



**Рис. 6.** Структурные формулы компонентов экстракта шишкоягод можжевельника продолговатого:

А — сабинен; Б —  $\beta$ -мирцен; В — лимонен; Г —  $\beta$ -элемин; Д — гермакрен-D; Е — гермакрен-D-4-ол; Ж — бисаболол; 3 — линолевая кислота

$\alpha$ -пинена, полученного в данной работе (а) и из библиотеки стандартных спектров (б).

Соединения, обнаруженные в СК-СО<sub>2</sub> экстракте можжевельника продолговатого, обладают рядом уникальных свойств. Так, например,  $\alpha$ -пинен обладает антибактериальными и противогрибковыми свойствами, оказывает дозозависимый антимутагенный эффект, то есть предупреждает мутации, вызванные УФ-излучением, входит в состав препаратов для лечения УФ-индуцированного рака кожи, эффективен при лечении дыхательных путей; вместе с  $\beta$ -пиненом используется для синтеза феромонов [17–20].

Сабинен обладает активностью в отношении ацетилхолинэстеразы и бутирилхолинэстеразы [21], является эффективным средством для создания репеллентов нового поколения [22].

$\beta$ -Мирцен широко применяется для производства ароматизаторов для косметической, пищевой промышленности и бытовой химии. Фармакологические исследования на лабораторных грызунах показали, что  $\beta$ -мирцен в больших количе-

ствах может вызвать почечный канцерогенез [23, 24]. По запаху  $\beta$ -мирцен с  $\alpha$ -,  $\beta$ -пиненами и  $\beta$ -фелландреном весьма близок к феромону тревоги тли, и тем самым растение отпугивает ее [25].

Лимонен широко применяется в парфюмерной и косметической промышленности, в производстве ароматизаторов, является хорошим инсектицидом [26, 27].

$\beta$ -Элимин используется для лечения раковых опухолей, в том числе головного мозга, печени и пищевода. Данное вещество не приводит к изменению костного мозга и не сокращает количество лейкоцитов, что является общими побочными действиями обычных антираковых препаратов.  $\beta$ -Элимин является ингибитором апоптоза (спонтанной гибели) клеток [28].

Гермакрен-D, по данным [29, 30], является предшественником таких сесквитерпенов, как кадинен, селинен. Запах его привлекает одни виды насекомых и отпугивает другие, обеспечивая химическую регуляцию коммуникации насекомых [31, 32]; обладает антибактериальным свойством; используется как ароматизатор [33].

Бисаболол применяется как успокаивающее раздраженную кожу вещество, в противовоспалительных и антибактериальных целях, а также в парфюмерии [34, 35]. В последние годы бисаболол используют для борьбы со злокачественными опухолями и лейкозом [36, 37].

Линолевая и олеиновая кислоты обладают отпугивающим насекомых запахом [38, 39]. Они также широко применяются в косметической промышленности. Конъюгированная линолевая кислота предотвращает и тормозит развитие рака молочной железы [40].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Экстракт шишкоягод можжевельника продолговатого, получаемый экстракцией сверхкритическим  $\text{CO}_2$ , содержит монотерпены, сесквитерпены, дитерпены, спирты, кислоты, эфиры. В качестве основных компонентов в экстракте обнаружены  $\alpha$ -пинен, сабинен,  $\beta$ -мирцен, лимонен,  $\beta$ -элимин, гермакрен-D, гермакрен-D-4-ол, бисаболол, линолевая кислота. Благодаря богатому химическому составу СК- $\text{CO}_2$  экстракт шишкоягод можжевельника продолговатого может найти применение в медицине (в том числе для лечения и профилактики раковых заболеваний), в пищевой, косметической промышленности и для создания эффективных, экологически чистых репеллентов нового поколения.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Robert P. Adams, Ram N. Pandey. Biochemical Systematics and Ecology. 2003. Vol. 31. P. 1271.
2. Алексеев Ю.Е., Жмылёв П.Ю., Карпухина Е.А. Деревья и кустарники: Энциклопедия природы России. М.: АБФ, 1997. 592 с.
3. Гроссгейм А.А. Растительные богатства Кавказа. М.: Советская наука, 1952. 632 с.
4. Исмаилов М.И. Ботанико-географический обзор можжевельников в связи с их происхождением и развитием // Вопросы экологии и географии растений. Душанбе, 1974. С. 3.
5. Государственная фармакопея СССР. Вып. 2. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье. МЗ СССР. 11-е изд., доп. М.: Медицина, 1991. 397 с.
6. Зильфикаров И.Н., Челомбитько В.А., Алиев А.М. Обработка лекарственного растительного сырья сжиженными газами и сверхкритическими флюидами. Пятигорск, 2007. 244 с.
7. Зильфикаров И.Н., Алиев А.М. СКФ-ТП. 2008. Т. 3. № 2. С. 43.
8. Robert P. Adams. Biochemical Systematics and Ecology. 2000. Vol. 28. P. 515.
9. Emami S.A., Asili J., Mohagheghi Z., Hassanzadeh M.K. eCAM. 2007. Vol. 4 (3). P. 1.



10. *Angioni A., Barra A., Russo M.T., Coroneo V., Dessi S., Cabras P. J.* Agric Food Chem. Issue 10. 2003. Vol. 51. No. 7. P. 3073.
11. *Emami S.A., V. Javadi M.K.* Pharmaceutical Biology. 2007. Vol. 45. No. 10. P. 1.
12. *Писарев Д.И.* Фармакогностическое изучение можжевельника длиннохвойного и можжевельника казацкого. Дис. ... канд. фарм. наук. Пятигорск, 2005.
13. *Писарев Д.И., Денисенко О.Н.* Фармация. 2005. № 1. С. 12.
14. *Robert P. Adams.* Juniperus of the World: The genus *Juniperus*. 2<sup>nd</sup> ed. Vancouver: Trafford Publishing Co., 2008. P. 402.
15. *Butkiene R., Nivinskiene O., Mockute D.* Chemija. 2005. T. 16. Nr. 1. P. 53.
16. *Лебедев А.Т.* Масс-спектрометрия в органической химии. М.: Бином. Лаборатория знаний, 2003. 496 с.
17. *Ишмуратов Г.Ю., Яковлева М.П., Харисов Р.Я., Толстиков Г.А.* Успехи химии. 1997. № 12. С. 1095.
18. *Корсун В.Ф., Кубанова А.А., Соколов С.Я.* Фитотерапия аллергических заболеваний кожи. Минск: Полымя, 1998. 426 с.
19. *Лавренёв В.К., Лавренёва Г.В.* Полная энциклопедия лекарственных растений: В 2 т. СПб.: Изд. дом «Нева»; М.: ОЛМА-ПРЕСС, 1999. Т. 2. 816 с.
20. *Николайчук Л.В., Матусевич Н.М., Желясков Р.П.* Целебные деревья и кустарники. Минск: Современ. слово, 2002. 224 с.
21. *Menichini F., Tundis R., Loizzo M.R., Bonesi M., Marrelli M., Statti G.A., Menichini F., Conforti F.* Fitoterapia. 2009. Vol. 80. P. 297.
22. *Samira Sadek Garboui.* Plant-Derived Chemicals as Tick Repellents. Doctoral thesis. Digital Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Science and Technology. Uppsala (Sweden), 2008. 61 p.
23. NTP Technical Report on the Toxicology and Carcinogenesis Studies of  $\beta$ -myrcene (CAS No. 123-35-3). In F344/N RATS and B6C3F1 Mice (Gavage Studies).
24. National Institutes of Health Public Health Service U.S. Department of Health and Human Services. NTP TR 557. NIH Publication No. 09-5898. February 25. 2009.
25. *Stokl J., Brodmann J., Dafni A., Ayasse M., Hansson B.S.* Proc. Biol. Sci. 2011. Apr. 22; 278(1709):1216-22.
26. Пат. США 5565208 (1996).
27. *Hebeish A., Moustafa M.G. Fouda, Hamdy I.A., EL-Sawy S.M., Abdel-Mohdy F.A.* Carbohydrate Polymers. 2008. Issue 2. Vol. 74. P. 268.
28. Пат. США 6464839 (2002).
29. *Bulow N., Konig W.A.* Phytochemistry. 2000. Vol. 55. P. 141.
30. *Telascrea M., de Araujo C.C., Marques M.O.M., Facanali R., de Moraes P.L.R., Cavalheiro A.J.* Biochem. Syst. Ecol. 2007. Vol. 35. P. 222.
31. *Bruce T.J.A., Birkett M.A., Blande J., Hooper A.M., Martin J.L., Khambay B., Prosser I., Smart L.E., Wadhams L.J.* Pest Manag. Sci. 2005. Vol. 61. P. 1115.
32. *Rostelien T., Borg-Karlson A.-K., Faldt J., Jacobsson U., Mustaparta H.* Chem. Senses. 2000. Vol. 25 (2). P. 141.
33. <http://www.phenomenex.com/Compound?id=Germacrene+D>
34. *Russell K., Jacob S.E.* Dermatitis. 2010. Issue 21. Vol. 1. P. 57.
35. Пат. WO 2010000877(A2) (2010).
36. *Cavaliere E., Rigo A., Bonifacio M., Carcereri de Prati A., Guardalben E., Bergamini C., Fato R., Pizzolo G., Suzuki H., Vinante F.* J. of Translational Medicine. 2011. 9:45.
37. *Darra E., Lenaz G., Cavaliere E., Fato R., Mariotto S., Bergamini C., Carcereri de Prati A., Perbellini L., Leoni S., Suzuki H.* Ital. J. Biochem. 2007. Issue 56. Vol. 4. P.323.
38. *Anies Hannawati Purnamadajaja, R. Andrew Russell.* Pheromone communication in a robot swarm: necrophoric bee behaviour and its replication. Robotica. Cambridge University Press, 2005. P. 731.
39. *Yao M., Rosenfeld J., Attridge S., Sidhu S., Aksenov V., Rollo C.D.* J. of Evolutionary Biology. 2009. Vol. 36. No. 3. P. 267.
40. *Clement Ip, Sou Fei Chin, Joseph A. Scimeca, Michael W. Pariza.* Cancer Research. 1991. No. 15. P. 6118.

**COMPOSITION OF *JUNIPERUS OBLONGA M. BIEB.* FRUITS EXTRACT  
OBTAINED BY SUPERCRITICAL CO<sub>2</sub> EXTRACTION**

**<sup>1,2</sup>A.M. Aliev, <sup>1</sup>G.K. Radjabov, <sup>2</sup>G.V. Stepanov**

<sup>1</sup>*Mountain Botanical Garden DSC RAS, Makhachkala, Russia*

<sup>1,2</sup>*Institute of Physics DSC RAS, Makhachkala, Russia*

The extraction of *Juniperus oblonga M. Bieb.* fruits, growing in Dagestan (Russia) in a height of 1750 m above sea level, was obtained by means of supercritical CO<sub>2</sub> extraction. The extraction was carried out at constant temperature 311 K and pressures 8, 10, 15, 20, 25, and 30 MPa. Using the gas chromatography/mass spectrometry analysis, 43 compounds in the extract obtained at 10 MPa are identified. Among them the major components are:  $\alpha$ -pinene (7,11 %), sabinene (19,47 %),  $\beta$ -myrcene (11,97 %), limonene (2,64 %),  $\beta$ -elemene (2,31 %), germacrene-D (20,66 %), germacrene-D-4-ol (4,90 %), bisabolol (2,78 %), linoleic acid (5,28 %).

**Key words:** *Juniperus oblonga*, supercritical extraction, gas chromatography-mass spectrometry, component analysis.

---