



# Хроматографічне визначення летких сполук *Achillea micranthoides* Klok. et Krytzka

І. Ф. Дуюн<sup>ID</sup>\*A,C,D,F, С. В. Панченко<sup>ID</sup>B,E

Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, Україна

A – концепція та дизайн дослідження; B – збір даних; C – аналіз та інтерпретація даних; D – написання статті; E – редагування статті;  
F – остаточне затвердження статті

Процеси вільнорадикального окиснення відіграють важливу роль у патогенезі багатьох захворювань, тому застосування антиоксидантів є патогенетично виправданим і раціональним. Завдяки різноманітному вмісту біологічно активних речовин рослини роду *Achillea* L. виявляють антиоксидантну активність. Беручи до уваги особливості сировини та високу біологічну активність летких сполук, доцільним є дослідження перспективних видів роду *Achillea* L. – деревію подового (*Achillea micranthoides* Klok. et Krytzka), який значно поширений в Україні, має тривалий період вегетації та є перспективним для фармакогностичного вивчення.

**Мета роботи** – вивчити леткі сполуки екстракту деревію подового трави (*Achillea micranthoides* Klok. et Krytzka) і встановити їхній компонентний склад.

**Матеріали і методи.** За допомогою методу тонкошарової хроматографії та методу газової хромато-мас-спектрометрії на хроматографі Agilent Technology 7890 B визначили компонентний склад летких сполук *Achillea micranthoides* Klok. et Krytzka. Для ідентифікації компонентів проб використали бібліотеку мас-спектрів NIST14.

**Результати.** Ідентифікацію компонентів летких сполук здійснили методом тонкошарової хроматографії за допомогою етилацетатних витягів із листя та суцвіть виду, що досліджували. Як рухомих фаз використали етилацетат-толуол у співвідношенні (5:95). Методом газової хромато-мас-спектрометрії визначено наявність 30 летких сполук у траві *A. micranthoides* Klok. et Krytzka, серед них ідентифіковано 26 сполук, що становило 86,76 % від загальної кількості.

**Висновки.** Аналіз результатів свідчить, що домінуючими леткими сполуками в етанольному екстракті трави *A. micranthoides* Klok. et Krytzka є thymol (45,08 %),  $\gamma$ -terpinene (7,8 %) та *p*-сумене (7,69 %). Ці сполуки пропонуємо використовувати як маркерні під час стандартизації.

**Ключові слова:** *Achillea micranthoides* Klok. et Krytzka, газова хромато-мас-спектрометрія, леткі сполуки, етанольні екстракти.

**Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики.** 2024. Т. 17, № 1(44). С. 26-30

## Chromatographic determination of volatile compounds of *Achillea micranthoides* Klok. et Krytzka

I. F. Duiun, S. V. Panchenko

The processes of free radical oxidation are known to play a crucial role in the pathogenesis of many diseases. Therefore, the use of antioxidants is considered both pathogenetically justified and rational. Plants belonging to the genus *Achillea* L. are noted for their diverse content of biologically active substances, which contributes to their antioxidant activity. Given the availability of raw materials and the high biological activity of volatile compounds, it is particularly advisable to explore promising species within the genus *Achillea* L., such as yarrow (*Achillea micranthoides* Klok. et Krytzka). Yarrow is widespread in Ukraine, characterized by a long vegetation period, and holds promise for further pharmacognostic study.

**Aim.** The purpose of the work is to study the volatile compounds of the yarrow extract (*Achillea micranthoides* Klok. et Krytzka) and to establish their component composition.

**Materials and methods.** The Thin-Layer Chromatography (TLC) method and Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC/MS) on an Agilent Technology 7890 B chromatograph were employed to determine the component composition of volatile compounds in *Achillea micranthoides* Klok. et Krytzka. The NIST14 mass spectral library was utilized for identifying the components of the samples.

**Results.** Identification of volatile compound components was carried out by chromatography of ethyl acetate extracts from the leaves and inflorescences of the subject TLC in the mobile phase ethyl acetate – toluene (5:95). By the gas method Chromatography-mass spectrometry determined the presence of 30 volatile compounds of grass *A. micranthoides* Klok. et Krytzka, 26 of the compounds were identified, which accounted for 86.76 % of the total number of compounds.

### ARTICLE INFO



<http://pharmed.zsmu.edu.ua/article/view/292618>

UDC 615.322:582.998.16:577.19].074:543.544  
DOI: 10.14739/2409-2932.2024.1.292618

Current issues in pharmacy and medicine: science and practice. 2024;17(1):26-30

**Keywords:** *Achillea micranthoides* Klok. et Krytzka, gas chromatography-mass spectrometry, volatile compounds, ethanol extracts.

\*E-mail: [duyun77@ukr.net](mailto:duyun77@ukr.net)

Received: 04.12.2023 // Revised: 12.01.2024 // Accepted: 15.01.2024

**Conclusions.** Analysis of the data obtained showed that the dominant volatile compounds in the ethanolic extract of the herb *A. micranthoides* Klok. et Krytzka are: Thymol (45.08 %),  $\gamma$ -Terpinen (7.8 %), *p*-Cymene (7.69 %), which we propose to use as marker compounds when conducting standardization.

**Keywords:** *Achillea micranthoides* Klok. et Krytzka, gas chromato-mass-spectrometry, volatile compounds, ethanol extracts.

**Current issues in pharmacy and medicine: science and practice. 2024;17(1):26-30**

Відомо, що сучасний екологічний стан, радіаційне випромінювання, шкідливі звички, гіподинамія, неправильне харчування та стреси спричиняють накопичення в організмі надлишкової кількості вільних радикалів. Доведено участь вільнорадикальних механізмів у патогенезі атеросклерозу і його тромбонекротичних наслідків (інфаркт, інсульт), цукрового діабету, вікових змін, захворювань репродуктивної системи, онкологічних захворювань, а також зниження клітинного та гуморального імунітету [1].

Акумуляція вільних радикалів зумовлює збільшення ланцюгового перекисного окиснення, від якого захищають антиоксиданти [2]. Вони мають здатність запобігати окисненню біологічних структур організму вільними радикалами, що уповільнює процеси старіння та формування патологічних змін. Пріоритетним є використання природних антиоксидантів, які характеризуються м'якшою дією та нижчою токсичністю. Незважаючи на динамічний розвиток синтетичної хімії й активне впровадження нових препаратів, доцільним і перспективним є пошук нових субстанцій рослинного походження, здатних пригнічувати перекисне окиснення.

Перспективним об'єктом для фармакогностичного дослідження є трава *Achillea micranthoides* Klok. et Krytzka (син. *A. biebersteinii*) деревію подового, який має значне поширення та тривалий вегетаційний період [3].

Результати попередніх досліджень показали наявність антиоксидантної активності етанольного екстракту *Achillea micranthoides* Klok. et Krytzka [4], яка пов'язана з перериванням вільнорадикальних реакцій, що проходять на різних етапах оксидативного стресу. Біологічно активні сполуки, виділені з *Achillea micranthoides* Klok. et Krytzka, здатні виступати як скаведжери активних форм кисню та насамперед гідрофільних вільних радикалів. Зниження концентрації маркерів окиснювальної модифікації білка вказує на здатність екстрактивних речовин регулювати рівень гідрофільних вільних радикалів у клітині та свідчить про антиоксидантну дію досліджуваного екстракту [2].

У результаті попередніх досліджень встановили високий вміст поліфенольних сполук внаслідок накопичення під час вегетації. Ці сполуки характеризуються антиоксидантною активністю. Встановлено, що етанольні витяжки з трави *Achillea micranthoides* Klok. et Krytzka доцільно застосовувати як антиоксидантні засоби [5,6].

Відомо, що ще одним із класів біологічно активних сполук, які мають антиоксидантну активність, є леткі сполуки. Вони містять велику кількість різних за складом органічних сполук, основну масу яких становлять речовини ізопреноїдної структури – моно- і сесквітерпени, кисневмісні ароматичні сполуки: спирти, альдегіди,

кислоти, складні ефіри, лактони, а також вуглеводні та деякі гетероциклічні сполуки [7].

У доступних наукових джерелах недостатньо даних щодо хімічного складу, оскільки відомо, що леткі речовини представників родини *Achillea* L. використовують як антиоксидантні агенти [8,9,10].

### Мета роботи

Вивчити леткі сполуки екстракту деревію подового трави (*Achillea micranthoides* Klok. et Krytzka) і встановити їхній компонентний склад.

### Матеріали і методи дослідження

Як матеріал для дослідження обрали траву деревію подового з прилеглим листям. Сировину збирали на території Запорізької та Дніпропетровської областей протягом вегетаційного періоду (липень – жовтень) у 2019–2020 рр.

Ідентифікацію компонентів летких сполук здійснили методом тонкошарової хроматографії в рухомій фазі етилацетат-толуол (5:95). Витяги для хроматографування готували за визначеною методикою: до 2 г подрібненої на порошок сировини додавали 25 мл етилацетату, струшували протягом 5 хв, фільтрували та випарювали до сухого залишку на водяному огрівнику. Одержаний залишок розчиняли в 0,5 мл толуолу. Після висушування на повітрі хроматограми обробляли 1 % етанольним розчином анісового альдегіду та нагрівали за температури 100–105 °C протягом 3–5 хв. Компоненти летких сполук проявлялись як смуги червоного, синього або фіолетового кольору.

Етанольні екстракти готували методом дробної мацерації за такою методикою: 1,0 г (точна наважка) подрібненої рослинної сировини ( $d = 0,1$  мм) вносили в колбу ємністю 100 мл, додавали 25 мл спирту етилового 96 %, нагрівали на киплячому водяному огрівнику ВБ-4 місcomed ( $t = 70$ – $80$  °C) протягом 15 хв. Одержані витяги фільтрували в мірну колбу ємністю 100 мл. Екстракцію повторювали ще двічі за таких самих умов по 30 мл протягом 15 хв. Розчини охолоджували, об'єднані витяги фільтрували крізь фільтр «блакитна стрічка» у колбу ємністю 100 мл, запобігаючи потраплянню рослинної сировини на фільтр, який потім промивали 10 мл спирту етилового 96 %. До мірної колби ємністю 50 мл вносили 5 мл витягу і доводили об'єм тим самим розчинником до позначки.

Дослідження летких сполук здійснили методом газової хромато-мас-спектрометрії (ГХ/МС) [11].

Компонентний склад летких сполук проаналізували на хроматографі Agilent Technology 7890 В з мас-спектрометричним детектором 597 на мікрокапілярних колонках у

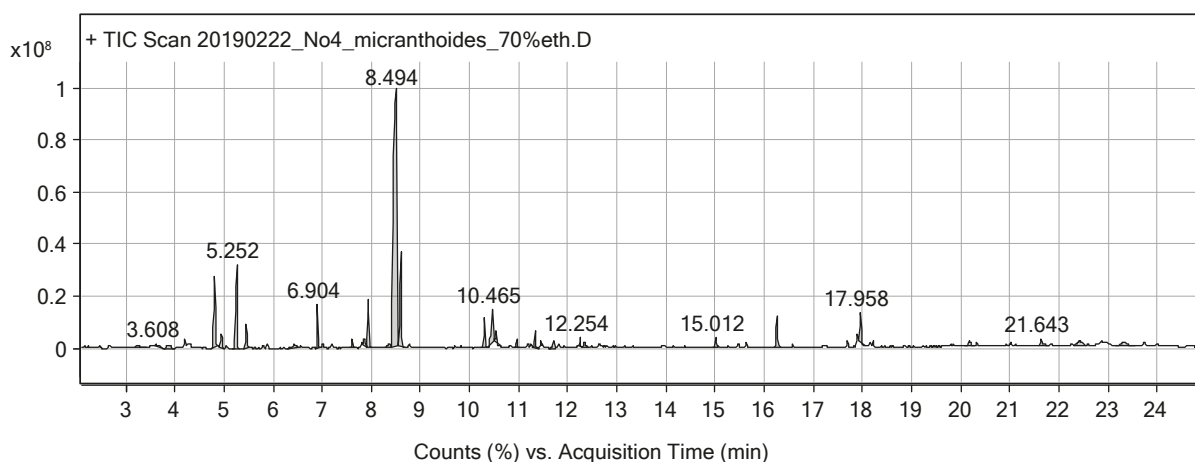


Рис. 1. Хроматограма етанольного екстракту *A. micranthoides* Klok. et Krytzka.

запрограмованому режимі. Хроматографічна колонка – DB-5ms завдовжки 30 м × 250 мкм × 0,25 мкм. Швидкість газу-носія (гелій) – 1,3 мл/хв. Об'єм інжекції – 0,5 мкл. Поділ потоку – 1:5. Температура блока введення проб – 200 °C → 12 °C/c → 265 °C. Температура термостата – програмована, 70 °C (затримка 1 хв) → 10 °C/хв → 270 °C (затримка 4 хв). Загальний час хроматографування – 25 хв. Температура інтерфейсу ГХ/МС – 275 °C, джерела іонів – 230 °C, квадрупольного мас-аналізатора

– 150 °C. Тип іонізації: EI при енергії електронів 70 eV. Діапазон масових чисел, що був сканований, – 30–700 m/z.

Для ідентифікації компонентів проб використана бібліотека мас-спектрів NIST14.

## Результати

Результати досліджень летких сполук методом ГХ/МС наведено на рис. 1 й у таблиці 1.

Таблиця 1. Газова хромато-мас-спектрометрія компонентів летких сполук *A. micranthoides* Klok. et Krytzka.

Висота піка, RT	Компонент летких сполук <i>A. micranthoides</i> Klok. et Krytzka	Кількісний вміст, %
3,227	Dihydroxyacetone	0,51
3,608	Tricyclo[2.2.1.0(2,6)]heptane, 1,3,3-trimethyl-	0,48
3,847	Camphene	0,67
4,811	<i>p</i> -Cymene	7,69
4,948	Eucalyptol	1,15
5,252	$\gamma$ -Terpinene	7,8
5,449	Bicyclo-hexan-2-ol	1,58
6,43	н/в	0,74
6,904	Bicyclo-heptan-2-o	2,64
7,612	Benzene	0,46
7,851	Ascaridole	0,78
7,937	Thymoquinone	4,52
8,364	н/в	0,46
8,494	Thymol	45,08
8,597	3-Methyl-4-isopropylphenol	6,42
10,304	Caryophyllene	2,73
10,465	<i>p</i> -Cymene-2,5-dio	3,19
10,542	Aromandendrene	0,54
10,964	Naphthalene	0,69

Продовження таблиці 1.

Висота піка, RT	Компонент летких сполук <i>A. micranthoides</i> Klok. et Krytzka	Кількісний вміст, %
11,329	$\delta$ -Bisabolene	1,22
11,719	1 <i>H</i> -Benzocycloheptene	0,78
12,254	1 <i>H</i> -Cyclopropazulen-7-ol	0,56
12,338	Caryophyllene oxide	0,49
15,012	Phytol acetate	0,59
16,261	<i>n</i> -Hexadecanoic acid	2,41
17,958	9,12,15-Octadecatrienoic acid	2,03
20,172	n/b	0,69
21,643	n/b	0,65
22,427	$\gamma$ -Sitosterol	1,14
23,33	Lupeol	1,3

## Обговорення

Для ідентифікації компонентів летких сполук використали метод хроматографії на тонкому шарі за допомогою етилацетатних витягів із листя та суцвіть досліджуваного виду. Як рухому фазу використали етилацетат-толуол у співвідношенні 5:95.

Після хроматографування з використанням 1 % етанолового розчину анісового альдегіду визначили зони забарвлення червоного, синього або фіолетового кольорів (різних відтінків). Інтенсивність забарвлення цих зон свідчила про наявність сполук терпенової природи в екстрактах.

Методом ГХ/МС визначено наявність 30 летких сполук у траві *A. micranthoides* Klok. et Krytzka, з них 26 ідентифіковано, що становило 86,76 % від загальної кількості. Виявили, що домінували такі компоненти, як thymol (45,08 %),  $\gamma$ -terpinene (7,8 %), *p*-cymene (7,69 %).

Згідно з відомостями фахової літератури, антиоксидантна активність властива таким біологічно активним сполукам, як thymol,  $\gamma$ -terpinene та *p*-cymene [12,13,14,15]. Враховуючи високу біологічну активність цих сполук, пропонуємо проводити стандартизацію саме за вмістом тимолу,  $\gamma$ -терпінену та цимену.

## Висновки

1. Методом тонкошарової хроматографії встановлено наявність летких сполук в етанольному екстракті трави *A. micranthoides* Klok. et Krytzka.

2. Дослідження летких сполук етанольного екстракту трави *A. micranthoides* Klok. et Krytzka здійснили методом ГХ/МС і визначили наявність в етанольному екстракті трави 30 сполук, 26 з яких ідентифіковані.

3. У результаті визначення частки кожної з ідентифікованих речовин у загальній сумі летких сполук встановлено: домінуючі леткі сполуки в етанольному екстракті трави *A. micranthoides* Klok. et Krytzka – тимол (45,08 %),  $\gamma$ -терпінен (7,8 %) та *p*-цимен (7,69 %). Ці сполуки пропонуємо використовувати як маркерні під час стандартизації.

**Перспективи подальших досліджень.** Леткі сполуки етанольного екстракту трави *A. micranthoides* Klok. et Krytzka мають антиоксидантну активність, тому їх високий вміст дає змогу визначити сировину *A. micranthoides* Klok. et Krytzka як перспективну для створення нових лікарських засобів.

## Фінансування

Дослідження виконане в рамках спільної комплексної роботи кафедри клінічної фармації, фармакотерапії, фармакогнозії та фармацевтичної хімії Запорізького державного медико-фармацевтичного університету.

**Конфлікт інтересів:** відсутній.

**Conflicts of interest:** authors have no conflict of interest to declare.

## Відомості про авторів:

Дуїн І. Ф., PhD, старший викладач каф. клінічної фармації, фармакотерапії, фармакогнозії та фармацевтичної хімії, Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, Україна.

ORCID ID: 0000-0003-1134-2543

Панченко С. В., канд. фарм. наук, старший викладач каф. фармакогнозії, фармакології та ботаніки, Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, Україна.

ORCID ID: 0000-0002-6668-1959

## Information about authors:

Duiun I. F., PhD, Senior Lecturer of the Department of Clinical Pharmacy, Pharmacotherapy, Pharmacognosy and Pharmaceutical Chemistry, Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, Ukraine.

Panchenko S. V., PhD, Senior Lecturer of the Department of Pharmacognosy, Pharmacology and Botany, Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, Ukraine.

## References

1. Navaie BA, Kavoosian S, Fattahi S, Hajian-tilaki K, Asouri M, Bishe-kolaie R, et al. (). Antioxidant and Cytotoxic Effect of Aqueous and Hydroalcoholic Extracts of the Achillea Millefolium L. on MCF-7 Breast Cancer Cell Line. IBBJ. 2016;1(3):119-25.
2. Belenichev IF, Bak PG, Popazova OO, Bukhtiyarova NV, Yadlovsky OE. Nitric oxide-dependent mechanism of endothelial dysfunction formation is a promising target link for pharmacological management. Biopolym Cell. 2022;38(3):145-57. doi: 10.7124/bc.000A79

3. European Pharmacopoeia. 5th ed. Strasbourg; 2005. Vol. 2. p. 2667-8.
4. Zengin G, Aktumsek A, Ceylan R, Uysal S, Mocan A, Guler GO, et al. Shedding light on the biological and chemical fingerprints of three *Achillea* species (*A. biebersteinii*, *A. millefolium* and *A. teretifolia*). *Food Funct.* 2017; 8(3):1152-65. doi: [10.1039/c6fo01847e](https://doi.org/10.1039/c6fo01847e)
5. Duyun IF, Mazulin OV, Mazulin GV, Oproshanska TV. [The chemical composition of polyphenolic compounds *Achillea micranthoides* Klok. herbs]. *Farmatsevtichnyi zhurnal.* 2020;75(1):80-7. Ukrainian. doi: [10.32352/0367-3057.1.20.09](https://doi.org/10.32352/0367-3057.1.20.09)
6. Dujun IF, Mazulin OV, Mazulin GV. Study of polyphenolic compounds of *Achillea Micranthoides* Klok. et *Krytzka Herbs*. In: *Relevant issues of modern medicine : the experience of Poland and Ukraine. Proceedings of scientific and practical conference; 2017 Oct 20-21. Lublin, Republic of Poland; 2017.* p. 126-9.
7. Benzel LV, Darmohrai RY, Oliinyk PV, Benzel IL. *Likarski roslyny i fitoterapiia (fitoterapevtychna retseptura)*. Kyiv: Medytsyna; 2010. Ukrainian.
8. Toplan GG, Taşkın T, İşcan G, Göger F, Kürkçüoğlu M, Civaş A, et al. Comparative Studies on Essential Oil and Phenolic Content with In Vitro Antioxidant, Anticholinesterase, Antimicrobial Activities of *Achillea biebersteinii* Afan. And *A. millefolium* subsp. *Millefolium* Afan. L. Growing in Eastern Turkey. *Molecules.* 2022;27(6):1956. doi: [10.3390/molecules27061956](https://doi.org/10.3390/molecules27061956)
9. Gawel-Bęben K, Strzypek-Gomółka M, Czop M, Sakipova Z, Głowniak K, Kukula-Koch W. *Achillea millefolium* L. and *Achillea biebersteinii* Afan. Hydroglycolic Extracts-Bioactive Ingredients for Cosmetic Use. *Molecules.* 2020;25(15):3368. doi: [10.3390/molecules25153368](https://doi.org/10.3390/molecules25153368)
10. Zengin G, Aktumsek A, Ceylan R, Uysal S, Mocan A, Guler GO, et al. Shedding light on the biological and chemical fingerprints of three *Achillea* species (*A. biebersteinii*, *A. millefolium* and *A. teretifolia*). *Food Funct.* 2017;8(3):1152-65. doi: [10.1039/c6fo01847e](https://doi.org/10.1039/c6fo01847e)
11. Parashchuk EA, Marchyshyn SM, Slobodianiuk LV. [Research of volatile components of burnet saxifrage (*Pimpinella saxifraga* L.)]. *Medical and clinical chemistry.* 2019;20(4):107-13. Ukrainian. doi: [10.11603/mcch.2410-681X.2018.v0.i4.9822](https://doi.org/10.11603/mcch.2410-681X.2018.v0.i4.9822)
12. Nagoor Meeran MF, Javed H, Al Taei H, Azimullah S, Ojha SK. Pharmacological Properties and Molecular Mechanisms of Thymol: Prospects for Its Therapeutic Potential and Pharmaceutical Development. *Front Pharmacol.* 2017;8:380. doi: [10.3389/fphar.2017.00380](https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00380)
13. Escobar A, Perez M, Romanelli G, Blustein G. Thymol bioactivity: A review focusing on practical applications. *Arab J Chem.* 2020;13:9243-69. doi: [10.1016/j.arabjc.2020.11.009](https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2020.11.009)
14. de Oliveira TM, de Carvalho RB, da Costa IH, de Oliveira GA, de Souza AA, de Lima SG, et al. Evaluation of p-cymene, a natural antioxidant. *Pharm Biol.* 2015;53(3):423-8. doi: [10.3109/13880209.2014.923003](https://doi.org/10.3109/13880209.2014.923003)
15. Krause ST, Liao P, Crocoll C, Boachon B, Förster C, Leidecker F, et al. The biosynthesis of thymol, carvacrol, and thymohydroquinone in Lamiaceae proceeds via cytochrome P450s and a short-chain dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2021;118(52):e2110092118. doi: [10.1073/pnas.2110092118](https://doi.org/10.1073/pnas.2110092118)