


МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

імені В. Н. Каразіна

Кафедра хімічної метрології

УДК 543.544


До захисту допускаю _____
завідувач кафедри хімічної метрології
д.х.н., проф. Олег ЮРЧЕНКО
«16» травня 2025 року

**ХРОМАТОГРАФІЧНЕ ВИЗНАЧЕННЯ МЕНТОЛУ У ЗРАЗКАХ
РОСЛИННОЇ СИРОВИНИ ТА ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБАХ РОСЛИННОГО
ПОХОДЖЕННЯ**

Кваліфікаційна робота магістра II курсу
групи ХМ-21
хімічного факультету
МЕЛЬНИКА ПАВЛА ВІКТОРОВИЧА

Науковий керівник

к.х.н., доцент



Наталія НІКІТИНА

Харків – 2025

РЕФЕРАТ

Дана дипломна робота вміщує 47 сторінок, 2 розділи, 30 джерел інформації, 13 таблиць, 13 рисунків, 1 рівняння.

Об'єкт дослідження – рослинний матеріал, та фармацевтичні препарати в яких міститься ментол

Мета – запропонувати швидкий, точний спосіб ГХ визначення вмісту ментолу у зразках рослинної сировини та фармацевтичному препараті «Валідол».

Метод дослідження – газо-рідинна хроматографія з полуменево-іонізаційним детектором, екстракція ментолу з рослинної сировини методом Сокслета.

Результати та їх новизна: запропоновано методику газохроматографічного визначення вмісту ментолу в рослинній сировині, фармацевтичних препаратах на її основі та фармацевтичному препараті «Валідол»; показано, що для вилучення ментолу зі зразків рослинної сировини доцільно використовувати розчинник дихлорметан, також для повного вилучення ментолу із фільтр-пакетів чаю на основі м'яти перцевої достатньо 5 годин екстракції Сокслета. Визначено вміст ментолу: у таблетках «Валідол» — $14.72 \pm 0,08$ мг на таблетку; сировині чаю з м'яти перцевої — до 3.24 мг/г сухої маси; настоянці м'яти перцевої «Віола» — 19.56 мг/мл.

Ключові слова: МЕНТОЛ, М'ЯТА, ГАЗОВА ХРОМАТОГРАФІЯ, ЕКСТРАКЦІЯ, ДИХЛОРМЕТАН

ABSTRACT

This qualification work contains 47 pages, 2 sections, 30 sources of information, 13 tables, 13 figures, 1 equation.

The object of the study is plant material and pharmaceutical preparations containing menthol.

Purpose - to propose a quick, accurate method of GC determination of menthol content in samples of plant material and pharmaceuticals "Validol".

Methods - gas-liquid chromatography with a flame ionization detector, extraction of menthol from plant material by the Soxhlet method.

Results and their novelty: a method for gas chromatographic determination of menthol content in plant materials, pharmaceutical preparations based on it and the pharmaceutical drug Validol was proposed; it was shown that it is advisable to use dichloromethane solvent for the extraction of menthol from samples of plant materials, and 5 hours of Soxhlet extraction is sufficient for the complete extraction of menthol from filter bags of peppermint tea. The content of menthol was determined: in Validol tablets - 14.72 ± 0.08 mg per tablet; in peppermint tea raw materials - up to 3.24 mg/g dry weight; in peppermint tincture "Viola" - 19.56 mg/ml.

Keywords: MENTHOL, MINT, GAS CHROMATOGRAPHY, EXTRACTION, DICHLOROMETHAN

ЗМІСТ

ВСТУП	6
1 ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД	8
1.1. Загальна характеристика ментолу	8
1.2. Методи виділення ЕО м'яти перцевої	10
1.2.1 Методи, засновані на гідродистиляції	11
1.2.2 Методи засновані на екстракції	13
1.3 Вибір розчинника для вилучення ментолу	16
1.4. Методи визначення ментолу	18
1.4.1 Газова хроматографія	18
1.4.2 Високоєфективна рідинна хроматографія (ВЕРХ).	21
1.4.3 Інші методи	23
2 ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА	27
2.1 Обладнання та реактиви	27
2.2 Методики експерименту	28
2.2.1 Методика приготування стандартного розчину з концентрацією 50 мг/мл	28
2.2.2 Методика приготування градувальних розчинів для визначення ментолу методом ГХ-ПД	28
2.2.3 Методика ГХ-ПД визначення ментолу	29
2.2.4 Методика екстракції ментолу в рослинній сировині м'яти перцевої методом Сокслета	30
2.2.5 Методика визначення ментолу в препараті «Валідол»	31
2.2.6 Методика визначення ментолу в чаї, що приготований з рослинної сировини м'яти перцевої.	32
2.2.7 Методика визначення ступеню екстракції ментола в ДХМ	32
2.3 Результати експерименту	33
2.3.1 Результати хроматографування розчинів ментолу	33
2.3.2 Результати експерименту з вибору розчинника	35
2.3.3 Результати вивчення ступеня екстракції ментолу в ДХМ.	37
2.3.4 Результати визначення ментолу в рослинній сировині	38
2.3.5 Результати визначення ментолу в м'яти перцевої настоянці «Віола»	39
2.3.6 Результати експерименту визначення ментолу в чаї приготованого з рослинної сировини.	40
2.4 Охорона праці	41
ВИСНОВКИ	44
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ	45

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СКОРОЧЕНЬ, ТЕРМІНІВ

ЕО – ефірна олія.

ДФУ – державна фармакопея України.

ГХ – газова хроматографія.

РХ – рідинна хроматографія.

ВЕРХ – високоефективна рідинна хроматографія.

ГД – гідродистиляція.

ПГД – парова гідродистиляція.

ДМО – дементолізована олія.

ОГД – Омічна гідродистиляція.

МХГД – мікрохвильова гідродистиляція.

МС – мас-спектрометрія.

ДХМ – дихлорметан.

МТБЕ – метилтретиннийбутиловий етер.

НФЕ (СФЕ) – надкритична флюїдна екстракція.

ПІД (FID, Flame Ionization Detector) - полум'яно-іонізаційний детектор.

DAD – діодно-матричний детектор (УФ-детектор).

R_t (RT) – час утримування.

ЯМР – ядерний магнітний резонанс.

RID – рефрактометричний детектор.

НАС – напроксенацилхлорид.

ІЧ – інфрачервона спектроскопія.

ВСТУП

Ментол є однією з найбільш відомих органічних сполук природного походження, що використовується в багатьох комерційних продуктах. Завдяки своїм знеболювальним, місцевим анестезуючим, протисвербіжним, антисептичним і слабким спазмолітичним властивостям ментол широко застосовується у медицині, косметології, а також у харчовій промисловості як ароматизатор та харчова добавка, що надає їжі м'ятний присмак. У фармацевтичній практиці ментол входить до складу мазей, кремів, крапель, льодяників, спреїв для горла та носа, а також таблеток, які мають седативний або серцево-судинний ефект. Зокрема до таких препаратів можна віднести Валідол, що є недорогим «народним» препаратом, який має переважно заспокійливу дію, проте часто застосовується та рекомендується як засіб для лікування стенокардії.

Ментол за структурою є циклічним монотерпеновим спиртом. У природі існує кілька оптичних ізомерів ментолу, однак фармакологічну активність проявляє переважно L-ментол (лівообертний ізомер), що володіє характерним освіжаючим ароматом і фізіологічною активністю. Саме цей ізомер входить до складу ефірної олії (ЕО) м'яти перцевої (*Mentha piperita*), яка є основним джерелом ментолу та може містити до 50–60 % L-ментолу. Ефірну олію отримують переважно методом парової дистиляції свіжої або висушеної рослинної сировини або методом екстракції (метод Сокслета чи надкритична рідинна екстракція з використанням CO_2). З ЕО ментол може бути виділений шляхом кристалізації або шляхом фракційної перегонки з подальшим очищенням. Крім того, ментол може бути отриманий синтетичним шляхом, однак саме природне походження вважається більш безпечним і прийнятним для використання в лікарських засобах та не потребує попереднього розділення оптичних ізомерів.

В державній фармакопеї України (ДФУ) відсутні будь-які нормативні методики визначення ментолу в лікарських засобах. Контроль якості та стандартизація вмісту ментолу у цих продуктах має важливе значення для забезпечення їхньої ефективності та якості. Саме тому розробка точного, швидкого та надійного методу визначення ментолу є актуальною задачею аналітичної хімії.

Сучасна аналітична хімія пропонує декілька підходів до визначення вмісту ментолу в складних матрицях, серед яких особливе місце посідають рідинна та газова хроматографія. Проте найбільш ефективним методом для аналізу ментолу є саме газова хроматографія (ГХ), яка дозволяє досягати високої чутливості, селективності та швидкості аналізу. Газова хроматографія особливо ефективна при аналізі летких компонентів, до яких належить ментол, що забезпечує точне та надійне визначення його вмісту як у сировині, так і в готових лікарських формах. Тоді як рідинна хроматографія (РХ) вимагає використання специфічних детекторів, зокрема рефрактометричного детектора [26].

Виходячи з вищезгаданого, метою кваліфікаційної роботи стало запропонувати швидкий, точний спосіб ГХ визначення вмісту ментолу у зразках рослинної сировини та фармацевтичному препараті «Валідол». Для досягнення мети необхідно було вирішити наступні завдання:

1. обрати розчинник для вилучення ментолу із зразків рослинної сировини та таблеток «Валідолу»;
2. обрати оптимальні умови газохроматографічного визначення ментолу (температуру інжектора, температурний режим роботи термостата колонки);
3. оцінити метрологічні характеристики запропонованої методики: межю кількісного визначення та правильність;
4. провести аналіз реальних об'єктів із використанням запропонованої методики.

1 ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

1.1. Загальна характеристика ментолу

Ментол ($C_{10}H_{20}O$) (рис.1.1) — це моноциклічний терпеновий спирт, який є основним компонентом ефірної олії м'яти. У природі ментол існує у вигляді восьми стереоізомерів, серед яких найпоширенішим і біологічно активним є (-)-ментол або L-ментол. Цей ізомер має специфічну конфігурацію, яка забезпечує його характерний охолоджуючий ефект та інші фармакологічні властивості [1].

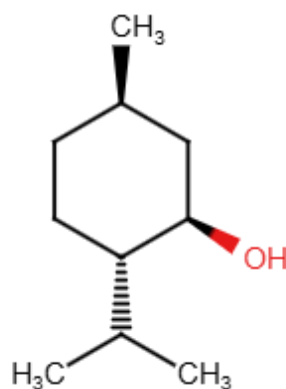


Рисунок 1.1 L-ментол ((-)-ментол).

При нормальних умовах ментол є білою або прозорою кристалічною речовиною з характерним сильним охолоджуючим ароматом, типовим для м'яти перцевої. Його температура плавлення становить приблизно 41–44 °С, температура кипіння — близько 212 °С при нормальному атмосферному тиску. Ментол добре розчиняється в етанолі, ефірі, хлороформі, жирах та оліях, але практично нерозчинний у воді при (456 мг/л при 25 °С) [2].

L-ментол є оптично активним ізомером, який обертає площину поляризованого світла вліво. Його оптична чистота є важливою характеристикою при виробництві лікарських засобів, оскільки інші ізомери (рис. 1.2) можуть мати відмінні або навіть небажані біологічні ефекти. Тому контроль за оптичною чистотою ментолу є критично важливим у фармацевтичному виробництві.

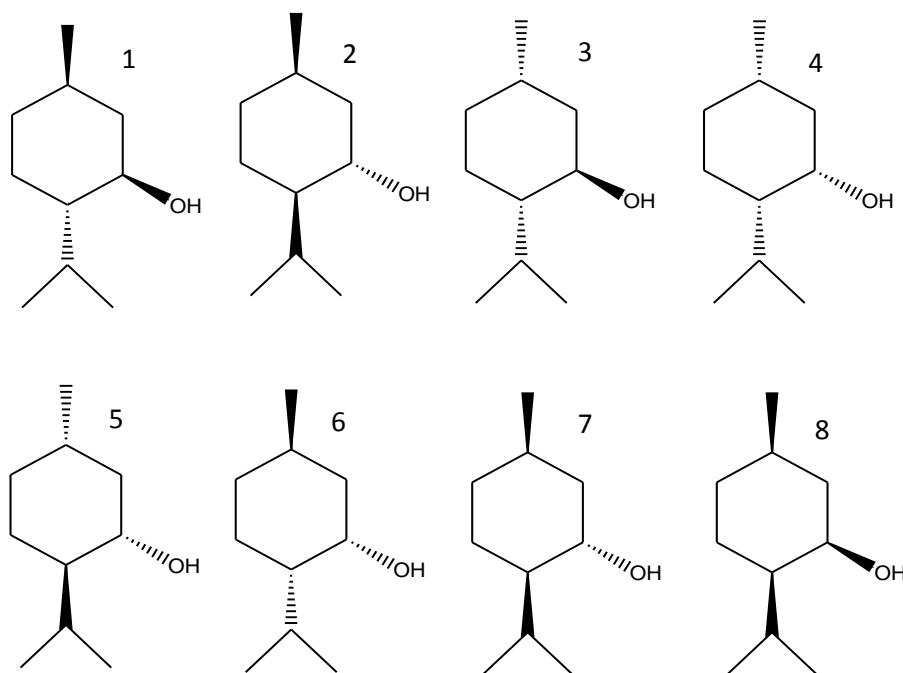


Рисунок 1.2 Оптичні ізомери ментолу (1-(-)-ментол, 2-(-)-неоментол, 3-(-)-ізоментол, 4-(-)-ізоментол, 5-(+)-ментол, 6-(+)-неоментол, 7-(+)-ізоментол, 8-(+)-ізоментол).

За результатами дослідження впливу структури на біологічну активність ментолу встановлено, що (-)-ментол проявляє найбільшу здатність до активації термо-рецепторів порівняно з його естерами та оптичними ізомерами. Модифікація гідроксильної групи ментолу знижує охолоджуючий ефект та змінює профіль взаємодії із біомолекулами, що підкреслює важливість стереохімічної цілісності молекули для збереження її біологічної активності [3].

Ментол отримують переважно з природної ефірної олії (ЕО) м'яги перцевої шляхом екстракції та подальшого очищення. Альтернативним способом є синтетичне отримання ментолу шляхом каталізованої гідрогенізації тимолу або через багатоступеневі хімічні реакції, що дозволяють отримати необхідний стереоізомер з високою оптичною чистотою. Світовий обсяг виробництва (-)-ментолу становить приблизно 19 000 тонн станом на 2007 рік [4], він в основному отриманий з ЕО м'яги canadensis. Лише 6300 тонн було вироблено синтетичним шляхом, це приблизно $\frac{1}{4}$ від всього отриманого ментолу, такий ментол потребує гарного очищення від різних домішок реагентів, розчинників та побічних

продуктів, а також розділення від його оптичних ізомерів, що може бути не тривіальною задачею [5, 6].

Таким чином розробка методики виділення та визначення ментолу в ефірній олії отриманої безпосередньо з рослинної сировини є пріоритетним завданням для аналітичної хімії. Рослини синтезують лише (–)-ментол, що спрощує задачу до виділення ментолу з ЕО без участі небажаних розчинників, побічних продуктів, залишків реагентів тощо.

1.2. Методи виділення ЕО м'яти перцевої

Ментол не єдина речовина, що міститься в ЕО м'яти перцевої, в ній знаходяться й інші речовини схожої природи, а також ізомери (ментон, 1,8-цинеол, неоментол та ізоментон). Приблизний склад ЕО представлено в табл. 1.1:

Таблиця 1.1 Склад ЕО м'яти перцевої [8].

Сполука	%
Ментол	38.45
Карвон	-
Ментон	21.80
Ізоментон	3.75
Неоментол	4.16
1,8-цинеол	5.62
Лимонен	1.58
Ментофуран	2.08
Інші речовини	22.56

Вихід та хімічний склад ефірної олії, отриманої з рослинної сировини значною мірою залежать як від особливостей вихідного матеріалу, так і від застосованої технології екстракції. Загалом методи отримання ефірної олії м'яти ґрунтуються на процесах дистиляції або екстракції.

Ментол зазвичай виділяють з ефірної олії м'яти перцевої, отриманої методом парової дистиляції. Цей процес дозволяє зберегти термолабільні компоненти олії, включаючи ментол, без значної їх деградації. Після отримання ефірної олії можливе подальше очищення ментолу шляхом кристалізації з різних органічних розчинників, таких як дихлорметан або етанол. Альтернативними методами екстракції можуть бути надкритична флюїдна екстракція за допомогою діоксиду вуглецю (CO_2), що забезпечує високу чистоту кінцевого продукту без застосування токсичних органічних розчинників [7].

1.2.1 Методи, засновані на гідродистиляції

Гідродистиляція (ГД) — це традиційний метод отримання ефірної олії з рослинної сировини, який широко застосовується як у промисловості, так і в лабораторних умовах. Вона базується на тому, що леткі сполуки, зокрема ефірні олії, мають нижчу температуру кипіння у присутності води чи водної пари ніж температура їх деструкції. Це дозволяє їх виділити без термічної деградації, яка могла б статися при прямому нагріванні.

Парова гідродистиляція (ПГД) – це подібний метод до ГД, різниця полягає в тому, що рослину не поміщають безпосередньо у воду, а розташовують над нею під час нагрівання і ЕО виділяються з потоком пара, коли вона проходить через рослинний матеріал, руйнуючи клітинні структури листя.

ГД – це типовий промисловий метод отримання ЕО, її вихід таким методом становить, приблизно, 0.3-0.5% [9]. Далі чистий ментол можна отримати конвекційним методом, ЕО поміщають в глибоку морозильну камеру, при температурі -45°C близько 48 годин. Далі заморожену олію переносять в центрифугу, в якій кристали ментолу відокремлюються у вигляді пластівців, рідкий залишок називається: дементолізована олія (ДМО).

Недоліками цих методів є те, що це не швидкі методи, так як вода нагрівається поступово і виділення ефірної олії почнеться не одразу, а повторна перегонка та відстоювання займе додатковий час. Також, без гарної оптимізації

процесу ці методи достатньо затратні по використанні електроенергії. На сьогоднішній день існують методи вдосконалення ГД, що здатні обійти ці недоліки: значно зменшити необхідний час та заощадити необхідну електроенергію. Це методи мікрохвильової гідродистиляції (МХГД) та омічної гідродистиляції (ОГД).

Мікрохвильова гідродистиляція (МХГД) — це метод, у якому рослинну сировину нагрівають мікрохвильовим випромінюванням, що стимулює швидке виділення ефірної олії з мінімальними втратами термолабільних компонентів. Хоча для виділення ефірної олії зазвичай використовують висушений рослинний матеріал, рослинні клітини все ж таки містять деяку кількість вологи, яка слугує мішенню для мікрохвильового нагрівання. Швидке підвищення температури призводить до підвищення внутрішнього тиску, що спричиняє розриви клітинних структур і швидкої дифузії ЕО. В дослідженні [11] повідомляється, що при застосуванні МХГД вихід ментолу з м'яти був вищим, ніж при класичній перегонці.

Омічна гідродистиляція (ОГД) базується на пропусканні електричного струму через рослинну масу, яка містить воду у присутності електроліту. Це викликає її нагрів безпосередньо зсередини, що сприяє швидкому вивільненню летких компонентів через розрив клітинної структури рослини. Електропровідність є основним параметром, що визначає швидкість нагрівання при омічній обробці, чим вона менша, тим сильніший буде нагрів. За даними [12], ОГД має найменше енергоспоживання у порівнянні з традиційною методикою ГД.

У дослідженні [10] проведено порівняльний аналіз трьох методів отримання ЕО з *Mentha piperita*: традиційної гідродистиляції (ГД), мікрохвильової (МХГД) та омічної гідродистиляції (ОГД). Експерименти показали, що сучасні методи дозволяють значно скоротити час екстракції — до 15-20 хвилин, порівняно з годиною у випадку ГД. Усі три методи забезпечили схожий вихід ефірної олії (близько 2.2–2.3 %), при цьому хімічний склад, зокрема вміст ментолу, залишався стабільним незалежно від способу обробки, що підтверджено аналізом ГХ-МС. Також, як видно з табл. 1.2, МХГД та ОГД виявились більш енергоефективними процесами, зокрема більшу швидкість вилучення ЕО.

Таблиця 1.2 Параметри процесів ГД, МХГД та ОГД [10].

Параметр	МХГД	ОГД	ГД
Шв. підвищення температури, (С°/хв)	14.5	15.7	2.8
Час початку накопичення ЕО, (хв)	9.86	6.17	34.16
Загальний час екстракції, (хв)	16.5	19.71	55.88
Споживання електроенергії, (кВт-год/мл ЕО)	0.212	0.135	0.689
СО ₂ виділено, (г/мл ефірних олій)	169.8	108.3	551.8

1.2.2 Методи засновані на екстракції

Метод Сокслета є класичним лабораторним методом екстракції, який застосовується для тривалого багаторазового вилучення ЕО із подрібненої рослинної сировини за допомогою органічного розчинника. Він був розроблений Францем фон Сокслетом у 1879 році та залишається популярним завдяки своїй ефективності та простоті. Процес вилучення ефірної олії проходить в спеціальному приладі – екстрактор Сокслета (рис. 1.3).



Рисунок 1.3 Апарат Сокслета та його схема.

Пристрій включає колбу з розчинником (наприклад, дихлорметан (ДХМ) або н-гексану), тримач для вихідного матеріалу, сифонну трубку для забезпечення безперервної циркуляції розчинника (ключовий елемент процесу екстракції), систему охолодження з циркулюючою холодною водою, парову трубку для циркуляції парів розчинника та нагрівальний елемент під колбою з розчинником.

У контексті виділення ЕО м'яти цей метод зазвичай передбачає використання таких розчинників, як етанол, петролейний ефір, дихлорметан чи метилтретинний бутиловий етер (МТБЕ), також можливо використовувати їх суміші (наприклад ДХМ та н-гексан 1:1) [13].

Процес екстракції ЕО проходить наступним чином: нагрівальний елемент доводить розчинник у круглodonній колбі до кипіння. Утворені пари етанолу підіймаються, конденсуються в холодильнику та крапають на зразок рослинного матеріалу, розчиняючи цільову сполуку (ментол та інші). Далі розчинник скапує з екстрагованими речовинами в колбу, де знову закипає та випаровується. Цикл повторюється до повного вилучення цільових сполук.

Серед основних переваг — простота реалізації та високий вихід ЕО в порівнянні з ГД [14]. Однак, попри високу ефективність, метод має й низку недоліків: тривалість процесу (3–6 годин іноді більше), потреба в великій кількості розчинника та обов'язкове випаровування і очищення отриманого екстракту.

Надкритична флюїдна екстракція (НФЕ, Supercritical Fluid Extraction), а конкретно екстракція надкритичним діоксидом вуглецю ($SC\text{-}CO_2$) привернула значну увагу в останні роки як перспективна альтернатива традиційній екстракції розчинником для вилучення олій та інших матеріалів, оскільки вона має ряд переваг, включаючи відсутність залишкового розчинника та гарне утримання ароматичних сполук.

Надкритичний флюїд або надкритична рідина – це стан речовини, який досягається за умов, коли температура і тиск перевищують відповідно критичні температуру і тиск. У цьому стані речовина має властивості як газу (низька в'язкість і здатність проникати в пористі матеріали), так і рідини (висока густина, що забезпечує гарне розчинення речовин).

Температура критичного стану CO_2 становить $32\text{ }^\circ\text{C}$, а тиск — близько 74 бар, це дозволяє уникнути термічної деградації чутливих речовин в ЕО. Згідно з

дослідженням [15], застосування СФЕ дозволило отримати ЕО м'яти високої чистоти із збереженням стереохімічної цілісності ментолу. Автори зазначають, що якісний склад ЕО, отриманої таким методом, є стабільним та характеризується високою концентрацією біологічно активних компонентів. В порівнянні з гідродистиляцією, СФЕ показала в 10 разів більший вихід, значно вищу концентрацію діючих речовин та менший час екстракції (2.5 години проти 6 годин). До недоліків технології можна віднести високу вартість обладнання, складність у керуванні параметрами процесу та потребу у високому рівні безпеки [16].

Таким чином, кожен із розглянутих методів отримання ефірної олії з м'яти має свої переваги й обмеження. Традиційні способи, як ГД, залишаються популярними через простоту, але все частіше поступаються сучасним технологіям, які забезпечують вищу ефективність, селективність та екологічність процесу. Нижче представлено узагальнену порівняльну таблицю основних методів екстракції ЕО з м'яти, яка враховує ключові параметри процесу, вихід, якість продукту та технологічні особливості (табл. 1.3).

Таблиця 1.3 Порівняння методів отримання ефірної олії м'яти.

Метод	Принцип	Час процесу	Вихід ефірної олії	Збереження ментолу	Переваги	Недоліки
Класична гідродистиляція	Нагрів води, що випаровує леткі компоненти	2–3 год	Середній	Помірне	Проста, доступна технологія	Тривалий час, теплові втрати
Мікрохвильова гідродистиляція (МХГД)	Нагрів за допомогою мікрохвильової енергії	15–30 хв	Високий	Високе	Швидкість, менші втрати, збереження летких речовин	Потребує спеціального обладнання
Омічна гідродистиляція (ОГД)	Нагрів за рахунок пропускання струму через сировину	20–30 хв	Високий	Високе	Енергоефективність, швидкість, рівномірне нагрівання	Необхідність контролю електропровідності сировини
Екстракція органічним розчинником (метод Сокслета)	Витягування ефірної олії за допомогою органічного розчинника (наприклад, ДХМ)	2-6 год	Високий	Залежить від розчинника	Добра розчинність ментолу, можливість підбору умов	Залишки розчинника, складна очистка

Суперкритична CO ₂ -екстракція	Витягування у суперкритичних умовах за допомогою CO ₂	~1 год	Високий	Високе	Висока селективність, екологічність, якість	Висока вартість обладнання
---	--	--------	---------	--------	---	----------------------------

1.3 Вибір розчинника для вилучення ментолу

Правильний вибір розчинника є критичним етапом підготовки зразків до кількісного визначення ментолу. Оскільки ментол є слабкополярною сполукою, для його ефективного вилучення з рослинної сировини або фармацевтичних препаратів доцільно використовувати органічні розчинники середньої або низької полярності для його гарного розчинення. При виборі розчинника ми керувались наступними міркуваннями:

- Ментол повинен добре розчинятись. Якщо його полярність чи хімічна природа не відповідає властивостям ментолу, то вилучення буде частковим, що буде занижати результат. Це можна виправити, зробивши більше циклів екстракції, що також буде затратно по часі.
- Сумісність з методом аналізу. Для газової хроматографії потрібні леткі розчинники, які легко та повністю випаровуються. Якщо розчинник залишиться в пробі — він може впливати на відтворюваність піків, перешкоджати ідентифікації або перевантажити колонку [17].
- Хімічна інертність розчинника. Деякі розчинники можуть взаємодіяти з компонентами екстракту, викликаючи деградацію його компонентів.
- Токсичність і безпека. Розчинники на кшталт хлороформу або метанолу — дуже токсичні, тому у фармацевтичній практиці часто віддають перевагу менш токсичним речовинам (наприклад, етанол чи ДХМ).

До найчастіше застосовуваних розчинників для екстракції ментолу належать: етанол, МТБЕ, н-гексан, петролейний ефір та дихлорметан (ДХМ).

Загалом, етанол є одним з найкращих розчинників для екстракції ментолу, в дослідженні [18] саме він пропонується для визначення діючої речовини в таблетках. Він добре розчиняє ментол, з ним можна проводити екстракцію методом Сокслета, також сумісний з ГХ-ПІД аналізом. Також він відносно безпечний для людини, навіть деякі лікарські препарати випускають у вигляді розчинених в етанолі речовин. Але для етанолу існують деякі обмеження: він добре змішується з водою, не утворює іншу фазу та в такому вигляді не підходить для ГХ-ПІД аналізу. Також він має відносно велику температуру кипіння ($T(\text{кип.}) = 78\text{ }^{\circ}\text{C}$), порівняно з ДХМ ($T(\text{кип.}) = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$) чи МТБЕ ($T(\text{кип.}) = 55\text{ }^{\circ}\text{C}$), на його випаровування іде більше часу при екстракції Сокслета чи концентруванні проби.

Н-гексан ($T(\text{кип.}) = 68\text{ }^{\circ}\text{C}$) також використовується для визначення ментолу в рослинному матеріалі [19]. Він сумісний для визначення методом ГХ-ПІД, для екстракції методом Сокслета та не змішується з водою. Існують дослідження, де в якості розчинника використовують суміш гексану і іншим розчинником, зокрема суміш 1:1 н-гексану з ДХМ [13].

В дослідженні [20] було порівняно декілька розчинників: н-гексан, ацетон, петролейний ефір та МТБЕ для екстракції ментолу з таблетованих форм, що містять ефірну олію м'яти, серед яких саме останній виявився найкращим. Він забезпечив: найвищу відтворюваність піків ментолу, добру розчинність, повне вилучення ментолу менш ніж на 5 хв, мінімальне вилучення сторонніх компонентів.

ДХМ викликає інтерес в якості розчинника для вилучення ментолу, так як не вдалось знайти літературних джерел де його визнано найефективнішим розчинником. Згідно з даними літератури [21-23], ДХМ можна використовувати в якості розчинника для ментолу через поєднання високої розчинної здатності, леткості та хімічної інертності до компонентів ЕО. Крім того, він дозволяє уникнути утворення емульсій з водою, які можуть ускладнювати подальший аналітичний процес. Тому, як вже сказано вище, ми порівняли його з МТБЕ в експериментальній частині.

1.4.Методи визначення ментолу

(-)-Ментол (рис. 1.1) є леткою органічною сполукою з вираженими фізико-хімічними та фармакологічними властивостями, точне та надійне його визначення в рослинних, фармацевтичних і харчових зразках має велике практичне значення. З огляду на це, у сучасній аналітичній практиці застосовується низка методів, які відрізняються чутливістю, специфічністю, вимогами до підготовки зразків та обладнанням.

Оскільки молекула ментолу не містить хромофорних груп, що ускладнює її визначення традиційними УФ-методами, особливого значення набувають методи, що базуються на газовій та рідинній хроматографії, а також мас-спектрометрії. Спектроскопічний аналіз поглинання в УФ області або застосування детекторів, що засновані на такому явищі (DAD) можливо лише після попередньої дериватизації ментолу та введення хромофорних груп [24]. Вибір конкретного методу зазвичай обумовлений природою зразка, необхідною чутливістю, наявністю супутніх компонентів, а також технічними можливостями лабораторії.

Нижче ми розглянемо основні методи, які застосовуються для визначення ментолу.

1.4.1 Газова хроматографія

Газова хроматографія (ГХ) є високоефективним методом аналітичного розділення і кількісного визначення летких органічних сполук, включаючи ментол. Метод базується на розподілі компонентів суміші між нерухою фазою (хроматографічною колонкою) та рухою фазою (газом носієм), найчастіше азотом, гелієм або воднем. Компоненти, які мають меншу спорідненість до нерухої фази (слабше адсорбуються), швидше просуваються вздовж колонки з газовою фазою та виходять з колонки раніше. Компоненти з більшою спорідненістю до нерухої фази затримуються в колонці довше. Якісною характеристикою в ГХ є час утримування компоненту (R_t).

Принципову схему ГХ системи можна зобразити наступним чином (рис.1.4):

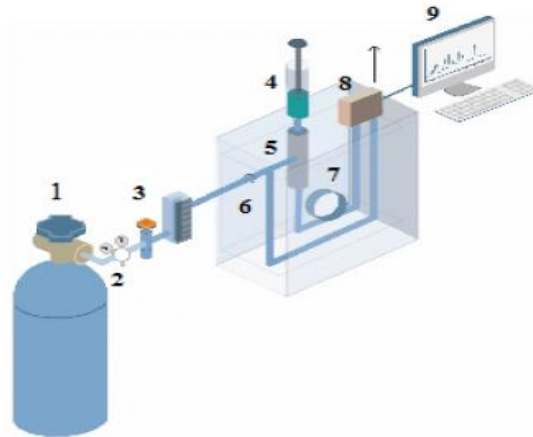


Рисунок 1.4 Принципова схема ГХ системи

Основні елементи газового хроматографа включають: Балон з газом-носієм (1) та манометри (2) для контролю тиску газу в балоні та його подачі до приладу. Фільтри (3) для очищення газу-носія від домішок. Дозуючий пристрій (4) та інжектор (5) для введення проби в хроматограф. Канал для скидання проби (6), який використовується при введенні проби з поділом потоку. Хроматографічна колонка (7), де відбувається розділення компонентів суміші. Детектуюча система (8) для реєстрації розділених компонентів. Комп'ютер (9) з програмним забезпеченням для обробки та аналізу отриманих хроматографічних даних.

Після введення екстракту до системи проба проходить через капілярну колонку, де проходить поділ речовин ЕО. Розділені компоненти детектуються одним із детекторів, які забезпечують якісну та/або кількісну інформацію про аналіти. Найчастіше для визначення ментолу використовуються два типи детекторів:

- **Полум'яно-іонізаційний детектор (ПІД / FID).** Цей детектор є найбільш поширеним у рутинному ГХ-аналізі органічних сполук. Принцип виміру заснований на зростанні електропровідності водневого полум'я при підвищенні концентрації вуглецю в ньому. ПІД має: високу чутливість до вуглецевих сполук, великий лінійний діапазон (10^7), хорошу відтворюваність. Недоліком є те, що ПІД не

дає інформації про структуру сполуки — тільки про її наявність і концентрацію.

- **Мас-детектор.** Для більш точної ідентифікації компонентів ГХ часто поєднують із мас-спектрометрією. У цьому випадку речовини після поділу на колонці іонізуються (наприклад, електронним ударом), а потім надходять вакуумну камеру мас-детектора, де вони розподіляються за масами в мас-аналізаторі. Далі кількість іонів з певним відношенням m/z^+ детектуються для отримання мас-спектрів. Мас-спектри дають інформацію про молекулярну масу, структуру, ідентичність, кількість та чистоту проби. Це дозволяє точно ідентифікувати ментол серед схожих сполук, визначати навіть мікрокількості у складних матрицях та працювати з багатокомпонентними сумішами де можливе перекривання піків цільової речовини та домішки.

Серед переваг методу: висока чутливість (до нг/мл), точність і селективність, що залежить від вибору детектора, а також можливість розділення ізомерів та супутніх компонентів в ЕО (залежить від вибору НФ). Недоліками є необхідність ретельної підготовки зразка, вимоги до леткості аналіту, а також обмеження для водних і неорганічних матриць.

Загалом це один з найкращих та найбільш вживаних методів визначення ментолу, що підтверджено багатьма дослідженнями [10, 11, 13, 16, 18, 20]. У дослідженні [20], поряд з вибором оптимального розчинника, метод ГХ-ПІД застосовано для визначення ментолу в таблетках з ефірною олією м'яти, було показано чітке розділення та гарну відтворюваність результатів.

Особливої уваги заслуговує робота [25], де запропоновано препаративну ГХ із кріозахопленням та наступним аналізом методом ГХ–МС і ^1H ЯМР для підтвердження структури та чистоти ментолу. В цьому дослідженні для розділення ЕО з м'яти перцевої для використовують колонку **DB-5** – це одна з найпоширеніших капілярних колонок для газової хроматографії, вона неполярна, складається з 95% диметилполісилоксану та 5% фенілполісилоксану. Довжина колонки - 15 м з внутрішнім діаметром 0,32 мм та товщиною плівки 1 мм. Газ-носії, що застосовувався був гелій (He), він подавався зі швидкістю потоку 2.4

мл/хв, постійний тиск на вході 0.79 бар. FID-детектор (Flame Ionization Detector) працював при температурі 250°C. Величина однієї інжекції ЕО становила 1 мкл. Автори продемонстрували можливість високоточного виділення ментолу з ефірної олії м'яти з відновлюваністю понад 97% та високою аналітичною точністю, що робить метод надзвичайно перспективним як для аналітичних, так і для препаративних цілей.

1.4.2 Високоєфективна рідинна хроматографія (ВЕРХ).

На відміну від газової хроматографії, яка використовує газоподібну рухому фазу та потребує легких і термостабільних зразків, високоєфективна рідинна хроматографія (ВЕРХ) базується на розподілі компонентів суміші між рідкою РФ та твердою НФ, що заповнює колонку. Це дозволяє аналізувати термолабільні, нелеткі або менш полярні сполуки без необхідності їх дериватизації.

ВЕРХ широко використовується для аналізу органічних речовин, у тому числі сполук, які не мають хромофорних груп. Ментол — одна з таких сполук, через відсутність поглинання у видимому чи ультрафіолетовому діапазоні його визначення за допомогою ВЕРХ з УФ-детекцією є неефективним. У таких випадках доцільно застосовувати рефрактометричний детектор (RID).

Принцип роботи RID-детектору базується на вимірюванні зміни показника заломлення елюенту при проходженні через детектор. Цей метод добре підходить для визначення органічних сполук без хромофорів у фармацевтичних препаратах, напоях та інших матрицях. У дослідженні [26] був розроблений і валідований метод ВЕРХ з RID-детектором для визначення ментолу у сиропах від кашлю. Автори застосували колонку Inertsil ODS 3V (4,6 мм × 250мм, 5 мкм) (C18), рухому фазу — метанол:вода (70:30), та об'єм ін'єкції 100 мкл. Піки ментолу були чітко розділені від компонентів матриці, а час утримання становив ~17 хв.

У порівнянні з іншими ВЕРХ-методами, описаними в іншій літературі, розроблений підхід з використанням RID має кілька переваг, він не потребує

дериватизації, має просту пробопідготовку та гарну роздільну здатність. Це робить метод ефективним і доступним для аналізу ментолу в готових лікарських формах.

Як вже було вказано вище, ментол сам по собі має слабке поглинання в УФ-діпазоні, що обмежує чутливість його прямого визначення за допомогою УФ-детекції. Для подолання цієї проблеми часто застосовують метод дериватизації, при якому ментол хімічно модифікують, приєднуючи до нього хромофорну групу, яка буде поглинає УФ-випромінювання. У статті [27] описано чутливий метод ВЕРХ для аналізу енантіомерів ментолу, що ґрунтується на дериватизації ментолу хлоридом напроксену ацилу (НАС) (рис.1.5). Розділення було досягнуто за допомогою колонки Merck LiChrospher 60 RP-C8 (250 мм × 4 мм, 5 мкм) та суміші розчинників метанол-вода-тетрагідрофуран (80:18:2, v/v) за швидкості потоку 1.2 мл/хв, час утримання (-)-ментолу склав близько ~16 хв.

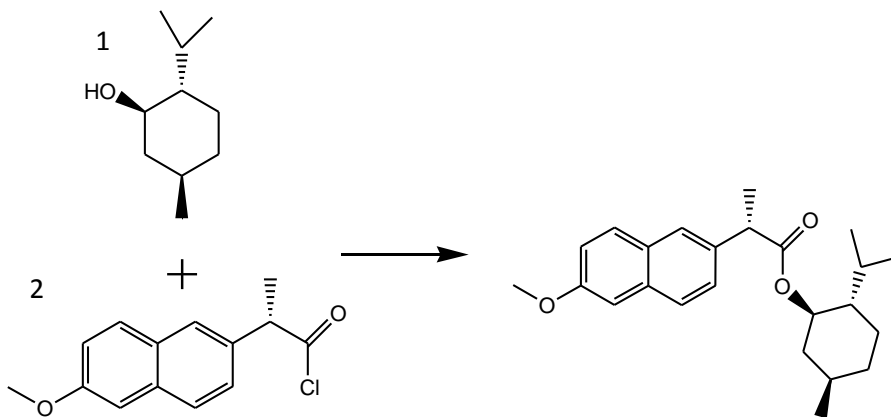


Рисунок 1.5 Реакція дериватизації (-)-ментолу (1) за допомогою напроксен ацилхлорида (НАС, 2).

Хоча в цій роботі використовується флуориметричний детектор для досягнення високої чутливості, принцип дериватизації є релевантним і для УФ-детекції. Вибір конкретного реагенту для дериватизації залежить від його реакційної здатності з аналітом та спектральних властивостей похідної. Таким чином, попередня дериватизація є ефективним підходом для розширення можливостей УФ-детекції в аналізі ментолу, забезпечуючи можливість кількісного визначення низьких концентрацій цієї сполуки

1.4.3 Інші методи

Окрім хроматографічних методів, у аналітичній практиці для ідентифікації та кількісного визначення ментолу застосовуються також спектроскопічні та прямі мас-спектрометричні методи. Їх вибір залежить від цілей дослідження, типу матриці та наявності відповідного обладнання.

Інфрачервона (ІЧ) спектроскопія є швидким і неруйнівним методом для ідентифікації ментолу за наявності характерних смуг поглинання, що відповідають функціональним групам молекули. Цей метод широко використовується для якісного контролю ефірних олій і фармацевтичної продукції. Для ментолу спектр записують в діапазоні $500\text{-}4000\text{ см}^{-1}$. Характерний ІЧ спектр ментолу наведений на рис. 1.6 [28].

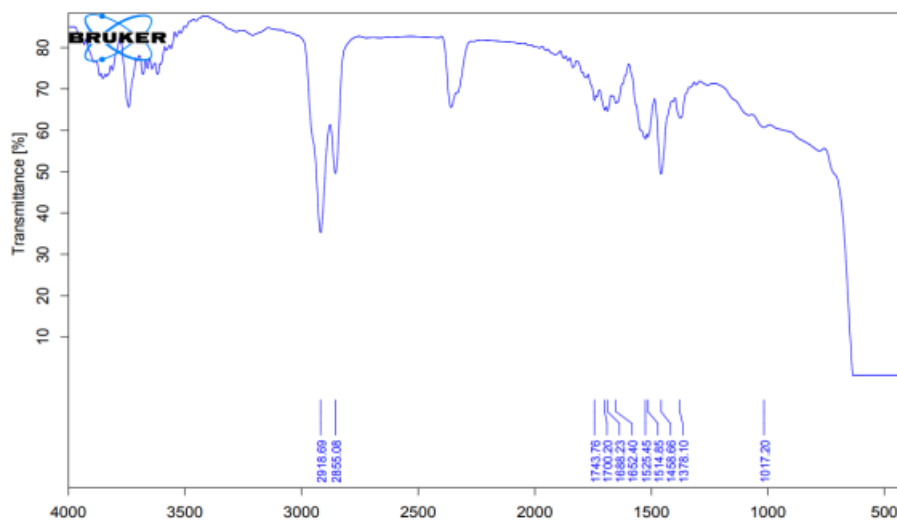


Рисунок 1.6 Характерний ІЧ спектр ментолу [28].

Ментол є вторинним спиртом і його спектр включає як смуги від ОН-групи, так і сигнали, характерні для аліфатичних вуглеводнів. Інтерпретацію ІЧ спектра представлено в табл. 1.4. Переваги методу — простота, мінімальна пробопідготовка та висока швидкість аналізу. Основним обмеженням є відсутність чутливості для кількісного аналізу, а також перекриття смуг у багатокомпонентних сумішах.

Таблиця 1.4 Інтерпретація ІЧ спектра ментола.

Хвильове число, cm^{-1}	Характеристика	Коментар
3313-3165	Валентні коливання О-Н	Широкий пік (водневі зв'язки)
2918, 2855	Валентні коливання С-Н	Типові для насичених вуглеводнів
1450–1510	Деформаційні С-Н коливання	Вказує на наявність метильних груп.
1000-1100	валентні С-О коливання	Характерні для спиртів

Пряма мас-спектрометрія з іонізацією електронним ударом є високочутливим методом, що дозволяє визначати ментол навіть у мікрокількостях у складних біологічних або фармацевтичних матрицях. Метод зазвичай поєднується з ГХ (ГХ–МС) [25] і дає можливість отримати унікальний мас-спектр сполуки (рис.1.7). Також можна застосовувати пряму мас-спектрометрію та порівнювати отриманий спектр зі спектром стандартного зразка.

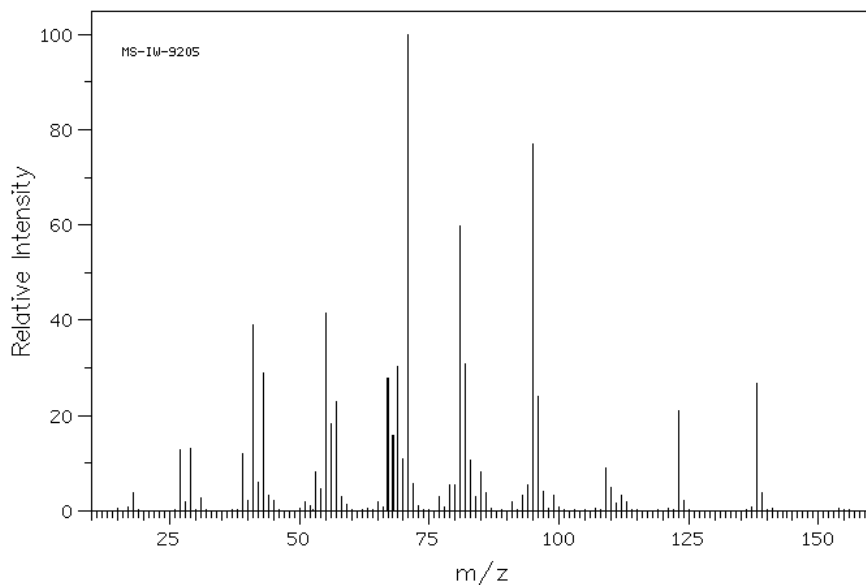


Рисунок 1.7 Мас спектр ментолу з використанням іонізації електронним ударом (SDBS) [29].

Переваги МС: надзвичайно висока селективність і чутливість, можливість одночасної ідентифікації й кількісного аналізу, ефективність визначення у складних матрицях. Недоліками є висока вартість обладнання.

^1H -ЯМР спектроскопія є потужним інструментом для ідентифікації та кількісного аналізу ментолу, особливо у випадках, коли необхідно підтвердити структуру, так як метод дозволяє отримати детальну інформацію про хімічне оточення протонів у молекулі. У дослідженні [25] ^1H -ЯМР спектроскопія була використана для підтвердження структури ментолу, ізольованого з ефірної олії м'яти, порівнюючи отриманий спектр зі спектром стандартного зразка (рис.1.8).

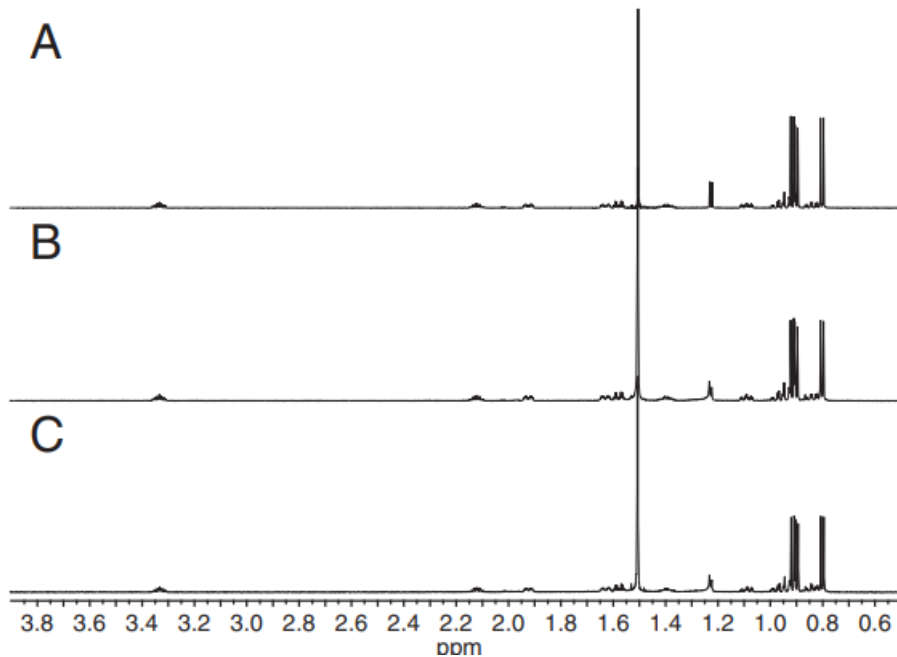


Рисунок 1.8 ^1H ЯМР спектр А) Стандарту ментолу; В) Стандарту ментолу пропущеного через ГХ систему; С) Аналіз розчину ментолу, отриманого зі зразка олії м'яти перцевої.

Основні переваги ^1H -ЯМР спектроскопії, це висока специфічність для ідентифікації структурних особливостей, можливість кількісного аналізу, неруйнівний метод, що дозволяє подальше використання зразка. Однак метод вимагає наявності дорогого обладнання та високої кваліфікації персоналу, що може обмежувати його застосування в рутинному контролі якості.

Спектрофотометрія є простим, доступним і недорогим методом, який застосовується для кількісного визначення ментолу, особливо у випадках, коли доступ до хроматографічного або мас-спектрометричного обладнання обмежений. Через відсутність хромофорних груп у структурі ментолу, для його аналізу необхідне утворення кольорового похідного, тобто дериватизація.

У дослідженні [24] запропоновано просту та селективну методику визначення ментолу, засновану на його реакції з саліциловим альдегідом у концентрованій сірчаній кислоті (96–98%). У результаті утворюється продукт червонувато-оранжевого кольору з максимумом поглинання при 510 нм. Метод є простим, селективним, відтворюваним і точним, дозволяє визначати ментол в діапазоні 1.33-13.33 мкг/мл з коефіцієнтом молярного поглинання $11533 \text{ л}\cdot\text{моль}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$ та межею виявлення 0.17 ppm. Він є швидким, вимагає недорогого обладнання і тому може бути гарною альтернативою для прямого визначення ментолу в зразках харчових продуктів і косметики.

Таким чином, для визначення ментолу описано низку методів, серед яких найбільш поширеними є хроматографічні — газова та рідинна хроматографія, а також спектроскопічні методи, зокрема ІЧ, спектрофотометрія та ЯМР. Вибір конкретного методу залежить від типу зразка, наявного обладнання та вимог до точності й селективності аналізу.

Зважаючи на леткість, термостабільність та структурні особливості ментолу, у експериментальній частині цієї роботи було обрано метод газової хроматографії з полум'яно-іонізаційним детектором (ГХ–ПД), який забезпечує необхідний рівень чутливості, точності та надійності для кількісного визначення ментолу в лікарських засобах і рослинній сировині.

2 ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

Метою експериментальної частини роботи є розробка та оптимізація методики кількісного визначення ментолу в лікарських засобах та рослинній сировині методом газової хроматографії з полум'яно-іонізаційним детектором (ГХ–ПІД). Було підбрано оптимальний розчинник для підготовки проб таблеток з подальшим визначенням ментолу за допомогою газового хроматографа. Було проведено підбір та оптимізацію умов хроматографування, зокрема температурного режиму, швидкості потоку газу-носія та часу утримання аналіту, для забезпечення розділення та кількісного визначення ментолу методом ГХ–ПІД.

2.1 Обладнання та реактиви

Реактиви:

- Стандарт ментолу, чистота 99%, отриманий від ТОВ «НВП «УКРОРГСИНТЕЗ»;
- Етанол LC-MS grade, Sigma-Aldrich;
- ДХМ, чистота 99%, отриманий від ТОВ «НВП «УКРОРГСИНТЕЗ»;
- МТБЕ чистота 99%, отриманий від ТОВ «НВП «УКРОРГСИНТЕЗ».

Обладнання:

- Газовий хроматограф Agilent 6890 GC з ручним введенням проби, оснащений ПІД-детектором та колонкою DB-WAX (довжина 30 м, внутрішній діаметр 0.25 мм, товщина шару НФ 0.25 мкм);
- Роторний випарювач ІКА RV 3 есо;
- Лабораторні ваги ADG120G (ціна поділки (дискретність), 0.0001 г);
- Нагрівальний елемент;
- Екстрактор Сокслета;

- Політетрафлуороетиленові фільтри Chromafil O-20/15 MS;
- Шприц ін'єкційний 5 мл, двокомпонентний з голкою, Nemoplast;
- Ступка фарфорова з товкачем 60мм;
- Ділільна лійка 100 мл;
- Термостійкий мірний стакан, 100 мл;
- Мірні колби 10 мл, 25 мл;
- Віали, 1 мл та 10 мл;
- Піпетки градуйовані 1 мл, 2 мл, 5 мл, 10 мл, 20 мл.

2.2 Методики експерименту

2.2.1 Методика приготування стандартного розчину з концентрацією 50 мг/мл

Для побудови калібрувального графіка та контролю точності визначення ментолу було приготовлено стандартний розчин концентрацією **50 мг/мл** у етанолі.

Наважку ментолу у вигляді подрібнених кристалів зважували на лабораторних вагах з точністю до 0.0001 г. Для отримання розчину зазначеної концентрації зважували 1.2500 г ментолу, який поміщали у мірну колбу об'ємом 25.00 мл. Далі додавали невелику кількість етанолу до повного розчинення кристалів при кімнатній температурі, перемішували, після чого доводили об'єм до мітки. Готовий розчин зберігали в щільно закупореному скляному флаконі в холодильнику за температури 4 °С. Стандартні розчини з ДХМ та МТБЕ готували аналогічним чином.

2.2.2 Методика приготування градуювальних розчинів для визначення ментолу методом ГХ-ПД

Градуювальні розчини готували поступовим розбавленням стандартного розчину в двічі. Схема приготування стандартних розчинів наведена в табл. 2.1.

Таблиця 2.1 Приготування градуювальних розчинів з стандартного розчину

с(ст), мг/мл	Vал, мл	Vк, мл	с, мг/мл
50.0	5.00	10.00	25.00
50.0	2.50	10.00	12.50
50.0	1.25	10.00	6.25
5.0	6.25	10.00	3.13
5.0	3.10	10.00	1.56

2.2.3 Методика ГХ-ПД визначення ментолу

Нами була проведена оптимізація умов ГХ розділення ментолу, були обрані оптимальні параметри системи (таб. 2.2, таб.2.3). $R_T(\text{ментолу}) = 4.71 - 4.76$ хв.

Таблиця 2.2 Умови проведення ГХ розділення.

Показник	Величина
Інжектор	
Температура, °С	230
Лінійна швидкість газу-носія (азот), см/с	123.2 мл/хв
Ділення потоку	1:80
Лайнер (вкладка)	Дезактивоване скло з шаром скловолокна
Об'єм проби, мкл	1
Полуменево-іонізаційний детектор	
Температура, °С	240
Лінійна швидкість потоків газів, мл/хв:	
азот	10
водень	30
повітря	350

Таблиця 2.3 Параметри термостату колонки на НФ.

Термостат колонки	
Початкова температура, °С	40
Час першої ізотерми, хв	1
Швидкість зміни температури термостата колонки, °С/хв	50
Температура другої ізотерми, °С	160
Час другої ізотерми, хв	0
Швидкість зміни температури термостата колонки, °С/хв	30
Температура третьої ізотерми, °С	190
Час кінцевої ізотерми, хв	1.5
Колонка DB-WAX	
Лінійна швидкість потоку, мл/хв	1
Довжина, м	30
Внутрішній діаметр, мм	0.25
Товщина плівки НФ, мкм	0.25
Нерухома фаза	Поліетиленгліколь
Загальний час аналізу, хв	10
Температурний режим, °С	30-240

2.2.4 Методика екстракції ментолу в рослинній сировині м'яти перцевої методом Сокслета

Для виділення ментолу з рослинної сировини використовували готовий фільтр-пакет з висушеними листками м'яти перцевої (*Mentha piperita*), маса якого складала ~1,5 г ($m_{\text{сер}}(\text{ч, ЛікТрави})=1.554$ г, $m_{\text{сер}}(\text{ч, Арбор Віте})=1.474$ г). Фільтр-пакет поміщали в гільзу екстрактора Сокслета, а в приймальну колбу додавали 20 мл дихлорметану (ДХМ). Процес екстракції проводили протягом 5 годин при постійному кипінні розчинника. Після завершення екстракції дихлорметановий

екстракт випарювали досуха на роторному випарювачі при температурі 40 °С та зниженому тиску. Отриманий сухий залишок розчиняли у 1.00 мл свіжого дихлорметану, ретельно перемішували до повного розчинення. Перед хроматографічним аналізом зразок фільтрували через шприцевий фільтр (0.45 мкм) та переносили у скляну віалу об'ємом 1 мл із герметичною кришкою. Підготовлені зразки зберігали в холодильнику до моменту ін'єкції у хроматограф. ГХ визначення ментолу проводили за методикою 2.2.3.

Екстрагували ментол з чаю м'яти перцевої, виробник ПРАТ «ЛІКТРАВИ» та чай виробника ПП «АРБОР ВІТЕ».

2.2.5 Методика визначення ментолу в препараті «Валідол»

Для аналізу використовували Валідол таблетки сублінгвальні 0,06 г блістер №10, виробник АТ «ФАРМАК». Попередньо визначали середню масу однієї таблетки: було зважено 10 таблеток, сумарна маса яких становила 12.1750 г, отже середня маса однієї таблетки складала 1.2180 г.

Таблетки подрібнювали в порцеляновій ступці до порошкоподібного стану. Для екстракції ментолу брали наважку масою 3.0000 г порошку, яку переносили у герметичну скляну пробірку високого тиску з гвинтовою кришкою. До пробірки додавали 6.0 мл дихлорметану (ДХМ) за допомогою автоматичної піпетки. Суміш інтенсивно струшували вручну протягом 15 хвилин для забезпечення повного переходу ментолу в органічну фазу. Після завершення екстракції зразок фільтрували через паперовий фільтр, а фільтрат переносили у віалу об'ємом 2 мл для подальшого хроматографічного аналізу. Готові зразки зберігали при температурі +4 °С до моменту введення у газовий хроматограф. ГХ визначення ментолу проводили за методикою 2.2.3.

2.2.6 Методика визначення ментолу в чаї, що приготований з рослинної сировини м'яти перцевої.

Для аналізу використовували чай із рослинної сировини м'яти перцевої (*Mentha piperita*), розфасований у фільтр-пакети. Згідно інструкції виробника, 2 пакети слід заварювати у 200 мл окропу. Відповідно, для лабораторного зразка використовували 1 фільтр-пакет на 100 мл кип'яченої води, який настоювали 10 хвилин під кришкою.

Після охолодження при кімнатній температурі, 25.0 мл готового настою переносили у ділільну лійку, додавали 10.0 мл дихлорметану (ДХМ) та інтенсивно струшували протягом 5 хвилин, періодично стравлюючи тиск. Органічний (нижній) шар після розшарування збирали у віалу об'ємом 10 мл. Процедуру екстракції повторювали ще двічі з новими порціями ДХМ (по 10 мл кожна). Всі три органічні екстракти об'єднували, після чого розчин випаровували досуха на роторному випарювачі при температурі 40 °С.

Сухий залишок розчиняли у 1,00 мл свіжого дихлорметану, перемішували до повного розчинення, фільтрували через шприцевий фільтр (0.45 мкм) та переносили у скляну віалу для подальшого аналізу методом ГХ-ПД. Визначення ментолу проводили за методикою 2.2.3.

2.2.7 Методика визначення ступеню екстракції ментола в ДХМ

У ділільну лійку об'ємом 100 мл вносили 1.0 мл стандартного розчину ментолу в етанолі (50 мг/мл) та додавали 24.0 мл дистильованої води, після чого ретельно перемішували.

Потім проводили поетапну екстракцію цієї суміші дихлорметаном (ДХМ). Спочатку додавали 10.0 мл ДХМ, інтенсивно струшували протягом 5 хвилин, стравлюючи надлишковий тиск, органічний шар після розділення збирали окремо у скляну віалу. Потім проводили другу екстракцію 5.0 мл ДХМ, за аналогічною

процедурою. Отримані екстракти не об'єднували, а аналізували окремо за методикою 2.2.3 для визначення кількості ментолу у кожному з них.

2.3 Результати експерименту

2.3.1 Результати хроматографування розчинів ментолу

Для побудови калібрувального графіка було проаналізовано серії стандартних розчинів ментолу в концентраційному діапазоні, що відповідав очікуваному вмісту ментолу в дослідних зразках (табл.2.4). Для оцінки впливу розчинника на градувальні характеристики були використані розчини ментолу, приготовлені в етанолі, дихлорметані (ДХМ) та метил-трет-бутиловому етері (МТБЕ).

Таблиця 2.4 Площі піків градувальних розчинів

C, мг/мл	S, у.о	RT, хв
25.0	3695	4.730
12.5	1873	4.726
6.25	939	4.725
3.13	470	4.759
1.56	235	4.747

За таблицею 2.4 побудовано градувальний графік (рис.2.1). За допомогою МНК було знайдено рівняння лінії тренду: $y = 148x + 12$. За результатами аналізу встановлено, що лінійне рівняння градувального графіка практично не залежить від типу розчинника, що свідчить про відсутність суттєвого матричного ефекту на рівні ін'єкції.

Хроматографічний сигнал холостого дослідження, виміряний при ін'єкції чистого розчинника (ДХМ), становив 38–43 умовних одиниці, що було враховано при визначенні межі виявлення ментолу. Згідно з критерієм межі виявлення (LOD), який обчислювали за формулою (2.1):

$$LOD=10 \cdot S_0$$

2.1

де S_0 — стандартне відхилення сигналу холостого дослідження, було встановлено, що межа визначення ментолу склала 1.38 мг/мл.

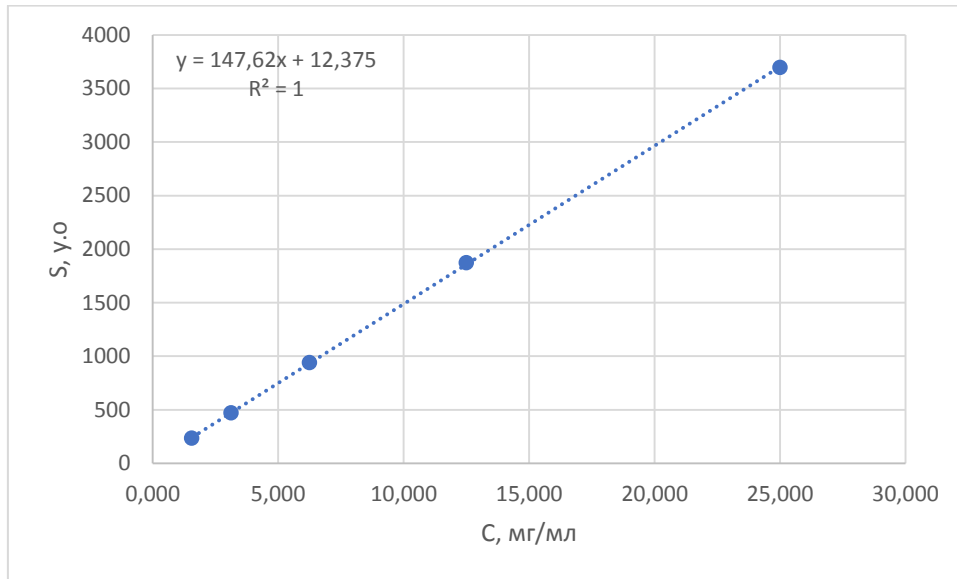


Рисунок 2.1 Градувальний графік розчинів ментолу

Для прикладу наведено хроматограму розчину з концентрацією ментолу $c(\text{ментолу}) = 12.5 \text{ мг/мл}$ (рис. 2.2).

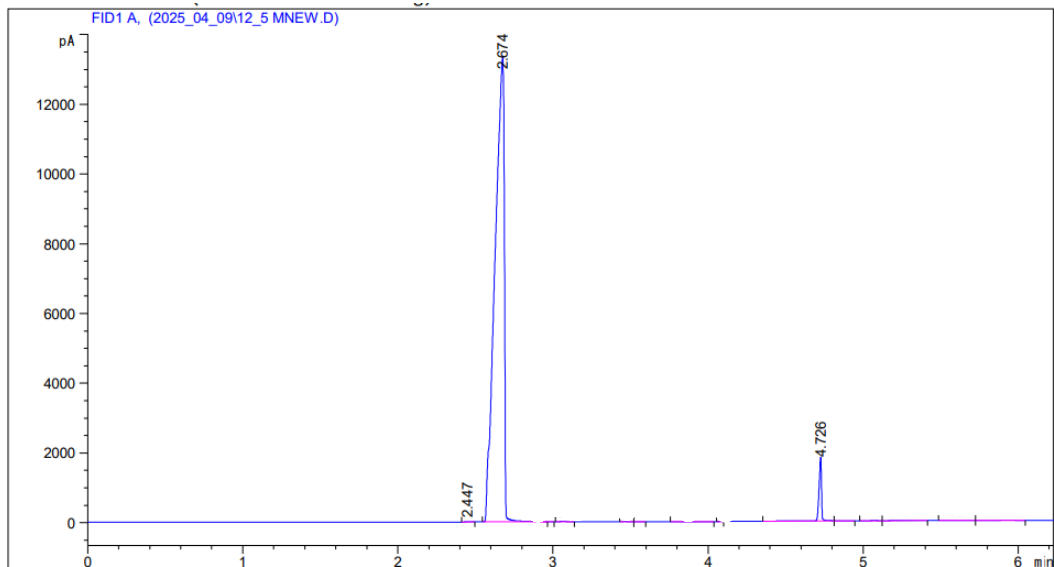


Рисунок 2.2 Хроматографування розчину $c(\text{ментолу}) = 12.5 \text{ мг/мл}$.

2.3.2 Результати експерименту з вибору розчинника

Ментол характеризується низькою розчинністю у воді, однак добре розчиняється в органічних розчинниках, зокрема в етанолі. Згідно з літературними даними, зокрема в роботі [18], для визначення ментолу в таблетках Валідолу застосовували розчинення препарату в етанолі. З іншого боку, в [20] досліджували ефективність різних розчинників (н-гексан, ацетон, петролейний ефір та МТБЕ) для вилучення ментолу з лікарських форм та встановили, що найкращі результати отримано при використанні метил-трет-бутилового етеру (МТБЕ). З метою верифікації та оптимізації методики ми експериментально перевірили ефективність трьох розчинників: етанолу, МТБЕ та дихлорметану (ДХМ). Для цього підготували три наважки подрібнених таблеток Валідолу масою по 3.0000 г, кожен з яких екстрагували 6.0 мл відповідного розчинника при струшуванні протягом 15 хвилин. Після фільтрації зразки аналізували методом ГХ-ПІД за методикою 2.2.3.

Крім того, було проведено експеримент з додаванням стандартної кількості ментолу (50 мг) до кожного з розчинів для оцінки повноти вилучення.

Результати експерименту наведено в табл. 2.5 нижче:

Таблиця 2.5 Визначення вмісту ментолу при використанні різних розчинників

m(таб.)	розчинник	m(ментолу), мг	m(ментолу)+доб 50 мг, мг
3.0150	Етанол	37.06±0.04	86.81±0.06
3.0002	ДХМ	36.87±0.07	86.90±0.08
3.0018	МТБЕ	24.4±0.2	52.4±0.09

Як видно з таблиці, етанол і дихлорметан показали високі значення вилучення ментолу, які добре узгоджувалися з теоретичною кількістю (з урахуванням доданої стандартної добавки), що свідчить про їхню ефективність. Натомість МТБЕ продемонстрував значно нижчі результати, в середньому на 30%

менше, порівняно з іншими розчинниками, а також меншу відтворюваність. Хроматограми ГХ визначення ментолу з добавкою наведені нижче (рис. 2.3):

a)

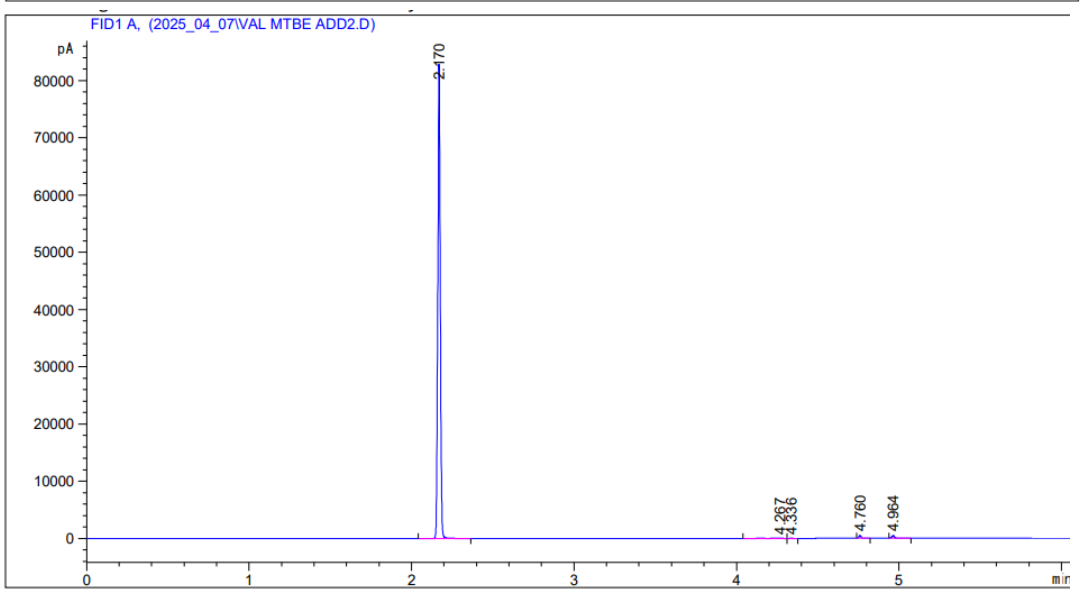
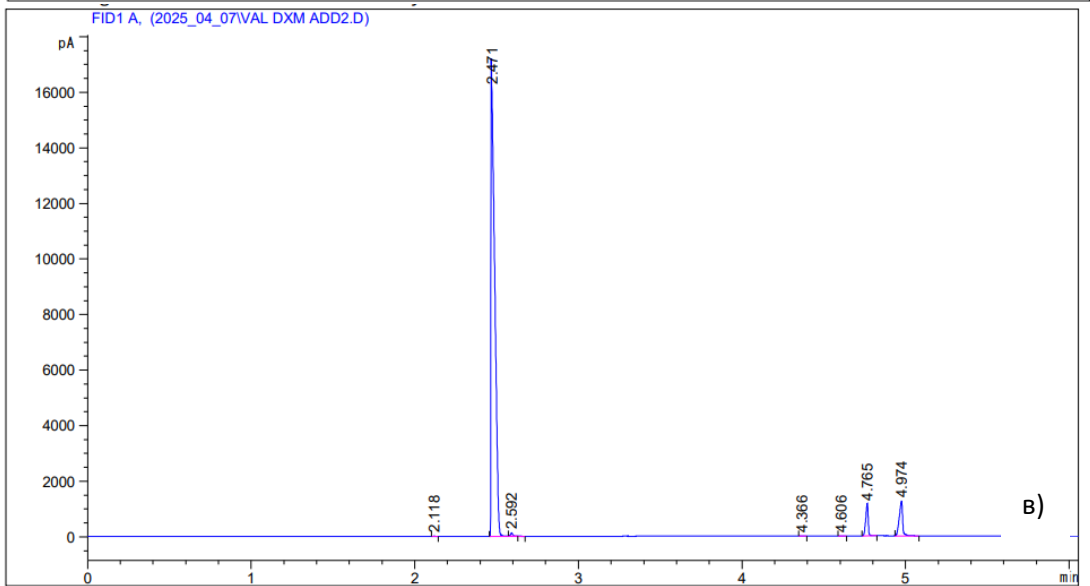
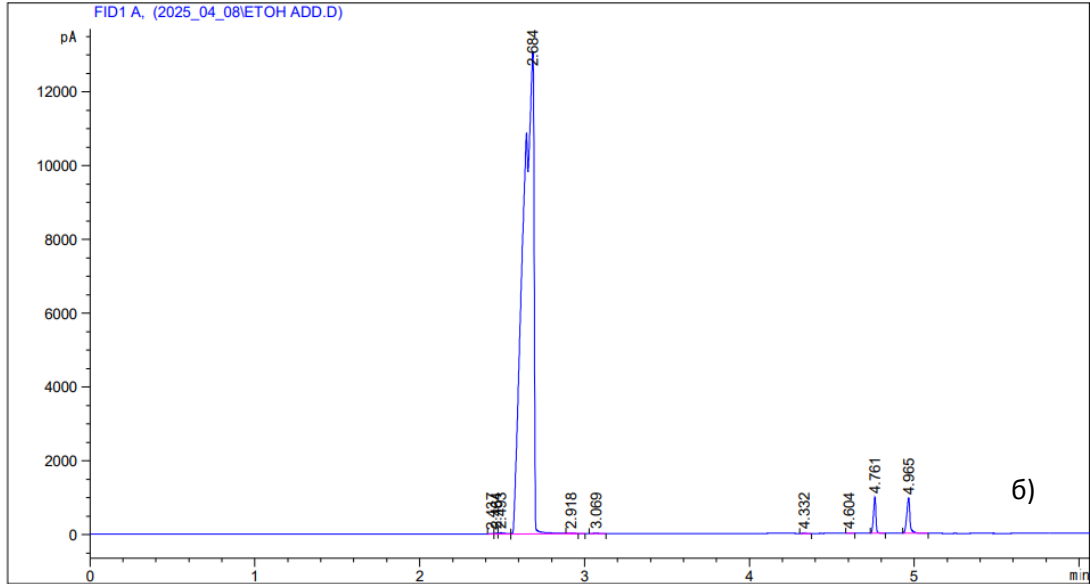


Рисунок 2.3 Визначення вмісту ментолу в таблетках «Валідол» з використанням етанолу (а), ДХМ (б), МТБЕ (в).

Додатковий експеримент з розчиненням таблеток у воді з подальшою екстракцією в органічний розчинник (ДХМ або МТБЕ) не забезпечив стабільних результатів і показав низьку відтворюваність, що свідчить про недоцільність застосування водного середовища для аналітичної пробопідготовки ментолу. З огляду на результати, для подальшого визначення ментолу у рослинній сировині був обраний ДХМ як оптимальний розчинник. Для аналізу таблеток Валідолу допустимо використовувати як ДХМ, так і етанол, залежно від зручності пробопідготовки.

2.3.3 Результати вивчення ступеня екстракції ментолу в ДХМ.

Для оцінки ефективності вилучення ментолу з водного середовища було проведено модельний експеримент за методикою, описаною у розділі 2.2.7. У водно-етанольний розчин об'ємом 25.0 мл, що містив 50.0 мг ментолу, проводили рідинно-рідинну екстракцію дихлорметаном з метою визначення оптимальної кількості екстракцій та об'єму органічного розчинника, необхідного для повного вилучення аналіту.

Було виконано дві серії дослідів:

- три послідовні екстракції по 10.0 мл ДХМ;
- три послідовні екстракції по 5.0 мл ДХМ.

Кожен органічний шар аналізували окремо за методикою 2.2.3, а концентрації ментолу розраховували за калібрувальним графіком.

Таблиця 2.6 Ступінь екстракції ментолу в ДХМ при послідовних екстракціях.

V(ДХМ), мл	№ екстракції		
	1	2	3
	m(ментолу), мг/мл		
10	47.2±0.3	3.10±0.05	-
5	35.6±0.2	14.41±0.07	1.12±0.04

Як видно з таблиці, дві екстракції по 10 мл забезпечили повне ($\approx 100\%$) вилучення ментолу з водного середовища, аналогічно до трьох послідовних екстракцій по 5 мл. Таким чином, у подальших практичних визначеннях було обґрунтовано використання двох послідовних екстракцій по 10 мл ДХМ як достатніх для повного вилучення ментолу із водної матриці.

2.3.4 Результати визначення ментолу в рослинній сировині

Для визначення ефективності екстракції ментолу з рослинної сировини (чай з м'яти перцевої) було проведено серію дослідів з різною тривалістю екстракції у апараті Сокслета — 3, 4, 5 та 6 годин. Концентрації ментолу визначали за градувальним графіком (рис. 2.1).

Зразки розчиняли в 1 мл ДХМ після упарювання, отже обчислена концентрація відповідає мг ментолу у зразку. Було розраховано вміст ментолу на 1 г сировини для двох варіантів чаїв:

- ЛікТрави (1.554 г у пакетику, таб. 2.7);
- Арбор Віте (1.474 г у пакетику, таб. 2.8).

Таблиця 2.7 Визначення ментолу при різній тривалості екстракції (ЛікТрави).

Час екстракції, год	Площа піка	Конц. ментолу, мг/мл	Ментол у зразку, мг	Вміст, мг/г (ЛікТрави)
3	202	1.28	-	-
4	375	2.45	-	-
5	728	4.84	-	-
6	758	5.04	5.04	3.24

Таблиця 2.8 Визначення ментолу при різній тривалості екстракції (Арбор Віте).

Час екстракції, год	Площа піка	Конц. ментолу, мг/мл	Ментол у зразку, мг	Вміст, мг/г (Арбор Віте)
3	190	1.20	-	-
4	335	2.18	-	-
5	676	4.49	-	-
6	703	4.67	4.67	3.17

Розрахунок середньої маси чаю в пакетуку наведено в таб. 2.9:

Таблиця 2.9 Розрахунок середньої маси чаю на один пакетик чаю.

Арбор Віте			ЛікТрави		
m(п), г	m(ч), г	m(ч, середня), г	m(п), г	m(ч), г	m(ч, середня), г
1.667	1.480	1.474	1.746	1.557	1.554
1.634	1.456		1.696	1.500	
1.675	1.486		1.806	1.604	

Як видно з таблиць 2.7-2.8, інтенсивність екстракції ментолу зростала до 5–6 години, після чого приріст ставав незначним, що свідчить про насичення процесу екстракції. Визначено, що оптимальний час екстракції становить 5 годин.

2.3.5 Результати визначення ментолу в м'яти перцевої настоянці «Віола»

Так як це етанольний розчин ЕО, то можна його вносити в ГХ систему без попередньої пробопідготовки. Визначення проводили за методикою 2.2.3. Отримана наступна хроматограма (рис. 2.4):

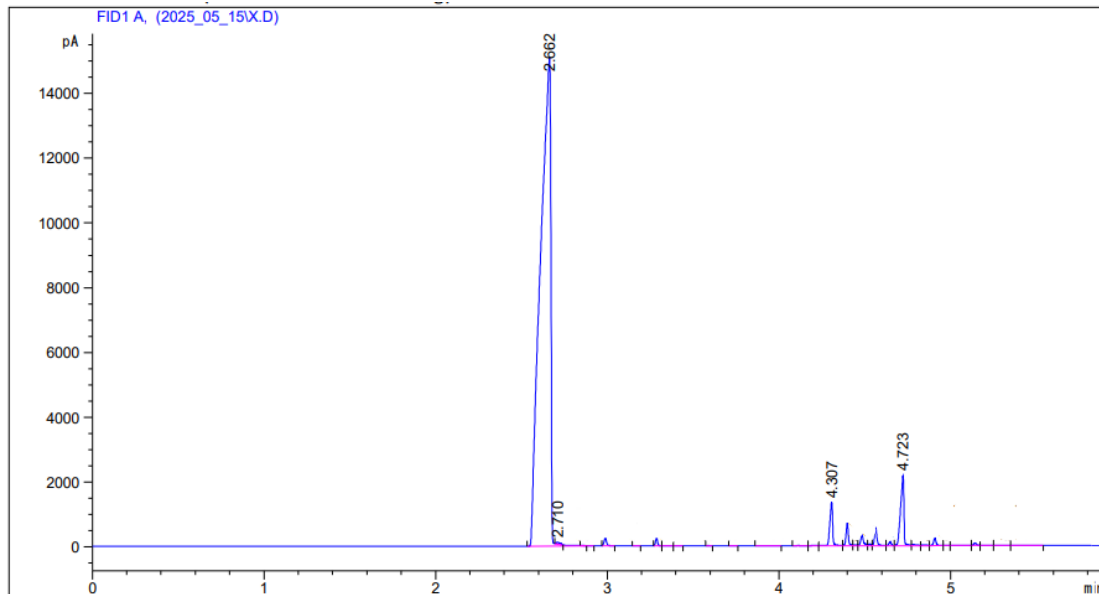


Рисунок 2.4 ГХ визначення ментолу в настоянці «Віола»

Площа піка становить $S(\text{«Віола»}) = 2907$. А отже, можна розрахувати концентрацію ментолу за градувальним графіком (рис. 2.1). $C(\text{ментолу}) = 19.56$ мг/мл.

2.3.6 Результати експерименту визначення ментолу в чаї приготованого з рослинної сировини.

Для оцінки вмісту ментолу у готовому до вживання напої було проаналізовано зразок чаю з м'яти перцевої, приготовленого за інструкцією виробника — 1 фільтр-пакет на 100 мл окропу з настоюванням 10 хвилин. Хроматографічний аналіз за методикою, описаною в розділі 2.2.3, показав, що

вміст ментолу екстракті виявився нижчим за межу визначення (1.38 мг/мл), запропонованої методики ГХ-ПД. Як видно з рисунку 2.5, пік ментолу на хроматограмі майже відсутній.

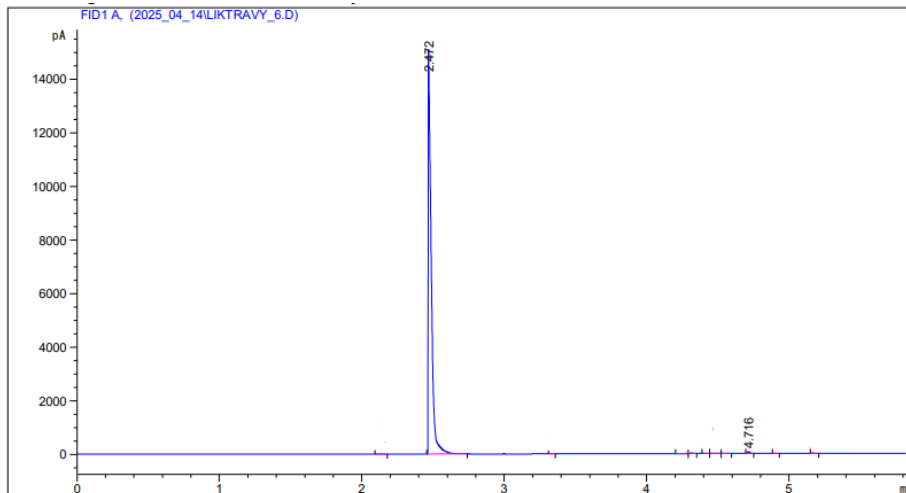


Рисунок 2.5 Результат хроматографування екстракту (в ДХМ) з завареного чаю.

2.4 Охорона праці

1. Вимоги безпеки при роботі з органічними розчинниками.

У процесі виконання експериментальної частини роботи використовувались органічні розчинники — етанол, дихлорметан (ДХМ) та метил-трет-бутиловий етер (МТБЕ), які належать до хімічно активних і потенційно небезпечних речовин. З цієї причини особливу увагу слід приділяти дотриманню правил охорони праці, пожежної безпеки та гігієни праці.

Етанол (C_2H_5OH). Фізико-хімічні властивості: легкозаймиста, летка рідина з характерним запахом. Утворює вибухонебезпечні пари. Він може викликати подразнення слизових оболонок, діє наркотично при вдиханні у великих концентраціях.

Вимоги безпеки:

- Працювати лише у витяжній шафі.

- Не працювати з ним поряд із відкритим полум'ям.
- Уникати вдихання парів, використовувати щільно закриту тару.

Метил-трет-бутиловий етер (МТБЕ). Фізико-хімічні властивості: прозора, дуже летка та легкозаймиста рідина з характерним ефірним запахом. Його пари утворюють вибухонебезпечні суміші з повітрям, подразнює очі та дихальні шляхи, токсичний при вдиханні. Вимоги безпеки:

- Застосовувати тільки у витяжці, забезпечити вентиляцію.
- Не зберігати біля джерел нагрівання або полум'я.
- Використовувати індивідуальні засоби захисту (ІЗЗ): респіратор, окуляри, рукавички.
- При розливі — адсорбувати інертним матеріалом та утилізувати згідно з нормами.

Дихлорметан (CH₂ Cl₂ , ДХМ). Фізико-хімічні властивості: безбарвна летка рідина з помірним запахом. Негорючий, але токсичний. Може діяти на ЦНС, може спричинити головний біль, запаморочення, подразнення шкіри та очей. Має канцерогенну дію при тривалому впливі. Вимоги безпеки:

- Обов'язково працювати у витяжній шафі.
- Використовувати захисні окуляри, рукавички з нітрилу або ПВХ, халат.
- Не допускати контакту з шкірою, уникати вдихання парів.
- Зберігати в окремій шафі для легколетких токсичних речовин.

1. Вимоги безпеки під час роботи з роторним випаровувачем.

Під час роботи з роторним випаровувачем необхідно дотримуватися таких запобіжних заходів: переконатися, що подача води в холодильник налагоджена; заповнити водяну баню на 2/3 та підтримувати цей рівень; використовувати лише термостійкі колби, призначені для вакуумної дистиляції; надійно приєднати колбу до паровідвідної трубки, використовуючи зажим; перекрити двоходовий кран перед запуском обертання та зануренням колби в баню; вакуумний насос вмикати після встановлення швидкості обертання, а температуру бані регулювати для забезпечення потрібної швидкості перегонки. [30]

2. Вимоги безпеки під час роботи з газовими балонами високого тиску

У ГХ використовуються балони з газом під високим тиском, це азот, водень, гелій, повітря. Робота з такими балонами вимагає суворого дотримання правил техніки безпеки, оскільки порушення може призвести до вибуху, пожежі чи отруєння. Основні вимоги:

- Газові балони повинні бути надійно закріплені у вертикальному положенні за допомогою ланцюгів або спеціальних кріплень.
- Балони мають бути оснащені справними редукторами тиску, придатними для конкретного виду газу.
- Категорично заборонено:
 - Самостійно відкривати або ремонтувати редуктори.
 - Працювати з балонами без підготовки або інструктажу.

Перед використанням треба перевірити маркування балона, наявність пломби, строк придатності. Візуально оглянути балон на наявність пошкоджень або корозії. Перевірити герметичність з'єднань перед подачею газу до хроматографа (наприклад, за допомогою мильного розчину).

Під час експлуатації треба відкривати вентиль повільно, обережно, без ривків. Слідкувати за показниками манометрів: тиск не повинен перевищувати рекомендованих меж. Заборонено повністю використовувати балон «до нуля» — залишок має бути не менше 0.05 МПа (0.5 бар).

ВИСНОВКИ

1. Запропоновано методику газохроматографічного визначення (газовий хроматограф Agilent 6890 GC оснащений полум'яно-іонізаційним детектором, колонкою DB-WAX) вмісту ментолу в рослинній сировині, фармацевтичних препаратах на її основі та фармацевтичному препараті «Валідол»: температура інжектора 230 °С, поділ потоку 1:80, програмування температури колонки від 40 °С до 190 °С, лінійна швидкість рухомої фази (азот) 1 мл/хв, час аналізу 5.9 хв. Час утримування ментолу за таких умов знаходиться в діапазоні 4.71 – 4.76 хв, межа визначення – 1.38 мг/мл.

2. Показано, що для вилучення ментолу зі зразків рослинної сировини доцільно використовувати розчинник дихлорметан, також для повного вилучення ментолу із фільтр-пакетів чаю на основі м'яти перцевої достатньо 5 годин екстракції Сокслета.

3. Було визначено вміст ментолу: у таблетках «Валідол» — $14.72 \pm 0,08$ мг на таблетку; сировині чаю з м'яти перцевої — до 3.24 мг/г сухої маси; настоянці м'яти перцевої «Віола» — 19.56 мг/мл.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Hojanyyazova, M. Isolation Technology of Menthol from Mint (*Mentha Arvensis*) and Using on Food Industry. *Symbol of Science* **2024**, *11*(1-1), 16–18.
2. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 1254, Menthol. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Menthol> (accessed 2025, May 14).
3. Mansurov, D. A.; et al. Relationship between Structural Properties and Biological Activity of (–)-Menthol and Some Menthyl Esters. *Comput. Biol. Chem.* **2025**, *108*, 35–37.
4. Clark, G. S. Aroma Chemical Profile: Menthol—History, World Consumption, Synthetics, By-products, Substitutes and Derivatives; 2007.
5. Etzold, B.; Jess, A.; Nobis, M. Epimerisation of Menthol Stereoisomers: Kinetic Studies of the Heterogeneously Catalysed Menthol Production. *Catal. Today* **2009**, *140*(1–2), 30–36.
6. Khaliq, F. A.; Mushtaq, A. The Five Most Traded Compounds Worldwide: Importance, Opportunities, and Risks. *Int. J. Chem. Biochem. Sci.* **2023**, *23*, 185–194.
7. Reverchon, E.; De Marco, I. Supercritical Fluid Extraction and Fractionation of Natural Matter. *J. Supercrit. Fluids* **2006**, *38*(2), 146–166.
8. Wu, Z.; et al. Chemical Composition and Antioxidant Properties of Essential Oils from Peppermint, Native Spearmint and Scotch Spearmint. *Molecules* **2019**, *24*(15), 2825.
9. Nadeem, M.; Saxena, B.; Akbar, N. Chemical Profile and Extraction Technique of Oil of *Mentha Arvensis*. *IRA-Int. J. Technol. Eng.* **2017**, *6*(2), 24–28. <https://doi.org/10.21013/jte.v6.n2.p2>
10. Gavahian, M.; Farahnaky, A.; Farhoosh, R.; Javidnia, K.; Shahidi, F. Extraction of Essential Oils from *Mentha Piperita* Using Advanced Techniques: Microwave Versus Ohmic Assisted Hydrodistillation. *Food Bioprod. Process.* **2015**, *94*, 50–58. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2015.01.003>
11. Bui-Phuc, T.; Nhu-Trang, T. T.; Cong-Hau, N. Comparison of Chemical Composition of Essential Oils Obtained by Hydro-distillation and Microwave-assisted

Extraction of Japanese Mint (*Mentha Arvensis* L.) Grown in Vietnam. *IOP Conf. Ser.: Mater. Sci. Eng.* **2020**, 991(1), 012012.

12. Gavahian, M.; et al. Ohmic-Assisted Hydrodistillation of Essential Oils from *Zataria Multiflora* Boiss (Shirazi Thyme). *Int. J. Food Sci. Technol.* **2011**, 46(12), 2619–2627. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2011.02792.x>

13. Pavlić, B.; et al. Antioxidant and Enzyme-Inhibitory Activity of Peppermint Extracts and Essential Oils Obtained by Conventional and Emerging Extraction Techniques. *Food Chem.* **2020**, 127724. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127724>

14. Kumari, M. Comparative Study of Extraction of Peppermint (*Mentha Piperita*) Essential Oil by Three Different Methods. *Inspira-Res. Trends Sci. Technol.* **2022**, 2(1), 17–19. <https://www.inspirajournals.com/uploads/Issues/220579144.pdf>

15. Reverchon, E.; De Marco, I. Supercritical Fluid Extraction and Fractionation of Natural Matter. *J. Supercrit. Fluids* **2006**, 38(2), 146–166. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2006.03.020>

16. Shrigod, N. M.; Swami Hulle, N. R.; Prasad, R. V. Supercritical Fluid Extraction of Essential Oil from Mint Leaves (*Mentha Spicata*): Process Optimization and Its Quality Evaluation. *J. Food Process Eng.* **2016**, 40(3), e12488. <https://doi.org/10.1111/jfpe.12488>

17. Мельник, П. В.; Нікітіна, Н. О. Умови Визначення Вмісту Ментолу в Продуктах на Основі Рослинної Сировини М'яти Перцевої Методом Газової Хроматографії. In *Хімічні Каразінські читання – 2025*; ХНУ імені В. Н. Каразіна: Харків, Україна, 2025; pp 56.

18. Tsvetkova, B.; Pencheva, I.; Zlatkov, A.; Peikov, P. Validated GC Method for Determination of Validol in Tablet Dosage Forms. *Asian J. Pharm. Clin. Res.* **2012**, 5(Suppl 3), 96–97.

19. Orav, A.; Kann, J. Determination of Peppermint and Orange Aroma Compounds in Food and Beverages. *Proc. Est. Acad. Sci. Chem.* **2001**, 50(4), 217–225.

20. Lo, Y. M.; et al. Menthol as the Flavour Quality Indicator for Tablets Containing Peppermint Oil. *Food Sci. Technol. Int.* **2002**, 8(4), 249–254. <https://doi.org/10.1106/108201302028117>

21. Feng, Y.; et al. Optimization of Determination Method of Cooling Agents in Cigarette Tipping Paper by Gas Chromatography. *LC GC N. Am.* **2022**, *40*, 180–185. <https://doi.org/10.56530/lcgc.na.dz7880w9>
22. Botrel, B. M. C.; et al. Dispersive Liquid–Liquid Microextraction for the Determination of Menthol Residue in Fish by GC–MS. *Microchem. J.* **2017**, *133*, 70–75. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2017.03.008>
23. Milić, S.; et al. Comparison of Mentha Extracts Obtained by Different Extraction Methods. *Acta Period. Technol.* **2006**, *37*, 145–154.
24. Anastasia-Sandu, A.; et al. Direct Determination of Menthol Using a Simple Spectrophotometric Method. *Bull. Inst. Politeh. Iași* **2013**, *59*(2), 72–80.
25. Park, H. E.; et al. Simple Preparative Gas Chromatographic Method for Isolation of Menthol and Menthone from Peppermint Oil, with Quantitative GC-MS and ¹H NMR Assay. *J. Sep. Sci.* **2011**, *35*(3), 416–423. <https://doi.org/10.1002/jssc.201100670>
26. Shaikh, K.; Patil, S. Sensitive and Selective Method for the Analysis of Menthol from Pharmaceutical Products by RP-HPLC with Refractive Index Detector. *J. Pharm. Bioall. Sci.* **2010**, *2*(4), 360. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.72141>
27. Lin, Y.-T.; et al. Enantiomeric Analysis of (+)-Menthol and (–)-Menthol by Fluorogenic Derivatization and Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. A* **2005**, *1087*(1–2), 223–228. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.01.056>
28. Al-Hilfi, A. A.; et al. Effect of Citrus Limon and Mentha Piperita Oil on the *Balantidium coli* in Vitro. *Ann. Rom. Soc. Cell Biol.* **2021**, *50*(16), 20–33.
29. National Institute of Advanced Industrial Science and Technology. SDDBS: Spectral Database for Organic Compounds. <https://sdbs.db.aist.go.jp/> (accessed 2025, May 14).
30. Інструкція з охорони праці при виконанні робіт в лабораторії хроматографічної очистки речовин: ОП 029. ТОВ «НВП «СНАМІН», 2019.