

НОВОСИБИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

Факультет естественных наук

Кафедра аналитической химии

Научно-учебно-методический Центр "Хроматография"

Курсовая работа

**Идентификация основных компонентов пихтового масла  
и соснового скипидара методом ВЭЖХ**

Выполнила:

студентка гр. 047 М.С.Вяткина

Научный руководитель:

А.Г.Друганов

Новосибирск - 2004

## Содержание

1. ВВЕДЕНИЕ.....	3
2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	
2.1. Жидкостная хроматография в системах с динамическим модифицированием.....	4
2.2. Образование $\pi$ -комплексов с $Ag^+$ .....	6
3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	
3.1. Методы и материалы.....	8
3.2. Оптимизация условий разделения методом обращенно-фазовой ВЭЖХ.....	8
3.3. Определение и идентификация $\alpha$ -пинена.....	10
3.4. Определение $\beta$ -фелландрена ( $\beta$ ) и $\beta$ -пинена.....	12
3.5. Попытка определения борнилацетата.....	12
3.6. Определение терпеноидов методом обращенно-фазовой ВЭЖХ в присутствии в подвижной фазе $AgNO_3$ .....	14
3.7. Хроматографическое исследование образца соснового скипидара.....	15
4. ВЫВОДЫ.....	16
5. ЛИТЕРАТУРА.....	17

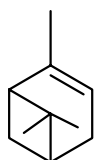
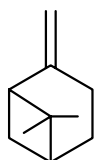
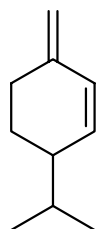
## 1. ВВЕДЕНИЕ

Эфирные масла представляют собой сложные смеси веществ, с приятным ароматом, присутствующие в растениях. По физико-химическим свойствам и по составу терпеноидов, входящих в состав сложной смеси эфирных масел, они заметно отличаются друг от друга. Многие из этих природных смесей используются в парфюмерии. Большинство эфирных масел, содержащих в своем составе смеси моно- и сесквитерпенов, а также незначительные количества компонентов других классов представляют коммерческий интерес.

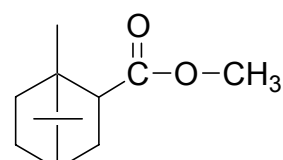
Эфирные масла обычно получают холодным прессованием. Более 95% содержащихся в них веществ приходится на монотерпены. Многие из них обладают антибактериальной активностью и эти вещества вводят в состав фармацевтических препаратов. Для ряда монотерпенов характерны такие терапевтические свойства, как противовоспалительные, гипотонические, успокаивающие, отхаркивающие. Некоторые монотерпены, включая спирты линалоол и  $\alpha$ -терпениол, биологически активны по отношению к млекопитающим, а их эфиры – по отношению к насекомым.

Интерес к веществам, содержащимся в эфирных маслах, стимулирует развитие и совершенствование аналитических методов их определения. К таким методам прежде всего относятся различные варианты газовой и жидкостной хроматографии, мицеллярный капиллярный электрофорез [1]. Так как компоненты эфирных масел обладают хорошей летучестью и термостабильны, то наибольшее распространение получил метод газовой хроматографии (ГХ). Однако, особенно в тех случаях, когда вещества необходимо препаративно выделить из смеси в чистом виде для последующего изучения их химических свойств и строения, целесообразнее использовать метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Одной из проблем, которая возникает при определении монотерпенов методом ВЭЖХ, является проблема отделения насыщенных веществ от ненасыщенных. Она актуальна, в частности, при исследовании пихтового масла, главными компонентами которого являются:

 $\alpha$ -пинен (1) $\beta$ -пинен (2) $\beta$ -фелландрен (3)

борнилацетат (4)



Известным способом, применяемым в жидкостной хроматографии для разделения ненасыщенных и насыщенных соединений, является введение в подвижную фазу ионов серебра, которые, образуя  $\pi$ -комплексы с двойными связями, изменяют хроматографические свойства последних. Такой вариант хроматографического разделения называется "жидкостная хроматография с динамическим модифицированием".

Данное исследование посвящено разработке методики разделения и идентификации основных компонентов пихтового масла и соснового скипидара с помощью ВЭЖХ на колонке с обращенной фазой с динамическим модифицированием подвижной фазой ионами серебра.

## 2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 2.1. Жидкостная хроматография в системах с динамическим модифицированием

Динамическое модифицирование (ДМ) – весьма часто применяемый в жидкостной хроматографии прием, позволяющий регулировать селективность хроматографической системы и, тем самым, разрешение веществ, в широких пределах. Его суть заключается во введении в состав подвижной фазы специального вещества-модификатора, который, находясь в динамическом равновесии со всеми "участниками" хроматографического

процесса, образует ассоциаты с молекулами вещества-аналита или с функциональными группами сорбента и изменяет в результате такой ассоциации механизм всего хроматографического процесса.

Иногда ДМ используется при работе с немнофункциональными сорбентами для подавления нежелательных побочных механизмов сорбции, которые ухудшают линейность изотерм сорбции и симметрию хроматографических пиков. Так с этой целью при ВЭЖХ аминов на обращенных фазах, синтезированных на основе силикагеля, в состав подвижной фазы вводят соли триэтиламмония для подавления ионообменного взаимодействия аминов-аналитов с остаточными силанольными группами сорбента. В качестве другого примера можно привести ион-парную обращенно-фазовую ВЭЖХ, при которой в подвижную фазу вводят гидрофобные катионы (или анионы) для увеличения удерживания гидрофильных ионов с зарядом противоположного знака.

Как уже было сказано выше, для разделения насыщенных и ненасыщенных соединений в подвижную фазу вводят ионы серебра. Такой способ был применен, например, для разделения *цис*- и *транс*-изомеров метиловых эфиров жирных кислот [2]. При исследовании терпеноидов в качестве адсорбентов для колоночной или препаративной тонкослойной хроматографии чаще всего используются силикагель или силикагель, импрегнированный нитратом серебра. Применение последнего позволяет отделять сумму алканов от терпеновых углеводов, разделять сложные смеси близких по строению и, в том числе, изомеров терпеноидов разных типов, однако, существуют определенные трудности в получении гомогенного и постоянного во времени упакованного материала [3]. Колонки готовят пропитыванием силикагеля водным раствором нитрата серебра с последующей сушкой при 120 °С. Появление колонок такого типа было вызвано оживлением интереса к ВЭЖХ жиров [4] и метиловых эфиров жирных кислот [5]. Определенным ограничением при использовании

колонок с импрегнированным ионами серебра силикагелем является то, что некоторые вещества склонны в его присутствии изомеризоваться, что нежелательно [6].

Соли серебра для динамической модификации в обращенной-фазовой ВЭЖХ были применены для определения многих липидов - витамин *D*, ненасыщенные углеводороды, триглицериды и другие жиры. Было показано, что присутствие соли серебра в подвижной фазе приводит к формированию  $\pi$ -комплексов. Связывание осуществляется за счет взаимодействия электрофильного иона серебра с занятой  $\pi$ -орбиталью ненасыщенного углеводорода. Так как полярность молекулы в результате ассоциации увеличивается, то ее удерживание уменьшается. Ассоциаты иона серебра с цис-изомерами прочнее ассоциатов с *транс*-изомерами, и это различие лежит в основе разделения этих геометрических изомеров.

Следует отметить, что хроматографическое поведение веществ с двойными связями определяется не только ассоциацией их с ионами серебра. Здесь могут присутствовать и смешанные механизмы, такие как взаимодействие ионов серебра с силикагелем.

## 2.2. Образование $\pi$ -комплексов с $\text{Ag}^+$

Образование  $\pi$ -комплексов веществ, имеющих двойные связи, было продемонстрировано хроматографированием насыщенных и ненасыщенных метиловых эфиров жирных кислот в присутствии солей серебра и калия. При низких концентрациях  $\text{Ag}^+$  ( $<10^{-3}$  М) происходит незначительное изменение времен удерживания как насыщенных, так и ненасыщенных соединений. При концентрации  $\text{Ag}^+$  в подвижной фазе выше  $10^{-3}$  М (используется раствор соли  $\text{AgClO}_4$ ) время удерживания ненасыщенных веществ уменьшается значительно, в то время как удерживание эфиров насыщенных жирных кислот возрастает из-за эффекта высаливания.

Сравнение влияния добавок в подвижную фазу нитратов или перхлоратов калия и серебра показало, что в присутствии ионов  $\text{Ag}^+$  уменьшается удерживание только ненасыщенных веществ, а в присутствии солей калия удерживание всех веществ увеличивается. Это послужило основанием для вывода об образовании гидрофильных  $\pi$ -комплексов между двойными связями и ионом  $\text{Ag}^+$  [5].

Концентрация  $\pi$ -комплексов зависит от химической природы вещества и типа соли серебра. Образование комплексов метиловых эфиров жирных кислот с  $\text{Ag}^+$  происходит при концентрации  $\text{AgClO}_4$   $5 \cdot 10^{-3}$  М, тогда как комплексы с *фото*-изомерами жирных кислот при концентрации этой соли  $10^{-2}$  М.

Для ВЭЖХ с фотометрическим детектированием при  $\lambda=190-210$  нм целесообразно использовать в качестве модификатора перхлорат серебра, т.к. раствор нитрат серебра обладает в этой области спектра значительным оптическим поглощением.

### 3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

#### 3.1. Методы и материалы

Исследования проводили в Научно-учебно-методическом центре "Хроматография". В работе использовали высокоэффективный жидкостный хроматограф "Милихром А-02" (ЗАО "ЭкоНова", Новосибирск). Типичные условия анализа пихтового масла были следующими:

- колонки:  $\varnothing 2 \times 75$  мм с Silasorb C18, 5 мкм (LaChema, ЧССР) или с ProntoSIL-120-5-C18 ("BISCHOFF Analysentechnik", Германия);
- режим элюирования: изократический или градиентный;
- температура колонки:  $35^\circ\text{C}$ ;
- детектор: 200, 210, 220, 230, 240 и 250 нм, одновременно.

Обработку полученных хроматограмм осуществляли с помощью обрабатывающей программы "МультиХром" (ЗАО "Амперсенд", Москва).

Химические реактивы. Ацетонитрил сорт "0" или "1" ("Криохром", С.-Петербург). Образцы пихтового масла любезно предоставлены А.Г.Другановым (Новосибирский институт органической химии СО РАН, Новосибирск). Остальные реактивы квалификации "ч.д.а." или "х.ч."

### 3.2. Оптимизация условий разделения методом обращенно-фазовой ВЭЖХ

Цель данного исследования - оптимизация условий ВЭЖХ анализа для разделения основных компонентов образца пихтового масла с приемлемым разрешением. Нами были опробованы следующие подвижные фазы:

- 0.1% трифторуксусная кислота:ацетонитрил;
- 0.05 М  $\text{H}_3\text{PO}_4$ :ацетонитрил;
- 0.2М  $\text{LiClO}_4$  в 0,005М  $\text{HClO}_4$ : ацетонитрил;
- вода:ацетонитрил+гексан (7:1);
- вода:метанол;
- вода:этанол;
- вода:изопропанол.

Применение этих подвижных фаз не позволило решить поставленную задачу в полной мере. Разрешение компонентов образца пихтового масла существенным образом зависит от эффективности колонки и типа обращенной фазы. Сравнение хроматограмм одного образца на разных колонках приведено на рис. 1. Эффективность колонок измеряли по пику пирена при элюировании его 80% водным ацетонитрилом.

Наиболее оптимальными условиями оказались: элюенты: А- вода, Б-  $\text{CH}_3\text{CN}$ ; градиентное элюирование: от 70 до 100% Б; скорость потока: 100 мкл/мин; температура колонки: 35°С; детектор: длины волн 200, 210, 220, 230, 240, 250 нм,  $\tau=0.18$  с; объем пробы: 4 мкл.

В этих условиях были проанализированы другие образцы пихтовых масел. Все образцы имели одну и ту же группу основных пиков (наиболее



интенсивных) и малых пиков. Между собой они отличались лишь соотношением отдельных компонентов. Всем пикам были присвоены номера, (см. рис 2), по которым они далее именуется в работе. Для дальнейшей работы был выбран образец пихтового масла (г. Кемерово).

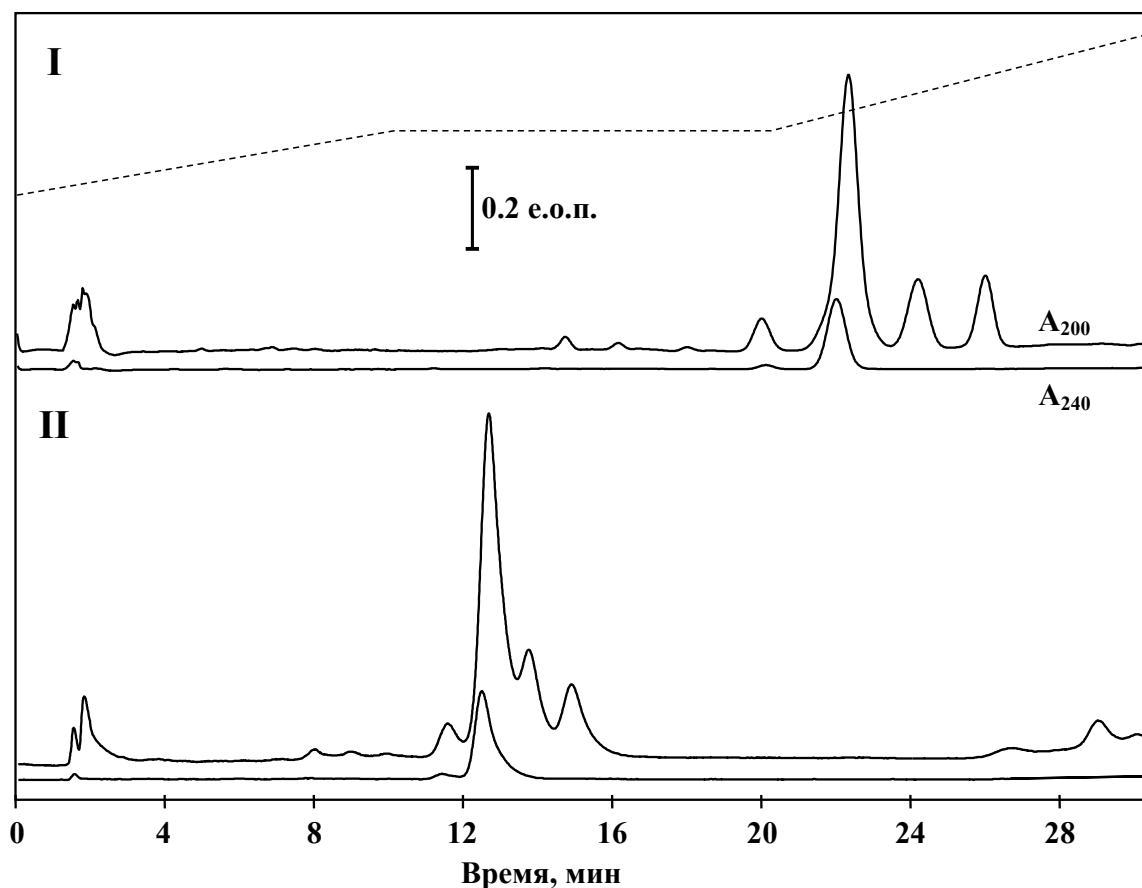


Рис. 1. Сравнение хроматограмм образцов пихтового масла, полученных на разных колонках.

**I-** ProntoSIL-120-5-C18 (N=6000 т.т.); **II-** Silasorb C18 (5мкм) (N=3000 т.т.).

элюенты: А- вода, Б-  $\text{CH}_3\text{CN}$ ; градиентное элюирование: от 70 до 100% Б; скорость потока: 100 мкл/мин; температура колонки: 35 °С; детектор: длины волн 200, 210, 220, 230, 240, 250 нм,  $\tau=0.18$  с; объем пробы: 4 мкл.

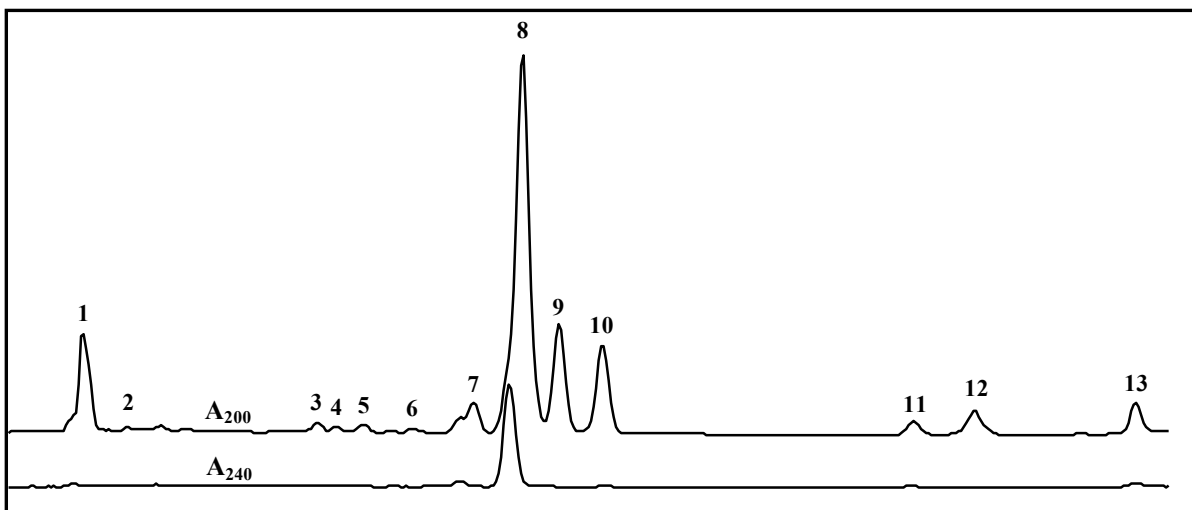


Рис 2. Хроматограмма пихтового масла на колонке ProntoSIL-120-5-C18 условия хроматографирования как в подписи к рис. 1

Главные компоненты пихтового масла детектируются с помощью фотометрического детектора за счет поглощения, обусловленного хромофорами, которыми являются двойные связи:  $\alpha$ -пинен (1) содержит одну двойную связь,  $\beta$ -пинен (2) и  $\beta$ -фелландрена (3) – две сопряженные двойные связи. По литературным данным [8] детектирование сопряженных систем следует проводить на длине волны 240 нм, а одинарной двойной связи – на 200 нм. В молекуле борнилацетата (4) присутствует другая хромофорная группа – ацетатная. Ее экстинкция примерно в 10 раз меньше, чем экстинкция двойной связи. УФ-спектр ацетатной группы дает максимум поглощения при  $\lambda=210$  нм.

### 3.3. Определение и идентификация $\alpha$ -пинена (1)

Идентификацию  $\alpha$ -пинена (1) на хроматограммах пихтового масла проводили методом внешнего стандарта. В качестве внешнего стандарта использовали препарат  $\alpha$ -пинена (1), который растворили в метаноле с концентрацией 1 мг/мл и хроматографировали в условиях, приведенных в подписи к рис. 1. Кроме времени удерживания рассчитывали спектральные отношения (отношения площадей пиков), приведенные к площади пика на кривой  $A_{200}$ , т.е.  $S_X/S_{200}$ . Результаты приведены в табл 1.

Таблица 1. Сравнение хроматографических параметров  $\alpha$ -пинена (1) и вещества №10 образца пихтового масла.

Вещество	$t_R$ , сек	Спектральные отношения $S_X/S_{200}$				
		$S_{210}$	$S_{220}$	$S_{230}$	$S_{240}$	$S_{250}$
пик №10	1430	0,94	0,44	0,07	0,01	0,00
$\alpha$ -пинен	1428	0,95	0,45	0,08	0,01	0,00

Из табл. 1 видно, что времена удерживания и спектральные отношения вещества №10 и  $\alpha$ -пинена (1) совпадают в пределах допустимой погрешности (для  $t_R$ , погрешность менее 1%, для  $S_X/S_{200}$  – менее  $\pm 0,02$ ).

Для подтверждения правильности идентификации нами были записаны во время хроматографии (после остановки потока) УФ-спектры  $\alpha$ -пинена (1) и пика №10. Как видно на рис. 2, нормированные УФ-спектры этих веществ совпали.

Таким образом нами доказано, что пик №10 на хроматограмме пихтового масла соответствует  $\alpha$ -пинену (1).

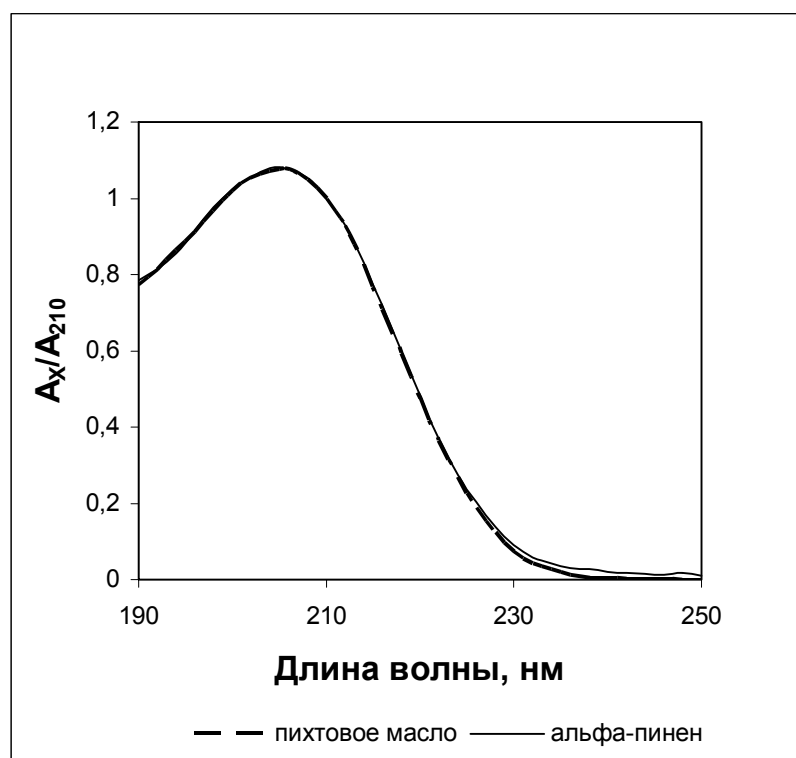


Рис. 2. Сравнение нормированных спектров поглощения пика №10 в образце пихтового масла и раствора  $\alpha$ -пинена (1)

### 3.4. Определение $\beta$ -фелландрена (3) и $\beta$ -пинена (2)

Растворы  $\beta$ -фелландрена (3) и  $\beta$ -пинена (2) в метаноле (по 1 мг/мл) хроматографировали в условиях, приведенных в подписи к рис. 1. Результаты хроматографии приведены в табл. 2.

Таблица 2. Сравнение времен удерживания  $\beta$ -пинена (2),  $\beta$ -фелландрена (3) и вещества №8 образца пихтового масла.

Образец	$t_R$ при $\lambda=200$ нм, сек	$t_R$ при $\lambda=240$ нм, сек
пик № 8	1236,9	1205, 5
$\beta$ -пинен (2)	1244,9	-----
$\beta$ -фелландрен (3)	1211,0	1211,0

Из табл. 2 видно, что времена удерживания стандартов и пика №8 совпадают, т.е.  $\beta$ -пинен (2) и  $\beta$ -фелландрен (3) в этих условиях не разделяются.

Хроматограмма образца пихтового масла с маркировкой пиков приведена на рис. 3.

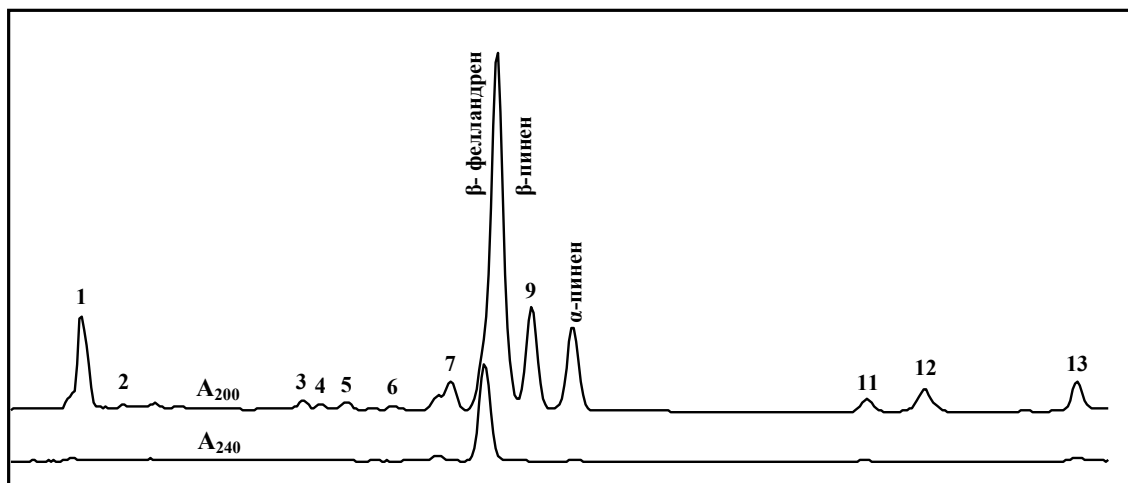


Рис. 3. Хроматограмма пихтового масла на колонке с фазой ProntoSIL-120-5-C18 (N=6000 т.т.)

### 3.5. Попытка определения борнилацетата (4)

Препарат борнилацетата (4) был получен из лаборатории химии терпеновых соединений Института органической химии СО РАН

(г.Новосибирск). По данным ПМР-спектроскопии содержание основного вещества в нем составляла около 95%. Однако, на хроматограмме раствора этого препарата в метаноле (1 мг/мл), записанной нами в стандартных условиях (см. подпись к рис. 1) оказалось много мелких пиков, среди которых "главным" пиком ни один назвать было нельзя. Сравнение времен удерживания и спектральных отношений основных пиков на хроматограмме борнилацетата (4) с основными пиками на хроматограмме образца пихтового масла не выявило "похожих" пиков. На основании этих данных нами сделан вывод о том, что борнилацетат (4) в полученном из НИОХ СО РАН препарате разложился. О том, что это вещество весьма лабильно, известно из работы [6].

### 3.6. Определение терпеноидов методом обращенно-фазовой ВЭЖХ в присутствии в подвижной фазе $\text{AgNO}_3$

Для разделения  $\beta$ -фелландрена (3) и  $\beta$ -пинена (2) нами была апробирована обращенно-фазовая ВЭЖХ в присутствии в подвижной фазе  $\text{AgNO}_3$ . Ионы  $\text{Ag}^+$  из общих соображений должны образовывать более прочный  $\pi$ -комплекс с  $\beta$ -фелландреном (3) (две двойные сопряженные связи), чем с  $\beta$ -пиненом (2) (одна двойная связь), что должно способствовать разделению этих веществ.

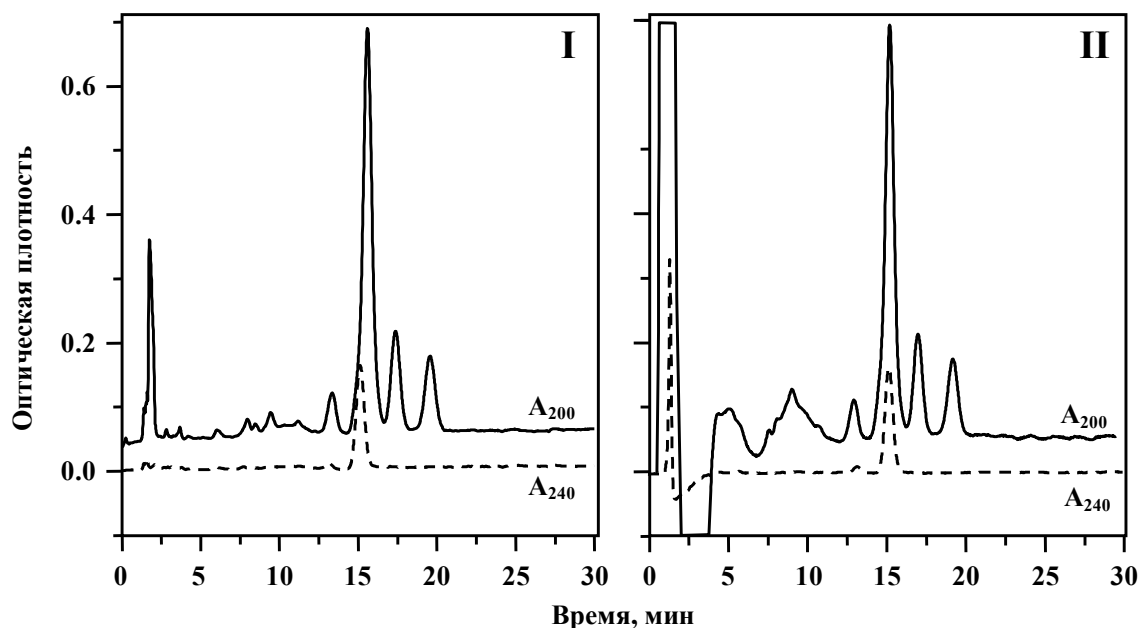


Рис. 4. Хроматограммы образца пихтового масла.

I. Элюент: вода:CH<sub>3</sub>CN (30:70).

II. Элюент: 0.001 М водный раствор AgNO<sub>3</sub>: CH<sub>3</sub>CN (30:70).

Режим разделения – изократический. Остальные условия как в подписи к рис. 1.

Результаты эксперимента показаны на рис. 4. Из хроматограммы II видно, что присутствие ионов Ag<sup>+</sup> в подвижной фазе с концентрацией около 0.0003 М не приводит к изменению удерживания β-фелландрена (3) и β-пинена (2) и, тем самым, не способствует их разделению. Видимо, концентрация нитрата серебра, соизмеримая с концентрацией веществ-аналитов оказалась слишком низкой для образования π-комплексов. Мы не смогли ее увеличить в 5-10 раз, т.к. раствор нитрата серебра обладает слишком высоким поглощением при λ=200 нм и не дает возможность использовать фотометрическое детектирование с приемлемым уровнем шума сигнала. Выходом из этого положения была бы замена нитрата серебра на перхлорат, но этой соли в нашем распоряжении не оказалось.

С другой стороны, разделение β-фелландрена (3) и β-пинена (2) в присутствии ионов Ag<sup>+</sup>, в отличие от известного разделения ненасыщенных длиноцепочечных жирных кислот, может и не произойти из-за того, что

молекулы жирных кислот весьма "гибкие", а молекулы терпеноидов – кофигурационно "жесткие".

В принципе разделение этих компонентов необязательно. Для количественного определения  $\beta$ -фелландрена (3) и  $\beta$ -пинена (2) в образцах пихтовых масел достаточно того, что  $\beta$ -фелландрен (3) поглощает на длине волны 240 нм, а общее поглощение  $\beta$ -фелландрена (3) и  $\beta$ -пинена (2) – на длине волны 200 нм. Таким образом, площадь под пиком на длине волны 240 нм соответствует количеству  $\beta$ -фелландрена (3) в образце, а разница площадей пиков на 200 нм и 240 нм даёт количество  $\beta$ -пинена (2) в образце.

### 3.7. Хроматографическое исследование образца соснового скипидара

Среди эфирных масел особое значение имеет скипидар, производство которого составляет отдельную отрасль лесной промышленности. Скипидар применяется при изготовлении лаков, красок, технических восков и вакс, используется в качестве растворителя. Кроме того, скипидар является сырьем для синтеза целого ряда технически важных продуктов: камфора, терпин, терпинеол и др. [7].

Полученные на примере пихтового масла результаты были нами использованы для исследования образца скипидара. Образец растворяли в метаноле с концентрацией 1 мг/мл и хроматографировали в тех же условиях, что и образец пихтового масла. Хроматограмма приведена на рис. 5.

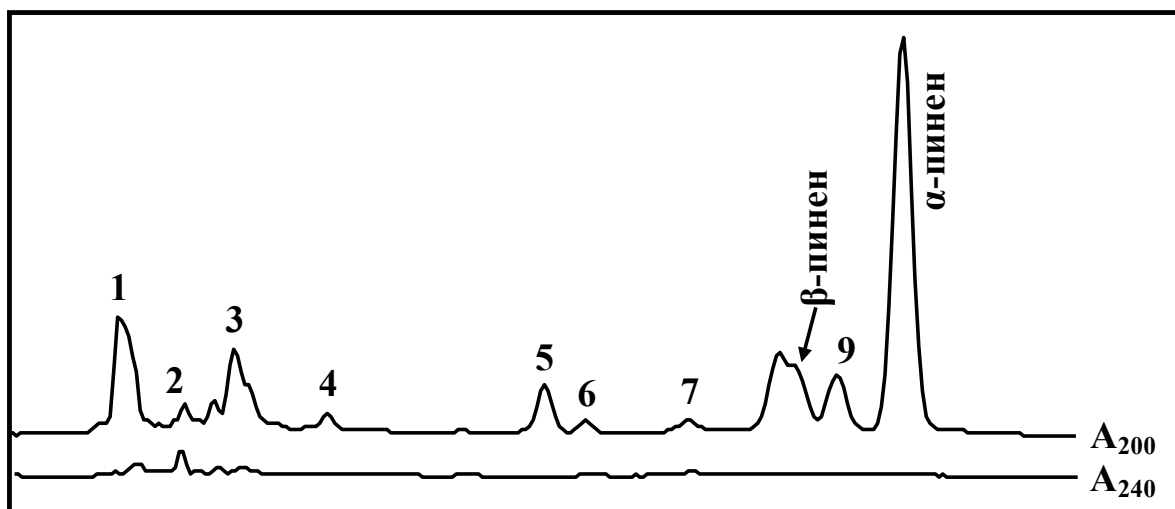


Рис. 5. Хроматограмма образца скипидара.

Условия разделения как в подписи к рис. 1.

Из полученных данных видно, что самый большой по интенсивности пик в образце скипидара – пик  $\alpha$ -пинена (1). Согласно литературным данным [7]  $\alpha$ -пинен (1) является составною частью многих эфирных масел и скипидара. По информации из "Краткой химической энциклопедии" следует, что в состав соснового живичного скипидара входят:  $\alpha$ -пинен (1) (60-70%),  $\beta$ -пинен (2) (6-8%) и другие компоненты. Сравнение хроматограмм пихтового масла (рис. 3) и скипидара (рис. 5) показывает наличие  $\beta$ -пинена (2) и отсутствие  $\beta$ -фелландрена (3) в образце скипидара. Это качественно отображает хроматограмма на рис. 5: отсутствие поглощения пика №8 на длине волны 240 нм, характерного для  $\beta$ -фелландрена (3) в образце пихтового масла.

#### 4. ВЫВОДЫ

1. Найдены приемлемые условия хроматографирования пихтового масла и скипидара на обращенной фазе в водном растворе ацетонитрила, позволяющие разделять основные компоненты.
2. Определены три основных компонента, входящих в состав пихтового масла и скипидара:  $\beta$ -фелландрен (3),  $\beta$ -пинен (2) и  $\alpha$ -пинен (1).



## 5. ЛИТЕРАТУРА

1. Fernando M. Lancas, Ogawa. Separation of monoterpenes in orange essential oil by capillary liquid chromatography and micellar electrokinetic chromatography. *Journal Liq. Chrom and Rel. Technol., Brazil 2002, p. 1651-1659.*
2. Williams C.M., Mander L.N. Chromatography with silver nitrate. *Tetrahedron, Vol. 57 (2001) 425-447.*
3. Antosova M., Polakovic M., Bales V. Separation of fructooligosaccharides on a cation-exchange HPLC column in silver form with refractometric detection. *Biotechnology Techniques, Vol. 13 (1999) 889-892.*
4. Hu Q., Yang G., Zhao Y., Yin J. Determination of copper, nickel, cobalt, silver, lead, cadmium, and mercury ions in water by solid-phase extraction and the RP-HPLC with UV-Vis detection. *Anal. Bioanal. Chem., Vol. 375 (2003) 831-835.*
5. Baillet A., Corbeau L., Rafidison P., Ferrier D. Separation of isomeric compounds by reversed-phase high-performance liquid chromatography using  $\text{Ag}^+$  complexation. *J. Chromatogr., Vol. 634 (1993) 251-256.*
6. Семенов А.А. (Ред.). Терпеноиды хвойных растений. Наука, Новосибирск, 1987, с. 11.
7. Пигулевский Г.В. Химия терпенов. Изд-во Ленинградского Государственного Университета, Ленинград, 1949, с. 145.
8. Штерн Э., Тиммонс К. Электронная абсорбционная спектроскопия в органической химии. Мир, Москва, 1974.