

**МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
НОВОСИБИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
Факультет естественных наук
Кафедра аналитической химии**

Дипломная работа

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОНОТЕРПЕНОВ В ПРОДУКТАХ
ПЕРЕРАБОТКИ ЖИВИЦЫ ПИХТЫ МЕТОДОМ
ОБРАЩЕННО-ФАЗОВОЙ ВЭЖХ**

Вяткина Мария Сергеевна

Научный руководитель
Друганов Александр Георгиевич

Новосибирск – 2005

СОДЕРЖАНИЕ

УСЛОВНЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ	3
1. ВВЕДЕНИЕ	4
2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	
2.1. Введение	5
2.2. Электронные спектры веществ	6
2.3. УФ детекторы в ВЭЖХ	6
2.4. Растворители для ВЭЖХ с УФ детектированием	7
2.5. Основные параметры хроматографической системы	8
2.6. Типичные вещества с малыми значениями коэффициентов экстинкции, анализируемые ОФ ВЭЖХ с УФ детектированием	10
2.7. Эфирные масла. Состав пихтового масла	10
2.8. Принцип косвенного детектирования	12
3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	
3.1. Материалы	14
3.2. Оборудование	14
3.3. Методы	
3.3.1. Оценка погрешности приготовления растворов	15
3.3.2. Хроматографические методы	15
4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	
4.1. Исследование возможностей ОФ ВЭЖХ с УФ детектированием для определения веществ с малым значением коэффициента экстинкции	17
4.1.1. Влияние концентрации ацетонитрила в подвижной фазе	17
4.1.2. Влияние скорости потока подвижной фазы	17
4.1.3. Влияние температуры колонки на ее эффективность	19
4.1.4. Зависимость эффективности колонки от нагрузки	20
4.1.5. УФ спектры сложных эфиров	21
4.1.6. Постоянная времени детектора и уровень его шумов	22
4.2. Оптимизация условий разделения компонентов пихтового масла	23
4.3. Определение борнилацетата	25
4.4. Определение α -пинена	28
4.5. Определение Δ^3 -карена	30
4.6. Определение кариофиллена	31
4.7. Определение β -фелландрена, лимонена, β -пинена и камфена	32
4.8. Исследование удерживания β -фелландрена, лимонена, β -пинена и камфена на ОФ в разных подвижных фазах	33
4.9. Количественный анализ пихтовых масел	35
4.10. Исследование бергамотового, грейпфрутового, кедрового масел и скипидара	36
4.11. Газохроматографический анализ эфирных масел	38
5. ВЫВОДЫ	40
6. ЛИТЕРАТУРА	41

УСЛОВНЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

Δ_{σ} – допускаемая погрешность содержания примесей в основном веществе, %

$\Delta_m^{взвеш.}$ – погрешность взвешивания

Δ_m – допускаемая погрешность взвешивания, мг

δ_m – относительная погрешность определения массы вещества

δ_{ω} – относительная погрешность определения массовой доли основного вещества в препарате, %

ω – массовая доля основного вещества в препарате, %

A_{200} – поглощение раствора вещества при $\lambda=200$ нм, е.о.п.

A_x/A_{200} – спектральное отношение как отношение оптических плотностей раствора вещества при длинах волн λ_x и λ_{200}

C_m – массовая концентрация, г/л

C_M – молярная концентрация, моль/л

C18 – неподвижная фаза (адсорбент) *n*-октадецилсиликагель

d_p – диаметр частиц сорбента

F – объёмная скорость потока подвижной фазы

m – масса, г

M – молярная концентрация, моль/л

R_S – коэффициент разрешения хроматографических пиков

S_x/S_{200} – спектральное отношение как отношение площадей хроматографических пиков вещества на хроматограммах при длинах волн λ_x и λ_{200}

S_r – относительное стандартное отклонение

S_{λ} – площадь хроматографического пика при длине волны детектирования λ , е.о.п.·мкл

T_R – время удерживания вещества в колонке, мин

V_R – объём удерживания вещества в колонке, мкл

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ГЖХ-МС – газо-жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектором

ЖХ – жидкостная хроматография

КД – косвенное детектирование

ОФ – обращенная фаза; обращенно-фазовая

ПФ – подвижная фаза

ТТ – теоретические тарелки

УФ – ультрафиолетовый

ВВЕДЕНИЕ

Эфирные масла являются важнейшими продуктами для многих отраслей промышленности и медицины. Они представляют собой сложную смесь веществ, химический анализ которой требует применения хроматографических методов. Основные компоненты эфирных масел обладают хорошей летучестью, и для их разделения наибольшее распространение получила газовая хроматография (ГХ) [1], которая, однако, не давая информации о содержании в маслах нелетучих или термолabileльных соединений, фактически делает данный тип анализа неполным.

Наиболее универсальным методом с этой точки зрения является высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), которая принципиально способна осуществить определение практически всех компонентов образца. Она незаменима также и при препаративном выделении чистых компонентов эфирных масел, когда требуется определить структуру веществ с привлечением таких спектральных методов анализа как ЯМР-, МС- и ИК-спектроскопии.

Учитывая широкие потенциальные возможности ВЭЖХ для анализа эфирных масел, разработка соответствующих методик анализа представлялась весьма актуальной задачей. Несколько таких методик были нами разработаны на основе обращенно-фазовой (ОФ) ВЭЖХ с УФ детектированием с применением хроматографа "Милихром А-02". В качестве основного объекта исследования мы выбрали пихтовое масло как наиболее доступное, дешевое и достаточно полно изученное по химическому составу. Качество пихтового масла определяется, в основном, содержанием борнилацетата, относящегося к группе монотерпенов.

Главная проблема анализа эфирных масел методом ВЭЖХ с УФ детектированием связана с низким удельным поглощением ряда важных монотерпенов (в первую очередь, борнилацетата) и близким строением их молекул, которое делает эти вещества "хроматографически похожими". Для разработки достаточно чувствительной методики определения борнилацетата потребовалось подробно исследовать влияние всех значимых параметров хроматографической системы на эффективность разделения, чтобы оптимизировать условия разделения по отношению и к чувствительности, и к разрешению.

Нами использовался метод многоволнового (многопараметрового) детектирования, позволяющий выявлять количество компонентов в растворе, соответствующее отдельному хроматографическому пику. ОФ ВЭЖХ с УФ детекцией может быть в ряде случаев важным дополнительным по отношению к ГХ методом для контроля качества сырья в парфюмерно-косметической и пищевой промышленности.

2. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

ВЭЖХ с УФ детектированием: анализ веществ с низкими значениями коэффициента экстинкции

2.1. Введение

ВЭЖХ на обращенных фазах с УФ детектированием является одним из наиболее распространенных методов анализа органических веществ [2]. По типу детектирования этот метод предназначен для определения соединений, имеющих выраженный электронный спектр. Однако возможности ВЭЖХ-УФ при анализе соединений с низким коэффициентом экстинкции из-за малого оптического поглощения заметно ограничены. Это связано с тем, что для достижения приемлемой чувствительности анализа в колонку приходится вводить относительно большее количество аналита, а это, в свою очередь, приводит к заметному уменьшению ее эффективности и, как следствие, к заметному ухудшению разделения компонентов образца.

В качестве альтернативы фотометру в ВЭЖХ можно применять и такие детекторы как рефрактометр и масс-спектрометр. Но, являясь по сути "универсальными" детекторами, они тоже не решают все проблемы в полной мере. Так, рефрактометры не допускают изменения состава подвижной фазы в процессе хроматографии, т.е. не пригодны для градиентного элюирования. В силу своей низкой концентрационной чувствительности, они требуют слишком большой нагрузки на колонку, что отрицательно сказывается на ее разделительной способности [3]. МС-детекторы обладают очень высокой чувствительностью, но их цена пока слишком высока. Кроме того, они не допускают введения в состав подвижной фазы солей, а их присутствие иногда необходимо для достижения требуемой эффективности и селективности колонки. И, наконец, МС-детекторы требуют разных методов ионизации для полярных и неполярных веществ, что ограничивает их применимость при одновременном присутствии таких соединений в анализируемом образце [3].

Возвращаясь к фотометрическому детектированию, мы считаем, что в целом ряде случаев его можно успешно применять при исследовании веществ с низким удельным поглощением при их низких концентрациях, если методика будет специально оптимизирована для этих целей. Далее рассмотрим основные проблемы, касающиеся разработок таких методик.

2.2. Электронные спектры веществ

Поглощение веществ в УФ части спектра (190-400 нм) связано со способностью электронов молекул поглощать кванты электромагнитного излучения и переходить в возбужденное состояние в результате возбуждения π -электронов кратных связей или n -электронов несвязанной электронной пары [4].

Группы атомов, обуславливающие появление полос поглощения в электронных спектрах, называют хромофорами. К ним, прежде всего, относят ненасыщенные или ароматические фрагменты молекул. Переход электрона с одной орбитали на другую существенно облегчается, если орбитали заметно перекрываются. В случае сопряжения нескольких хромофоров (сопряженные двойные связи) перекрывание π -орбиталей становится более существенным, что приводит к повышению вероятности перехода, и, следовательно, к появлению более интенсивной полосы поглощения в УФ спектре. Переход $n \rightarrow \pi^*$ за счет малого перекрывания орбиталей характеризуется меньшей интенсивностью полосы поглощения.

Связь между количеством поглощенной энергии электромагнитного излучения и концентрацией вещества описывается законом Бугера-Ламберта-Бера, который может быть записан в виде уравнения

$$A_{\lambda} = \varepsilon_{\lambda}^{\text{м}} \cdot C_{\text{м}} \cdot l,$$

где A_{λ} - величина оптического поглощения при длине волны λ (е.о.п.); ε_{λ} - молярный коэффициент поглощения при длине волны λ ($\text{л} \cdot \text{М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$); $C_{\text{м}}$ - концентрация вещества в растворе (моль/л); l - длина оптического пути (см) [4].

На практике это уравнение справедливо для растворов с концентрацией 10^{-4} - 10^{-3} М. При более высоких концентрациях из-за межмолекулярных взаимодействий зависимость между оптическим поглощением и концентрацией становится нелинейной.

2.3. УФ детекторы в ВЭЖХ

Принципы действия детекторов, применяемых в современной жидкостной хроматографии, основаны на измерении некоторого параметра (аналитического свойства) определяемого вещества. Такими свойствами могут быть оптические характеристики в УФ-, ИК- или видимом спектральном диапазоне, показатель преломления, флуоресценция, электропроводность, диэлектрическая проницаемость, способность к окислению или восстановлению и др. [5].

К хроматографическим детекторам предъявляются ряд специфических требований, которые определяют те или иные их конструктивные особенности. К таким требованиям,

прежде всего, относятся: линейность, концентрационная чувствительность и уровень шумов, влияющие на правильность и воспроизводимость анализа [5].

Чувствительность детектора определяется значением минимально обнаруживаемой концентрации вещества в подвижной фазе, для которой сигнал детектора в два (иногда, в три) раза превышает шум детектора. Желательно, чтобы зависимость сигнала детектора от концентрации вещества в элюате была линейной в достаточно широком динамическом диапазоне. Каждый детектор характеризуется также величиной дрейфа сигнала. Этот параметр определяют как смещение нулевой линии за определенный промежуток времени.

Важным свойством детектора является его постоянная времени, которая должна быть достаточно мала, чтобы детектор мог быстро реагировать на изменение концентрации вещества в проточной ячейке. С другой стороны, малая величина постоянной времени (τ) приводит к возрастанию амплитуды шума. Зависимость уровня шумов от постоянной времени описывается уравнением $A=k\tau^{-1/2}$ [6].

УФ детекторы делятся на два типа. Наиболее популярны проточные УФ фотометры, для которых характерна простота и надежность конструкции, относительно невысокая стоимость и весьма высокая чувствительность. Главный недостаток фотометров – работа при фиксированной длине волны, что ограничивает его применимость при анализе смесей веществ с существенно различающимися УФ спектрами. В таких случаях более целесообразно использовать более сложные по устройству и более дорогие спектрофотометрические детекторы, которые могут регистрировать изменение интенсивности поглощения в широком спектральном диапазоне, где поглощают многие вещества, анализируемые методом ВЭЖХ. Некоторые спектрометрические детекторы позволяют осуществлять быстрое сканирование оптического поглощения в заданной области спектра и получать, тем самым, спектральную информацию, весьма полезную для более надежной идентификации веществ на хроматограмме.

2.4. Растворители для ВЭЖХ с УФ детектированием

Применение в ВЭЖХ УФ детекторов налагает на используемые в качестве подвижной фазы растворители главное требование – они должны быть прозрачны в выбранной для детектирования области спектра. Список таких прозрачных растворителей весьма ограничен и наиболее распространенные из них приведены в таблице 1.

Однако показатель прозрачности подвижной фазы определяется не только самим растворителем (или смесью растворителей), но и содержанием в ней тех или иных солей, с

помощью которых изменяют селективность хроматографической системы "адсорбент-элюент". Для регулирования селективности в элюент вводят фосфаты, ацетаты, перхлораты, серную, хлорную, фосфорную, уксусную или трифторуксусную кислоты. Каждое из этих веществ обладает определенным поглощением в выбранной области УФ спектра и его необходимо учитывать особенно внимательно при анализе веществ с низким поглощением.

Таблица 1. Граница прозрачности растворителя как $A_{\lambda}=1$ е.о.п.

Растворитель	Вода	Ацетонитрил	Изопропанол	Этанол	Метанол
Длина волны λ , нм	>190	>190	>205	>210	>205

Вязкость подвижной фазы в ВЭЖХ должна быть, по возможности, низкой. Повышение вязкости фазы отрицательно сказывается на эффективности колонки, а также требует применения насосов, развивающих при тех же скоростях потока более высокое давление [7].

Использование колонок с обращенными фазами на основе силикагеля требует, чтобы значение рН подвижной фазы не выходило за пределы диапазона 2-8, в котором эти адсорбенты гидролитически устойчивы.

2.5. Основные параметры хроматографической системы

Надежные результаты анализа можно получить только в том случае, когда все параметры хроматографической системы стабильны. Среди них одной из важнейших характеристик системы является эффективность колонки (N), измеряемая количеством теоретических тарелок. Она зависит от длины колонки (L), от диаметра частиц сорбента (d_p), от качества упаковки и условий проведения самого анализа.

Как известно, вещества вводятся в колонку в виде узкой зоны, которая по мере ее движения с подвижной фазой по колонке уширяется в результате диффузионных процессов. Мерой этого размывания в колонке является высота, эквивалентная теоретической тарелке (ВЭТТ или H). Размывание полосы в хроматографической колонке обусловлено в основном тремя причинами: вихревой диффузией, молекулярной диффузией и сопротивлением массопередаче. Зависимость величины ВЭТТ от линейной скорости потока (u) подвижной фазы описывается эмпирическим уравнением Ван-Деемтера [8] $H=A+B/u+Cu$, где A , B и C – константы разных типов диффузии. Согласно этому уравнению, существует диапазон скоростей потока, в котором величине H соответствует область, где величина теоретической тарелки минимальна, т.е.

эффективность колонки максимальна. Для адсорбентов с диаметром частиц 5 мкм максимальная эффективность колонки наблюдается при $u=1-2$ мм/с [9].

Разделяющую способность колонки более наглядно можно представить в виде ее пиковой емкости (Z), которая численно равна количеству пиков веществ на хроматограмме, разделенных с заданным разрешением R_s . Так, пиковая емкость колонки с $N=5000$ ТТ для веществ, имеющих коэффициенты сорбции k' в диапазоне от 0 до 6 (при разрешении пиков $R_s=1.2$) составляет около 40 пиков [8]. Если требуется разделить большее количество веществ, то эффективность колонки следует увеличить путем увеличения ее длины ($N \sim L$). При этом следует учитывать, что $Z \sim N^{1/2}$, т.е. пиковая емкость колонки возрастает с увеличением N непропорционально. С другой стороны, увеличение длины колонки приводит к пропорциональному росту давления, которое должно развиваться насосом для обеспечения заданной скорости потока, а также пропорциональному увеличению продолжительности анализа. Эти два обстоятельства, в конечном итоге, делают удлинение колонки как способ повышения эффективности невыгодным. Более рационально улучшать разделение веществ не за счет повышения эффективности колонки, а за счет изменения селективности хроматографической системы, достигаемой изменением состава подвижной фазы.

Важнейшим фактором, определяющим эффективность колонки, является количество вводимого в нее вещества, т.е. нагрузка на колонку. Для обращенных фаз, синтезированных на основе силикагеля с удельной площадью поверхности около 300 м²/г, допустимая нагрузка по веществу составляет 1-10 мкг на 1 г адсорбента. При нагрузке более 10 мкг/г эффективность колонки быстро уменьшается с ростом нагрузки [9].

Температура, при которой проводится разделение, для большинства веществ не оказывает решающего влияния на селективность. Повышение температуры колонки, как правило, приводит к уменьшению удерживания. В общем виде эта зависимость описывается уравнением $\ln k=A/T+B$, где A и B - константы, величины которых обычно больше нуля. Для обеспечения высокой воспроизводимости времен удерживания необходимо термостатировать колонку [5-8, 10]. Следует также отметить, что некоторое повышение температуры относительно комнатной часто применяют для снижения вязкости подвижной фазы, которое, в свою очередь, позволяет проводить хроматографию при более низких давлениях.

В общем случае разработка методики предусматривает исследование влияния всех перечисленных выше факторов на степень разделения аналитов, что позволяет, в конечном итоге, оптимизировать процесс по отношению к выбранному критерию

оптимизации (полнота разделения, продолжительность анализа, чувствительность анализа, экономичность аналитической процедуры и т.д.).

2.6. Типичные вещества с малыми значениями коэффициентов экстинкции, анализируемые ОФ ВЭЖХ с УФ детектированием

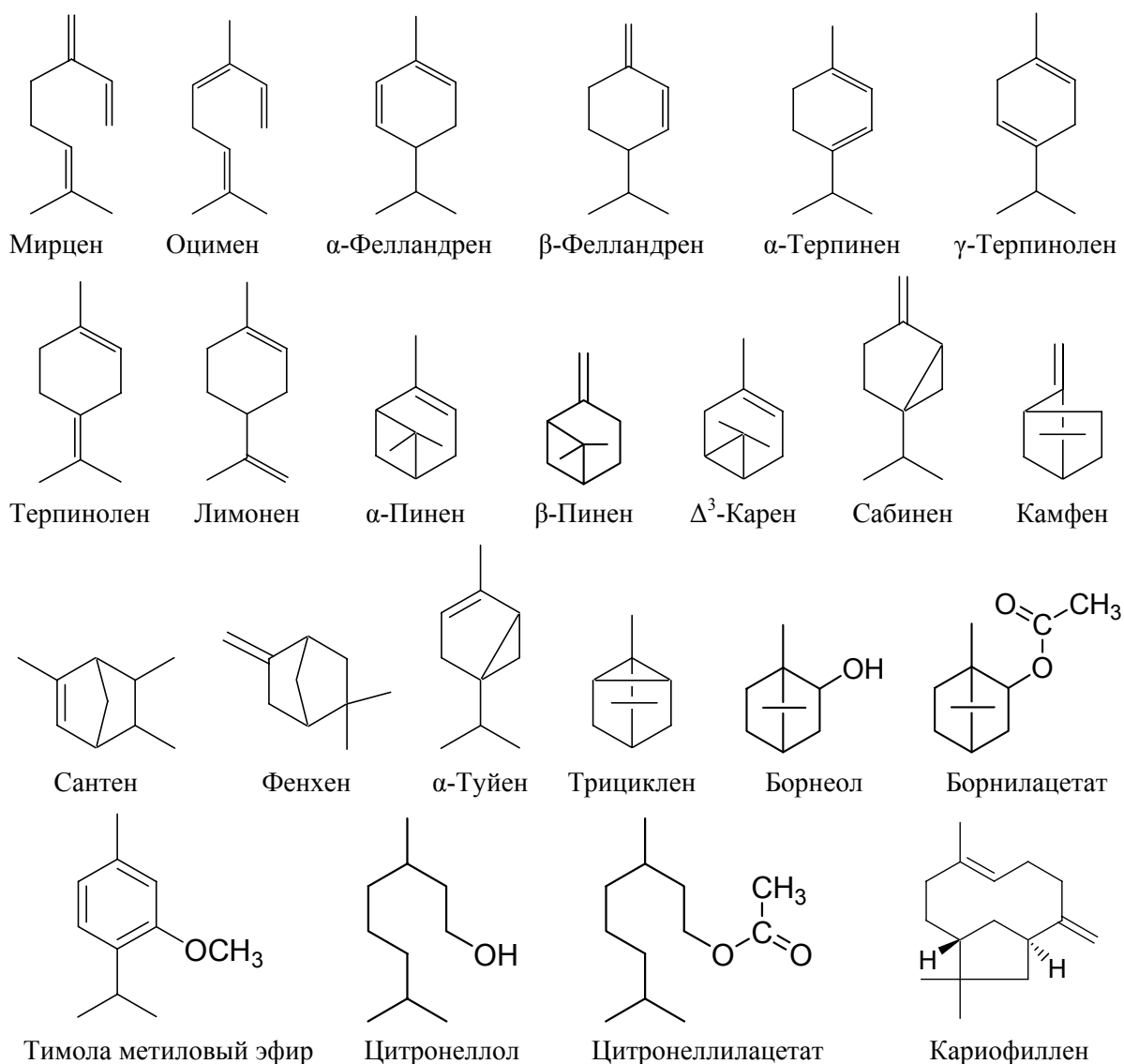
Основными представителями групп соединений с малыми значениями коэффициентов экстинкции являются карбоновые кислоты, их эфиры, соединения с одиночными $-C=C-$ связями, кетоны и альдегиды, тиолы и пр. Для достижения приемлемой чувствительности детектирование этих веществ в подвижной фазе проводят в области коротких длин волн (190-210 нм), применяя в качестве элюентов растворы с минимальным поглощением [11]. Особые проблемы возникают в случае градиентного элюирования, когда состав подвижной фазы изменяется в процессе разделения. Градиентное элюирование требует особой чистоты компонентов подвижной фазы, т.к. присутствие в них даже малых количеств УФ-поглощающих примесей приводит к тому, что эти примеси элюируются из колонки узкими зонами и проявляются на хроматограмме в виде пиков, которые могут перекрываться с пиками аналитов. Вода и органические растворители, применяемые для приготовления подвижных фаз в градиентной ОФ ВЭЖХ, многими фирмами выпускаются с квалификацией "Для градиентной ВЭЖХ" с указанием области длин волн, где они пригодны для использования. В любом случае, даже если подвижная фаза формируется из компонентов высокой чистоты, перед выполнением анализа необходимо провести контрольный эксперимент без ввода образца в колонку. Анализировать сам образец можно только в том случае, когда полученная контрольная хроматограмма не содержит мешающих пиков.

2.7. Эфирные масла. Состав пихтового масла

Химический состав летучих компонентов масла, полученного из хвойных растений семейства *Abies* (пихта), изучен достаточно полно [12-14]. Содержание отдельных компонентов в масле может существенно изменяться в зависимости от способа получения живицы – смолистой прозрачной жидкости, добываемой из древесины разной природы, разного возраста и места произрастания [15].

Газохроматографические исследования показали, что в живицах хвойных содержатся десятки насыщенных и ненасыщенных углеводородов. Структурные формулы основных соединений, встречающихся в пихтовых маслах, приведены ниже. Отличительной особенностью живиц пихт является высокое содержание борнилацетата,

который доминирует среди кислородсодержащих монотерпеноидов практически всех видов пихт. Известны живичные скипидары, состоящие почти из одного компонента. Например, сосна мягкоигльчатая и сосна алевская содержат α -пинен (95-99%), сосна песчаная - β -пинен (75%), сосна скрученная - β -фелландрен (96%) [16].



Полоса оптического поглощения двойной связи, максимум которой находится при 180-195 нм, обуславливает заметное поглощение и в области от 205-225 нм. Литературные данные о сопряженных системах показывают, что максимальное поглощение таких систем наблюдается при длине волны около 240 нм.

Из приведенных выше соединений только борнеол, цитронеллол и трициклен практически не поглощают свет при $\lambda > 190$ нм и не могут напрямую детектироваться УФ фотометром. Борнилацетат и цитронеллилацетат, содержат слабую хромофорную группу

– ацетатную, экстинкция которой примерно в 10 раз меньше, чем экстинкция двойной связи. УФ спектр ацетатной группы имеет максимум поглощения при $\lambda=210$ нм [17].

Работ, посвященных систематическому исследованию хроматографического поведения терпеноидов на обращенно-фазовых адсорбентах, мы в литературе не нашли.

2.8. Принцип косвенного детектирования

Один из вариантов определения веществ с малым оптическим поглощением методом ВЭЖХ-УФ предусматривает применение метода непрямого (косвенного) фотометрирования. Его суть заключается в использовании подвижной фазы, в которую добавлено сильно поглощающее вещество ("проявитель"), которое по отношению к анализу является "хроматографическим" конкурентом. При элюировании аналитов из колонки их место на сорбенте занимает вещество-конкурент, и его концентрация в подвижной фазе уменьшается, что, в свою очередь, сопровождается пропорциональным уменьшением поглощения элюата. Это приводит к появлению отрицательных пиков на хроматограмме, как показано на рис. 1-А. Если изменить полярность сигнала на обратную, то, в итоге, будет получена привычная хроматограмма (рис. 1-В).

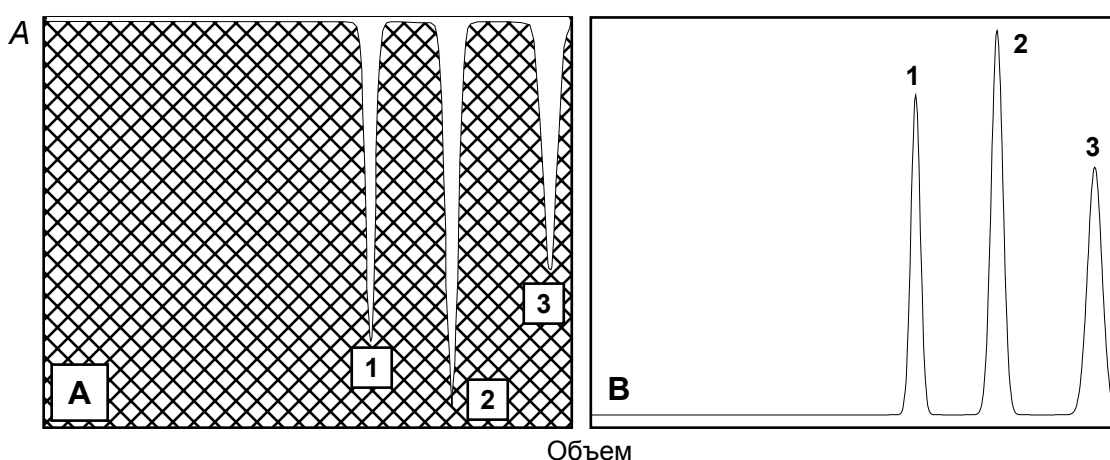


Рис. 1. Принцип непрямого (косвенного) фотометрического детектирования в ВЭЖХ.

- А-** разделение непоглощающих свет соединений 1, 2 и 3 с использованием подвижной фазы, содержащей поглощающее вещество-конкурент;
- В-** представление хроматограммы, показанной на рис. 1-А, после компенсации поглощения элюата и изменения полярности сигнала на обратную.

Для уменьшения вероятности появления множества артефактов, которые часто наблюдаются при косвенном детектировании, важно, чтобы механизмы адсорбции молекул аналита и проявителя были одинаковыми, их удерживание на колонке определялось только сродством молекул к поверхности адсорбента, а межмолекулярные взаимодействия в подвижной фазе были сведены к минимуму [18].

Появившись в начале 80-х годов [19], косвенное детектирование нашло особенно широкое применение в ВЭЖХ при определении неорганических анионов [20-25] – традиционно неудобных объектов аналитической химии. ВЭЖХ с косвенным УФ детектированием является вполне сопоставимым методом по своим характеристикам с методом ионной хроматографии, в которой детектирование осуществляется с помощью кондуктометров [26, 27].

Весьма высокую чувствительность обеспечивает косвенное детектирование и по отношению к другим "необычным" для ВЭЖХ соединениям – алканам. Примеры их разделения на обращенных фазах можно найти в работах [28, 29], где приводятся уравнения для вычисления минимально определяемой концентрации аналита в зависимости от состава элюента и концентрации "вещества–проявителя".

Для косвенного детектирования могут использоваться не только фотометры, но и, например, флуориметры [29]. Очевидно, что при косвенном флуориметрическом детектировании вещество-проявитель должно обладать способностью флуоресцировать. Оптимизация чувствительности анализа для каждой конкретной методики требует обязательного рассмотрения таких важных факторов, как нагрузка вещества на колонку и селективность колонки по отношению к веществу - аналиту и веществу-проявителю [24].

Принцип непрямого фотометрирования может быть применен лишь при изократическом элюировании, что ограничивает его применимость для анализа образцов, содержащих вещества с сильно различающимся сродством к адсорбенту. Он требует использования малошумящих детекторов с широким линейным диапазоном. Для уменьшения шума и дрейфа нулевой линии детектора колонку необходимо термостатировать, а пульсации потока подвижной фазы должны быть максимально демпфированы.

Вообще говоря, разработка метода анализа с косвенным детектированием требует тщательного изучения всех сторон хроматографического процесса. Лишь в этом случае можно достичь ясного понимания результатов анализа, а также осуществить оптимизацию методики анализа в целом [26-29].

3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

3.1. Материалы

Для приготовления подвижных фаз для ОФ ВЭЖХ использовали ацетонитрил "Для ВЭЖХ, сорт 1", $A_{200}=0.02$ е.о.п. ("Криохром", Санкт-Петербург); метанол, этанол, изопропанол, гексан ("х.ч.") и бидистиллированную воду.

В качестве внешних стандартов использовали следующие вещества: α -пинен, β -пинен, β -фелландрен, Δ^3 -карен, камфен, лимонен, кариофиллен и борнилацетат. Их структурные формулы приведены в разделе 2.7. За исключением β -фелландрена, содержание основного вещества в указанных препаратах составляло более 95%. Борнилацетат имел квалификацию "Государственный стандартный образец" с содержанием основного вещества 99%.

Образцы пихтового масла были получены от следующих производителей:

- №1 Пихтовое масло (ООО ПКП "Лазурин", г. Кемерово, 2003 г.);
- №2 Пихтовое масло (ООО ПКП "Лазурин", г. Кемерово, 2003 г.);
- №3 Пихтовое масло (ООО ПКП "Лазурин", пос. Маслянино, 2003 г.);
- №4 Пихтовое масло (ООО ПКП "Лазурин", пос. Шарыпово, 2003 г.);
- №5 Пихтовое масло (марка А, ОАО "Новосибхимфарм", ЗАО "ЭРКА-Ф", 2001 г.);
- №6 Пихтовое масло (ООО Компания "СиНам", 2004 г.);
- №7 Пихтовое масло (ООО ПКП "Лазурин", 1 сорт, 2005 г.);
- Масло бергамотовое, масло кедровое Алесского и масло грейпфрута (ООО "Лазурин").

3.2. Оборудование

Хроматограф жидкостной микроколоночный "Милихром А-02" (ЗАО "ЭкоНова", Новосибирск); весы электронные аналитические "Adventurer" и технические "Scout II" ("Ohaus Europe", Швейцария); рН-метр "Анион-4100" (НПП "Инфраспек-Аналит", Новосибирск); магнитная мешалка "ПЭ-6110" (АО "Экрот", Санкт-Петербург); микроцентрифуга "MiniSpin" ("Eppendorf", Германия); пипетки переменного объема со сменными наконечниками "Ленпипет Колор" (ЗАО "ТермоЛабсистемс", Санкт-Петербург); фильтр "MILLIPORE 0.22 μ m Filter Unit" ("Millipore Corp.", США).

3.3. Методы

3.3.1. Оценка погрешности приготовления растворов

При приготовлении растворов массовую (C_m) и молярную (C_M) концентрации вещества определяли соответственно по формулам:

$$C_m = \varpi \cdot m/V \text{ и } C_M = \varpi \cdot m/V \cdot Mr ,$$

где ϖ - массовая доля основного вещества в препарате; m - масса препарата (г), V - объем раствора (мл), Mr - молярная масса вещества.

Погрешность приготовления контрольного раствора определяется погрешностью, обусловленной наличием примесей в препарате, погрешностью взвешивания, погрешностью используемой мерной посуды. Предел допускаемой погрешности аналитических весов "Adventurer" составляет 0.75 мг. Относительную погрешность определения массы вещества δ_m определяли по формуле:

$$\delta_m = \pm \Delta_m / m ,$$

где Δ_m - допускаемая погрешность взвешивания (мг).

Допускаемая погрешность взвешивания для двух измерений $\Delta_m^{взвеш.}$ (тара и тара с навеской):

$$\Delta_m^{взвеш.} = \sqrt{\Delta_{m1}^2 + \Delta_{m2}^2}$$

Относительная погрешность используемой мерной посуды δ_V :

$$\delta_V = \pm \Delta_V / V ,$$

где Δ_V - допускаемая погрешность номинальной вместимости мерной посуды (мл), V - объем используемого раствора (мл).

Относительная погрешность определения массовой доли основного вещества δ_ϖ в препарате:

$$\delta_\varpi = \pm \Delta_\varpi / \varpi ,$$

где Δ_ϖ - допускаемая погрешность от содержания примесей в основном веществе (%).

3.3.2. Хроматографические методы

Условия ВЭЖХ анализа эфирных масел были следующими:

- колонка: $\varnothing 2 \times 75$ мм ProntoSIL-120-5-C18 AQ ("BISCHOFF Analysentechnik und Geräte GmbH", Германия);
- подвижная фаза: А- вода; Б- ацетонитрил;
- режим элюирования: изократический или градиентный;
- температура колонки: 35°C;
- детектор: 200, 210, 220, 240 и 300 нм, однолучевой режим измерения, $\tau=0,34$ с.

Обработку полученных хроматограмм осуществляли с помощью компьютерных программ "МультиХром[®]" (ЗАО "Амперсенд", Москва) и "Excel[®]" ("Microsoft Co.", США).

Анализ эфирных масел методом газо-жидкостной хроматографии проводили в аналитической лаборатории Института катализа им. Г.К. Борескова Сибирского отделения РАН на хроматографе ГХ-МС Saturn 2000 ("Varian Inc.", США) в следующих условиях:

- колонка: кварцевая капиллярная $30 \text{ м} \times 0,25 \text{ мм}$, неподвижная фаза CP-SIL 8 (полиметилсилоксановая фаза);
- масс-спектрометр с ионной ловушкой;
- газ-носитель: гелий, поток 0,7 мл/мин;
- температура испарителя: 300°C;
- температура термостата: 50-250°C, скорость нагрева 8°C/мин.

4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

4.1. Исследование возможностей ОФ ВЭЖХ с УФ детектированием для определения веществ с малым значением коэффициента экстинкции

Исследование проводили с помощью раствора смеси трех модельных веществ – этилацетат, бутилацетат и борнилацетат. В молекулах этих соединений хромофором является ацетатная группа. Величина экстинкции этой группы весьма мала. Она примерно в 10 раз меньше экстинкции двойной связи $\text{C}=\text{C}$. УФ спектр ацетатной группы имеет максимум поглощения при $\lambda=210$ нм [17].

Нами были изучены зависимости удерживания модельных веществ и эффективности колонки от таких параметров хроматографической системы, как:

- концентрация ацетонитрила в подвижной фазе;
- скорость потока подвижной фазы;
- температура колонки;
- нагрузка вещества на колонку.

4.1.1. Влияние концентрации ацетонитрила в подвижной фазе

Раствор этилацетата, бутилацетата и борнилацетата в ацетонитриле с концентрацией 5 мг/мл каждого компонента хроматографировали в изократических условиях при различных концентрациях ацетонитрила в подвижной фазе. По полученным хроматограммам (одна из них показана на рис. 2-**I**) для всех трех веществ были рассчитаны значения факторов емкости k' по уравнению:

$$k'=(V_R/V_0)-1,$$

где V_0 - свободный объем хроматографической колонки (150 мкл). Зависимости величины k' от концентрации ацетонитрила в подвижной фазе приведены на рис. 2-**II**, из которого следует, что в полулогарифмических координатах они носят линейный характер. Это говорит о чисто распределительном механизме удерживания веществ на колонке [7]. Очевидно, что зная зависимость $\lg k'=f(C)$, можно определить значение k' для любой концентрации ацетонитрила и, тем самым, вычислить значения V_R или T_R удерживания вещества на данной колонке.

4.1.2. Влияние скорости потока подвижной фазы

Модельную смесь хроматографировали при разных скоростях потока подвижной фазы в изократических условиях. Концентрация CH_3CN в элюенте составляла 55%. Для каждой скорости потока фиксировалось значение величины давления на входе в колонку,

которое создавал насос хроматографа. По полученным хроматограммам были построены зависимости, приведенные на рис. 3-I.

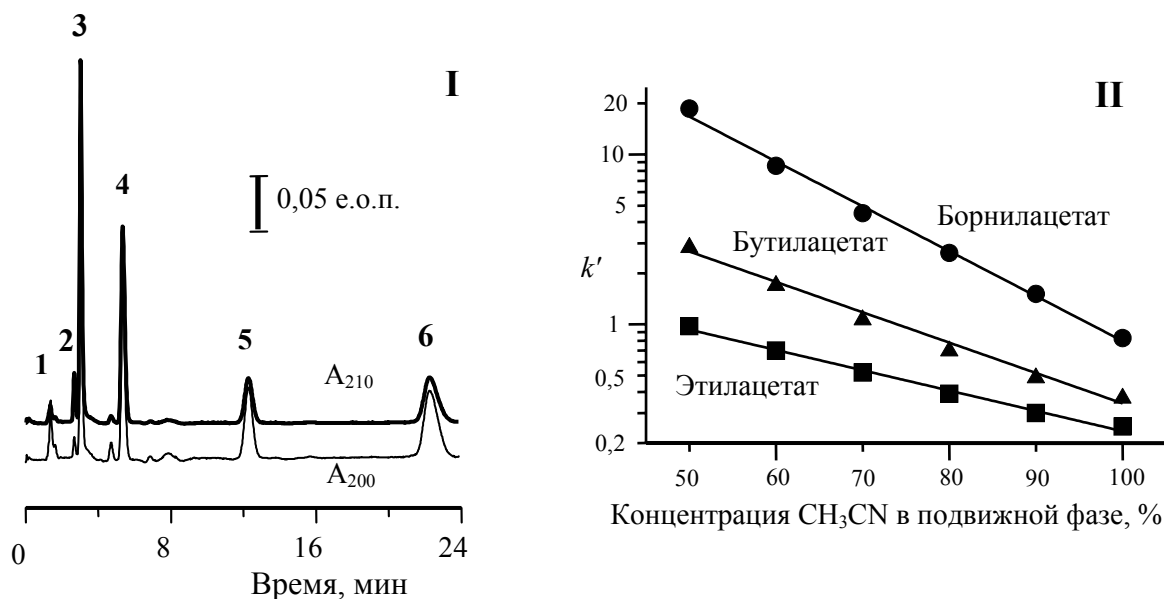


Рис. 2. Влияние концентрации ацетонитрила на удерживание веществ модельной смеси на колонке с обращенной фазой.

I- Хроматограмма модельной смеси. Колонка 2x75 мм с ProntoSIL-120-5-C18 AQ; элюент: $\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{CN}=(45:55)$; температура 35°C, поток: 100 мкл/мин.

3- этилацетат, 4- бутилацетат, 6- борнилацетат; пики 1, 2 и 5- примеси из образцов этилацетата и бутилацетата.

II- Зависимость удерживания веществ от концентрации CH_3CN в подвижной фазе.

ВЭТГ рассчитывали как $\text{ВЭТГ}=L/N$ (мкм), где L - длина колонки (75000 мкм), а $N=5.54 \cdot (V_R/w)^2$ (V_R - объем удерживания вещества, мкл; w - ширина пика на половине высоты пика, мкл).

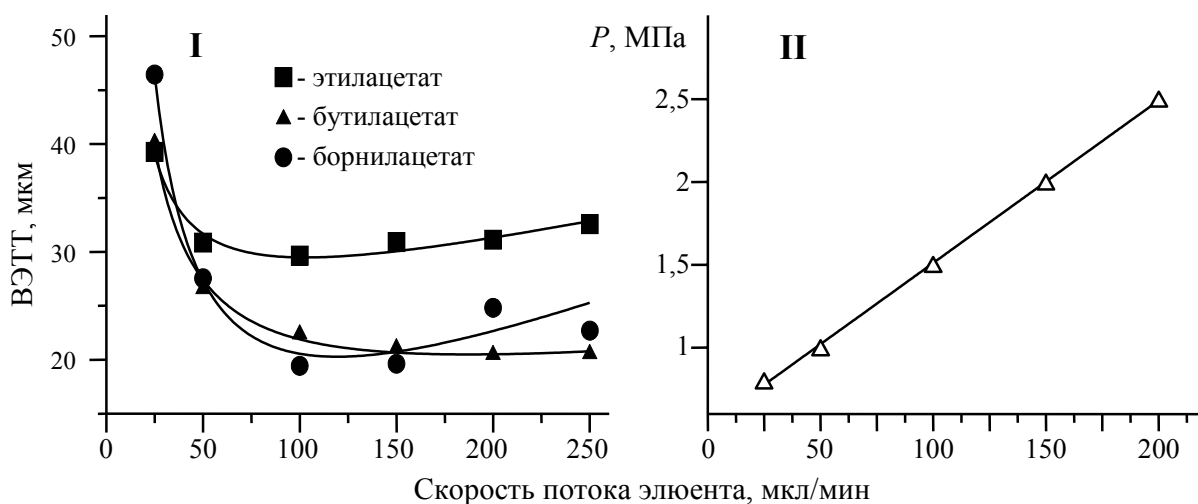


Рис. 3. Зависимость ВЭТГ (I) и входного давления (II) от скорости потока элюента.

Следует отметить, что кривые, приведенные на рис. 3-I, получены без учета приборной ошибки, характерной для всех хроматографов серии "Миличром" [30]. Эта ошибка вызвана особенностью хроматографов, связанной с тем, что в них ввод пробы в колонку осуществляется при атмосферном давлении, после чего шприцевой насос начинает подавать элюент в колонку при постоянной скорости движения поршня. Т. к. в это время происходит сжатие жидкости, то реальная скорость потока будет меньше заданной. Лишь после того, как жидкость в хроматографической системе сожмется полностью и давление станет стационарным, скорость потока достигает заданного значения. Очевидно, что при увеличении скорости подачи элюента входное давление будет возрастать, причем эта зависимость носит линейный характер (рис. 3-II). В конечном итоге получается, что истинный объем удерживания вещества (V_R) будет всегда меньше кажущегося объема удерживания (V_R^*), вычисленного по соотношению $V_R^* = T_R \cdot F$, где T_R - измеренное время удерживания вещества, а F - скорость подачи элюента. Разность между этими объемами ($\Delta V = V_R^* - V_R$) будет примерно равна объему сжатия всего элюента, находящегося в жидкостной системе хроматографа к этому моменту времени. Величину ΔV можно оценить экспериментально, и для хроматографа "Миличром А-02" при $P < 4$ МПа она не превышает 25-30 мкл [30].

Из рис. 3-I видно, что значение ВЭТТ, измеренное по пику этилацетата, заметно выше, чем по пикам бутилацетата и борнилацетата. Это связано с приборным уширением пиков из-за дополнительного размывания их зон в капилляре, соединяющим колонку с ячейкой детектора [30]. Т. к. пик этилацетата наиболее узкий, то и его относительное уширение наибольшее.

Таким образом, оптимальной скоростью потока, при которой эффективность колонки для компонентов модельной смеси максимальна, является объемная скорость потока 100-200 мкл/мин или линейная скорость 0,6-1,2 мм/сек, что хорошо согласуется с литературными данными [7].

4.1.3. Влияние температуры колонки на ее эффективность

Модельную смесь хроматографировали при концентрации ацетонитрила в ПФ равной 55% и при скорости потока 100 мкл/мин. Температуру колонки изменяли от 35 до 60°C. По полученным хроматограммам были построены зависимости, показанные на рис. 4. Эти зависимости хорошо согласуются с общепринятыми представлениями [7] и свидетельствуют о том, что модельные вещества не проявляют аномальных свойств, связанных с изменением температуры колонки.

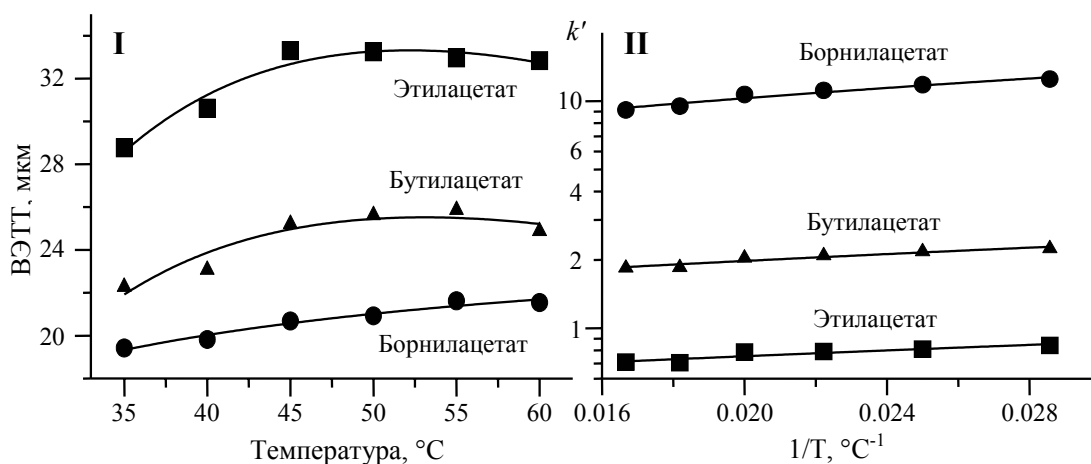


Рис. 4. Зависимость ВЭТТ (I) и k' модельных веществ (II) от температуры колонки.

Для последующих экспериментов нами была выбрана температура 35°C, при которой ВЭТТ минимальна. Этот выбор был обусловлен еще и желанием максимально продлить срок службы колонки, который, как известно, с повышением температуры уменьшается из-за деградации адсорбента [9].

4.1.4. Зависимость эффективности колонки от нагрузки

Растворы борнилацетата в ацетонитриле с концентрацией 1, 2, 5, 10 и 40 мг/мл хроматографировали на колонке $\varnothing 2 \times 75$ мм (ProntoSIL-120-5-C18 AQ) в элюенте $\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{CN}=(45:55)$ при скорости потока 100 мкл/мин. Объем пробы составлял 2 мкл. При этих же условиях хроматографировали раствор борнилацетата с концентрацией 2 мг/мл, изменяя объем пробы от 2 до 20 мкл. Для двух серий экспериментов были найдены зависимости ВЭТТ от концентрации борнилацетата в пробе и от объема пробы при неизменной концентрации борнилацетата, которые приведены на рис. 5.

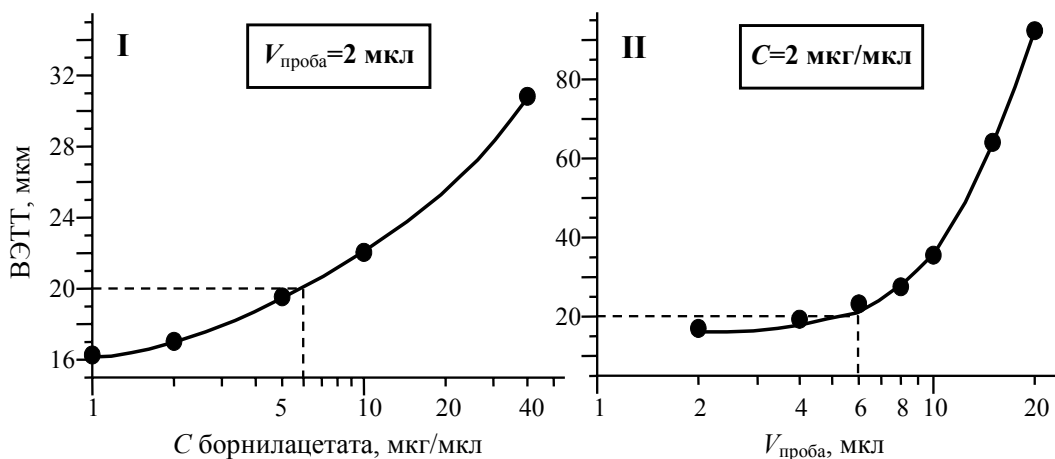


Рис. 5. Зависимость ВЭТТ от концентрации борнилацетата в пробе (I) и от объема пробы раствора борнилацетата (II).

Из полученных зависимостей следует, что при увеличении количества вводимого в колонку борнилацетата от 2 до 12 мкг ее эффективность остается приемлемо высокой ($V_{ЭТТ} \leq 20$ мкм), но дальнейшее увеличение количества вводимого вещества приводит к заметному снижению эффективности колонки, причем оно происходит медленнее, если увеличивать концентрацию борнилацетата, а не объем пробы.

Следует отметить, что даже при инжестировании раствора, содержащего 80-100 мкг борнилацетат, эффективность колонки остается довольно высокой. Это дает основание применять даже такую весьма небольшую колонку для очистки вещества с производительностью 0,25-0,5 мг/час.

4.1.5. УФ спектры сложных эфиров

Известно, что электронные спектры сложных эфиров в коротковолновой области УФ диапазона (200-230 нм) весьма "невыразительны", однако применение многоволнового детектирования в сочетании с методом ОФ ВЭЖХ и здесь может дать много полезной информации. Для получения этой информации мы хроматографировали раствор этилацетата, бутилацетата и борнилацетата в ацетонитриле (по 5 мг/мл каждого вещества) в условиях, приведенных в подписи к рис. 2-I, с использованием детектирования при длинах волн 200, 206, 210, 216, 220, 226, 230 и 240 нм. В качестве спектральных параметров использовали отношения площадей пиков S_λ к площади пика S_{200} . Эти параметры принято называть спектральными отношениями [31]. Их важная особенность – независимость от концентрации вещества в растворе.

Полученные таким образом для каждого вещества нормированные значения S_λ/S_{200} (спектральные отношения) показаны на рис. 6.

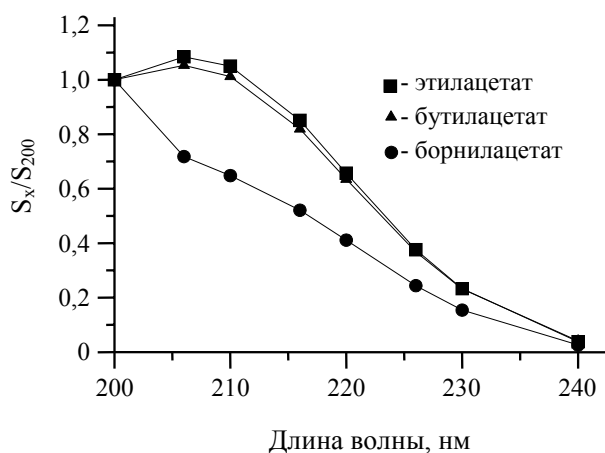


Рис. 6. Спектральные отношения эфиров уксусной кислоты в диапазоне длин волн 200-240 нм.

Во всех трех соединениях хромофором является только эфирная группа. Это дает основание полагать, что их нормированные спектры должны быть идентичными, однако, спектр борнилацетата заметно отличается от спектров этил- и бутилацетата. Вероятно, такое отличие является следствием соседства эфирной группы с циклическим радикалом. Описание подобного феномена нам в литературе найти не удалось.

Из приведенных на рис. 6 спектров следует, что для максимально чувствительного определения сложных эфиров при ВЭЖХ анализе надо выбирать длины волн 200-210 нм.

4.1.6. Постоянная времени детектора и уровень его шумов

Низкие значения экстинкции борнилацетата могут привести к большим погрешностям при количественном анализе из-за флуктуаций сигнала детектора. Одним из важных факторов, влияющих на амплитуду шумов детектора, является его постоянная времени (τ), которую надо в каждом конкретном случае выбирать, исходя из требований, предъявляемых к самому анализу [31].

Для изучения влияния величины τ на шумовые характеристики детектора хроматографа "Милихром А-02" мы провели ряд экспериментов для одно- и двухлучевого режимов детектирования. В общем виде амплитуда шумов детектора связана с постоянной времени как $A_{\text{шум}} \sim \tau^{-1/2}$ [6].

Кроме того, что величина постоянной времени детектора определяет его шумовые характеристики, она также определяет уровень сглаживания выходного сигнала. С увеличением постоянной времени уровень шумов уменьшается, но в то же время искажается форма хроматографического пика (рис. 7). Следствием такого "приборного" уширения пика является наблюдаемое на хроматограмме ухудшение разделения пиков веществ, которое нельзя интерпретировать снижением эффективности колонки.

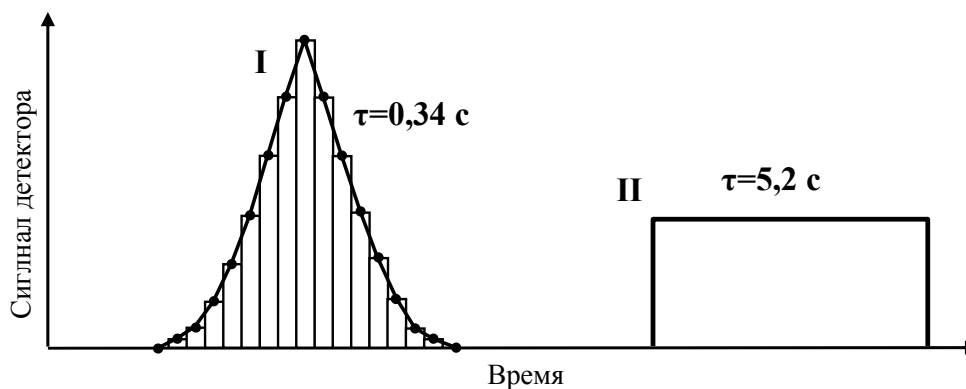


Рис. 7. Форма хроматографического пика при разных значениях постоянной времени детектора τ .

В нашем случае оптимальным значением τ , при котором уровень шумов достаточно низкий, а форма пика искажается несущественно, является значение 0,34 с при однолучевом режиме детектирования (рис. 8). Для двухлучевого режима τ должна быть уменьшена до 0,18 с и уровень шумов при этом возрастает примерно в 1,5 раза. Возрастание уровня шума объясняется тем, что в двухлучевом режиме пучок света направляется попеременно в рабочую ячейку и в ячейку сравнения.

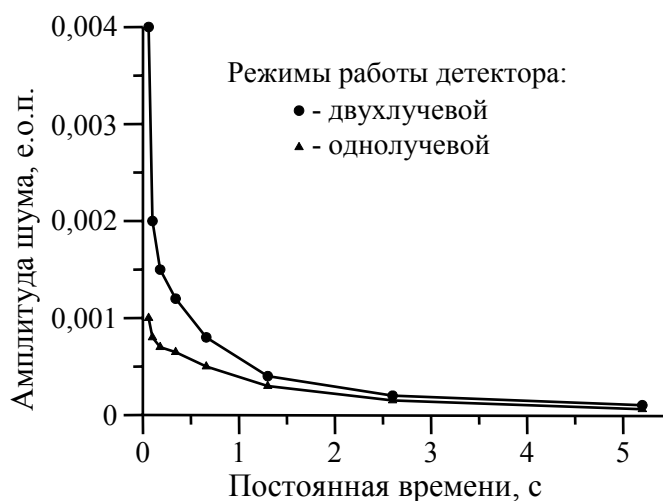


Рис. 8. Зависимость уровня шумов детектора от постоянной времени для двух режимов детектирования.

Таким образом, из полученных результатов следует, что наибольшая эффективность колонки $\varnothing 2 \times 75$ мм с ProntoSIL-120-5-C18 по отношению ко всем компонентам модельной смеси и получение наибольшего объема информации достигаются в следующих условиях проведения анализа:

- подвижная фаза: вода ацетонитрил (45:55);
- скорость потока: 100 мкл/мин;
- температура колонки: 35°C;
- объем пробы: 2 мкл; концентрация веществ в пробе: по 2 мг/мл;
- детектор: длины волн 200, 210, 220, 240 и 300 нм (одновременно); однолучевой режим измерения; $\tau=0.34$ с.

4.2. Оптимизация условий разделения компонентов пихтового масла

Следующим этапом исследования стала разработка методики анализа пихтового масла с использованием данных, полученных для модельных соединений.

Образец пихтового масла №1 растворяли в ацетонитриле ($C=10$ мг/мл) и хроматографировали в градиентном режиме при разных формах градиента концентрации ацетонитрила, увеличивая его концентрацию так, чтобы элюировать из колонки все компоненты образца. Две такие хроматограммы приведены на рис. 9. Остальные хроматографические параметры поддерживали постоянными и их значения соответствовали оптимальным, полученным для модельной смеси эфиров.

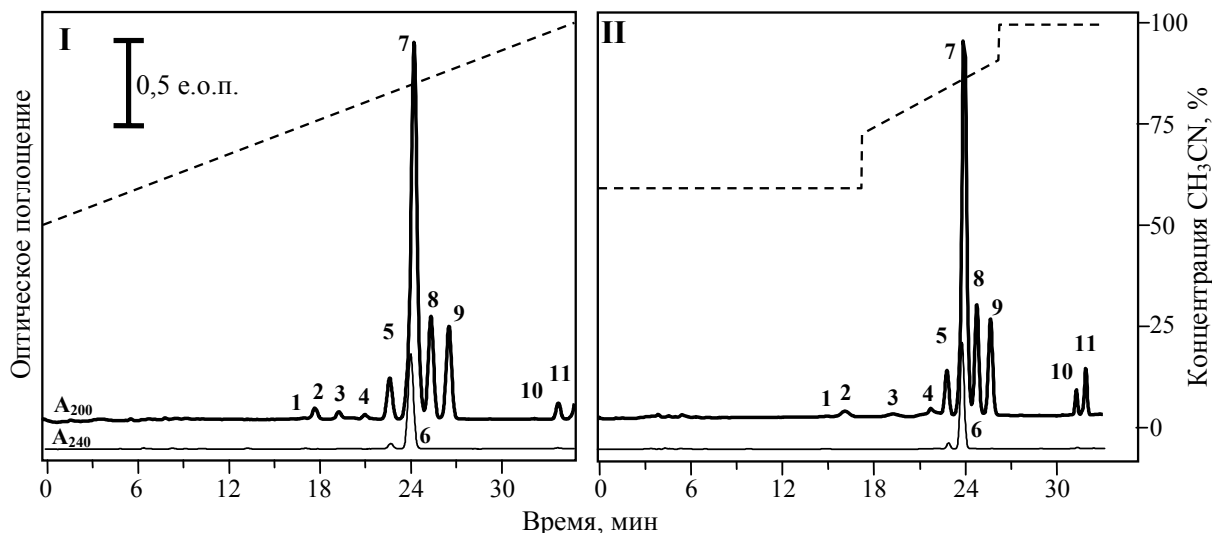


Рис. 9. Хроматограммы пихтового масла при разных формах градиента ацетонитрила.

Лучшим вариантом элюирования компонентов пихтового масла является хроматограмма, приведенная на рис. 9-**II**, где разрешением всех компонентов наибольшее. Она получена в следующих условиях:

элюенты: А- вода, Б- CH_3CN ;

градиентная элюция: 1700 мкл 60% Б; 2600 мкл от 80 до 90% Б; 3200 мкл 100% Б;

скорость потока: 100 мкл/мин;

температура колонки: 35°C ;

детектор: длины волн 200, 210, 220, 240, 300 нм, $\tau=0.34$ с, однолучевой режим;

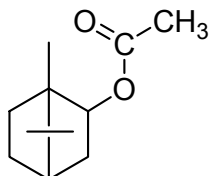
объем пробы: 2 мкл.

В этих условиях был проанализирован ряд образцов 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, (рис. 9-**II**), по которым они далее именуется в работе.

Главные компоненты пихтового масла детектируются фотометрически за счет поглощения, обусловленного хромофорами, которыми являются двойные связи. α -Пинен, β -пинен, Δ^3 -карен, кариофиллен, камфен и лимонен содержат одну двойную связь, β -фелландрен – две сопряженные двойные связи. По литературным данным [17]

детектирование сопряженных систем следует проводить на длине волны 240 нм, а одинарной двойной связи – на 200 нм. Единственная хромофорная группа в молекуле борнилацетата характеризуется максимумом поглощения при $\lambda=210$ нм.

4.3. Определение борнилацетата



По литературным данным основным и наиболее важным компонентом эфирных масел является борнилацетат. Качество пихтового масла, регламентированное еще требованиями X Фармакопеи СССР, определяется содержанием борнилацетата, которое в готовом продукте должно быть не менее 30% [32].

Примеры определения борнилацетата в двух образцах методом ОФ ВЭЖХ приведены на рис. 10. Сравнение этих хроматограмм, показывает, что даже при высоком содержании в образце борнилацетата (рис. 10-**I**), высота его хроматографического пика из-за низкого коэффициента экстинкции борнилацетата по сравнению с пиками других поглощающих веществ весьма мала. Очевидно, что для надежной идентификации пика борнилацетата на хроматограмме при его невысоком содержании в пробе, наряду с временем удерживания (метод внешнего стандарта) необходимо привлекать и спектральные параметры (спектральные отношения).

Так, на хроматограммах, приведенных на рис. 9, пик вещества "2" вполне симметричен и соответствует по величине V_R пику борнилацетата. Является ли этот пик действительно пиком только борнилацетата, или он представляет собой сумму пиков неразделившихся веществ, детектируемых по их оптическому поглощению?

Для ответа на этот вопрос мы вычислили значения спектрального отношения A_{210}/A_{200} во время элюирования вещества "2" из колонки и наложили эти значения на профиль изменения поглощения элюата, соответствующий хроматографическому пику вещества "2" (рис. 11-**I**). Так как величина A_{210}/A_{200} не зависит от концентрации вещества по определению, то при фотометрировании элюата, содержащего только одно вещество, поглощающее при заданных длинах волн, значение A_{210}/A_{200} должно оставаться постоянным [31]. Именно такую картину мы видим в случае пика борнилацетата на рис. 11-**II**). Вид зависимости A_{200}/A_{210} от времени на рис. 11-**I** говорит о том, что из колонки в интервал времени от 15,2-16,4 мин вымываются как минимум три вещества,

имеющих разные значения A_{210}/A_{200} . Суммарный пик этих неразделенных веществ по времени удерживания совпадает с пиком борнилацетата.

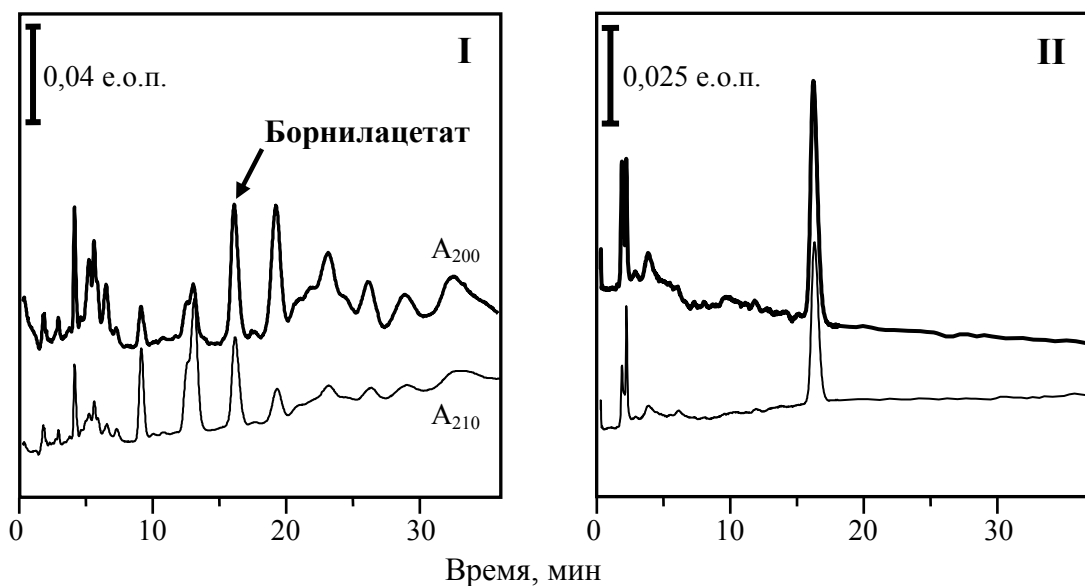


Рис. 10. Сравнение хроматограмм двух образцов борнилацетата.

I- образец с содержанием основного вещества 66%; 5 мг/мл;
II- ГСО борнилацетата (99% основного вещества); 2 мг/мл.
 Условия хроматографирования в подписи к рис. 9-II.

Такую процедуру проверки хроматографического пика на "чистоту" в англоязычной литературе называют иногда "проверкой пика на гомогенность" [33]. В русском языке официального аналога этого термина пока нет, поэтому мы будем использовать термин "гомогенность пика" в кавычках.

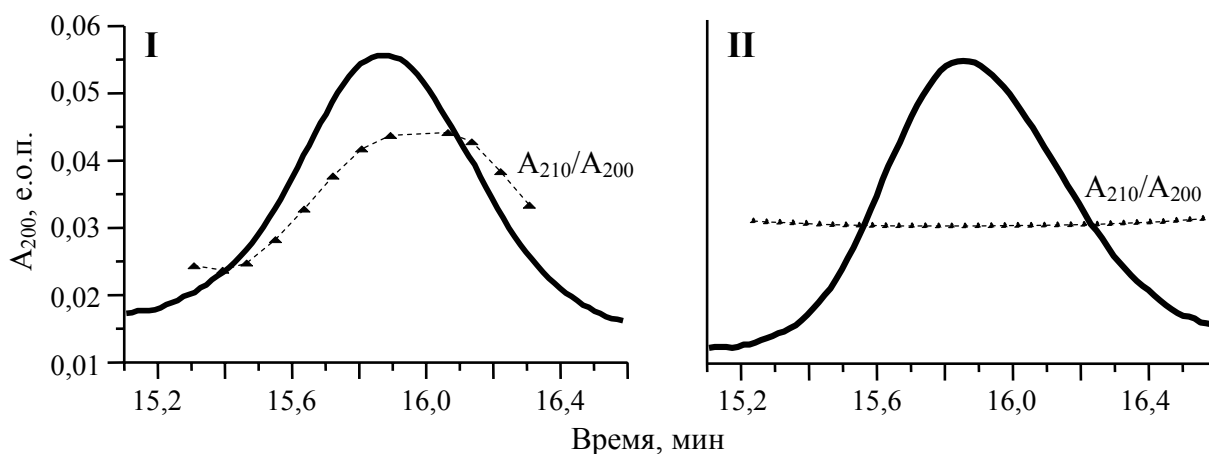


Рис. 11. Спектральный анализ пика борнилацетата.

I- фрагмент хроматограммы образца пихтового масла;
II- фрагмент хроматограммы ГСО борнилацетата.

Для разделения веществ, соответствующих пику №2, мы снизили начальную концентрацию ацетонитрила в подвижной фазе до 50%. Полученная хроматограмма приведена на рис. 12. На ней ясно видно, что пик №2 распался на три пика (1, 2 и 3), которые разделились не полностью ($R_{S1,2}=0,95$ и $R_{S2,3}=0,98$).

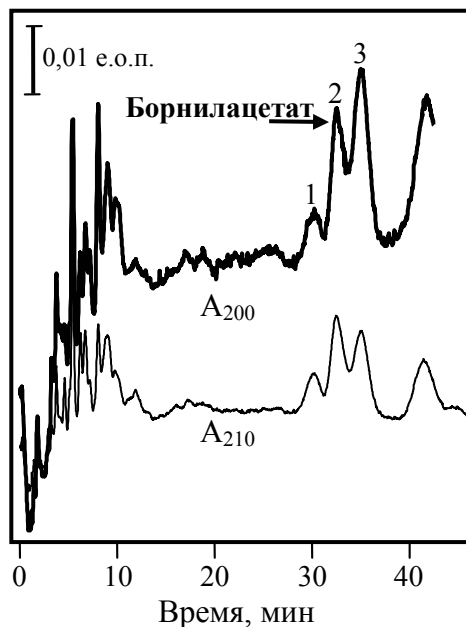


Рис. 12. Фрагмент хроматограммы пихтового масла. Концентрация ацетонитрила в подвижной фазе составляет 50%.

Хроматографическая колонка, которая использовалась в этом эксперименте, имела эффективность 4000 теоретических тарелок (ТТ). Можно показать, что для разделения всех трех пиков с $R_S=1,5$, когда они разделяются до базовой линии и их площади могут быть вычислены с минимальной погрешностью, эффективность колонки должна составлять около 7000 ТТ [7].

Однако, увеличивать эффективность колонки в данном случае особой необходимости нет. Программа "МультиХром" позволяет "разделять" плохо разделенные пики веществ с разными УФ спектрами математически с применением факторного анализа [34].

Для идентификации пика борнилацетата на хроматограмме, приведенной на рис. 12, кроме значения V_R , привлекали не зависящие от концентрации интегральные спектральные отношения S_X/S_{200} , представляющие собой отношения площадей пиков при детекции при соответствующих длинах волн. Эти данные приведены в табл. 2.

Таблица 2. Сравнение хроматографических и спектральных параметров борнилацетата и вещества №2 образца пихтового масла.

Вещество	V_R , мкл	Спектральные отношения S_X/S_{200}			
		S_{210}	S_{220}	S_{240}	S_{300}
Пик №2	3230	0,67	0,40	0,03	0,01
Борнилацетат	3220	0,65	0,42	0,02	0,01

Из табл. 2 видно, что объемы удерживания и спектральные отношения вещества №2 и борнилацетата совпадают в пределах допустимой погрешности (для V_R погрешность менее 1%, для S_X/S_{200} – менее $\pm 0,02$).

Для дополнительного подтверждения правильности идентификации пика №2 в пихтовом масле нами были записаны во время хроматографии (после остановки потока вблизи максимума пика) УФ спектры борнилацетата и пика №2. Как видно из рис. 13-I, нормированные УФ-спектры этих веществ совпадают.

На рис. 13-II представлена градуировочная зависимость для борнилацетата, которая линейна до концентрации 5 мг/мл.

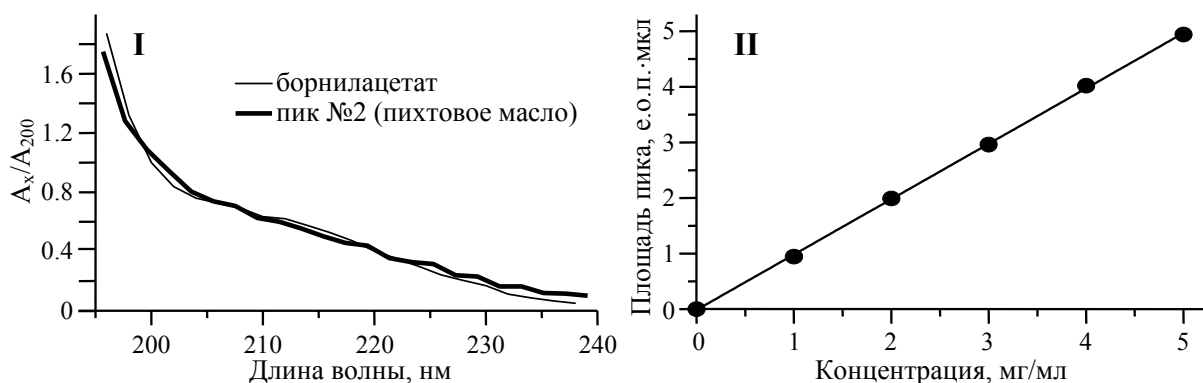
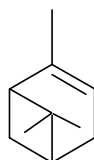


Рис. 13. УФ спектры (I) и градуировочный график (II) для борнилацетата. СКО=1,34%, площади пика рассчитаны при A_{200} , градуировочный коэффициент 2,015.

4.4. Определение α -пинена



Идентификацию α -пинена на хроматограммах пихтового масла проводили методом внешнего стандарта. В качестве внешнего стандарта использовали препарат α -пинена, который растворяли в ацетонитриле с концентрацией 2 мг/мл и хроматографировали в

условиях, приведенных в подписи к рис. 9-II. Кроме объема удерживания рассчитывали спектральные отношения S_X/S_{200} . Результаты приведены в табл 3.

Таблица 3. Сравнение хроматографических и спектральных параметров α -пинена и вещества №9 образца пихтового масла.

Вещество	V_R , мкл	Спектральные отношения S_X/S_{200}			
		S_{210}	S_{220}	S_{240}	S_{300}
Пик №9	2520	0,93	0,42	0,01	0,00
α -Пинен	2520	0,94	0,42	0,01	0,00

Из табл. 3 видно, что времена удерживания и спектральные отношения вещества №9 и α -пинена совпадают в пределах допустимой погрешности.

Для подтверждения правильности идентификации были записаны во время хроматографии (после остановки потока) УФ спектры α -пинена и пика №9. Как видно на рис. 14-I, нормированные УФ спектры этих веществ совпадают.

На рис. 14-II приведен градуировочный график, линейный до концентрации 5 мг/мл.

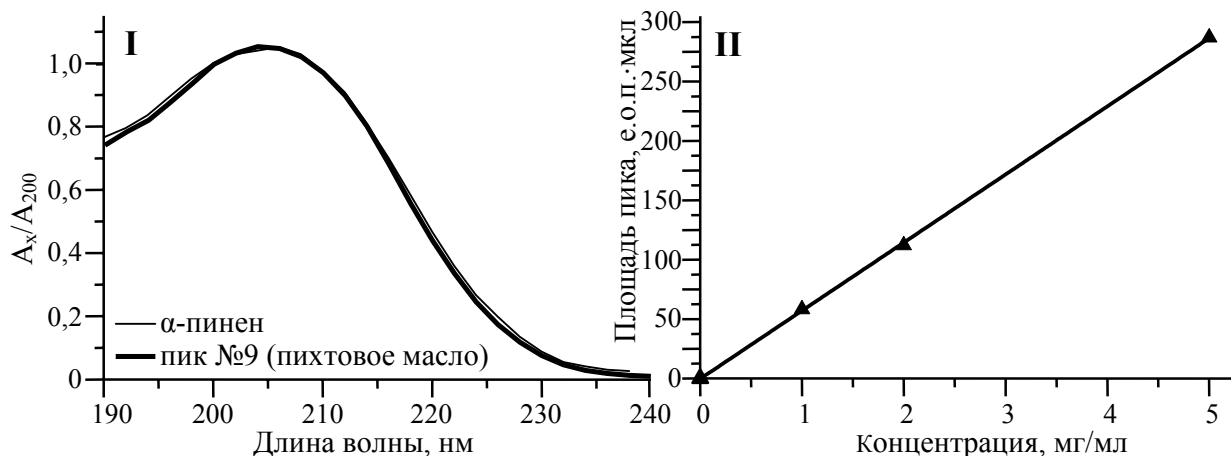
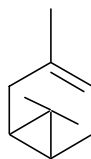


Рис. 14. Сравнение УФ спектров (I) и градуировочный график для α -пинена (II) СКО=1,14%; площади пика рассчитаны при A_{200} , градуировочный коэффициент 0,035.

4.5. Определение Δ^3 -карена



Идентификацию Δ^3 -карена на хроматограммах пихтового масла проводили методом внешнего стандарта. В качестве внешнего стандарта использовали препарат Δ^3 -карена, который растворяли в ацетонитриле с концентрацией 2 мг/мл и хроматографировали в условиях, приведенных в подписи к рис. 9-II. Кроме объема удерживания рассчитывали отношения S_X/S_{200} . Результаты приведены в табл. 4.

Таблица 4. Сравнение хроматографических и спектральных параметров Δ^3 -карена и вещества №8 образца пихтового масла.

Вещество	V_R , мкл	Спектральные отношения S_X/S_{200}			
		S_{210}	S_{220}	S_{240}	S_{300}
Пик №8	2430	0,35	0,07	0,01	0,00
Δ^3 -Карен	2430	0,34	0,06	0,00	0,00

Из табл. 4 видно, что объемы удерживания и спектральные отношения вещества №8 и Δ^3 -карена совпадают в пределах допустимой погрешности.

Для подтверждения правильности идентификации нами были записаны во время хроматографии (после остановки потока) УФ спектры Δ^3 -карена и пика №8. Как видно на рис. 15, нормированные УФ спектры этих веществ совпали.

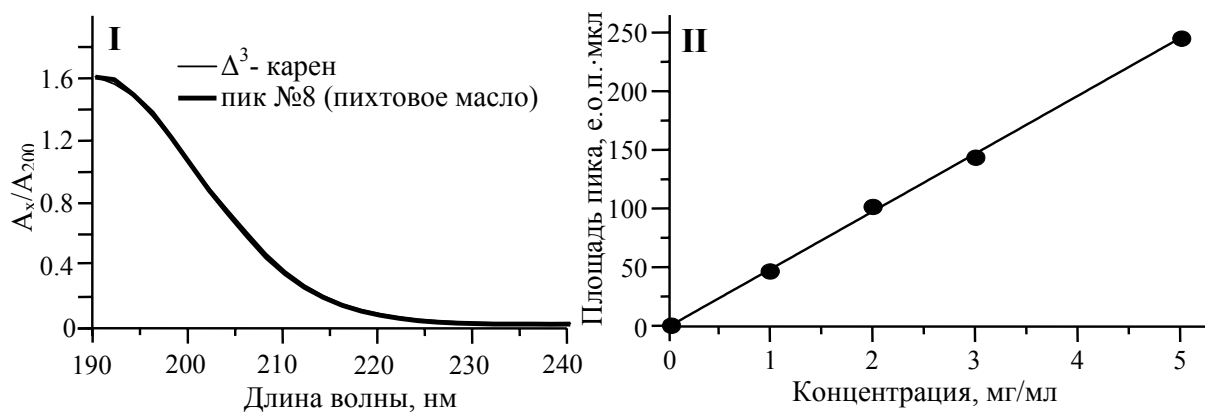
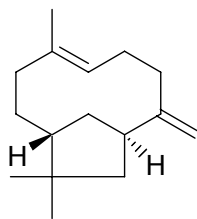


Рис. 15. Сравнение УФ- спектров (I) и градуировочный график Δ^3 -карена (II). СКО=2,66%; площади пика рассчитаны при A_{200} , градуировочный коэффициент 0,041.

4.6. Определение кариофиллена



Идентификацию кариофиллена на хроматограммах пихтового масла проводили методом внешнего стандарта. Препарат кариофиллена растворяли в ацетонитриле с концентрацией 2 мг/мл и хроматографировали в условиях, приведенных в подписи к рис. 9-II. Кроме объема удерживания рассчитывали отношения S_x/S_{200} . Результаты приведены в табл 5.

Таблица 5. Сравнение хроматографических и спектральных параметров кариофиллена и вещества №11 образца пихтового масла.

Вещество	V_R , мкл	Спектральные отношения S_x/S_{200}			
		S_{210}	S_{220}	S_{240}	S_{300}
Пик №11	3140	0,67	0,27	0,00	0,00
Кариофиллен	3140	0,69	0,29	0,01	0,00

Из табл. 5 видно, что времена удерживания и спектральные отношения вещества №11 и кариофиллена совпадают в пределах допустимой погрешности.

Для подтверждения правильности идентификации нами были записаны во время хроматографии (после остановки потока) УФ спектры кариофиллена и пика №11. Как видно на рис. 16, нормированные УФ спектры этих веществ совпали.

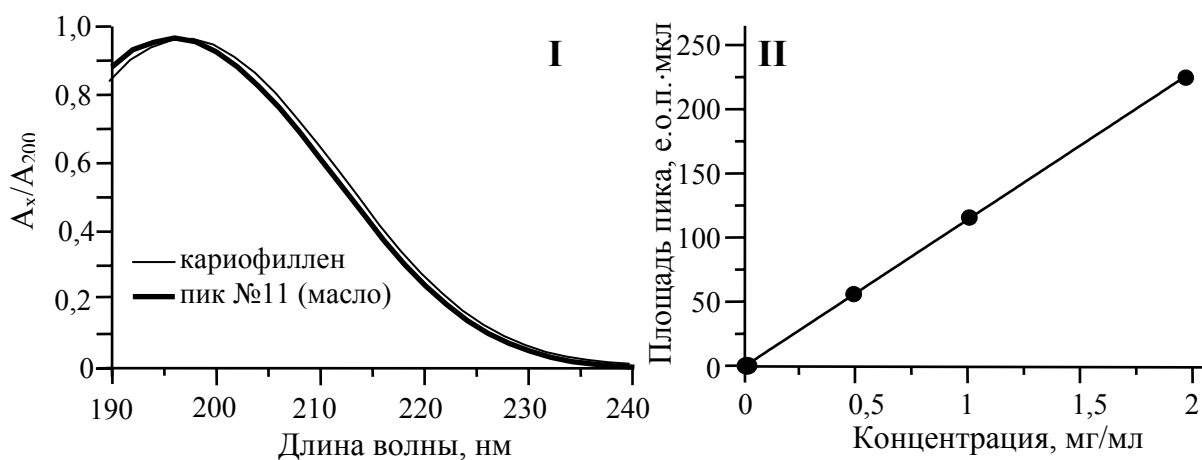


Рис. 16. Сравнение УФ спектров (I) и градуировочный график кариофиллена (II). СКО=2,45%; площади пика рассчитаны при A_{200} , градуировочный коэффициент 0,018.

Хроматограмма образца пихтового масла с названиями пиков идентифицированных веществ приведена на рис. 17.

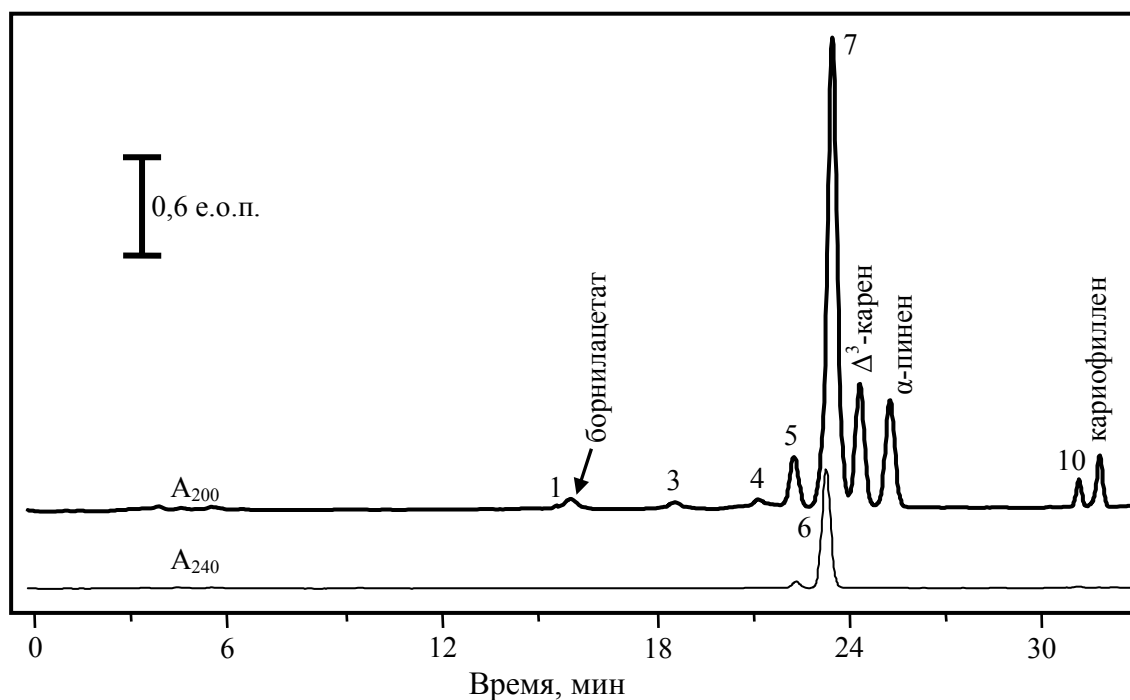
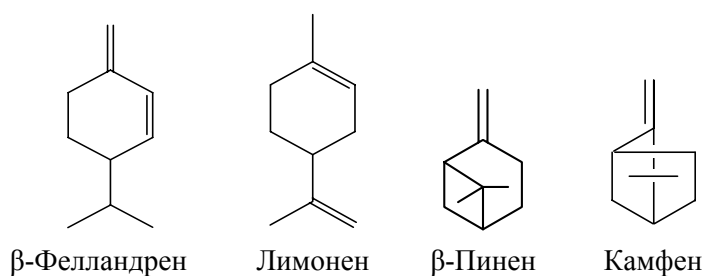


Рис. 17. Хроматограмма образца пихтового масла (образец №1).

Условия хроматографирования в подписи к рис. 9-П.

4.7. Определение β -фелландрена, лимонена, β -пинена и камфена



Растворы лимонена, β -пинена и камфена в ацетонитриле (по 2 мг/мл) хроматографировали в условиях, приведенных в подписи к рис. 9-П. Результаты хроматографии приведены в табл. 6.

Вследствие окисления стандартного образца β -фелландрена на воздухе, его количественный анализ не проводили.

Таблица 6. Сравнение объемов удерживания β -фелландрена, лимонена, β -пинена, камфена и вещества №7 образца пихтового масла.

Образец	V_R , мкл	
	при $\lambda=200$ нм	при $\lambda=240$ нм
Вещество пика № 7	2350	2340
β -Фелландрен	-	2340
Лимонен	2350	-
β -пинен	2360	-
Камфен	2350	-

Из табл. 6 видно, что времена удерживания всех рассматриваемых веществ и пика №7 совпадают в пределах допустимой погрешности (для V_R погрешность менее 1%), т.е. β -фелландрен, лимонен, β -пинен и камфен в этих условиях не разделяются.

Для лимонена, β -пинена и камфена были найдены спектральные отношения S_X/S_{200} (табл. 7), записаны нормированные спектры (рис. 18-а) и получены градуировочные зависимости (рис. 18-б).

Таблица 7. Спектральные отношения лимонена, β -пинена и камфена.

Вещество	Спектральные отношения S_X/S_{200}			
	S_{210}	S_{220}	S_{240}	S_{300}
Лимонен	0,32	0,05	0,01	0,00
β -Пинен	0,67	0,13	0,00	0,00
Камфен	0,28	0,01	0,00	0,00

4.8. Исследование удерживания β -фелландрена, лимонена, β -пинена и камфена на ОФ в разных подвижных фазах

С целью достижения разделения компонентов пихтового масла путем изменения селективности колонки нами были опробованы подвижные фазы, содержащие разные органические растворители:

- вода:ацетонитрил+гексан (7:1);
- вода:метанол;
- вода:этанол;
- вода:изопропанол.

Полученные зависимости k' от концентрации растворителей в подвижной фазе приведены на рис. 19. В полулогарифмических координатах все они линейны, что свидетельствует о чисто распределительном механизме удерживания веществ на обращенной фазе. Ни в одной из исследованных подвижных фаз не получена селективность, позволяющая разделить эти вещества на колонке с $N=4000$ ТТ. Чтобы получить приемлемое разрешение пиков, эффективность колонки с такой обращенной фазой должна быть в десятки раз выше, что невозможно реализовать на обычных жидкостных хроматографах.

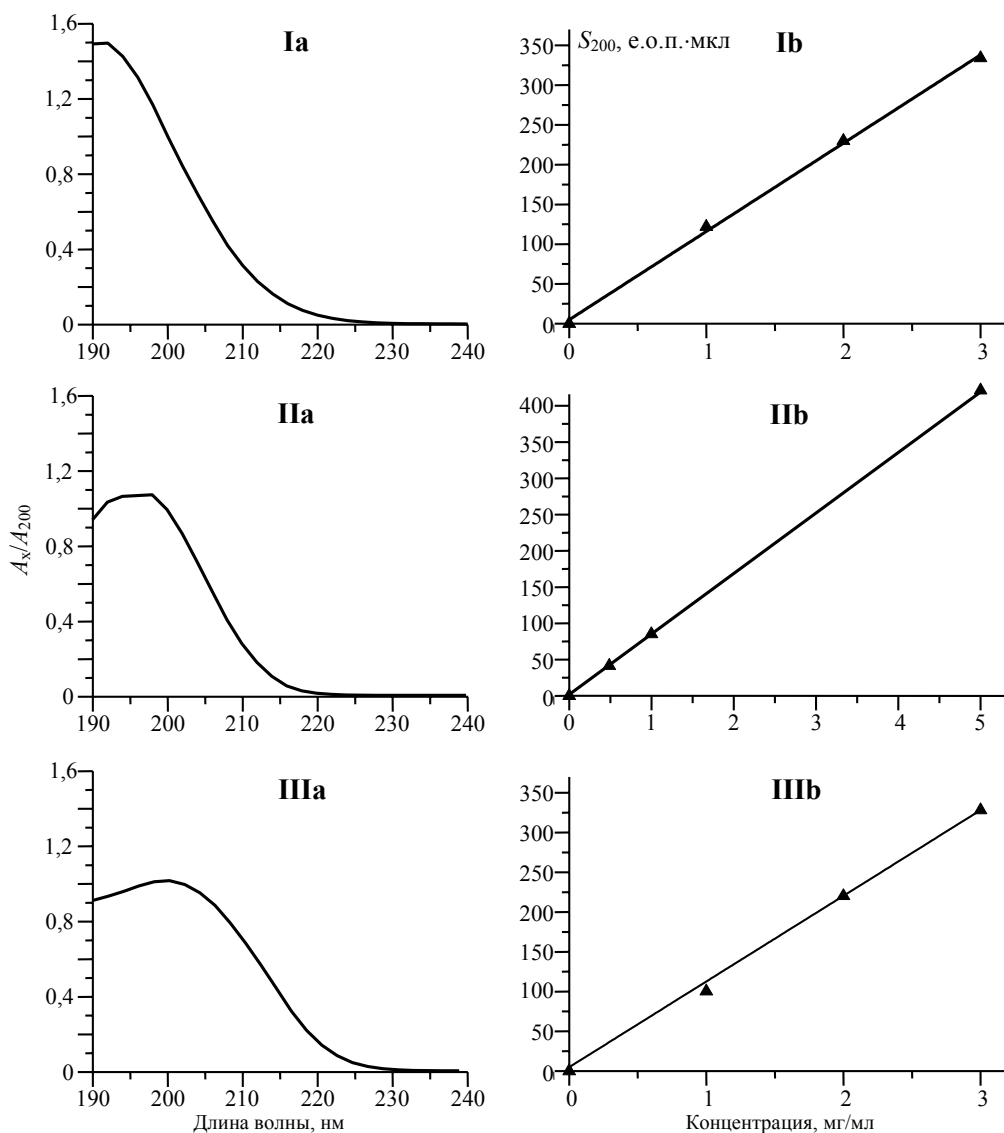


Рис. 18. Нормированные УФ спектры (а) и градуировочные графики (б) для лимонена, камфена и β -пинена.

I- лимонен; СКО=3,24%; градуировочный коэффициент 0,018;

II- камфен; СКО=2,28%; градуировочный коэффициент 0,025;

III- β -пинен; СКО=3,22%; градуировочный коэффициент 0,018.

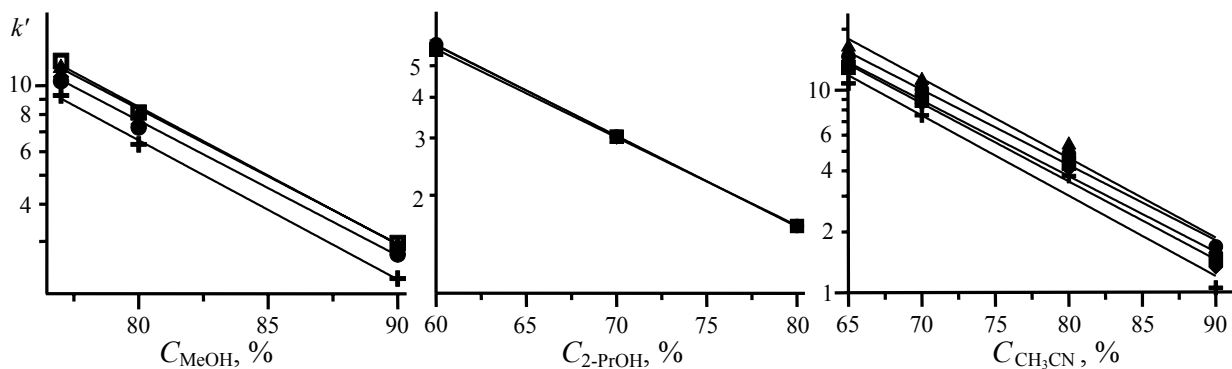


Рис. 19. Зависимость удерживания β -фелландрена, лимонена, β -пинена и камфена от состава подвижной фазы.

4.9. Количественный анализ пихтовых масел

Полученные для стандартных образцов градуировочные зависимости позволили провести количественное определение борнилацетата, Δ^3 -карена, α -пинена и кариофиллена в пихтовых маслах. Полученные данные приведены в табл. 8.

Таблица 8. Количественный анализ образцов пихтовых масел.

Образец			Содержание, %			
№	Производитель	Дата	Борнилацетат	Δ^3 -Карен	α -Пинен	Кариофиллен
1	Кемерово №1	2003 г.	25,2±0,8	15,3±0,4	11,7±0,3	1,9±0,2
2	Кемерово №2	2003 г.	25,3±1,0	15,8±1,8	12,2±1,3	0,9±0,1
3	Маслянино	2003 г.	23,8±1,0	15,4±0,3	13,2±0,4	1,0±0,1
4	Шарыпово	2003 г.	26,7±2,8	17,1±0,3	13,1±0,2	1,2±0,1
5	Новосибхимфарм	2001 г.	26,5±2,8	12,4±0,1	12,1±0,1	0,6±0,1
6	"СиНам"	2004 г.	27,0±1,1	16,6±0,3	14,2±0,3	0,8±0,1
7	Сорт 1 (Лазурин)	2005 г.	29,0±1,5	18,1±0,2	17,4±0,2	1,0±0,1

Содержание борнилацетата в пихтовых маслах для фармакопейных целей должно составлять не менее 30% [32]. Из исследованных нами образцов только образец №7 удовлетворяет этому требованию. Возможно, что пониженное содержание борнилацетата в других образцах связано с длительным сроком их хранения. Следует отметить, что несмотря на существенно разное происхождение образцов масла, их состав по четырем главным компонентам различается весьма мало.

4.10. Исследование бергамотового, грейпфрутового, кедрового масел и скипидара

Разработанный для анализа пихтового масла подход был нами использован для исследования других эфирных масел: грейпфрутового, бергамотового и кедрового. Также мы исследовали скипидар, который среди эфирных масел занимает особое место - его производство составляет отдельную отрасль лесной промышленности. Скипидар применяется при изготовлении лаков, красок, технических восков и вакс, используется в качестве растворителя. Скипидар является сырьем для синтеза целого ряда технически важных продуктов: камфоры, терпина, терпинеола и др. [1].

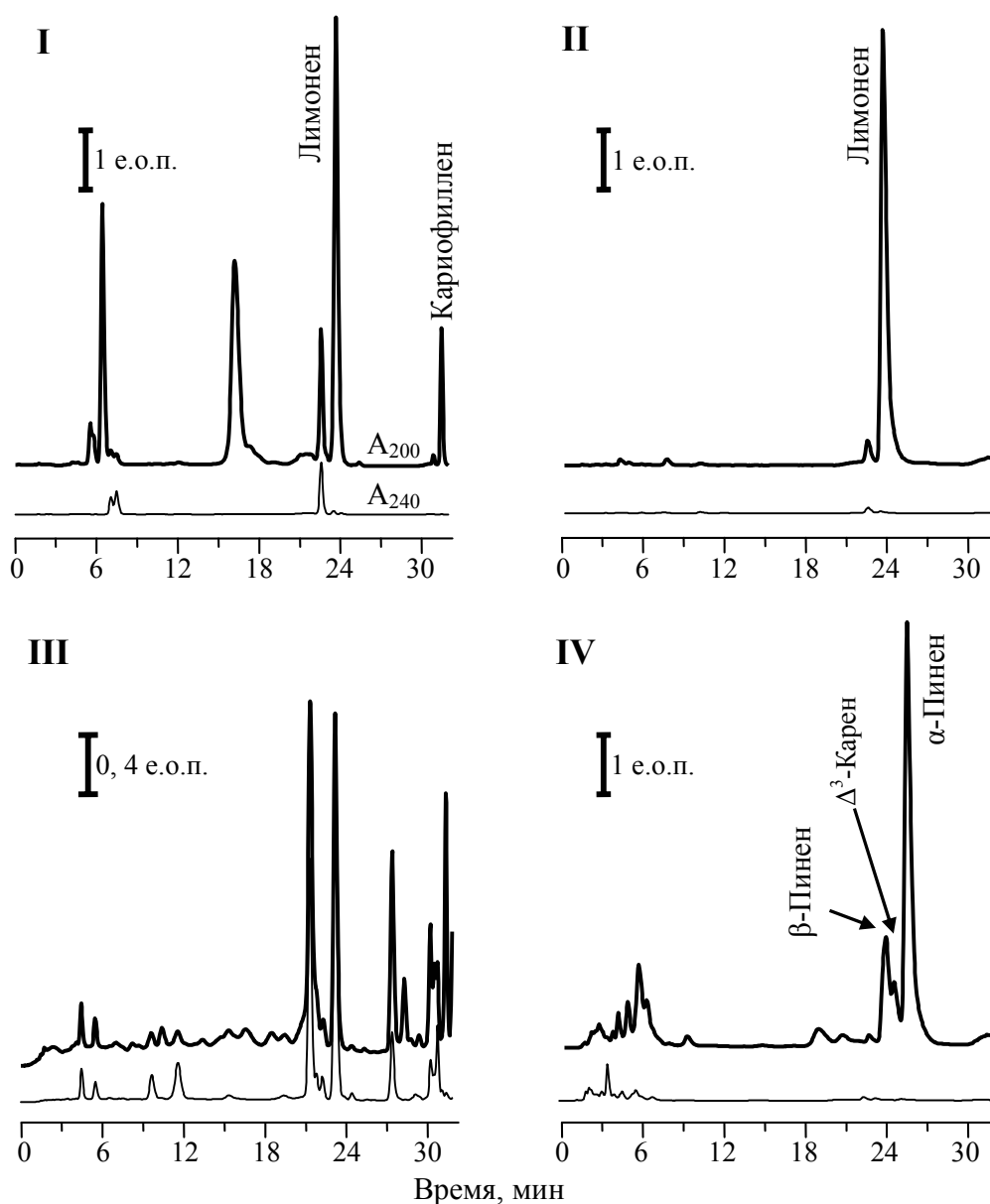


Рис. 20. Хроматограммы эфирных масел.

I- бергамотовое масло; II- грейпфрутовое масло; III- кедровое масло; IV- скипидар.
 Условия хроматографирования в подписи к рис. 9-II.

Образцы масел растворяли в ацетонитриле с концентрацией 10 мг/мл и хроматографировали в тех же условиях, что и образцы пихтового масла. Соответствующие хроматограммы масел приведены на рис. 20.

В бергамотовом и грейпфрутовом маслах обнаружен основной пик с $V_R=2360-2370$ мкл. Этому пику по объему удерживания и спектральному отношению соответствуют лимонен.

Таблица 9. Сравнение хроматографических и спектральных параметров лимонена и одного из компонентов бергамотового и грейпфрутового масел.

Вещество	V_R , мкл	Спектральные отношения S_X/S_{200}			
		S_{210}	S_{220}	S_{240}	S_{300}
Лимонен	2350	0,32	0,05	0,01	0,00
Из грейпфрутового масла	2370	0,32	0,06	0,01	0,00
Из бергамотового масла	2370	0,34	0,07	0,01	0,00

Для подтверждения правильности идентификации этого компонента были записаны их УФ спектры, которые совпали со спектром лимонена (рис. 21).

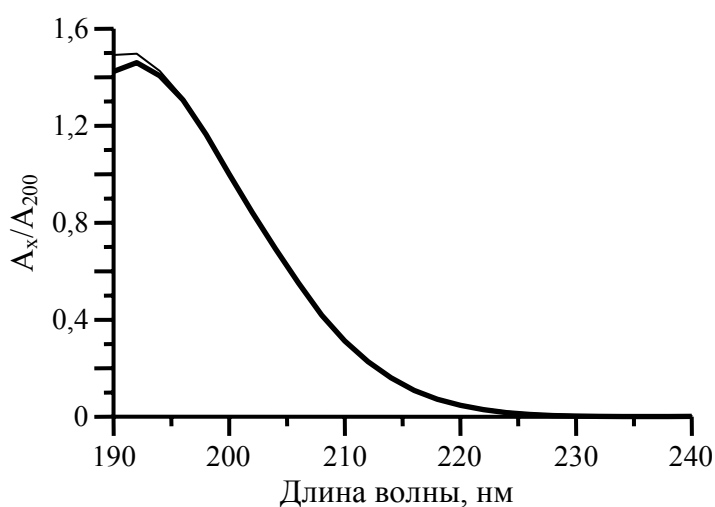


Рис. 21. Сравнение нормированных УФ- спектров лимонена и пиков с $V_R=2370$ мкл на хроматограммах бергамотового и грейпфрутового масел.

Аналогичным образом идентифицированы кариофиллен в бергамотовом масле и α -пинен в скипидаре (см. табл. 10).

β -пинен и Δ^3 -карен в образце скипидара в этих условиях не разделяются.

В кедровом масле выявлено много веществ, но ни один из главных пиков не совпал по удерживанию с нашими внешними стандартами.

Таблица 10. Сравнение хроматографических и спектральных параметров кариофиллена и α -пинена с компонентами эфирных масел.

Вещество	V_R , мкл	Спектральные отношения S_x/S_{200}			
		S_{210}	S_{220}	S_{240}	S_{300}
Бергамотовое масло	3140	0,69	0,29	0,01	0,00
Кариофиллен	3140	0,69	0,29	0,01	0,00
Скипидар	2530	0,94	0,41	0,00	0,00
α -Пинен	2520	0,94	0,42	0,01	0,00

Данные по количественному составу образцов пихтовых масел приведены в табл. 11.

Таблица 11. Количественный состав эфирных масел.

Образец	Содержание, %		
	Лимонен	α -Пинен	Кариофиллен
Бергамотовое масло	25,0 \pm 0,7	-	3,7 \pm 0,1
Грейпфрутовое масло	90,1 \pm 1,7	-	-
Скипидар	-	47,8 \pm 1,1	-

Согласно литературным данным [16], α -пинен является составной частью многих эфирных масел и скипидара. По информации из "Краткой химической энциклопедии" [35] следует, что в состав соснового живичного скипидара входят 60-70% α -пинена 6-8% β -пинена.

4.11. Газохроматографический анализ эфирных масел

Для подтверждения полученных данных некоторые образцы эфирных масел были исследованы методом ГЖХ-МС в аналитической лаборатории Института катализа им. Г.К.Борескова Сибирского отделения РАН. Условия хроматографирования приведены в Экспериментальной части (раздел 3.2). Полученные хроматограммы приведены на рис. 22.

Идентификацию пиков на хроматограммах проводили путем их сопоставления с параметрами из имеющейся базы данных для природных соединений. Эта база данных содержит параметры удерживания, что помогает провести окончательное отнесение пиков путем сравнения масс-спектров.

Родственные соединения, такие как изомеры или гомологи, которые могут давать похожие масс-спектры, без использования внешних стандартов надежно

идентифицировать весьма трудно [8]. Основным условием для однозначной идентификации пиков является их полное отделение от других компонентов.

Газовая хроматография подтвердила данные, полученные нами методом ВЭЖХ. Обнаруженные с помощью ВЭЖХ вещества в пихтовом масле, удерживание которых соответствует неразделяемым компонентам (β -фелландрен, лимонен, β -пинен и камфен) методом ГЖХ определяются. Метод ГЖХ также подтвердил, что основными компонентами бергамотового и грейпфрутового масел является лимонен.

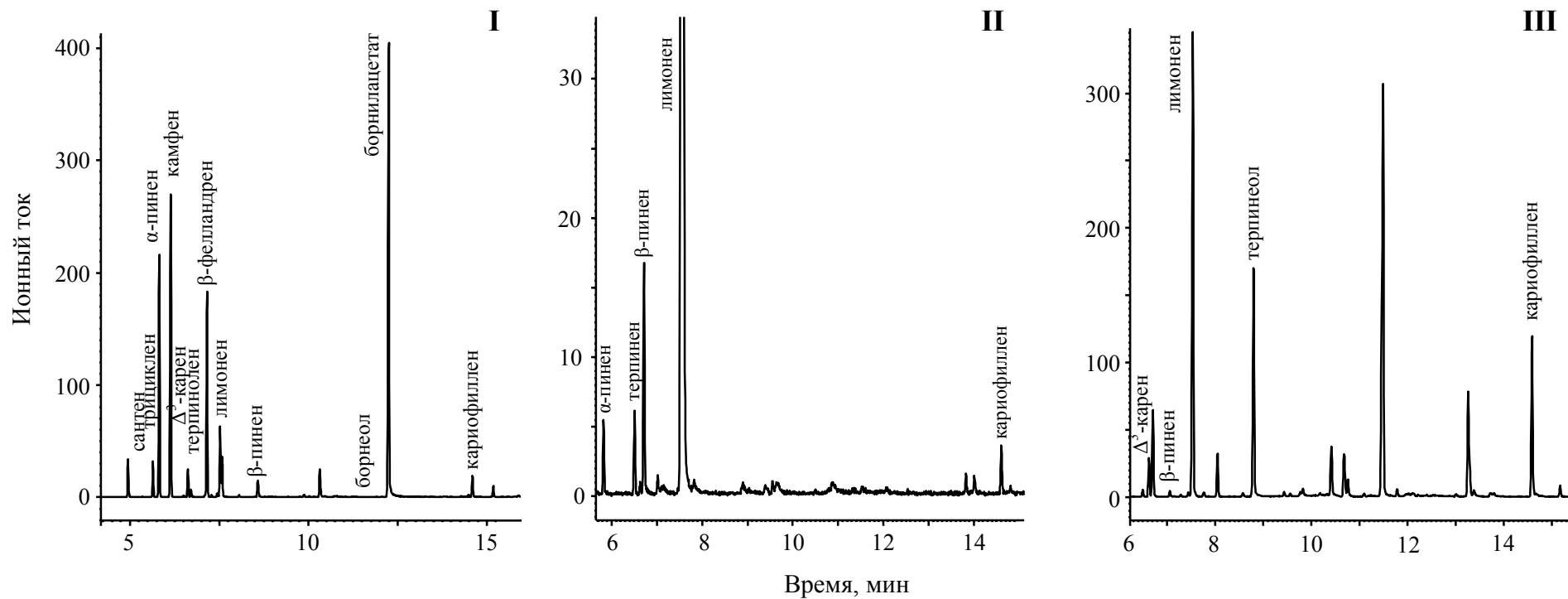


Рис. 27. Анализ эфирных масел методом ГЖХ-МС.

I- пихтовое масло; II- грейпфрутовое масло; III- бергамотовое масло.

Условия анализа приведены в Экспериментальной части.

5. ВЫВОДЫ

1. В работе предложен подход к изучению состава эфирных масел методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии с многоволновым фотометрическим детектированием в области длин волн 200-240 нм.

2. На примере этилацетата, бутилацетата и борнилацетата показано влияние на хроматографическую подвижность низкомолекулярных сложных эфиров таких параметров как скорость потока подвижной фазы, температуры колонки, состава подвижной фазы и формы градиента концентрации ацетонитрила в ней, нагрузки вещества на колонку. Экспериментально определены допустимые границы изменения хроматографических параметров, при которых сохраняется приемлемая эффективность колонки.

3. Получены хроматографические, спектральные и градуировочные характеристики важнейших компонентов эфирных масел (борнилацетат, α -пинен, β -пинен, Δ^3 -карен, кариофиллен, β -фелландрен, лимонен, камфен), которые необходимы для количественного и качественного определения этих веществ методом ВЭЖХ-УФ.

4. Разработанный метод анализа на основе обращенно-фазовой ВЭЖХ апробирован для количественного определения главных компонентов в более чем 10 образцах эфирных масел.

6. ЛИТЕРАТУРА

1. Пигулевский, Г.В. Химия терпенов, Ленинград: изд-во ЛГУ, 1949.- 145 с.
2. 100 лет хроматографии / Отв. ред. Б.А. Руденко.-М.: Наука, 2003.-739 с.
3. Рудаков, О. Б., Востров, И. А., Федоров, С. В. Спутник хроматографиста, Воронеж: Водолей, 2004.- 274 с.
4. Браун, Д., Флойд, А., Сейнзбери, М. Спектроскопия органических веществ, М.:Мир, 1992.- С. 12-26.
5. Количественный анализ хроматографическими методами / Ред. Э. Кэц. -М.: Мир, 1990.- С. 26-37.
6. Scott, R. P. W. Liquid chromatography detectors (2nd, Completely revised edition), Elsevier, 1986.
7. Шатц, В.Д., Сахартова, О.В. Высокоэффективная жидкостная хроматография, Рига: Зинатне, 1988.- С. 38-40.
8. Схунмакерс, П. Оптимизация селективности в хроматографии, М.: Мир, 1989.- 23с.
9. Стыскин, Е.Л., Ициксон, Л.Б., Брауде, Е.В., Практическая высокоэффективная жидкостная хроматография, М.: Мир, 1986.- 175 с.
10. Руденко, Б.А., Руденко, Г.И. Высокоэффективные хроматографические процессы, М., 2002.- С. 105-117.
11. Хеншен, А., Хупе, К.-П., Лотшпайх, Ф., Вельтер, В. Высокоэффективная жидкостная хроматография в биохимии, М.: Мир, 1988.- С.- 383-428.
12. Mirov, N. T. Composition of gum terpenes of pinus. U. S. Department of Agriculture. // Tech. Bul.- 1961.- N 1239.- P.158.
13. Бардышев, И. И., Донцова, Э.П. Синтетические продукты из канифоли и скипидара. Горький: Волго-Вят. кн. изд-во, 1970.- С. 36-45.
14. Fernando, Lancas, Ogawa. Separation of monoterpenes in orange essential oil by capillaryliquid chromatography and micellar electrokinetic chromatography. // J. Liq. Chrom and Rel. Technol.- 2002.- P. 1651-1659.
15. Сидельников, В.Н. Сравнительный анализ состава пихтового масла, полученного водно-паровой дистилляцией и эфиромаслянической фракции CO₂-экстракта лапки пихты сибирской. // Химия растительного сырья.- 2003.- №1.- С.79-85.
16. Семенов, А.А. Терпеноиды хвойных растений, Новосибирск: Наука, 1987.- 11 с.
17. Штерн, Э., Тиммонс, К. Электронная абсорбционная спектроскопия в органической химии, М.: Мир, 1974.

18. Steiner, F., Beck, W., Engelhardt, H. Optimization of indirect UV detection in high-performance liquid chromatography and capillary electroforesis. // J.Chromatogr. A.- 1996.- V.738.- P. 11-23.
19. Small, H., Miller, T.E. Indirect Photometric Chromatography. // Anal. Chem.- 1982.- V.54. -P. 462-469.
20. Dreux, M., Lafosse, M., Pequignot, M. Separation of Inorganic Anions by Ion-Pair, Reverse Phase Liquid Chromatography Monitored by Indirect Photometry. // Chromatographia.- 1982.- V.15.- P. 653-656.
21. Jones, V.K., Frost, S.A., Tarter, J.G. Simultaneous Ion Chromatographic Analysis of Anions and Mono- or Divalent Cations. // J.Chromatogr.Sci.- 1985.- V.23.- P. 442-445.
22. Iskandarani, Z., Miller, T.E. Simultaneous Independent Analysis of Anions and Cations Using Indirect Photometric Chromatography. // Anal.Chem.- 1985.- V.57.- P.- 1591-1594.
23. Walker, T.A. The Separation of Organic Analyte Cations on a Low-Capacity Cation Exchange Column Using Indirect UV Detection. // J.Liquid Chromatogr.- 1988.- V.11.- No.7.- P.- 1513-1530.
24. Schill, G., Arvidsson, E. Application of Indirect Detection Methods in Biomedical Analysis. // J.Chromatogr.- 1989.- V.492.- P. 299-318.
25. Riedmann, M., Glatz, B. Sensitive HPLC analysis of Inorganic Anions Using Standard Equipment. // International Labor.- 1994.- V.22.- P. 7-14.
26. Фритц, Дж., Гьерде, Д., Поланд, К. Ионная хроматография, М.: Мир.-1984.
27. Gjerde, D.T., Fritz, J.S. Ion Chromatography. // 2nd Edition: Huthig.-1987.
28. Takeuchi, T., Ishii, D. Indirect Photometric Detection of Hydrocarbons in Micro High-Performance Liquid Chromatography. // J.Chromatogr.- 1987.- V.396.- P. 149-155.
29. Ishii, D., Takeuchi, T. Indirect Detection in High-Performance Liquid Chromatography. // J.Liquid Chromatogr.- 1988.- V.11.- No.9&10.- P. 1865-1974.
30. Барам, Г.И. Развитие метода микроколоночной высокоэффективной жидкостной хроматографии и его применение для исследования объектов окружающей среды. // 100 лет хроматографии, М.: Наука, 2003.- С. 42-45.
31. Хубер, Л., Применение диодно-матричного детектирования в ВЭЖХ, М.: Мир, 1993.- С. 74-80.
32. X Государственная Фармакопея / Частная фармакопейная статья ФС 42-3370-97.
33. Polster, J., Sauerwald, N., Feucht, W., Treutter, D. New methods for spectrometric peak purity analysis in chromatography // J. Chromatogr. A.- 1998.- V.800. №2.- P. 121-133.

34. МультиХром для Windows 9x & NT. Программный комплекс для обработки хроматографических данных, Новосибирск.: ЗАО "ЭкоНова".- 2001.- 105 с.
35. Кнунянц, И. Л., Скипидар // Краткая химическая энциклопедия, "Советская Энциклопедия", М.- 1965.- Т.4.-с.-899.