

УДК 543.641

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДВУХ ГРУПП ТЕРПЕНОВЫХ СОЕДИНЕНИЙ МЕТОДОМ ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

© *А.Н. Нарчуганов, А.А. Ефремов**

Сибирский федеральный университет, пр. Свободный, 79, Красноярск, 660041 (Россия), e-mail: aefremov@sfu-kras.ru.

В работе представлена методика анализа растительного сырья для количественного определения 10 монотерпенов и 20 сесквитерпенов методом ГХ-МС. Для количественного определения содержания монотерпенов в качестве стандартного образца предложено использовать α -пинен, для определения сесквитерпенов – γ -кадинен. Представлены результаты анализа эфирных масел, полученных из древесной зелени хвойных растений Сибирского региона.

Ключевые слова: терпены, эфирное масло, количественное определение, хромато-масс-спектрометрия, пихта сибирская, сосна сибирская.

Введение

При определении летучих биологически активных веществ, содержащихся в растительном сырье, первое место среди других аналитических методов занимает, безусловно, хромато-масс-спектрометрия. Этот метод является гибким и универсальным, а выпускаемые за рубежом и в последние годы в России газовые масс-спектрометры отличаются высокой надежностью и просты в эксплуатации. Хромато-масс-спектрометрия оказывается незаменимой при решении исследовательских задач: масс-спектры большинства летучих БАВ растительного сырья приведены в так называемых библиотеках масс-спектров, что позволяет проводить качественную идентификацию компонентов сложных смесей путем сопоставления экспериментальной и библиотечной информации. Для повышения надежности идентификации рекомендуется дополнительно проводить расчет линейных индексов удерживания. Сравнение экспериментального и библиотечного индексов удерживания дает дополнительную хроматографическую точку идентификации, сочетание которой с масс-спектрометрическими точками идентификации позволяет проводить определение качественного состава более надежно [1].

Для количественного хромато-масс-спектрометрического определения компонентов сложной смеси, как правило, используют метод внутренней нормировки. При этом суммарная площадь хроматографических пиков принимается за 100%, а содержание отдельных компонентов определяется в массовых процентах пропорционально их площади. Этот метод расчета едва ли можно назвать точным: отклик масс-спектрометра сильно зависит от строения определяемого вещества. Ошибка количественного определения может достигать 20% и более.

Более точным является метод внутреннего стандарта, который также часто используется в хромато-масс-спектрометрических методиках. Однако он не применим при анализе сложных смесей БАВ, выделяемых из растительного сырья. Это связано с отсутствием стандартных образцов на большинство подобных соединений. В данной работе предложен подход, предполагающий количественное определение двух групп терпеновых соединений, с использованием только одного из членов группы в качестве внутреннего

Нарчуганов Антон Николаевич – аспирант кафедры аналитической и органической химии Института цветных металлов и материаловедения, тел.: (391) 246-99-41, e-mail: anarhuganov@sfu-kras.ru
Ефремов Александр Алексеевич – заведующий лабораторией хроматографических методов анализа центра коллективного пользования, доктор химических наук, профессор, e-mail: AEfremov@sfu-kras.ru

стандарта для определения остальных. Членами группы являются изомерные терпены, схожие по механизму фрагментации при масс-спектрометрическом детектировании. Было сделано предположение, что отклик масс-спектрометра на эти соединения является одинаковым с некоторой погрешностью, не превышающей случайную погрешность метода.

* Автор, с которым следует вести переписку.

Экспериментальная часть

Анализировали образцы эфирного масла и гексановые экстракты древесной зелени хвойных растений, богатые моно- и сесквитерпеноидами. Анализируемый образец эфирного масла объемом 1 мкл помещали в виалу, добавляли 600 мкл *n*-гексана, тщательно перемешивали и помещали в автосэмплер. Объем вводимой пробы – 1 мкл. Растворы, полученные после перегонки гексановых экстрактов, как правило, отличались невысокими концентрациями терпеноидов и анализировались без дополнительного разбавления. Параметры хроматографа устанавливали на основе рекомендаций, приведенных в [2]: температура испарителя – 250 °С, режим ввода – с делением потока, коэффициент деления – 19 : 1. Анализ вели на кварцевой капиллярной колонке HP-5ms длиной 30 м и внутренним диаметром – 0,25 мм, неподвижной фазой служил 5%-дифенил-95%-диметилсилоксан, толщина пленки неподвижной фазы 0,25 мкм. Газ-носитель – гелий с постоянной скоростью потока 1 мл/мин. Использовали следующий режим программирования температуры: начальная температура колонки составляла 50 °С (удерживается 2 мин), затем градиентный подъем температуры 4°/мин до 180 °С, затем градиентный подъем со скоростью 25°/мин до 280 °С (удерживается 5 мин). Общее время анализа составляло 43,5 мин. Параметры масс-спектрометра: задержка растворителя (время от начала анализа до подачи тока на источник ионов) составляла 4 мин, ионизация электронная с энергией электронов 70 эВ. Температура интерфейса (хроматограф – масс-спектрометр) составляла 280 °С, температура источника ионов – 230 °С, температура квадруполя – 150 °С. Масс-спектрометр работал в режиме регистрации полного ионного тока.

Обсуждение результатов

Путем анализа масс-спектров было выявлено две группы терпенов: 10 монотерпенов с основным ионом $m/z=93$ в масс-спектре и 20 сесквитерпенов с основным ионом $m/z=161$. Для проверки гипотезы об одинаковом отклике масс-спектрометра на изомерные соединения и, соответственно, подтверждения однородности представленных групп провели анализ одних и тех же проб на хромато-масс-спектрометре и на газовом хроматографе с пламенно-ионизационным детектором. Известно, что отклик пламенно-ионизационного детектора (ПИД) незначительно изменяется для соединений одного класса. Установлено, что отклик масс-спектрометрического детектора коррелирует с откликом ПИД для всех моно- и сесквитерпенов, входящих в исследуемые группы, это подтверждает рассматриваемую гипотезу.

Хроматограммы эфирного масла сосны сибирской представлены на рисунках 1 и 2. Качественную идентификацию проводили путем сопоставления масс-спектров и индексов удерживания.

Рабочие растворы (7 уровней концентрации) для построения градуировочного графика готовили из стандартных образцов терпенов методом последовательного разбавления. В качестве растворителя использовался гексан. Каждый рабочий раствор содержал стандарт для определения монотерпенов (α -пинен) и сесквитерпенов (γ -кадинен). Каждый раствор анализировался в 6 параллелях, относительное стандартное отклонение не превышало 3%. Уравнения калибровочных кривых и коэффициенты регрессии для соответствующих диапазонов определяемых содержаний приведены в таблице 1.

Таким образом, приемлемый уровень коэффициента регрессии для обоих аналитов находится в двух диапазонах концентраций: 5–200 и 5–2000 мг/л. Тем не менее использовали меньший из двух диапазонов, поскольку было установлено, что высокие концентрации аналитов вызывают перегрузку колонки.

В качестве образцов для оценки прецизионности в условиях повторяемости использовали эфирное масло пихты сибирской и сосны сибирской, а также гексановый экстракт сосны сибирской. Анализ проводили в 10 параллелях, в одинаковых условиях и практически одновременно. Количество α -пинена определяли методом градуировочного графика, количество остальных монотерпенов – методом внутреннего стандарта по α -пинену, коэффициент пересчета 1,00. Количество γ -кадинена определяли методом градуировочного графика, количество остальных сесквитерпенов – методом внутреннего стандарта по γ -кадинену, коэффициент пересчета 1,00. Установлено, что погрешность определения, выраженная в относительных единицах, не превышала 4%. Значение предела обнаружения для обоих аналитов было определено графически по зависимости соотношения сигнал – шум от концентрации, предел обнаружения соответствовал соотношению сигнал – шум 3 : 1. Предел обнаружения для α -пинена составил 0,3 мг/л, для γ -кадинена – 0,2 мг/л.

Для проверки правильности методики был использован метод «введено – найдено». В пробы эфирных масел (с разбавлением) и экстрактов добавлено определенное количество смеси стандартов, содержащей α -пинен и γ -кадинен. Проанализированы исходные образцы и образцы с добавкой. Результаты представлены в таблице 2.

Представленная методика апробирована на образцах эфирного масла, полученного из древесной зелени пихты сибирской и сосны сибирской. Результаты отражены в таблице 3.

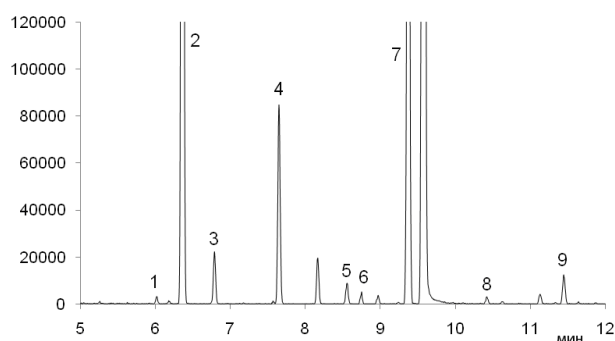


Рис. 1. Хроматограмма образца эфирного масла сосны сибирской, область монотерпенов:

1 – трициклен, 2 – α -пинен, 3 – камфен,
4 – β -пинен, 5 – α -фелландрен, 6 – 3-карен,
7 – β -фелландрен

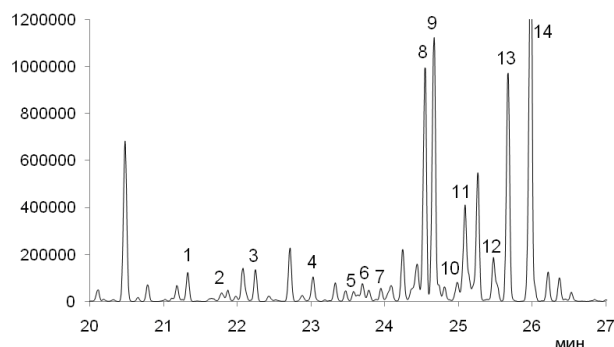


Рис. 2. Хроматограмма образца эфирного масла сосны сибирской, область сесквитерпенов:

1 – α -копаен, 2 – β -кубебен, 3 – β -фунебрэн,
4 – β -копаен, 5 – *цис*-муурола-3,5-диен,
6 – *транс*-муурола-3,5-диен, 7 – *цис*-муурола-4(14),5-диен,
8 – *транс*-кадина-1(6),4-диен,
9 – гермакрэн Д, 10 – бициклосесквифелландрен,
11 – γ -аморфен, 12 – δ -аморфен, 13 – γ -кадинен,
14 – δ -кадинен

Таблица 1. Результаты калибровки по α -пинену и γ -кадинену

Аналит	Диапазон линейности градуировочного графика, мг/л	Уравнение калибровочной кривой	Коэффициент регрессии
α -пинен	5–5000	$S=1,09 \cdot 10^5 C + 7 \cdot 10^6$	0,9970
	5–2000	$S=1,23 \cdot 10^5 C + 2 \cdot 10^6$	0,9993
	5–500	$S=1,35 \cdot 10^5 C + 5,06 \cdot 10^5$	0,9979
	5–200	$S=1,51 \cdot 10^5 C - 3,18 \cdot 10^5$	0,9993
γ -кадинен	5–5000	$S=1,84 \cdot 10^5 C + 2 \cdot 10^7$	0,9843
	5–2000	$S=2,41 \cdot 10^5 C - 1 \cdot 10^6$	0,9996
	5–500	$S=2,25 \cdot 10^5 C + 8,4 \cdot 10^5$	0,9979
	5–200	$S=2,51 \cdot 10^5 C + 5,3 \cdot 10^5$	0,9993

Таблица 2. Результаты анализа проб эфирного масла

Проба	Аналит	Содержание аналита в исходной пробе, мг/л	Введено аналита, мг/л	Найдено аналита, мг/л
Эфирное масло пихты сибирской	α -пинен	152,6±1,6	50	48,2±1,6
Эфирное масло сосны сибирской	γ -кадинен	14,2±1,3	10	9,8±1,4
Экстракт сосны сибирской	α -пинен	24,3±1,5	10	9,8±1,5
	γ -кадинен	9,4±1,4	10	9,6±1,4
Экстракт сосны обыкновенной	α -пинен	19,8±1,4	10	10,2±1,5
	γ -кадинен	5,6±1,3	10	10,2±1,5

Таблица 3. Содержание некоторых моно- и сесквитерпенов в эфирных маслах пихты сибирской и сосны сибирской

№	Компонент	t_r , мин	Содержание в эфирных маслах (г/л):	
			пихты сибирской	сосны сибирской
1	2	3	4	5
1	Трициклен	6,02	20,5	1,4
2	α -пинен	6,40	92,9	392,6
3	Камфен	6,87	197,1	9,6
4	Сабинен	7,53	<0,2	0,2
5	β -пинен	7,65	16,4	36,9
6	α -фелландрен	8,56	2,0	4,1
7	3-карен	8,77	98,1	1,9
8	β -фелландрен	9,42	86,8	181,0
9	γ -терпинен	10,42	1,7	1,4

Окончание таблицы 3

1	2	3	4	5
10	Терпинолен	11,45	11,6	6,2
11	α -кубебен	20,50	<0,2	<0,2
12	α -копаен	21,34	<0,2	1,2
13	β -кубебен	21,82	<0,2	0,3
14	β -фунебрен	22,30	0,9	1,4
15	β -кедрен	22,50	<0,2	<0,2
16	β -копаен	23,04	<0,2	1,0
17	β -гурьюнен	23,15	<0,2	<0,2
18	Изогермакрен Д	23,51	<0,2	<0,2
19	<i>цис</i> -муурола-3,5-диен	23,59	<0,2	0,3
20	<i>транс</i> -муурола-3,5-диен	23,71	<0,2	0,5
21	<i>цис</i> -муурола-4(14),5-диен	24,10	<0,2	<0,2
22	β -неокловен	24,30	<0,2	<0,2
23	<i>транс</i> -кадина-1(6),4-диен	24,46	<0,2	0,9
24	γ -мууролен	24,56	<0,2	9,5
25	Гермакрен Д	24,69	<0,2	11,1
26	Бициклосесквифелландрен	25,03	0,2	0,7
27	γ -аморфен	25,10	0,3	3,9
28	δ -аморфен	25,49	<0,2	2,4
29	γ -кадинен	25,69	<0,2	10,0
30	δ -кадинен	26,05	0,2	17,6

Выводы

1. Предложена эффективная методика количественного определения групп моно- и сесквитерпенов, предполагающая использование одного из веществ определяемой группы в качестве внутреннего стандарта для определения остальных, с коэффициентом пересчета, принимаемым равным единице.

2. Определены метрологические характеристики представленной методики, проведена апробация на образцах эфирного масла, полученного из древесной зелени хвойных растений Сибирского региона.

Список литературы

1. Журкович И.К., Мильман Б.Л. Общая характеристика современных методик анализа. Пример масс-спектрометрии и хромато-масс-спектрометрии // Журнал аналитической химии. 2009. Т. 64, №10. С. 1012–1021.
2. Ткачев А.В. Исследование летучих веществ растений. Новосибирск, 2008. 969 с.

Поступило в редакцию 26 января 2013 г.

После переработки 13 марта 2013 г.

Narchuganov A.N., Efremov A.A. * QUANTITATIVE DETERMINATION OF TWO GROUPS OF TERPENS BY GC-MS METHOD

Siberian Federal University, st. Svobodnyi, 79, Krasnoyarsk, 660041 (Russia), e-mail: AEfremov@sfu-kras.ru

In this work was presented a method of analysis of plant materials for the quantitative determination of 10 monoterpenes and 20 sesquiterpenes using GC-MS. For determination of quantity of monoterpenes was used the α -pinene as an analytical standard, and for determination of sesquiterpenes – the γ -cadinene. Also, in this work was shown results of the analysis of the essential oils, made from green wood of coniferous plants of Siberia.

Keywords: terpenes, essential oil, quantitative determination, GC-MS, *Juniperus Sibirica*, *Pinus Sibirica*.

References

1. Zhurkovich I.K., Mil'man B.L. *Zhurnal analiticheskoi khimii*, 2009, vol. 64, no. 10, pp. 1012–1021. (in Russ.).
2. Tkachev A.V. *Issledovanie letuchikh veshchestv rastenii*. [The study of plant volatiles]. Novosibirsk, 2008, 969 p. (in Russ.).

Received January 26, 2013

Revised March 13, 2013

* Corresponding author.