

*У статті наведено дослідження умов проведення газохроматографічного аналізу ефірних олій на капілярних колонках з максимальним поділом терпенових вуглеводнів і кисневмісних компонентів. Під час розроблення методик підібрано нерухомі фази, обрано газ-носії і його швидкість, температури нагріву колонок, детектора, інжектора. Розроблені методики можуть бути використані для вивчення складу ефірних олій як ефіроолійних культур, так і пряно-ароматичних рослин нової селекції*

*Ключові слова: ефірна олія, нерухома фаза, терпенові вуглеводні, кисневмісні компоненти, газохроматографічний аналіз*

*В статье приведены исследования условий проведения газохроматографического анализа эфирных масел на капиллярных колонках с максимальным разделением терпеновых углеводородов и кислородсодержащих компонентов. При разработке методик подобраны неподвижные фазы, выбран газ-носитель и его скорость, температуры нагрева колонок, детектора, инжектора. Разработанные методики могут быть использованы для изучения состава эфирных масел как эфиромасличных культур, так и пряно-ароматических растений новой селекции*

*Ключевые слова: эфирное масло, неподвижная фаза, терпеновые углеводороды, кислородсодержащие компоненты, газохроматографический анализ*

# РАЗРАБОТКА МЕТОДИК КАПИЛЛЯРНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ ТЕРПЕНОВЫХ УГЛЕВОДОРОДОВ И КИСЛОРОД- СОДЕРЖАЩИХ КОМПОНЕНТОВ ЭФИРНЫХ МАСЕЛ

**Н. Э. Фролова**

Кандидат технических наук, доцент

Кафедра технологии оздоровительных продуктов\*

E-mail: nef1956@mail.ru

**Е. М. Усатюк**

Ассистент

Кафедра молекулярной и  
авангардной гастрономии\*

E-mail: lленаusatiuk@gmail.com

\*Национальный университет пищевых технологий  
ул. Владимирская, 68, г. Киев, Украина, 01601

## 1. Введение

Эфирные масла (essential oils) – сложные смеси органических соединений, состоящие, в основном, из

терпенов и их кислородсодержащих производных – терпеноидов [1].

Всестороннее развитие в современной методологии изучения состава сложных смесей органических

веществ получили инструментальные методы, направленные на применение двумерной газовой хроматографии (GC×GC) [2], ядерного магнитного резонанса (ЯМР), ольфактометрии [3] масс-спектрологии [4], а также хроматографии и капиллярного электрофореза [5].

Практика хроматографического изучения многокомпонентного состава эфирных масел (ЭМ) существенно сложнее, чем анализ распространенных в природе смесей органических соединений [6], что и предопределяет необходимость оптимизации условий проведения такого анализа, регулирования селективности, эффективности хроматографической системы [7].

Разработка оптимальных условий хроматографического анализа ЭМ ставит целый ряд теоретических и практических задач, связанных с разработкой специальных методов, конкретизированных под изучаемые объекты, с учетом специфики их состава, физических характеристик, чувствительности к изменениям условий эксперимента [8].

Кроме всего сказанного, разработка новых методик анализа природных носителей аромата и их применение для решения проблем замены синтетических аналогов способствуют развитию пищевой науки.

---

## 2. Анализ литературных данных и постановка проблемы

---

Публикации по теории газохроматографического анализа природных летучих фракций в большей мере сосредоточены в химических, медицинских журналах [9, 10]. В меньшей мере изучение носителей аромата, особенно природного происхождения представлено в журналах пищевой науки. При этом, анализ библиографии научных статей в области хроматографического изучения ЭМ показал, что большинство публикаций относятся к области усовершенствований инструментального комплекса проведения анализа [11, 12], нежели к научным исследованиям развития методологии хроматографического анализа, в том числе с учетом различий в свойствах терпенов и терпеноидов.

Известно, что основой газохроматографической методики является колонка с неподвижной фазой (НФ), селективной к компонентам смеси. При исследовании ЭМ выбор НФ усложняется многокомпонентностью веществ, входящих в его состав и принадлежностью их к различным классам [5]. Определение зависимости между химическим строением вещества и его коэффициентом распределения между фазами позволяет предсказать хроматографическое поведение компонентов масла, добиться максимального их разделения [13]. Кроме этого, эффективность хроматографического разделения зависит и от рабочих параметров процесса [14].

При этом анализ существующих методик хроматографического анализа эфирных масел [15, 16] показал, что даже после адаптации методик к имеющемуся в лаборатории оборудованию полученные данные компонентного состава ЭМ не соответствовали уровню точности и достоверности поставленных задач. Так, при одинаковых условиях хроматографирования терпенов и их многочисленных кислородсодержащих

производных отмечалось неполное разделение компонентов, наложение пиков, маскировка одних пиков другими.

В статье [17] указывается, что в составе ЭМ лимона находится ~96 % терпеновых углеводородов и только 4 % кислородсодержащих соединений, которые придают ЭМ характерный аромат. На хроматограмме ЭМ эти вещества полностью маскируются большим пиком основного компонента.

Регулирование селективности хроматографической колонки для терпенов и терпеноидов подбором эффективной НФ и условий хроматографирования наряду с известными методами регулирования позволит значительно повысить качество разделения различных групп компонентов, их идентификацию и количественное определение. Наличие такой информации способствует пониманию природы аромата эфирного масла, вариантов его использования как природных ароматизаторов, а так же для проверки на подлинность.

---

## 3. Цель и задачи исследования

---

Цель работы: разработка двух методик капиллярной хроматографии – для анализа терпеновых углеводородов ЭМ с обоснованием выбора неполярной НФ, а также методики изучения состава кислородсодержащих соединений с использованием полярной НФ. Данные, полученные на обеих колонках, фактически обеспечивают 100 % идентификацию состава ЭМ.

Для достижения поставленной цели необходимо решить такие задачи:

- 1) выбрать ЭМ в качестве объекта исследования;
- 2) исследовать качественный и количественный состав ЭМ;
- 3) выбрать НФ для эффективного разделения терпеновых углеводородов и кислородсодержащих компонентов ЭМ;
- 4) установить условия хроматографического анализа;
- 5) оценить эффективность газохроматографического разделения ЭМ.

---

## 4. Хроматографические методы анализа и оборудование

---

В исследованиях использовалось модельный образец ЭМ кориандра. Это масло в своем составе содержит как терпены, так и терпеноиды, распространенные в ЭМ других растений.

Анализ проводили на хроматографе «Хром-41». Образец ЭМ микрошприцем фирмы «Hamilton» вводили в испаритель хроматографа [18].

ЭМ кориандра исследовалось на хромато-масс-спектрометре «HP 5985 A Series» (Хьюлетт – Паккард, США) с целью точной идентификации компонентов, а также их массовых соотношений.

Точность результатов газохроматографического анализа обеспечивалась пятикратной повторяемостью опытов. Метрологическая оценка измерений осуществлялась системой обработки результатов модели МХ-Е «Хьюлетт-Паккард».

Таблица 1

Для препаративного выделения чистых компонентов были приняты следующие условия: размер колонки – стальная спиральная трубка 500x10 см (внутренний диаметр). Твердый носитель: хромсорб А (30/40 меш). НФ полиэтиленгликоль адипинат-20 %. Температура: инжектора – 180 °С, термостата – 100...180 °С с программированием температуры. Газ-носитель: гелий – 50...100 см<sup>3</sup>/мин. Детектор: катарометр 170 мА. Размер пробы: 0,7..1,0 см<sup>3</sup>. Температура распределительного устройства ловушки веществ поддерживалась в пределах 170...180 °С. Приемщик фракций погружали в сосуд Дьюара со смесью сухого льда с ацетоном [19].

Для идентификация  $\alpha$ -пинена, линалола гераниола, камфоры, геранилацетата, линалилацетата была использована ИК-спектроскопия. Для снятия ИК-спектров выделенные компоненты растворялись в четыреххлористом углеводе.

Для получения ИК-спектров нами использовался двухлучевой инфракрасный спектрофотометр UR-20 в области 700...1200 см<sup>-1</sup> с оптикой и кюветами NaCl. Исследуемый образец в виде 10 %-го раствора помещался в измерительную кювету с толщиной слоя 0,1 мм.

## 5. Результаты исследований и их обсуждение

Эффективность газохроматографического разделения оценивается двумя факторами: эффективностью колонки и эффективностью НФ. Эффективность колонки зависит от ее конструкции (капиллярная или насадочная), от условий проведения анализа, к которым относят температурные режимы и расходы газовых потоков. Эффективность НФ зависит от полярности, как компонентов смеси, так и НФ. Разделение неполярных веществ на неполярных НФ происходит по температурам кипения. В связи с этим для первой методики подбирались селективная капиллярная колонка с НФ, на которой неполярные терпеновые углеводороды ЭМ разделялись по температурам кипения.

Для исследования состава терпеноидов, которые проявляют электронно-донорные свойства, выбиралась капиллярная колонка с полярной НФ с циклическим строением молекулы, сходным с терпеноидами.

К основным характеристикам НФ относятся: химическая формула; максимально допустимая рабочая температура; вязкость; полярность по Роршнайдеру; полярность по Мак-Рейнольдсу.

Для разделения неполярных терпеновых углеводородов ЭМ по температурам кипения изучались НФ низкой и средней полярностью, которые относятся к классам В1, В2, С4, D1 по системе НФ Nawkes'a. Это такие НФ:

- HP-5MS (crossliness 5 % PH ME siloxane) Film Thickness: 0,25 mm,
- length 30 m, phase ratio 250, column ID 0,25 mm; (Хьюлетт-Паккард);
- OV/0/ 50 m × 0,25 mm × 0,2 mkm;
- SE – 30 150 m × 0,25 mm × 0,2 mkm.

Условия хроматографирования представлены в табл. 1, 2.

Расход газов, см<sup>3</sup>/мин

Газ-носитель, азот			Водород	Воздух
через колонку	на сбросе с инжектора	на продувку детектора		
1,2	120	29,5	30	430

Таблица 2

Температурные режимы, °С

Термостат колонок	Инжектор	Детектор
начальная температура, °С – 60	200	200
конечная температура, °С – 180	–	–
программирование температуры, °С/хв – 6	–	–

Результаты хроматографирования ЭМ кориандра подтверждают высокую способность колонок с НФ-5MS (Хьюлетт-Паккард) и OV-0 к разделению терпенов. При этом колонка HP 5MS (120 тыс. теоретических тарелок) имела более высокие показатели разделения, однако хроматографический анализ длится значительное время (35...40 мин). Использование капиллярной колонки OV-0 менее результативно, однако обеспечивает сокращение времени анализа в два раза, что немаловажно для серийных анализов смесей ароматических веществ с известным качественным составом.

Поэтому в методике была использована НФ-5MS, с характеристиками, приведенными в табл. 3.

Таблица 3

Характеристики НФ HP-5MS

Показатель	Значение
НФ	HP-5MS
Класс за системой Nawkes'a	В.2
Допустимая рабочая температура, °С	300
Полярность за Роршнайдера	4
Геометрические размеры (d/L)	0,25 мм/30м

Оптимальную температуру колонки определили экспериментальным путем с учетом температурного максимума НФ HP-5MS.

Объем пробы определяли с учетом возможной потери эффективности не более 10 %. Перегрузка колонки приводит не только к потере эффективности, и к искажению формы пика, но и сдвигу времен удерживания, что недопустимо в капиллярной хроматографии.

Свойства НФ определяют и оптимальный диапазон скоростей газов. Легкие газы-носители (водород, гелий) лучше применять для колонок с малым содержанием НФ, которые работают с высокими скоростями потока для быстрых аналитических разделений. Тяжелые газы-носители (азот, аргон) наиболее пригодны для колонок с высоким содержанием НФ, которые работают с оптимальной скоростью потока в препаративном режиме.

Для установления оптимального газа-носителя было проведено серию экспериментов на выбранной колонке с определением ее эффективности по лимонену (температура термостата колонки 120 °С).

На рис. 1 представлено изменение значения ВЭТТ (*height equivalent to a theoretical plate, HETP*) при использовании различных газов-носителей.

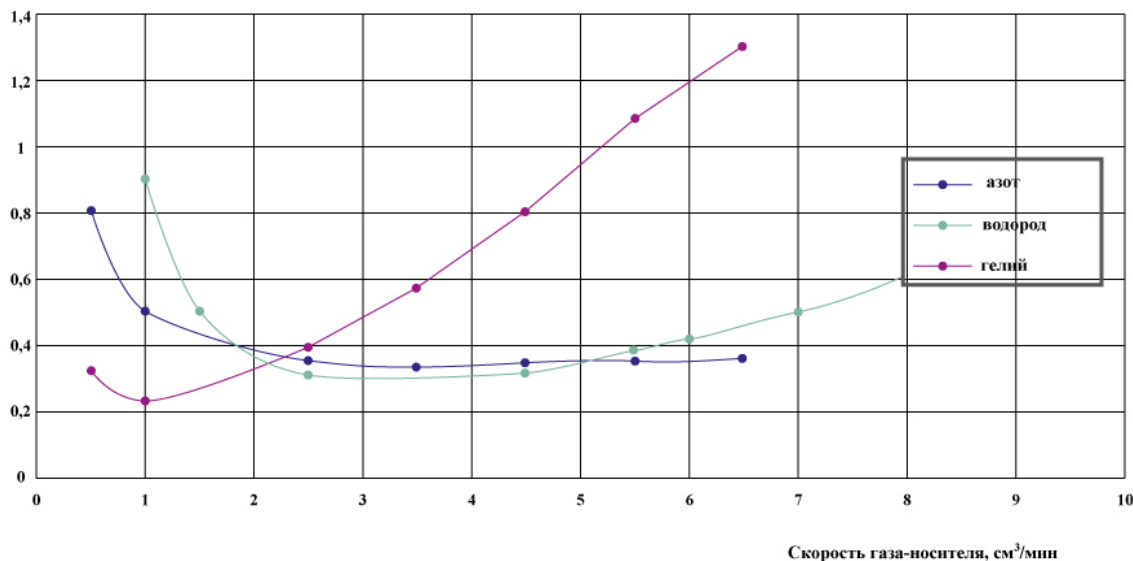


Рис. 1. Значения ВЭТТ при использовании различных газов-носителей

Полученные зависимости определили гелий в качестве газа-носителя.

В разработке методик исследовались интервалы расхода гелия через колонку, на сбросе из инжектора; гелия, водорода и воздуха на продувку детектора. Рациональные значения расходов водорода и воздуха зависят от типа детектора и являются стандартными величинами. Для пламенно-ионизационного детектора расход водорода составляет 33 см³/мин, воздуха – 330 см³/мин.

Рациональный расход гелия устанавливали экспериментально по зависимости с величиной ВЭТТ. При этом достаточное значение расхода гелия соответствует минимальному значению ВЭТТ. Значения расхода газовых потоков приведено в табл. 4.

Устанавливались также температурные режимы инжектора, термостата колонки, детектора. При выборе эффективных значений температур инжектора, детектора руководствовались температурами кипения ароматических компонентов ЭМ, при выборе температурных интервалов колонки руководствовались значениями температур кипения ароматических компонентов и максимально допустимых значениях выбранных НФ.

Проведенные исследования позволили установить рабочие параметры проведения хроматографического анализа разделения терпеновых углеводов на неполярной капиллярной колонке, приведенные в табл. 4.

На рис. 2 изображено хроматограмму разделения терпеновых углеводов ЭМ кориандра.

При разработке методики разделения терпеноидов ЭМ кориандра исследовались капиллярные колонки с полярной НФ:

- Grosslinked 5 % Ph Me Silikone (ultraPerformance) 25 m x 0,2 mm;

- HP-20M (Carbowax 20M.) 130 m x 0.53 mm x 1.33 m ilm thickness.

Экспериментально была подтверждена высокая эффективность разделения кислородсодержащих компонентов ЭМ с применением капиллярной колонки Carbowax 20M. Характеристики колонки приведены в табл. 5.

Таблица 4

Основные условия методики капиллярной хроматографии терпеновых углеводов ЭМ

Параметры	Значение
Колонка	капиллярная HP-5MS (crossliness 5 % PH ME siloxane) Film Thickness: 0,25 mm, length 30 m, phase ratio 250, column ID 0,25 mm
Газ-носитель	гелий
Расход гелия, см³/мин	
через колонку,	1,0
на сбросе из инжектора	100
на продув детектора	29,5
Расход газа, см³/мин,	
водорода	30
воздуха	330
Детектор	пламенно-ионизационный форсунка внутреннего диаметра – 0,25 мм
Температурные режимы, °С:	
термостата колонок	
начальная	100
конечная	250
скорость нагрева	6
детектора	250
инжектора	230
Объем образца	0.2 мкл.

Таблица 5

Характеристика полярной капиллярной колонки Carbowax 20M (ПЕГ 20M)

Показатель	Значение
НФ	Carbowax 20M
Класс за системой Nawkes'a	B.2
Допустимая рабочая температура, °С	300
Полярность за Роршнайдера	4
Геометрические размеры (d/L)	0,25 мм/30 м

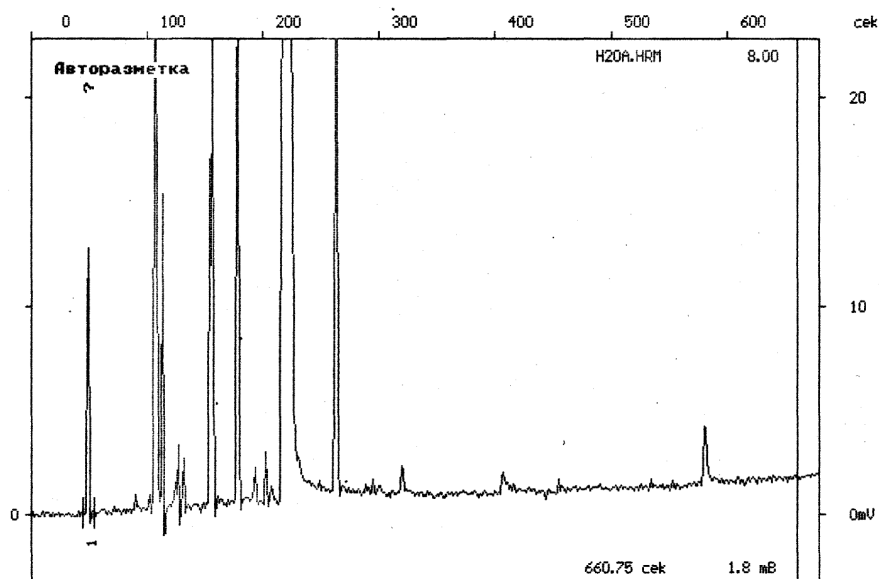


Рис. 2. Хроматограмма ЭМ кориандра на неполярной колонке HP-5MS

Разработанные параметры хроматографического анализа приведены в табл. 6.

Таблица 6

Основные условия газохроматографического анализа кислородсодержащих компонентов ЭМ

Параметры	Значение
Колонка	капиллярная Carbowax 20 M, длина 50 м, вн. диаметр 0,25 мм
Газ-носитель	гелий
Расход гелия, см <sup>3</sup> /мин	
через колонку,	1,2
на сбросе из инжектора	120
на продув детектора	29,5
Расход газа, см <sup>3</sup> /мин	
водорода	30
воздуха	300
Детектор	пламенно-ионизационный форсунка внутреннего диаметра– 0,25 мм
Температурные режимы, °С: термостата колонок	
начальная	120
конечная	180
скорость нагрева	6
детектора	250
инжектора	180
Объем образца	0.2 мкл.

На рис. 3 приведена хроматограмма ЭМ кориандра, полученную с использованием полярной капиллярной колонке Carbowax 20M при установленных условиях анализа.

Полученные хроматограммы были использованы для исследования компонентного состава проб ЭМ кориандра. Идентификацию  $\alpha$ -пинена, линалоола, гераниола, камфоры, геранилацетат, линалилацетат проводили по образцам чистых веществ полученных

препаративной газожидкостной хроматографией. Использовали метод подсадки образцов чистых веществ с контролем совпадения пиков.

Идентификацию других компонентов ЭМ кориандра проводили по относительному времени удержания исследуемого и стандартного вещества модельной смеси. За стандартное вещество использовали  $\alpha$ -пинен. Этот компонент содержится в большинстве ЭМ. Относительное время содержание находили по формуле:

$$\Gamma = t_{R2} / t_{R1}$$

где  $\Gamma$  – относительное время удержания;  $t_{R1}$  – время удержания исследуемого вещества ЭМ;  $t_{R2}$  – время удержания  $\alpha$ -пинена

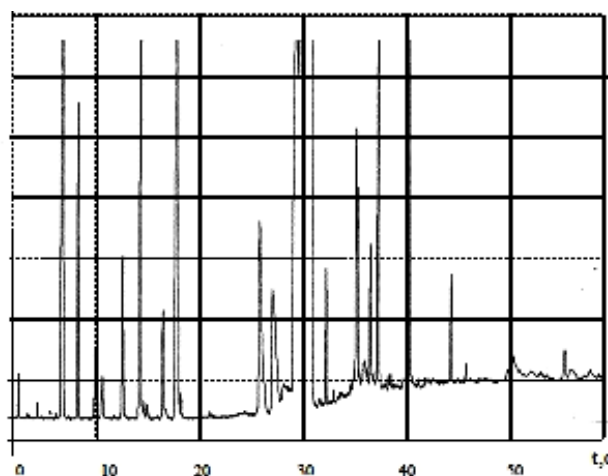


Рис. 3. Хроматограмма ЭМ кориандра на капиллярной колонке с полярной НФ Carbowax 20M

Обработка полученных хроматограмм методом внутренней нормализации позволила определить массовые соотношения компонентов ЭМ кориандра. Используются массовые коэффициенты чувствительности к компонентам ЭМ для пламенно-ионизационного детектора.

Объединенные данные, полученные с использованием разработанных методик, представлены в табл. 7.

Таблица 7

Компонентный состав ЭМ кориандра

Название компонента	Содержание в ЭМ, %	Название компонента	Содержание в ЭМ, %
$\alpha$ -пинен	7,04	линалоол	67,3
камфен	1,3	d-камфора	2,9
мирцен	2,49	линалилацетат	0,22
лимонен	3,13	l-борнеол	0,13
цинеол	10,56	$\alpha$ -терпинеол	0,32
$\beta$ -феллалдрен	0,25	гераниол	1,42

Данные, полученные с помощью двух хроматографических методик, фактически обеспечивают 100 % идентификацию состава ЭМ за счет максимального разделения терпеновых углеводородов и кислородсодержащих компонентов.

## 6. Выводы

1. Разработаны две газохроматографические методики исследования, позволяющие максимально разделить терпеновые углеводороды и кислородсодержащие компоненты эфирных масел.

2. В методике разделения терпеновых углеводородов использована капиллярная колонка HP-5MS (crossliness 5 % PHME siloxane) Film Thickness: 0,25 mm, length 30 m, phase ratio 250, column ID 0,25 mm с неполярной НФ. Определены температурные режимы, °С: термостата колонок – 100, детектора – 250; инжектора – 220.

3. В методике разделения кислородсодержащих ароматических компонентов ЭМ использована капиллярная колонка Carbowax 20M с полярной НФ. Температурные режимы, °С: термостата колонок – начальная 60, конечная – 180; детектора – 200; инжектора – 200.

4. Данные, полученные на обеих колонках, фактически обеспечивают 100 % идентификацию состава ЭМ. Определение массовых соотношений компонентов ЭМ кориандра осуществляется методом внутренней нормализации. Полученные данные с суммарной погрешностью  $\delta=15\%$ , при  $r=0,95$  представлены в таблице компонентного состава ЭМ кориандра.

## Благодарности

Посвящается 130-летию Национального университета пищевых технологий.

## Литература

1. Гуринович, Л. Эфирные масла: химия, технология, анализ, применение [Текст] / Л. Гуринович, Т. Пучкова. – М.: Школа косметических химиков, 2005. – 190 с.
2. Special Issue: Proceedings of the 40th International Symposium on Essential Oils (ISEO) [Text] / Savigliano (Italy). – 2010. – Vol. 25, Issue 3. – P. 111.
3. Marriott, P. J. Emerging Opportunities for Flavor Analysis through Hyphenated Gas Chromatography [Text] / P. J. Marriott, T. E. Graham, J.-P. Dufour // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2009. – Vol. 57, Issue 21. – P. 9962–9971. doi: 10.1021/jf9013845
4. Шайдуллина, Г. М. Хромато-масс-спектрометрический анализ при производстве ароматобразующих композиций с использованием эфирных масел мяты [Текст] / Г. М. Шайдуллина // Пищевая промышленность. – 2005. – № 5. – С. 16–19.
5. Бёккер, Ю. Хроматография. Инструментальная аналитика: методы хроматографии и капиллярного электрофореза [Текст] / Ю. Бёккер. – М.: Техносфера, 2009. – 472 с.
6. Арутюнов, Ю. И. Газохроматографический анализ смесей, содержащих неизвестные компоненты [Текст] / Ю. И. Арутюнов, С. Ю. Кудряшов, Л. А. Онучак, И. А. Платонов // Вестник СамГУ. – 2005. – Вып. 5. – С. 137–162.
7. Ташлицкий, В. Н. Разработка хроматографического метода разделения сложных смесей [Текст] / В. Н. Ташлицкий, Д. А. Царев, Э. М. Казьмина // ACD/AutoChrom. – 2013. – № 1(2). – С. 38–42.
8. Franz, C. M. Essential oil research: past, present and future [Text] / C. M. Franz // Flavour and Fragrance Journal. – 2010. – Vol. 25, Issue 3. – P. 112–113.
9. Bicchì, C. Quantitative analysis of essential oils: a complex task [Text] / C. Bicchì et al. // Flavour and Fragrance Journal. – 2008. – Vol. 23, Issue 6. – P. 382–391. doi: 10.1002/ffj.1905
10. Bicchì, C. New trends in the analysis of the volatile fraction of matrices of vegetable origin: a short overview. A review [Text] / C. Bicchì et al. // Flavour and Fragrance Journal. – 2011. – Vol. 26, Issue 5. – P. 321–325.
11. Rubiolo, P. Analysis of the plant volatile fraction. Part 3 [Text] / P. Rubiolo et al. – The Chemistry and Biology of Volatiles. – 2010. – P. 49–93. doi: 10.1002/9780470669532.ch3
12. Gong, F. I. Determination of volatile components in ginger using gas chromatography-mass spectrometry with resolution improved by data processing techniques [Text] / F. I. Gong, Y. S. Fung, Y. Z. Liang // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2004. – Vol. 52, Issue 21. – P. 6378–6383. doi: 10.1021/jf040102z
13. Smelcerovic, A. Recent Advances in Analysis of Essential Oils [Text] / A. Smelcerovic // Current Analytical Chemistry. – 2013. – Vol. 9, Issue 1. – P. 61–70. doi: 10.2174/15734110130109
14. Cicchetti, E. Quantitation in gas chromatography: usual practices and performances of a response factor database [Text] / E. Cicchetti, P. Merle, A. Chaintreau // Flavour and Fragrance Journal. – 2008. – Vol. 23, Issue 6. – P. 450–459. doi: 10.1002/ffj.1906
15. Туркельтауб, Г. Н. Хроматография: учебное пособие [Текст] / Г. Н. Туркельтауб, А. А. Ищенко. – М.: МИТХТ, 2011. – 67 с.
16. Доля, В. С. Особенности химического состава видов рода SALVIA L. [Текст] / В. С. Доля, С. Д. Тржецинский, В. И. Мозуль, Н. И. Третьяк // Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики. – 2013. – № 3 (13). – С. 83–85.
17. Коваленко, Н. А. Динамика накопления и компонентный состав эфирных масел некоторых видов рода Salvia L. [Текст] / Н. А. Коваленко и др. // Труды Белорусского государственного университета. – 2010. – Т. 5, Ч. 2. – С. 27–33.
18. Фролова, Н. Идентификация компонентов эфирных масел в режиме выделения препарата [Текст] / Н. Фролова, В. Усенко, И. Мацко // Пищевая промышленность. – 2005. – № 4. – С. 79–82.
19. Фролова, Н. Э. Исследование выделения ароматических компонентов эфирных масел препаративной хроматографией [Электронный ресурс] / Н. Э. Фролова, Н. В. Чепель, К. А. Науменко, Е. М. Усатюк // Научный журнал СПб НИУИТМО. Санкт-Петербург: СПб НИУИТМО, 2013. – № 1. – Режим доступа: <http://processes.open-mechanics.com/articles/708.pdf>