

УДК 547.913:543.2

## МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ И АНАЛИЗА ЭФИРНЫХ МАСЕЛ

**Д.И. ПИСАРЕВ**  
**О.О. НОВИКОВ**

*Белгородский государственный  
национальный исследовательский  
университет*

*e-mail: pisarev@bsu.edu.ru*

В результате проведенного обзора установлено, что основным методом анализа эфирных масел является использование газожидкостной хроматографии с масс-спектрометрической детекцией. В качестве способа ионизации наиболее оптимален электронный удар, позволяющий по характеру образовавшихся осколочных ионов надежно охарактеризовать структуру анализируемых компонентов.

Ключевые слова: эфирные масла, хромато-масс-спектрометрия, ионизация.

Эфирномасличная флора насчитывает около 3000 видов растений, большая часть которых приходится на сухие субтропики. Промышленное значение имеют 150-200 эфирных масел, используемых в косметике, парфюмерии, пищевой и фармацевтической промышленности [1].

Эфирные масла содержатся в растениях, как правило, в небольших количествах – 0,01-1,0%, хотя встречаются виды, содержащие до 10,0% и даже 20-22% (бутоны гвоздики). Первым шагом, предшествующим анализу эфирных масел, является их выделение. Обычными методами выделения эфирных масел из природных источников для последующего анализа являются: перегонка с водяным паром, экстракция, концентрирование на твердых сорбентах и криоловушках, анфлераж [2, 3].

Для выделения эфирных масел из растительного материала наиболее широко используют перегонку с водяным паром. В фармакопее XI издания приводятся 4 метода выделения эфирных масел из растительного материала с помощью гидродистилляции. В этих методах используют стеклянные приборы различной конструкции, позволяющие с точностью до  $\pm 0,02$  мл измерить объём выделенного масла [4].

На выход и состав эфирного масла влияют подготовка растительного сырья и продолжительность перегонки. Кроме того, имеют значение температура и давление пара. При перегонке с перегретым паром продолжительность процесса сокращается и обеспечивается наиболее полный выход масла, поэтому многие из лабораторных методов определения содержания эфирных масел страдают неточностью и несовместимостью с производственными принципами переработки растительного сырья.

Преимущество метода гидродистилляции – возможность получения эфирного масла в чистом виде, недостаток – разложение термолабильных компонентов эфирного масла и различные химические превращения под воздействием высоких температур.

Существует комбинированный метод выделения эфирных масел с помощью сочетания перегонки с паром и экстракции их из дистиллята органическими соединениями.

Другим методом выделения и концентрирования эфирных масел является улавливание летучих веществ сорбентами (тенакс, полисорб) или криоловушками. Этот метод удобен в тех случаях, когда необходимо исследовать легколетучие вещества в газовых образцах. Определённый объём газа, содержащего летучие вещества, пропускают через трубку с сорбентом или капилляр, охлаждаемый жидким азотом. После этого с помощью быстрого нагревания до 200-250°C сорбента или криоловушки в токе газа-носителя эфирные масла переводятся в колонку хроматографа. Эта процедура связана с риском разложения и изомеризации лабильных соединений.

Экстракцию эфирных масел проводят в тех случаях, когда их компоненты термолабильны и подвергаются деструкции при перегонке с водяным паром. Экстракцию проводят органическими растворителями с низкими температурами кипения (эфир петролейный, эфир диэтиловый, ацетон и др.). Часто экстракцию осуществляют в течение определённого времени (иногда до нескольких суток) в аппарате типа Сокслета. Полученный экстракт концентрируют упариванием в токе инертного газа или пони-



женном давлении при низких температурах. К преимуществам этого метода можно отнести возможность выделения из образца термолабильных и малолетучих соединений, к недостаткам – необходимость концентрирования извлечения (может привести к потерям легколетучих веществ), возможность загрязнения испарителя колонки газового хроматографа нелетучими соединениями и продуктами их разложения.

Анфлеражом извлекают эфирные масла, содержащиеся в очень малых количествах в сырье (цветки розы, ландыша и др.).

Выжимание – способ, применимый к сырью, богатому эфирным маслом, заключенным в крупных вместилищах. Этот метод разработан для добывания масла из кожуры плодов цитрусовых – лимонов, апельсинов, померанцев, бергамотов; полученные эфирные масла имеют более высокое качество, чем добытые перегонкой [2].

Главной особенностью анализа большинства эфирных масел и терпеновых соединений как их составных частей является то, что в растениях они чаще всего встречаются в составе сложных смесей, насчитывающих до нескольких десятков индивидуальных веществ, находящихся в широком диапазоне концентраций.

Подлинность эфирных масел устанавливают по их физико-химическим свойствам. Определяют цвет, запах, вкус, плотность, удельное вращение, показатель преломления, растворимость в спирте, кислотное и эфирное число, состав действующих веществ [5].

Плотность эфирных масел колеблется в пределах 0,69-1,188. Угол вращения плоскости поляризации отражает состав оптически активных веществ, а так как эфирные масла представляют собой смесь оптически активных веществ, то угол вращения плоскости поляризации – это сумма углов вращения, входящих в смесь ингредиентов, свидетельствует о качестве эфирного масла. Растворимость эфирного масла в спирте (96% или 70%) даёт представление о его подлинности и качестве. Большинство углеводов плохо растворимо в спирте, особенно в разведённом. Отклонение от норм растворимости служит критерием недоброкачества эфирного масла.

Для установления качественных характеристик эфирных масел определяют кислотное, эфирное число (до и после ацетилирования). Количество свободных спиртов в эфирных маслах устанавливают путём ацетилирования и определения эфирного числа (до и после ацетилирования) [2, 5].

На начальных этапах эфирные масла изучали так называемыми классическими методами: определялись физические свойства (плотность, угол вращения поляризованного света, показатель преломления, температуры замерзания, плавления, кипения) и химические показатели (эфирное и кислотное число, эфирное число после ацетилирования). Количество главных компонентов эфирных масел определяли химическими методами (ацетилирование спиртов, омыление эфиров, экстракция фенолов водными растворами щелочей). Для изучения качественного состава эфирных масел их подвергали фракционированию с помощью групповых химических реакций или перегонки с целью выделения индивидуальных соединений, которые идентифицировали по температурам их кристаллических производных и характерным химическим реакциям.

Период 1940-1960 гг. характеризуется введением в анализ эфирных масел новых физико-химических методов разделения и анализа: хроматографии – тонкослойной, бумажной, колоночной и газожидкостной для разделения смесей терпеновых соединений с использованием спектроскопических методов (УФ-, ИК-, ЯМР-спектроскопии, рентгеноструктурного метода).

Тонкослойная и бумажная хроматография сыграли большую роль в исследовании смесей терпенов. Эти методы позволяют проводить качественное и полуколичественное определение основных компонентов. Для разделения эфирных масел методом тонкослойной хроматографии в качестве сорбента чаще используют силикагель и алюминия оксид. Подвижной фазой при разделении служат н-гексан, бензол, хлороформ, их смеси с этилацетатом, эфиром петролейным. Спирты можно разделять в смеси спирта метилового и воды (7:3) на слоях, обработанных парафином или маслом силиконовым. Карбонильные соединения разделяют в системах, содержащих этилаце-

тат: этилацетат – н-гексан (3:17), этилацетат – хлороформ (1:9), этилацетат – бензол (3:17). Детектирование проводят облучением хроматограмм в УФ-свете или с помощью реагентов-проявителей (кислота серная 50%, иногда с добавлением ванилина или альдегида анисового, сурьма (III) хлорид, кислота фосфорномолибденовая). Недостатками метода являются большая длительность анализа, малая эффективность разделения, невозможность точного количественного определения компонентов смеси [2, 6, 7].

Применение спектроскопических методов (УФ-, ИК-, ЯМР-спектроскопии) возможно только после выделения терпеноидов в индивидуальном виде из эфирных масел. Их использование в настоящее время оправдано чаще всего для установления структуры впервые выделенных веществ [8].

Ультрафиолетовая спектроскопия иногда используется для определения наличия и характера сопряжения химической связи в структурах терпеноидов. Эмпирические правила, предложенные Вудвордом и видоизменённые Физером, позволяют предсказывать положение максимума полосы поглощения с высокой интенсивностью в таких системах, как сопряжённые диены, триены, кетоны. Положение максимума поглощения определяется природой основного хромофора и степенью его замещения.

Инфракрасная спектроскопия существенно дополняет УФ-спектроскопию. Для химии терпенов наиболее важны два участка спектра. Полосы поглощения в области приблизительно  $3650-2650\text{ см}^{-1}$  (не считая колебаний С-Н) в случае терпеноидов почти всегда характерны для колебаний связей О-Н. При правильной интерпретации полосы поглощения в этой области могут служить доказательством наличия гидроксидной или родственной ей групп. Поглощение во втором и более важном участке спектра (приблизительно  $1820-1640\text{ см}^{-1}$ ), если оно достаточно интенсивное, обычно отвечает колебаниям С=О. По положению максимума поглощения в этой области можно определить, является ли соединение насыщенным или сопряжённым эфиром, альдегидом, кетоном, кислотой, лактоном или ангидридом. Важными, но менее общими являются данные по поглощению в других участках спектра. Так, слабая полоса поглощения в области  $3050\text{ см}^{-1}$  свидетельствует о наличии метиленовой группы в циклопропановом кольце.

Ранее использование метода ядерно-магнитного резонанса в химии терпенов ограничивалось применением протонного резонанса (ПМР), который применялся для установления структур некоторых соединений, например,  $\phi$ -сантонина. В настоящее время ПМР широко применяется для установления структур терпеноидов [5, 9].

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) ограничено применяется при анализе эфирных масел, что связано, во-первых, с невысокой эффективностью хроматографических колонок, не применимых для разделения многокомпонентных смесей близких по свойствам веществ, и, во-вторых, с большой селективностью чаще всего применяемых УФ-спектрометрических детекторов. ВЭЖХ иногда применяют для предварительного фракционирования образцов. Однако важным преимуществом ВЭЖХ является возможность анализа малолетучих и термолабильных соединений [10].

Газожидкостная хроматография (ГЖХ) очень широко используется для изучения сложных смесей терпеновых соединений. Это обусловлено следующим: терпеноиды имеют температуры кипения от  $150$  до  $350^\circ\text{C}$  и достаточное парциальное давление для проведения анализа этим методом; ГЖХ в настоящее время является наиболее эффективным методом разделения сложных смесей, она может использоваться в сочетании со спектроскопическими методами идентификации. Для анализа смесей терпенов используют различные неподвижные жидкие фазы широкого диапазона полярности – от неполярных (SE-30, OV-101) до полярных (карбовакс 20 М). На колонках с неполярными неподвижными фазами соединения элюируются в соответствии с их температурами кипения: сначала монотерпены, далее сескви-, ди- и тритерпены. Кислородсодержащие соединения удерживаются дольше, чем соответствующие углеводороды. Анализ смесей терпеновых соединений осуществляется как на набивных, так и на капиллярных колонках. Так как капиллярные колонки более эффективно разделяют смеси, то тенденция к их применению постепенно возрастает. Чувствительность мето-



да ГЖХ определяется типом используемого детектора. Для проведения хроматографии с помощью микрошприца в испаритель хроматографа вводят небольшую пробу (0,001 мкл) эфирного масла и испаряют при температуре 250°C. Под действием постоянно протекающего через эту трубку газа-носителя (обычно гелия, водорода или азота) эфирное масло в виде пара движется по трубке. Одновременно температура колонки повышается от 50°C до 220°C со скоростью 3-4 градуса/мин. Внутренняя поверхность трубки (колонки) покрыта тонким слоем (0,25 микрон) нейтральной жидкости полимерной природы (жидкая фаза, имеющая свое кодовое название, например, SE-30 или Carbowax 20M, отражающее хроматографические свойства фазы). Компоненты эфирного масла имеют различное адсорбционное сродство к жидкой фазе, из-за чего скорость продвижения вдоль колонки веществ, составляющих эфирное масло, различна. В результате компоненты выходят из колонки в виде отдельных веществ. Обычное время анализа эфирного масла – не более 30-40 мин. В современных методиках отдельное вещество может выходить в течение 3-7 секунд. Таким образом, за время анализа можно обнаружить сотни веществ. Эти вещества различными методами детектируются. Основным методом обнаружения веществ, выходящих из колонки, является ионизационно-пламенное детектирование. С этой целью выходной конец колонки вставляется в детектор, представляющий собой тонкое сопло с непрерывно горящим пламенем водорода. Поступающие в пламя вещества ионизируются под действием высокой температуры и обнаруживаются по появлению этих ионов. Количество ионов пропорционально количеству вещества в пламени. В результате проведения хроматографического анализа получают хроматограмму в виде пиков. Размеры пика указывают на количество вещества в пробе. Количественные соотношения (обычно в виде процентного соотношения) рассчитываются автоматически с помощью компьютера [2, 11-13].

Обычным методом анализа легколетучих и ограниченно летучих терпеноидов (моно-, сескви-, дитерпенов) является газожидкостная хроматография. Хотя газожидкостной хроматографией возможно с очень высокой эффективностью разделять сложные смеси летучих органических соединений, однако, к сожалению, она даёт недостаточно информации о строении веществ. К тому же идентификация терпеноидов, основанная только на данных ГЖХ-удерживания, является весьма ненадёжной. Поэтому необходимым оказался детектор, который может с большей степенью вероятности идентифицировать вещества на выходе из газохроматографической колонки. Наиболее приемлемым детектором для этого является масс-спектрометр, так как он удовлетворяет важнейшим характеристикам метода газожидкостной хроматографии – скорости и чувствительности метода. К тому же масс-спектрометрия даёт уникальную информацию об исследуемом веществе и может быть использована для идентификации веществ и изучения их строения [2, 12, 14-17].

В настоящее время основными методами изучения эфирных масел является сочетание газожидкостной хроматографии и масс-спектрометрии, которые не требуют предварительного выделения индивидуальных веществ и наличия их характеристики, полученной другими спектральными методами [8].

При идентификации компонентов методом хромато-масс-спектрометрии выходящие из колонки вещества не попадают в горящее пламя водорода, а направляются в поток электронов, имеющих стандартную энергию (70 эВ). Но перед вводом газовой смеси в масс-детектор из неё удаляется как можно больше газа-носителя, ибо масс-спектрометр работает при низком давлении. Для его удаления смесь газа-носителя и образца поступает в молекулярный сепаратор, состоящий из соединённых между собой двух ступеней. Каждая ступень состоит из вакуумной камеры и двух сопел. В сепараторе происходит откачка молекул газа-носителя как более лёгких, в то время как более тяжёлые молекулы испытуемого образца остаются в сепараторе. Попав в масс-спектрометр, молекулы образца подвергаются электронной бомбардировке. При этом молекула теряет один электрон. Если энергия бомбардирующих электронов больше, чем энергия ионизации, то возникающий положительный ион будет обладать избытком энергии. Эта энергия вызывает распад молекулярного иона. Распад идёт по многим направлениям, и в ионном источнике образуется ряд ионов с различными масса-

ми, заряд и количество которых в стандартных условиях для каждого вещества является постоянным и уникальным. Терпеноиды под воздействием электронных ударов испытывают фрагментацию, приводящую в основном к одинаковым по массовым числам ионам ( $m/z$ ), характеризующимся относительной интенсивностью ( $I_{\text{отн.}}$ ) пиков. Такое положение в масс-спектрах монотерпенов вызвано отсутствием места локализации заряда в молекулярном пике ионов ( $M^+$ ), что предполагает смещение двойной связи в цикле в более энергетически выгодное положение, что приводит к усреднённой его структуре, из которой осуществляется фрагментация. По другим представлениям, различия в интенсивности основных осколочных ионов у изомерных монотерпенов вызваны перестройкой первоначального углеводородного скелета молекулы, что требует определённых энергетических затрат и может протекать за время, большее для стереоизомеров, чем «время жизни»  $M^+$  [14-20].

Используя базы данных (*NIST*, *WILEY-275*), содержащие масс-спектры электронной ионизации, можно с высокой точностью идентифицировать анализируемые компоненты.

Качество получаемого масс-спектра зависит от продолжительности времени сканирования интервала масс. Для хромато-масс-анализа наиболее предпочтительны приборы, обладающие возможностью быстрого сканирования, что позволяет получать достоверные масс-спектры соединений. Этому требованию отвечают квадрупольные масс-спектрометры, которые наиболее широко используются для анализа эфирных масел.

Термостабильность терпеноидов предъявляет особые требования к масс-спектрометрической части хромато-масс-спектрометра. В частности, требуется инертность переходных линий между хроматографом и ионным источником масс-спектрометра. Кварцевые капиллярные колонки, введённые через интерфейс непосредственно в ионный источник, в основном решают эту проблему [2].

### Резюме

Таким образом, представленные данные позволяют утверждать, что до сих пор основным методом анализа терпеноидов остаётся использование гибридного метода – хромато-масс-спектрометрии, а именно газожидкостной хроматографии с масс-спектрометрической детекцией. В качестве способа ионизации наиболее оптимален электронный удар, позволяющий по характеру образовавшихся осколочных ионов надёжно охарактеризовать структуру анализируемых компонентов. Поэтому актуальность использования данного подхода может заключаться только в анализе малоисследованных объектов.

### Литература

1. Зюков, Д.Г. Технология и оборудование эфирномасличного производства / Д.Г. Зюков, Е.Н. Андреевич, А.П. Чипига. – М. : Пищ. пром-сть, 1979. – 190 с.
2. Сур, С.В. Методы выделения, идентификации и определения терпеновых соединений / С.В. Сур // Раст. ресурсы. – 1990. – Т. 26, вып. 1. – С. 42-50.
3. Технология натуральных эфирных масел и синтетических душистых веществ / И.И. Сидоров [и др.]. – М. : Легкая и пищ. пром-сть, 1984. – 368 с.
4. Государственная фармакопея СССР: Вып. 1. Общие методы анализа / МЗ СССР. – 11-е изд., доп. – М. : Медицина, 1987. – 334 с.
5. Горяев, М.И. Методы исследования эфирных масел / М.И. Горяев, И. Плива. – Алма-Ата : Изд-во АН Каз. ССР, 1962. – 739 с.
6. Растительные лекарственные средства / под ред. Н.П. Максютинной. – Киев : Здоров'я, 1985. – 102 с.
7. Хроматография в тонких слоях / под ред. Э. Штала. – М. : Химия, 1965 – 508 с.
8. Зенкевич, И.Г. Аналитические параметры компонентов эфирных масел для их хроматографической и хромато-масс-спектрометрической идентификации. Моно- и сесквитерпеновые углеводороды / И.Г. Зенкевич // Раст. ресурсы. – 1996. – Т. 32, вып. 1-2. – С. 45-58.
9. Де Майо, П. Терпеноиды растений / П. Де Майо. – М. : Изд-во иностранной литературы, 1963. – 494 с.
10. Зенкевич, И.Г. Некоторые особенности количественного анализа компонентов эфирных масел в высокоэффективной жидкостной хроматографии / И.Г. Зенкевич, В.М. Косман, К.Г. Ткаченко // Раст. ресурсы. – 1999. – Вып. 1. – С. 128-136.



11. Баффингтон, Р. Детекторы для газовой хроматографии : пер. с нем. / Р. Баффингтон, М. Уилсо. – М. : Мир, 1993. – 80 с.
12. Идентификация органических соединений : пер. с англ. / Р. Шрайнер [и др.]. – М. : Мир, 1983. – 704 с.
13. Booth, A.V. Examination of savin oil / A.V. Booth // Amer. Perfumer Aromat. – 1957. – Vol. 69. – P. 45-48.
14. Василенко, И.А. Физические методы анализа в биотехнологии, биологии, медицине / И.А. Василенко // Рос. хим. журн. – 1994. – №1. – С. 81-85.
15. Джонстон, Р. Руководство по масс-спектрометрии для химиков-органиков / Р. Джонстон : пер. с англ. – М. : Мир, 1975. – 236 с.
16. Карасек, Ф. Введение в хромато-масс-спектрометрию : пер. с англ. / Ф. Карасек, Р. Клемент – М. : Мир, 1993. – 237 с.
17. Новые физические и физико-химические методы исследования органических соединений / Б.В. Иоффе [и др.]. – Л. : Изд-во Ленингр. ун-та, 1984. – 240 с.
18. Клюев, Н.А. Использование масс-спектрометрии в структурном анализе компонентов эфирных масел / Н.А. Клюев, В.А. Замуреенко, Н.С. Евтушенко // Фармация. – 1987. – № 5. – С. 69-75.
19. Клюев, Н.А. Применение хромато-масс-спектрометрии для определения компонентного состава эфирных масел / Н.А. Клюев, В.А. Замуреенко, Н.С. Евтушенко // Фармация. – 1986. – № 5. – С. 70-76.
20. Полякова, А.А. Молекулярный масс-спектральный анализ органических соединений / А.А. Полякова. – М. : Химия, 1983. – 248 с.

## METHODS OF ISOLATION AND ANALYSIS OF ESSENTIAL OILS

**D.I. PISAREV**  
**O.O. NOVIKOV**

*Belgorod National Research University*

*e-mail: pisarev@bsu.edu.ru*

The review proved that the primary method of analysis of essential oils is the use of gas-liquid chromatography with mass spectrometric detection. As a method of ionization the electron impact is viewed as optimal, which allows to characterize the structure of the analyzed components reliably regarding the nature of fragmented ions formed.

Ke words: essential oils, gas chromatography-mass spectrometry, ionization.