

УДК 547.913:543

## ГЖХ-МС МЕТОД АНАЛИЗА ЭФИРНЫХ МАСЕЛ

В. А. ЗАМУРЕНКО, Л. Б. ДМИТРИЕВ, Н. А. КЛЮЕВ, И. И. ГРАНДБЕРГ

(Кафедра органической химии)

В настоящее время потребности парфюмерно-косметической, медицинской и пищевой промышленности в эфирных маслах (ЭМ) удовлетворяются далеко не полностью. Рост объема производства ЭМ не может быть достигнут только за счет увеличения посевных площадей под эфиромасличными культурами, поскольку последние выращиваются, как правило, на лучших землях в зонах с наиболее благоприятными климатическими условиями, в частности в субтропиках. Важным резервом увеличения производства ЭМ являются интродукция новых эфирносонов, выведение и внедрение новых высокоурожайных сортов, рациональное размещение эфиромасличных культур в тех или иных природно-климатических зонах страны [11]. С ростом спроса на ЭМ повышаются требования к их качеству и ассортименту, которые определяются компонентным составом. Вовлечение в производство новых эфиромасличных растений и селекция новых сортов связаны с применением объективных экспрессных методов определения состава ЭМ. Их роль особенно важна при современных методах селекции, поскольку в данном случае показателем урожая зеленой массы или даже масляности не могут быть критериями оценки положительных качеств новых гибридов.

Разделение и концентрация компонентов ЭМ традиционными методами с последующей их идентификацией химическими или физико-химическими методами весьма трудоемки, требуют значительных затрат времени [3, 12, 22]. Использование для указанных целей метода ГЖХ также недостаточно эффективно, так как необходимо значительное количество стандартов (эталонных) мало доступных индивидуальных соединений — компонентов ЭМ.

Применение ГЖХ-масс-спектропии (ГЖХ-МС) существенно упрощает идентификацию компонентов ЭМ, при этом обеспечиваются высокие воспроизводимость и чувствительность ( $10^{-12}$  г), а возможность использования для автоматизации управления процессами хроматографического и масс-спектрометрического анализов и обработки результатов разнообразных средств вычислительной техники (микро- и мини-ЭВМ) позволяет получать точные результаты и затрачивать минимальное время.

В советском Союзе метод ГЖХ-МС практически не используется при решении задач, связанных с расшифровкой состава

ЭМ; за рубежом он является основным [15, 17]. В нашу задачу входила разработка методики ГЖХ-МС применительно к анализу ЭМ, которая исключала бы обязательное использование образцов-эталонных компонентов ЭМ и основывалась бы на литературных масс-спектрометрических характеристиках этих соединений.

Большинство работ, в которых используются ГЖХ-МС-ЭВМ методы анализа ЭМ, проводятся путем сравнения полученных МС с идентичными, что трудоемко и требует, как уже отмечалось, большого количества стандартов, или на основании сопоставления опубликованных масс-спектров [15, 17]. В последнем случае достоверность результатов, особенно при работе с ЭВМ, зависит от правильности выбора критериев сравнения масс-спектров.

Результаты анализов ЭМ с помощью названных способов вполне удовлетворительны, но однозначность отнесения не всегда достигается. Японские исследователи [21] указывают, что корректная идентификация терпеноидов ЭМ возможна только в случае совместной интерпретации данных МС, ИК- и ЯМР-спектропии.

Нам представлялось, что наиболее перспективной является разработка схемы идентификации, включающей для сравнения масс-спектров отношения интенсивностей специфических осколочных ионов ( $I_i/I_j$ ). Данный критерий сравнения и привлечение хроматографических характеристик позволяют проводить анализ ЭМ в достаточно короткий срок, на основании литературных данных и без применения ЭВМ.

На первом этапе работы проводили сравнительную оценку воспроизводимости масс-спектров в режиме ГЖХ-МС на одном приборе в течение длительного времени и на разных типах масс-спектрометров с единым способом ионизации (электронный удар) [7]. В первом случае относительная ошибка измерений интенсивностей по всем пикам ионов в масс-спектрах не превышала 5% (относительных), во втором — 15%. Кроме того, было установлено, что при найденных значениях воспроизводимости идентификацию любого монотерпенового углеводорода можно осуществлять по набору ограниченного числа сигналов (пиков) специфических ионов, а в качестве критериев сравнения масс-спектров использовать отношения интенсивностей пиков этих ионов.

Состав эфирного масла непеты лимонной

Порядковый номер соединения на хроматограмме	Соединение	Время удерживания, мин	Содержание в ЭМ, %	Порядковый номер соединения на хроматограмме	Соединение	Время удерживания, мин	Содержание в ЭМ, %
1	Строение не установлено	0,4	0,2	16	Монотерпеновый альдегид	13,0	0,1
2	Муравьиная кислота	0,5	0,5	17	Цитронеллаль	14,1	0,4
3	Октадиен-2,4-аль	0,9	Следы	18	Монотерпеновый альдегид	15,1	0,4
4	$\alpha$ -Пинен	1,2	»	19	Линалоол	16,4	Следы
5	$\beta$ -Пинен	2,1	0,5	20	Кариофиллен	17,5	2,4
6	Собинен	2,3	0,1	23	Гумулен	20,4	0,1
7	Лимонен	3,8	0,1	24	$\beta$ -Цитраль	21,1	7,0
8	транс- $\beta$ -Оцимен	4,7	Следы	25	Геранилформиат	22,5	0,1
9	цис- $\beta$ -Оцимен	5,2	0,3	26	$\alpha$ -Цитраль	23,1	9,0
10	2-Метилгептен-2-он-6	7,8	0,3	27	Монотерпенол	24,2	0,2
11	Строение не установлено	8,4	Следы	28	Цитронеллол	24,9	15,8
12	Монотерпеновый альдегид	10,5	»	29	Нерол	26,2	27,5
13	Строение не установлено	11,0	»	30	Гераниол	28,0	27,8
14	Октен-4-ол-3	12,3	»	31	Непета лактон	32,8	0,6
15	Монотерпеновый альдегид	12,8	»				

Эффективность метода проверяли на изомерных монотерпеновых углеводородах с молекулярной массой 136. Аналогичные результаты получены и для соединений ряда монотерпеноидов, сесквитерпенов и сесквитерпеноидов [7, 23].

С целью установления возможности применения этой методики при анализе конкретных ЭМ был изучен состав хорошо известных масел *Mentha piperita* [8], *Pelargonium roseum* [7], розового масла и др. В мяте перечной было идентифицировано 28 основных компонентов, составляющих 99,1% общей массы масла; в ЭМ герани розовой — 42 компонента (92,2%) и розовом масле — 13 компонентов (96,4%).

Экспериментальные МС имели хорошую воспроизводимость и совпадали, в пределах ошибки, с литературными данными. Более того, при ГЖХ-МС исследовании указанных масел обнаружены компоненты, ранее не описанные в литературе в качестве ингредиентов ЭМ изучавшихся образцов, но содержащиеся в ЭМ растений других видов этих родов. Так, в ЭМ герани розовой, изучавшемся ранее с применением методов ГЖХ и классических методов [2], было идентифицировано, кроме кислот и их производных, лишь 13 компонентов. Остальные компоненты, обнаруженные нами, ранее были описаны как составляющие ЭМ герани видов *P. capitatum* Ait., *P. Radula* L'Herit. [2], *P. species* и др., что позволяет предположить участие этих видов в формировании гибридов герани розовой.

При ГЖХ-МС методе анализа ЭМ так же, как в случае ГМХ метода, важны

выбор неподвижной жидкой фазы (НФ) для хроматографических колонок и полнота разделения компонентов смесей. В наших исследованиях в обоих случаях лучшие результаты получены на капиллярных колонках с различными типами НФ. В ГЖХ-МС применение этих колонок особенно предпочтительно, так как размывание хроматографических пиков, часто имеющее место при использовании набивных колонок, может приводить к появлению большого числа фоновых сигналов фрагментных ионов в МС, что сильно затрудняет их интерпретацию, а порой делает ее невозможной.

Однако метод ГЖХ-МС при наложении хроматографических сигналов (полное или частичное неразделение компонентов) позволяет надежно регистрировать такие случаи по характеру МС, а иногда и идентифицировать не разделяющиеся в данных условиях ГЖХ компоненты. Последнее возможно потому, что в период выхода из колонки смеси компонентов (регистрируемых как один хроматографический пик) снимается несколько МС. Путем их сравнения и взаимного вычитания можно восстановить первоначальный характер МС индивидуальных соединений.

Обнаружить все компоненты ЭМ, особенно минорного характера, при использовании одной хроматографической колонки нелегко прежде всего из-за того, что микрокомпоненты ЭМ маскируются наложением на них пиков основных соединений ЭМ. ГЖХ-МС метод позволяет легко перейти на ГЖХ колонку с НФ другой полярности, поскольку идентификация компонентов смеси с новым порядком выхо-

Т а б л и ц а 2  
Состав эфирного масла лопанта анисового

Соединение	Время удерживания, мин	Содержание, %
Сабинен	2,3	Следы
Мирцен	3,1	0,3
α-Лимонен	3,8	5,7
Оцимен	4,7	0,1
Октанон-3	5,1	0,2
Этилгексанон	9,5	0,9
1-Октен-3-ол	12,3	0,3
Ментон	13,0	Следы
β-Бурбонен	14,4	0,1
Линалоол	15,9	Следы
цис-Кариофиллен	17,1	0,5
транс-Кариофиллен	17,4	1,2
Метилхавикол	20,4	43,7
γ-Кадинен	21,5	1,2
γ-Элемен	22,3	0,6
δ-Кадинен	23,4	Следы
Цитронеллол	24,3	0,5
Нерол	25,4	0,1
Гераниол	27,3	0,2
Метилэвгенол	33,0	43,7
Сесквитерпенол	34,0	0,1
Строение не установлено	36,1	Следы
Изо-эвгенол и эвгенол	37,5	»

да компонентов не связана с какими-либо трудностями. Так, при анализе масла герани розовой на колонке с НФ OV-1 (практически неполярный метилсилоксан)

идентификация цис- и транс-розокидов (0,3—0,1 % в смеси), нероля (0,1 %) и гераниоля (0,1 %) была затруднена из-за их плохого разделения и частичного наложения на них интенсивных пиков линалоола (7,2 %) и ментона (10,8 %). При переходе на колонку с полярной НФ — «Карбовакс-20М» — интерпретация этих соединений не представляла труда [7].

Культивируемые формы и сорта эфиромасличных культур часто бывает трудно отнести к какому-либо виду данного рода по внешним признакам. Однако хемотип, в частности состав ЭМ, могут сказать многое об их происхождении [16]. Систематическое накопление данных о составе не только основных компонентов ЭМ, что доступно с помощью различных методов исследований, но и микрокомпонентов, что реально лишь при применении ГЖХ-МС с последующим переходом при массовых сериях образцов на ГЖХ, позволяет наряду с определением происхождения данной популяции вести целенаправленную селекцию новых сортов.

Изучение состава ЭМ котовника лимонного (*Nepeta cataria* var *citriodora* Ball. (табл. 1) [9] показало, что по хемотипу ЭМ интродуцируемая Сухумской опытной станцией ЭМК разновидность близка к виду *N. citriodora* и сильно отличается от *N. cataria* и других видов рода *Nepeta* [19, 20]. Это подтверждается данными о высоком содержании в ЭМ спиртов и альдегидов терпенового ряда, а также характером минорных компонентов.

Аналогичные данные о ЭМ лопанта анисового (*Agastache foeniculum*) (табл. 2) [10] указывают на его дальнейшее родство

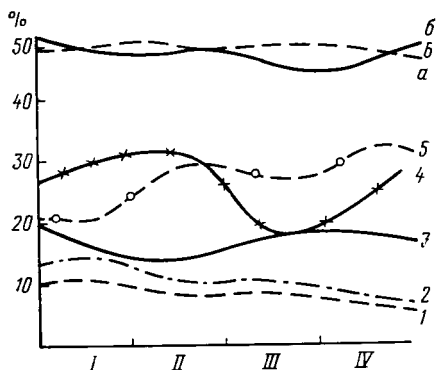
Т а б л и ц а 3

Сравнительный состав ЭМ базиликов

Соединение	O. gratissimum *				O. basilicum	
	сорт		технический образец			
	Юбилейный	Келасури	из Вьетнама	из Швеции	Sweet	Exotic
Лимонен	Следы	Следы	Следы	0,4	2,0—10	0,5—3,0
1,8-Цинеол	»	0,2	»	Следы	3,0—6,0	0,1—0,4
цис-β-Оцимен	6—12	14—16	5—10	6,5	0,1—2,0	0,2—1,0
транс-β-Оци мен	0,2—1,0	10—12	0,3—0,5	Следы		0,2—1,0
Δ <sup>3</sup> -Карен				11,0	0,1	0,2—0,5
Линалоол	0,3—0,5	0,5—0,7	0,1—0,2	0,6	10—60	1—5
Камфора					2,0—4,0	Следы
Метилхавикол					10—60	70—90
Эвгенол	60—65	30—35	65—70	65	5—20	1,0—5,0
α-Кубебен	1,7—2,9	3,0—3,9	1,2—1,5	0,2	Следы	Следы
α-Копаен	0,2—0,5	0,4—0,5	0,3—0,7	1,3	0,5—0,8	0,1—0,2
β-Бурбонен	0,2—0,9	0,9—1,5	0,3—1,0	0,2	0,7—0,8	0,1—0,2
β-Бисаболен					5,0—10	
β-Кариофиллен	3,5—5,3	4,0—4,5	4,5—6,5	2,0	0,8—1,0	Следы
β-Кубебен	0,3	0,1	0,1—0,3	0,1	—	«
α-Гомулен	Следы					0,2
γ-Мюрелен						0,2
α-Кариофиллен	0,3	0,2	0,2—0,5	0,4	0,5—1,0	Следы
Гермакрен-Д**	10—15	12—15	10—12	5—6	Следы	0,1
Δ-Гуйен					»	0,1
δ-Кадинен	1,3—1,6	2,0—2,1	0,7—1,1	0,9	»	

\* «Легкое» масло.

\*\* Предположительно.



Изменение состава ЭМ *N. cataria* var *citriodora*.

I — начало вегетации; II — фаза бутонизации; III — цветения; V — созревания семян. 1 — β-цитраль, 2 — α-цитраль, 3 — цитронеллол, 4 — гераниол, 5 — нерол, 6 — суммарное количество цитралей и нерола (а), цитронеллола и гераниола (б).

с *A. rugosa* [13]. В ЭМ этих видов присутствуют линалоол и в значительном количестве метилхавикол, которые не обнаружены в видах *A. mexicana* [18], *A. forsanianum* [14] и других, в то же время не найдены 1-изоментон и пулегон, характерные для последних. Кроме того, высокое содержание метилэвгенола, не обнаруженное в ЭМ других видов, а также характер распределения микрокомпонентов указывают на самостоятельность существования данного вида.

Сравнение литературных данных и результатов исследования промышленных образцов ЭМ базиликов эвгенольного направления (табл. 3) подтверждает предположение [16] о их происхождении от вида *Ocimum gratissimum* L., как и базиликов тимольного направления; в то время как базилики европейского, экзотического, метилэвгенольного типа ЭМ происходят от *O. basilifum* L. Об этом свидетельствует не только присутствие основных компонентов в ЭМ и их соотношение, но и, пожалуй, в большей степени состав сесквитерпенового компонента.

Детальное изучение состава ЭМ лопуха анисового, котовника лимонного, а также эльшольции Патрена позволило уста-

новить динамику накопления отдельных компонентов ЭМ по фазам вегетации, определить состав ЭМ в различных органах растений, а также проследить изменения, происходящие с ЭМ при различных сроках хранения растительного сырья до переработки [4—6]. При массовых анализах использовался метод ГЖХ, в случаях появления на хроматограммах каких-либо новых компонентов — еще и ГЖХ-МС.

Применение в сочетании этих двух методов позволило в сравнительно короткий срок получить объективные данные об изменении состава ЭМ и установить характер связей между отдельными его компонентами, что дало возможность судить о направлении биохимических превращений в растениях. Так, при анализе характера изменения содержания отдельных компонентов в ЭМ неперты [4] была выявлена генетическая связь между гераниолом и цитронеллолом, с одной стороны, и неролом и α- и β-цитралями, с другой. Увеличение содержания в ЭМ гераниола на определенных этапах развития растений сопровождалось уменьшением содержания цитронеллола, и наоборот. Однако суммарное их содержание оставалось постоянным (рисунком). Аналогичная картина наблюдалась и для второй группы соединений.

Таким образом, состав ЭМ обуславливается направлением окислительно-восстановительных биохимических процессов во взаимосвязанных группах компонентов в ЭМ в различные периоды онтогенеза растений. Сходные результаты были получены и при изучении ЭМ лопуха анисового [5].

В связи с ростом применения пестицидов весьма перспективным представляется использование ГЖХ-МС для определения в ЭМ остаточных количеств этих соединений. В данном случае при использовании хроматографических предколонных анализов можно проводить без предварительного отделения основных компонентов ЭМ и концентрации микропримесей пестицидов. Идентификация соединений, особенно с нечетной молекулярной массой, к которым относятся многие галоген- и фосфорсодержащие пестициды, при этом не представляется каких-либо трудностей, даже если в объектах имеется 40—60 и более компонентов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Гогия В. Т., Иванова Л. И. Изучение эфирного масла розовой герани. — Тез. докл. на IV Междуна. Конгр. по эфирным маслам. (Тбилиси, 1968). М.: Пищевая промышленность, 1971, т. 1, с. 71. — 2. Гогия В. Т., Иванова Л. И. Исследование состава эфирного масла *Pelargonium scarpitatum* Ait. и *P. Radula* L'Herit. — Прикладная биохимия и микробиология, 1970, т. 9, вып. 1, с. 120. — 3. ГОСТ. Масла эфирные, вещества душистые и полупродукты из синтеза. Правила приемки и методы анализа. М.: Государственный комитет СССР по стандартам, 1979. — 4. Дмитриев Л. Б., Мумладзе М. Г., Эсванджия Г. А., Грандберг И. И., Якубашвили И. З. Динамика накопления и состав эфирного масла *Nepeta cataria*

1. *catia* var *citri.* в течение вегетации и при хранении сырья. — Изв. ТСХА, 1981, вып. 3, с. 75. — 5. Дмитриев Л. Б., Мумладзе М. Г., Ключев Н. А., Кобахадзе Ш. К., Грандберг И. И. Динамика накопления и состав эфирного масла *Agastache foeniculum* в течение вегетации и при хранении сырья. — Изв. ТСХА, 1981, вып. 6, с. 86—91. — 6. Дмитриев Л. Б., Ключев Н. А., Мумладзе М. Г., Замуреенко В. А., Эсванджия Г. А., Грандберг И. И. Эфирное масло эльшольции Патрена. — Изв. ТСХА, 1984, вып. 3, с. 171—175. — 7. Замуреенко В. А., Ключев Н. А., Дмитриев Л. Б., Грандберг И. И. Хромато-масс-спектрометрический метод идентификации компонентов эфирных масел. — Изв.

ТСХА, 1979, вып. 1, с. 156—162. — 8. Замуреенко В. А., Ключев Н. А., Дмитриев Л. Б., Грандберг И. И. Изучение состава эфирного масла мяты перечной (*Mentha piperita*) с использованием хромато-масс-спектрометрии. — Изв. ТСХА, 1980, вып. 1, с. 169—172. — 9. Замуреенко В. А., Ключев Н. А., Мумладзе М. Г., Дмитриев Л. Б., Грандберг И. И. Идентификация компонентов эфирного масла неветы лимонной (*Nepeta cataria* var *citriodora* Bald). — Изв. ТСХА, 1980, вып. 5, с. 167—169. — 10. Замуреенко В. А., Ключев Н. А., Мумладзе М. Г., Дмитриев Л. Б., Грандберг И. И. Исследование состава эфирного масла лопанта анисового *Lophanthus anisatus* (*Agastache foeniculum*). — Изв. ТСХА, 1980, вып. 6, с. 164—166. — 11. III симпозиум «Актуальные вопросы изучения эфиромасличных растений и эфирных масел» (Симферополь, 1980). М.: Пищевая пром-ность, 1980. — 12. *Agricultural a. Food Chemistry: past, present, future*. Ed. Terenishi R. A. VI. Publ. comp. inc., Westport, Connecticut, 1978, p. 458. — 13. Fujita Y., Fujita S. — *Nippon Kagaku Zasshi*, 1965, vol. 86(6), p. 635. — 14. Fujita S., Fujita Y. — *Yakugaku Zasshi*, 1970, vol. 90(12), p. 1514. — 15. Junk G. A. — *Int. J. Mass spectrom. Ion Phys*, 1972, v. 8(1), p. 1—71. — 16. Lawrence B. M. — *Perf. Flav.*, 1978, vol. 3(5), p. 36. — 17. Masada Y. *Analysis of essential oils by gas chromatography and mass-spectrometry*. N.—Y. etc., John Wiley a. Sons Inc., 1976. p. 334. — 18. Moreno I., Manjaver A., Mendora V. — *Parfum. Essent. Oil Record.*, 1966, vol. 57(9), p. 561. — 19. Regnier F. E., Waller G. R., Eisenbrawn E. I. — *Phytochem.*, 1967, vol. 6(9), p. 1281—1289. — 20. Regnier F. E., Eisenbrawn E. I., Waller G. R. — *Phytochem.*, 1967, vol. 6(9), p. 1271—1280. — 21. Sasaki S., Abe H., Ishida Y. — *Bull. Chem. Soc. Japan*, 1978, vol. 51(II), p. 3218. — 22. *The chemical analysis of foods*. Ed. Pearson D., Edinburgh, 1976, p. 575. — 23. Zамуреенко В. А., Ключев Н. А., Дмитриев Л. Б., Грандберг И. И. — *J. of Chromatography*, 1984, vol. 303, p. 115.

*Статья поступила 8 июня 1985 г.*

#### SUMMARY

The identification of volatile components of essential oils by GLC—MS is the basic method of this analysis. In this paper the components of the essential oils of *Nepeta*, *Agastache*, *Ocimum* ec. are identified on the basis of published data using the intensity ratio of the characteristic fragment ions in the mass spectrum as well Kovats retention indices. The method suggested permits to identify the components which are 90—99 % of essential oil.