

НАРЧУГАНОВ АНТОН НИКОЛАЕВИЧ

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ НЕКОТОРЫХ МОНО- И СЕСКВИТЕРПЕНОВ В
РАСТИТЕЛЬНОМ СЫРЬЕ И ПРОДУКТАХ ЕГО ПЕРЕРАБОТКИ
МЕТОДОМ ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ**

02.00.02 – аналитическая химия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Томск, 2013

Работа выполнена на кафедре аналитической и органической химии Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Сибирский федеральный университет»

Научный руководитель: доктор химических наук, профессор
Ефремов Александр Алексеевич

Официальные оппоненты: Ткачёв Алексей Васильевич
доктор химических наук, профессор,
Новосибирский институт органической
химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН,
заведующий лабораторией

Короткова Елена Ивановна
доктор химических наук, доцент,
Национальный исследовательский
Томский политехнический университет,
кафедра физической и аналитической
химии, профессор

Ведущая организация: Московский государственный
университет им. М.В. Ломоносова

Защита состоится 26 июня 2013 года в 14:30 часов на заседании диссертационного совета Д 212.269.04 при ФГБОУ ВПО «Национальный исследовательский Томский политехнический университет» по адресу: 634050 г. Томск, пр. Ленина, 30, ТПУ, 2 корпус, химико-технологический факультет

С диссертацией можно ознакомиться в Научно-технической библиотеке ФГБОУ ВПО «Национальный исследовательский Томский политехнический университет» по адресу: г. Томск, ул. Белинского, 55

Автореферат разослан 24 мая 2013 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета

Т.М. Гиндуллина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы.

Биологически-активные вещества (БАВ), выделяемые из растительного и животного сырья, составляют основу современной медицины. Большинство новых медицинских препаратов основано на веществах, выделяемых из природных объектов, и их доля по сравнению с полностью синтетическими препаратами неуклонно возрастает. В связи с этим, аналитическая задача, связанная с установлением качественного и количественного состава сложных смесей БАВ, выделяемых из растительного сырья, является актуальной.

Одним из основных классов БАВ, выделяемых из древесного растительного сырья, являются терпеновые соединения (терпены и терпеноиды). Для их определения чаще всего используется метод газовой хромато-масс-спектрометрии. Существующие библиотеки масс-спектральной информации позволяют экспрессно идентифицировать большинство терпеновых соединений. Кроме того, хромато-масс-спектрометрия позволяет быстро установить количественный состав с использованием метода внутренней нормировки. Однако, надёжный качественный и количественный анализ осложнён рядом факторов: во-первых, распространены ошибки идентификации, связанные с наличием большого количества изомерных терпеноидов близких по своим физико-химическим свойствам. Во-вторых, отклик масс-спектрометра на различные соединения не одинаков, что приводит к значительным погрешностям при расчёте методом внутренней нормировки. Также важно отметить, что метод внутренней нормировки даёт не абсолютные, а относительные значения концентрации того или иного компонента.

Для более точного количественного анализа терпеноидов методом хромато-масс-спектрометрии необходимо использовать метод внутреннего стандарта или метод добавок. Но в таком случае на каждое определяемое соединение необходимо иметь соответствующий стандартный образец. В вытяжках из растительного сырья может содержаться 50-100 и более компонентов, при этом промышленностью выпускается ограниченный ассортимент стандартов терпеноидов (не более 5 индивидуальных соединений). Получение стандартов терпеноидов в лаборатории также затруднено.

Таким образом, **цель данной работы** – разработка методики количественного определения не менее 30 индивидуальных терпеноидов в объектах сложного состава с улучшенными метрологическими характеристиками, без использования стандартного образца на каждое определяемое соединение.

Задачи исследования:

- 1) Подбор оптимальной методики пробоподготовки, позволяющей осуществить наиболее полное извлечение биологически активных терпеноидов из древесного растительного сырья.

- 2) Разработка методики идентификации отдельных терпеноидов в объектах сложного состава, позволяющей повысить надежность идентификации и исключить связанные с этим ошибки.
- 3) Выделение групп изомерных терпеноидов, подобранных таким образом, чтобы при количественном определении исключить необходимость использования стандартного образца на каждое определяемое вещество.
- 4) Экспериментальное определение факторов отклика для каждого из определяемых терпеноидов, разработка методики количественного определения терпеноидов и оценка её метрологических характеристик.
- 5) Разработка методики для количественного определения низких концентраций терпеноидов с использованием режима селективного ионного детектирования.
- 6) Апробация разработанных методик на реальных образцах эфирных масел, экстрактов, пробах воздуха.

Научная новизна.

- Подобраны условия для полного и воспроизводимого извлечения летучих терпеноидов из древесного и недревесного растительного сырья методом исчерпывающей гидропародистилляции.
- Впервые предложен подход к идентификации терпеноидов с использованием хроматографических и масс-спектрометрических точек идентификации, обеспечивающий надежную безошибочную идентификацию.
- Впервые предложен подход к количественному определению с использованием одного стандарта для определения нескольких терпеноидов, основанный на схожести строения и закономерностей их фрагментации, с расчётом факторов отклика для каждого индивидуального терпеноида.
- Разработан подход для количественного определения летучих монотерпенов в воздухе с применением режима селективного ионного детектирования.
- Впервые установлено абсолютное количественное содержание ряда моно- и сесквитерпенов в некоторых эфирных маслах древесных и недревесных растений.

Практическая значимость.

- Разработана методика одновременного количественного определения 30 индивидуальных терпенов в объектах сложного состава, не требующая наличия стандартных образцов на каждое определяемое соединение.
- Разработана методика количественного определения монотерпенов в воздухе при содержаниях на уровне нескольких нанограммов на литр воздуха.
- Определено количество моно- и сесквитерпенов в эфирных маслах, используемых в пищевой, фармацевтической и косметической промышленности.

- Определено количество летучих монотерпенов в воздухе, насыщенном веществами, эмитированными свежесобранной древесной зеленью.

Основные положения, выносимые на защиту:

- 1) Методика пробоподготовки древесного и недревесного растительного сырья с использованием исчерпывающей гидропародистилляции.
- 2) Подход к качественному анализу, предполагающий использование хроматографических и масс-спектрометрических точек идентификации.
- 3) Методика количественного определения 30 индивидуальных моно- и сесквитерпенов в объектах сложного состава, предполагающая использование двух стандартных образцов.
- 4) Количественное содержание ряда моно- и сесквитерпенов в эфирных маслах; экстрактах, полученных из растительного сырья; образцах воздуха, содержащих терпены, эмитированные свежесобранной древесной зеленью.

Апробация работы.

Материалы диссертации были представлены на следующих научных конференциях: Всероссийская научно-практическая конференция «Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья», Барнаул (2009); Региональная научно-практическая конференция «Химическая наука и образование Красноярья», Красноярск (2009, 2010); Международная школа-конференция студентов и молодых ученых «Экология Южной Сибири и сопредельных территорий», Абакан (2009); Международная конференция «Современные достижения в химии природных соединений и биотехнологии», Новосибирск (2010); Всероссийская конференция «Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез», Краснодар (2010); Международная конференция «Renewable Wood and Plant Resources: Chemistry, Technology, Pharmacology, Medicine», Санкт-Петербург (2011); Всероссийская с международным участием научно-практическая конференция «Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья», Барнаул (2012); Всероссийская конференция «Аналитика Сибири и Дальнего Востока», Красноярск (2012).

Публикации.

По материалам диссертации опубликовано 13 работ, в том числе 3 в изданиях, рекомендованных ВАК РФ.

Структура и объем работы.

Диссертация состоит из введения, литературного обзора, 3 глав, выводов, приложения и списка использованных литературных источников. Материалы диссертации изложены на 135 страницах, включают 36 таблиц, 26 рисунков и 2 приложения с масс-спектрами всех определяемых соединений. Список использованных источников включает 115 наименований.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность темы, научная новизна и практическая значимость, сформулированы основные положения,

выносимые на защиту. Приведены данные об апробации и публикации результатов исследования.

Глава 1. Литературный обзор. Подробно описан химический состав биологически активных веществ растений. Отмечено, что углеводороды растений, как правило, относятся к классу терпенов, а большая часть спиртов, альдегидов и кетонов – к классу терпеноидов. Терпены и терпеноиды обладают высокой биологической активностью, в том числе: антиоксидантной и противораковой активностью, иммуномодулирующим и противовоспалительным эффектом, и другими полезными свойствами.

Для выделения терпеноидов из растительного сырья чаще всего применяют экстракцию и перегонку с водяным паром. Приведены технологические тонкости каждого из указанных методов, отмечено, что выбор конкретного метода неоднозначен и определяется рядом факторов, в том числе типом сырья и его составом.

Для анализа большинства терпеноидов чаще других используется метод газовой хроматографии. Подробно рассмотрены теоретические основы метода и вопросы его практического применения при анализе растительного сырья. Сочетание газовой хроматографии и масс-спектрометрии даёт практически неограниченные возможности для качественного и полуколичественного анализа терпеноидов.

Глава 2. Экспериментальная часть. Подробно рассмотрены различные варианты выделения биологически-активных веществ из растительного сырья, проведён сравнительный анализ компонентного состава продуктов, получаемых различными методами. Указана методика подготовки проб воздуха для определения содержания в нём летучих терпеноидов.

Для определения терпеноидов использовали метод хроматомасс-спектрометрии, реализованный на газовом хроматографе Agilent 7890 А с квадрупольным масс-спектрометром Agilent 5975 С Inert MSD. Анализ вели на кварцевой капиллярной колонке HP-5ms длиной 30м и внутренним диаметром 0,25 мм, неподвижной фазой служил 5%-дифенил-95% диметилсилоксан, толщина пленки неподвижной фазы 0,25 мкм. Использовали несколько вариантов программирования температуры в зависимости от перечня определяемых соединений, общее время анализа варьировалось от 24,6 до 43,5 минут.

На рисунке 1 представлен пример, иллюстрирующий разделение определяемых терпенов: хроматограмма эфирного масла пихты сибирской.

При определении высоких концентраций моно- и сесквитерпеноидов масс-спектрометр функционировал в режиме регистрации полного ионного тока (SCAN). В данном режиме диапазон сканирования масс составил 50-500 а.е.м. Режим селективного ионного детектирования (SIM) использовали для анализа образцов, содержащих низкие количества терпеноидов. В этом режиме регистрировали одновременно 5 ионов с массами 69, 79, 91, 93, 121 а.е.м.

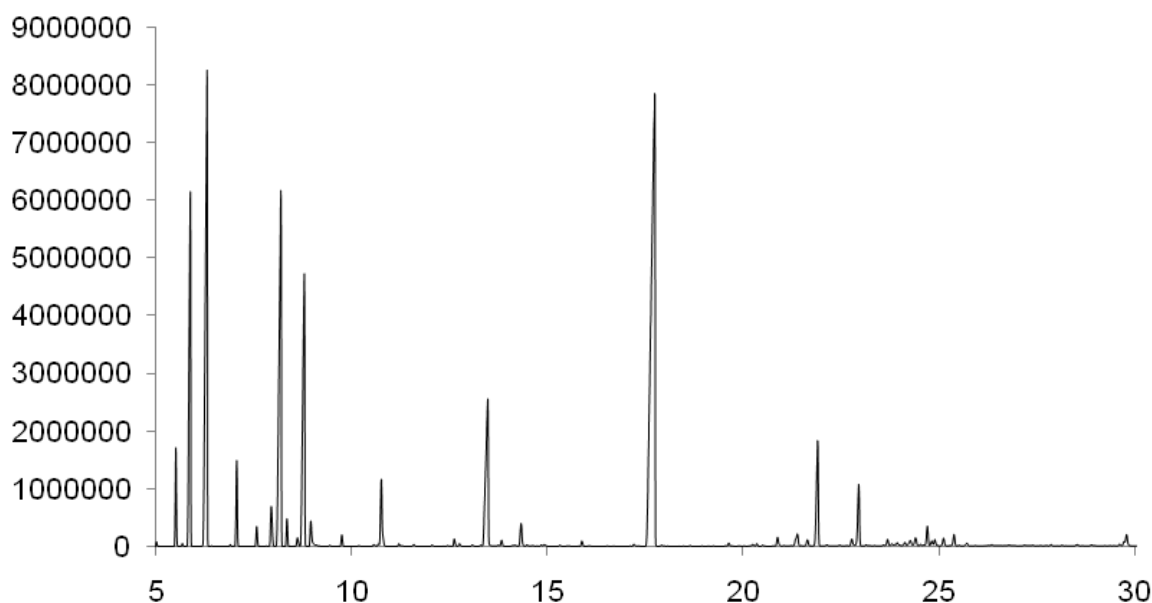
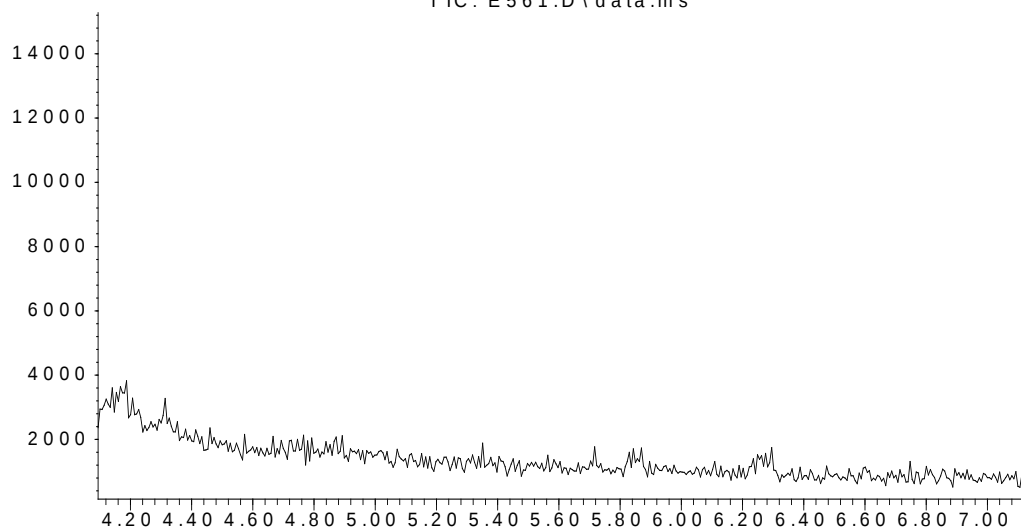


Рисунок 1. Хроматограмма эфирного масла пихты сибирской.

SIM-режим оказывается незаменим в случае анализа проб, содержащих незначительные количества терпеноидов. Примером могут служить пробы воздуха, богатого летучими монотерпенами. Вследствие низкого содержания определяемых соединений в образцах, методика, предусматривающая детектирование полного ионного тока, оказалась непригодна. На рисунках 3-4 приведены масс-хроматограмма и масс-фрагментограмма, подтверждающие этот факт.

Abundance

TIC: E561.D\data.ms



Time-->

Рисунок 3. Хроматограмма спиртового концентрата воздуха соснового бора, снятая в режиме сканирования полного ионного тока (SCAN).

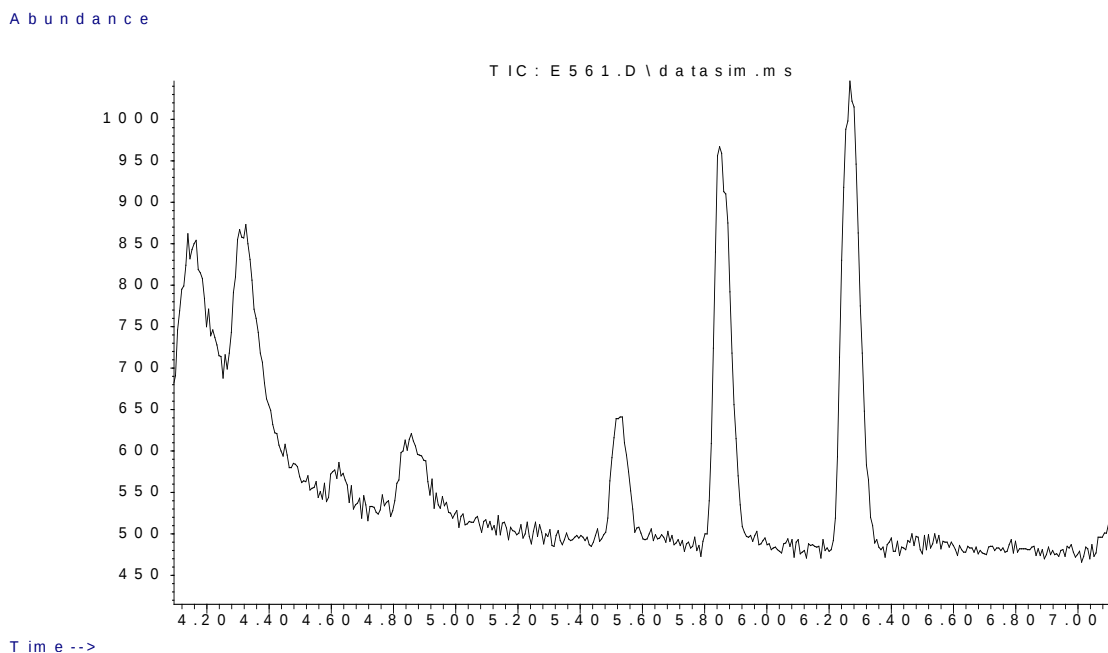


Рисунок 4. Хроматограмма спиртового концентрата воздуха соснового бора, снятая в режиме регистрации отдельных ионов (SIM).

Для идентификации сравнивали линейный индекс удерживания компонента (хроматографическая точка идентификации) и относительные интенсивности пиков ионов в полном масс-спектре компонента (масс-спектрометрические точки идентификации) с литературными данными, полученными при идентичных условиях анализа и приведёнными в библиотеках масс-спектров. Совпадение хроматографической точки идентификации предполагает, что индекс удерживания пика попадает в диапазон ± 3 единицы индекса по отношению к индексу удерживания, приведённому в литературных данных. Для определения масс-спектрометрических точек идентификации сравнивали масс-спектр анализируемого соединения с библиотечными данными. При этом интенсивности пиков как минимум четырёх ионов должны лежать в диапазоне, указанном в таблице 1 (данные значения рекомендованы решением Европейской комиссии).

Таблица 1. Допустимые интервалы отклонения интенсивности пиков от библиотечного значения в зависимости от их относительной интенсивности.

Относительная интенсивность, % от основного пика	>50%	20-50%	10-20%	<10%
Допустимые интервалы изменения интенсивности пика	$\pm 10\%$	$\pm 15\%$	$\pm 20\%$	$\pm 50\%$

Для идентификации предпочтительно выбирали ионы, относительная интенсивность которых составляла не менее 10 %. Пример идентификации представлен на рисунке 5.

Abundance

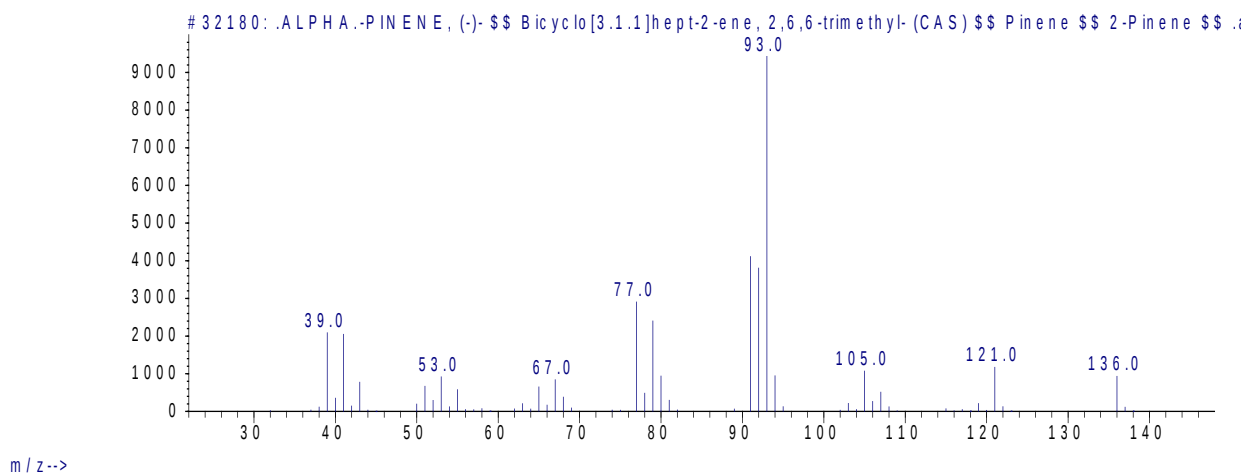
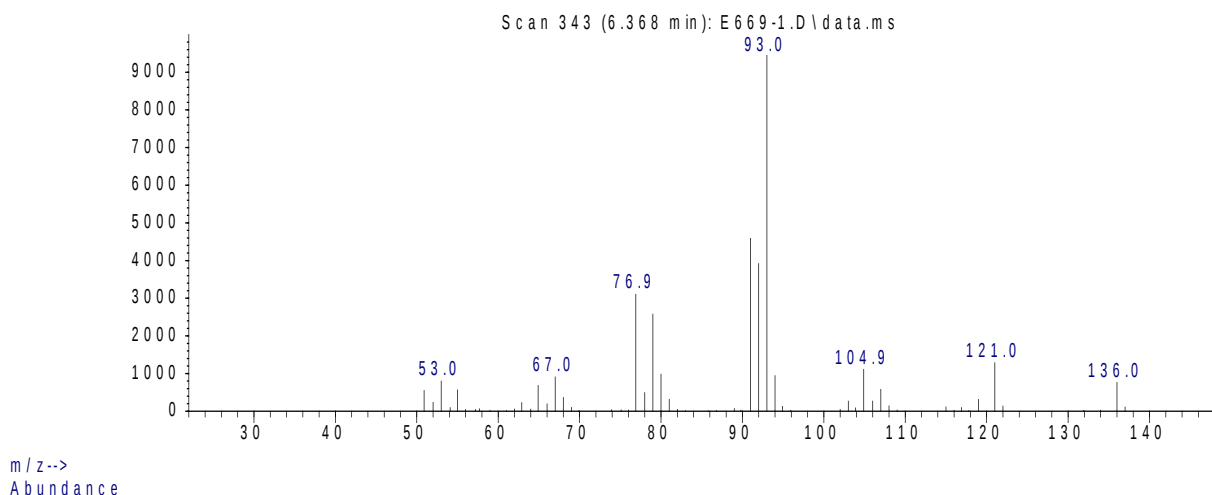


Рисунок 5. Масс-спектр α -пинена, RT = 6,4 мин, и библиотечный масс-спектр. Хроматографическая точка идентификации: RI = 933; RI_{lib}=932; Δ RI=1. Масс-спектрометрические точки идентификации: ионы с m/z= 93, 77, 105, 121, 136.

Пример разделения и идентификации моно- и сесквитерпенов в образце эфирного масла сосны сибирской приведён на рисунках 6-7.

Главной трудностью при количественном определении терпеноидов с использованием метода хромато-масс-спектрометрии является отсутствие стандартных образцов на большинство терпеноидов. В данной работе выдвинута гипотеза, что отклик масс-спектрометра на изомерные терпеновые соединения, закономерности фрагментации которых при масс-спектрометрическом детектировании одинаковы, является приблизительно равным. Это позволит использовать только один стандартный образец для количественного определения нескольких изомерных терпенов.

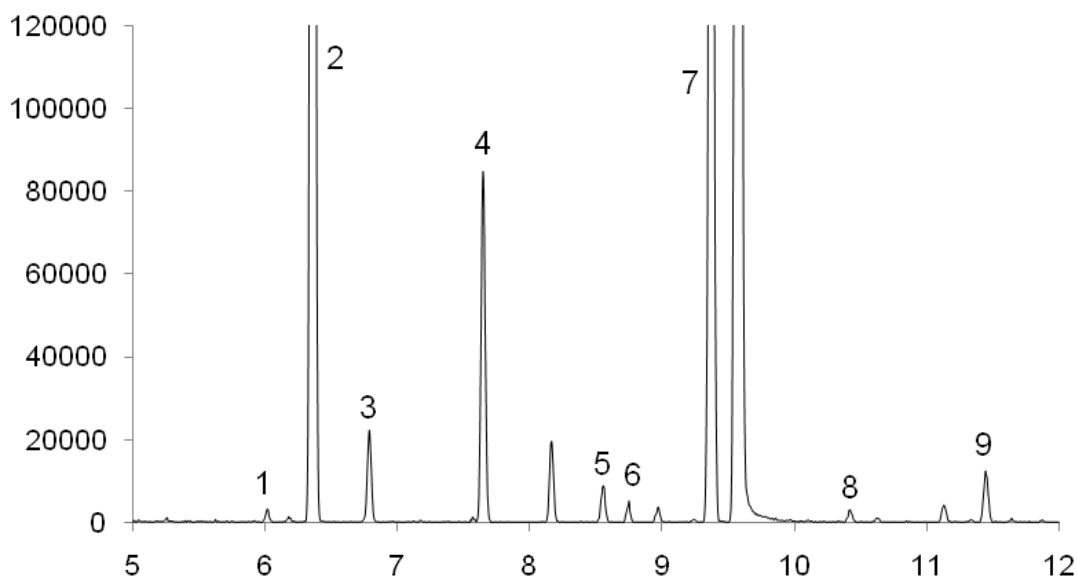


Рисунок 6. Хроматограмма тестового образца эфирного масла сосны сибирской, область монотерпенов. Цифрами обозначены: 1 – трициклен, 2 – α -пинен, 3 – камфен, 4 – β -пинен, 5 – α -фелландрен, 6 – 3-карен, 7 – β -фелландрен.

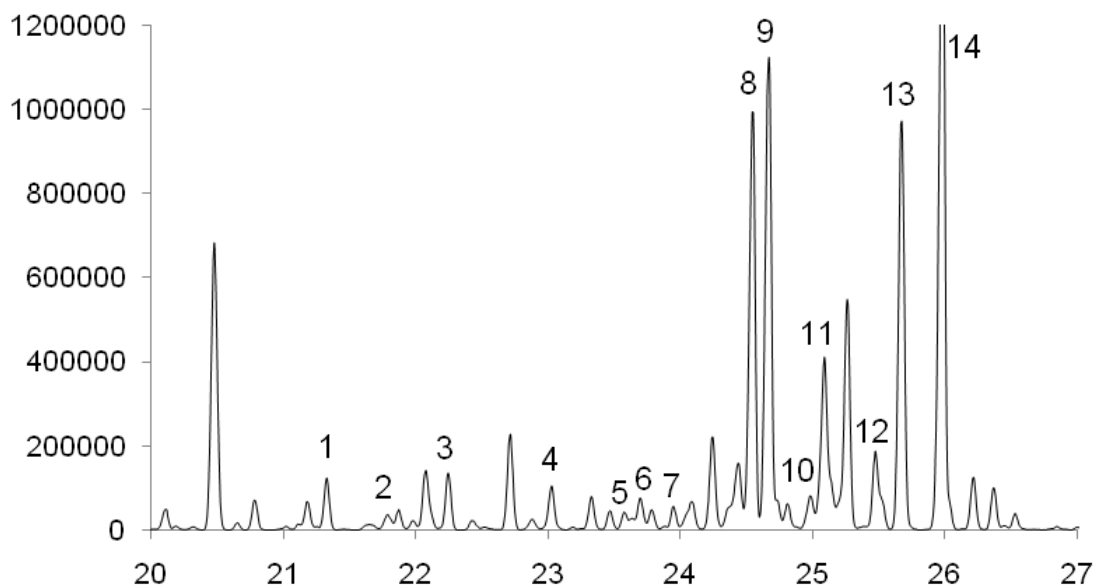


Рисунок 7. Хроматограмма тестового образца эфирного масла сосны сибирской, область сесквитерпенов. Цифрами обозначены: 1 – α -копаен, 2 – β -кубебен, 3 – β -фунебрен, 4 – β -копаен, 5 – цис-муурола-3,5-диен, 6 – транс-муурола-3,5-диен, 7 – цис-муурола-4(14),5-диен, 8 – транс-кадина-1(6),4-диен, 9 – гермакрен Д, 10 – бициclosесквифелландрен, 11 – γ -аморфен, 12 – δ -аморфен, 13 – γ -кадинен, 14 – δ -кадинен.

Среди множества терпеновых соединений выделяли группы, члены которых имеют схожую структуру и одинаковые закономерности масс-фрагментации (анализировали по схожести их масс-спектров, в том числе наличию одинакового основного иона). Было выделено две группы таких соединений: 10 монотерпенов с основным ионом в масс-спектре с $m/z=93$, и 25 сесквитерпенов с основным ионом в масс-спектре с $m/z=161$. В каждой группе был определён один из терпенов, который использовали в качестве стандарта для определения остальных (методом внешнего стандарта). Для группы монотерпенов был выбран α -пинен, весьма распространённый терпен, на который в продаже имеются ГСО, для группы сесквитерпенов – γ -кадинен, широко распространённый в природе и сравнительно легко выделяемый из эфирного масла можжевельника сибирского.

Для снижения систематической составляющей погрешности при определении терпенов, не калиброванных с использованием соответствующих стандартных образцов, были экспериментально определены поправочные коэффициенты (факторы отклика). Для этого сопоставляли масс-хроматограммы, полученные на масс-спектрометре, с хроматограммами, полученными на газовом хроматографе с пламенно-ионизационным детектором, отклик которого на определяемые терпены можно считать одинаковым. Полученные факторы отклика (таблица 2) использовали при расчёте концентрации. Установлено, что отклик соединений из определяемых групп действительно близок (факторы отклика лежат в диапазоне от 0,8 до 1,2), а для соединений другой структуры отличается более значительно. Поэтому исходную гипотезу о близости отклика масс-спектрометра для соединений схожей структуры считали подтверждённой.

Таблица 2. Факторы отклика для моно- и сесквитерпенов, определяемых по предлагаемой методике.

№	Компонент	Стандарт	Фактор отклика k
1	Трициклен	α -пинен	0,88
2	α -пинен	α -пинен	1,00
3	Камфен	α -пинен	0,92
4	Сабинен	α -пинен	0,95
5	β -пинен	α -пинен	0,99
6	α -фелландрен	α -пинен	1,05
7	3-карен	α -пинен	0,87
8	β -фелландрен	α -пинен	0,89
9	γ -терпинен	α -пинен	1,07
10	Терпинолен	α -пинен	0,91
11	α -Кубебен	γ -кадинен	1,05

12	α -Копаен	γ -кадинен	1,01
13	β -Кубебен	γ -кадинен	0,89
14	β -Фунебрен	γ -кадинен	0,95
15	β -Кедрен	γ -кадинен	1,06
16	β -Копаен	γ -кадинен	1,10
17	β -Гурыюнен	γ -кадинен	0,94
18	Изогермакрен Д	γ -кадинен	0,89
19	цис-Муурола-3,5-диен	γ -кадинен	0,91
20	транс-Муурола-3,5-диен	γ -кадинен	0,92
21	цис-Муурола-4(14),5-диен	γ -кадинен	0,92
22	β -Неокловен	γ -кадинен	1,11
23	транс-Кадина-1(6),4-диен	γ -кадинен	0,91
24	γ -Мууролен	γ -кадинен	1,12
25	Гермакрен Д	γ -кадинен	0,87
26	Бицикросесквифелландрен	γ -кадинен	0,95
27	γ -Аморфен	γ -кадинен	0,90
28	δ -Аморфен	γ -кадинен	1,10
29	γ -Кадинен	γ -кадинен	1,00
30	δ -Кадинен	γ -кадинен	0,88

Глава 3. Результаты и их обсуждение.

Определены метрологические характеристики предлагаемой методики в двух вариантах: SCAN- и SIM-режиме. В SIM-режиме калибровались только по α -пинену в связи с тем, что в пробах воздуха, которые анализируются в данном режиме, как правило присутствуют только наиболее летучие соединения – монотерпены. Результаты калибровки и диапазон линейности предлагаемой методики представлены в таблице 3.

Таблица 3. Результаты калибровки.

Аналит	Диапазон линейности	Уравнение калибровочной кривой	Коэффициент регрессии
α -Пинен	5-200 мг/л	$S=1,5 \cdot 10^5 C - 3,2 \cdot 10^5$	0,9993
γ -Кадинен	5-200 мг/л	$S=2,8 \cdot 10^5 C + 2,2 \cdot 10^5$	0,9998
α -Пинен, SIM-режим	0,008-1 мг/л	$S=3,9 \cdot 10^4 C + 1,2 \cdot 10^3$	0,9994

При оценке метрологических характеристик методики для установления приписанных характеристик погрешности руководствовались ГОСТ Р ИСО 5725-2002. В качестве образцов для оценивания для α -пинена и γ -кадинена использовали аттестованные смеси, приготовленные на основе ГСО – для α -пинена и на основе СОП – для γ -кадинена.

Для α -пинена и γ -кадинена установили границы диапазонов, в которых значения характеристики случайной погрешности, соответствующие верхней и нижней границе диапазона, являются однородными. Получили 4 диапазона, внутри которых приняли постоянство показателей прецизионности. Полученные значения приписанной характеристики случайной погрешности для данных диапазонов представлены в таблице 4.

Для остальных терпенов в качестве образцов для оценивания использовались однородные и стабильные рабочие пробы, и в качестве показателя точности выступало среднее квадратическое отклонение погрешности результатов анализа, таким образом производили точечную оценку приписанной характеристики случайной погрешности. Результаты представлены в таблице 5. Аналогичные показатели повторяемости и воспроизводимости (интервальные для α -пинена и точечные для остальных 9 монотерпенов) определены для варианта методики в SIM-режиме. Результаты представлены в таблицах 6-7.

Таблица 4. Значения показателей повторяемости и воспроизводимости в зависимости от содержания определяемого соединения (SCAN-режим).

Номер	Диапазон определяемых содержаний, мг/л	Показатель повторяемости σ_r		Показатель воспроизводимости σ_R	
		α -Пинен	γ -Кадинен	α -Пинен	γ -Кадинен
1	5-30	0,2	0,2	0,3	0,2
2	30-65	1,1	1,2	1,3	1,2
3	65-110	1,7	1,8	1,9	2,0
4	110-160	2,5	2,4	2,7	2,8
5	160-200	3,5	3,6	3,9	3,8

Таблица 5. Среднеквадратическое отклонение результатов анализа, полученных в условиях повторяемости и воспроизводимости, для определяемых моно- и сесквитерпенов (SCAN-режим).

№	Компонент	$\bar{C}$, мг/л	$\sigma_{r,m}$	r_m	$\sigma_{R,m}$	R_m
1	Трициклен	28,0	0,7	2,3	0,8	2,2
2	Камфен	9,6	0,4	1,3	0,5	1,4
3	Сабинен	5,5	0,4	1,3	0,4	1,1

4	β -Пинен	37,5	0,9	3,0	1,0	2,8
5	α -Фелландрен	4,1	0,4	1,3	0,4	1,1
6	3-Карен	12,0	0,5	1,7	0,5	1,4
7	β -Фелландрен	189,9	3,2	10,6	3,5	9,7
8	γ -Терпинен	6,5	0,4	1,3	0,4	1,1
9	Терпинолен	6,4	0,4	1,3	0,4	1,1
10	α -Кубебен	4,5	0,4	1,3	0,4	1,1
11	α -Копаен	13,0	0,5	1,7	0,5	1,4
12	β -Кубебен	4,8	0,4	1,3	0,4	1,1
13	β -Фунебрен	15,3	0,5	1,7	0,6	1,7
14	β -Кедрен	20,6	0,6	2,0	0,7	1,9
15	β -Копаен	11,2	0,5	1,7	0,5	1,4
16	β -Гурыюнен	5,4	0,4	1,3	0,4	1,1
17	Изогермакрен Д	6,2	0,4	1,3	0,4	1,1
18	цис-Муурола-3,5-диен	4,8	0,4	1,3	0,4	1,1
19	транс-Муурола-3,5-диен	6,3	0,4	1,3	0,4	1,1
20	цис-Муурола-4(14),5-диен	5,4	0,4	1,3	0,4	1,1
21	β -Неокловен	20,1	0,6	2,0	0,7	1,9
22	Кадина-1(6),4-диен	10,4	0,5	1,7	0,5	1,4
23	γ -Мууролен	11,4	0,5	1,7	0,5	1,4
24	Гермакрен Д	12,1	0,5	1,7	0,5	1,4
25	Бициклосескви-фелландрен	7,2	0,4	1,3	0,5	1,4
26	γ -Аморфен	6,5	0,4	1,3	0,4	1,1
27	δ -Аморфен	8,5	0,4	1,3	0,5	1,4
28	δ -Кадинен	18,7	0,6	2,0	0,6	1,7

Таблица 6. Значения показателей повторяемости и воспроизводимости в зависимости от содержания α -пинена, SIM-режим.

Номер	Диапазон определяемых содержаний, мг/л	Показатель повторяемости σ_T	Показатель воспроизводимости σ_R
1	0,008-0,15	0,001	0,001
2	0,15-0,4	0,02	0,02
3	0,4-0,8	0,04	0,05
4	0,8-1,0	0,06	0,07

Таблица 7. Среднеквадратическое отклонение результатов анализа, полученных в условиях повторяемости и воспроизводимости, для определяемых в SIM-режиме монотерпенов.

№	Компонент	$\bar{C}$, мг/л	$\sigma_{r,m}$	r_m	$\sigma_{R,m}$	R_m
1	Трициклен	0,008	0,001	0,003	0,001	0,003
2	Камфен	0,11	0,01	0,03	0,01	0,03
3	Сабинен	0,008	0,001	0,003	0,001	0,003
4	β -Пинен	0,042	0,003	0,010	0,004	0,008
5	α -Фелландрен	0,011	0,001	0,003	0,001	0,003
6	3-Карен	0,022	0,002	0,006	0,002	0,006
7	β -Фелландрен	0,072	0,005	0,015	0,006	0,014
8	γ -Терпинен	0,012	0,001	0,003	0,001	0,003
9	Терпинолен	0,015	0,001	0,003	0,001	0,003

Правильность методики оценивали только для α -пинена и γ -кадинена. Для каждого из диапазонов (в которых значения характеристики случайной погрешности являются однородными) готовили рабочую пробу, в качестве которой использовали эфирное масло сосны сибирской для оценки методики в режиме SCAN, и спиртовой концентрат воздуха, насыщенного терпенами сосны сибирской – в режиме SIM. Разбавление пробы подбирали таким образом, чтобы содержание определяемого терпена в рабочей пробе с учётом добавки не превышало верхней границы поддиапазона. Значение добавки определяли по рекомендациям, приведённым в ГОСТ Р ИСО 5725-4-2002. Результаты представлены в таблицах 8-9.

Таблица 8. Метод «введено-найденно», режим SCAN.

Определяемое соединение	Диапазон определяемых содержаний	Величина добавки, мг/л	Экспериментально найденная величина добавки, мг/л
α -пинен	5-30	10	10,1 $\pm$ 0,3
	30-65	15	15,2 $\pm$ 0,7
	65-110	20	20,6 $\pm$ 2,5
	110-160	30	32,2 $\pm$ 3,4
	160-200	30	31,4 $\pm$ 4,2
γ -кадинен	5-30	10	9,8 $\pm$ 0,3
	30-65	15	14,5 $\pm$ 0,8
	65-110	20	19,8 $\pm$ 1,9
	110-160	30	30,5 $\pm$ 3,8
	160-200	30	31,2 $\pm$ 4,9

С использованием t-критерия было установлено, что оценка систематической погрешности незначима на фоне случайного разброса для обоих вариантов методики, и её значение было принято равным нулю.

Точность анализа оценивали, определяя границы, в которых погрешность результатов единичного анализа находится с заданной вероятностью $P=0,95$. Результаты представлены в таблицах 10-11.

Таблица 9. Метод «введено-найденно», режим SIM.

Диапазон определяемых содержаний	Величина добавки, мг/л	Экспериментально найденная величина добавки, мг/л
0,008-0,15	0,1	0,12±0,01
0,15-0,4	0,1	0,13±0,02
0,4-0,8	0,2	0,23±0,05
0,8-1,0	0,1	0,14±0,07

Таблица 10. Интервальная оценка точности методики анализа, режим SCAN.

Номер	Диапазон определяемых содержаний, мг/л	Оценка показателя точности анализа Δ , мг/л	
		α -Пинен	γ -Кадинен
1	5-30	0,9	0,8
2	30-65	1,8	1,7
3	65-110	3,2	3,5
4	110-160	4,1	4,3
5	160-200	5,2	5,6

Таблица 11. Интервальная оценка точности методики анализа, режим SIM.

Номер	Диапазон определяемых содержаний, мг/л	Оценка показателя точности анализа Δ , мг/л
1	0,008-0,15	0,002
2	0,15-0,4	0,03
3	0,4-0,8	0,05
4	0,8-1,0	0,08

Представленные методики были использованы для анализа различных образцов товарного эфирного масла, производимых на территории РФ. Были проанализированы пользующиеся широким спросом среди потребителей

эфирные масла пихты сибирской, укропа пахучего и розмарина. Результаты представлены в таблице 12.

Таблица 12. Содержание моно- и сесквитерпенов в товарных эфирных маслах пихты сибирской, укропа пахучего и розмарина.

№	Компонент	t_r , мин	Содержание, г/л, в эфирных маслах:		
			пихты сибирской	укропа пахучего	розмарина
1	Трициклен	6,02	20,5	<0,2	<0,2
2	α -Пинен	6,40	92,9	1,5	<0,2
3	Камфен	6,87	197,1	0,2	<0,2
4	Сабинен	7,53	<0,2	<0,2	<0,2
5	β -Пинен	7,65	16,4	0,2	<0,2
6	α -Фелландрен	8,56	2,0	87,5	0,2
7	3-Карен	8,77	98,1	0,2	<0,2
8	β -Фелландрен	9,42	86,8	17,6	0,2
9	γ -Терпинен	10,42	1,7	0,2	0,2
10	Терпинолен	11,45	11,6	<0,2	<0,2
11	α -Кубебен	20,50	<0,2	<0,2	0,5
12	α -Копаен	21,34	<0,2	<0,2	1,3
13	β -Кубебен	21,82	<0,2	<0,2	0,4
14	β -Фунебрэн	22,30	0,9	<0,2	<0,2
15	β -Кедрен	22,50	<0,2	<0,2	<0,2
16	β -Копаен	23,04	<0,2	<0,2	<0,2
17	β -Гурьюнен	23,15	<0,2	0,3	<0,2
18	Изогермакрен Д	23,51	<0,2	<0,2	<0,2
19	цис-Муурола-3,5-диен	23,59	<0,2	<0,2	<0,2
20	транс-Муурола-3,5-диен	23,71	<0,2	<0,2	2,4
21	цис-Муурола-4(14),5-диен	24,10	<0,2	<0,2	5,7
22	β -Неокловен	24,30	<0,2	<0,2	<0,2

23	транс-Кадина-1(6),4-диен	24,46	<0,2	<0,2	<0,2
24	γ-Мууролен	24,56	<0,2	<0,2	0,8
25	Гермакрен Д	24,69	<0,2	1,6	18,1
26	Бициclosескви-фелландрен	25,00	0,2	<0,2	<0,2
27	γ-Аморфен	25,10	0,3	0,4	<0,2
28	δ-Аморфен	25,49	<0,2	<0,2	<0,2
29	γ-Кадинен	25,69	<0,2	8,3	28,9
30	δ-Кадинен	26,00	0,2	7,4	14,6

Вариант методики, при котором масс-спектрометр работает в SIM-режиме, использовали для изучения эмиссии монотерпенов из древесной зелени хвойных растений. Данные для образцов древесной зелени разных пород представлены в таблице 13. Из полученных данных видно, что древесная зелень сосны сибирской эмитирует в 9 раз больше α-пинена, по сравнению с древесной зеленью пихты сибирской.

Таблица 13. Содержание монотерпенов в спиртовых концентратах.

№	Компонент	t_r , мин	Содержание в спиртовом концентрате, мкг/л		
			Пихта сибирская	Сосна сибирская	Сосна обыкновенная
1	Трициклен	6,03	3,0	<0,2	<0,2
2	α-Пинен	6,25	13,0	112,9	7,7
3	Камфен	6,86	18,3	4,5	0,2
4	Сабинен	7,54	<0,2	<0,2	<0,2
5	β-Пинен	7,67	2,7	35,0	3,0
6	α-Фелландрен	8,55	<0,2	1,1	<0,2
7	З-Карен	8,77	4,1	3,6	0,9
8	β-Фелландрен	9,43	4,3	70,7	3,6
9	γ-Терпинен	10,41	<0,2	0,1	<0,2
10	Терпинолен	11,44	2,0	0,4	<0,2

ВЫВОДЫ

1) С использованием метода хромато-масс-спектрометрии изучен компонентный состав эфирных масел и экстрактов, выделяемых из растительного сырья с использованием различных методов, установлены оптимальные условия пробоподготовки.

2) Предложен подход к качественному анализу биологически активных терпеноидов с использованием масс-спектрометрических и хроматографических точек идентификации, исключающий ошибки идентификации.

3) Разработан подход к количественному определению ряда терпеновых соединений методом хромато-масс-спектрометрии, предполагающий использование одного вещества в качестве стандартного образца для определения нескольких, с экспериментальным определением факторов отклика.

4) Разработана методика одновременного количественного определения 30 терпеноидов в объектах сложного состава: 10 монотерпенов и 20 сесквитерпенов, предполагающая использование двух веществ в качестве стандартных образцов.

5) Разработана методика количественного определения низких концентраций монотерпенов в воздухе с использованием режима селективного ионного детектирования.

6) Определены метрологические характеристики разработанных методик. Показана возможность использования разработанных методик для количественного анализа сложных смесей БАВ, выделяемых из растений, а также образцов воздуха.

Основные результаты работы изложены в следующих публикациях:

1. А.Н. Нарчуганов, А.А.Ефремов. Нативные компоненты и артефакты эфирного масла Сосны Сибирской (*Pinus Sibirica*) /Мат. IV регион. научно-практ. конф. «Химическая наука и образование Красноярья». – Красноярск. – 2010. – С. 92-96.

2. Е.Г. Струкова, А.Н. Нарчуганов, А.А. Ефремов. Компонентный состав эфирного масла лапки хвойных Сибирского региона по данным хромато-масс-спектрометрии //Журнал Сибирского федерального университета. – Химия. – Т. 2. – Вып. 4. – 2009. – С. 335-350.

3. А.Н. Нарчуганов, А.А. Ефремов, Е.Г. Струкова. Компонентный состав эфирного масла сосны сибирской (*Pinus Sibirica*) // Химия растительного сырья. – № 4. – 2011. – С. 103-108.

4. А.Н. Нарчуганов, А.А. Ефремов, К.Б. Оффан, Е.П. Федянина. Закономерности экстракции лапки хвойных из Эвенкии спиртовым раствором при ультразвуковой обработке / Мат. IV всерос. конф. «Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья». – Барнаул. – 2009. – С. 111-113.
5. А.Н. Нарчуганов, Е.Г. Терещенко, А.А.Ефремов. Идентификация компонентов эфирного масла лапки Сосны Сибирской методом хромато-масс-спектрометрии / Мат. IV межвуз. научно-практ. конф. «Химическая наука и образование Красноярья». – Красноярск. – 2009. – С. 62-66.
6. А.Н. Нарчуганов, Е.Г. Струкова, А.А.Ефремов. Сравнительное исследование компонентного состава эфирного масла *Pinus Sibirica*, полученного в разное время года /Мат. XII межд. школы-конф. студентов и молодых ученых «Экология Южной Сибири и сопредельных территорий». – Абакан. – 2009. – С. 38.
7. А.Н. Нарчуганов, А.А. Гонтова, А.А.Ефремов. Contrastive Analysis of Composition and Bactericidal Activity of Various Fraction of Siberian Pine Essential Oil /Мат. II междунар. конф. «Current Issues of Natural products Chemistry and Biotechnology». – Новосибирск. – 2010. – С.28.
8. А.Н. Нарчуганов, А.А. Ефремов, К.Б. Оффан. Экстрактивные вещества лапки хвойных Эвенкии, извлекаемые при спиртовой обработке с использованием ультразвука // Химия растительного сырья. – № 1. – 2010. – С.105-108.
9. А.Н. Нарчуганов, А.А. Ефремов. Применение хромато-масс-спектрометрии для качественного анализа минорных компонентов эфирных масел растений/Мат. всерос. конф. «Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез». – Краснодар. – 2010. – С.119.
10. А.Н. Нарчуганов, А.А. Ефремов. Comparison of Some Technologies of Extraction of Terpenoids from the Plant Materials / Мат. междунар.конф. «Renewable Wood and Plant Resources: Chemistry, Technology, Pharmacology, Medicine». – Санкт-Петербург. – 2011.– С.145-146.
11. А.Н. Нарчуганов, А.А. Ефремов. Исчерпывающая экстракция терпеноидов из древесной зелени с использованием растворителей различной полярности /Мат. V Всерос. с межд. участием конф. «Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья». – Барнаул. – 2012. – С. 300-302.
12. А.Н. Нарчуганов, А.А. Ефремов. Определение монотерпенов в растительном сырье методом хромато-масс-спектрометрии / Мат. IX всерос. конф. «Аналитика Сибири и Дальнего Востока». – Красноярск. – 2012. – С. 163.
13. А.Н. Нарчуганов, А.А. Ефремов. Количественное определение двух групп терпеновых соединений методом хромато-масс-спектрометрии // Химия растительного сырья. – № 1. – 2013. – С.114-116.