

Исследование выделения ароматических компонентов эфирных масел препаративной хроматографией

*Канд. техн. наук Фролова Н. Э., канд. техн. наук Чепель Н. В.,
канд. техн. наук Науменко К. А., аспирант Усатюк Е. М.
llenausatiuk@gmail.com*

Национальный университет пищевых технологий

В статье приведены научные исследования относительно разработки способа выделения ароматических компонентов эфирных масел препаративной хроматографией, которые предусматривали научное обоснование и подбор твердого носителя, неподвижной фазы, способа нанесения неподвижной фазы, а также определение условий газохроматографического препаративного разделения.

Ключевые слова: ароматический компонент, эфирное масло, препаративная хроматография.

Аромат эфирного масла определяется суммарным содержанием всех летучих компонентов, в том числе и тех, которые находятся в незначительных количествах. При определении компонентного состава эфирных масел газовой хроматографией идентифицируют предпочтительно только ключевые компоненты, которые характеризуют их основной аромат. Содержание десятков других компонентов, отвечающих за оттенки аромата, остаётся, как правило, мало изученным. Особо актуальным остается вопрос относительно содержания в эфирном масле оптических изомеров с массовой долей 1...5 %, поскольку право- и левовращающие изомеры отличаются интенсивностью и чистотой аромата, а также фармакологическими свойствами.

Для достоверного определения свойств оптических изомеров используют современные физические методы разделения эфирного масла как многокомпонентной смеси. Одним из них является *препаративная газовая хроматография* – современный инструментальный метод разделения, идентификации и количественного анализа смесей, который позволяет выделить летучие вещества непосредственно из исходной смеси. С помощью препаративной хроматографии удастся разделять азеотропные смеси и изомеры с близкими температурами кипения, выделять отдельные компоненты с целью их дальнейшего исследования, готовить реактивы высокой чистоты и получать очищенные образцы, которые можно использовать в качестве стандартов [1, 2].

Препаративная газовая хроматография имеет ряд преимуществ:

- ✓ универсальность применения для разделения веществ с различными физико-химическими свойствами;
- ✓ высокая селективность хроматографического разделения веществ, близких по физико-химическим показателям;

- ✓ высокая эффективность разделения в результате большой поверхности массообмена;
- ✓ возможность выделения одного или нескольких компонентов за один цикл разделения сложной многокомпонентной смеси с достижением высокой степени обогащения;
- ✓ минимальные потери при выделении целевого компонента.

Выше изложенные данные позволили ученым ПНИЛ НУПТ разработать способ выделения ароматических компонентов эфирного масла препаративной хроматографией.

Основной задачей разработки данного способа было достижение максимального разделения эфирного масла на хроматографической препаративной колонке, которое требует значительного увеличения количества её теоретических тарелок.

Решение задачи предусматривало научное обоснование выбора твердого носителя (ТН), неподвижной фазы (НФ), способа нанесения неподвижной фазы; определение условий газохроматографического препаративного разделения.

Выбор ТН и НФ для заполнения препаративной насадочной колонки предопределяет эффективность разделения и выделения индивидуальных ароматических компонентов из эфирного масла.

ТН предназначен для обеспечения однородного нанесения на его поверхность НФ. В хроматографии в качестве ТН используют диатомиты, стеклянный бисер, металлические частицы, керамические материалы, гранулированные полимеры [3]. Из-за большего диаметра препаративной колонки, в сравнении с аналитической, обычно используют более дешевые материалы, к которым и относится диатомит.

Проанализировав физико-химические свойства пяти существующих товарных типов диатомитовых носителей хромосорбов фирмы "Johns Manville" (США) – А, G, P, W и T [4], выбран хромосорб А, поскольку ТН имеет большую емкость по НФ, значительную механическую прочность, небольшую адсорбционную и каталитическую активность поверхности, инертность относительно терпенов [5].

Выбор НФ основан на данных о компонентном составе эфирных масел и химической природе ароматических веществ, а также на селективном взаимодействии между ароматическими веществами и НФ.

В настоящее время известна система НФ, разработанная комитетом Nawkes'a [6]. Данная система предусматривает соответствие классов НФ с разделением органических и неорганических классов веществ, которые считаются селективными по отношению к ним. К НФ, перспективным для выделения индивидуальных ароматических компонентов из эфирного масла, принадлежат представители группы В и С, а именно: полиметилсилоксаны, апиезон, полиметилфенилсилоксаны, полиэтиленгликоли и другие.

Исходя из характеристик проанализированных НФ, выбрано ПЭГ-6000 из-за её высокой стойкости к окислению и влиянию высоких температур. Свойства НФ марки ПЭГ-6000 [7] приведены в табл. 1.

Таблица 1

Характеристика неподвижной фазы ПЭГ-6000

| Показатель | Значение |
|---|---|
| Химическая формула | HO-CH ₂ -(CH ₂ -O-CH ₂) _n -CH ₂ -OH |
| Молекулярная масса, г/моль | 6000...7500 |
| Рабочая температура, °С: минимальная максимально допустимая | 70 170...200 |
| Вязкость, Ст. | 320 |
| Растворитель | хлороформ, ацетон |
| Полярность по Роршнайдеру | 4,00 (по бутанолу) |
| Полярность по Мак-Рейнольдсу | 540 (по бутанолу) |

Для увеличения количества числа теоретических тарелок предложено использование неоднородного зернения ТН и градиентного нанесения НФ на ТН по длине колонки [8]. Следовательно, проведена серия исследований по определению градиентов размера зерен ТН и количества нанесения НФ на него.

Размер зерен ТН является фактором влияния на эффективность колонки, которая измеряется числом теоретических тарелок. По размерам зерен хромосорб А выпускается трёх видов: 10...20, 20...30 та 30...40 меш. Такое зернение обеспечивает небольшое сопротивление потоку газа-носителя вдоль препаративной колонки.

Результаты исследования влияния размера зерен ТН на эффективность колонки при разном объеме пробы и скорости газа-носителя показаны в табл. 2. Опыты проводили на колонке диаметром 10 мм с 20 % нанесением на ТН фазы ПЭГ-6000. В качестве стандартного вещества использовали лимонен как компонент многих эфирных масел.

Таблица 2

Влияние размера зерен твердого носителя на эффективность колонки

| Объём пробы, мкл | Число теоретических тарелок колонки | | | |
|---------------------|-------------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | 30...40 меш (а) | 20...30 меш (б) | 10...20 меш (а) | 10...20 меш (б) |
| 25 | 320 | 324 | 145 | 287 |
| 250 | 144 | 204 | 89 | 248 |
| 1000 | 41 | 56 | 38 | 49 |
| 2500 | 26 | 25 | 28 | 22 |
| 5000 | 8 | 7 | 8 | 7 |

а – скорость газа-носителя 100 см³/мин; б – скорость газа-носителя 60 см³/мин.

Данные табл. 2 показывают, что при введении небольших объемов пробы и небольшом размере зерен ТН достигается максимальная эффективность колонки.

Используя опыт ученых в хроматографии, исследовано влияние заполнения колонки тремя секциями ТН с разным диаметром зерен. Таким

образом, колонка разделена на три секции: первая секция заполнена ТН с зернением 2,0...3,0 мм; вторая – 1,0...2,0 мм; третья – 0,56...1,0 мм. Преимуществом такого подхода является то, что секция около испарителя имеет наибольший размер зерен и способствует снижению сопротивления потока в начале колонки. Третья секция с наименьшим размером зерен является основной и обеспечивает необходимую эффективность разделения.

Серией экспериментов установлено зависимость количества теоретических тарелок по лимонену n и длительности разделения τ от массового соотношения секций ТН (табл. 3). Эксперимент проводили на колонке, описанной выше. Скорость газа-носителя установлена на уровне 100 см³/мин. Объем пробы составлял 500 мкл.

Таблица 3

Влияние способа заполнения твердым носителем колонки на её эффективность

| Опыт | Количество ТН в секциях, % | | | τ , ч. | n , т.т. |
|------|----------------------------|--------|--------|-------------|------------|
| | первая | вторая | третья | | |
| 1 | 15 | 15 | 70 | 2 | 440 |
| 2 | 15 | 25 | 60 | 1,33 | 425 |
| 3 | 15 | 35 | 50 | 1,30 | 405 |

Данные табл. 3 свидетельствуют о повышении эффективности колонки при увеличении количества третьей секции с зернением 0,56...1,0 мм. При этом увеличивается длительность разделения.

Учитывая значения эффективности колонки и длительности анализа, оптимальным определено количественное соотношение секций ТН, соответствующее опыту 2.

Следующим этапом исследований определено градиент количества нанесения НФ. НФ наносится на ТН в пределах 15...25 % относительно массы последнего. Поскольку в препаративной хроматографии в колонку вводится большой объём пробы до 1 см³, используются большие концентрации нанесения НФ.

Таким образом, проведена серия исследований для определения оптимальной концентрации НФ. Количество НФ относительно ТН изменяли в пределах от 15 до 25 %, определяли эффективность n и длительность разделения τ . Результаты проведенных исследований в табл. 4.

Таблица 4

Влияние концентрации ПЭГ-6000 на эффективность и время разделения

| Опыт | Концентрация НФ в секциях, % | | | | τ , ч. | n , т.т. |
|------|------------------------------|--------|--------|-----------|-------------|------------|
| | первая | вторая | третья | четвёртая | | |
| 1 | 20 | 20 | 20 | 20 | 1,33 | 425 |
| 2 | 15 | 20 | 24 | 25 | 1,77 | 435 |
| 3 | 25 | 20 | 17 | 15 | 1,25 | 510 |

По результатам исследований определено, что эффективнее является уменьшение концентрации НФ по высоте колонки, начиная с введения пробы. Максимальная эффективность колонки обеспечивается следующим: на первую

секцию ТН нанесено максимально возможное количество НФ, которое представляло 25% от массы ТН. Это помогает избежать перегрузки колонки и увеличивает её ёмкость с возможностью введения пробы большего объёма. Высокое содержание НФ на начальном участке колонки полностью растворяет введенный образец, за счет чего устанавливается равновесие концентраций жидкости и пары. Третья секция ТН, массовая часть которой наибольшая, разделена на две: третью и четвертую – для обеспечения постепенного уменьшения количества НФ. На четвертую секцию ТН, в конце колонки, нанесено минимальное количество НФ – 15 %. Распределение количества НФ относительно ТН приведено в табл. 5.

Таблица 5

Количественные соотношения ПЭГ-6000 в колонке

| Секция | Массовые соотношения фракций ТН в колонке, % | Количество неподвижной фазы, % | Масса НФ, г |
|-----------|--|--------------------------------|-------------|
| Первая | 15 | 25 | 8,16 |
| Вторая | 25 | 20 | 12,05 |
| Третья | 25 | 17 | 9,72 |
| Четвертая | 35 | 15 | 15,09 |

Постепенное изменение размера зёрнения ТН и количества НФ по длине колонки и обеспечивает ее градиентность. Схема градиентной препаративной колонки представлена на *рис. 1*.

Заданную эффективность препаративного разделения эфирного масла и выделение из него индивидуальных компонентов обеспечивают также условия проведения хроматографического анализа: скорость газа-носителя, температурные режимы, количество пробы. Определение оптимальных условий проводили с использованием детектора по теплопроводности. Газ-носитель – азот.

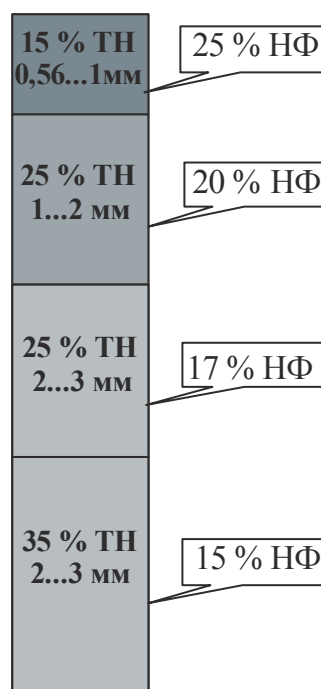


Рис. 1. Схема градиентной препаративной колонки

Оптимальная объемная скорость газа-носителя через градиентную препаративную колонку определена на основе зависимости числа теоретических тарелок от скорости инертного газа-носителя по лимонену (рис. 2).

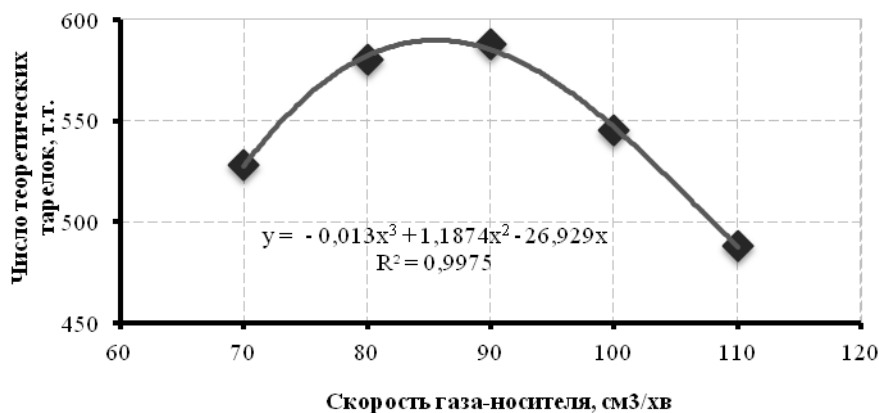


Рис. 2. Зависимость числа теоретических тарелок препаративной колонки от скорости газа-носителя

По полученной математической зависимости установлено, что при подаче азота со скоростью 85...90 см³/мин число теоретических тарелок по лимонену достигает максимального значения – 580...588 т.т.

Учитывая значение температур кипения индивидуальных ароматических компонентов эфирного масла и максимально допустимые рабочие значения температуры ПЭГ-6000, выбрано и экспериментально подтверждено использование программирования температуры термостата колонки в пределах 150...190 °С с интервалом нагрева 5 °С.

Оптимальной температурой испарителя установлено температурный интервал 180...250 °С, который обеспечивает скорость выпаривания, при которой исключаются потери при вводе пробы и термическая деструкция или изменение строения ароматических компонентов.

Исследования влияния объема пробы на эффективность препаративной колонки по лимонену показали, что с увеличением объема пробы уменьшается число теоретических тарелок колонки, а соответственно и её эффективность (рис. 3).

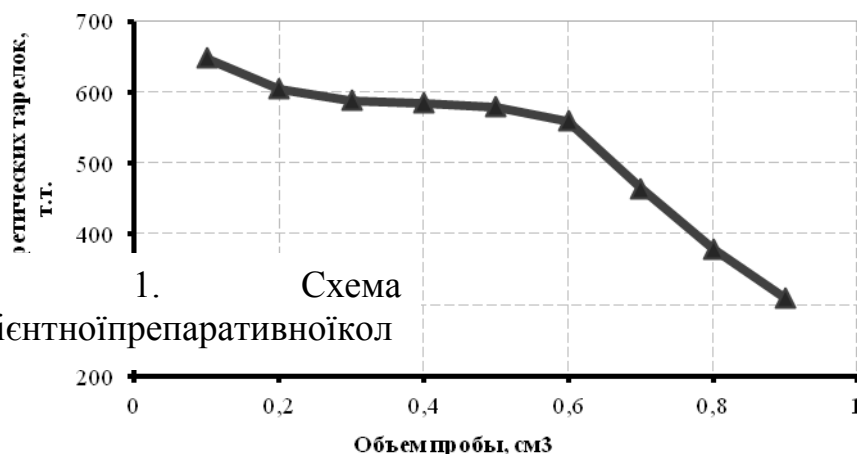


Рис. 3. Зависимость числа теоретических тарелок препаративной колонки от объема пробы

1. Схема градиентной препаративной колонки

Таким образом, количество пробы, необходимое для эффективного разделения и выделения ароматических компонентов, равно $0,5 \dots 0,6 \text{ см}^3$.

Для улавливания ароматических компонентов разделяемого масла использовали специальные сборники на выходе из препаративной колонки, которые представляют собой емкости с инертной насадкой. Сборники охлаждали с помощью хладагентов. Установленные в ходе экспериментов параметры выделения индивидуальных компонентов эфирных масел препаративной хроматографией представлены в табл. 6.

Таблица 6

Параметры разделения и выделения индивидуальных компонентов эфирного масла на препаративном хроматографе

| Название показателя | | Значение показателя |
|---|--------------------|--|
| Скорость потока газа-носителя, $\text{см}^3/\text{мин}$ | | 85...90 |
| Объем пробы, см^3 | | 0,5...0,6 |
| Температура, °С | испарителя | 180...250 |
| | термостата колонки | программирование в интервале 150...190 с шагом 5 |
| | сборника фракций | 180...250 |
| | сосуда Дьюара | -20...-15 |
| | детектора | 250 |

Вывод. Проведенный в ходе экспериментов подбор оптимальных параметров разделения эфирных масел препаративной хроматографией позволил повысить эффективность разделения до 570..600 теоретических тарелок. На основе данного результата разработан способ выделения ароматических компонентов с низким содержанием в исходном эфирном масле. Это позволило выделить ароматические компоненты эфирных масел укропа и тмина для установления их оптической активности, органолептических свойств, степени чистоты и перспективности в создании традиционных ароматов и изысканных, оригинальных ароматических композиций.

Список литературы

1. Березкина В. Г. Препаративная газовая хроматография / В. Г. Березкина, К. И. Сакодынский. – М.: Мир, 1994. – 408 с.
2. Аналитическая хроматография / [Сакодынский К. И., Бражников В. В., Волков С. А., Зевельский В. Ю. и др.]. – М.: Химия, 1995. – 464 с.
3. Лейбница Э. Руководство по газовой хроматографии / Э. Лейбница, Х. Г. Штруппе; пер. с нем. В. В. Соболя. – М.: Мир, 1998. – 479 с.
5. Яшин Я. И. Физико-химические основы хроматографического разделения / Я. И. Яшин. – М.: Химия, 1996. – 215 с.
6. Мак-Нейр Г. Введение в газовую хроматографию / Г. Мак-Нейр, Э. Бонелли; [пер. с англ. И. А. Ревельского]. – М.: Мир, 1995. – 280 с.

7. *Michel Petitjean*. Flavouring substances and natural sources of flavourings / Michel Petitjean, Gaston Vernin, Jacques Metzge. – Strasbourg : Chem. Anal., 1992.– 630 p.

8. *Берфилд Г.* Газовая хроматография в биохимии / Г. Берфилд, Э. Сторрс; пер. с англ. В.В. Соколовский. – М.: Мир, 1994. – 619с.

Investigation of separation of aromatic components out of essential oil by preparative chromatography

*Ph. D. Frolova N. E., Ph. D. Chepel N. V.,
Ph. D. Naumenko K. A., postgraduate student Usatyuk E. M.
National University of Food Technologies*

The article presents the research on the development of isolation method for aromatic components out of essential oils by preparative chromatography. Scientific justification and selection of the solid support, stationary phase, the method of application of the stationary phase were provided. The conditions for gas chromatographic preparative separation were determined.

Keywords: aromatic components, essential oil, preparative chromatography.