

IZOLACE TERPENŮ DESTILACÍ JEHLIČÍ SMRKU ZTEPILÉHO

PAVEL ŘEZANKA* a JAN FÄHRICH

Ústav analytické chemie, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6
e-mail: prezanka@seznam.cz, jan.fahrnich@vscht.cz

Došlo 3.9.02, přepracováno 10.10.02, přijato 28.11.02.

Klíčová slova: destilace, plynová chromatografie, kapalinová chromatografie, smrk ztepilý, terpeny

Úvod

Studium výskytu a složení terpenických látek v jehličnanech bylo předmětem mnoha studií. Kromě porovnávání různých druhů jehličnanů může být jejich cílem i monitorování vlivu životního prostředí na rostliny. K izolaci terpenických látek z rostlinného materiálu pro analytické účely je používána řada metod. Mezi nejrozšířenější patří destilace¹⁻⁴, paralelní destilace a extrakce^{5,6}, extrakce rozpouštědlem¹⁻⁹ (SE) a extrakce superkritickou kapalinou^{3,5} (SFE). Izolačním postupům se podrobně věnuje studie Holubové, Chvílíčkové a Kubáně¹, kteří srovnávali různé metody izolace monoterpenů z jehličí smrku ztepilého (*Picea abies*) a smrku omorika (*Picea omorica*). Jüttner⁷ zjišťoval změny koncentrací terpenů v jehličí smrku ztepilého rostoucího ve znečištěném prostředí. Množství nejvíce zastoupených terpenů (v $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ jehličí) izolovaných těmito autory z jehličí smrku ztepilého jsou uvedena v tabulce I.

Většina monoterpenů jsou látky opticky aktivní. Kromě stáčení roviny polarizovaného světla se tyto látky projevují i v infračervené oblasti ve spektrech vibračního cirkulárního dichroismu (VCD). Touto metodou by proto mohlo být sledováno složení terpenických látek v jehličí s případným využitím při monitorování vlivu prostředí na jejich tvorbu. Nevýhodou metody VCD je to, že potřebuje poměrně velké množství vzorku (řádově jednotky až desítky mg ve 100 μl

Tabulka I

Množství terpenů izolovaných z jehličí smrku ztepilého ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ čerstvého jehličí) v závislosti na metodě izolace

Metoda izolace	α -Pinen	Limonen	Kamfen	Lit.
SE	44,4	53,9	84,1	1
SFE	44,3	50,2	78,7	1
Destilace	14,0	22,8	31,9	1
SE ^a	131	120	241	7

^a U této metody použit jiný způsob zpracování jehličí

* Pavel Řezanka se s touto prací úspěšně zúčastnil celostátní soutěže o nejlepší studentskou práci v oboru analytické chemie o cenu firmy Merck v Praze 6.–7. února 2002.

rozpouštědla), a proto je třeba zpracovat navážku několika desítek gramů jehličí. To je poměrně snadno proveditelné metodou destilace z vodného prostředí. Tato práce se proto zabývá několika různými variantami destilace se snahou dosáhnout uspokojivé výtěžnosti postupu při současném zakoncentrování izolovaných látek v co nejmenším objemu rozpouštědla. Tyto varianty byly studovány na mesitylenu (1,3,5-trimethylbenzenu) jako modelové látky. Jako perspektivní z těchto variant se jevila destilace z vodného prostředí spojená s přímým zakoncentrováním destilátu na tuhém sorbentu. Tento postup byl pak použit pro izolaci terpenů z jehličí. Pro porovnání byly některé aspekty izolace terpenických látek studovány i metodou přímé extrakce rozpouštědlem.

Experimentální část

Použité přístroje

Absorpční spektra v UV oblasti byla měřena na spektrofotometru Cary 50 (Varian) v rozsahu vlnových délek 200–400 nm. Obsah mesitylenu v modelových pokusech byl vyhodnocen z rozdílu absorbance při vlnové délce 272,5 nm (vlnová délka absorpčního maxima mesitylenu) a 285 nm (pozadí).

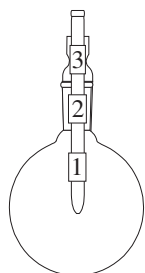
K separaci kapalinovou chromatografií byla použita skleněná kolona 150×3 mm plněná sorbentem Separon SGX C18, 7 μm (Tessek, Praha). Methanol jako mobilní fáze byl čerpán rychlostí 0,4 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ čerpadlem LCP 4000 (Ecom, Praha). K fotometrické detekci při vlnové délce 202 nm sloužil spektrofotometrický detektor Knauer (Německo), nebo byla zaznamenávána spektra eluátů v rozsahu 190 až 360 nm detektorem s diodovým polem SM 5000 (LDC Analytical, USA). Naměřené chromatogramy byly zpracovány programem CSW (Data Apex, Praha).

Analýzy plynovou chromatografií byly prováděny na chromatografu Varian 3350 na kapilární koloně 25 m × 0,32 mm s NB-54 stacionární fází (Nordion), s dusíkem jako nosným plynem a plamenovým ionizačním detektorem. Počáteční teplota kolony byla 45 °C po dobu 2 min, potom byla zvyšována rychlostí 10 °C·min⁻¹ na teplotu 180 °C a při ní byla kolona udržována další 4,5 min. Injektor a detektor byly vyhřáty na teplotu 200 °C.

Spektra VCD byla měřena ve střední infračervené oblasti na spektrometru s Fourierovou transformací IFS-66/S (Bruker, Německo) vybaveném modulem PMA 37 (Bruker, Německo). Metoda měření byla detailně popsána dříve¹⁰.

Destilační postupy

Při destilaci modelových vzorků s mesitylenem bylo ke 400 ml destilované vody v 0,5 l varné baňce přidáno 200 μl mesitylenu. Směs byla destilována po dobu 45 až 60 minut. K zachyceným frakcím destilátu bylo přidáno dostatečné množství methanolu (několik ml) tak, aby se mesitylen přítomný ve frakcích rozpustil. Po skončení destilace byla destilační aparatura rozebrána a její jednotlivé části opláchnuty methanolem do připravených baněk. Při použití polyuretha-



Obr. 1. Destilační aparatura č. 5; čísla 1, 2 a 3 označují umístění polyurethanových válečků

nové pěny byly po skončení destilace polyurethanové válečky promyty methanolem. Ve frakcích i extraktech byl obsah mesitylenu stanoven absorpční spektrometrií.

Destilace byla prováděna s pěti variantami destilačních aparatur:

Aparatura č. 1 byla tvořena destilační baňkou a sestupným chladičem o délce 50 cm.

Aparatura č. 2 se od aparatury č. 1 lišila pouze destilační baňkou s postranním otvorem, jímž byl v průběhu destilace vstříkován ethanol.

Aparatura č. 3 byla tvořena destilační baňkou, límcovkou s postranní trubicí pro odběr destilátu a zpětným chladičem.

Aparatura č. 4 byla shodná s aparaturou č. 3, pouze do postranní trubice pro odběr destilátu byly umístěny tři válečky z polyurethanové pěny.

Aparatura č. 5 (obr. 1) byla tvořena destilační baňkou s nasazenou redukcí NZ 32-14, do níž byl zasunut vodou chlazený tm osazený válečky z polyurethanové pěny. Na obrázku jsou vyznačena místa, kde byly válečky umístěny.

Výsledky a diskuse

Modelové pokusy

Postupy, jako je destilace s vodní parou, jsou často s výhodou používány při izolaci těkavých složek z matrice vzorku. Postup je obtížnější pro látky, které jsou velmi málo rozpustné ve vodě. Tato skutečnost je sice příznivá pro urychlení přechodu látky do plynné fáze, avšak z kondenzuje-li tato látka jako oddělená fáze v chladiči nebo na jiných místech aparatury, pak je jen velmi pomalu transportována předestilovanou vodou do předlohy. To se velmi zřetelně projevilo při modelovém pokusu s destilací mesitylenu v aparatuře č. 1, která se jinak v laboratořích k destilacím běžně používá. V sestupném chladiči aparatury se velmi rychle vytvořily kapičky mesitylenu, které dlouho ulpávaly na jeho stěnách, takže do prvních 70 ml destilátu se dostalo pouze 37 % vneseného množství mesitylenu. Hlavní nevýhodou aparatury č. 1 je tedy velký objem destilátu potřebný k předestilování mesitylenu s dostatečnou výtěžností (tabulka II).

Ve snaze urychlit vymytí z kondenzovaného mesitylenu z aparatury byl v dalším pokusu s aparaturou č. 2 přidán během destilace do varné baňky postranní trubicí ethanol. Výrazného urychlení destilace mesitylenu se ale tímto způsobem nedo-

Tabulka II

Celkový objem destilátů a extraktů vzorků V_C a výtěžnost R_V mesitylenu při použití různých destilačních aparatur

Aparatura	V_C [ml]	R_V [%]
1	213	74,9
2	211	81,2
3	32	81,0
4	34	84,6
5	22	89,8

sáhlo. Úspěšnější byla destilační aparatura č. 3; díky jejím menším rozměrům bylo 63 % mesitylenu obsaženo v prvních 10 ml destilátu. Poměrně značný podíl (asi 13 %) mesitylenu zůstával v postranní trubicí pro odběr destilátu.

Vzhledem k tendenci mesitylenu ulpívat na stěnách aparatury se nabízí možnost využít této skutečnosti k jeho zachycení na vhodném materiálu přímo v destilační aparatuře. Při prvním pokusu v tomto směru byla aparatura č. 3 upravena tak, že do postranní trubice byly vloženy tři válečky z polyurethanové pěny, takže odebíraný destilát protékal těmito válečky (aparatura č. 4). Zachytilo se v nich 57 % mesitylenu, v protoklém destilátu o celkovém objemu 25 ml bylo nalezeno 39 % mesitylenu. Účinnost záchytu v polyurethanových válečkách je v tomto případě snižována vysokou teplotou destilátu, který jimi protéká. Proto byla v destilační aparatuře č. 5 polyurethanová pěna navléknuta ve třech segmentech přímo na chladič tm umístěný nad vroucí kapalinou (obr. 1). Po 30 minutách varu a vychladnutí aparatury bylo v segmentech polyurethanové pěny nalezeno 90 % mesitylenu, okolo 3 % mesitylenu bylo nalezeno ve vodě zbylé v destilační baňce. Dostatečně vysoká výtěžnost byla zjištěna i v případě, že do vody bylo kromě mesitylenu přidáno 50 g jehličí. V tomto případě extrakty z polyurethanových válečků obsahovaly kromě mesitylenu příliš mnoho jiných látek absorbujících v UV oblasti spektra, a proto byl mesitylen stanoven kapalinovou chromatografií.

Destilace jehličí

Při prvním experimentu se zpracováním jehličí bylo v aparatuře č. 5 vařeno ve 400 ml vody 5 g čerstvého jehličí po dobu 30 minut. Jehličí bylo jen minimálně poškozené při oddělování ze smrkové větvičky. Po týdnu byl týž vzorek destilován znovu. Methanolicke extrakty tří válečků z polyurethanové pěny byly analyzovány kapalinovou chromatografií s fotometrickou detekcí. Ze složek patrných na chromatogramech bylo možno porovnáním se standardy identifikovat tři monoterpeny, jejichž celkové množství nalezené v jednotlivých válečkách polyurethanové pěny je uvedeno v tabulce III. Překvapivě bylo po týdnu izolováno větší množství monoterpenů než při prvé extrakci. Je patrné, že terpeny jsou z nepoškozeného jehličí extrahovány jen velmi pomalu, a ani teplota varu vody nestačí k jejich uvolnění. To se potvrdilo i dalším pokusem, při kterém bylo zpracováno 15 g jehličí a polyurethanové válečky byly pro účely VCD extrahovány tetrachlormethanem. Po zředění hexanem byl roztok analyzován plynovou chromatografií. Tabulka IV udává celkové množství izolova-

ných monoterpenů ze všech tří polyurethanových válečků, tabulka V distribuci celkového množství monoterpenů mezi jednotlivé válečky. Opět je po týdenním stání patrný nárůst množství izolovaných monoterpenů.

Tabulka III

Celkové množství izolovaných monoterpenů (α -pinenu, limonenu a kamfenu) z jehličí smrku ztepilého ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ čerstvého jehličí) získané destilací 5 g jehličí v aparatuře č. 5 a analyzované kapalinovou chromatografií

Váleček	1. destilace	2. destilace ^a
1	51	89
2	23	64
3	21	33
<i>Celkem</i>	95	186

^a Destilace opakována týden po první destilaci

Tabulka IV

Množství izolovaných monoterpenů z jehličí smrku ztepilého ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ čerstvého jehličí) získané destilací 15 g jehličí v aparatuře č. 5 a analyzované plynovou chromatografií

Destilace	Limonen		Borneol		Kafr		Celkem
	α -Pinen	Kamfen	Kamfen	Terpinol	Terpinol		
1	1,3	4,5	3,7	9,5	15	15	49
2 ^a	32	87	94	11	11	27	262

^a Destilace opakována týden po první destilaci

Tabulka V

Distribuce celkového množství terpenů ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ čerstvého jehličí) v jednotlivých válečcích z polyurethanové pěny získaných destilací 15 g jehličí v aparatuře č. 5

Váleček	1. destilace	2. destilace ^a
1	18	179
2	21	50
3	10	33
<i>Celkem</i>	49	262

^a Destilace opakována týden po první destilaci

Tabulka VI

Množství jednotlivých monoterpenů ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ čerstvého jehličí) v hexanových extraktech stanovené plynovou chromatografií

Destilace	Limonen		Borneol		Celkem	
	α -Pinen	Kamfen	Kamfen	Terpinol	Terpinol	
Rozdrcené	210	420	430	31	64	1155
Nepoškozené	9,2	21	22	16	17	85,2

Význam narušení povrchu jehličí pro uvolnění monoterpenů byl sledován plynově-chromatografickou analýzou hexanových extraktů. Ve dvou vialkách s 1 ml hexanu byly po dobu 12 hodin extrahovány tři jehlice, přičemž v jedné vialce byly jehlice na počátku extrakce pod hladinou hexanu rozdrčeny skleněnou tyčinkou. Množství extrahovaných monoterpenů uvádí tabulka VI.

I v další sérii experimentů nebylo v hexanových extraktech nepoškozených jehlic nalezeno významné množství terpenů, a to ani tehdy, jestliže byla extrakce hexanem podpořena mikrovlnným ohřevem. Mikrovlnná energie není absorbována hexanem, ale pouze jehličím, které se tak intenzivně zahřívá, ačkoliv hexan přitom zůstává poměrně chladný. Ohřev byl ukončen, když jehličí ztratilo jasně zelený odstín; přitom se od jehličí oddělila povrchová vrstva vosků. V hexanu ale ani v tomto případě nebyly terpeny nalezeny ve významném množství. Jak jehlice zpracované mikrovlnným ohřevem v hexanu, tak i jehlice čerstvé byly extrahovány hexanem. V jedné řadě pokusů byly 3 jehlice rozdrčeny v 1 ml hexanu skleněnou tyčinkou, v druhé byly rozdrčeny v kulovém mlýnku za teploty kapalného dusíku. Hexan byl k jehlicím přidáván ještě před ochlazením na teplotu kapalného dusíku a drcením. Pokud byl přidán až po rozdrčení jehlic, byly nalezeny podstatně nižší obsahy monoterpenů, protože během temperace a další manipulace s jemně rozdrčeným vzorkem značná část monoterpenů ze vzorku vytékala.

Výsledky analýz jsou pro dva až tři paralelní pokusy uvedeny v tabulce VII. Nalezené obsahy se (na 5% hladině významnosti) neliší ani podle způsobu rozdrčení jehlic, ani při porovnání čerstvých jehlic s jehlicemi předběžně extrahovanými hexanem s mikrovlnným ohřevem.

Použitelnost postupu pro VCD analýzu

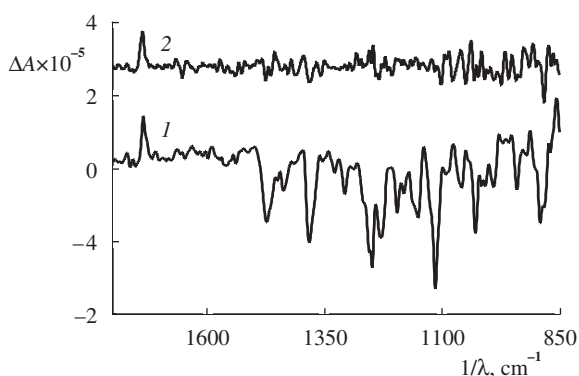
Ukazuje se, že i destilační postup izolace terpenů z jehličí s aparaturou č. 5 má pro praktické použití ve VCD spektroskopii

Tabulka VII

Množství jednotlivých monoterpenů ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ čerstvého jehličí) nalezené v hexanových extraktech pro různé způsoby zpracování jehlic

Zpracování jehlic ^a	Limonen		Borneol		Kafr		Celkem
	α -Pinen	Kamfen	Kamfen	Terpinol	Terpinol		
CR	155	138	284	84	65	163	890
	118	105	220	81	72	180	776
	164	146	312	90	70	191	972
CD	236	200	423	109	71	194	1234
	131	120	260	69	49	114	743
	211	200	385	89	63	224	1171
MR	120	113	226	67	50	174	751
	156	131	276	64	42	154	824
	202	195	388	91	75	189	1141
MD	137	117	266	63	53	126	762
	89	102	175	53	37	102	559

^a C – čerstvé jehličí, M – jehličí podrobené mikrovlnnému ohřevu, R – jehlice rozdrčeny v hexanu skleněnou tyčinkou, D – jehlice drcené v kulovém mlýnku za teploty kapalného dusíku



Obr. 2. VCD spektrum tetrachlormethanového extraktu jehličí; 1 – VCD spektrum, 2 – šum (k hodnotám je přičtena hodnota $3 \cdot 10^{-5}$)

metrii řadu nevýhod. K extrakci monoterpenů z polyurethanových válečků je třeba použít poměrně velký objem tetrachlormethanu (celkem asi 1,5 ml na jeden váleček). Spojené extrakty získané zpracováním 15 g jehličí byly proto po vysušení bezvodým síranem sodným zakoncentrovány odpařením přebytečného tetrachlormethanu proudem dusíku. To bylo nevyhnutelně doprovázeno ztrátami monoterpenů. Spektrum VCD odpařeného extraktu o výsledném objemu asi 100 μ l je na obr. 2. Ve spektru je zřetelná přítomnost opticky aktivních látek v extraktu. Signály jsou slabé, ale dobře odlišené od šumu přístroje. Je jich poměrně značný počet. Porovnáním s dostupnými standardy není možno jednoznačně určit, kterým látkám signály přísluší. V extraktu byla zřejmě obsažena příliš složitá směs opticky aktivních látek. Pravděpodobně bude v dalším postupu třeba získanou směs rozdělit na jednodušší skupiny látek. Také bude třeba ověřit, zda ztráty terpenických látek při odpařování extraktu bude možno udržet v přijatelných mezích.

Tato práce byla řešena v rámci grantu MŠMT ČR, č. MSM 223400008 a grantu MŽP ČR, č. VaV 340/1/01. Autoři děkují Ing. Vladimíru Setničkovi za změření VCD spektra.

LITERATURA

- Holubová V., Chvříčková I., Kubáň V.: Collect. Czech. Chem. Commun. 65, 1073 (2000).
- Pfeifhofer H. W.: Flavour Fragrance J. 15, 266 (2000).
- Muzika R. M., Campbell C. L., Hanover J. W., Smith A. L.: J. Chem. Ecol. 16, 2713 (1990).
- Owens M. K., Straka E. J., Carroll C. J., Taylor C. A.: J. Range Manag. 51, 540 (1998).
- Orav A., Kailas T., Koel M.: J. Essential Oil Res. 10, 387 (1998).
- Hennig P., Steinborn A., Engewald W.: Chromatographia 38, 689 (1994).
- Jüttner F.: Physiol. Plant. 72, 48 (1988).
- Kainulainen P., Holopainen J. K., Oksanen J.: New Phytol. 130, 231 (1995).
- Kainulainen P., Holopainen J. K., Oksanen J.: Water, Air, Soil Pollut. 85, 1393 (1995).
- Urbanová M., Setnička V., Volka K.: Chirality 12, 199 (2000).

P. Řezanka and J. Fährich (Department of Analytical Chemistry, Institute of Chemical Technology, Prague): **Isolation of Terpenes from Norway Spruce Needles by Distillation**

A novel approach to isolation of semivolatiles organic compounds from aqueous media is proposed based on combined distillation and solid phase extraction. A model compound, 1,3,5-trimethylbenzene, was concentrated with good yield on polyurethane foam coating of a cooler positioned above the boiling aqueous mixture. It was found that terpenes are released very slowly from intact Norway Spruce (*Picea abies*) needles even at the boil. Also microwave-assisted extraction with hexane was inefficient. The vibrational circular dichroism spectrum of compounds isolated from the needles by distillation and solid phase extraction was too complex to be easily interpreted.