



Politechnika Łódzka
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności
Instytut Podstaw Chemii Żywności



***PORÓWNANIE METOD WYODRĘBNIANIA I ANALIZA
LOTNYCH SKŁADNIKÓW DREWNA DRZEW IGLASTYCH
ORAZ NASION CZARNUSZKI***

mgr inż. Anna Wajs

Praca przedłożona
Radzie Wydziału Biotechnologii i Nauk o Żywności
Politechniki Łódzkiej
jako rozprawa doktorska

Promotor pracy
Dr hab. Danuta Kalemba, prof. PŁ

Łódź 2006

Praca w części finansowana ze środków Unii Europejskiej: Marie Curie Training Site jako
projekt badawczy nr HPMT-CT-2001-00297

Prof. Danucie Kalembie
promotorowi i opiekunowi naukowemu
chciałabym złożyć serdeczne podziękowania
za nieocenioną pomoc w czasie prac
eksperymentalnych i redakcji niniejszej rozprawy

Panom Jaceuszowi i Krzysztofowi Nowakom,
właścicielom Zakładu Zielarskiego Kawon
dziękuję serdecznie za przekazywanie mi
surowca roślinnego do badań

Rodzicom za miłość, wiarę we mnie
i wsparcie w każdym momencie mojego życia

Radkowi z głębi serca dziękuję za
radość każdego dnia i nieocenioną pomoc
podczas wykonywania tej pracy

Magdzie Gąsior za wspaniałą przyjaźń
i *Doktorantom* Instytutu Podstaw Chemii Żywności,
za niezapomniane chwile i naukowe dyskusje

Calemu zespołowi Chemii Bioorganicznej
dziękuję za rodzinną atmosferę i życzliwość na co dzień

Pani Teresie Majdzie
za fachową pomoc w dziedzinie
chromatografii gazowej i spektrometrii mas

*I wish to thank researchers
from Laboratory of Wood and Paper Chemistry,
Åbo Akademi in Turku, Finland,
where I made the analysis of wood of coniferous*

*Prof. Bjarne Holmbom
for being my supervisor in Åbo Akademi
and invaluable research caring during my fellowship*

*Dr. Andrey Pranovich
for the scientific guidance, valuable discussions
and sharing laboratory life with me*

*Prof. Stefan Willför
for research comments and generous help*

*Mr. Markku Reunanen
for many GC-MS analysis*

*Mr. Jarl Hemming
for excellent technical assistance*

*My sincere thanks also to **all friends and colleagues from SPK**
for creating a warm and helpful atmosphere filled with friendship and guidance
Warm and special thanks to *Eija Bergelin**

STRESZCZENIE	4
WSTĘP	5
SKRÓTY STOSOWANE W PRACY	6
1. PRZEGLĄD LITERATURY	7
1.1. Metody wyodrębniania lotnych związków z roślin	7
1.1.1. Metody destylacyjne	7
1.1.1.1. Destylacja z parą wodną.....	7
1.1.1.2. Równoczesna destylacja z parą wodą-ekstrakcja.....	8
1.1.1.3. Inne metody destylacji	9
1.1.2. Metody ekstrakcyjne	9
1.1.2.1. Ekstrakcja konwencjonalna.....	9
1.1.2.2. Ekstrakcja gazami w stanie nadkrytycznym	11
1.1.2.3. Inne metody ekstrakcji	12
1.1.3. Analiza fazy nadpowierzchniowej	13
1.1.4. Mikroekstrakcja do fazy stałej (SPME)	14
1.1.4.1. Metodyka SPME	15
1.1.4.2. Dynamika procesu SPME	17
1.1.4.3. Optymalizacja procesu SPME.....	18
1.1.4.4. Ilościowe oznaczenia metodą SPME	21
1.1.4.5. Zastosowanie SPME	23
1.2. Charakterystyka drzew iglastych oraz ich składników lotnych.....	25
1.2.1. Świerk pospolity.....	30
1.2.2. Sosna zwyczajna	38
1.2.3. Modrzew europejski.....	46
1.3. Charakterystyka roślin rodzaju czarnuszka oraz składników lotnych nasion	50
1.3.1. Czarnuszka siewna	50
1.3.1.1. Lotne składniki nasion czarnuszki siewnej	52
1.3.1.2. Aktywność biologiczna olejku eterycznego z nasion czarnuszki siewnej i jego składników	56
1.3.2. Czarnuszka damasceńska	59
1.3.3. Czarnuszka orientalna	64
2. CEL PRACY	66
3. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA.....	67
3.1. Metody.....	67
3.1.1. Destylacja z parą wodną – otrzymywanie olejku eterycznego	67
3.1.2. Destylacja frakcjonowana olejku eterycznego	67
3.1.3. Oznaczanie gęstości olejku	67
3.1.4. Ekstrakcja – otrzymywanie konkretów i olejków lotnych.....	67
3.1.5. Ekstrakcja nadkrytyczna	68
3.1.6. Analiza fazy nadpowierzchniowej metodą dynamiczną	69
3.1.7. Mikroekstrakcja do fazy stałej z fazy nadpowierzchniowej	69
3.1.8. Chromatografia gazowa	70

3.1.9. Sprzężenie chromatografii gazowej ze spektrometrią masową.....	71
3.1.10. Chromatografia kolumnowa z przyspieszonym przepływem eluenta.....	71
3.1.11. Chromatografia cienkowarstwowa.....	72
3.1.12. Spektroskopia jądrowego rezonansu magnetycznego.....	72
3.1.13. Identyfikacja składników	72
3.1.14. Oznaczanie zawartości wody w surowcu roślinnym.....	73
3.1.15. Rozpuszczalniki i odczynniki.....	73
3.1.16. Parametryczny test istotności	74
3.2. Ocena aktywności przeciwdrobnoustrojowej olejku eterycznego.....	75
3.2.1. Metoda płytkowa.....	75
3.2.2. Metoda impedymetryczna	75
3.3. Izolowanie i identyfikacja składników olejku eterycznego z nasion czarnuszki siewnej	76
3.3.1. Destylacja frakcjonowana olejku eterycznego.....	76
3.3.2. Chromatografia flesztowa frakcji olejku eterycznego.....	78
3.3.3. Identyfikacja składników	80
3.3.4. Izolowanie, synteza i określenie struktury eterów metylowych <i>trans</i> - i <i>cis</i> -tujan-4-olu	82
3.3.4.1. Synteza eterów metylowych <i>trans</i> - i <i>cis</i> -tujan-4-olu z sabinenu	84
3.3.4.2. Synteza <i>trans</i> - i <i>cis</i> -tujan-4-olu z sabinenu	85
3.3.4.3. Synteza eterów metylowych <i>trans</i> - i <i>cis</i> -tujan-4-olu z odpowiednich alkoholi.....	86
3.4. Izolowanie i identyfikacja składników olejku eterycznego z nasion czarnuszki damasceńskiej.....	86
3.4.1. Destylacja frakcjonowana olejku eterycznego.....	88
3.4.2. Chromatografia flesztowa frakcji olejku eterycznego.....	88
3.4.3. Identyfikacja składników	92
4. BADANIA WŁASNE – DREWNO DRZEW IGLASTYCH.....	95
4.1. Zakres badań.....	95
4.2. Materiał.....	95
4.3. Wybór metody wyodrębniania lotnych składników drewna	96
4.3.1. Destylacja z parą wodną drewna świerka pospolitego.....	96
4.3.1.1. Skład chemiczny olejku eterycznego z bielu i twardego świerka pospolitego	97
4.3.2. Analiza fazy nadpowierzchniowej drewna świerka pospolitego	102
4.3.3. Mikroekstrakcja do fazy stałej	104
4.3.3.1. Dobór warunków SPME drewna.....	104
4.3.3.2. Składniki bielu i twardego świerka pospolitego oznaczone metodą HS-SPME.....	106
4.3.3.3. Próby ilościowej analizy metodą HS-SPME.....	109
4.3.4. Porównanie metod wyodrębniania związków lotnych drewna świerka pospolitego	111
4.4. Lotne składniki drewna drzew iglastych analizowane metodą HS-SPME.....	118
4.4.1. Lotne składniki drewna świerka pospolitego	118
4.4.2. Lotne składniki drewna sosny zwyczajnej	126
4.4.3. Lotne składniki drewna modrzewia europejskiego.....	129
4.4.4. Porównanie składników lotnych drewna świerka, sosny i modrzewia	132
4.5. Składniki lotne drewna drzew iglastych – podsumowanie i wnioski.....	139

5. BADANIA WŁASNE – NASIONA ROŚLIN RODZAJU CZARNUSZKA	140
5.1. Zakres badań.....	140
Czarnuszka siewna	140
5.2. Materiał.....	140
5.3. Wydzielanie składników lotnych nasion czarnuszki siewnej.....	141
5.3.1. Destylacja z parą wodną.....	141
5.3.1.1. Otrzymanie i charakterystyka olejku eterycznego czarnuszki siewnej	141
5.3.1.2. Składniki olejku eterycznego czarnuszki siewnej	142
5.3.1.3. Izolowanie, synteza i identyfikacja eterów metylowych <i>trans</i> - i <i>cis</i> -tujan-4-olu	147
5.3.2. Mikroekstrakcja do fazy stałej nasion czarnuszki siewnej.....	155
5.3.2.1. Dobór warunków SPME nasion.....	155
5.3.3. Lotne składniki nasion czarnuszki siewnej wyodrębnione różnymi metodami	156
5.3.4. Porównanie metody SPME z destylacją z parą wodną	161
5.3.5. Porównanie wydajności i składu olejków eterycznych nasion czarnuszki siewnej w zależności od roku i miejsca zbioru	162
5.4. Składniki lotne nasion czarnuszki siewnej – podsumowanie i wnioski	167
Czarnuszka damasceńska	168
5.5. Materiał.....	168
5.6. Wydzielanie składników lotnych nasion czarnuszki damasceńskiej.....	168
5.6.1. Destylacja z parą wodną.....	168
5.6.1.1. Otrzymanie i charakterystyka olejku eterycznego czarnuszki damasceńskiej.....	168
5.6.1.2. Składniki olejku eterycznego z nasion czarnuszki damasceńskiej.....	169
5.6.2. Lotne składniki czarnuszki damasceńskiej wyodrębnione różnymi metodami	175
5.6.2.1. Porównanie metody SPME z destylacją z parą wodną	179
5.7. Składniki lotne nasion czarnuszki damasceńskiej – podsumowanie i wnioski	183
Czarnuszka orientalna	184
5.8. Materiał.....	184
5.9. Wydzielanie składników lotnych nasion czarnuszki orientalnej.....	184
5.9.1. Destylacja z parą wodną.....	184
5.9.1.1. Składniki olejku eterycznego czarnuszki orientalnej	184
5.9.2. Inne metody otrzymywania olejku.....	186
5.9.3. Porównanie metody SPME z destylacją z parą wodną	186
5.10. Składniki lotne nasion czarnuszki orientalnej – podsumowanie i wnioski	188
5.11. Właściwości przeciwdrobnoustrojowe olejków z nasion <i>N. sativa</i> i <i>N. damascena</i>	189
6. PODSUMOWANIE I WNIOSKI.....	191
7. SPIS TABEL	193
8. SPIS RYSUNKÓW	194
9. SPIS LITERATURY	196
DOROBK NAUKOWY	206

STRESZCZENIE

W części literaturowej pracy omówiłam różne techniki stosowane do wydzielania związków lotnych z roślin. Opisałam zarówno metody stosowane od szeregu lat, jak i te najnowsze. W kolejnym dziale części literaturowej przytoczyłam wyczerpujące dane na temat izolowanych różnymi metodami, poznanych składników lotnych następujących roślin:

- różnych organów drzew gatunku: świerk pospolity (*Picea abies* L.), sosna zwyczajna (*Pinus sylvestris* L.) i modrzew europejski (*Larix decidua* Mill.)
- nasion roślin rodzaju czarnuszka: czarnuszka siewna (*Nigella sativa* L.), czarnuszka damasceńska (*N. damascena* L.) i czarnuszka orientalna (*N. orientalis* L.).

W badawczej części pracy określiłam jak wydajność i skład mieszaniny związków lotnych badanych roślin zależy od techniki ich wydzielania. Stosowałam metody:

- destylacja z parą wodną i destylacja z parą wodną-ekstrakcja
- destylacja z parą wodną konkretów
- ekstrakcja ditlenkiem węgla w stanie nadkrytycznym
- analiza fazy nadpowierzchniowej
- mikroekstrakcja do fazy stałej.

Metodą HS-SPME określiłam szczegółowo skład drewna bielu i twardego świerka pospolitego, sosny zwyczajnej i modrzewia europejskiego. Dotychczas nie przeprowadzono tak szczegółowych badań składu terpenów drewna świerka i sosny, a drewno modrzewia nie było badane. W każdym z badanych gatunków zidentyfikowałam około 100 składników. Stwierdziłam, że skład związków lotnych bielu i twardego w obrębie danego gatunku drzewa jest bardzo podobny. Obserwowałam istotne różnice w składzie frakcji lotnej drewna trzech badanych gatunków.

Określiłam skład olejków eterycznych i lotnych oraz wydzielonych różnymi metodami składników lotnych nasion trzech gatunków czarnuszki. W nasionach *N. sativa* zidentyfikowałam 50 związków (20 po raz pierwszy), głównymi były węglowodory monoterpene, dwa ze składników: etery metylowe *cis*- i *trans*-tujan-4-olu, były nowymi związkami naturalnymi. W nasionach *N. damascena* zidentyfikowałam 63 składniki (44 po raz pierwszy), wśród których dominowały węglowodory seskwiterpenowe, podobnie jak w nasionach *N. orientalis*, w których zidentyfikowałam 27 związków (17 po raz pierwszy). Olejek eteryczny z nasion czarnuszki siewnej różnił się zasadniczo od olejków z dwu pozostałych gatunków. Wydajność i skład związków lotnych każdego gatunku w dużym stopniu zależały od zastosowanej metody wydzielania.

Oceniona została aktywność przeciwdrobnoustrojowa olejków eterycznych z czarnuszki siewnej i damasceńskiej.

WSTĘP

Składniki lotne roślin, będące ich wtórnymi metabolitami, pełnią doniosłą rolę zarówno w życiu roślin, jak i człowieka. W świecie roślin rola związków lotnych sprowadza się głównie do funkcji odstraszających szkodniki lub przyciągających owady. Człowiek wykorzystuje składniki lotne najczęściej w postaci olejków eterycznych, które dzięki właściwościom zapachowym stosowane są do aromatyzowania żywności i napojów oraz w perfumerii i przemyśle kosmetycznym, a ze względu na właściwości lecznicze – w medycynie i aromaterapii. Bogactwo i różnorodność składu związków lotnych roślin uzależniona jest od wielu czynników i jest przyczyną podejmowania szerokich badań analitycznych w celach poznawczych i aplikacyjnych.

Analiza naturalnych składników lotnych roślin zarówno mało znanych, dotąd niezbadanych, jak i szeroko stosowanych, ale poznanych w niedostatecznym stopniu, pozostaje nadal wyzwaniem. Do drugiej grupy produktów roślinnych należy drewno drzew iglastych, takich jak świerk pospolity, sosna zwyczajna i modrzew europejski – cenny surowiec budowlany, emitujący liczne związki lotne, które przedostają się do układu oddechowego ludzi. Nasiona niektórych gatunków rodzaju czarnuszka, m. in. czarnuszka siewna i czarnuszka damasceńska, zawierają związki lotne o cennych właściwościach leczniczych lub zapachowych. Analiza związków lotnych tych surowców była przedmiotem niniejszej pracy.

Ponieważ składniki lotne charakteryzują się różnorodną polarnością, rozpuszczalnością, lotnością i stabilnością termiczną oraz występują często w niskich stężeniach w surowcu, dlatego też nie ma jednej uniwersalnej, a zarazem prostej metody ich wydzielania w celu identyfikacji. W procesie przygotowania próbek do analizy składników lotnych stosowane są metody destylacyjne (np. destylacja z parą wodną) i ekstrakcyjne, a w ostatnich latach również dynamicznie rozwijające się metody sorpcyjne, w tym mikroekstrakcja do fazy tałej. Analizę ilościową i jakościową wydzielonych związków prowadzi się najczęściej metodami: GC z określeniem indeksów retencji i GC-MS.

SKRÓTY STOSOWANE W PRACY

- **DHS** – analiza fazy nadpowierzchniowej metodą dynamiczną
- **E_h/HD** – ekstrakcja heksanem i destylacja konkretnego z parą wodną
- **E_n/HD** – ekstrakcja eterem naftowym i destylacja konkretnego z parą wodną
- **E_p/HD** – ekstrakcja pentanem i destylacja konkretnego z parą wodną
- **E_{pe}/HD** – ekstrakcja mieszaniną pentan:eter dietylowy i destylacja konkretnego z parą wodną
- **FC** – chromatografia z przyspieszonym przepływem eluenta, chromatografia fletzowa
- **GC** – chromatografia gazowa
- **GC-MS** – chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas
- **GC-RI** – chromatografia gazowa połączona z oznaczaniem indeksów retencji
- **HD** – destylacja z parą wodną
- **HS** – faza nadpowierzchniowa
- **IPChŻ** – Instytut Podstaw Chemii Żywności, Politechniki Łódzkiej
- **MIB** – stężenie bójcze
- **MIC** – minimalne stężenie hamujące
- **MS** – spektrometria mas
- **NMR** – spektroskopia jądrowego rezonansu magnetycznego
- **OE** – olejek eteryczny
- **OL** – olejek lotny
- **RI** – indeks retencji
- **s** – odchylenie standardowe
- **SD** – destylacja z parą wodną dostarczaną z zewnątrz
- **SDE** – jednoczesna destylacja z parą wodną-ekstrakcja
- **SFE** – ekstrakcja ditlenkiem węgla w stanie nadkrytycznym
- **SHS** – analiza fazy nadpowierzchniowej metodą statyczną
- **SPME** – mikroekstrakcja do fazy stałej
- **s. m.** – sucha masa
- **TLC** – chromatografia cienkowarstwowa
- **tr** – zawartość śladowa
- $\bar{X}$ – wartość średnia

1. PRZEGLĄD LITERATURY

1.1. Metody wyodrębniania lotnych związków z roślin

Szeroko pojęta chemia i analiza związków lotnych jest intensywnie rozwijającą się gałęzią nauki. Pomimo wielu dostępnych technik izolowania i analizy składników lotnych, nadal poszukuje się doskonalszych metod. Wynika to ze wzrastających potrzeb poznawczych oraz wymaganych coraz szybszych, dokładniejszych i bardziej dostępnych metod kontroli jakości surowców i produktów, a także oceny stanu środowiska. Celem wielu badań naukowych jest poznanie składu jakościowego i ilościowego surowców naturalnych, w tym wyodrębnienie i identyfikacja lotnych składników, mających cenne właściwości zapachowe, lecznicze lub konserwujące.

Ze względu na sposób wydzielania lotnych składników oraz przygotowania próbki do analizy, wyróżnia się następujące metody izolowania związków lotnych:

- destylacja (np. destylacja z parą wodną)
- ekstrakcja
- analiza fazy nadpowierzchniowej, tzw. headspace (HS)
- techniki sorpcyjne, do których należy mikroekstrakcja do fazy stałej (SPME).

Metoda destylacji z parą wodną oraz ekstrakcja stosowane są nie tylko do wydzielania lotnych związków w celu ich późniejszej analizy, ale służą zarówno w skali laboratoryjnej, jak i przemysłowej do otrzymywania odpowiednich produktów: olejków eterycznych oraz ekstraktów. Natomiast metody tzw. headspace i sorpcyjne są technikami służącymi wyłącznie do pobierania próbek do analizy. W połączeniu z chromatografią gazową stanowią one szybkie i wygodne narzędzie analizy składu zarówno jakościowego, jak i ilościowego mieszanin lotnych związków [Da Costa i Eri, 2005].

1.1.1. Metody destylacyjne

1.1.1.1. Destylacja z parą wodną

Destylacja z parą wodną jest najstarszą, znaną i wykorzystywaną od wieków metodą izolowania lotnych składników roślin w postaci olejków eterycznych, które według definicji są mieszaninami wtórnych metabolitów roślin pozyskiwanych tą techniką. Wyjątkiem są olejki eteryczne otrzymane przez wyciskanie z naowocni cytrusów. Mieszaniny lotnych związków uzyskiwane z roślin innymi metodami noszą miano olejków lotnych [Stevens, 1999]. Destylacja z parą wodną jest procesem, w którym wysokowrzące składniki olejku można wydzielić w temperaturze niższej niż 100°C. Metoda ta stosowana jest zarówno

w przemyśle, jak i w laboratorium do izolowania olejków eterycznych, charakteryzujących się słabą rozpuszczalnością w wodzie i których składniki nie ulegają rozkładowi w warunkach procesu. Metoda polecana jest również do wydzielania olejków lotnych z olejów i tłuszczów.

Otrzymywanie olejków eterycznych w warunkach laboratoryjnych przeprowadza się w szklanych aparatach, których prototypem jest aparat Clevengera, a polską odmianą aparat Derynga [Klimek, 1957]. Metoda polega na oddestylowaniu olejku eterycznego z ogrzewanej w kolbie mieszaniny surowca olejkodajnego i wody (HD – hydrodistillation). W przemysłowej modyfikacji tej metody parę wodną dostarcza się do naczynia z surowcem z zewnątrz (SD – steamdistillation) [Gildemeister i Hoffman, 1956]. Substancje lotne destylują wraz z parą wodną, a następnie są kondensowane i jako lżejsze od wody i nie mieszające się z nią, zbierane są w odpowiednim fragmencie aparatury. Główną zaletą destylacji z parą wodną jest uzyskanie produktu pozbawionego składników nielotnych. Oczywiście jest natomiast, że w trakcie destylacji trwającej zwykle 3-5 godzin, w temperaturze zbliżonej do temperatury wrzenia wody, mogą powstawać artefakty: produkty izomeryzacji, cyklizacji, racemizacji, a także hydrolizy, eliminacji i transestryfikacji. W procesie destylacji, szczególnie roślin bogatych w saponiny, występuje niekorzystne zjawisko pienienia, któremu zapobiega dodatek substancji antypieniących, zanieczyszczających jednak destylat związkami krzemowymi [Da Costa i Eri, 2005].

1.1.1.2. Równoczesna destylacja z parą wodną-ekstrakcja

Równoczesną destylację z parą wodną-ekstrakcję (SDE – simultaneous distillation-extraction) umożliwia aparat Likensa-Nickersona. Typowa aparatura składa się z dwóch połączonych ze sobą kolb, ogrzewanych oddzielnie. W jednej znajduje się mieszanina surowca i wody, w drugiej rozpuszczalnik (np. pentan). Pary wody i lotnych składników surowca mieszają się z parami rozpuszczalnika w łączniku między kolbami, a lotne składniki są przenoszone między kondensującymi w chłodnicy parami, kondensat zawracany jest do odpowiednich kolb: woda do kolby z surowcem, a rozpuszczalnik ze związkami pozyskanymi z surowca do kolby pierwotnie wypełnionej czystym rozpuszczalnikiem. Po odparowaniu ekstraktu uzyskuje się olejek eteryczny. Ilość rozpuszczalnika stosowana w procesie jest mała, nawet w przypadku dużej masy surowca. Czas procesu destylacji z parą wodną-ekstrakcji to zwykle 2-4 godziny. Zastosowanie tej metody często skraca proces wydzielania olejku i podnosi jego wydajność w stosunku do metody destylacji z parą wodną. Produkty otrzymane metodą destylacji z parą wodną-ekstrakcji różnią się nieznacznie składem jakościowym i ilościowym od olejków eterycznych, ale podobnie jak te ostatnie nie zawierają

składników wysokowrzących i nielotnych, utrudniających analizę GC, mogą jednakże zawierać artefakty [Chaintreau, 2001; Da Costa i Eri, 2005].

1.1.1.3. Inne metody destylacji

Do wydzielania składników lotnych z roślin lub żywności o wysokiej zawartości wody stosować można destylację pod zmniejszonym ciśnieniem. Zasada metody polega na destylacji związków lotnych z wodą, a następnie skropleniu mieszaniny w układzie chłodzonym najczęściej ciekłym azotem. Zaletą tej metody jest brak artefaktów, co wynika z obniżonej temperatury procesu. Wadą zaś długi czas procesu, a także wymagana większa ilość surowca, gdy wydzielane składniki są polarne i trudniej lotne [Maarse i Belz, 1981; Marsili, 2002]. Metoda ta może być połączona z mikrofalowym ogrzewaniem surowca roślinnego (VMHD – vacuum microwave hydrodistillation). Olejek eteryczny uzyskany w ten sposób przypomina składem jakościowym olejek otrzymany przez destylację z parą wodną, różni się jednak znacznie udziałem poszczególnych składników [Scheffer, 1996].

Składniki lotne produktów żywnościowych opartych na bazie tłuszczów mogą być wydzielane za pomocą destylacji molekularnej, w której dla produktów pozbawionych wody, takich jak oleje, można stosować redukcję ciśnienia [Maarse i Belz, 1981; Reineccius, 1994].

1.1.2. Metody ekstrakcyjne

1.1.2.1. Ekstrakcja konwencjonalna

Ekstrakcja rozpuszczalnikami jest najczęściej stosowaną metodą izolowania różnych związków z produktów naturalnych zarówno na skalę laboratoryjną, jak i przemysłową. Produkty uzyskane w wyniku ekstrakcji rozpuszczalnikami znajdują szerokie zastosowanie w przemyśle perfumeryjnym i kosmetycznym. Proces ekstrakcji oparty jest na różnicy wartości współczynników podziału izolowanych składników między surowcem, będącym cieczą lub ciałem stałym, a rozpuszczalnikiem lub mieszaniną rozpuszczalników. Ekstrakt uzyskuje się przez mieszanie ręczne lub automatyczne surowca z rozpuszczalnikiem, który jest następnie oddzielany od matrycy. Punktem newralgicznym wszystkich metod ekstrakcyjnych jest dobór rozpuszczalnika, który szczególnie w przypadku wydzielania olejków lotnych, powinien mieć niską temperaturę wrzenia, pozwalającą na łatwe wydzielenie go z ekstraktu, bez strat składników. Rozpuszczalnik nie może maskować badanych związków podczas analizy chromatograficznej. Powinien również, w przypadku wydzielania naturalnych związków lotnych, ekstrahować składniki zarówno polarne, jak i niepolarne. Zaletą metody ekstrakcji rozpuszczalnikami organicznymi jest jej prostota oraz

wysoka wydajność izolowanych składników. Wadami zaś są straty najbardziej lotnych związków podczas zateżniania oraz obecność w ekstrakcie składników wysokowrzących i nielotnych, które utrudniają analizę metodą chromatografii gazowej. Zastosowanie tzw. prekolumny – krótkiej kolumny między dozownikiem a kolumną właściwą, adsorbującej składniki wielkocząsteczkowe, ułatwia analizę GC [Da Costa i Eri, 2005]. Frakcję lotną można również przed analizą wydzielić z ekstraktu następującymi metodami:

- destylacja z parą wodną, tak uzyskany olejek lotny może być bezpiecznie analizowany metodą GC
- wymrażanie związków nielotnych i dekantowanie (np.: tłuszcze, kwasy tłuszczowe, kofeina)

Najbardziej popularną laboratoryjną metodą ekstrakcji składników z matryc roślinnych jest ekstrakcja w aparacie Soxhleta. W zależności od składu matrycy oraz charakteru izolowanych związków stosowane są rozpuszczalniki niepolarne, polarne lub ich mieszaniny.

Zateżniony ekstrakt rośliny olejkodajnej uzyskany rozpuszczalnikami niepolarnymi nosi nazwę konkretnego. Jeśli konkretny rozpuści się w rozpuszczalniku polarnym (najczęściej etanol), wymrozi i odfiltruje nielotne substancje parafinowe, uzyska się tzw. absolut – cenny surowiec przemysłu perfumeryjnego. Zateżniony ekstrakt można również poddać destylacji z parą wodną, uzyskując olejek lotny, który jest cennym surowcem przemysłu kosmetycznego [Da Costa i Eri, 2005; Maarse i Belz, 1981]. Zarówno absolut, jak i olejek lotny to mieszaniny związków lotnych.

Jeśli cenne zapachowo składniki matrycy roślinnej są związkami termolabilnymi i ulegającymi degradacji pod wpływem wody i rozpuszczalników organicznych, do ich izolowania mogą być stosowane procesy maceracji lub nawaniania.

Maceracja polega na zaabsorbowaniu na gorąco (50-70°C) substancji zapachowych przez tłuszcze. Służy głównie do otrzymywania na skalę przemysłową absolutu z jaśminu, fiołka, kwiatów akacji, bzu, róży i żonkili. Jako absorbent stosuje się mieszaninę świeżych, bezwonnych, stopionych tłuszczów, np.: łój, smalec, oliwa, stosowany jest także olej parafinowy i benzoesan benzylu. Surowiec jest przez kilka godzin mieszany z tłuszczem, który następnie jest filtrowany. Po kilkakrotnej maceracji uzyskuje się pomadę, którą miesza się z etanolem. Z ekstraktu oddestylowuje się etanol, uzyskując absolut. Jest to metoda niezmienna od lat, czaso- i pracochłonna, ale umożliwia wyizolowanie labilnych składników lotnych [Bauer i in., 2004; Klimek, 1957].

Nawanianie („enfleurage”) jest również metodą absorpcji składników wonnych przez tłuszcze, ale stały (łój i smalec) i na zimno. Proces polega na ręcznym nanoszeniu płatków

kwiatów na szklane płytki pokryte tłuszczem. Warstwę tłuszczu wysyca się kilkakrotnie związkami lotnymi ze świeżego surowca. Proces jest żmudny i pracochłonny, stosowany jedynie wówczas, gdy w surowcu trwa biosynteza olejku nawet w czasie ekstrakcji oraz gdy surowiec ulega przemianom w wysokiej temperaturze. Metoda „enfleurage” najczęściej stosowana jest dla jaśminu i tuberozy, z których pozyskuje się cenny absolut z wydajnością znacznie wyższą niż w wyniku ekstrakcji rozpuszczalnikami, np. dla tuberozy jest ona piętnastokrotnie wyższa [Bauer i in., 2004; Klimek, 1957]. Metody maceracji oraz nawaniania, z racji swej czasochłonności, są wypierane przez mniej żmudne, aczkolwiek nie zawsze równie wydajne inne metody ekstrakcyjne [Bauer i in., 2004].

1.1.2.2. Ekstrakcja gazami w stanie nadkrytycznym

Ekstrakcja gazami w stanie nadkrytycznym (SFE – supercritical fluid extraction) jest doskonałą zachowawczą metodą izolowania składników surowców naturalnych, stosowaną od pięćdziesięciu lat. W metodzie tej wykorzystuje się właściwości rozpuszczalnika w warunkach ciśnienia i temperatury poniżej tzw. punktu krytycznego, w którym ekstrahent występuje równocześnie w fazie ciekłej i gazowej. Główną zaletą ekstrakcji gazami w stanie nadkrytycznym jest wielokrotne zwiększenie szybkości transportu masy i ciepła, a co za tym idzie, wzrost szybkości procesu ekstrakcji. Związane jest to z faktem, iż lepkość płynu nadkrytycznego jest podobna do lepkości gazu, ale współczynnik dyfuzji osiąga wartość zbliżoną do współczynnika dyfuzji cieczy. Nawet niewielkie zmiany temperatury i ciśnienia w obszarze bliskim punktu krytycznego prowadzą do zmiany gęstości rozpuszczalnika, co prowadzi do zmiany jego zdolności rozpuszczania. Proces ekstrakcji nadkrytycznej obejmuje trzy główne etapy: sprężanie rozpuszczalnika do stanu nadkrytycznego, ekstrakcja ciśnieniowa, separacja – wydzielanie składnika ekstrahowanego. Wydzielania składników z ekstraktu dokonuje się najczęściej przez zmianę temperatury i ciśnienia, w przypadku wydzielania kilku frakcji dokonuje się tego stopniowo. Prowadzi to do obniżenia gęstości związków, a w efekcie do wytrącenia składników. Rozpuszczalnik regeneruje się i ponownie wykorzystuje do ekstrakcji [Kaiser i in., 2001; Wolski i Ludwiczuk, 2001].

Dobierając odpowiednio warunki ekstrakcji (temperatura, ciśnienie, czas) można otrzymać produkt przypominający składem olejek eteryczny, a zmieniając stopniowo parametry procesu, można otrzymać frakcje zawierające różne składniki surowca. Produkty uzyskane tą metodą mogą jednak często znacznie różnić się składem nie tylko ilościowym, ale i jakościowym od olejków eterycznych. Efektywność wydzielania lotnych związków jest

wyższa dla surowców uprzednio nawilżonych wodą, lub będących gęstymi cieczami (szampony, kondycjonery) [Reverchon i in., 1995; Vilegas i in., 1995].

Zaletą ekstrakcji nadkrytycznej jest możliwość dużej selektywności, krótki czas ekstrakcji, zmniejszenie stopnia degradacji składników termolabilnych i wrażliwych na działanie tlenu. Sprężone gazy trudno ekstrahują składniki polarne, ale tę niedogodność można zniwelować dodając do nich modyfikatorów, np. metanolu czy etanolu, zwiększających rozpuszczalność związków polarnych w lipofilowym ditlenku węgla. Wadami tej metody są: wysoki koszt aparatury i jej eksploatacji oraz trudny i czasochłonny proces doboru odpowiedniego przedziału temperatur, ciśnienia i przepływu gazu [Da Costa i Eri, 2005; Maarse i Belz, 1981]. Najpopularniejszymi gazami stosowanymi do ekstrakcji gazami w stanie nadkrytycznym są: ditlenek węgla, tlenek azotu, amoniak, etan, propan, butan, heksan, woda, ksenon. Najczęściej stosowanym medium, ze względu na swe zalety, jest ditlenek węgla. Ma on dość niską temperaturę wrzenia ($-78,5^{\circ}\text{C}$), a parametry punktu krytycznego są następujące: $31,3^{\circ}\text{C}$, 72,9 atm. Ditlenek węgla jest naturalnym produktem metabolizmu, a jego pozostałości w ekstraktach są nieznaczne, ponadto jest nietoksyczny, niepalny i tani [Wolski i Ludwiczuk, 2001].

Ekstrakcja nadkrytyczna jest szeroko stosowana do pozyskiwania związków lotnych z surowców olejkodajnych [Reverchon i in., 1995], w tym również terpenów z igieł drzew iglastych [Orav i in., 1998].

1.1.2.3. Inne metody ekstrakcji

W celu zwiększenia wydajności proces ekstrakcji surowców olejkodajnych rozpuszczalnikami może być wspomagany ultradźwiękami lub mikrofalami (MAE – microwave-assisted extraction) [Dung i Thang, 2005].

Inną alternatywą klasycznej ekstrakcji jest wspomagana mikrofalami ekstrakcja bezrozpuszczalnikowa (SFME – solvent-free microwave extraction), która jest odmianą suchej destylacji z mikrofalowym źródłem ogrzewania. Izolowanie i zateżanie składników lotnych zachodzi w jednym etapie. Metoda ta stosowana jest do wydzielania olejków lotnych, aromatów, pestycydów, fenoli, dioksyn z różnego rodzaju matryc, takich jak: rośliny, żywność, gleba, osady. Główną zaletą metody jest skrócenie czasu wydzielania składników lotnych (do 30 min.) oraz oszczędność energii [Dung i Thang, 2005].

Do ekstrakcji związków lotnych z materiałów stałych stosuje się przyspieszoną ekstrakcję rozpuszczalnikami (ASE – accelerate solvent extraction). Metoda polega na umieszczeniu surowca w szczelnym szklanym pojemniku, który wypełnia się

rozpuszczalnikiem, a następnie wprowadzając azot wypycha się ekstrakt do odbieralnika. Zaletą tej metody jest używanie stosunkowo małej ilości rozpuszczalnika i krótki czas ekstrakcji nie przekraczający 15 min. Wadą zaś są straty najbardziej lotnych składników podczas ekstrakcji w wyższej temperaturze [Richter i in., 1996].

Ciekła żywność np.: mleko, przetwory owocowe czy produkty zawierające dużo oleju, mogą być wydzielane metodą odparowania składników lotnych wraz z rozpuszczalnikiem (SAFE – solvent assisted flavour evaporation). Ekstrakcja prowadzona jest pod zmniejszonym ciśnieniem i w niskiej temperaturze, a skład uzyskanej frakcji lotnej jest reprezentatywny dla badanego materiału – brak jest artefaktów. Produkt nie zawiera składników o wysokiej masie cząsteczkowej i barwników. Wadą tej metody jest skomplikowana aparatura i potrzeba jej częstego czyszczenia [Engel i in., 1999].

1.1.3. Analiza fazy nadpowierzchniowej

Analiza fazy nadpowierzchniowej (HS – headspace) jest metodą pobierania próbek związków lotnych z fazy gazowej. Analizie metodą GC poddaje się określoną objętość próbki w fazie gazowej lub powietrza zebranego znad próbki stałej lub ciekłej, pozostającego z nią w równowadze statycznej, jest to tzw. headspace statyczny (SHS – static headspace). Próbkę fazy gazowej, zawierającą składniki lotne, przenosi się w strzykawce bezpośrednio do kolumny (0,1-2,0 ml). Składniki lotne obecne w fazie gazowej nad surowcem można zateńczyć adsorbując je w rurce wypełnionej odpowiednim nośnikiem, a następnie wyeluować rozpuszczalnikiem. Jest to tzw. headspace dynamiczny (P&T – purge and trap, DHS – dynamic headspace). Wydajność zaadsorbowanych składników można zwiększyć poprzez podwyższenie temperatury lub mieszanie matryc ciekłych. Analiza fazy nadpowierzchniowej w połączeniu z metodą GC pozwala zidentyfikować składniki najbardziej lotne, obecne nad badanym surowcem i w dużym stopniu tworzące jego zapach [Da Costa i Eri, 2005]. Związki te, z racji swej wysokiej lotności, mogą być nieobecne w olejkach eterycznych czy ekstraktach lub mogą być maskowane w grupie pików pochodzących od rozpuszczalników na chromatogramie gazowym ekstraktów. Możliwe jest również określenie zawartości składników lotnych, które wykonuje się najczęściej metodą ze standardem zewnętrznym. Zaletą tej metody jest prostota oraz brak artefaktów i zanieczyszczeń. Wymaga ona ponadto niedużej ilości badanego surowca, który w analizie prowadzonej w temperaturze pokojowej nie ulega zniszczeniu. Wadą metody jest często niedostateczne dla potrzeb analizy metodą chromatografii gazowej stężenie składników lotnych. Ponadto różnice w lotności poszczególnych składników surowca mogą wpłynąć na zafałszowanie proporcji między

związkami, na korzyść składników bardziej lotnych. Profil składników lotnych produktu jest uzależniony od temperatury i czasu izolowania związków, wielkości kolby z materiałem oraz rozpuszczalności składników w matrycy. Metodę analizy fazy nadpowierzchniowej stosuje się w badaniu związków lotnych różnych produktów, zarówno kosmetyczno-perfumeryjnych [Da Costa i Eri, 2005; Marsili, 2002], jak i spożywczych: herbata, kawa, miód, orzechy [Wampler, 1997], owoce [Dirinck i in, 1984], surowce roślinne i olejki eteryczne [Kjeldsen i in, 2001; Jorgensen i in, 2000; Coleman i Lawrence, 1997; Boscherini i Michelozzi, 1993].

Doskonalszą odmianą analizy fazy nadpowierzchniowej jest nowa technika bezpośredniej desorpcji termicznej (DTD – direct thermal desorption). Analizowany surowiec umieszczany jest w komorze ogrzewanego do wysokiej temperatury urządzenia, które jest połączone z chromatografem gazowym. Wprowadzany do układu gaz nośny transportuje lotne związki znad surowca do kolumny chromatograficznej bezpośrednio lub po ich zatężeniu pułapce kriogenicznej. Zaletą tej metody jest prostota i szybkość wykonania, ale jej wadą jest wysoka cena urządzenia. Metoda stosowana jest do analizy składników lotnych żywności i roślin [Ozel i in, 2004; Grimm i in, 1997; Hartman i in, 1991; Marsili, 2002]. Była ona wykorzystana m.in. do analizy jakościowej i ilościowej składników lotnych emitowanych podczas suszenia drewna [Manninen i in, 2002b].

1.1.4. Mikroekstrakcja do fazy stałej (SPME)

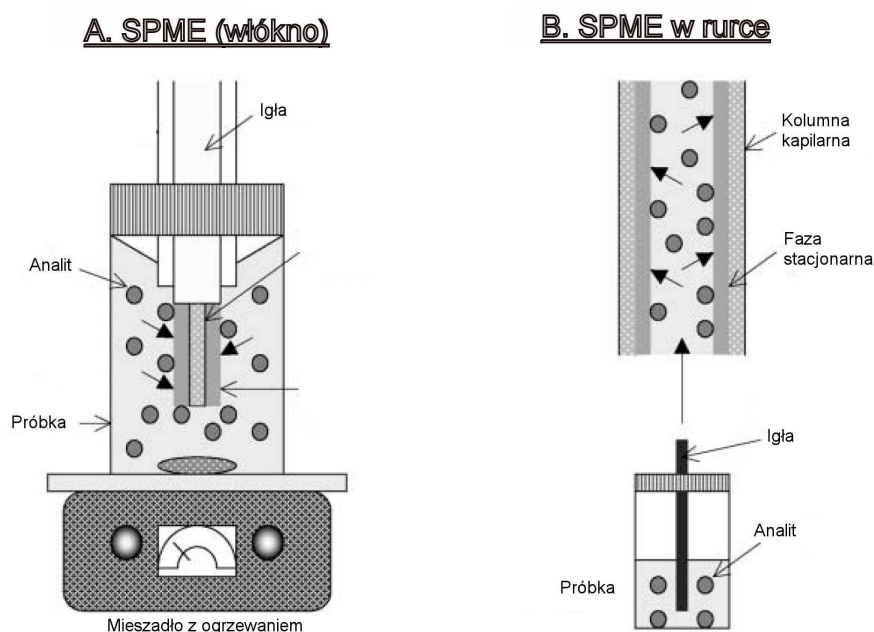
Pierwszym i bardzo ważnym etapem każdej analizy jest przygotowanie próbki. Etap ten decyduje w dużym stopniu o wiarygodności i dokładności wyników analizy. W klasycznych metodach przygotowania próbki ponad 80% czasu analizy przeznaczone jest na ekstrakcję, zatężanie, oczyszczanie i frakcjonowanie analitów. Dlatego też mimo, że rozwój technik przygotowania próbek zmierza obecnie głównie w kierunku obniżenia granicy oznaczalności, nadal dużo uwagi poświęca się ograniczeniu praco- i czasochłonności analizy, eliminowaniu lub minimalizowaniu ilości rozpuszczalników oraz automatyzacji procesu analitycznego. Metodą spełniającą oczekiwania analityków jest rozwijająca się dynamicznie w ostatnim dziesięcioleciu mikroekstrakcja do fazy stałej (SPME – Solid Phase Microextraction), zaliczana do technik sorpcyjnych [Baltussen i in., 2002], która w połączeniu z technikami analizy: GC, GC-MS, HPLC i LC-MS jest skutecznym i efektywnym narzędziem w analizie związków lotnych. Pomysłodawcą metody SPME jest Janusz Pawliszyn, który wprowadził ją w latach 90-tych XX wieku [Pawliszyn, 1997]. Popularność metody nieustannie rośnie, o czym świadczy ogromna ilość artykułów naukowych: Chemical Abstracts odnotowały pod hasłem SPME 117 publikacji w 1997 roku, a 468 w 2005 roku. Metoda mikroekstrakcji do

fazy stałej jest wciąż udoskonalana i automatyzowana zarówno przez samego twórcę, jak i w wielu ośrodkach na świecie.

Do technik sorpcyjnych należą również: HSSE – headspace sorptive extraction oraz SBSE – stir bar sorptive extraction, które wymagają użycia desorbera termicznego [Da Costa i Eri, 2005].

1.1.4.1. Metodyka SPME

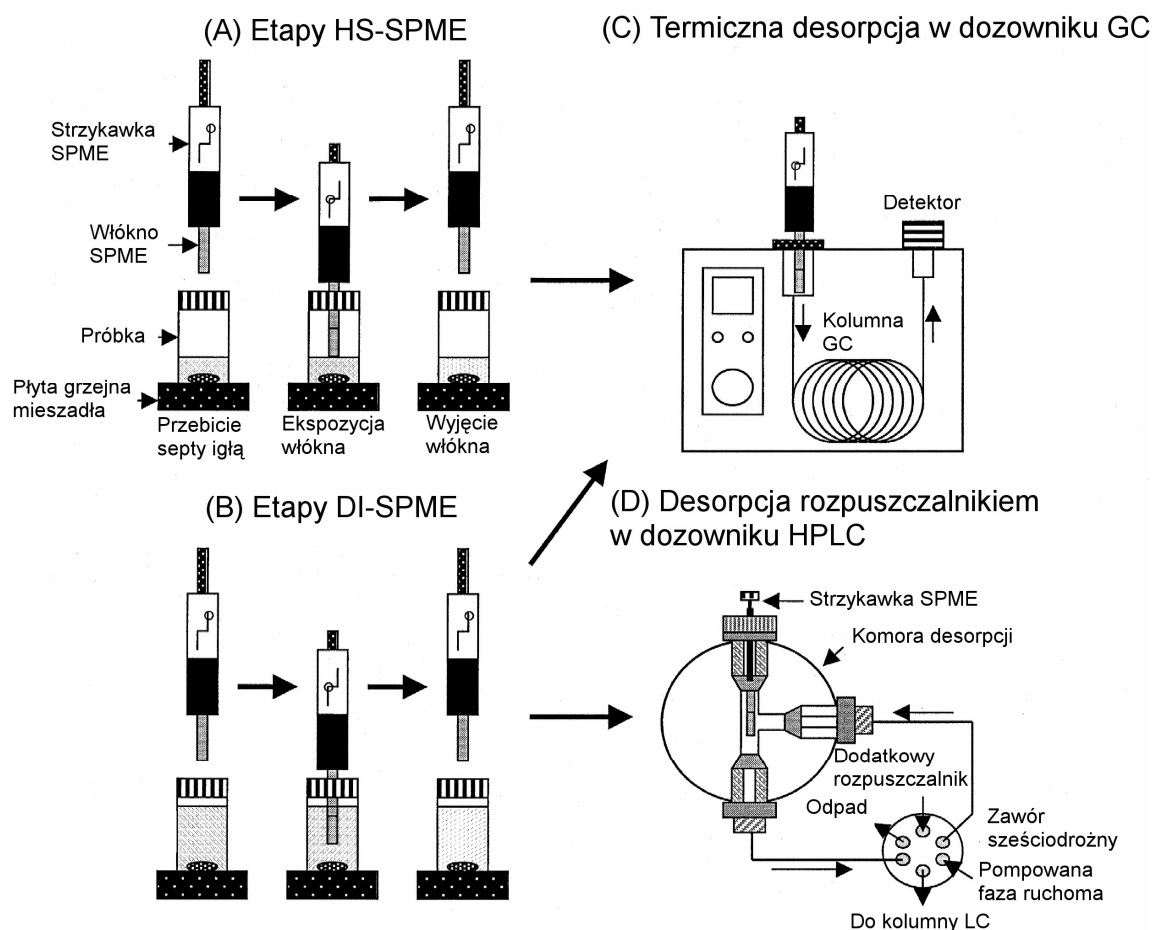
Metoda SPME opiera się na podziale składników lotnych między matrycę a włóknem i umożliwia pobieranie próbek składników lotnych z matryc stałych, ciekłych i gazowych. Składniki lotne są osadzane na włóknie SPME (Rysunek 1, A), a następnie są desorbowane termicznie (GC), np. w komorze dozownika chromatografu gazowego lub przez elucję rozpuszczalnikami (HPLC).



Rysunek 1. Ekstrakcja analitów (A) na włóknie SPME i (B) w rurce SPME [Kataoka, 2002]

Włókno SPME to warstwa odpowiedniego polimeru, długości 1 lub 2 cm osadzona na krzemowym rdzeniu. Włókno umieszczone jest w osłaniającej je rurce, z której jest wysuwane na czas ekstrakcji i desorpcji, lub wsuwane podczas przenoszenia znad próbki do dozownika, w celu ochrony przed uszkodzeniem i zapobieżeniem desorpcji osadzonych składników. Układ taki stanowi całość i może być wymiennie mocowany do strzykawki SPME. W celu przeprowadzenia ekstrakcji włókno umieszcza się nad badanym materiałem stałym lub ciekłym (headspace: HS-SPME) albo w próbce stanowiącej roztwór wodny

analizowanych składników lub gazie (direct immersion: DI-SPME) [Pawliszyn, 1997]. Można również umieścić włókno w zbiorniczkach, w których roślina gromadzi składniki lotne [Kubeczka, 1997]. Faza polimeru może być osadzona nie tylko na włóknie SPME, ale może również pokrywać wewnętrzną ściankę mikrokolumny kapilarnej – rurki SPME (Rysunek 1, B). Zastosowanie takiego układu rozszerza grupę adsorbowanych składników o związki nietlotne lub trudnolotne, termolabilne i polarne, takie jak: pestycydy, związki nieorganiczne lub jony metali [Baltussen i in, 2002; Zambanin, 2003]. Związki są adsorbowane na fazie stacjonarnej kolumny podczas jej okresowego wprowadzania do cieczy, a następnie po połączeniu z kolumną chromatografu cieczowego są analizowane metodą HPLC. Metoda nazywana jest SPME w rurce (in-tube SPME) [Kataoka, 2002].



Rysunek 2. SPME na włóknie z fazy nadpowierzchniowej: (A) HS-SPME i z roztworu: (B) DI-SPME połączone z systemem desorpcji (C) GC i (D) HPLC [Kataoka i in., 2000]

1.1.4.2. Dynamika procesu SPME

Mikroekstrakcja do fazy stałej jest metodą równowagową. Transport analitów do włókna SPME przebiega do momentu ustalenia się równowagi w systemie. Polimery stosowane w technice SPME mają właściwości absorbujące lub adsorbujące. Włókna jednoskładnikowe, będące cieczami o wysokiej gęstości, absorbują ekstrahowane z matrycy składniki, czyli pochłaniają je w całej objętości. Natomiast włókna wieloskładnikowe zachowują się jak adsorbenty: składniki izolowane z matrycy są osadzane na powierzchni nośnika i wewnątrz porowatych kanalików polimerów.

Proces absorpcji jest mniej skomplikowany w opisie matematycznym i jest to proces liniowy w większym zakresie stężeń analitów matrycy niż adsorpcja. Również dynamika procesu wyznaczana w ujęciu teoretycznym dla układu, gdzie włókno zanurzone jest bezpośrednio w cieczy lub gazie (DI-SPME), opisywana jest przez mniej zmiennych niż dla układu HS-SPME, w którym włókno umieszczane jest nad badaną matrycą.

Stała równowagi dla włókien o charakterze absorpcyjnym jest opisana prawem Nernsta:

$$K_{fs} = \frac{C_f}{C_s} \quad (1)$$

gdzie, K_{fs} jest stałą podziału analitu między włókno a matrycę, C_f i C_s to stężenie analitu w fazie równowagi odpowiednio we włóknie i matrycy.

Całkowita masa składnika (n_o) może być wyrażona jako:

$$n_o = n_f + n_s \quad (2)$$

gdzie, n_f i n_s określają odpowiednio masę analitu na włóknie i w próbce,

albo opisana przy użyciu stężeń analitu w każdej z faz:

$$C_o \times V_f = C_f \times V_f + C_s \times V_s \quad (3)$$

gdzie, V_f i V_s to objętości odpowiednio włókna i próbki.

Równanie (3), po przekształceniu daje równanie (4), które opisuje równowagę dla wariantu DI-SPME.

$$n = \frac{K_{fs} \times V_f \times V_s \times n_o}{K_{fs} \times V_f + V_s} \quad (4)$$

Typowy proces ekstrakcji SPME uważa się za skończony, kiedy stężenie analitu osiągnie stan równowagi pomiędzy surowcem a włóknem, czyli kiedy pomimo zwiększania czasu ekstrakcji ilość osadzonego analitu na włóknie jest stała.

Kiedy objętość próbki (V_s) jest o wiele większa od pojemności włókna (V_f), ($K_{fs} V_f \ll V_s$) równowaga procesu DI-SPME może być opisana uproszczonym wzorem:

$$n_f = K_{fs} \times V_f \times n_o \quad (5)$$

Równania (4) i (5) wskazują na proporcjonalną zależność pomiędzy stężeniem analitu w próbce a ilością wyekstrahowaną. Z zależności (5) wynika, iż efektywność ekstrakcji jest bezpośrednio uzależniona od współczynnika podziału K_{fs} . Dlatego też selektywność metody SPME w stosunku do wybranych analitów można regulować poprzez zmianę parametrów ekstrakcji SPME. Zmiany te mogą dotyczyć pH próbki, derywatyzacji analitów lub bardziej podstawowych czynników, jak np. dobór włókna SPME [Pawliszyn, 1997; Mullett i Pawliszyn, 2003]. Z równania (5) wynika, że ilość analitu zaabsorbowanego nie zależy bezpośrednio od objętości próbki, ale jest wprost proporcjonalna do jego stężenia w tej próbce. Pozwala to na wykorzystanie SPME do oznaczeń ilościowych, a także wskazuje na dogodność tej techniki w badaniach w terenie (poza laboratorium). W praktyce zaś oznacza, iż nie ma potrzeby prowadzenia SPME z ustalonej objętości próbki, dopóty dopóki włókno jest umieszczane bezpośrednio w badanym gazie czy roztworze wodnym. Jeśli natomiast warunki te nie są spełnione, w celu uzyskania dobrych parametrów ekstrakcji SPME, objętość próbki powinna być optymalizowana [Pawliszyn, 1997].

1.1.4.3. Optymalizacja procesu SPME

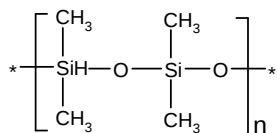
W rutynowych analizach metodą SPME pierwszym etapem procesu jest dobór i optymalizacja warunków mikroekstrakcji. Bywa to niekiedy czasochłonne, gdyż wymaga doboru wielu parametrów, takich jak:

- metoda SPME (DI-SPME, HS-SPME lub SPME w rurce)
- metoda analizy i detekcji (chromatografia gazowa lub cieczowa)
- włókno SPME
- objętość/masa próbki i objętość fiolki
- czas ustalania się równowagi i ekstrakcji
- optymalizacja innych warunków ekstrakcji SPME (mieszanie, temperatura, stężenie NaCl, pH)
- czas i warunki desorpcji.

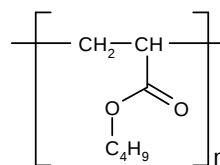
Wybór metody SPME jest determinowany przez właściwości analizowanych składników (lotność i polarność), a także rodzaj matrycy. Jeśli matrycą jest gaz (np. spaliny) lub związki organiczne w wodzie, można stosować technikę DI-SPME. Najczęściej jednak wykorzystywana jest metoda HS-SPME, która wyklucza oddziaływanie matrycy na włókno, bowiem sorpcja składników lotnych następuje z powietrza nad próbką. Zarówno metoda HS-SPME, jak i DI-SPME stosowane są głównie do analizy lotnych niepolarnych związków. Zastosowanie metody SPME w rurce umożliwia oznaczanie składników trudnolotnych i polarnych, zawęża jednak rodzaj detekcji do chromatografii cieczowej.

Ponieważ stosowane w SPME włókna (szczególnie jednoskładnikowe) działają wybiórczo na niektóre związki, dlatego wyniki analizy SPME można porównywać jedynie dla tych samych włókien [Pawliszyn, 1997].

Rodzaj włókna (polarność, porowatość) oraz jego grubość wpływają w zasadniczym stopniu na ilość osadzonych na nim składników. Włókna SPME można podzielić na dwie grupy: absorbujące – jednoskładnikowe i adsorbujące – wieloskładnikowe. Najbardziej popularnym absorbentem jest niepolarny polimer: polidimetylosiloksan – PDMS. Jest on skuteczny w ekstrakcji składników niepolarnych. Alternatywnym materiałem jest polarny poliakryl – PA, stosowany do analizy związków polarnych, np. fenoli i alkoholi.



Polidimetylosiloksan



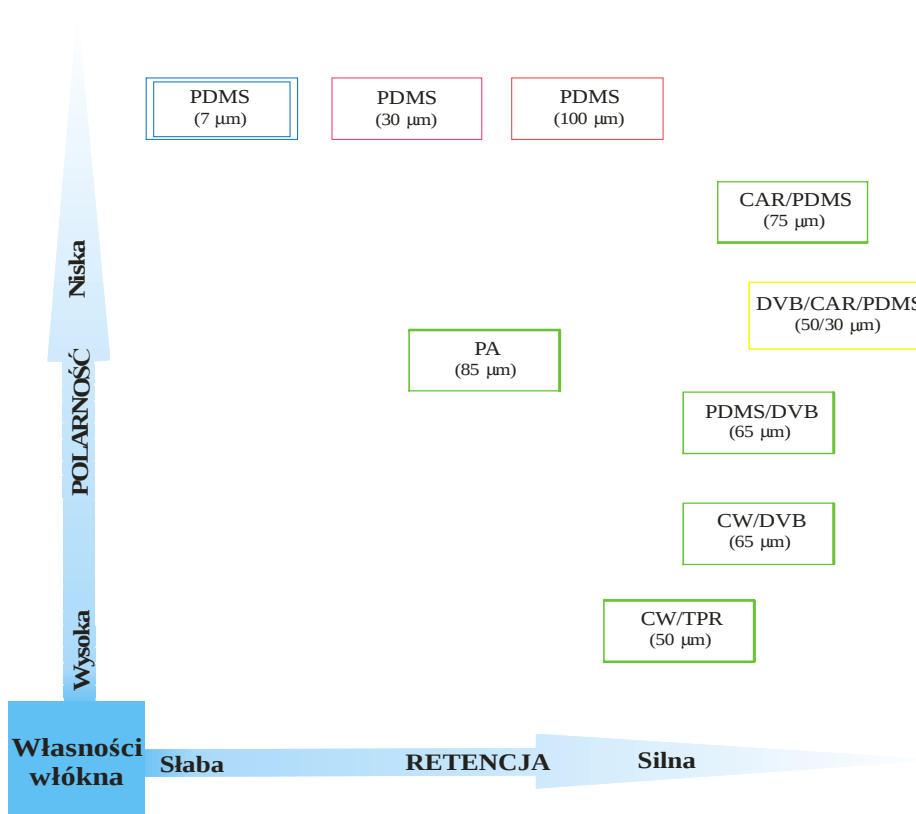
Polibutyloakryl

Włókna wieloskładnikowe mają zwiększoną zdolność adsorbowania składników o szerokim spektrum polarności i lotności. Jako warstwy adsorpcyjne włókien stosuje się: polidimetylosiloksan (PDMS), diwinylobenzen (DVB), CarboxenTM (CAR), Carbowax[®] (CW) oraz sieciowaną żywicę (TPR). W handlu dostępne są następujące włókna:

- PDMS – 100, 30 i 7 µm (GC/HPLC)
- PA – 85 µm (GC/HPLC)
- PDMS/DVB – 65 µm (GC), 60 µm (HPLC)
- CW/DVB – 65 i 70 µm (GC)
- CAR/PDMS – 75 i 85 µm (GC)
- DVB/CAR/PDMS – 50/30 µm (GC)
- CW/TPR – 50 µm (HPLC)

Włókna stosowane do GC mają długość 1 cm, a do HPLC – 2 cm.

Warstwy polimerów, ze względu na typ utwardzenia, mają odpowiednie przeznaczenie. I tak, włókna o niezwiązanej fazie można stosować do roztworów wodnych zawierających polarne rozpuszczalniki organiczne, ponieważ pod wpływem rozpuszczalników niepolarnych ulegają one rozdęciu. Włókna związane, podobnie jak częściowo lub wysokosieciowane, są stabilne prawie we wszystkich rodzajach rozpuszczalników (roztwory wodne), z wyjątkiem niektórych niepolarnych. Znakomita większość włókien może być stosowna bez zastrzeżeń w analizie HS-SPME. Szeroki wybór włókien o różnych właściwościach pozwala efektywnie przeprowadzić ekstrakcję składników, charakteryzujących się różną polarnością i wielkością cząsteczek (Rysunek 3).



Rysunek 3. Właściwości komercyjnie dostępnych włókien SPME [Kataoka, 2000]

 związane, niezwiązane, częściowo sieciowane, wysoko sieciowane

W przypadku analizy metodą HS-SPME, objętość fazy nadpowierzchniowej oraz wielkość fiołki wpływają na czas i wydajność ekstrakcji, determinują również kinetykę procesu ustalania się równowagi. Jeśli objętość fazy gazowej we fiołce będzie zbyt mała lub zbyt duża, tylko niewielka ilość składników zostanie zaabsorbowana przez włókno.

Efektywność metody SPME determinowana jest również czasem ekstrakcji, który z kolei uzależniony jest od czasu ustalania się równowagi między surowcem a fazą gazową, czyli czasu, po upływie którego stężenie analitu w fazie nadpowierzchniowej jest stałe.

Stężenie to wzrasta najszybciej w pierwszych kilku minutach procesu ustalania równowagi i układa się liniowo – dlatego też w analizie SPME nie jest wymagane uzyskanie całkowitej równowagi. W przypadku wydłużenia czasu ustalania się równowagi można zastosować krótszy czas ekstrakcji. Etapy te mogą być również optymalizowane poprzez podwyższenie temperatury, zastosowanie mieszania, regulację pH roztworu (dysocjacja związków) czy obecność w nim soli, jako czynnika wysalającego (NaCl , CaCO_3 , NaHCO_3) [Kataoka, 2000; Pawliszyn, 1997].

Ważnym elementem optymalizacji procesu jest również ustalenie czasu desorpcji (np. w dozowniku chromatografu), czyli czasu po upływie którego związki osadzone na włóknie zostaną z niego usunięte.

1.1.4.4. Ilościowe oznaczenia metodą SPME

Analizę ilościową składników oznaczanych metodą SPME można przeprowadzić czterema sposobami:

- kalibracja bezwzględna (standard zewnętrzny)
- dodatek wzorca
- standard wewnętrzny
- teoretyczne wyznaczanie współczynnika podziału analitu pomiędzy matrycę a włókno.

Trzy pierwsze techniki stosowane są rutynowo w ilościowym oznaczaniu związków lotnych, wydzielanych dowolnymi metodami. Metoda kalibracji bezwzględnej (standardu zewnętrznego) polega na przygotowaniu roztworów standardu (taka sama substancja jak substancja oznaczana) w rozpuszczalnikach organicznych lub osadzeniu ich w matrycy stałej i wyznaczeniu zależności pomiędzy stężeniem wzorca a polem powierzchni pod pikiem, odczytanym z chromatogramu gazowego. Jest to metoda prosta, odpowiednia dla względnie czystych próbek (prosty skład, znana matryca). Wykorzystując ją w analizie SPME oznaczano m. in. zawartość karwonu i limonenu w różnych odmianach kopru [Zawirska-Wojtasiak i Wąsowicz, 2002] oraz wybranych związków lotnych w winach [Buszewski i Ligor, 2001].

Metoda dodatku wzorca polega na dodaniu do badanej próbki znanej ilości oznaczanego składnika. Szukane stężenie określa się przez wyznaczenie krzywej kalibracyjnej (zależność powierzchni pod pikiem od stężenia), a następnie ekstrapolowaniu jej do ujemnej osi X. Różnica pomiędzy ekstrapolowaną wartością na osi X a wartością zero wyznacza stężenie. Metoda jest odpowiednia dla kompleksowych matryc, takich jak żywność. Metodą dodatku standardu oznaczano m. in. zawartość β -damaskonu w sokach z pomarańczy [Mahattanatawee i in., 2004].

Metoda wzorca wewnętrznego polega na dodaniu do badanej matrycy związku nie występującego w niej. Jest to metoda szybka, wygodna dla matryc wieloskładnikowych. W metodzie tej często wyznaczany jest teoretyczny lub eksperymentalny współczynnik korekcyjny dla detektora. Dodatek standardu wewnętrznego do analizowanej próbki może powodować jednak reakcję matrycy. Metodą wzorca wewnętrznego najczęściej oznaczane były lotne składniki roślin [Deng i in., 2004] oraz produkty autooksydacji tłuszczów [Vichi i in., 2003]. Bardzo wygodne, aczkolwiek drogie, jest stosowanie jako wzorców znakowanych izotopowo analizowanych składników, np. 2-furfuralu w analizie oliwy z oliwek [Giordano i in., 2003], formaldehydu w oznaczaniu czystości kosmetyków [Rivero i Topiwala, 2004].

Oznaczenie zawartości bezwzględnej poszczególnych składników mieszaniny można również wykonać wykorzystując podstawy teoretyczne metody SPME. Jest to, jak do tej pory, jedyny opisany w literaturze sposób oznaczania sumy wielu związków lotnych. Wykorzystuje się w nim współczynniki K_{fg} – podziału analitu pomiędzy włókno a fazę gazową. Współczynniki wyznacza się doświadczalnie lub teoretycznie, wykorzystując liniową zależność między logarytmami K_{fg} związków a ich indeksami retencji (RI) uzyskanymi na kolumnie GC, w liniowym programie temperaturowym analizy (LTPRI – linear temperature programmed retention index system). Stwierdzono występowanie bezpośredniej korelacji między rodzajem włókna SPME a kolumną kapilarną GC, zatem znając LPTRI związku, można wyznaczyć jego K w SPME. Metodą tą można określić ilość składnika, bez uprzedniej potrzeby kalibracji włókna SPME z zastosowaniem standardów.

Przeprowadzono doświadczenia dla szeregu homologicznego 29 alkanów oraz 33 węglowodorów aromatycznych w powietrzu. Obliczone teoretycznie i wyznaczone eksperymentalnie współczynniki podziału były zgodne, a zastosowanie ich w ilościowym oznaczaniu kilkudziesięciu składników benzyny było równie efektywne jak metoda referencyjna [Martos i in., 1997]. Opracowano też oznaczenie ilościowe 71 różnych związków lotnych, zawierających od 1 do 16 atomów węgla i różne grupy funkcyjne. Na podstawie indeksów retencji, temperatury wrzenia i grupy funkcyjnej badanych związków, zbudowano model regresji dla współczynnika K_{fg} . Ilość składnika zaabsorbowanego na włóknie określano w nanogramach [Bartelt, 1997]. Podobne doświadczenie przeprowadzono dla homologów alkoholi, związków karbonylowych i estrów. Stwierdzono, iż wraz ze wzrostem liczby atomów węgla w cząsteczce, rośnie również $\log K_{fg}$. Niskie wartości tego współczynnika przypisane są związkom o niewysokich temperaturach wrzenia oraz wysokich prężnościach par. Wartość współczynnika K_{fg} może służyć do oznaczania zawartości

składników lotnych i szybkości ich emisji z gazowych wydzielin ściółek drzew [Purzyńska i in., 2005].

1.1.4.5. Zastosowanie SPME

Prostota metody mikroekstrakcji do fazy stałej sprzyja jej zastosowaniu, m. in. w takich dziedzinach jak:

- ochrona środowiska – w monitoringu zanieczyszczeń gleby, powietrza, wód [Hawthorne i in., 1998; Llompert i in., 1999; Martos i in., 1997; Penalver i in., 1999; Zombonin, 2003] lub materiałów budowlanych [Wady i in., 2003]
- medycyna – analiza m. in. płynów ustrojowych, leków [Hiroyuki, 2003; Lee i in., 1998; Theodoridis i in., 2000], lotnych związków w wydychanym przez człowieka [Baltussen i in., 2002]
- analiza żywności [Jeleń i in., 2000; Kataoka i in., 2000; Vichi 2003; Yang i in., 1997; Holt, 2001]
- analiza surowców roślinnych [Isidorov i in., 2003; Tammela i in., 2003; Zini, 2002, Vereen i in., 2000].

Przydatność mikroekstrakcji do fazy stałej w analizie chemicznej została poparta wieloma publikacjami naukowymi, w których SPME porównywana była z innymi technikami wyodrębniania i analizy składników lotnych, takimi jak: destylacja z parą wodną, destylacja z parą wodną-ekstrakcja (SDE), analiza fazy nadpowierzchniowej (HS).

Technika HS-SPME, prowadzona w 20°C była równie skuteczna w jakościowych oznaczeniach lotnych składników (zanieczyszczeń) gleby jak statyczna metoda analizy fazy nadpowierzchniowej (95°C). Metody te nie sprawdziły się w analizie składników trudno-lotnych gleby, nawet po zwiększeniu temperatury ekstrakcji do 100°C [Llompert i in., 1999].

Czas ekstrakcji jest bardzo ważnym czynnikiem w analizie metodami HS i SPME. Oznaczając lotne składniki cedru (*Juniperus virginiana* L.) odnotowano, iż niewielkie wydłużenie czasu ekstrakcji, rzędu kilku sekund w SPME, a kilku minut w HS, powodowało wyraźne różnice w zawartości składników [Coleman i Lawrence, 1997].

Porównano dwie metody oznaczania lotnych składników w dwóch gatunkach bylicy. Metodą SPME wyizolowano i zidentyfikowano składniki bardziej lotne, a metodą destylacji z parą wodną, składniki mniej lotne, np. seskwiterpeny [Demirci i in., 2004].

Porównano również przydatność SPME i SDE jako metod wydzielania składników lotnych z wybranych owoców. Ekstrakcja SPME z użyciem włókna PDMS dała podobne rezultaty jak destylacja z parą wodną-ekstrakcja (podobna ilość wydzielonych

i zidentyfikowanych związków oraz zbliżone proporcje między składnikami). Różnicą było wykrycie niskocząsteczkowych estrów jedynie metodą SPME, zaś wysokiej zawartości α -terpineolu metodą SDE. Wolne terpenowe alkohole są produktami degradacji glikozydów powstającymi podczas obróbki termicznej owoców [Ceva-Antunes i in., 2003].

Porównawcze badania SPME i SPE (solid phase extraction) w analizie lotnych składników jabłek wskazały, że SPME jest idealną metodą oznaczania jakościowego i ilościowego (GC) lotnych związków tych owoców. Składniki o większej masie cząsteczkowej stanowiły duży udział w sumie związków wydzielonych metodą SPE, ale mniejszy w sumie składników wydzielonych w SPME, w której adsorbowane były na włóknie SPME dopiero po 90 min. [Matich i in., 1996].

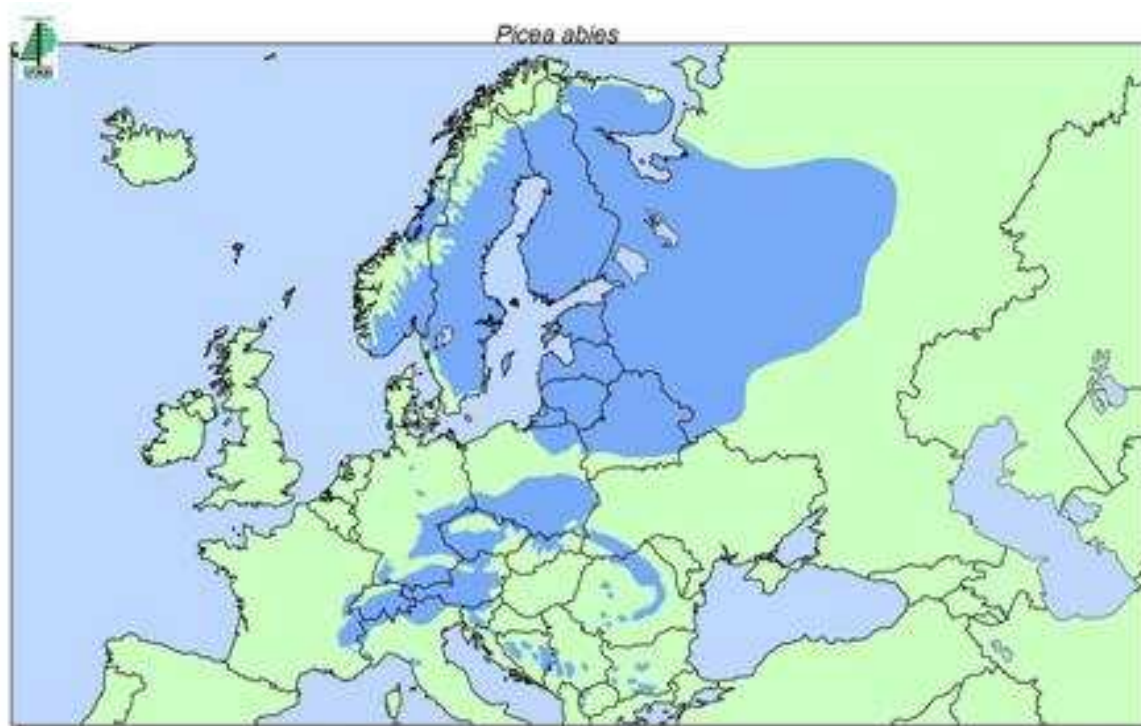
Skład związków zapachowych emitowanych przez lawendę porównano czterema metodami: HS-SPME, metodą SPTE (solid-phase trapping solvent extraction), destylacji z parą wodną (HD) i destylacji z parą wodną-ekstrakcji (SDE). Metody SPME i SPTE najdokładniej odzwierciedlały skład lotnej frakcji roślin, minimalizując wpływ enzymów na zmianę składu mieszaniny związków lotnych podczas ich wydzielania. Metoda SPTE pozwoliła na identyfikację najbardziej lotnych składników lawendy, nieobecnych nawet w próbce SPME, nie wykryto zaś nią składników o wyższej temperaturze wrzenia, które pojawiły się w próbce olejku otrzymanego metodą destylacji z parą wodną. Małe ilości surowca wymagane do badań są przewagą metody SPME (1-7 g), SDE (10 g) oraz SPTE (20 g) nad wymaganiami metody destylacji z parą wodną (300 g). Ta ostatnia jednak pozwoliła wyizolować olejek eteryczny (0,43%) będący cennym surowcem kosmetycznym. Polarne składniki lawendy (alkohole) oraz niskocząsteczkowe terpeny były słabo ekstrahowane podczas SPME na włóknie PDMS, w porównaniu np. z metodą SPTE. Kiedy jednak zmieniono włókno na bardziej polarne (PA lub CW/DVB), składniki polarne były wydzielane w stopniu zbliżonym do obu metod destylacji (HD i SDE). Pokazuje to, w jak dużym stopniu dobór włókna SPME wpływa na efektywność ekstrakcji [Kim i Lee, 2002].

Metoda HS-SPME jest doskonałym narzędziem w oznaczaniu jakościowego i ilościowego składu mieszanin, nawet bardzo złożonych. Stosowana jest też coraz szerzej do oznaczania zawartości pojedynczych lub kilku składników lotnych w różnych matrycach. Nadal jednak ma bardzo ograniczone zastosowanie w ilościowym określeniu sumy wielu składników różniących się lotnością i polarnością.

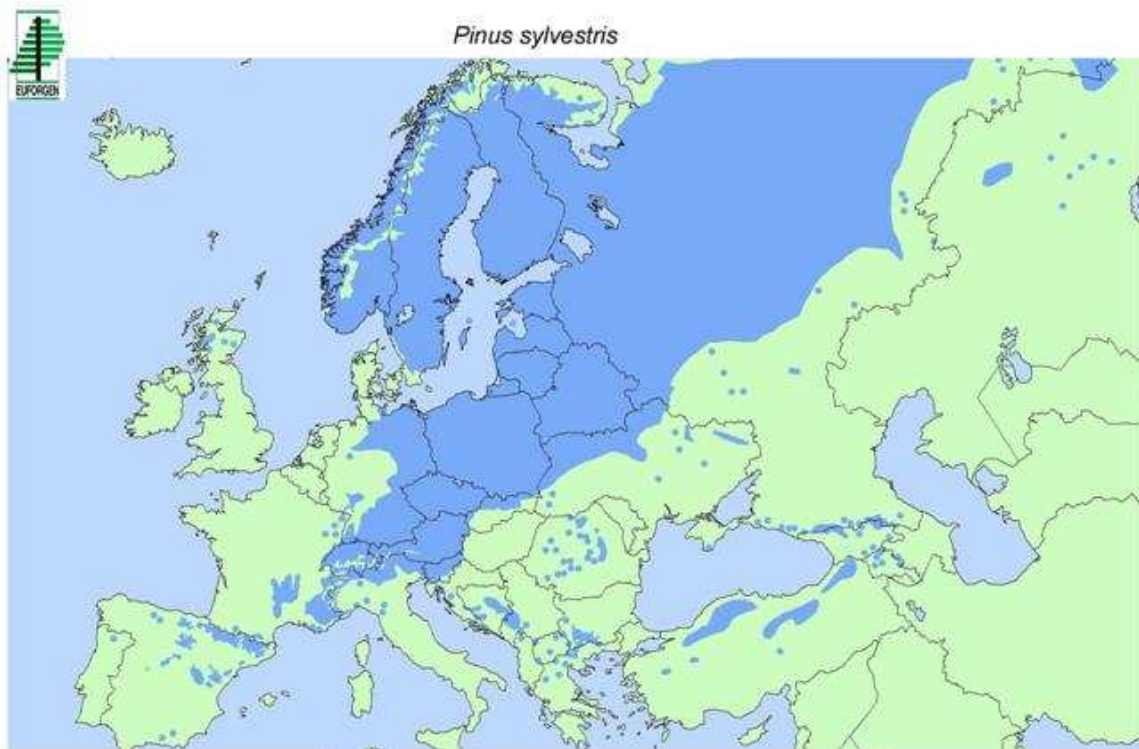
1.2. Charakterystyka drzew iglastych oraz ich składników lotnych

Liczący sześć rodzin i około 600 gatunków kosmopolityczny rząd Pinales jest najważniejszą grupą roślin nagonasiennych. Szpilkokształtne liście tych roślin – w większości wiecznie zielone – są dobrze przystosowane zarówno do gorącego lata, jak i mroźnej zimy oraz są odporne na uszkodzenia mechaniczne, dzięki temu na półkuli północnej drzewa szpilkowe tworzą bujne lasy. Najliczniejsza i mająca największe znaczenie ekonomiczne grupa drzew iglastych to licząca około 230 gatunków rodzina Pinaceae (sosnowate), reprezentowana we florze europejskiej, a zarazem polskiej, przez cztery główne rodzaje: *Pinus* (sosna zwyczajna *Pinus sylvestris* L.), *Picea* (świerk pospolity *Picea abies* (L.) Karst.), *Larix* (modrzew europejski *Larix decidua* Mill.) oraz *Abies* (jodła pospolita *Abies alba* Mill.).

Rejony występowania świerka pospolitego (Rysunek 4) oraz sosny zwyczajnej (Rysunek 5) na starym kontynencie to środkowa, północna i północno-wschodnia Europa. Świerk jest drzewem również terenów górzystych, występuje do 2000 m n.p.m. (Alpy). Północna granica występowania świerka i sosny przebiega w Norwegii (około 70°N), wschodnia na Uralu. Te dwa gatunki drzew dominują w drzewostanie Finlandii. W Polsce świerk występuje najliczniej w części północno-wschodniej oraz południowej (na Podkarpaciu i w górach). Z kolei sosna najbardziej popularna jest na nizinach i jest zarazem najważniejszym gatunkiem drzewostanów polskich i fińskich lasów.

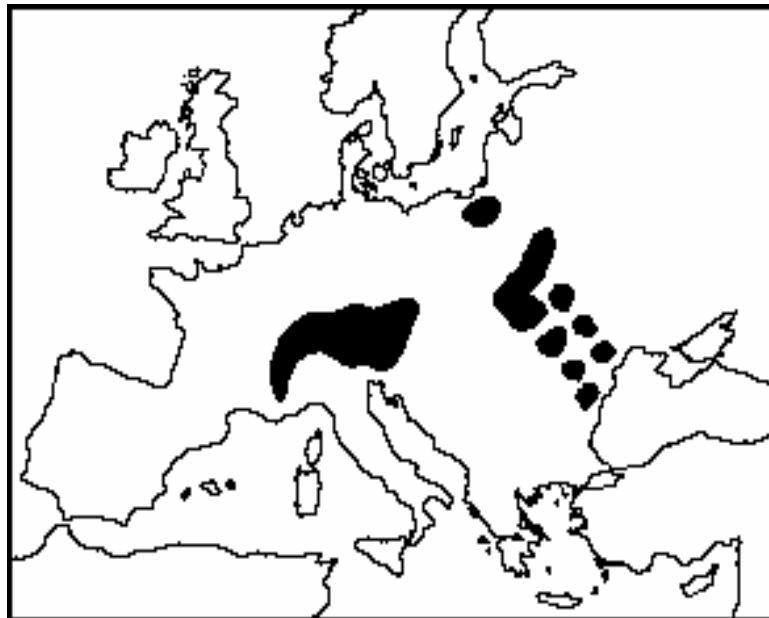


Rysunek 4. Rejony występowania świerka pospolitego w Europie [Schmidt-Vogt, 1997]



Rysunek 5. Rejony występowania sosny zwyczajnej w Europie [Schmidt-Vogt, 1997]

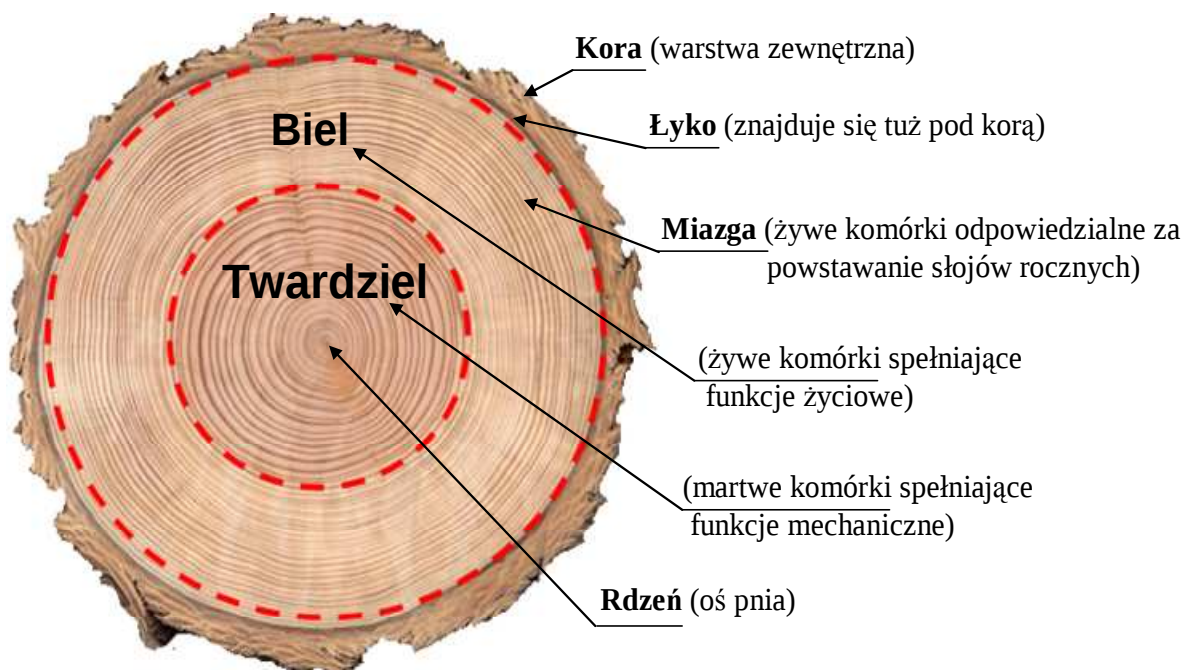
Modrzew europejski pierwotnie występujący w Alpach Centralnych, we wschodnich Sudetach, w Tatrach i na Niżu Polskim (Rysunek 6), został szeroko rozpowszechniony dzięki uprawom leśnym.



Rysunek 6. Rejony występowania modrzewia europejskiego w Europie [Mitchel i in., 1988]

Ogromne znaczenie ekonomiczne drzew z rodziny sosnowatych wynika z tego, że dostarczają one 75% drewna budowlanego i surowca do produkcji papieru. Ze względu na dobre parametry techniczne i trwałość, drewno świerkowe stosowane jest dodatkowo jako materiał na maszty, instrumenty muzyczne (drewno rezonansowe) oraz gonty. Drewno sosnowe zaś, ze względu na niską (w porównaniu z innymi gatunkami drzew) cenę, jest najczęściej wykorzystywane jako materiał konstrukcyjny. Wartość drewna modrzewiowego wynika z jego trwałości, którą modrzewie przewyższają wszystkie inne gatunki polskich drzew iglastych. Jego drewno stanowi znakomity materiał budulcowy (dworki, kościoły, spichrze). Na zalety drewna modrzewia zwrócono uwagę już w starożytności, polecając je szczególnie do budowy mostów. W średniowieczu drewno modrzewia, odznaczające się odpornością na paczenie, stosowano do wyrobu desek przeznaczonych do malowania obrazów [Tołpa i Radomski, 1980; Mała encyklopedia leśna, 1980].

Pień drzew, w tym świerka, sosny i modrzewia, złożony jest z wielu warstw, główne z nich przedstawiłam na Rysunku 7. Największy udział mają biel i twardziel. Drewno bielu (strefa zewnętrzna) jest żywą tkanką, przewodzącą w drzewie substancje odżywcze i wodę.



Rysunek 7. Przekrój poprzeczny pnia drzewa

W drzewach beztwardzielowych, takich jak brzoza, olsza, buk oraz w drzewach o niezabarwionej twardzieli (świerk, jodła), przekrój poprzeczny pnia ma jednolite jasne

zabarwienie. W wielu drzewach twardełowych biel odróżnia się od ciemno zabarwionej twardełi. W 100-letnim drzewie biel zajmuje w modrzewiu 15%, a w sośnie 50% powierzchni przekroju poprzecznego. Drewno twardełi to martwa tkanka, stanowiąca szkielet drzewa. Obejmuje drewno, w którym obumarły strefy bieli – promienie rdzeniowe, skupienia miękiszu i przewody żywiczne. W toku obumierania następuje przesycenie błon komórkowych substancjami twardełowymi: związkami żywicznymi, garbnikami i barwnikami. Wilgotność twardełi jest mniejsza (35-70%) od wilgotności bieli (50-150%) [Hejnowicz, 2002; Mała encyklopedia leśna, 1980].

Zarówno drewno, jak i pozostałe organy drzew iglastych (korzenie, kora, gałęzie, igliwie, szyszki, pąki) zawierają składniki lotne, głównie terpenoidy. Te związki obdarzone zapachem, wytwarzane i emitowane przez drzewa szpilkowe, wpływają dobroczynnie na zdrowie człowieka, przede wszystkim zaś na jego układ oddechowy. Sanatoria, zwłaszcza te dla chorych na gruźlicę, lokowane są w naturalnych lasach szpilkowych. Składniki lotne drzew iglastych są gromadzone w schizogenicznych kanalikach wydzielniczych, powstających przez rozsuniecie się komórek w tkance rośliny [Kubeczka i Schultze, 1987].

W drewnie i korze kumulowane są oleozywice, które niekiedy produkowane są w tak dużych ilościach, że pozyskuje się je przez nacinanie drzew, głównie *P. sylvestris* i innych gatunków sosny i jodły, rzadziej świerka i modrzewia (Rysunek 8). Oleozywice są homogenicznymi mieszaninami związków lotnych, stanowiących zwykle około 30% i nielotnych [Kubeczka i Schultze, 1987].

Z oleozywicy produkowana jest terpentyna i kalafonia. Wyróżnia się dwa zasadnicze typy terpentyny: terpentynę balsamiczną otrzymywaną metodą destylacji z parą wodną żywicy zbieranej z nacięć na pniach żywych drzew oraz terpentynę siarkową, będącą produktem ubocznym w przemyśle celulozowo-papierniczym, tzw. TMP-terpentynę (TMP-termomechanical pulping process). Terpentyny pocelulozowe stosowane są głównie jako rozpuszczalniki i rozcieńczalniki farb i lakierów. Terpentyna balsamiczna, zwana też olejkami terpentynowym, zajmuje pierwsze miejsce wśród olejków eterycznych pod względem wielkości produkcji [FAO; Kubeczka i Schultze, 1987]. Roczna światowa produkcja wynosi 100 tys. ton. Otrzymuje się ją z żywicy z wydajnością 18-20%, pozostałość podestylacyjna to kalafonia. Skład chemiczny terpentyny zależy jest od gatunku drzew, z których jest pozyskiwana i od sposobu wyodrębniania.

Żywica drzew iglastych, olejek terpentynowy oraz kalafonia od dawna stosowane były w medycynie. Olejek ma działanie wykrztuśne, rozkurczowe, odkażające. Nie jest stosowany wewnętrznie, gdyż działa drażniąco na błony śluzowe, ale izolowana frakcja pinenów jest

składnikiem kropli stosowanych jako środek moczopędny oraz przeciwbakteryjny. Terpentyna stosowana zewnętrznie (w maściach) ma działanie przeciwbólowe, rozgrzewające, aseptyczne. Dobrze wchłania się przez skórę, ułatwiając resorpcję rozpuszczonych w niej substancji. Kałafonia zawiera głównie diterpenowe kwasy żywiczne, m. in. kwas abietynowy. Działa przeciwbakteryjnie i rozkurczowo, z tego też względu jest składnikiem maści i plastrów. Dziegieńdz otrzymany przez suchą destylację drewna, głównie sosnowego, zawierający związki fenolowe (krezol, gwajakol), węglowodory aromatyczne, aldehydy i kwasy żywiczne, a także terpeny, działa silnie odkażająco i przeciwgrzybowo – stosowany jest w postaci maści w chorobach skóry [Góra i Lis, 2005; Reunanen i in., 1996].



Rysunek 8. Żywicowanie sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris*)

Obecnie terpentyna, najczęściej z sosny, wykorzystywana jest do otrzymywania tzw. syntetycznego olejku sosnowego (ponad 50% produkcji olejku), którego dużą część (40%) zużywa przemysł chemiczny. Izolowane z terpentyny α - i β -pinen służą do produkcji związków zapachowych, m. in. linalolu, geraniolu, nerolu, cytronellolu, cytralu, mircenu, kamfenu, jononów, octanu izobornylu.

Jako bogate źródło terpenów wykorzystuje się igliwie i cetynę (gałązki z igłami). Z surowców tych produkuje się na skalę przemysłową, metodą destylacji z parą wodną olejki eteryczne, znajdujące zastosowanie w wielu działach gospodarki, w tym w branżach perfumeryjnej i kosmetycznej oraz w lecznictwie.

Mimo znacznych różnic międzygatunkowych, główne składniki olejków rodzaju *Picea*, *Pinus* i *Larix* należą do tych samych grup związków chemicznych. Wśród monoterpenoidów dominują związki bicykliczne: α - i β -pinen, sabinen, kamfen, 3-karen i octan bornylu, często obecne są też: monocykliczny limonen i alifatyczny mircen. Najczęściej występujące seskwiterpeny to β -kariofilen, α -humulen, γ - i δ -kadinen oraz germakren D.

Udokumentowane jest występowanie chemotypów lub odmian chemicznych w obrębie określonych gatunków drzew iglastych oraz istotnych różnic w składzie między odmianami hodowlanymi [Back i Allen, 2000; Kubeczka i Schultze, 1987].

1.2.1. Świerk pospolity

Rodzaj *Picea* (świerk) liczy około 40 gatunków, z których najbardziej rozpowszechnionym na świecie i jedynym w Polsce, a także w Finlandii jest świerk pospolity – *Picea abies* (L.) Karst, syn.: *P. excelsa* (Lam.) LK. (Rysunek 9). Jest to najwyższe drzewo rodzime w Europie, osiągające wysokość do 70 m. Ciemnozielone igły o długości 1-2,5 cm, są sztywne, z zastrzonymi końcami. Rozdzielnopłciowe kwiaty kwitną w kwietniu – maju. Kwiatostany męskie mają kolor karminowoczerwony, jasnobrunatne szyszki żeńskie są podługne, licznie skupione w górnych partiach korony. Świerk korzeni się płytko w luźnych, próchniczych glebach przemarzających zimą. Produkuje butwinę, która zakwasza glebę. Skutkiem tego w monokulturach świerkowych ponowne obsadzenie tego obszaru drzewami liściastymi jest utrudnione [Tołpa i Radomski, 1980].

Lotne składniki drewna świerka pospolitego, izolowane różnymi technikami, były szeroko analizowane, chociaż nie wykorzystywano dotychczas do tego celu metody SPME. Według mojej wiedzy, tylko w jednej pracy analizowano oddzielnie skład terpenów bielu i twardzieli świerka, ale zidentyfikowano jedynie około 50% składników [Fuksman, 1990].

Zawartość oleożywicy w bielu *P. abies* jest znacznie większa niż w twardzieli, prawidłowość ta jest odwrotna dla *P. sylvestris* [Back i Allen, 2000]. Żywica świerka składa się w 50% z kwasów żywicznych, 20-30% stanowią monoterpeny, na pozostałość składają się inne terpeny i estry kwasów tłuszczowych. W Szwecji produkuje się rocznie około 540 ton TMP-terpentyny, będącej produktem odpadowym w produkcji papieru, a pochodzącej z drewna świerka pospolitego. Jej wydajność z miazgi drzewnej wynosi około 0,2 kg/ton.

Składa się ona z frakcji monoterpenowej (74%), seskwiterpenowej (13%) oraz diterpenowej (1%). Składniki niepolarne stanowią 92% terpentyny, pozostałe 8% to tlenowe pochodne terpenów [Lindmark-Henrikson 2003].



Rysunek 9. Świerk pospolity (*Picea abies* L.) [Herba]

Składniki lotne z drewna świerkowego wyodrębniano następującymi metodami:

- destylacja z parą wodną
- ekstrakcja konwencjonalna rozpuszczalnikami
- analiza fazy nadpowierzchniowej.

Drewno świerka pospolitego rosnącego w Szwecji zawierało 0,18% monoterpenów i 0,04% seskwiterpenów, w przeliczeniu na suchy surowiec [Lindmark-Henrikson, 2003].

Analizowano frakcję monoterpenową oleożywicy z drewna [Kimland i Norin, 1972; Persson, 2004] i olejku eterycznego, otrzymanego metodą destylacji z parą wodną drewna świerka [Groth i in., 1958]. Wydajność olejku wynosiła 0,04% w przeliczeniu na suchą masę drewna, a głównymi jego składnikami były α - i β -pinen, stanowiące odpowiednio 58% i 24%. Pozostałe to kamfen, 3-karen, limonen, p-cymen, terpinolen, mircen i β -felandren. Skład

oleożywicy był bardzo zbliżony do składu olejku, z tym iż oleożywica zawierała dodatkowo alkohole monoteprenowe: terpinen-4-ol, α -terpineol i borneol [Kimland i Norin, 1972]. Związki te oraz zidentyfikowane w TMP-terpentynie: myrtenol, 1,8-cyneol, fenchol, linalol, karwon są cennymi substancjami zapachowymi [Lindmark-Henrikson, 2003]. Zidentyfikowane w żywicy i terpentynie pinokarwon i *cis*-werbenol to feromony szkodników drzew, a *trans*- i *cis*-werbenol to semiozwiązki [Philips i Croteau, 1999]. Żywica oraz produkty z niej pozyskiwane są bogate w składniki seskwiterpenowe, wśród których dominują bicykliczne seskwiterpeny o szkielecie kadinanu: γ -muurolen, α - i δ -kadinen, α -kadinol. W znaczących ilościach występują również: α -longipinen, kopaen, longifolen, longicyklen oraz tlenowe pochodne seskwiterpenów: juniperol i nerolidol. Poza mono- i seskwiterpenami oleożywica z drewna i terpentyna zawierają składniki nieterpenowe: alkohole, aldehydy, związki aromatyczne oraz n-alkany C_{11} - C_{33} , przy czym dominującymi są alkany C_{22} i C_{27} . Wśród aldehydów dominują heksanal, heptanal i dekadienale, które mogą być produktami autooksydacji lub enzymatycznej degradacji kwasów tłuszczowych. Związki trudne takie jak węglowodory diterpenowe (pimaradien, izopimaradien, tunbergen-cembren) i ich tlenowe pochodne oraz nietłoczne woski, kwasy tłuszczowe i żywiczne, były wielokrotnie badane, nie tylko jako składniki terpentyny i żywicy z drewna [Lindmark-Henrikson, 2003; Staccioli i in., 1999], ale również jako składniki igieł, gałązek i kory świerka [Lorber i Zelman, 1988].

Ekstrakcja rozpuszczalnikami była najczęściej stosowaną metodą wydzielania składników z różnych części świerka. Z drewna świerka otrzymywano ekstrakty z wydajnością 0,8-2,5% s. m., zależną od rodzaju użytego rozpuszczalnika, a także od cech surowca [Englund i Nussbaum, 2000, Staccioli i in., 1999, Kimland i Norin, 1972]. Wydajność ekstraktów acetonowych wynosiła 1,0-2,5%, eterowych 0,8-1,5%, w niektórych przypadkach dochodziła nawet do 6,9% [Kimland i Norin, 1972]. Zawartość terpenów wydzielonych metodą ekstrakcji acetonem białego i twardego wynosiła 0,02-0,08% s. m. Głównymi składnikami były α -pinen (48-66%), β -pinen (12-24%), α -terpineol (5-12%) i limonen (2-7%) [Englund i Nussbaum, 2000].

Składniki lotne kory świerka pospolitego rosnącego w pięciu regionach Włoch badane były metodą analizy fazy nadpowierzchniowej (HS) połączonej z GC. Metoda headspace okazała się odpowiednia i szybka do analizy najbardziej lotnych składników w dużej populacji drzew. Głównymi składnikami kory były: α -pinen (28,4-30,9%) i β -pinen (58,4-61,0%). Zawartość tych dwóch monoterpenu oraz kamfenu i 3-karenu mogą, według autorów, stanowić wskaźnik określający przynależność świerka do danej grupy genetycznej.

Zidentyfikowano ponadto sabinen, mircen, limonen, 1,8-cyneol, γ -terpinen, p-cymen i β -kariofilen. Stwierdzono, iż skład terpenów emitowanych z drewna świeżego i suszonego był zbliżony. Ilość terpenów emitowanych z drewna poddanego działaniu wysokiej temperatury była wyższa o 10-50% niż ze świeżego surowca [Boscherini i Michelozzi, 1993].

Składniki lotne z kory świerka rosnącego w Niemczech analizowane były w ekstrakcie pentanowym. Zidentyfikowano 48 terpenów, ale nie podano ich zawartości (Tabela 1) [Heeman i Franke, 1977].

Kolejne doniesienie dotyczyło składu ekstraktów (eter dietylowy: eter naftowy, 1:9), z różnych organów kilku drzew gatunku *P. abies* rosnących w Rosji. Analizowano składniki lotne pnia, z podziałem na biel, twardziel i miazgę oraz gałęzie drzew (ich korę i drewno). Wydajność olejku lotnego z drewna wynosiła przeciętnie 0,04%. Skład jakościowy i ilościowy terpenów w ekstraktach był zróżnicowany i charakterystyczny dla danej tkanki drzewa. Charakterystyczną cechą frakcji lotnej ekstraktów z drewna i gałęzi (z wyjątkiem miazgi) była wysoka zawartość tlenowych pochodnych monoterpenów oraz znacznie mniejsza zawartość α -pinenu, który w olejkach tych nie był składnikiem dominującym (Tabela 1) [Fuksman, 1990].

Obok frakcji lotnej (głównie monoterpeny) w ekstraktach z kory świerkowej zidentyfikowano składniki nielotne (estry kwasów tłuszczowych, sterole, wyższe alkohole: C_{18} - C_{26} , wyższe węglowodory: C_{15} - C_{38}). Wśród alkoholi terpenowych oznaczono: borneol, terpineol, pimarol, dehydroabietol i abienol. Zidentyfikowano też trudnolotne tlenowe diterpeny: tlenek manoilu i tlenek *epi*-manoilu. Skład alkanów w *P. abies* był odmienny od składu tej grupy związków w *P. sylvestris*. Kora świerka zawierała alkany zarówno o parzystej jak i nieparzystej liczbie atomów węgla, natomiast sosna głównie alkany o nieparzystej ich liczbie. Skład węglowodorów alifatycznych w korze świerka był podobny jak w drewnie i żywicy tego gatunku [Norin i Winell, 1972].

Ekstrakt eterem naftowym z kory, gałązek i igieł świerka zawierał kwasy żywiczne, węglowodory i alkohole diterpenowe (abietol, neoabienol i dehydroabietol), aldehydy diterpenowe (neoabietal) oraz kwasy tłuszczowe (C_{17} - C_{24}). Zanotowano sezonowe zmiany w składzie ekstraktu z igieł i gałązek. Skład ekstraktu z kory był na tyle zmienny, iż nie można było go uzależnić od żadnego czynnika. Na skład ekstraktu może mieć wpływ nie tylko pora roku, ale i uaktywnione mechanizmy obronne drzewa wobec insektów czy mikroorganizmów [Lorber i Zelman, 1988].

Tabela 1. Skład chemiczny olejków z różnych części *Picea abies*

Składnik	Zawartość [%]									
	¹ Rosja					² Niemcy	³ Austria	³ Austria (handlowy)	⁴ Estonia	⁵ Rosja
	Pień			Gałązki		Kora	Cetyna		Igły	Igły
	Miazga	Biel	Twardziel	Kora	Drewno					
heksanal									0,3	
(E)-heks-2-enal									1,1	
(Z)-heks-2-enal									1,0	
santen							0,5	1,2	0,6	
tricyklen	2,0	2,0	0,6	0,8	tr	+	2,7	0,7	0,8	tr
α-pinen	29,4	3,4	9,1	9,1	9,2	+	14,2	21,5	4,1	1,2
kamfen	2,3	0,1	0,6	0,2	tr	+	26,5	7,0	10,6	11,1
β-pinen	17,2	5,0	1,0	7,9	3,4	+	4,8	31,9	0,9	
sabinen						+	0,6	0,3	0,5	
3-karen	6,5	1,4	0,9	2,7	tr	+	2,5	5,8	0,4	2,5
mircen	3,6	0,3	0,3	7,5	0,4	+	2,9	5,2	2,4	12,6
α -terpinen						+			0,3	
α -felandren						+			0,1	
limonen						+	15,9	9,5	11,3	5,9
β-felandren	0,1	0,6	0,1	0,8	0,2	+	1,1	5,1	-	12,7
1,8-cyneol						+	4,1	-	15,9	0,9
p-cymen									0,3	
trans-ocymen									0,2	
γ -terpinen	1,4	1,0	1,2	1,3	0,8	+			0,3	13,8
terpinolen	0,3	0,5	tr	tr	tr	+	0,5	0,8	0,3	
linalol									0,7	
geranial	0,1	0,2	tr	0,1	-					
neral	0,1	0,2	0,3	0,2	-					tr
kamfora	tr	0,5	tr	0,1	-	+	2,4	0,5	7,2	0,6
pinokamfon						+				
izopinokamfon						+				
pinokarwon						+				
fenchol						+				
eter metylowy tymolu						+				
myrtenal						+				
trans-pinokarweol						+				
izoborneol						+				
trans-werbenol						+				
borneol						+	4,9	0,8	7,4	
octan α-terpinylu						+			0,4	

Tabela 1. c.d.

Składnik	¹ Rosja					² Niemcy	³ Austria	³ Austria (handlowy)	⁴ Estonia	⁵ Rosja
	Pień			Gałązki		Kora	Cetyna		Igły	Igły
	Miazga	Biel	Twardziel	Kora	Drewno					
terpinen-4-ol						+	2,0	0,3	0,4	
α -terpineol						+	1,1	0,7	3,8	0,3
octan bornylu	11,0	9,1	7,3	5,8	2,7	+	5,1	2,9	12,2	22,2
β -cytronellol									0,6	
geraniol									0,4	
octan nerylu									0,1	
octan geranylu									0,1	
cyklosatiwen	1,2	3,3	1,9	4,6	-					
α -ylangen	0,5	0,4	0,3	tr	-					
α -kopaen	0,2	0,2	0,1	-	-				0,1	
longicyklen	0,2	-	0,2	0,8	-					
longifolen	2,5	7,6	7,0	10,7	43,0	+				2,8
β-kariofilen	1,8	2,0	1,5	3,5	1,3	+	-	1,2	0,1	
werbenon						+				
myrtenol						+				
gurjunen									7,0	
α-muurolen	1,1	3,6	1,4	1,8	0,6	+			tr	1,5
γ -muurolen	1,0	1,1	2,0	2,3	0,3	+			0,3	
piperitol	2,0	10,2	5,6	6,2	1,9					3,2
α-humulen	4,1	1,9	5,0	2,3	2,4		-	0,4	0,2	
germakren D									tr	
ϵ -muurolen									tr	
germakren B									tr	
α -kadinen										1,6
β - kadinen	1,0	0,1	tr	0,4	1,4					
γ -kadinen						+			0,2	
δ -kadinen						+	-	0,6	0,7	
α -farnezen									tr	
kalamenen									0,3	
tlenek kariofilenu									0,3	
T-kadinol									0,3	
α -kadinol									0,8	

tr – <0,1%; - – związek niewykryty, + – związek zidentyfikowany; ¹ [Fuksman, 1990]; ² [Heeman i Franke, 1977];³ [Kubeczka i Schultze, 1987]; ⁴ [Orav i in., 1996], ⁵ [Chernobrovkina i Stepanov, 1983]

Olejek eteryczny z igieł świerka pospolitego nie jest poznany tak dokładnie jak olejki z innych gatunków drzew iglastych (olejek ten nie ma takiego znaczenia w perfumerii jak olejki sosnowy i jodłowy).

Składniki lotne świerka były wyodrębniane z cetyny (gałązki z igłami) metodą destylacji z parą wodną. Skład olejku eterycznego uzależniony był od proporcji igieł i gałązek w surowcu. Prawidłowość tę zaobserwowano analizując skład olejku handlowego z cetyny świerka (głównie gałązki) z Austrii i olejku otrzymanego w laboratorium (głównie igły) (Tabela 1). Oba olejki składały się przede wszystkim z węglowodorów monoterpenowych, ale w oleju handlowym dominowały: α - i β -pinen, stanowiące ponad 53%, a w oleju z surowca zawierającego głównie igły: kamfen (26,5%), limonen (15,9%) i α -pinen (14,2%). Ponadto olejek ten zawierał więcej niż handlowy tlenowych pochodnych monoterpenów (około 15%) [Kubeczka i Schultze, 1987].

Olejek eteryczny z igieł świerka pospolitego z Estonii, otrzymany metodą destylacji z parą wodną-ekstrakcji, składał się w około 70% z tlenowych pochodnych monoterpenów, w tym: octanu bornylu (12,2%), borneolu i kamfory (do 7,4%). Jest to skład całkowicie odmienny od składu olejków z drzew *P. abies* rosnących w innych niż Estonia częściach Europy. W oleju zidentyfikowano 36 składników (Tabela 1) [Orav i in., 1996]. Składniki lotne z igieł świerka wyodrębniono również metodą ekstrakcji nadkrytycznej ditlenkiem węgla. Skład jakościowy i ilościowy obu olejków różnił się. Metoda ekstrakcji nadkrytycznej pozwoliła na izolację składników trudnolotnych np. diterpenów, których nie zidentyfikowano lub oznaczono w śladowych ilościach w oleju uzyskanym metodą destylacji-ekstrakcji. Wydajność olejków lotnych uzyskanych metodą ekstrakcji nadkrytycznej z użyciem etanolu jako modyfikatora była znacznie wyższa (1,06%), niż olejków uzyskanych metodą destylacji-ekstrakcji (0,21%). Zaletą metody ekstrakcji nadkrytycznej była też lepsza powtarzalność wyników, zarówno pod względem wydajności olejków, jak i zawartości składników. Olejek eteryczny był jednak bogatszy w bardziej lotne składniki [Orav i in., 1998].

Olejki oraz ekstrakty z różnych organów świerka rosnącego w Rosji, podobnie jak olejek z igieł świerka z Estonii, miały niekiedy skład bardzo odmienny od składu frakcji lotnej odpowiednich organów drzew rosnących w innych rejonach Europy. Charakterystyczną ich cechą była wysoka zawartość tlenowych pochodnych monoterpenów oraz bardzo niska zawartość α -pinenu (1,2%) [Chernobrovkina i Stepanov, 1983; Fuksman, 1990]. W oleju z igieł zidentyfikowano głównie mono- i seskwiterpeny, stanowiące odpowiednio 43,3% i 52,9% olejku. Głównym składnikiem był octan bornylu (22,2%), w znacznych ilościach

występowały również: γ -terpinen (13,8%), β -felandren (12,7%), mircen (12,6%), kamfen (11,1%) i limonen (5,9%) (Tabela 1).

Tabela 2. Zawartość terpenów w drewnie i korze świerka pospolitego zdrowego oraz zainfekowanego metylojasmonem [Martin i in., 2002]

Składnik	Zdrowe		Zainfekowane	
	Drewno	Kora	Drewno	Kora
	Zawartość [$\mu\text{g/g}$]			
santen	-	19,2	-	19,0
tricyklen	6,0	14,9	5,8	21,4
α -pinen	212,6	1.609,3	522,6	2.744,8
kamfen	15,9	68,0	22,0	127,7
β -pinen	225,6	4.586,3	836,8	6.388,1
sabinen	1,7	22,5	7,0	34,0
3-karen	-	109,8	4,3	123,2
α -felandren	-	11,8	-	15,3
mircen	15,7	240,8	56,1	337,8
limonen	10,0	100,5	35,6	463,1
β -felandren	38,3	623,5	142,6	845,9
1,8-cyneol	3,4	-	1,8	31,1
α -terpinolen	1,5	31,5	6,4	41,0
α -fenchon	3,1	31,6	2,1	44,9
octan bornylu	0,8	37,1	6,6	62,3
inne monotereny	1,4	37,5	1,5	54,4
suma monoterenów	536,0	7.544,3	1.651,2	11.354,0
longipinen	0,9	14,8	0,4	25,3
longifolen	25,	38,4	1,2	52,5
α -cedren	1,2	14,4	0,0	17,5
β -kariofilen	1,3	134,1	5,5	189,5
(Z)- β -farnezen	0,7	23,2	1,5	23,6
α -humulen	0,5	25,9	1,5	41,5
(Z,E)- α -farnezen	0,3	12,6	0,8	17,7
(E)- β -farnezen	-	5,7	-	8,0
(Z)- α -bisabolen	2,2	3,9	3,4	3,7
(E)- β -bisabolen	1,3	4,9	0,9	5,8
inne seskwiterpeny	4,5	20,0	7,0	25,5
suma seskwiterpenów	15,4	297,9	22,2	410,6
suma diterpenów	1.505,6	18.230,2	3.890,8	20.776,1

- - związek niewykryty

Składniki terpenowe żywicy spełniają doniosłą rolę w mechanizmie obronnym drzew iglastych wobec patogenów i wirusów. Żywica zlokalizowana w kanałach żywicznych wydzielana jest w momencie uszkodzenia mechanicznego drzewa, ataku przez insekty czy grzyby. Wielokrotnie badano zmiany składu frakcji lotnej żywicy drzew poddanych wpływowi niekorzystnych dla nich czynników (uszkodzenie mechaniczne, atak insektów czy mikroorganizmów, zanieczyszczone powietrze, ozon) [Lindskog i Potter, 1995; Manninen i in., 2000; Martin i in., 2002; Person, 2004; Philips i Croteau, 1999]. Analizując frakcje mono-, seskwi- i diterpenowej drewna oraz kory świerka zdrowego oraz zainfekowanego metylojasmonem stwierdzono, że ingerencja powodowała wzmożone wytwarzanie wszystkich grup terpenów, zarówno w drewnie, jak i korze. Składniki lotne wydzielane były metodą wielostopniowej ekstrakcji rozpuszczalnikami (Tabela 2) [Martin i in., 2002].

1.2.2. Sosna zwyczajna

Rodzaj *Pinus* (sosna) jest najliczniejszy wśród Pinales i obejmuje około 100 gatunków, z których najpospoliej występującym w Polsce i jedynym w Finlandii jest sosna zwyczajna *Pinus sylvestris* L. Drzewo dorasta do 40 m wysokości, żyje 100-120 lat. Jest to roślina jednopienna, lecz wytwarza osobne, wiatropylne kwiaty męskie i żeńskie. Owoc stanowi szyszka. Liście występują w dwóch formach: na młodych gałązkach są to szpilki osadzone skrótolegle na pędzie, a u starszych osobników przekształcone są w łuski, z których wyrastają krótkopędy (Rysunek 10). Na końcu krótkopędu znajduje się pęk kilku równowąskich szpilek, które pozostają na zimę, a opadają po 3-6 latach [Tołpa i Radomski, 1980].

Dorobek naukowy na temat składu chemicznego sosny – najbardziej znanego i rozpowszechnionego drzewa Europy, jest bogaty. Frakcja lotna z różnych organów drzewa została dość dokładnie zbadana, aczkolwiek brak jest szczegółowych informacji na temat porównania składu drewna bielu i drewna twardzieli sosny.

Frakcja monoterpenowa żywicy sosny stanowi 0,02-2% s.m. drewna. Jej ilość uzależniona jest nie tylko od czynników atmosferycznych, którym podlega populacja drzew, ale zmienna jest również w obrębie pnia jednego drzewa. Zawartość żywicy, a co za tym idzie składników lotnych, jest większa w twardzieli niż w bielu sosny, podczas gdy dla świerka zależność ta jest odwrotna. Charakterystycznymi seskwiterpenami drewna sosny zwyczajnej są longifolen oraz związki o szkielecie muurolanu: α -, γ - i ε -muuroleny. Gatunki sosny charakteryzują się obecnością innych seskwiterpenów specyficznych dla każdego z nich, np. humulenów i izokariofilenu (*P. palustris*) czy kadinenów (*P. edulis*) [Back i Allen, 2000].



Rysunek 10. Sosna zwyczajna (*Pinus sylvestris* L.) [Herba]

Z drewna i żywicy sosny pozyskiwane są liczne aromatyczne produkty. Najważniejszym z nich jest olejek terpentynowy. W Polsce terpentyna otrzymywana jest głównie z drewna sosnowego (90%). Frakcja monoterenowa terpentyny zawierała: α -pinen (50%), 3-karen (35%), α -terpineol (10%), kamfen, β -pinen i limonen [Góra i Lis, 2005]. Frakcja seskwiterpenowa, stanowiąca około 10% terpentyny, zawierała głównie węglowodory seskwiterpenowe: α -muurolen (22%), longifolen (17%), γ -muurolen (6%), α -, γ - i δ -kadinen, α -longipinen, α -kopaen, δ -elemen, *trans*- α -bergamoten, β -kalakoren, *cis*-kalamenen. Obecne były także: δ -kadinol, metyleugenol i benzoesan benzyli [Kula i in., 1996].

Do oznaczania składników lotnych z drewna sosnowego stosowano następujące metody:

- ekstrakcja konwencjonalna rozpuszczalnikami
- analiza fazy nadpowierzchniowej
- mikroekstrakcja do fazy stałej.

Drewno sosny jest cennym materiałem budulcowym, stanowi element otoczenia człowieka, a zawarte w nim i emitowane lotne składniki oddziałują na układ oddechowy. Podejmowano liczne badania oznaczania ilościowego i jakościowego lotnych składników emitowanych z drewna sosny suszonego na powietrzu i termicznie. Cechą charakterystyczną są często bardzo odmienne rezultaty, które można wyjaśnić różnymi technikami suszenia drewna oraz wydzielania i oznaczania terpenów. Manninen i in. [2002b] stwierdzili, iż drewno sosny wysuszone na powietrzu w temperaturze pokojowej wydzielalo w warunkach analizy około osiem razy więcej składników lotnych niż drewno wysuszone w temperaturze 230°C przez 24 godz. Autorzy wykorzystywali metodę analizy fazy nadpowierzchniowej (DHS) z użyciem polimeru Tenax TA, połączoną z metodą termicznej desorpcji (DTD). Wysuszone na powietrzu drewno sosny emitowało głównie terpeny (α -pinen i 3-karen) oraz heksanal, podczas gdy drewno poddane obróbce termicznej: aldehydy, kwasy karboksylowe i ich estry. W grupie tej dominowały 2-furanokarboaldehyd i kwas octowy, wykazujące niekorzystny wpływ na układ oddechowy człowieka, a powstające na skutek termicznej degradacji celulozy [Manninen i in., 2002b].

Porównano wydajność frakcji monoterpenowej ekstraktów z bielu i twardzieli sosny świeżych oraz poddanych obróbce termicznej. Wydajność frakcji monoterpenowej ekstraktów acetonowych ze świeżego drewna bielu wynosiła 0,4-0,5%, a z drewna twardzieli była dwukrotnie wyższa: 0,8-1,1%. Ilość monoterpenów emitowanych podczas suszenia bielu (60°C) stanowiła 20-40% pierwotnej ich zawartości w tej warstwie drewna, natomiast dla twardzieli sosny wartość ta wynosiła 25-50%. Podwyższenie temperatury suszenia do 110°C, powodowało wzrost ilości emitowanych terpenów. Głównymi monoterpenami drewna świeżego i suszonego były: α -pinen, β -pinen i 3-karen, które stanowiły 86-98% frakcji lotnej. Mierzono różnicę masy ekstraktów otrzymanych przed i po suszeniu drewna. Metoda konwencjonalna – ekstrakcja rozpuszczalnikami w aparacie Soxhleta okazała się dokładniejsza niż metoda analizy fazy nadpowierzchniowej, która dawała wyniki o niedostatecznej powtarzalności [Englund i Nussbaum, 2000].

Zawartość dwu głównych składników α -pinenu i 3-karenu emitowanych podczas suszenia bielu i twardzieli sosny w temperaturze 50, 70 i 90°C, oznaczana była metodą mikroekstrakcji do fazy stałej ze standardem zewnętrznym. Ilość związków lotnych emitowanych z twardzieli była trzykrotnie większa niż z bielu. Emisja składników lotnych z warstw drewna wzrastała wraz ze wzrostem temperatury suszenia i w temperaturze 50°C i 90°C wynosiła odpowiednio: α -pinen 400 i 1850 mg/kg z bielu, 1200 i 3600 mg/kg z twardzieli; 3-karen: 1200 i 3000 mg/kg z bielu, 4000 i 8500 mg/kg z twardzieli. Analiza

SPME-GC pozwoliła zidentyfikować również pimaral, biformen, terpinolen i α -muurolen, mające duży udział w mieszaninie emitowanych składników [Bengtsson i Sanari, 2004].

Metodą analizy fazy nadpowierzchniowej (DHD) oraz mikroekstrakcji do fazy stałej (SPME) analizowano składniki lotne, w tym enancjomery monoterpenów, w zdrowym i zakażonym uprzednio grzybami drewnie, m. in. sosny zwyczajnej. Metody te wybrano ze względu na ich prostotę i szybkość, a także nieinwazyjność w stosunku do wrażliwych na działanie wysokiej temperatury enzymów [Faldt, 2000].

Aktywne mechanizmy obronne sosny w przypadku ataku, m. in. grzybami *Periderum pini*, powodują wzmożone wydzielanie oleożywicy, w tym składników lotnych. Fakt ten został odnotowany na podstawie porównawczej analizy jakościowej i ilościowej frakcji lotnej ekstraktów z drewna drzewa zdrowego i chorego. Składniki lotne były wydzielane z ekstraktów metodą destylacji z parą wodną [Westfelt, 1966a, b].

W drewnie sosny zidentyfikowano liczne trudnolotne diterpeny: węglowodory (pimaradien i izopimaradien), alkohole (abietinol, pimarinol, izopimarinol i dehydroabietol), aldehydy (abietinal, dehydroabietinal, pimarinal i izopimarinal), nielotne diterpenowe kwasy żywiczne (lewopimarowy i abietynowy), ale również inne związki nielotne: wolne kwasy tłuszczowe stanowiące 7,5% oleożywicy (głównie kwas palmitynowy, oleinowy, linolowy i linolenowy) i składniki neutralne takie jak: węglowodory (C_{12} - C_{33}), woski, tri-, di- i monoglicerydy [Assarsson i Akerlund, 1969; Erdtman i Westfelt, 1963; Hafizoglu, 1983].

Poza bogatym w oleożywicę drewnem, również igły oraz cetyna sosny stanowią cenne źródło związków lotnych, pozyskiwanych na skalę przemysłową jako olejek eteryczny. Olejki sosnowe otrzymuje się z kilkunastu gatunków sosny, zależnie od regionu świata, m. in. w Skandynawii i Polsce z *P. sylvestris*, we Francji z *P. pinaster*. Olejki z *P. sylvestris* i *P. mugo* wyróżniają się wysoką zawartością 3-karenu. Wspólną cechą większości olejków sosnowych, odróżniającą je od olejków z innych drzew iglastych, jest wysoka zawartość seskwiterpenów.

Olejek eteryczny z igieł sosny zwyczajnej należy do najszerzej badanych w ostatnich latach olejków drzew iglastych, o czym świadczą prace przeglądowe [Góra i Lis, 2005; Lawrence, 1991; 2001; 2003]. Składniki olejku sosnowego z surowca z różnych krajów przedstawione są w Tabeli 3. Wydajność olejku wynosiła 0,20-0,35% i zależała głównie od pochodzenia surowca i terminu jego pozyskiwania. Na podstawie wieloletnich badań ustalono, iż najbardziej olejkodajne są surowce pozyskiwane w kwietniu, a najmniej w lipcu. Na wydajność wpływa także czas upływający od zbioru do destylacji [Góra i Lis, 2005].

Tabela 3. Skład olejku sosnowego z cetyny (*Pinus sylvestris*) z surowca z różnych krajów

Składnik	Finlandia ¹	Austria ¹	Francja ²	Jugosławia ¹	Litwa ³	Rosja (Kaukaz) ²	Rosja (Syberia) ¹	Portugalia ¹
	Zawartość [%]							
(E)-heks-2-enal					tr-1,0			
(Z)-heksan-3-ol					0-0,1			
tricyklen	1,1	0,9	0,7-0,8		0,2-1,2	tr		
α -tujen					0,1-0,7			
α-pinen	64,3	42,1	22,2-41,1	34,7	18,5-33,0	20,3	28,0-31,0	20,3
kamfen	4,7	4,1	3,2-3,3		1,5-5,3	9,4	6,5-8,6	7,1
β-pinen	3,1	1,9	3,8-18,4	20,6	0,6-2,1	2,0	8,3-10,3	4,7
sabinen	0,5	0,7	0,3-0,5		0,3-0,7			0,9
2-karen					0-0,1			
3-karen	17,8	20,6	0-43,3		9,1-24,6	20,4	9,5-11,3	1,8
mircen	1,8	2,2	3,1-3,6	1,2	1,3-2,3		2,1-3,8	
α -terpinen	0,1	0,2	tr		tr-0,1	3,2		3,0
limonen	1,8	5,2	0,9-2,6		0,6-1,2	3,1		3,6
β-felandren	1,2	0,3	0,7-0,9			4,0	8,6-10,9	
γ -terpinen	0,1	0,3	0,1-1,1		0,1-0,3	0,2	0,2-0,4	0,3
β -ocymen (E,Z)		0,8	1,1-1,3		0-1,8			2,3
p-cymen		0,1	0,2-0,3	7,6	0-0,2	tr		
terpinolen	1,5	1,7	0,8-4,1	0,5	1,0-2,4	tr		2,3
p-cymen-8-ol					0-tr			
borneol			1,8-5,8	0,7			0,1-0,3	0,3
terpinen-4-ol			0,8-1,1		t-0,1			1,9
α -terpineol		tr		2,3	0-0,1	1,9		0,4
octan bornylu		0,2	0,1-0,3	4,2	0,5-2,6	1,7	2,9-4,2	0,6
2-undekanon					0,1-1,1			
octan terpinen-4-ylu					0,2-0,4			
octan α -terpinyłu					tr-1,2			
longifolen			tr			3,5	0,5-1,2	1,1
α -kopaen					0,2-0,6			
α -kubeben		0,2						
β -burbonen					0,1-0,2			
β -elemen					0,8-2,7			
metylloeugenol					0-tr			
β-kariofilen		1,0	3,1-3,8		2,6-4,9	1,7	3,3-3,8	1,1
α -muurolen			0,1-0,3		0-1,3	2,6	7,8-11,6	
γ -muurolen			0,8-0,9		0,5-1,5		0,5-0,9	
α -humulen		tr	0,6-1,1		0,6-1,5	1,8		0,7
germakren D		1,5			1,4-6,0			0,4
α -kadinen			0,1-0,3		0,2-0,4		0,3-0,6	
γ -kadinen			0,5-0,8		3,0-5,5	5,4		
δ-kadinen		4,8	1,2-4,0		4,7-11,6	9,5		
germakren D-4-ol		1,9			2,6-13,2			
β -bisabolen					0,1-0,2	0,2	6,3-8,5	
nerolidol								8,0
<i>epi</i> - α -kadinol		0,6	0,3-0,9					
<i>epi</i> - α -muurolol		0,6	0,3-0,9					
α -kadinol		1,3	0,4-1,6		1,9-7,7			

tr – <0,1%; ¹ [Lawrence, 1991]; ² [Góra i Lis, 2005]; ³ [Lawrence, 2003]

W olejku sosnowym dominują węglowodory monoterenowe (75 %). Większość z nich została zidentyfikowana już na początku XX wieku. Głównymi składnikami są: α -pinen,

3-karen, β -pinen, kamfen i β -felandren. Skład ilościowy frakcji monoterpenu jest zmienny, zależny od pochodzenia surowca. Zawartości głównych składników w olejku sosny zwyczajnej wahały się w zależności od pochodzenia następująco: α -pinen od 19% (Litwa) do 64% (Finlandia), β -pinen od 2% (Austria, Estonia) do 20% (Jugosławia), 3-karen od 0 do 43% (Francja i pozostałe kraje), kamfen od 2% (Litwa) do 7% (Portugalia), β -felandren od 0 do 11% (Syberia) i limonen od 1% (Francja) do 5% (Austria) [Góra i Lis, 2005; Lawrence, 2003; Orav i in., 1996]. Olejek sosnowy z Polski zawierał: α -pinen (35,8%), β -pinen (38,3%), limonen (14,5%) i γ -terpinen (4,5%) [Ochocka i in., 1991] lub według innego źródła: α -pinen (35,8%) i 3-karen (35,1%) [Góra i in., 1997]. Wśród pochodnych tlenowych terpenów najważniejsze to borneol (0-6%) i octan bornylu (0-5%) [Góra i Lis, 2005]. Całkiem odmienny był skład olejku z sosny pochodzącej z bliskiej nam terytorialnie Słowacji. Jego głównymi składnikami były α -pinen (21-69%) i karwon (5-31%) [Berta i in., 1997]. Zwłaszcza zawartość karwonu jest cechą interesującą, która może okazać się istotna zarówno w chemotaksonomii tego gatunku, jak i aktywności przeciwdrobnoustrojowej olejku (tlenowe pochodne terpenów mają wyższą aktywność niż węglowodory). Olejek z Grecji zawierał znaczne ilości mircenu (14,0%) i β -felandrenu (29,1%) [Koukos i in., 2001].

Około 15% olejków z cetyny sosny stanowią seskwiterpeny, głównie izomeryczne muuroleny i kadineny: α -muurolen, α -, γ -, δ -kadinen, *epi*- α -muurolol, *epi*- α -kadinol, a także β -kariofilen i longifolen [Góra i Lis, 2005].

Badane były też olejki eteryczne z igieł nowych odmian *P. sylvestris* odpornych na szkodniki 'Belgium' i 'Lake Superior Blue', które od olejków z drzew dziko rosnących różniły się wysoką zawartością limonenu. W badaniach lotnych związków sosny określono ich bardzo nietypowy skład: 30% stanowił tlenek manoilu, a resztę węglowodory seskwiterpenowe [Tsitsimpikou i in., 2001].

Najbardziej szczegółowo oznaczono skład olejków eterycznych z igieł i gałązek (cetyny) drzew pochodzących z 15 różnych regionów Litwy. Poza związkami zamieszczonymi w Tabeli 3, wykryto w olejkach seskwiterpeny o szkieletach: kadinanu (α -kadinol, α -muurolol, kadina-1,4-dien, *cis*-muurola-4(14),5-dien, *cis*-muurol-5-en-(4 β)-ol i *cis*-muurol-5-en-(5 α)-ol), eudesmanu (β -selinen), bergamotanu (*trans*- α -bergamoten), aromadendranu (aromadendren, *allo*-aromadendren, β - i γ -gurjunen, spatulenol), germakranu (bicyklogermakren), himachalanu (tlenek himachalenu), kariofilanu (β -kariofilen), kubebanu (di-*epi*-kubenol, 1-*epi*-kubenol i kubenol), bisabolanu (α -bisabolol) oraz benzoesan i salicylan benzylu [Tsitsimpikou i in., 2001].

Wielokrotnie analizowane były składniki lotne samych igieł. Ze względu na dużą zawartość olejku w igłach i łatwość jego wydzielania, analiza składu olejku miała często na celu ustalenie chemotypu danej populacji sosny. W obrębie gatunku *P. sylvestris* wyróżnia się chemotypy o wysokiej lub niskiej zawartości 3-karenu.

Składniki lotne z igieł, poza najczęściej stosowaną destylacją z parą wodną, wydzielane były również innymi metodami, m. in. destylacji z parą wodną-ekstrakcji (SDE), ekstrakcji nadkrytycznej CO₂ (SFE) [Orav i in., 1998], analizy fazy nadpowierzchniowej (headspace) [Vuorela i in., 1989] oraz mikroekstrakcji do fazy stałej (SPME), którą wykorzystano również do analizy składników lotnych z szyszek [Tammela i in., 2003].

Skład jakościowy olejków eterycznych otrzymanych metodą destylacji z parą wodną-ekstrakcji z igieł sosny i skład lotnych związków oznaczony metodą analizy fazy nadpowierzchniowej były zbliżone, natomiast udział najbardziej lotnych składników był nieznacznie wyższy w fazie nadpowierzchniowej (Tabela 4) [Vuorela i in., 1989].

Tabela 4. Skład olejku eterycznego z igieł oraz fazy nadpowierzchniowej olejku i igieł *Pinus sylvestris* [Vuorela i in., 1989]

Składnik	Olejek z igieł (GC)	Analiza fazy nadpowierzchniowej headspace	
		Olejek z igieł	Igły
	Zawartość [%]		
tricyklen	1,8	1,8	2,1
α-pinen	45,9	45,8	46,7
kamfen	8,2	8,2	9,6
β-pinen	3,3	3,3	4,3
sabinen	0,8	0,8	0,7
3-karen	29,5	29,2	26,5
mircen	3,3	3,3	3,1
α-terpinen	0,2	0,2	0,5
limonen	1,1	1,1	1,2
β-felandren	-	tr	-
γ-terpinen	0,3	0,4	0,4
cis-ocymen	1,8	1,6	1,2
p-cymen	0,1	0,1	0,1
terpinolen	2,6	2,5	1,7

tr – <0,05%; - - związek niewykryty

W celu określenia strat składników lotnych podczas destylacji surowca, zastosowano układ „pułapek” – trzech rurek wypełnionych adsorbentem, osadzonych u wylotu układu

destylacyjnego. W pierwszej rurce zaadsorbowanych zostało 81,7% ulatniających się z układu destylacyjnego monoteprenów, w drugiej 17,7%, a w trzeciej tylko 0,6%. Ilość tych składników oznaczona z zastosowaniem standardu (α -pinen) wynosiła 1,27 μ l, co stanowiło 0,25% olejku eterycznego. Metoda analizy fazy nadpowierzchniowej okazała się bardziej skuteczna i powtarzalna od metody destylacji z parą wodną-ekstrakcji i ekstrakcji nadkrytycznej zarówno w oznaczaniu jakościowym, jak i ilościowym bardziej lotnych składników roślin. W opisanych badaniach wykorzystano sosnę o wysokiej zawartości 3-karenu [Vuorela i in., 1989]. Wykorzystując metodę headspace w kolejnych badaniach, autorzy dokonali analizy składników lotnych igieł w dużej populacji sosny rosnącej w Finlandii. Drzewa należały do dwóch chemotypów: o wysokiej zawartości 3-karenu (25,9-52,9%) i o niskiej zawartości 3-karenu (0,7-0,8%), a wysokiej zawartości α -pinenu (82,5-88,5%) [Pohiola i in., 1989].

W olejku eterycznym otrzymanym metodą SDE z igieł sosny rosnącej w Estonii zidentyfikowano 53 składniki, spośród nich 85% stanowiły monoterpény (Tabela 3). Liczne związki wykryto po raz pierwszy w olejku sosny zwyczajnej, a wśród nich: α -tujen, α -felandren, 1,8-cyneol, kamfora, cytronellol, geraniol, octan α -terpinylu, δ -elemen, octan geranylu, α -ylangen, β -burbonen, β -elemen, β -kopaen, α - i β -guajen, ϵ -muurolen, germakren B, α - i β -farnezen, kalamenen, tlenek kariofilenu i α -muurolol. Olejek sosnowy z igieł różnił się od olejku z cetyny wyższą zawartością tlenowych pochodnych seskwiterpenów: α -, δ - i T-kadinolu, T-muurololu oraz tlenku kariofilenu. Badana sosna estońska należała do chemotypu o wysokiej zawartości 3-karenu [Orav i in., 1996].

Lotne składniki z igieł sosny rosnącej w Estonii wyodrębniano dwiema metodami: destylacji z parą wodną-ekstrakcji (SDE) oraz ekstrakcji nadkrytycznej CO₂ (SFE). Skład jakościowy i ilościowy różnił się i był charakterystyczny dla danej metody wyodrębniania. Metoda ekstrakcji nadkrytycznej pozwoliła na wydzielenie składników trudnolotnych takich, jak alkohole seskwiterpenowe, diterpény i ich pochodne tlenowe oraz wyższe alkany i skwalen, które nie występowały w produkcie uzyskanym metodą SDE [Orav i in., 1998].

Najwyższą wydajność lotnych składników (4,42%) uzyskano poprzez ekstrakcję ditlenkiem węgla z dodatkiem chlorometanu jako modyfikatora, z użyciem etanolu wydajność wynosiła 2,83%, bez zastosowania modyfikatora była najniższa – 1,90%. Wydajność olejku eterycznego otrzymanego metodą SDE wynosiła 0,24%. Metoda SFE okazała się bardziej powtarzalna niż SDE, zarówno pod względem wydajności wydzielanej frakcji lotnej, jak i zawartości składników [Orav i in., 1998].

1.2.3. Modrzew europejski

Modrzew europejski (*Larix decidua* Mill., Rysunek 11) jest drzewem szpilkowym wyróżniającym się spośród innych z rodziny sosnowatych tym, iż – podobnie jak pozostałych 15 gatunków modrzewia – zrzuca liście (igły) na zimę. Osiąga on wysokość do około 40 m i żyje do 500 lat. Jego korona jest smukła i stożkowata. Modrzew ma miękkie, jasnozielone szpilki (2-4 cm), umieszczone na krótkopędach w pęczkach po 20-40 lub rosnące na długopędach pojedynczo i dość gęsto. Kwiaty są rozdzielнопłciowe, wiatropylne, w baziach. Ich okres kwitnienia przypada od marca do kwietnia. Szyszki żeńskie (3-4 cm) obrastają gęsto gałęzie i mniejsze gałązki, pozostając na drzewie wiele lat [Tołpa i Radomski, 1980].



Rysunek 11. Modrzew europejski (*Larix decidua* Mill.) [Herba]

Zarówno drewno, jak i pozostałe części drzewa zawierają bogatą w składniki lotne żywicę. Według mojej wiedzy brak jest danych literaturowych na temat składu olejku z drewna pnia modrzewia europejskiego, a publikacje określające skład olejków z igieł,

drewna i kory gałązek oraz ulistnionych gałązek modrzewia nie są liczne [Holm i Hiltunen, 1997; Kubeczka i Schultze, 1987; Kurowska i Kalemba, 1999].

Szpilki drzew rodzaju *Larix* zawierają około 0,4% olejku eterycznego, a jego ilość uzależniona jest od fazy rozwoju. W olejku eterycznym z igieł modrzewia zidentyfikowano 16 węglowodorów monoterpenowych i 11 ich tlenowych pochodnych, 16 seskwiterpenów oraz 7 tlenowych seskwiterpenów (Tabela 5). Główne składniki olejku były takie jak w innych olejkach z rodziny sosnowatych: α - i β -pinen, 3-karen, mircen, octan bornylu, β -kariofilen, germakren D i δ -kadinen. Skład olejku z igieł był zbliżony do składu olejku z drewna gałązek. Obydwa olejki zawierały głównie węglowodory terpenowe, odpowiednio 85,9% i 93,0%. Natomiast olejek z kory gałązek znacznie się różnił od olejków z igieł i drewna gałązek – zawierał bowiem więcej tlenowych pochodnych terpenów (22%), szczególnie alkoholi [Kubeczka i Schulze, 1987].

W olejku eterycznym z młodych gałązek bez igieł *L. decidua* z Polski (wydajność 0,47%) zidentyfikowano 81 składników, w tym jako główne: 3-karen (16%), α -pinen (12%), 4-terpineol (13,6%) i octan bornylu (8%) (Tabela 5) [Kurowska i Kalemba, 1999]. Skład jakościowy olejku *L. decidua* i *L. kaempferi* Carr. (modrzew japoński) był zbliżony, ale widoczne były różnice w zawartości składników. Olejki z gałązek modrzewia europejskiego i japońskiego wykazywały właściwości przeciwbakteryjne oraz repelentne wobec komarów i ich larw [Kurowska i Kalemba, 1998].

Analizowano skład enancjomeryczny olejku eterycznego z igieł, zarówno modrzewia europejskiego, jak i jego krzyżówek z modrzewiem syberyjskim (*Larix sibirica* Lebed.) i japońskim (*L. leptolepis* Gord., syn. *L. kaempferi* Carr.). Wszystkie olejki charakteryzowały się wysoką zawartością (+)-3-karenu i α -pinenu, którego enancjomery występowały w równych proporcjach [Holm i Hiltunen, 1997].

Tabela 5. Skład olejku eterycznego różnych organów *Larix decidua*

Składnik	Gałązki [%]			
	Gałązki ¹	Igły ²	Drewno ²	Kora ²
	Zawartość [%]			
tricyklen	0,1	0,2	0,1	0,3
tujen	0,7	-	-	-
α-pinen	12,0	28,6	44,7	38,3
α -fenchon	3,2	-	-	-
kamfen	0,3	0,3	0,5	0,7
sabinen	2,5	0,8	1,0	1,0
β-pinen	4,7	11,9	10,2	8,1
mircen	1,1	3,0	2,1	2,4
α -felandren	0,5	0,1	0,2	0,2
3-karen	15,9	19,2	2,8	4,8
werbenen	-	-	-	0,4
α -terpinen	2,7	0,2	0,2	0,3
p-cymen	2,8	0,1	0,3	0,9
limonen	1,5	1,0	2,1	2,2
β -felandren	1,1	2,4	6,1	2,4
1,8-cyneol	1,3	tr	-	2,1
γ-terpinen	4,4	0,3	0,3	0,5
trans-hydrat sabinenu	0,1	-	-	-
fenchon	tr	-	-	-
p-cymenen	0,6	-	-	-
terpinolen	2,8	1,2	1,4	1,1
linalol	tr	-	-	-
β -tujon	tr	-	-	-
endo-fenchol	0,1	-	-	-
kamfolenal	0,3	-	-	-
trans-p-menten-1-ol	0,5	-	-	-
kamfora	0,2	-	-	-
trans-pinokarweol	1,9	-	-	3,2
cis-werbenol	2,0	-	-	1,7
trans-werbenol	-	-	-	-
hydrat kamfenu	tr	-	-	-
tlenenk β -pinenu	0,3	-	-	-
pinokamfon	tr	-	-	-
pinokarwon	0,7	-	-	1,4
izoborneol	0,6	-	-	-
borneol	2,2	-	-	-
izopinokamfon	tr	-	-	-
p-cymen-8-ol	tr	-	-	-
terpinen-4-ol	13,6	tr	0,8	1,8
myrtenal	1,1	-	-	-
α -terpineol	1,5	-	1,5	0,7
cis-piperytol	0,2	-	-	-
myrtenol	0,7	-	-	1,3
werbenon	1,6	-	-	-
trans-karweol	0,3	-	-	-
aldehyd kuminowy	0,1	-	-	-
karwon	tr	-	-	-
p-ment-1-en-7-al	0,5	-	-	-
octan bornylu	8,2	0,3	0,1	1,2
eugenol	tr	-	-	-
karwakrol	tr	-	-	-
octan α -terpinylu	0,7	-	-	0,4
octan geranylu	tr	-	-	-
eter metylowy eugenolu	tr	-	-	-
longicyklen	tr	-	-	-
α -kopaen	0,1	-	-	-
longifolen	0,1	-	-	-

Tabela 5. c.d.

Składnik	Gałązki [%]			
	Gałązki ¹	Igły ²	Drewno ²	Kora ²
γ -elemen	tr	-	-	-
α -humulen	0,2	0,7	1,1	0,2
γ -muurolen	tr	-	-	-
walencen	tr	-	-	-
<i>cis</i> -kalamenen	tr	-	-	-
α -muurolen	tr	0,8	-	tr
β -bisabolen	tr	-	-	-
γ -kadinen	tr	0,7	0,1	0,1
<i>trans</i> -kalamenen	tr	-	-	-
germakren D	-	10,0	12,4	1,7
germakren B	-	0,4	4,4	0,5
δ -kadinen	tr	3,1	0,5	0,5
α -kalakoren	tr	-	-	-
tlenek kariofilenu	0,3	-	0,9	2,0
germakra-1(10)E,5E-dien-4-ol	-	0,8	0,8	-
keton miętowy	tr	-	-	-
tlenek humulenu I	tr	-	-	1,1
tlenek humulenu II	0,3	-	-	-
torilenol	tr	-	-	-
<i>epi</i> -10-kubenol	tr	-	-	-
torrejol	0,1	-	-	-
T-muurolol	0,1	1,5	-	0,2
T-kadinol	tr	1,4	-	0,3
α-kadinol	0,3	4,2	-	1,1
β -bisabolol	tr	-	-	-
kadalen	tr	-	-	-
tlenek manoilu	0,4	-	-	-
<i>epi</i> -13-manol	0,2	-	-	-

tr – <0,05%; - - związek niewykryty

¹ – [Kurowska i Kalembe, 1998]; ² – [Kubeczka i Schultze, 1987]

1.3. Charakterystyka roślin rodzaju czarnuszka oraz składników lotnych nasion

1.3.1. Czarnuszka siewna

Rodzaj czarnuszka (*Nigella*) obejmuje rośliny jednoroczne należące do rodziny jaskrowatych (*Ranunculaceae*) i liczy około dwudziestu gatunków. Najbardziej rozpowszechniona jest czarnuszka siewna (*Nigella sativa* L.). Popularne są również czarnuszka damasceńska (*N. damascena* L.), czarnuszka orientalna (*N. orientalia* L.), czarnuszka hiszpańska (*N. hispanica* L.) i czarnuszka polna (*N. arvensis* L.). Wywodzą się one z Azji południowo-zachodniej, w stanie naturalnym występują także w regionie Morza Śródziemnego, a czarnuszka polna występuje też w stanie dzikim w Polsce. Nasiona roślin gatunków *N. sativa* i *N. damascena* są surowcami olejkodajnymi. Czarnuszka siewna, damasceńska, orientalna i hiszpańska to rośliny ozdobne spotykane w ogrodach, natomiast czarnuszka polna jest chwastem zbóż.



Rysunek 12. Czarnuszka siewna (*N. sativa* L.) i czarnuszka damasceńska (*N. damascena* L.)

[Köhler, 1914]

Czarnuszka siewna jest szeroko uprawiana do celów leczniczych i przyprawowych, głównie w krajach o klimacie umiarkowanym i subtropikalnym, ale również w Polsce. Roślina zakwita w lipcu, torebki nasienne zawiązują się w sierpniu, a nasiona dojrzewają we wrześniu. Osiąga około 40 cm wysokości. Na szczytach pędów z pierzastodzielnymi liśćmi, zakwitają pięciopłatkowe, białoniebieskie kwiaty o średnicy do 3 cm. Owoc zbudowany jest ze zrosniętych ze sobą mieszków (5-10 sztuk) zawierających liczne, spłaszczone czarne nasiona [Tuszyńska-Kownacka, 1987]. Mają one specyficzny aromat i gorzko-słodkawy, korzenny, ostry i piekący smak, przypominający pieprz. Zawierają olejek eteryczny (0,5-1,5%), gorycz nigellinę, garbniki, alkaloidy, saponiny i olej (do 40%) [Khan Akram, 1999].

Już 1400 lat temu roślina była doskonale znana w medycynie Islamu. Wyciągi z nasion stosowano przeciw astmie, alergiom i dla zwiększenia odporności organizmu. Istnieją dowody, iż olej z nasion czarnuszki znany był starożytnym Egipcjanom. Wiadomo również, że używała go m. in. Kleopatra, ze względu na cenne właściwości zdrowotne i upiększające. Pod nazwą „Melanthion” zalety rośliny opisywali Hipokrates, Dioskorides, Pliniusz i Galenos. Zaś w średniowieczu w Europie „czarną kolendrę” zalecali ziołarze [Dedio 1990; Kozłowski 1990]. Chociaż obecnie *N. sativa* nie figuruje w Farmakopei Polskiej, dawniej jej nasiona, jak również olej z tych nasion stanowiły surowiec farmakopealny. Nasiona czarnuszki są wykorzystywane w medycynie ludowej oraz w homeopatii, głównie jako środek poprawiający trawienie i moczopędny, ekstrakty alkoholowe z nasion działają przeciwgorączkowo, przeciwkaszlowo i przeciwzapalnie. Nasiona *N. sativa* znajdują zastosowanie w przemyśle spożywczym jako:

- aromatyczny dodatek do pieczywa polepszający smak
- namiastka pieprzu polecana szczególnie dla osób o wrażliwej błonie śluzowej żołądka
- składnik indyjskich mieszanek przyprawowych typu curry, masala
- dodatek do mięs, marynat, ogórków i kapusty kwaszonej, gdyż zwiększa ich jędrność i poprawia trwałość [Khan Akram, 1999].

Nasiona czarnuszki mają wysokie walory żywieniowe. W skład nasion wchodzi: białko, olej, sterole, alkaloidy izochinolinowe i imidazolowe, saponiny, polifenole, kumaryny oraz olejek eteryczny. Wyczerpujące informacje na temat dobroczynnych właściwości, szerokiego zastosowania i różnych składników nasion czarnuszki siewnej przedstawiłam w artykule przeglądowym [Wajs i Kalemba, 2003]. Zatem tutaj szerzej zaprezentuję jedynie liczne informacje literaturowe dotyczące związków lotnych tego surowca.

1.3.1.1. Lotne składniki nasion czarnuszki siewnej

Z nasion *N. sativa* izolowano zarówno olejek eteryczny (OE) otrzymywany metodą destylacji z parą wodną nasion, jak i olejek lotny (OL), który był uzyskiwany różnymi metodami. Wydajność olejku z nasion była bardzo zróżnicowana i wynosiła od 0,09% do 3%. Uzależniona była od rejonu wegetacji rośliny, terminu siewu nasion oraz metody izolowania. W celu otrzymania olejku stosowano następujące metody:

- destylacja z parą wodną zmielonych nasion, wydajność: 0,18-1,4% [Benyoussef i in., 2001; Berger i in., 1964; Bourrel i in., 1995; Ghosheh i in., 1999; Gildemeister i Hofmann, 1956; Jadayil i in., 1999; Wolski i Najda, 2004]
- destylacja z parą wodną-ekstrakcja w aparacie Likensa-Nickersona, wydajność 0,39 % [D'Antuono i in., 2002; Moretti i in., 2004]
- destylacja z parą wodną oleju, wydajność: 0,4-1,4% [El-Alfy i in., 1975; El-Dakhahny, 1963]
- ekstrakcja nasion eterem naftowym w aparacie Soxhleta, następnie destylacja z parą wodną ekstraktu, wydajność: 0,41-1,5% [Burits i Bucar, 2000; Rathee i in., 1982]
- ekstrakcja nadkrytyczna nasion ditlenkiem węgla, wydajność 3% [El-Ghorab, 2003].

Olejek eteryczny z nasion czarnuszki siewnej ma barwę żółtą, charakterystyczny zapach i smak. Dobrze rozpuszcza się w rozpuszczalnikach organicznych, takich jak: eter etylowy, chloroform, etanol, w niewielkim zaś stopniu w wodzie [Khan Akram, 1999]. Olejek eteryczny ma następujące wartości fizykochemiczne:

$$d_{20}=0,8860; n_D^{20}=1,4859; \alpha=+1^{\circ}30'-2^{\circ}20'; LK=0,1; LE=3,6 \text{ [El Alf, 1975].}$$

Olejek eteryczny z nasion czarnuszki wyodrębniany był najczęściej metodą destylacji z parą wodną. Wydajność olejku oraz mieszanin składników lotnych z nasion była podobna dla destylacji z parą wodną oraz destylacji z dodatkiem ksyleny lub mieszaniny ksyleny i 20% kwasu siarkowego [Wolski i Najda, 2004].

Skład chemiczny olejku eterycznego oraz olejku lotnego z nasion czarnuszki siewnej był analizowany metodami GC i GC-MS, a opisane poniżej wyniki dotychczasowych badań zestawione zostały w Tabeli 6.

W olejku eterycznym (OE 1) otrzymanym przez destylację z parą wodną nasion *N. sativa* z Iranu zidentyfikowano 18 składników, wśród których dominowały: p-cymen (41,7%), γ -terpinen (12,8%), α -tujen (8,2%). Węglowodory monoterpenowe stanowiły (73,7%) olejku, tlenowe pochodne mono- i seskwiterpenów odpowiednio (20,3%) i (5,8%) [Hasanzadeh i in., 2000].

Głównymi składnikami olejku eterycznego z nasion czarnuszki uprawianej w Indiach (OE 2) były: p-cymen (77,3%), węglowodór C₁₀H₁₆ (5,9%), octan cytronellilu (4,9%), limonen (4,3%) i karwon (4,1%) [Rao i Nigam, 1978].

Z nasion *N. sativa* uprawianej we Francji wydzielono olejek eteryczny (OE 3), którego głównymi składnikami były: p-cymen (50%), tymochinon (8,9%), terpinen-4-ol (4,5%) i karwakrol (4,5%) [Bourrel i in., 1995].

Dominującymi składnikami olejku eterycznego z nasion czarnuszki uprawianej w Algierii (OE 4) były: p-cymen (46,6%) i α -tujen (14,6%), a 24,5% stanowiły alkanany [Benyoussef i in., 2001].

W badaniach prowadzonych w Polsce oceniano wpływ terminu siewu na wydajność i skład olejku eterycznego z czarnuszki (OE 5). Zidentyfikowano 23 składniki, wśród których dominowały monoterpény. Obserwowano tylko niewielkie różnice w składzie ilościowym, a głównymi zidentyfikowanymi składnikami były: p-cymen (61,3-62,9%) i α -tujen (9,9-11,3%) [Wolski i Najda, 2004].

Olejek eteryczny (OE 6), otrzymany przez destylację z parą wodną-ekstrakcją nasion czarnuszki uprawianej we Włoszech zawierał jako główne składniki p-cymen (33,8%) oraz tymol (26,8%). Zidentyfikowano również po raz pierwszy takie węglowodory seskwiterpenowe jak: β -elemen, α - i β -selinen oraz 7-*epi*- α -selinen [Moretti i in., 2004].

Olejek lotny pozyskiwany był z największą wydajnością metodą ekstrakcji ciekłym CO₂ pod ciśnieniem 200 bar. Olejek taki składał się głównie z lotnych tlenowych pochodnych mono- i seskwiterpenów (68%), wśród nich dominował tymochinon (41,1%), znacznie mniejszy udział miały węglowodory monoterpény (około 30%) [El-Ghorab, 2003]. Ekstrakcja nadkrytyczna CO₂ pod ciśnieniem 58 barów pozwoliła uzyskać olejek z wydajnością o 10-36% wyższą niż destylacja nasion z parą wodną. Olejek taki wykazywał lepsze właściwości sensoryczne oraz niższą zawartość węglowodórów monoterpény, które jako słabiej rozpuszczalne w ciekłym CO₂ w porównaniu ze związkami tlenowymi, trudniej przechodziły do ekstraktu [Naik i in., 1991; 1989].

Olejki lotne z nasion czarnuszki zakupionych w hurtowni i sklepach Austrii, ale o nieokreślonym pochodzeniu (OL 7-12) otrzymano przez ekstrakcję eterem naftowym w aparacie Soxhleta, a następnie destylację z parą wodną otrzymanego ekstraktu. Zidentyfikowano 32 lotne składniki, wśród których dominowały monoterpény: tymochinon (28-57%), p-cymen (7-15%), karwakrol (6-12%), terpinen-4-ol (2-7%), *trans*-anetol (1-4%) oraz seskwiterpen longifolen (1-8%). Zidentyfikowano też śladowe ilości estrów nasyconych

oraz nienasyconych kwasów tłuszczowych. Autorzy nie stwierdzili natomiast obecności disulfidów, które zidentyfikowano we wcześniejszych pracach [Burits i Bucar, 2000].

Olejek lotny (OL 13) otrzymany przez destylację z parą wodną handlowego oleju z nasion czarnuszki siewnej zakupionego w Austrii, charakteryzował się wysoką zawartością tymochinonu (35,3%) [Burits i Bucar, 2000].

Kolejne doniesienia na temat lotnych związków zawartych w nasionach czarnuszki pochodzą z Kairu (OL 14). Metodą GC-MS zidentyfikowano 67 składników: 46% stanowiły węglowodory monoterpenowe, z których główne to p-cymen (31,7%) i α -pinen (9,3%) oraz tlenowe pochodne monoterpenów należące do następujących grup: fenole (1,7%), alkohole (0,8%), estry (16%) oraz około 25% związków karbonylowych, wśród których głównym był tymochinon (24,5%) [Aboutable i in., 1986].

Olejek lotny (OL 15), otrzymany poprzez ekstrakcję nadkrytycznym CO₂ nasion czarnuszki uprawianej w Egipcie zawierał jako główne składniki tymochinon (41,1%) i p-cymen (10,6%). Po raz pierwszy zostały w tym oleju również zidentyfikowane takie składniki jak tricyklen, m-cymen, pinokarwon, trans-terpineol, mrówczan izobornylu, (E)-ocymenon, longipien, (Z)-kariofilen oraz 2-hydroksy-5-metoksy-acetofenon [El-Ghorab, 2003].

Z dotychczasowych badań, których wyniki zestawiałam w Tabeli 6 wynika, że metoda wyodrębniania olejku z nasion czarnuszki w zasadniczy sposób wpływa na jego skład chemiczny. Dominującym składnikiem olejku eterycznego był zawsze p-cymen (do 77%) [Rao i Nigam, 1978], natomiast olejku lotnego (OL 7-13) – tymochinon (do 57%) [Burits i Bucar, 2000]. Wysoki udział w większości badanych prób obu rodzajów olejków mają: terpinen-4-ol, karwakrol, γ -terpinen, β -pinen, limonen i longifolen. Składnikiem charakterystycznym dla olejków eterycznych, a nie występującym w olejkach lotnych (z wyjątkiem mieszanin lotnych uzyskanych podczas ekstrakcji nadkrytycznej CO₂) jest α -tujen (3,3-14,6%).

Faktem godnym uwagi jest zróżnicowana zawartość związków chinonowych w olejkach eterycznych i olejkach lotnych z nasion czarnuszki. W olejkach lotnych tymochinon był zwykle głównym składnikiem i jego zawartość wynosiła od 24% do 57% [Aboutable i in., 1986; Burits i Bucar, 2000]. W olejkach eterycznych nie zawsze go wykrywano, a maksymalna zawartość wynosiła 8,9% [Bourell i in., 1995]. Otrzymane z tej samej partii surowca olejek eteryczny i lotny (z ekstraktu eterem naftowym) wynosiła odpowiednio 3% i 48% [Burits i Bucar, 2000].

Tabela 6. Skład olejku eterycznego oraz olejku lotnego z nasion *Nigella sativa*

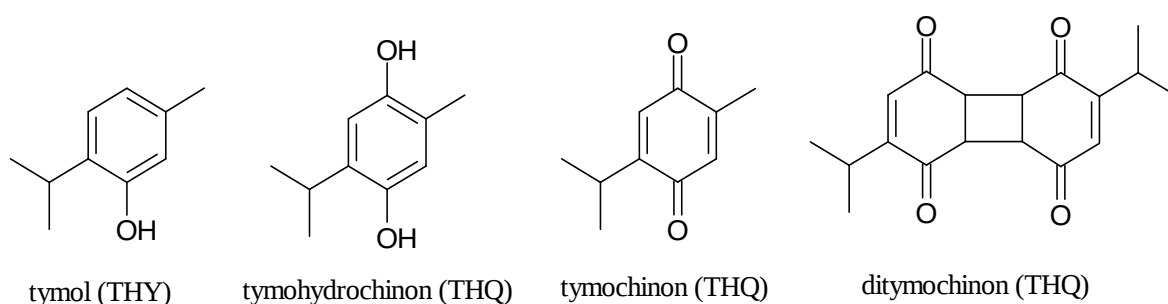
Składnik	OE 1 ¹	OE 2 ²	OE 3 ³	OE 4 ⁴	OE 5 ⁵	OE 6 ⁶	OL 7-12 ⁷	OL 13 ⁷	OL 14 ⁸	OL 15 ⁹
	Zawartość [%]									
α-tujen	8,2		1,9	14,6	10,6	3,3				5,9
α -pinen	2,0		0,6	3,2	2,0	0,7	0,3-2,0	0,2	9,3	1,9
kamfen							$\leq 0,1$			0,1
β -pinen	2,9		1,4		2,4	1,1	0,1-1,8	0,2		2,0
sabinen	1,3		0,5	1,5	1,1	0,5	0,1-1,2	0,1		1,7
β -mircen					0,1	0,3	$\leq 0,2$			
α -felandren					0,1					
α -terpinen	1,8		0,8	0,2	1,7	0,6	$\leq 0,1$	0,1		
limonen	3,0	4,3	1,7	2,2	1,7	1,1	0,3-3,3	0,4		
β -felandren							$\leq 0,1$			
1,8-cyneol				0,8	tr		$\leq 0,1$	0,2		
γ-terpinen	12,8		0,3		2,8	2,4	$\leq 1,1$			0,6
α-kamfolenal	9,7									
octan terpinen-4-olu	1,5									
p-cymen	41,7	77,3	50,0	46,6	61,3	33,6	11,0-15,5	7,1	31,7	10,6
m-cymen										7,3
o-cymen						3,3				
α -terpineol					0,2		$\leq 0,1$	tr		4,5
trans-werbenol	0,6									
2-heptanal							0-0,1	0,4		
tujon							$\leq 0,2$	0,2		
tujanol			0,7			7,4				
trans-hydrat sabinenu			0,3		tr	1,1	0-0,2	0,1		4,0
α -longipinen	2,1						0,2-1,7	0,2		
β-longipinen			4,4							
kamfora			0,2	0,2	tr		0,1-0,1	0,1		6,3
pinokarwon										0,3
linalol			0,9	1,1	tr		0,1-0,4	0,4		0,2
cis-hydrat sabinenu							0-0,2			
longifolen	3,3		0,8		0,5	3,1	1,3-8,0	1,3		
octan bornylu			0,4				0,3-0,8	0,5		0,7
octan cytronellilu		4,8								
octan linalilu			1,2				-			
terpinen-4-ol	1,9		4,5	0,7	0,8		2,0-6,6	3,4		0,5
borneol							0-0,5	0,2		3,6
cis-dihydrokarwon	1,8									
trans-dihydrokarwon										0,8
cytronellol		1,6								
karwon	0,6	4,1	0,7		0,1		0-1,1	0,1		
tymochinon	2,0		8,9		1,9	3,8	27,8-57,0	35,3	24,5	41,1
Tridekanu-2-on							0-0,4	0,2		
trans-anetol			3,8				0,8-4,3	1,3		
p-cymen-8-ol					tr		0-0,8			
aldehyd anyzowy							$\leq 0,1$			
tymol				0,1	0,1	26,8	0,1-0,3	0,2		
karwakrol	2,2		4,5	2,3	2,5		5,8-10,8	8,5		1,4
tymohydrochinon										1,2
octan bornylu					0,2					
kwas palmitynowy										0,1
palmitynian etylu			0,8							
kwas linolenowy			0,5							0,1
linolenian etylu										tr
β-elemen						5,5				
β -selinen						0,4				
α -selinen						2,2				
7-epi- α -selinen						0,3				

tr – <0,05%;

¹ – [Hasanzadeh i in., 2000]; ² – [Rao i Nigam, 1978]; ³ – [Bourrel i in., 1995]; ⁴ – [Benyoussef i in., 2001]; ⁵ – [Wolski i Najda, 2004]; ⁶ – [Moretti i in., 2004]; ⁷ – [Burits i Bucar, 2000]; ⁸ – [Aboutable i in., 1986]; ⁹ – [El-Ghorab, 2003]

Niewyjaśniona jest dotychczas przyczyna, jak metoda otrzymywania olejku w tak zasadniczy sposób wpływa na zawartość tymochinonu. Literatura podaje jedynie, że w trakcie izolowania chinonów z nasion lub też procesu przechowywania zarówno nasion, jak i oleju tymochinon ulega pod wpływem światła i ciepła dimeryzacji z utworzeniem ditymochinonu – substancji znanej początkowo jako „nigellon” [Gad i in., 1963; Ghosheh i in., 1999].

Zidentyfikowany w nasionach *N. sativa* tymochinon (TQ) należy do związków chinonowych, które wykazują różnorodną aktywność biologiczną. Jego zawartość oraz zawartość tymolu (THY) i tymohydrochinonu (THQ) (Rysunek 13) decydują więc w dużym stopniu o właściwościach olejku.



Rysunek 13. Tymol i pochodne

Wykorzystując metodę wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej (HPLC) określono zawartość TQ, THQ, THY oraz DTQ, w różnych handlowych olejach pozyskanych z nasion *N. sativa* z Egiptu (Tabela 7) [Aboul-Enein i in., 1995; Ghosheh i in., 1999; Khan Akram, 1999]. Metodą chromatografii cienkowarstwowej (TLC) potwierdzono obecność w nasionach: TQ, DTQ oraz THY. Zawartość TQ w różnych handlowych olejach z nasion czarnuszki z Arabii Saudyjskiej została oznaczona metodą chromatografii gazowej wahała się w przedziale 0,13-0,17% (Tabela 7) [Houghton i in., 1995].

1.3.1.2. Aktywność biologiczna olejku eterycznego z nasion czarnuszki siewnej i jego składników

Olejkowi eterycznemu pozyskanemu z nasion *N. sativa* przypisuje się właściwości antyutleniające, antyhistaminowe, obniżające nadciśnienie, regulujące niedobór glukozy we krwi. Ponadto olejek wykazuje właściwości przeciwdrobnoustrojowe, antyrobacze, detoksykacyjne wobec wątroby, podnosi odporność immunologiczną organizmu. Inhalacje z zastosowaniem olejku stosowane są w leczeniu objawów grypy, zawrotów i bólów głowy

[Abdel-Fattah i in., 2000; El-Dakhahny, 1963; El-Kamali i in., 1998; Khan Akram, 1999]. Pomimo, iż nasiona czarnuszki, a także olejek stosowany jest jedynie w medycynie ludowej (głównie Azji i Afryki), ich cenne właściwości biologiczne zostały potwierdzone w wielu badaniach naukowych i opisane w artykule przeglądowym [Wajs i Kalembe, 2003]. W rozdziale tym przedstawiłam jedynie wybrane właściwości olejku z nasion czarnuszki i jego składników.

Tabela 7. Zawartość pochodnych tymolu w oleju z nasin *Nigella sativa*

Składnik	Zawartość w oleju [%]	
	Egipt ¹	Arabia Saudyjska ²
tymohydrochinon THQ	$7,67 \cdot 10^{-4}$	0,13-0,17
tymochinon TQ	$5,26 \cdot 10^{-2}$	
tymol THY	$9,12 \cdot 10^{-3}$	

¹ [Khan Akram, 1999]; ² [Houghton i in., 1995]

Właściwości antybakteryjne olejku lub ekstraktów z nasion są na tyle silne, iż sugeruje się aby stosować go jako substytut antybiotyków: penicyliny-G oraz streptomycyny przy zwalczaniu bakterii powodujących groźne choroby u człowieka, takich jak: *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* i *Shigella shigae* [Khan Akram, 1999; Rathee i in., 1982], a także innych bakterii opornych na działanie antybiotyków [Ferdous i in., 1992; Morsi, 2000]. Stwierdzono synergizm w działaniu antybakteryjnym mieszaniny ekstraktu z nasion czarnuszki z kombinacją streptomycyny i gentamycyny [Houghton i in., 1995].

Dzięki hamowaniu rozwoju *Chaetomium olivaceum* (MIC 2,5 mg/ml), a także wielu innych gatunków grzybów, olejek eteryczny może znaleźć zastosowanie w naturalnej ochronie upraw ryżu, pszenicy i bawełny [Atta i Malik, 1995]. Jako silny inhibitor rozwoju bakterii i grzybów stosowany może być jako środek konserwujący [Khan Akram, 1999].

Już w latach sześćdziesiątych stwierdzono, że fenolowa frakcja olejku z nasion czarnuszki wykazuje aktywność antybakteryjną, przy jednoczesnym braku toksyczności dla organizmu człowieka. Roztwór tej frakcji w glikolu propylenowym znalazł zastosowanie w medycynie ludowej Egiptu [Khan Akram, 1999].

Wyizolowane z olejku związki chinonowe mają interesujące właściwości farmakologiczne. Zarówno TQ, jak i DTQ przypisuje się działanie antynowotworowe, dzięki zdolności tych związków do wychwytywania wolnych rodników [Crooks i in., 2001;

Hasanzadeh i in., 2000; Khan Akram, 1999; Kruk i in., 2000]. Właściwości antyoksydacyjne TQ i DTQ są porównywalne z właściwościami butylowanego hydroksytoluenu (BHT) [Daba i in., 1998; Khan Akram, 1999; Nagi i in., 1999; Salem i Hossain 2000]. Zidentyfikowane w olejku: karwakrol, *trans*-anetol, terpinen-4-ol i tymohydrochinon również działają antyoksydacyjnie [Burits i Bucar, 2000; Hasanzadeh i in., 2000]. Wykazano również, że TQ chroni wątrobę przed toksycznym działaniem nieenzymatycznych utleniaczy, a podawany w dawce 8 mg/kg/dzień chroni organizm ludzki przed chemicznymi uszkodzeniami nerek w wyniku terapii nowotworowej *cis*-platyną oraz przed kardiotoxycnością przy podawaniu doksorubicyny. Związek ten jest generalnie dobrze tolerowany przez organizmy żywe i może być stosowany dla ochrony tkanek [Khan Akram, 1999]. Składniki chinonowe czarnuszki mają działanie przeciwhistaminowe oraz przeciwzapalne, dzięki czemu celowe wydaje się ich stosowanie w leczeniu astmy, alergii oraz chorób reumatycznych i zapalnych [El-Dakhahny, 1963; Houghton i in., 1995, Khan Akram, 1999].

Z badań wynika, iż związki mające aromatyczne grupy hydroksylowe, czyli tymol i karwakrol oraz ich octany silnie hamują agregację płytek krwi, czyli zapobiegają tworzeniu się zakrzepów. Działanie to jest trzykrotnie silniejsze niż działanie aspiryny, która jest znanym lekiem w trombozie [Enomoto i in., 2001]. Ponadto potwierdzono spazmolityczne, czyli rozkurczowe działanie olejku w przypadku astmy [El Tahir i in., 1993a, b].

Składniki nasion czarnuszki siewnej wykazują szerokie spektrum aktywności biologicznej, w tym farmakologicznej. Historyczne przesłanki sprzed tysięcy lat o wykorzystaniu rośliny w medycynie ludowej oraz do celów spożywczych znajdują poparcie w licznych pracach naukowych zapoczątkowanych już w 1880 roku w Rosji i nadal kontynuowanych [Khan Akram, 1999; Üstün i in., 1990]. O popularności czarnuszki siewnej może świadczyć ponad trzydzieści opublikowanych prac naukowych w ciągu ostatnich pięciu lat. Bazując na dorobku wielu naukowców, może kiedyś będzie można świadomie potwierdzić słowa proroka Mahometa zawarte w Koranie, iż „czarne nasiona *Nigella sativa* są lekarstwem na wszystkie choroby” [Khan Akram, 1999].

1.3.2. Czarnuszka damasceńska

Czarnuszka damasceńska (*Nigella damascena* L.) jest rośliną nieco wyższą od czarnuszki siewnej, o łodydze prostej, wysokiej do 50 cm i bardziej rozgałęzionej. Kwiaty ma okazalsze, średnicy 6 cm, jasnobłękitne z zielonymi zakończeniami nerwów (Rysunek 14). Dość duży owoc składa się z rozdętych i całkowicie zrośniętych mieszków. Nasiona wyglądem są podobne do nasion czarnuszki siewnej, lecz nieco większe. Po roztarciu mają zapach landrynkowy, a smak mniej ostry. W stanie dzikim roślina występuje w Europie południowej, Azji zachodniej i Afryce północnej. Uprawiana jest w klimacie umiarkowanym i subtropikalnym, głównie jako roślina ozdobna, chociaż olejek z nasion jest stosowany w przetwórstwie cukierniczym.



Rysunek 14. Czarnuszka damasceńska (*Nigella damascena* L.) [Botanix]

N. damascena (turecki czarny kminek) stosowana była w Europie już w XVI wieku, jej czarne dojrzałe nasiona, tak jak nasiona *N. sativa* (prawdziwy czarny kminek) znalazły zastosowanie w medycynie ludowej, natomiast obecnie olejek eteryczny z nasion stosowany

jest do aromatyzowania win i likierów [Dedio, 1999; Kozłowski, 1990]. Dzięki obecności alkaloidów, nasiona wykazują działanie fizjologiczne. Czarnuszka damasceńska jest rośliną mniej popularną od czarnuszki siewnej, poświęcono jej również mniejszą ilość badań. Oprócz składników lotnych nasion badano także skład kwasów tłuszczowych oleju [Dauksas i in., 2002; Hodisan i in., 1997] i związki fenolowe w nasionach [Fico i in., 2000].

Większość wyników badań naukowych poruszających tematykę składników lotnych nasion *N. damascena* opublikowano w latach 2002-2004. Materiał do badań stanowiły nasiona roślin uprawianych w różnych częściach Włoch [D'Antuono i in., 2002; Fico i in., 2003; Moretti i in., 2004] oraz w Polsce [Wolski i Najda, 2004] i na Litwie [Dauksas i in., 2002].

Wydajność olejku z nasion rośliny wahała się w przedziale 0,13 – 0,53% i uzależniona była od rejonu jej uprawy oraz metody wyodrębniania olejku, natomiast w niewielkim stopniu zależała od terminu siewu nasion [D'Antuono i in., 2002].

Związki lotne z nasion czarnuszki damasceńskiej wyodrębniano następującymi metodami:

- destylacja z parą wodną zmielonych nasion, wydajność: 0,13-0,53% [Fico i in., 2003; Gildemeister i Hofmann, 1956; Wolski i Najda, 2004]
- destylacja-ekstrakcja w aparacie Likensa-Nickersona, wydajność: $0,39 \pm 0,08\%$ [D'Antuono i in., 2002; Moretti i in., 2004]
- ekstrakcja nadkrytyczna CO₂, wydajność mieszaniny związków zawierających głównie kwasy tłuszczowe: 10,57-37,14% [Dauksas i in., 2002].

Nasiona *N. damascena* są materiałem uboższym w składniki lotne niż nasiona *N. sativa*. Czynnikiem odróżniającym oba gatunki jest również skład olejku eterycznego z nasion: olejek z *N. sativa* składa się w około 90% z monoterpenów, natomiast olejek *N. damascena* składa się prawie w 100% z węglowodorów seskwiterpenowych.

Z nasion czarnuszki damasceńskiej, metodą destylacji z parą wodną wyodrębniono z wydajnością 0,37-0,50% olejek o przyjemnym aromacie leśnych jagód i barwie żółtej lub niebieskiej, fluoryzującej. Charakteryzował się on następującymi stałymi fizykochemicznymi: $d_{15} = 0,895-0,915$; $\alpha_D = +1,4^\circ - -7,8^\circ$; $n_D^{20} = 1,4997-1,5582$ [Gildemeister i Hofmann, 1956].

Olejek eteryczny z nasion czarnuszki damasceńskiej uprawianej w Pizie i nasion zakupionych w sklepie nasiennym w Mediolanie izolowany był metodą destylacji z parą wodną. Wydajność olejku wynosiła odpowiednio 0,27% i 0,13%. W olejku zidentyfikowano 28 składników (Tabela 8), głównymi były seskwiterpeny (93,8%). Zidentyfikowano również

dwie pochodne kwasu antranilowego: 2-amino-N-metylo-3-metoksybenzoesan metylu, zwany damasceniną, i 2-amino-3-metoksybenzoesan metylu oraz śladowe ilości monoterpenu. Głównym składnikiem nasion czarnuszki uprawnej był germakren A (52,8%), natomiast nasion komercyjnych β -elemen (49,6%). Zakupione nasiona zawierały więcej (3,2%) damasceniny niż uprawiane (0,1%) [Fico i in., 2003]. Związek ten został wyizolowany wcześniej z nasion *N. damascena* i *N. arvensis* [Gildemeister i Hoffmann, 1956; Hannig i Vishin, 1960]. Natomiast 2-amino-3-metoksy antranilan metylu, będący prawdopodobnie metabolitem damasceniny, zidentyfikowano po raz pierwszy w nasionach czarnuszki damasceńskiej [Fico i in., 2003].

Tabela 8. Skład olejków eterycznych z nasion *Nigella damascena*

Składnik	Włochy		
	Uprawna (Bolonia) ¹	Uprawna (Piza) ²	Komercja (Mediolan) ²
	[%]		
<i>Wydajność olejku</i>	0,39±0,08	0,27	0,13
α -pinen	-	tr	tr
β -pinen	-	-	tr
β -mircen	-	-	tr
2-pentylofuran	-	tr	-
p-cymen	-	-	tr
limonen	tr	tr	0,1
1,8-cyneol	-	-	0,1
γ -terpinen	-	-	tr
kamfora	-	-	tr
pulegon	-	-	tr
tujol	0,1±0,3	-	-
tymochinon	0,1±0,3	-	-
tymol	tr	-	-
α -kopaen	-	0,1	0,1
β -burbonen	2,1±0,4	-	1,0
β-elemen	73,2±4,0	38,4	49,6
β -kariofilen	-	1,4	0,7
β -gurjunen	-	-	0,1
β -kadinen	-	0,3	0,4
γ -gurjunen	-	-	0,6
germakren D	-	0,1	0,4
β -selinen	2,7±1,2	0,6	0,4
walencen	-	-	0,4
α -selinen	4,7±2,4	0,6	-
wiridifloren	-	0,3	9,5
germakren A	10,5±2,3	52,8	23,6
7-epi- α -selinen	6,5±0,6	0,1	3,5
2-amino-3-metoksybenzoesan metylu	-	0,2	0,1
damascenina	-	0,1	3,2
spatulenol	-	-	0,1
(Z)-oktadec-9-en-1-ol	-	-	2,1

tr – < 0,1%; – – związek niewykryty; ¹ – [Moretti i in., 2004]; ² – [Fico i in., 2003]

W olejkach z nasion *N. damascena* uprawianej w Bolonii, pozyskanych metodą destylacji z parą wodną-ekstrakcji eterem dietylowym zidentyfikowano 10 składników, wśród

nich dominowały seskwiterpeny (Tabela 8). Głównymi były, tak jak w poprzednich olejkach: β -elemen (73,2%) i germakren A (10,5%) [Moretti i in., 2004]. Cechą charakterystyczną olejków z nasion czarnuszki damasceńskiej jest znikoma ilość monoterpenów [D'Antuono i in., 2002; Fico i in., 2003; Moretti i in., 2004]. Stwierdzono, że skład olejku, podobnie jak jego wydajność, zależał, aczkolwiek w niewielkim stopniu, od terminu siewu nasion *N. damascena* [D'Antuono i in., 2002].

Ekstrakty z nasion czarnuszki uprawianej na Litwie izolowano następującymi technikami: tłoczenie na zimno, ekstrakcja w aparacie Soxhleta eterem dietylowym oraz ekstrakcja nadkrytyczna CO₂ z dodatkiem modyfikatora (1% etanol), przeprowadzana w różnych warunkach ciśnienia (60, 250, 350 bar) [Dauksas i in., 2002]. Badano skład frakcji lotnej i tłuszczowej (Tabela 9). Najmniejszą wydajność ekstraktu uzyskano metodą zimnego tłoczenia (7,65%), była ona ponad czterokrotnie mniejsza niż wydajność uzyskana metodą ekstrakcji eterem dietylowym w aparacie Soxhleta (33,56%), która z kolei była porównywalna z wydajnością ekstraktów eterowych (Soxhlet) z czarnuszki siewnej [Üstün i in., 1990]. Wydajność produktu ekstrakcji nadkrytycznej CO₂ rosła wraz ze wzrostem ciśnienia, a dodatek modyfikatora powodował 50% wzrost wydajności ekstraktu. [Dauksas i in., 2002]. Ekstrakt nadkrytyczny zbierany był w dwóch separatorach, w których temperatura wynosiła 40°C, a ciśnienie 150, 250 lub 350 bar. Zarówno w pierwszym, jak i drugim separatorze dominowała frakcja kwasów tłuszczowych, zawierająca przede wszystkim kwas linolowy. Wśród składników izolowanych w separatorze drugim również dominowała frakcja nielotna (35,0-51,2%), ale dodatkowo zidentyfikowano lotne terpeny, głównie węglowodory seskwiterpenowe (21,4-29,3%), wśród których dominowały izomery elemenu (α -, β -, γ -, δ -elemen) [Dauksas i in., 2002]. Nie stwierdzono zaś obecności monoterpenów, które występują w śladowych ilościach w olejkach eterycznych

Nasiona *N. damascena* uprawianej w Rumunii poddano ekstrakcji w aparacie Soxhleta, mieszaniną chloroformu i metanolu (2:1). Wydajność ekstraktu wynosiła 39,2-41,3% [Hodisan i in., 1997] i była wyższa niż ekstraktu z nasion uprawianych na Litwie, uzyskanego eterem dietylowym [Dauksas i in., 2002]. Zidentyfikowano w nim kwasy tłuszczowe: oleinowy (38,0%), linolowy (37,2%), palmitynowy (12,2%), eikozadienowy (5,0%) i stearynowy (5,0%) [Hodisan i in., 1997]. Te dwa ostatnie kwasy nie zostały oznaczone w ekstraktach z nasion *N. damascena* z Litwy.

Tabela 9. Skład i wydajność otrzymanych różnymi metodami ekstraktów z nasion *Nigella damascena*
[Dauksas i in., 2002]

Składnik	Zawartość [%]				
	Tłoczenie na zimno	Ekstrakcja w aparacie Soxhleta	Ekstrakcja SFE (40 °C)		
			ciekły CO ₂ 60 bar	nadkrytyczny CO ₂	
				250 bar (separator II)	250 bar 1% Etanol (separator II)
wydajność [%]	7,65	33,56	10,57	28,75	35,99
kapronian metylu	1,4	1,5	1,6	1,5	1,6
kwas benzoesowy	0,6	1,4	1,2	1,2	1,3
δ-elemen	9,6	12,4	9,7	14,1	11,3
β-elemen	1,5	1,5	1,2	1,3	1,2
γ-elemen	2,5	2,4	3,0	1,9	2,6
α-elemen	11,0	6,1	7,6	11,9	6,2
kwas 2-amino 3-metoksy benzoesowy	3,0	3,1	2,3	3,4	3,6
n.z (148/195/120/162/65/92)	19,9	17,9	15,5	23,5	21,1
kwas palmitynowy	1,8	1,6	1,4	2,4	1,7
stearynian etylu	2,2	3,3	2,9	1,3	1,2
kwas linolowy	38,7	32,7	40,6	28,8	35,0
kwas oleinowy	5,0	8,8	6,2	5,0	5,1
linolenian etylu	2,5	2,9	6,8	2,3	4,6
<i>Suma nienasyconych kwasów tłuszczowych</i>	45,5	43,2	48,2	36,2	41,9
<i>suma zidentyfikowanych</i>	99,6	95,6	99,9	98,5	96,6

Skład olejku eterycznego nasion czarnuszki damasceńskiej uprawianej w Lublinie [Wolski i Najda, 2004] istotnie różnił się od wcześniejszych danych literaturowych. Głównymi składnikami był α-tujen (9,9-11,3%), ponadto wykryto: α-pinen, sabinen, β-pinen, mircen, α-felandren, α-terpinen, p-cymen, limonen, γ-terpinen, *trans*-wodzian sabinenu, tujol, kamforę i octan bornylu. Zawartość monoterpenu była wyższa niż seskwiterpenów. Ponieważ wszystkie składniki monoterpenu nasion z Lublina występowały również w olejkach z nasion *N. sativa*, można podejrzewać iż nasiona wysiewane i badane w Lublinie były krzyżówką obu gatunków czarnuszki: siewnej i damasceńskiej.

Wydajność olejku z nasion czarnuszki damasceńskiej i jego skład zależą od metody pozyskiwania i pochodzenia surowca. Różnice w składzie widoczne są nawet dla nasion pozyskiwanych z jednego państwa (Włoch) [Fico i in., 2003].

1.3.3. Czarnuszka orientalna

Czarnuszka orientalna (*Nigella orientalis* L.) jest rośliną mniej popularną niż czarnuszki siewna i damasceńska. Ma żółte kwiatostany, ułożone na dorastającej do 30 cm łodydze (Rysunek 15). Owoc stanowią czarne nasiona. *N. orientalis* występuje w stanie dzikim w północno-wschodniej części basenu Morza Śródziemnego oraz na obszarach od Kaukazu po Syrię.



Rysunek 15. Czarnuszka orientalna (*Nigella orientalis* L.) [Anniesannuals]

Nasiona czarnuszki orientalnej używane są do fałszowania pieprzu. Sama zaś czarnuszka jest rośliną ozdobną, hodowaną w ogrodach [Dedio, 1999; Kozłowski, 1990]. W jedynej dostępnej publikacji na temat lotnych związków tej rośliny opisano olejek eteryczny otrzymany metodą destylacji z parą wodną nasion z hurtowni nasiennej w Czechach. Wydajność olejku była bardzo niska i wynosiła 0,03% (w/w). Zidentyfikowano 18 składników (Tabela 10), główne należały do grupy węglowodorów seskwiterpenowych (90,3%), tlenowe pochodne seskwiterpenów stanowiły 0,4%, zaś monotereny około 0,1%. Głównym składnikiem był, tak jak w przypadku olejku z *N. damascena*, β -elemen (68,8%). Zidentyfikowano również δ -kadinen (5,2%), β -selinen (4,3%) i α -selinen (3,3%).

Tabela 10. Skład olejku eterycznego z nasion *Nigella orientalis* [Kokoska i in., 2004]

Składnik	Zawartość [%]
p-cymen	tr
limonen	0,1
linalol	tr
α -kopaen	0,6
izomer elemenu	2,3
β-elemen	68,8
β -kariofilen	1,6
γ -selinen	0,9
germakren D	0,1
β -selinen	4,3
α -selinen	3,3
α -muurolen	tr
germakren A	2,7
7- <i>epi</i> - α -selinen	0,2
δ -kadenin	5,2
<i>trans</i> -kalamenen	0,3
elemol	0,1

tr – <0,05%

Olejek eteryczny z nasion czarnuszki siewnej zawierał przede wszystkim monotereny, głównie p-cymen, zaś olejek z czarnuszki damasceńskiej – seskwiterpeny, głównie węglowodory. Skład olejku eterycznego z nasion czarnuszki orientalnej jest bardziej podobny do olejku z *N. damascena*, niż do olejku z *N. sativa*.

2. CEL PRACY

Określenie składu jakościowego i ilościowego związków lotnych:

- drewna drzew gatunków: *Picea abies*, *Pinus sylvestris* i *Larx decidua*, w następujących aspektach:
 - porównanie składu chemicznego bielu i twardego każdego z gatunków
 - porównanie składników lotnych drewna między gatunkami
- nasion uprawianych w Polsce roślin rodzaju czarnuszka: *Nigella sativa*, *N. damascena* i *N. orientalis*.

Określenie przydatności różnych metod wydzielania składników lotnych z roślin:

- jako sposobu pozyskania użytecznych produktów o różnorodnym zastosowaniu
- jako etapu przygotowania próbek do analizy.

Dodatkowo ocenione zostały właściwości przeciwdrobnoustrojowe olejków z *N. sativa* i *N. damascena*

3. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA

3.1. Metody

3.1.1. Destylacja z parą wodną – otrzymywanie olejku eterycznego

Olejki eteryczne izolowałam z uprzednio rozdrobnionych surowców metodą destylacji z parą wodną z użyciem aparatu Derynga, według Farmakopei Polskiej VI [Farmakopea Polska, 2002]. Pojemność kolb destylacyjnych dostosowana była do ilości surowca i wynosiła odpowiednio: 5 l dla drewna bielu (860 g) i twardzieli (370 g) świerka pospolitego, 0,25-2,5 l dla nasion roślin rodzaju czarnuszka (20-300 g). Surowiec zalewany był wodą do 2/3 objętości kolby. Czas destylacji wynosił 4 lub 5 godzin. Destylację nasion czarnuszki siewnej prowadziłam z dodatkiem środka antypieniącego.

Jednoczesną destylację z parą wodną-ekstrakcję z zastosowaniem pentanu prowadziłam w aparacie Likensa-Nickersona w ciągu 4 godzin. Uzyskany ekstrakt zateżałam na wyparce rotacyjnej pod zmniejszonym ciśnieniem, a otrzymany olejek ważyłam.

Olejki suszyłam bezwodnym siarczanem magnezowym. Wydajność olejku podawałam w ml/100 g surowca (% objętościowy); w przypadku bardzo małych objętości destylatu (poniżej 0,1 ml – najmniejsza podziałka skali aparatu Derynga) i destylacji-ekstrakcji wydajność olejku podawałam w g/100 g surowca (% masowy).

3.1.2. Destylacja frakcjonowana olejku eterycznego

Destylację frakcjonowaną olejku prowadziłam przy użyciu kolumny Vigreux (10 × 1 cm), w zakresie temperatur 30-115°C, kolejno pod ciśnieniem około 15 mm Hg (pompka wodna) i 0,02-2 mm Hg (pompa olejowa).

3.1.3. Oznaczanie gęstości olejku

Gęstość olejku eterycznego oznaczałam metodą piknometryczną [Strzelecka i in., 1987].

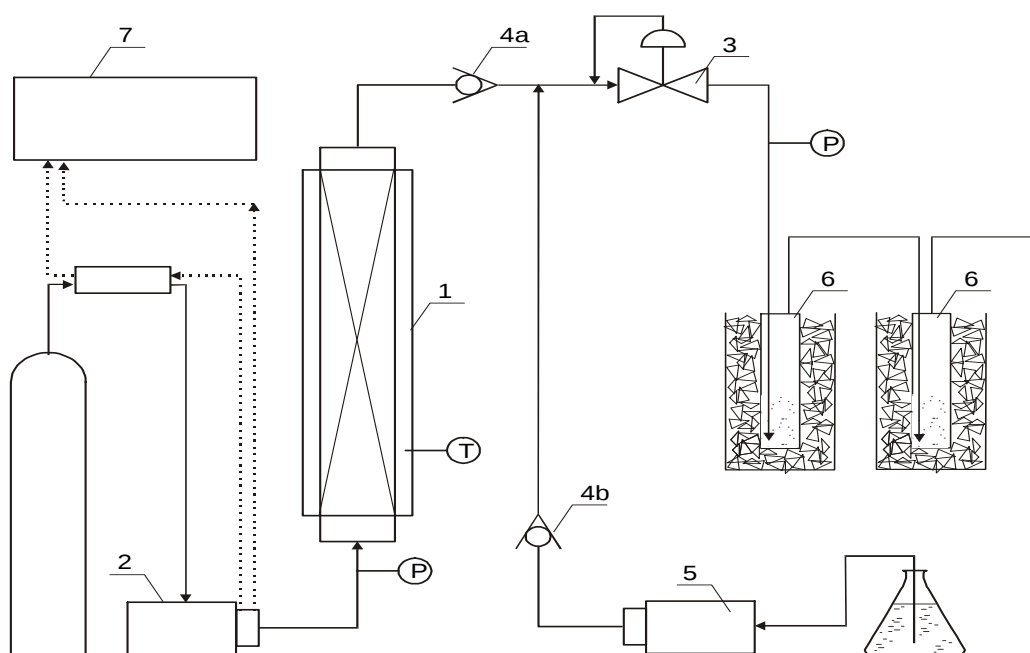
3.1.4. Ekstrakcja – otrzymywanie konkretów i olejków lotnych

Zmielone nasiona roślin rodzaju czarnuszka poddawałam ekstrakcji w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika w aparacie Soxhleta w ciągu 4 godzin. Masa nasion użytych do ekstrakcji wynosiła 25-55 g. Stosowałam następujące rozpuszczalniki: eter naftowy, pentan, eter dietylowy i mieszanina pentan-eter dietylowy 1:1. Uzyskane ekstrakty zateżałam na wyparce rotacyjnej pod zmniejszonym ciśnieniem otrzymując konkrety, które następnie po dodaniu 50 ml wody destylowałam z parą wodną w aparacie Derynga w ciągu 3 godzin.

3.1.5. Ekstrakcja nadkrytyczna

Ekstrakcja surowca ditlenkiem węgla w stanie nadkrytycznym została przeprowadzona na Wydziale Inżynierii Procesowej i Ochrony Środowiska Politechniki Łódzkiej.

Proces prowadzono w instalacji pracującej półokresowo z przepływem CO₂. Aparatura (schemat na Rysunku 16) umożliwiała stosowanie ciśnienia do 300 bar, temperatury do 50°C i przepływu ditlenku węgla od 0,1 ml/min. do 10 ml/min. Ciśnienie w układzie regulowano zaworem 3, przemywanym niewielkim strumieniem heksanu, który doprowadzano zaworem 4a. Eksperyment prowadzono przez 10 godz. w następujących warunkach: ciśnienie 250 bar, temperatura 14°C, przepływ CO₂ 3 ml/min. Zebrany ekstrakt heksanowy po zateżeniu do stałej masy poddano trwającej 3 godz. destylacji z parą wodną w aparacie Derynga w celu wydzielenia olejku lotnego.



Rysunek 16. Schemat aparatury doświadczalnej do ekstrakcji nadkrytycznej

- | | |
|--------------------------|---------------------------|
| 1- ekstraktor | 2- pompa CO ₂ |
| 3- regulator ciśnienia | 4- zawory kontrolne |
| 5- pompa rozpuszczalnika | 6- odbieralniki ekstraktu |
| 7- kriostat | |

3.1.6. Analiza fazy nadpowierzchniowej metodą dynamiczną

Analiza fazy nadpowierzchniowej metodą dynamiczną (DHS: Dynamic Headspace) polegała na pobraniu próbki z przestrzeni nad powierzchnią surowca i jej analizie metodami GC i GC-MS. Próbkę pobierałam przy użyciu szklanej aparatury, zbudowanej w Instytucie Podstaw Chemii Żywności PŁ według Mullera i Lamparskiego [1991]. Związki lotne ekstrahowałam z 14 g kawałków świeżego drewna (20×10×0,36 mm) lub 20 g zmielonych nasion czarnuszki siewnej. Surowiec umieszczałam w 2 l kolbie okrągłodennej. Nad materiałem roślinnym, w odległości ok. 1-2 cm umieszczałam końcówkę z mikrofiltrem, zawierającym ok. 40 mg adsorbenta (Porapak Q 80/100). Mikrofiltr był szczelnie połączony z końcówką szklanego przewodu, którego koniec znajdował się w biurecie wypełnionej wodą w ilości 2 l. Po ustaleniu się równowagi nad powierzchnią badanej próbki (30 min.) prowadziłam proces adsorpcji substancji lotnych w mikrofiltrze w temperaturze 20°C przez 120 min. Szybkość wypływu wody z biurety, a tym samym pobieranie oparów, regulowałam różnicą wysokości między wylotem powietrza z przewodu szklanego a wypływem wody z biurety. Wypływ wody wynosił 1 l/godz.

Po zakończeniu adsorpcji przemyłam 1 ml dichlorometanu. Eluat zebrałam w 2 ml fiolce i analizowałam metodami GC i GC-MS.

Oznaczenie zawartości sumy lotnych składników w drewnie wykonałam metodą ze standardem wewnętrznym. Do eluatu zawierającego składniki lotne drewna dodałam 20 µl roztworu tridekanu w dichlorometanie (1,51 µg/µl). Każda próbka eluatu analizowana była pięciokrotnie metodą GC (po 5 µl), a średnie wyniki zawartości składników podałam w przeliczeniu na suchą masę drewna.

3.1.7. Mikroekstrakcja do fazy stałej z fazy nadpowierzchniowej

Mikroekstrakcja do fazy stałej z fazy nadpowierzchniowej (HS-SPME) wykonana była przy użyciu sprzętu i włókien firmy Supelco Ltd. (Bellefonte, PA, USA). Testowane były następujące włókna: 100 µm PDMS, 50/30µm DVB/CAR/PDMS, 75 µm CAR/PDMS, 70 µm CW/DVB i 65 µm PDMS/DVB. Włókna były kondycjonowane przed analizą zgodnie z instrukcją producenta.

Surowiec bezpośrednio po rozdrobnieniu umieszczałam w szklanej fiolce uszczelnionej zakrętką z silikonową septą. Fiolkę umieszczałam w łaźni wodnej. Po ustaleniu równowagi między matrycą a fazą gazową, wprowadzałam do fiolki włókno i prowadziłam ekstrakcję. Następnie włókno wprowadzałam do dozownika chromatografu gazowego lub

chromatografu gazowego sprzężonego ze spektrometrem masowym w celu desorpcji związków (2 minuty).

Parametry analizy HS-SPME były następujące:

- **drewno drzew iglastych:** masa próbki 0,8 g (drewno cięłam mikrotomem firmy Leitz Wetzlar, Austria na plasterki o wymiarach 20×10×0,36 mm), pojemność fiolki 4 ml, temperatura ustalania równowagi i ekstrakcji 60°C, czas ustalania równowagi 30 min., czas ekstrakcji 30 min.
- **nasiona roślin rodzaju czarnuszka:** masa próbki 10,0 g (zmielone w młynku udarowym do kawy, 1 min.), pojemność fiolki 20 ml, temperatura ustalania równowagi i ekstrakcji 60°C, czas ustalania równowagi 15 min., czas ekstrakcji 30 min.

3.1.8. Chromatografia gazowa

Drewno drzew iglastych

Chromatografia gazowa (GC) próbek otrzymanych z drewna drzew iglastych została przeprowadzona na chromatografie gazowym Varian 3400 z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym FID, przy użyciu kolumny kapilarnej HP-5 lub HP-1 (30 m / 0,32 mm; grubość filmu 0,25 µm). Temperatura kolumny programowana była w zakresie odpowiednio: DHS i HS-SPME 50°C (0,5 min.) – 250°C (10 min.), olejki eteryczne: 50°C (0,5 min.) – 270°C (10 min.); przyrost temperatury 4°C/min., następnie 10°C/min. do 290°C (5 min.). Temperatura dozownika 230°C, temperatura detektora 270°C, prędkość przepływu wodoru 1,0 ml/min.

Nasiona roślin rodzaju czarnuszka

Chromatografia gazowa próbek otrzymanych z roślin rodzaju czarnuszka została przeprowadzona na chromatografie gazowym Vega 6000 (firma Carlo Erba), z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym FID, przy użyciu kolumny kapilarnej CP Sil 5 CB (30 m / 0,32 mm; grubość filmu 0,25 µm). Temperatura kolumny programowana była w zakresie odpowiednio: HS-SPME 60°C (0,5 min.) – 250°C (30 min.), olejki eteryczne i olejki lotne: 60°C (0,5 min.) – 300°C (30 min.). Przyrost temperatury 4°C/min. Temperatura dozownika wynosiła odpowiednio: HS-SPME 230°C, olejki 320°C, a temperatura detektora 250°C lub 310°C. Prędkość przepływu azotu 1,5 ml/min.

3.1.9. Sprzężenie chromatografii gazowej ze spektrometrią masową

Drewno drzew iglastych

Chromatografię gazową sprzężoną ze spektrometrią masową (GC-MS) składników drewna wykonano przy użyciu spektrometru masowego sprzężonego z chromatografem gazowym HP 6890-5973 GC-MSD (Hewlett Packard).

Warunki analizy:

- kolumny: HP-5 (20 m / 0,25 mm, 0,25 μ m) lub HP-1 (15 m / 0,25 mm; 0,25 μ m)
- temperatura kolumny 50°C (0,5 min.) – 250°C (10 min.), przyrost temperatury: 4°C/min., następnie do 290°C, 10°C/min.
- temperatura dozownika 240°C
- gaz nośny – hel, prędkość przepływu 1 ml/min.
- energia jonizacji 70 eV
- temperatura źródła jonów 220°C.

Nasiona roślin rodzaju czarnuszka

Analiza GC-MS próbek składników lotnych nasion roślin rodzaju czarnuszka prowadzone były z zastosowaniem chromatografu gazowego Fisons GC 8000 sprzężonego ze spektrometrem masowym MD 800. Warunki analizy:

- rodzaj kolumny i temperatura analiz identyczna jak w 3.1.8)
- gaz nośny – hel, prędkość przepływu 1 ml/min.
- energia jonizacji 70 eV
- temperatura źródła jonów 220 °C

3.1.10. Chromatografia kolumnowa z przyspieszonym przepływem eluenta

Chromatografię kolumnową z przyspieszonym przepływem eluenta (chromatografia fleszowa, FC: flesh chromatography) wykonałam stosując szklane kolumny chromatograficzne o średnicach wewnętrznych 1, 2 lub 5 cm, dostosowując je do masy rozdzielanej próbki. Jako adsorbenta używałam żelu krzemionkowego (Kieselgel 60: 60Å, grubość ziarna 0,040-0,063 mm, firma Merck) lub żelu impregnowanego AgNO₃, wysokość warstwy żelu wynosiła zawsze 15 cm.

Przygotowanie żelu impregnowanego azotanem srebra:

Odważałam 100 g żelu, który zawieszałam w 250 ml eteru naftowego. Następnie mieszając wkraplałam roztwór 25 g AgNO₃ w 10 g H₂O, całość mieszałam na wyparce przez

3 godz. Po odessaniu rozpuszczalnika żel suszony był w temperaturze 70°C przez 12 godz. [Schneider, 1992].

Pierwszym etapem rozdziału było zwilżenie adsorbenata pentanem lub heksanem, którego przepływ przyspieszałam za pomocą sprężonego azotu. Następnie nanosiłam na powierzchnię żelu 20% roztwór próbki w pentanie lub heksanie. Kolumnę rozwijałam gradientem polarności rozpuszczalników – początkowo pentanem (monoterpeny) lub heksanem (seskwiterpeny), następnie roztworami odpowiednio pentanu lub heksanu z dodatkiem wzrastającej ilości eteru dietylowego (od 2 do 100%). Eluat zbierałam do probówek o pojemności 15 ml.

Po wykonaniu analizy TLC wszystkich uzyskanych frakcji, łączyłam zawartość odpowiednich probówek i otrzymane roztwory zatężałam na wyparce pod zmniejszonym ciśnieniem. Próbkę analizowałam metodami GC, GC-MS, a wybrane również metodą NMR.

3.1.11. Chromatografia cienkowarstwowa

Chromatografię cienkowarstwową (TLC) wykonałam na płytkach aluminiowych firmy Merck (DC-Alufolien Kieselgel 60 F₂₅₄) pokrytych żelem krzemionkowym o grubości warstwy 0,2 mm. Płytki rozwijałam w komorach do chromatografii cienkowarstwowej w heksanie lub 20% roztworze eteru dietylowego w heksanie, po wysuszeniu spryskiwałam je roztworem aldehydu anyżowego (2 ml aldehydu anyżowego, 250 ml etanolu, 30 ml kwasu octowego i 15 ml kwasu siarkowego). Płytki wywoływałam w temperaturze 110°C.

3.1.12 Spektroskopia jądrowego rezonansu magnetycznego

Analizy metodą spektroskopii jądrowego rezonansu magnetycznego (NMR) wykonano w roztworach CDCl₃ z zastosowaniem TMS jako wzorca wewnętrznego na aparacie Bruker AM 250 MHz, częstotliwość robocza ¹H-NMR – 250 MHz, ¹³C-NMR – 62,90 MHz.

3.1.13. Identyfikacja składników

Składniki lotne identyfikowałam wykorzystując:

- porównanie indeksów retencji (RI) analizowanych składników, ustalonych na podstawie czasów retencji mieszaniny n-alkanów C₈-C₃₂, z indeksami wzorców zebranymi w bazie danych Instytutu Podstaw Chemii Żywności PŁ (IPChŻ) oraz indeksami literaturowymi [Adams, 1998; Macchioni i in., 2003; Manninen i in., 2002; Ucar i in., 2003; NIST Standard Reference Databas]

- porównanie widm masowych z widmami masowymi wzorców z bibliotek widm: Wiley 275.1 i NIST 98.1 dla składników drewna drzew iglastych oraz z biblioteki NIST 98.1, MassFinder 3.1 i widmami wzorców zebranymi w IPChŻ dla składników roślin rodzaju czarnuszka
- porównanie widm ^1H -NMR oraz ^{13}C -NMR składników z danymi literaturowymi [m. in. Joulain i König, 1998] lub widmami wzorców zebranymi w IPChŻ.

3.1.14. Oznaczanie zawartości wody w surowcu roślinnym

Zawartość wody w surowcu oznaczałam metodą suszenia [Strzelecka i in., 1982].

3.1.15. Rozpuszczalniki i odczynniki

n-Pentan cz., heksan frakcja z nafty (rektyfikowany), eter naftowy ($T_w=53-64^\circ\text{C}$), eter dietylowy cz.d.a, metanol cz., kwas octowy, kwas siarkowy, wodorotlenek sodu: wszystkie zakupione w firmie POCh, Łódź; dichlorometan cz.: Chempur, Piekary Śląskie; etanol – rektyfikat: Zakłady Przemysłu Spirytusowego "POLMOS" S.A. w Kutnie.

- mieszanina n-alkanów $\text{C}_8\text{-C}_{32}$, tridekan (99%), heptadekan: Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Niemcy
- Porapak Q 80/100, Altech Associates Inc. Baranowo, Polska
- BF_3 w metanolu: BDH Chemicals Ltd Poole England
- sabinen: R C Treatt Ltd – 70% wg GC (30% stanowił β -pinen)
- octan rtęci (II), tetrahydrofuran, borowodorek sodu, wodorek sodu: Fluka
- siarczan dimetylu, dimetyloformamid: Aldrich

3.1.16. Parametryczny test istotności

Test istotności dwóch średnich zastosowałam do porównania czy skład bielu i twardzieli badanych gatunków drzew iglastych różnił się istotnie. Test ten można stosować dla cech (μ_1 i μ_2) posiadających rozkład normalny oraz gdy wariancje porównywanych populacji nie różnią się między sobą istotnie. Test rozpocząłam od postawienia hipotezy zerowej:

$$H_0: \mu_1 = \mu_2 \text{ (zawartość składnika w bielu jest taka sama jak w twardzieli)}$$

wobec hipotezy alternatywnej:

$$H_1: \mu_1 \neq \mu_2 \text{ (zawartość składnika jest inna w bielu i twardzieli).}$$

Test przeprowadziłam dla wybranych składników lotnych drewna, których zawartość w bielu lub twardzieli w co najmniej dwóch egzemplarzu drzew (spośród 3 badanych) danego gatunku wynosiła powyżej 0,1%. Dla tych składników obliczyłam wartość t:

$$t = \frac{X_1 - X_2}{\sqrt{\frac{n_1 * S_1^2 + n_2 * S_2^2}{n_1 + n_2 - 2} \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}}$$

x_1 – średnia zawartość składnika w bielu

x_2 – średnia zawartość składnika w twardzieli

n_1 – liczba pomiarów dla bielu

n_2 – liczba pomiarów dla twardzieli

s_1 – odchylenie standardowe średniej zawartości składnika w bielu

s_2 – odchylenie standardowe średniej zawartości składnika w twardzieli

Obliczoną na podstawie powyższego wzoru wartość t porównywałam z wartością statystyki t-Studenta (t_s) dla określonego przedziału ufności (α) i wartości stopnia swobody (n_1+n_2-2). Przedział ufności przyjąłam 0,05, natomiast liczba stopni swobody wyniosła 4 (3 pomiary dla bielu i 3 dla twardzieli). Wartość obliczona t większa od wartości krytycznej, pozwalała na odrzucenie hipotezy zerowej (czyli zawartość związku w bielu różniła się istotnie od zawartości w twardzieli). Jeśli natomiast wartość obliczona była mniejsza – nie było podstaw do odrzucenia hipotezy zerowej (czyli zawartość związku w obu warstwach nie różniła się statystycznie). Wartość krytyczna t_s wynosiła 2,776, odczytałam ją z rozkładu t-Studenta (przecięcie wartości 0,05 (α) i 4 (liczba stopni swobody) [Łomnicki, 2002].

3.2. Ocena aktywności przeciwdrobnoustrojowej olejku eterycznego

Aktywność przeciwdrobnoustrojowa olejków z nasion *N. sativa* i *N. damascena* została określona w Instytucie Technologii Fermentacji i Mikrobiologii Politechniki Łódzkiej. Do sprawdzenia działania bakteriobójczego stosowane były następujące szczepy referencyjne: *Escherichia coli* ATCC 8793, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 oraz *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Grzybobójcze działanie olejków testowane było wobec szczepów *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida mycoderma* i *Aspergillus niger* ATCC 16404.

3.2.1. Metoda płytkowa

Badanie wykonano metodą płytkową rozcieńczeń na podłożu agarowym. Pożywkę dla bakterii stanowił bulion odżywczy z glukozą, natomiast dla grzybów – YPG. Olejek eteryczny z nasion *N. sativa* w postaci 20% roztworu etanolowego dodano do podłoża i uzyskano szereg stężeń od 0,05% do 0,8%. Hodowlę drobnoustrojów, zawierającą 10^8 jtk/ml, rozcieńczono roztworem soli fizjologicznej (0,85% NaCl), tak aby w 1 ml znajdowało się 10^2 - 10^3 jtk (jednostek tworzących kolonie). Następnie na płytki Petriego naniesiono inokulum kultury testowej po 0,1 ml i 1 ml. Inokulum zalano pożywką i dokładnie wymieszano. Po zastygnięciu i podsuszeniu płytki inkubowano. Hodowlę *E. coli*, *P. aeruginosa* i *S. aureus* prowadzono w temperaturze 37°C, a pozostałych mikroorganizmów w 30°C, aż do wyrośnięcia. Równolegle wykonano próbę kontrolną nie zawierającą olejku. Na podstawie uzyskanych wyników ustalono minimalne stężenie olejku hamujące (MIC) rozwój wybranych szczepów drobnoustrojów.

3.2.2. Metoda impedymetryczna

W badaniach aktywności przeciwbakteryjnej i przeciwgrzybowej olejków został wykorzystany impedymetryczny system monitorujący Bactometr M64 Firmy bioMérieux z celami pomiarowymi o pojemności 1-2 ml, którym dysponuje Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii PŁ. Aktywność statyczna i bójcza olejku eterycznego z nasion *N. damascena* oraz olejku lotnego z nasion *N. sativa* określona została przez wyznaczanie odpowiednio wartości MIC (minimalne stężenie hamujące) i MBC (minimalne stężenie bójcze) w stosunku do określonych drobnoustrojów testowych.

3.3. Izolowanie i identyfikacja składników olejku eterycznego z nasion czarnuszki siewnej

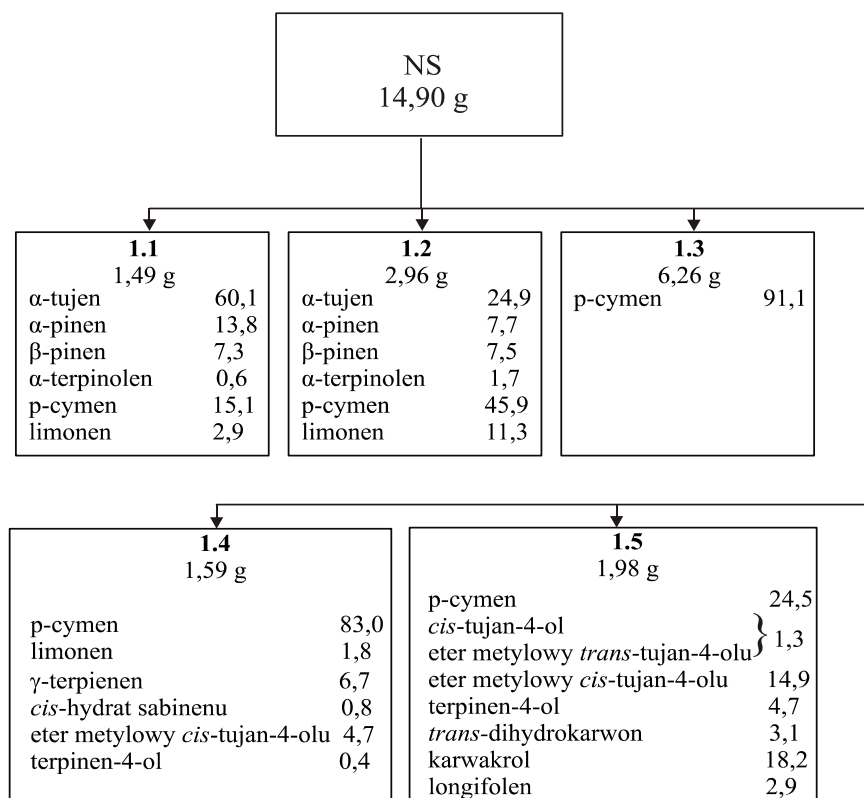
Olejek eteryczny z nasion czarnuszki siewnej otrzymany w wyniku 4-godzinnej destylacji z parą wodną (14,9 g) nasion *N. sativa* (NS), (Wielkopolska, 2002) poddałam destylacji pod zmniejszonym ciśnieniem, a otrzymane frakcje rozdzielałam metodą chromatografii faszowej według schematu przedstawionego na Rysunku 17.

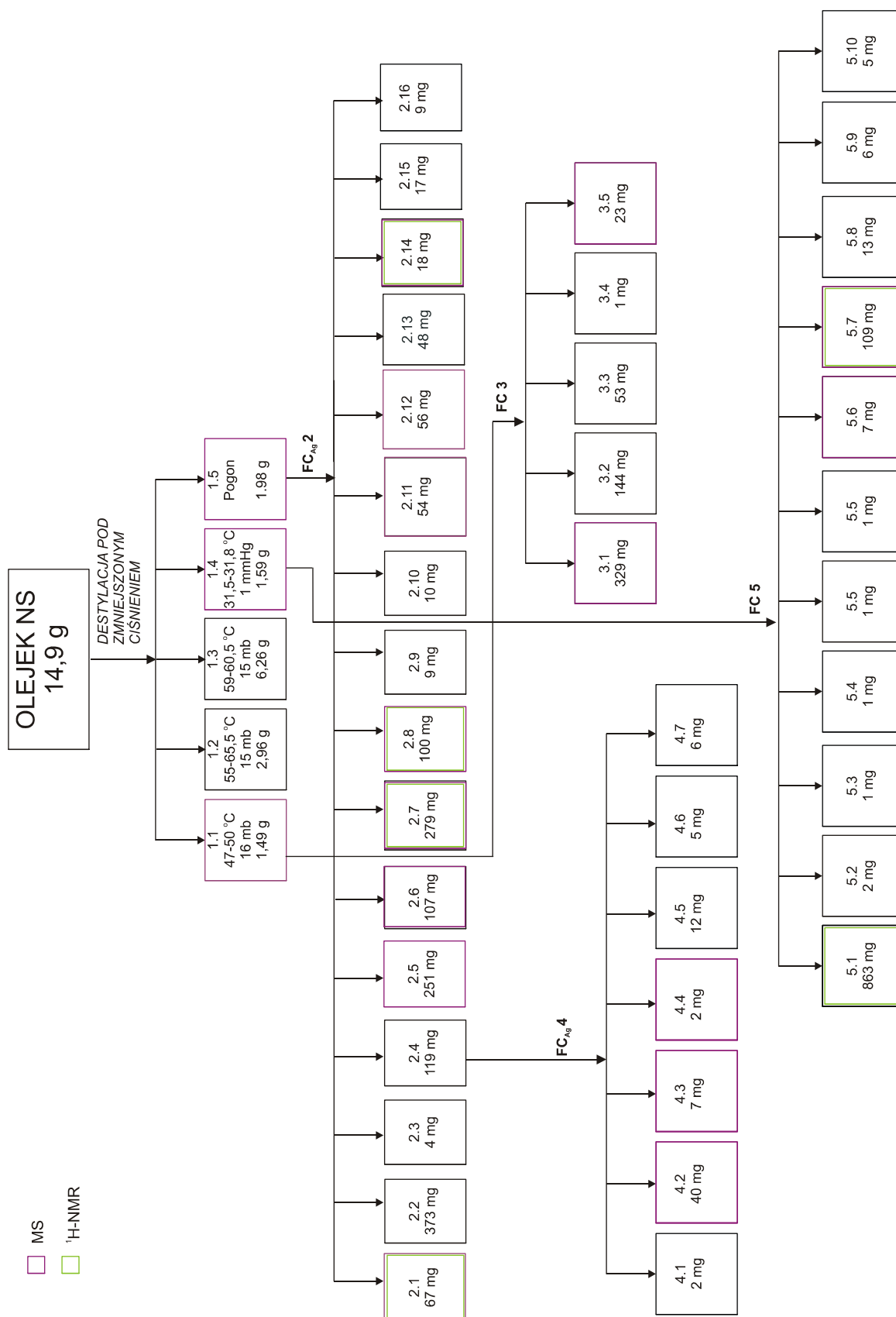
Skład chemiczny frakcji analizowałam metodami GC i GC-MS, zidentyfikowane główne składniki i ich zawartość (%) podałam na schematach. Kolejność składników jest zgodna z kolejnością elucji z kolumny CP Sil 5.

3.3.1. Destylacja frakcjonowana olejku eterycznego

Destylację wykonałam według opisu przedstawionego w rozdziale 3.1.1, uzyskując następujące frakcje:

- 1.1 1,49 g, 47-50°C/ 12 mmHg
- 1.2 2,96 g, 55-56,6°C/ 12 mmHg
- 1.3 6,26 g, 59-60,5°C/ 12 mmHg
- 1.4 1,59 g, 31,5-31,8°C/ 1 mmHg
- 1.5 1,98 g, pogon



Rysunek 17. Schemat rozdziatu oleju eterycznego z nasion *Nigella sativa*

3.3.2. Chromatografia flesztowa frakcji olejku eterycznego

Chromatografia flesztowej (FC) frakcji olejku wykonana została według opisu przedstawionego w rozdziale 3.3.11.

Chromatografia flesztowa frakcji 1.5 (FC2)

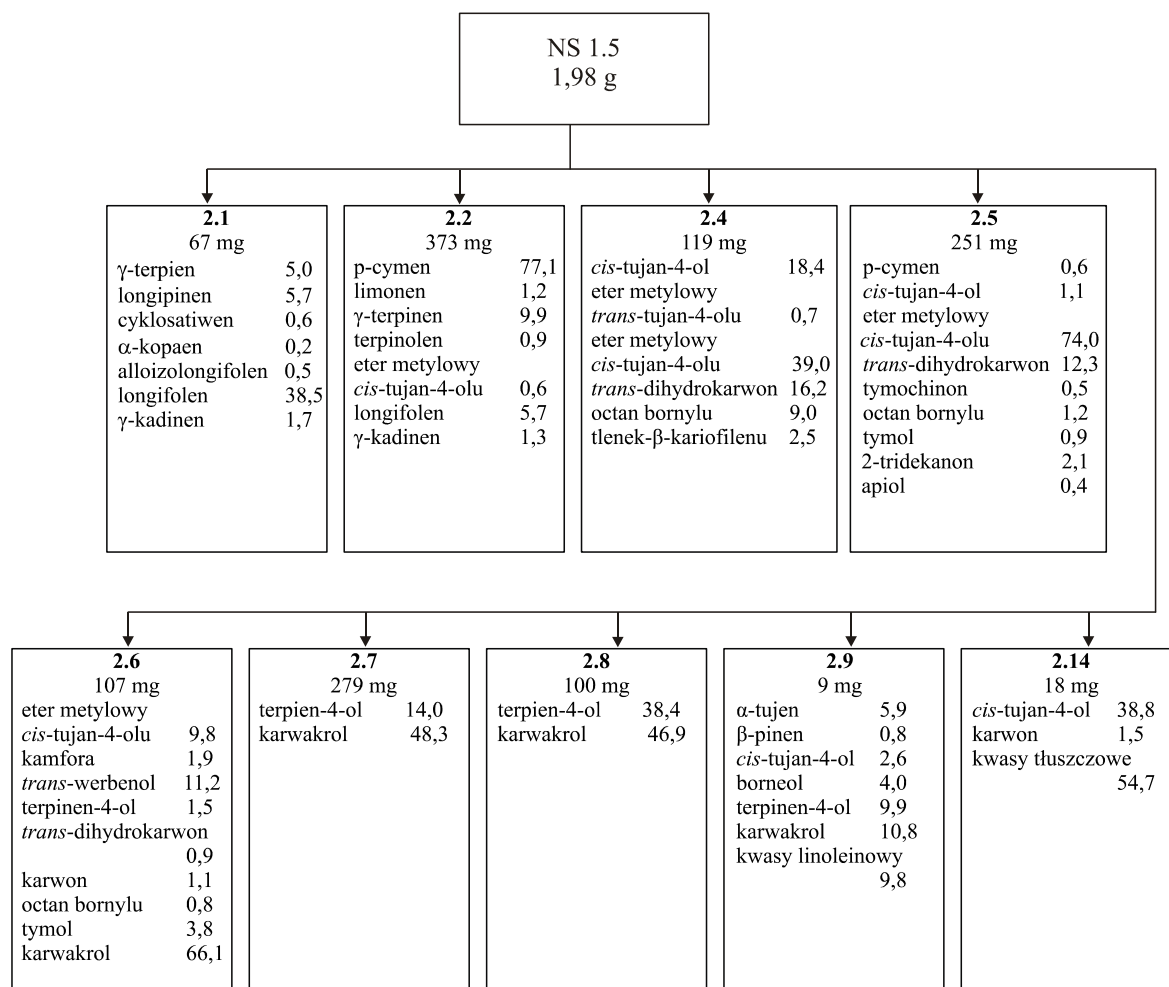
średnica kolumny: 2 cm, wypełnienie: żel krzemionkowy impregnowany AgNO₃

układ rozwijający: heksan, 5%, 10%, 20% i 50% eter dietylowy w heksanie (po 150 ml), eter dietylowy 200 ml

ilość probówek: 64; frakcje 2.1-2.16

GC-MS: frakcje 2.1, 2.5-2.8, 2.11, 2.12, 2.14

¹H-NMR: frakcje 2.1, 2.7, 2.14



Chromatografia flesztowa (FC3) frakcji 1.1

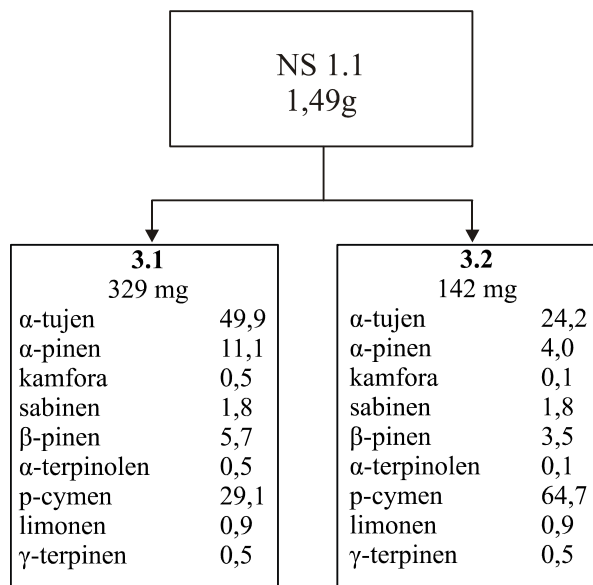
średnica kolumny: 2 cm; wypełnienie: żel krzemionkowy

układ rozwijający: heksan 200 ml, 2%, 5% eter dietylowy w heksanie (po 100 ml), eter dietylowy 100 ml

ilość probówek: 37; frakcje 3.1-3.5

GC-MS: frakcje 3.1, 3.2

¹H-NMR: frakcja 3.1

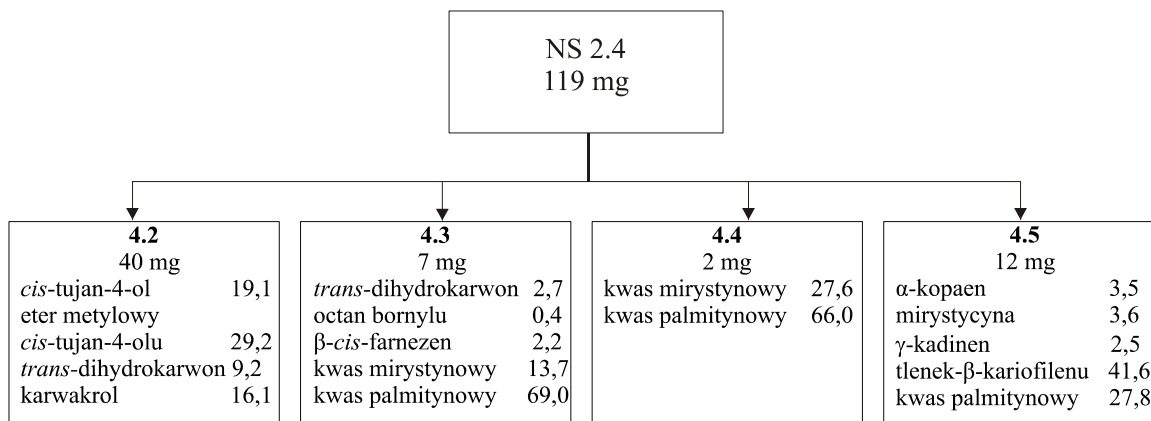
**Chromatografia flesztowa (FC4) frakcji 2.4**

średnica kolumny: 1 cm; wypełnienie: żel krzemionkowy impregnowany AgNO₃

układ rozwijający: heksan 50 ml, 5%, 10%, 20%, 50 % eter dietylowy w heksanie (po 100 ml), eter dietylowy 100 ml.

ilość probówek: 40; frakcje 4.1-4.7

GC-MS; frakcje 4.2, 4.3, 4.4



Chromatografia faszowa (FC5) frakcji 1.4

średnica kolumny: 2 cm; wypełnienie: żel krzemionkowy

układ rozwijający: heksan 200 ml, 2%, 5% eter dietylowy w heksanie (po 100 ml) i 10%, 20%, 50 % eter dietylowy w heksanie (po 50 ml), eter dietylowy 100 ml

Ilość probówek: 51; frakcje 5.1-5.10

GC-MS: frakcje 5.1, 5.6 i 5.7

¹H-NMR: frakcje 5.1

NS 1.4 1,59 g			
5.1 863 mg		5.7 109 mg	
α-tujen	0,4	α-tujen	1,1
sabinen	0,2	p-cymen	41,3
β-pinen	0,2	limonen	1,7
α-terpinen	0,4	γ-terpinen	3,4
p-cymen	88,3	β-tujen	1,6
limonen	1,9	eter metylowy	
γ-terpinen	7,8	cis-tujan-4-olu	45,1
terpinolen	0,5	dihydrokarwon	3,0
5.9 13 mg		5.10 5 mg	
β-tujen	1,5	p-cymen	4,8
terpinolen	18,8	γ-terpinen	1,7
karwakrol	61,4	cis-tujan-4-ol	3,2
		terpinen-4-ol	10,6
		α-terpineol	5,1
		karwon	6,4
		karwakrol	32,1

3.3.3. Identyfikacja składników

Obecność składników, które wydzieliłam z olejku eterycznego, w czystości i ilości odpowiedniej do analizy ¹H-NMR, potwierdziłam tą metodą. Niektóre składniki (np. tymochinon i octanu bornylu) wydzieliłam we frakcjach olejku lotnego (E_{pe}/HD – destylacja z parą wodną ekstraktu pentanowego-eterowego) otrzymanych w analogiczny sposób.

- longifolen RI 1407 (38,5% frakcji 2.1)

MS: 204 [M]⁺ (28) m/z (%) = 91 (100), 161 (85), 105 (71), 119 (52), 79 (50), 133 (50), 189 (43), 41 (33), 147 (30), 67 (24), 55 (22), 175 (14)

¹H-NMR, δ (ppm): 0,89 (s, 3H); 0,92 (s, 3H), 0,99 (s, 3H), 2,01 (d, 1H, J=3,3 Hz); 2,61 (d, 1H, J=5 Hz); 4,50 (s, 1H); 4,75 (s, 1H)

- karwakrol RI 1282 (48,3% frakcji 2.7)

MS: 150 [M]⁺ (37) m/z (%) = 135 (100), 91 (20), 107 (20), 115 (12), 77 (10)

- $^1\text{H-NMR}$, δ (ppm): 1,23 (d, 6H, $J=7,0\text{Hz}$); 2,21 (s, 3H); 2,82 (spt, 1H, $J=7,0\text{Hz}$); 6,65 (d, 1H, $J=1,5\text{Hz}$); 6,72 (dd, 1H, $J=1,5$ i $7,75\text{Hz}$); 7,03 (d, 1H, $J=7,75$)
- terpinen-4-ol RI 1168 (12% frakcji 2.7; 52% frakcji olejku lotnego E_{pe}/HD)
 MS: 154 $[\text{M}]^+$ (12) m/z (%) = 93 (100), 121 (44), 71 (41), 136 (39), 77 (36), 111 (36), 41 (28), 53 (14), 105 (12)
 $^1\text{H-NMR}$, δ (ppm): 0,93 (d, 3H, $J=6,5$); 0,96 (d, 3H, $J=6,75$); 1,54 (m, 2H); 2,13-2,15 (m, 2H), 1,69 (s, 3H), 5,30 (m, 1H)
 - *cis*-tujan-4-ol (*cis*-hydrat sabinenu) RI 1085 (39% frakcji 2.14)
 MS: 154 $[\text{M}]^+$ (5) m/z (%) = 93 (100), 79 (57), 43 (51), 65 (21), 121 (21), 136 (20), 55 (19), 107 (13)
 $^1\text{H-NMR}$, δ (ppm): 0,32 (dd, 1H, $J=5/7,8\text{Hz}$); 0,64 (dd, 1H, $J=3,8/5\text{Hz}$); 0,87 (d, 3H, $J=6,8\text{Hz}$), 0,91 (d, 3H, $J=6,8\text{Hz}$) 1,04 (dd, 1H, $J=3,8/7,8\text{Hz}$); 1,32 (s, 3H)
 - α -tujen RI 926 (49,9% frakcji 3.1)
 MS: 136 $[\text{M}]^+$ (10) m/z (%) = 93 (100), 77 (35), 39 (7), 105 (6), 65 (6)
 $^1\text{H-NMR}$, δ (ppm): 0,88 (d, 3H, $J=7,0\text{Hz}$); 0,93 (d, 3H, $J=7,0\text{Hz}$); 1,75 (dd, 3H, $J=1,7/3,5\text{Hz}$); 2,19(m, 1H); 2,29 (m, 1H); 4,94 (s, 1H)
 - p-cymen RI 1016 (88,3% frakcji 5.1)
 MS: 134 $[\text{M}]^+$ (27) m/z (%) = 119 (100), 91 (29), 77 (6)
 $^1\text{H-NMR}$, δ (ppm): 1,23 (d, 6H, $J=6,8\text{Hz}$); 2,30 (s, 3H); 2,85 (spt, 1H, $J=6,8\text{Hz}$); 7,12 (s, 4H)
 - γ -terpinen RI 1049 (7,8% frakcji 5.1)
 MS: 136 $[\text{M}]^+$ (36) m/z (%) = 93 (100), 77 (67), 43 (34), 121 (36), 65 (19), 105 (19)
 $^1\text{H-NMR}$, δ (ppm): 1,02 (d, 6H, $J=6,8\text{Hz}$), 1,65 (s, 3H); 5,43 (m, 1H)
 - tymochinon RI 1233 (98,5% frakcji olejku lotnego E_{pe}/HD)
 MS: 164 $[\text{M}]^+$ (100), m/z (%) = 149 (50), 136 (77), 93 (73), 39 (70) 121 (69), 53 (36), 77 (32), 108 (23), 67 (22)
 $^1\text{H-NMR}$, δ (ppm): 1,13 (d, 6H, $J=6,8\text{Hz}$); 2,03 (d, 3H, $J=1,8\text{Hz}$); 3,02 (dspt, 1H, $J=1,8/6,8\text{Hz}$); 6,52 (s, 1H); 6,59 (s, 1H)
 - octan bornylu RI 1272 (12% frakcji olejku lotnego E_{pe}/HD)
 MS: 196 $[\text{M}]^+$ (1), m/z (%) = 95 (100), 43 (89), 121 (54), 136 (32), 67 (28), 154 (18)
 $^1\text{H-NMR}$, δ (ppm): 0,76(s, 3H); 0,83(s, 3H); 0,86 (s, 3H); 0,96 (dd, 1H, $J=2,5/10,0\text{Hz}$); 1,26 (m, 2H); 1,65 (m, 1H); 2,06 (s, 3H); 4,86 (m, 1H)

3.3.4. Izolowanie, synteza i określenie struktury eterów metylowych *trans*- i *cis*-tujan-4-olu

Etery metylowe *trans*- i *cis*-tujan-4-olu (etry metylowe *trans*- i *cis*-hydratu sabinenu) wydzieliłam z 10,6 g olejku eterycznego (Wielkopolska, 2004) metodą destylacji pod zmniejszonym ciśnieniem (frakcje 1.1-1.8), a następnie chromatografii flesztowej frakcji 1.7 o najwyższej zawartości eterów, odpowiednio 4,5% i 34,6% (Rysunek 18).

Chromatografia flesztowa frakcji 1.7 (FC)

średnica kolumny: 1 cm, wypełnienie: żel krzemionkowy

układ rozwijający: pentan 150 ml, 2 %, 4% eter dietylowy w pentanie (po 150 ml), 10%, 20%, 50% eter dietylowy w pentanie (po 50 ml), eter dietylowy 50 ml

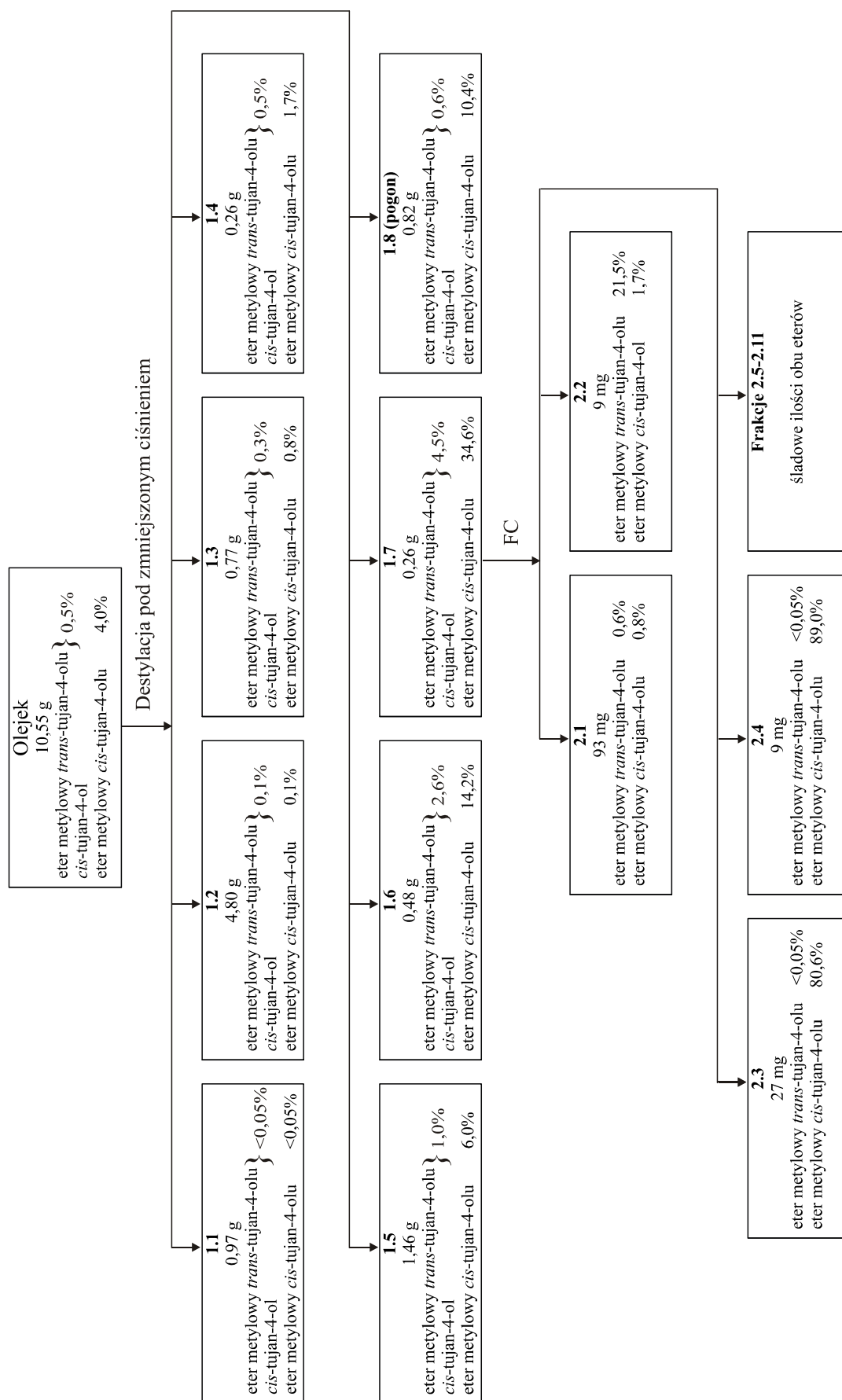
ilość probówek 49; frakcje 2.1-2.11

GC-MS: frakcje 2.2, 2.3

¹H-NMR: frakcje 2.2, 2.3

¹³C-NMR: frakcja 2.3

- eter metylowy *trans*-tujan-4-olu RI 1088 (21,5% frakcji 2.2, 9 mg)
MS: 168 [M]⁺ (2), m/z (%) = 125(100); 93(79), 85(56); 121(42); 72(39); 55(37); 97(37); 100(37); 153(36); 81(35); 136(22)
¹H-NMR, δ (ppm): 0,15 (m, 1H); 0,85 (d, 3H, *J*=6,8Hz); 0,96 (d, 3H, *J*=6,8Hz); 3,25 (s, 3H); 1,23 (s, 3H)
- eter metylowy *cis*-tujan-4-olu RI 1110 (80,6% frakcji 2.3, 27 mg,)
MS: 168 [M]⁺ (2), m/z (%) = 125(100); 153(86), 93(56); 85(50); 72(45); 121(44); 136(40); 81(33); 55(28); 100(20); 97(16);
¹H-NMR, δ (ppm): 0,33 (dd, 1H, *J*=5,0/7,9Hz); 0,64 (d, 3H, *J*=3,8/5,8Hz); 0,87 (d, 3H, *J*=6,8Hz); 0,91 (d, 3H, *J*=6,8Hz); 1,00 (dd, 1H, *J*=3,8/7,9Hz); 1,25 (s, 3H); 3,27 (s, 3H)
¹³C-NMR, δ(ppm): 19,5 (q); 19,7 (q); 23,5 (q); 24,9 (t); 29,9 (d); 32,8 (d); 33,0 (s); 33,6 (t); 51,4 (q); 83,8 (s)

Rysunek 18. Schemat izolowania eterów metylowych *trans*- i *cis*-tujan-4-olu z olejku eterycznego *Nigella sativa*

3.3.4.1. Synteza eterów metylowych *trans*- i *cis*-tujan-4-olu z sabinenu

Do roztworu sabinenu (0,35 g, 2,37 mmol) rozpuszczonego w osuszonym metanolu (15 ml), dodałam octan rtęci (II) (1,13 g, 3,54 mmol). Roztwór mieszałam przez 12 godz. z zastosowaniem mieszadła magnetycznego. Następnie dodałam 5 ml wodnego roztworu wodorotlenku sodu (3 M) i 5 ml 0,5 M borowodorku sodu rozpuszczonego w 3 M roztworze wodorotlenku sodu. Mieszanie kontynuowałam przez 8 godz. Po tym czasie dodałam 200 ml wody. Produkt oddestylowałam z parą wodną (destylacja prosta) i ekstrahowałam eterem dietylowym (3 × 50 ml). Warstwę organiczną osuszyłam bezwodnym siarczanem sodu i po odsączeniu środka suszącego, usunęłam rozpuszczalnik na wyparce obrotowej. Surowy produkt (biały olej, 68,8% GC – suma izomerów, *trans* : *cis* – 1 : 2,85) oczyściłam oraz rozdzieliłam metodą chromatografii kolumnowej (eter dietylowy : pentan, 1 : 9) na żelu krzemionkowym. Eter metylowy *trans*-tujan-4-olu (0,08 g; 0,48 mmol; 91,4% GC) eluował przed eterem metylowym *cis*-tujan-4-olu (0,13 g; 0,77 mmol; 98,3% GC). Wydajność syntezy wyniosła 53% (suma izomerów). Związki analizowane były metodami GC, GC-MS, ^1H - i ^{13}C -NMR oraz ^1H - ^1H -COSY.

- eter metylowy *trans*-tujan-4-olu

MS: 168 $[\text{M}]^+$ (2), m/z (%) = 125(100); 93(79), 85(56); 121(42); 72(39); 55(37); 97(37); 100(37); 153(36); 81(35); 136(22)

^1H -NMR, δ (ppm): 0,15 (dd, 1H, $J=3,5/4,9\text{Hz}$); 0,38 (dd, 1H, $J=4,9/8,5\text{Hz}$); 0,85 (d, 3H, $J=6,8\text{Hz}$); 0,96 (d, 3H, $J=6,8\text{Hz}$); 1,10 (dd, 1H, $J=3,8/8,5\text{Hz}$); 1,23 (s, 3H); 3,25 (s, 3H)

^{13}C -NMR δ (ppm): 12,1 (t) ; 19,9 (q); 20,1 (q); 20,9 (q); 27,2 (t); 30,8 (d); 32,1 (d); 33,3 (t); 34,8 (s); 49,8 (q); 85,1 (s)

- eter metylowy *cis*-tujan-4-olu

MS: 168 $[\text{M}]^+$ (2), m/z (%) = 125(100); 153(86), 93(56); 85(50); 72(45); 121(44); 136(40); 81(33); 55(28); 100(20); 97(16);

^1H -NMR: δ (ppm): 0,33 (dd, 1H, $J=5,0/7,9\text{Hz}$); 0,64 (d, 3H, $J=3,8/5,0\text{Hz}$); 0,87 (d, 3H, $J=6,7\text{Hz}$); 0,91 (d, 3H, $J=6,8\text{Hz}$); 1,00 (dd, 1H, $J=3,8/7,9\text{Hz}$); 1,25 (s, 3H); 3,27 (s, 3H)

^{13}C -NMR: δ (ppm): 19,5 (q); 19,7 (q); 23,5 (q); 24,9 (t); 29,9 (d); 32,8 (d); 33,0 (s); 33,6 (t); 51,4 (q); 83,8 (s)

3.3.4.2. Synteza *trans*- i *cis*-tujan-4-olu z sabinenu

Do roztworu sabinenu (1,00 g; 7,35 mmol) rozpuszczonego w mieszaninie THF:woda (5:1, 30 ml), dodałam octan rtęci (II) (3,52 g; 11,03 mmol). Roztwór mieszałam przez 12 godz. z zastosowaniem mieszadła magnetycznego. Następnie, dodałam 15 ml wodnego roztworu wodorotlenku sodu (3 M) i 15 ml 0,5 M borowodorku sodu rozpuszczonego w 3 M roztworze wodorotlenku sodu. Mieszanie kontynuowałam przez 8 godz. Po tym czasie dodałam 200 ml wody. Produkt oddestylowałam z parą wodną (destylacja prosta) i wyekstrahowałam eterem dietylowym (3 × 50 ml). Warstwę organiczną osuszyłam bezwodnym siarczanem sodu i po odsączeniu środka suszącego, usunęłam rozpuszczalnik na wyparce obrotowej. Otrzymaną mieszaninę izomerów (białe kryształy, 55,2% GC – suma izomerów, *trans* : *cis* – 2,5 : 1) rozdzieliłam metodą chromatografii kolumnowej (Et₂O : n-pentan, 2 : 8) na żelu krzemionkowym. *Trans*-tujan-4-ol (białe kryształy; 0,28 g; 1,82 mmol; 96,2% GC) eluował jako pierwszy, przed *cis*-tujan-4-olem (biały olej; 0,11 g; 0,71 mmol; 95,3 % GC). Wydajność syntezy wynosiła 34 % (suma izomerów). Związki poddane zostały analizie GC, GC-MS oraz ¹H i ¹³C-NMR.

- *trans*-tujan-4-ol

MS: 154 [M⁺](5), m/z (%) = 43 (100), 55 (30), 71 (74), 81 (28), 93 (48), 111 (28), 121 (26), 136 (15),

¹H-NMR, δ (ppm): 1,30 (s, 3H); 1,06 (dd, 1H, *J*=3,5/8,2Hz); 0,97 (d, 3H, *J*=6,8); 0,90 (d, 3H, *J*=6,8Hz); 0,64 (dd, 1H, *J*=5,0/8,2Hz); 0,22 (dd, 1H, *J*=3,5/5,0Hz)

¹³C-NMR, δ (ppm): 80,5 (s); 36,6 (t); 34,6 (s); 34,4 (d); 32,1 (d); 25,9 (t); 25,0 (q); 20,0 (q); 19,9 (q); 13,2 (t) ppm

- *cis*-tujan-4-ol

MS: 154 [M]⁺ (5) m/z (%) = 93 (100), 79 (57), 43 (51), 65 (21), 121 (21), 136 (20), 55 (19), 107 (13)

¹H-NMR: (250 MHz) ppm: 1,32 (s, 3H); 1,04 (dd, 1H, *J*=3,5/8,2Hz); 0,91 (d, 3H, *J*=6,8Hz); 0,87 (d, 3H, *J*=6,8Hz); 0,64 (dd, 1H, *J*=3,7/5,0Hz); 0,32 (dd, 1H, *J*=5,0/7,9Hz)

¹³C-NMR: δ = 79,3 (s); 36,1 (t); 33,6 (d); 33,2 (s); 32,5 (d); 28,0 (q); 25,5 (t); 19,6 (q); 19,5 (q); 11,1 (t) ppm.

3.3.4.3. Synteza eterów metylowych *trans*- i *cis*-tujan-4-olu z odpowiednich alkoholi

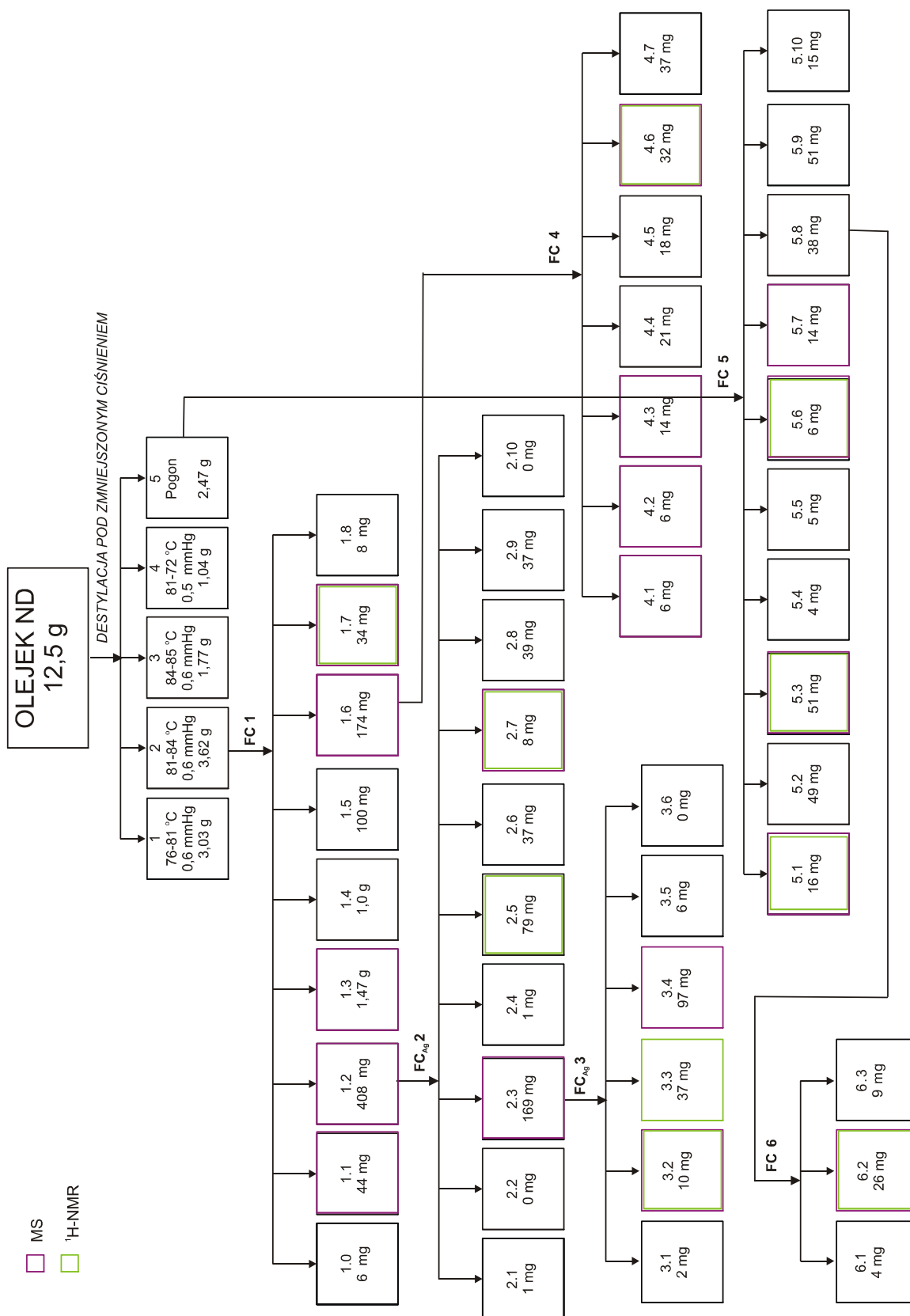
Próbkę *trans*-tujan-4-olu (0,10 g; 0,65 mmol) rozpuściłam w 2 ml dimetyloformamidu, dodałam wodorek sodu (0,03 g; 1,25 mmol) oraz siarczan dimetylu (0,15 g; 0,11 ml; 1,19 mmol). Roztwór ogrzewałam do delikatnego wrzenia pod chłodnicą zwrotną w czasie 15 min. Po tym czasie mieszaninę ochłodziłam i dodałam 10 ml wody. Z uzyskanej zawiesiny ekstrahowałam produkt eterem dietylowym (2×10 ml). Połączone warstwy organiczne przemyłam wodą (2×5 ml) i suszyłam bezwodnym siarczanem sodu. Po odsączeniu środka suszącego, roztwór zatężyłam na wyparce obrotowej. Produkt był mieszaniną *trans*-tujan-4-olu oraz eteru metylowego *trans*-tujan-4-olu w proporcji 1:9 (GC).

Eter metylowy *cis*-tujan-4-olu otrzymany był z *cis*-tujan-4-olu według tej samej procedury w tych samych proporcjach. Obecność tych składników potwierdziłam metodą GC-RI.

3.4. Izolowanie i identyfikacja składników olejku eterycznego z nasion czarnuszki damasceńskiej

Olejek eteryczny (ND) otrzymany metodą 5-godzinnej destylacji z parą wodną (12,5 g) nasion *Nigella damascena* (Kujawy, 2002), poddałam destylacji pod zmniejszonym ciśnieniem, a następnie chromatografii faszowej (Rysunek 19).

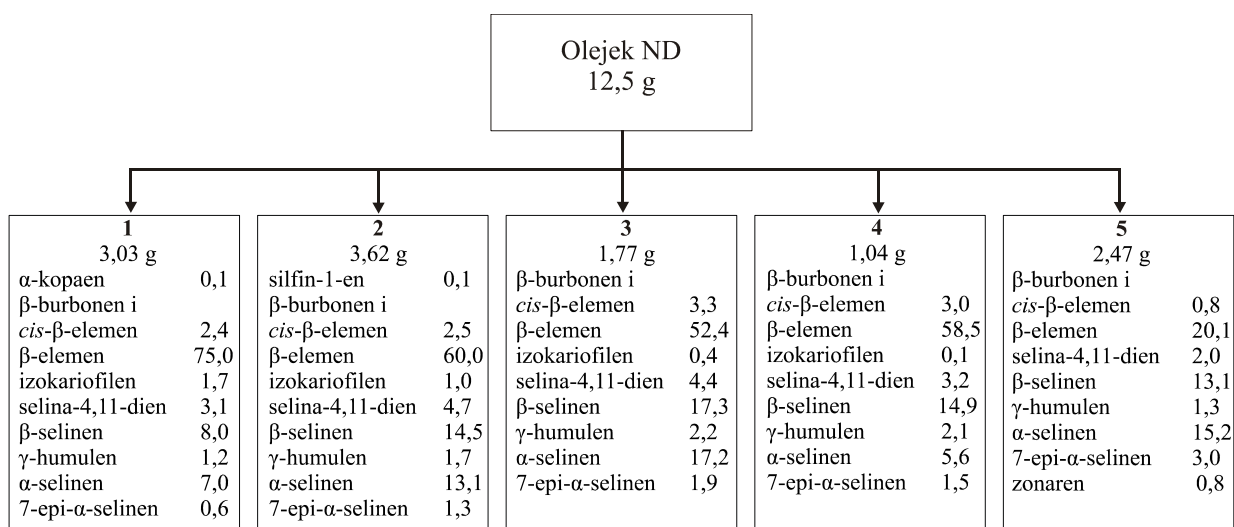
Skład chemiczny frakcji analizowałam metodami GC i GC-MS, zidentyfikowane główne składniki i ich zawartość (%) podałam na schematach. Kolejność składników jest zgodna z kolejnością elucji z kolumny CP Sil 5.

Rysunek 19. Schemat rozdziálu olejku eterycznego z nasion *Nigella damascena*

3.4.1. Destylacja frakcjonowana olejku eterycznego

W wyniku destylacji olejku otrzymałam następujące frakcje:

- 1 3,03 g, 76-81°C/ 0,6 mmHg
- 2 3,62 g, 81-84°C/ 0,6 mmHg
- 3 1,77 g, 84-85°C/ 0,6 mmHg
- 4 1,04 g, 81-72°C/ 0,5 mmHg
- 5 2,47 g, pogon.



3.4.2. Chromatografia fleszowa frakcji olejku eterycznego

Chromatografia fleszowa (FC1) frakcji 2

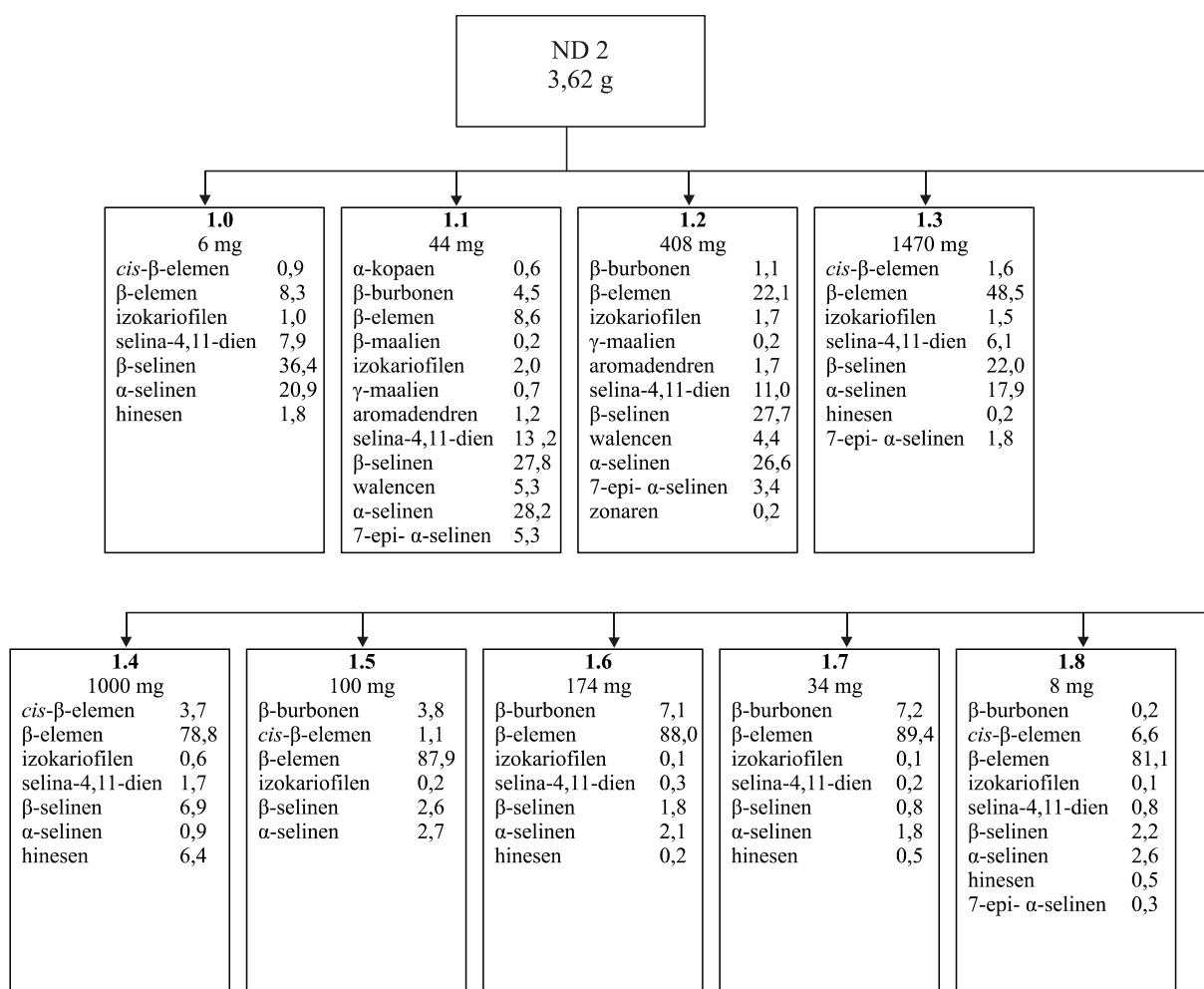
średnica kolumny: 5 ml, wypełnienie: żel krzemionkowy

układ rozwijający: heksan 250 ml, 2%, 5% eter dietylowy w heksanie (po 250 ml), 10%, 20%, 50 % eter dietylowy w heksanie (po 100 ml), eter dietylowy 100 ml

ilość probówek: 79; frakcje 1.0-1.8

GC-MS: frakcje 1.1, 1.2, 1.4, 1.6, 1.7

$^1\text{H-NMR}$: frakcja 1.7



Chromatografia fleszowa (FC2) frakcji 1.2

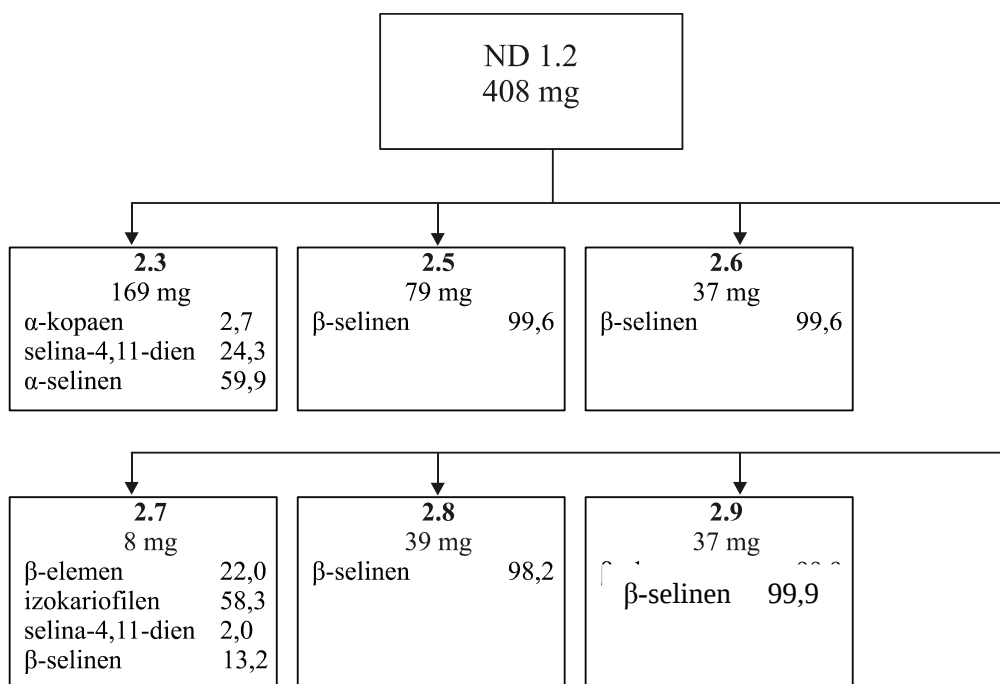
średnica kolumny: 2 cm; wypełnienie: żel krzemionkowy impregnowany AgNO₃

układ rozwijający: heksan, 5%, 10%, 20%, 50 % eter dietylowy w heksanie (po 100 ml),
eter dietylowy 100 ml

ilość probówek: 4; frakcje 2.1-2.10

GC-MS: frakcja 2.3, 2.5 i 2.7

¹H-NMR: frakcja 2.5



Chromatografia fleszowa (FC3) frakcji 2.3

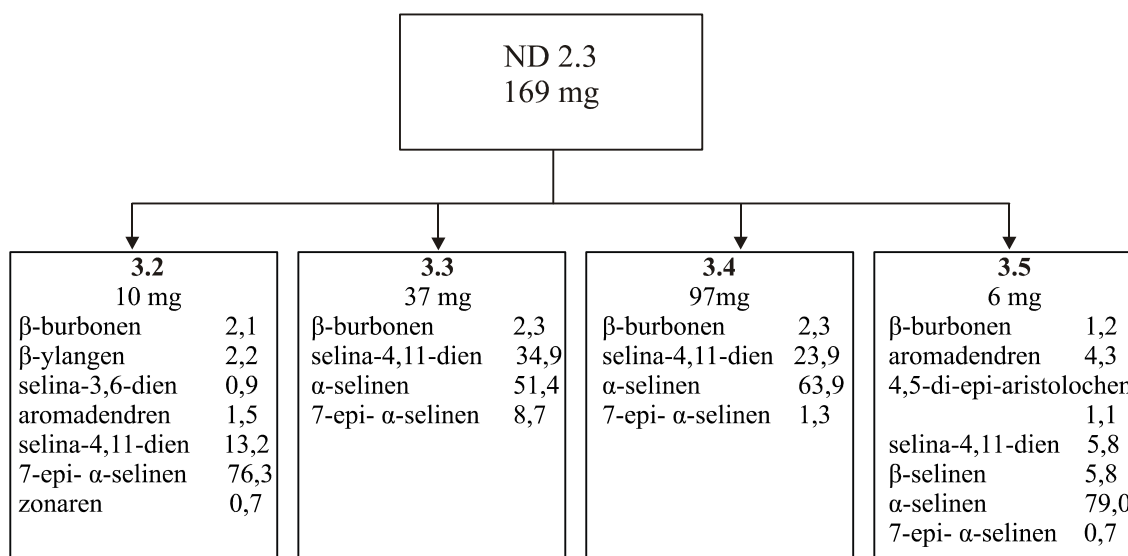
średnica kolumny: 2 cm; wypełnienie: żel krzemionkowy impregnowany AgNO₃

układ rozwijający: heksan 50 ml, 2% eter dietylowy w heksanie 100 ml, 5%, 10% eter dietylowy w heksanie (po 50 ml), eter dietylowy 50 ml

ilość probówek: 30; frakcje 3.1-3.5, pierwsze dwie połączyłam, nadając jej nazwę 3.2.

GC-MS: frakcje 3.2 i 3.4

¹H-NMR: frakcja 3.3



Chromatografia fleszowa (FC4) frakcji 1.6

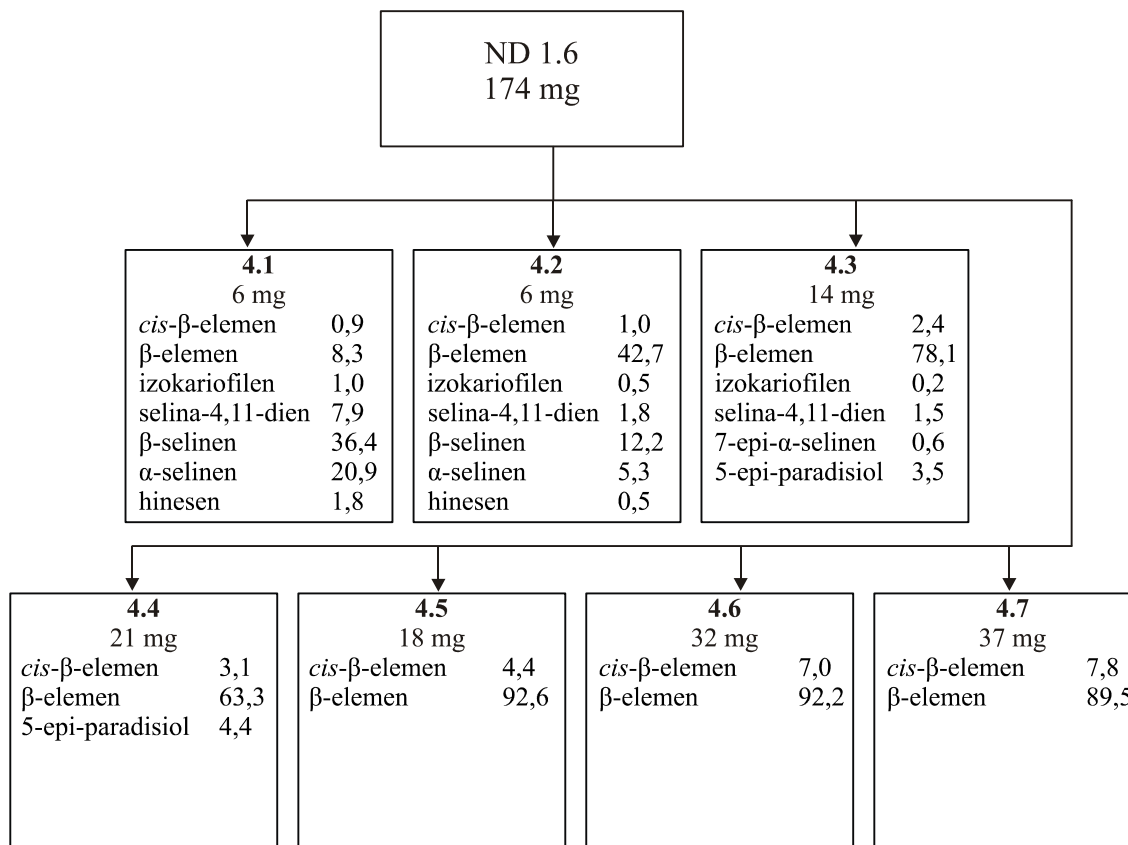
średnica kolumny: 2 cm; wypełnienie: żel krzemionkowy

układ rozwijający: heksan, 5%, 10%, 20%, 50% eter dietylowy w heksanie i eter dietylowy (po 100 ml)

ilość probówek: 41; frakcje 4.1-4.7,

GC-MS: frakcja 4.1-4.3 i 4.6

¹H-NMR: frakcja 4.6

**Chromatografia fleszowa (FC5) frakcji 5**

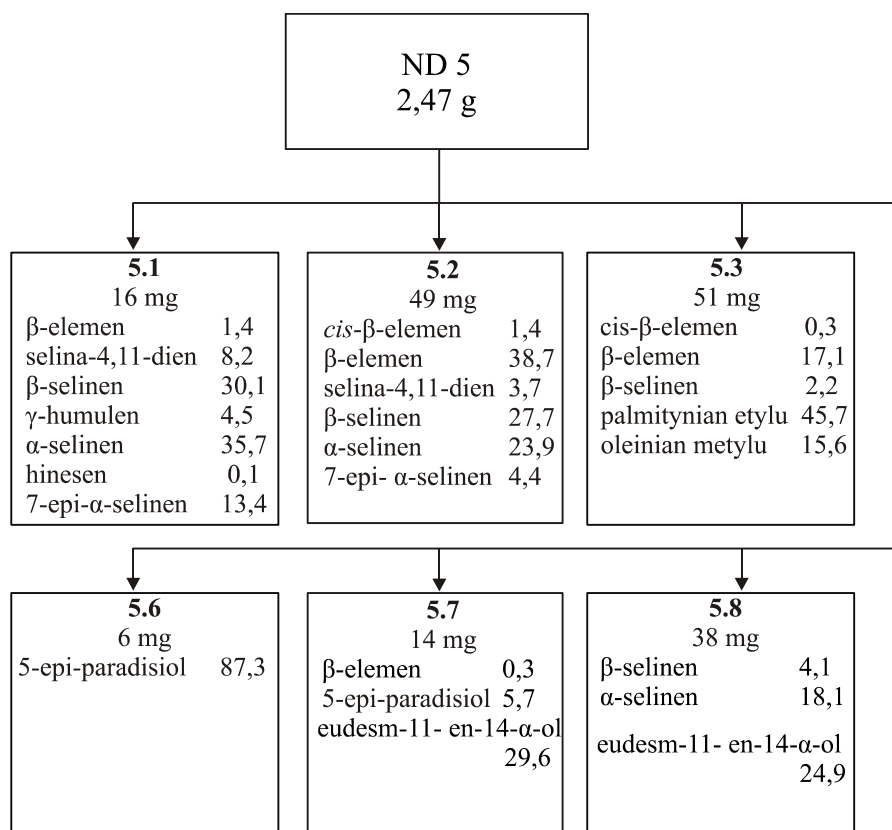
średnica kolumny: 2 cm; wypełnienie: żel krzemionkowy impregnowany AgNO₃

układ rozwijający: heksan, 5%, 10%, 20%, 50% eter dietylowy w heksanie i eter dietylowy (po 100cm³)

ilość probówek: 42; frakcje 5.1-5.10

GC-MS: frakcje 5.1, 5.3, 5.6, 5.7

¹H-NMR: frakcje 5.1, 5.3, 5.6



Chromatografia fleszowa (FC6) frakcji 5.6

średnica kolumny: 1 cm; wypełnienie: żel krzemionkowy

układ rozwijający: 10%, 20% eter dietylowy w heksanie (po 50 ml), eter dietylowy 100 ml

ilość probówek: 1; frakcje 6.1-6.3.

Jedynie frakcję 6.2, o odpowiednio dużej masie (26 mg), w której 69,7% stanowił eudesm-11-en-4α-ol analizowałam metodami GC, GC-MS oraz ¹H-NMR.

3.4.3. Identyfikacja składników

Obecność składników, które wydzieliłam z olejku eterycznego, w czystości i ilości odpowiedniej do analizy ¹H-NMR, potwierdziłam tą metodą.

- β-elemen (78% olejku; 80% frakcji 1.7)

MS: 204 [M]⁺ (1) m/z (%) = 81 (100), 93 (99), 67 (75), 107 (55), 53 (41), 121 (35), 147 (35), 133 (26), 161 (23), 189 (18), 175 (5)

¹H-NMR, δ (ppm): 1,0 (s, 3H); 1,46-1,56 (m, 5H); 1,61 (d, 1H); 1,72 (s, 3H); 1,75 (s, 3H); 1,93-2,14 (m, 2H); 4,59 (m, 1H); 4,70-4,72 (m, 2H); 4,82-4,93 (m, 3H); 5,82 (dd, 1H, J=10,5/17,8Hz)

- ^{13}C -NMR, δ (ppm): 16,5; 21,0; 24,8; 27,1; 32,8; 39,6; 39,8; 45,7; 52,6; 108,2; 109,7; 112,1; 147,2; 150; 150,3
- β -selinen RI 1486 (12,8 % olejku; 99,6% frakcji 2.5; 30,1 % frakcji 5.1)
MS: 204 $[\text{M}]^+$ (47) m/z (%) = 93 (100), 79 (93), 105 (85), 67 (83), 55 (68), 121 (68), 133 (62), 161 (58), 147 (56), 189 (45), 175 (26)
 ^1H -NMR, δ (ppm): 0,73 (s, 3H); 1,26-1,27 (m, 2H); 1,42 (m, 1H); 1,50 (m, 1H); 1,55 (m, 2H); 1,61 (m, 2H); 1,75 (s, 3H); 1,96 (m, 1H); 2,10 (m, 1H); 2,32 (m, 1H); 4,43 (m, 1H); 4,71 (m, 3H)
 ^{13}C -NMR, δ (ppm): 16,2; 21,0; 23,4; 26,7; 35,8; 36,8; 41,1; 41,9; 45,8; 49,9; 105,4; 108,2; 150,0; 150,1
 - α -selinen RI 1497 (12,6% olejku; 51,4% frakcji 3.3; 35,7 % frakcji 5.1)
MS: 204 $[\text{M}]^+$ (58) m/z (%) = 93 (100), 107 (97), 81 (92), 189 (82), 133 (79), 67 (72), 55 (69), 161 (61), 147 (55), 121 (55), 175 (39)
 ^1H -NMR, δ (ppm): 0,79 (s, 3H); 1,59 (s, 3H); 1,75 (s, 3H); 1,87 (m, 1H); 2,01 (m, 2H); 4,72 (m, 2H); 5,29 (m, 1H)
 ^{13}C -NMR, δ (ppm): 15,5; 20,1; 21,0; 22,8; 26,7; 28,8; 32,2; 38,0; 40,2; 46,6; 46,7; 108,3; 120,8; 134,7; 150,6
 - β -burbonen (7,2% frakcji 1.7)
MS: 204 $[\text{M}]^+$ (2) m/z % = 81 (100), 123 (65), 161 (29), 91 (21), 105 (18), 67 (14), 55 (14), 133 (7), 147 (3), 189 (2), 175 (1)
 ^1H -NMR, δ (ppm): 0,73 (d, 3H, $J=0,5$ Hz); 0,78 (d, 3H, $J=0,5$ Hz); 1,00 (s, 3H)
 - 7-*epi*- α -selinen RI 1517 (76,3% frakcji 3.2)
MS: 204 $[\text{M}^+]$ (18) m/z (%) = 122 (100), 161 (87), 107 (77), 41 (74), 67 (44), 81 (43), 91 (42), 55 (39), 133 (18), 189 (9), 146 (5), 175 (2)
 ^1H -NMR, δ (ppm): 0,84 (s, 3H); 1,14-1,21 (m, 11H); 1,61 (s, 3H); 1,75 (s, 3H); 2,40 (m, 1H); 4,86 (s, 1H); 4,92 (s, 1H); 5,32 (br. s, 1H)
 - selina-4,11-dien RI 1475 (13,2% frakcji 3.2; 34,9% frakcji 3.3)
MS: 204 $[\text{M}^+]$ (44) m/z (%) = 189 (100), 133 (71), 41 (65), 91 (51), 105 (49), 79 (39), 67 (38), 55 (35), 147 (34), 161 (24), 119 (24), 175 (5)
 ^1H -NMR, δ (ppm): 1,04 (s, 3H); 1,19 (m, 1H); 1,36 (m, 1H); 1,61 (s, 3H); 1,75 (s, 3H); 4,70 (br. s, 1H), 4,71 (br. s, 1H)

- 5-*epi*-paradisiol RI 1620 (87,3% frakcji 5.6)
MS: 222 [M^+] (2) m/z (%) = 43 (100), 81 (59), 67 (58), 55 (44), 135 (37), 93 (31), 204 (27), 107 (23), 189 (23), 123 (17), 161 (15), 147 (11), 179 (5)
 $^1\text{H-NMR}$, δ (ppm): 1,05 (s, 3H); 1,16 (s, 3H); 1,75 (s, 3H); 4,70 (s, 1H); 4,73 (s, 1H)
- eudesm-11-en-4 α -ol RI 1643 (69,7% frakcji 6.2)
MS: 222 [M^+] (4) m/z (%) = 81 (100), 71 (70), 93 (58), 55 (57), 135 (53), 109 (42), 204 (40), 189 (39), 161 (36), 121 (31), 147 (23), 175 (9)
 $^1\text{H-NMR}$, δ (ppm): 0,89 (s, 3H); 1,12 (s, 3H); 1,75 (s, 3H); 4,70 (br.s, 1H) ; 4,71 (br.s, 1H)

4. BADANIA WŁASNE – DREWNO DRZEW IGLASTYCH

4.1. Zakres badań

Zakres badań lotnych składników drzew iglastych obejmował:

- Wybór metody określenia składu ilościowego i jakościowego lotnych związków drewna. Doświadczenia prowadziłam oddzielnie dla bielu i twardzieli świerka pospolitego (*Picea abies* L.) wykorzystując trzy techniki:
 - destylacja z parą wodną w aparacie Derynga (HD)
 - analiza fazy nadpowierzchniowej metodą dynamiczną (DHS)
 - mikroekstrakcja do fazy stałej z fazy nadpowierzchniowej (HS-SPME).
- Zastosowanie wybranej metody (HS-SPME) do określenia składu związków lotnych emitowanych przez biel i twardziel trzech gatunków drzew iglastych:
 - świerka pospolitego (*Picea abies* L. Karst)
 - sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.)
 - modrzewia europejskiego (*Larix decidua* Mill.).

Badania dotyczące drewna drzew iglastych wykonałam w Laboratory of Wood and Paper Chemistry, Åbo Akademi w Turku/Finlandia.

4.2. Materiał

Materiał do badań stanowiło drewno zdrowych drzew iglastych: świerka pospolitego, sosny zwyczajnej oraz modrzewia europejskiego rosnących w Finlandii (świerk i sosna) lub Francji (modrzew) i ścinanych w trzech egzemplarzach każdego gatunku dla celów niniejszej pracy. Dane charakteryzujące badane drzewa zamieszczone są w Tabeli 11.

Tabela 11. Charakterystyka badanych drzew iglastych

Gatunek	Drzewo	Miejsce wzrostu	Liczba pierścieni na wysokości 1,5 m (wiek drzewa)	Czas ścięcia drzewa
Świerk pospolity	<i>Picea abies</i> 1	Finlandia	50	Sierpień 2003
	<i>Picea abies</i> 2		70	Sierpień 2003
	<i>Picea abies</i> 3		50	Październik 2003
Sosna zwyczajna	<i>Pinus sylvestris</i> 1	Finlandia	60	Listopad 2003
	<i>Pinus sylvestris</i> 2		55	Styczeń 2004
	<i>Pinus sylvestris</i> 3		58	Styczeń 2004
Modrzew europejski	<i>Larix decidua</i> 1	Francja	43	Maj 2003
	<i>Larix decidua</i> 2		43	Maj 2003
	<i>Larix decidua</i> 3		43	Maj 2003

Drewno przechowywane było w postaci 0,5 m pieńków w plastikowych, szczelnie zamkniętych torbach w temperaturze 24°C. Związki lotne identyfikowane były osobno w warstwie zewnętrznej (biel) oraz wewnętrznej (twardziel) drzew. W celu ułatwienia i zintensyfikowania wydzielania składników lotnych drewno było rozdrabniane bezpośrednio przed każdym procesem wydzielania składników lotnych. Dla potrzeb destylacji z parą wodną drewno było cięte na słupki kształtu zapalki o długości 3-5 cm i przekroju 0,5×0,5 cm. W metodzie analizy fazy nadpowierzchniowej oraz mikroekstrakcji do fazy stałej drewno było cięte na plasterki o wymiarach 20×10×0,36 mm.

4.3. Wybór metody wyodrębniania lotnych składników drewna

Jako sposoby wyodrębniania lotnych związków wybrałam:

- metodę destylacji z parą wodną, służącą do izolowania olejków eterycznych i oznaczania ich zawartości w surowcach roślinnych, polecaną przez Farmakopeę Polską [Farmakopea, 2002]; metoda ta jest najczęściej stosowana do przemysłowego pozyskiwania olejków eterycznych, jest też bardzo przydatna w laboratoriach badawczych, ze względu na możliwość zastosowania standaryzowanej aparatury, która gwarantuje powtarzalność wyników [Scheffer, 1996]
- technikę analizy fazy nadpowierzchniowej sposobem dynamicznym; jest to metoda stosunkowo nowa, prostsza, mniej pracochłonna i wymagająca mniejszej ilości surowca niż destylacja z parą wodną [Da Costa i Eri, 2005]
- mikroekstrakcję do fazy stałej z fazy nadpowierzchniowej; jest to nowoczesna metoda analizy związków lotnych, przewyższająca pod wieloma względami wszystkie inne; jej główne zalety to prostota, szybkość i innowacyjność, a ograniczenia wynikają z trudności ilościowego oznaczenia sumy związków lotnych mieszanin wieloskładnikowych [Pawliszyn, 1997].

Badania przeprowadziłam stosując drewno jednego drzewa świerka, oznaczonego w Tabeli 11 jako *Picea abies* 1.

4.3.1. Destylacja z parą wodną drewna świerka pospolitego

Do określenia wydajności i wyodrębniania olejków eterycznych z bielu i twardzieli świerka użyłam aparatu Derynga. Warunki destylacji olejku eterycznego z parą wodną są znormalizowane, a podstawowy parametr wpływający na wydajność i skład olejku to czas

destylacji, który ustala się indywidualnie dla surowca. Zbyt długo trwający proces destylacji może prowadzić do strat najbardziej lotnych składników, głównie monoterpenujących [Vuorela i in., 1989]. Czas destylacji ustaliłam na 5 godz., po tym czasie nie obserwowałam na skali aparatu Derynga przyrostu objętości wydzielanego olejku.

Ponieważ z literatury wynikało, że zawartość lotnych składników z drewna świerka jest niska, do wydzielenia olejku eterycznego użyłam kawałka pnia 50-cio letniego świerka, o średnicy 30 cm i długości 30 cm. Wykonane oznaczenie zawartości wody metodą suszenia potwierdziło znaną wcześniej [Back i Allen, 2000] zależność, że biel drzew iglastych zawiera więcej wody niż twardziel: zawartość wody w bielu wynosiła 45%, natomiast w twardzieli 21%.

W kawałku pnia świerka większą objętość stanowiła biel niż twardziel, uzyskałam z niego 850 g drewna bielu i 370 g drewna twardzieli. W wyniku destylacji z parą wodną bielu i twardzieli otrzymałam odpowiednio 0,62 ml i 0,11 ml olejku eterycznego, co stanowiło odpowiednio 0,07% i 0,03% świeżej masy oraz 0,13% i 0,04% suchej masy.

Oznaczone wydajności olejku eterycznego mieściły się w granicach podanych w literaturze dla drewna świerkowego: 0,02-0,12% s. m. [Englund i Nussbaum, 2000], 0,04% s. m. [Kimland i Norin, 1972], około 0,1% [Back i Allen, 2000], 0,12% w pulpie wykorzystywanej do produkcji papieru [Lindmark-Henriksson, 2003]. Potwierdziłam wcześniejsze informacje [Back i Allen, 2000] o wyższej zawartości związków lotnych w bielu niż w twardzieli świerka.

Uwzględniając zawartość olejku eterycznego w suchej masie drewna bielu i twardzieli świerka i skład ilościowy olejku określony metodą GC, oszacowałam zawartość poszczególnych lotnych składników w obu warstwach drewna (Tabela 12). Sumaryczna zawartość zidentyfikowanych składników wynosiła odpowiednio 1,24 mg/g w bielu i 0,33 mg/g w twardzieli *P. abies*.

4.3.1.1. Skład chemiczny olejku eterycznego z bielu i twardzieli świerka pospolitego

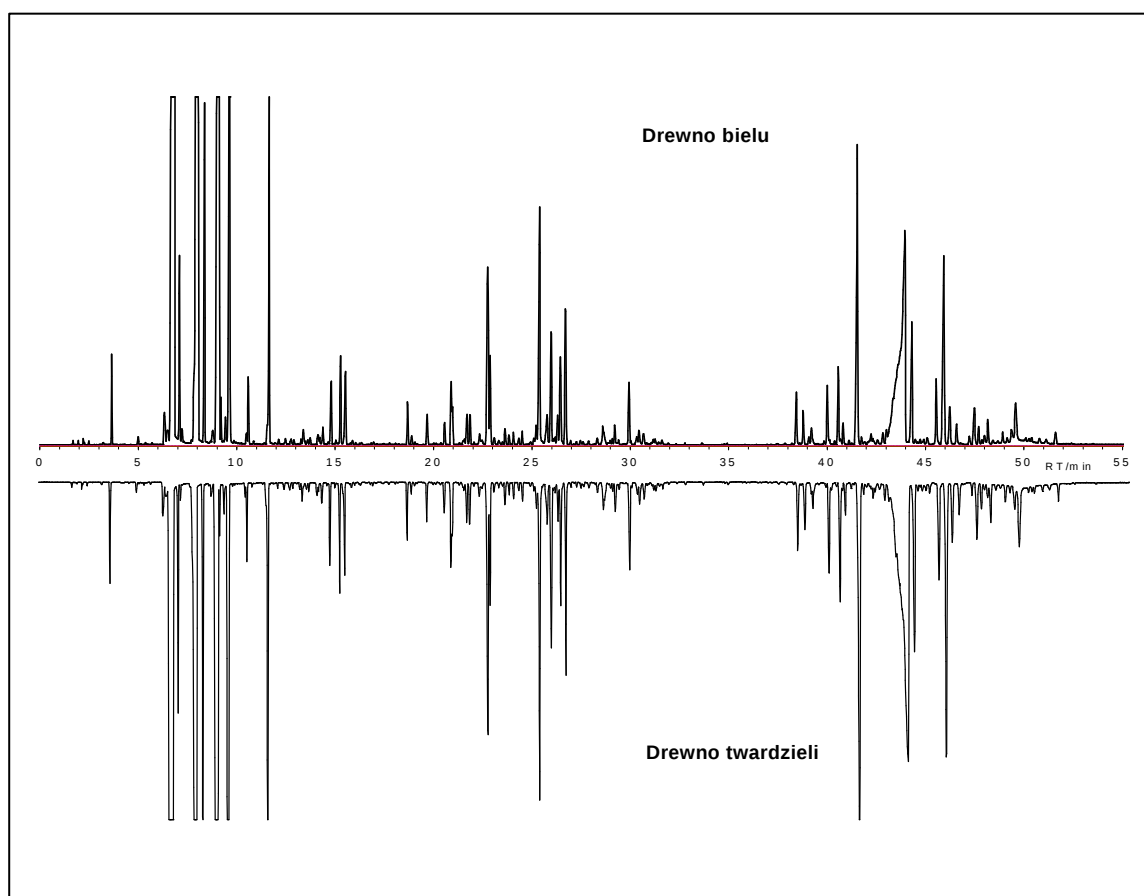
W olejkach eterycznych drewna świerkowego zidentyfikowałam około 100 składników. Skład jakościowy i ilościowy olejków z bielu i twardzieli przedstawiłam w Tabeli 12. Związki w tej tabeli oraz we wszystkich innych tabelach przedstawiających składniki lotne drewna drzew iglastych wymienione zostały w kolejności elucji z kolumny HP-5 i oznaczone numerami od 1-173. Numeracja zidentyfikowanych składników jest ujednolicona dla trzech badanych gatunków drzew iglastych, dlatego nie jest ona ciągła w poszczególnych tabelach.

Wzory związków umieściłam na schemacie stanowiących załącznik do pracy. Związki wymienione są w grupach (mono-, seskwi- i diterpeny) w kolejności alfabetycznej.

W olejkach z bielu i twardzieli świerka zidentyfikowałam odpowiednio 99 i 98 składników, stanowiących odpowiednio 94,7% i 81,2% zarejestrowanych na chromatogramie gazowym związków. Składniki należały do następujących grup:

- węglowodory monoterpenowe i tlenowe pochodne monoterpenów
- węglowodory seskwiterpenowe i tlenowe pochodne seskwiterpenów
- węglowodory diterpenowe i tlenowe pochodne diterpenów
- składniki nieterpenowe (alkany, aldehydy, kwasy tłuszczowe, estry i inne).

Chromatogramy olejków eterycznych bielu i twardzieli *P. abies* 1 zamieszczone są na Rysunku 20. Na obu chromatogramach zaobserwować można te same piki odpowiadające kolejnym składnikom, o czasach retencji od 1 do 55 minut i indeksach retencji od około 800 do 2500. Z podobieństwa obrazów chromatograficznych wynika, że jeśli olejki różnią się składem, to te różnice są niewielkie. Potwierdzają to wyniki analizy zestawione w Tabeli 12.



Rysunek 20. Chromatogram gazowy olejków eterycznych z bielu i twardzieli *Picea abies* 1 (kolumna HP-5)

Tabela 12. Skład olejków eterycznych z bielu oraz twardzieli świerka pospolitego

Numer piku	RI lit *	RI eksp **	Składnik	Biel		Twardziel	
				Zawartość [%]	Ilość ^b [µg/g]	Zawartość [%]	Ilość ^b [µg/g]
1	800	800	(nt) heksanal	tr	0,52	tr	0,08
2	888	885	(mt) santen	0,1	0,91	–	–
4	926	922	(mt) tricyklen	0,4	4,81	0,1	0,52
5	931	927	(mt) α-tujen	0,2	2,60	0,1	0,20
6	939	933	(mt) α-pinen	13,7	178	5,7	22,8
8	953	948	(mt) kamfen	1,2	16,1	0,9	3,52
9	957	952	(mt) tuja-2,4(10)-dien	tr	–	0,1	0,52
11	961	961	(nt) benzaldehyd	tr	–	tr	–
13	976	968	(mt) sabinen	tr	–	0,2	0,76
14	980	976	(mt) β-pinen	11,1	144	4,9	19,6
15	991	991	(mt) mircen	2,6	33,5	0,7	2,68
17	1005	1005	(mt) α-felandren	0,2	2,47	0,2	0,64
18	1011	1011	(mt) 3-karen	10,6	138	4,8	19,4
19	1018	1016	(mt) α-terpinen	tr	–	0,2	0,64
20	1026	1024	(mt) p-cymen	0,2	2,86	0,6	2,20
22+23	1031	1029	(mt) β-felandren ² + limonen ²	5,9	76,4	6,1	24,4
24	1033	¹	(mt) 1,8-cyneol	tr	–	–	–
25	1040	1047	(mt) (Z)-β-ocymen	0,6	8,06	–	–
27	1062	1055	(mt) γ-terpinen	tr	0,26	0,1	0,48
28	¹	1055	(nt) (E)-2-oktenal	tr	–	0,3	1,12
31	1088	1089	(mt) terpinolen	3,4	44,2	1,7	6,64
33	1102	1099	(nt) nonanal	tr	–	tr	–
35	1112	1112	(mt) α-fenchol	0,1	0,78	1,8	7,32
36	1117	1120	(mt) β-fenchol	–	–	0,1	0,52
37	1125	1124	(mt) α-kamfolenal	tr	–	0,1	0,20
37a	1139	1137	(nt) trans -pinokarweol	0,2	2,21	0,3	1,32
38	1140	1147	(mt) cis -werbenol	0,1	0,91	–	–
38a	1162	1159	(mt) pinokarwon	–	–	0,4	1,48
44	1165	1166	(mt) borneol	–	–	1,8	7,24
44a	1173	1167	(nt) izopinokamfon	0,2	2,47	tr	–
45	1177	1176	(nt) terpinen-4-ol	0,6	8,32	1,6	6,44
47	1189	1184	(mt) α-terpineol	0,1	0,78	7,4	29,4
47a	1193	1190	(mt) myrtenal	0,8	10,9	tr	–
48	1195	1197	(nt) estragol	0,8	10,1	tr	–
50	1204	1211	(mt) werbenon	tr	0,26	–	–
51	1235	1233	(mt) eter metylowy tymolu	tr	0,13	0,1	0,15
52	¹	1260	(nt) 3,4-dimetoksytoluen	tr	0,26	tr	0,12
54	1285	1285	(mt) octan bornylu	0,4	5,20	0,2	0,76
56	1291	1291	(nt) (E,Z)-2,4-dekadienal	0,1	1,04	0,1	0,32
59	1314	1314	(nt) (E,E)-2,4-dekadienal	0,3	3,64	0,2	0,88
63+64	1351	1351	(st) α-longipinen + α-kubeben	1,0	12,7	0,1	0,88
66	1368	1369	(st) cyklosatiwen	0,1	1,17	–	–
67	1372	1373	(st) α-ylangen	tr	–	0,2	0,76
68	1373	1375	(st) longicyklen	0,3	4,29	0,2	0,16
70	1376	1377	(st) α-kopaen	0,3	4,03	tr	0,36
72	¹	1400	(st) satiwen	tr	–	–	–
76	1397	1392	(st) 1,7-di- <i>epi</i> -α-cedren	0,1	1,17	–	–
77	1398	1401	(st) β-longipinen	–	–	0,1	0,20
78	1402	1404	(st) α-longifolen	2,4	31,1	0,7	2,84
81	1404	1404	(st) izokariofilen	0,9	11,3	0,7	2,60
82	1409	1406	(st) α-cedren	tr	–	tr	–
83	1418	1421	(st) β-cedren	0,1	0,65	tr	0,04
85	1432	1431	(st) β-gurjunen	0,2	2,08	–	–
87	1436	1437	(st) trans -α-bergamoten	0,1	1,17	0,1	0,28
89	1443	1444	(st) (Z)-β-farnezen	0,1	1,43	tr	0,16
91	1454	1452	(st) α- <i>neo</i> -klowen	0,1	0,91	tr	0,16
93	1458	1457	(st) (E)-β-farnezen	0,1	1,69	tr	0,16
94	1460	¹	(st) cis-muuroła-4(14),5-dien	–	–	tr	–
95	1467	1470	(st) 9- <i>epi</i> -β-kariofilen	tr	0,52	tr	–
96	1477	1479	(st) γ-muurolen	0,2	2,99	0,1	0,36
97	1480	1484	(st) germakren D	2,8	36,9	0,3	1,24
99	1483	1490	(st) <i>ar</i> -kurkumen	tr	–	0,1	1,12
101	1491	1495	(st) walencen	0,5	6,24	0,3	0,52

Tabela 12. c.d.

Numer piku	RI lit *	RI eksp **	Składnik	Biel		Twardziel	
				Zawartość [%]	Ilość ^b [µg/g]	Zawartość [%]	Ilość ^b [µg/g]
105	1499	1504 (st)	α-muurolen	1,3	16,8	tr	
110	1513	1514 (st)	γ-kadinen	0,3	3,90	0,1	0,48
111	1514	1517 (st)	kubebol ^d			0,1	1,72
112	1515	1517 (st)	(Z)-γ-bisabolen ^d	1,0	13,4	–	
113	1524	1526 (st)	δ-kadinen	1,5	19,4	0,9	3,44
115	1532	1534 (st)	kadina-1,4-dien	0,1	0,65	tr	
117	1538	1537 (st)	α-kadinen	tr		tr	
119	1542	1544 (st)	α-kalakoren	tr		0,1	0,15
121	1556	1550 (st)	germakren B	tr	0,39	tr	
122	1563	1563 (st)	β-kalakoleren	0,1	0,65	0,1	0,52
123	1564	¹ (st)	(E)-nerolidol	–		tr	
124	1574	1578 (st)	germakren D-4-ol	0,1	1,30	–	
125	1585	1587 (st)	gleenol	0,3	4,42	0,1	0,20
129	1627	1621 (st)	1- <i>epi</i> -kubenol	0,7	8,84	0,1	0,36
131	1642	1631 (st)	kubenol	0,1	0,91	0,9	3,48
131a	1645	1645 (st)	α-muurolol	tr		0,2	0,72
132	1653	1657 (st)	α-kadinol	0,1	1,69	0,1	0,32
133	1674	1673 (st)	kadalen	–		0,2	0,92
137	1775	1761 (st)	α-14-hydroksymuurolen	0,1	1,04	0,2	0,68
139		¹ (nt)	kwasy tetradekanowy	–		tr	0,08
140		¹ (nt)	kwasy pentadekanowy	–		0,1	0,32
143	1929	1929 (dt)	cembren	0,6	8,19	1,1	4,44
144	1941	1937 (dt)	pimaradien	0,4	5,07	0,4	1,68
145	1942	1950 (dt)	3-(E)-cembren A	0,4	5,07	0,4	1,68
146	1959	1961 (dt)	neocembren	0,2	3,12	1,5	6,08
150	1989	1994 (dt)	tlenek manoilu	0,8	10,3	0,6	2,40
151+152	2010	2016 (dt;nt)	tlenek 13- <i>epi</i> -manoilu + eikozan	1,0	13,0	1,0	4,04
153		¹ (dt)	palustradien	tr		tr	
155		¹ (dt)	tunbergol	4,3	55,3	5,0	19,8
156	2054	2064 (dt)	abieta-8,11,13-trien	–		0,1	0,36
158	2080	2089 (dt)	abieta-7,13-dien	0,1	1,30	0,1	0,56
160		¹ (dt)	δ-13- <i>trans</i> -neoabienol	0,1	1,82	0,6	2,68
161		¹ (dt)	<i>cis</i> -abienol	11,8	153	16,4	65,6
162		¹ (dt)	pimaral	1,7	21,5	0,3	1,40
164		¹ (dt)	izopimaral	0,8	10,7	0,4	1,76
165		¹ (dt)	palustral	2,7	35,6	3,1	12,6
166		¹ (dt)	pimarol	0,5	6,11	0,3	1,16
167	2263	2275 (dt)	dehydroabietal	0,3	3,25	1,1	4,24
169	2302	2304 (dt)	abietal	0,1	1,30	0,6	0,88
170		¹ (dt)	dehydroabietanian metylu	0,3	3,77	0,9	3,40
171	2359	2358 (dt)	dehydroabietol	tr	0,52	0,2	0,68
172		¹ (dt)	neoabietal	tr	0,39	0,3	1,08
173	2391	2392 (dt)	abietol	0,1	0,78	0,1	0,44
monoterpeny (mt)				52,9	700	40,1	160
liczba zidentyfikowanych składników				30		28	
seskwiterpeny (st)				14,8	100	5,8	25
liczba zidentyfikowanych składników				39		37	
diterpeny (dt)				27,0	300	35,3	140
liczba zidentyfikowanych składników				21		22	
składniki nieterpenowe (nt)				1,2	50	0,9	5
liczba zidentyfikowanych składników				9		11	
Suma zidentyfikowanych składników				94,7		81,2	
ilość związków lotnych [µg/g suchego drewna]					1240		330
liczba zidentyfikowanych składników				99		98	

tr < 0,05%

– związek niewykryty

RI lit* indeksy retencji literaturowe

RI eksp** indeksy retencji eksperymentalne

¹ składnik zidentyfikowany tylko na podstawie GC-MS² składnik zidentyfikowany na kolumnie HP-1^b przybliżona ilość składnika w przeliczeniu na suchą masę drewna^d związki eluujące jako jeden pik

Monoterpeny

Węglowodory monoterpenowe i ich tlenowe pochodne, których indeksy retencji zawierają się w przedziale od 800 do 1314, stanowiły w oleju z bielu świerka 52,9%, a z twardzieli 40,1% wydzielonych składników. Zawartość składników monoterpenowych oszacowałam na około 700 µg/g suchej masy bielu i 160 µg/g twardzieli. Olejki poddałam analizie GC-MS na kolumnie niepolarniej HP-1 w celu zidentyfikowania limonenu oraz β-felandrenu, które nie zawsze rozdzielają się na kolumnie HP-5. Na obrazie GC-MS zarysowały się dwa wierzchołki częściowo rozdzielonego piku pochodzące od tych monoterpenów, mających różne widma MS, nie określiłam jednak ich proporcji. Zatem we wszystkich tabelach tego rozdziału podana jest zawartość sumaryczna tych dwu składników.

Na podstawie przeprowadzonych analiz GC-RI i GC-MS olejków eterycznych bielu i twardzieli zidentyfikowałam 16 węglowodorów monoterpenowych, w tym jako składniki wiodące: α-pinen (odpowiednio 13,7% i 5,7%), β-pinen (11,1% i 4,9%), 3-karen (10,6% i 4,8%) oraz β-felandren z limonenem (5,9% i 6,1%). Skład jakościowy węglowodorów monoterpenowych w obu olejkach był prawie identyczny, jedyną zaobserwowaną różnicą był brak santenu w oleju z twardzieli.

W oleju z bielu i twardzieli zidentyfikowałam 12 składników należących do następujących klas monoterpenów: tlenki, alkohole, aldehydy, ketony i estry. Wśród nich dominowały: α-fenchol, α-terpineol i terpinen-4-ol. Związki takie jak: 1,8-cyneol, *cis*-werbenol i werbenon występowały tylko w oleju z bielu świerka, podczas gdy β-fenchol, pinokarwon i borneol oznaczyłam tylko w oleju z twardzieli.

Seskwiterpeny

Węglowodory seskwiterpenowe i ich tlenowe pochodne stanowiły odpowiednio 14,8% i 5,8% ogólnej sumy związków występujących w olejkach z bielu i twardzieli świerka. Zawartość tych składników w bielu oszacowałam na 190 µg/g drewna, a w twardzieli na 25 µg/g. Zidentyfikowałam 32 węglowodory seskwiterpenowe, wśród których dominowały: α-longifolen, izokariofilen, germakren D, α-muurolen i δ-kadinen. Związki te stanowiły około 50% frakcji seskwiterpenowej olejków.

Zdecydowana większość składników z tej grupy związków obecna była w obu warstwach drewna świerka. Cyklosatiwen, satiwen, 1,7-di-*epi*-α-cedren i β-gurjunen oznaczyłam tylko w oleju z bielu, zaś *cis*-muuroła-4(14),5-dien i β-longipinen tylko w oleju z twardzieli świerka.

Stwierdziłam obecność 7 tlenowych pochodnych seskwiterpenów, stanowiących w sumie poniżej 2% każdego z olejków. (E)-Nerolidol i kadalen występowały tylko w olejku z bielu, natomiast germakren-D-4-ol tylko w olejku z twardzieli. Pozostałe seskwiterpenoidy obecne były w olejkach z obu warstw drewna.

Diterpeny

Metodą destylacji z parą wodną wydzielone zostały też związki diterpenowe – o wysokich, jak na składniki lotne, masach cząsteczkowych. Węglowodory diterpenowe i ich tlenowe pochodne stanowiły w olejku z bielu około 27% i z twardzieli ponad 30%. Oszacowana ilość tych związków wynosiła w bielu około 300 µg/g, natomiast w twardzieli 140 µg/g. Analiza GC-RI i GC-MS umożliwiła identyfikację 21 diterpenów. W obu warstwach drewna świerka głównymi były *cis*-abienol i tunbergol, stanowiące ponad 50% zawartości tej grupy związków. W grupie składników trudnolotnych znajdowały się związki, których nie zidentyfikowałam. Niektóre z nich mogły być produktami degradacji składników termolabilnych lub ulegających hydrolizie podczas destylacji [Orav i in., 1998].

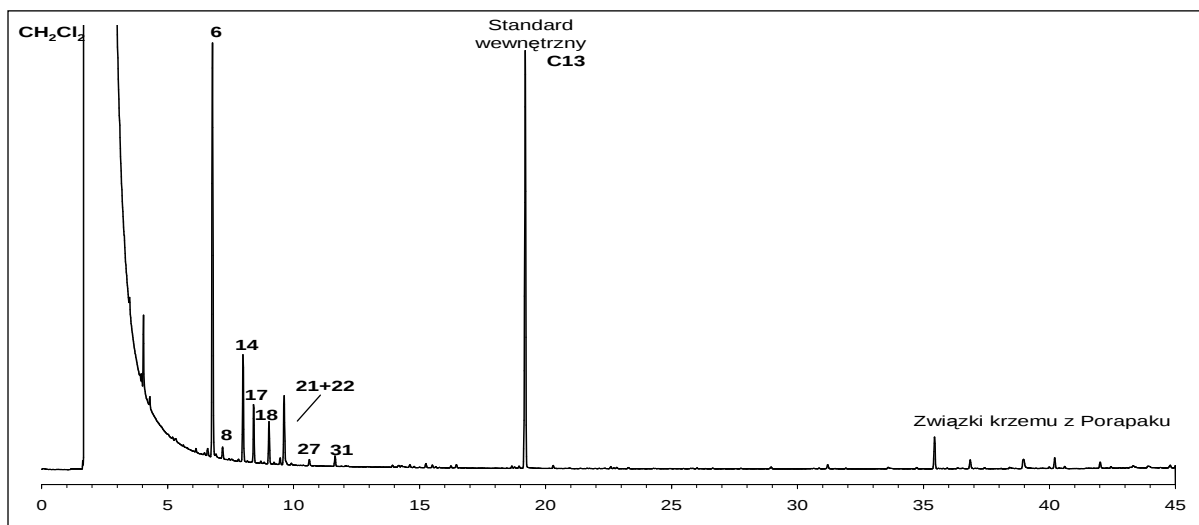
Składniki nieterpenowe

W olejkach z obu warstw drewna świerka (biel i twardziel) zidentyfikowałam również składniki nieterpenowe. Związki te należały zarówno do grupy bardziej lotnych, o indeksach retencji od 800 do 1314 (HP-5), jak i tych trudniej lotnych, o indeksach retencji powyżej 1800 (HP-5). Składniki te w olejkach oznaczyłam w ilości około 1%, co stanowiło w bielu około 50 µg/g, zaś w twardzieli 5 µg/g drewna. Zidentyfikowane związki należały do aldehydów, wśród których dominowały (E,Z)-2,4-dekadienal (0,1%) i (E,E)-2,4-dekadienal (0,2-0,3%), kwasów tłuszczowych (kwas tetradekanowy, kwas pentadekanowy) i alkanów (eikozan).

4.3.2. Analiza fazy nadpowierzchniowej drewna świerka pospolitego

Metodą analizy fazy nadpowierzchniowej metodą dynamiczną (DHS) uzyskałam informacje na temat składu i zawartości najbardziej lotnych składników drewna świerka, emitowanych z surowca w temperaturze pokojowej. Rysunek 21 przedstawia chromatogram gazowy składników lotnych bielu. Metoda analizy fazy nadpowierzchniowej jest najbardziej efektywna w wyodrębnianiu składników charakteryzujących się wysoką lotnością, np. węglowodórów monoterpenowych i okazała się mało wydajna dla składników trudniej lotnych, a związki seskwiterpenowe i diterpenowe nie były w ogóle widoczne na obrazie GC. Na podstawie analiz GC i GC-MS zidentyfikowałam 13 monoterpenów w bielu oraz 11

w twardzieli świerka. Były to obecne w obu warstwach drewna: α -pinen, kamfen, β -pinen, mircen, α -felandren, 3-karen, β -felandren i limonen, γ -terpinen, terpinolen i borneol oraz obecne tylko w bielu: mircen i γ -terpinen.



Rysunek 21. Chromatogram gazowy składników lotnych fazy nadpowierzchniowej bielu *Picea abies* 1

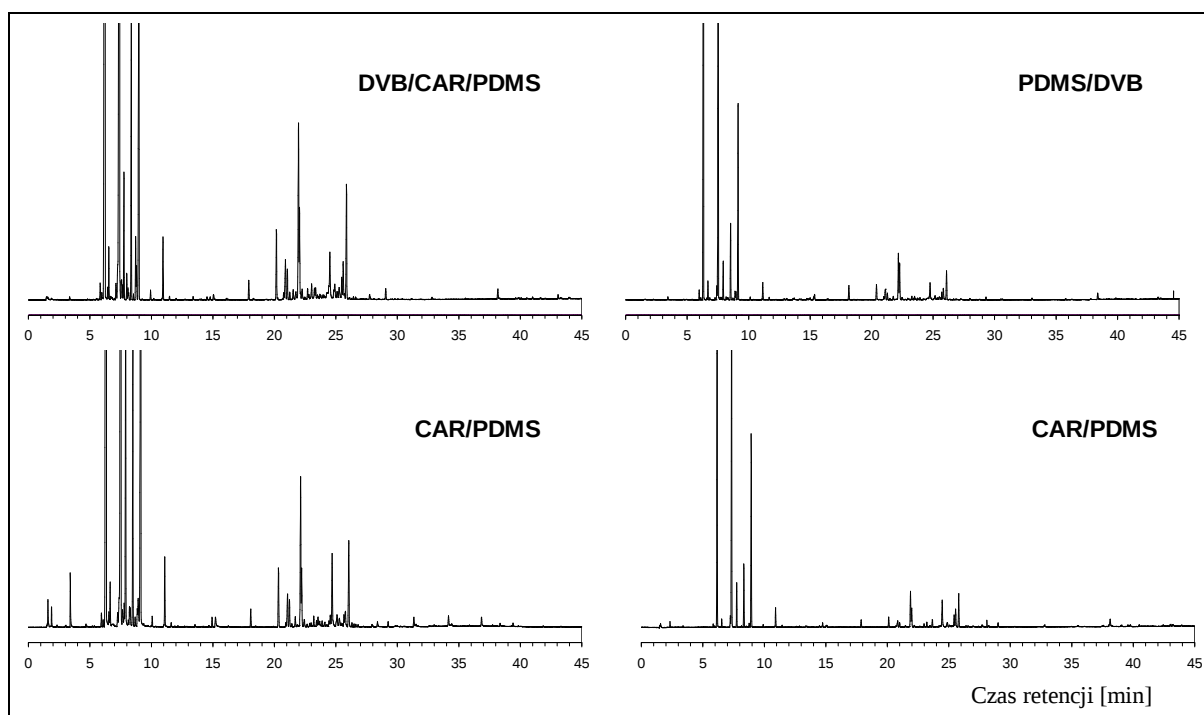
Zawartość ilościową poszczególnych składników lotnych w warstwach drewna określiłam metodą headspace z dodatkiem standardu wewnętrznego (tridekanu) [Jorgensen i in., 2000; Kijeldsen i in., 2001]. Ilość lotnych składników emitowanych z bielu wynosiła 9,6 $\mu\text{g/g}$ i była siedmiokrotnie większa niż z twardzieli – 1,4 $\mu\text{g/g}$ (Tabela 14). Zależność zatem była podobna jak przy zawartości olejku eterycznego, chociaż inne były proporcje: wydajność olejku z bielu (0,13%) była ponad trzykrotnie wyższa niż z twardzieli (0,04%). Jeszcze większa była różnica zawartości składników, w warstwie zewnętrznej i wewnętrznej drewna, oszacowana na podstawie wydajności olejku: 1240 $\mu\text{g/g}$ w bielu i 330 $\mu\text{g/g}$ w twardzieli.

4.3.3. Mikroekstrakcja do fazy stałej

4.3.3.1. Dobór warunków SPME drewna

Wydajność i skuteczność oznaczania składników lotnych metodą mikroekstrakcji do fazy stałej uzależniona jest od wielu czynników, z których najważniejszymi są rodzaj włókna SPME i warunki ekstrakcji [Pawliszyn, 1997]. Zatem przed przystąpieniem do właściwej analizy ustaliłam najkorzystniejsze warunki eksperymentu, dobierając kolejno: włókno, wielkość fiolki i masę materiału, temperaturę i czas ekstrakcji.

W pierwszym etapie przetestowałam cztery włókna SPME o charakterze adsorpcyjnym: DVB/CAR/PDMS, CAR/PDMS, CW/DVB i PDMS/DVB. Analizy wykonałam w następujących warunkach: próbka 20 g drewna we fiolce o pojemności 20 ml, temperatura procesu 60°C, czas ustalania się równowagi 30 min., czas adsorpcji 30 min. Na Rysunku 22 przedstawiłam chromatogramy składników lotnych bielu świerka uzyskane z użyciem testowanych włókien.



Rysunek 22. Chromatogram gazowy lotnych składników bielu *Picea abies* 1 zaadsorbowanych na czterech włóknach SPME

Z doświadczenia wynikało, iż intensywność i ilość pików na chromatogramach otrzymanych z użyciem włókna trójskładnikowego DVB/CAR/PDMS i włókna dwuskładnikowego CAR/PDMS była największa i podobna, a zatem były one najbardziej odpowiednie do analizy składników lotnych drewna. Obydwa te włókna zawierały karboksen.

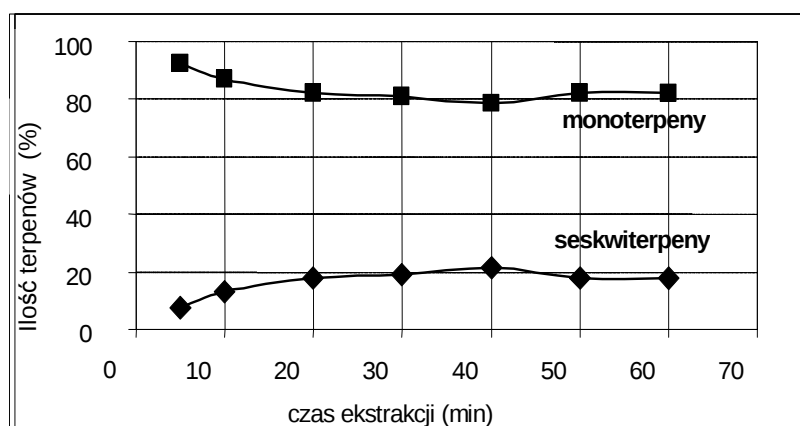
Polimer ten ma pory wielkości 2-20 Å, które umożliwiają adsorpcję składników o niewielkich molekułach. Szeroko stosowane i polecane do analizy lotnych związków włókno CW/DVB [Pawliszyn, 1997] nie było wystarczająco skuteczne. Włókno trójskładnikowe wybrałam do dalszych testów w celu ustalenia pozostałych parametrów procesu ekstrakcji.

Następnym etapem ustalenia warunków analizy SPME był dobór masy surowca i objętości fiolki. Przeprowadziłam analizę w następujących wariantach:

masa drewna objętość fiolki	0,4 g	0,8 g	1,2 g	2,0 g	5,0 g
4 ml	×	×			
20 ml			×	×	
50 ml					×

Najkorzystniejszy z analizowanych wariantów, wybrany na podstawie ilości i wysokości pików na chromatogramie to: 0,8 g drewna w fiolce 4 ml.

Przyjmując jako parametry stałe: masę drewna 0,8 g w 4 ml fiolce, temperaturę ustalania się równowagi i ekstrakcji 60°C oraz czas ustalania się równowagi 30 min., sprawdzałam następujące czasy adsorpcji składników na włóknie DVB/CAR/PDMS: 5, 10, 20, 30, 40, 50 i 60 minut (Rysunek 23). Jako najkorzystniejszy wybrałam czas 30 min., po upływie którego adsorbowane były również trudniej lotne składniki, takie jak seskwiterpeny.



Rysunek 23. Zawartość mono- i seskwiterpenów w drewnie *Picea abies* 1 w zależności od czasu ekspozycji włókna DVB/CAR/PDMS

W kolejnym etapie sprawdziłam wpływ temperatury na intensywność i ilość pików na chromatogramie. Przyjmując jako parametry stałe: masę drewna 0,8 g w 4 ml fiolce, czas

ustalania się równowagi 30 min., czas adsorpcji 30 min., wykonywałam analizy SPME w temperaturze: 25°C, 35°C, 45°C i 60°C. Spośród testowanych wybrałam 60°C jako tę temperaturę, w której zarówno grupa mono- jak i seskwiterpenów była adsorbowana na włóknie DVB/CAR/PDMS w ilościach umożliwiającą analizę chromatograficzną.

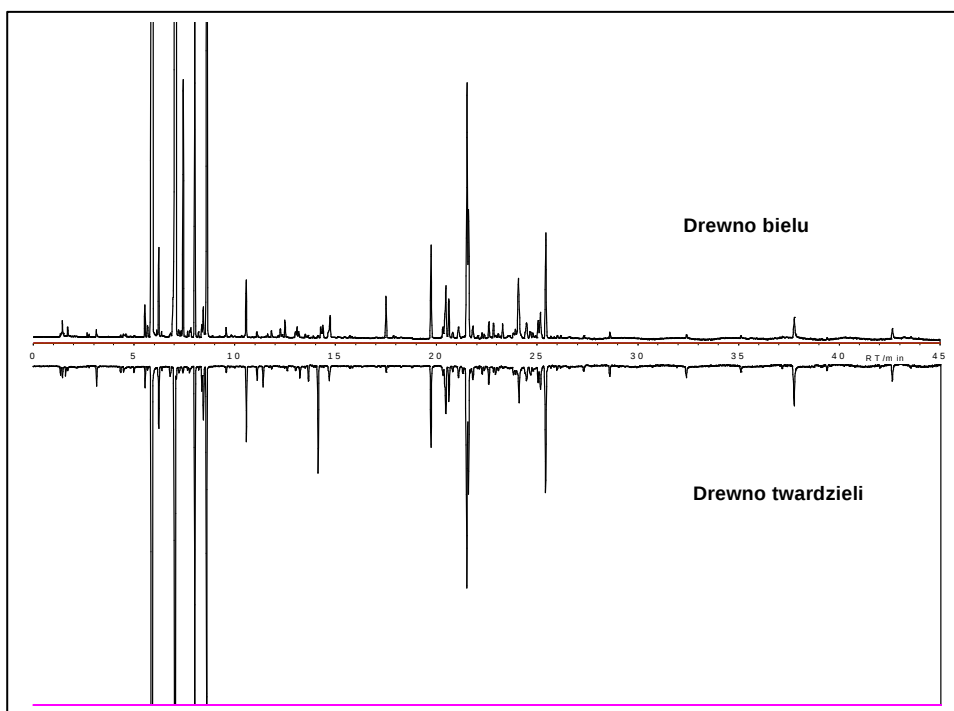
W celu określenia powtarzalności analiz przeprowadziłam trzykrotne eksperymenty SPME w ustalonych warunkach. Obrazy chromatogramów gazowych próbek tej samej warstwy drewna były identyczne, co świadczy o tym, że metoda jest powtarzalna.

Jako czas desorpcji składników w dozowniku chromatogramu przyjął 2 min.

W ustalonych warunkach: 0,8 g drewna (kawałki o wymiarach 20×10×0,36 mm) w 4 ml fiolce, czas ustalania równowagi 30 min., czas ekstrakcji 30 min., temperatura 60°C, wykonałam analizę na dwóch włóknach: DVB/CAR/PDMS i CAR/PDMS.

4.3.3.2. Składniki bielu i twardzieli świerka pospolitego oznaczone metodą HS-SPME

Skład jakościowy oraz ilościowy lotnych składników bielu i twardzieli świerka pospolitego (*Picea abies* L.) określony w ustalonych warunkach metodą HS-SPME w połączeniu z GC i GC-MS przedstawiłam w Tabeli 13, a chromatogramy składników na Rysunku 24.



Rysunek 24. Chromatogram gazowy składników lotnych izolowanych metodą HS-SPME z bielu i twardzieli *Picea abies* 1 (kolumna HP-5)

Tabela 13. Lotne składniki bielu i twardezieli świerka pospolitego (*Picea abies* L.) oznaczone metodą SPME z wykorzystaniem dwu włókien

Numer RI lit * RI eksp ** Składnik				DVB/CAR/PMDS				CAR/PMDS					
				Biel		Twardziel		Biel		Twardziel			
				$\bar{X}$	S	$\bar{X}$	S	$\bar{X}$	S	$\bar{X}$	S		
piku													
1	800	800	(nt)	heksanal	tr		0,3	0,06	0,6	0,06	1,5	0,26	
2	888	885	(mt)	santen	tr		—		tr		0,4	0,31	
4	926	922	(mt)	tricyklen	0,2	0,04	0,2	0,11	0,2	0,01	0,2	0,00	
5	931	927	(mt)	α -tujen	0,1	0,05	0,1	0,09	0,1	0,01	0,1	0,00	
6	939	933	(mt)	α -pinen	41,7	0,29	46,7	1,16	36,5	0,68	42,4	0,68	
8	953	948	(mt)	kamfen	0,6	0,02	0,8	0,07	0,5	0,01	0,6	0,02	
9	957	952	(mt)	tuja-2,4(10)-dien	tr		tr		tr		tr		
11	961	961	(nt)	benzaldehyd	tr		—		0,3	0,01	—		
13	976	968	(mt)	sabinen	0,3	0,22	0,2	0,01	0,5	0,05	0,1	0,01	
14	980	976	(mt)	β -pinen	27,8	0,92	16,9	0,67	22,7	0,20	16,9	0,50	
15	991	991	(mt)	mircen	1,4	0,32	0,1	0,02	4,9	0,03	0,3	0,06	
17	1005	1005	(mt)	α -felandren	0,3	0,16	0,1	0,00	0,3	0,02	0,1	0,02	
18	1011	1011	(mt)	3-karen	3,4	0,18	6,2	0,66	3,5	0,01	3,8	0,36	
19	1018	1016	(mt)	α -terpinen	0,8	0,47	0,3	0,03	0,2	0,04	0,3	0,03	
20	1026	1024	(mt)	p-cymen	0,5	0,17	0,8	0,09	0,6	0,07	1,5	0,07	
22+23	1031	1029	(mt)	β -felandren ² + limonen ²	7,6	0,61	7,3	0,85	12,0	0,32	12,0	0,35	
24	1033	¹	(mt)	1,8-cyneol	tr				—		—		
25	1040	1047	(mt)	(Z)- β -ocymen	tr				tr		—		
27	1062	1055	(mt)	γ -terpinen	0,1	0,02	0,1	0,02	0,1	0,00	0,1	0,01	
28	¹	1055	(nt)	(E)-2-oktenal	—				tr		tr		
29	1068	¹	(mt)	cis -tujan-4-ol (hydrat sabinenu)	tr				tr		tr		
31	1088	1089	(mt)	terpinolen	0,7	0,12	1,2	0,17	1,0	0,06	0,9	0,08	
33	1102	1099	(nt)	nonanal	0,1	0,00	0,2	0,02	0,1	0,00	0,2	0,03	
34	1111	1111	(mt)	p-menta-1,3,8-trien	—				tr		tr		
36	1117	1120	(mt)	β -fenchol	—		0,3	0,04	—		0,1	0,00	
38	1140	1147	(nt)	cis -werbenol	0,1	0,07	0,1	0,01	tr		0,1	0,00	
44	1165	1166	(mt)	borneol	—		0,2	0,03	—		0,1	0,01	
45	1177	1176	(mt)	terpinen-4-ol	tr		0,3	0,03	tr		0,1	0,00	
47	1189	1184	(mt)	α -terpineol	0,1	0,00	1,6	0,17	tr		0,8	0,02	
48	1195	1197	(nt)	estragol	0,1	0,05	tr		tr		0,1	0,02	
49	1204	1209	(nt)	dekanal	0,2	0,09	0,3	0,02	0,2	0,02	tr		
50	1204	1211	(mt)	werbenon	tr		tr		0,2	0,01	tr		
51	1235	1233	(mt)	eter metylowy tymolu	tr		tr		tr		tr		
52	¹	1260	(nt)	3,4-dimetoksytoluen	tr		tr		tr		tr		
54	1285	1285	(mt)	octan bornylu	0,3	0,04	0,1	0,01	0,3	0,02	0,1	0,02	
63+64	1351	1351	(st)	α -longipinen + α -kubeben	1,0	0,05	1,1	0,10	1,0	0,05	1,3	0,06	
66	1368	1369	(st)	cyklosatiwen	tr				tr		tr		
67	1372	1373	(st)	α -ylangen	0,8	0,05	0,9	0,08	0,7	0,04	1,0	0,05	
68	1373	1375	(st)	longicyklen	0,1	0,01	0,1	0,02	0,1	0,01	0,1	0,00	
70	1376	1377	(st)	α -kopaen	0,4	0,04	0,5	0,06	0,5	0,02	0,6	0,04	
76	1397	1392	(st)	1,7-di- <i>epi</i> - α -cedren	tr		0,1	0,00	0,1	0,00	0,1	0,00	
72	¹	1400	(st)	satiwen	0,1	0,03	0,2	0,01	0,2	0,01	0,2	0,02	
77	1398	1401	(st)	β -longipinen	0,1	0,08			tr		tr		
78	1402	1404	(st)	α -longifolen	2,7	0,05	3,0	0,35	2,7	0,16	3,5	0,18	
81	1404	1404	(st)	izokariofilen	1,4	0,12	1,8	0,15	1,1	0,12	1,7	0,04	
82	1409	1406	(st)	α -cedren	tr		tr		0,2	0,02	0,3	0,02	
83	1418	1421	(st)	β -cedren	0,2	0,01	0,2	0,03	0,1	0,00	0,1	0,01	
85	1432	1431	(st)	β -gurjunen	0,1	0,06	tr		0,1	0,01	0,1	0,00	
87	1436	1437	(st)	<i>trans</i> - α -bergamoten	0,2	0,05	0,1	0,00	0,2	0,01	0,1	0,00	
89	1443	1444	(st)	(Z)- β -farnezen	0,2	0,01	0,3	0,04	0,1	0,01	0,2	0,04	
91	1454	1452	(st)	α -neo -klowen	0,1	0,07	0,1	0,03	0,2	0,03	0,1	0,01	
93	1458	1457	(st)	(E)- β -farnezen	0,1	0,06	tr		0,1	0,01	tr		
94	1460	¹	(st)	cis -muurola-4(14),5-dien	tr		tr		—		tr		
95	1467	1470	(st)	9- <i>epi</i> - β -kariofilen	tr		tr		tr		—		
96	1477	1479	(st)	γ -muurolen	tr		0,1	0,02	0,1	0,00	0,1	0,02	
97	1480	1484	(st)	germakren D	0,1	0,02	0,1	0,04	0,2	0,00	0,1	0,02	
99	1483	1490	(st)	<i>ar</i> -kurkumen	0,8	0,11	0,4	0,14	1,3	0,08	0,5	0,09	

Tabela 13. c.d.

Numer piku	RI lit *	RI ep **	Składnik	DVB/CAR/PDMS				CAR/PDMS			
				Biel		Twardziel		Biel		Twardziel	
				$\bar{X}$	S	$\bar{X}$	S	$\bar{X}$	S	$\bar{X}$	S
105	1499	1504	(st)	α -muurolen	tr	tr		tr		tr	
108	1509	1510	(st)	β -bisabolen	0,2	0,12	tr	0,1	0,00	0,2	0,01
109	1512	1513	(st)	β -kurkumen	0,4	0,15	tr	0,2	0,00	0,1	0,00
110	1513	1514	(st)	γ -kadinen	—	—		tr		tr	
112	1515	1517	(st)	(Z)- γ -bisabolen	0,2	0,14	0,2	0,3	0,00	0,1	0,00
113	1524	1526	(st)	δ -kadinen	1,5	0,26	0,4	1,6	0,08	0,2	0,00
115	1532	1534	(st)	kadina-1,4-dien	tr		1,8	0,1	0,00	2,0	0,12
117	1538	1537	(st)	α -kadinen	tr		tr	0,1	0,00	0,1	0,01
119	1542	1544	(st)	α -kalakoren	tr		tr	tr		tr	
121	1556	1550	(st)	germakren B	tr		tr	tr		0,1	0,00
122	1563	1563	(st)	β -kalakoleren	tr		—	tr		tr	
123	1564	1	(st)	(E)-nerolidol	tr		—	tr		tr	
124	1574	1578	(st)	germakren D 4-ol	tr		tr	tr		tr	
125	1585	1587	(st)	gleenol	0,1	0,03	0,1	tr		tr	
129	1627	1621	(st)	1- <i>epi</i> -kubenol	0,1	0,04	tr	0,1	0,01	0,1	0,02
131	1642	1631	(st)	kubenol	tr		0,1	tr		tr	
132	1653	1657	(st)	α -kadinol	tr		tr	tr		tr	
137	1775	1761	(st)	α -14-hydroksymuurolen	tr		0,2	tr		0,1	0,03
139		1	(nt)	kwask tetradekanowy	tr		tr	—		—	
140	1	1862	(nt)	kwask pentadekanowy	tr		0,2	—		—	
141	1900	1899	(nt)	nonadekan	tr		tr	tr		tr	
142	1929	1929	(dt)	cembren	tr		tr	tr		tr	
143	1941	1937	(dt)	pimaradien	tr		tr	0,1	0,05	tr	
146	1959	1961	(dt)	neocembren	0,3	0,08	tr	—		—	
148	1	1992	(nt)	kwask heksadekanowy	tr		tr	tr		tr	
150	1989	1994	(dt)	tlenek manoilu	tr		1,1	tr		0,1	0,04
151+152	2010	2016	(dt;nt)	tlenek 13- <i>epi</i> -manoilu+eikozan	tr		tr	tr		tr	
153	1	2034	(dt)	palustradien	tr		tr	—		—	
154	1		(nt)	palmitynian izopropylu	tr		tr	tr		tr	
155	1	2060	(dt)	tunbergol	tr		tr	tr		tr	
156	2054	2064	(dt)	abieta-8,11,13-trien	—		—	tr		tr	
158	2080	2089	(dt)	abieta-7,13-dien	—		—	tr		tr	
159	2100	1	(nt)	heneikozan	tr		tr	tr		tr	
160	1	2114	(dt)	δ -13-(<i>trans</i>)-neoabienol	tr		tr	tr		tr	
161	1	2160	(dt)	<i>cis</i> -abienol	0,1	0,05	tr	tr		0,1	0,04
162	1	2175	(dt)	pimaral	—		—	tr		tr	
163	2200	1	(nt)	dokoza	tr		tr	tr		tr	
164	1	2229	(dt)	izopimaral	tr		tr	tr		tr	
165	1	2246	(dt)	palustral	tr		tr	tr		tr	
167	2263	2275	(dt)	dehydroabietal	tr		tr	tr		tr	
168	2300	1	(nt)	trikoza	tr		tr	tr		tr	
169	2302	2304	(dt)	abietal	—		—	tr		tr	
170	1	2347	(dt)	dehydroabietanian metylu	tr		tr	tr		tr	
174	2400	1	(nt)	tetrakoza	tr		tr	tr		tr	
175	2500	1	(nt)	pentakoza	tr		tr	—		—	
monoterpeny (mt)				85,9		84,0		83,9		80,6	
liczba zidentyfikowanych				26		24		26		27	
seskwiterpeny (st)				10,8		11,7		11,1		13,1	
liczba zidentyfikowanych				43		38		43		43	
diterpeny (dt)				0,4		1,3		0,2		0,6	
liczba zidentyfikowanych				13		13		15		15	
składniki nieterpenowe (nt)				0,8		0,9		1,3		1,9	
liczba zidentyfikowanych				17		16		15		15	
suma zidentyfikowanych składników				98,0		98,0		96,5		96,2	
liczba zidentyfikowanych				99		91		99		100	

tr < 0,05%

— związek niewykryty

1 składnik zidentyfikowany tylko na podstawie GC-MS

2 składnik zidentyfikowany na kolumnie HP-1

 $\bar{x}$ średnia zawartość składnika z trzech powtórzeń

s odchylenie standardowe

Liczba zidentyfikowanych składników i skład lotnych związków zaadsorbowanych na dwu włóknach (DVB/CAR/PDMS i CAR/PDMS) były zbliżone. Z użyciem włókna trójskładnikowego zidentyfikowałam 99 składników emitowanych z bielu oraz 91 z twardzieli świerka, z użyciem włókna dwuskładnikowego było to odpowiednio 99 i 100 składników (Tabela 13). Udział związków zidentyfikowanych z użyciem włókna DVB/CAR/PDMS zarówno dla bielu, jak i twardzieli wynosił 98,0%, a z użyciem włókna CAR/PDMS odpowiednio 96,5 i 96,2%.

Monoterpeny stanowiły w bielu i twardzieli odpowiednio 85,9% i 84,0% (DVB/CAR/PDMS) oraz 83,9% i 80,6% (CAR/PDMS) wyizolowanych składników. Głównymi składnikami były węglowodory: α -pinen, β -pinen, β -felandren z limonenem, 3-karen i mircen, a wśród monoterpenoidów dominował α -terpineol.

Seskwiterpeny stanowiły 10,8% i 11,7% (DVB/CAR/PDMS) oraz 11,1% i 13,1% (CAR/PDMS) ogólnej sumy związków wyizolowanych odpowiednio z bielu i twardzieli. Efektem analizy drewna metodą SPME była identyfikacja ponad 40 seskwiterpenów. Główne to: α -longifolen i izokariofilen. Zdecydowana większość oznaczonych seskwiterpenów występowała zarówno w bielu, jak i twardzieli, wyjątek stanowiły związki oznaczone w ilościach śladowych.

Udział diterpenów wyizolowanych z użyciem każdego włókien sbył niewielki (0,2-1,3%) składników. Zidentyfikowałam 15 związków z tej grupy. Głównymi były tlenek manoilu (do 1,1%), neocembren (do 0,3%) oraz *cis*-abienol (do 0,1%) i pimaradien (do 0,1%). Pozostałe diterpeny występowały w ilościach śladowych.

Składniki drewna o strukturze nieterpenowej (17 związków) występowały w niewielkich ilościach od 0,8% do 1,9% i należały, tak jak i w przypadku składników olejków eterycznych, głównie do aldehydów, wyższych alkanów oraz kwasów tłuszczowych.

4.3.3.3. Próby ilościowej analizy metodą HS-SPME

Posługując się doświadczeniami oznaczeń ilościowych jakie wykonałam stosując metodę analizy fazy nadpowierzchniowej, podjęłam próby wykorzystania HS-SPME do oznaczenia bezwzględnej zawartości składników lotnych drewna z użyciem standardu wewnętrznego

Problemem w analizie SPME próbek w stałym stanie skupienia jest dodanie standardu, który musi mieć lotność odpowiadającą lotności badanych składników, w taki sposób, by wyniki były powtarzalne i wiarygodne. Pierwszym etapem było zatem sprawdzenie czy stosowane często w analizie związków lotnych (np. metodą HS) jako standard wewnętrzny

alkany będą odpowiednie w HS-SPME. Do prób wybrałam tridekan (temp. wrzenia 234°C) i heptadekan (temp. topnienia 21°C). Analizy SPME wykonywałam w warunkach ustalonych w poprzednim rozdziale, tj.: włókno DVB/CAR/PDMS, masa drewna 0,8 g w 4 ml fiołce, czas ustalania się równowagi 30 min., czas adsorpcji 30 min., temperatura 60°C. Ze sporządzonego roztworu alkanów: C₁₃ (0,25%) i C₁₇ (0,25%) w pentanie pobierałam 60 µl roztworu, który wprowadzałam do 4 ml pustej fiołki, rozpuszczalnik odparowywałam przedmuchując fiołkę azotem. Po wykonanej ekstrakcji na włónie i analizie GC otrzymywałam wyniki o tak dużym rozrzucie, że dyskwalifikowało to wybrany tok postępowania.

W następnym eksperymencie przeprowadziłam analizę SPME mieszaniny standardów w pentanie (60 µl), z której nie odparowywałam rozpuszczalnika. Ponieważ wyniki były powtarzalne, wykonałam następnie trzy równoległe analizy SPME drewna z dodatkiem 60 µl roztworu standardów C₁₃ (0,25%) i C₁₇ (0,25%). Wyniki tych analiz nie były jednak powtarzalne: powierzchnie bezwzględne pod pikami standardów bardzo się różniły w poszczególnych analizach.

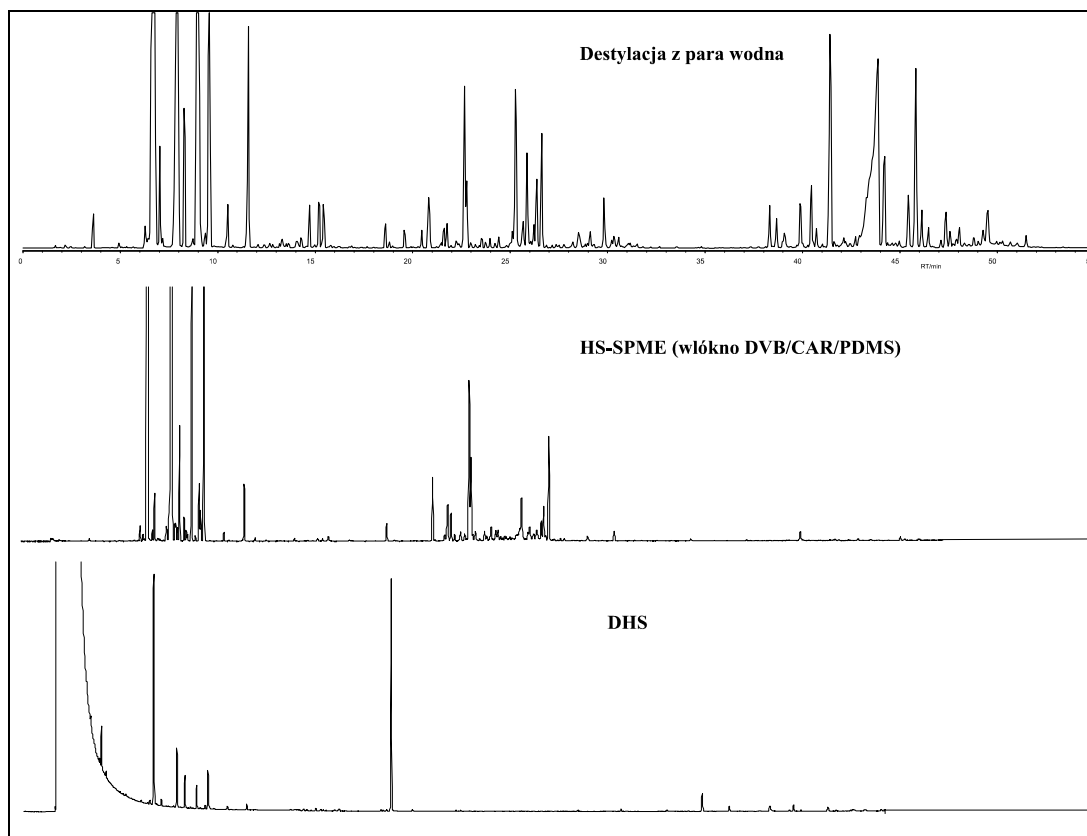
Kolejnym etapem eksperymentów było poszukiwanie takiej matrycy standardów, która nie emitowałaby związków lotnych w ustalonych warunkach analizy SPME. Niepowodzeniem skończyły się próby z ciekłym polimerem – dimetylopolisiloksanem (20 µl), który emitował związki, będące prawdopodobnie wynikiem depolimeryzacji. Sproszkowana celuloza również emitowała związki lotne, będące prawdopodobnie zanieczyszczeniami, gdyż w temperaturze 60°C nie następuje rozkład celulozy. Kolejnym surowcem był puder z drewna *P. abies*, poddany uprzednio 24 godzinnej ekstrakcji heksanem w aparacie Soxhleta. Pomimo zastosowania tak drastycznych warunków oczyszczania surowca ze związków lotnych, czułość metody SPME pozwoliła na wykrycie w nim składników lotnych, głównie monoterpenu, charakterystycznych dla drewna świerka.

Żaden z testowanych materiałów nie był więc odpowiednim nośnikiem dla standardów – wydzielane w ustalonych warunkach analizy związki lotne fałszowałyby obraz GC analizowanych składników.

Matrycą nie emitującą związków lotnych jest woda, spróbowałam zastosować ją jako nośnik tridekanu. Jednakże wyniki analiz SPME nie były wystarczająco powtarzalne.

4.3.4. Porównanie metod wyodrębniania związków lotnych drewna świerka pospolitego

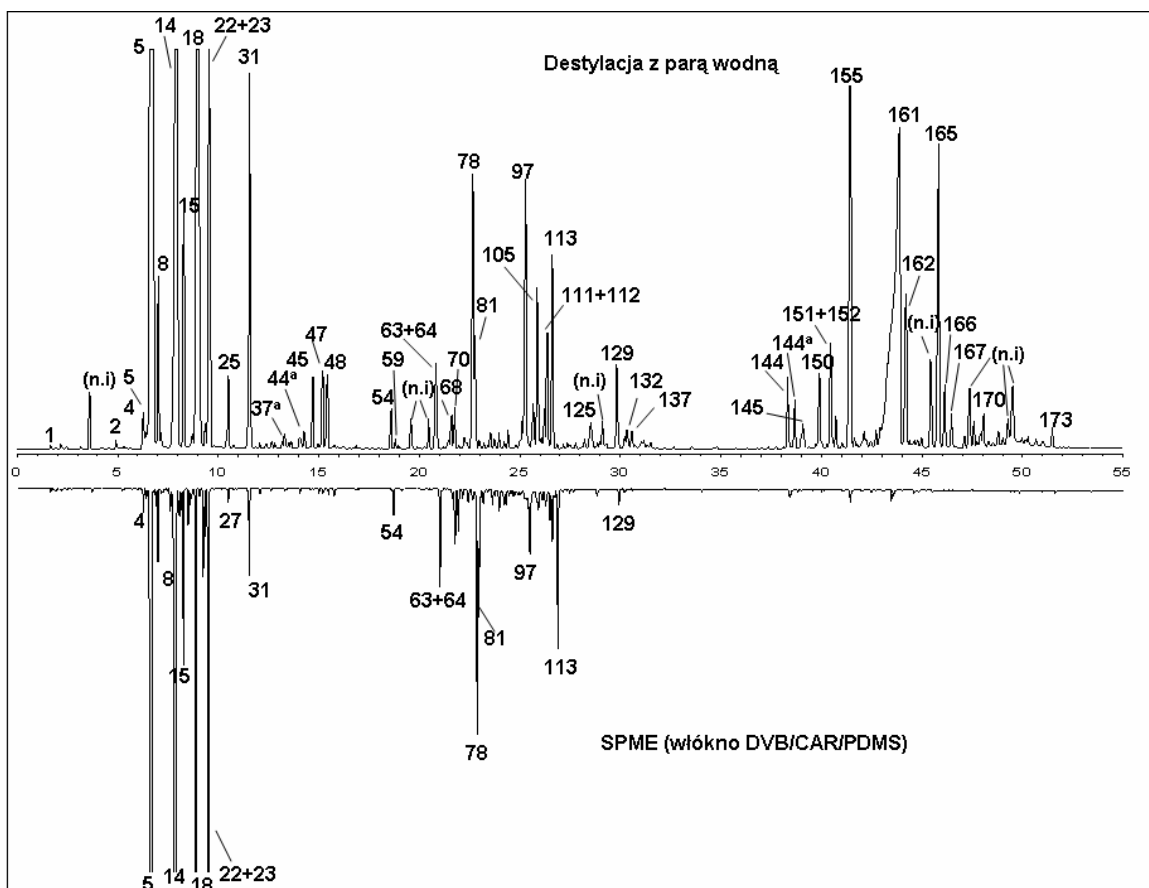
Porównanie wyników analizy GC lotnych składników drewna świerka wydzielanych metodami: destylacji z parą wodną, analizy fazy nadpowierzchniowej i mikroekstrakcji do fazy stałej zestawiałam na Rysunku 25 i w Tabeli 14. W biele i twardzieli zidentyfikowałam tymi metodami 125 związków. Jak widać, każdą z tych metod określa się inne cechy drewna.



Rysunek 25. Chromatogram gazowy olejku eterycznego i składników lotnych z biele *Picea abies* 1 wydzielonych metodą HS-SPME i DHS (kolumna HP-5)

Najmniej odpowiednia w porównawczej ocenie drewna okazała się metoda analizy fazy nadpowierzchniowej (DHS), która w warunkach, w jakich była prowadzona (20°C; 2 godz.), pozwoliła wykryć tylko najbardziej lotne składniki z grupy monoterenów. W biele i twardzieli świerka oznaczyłam niewiele ponad 10 składników, co w porównaniu z liczbą związków oznaczonych metodami SPME i destylacji z parą wodną, jest wartością dziesięć razy mniejszą. Metoda ta może być przydatna, gdy chcemy oceniać wpływ związków wydzielanych przez drewno w warunkach zbliżonych do naturalnych i oddziałujących, np. na człowieka poprzez wdychanie lub na owady. Dla realizacji celów niniejszej pracy analiza fazy nadpowierzchniowej okazała się niewłaściwa.

Metody HS-SPME i destylacji z parą wodną pozwoliły wydzielić po około 100 składników (Rysunek 26). Były to w większości te same związki, jakkolwiek 15 związków występowało tylko w olejkach eterycznych, a 16 tylko w ekstrakcie SPME. Związki te oznaczyłam najczęściej w ilościach śladowych i fakt, że wykryłam je tylko jedną z metod wynikał prawdopodobnie z niedostatecznej czułości metody GC.



Rysunek 26. Chromatogram gazowy składników bielu *Picea abies* 1 wydzielonych metodą destylacji z parą wodną i metodą HS-SPME

Składniki monoterpenowe stanowiły ponad 80% związków zidentyfikowanych metodą HS-SPME w bielu i twardzieli świerka, natomiast w olejku eterycznym z bielu 53%, a z twardzieli 40%, na korzyść wyższej zawartości w olejkach składników diterpenowych, odpowiednio 27% i 35%. Olejki eteryczne, szczególnie te z twardzieli świerka, zawierały większą niż ekstrakty SPME ilość alkoholi monoterpenowych, takich jak: terpinen-4-ol i α -terpineol, co mogło wynikać z hydrolizy glikozydów w temperaturze destylacji.

Tabela 14. Składniki lotne bielu i twardezieli świerka wydzielone różnymi

Numer piku	RI lit *	RI eksp **	Składnik	SPME				Destylacja z parą wodną			Headspace	
				DVB/CAR/PDMS		CAR/PDMS		Biel	Twardziel	Ilość ^a [μg/g]	Biel	Twardziel
				Biel	Twardziel	Biel	Twardziel				Ilość ^b [μg/g]	Ilość ^b [μg/g]
1	800	800	heksanal	tr	0,3	0,6	1,5	tr	0,52	tr	0,08	
2	888	885	santen	tr		tr	0,4	0,1	0,91			
4	926	922	tricyklen	0,2	0,2	0,2	0,2	0,4	4,81	0,1	0,52	
5	931	927	α-tujen	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	2,60	0,1	0,20	
6	939	933	α-pinen	41,7	46,7	36,5	42,4	13,7	178	5,7	22,8	0,99
8	953	948	kamfen	0,6	0,8	0,5	0,6	1,2	16,1	0,9	3,52	0,02
9	957	952	tuja-2,4(10)-dien	tr	tr	tr	tr	tr		0,1	0,52	
11	961	961	benzaldehyd	tr	tr	0,3	0,1	tr		tr		
13	976	968	sabinen	0,3	0,2	0,5	0,1	tr		0,2	0,76	0,02
14	980	976	β-pinen	27,8	16,9	22,7	16,9	11,1	144	4,9	19,6	
15	991	991	β-mircen	1,4	0,1	4,9	0,3	2,6	33,5	0,7	2,68	0,39
17	1005	1005	α-felandren	0,3	0,1	0,3	0,1	0,2	2,47	0,2	0,64	0,09
18	1011	1011	3-karen	3,4	6,2	3,5	3,8	10,6	138	4,8	19,4	0,30
19	1018	1016	α-terpinen	0,8	0,3	0,2	0,3	tr		0,2	0,64	0,003
20	1026	1024	p-cymen	0,5	0,8	0,6	1,5	0,2	2,86	0,6	2,20	0,06
21+22	1031	1029	β-felandren ² + limonen ²	7,6	7,3	12,0	12,0	5,9	76,4	6,1	24,4	0,52
24	1033	1	1,8-cineol	tr	tr	tr		tr				
25	1040	1047	Z-β-ocymen	tr		tr		0,6	8,06			
27	1062	1055	γ-terpinen	0,1	0,1	0,1	0,1	tr	0,26	0,1	0,48	0,07
28	1055	1055	(E)-okt-2-enal			tr	tr	tr		0,3	1,12	
29	1068	1	cis-tujan-4-ol (hydrat sabinenu)	tr		tr	tr					
31	1088	1089	terpinolen	0,7	1,2	1,0	0,9	3,4	44,2	1,7	6,64	0,01
33	1102	1099	nonanal	0,1	0,2	0,1	0,2	tr		tr		
34	1111	1111	1,3,8-p-mentatrien			tr	tr					
35	1112	1112	α-fenchol					0,1	0,78	1,8	7,32	
36	1117	1120	β-fenchol		0,3		0,1			0,1	0,52	
37	1125	1124	α-kamfolenal					tr		0,1	0,20	
37a	1139	1137	trans-pinokarweol					0,2	2,21	0,3	1,32	
38	1140	1147	cis-werbenol	0,1	0,1	tr	0,1	0,1	0,91	0,4	1,48	0,08
38a	1162	1159	pinokarwon							1,8	7,24	
44	1165	1166	borneol		0,2		0,1	0,2	2,47	tr		
44a	1173	1167	izopinokamfon					0,6	8,32	1,6	6,44	
45	1177	1176	terpinen-4-ol	tr	0,3	tr	0,1	0,1	0,78	7,4	29,4	
47	1189	1184	α-terpineol	0,1	1,6	tr	0,8	0,8	10,9	tr		
47a	1193	1190	myrtanal									

Numer piku	RI lit *	RI eksp **	Składnik	SPME				Destylacja z parą wodną				Headspace			
				DVB/CAR/PDMS		CAR/PDMS		Biel		Twardziel		Biel		Twardziel	
				Biel	Twardziel	Zawartość [%]	Zawartość [%]	Zawartość [%]	Twardziel	Zawartość [%]	Ilość ^a [µg/g]	Zawartość [%]	Ilość ^a [µg/g]	Ilość ^b [µg/g]	Ilość ^b [µg/g]
48	1195	1197	(nt) estragol	0,1	tr	tr	0,1	0,8	10,1	tr					
49	1204	1209	(nt) dekanal	0,2	0,3	0,2	tr	tr							
50	1204	1211	(mt) werbenon	tr	tr	0,2	tr	tr	0,26						
51	1235	1233	(mt) eter metylowy tymolu	tr	tr	tr	tr	tr	0,13	0,1	0,15				
52	¹	1260	(nt) 3,4-dimetoksytoluen	tr	tr	tr	tr	tr	0,26	tr	0,12				
54	1285	1285	(mt) octan bornylu	0,3	0,1	0,3	0,1	0,4	5,20	0,2	0,76				
56	1291	1291	(nt) (E,Z)-2,4-dekadienal					0,1	1,04	0,1	0,32				
59	1314	1314	(nt) (E,E)-2,4-dekadienal					0,3	3,64	0,2	0,88				
63+64	1351	1351	(st) α-longipinen + α-kubeben	1,0	1,1	1,0	1,3	1,0	12,7	0,1	0,88				
66	1368	1369	(st) cyklosatiwen	tr	tr	tr	tr	0,1	1,17						
67	1372	1373	(st) α-ylangen	0,8	0,9	0,7	1,0	tr		0,2	0,76				
68	1373	1375	(st) longicyklen	0,1	0,1	0,1	0,1	0,3	4,29	0,2	0,16				
70	1376	1377	(st) α-kopaen	0,4	0,5	0,5	0,6	0,3	4,03	tr	0,36				
76	1397	1392	(st) 1,7-di- <i>epi</i> -α-cedren	tr	0,1	0,1	0,1	0,1	1,17						
72	¹	1400	(st) satiwen	0,1	0,2	0,2	0,2	tr							
77	1398	1401	(st) β-longipinen	0,1	tr	tr	tr			0,1	0,20				
78	1402	1404	(st) α-longifolen	2,7	3,0	2,7	3,5	2,4	31,1	0,7	2,84				
81	1404	1404	(st) izokariofilen	1,4	1,8	1,1	1,7	0,9	11,3	0,7	2,60				
82	1409	1406	(st) α-cedren	tr	tr	0,2	0,3	tr		tr					
83	1418	1421	(st) β-cedren	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,65	tr	0,04				
85	1432	1431	(st) β-gurjunen	0,1	tr	0,1	0,1	0,2	2,08						
87	1436	1437	(st) <i>trans</i> -α-bergamoten	0,2	0,1	0,2	0,1	0,1	1,17	0,1	0,28				
89	1443	1444	(st) (Z)-β-farnezen	0,2	0,3	0,1	0,2	0,1	1,43	tr	0,16				
91	1454	1452	(st) α- <i>neo</i> -klowen	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,91	tr	0,16				
93	1458	1457	(st) (E)-β-farnezen	0,1	tr	0,1	tr	0,1	1,69	tr	0,16				
94	1460	¹	(st) <i>cis</i> -muuroła-4(14),5-dien	tr	tr	tr	tr			tr					
95	1467	1470	(st) 9- <i>epi</i> -β-kariofilen	tr	tr	tr	tr	tr	0,52	tr					
96	1477	1479	(st) γ-muurolen	tr	0,1	0,1	0,1	0,2	2,99	0,1	0,36				
97	1480	1484	(st) germakren D	0,1	0,1	0,2	0,1	2,8	36,9	0,3	1,24				
99	1483	1490	(st) <i>ar</i> -kurkumen	0,8	0,4	1,3	0,5	tr		0,1	1,12				
101	1491	1495	(st) walencen	0,3	0,3	0,4	0,3	0,5	6,24	0,3	0,52				
102	1493	1498	(st) <i>epi</i> -kubebol	0,1	0,2	0,2	tr								
103	1494	1503	(st) α-selenin	0,2	tr	0,1	tr	tr		tr					
105	1499	1504	(st) α-muurolen	tr	tr	tr	tr	1,3	16,8	tr					
108	1509	1510	(st) β-bisabolen	0,2	tr	0,1	0,2								
109	1512	1513	(st) β-kurkumen	0,4	tr	0,2	0,1								
110	1513	1514	(st) γ-kadinen			tr	tr	0,3	3,90	0,1	0,48				

Numer piku	RI lit *	RI eksp **	Składnik	SPME			Destylacja z parą wodną			Headspace	
				DVB/CAR/PDMS	CAR/PDMS		Biel	Twardziel	Ilość ^a [µg/g]	Zawartość [%]	Ilość ^b [µg/g]
				Biel Twardziel	Biel	Twardziel					
				Zawartość [%]	Zawartość [%]	Zawartość [%]	Zawartość [%]	Ilość ^a [µg/g]	Ilość ^a [µg/g]	Ilość ^b [%]	Ilość ^b [µg/g]
111	1514	1517	(st)	kubebol ^d							
112	1515	1517	(st)	(Z)-γ-bisabolol ^d	0,2	0,2	0,3	0,1	13,4	0,1	1,72
113	1524	1526	(st)	δ-kadinen	1,5	0,4	1,6	0,2	1,5	19,4	0,9
115	1532	1534	(st)	kadina-1,4-dien	tr	1,8	0,1	2,0	0,1	0,65	tr
117	1538	1537	(st)	α-kadinen	tr	tr	0,1	0,1	tr	tr	tr
119	1542	1544	(st)	α-kalakoren	tr	tr	tr	tr	tr	0,1	0,15
121	1556	1550	(st)	germakren B	tr	tr	tr	0,1	tr	tr	tr
122	1563	1563	(st)	β-kalakoleren	tr	tr	tr	tr	0,1	0,65	0,52
123	1564	1	(st)	(E)-nerolidol	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
124	1574	1578	(st)	germakren D-4-ol	tr	tr	tr	tr	0,1	1,30	tr
125	1585	1587	(st)	gleenol	0,1	0,1	tr	tr	0,3	4,42	0,1
129	1627	1621	(st)	1- <i>epi</i> -kubenol	0,1	tr	0,1	0,1	0,7	8,84	0,1
131	1642	1631	(st)	kubenol	tr	0,1	tr	tr	0,1	0,91	0,9
131a	1645	1645	(st)	α-muurolool	tr	tr	tr	tr	tr	tr	0,2
132	1653	1657	(st)	α-kadinol	tr	tr	tr	tr	0,1	1,69	0,1
133	1674	1673	(st)	kadalen	tr	tr	tr	tr	0,1	tr	0,32
137	1775	1761	(st)	α-14-hydroksy-muurolen	tr	0,2	tr	0,1	0,1	1,04	0,2
139	1	1	(nt)	kwasy tetradekanowy	tr	tr	tr	tr	tr	tr	0,08
140	1862	1862	(nt)	kwasy pentadekanowy	tr	0,2	tr	tr	tr	0,1	0,32
142	1900	1899	(nt)	nonadekan	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
143	1929	1929	(dt)	cembren	tr	tr	tr	tr	0,6	8,19	1,1
144	1941	1937	(dt)	pimaradien	tr	tr	0,1	tr	0,4	5,07	0,4
145	1942	1950	(dt)	3-(E)-cembren A	tr	tr	tr	tr	0,4	5,07	0,4
146	1959	1961	(dt)	neocembren	0,3	tr	tr	tr	0,2	3,12	1,5
148	1	1992	(nt)	kwasy heksadekanowy	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
150	1989	1994	(dt)	tlenek manoilu	tr	1,1	tr	0,1	0,8	10,3	0,6
151+152	2010	2020	(dt;nt)	tlenek 13- <i>epi</i> -manoilu+eikozan	tr	tr	tr	tr	1,0	13,0	1,0
153	1	2034	(dt)	palustradien	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
154	1	1	(nt)	palmitynian izopropylu	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
155	1	2060	(dt)	tunbergol	tr	tr	tr	tr	4,3	55,3	5,0
156	2054	2064	(dt)	abieta-8,11,13-trien	tr	tr	tr	tr	tr	tr	0,1
158	2080	2089	(dt)	abieta-7,13-dien	tr	tr	tr	tr	0,1	1,30	0,1
159	2100	1	(nt)	heneikozan	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
160	1	2114	(dt)	δ-13- <i>trans</i> -neoabienol	tr	tr	tr	tr	0,1	1,82	0,6
161	1	2160	(dt)	<i>cis</i> -abienol	0,1	tr	tr	tr	11,8	153	16,4
162	1	2175	(dt)	pimaral	tr	tr	tr	tr	1,7	21,5	0,3

Numer piku	RI lit *	RI eksp **	Składnik	SPME		Destylacja z parą wodną				Headspace					
				DVB/CAR/PDMS	CAR/PDMS	Biel		Twardziel		Biel		Twardziel			
				Biel	Twardziel	Zawartość [%]	Zawartość [%]	Biel	Twardziel	Zawartość [%]	Zawartość [%]	Ilość ^a [µg/g]	Ilość ^b [µg/g]	Ilość ^b [µg/g]	Ilość ^b [µg/g]
163	2200	1	(nt)	dokozan	tr	tr	tr	0,8	10,7	0,4	1,76				
164	2229	1	(dt)	izopimaral	tr	tr	tr	2,7	35,6	3,1	12,6				
165	2246	1	(dt)	palustral	tr	tr	tr	0,5	6,11	0,3	1,16				
166	2259	1	(dt)	pimarol	tr	tr	tr	0,3	3,25	1,1	4,24				
167	2263	2275	(dt)	dehydroabietal	tr	tr	tr	0,1	1,30	0,6	0,88				
168	2300	1	(nt)	trikozan	tr	tr	tr	0,3	3,77	0,9	3,40				
169	2302	2304	(dt)	abietal	tr	tr	tr	tr	0,52	0,2	0,68				
170	2347	1	(dt)	dehydroabietanian metylu	tr	tr	tr	tr	0,39	0,3	1,08				
171	2359	2358	(dt)	dehydroabietol	tr	tr	tr	0,1	0,78	0,1	0,44				
172	2370	1	(dt)	neoabietal	tr	tr	tr								
173	2391	2392	(dt)	abietol	tr	tr	tr								
174	2400	1	(nt)	tetrakozan	tr	tr	tr								
175	2500	1	(nt)	pentakozan	tr	tr	tr								
monoterpeny (nt)															
liczba zidentyfikowanych				85,4	83,6	83,2	80,3	52,9	700	40,1	160	9,55	1,37	13	11
				26	24	26	27	30		28					
seskwiterpeny (st)															
liczba zidentyfikowanych				11,4	12,2	11,8	13,4	14,8	200	5,8	25	0	0	0	0
				43	38	43	43	39		37					
diterpeny (dt)															
liczba zidentyfikowanych				0,4	1,3	0,2	0,6	27,0	400	35,3	140	0	0	0	0
				13	13	15	15	21		22					
składniki nieterpenowe (nt)															
liczba zidentyfikowanych				0,8	0,9	1,3	1,9	1,2	50	0,9	5	0	0	0	0
				17	16	15	15	9		11					
suma zidentyfikowanych składników															
ilość związków lotnych [µg/g suchego drewna]				98,0	98,0	96,5	96,2	94,7	1400	81,2	330	10	1	13	11
liczba zidentyfikowanych składników				99	91	99	100	99			98	10	1	13	11

tr < 0,05%

RI lit* indeksy retencji literaturowe

RI eksp** indeksy retencji eksperymentalne

1 składnik zidentyfikowany tylko na podstawie GC-MS

2 składnik zidentyfikowany na kolumnie HP-1

a przybliżona ilość składnika w przeliczeniu na suchą masę drewna

b przybliżona ilość składnika obliczona na podstawie standardu wewnętrznego, przeliczona na suchą masę drewna

d związki eluujące jako jeden pik

W bielu i twardzieli świerka zidentyfikowałam zarówno metodą SPME, jak i w olejku eterycznym liczną grupę seskwiterpenów. Ich liczba, a także sumaryczny udział (około 12%) określone obiema metodami były podobne. Seskwiterpenów nie oznaczyłam w próbkach badanych metodą analizy fazy nadpowierzchniowej.

Większość wykrytych w olejku diterpenów występowała również w ekstraktach SPME, ale w bardzo niewielkich ilościach. Wyższa zawartość diterpenów w twardzieli spowodowana jest tym, iż martwe tkanki drewna zawierają znacznie więcej trudniej lotnych składników, niż przewodząca materiały zapasowe żywa tkanka drewna bielu [Back i Allen, 2000].

Metodą SPME oraz w olejkach eterycznych oznaczyłam również, w bardzo niewielkich ilościach związki inne niż terpeny, które stanowiły po około 1%. Były to głównie aldehydy, wyższe alkany, kwasy tłuszczowe.

Przedstawione wyniki badań wskazują, że zarówno HS-SPME, jak i destylacja z parą wodną są jednakowo odpowiednie do jakościowej oceny lotnych składników drewna. Jednak obserwowane różnice w proporcjach składników bardziej i mniej lotnych są na tyle duże, że nie można ich stosować wymiennie, jeśli celem jest analiza ilościowa.

Dla realizacji celu pracy, jakim było porównanie składu jakościowego i ilościowego lotnych związków drewna drzew iglastych, najlepsza okazała się metoda HS-SPME. Jest to wygodna, prosta i szybka metoda bezrozpuszczalnikowa, doskonała do badań porównawczych nawet bardzo złożonych mieszanin. Dużą zaletą tej metody jest jej wysoka czułość umożliwiająca wykonanie powtarzalnych analiz na niewielkiej próbce materiału (0,8 g). Całkowita ilość (%GC) składników zidentyfikowanych metodą SPME była wyższa niż metodą destylacji z parą wodną czy analizy fazy nadpowierzchniowej. Technikę tę wybrałam jako metodę porównania związków lotnych warstw drewna świerka, sosny i modrzewia, oznaczając terpeny w 3 egzemplarzach każdego z gatunków drzew iglastych.

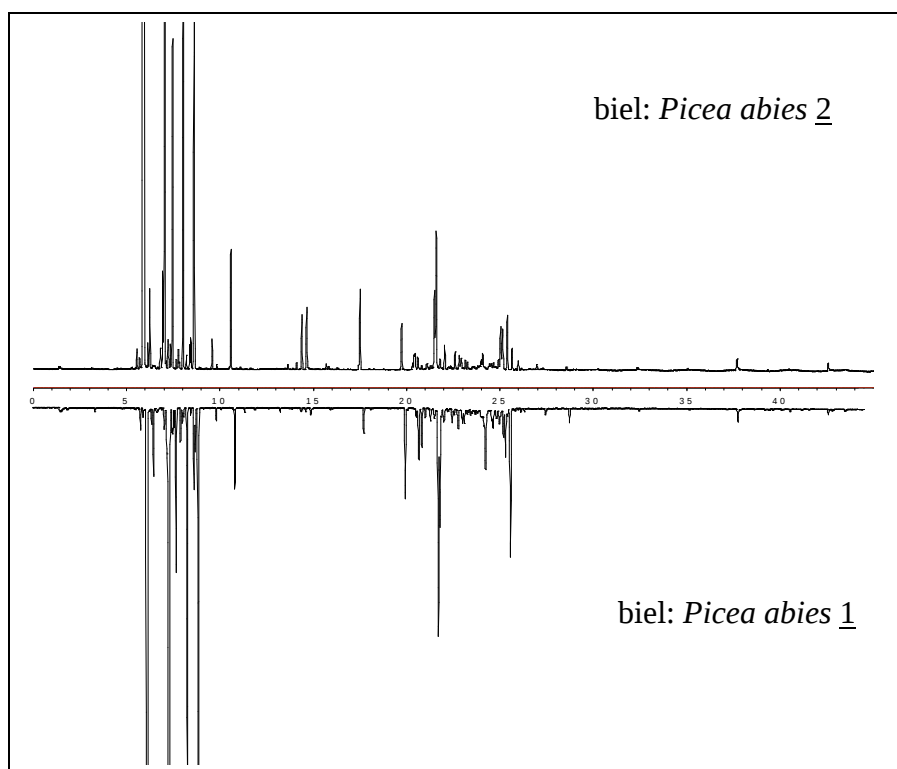
Metoda SPME nie była wcześniej stosowana do oznaczania lotnych składników drewna świerkowego, jakkolwiek jest ona szeroko stosowana do wyodrębniania i oznaczania związków lotnych z roślin [Isidorov i in., 2003; Zini i in., 2002] lub z ich ekstraktów [Vichi i in., 2003]. Była stosowana w analizie lotnych składników różnych organów drzew iglastych, a ostatnio również drewna sosny [Bengtsson i Sanari, 2004]. Nieliczne opisane w literaturze zastosowania SPME do ilościowego oznaczania sumy wielu składników były bardzo skomplikowane i nie obejmowały lotnych składników roślin [Bartelt, 1997; Martos i in., 1997].

4.4. Lotne składniki drewna drzew iglastych analizowane metodą HS-SPME

Do porównania lotnych składników bielu i twardzieli trzech gatunków drzew iglastych: *Picea abies* L., *Pinus sylvestris* L. i *Larix decidua* Mill wykorzystałam metodę analizy do fazy stałej w ustalonych warunkach (HS-SPME: 0,8 g kawałków drewna o wymiarach 20×10×0,36 mm w 4 ml fiole, włókno DVB/CAR/PDMS, czas ustalania równowagi 30 min., czas ekstrakcji 30 min., temperatura 60°C). Analizowałam trzy egzemplarze każdego z gatunków w trzech powtórzeniach. Zidentyfikowane składniki, występujące w co najmniej dwóch egzemplarzach danego gatunku (oznaczone numerami od 1 do 163, o czasach retencji od 1 do 45 minut i indeksach retencji od 800 do 2200) zestawiałam w Tabeli 15, w której podałam najniższą i najwyższą zawartość składnika (średnia z trzech pomiarów).

4.4.1. Lotne składniki drewna świerka pospolitego

Skład jakościowy frakcji lotnej bielu i twardzieli świerka był podobny zarówno dla trzech egzemplarzy jak i dla obu jego warstw (Tabela 15). Obserwowałam natomiast różnice w zawartości poszczególnych lotnych składników (Rysunek 27).



Rysunek 27. Chromatogram gazowy składników lotnych wydzielonych z bielu *Picea abies* 2 i 1 metodą HS-SPME (DVB/CAR/PDMS) (kolumna HP-5)

Tabela 15. Składniki lotne bielu i twardeści świerka, sosny i modrzewia oznaczone metodą SPME

Numer piku	RI lit*	RI eksp**	Składnik	Świerk pospolity		Sosna zwyczajna		Modrzew europejski	
				Biel	Twardziel	Biel	Twardziel	Biel	Twardziel
				Zawartość [%]					
1	800	800	heksanal	≤ 0,1	0,1 – 0,3	0 – tr	0 – tr	0,6 – 2,2	tr
2	888	884	santen	≤ 0,07	0 – 0,3			≤ 0,1	tr
3	899	901	heptanal					0,1	0,1 – 0,2
4	926	925	tricyklen	0,2 – 0,3	0,2 – 0,3	0,1	≤ 0,1	tr	tr
5	931	926	α-tujen	0,1 – 0,2	0 – 0,1	≤ 0,2	tr	41,6 – 47,2	51,6 – 65,7
6	939	936	α-pinen	38,7 – 46,4	46,7 – 54,2	25,0 – 47,5	31,5 – 41,2	0 – 0,5	0 – 0,1
7	951	948	α-fenchen	0 – 0,2		≤ 0,4	≤ 0,5	0,1 – 0,5	≤ 0,6
8	953	949	kamfen	0,5 – 0,6	0,6 – 2,1	tr	tr	≤ 0,1	0 – tr
9	957	952	tuj-2,4(10)-dien	tr	≤ 0,1			≤ 0,3	0,2 – 0,4
10	1	955	(E)-hept-2-enal	≤ 0,1	0 – 0,1	≤ 0,1	0,1 – 0,2		
11	961	961	benzaldehyd			0,2 – 0,3	0,1 – 0,2		
12	967	963	werbenen	0,3 – 1,1	≤ 0,2	0,6 – 0,9	≤ 0,5		
13	976	966	sabinen	10,3 – 27,8	0,8 – 16,9	1,1 – 17,8	≤ 7,7	10,3 – 21,0	11,4 – 21,3
14	980	978	β-pinen	1,4 – 4,38	0,1 – 0,2	1,7 – 2,1	0,2 – 0,6	1,5 – 1,6	0,5 – 1,3
15	991	989	mircen			≤ 0,1	0,4 – 1,2		
16	1001	999	2-karen	0,1 – 0,3	≤ 0,1	0,1 – 0,5	≤ 0,2	0,2 – 0,3	0,1 – 0,2
17	1005	999	α-felandren	0,1 – 5,0	≤ 6,2	35,8 – 36,9	40,5 – 47,9	≤ 1,2	0,1 – 1,8
18	1011	1010	3-karen	0,1 – 0,8	0,1 – 0,3	0,2	0,2 – 0,3	≤ 1,0	0,4 – 0,8
19	1018	1019	α-terpinen			0,1 – 0,3	0,1 – 0,3		
20	1022	1022	o-cymen	0,5	0,8 – 1,8	0,3 – 0,8	0,6 – 1,1	0,3 – 0,5	0,6 – 0,9
21	1026	1023	p-cymen	6,7 – 7,6	7,3 – 13,7	1,1 – 3,9	1,2 – 3,6	8,5 – 11,4	4,8 – 8,7
22+23	1031	1029	β-felandren ² + limonen ²	tr	0 – 0,1				
24	1033	1	1,8-cyneol	tr	0 – tr	tr	tr	tr	0 – 0,1
25	1040	1036	(Z)-β-ocymen	0 ≤ 0,1	0 – tr	tr	≤ 0,6		
26	1050	1046	(E)-β-ocymen	0,1 – 0,4	≤ 0,2	0,4 – 0,5	≤ 0,6	0,1 – 0,3	0,1 – 0,5
27	1062	1056	γ-terpinen					0 – 0,1	0 – tr
28	1	1057	(E)-okt-2-enal	≤ 0,1	0 – 0,2	tr	0 – tr		
29	1068	1064	cis-tujan-4-ol (hydrat sabinenu)			0,2	≤ 0,2	0,4 – 0,6	≤ 0,4
30	1082	1085	m-cymenen	0,7 – 1,7	0,5 – 2,9	4,3 – 4,5	2,2 – 3,7	0 – 0,1	0 – tr
31	1088	1087	terpinolen		0 – tr	tr	tr		
32	1089	1091	p-cymenen	≤ 0,1	0,1 – 0,2	tr	≤ 0,1	0,2 – 0,3	≤ 0,1
33	1102	1101	nonanal						

Numer piku	Składnik	Świerk pospolity		Sosna zwyczajna		Modrzew europejski	
		Biel	Twardziel	Biel	Twardziel	Biel	Twardziel
		Zawartość [%]					
34	1111 (mt)	1109 (mt)	p-menta-1,3,8-trien	0 – tr	0 – tr	≤ 0,1	tr
35	1112 (mt)	1112 (mt)	α-fenchol				0 – tr
36	1117 (mt)	1120 (mt)	β-fenchol	0,1 – 0,7			
37	1125 (mt)	1123 (mt)	α-kamfolenal	0 – tr	0,0 – tr	≤ 0,1	0 – tr
38	1140 (mt)	1143 (mt)	cis -werbenol	0 – 0,1			tr
39	1140 (mt)	1145 (mt)	trans -sabinol				
40	1143 (mt)	1146 (mt)	kamfora	0 – tr	0 – 0,2		0 – tr
41	1144 (mt)	1142 (mt)	trans -werbenol		tr	0 – tr	
42	1148 (mt)	1152 (mt)	hydrat kamfenu	0 – 0,8	0 – tr		0 – tr
43	1160 (mt)	1159 (mt)	pinokamfon	0 – 0,1			
44	1165 (mt)	1165 (mt)	borneol	0,2 – 0,4		≤ 0,1	
45	1177 (mt)	1177 (mt)	terpinen-4-ol	0,2 – 0,3	tr	0,1 – 0,2	tr
46	1180 (mt)	1180 (mt)	m-cymen-8-ol		tr	0 – tr	
47	1189 (nt)	1190 (nt)	α-terpineol	≤ 1,6	≤ 0,1	≤ 0,4	0 – 0,1
48	1195 (nt)	1193 (nt)	estragol	≤ 3,6	0,1 – 0,3	0,1 – 0,5	≤ 0,1
49	1204 (nt)	1206 (nt)	dekanal	0,2 – 1,1	≤ 0,6	0,1 – 0,4	≤ 0,1
50	1204 (mt)	1206 (mt)	werbenon	0 – tr	0 – 0,5		
51	1235 (mt)	1233 (mt)	eter metylowy tymolu	≤ 0,1	tr	tr	0,1 – 0,2
53	1244 (mt)	1 (mt)	eter metylowy karwakrolu	0 – tr	0 – 0,1	≤ 0,1	0 – tr
52	1 (nt)	1260 (nt)	3,4-dimetoksytoluen	≤ 0,1			
54	1285 (mt)	1286 (mt)	octan bornylu	≤ 0,1	≤ 0,1	0 – tr	0,3 – 0,5
54+55	1283(85) (mt)	1284 (mt)	octan bornylu + (E)-anetol		≤ 0,1		
56	1291 (nt)	1291 (nt)	(E,Z)-2,4-dekadienal			tr	
57	1292 (nt)	1 (mt)	octan trans -werbenylu		tr	tr	
58	1297 (mt)	1300 (mt)	octan trans -pinokarweolu		tr	0 – tr	
59	1314 (nt)	1314 (nt)	(E,E)-2,4-dekadienal				
60	1339 (st)	1338 (st)	δ-elemen		0 – tr	≤ 0,1	tr
61	1340 (mt)	1339 (mt)	octan terpinen-4-ylu		0 – 0,3	0 – tr	
62	1350 (mt)	1348 (mt)	octan α-terpinylu		≤ 1,5	0 – 0,6	0 – 0,3
63+64	1351 (st)	1350 (st)	α-longipinen + α-kubeben	0,9 – 2,0	0 – tr	0 – 0,3	0,2 – 0,3
65	1354 (mt)	1351 (mt)	octan cytronelilu	1,1 – 2,0		0 – 0,1	0 – tr
66	1368 (st)	1351 (st)	cyklosatiwen	≤ 0,1	0 – tr	0 – 0,1	
67	1372 (st)	1369 (st)	α-ylangen	0,2 – 0,8	0 – 0,1	0 – 0,1	0,1 – 0,2
68	1373 (st)	1369 (st)	longicyklen	0,1 – 1,5			0,1

Numer piku	RI lit* RI eksp**		Składnik	Swierk pospolity		Sosna zwyczajna		Modrzew europejski	
				Biel	Twardziel	Biel	Twardziel	Biel	Twardziel
				Zawartość [%]					
69	1373	1373	(st)	izoleđen	0,3 – 0,4	0,3 – 0,5	tr	0,4 – 0,5	0,4 – 0,5
70	1376	1374	(st)	α -kopaen				0,1 – 0,3	0,1 – 0,3
71	1380	1380	(st)	daucen				≤ 0,1	0,1 – 0,2
72	¹	1380	(st)	satiwen	≤ 0,1	≤ 0,4	0 – 0,4	0 – tr	tr
73	1387	¹	(st)	izolongifolen			0 – tr	0 – tr	tr
74	1390	1389	(st)	β -kubeben			0 – 0,1	0 – tr	tr
75	1391	1390	(st)	β -elemen			0 – 0,1	0 – tr	≤ 0,2
76	1397	1392	(st)	1,7-di- <i>epi</i> - α -cedren	≤ 0,4	0,1		≤ 0,1	≤ 0,1
77	1398	1395	(st)	β -longipinen	0,1	0 – tr		≤ 0,4	≤ 0,1
78	1402	1401	(st)	α -longifolen	1,5 – 2,9	2,3 – 3,0	0 – 0,3	1,2 – 2,4	1,5 – 1,6
79	1400	¹	(nt)	tetradekan				0 – tr	0 – tr
80	1401	1402	(nt)	metyloegenol			0,1 – 0,3		
81	1404	1403	(st)	izokariofilen	1,4 – 3,8	1,8 – 4,7			
82	1409	1406	(st)	α -cedren	≤ 0,1	≤ 0,4		≤ 1,4	≤ 0,1
83	1418	1412	(st)	β -cedren	0,2 – 0,6	0,2 – 0,6		0,1 – 0,4	≤ 0,2
84	1418	1420	(st)	β -kariofilen				0 – 0,1	0 – 0,1
85	1432	1427	(st)	β -gurjunen	0,1	≤ 0,6	0 – 0,1	0,1 – 0,4	0,1 – 0,3
86	1433	1433	(st)	γ -elemen				0,2 – 0,3	0,1 – 0,2
87	1436	1433	(st)	<i>trans</i> - α -bergamoten	0,2 – 0,3	≤ 0,2	0 – tr	≤ 0,2	≤ 0,1
88	1439	¹	(st)	aromadendren				0,3 – 2,2	0,2 – 0,7
89	1443	1444	(st)	(<i>Z</i>)- β -farnezen	0,2	0,1 – 0,3		0 – 0,2	0 – 0,1
90	1447	1449	(st)	α -himachalen					
91	1454	1449	(st)	α - <i>neo</i> -klowen	≤ 0,1	0,1 – 0,2			
92	1454	1455	(st)	α -humulen	0 – 0,2	0 – tr			
93	1458	1458	(st)	(<i>E</i>)- β -farnezen	0,1 – 0,4	≤ 0,1			
94	1460	1459	(st)	<i>cis</i> -muurola-4(14),5-dien	0 – tr	0 – tr	0 – 0,1		
95	1467	1464	(st)	9- <i>epi</i> - β -kariofilen	≤ 0,1	tr			
96	1477	1474	(st)	γ -muurolen	≤ 0,2	0,1 – 1,2			
97	1480	1478	(st)	germakren D	≤ 15,1	0,1 – 2,2	0 – 4,0	0 – 0,6	1,8 – 2,7
98	1480	¹	(st)	γ -kurkumen	0 – tr	0 – 0,1	≤ 0,1	0 – tr	
99	1483	1480	(st)	<i>ar</i> -kurkumen	0 – 0,3	≤ 1,4			
100	1490	1488	(st)	<i>cis</i> - β -guaien			0 – 1,6	0 – 0,1	≤ 0,1
101	1491	1492	(st)	walencen	0,1 – 0,3	0,1 – 0,3	0 – tr	0 – 0,1	≤ 0,3
102	1493	1497	(st)	<i>epi</i> -kubebol	≤ 0,3	0,0 – 0,3	0 – tr	0 – 0,2	
103	1494	1498	(st)	α -selinen	≤ 0,2			0 – 0,8	0 – tr

Numer piku	RI lit*	RI eksp**	Składnik	Świerk pospolity		Sosna zwyczajna		Modrzew europejski	
				Biel	Twardziel	Biel	Twardziel	Biel	Twardziel
				Zawartość [%]					
104	1495	1498	zingiberen	≤ 0,3	≤ 0,3	0 – 0,4	0 – 1,2	≤ 0,2	0,1 – 0,3
105	1499	1502	α-muurolen			0 – 2,1	0 – tr	≤ 0,6	≤ 0,6
106	1500	1506	trans-β-guaien						
107	1504	1507	(Z)-α-bisabolol	0 – 0,1	0 – tr			0 – 0,8	0,1 – 0,3
108	1509	1510	β-bisabolol	0,2 – 0,3	≤ 0,2			0,4 – 1,9	≤ 0,9
109	1512	1513	β-kurkumen	0,4 – 0,8	≤ 0,4				
110	1513	1514	γ-kadinen			≤ 0,2	≤ 0,2		
111	1514	1516	kubebol					0 – 0,4	0 – 0,3
112	1515	1517	(Z)-γ-bisabolol	0,1 – 0,9	0,2 – 0,7			0,1 – 1,1	≤ 1,2
113	1524	1526	δ-kadinen	1,1 – 1,9	0,4 – 2,3	0 – 0,3	0 – 0,8	0,1 – 3,0	0,1 – 0,4
114	1524	1527	β-seskwifelandren					0 – 0,8	0 – 0,7
115	1532	1533	kadina-1,4-dien	0 – tr	0 – 1,8	0 – tr	0 – tr		
116	1533	1535	(E)-γ-bisabolol	0 – 0,5	0 – 0,3			0,1 – 0,3	0,1 – 2,1
117	1538	1540	α-kadinen	≤ 0,1	≤ 0,1	0 – tr	0 – tr	0,1 – 0,2	≤ 0,2
118	1542	1541	selina-3,7(11)-dien	≤ 0,2	≤ 0,2	0 – tr	0 – tr	≤ 0,2	≤ 0,2
119	1542	1542	α-kalakoren					1,8 – 2,2	0,9 – 1,0
120	1545	1543	hydrat cis-seskwisabinenu	tr	tr			tr	tr
121	1556	1546	germakren B	tr	0 – tr			tr	≤ 0,1
122	1563	1563	β-kalakoloren	tr				tr	tr
123	1564	1572	(E)-nerolidol	0 – tr	0 – tr	0 – tr	0 – tr	≤ 0,4	0 – tr
124	1574	1579	germakren D-4-ol	≤ 0,1	0 – 0,1				
125	1585	1583	gleenol	0 – tr	0 – tr				
126	1592	1	longiborneol						
127	1611	1602	epi-cedrol	0,1	0 – 0,1			0 – 0,1	0 – tr
128	1614	1	1,10-di-epi-kubenol						
129	1627	1630	1-epi-kubenol	tr	0 – 0,1	0 – tr	0 – tr	tr	tr
130	1640	1640	epi-α-kadinen					≤ 0,2	≤ 0,1
131	1642	1641	kubenol						
132	1653	1657	α-kadinen	tr	0 – 0,1				
133	1674	1673	kadalen	tr	0 – tr	0 – tr	0 – tr	tr	tr
134	1683	1680	α-bisabolol	0 – tr	0 – tr			tr	tr
135	1686	1	epi-α-bisabolol	0 – tr				tr	tr
136	1700	1	heptadekan					tr	tr
137	1775	1774	14-hydroxy-α-muurolen	0 – 0,1	0 – 0,2			tr	tr
138		1	heksadekanal					tr	

Numer piku	RI lit*	RI eksp**	Składnik	Świerk pospolity		Sosna zwyczajna		Modrzew europejski	
				Biel	Twardziel	Biel	Twardziel	Biel	Twardziel
				Zawartość [%]					
139		1	(nt)	0 – tr	0 – tr	tr	0 – tr	tr	tr
140	1	1862	(nt)	0 – tr	0 – 0,2		0 – tr		
141	1894	1	(dt)			tr	0 – tr		
142	1900	1899	(nt)	0 – tr	0 – tr			0 – tr	
143	1929	1929	(dt)	tr	tr				
144	1941	1952	(dt)	tr	≤ 0,1	≤ 0,4	tr		
146	1959	1956	(dt)	≤ 0,3	tr				
147	1	1	(nt)			tr	0 – tr		
148	1	1962	(nt)	≤ 0,4	≤ 0,7	≤ 0,3	0,1 – 0,2	tr	tr
149	1	1	(dt)			tr	tr	tr	tr
150	1983	1977	(dt)	≤ 0,5	≤ 1,1	tr	tr		
151+152	2010	2016	(nt)	0 – tr	0 – tr				
153	1	2036	(dt)	0 – tr	0 – tr	tr	tr	tr	tr
154	1	2071	(nt)	tr	≤ 0,1	tr	tr	tr	tr
155	1	2053	(dt)	0 – tr	0 – tr				
156	2054	2055	(dt)	0 – tr	0 – tr				
157	2056	2062	(dt)	0 – tr	0 – 0,1			≤ 0,2	≤ 0,1
158	2080	2083	(dt)	0 – tr	0 – tr	≤ 0,1	tr	tr	tr
159	2100	1	(nt)	0 – tr	0 – tr				
160	1	2114	(dt)	0 – tr	0 – tr				
161	1	2156	(dt)	0 – tr	0 – tr	≤ 0,2	0,1		
162	1	2175	(dt)	0 – tr	0 – tr	≤ 0,2	tr		
163	2200	1	(nt)	tr	tr	tr	0 – tr	tr	0 – tr
monoterpeny (nt)				64,0 – 85,6	78,1 – 84,0	88,6 – 95,1	94,0 – 97,8	70,1 – 82,3	78,5 – 86,4
seskwiterpeny (st)				11,7 – 34,1	12,3 – 18,9	2,0 – 7,6	0,8 – 4,3	11,7 – 22,3	7,6 – 13,9
diterpeny (dt)				0,4 – 0,9	0,9 – 1,4	0,4 – 0,5	0,2 – 0,3	tr – 0,2	tr – 0,1
inne (nt)				0,4 – 0,8	0,3 – 0,9	0,3 – 0,6	0,2 – 0,5	0,5 – 4,3	0,4 – 3,9
suma zidentyfikowanych				95,6 – 98,4	98,1 – 98,5	97,5 – 98,8	98,3 – 99,0	93,7 – 96,2	94,9 – 97,5

tr < 0,05%

RI lit* indeksy retencji literaturowe

RI eksp** indeksy retencji eksperymentalne

1 składnik zidentyfikowany tylko na podstawie GC-MS

2 składnik zidentyfikowany na kolumnie HP-1

W celu określenia czy różnice były istotne statystycznie, dla wybranych składników lotnych świerka wykonałam tzw. test istotności różnicy dwóch średnich [Łomnicki, 2002]. Do analizy statystycznej wybrałam składniki występujące w zawartości powyżej 0,1% w każdej warstwie w przynajmniej dwóch egzemplarzach drzewa. Rezultaty testu oraz średnią zawartość składników w trzech drzewach i odchylenie standardowe średniej zawartości w trzech drzewach zamieściłam w Tabeli 16.

W drewnie bielu twardzieli świerka jako dominującą grupę związków lotnych oznaczyłam monoterpeny, które stanowiły odpowiednio w każdym z drzew 64-86% i 78-84%. W grupie tej zidentyfikowałam 21 węglowodorów monoterpenowych oraz 16 ich tlenowych pochodnych. Głównymi składnikami były: α -pinen (38,7-54,2%), β -pinen (0,8-27,8%), β -felandren z limonenem (6,7-13,7%) i mircen (0,1-4,4%).

Wszystkie składniki zidentyfikowane w drewnie świerka 1, który posłużył mi do dobierania warunków analizy SPME (Tabela 15), oznaczyłam również w drewnie pozostałych dwóch przedstawicieli tego gatunku. Zaobserwowałam w nich jednak kilkanaście mono-, seskwi- i diterpenów, których nie zidentyfikowałam wcześniej, ale większość z nich występowała w ilościach śladowych. Skład jakościowy monoterpenów w dwóch różnych warstwach drewna był podobny. Różnice dotyczyły występowania fenchenu i p-menta-1,3,8-trienu tylko w bielu oraz p-cymenenu, β -fencholu, α -kamfolenalu, wodzianu kamfenu, pinokamfonu i borneolu jedynie w twardzieli. Z kolei skład ilościowy monoterpenów w dwóch warstwach drewna różnił się. Różnice te nie były jednak istotne, co potwierdzają wyniki testu statystycznego (Tabela 16). Z obliczeń wynika że jedynie zawartość p-cymenu i terpinen-4-olu była istotnie wyższa w twardzieli niż bielu świerków.

Efektem analizy drewna świerka metodą SPME była identyfikacja 50 seskwiterpenów, stanowiących odpowiednio 11-34% i 12-19% ogólnej sumy związków wyizolowanych z bielu i z twardzieli. Było to 39 węglowodorów i 11 pochodnych tlenowych. Głównymi składnikami należącymi do tej grupy były: izokariofilen (1,4-4,7%), α -longifolen (0,1-1,5%), δ -kadinen (0,4-2,3%) i germakren D (0-15,1%). Jedynie trzy mikroskładniki wyróżniały biel od twardzieli: α -selinen, (E)-nerolidol i kadalen – oznaczone tylko w bielu, w ilościach poniżej 0,2%. Zdecydowana większość związków seskwiterpenowych występowała w ilościach zbliżonych w obu warstwach drewna świerka. Na podstawie testu istotności różnicy dwóch średnich mogę stwierdzić, że zawartość seskwiterpenów w warstwach drewna nie różniła się istotnie z wyjątkiem germakrenu D, którego ilość w bielu wynosiła do 15,1%, w twardzieli zaś 0,1-2,2%. Wysoką zawartość germakrenu D odnotowałam w bielu jednego ze świerków (w pozostałych występował w ilościach poniżej 0,1%).

Tabela 16. Istotność różnic w składzie lotnych związków bielu i twardzieli *Picea abies*

		Biel					Twardziel					t ^e
Numer piku	Drzewo	1	2	3			1	2	3			
	Składnik	$\frac{\bar{b}}{x}$	$\frac{\bar{b}}{x}$	$\frac{\bar{b}}{x}$	$\frac{\bar{c}}{x}$	d s	$\frac{\bar{b}}{x}$	$\frac{\bar{b}}{x}$	$\frac{\bar{b}}{x}$	$\frac{\bar{c}}{x}$	d s	
6	α-pinen	41,7	46,4	38,7	42,3	3,90	46,7	42,3	54,2	47,7	6,01	1,326
8	kamfen	0,6	1,0	0,5	0,7	0,25	0,8	2,1	0,6	1,2	0,78	1,012
13	sabinen	0,3	0,3	1,1	0,6	0,45	0,2	0,1	0,04	0,1	0,09	1,682
14	β-pinen	27,8	11,6	10,3	16,6	9,77	16,9	0,8	7,5	8,4	8,12	1,119
15	mircen	1,4	4,4	1,7	2,5	1,63	0,1	0,2	0,1	0,1	0,04	2,520
17	α-felandren	0,3	0,2	0,1	0,2	0,09	0,1	0,1	0,03	0,1	0,05	2,264
18	3-karen	3,4	5,0	0,1	2,8	2,47	6,2	6,4	0,01	4,2	3,64	0,551
19	α-terpinen	0,8	0,2	0,1	0,4	0,36	0,3	0,1	0,2	0,2	0,11	0,706
21	p-cymen ^a	0,5	0,5	0,5	0,5	0,01	0,8	1,8	2,0	1,5	0,64	2,890
22+23	β-felandren + limonen	7,6	6,8	6,7	7,0	0,51	7,3	13,7	7,6	9,5	3,60	1,188
27	γ-terpinen	0,1	0,4	0,3	0,3	0,15	0,1	0,2	0,02	0,1	0,08	1,645
31	terpinolen	0,7	1,7	0,7	1,0	0,61	1,2	2,9	0,5	1,5	1,25	0,659
45	terpinen-4-ol ^a	0,01	0,1	0,1	0,1	0,04	0,3	0,2	0,2	0,2	0,01	8,237
47	α-terpineol	0,1	0,1	0,7	0,3	0,33	1,6	0,0	0,2	0,6	0,88	0,623
48	estragol	0,1	0,8	0,5	0,4	0,38	0,01	3,6	1,7	1,8	1,77	1,250
49	dekanal	0,2	1,0	0,01	0,4	0,52	0,3	1,1	0,2	0,5	0,49	0,361
54	octan bornylu	0,3	1,5	0,7	0,8	0,58	0,1	0,04	0,03	0,1	0,04	2,320
63+64	α-longipinen + α-kubeben	1,0	0,9	2,0	1,3	0,61	1,1	1,2	2,0	1,4	0,50	0,327
68	longicyklen	0,1	0,4	1,5	0,7	0,71	0,1	0,4	0,2	0,2	0,18	1,004
67	α-ylangen	0,8	0,2	0,2	0,4	0,33	0,9	0,6	1,5	1,0	0,46	1,945
70	α-kopaen	0,4	0,3	0,3	0,3	0,11	0,5	0,4	0,3	0,4	0,10	0,673
76	1,7-di-epi-α-cedren	0,01	0,1	0,4	0,2	0,21	0,1	0,1	0,1	0,1	0,03	0,414
78	α-longifolen	2,7	0,02	2,9	1,9	1,60	3,0	2,3	2,5	2,6	0,38	0,778
81	izokariofilen	1,4	1,5	3,8	2,2	1,35	1,8	4,7	3,8	3,4	1,49	1,037
82	α-cedren	0,05	2,8	0,1	1,0	1,56	0,03	0,4	0,1	0,2	0,17	0,916
83	β-cedren	0,2	0,2	0,6	0,3	0,25	0,2	0,6	0,4	0,4	0,18	0,319
85	β-gurjunen	0,1	0,1	0,1	0,1	0,05	0,01	0,6	0,1	0,2	0,29	0,734
87	trans-α-bergamoten	0,2	0,3	0,2	0,2	0,04	0,1	0,01	0,2	0,1	0,08	2,443
89	(Z)-β-farnezen	0,2	0,2	0,2	0,2	0,02	0,3	0,2	0,1	0,2	0,10	0,164
91	α-neo-klowen	0,1	0,01	0,1	0,1	0,06	0,1	0,2	0,1	0,1	0,07	0,683
93	(E)-β-farnezen	0,1	0,2	0,4	0,2	0,17	0,00	0,1	0,01	0,03	0,04	1,715
96	γ-muurolen	0,03	0,2	1,0	0,4	0,51	0,1	0,2	1,2	0,5	0,63	0,263
99	ar-kurkumen	0,8	0,3	0,00	0,4	0,39	0,4	1,4	0,01	0,6	0,73	0,537
101	walencen	0,3	0,1	0,3	0,2	0,12	0,3	0,1	0,2	0,2	0,12	0,384
102	epi-kubebol	0,1	0,01	0,3	0,1	0,16	0,2	0,00	0,3	0,1	0,13	0,064
108	β-bisabolen	0,2	0,2	0,3	0,2	0,09	0,01	0,2	0,2	0,1	0,12	1,165
109	β-kurkumen	0,4	0,8	0,8	0,7	0,23	0,0	0,4	0,2	0,2	0,20	2,664
112	(Z)-γ-bisabolen	0,2	0,9	0,1	0,4	0,48	0,2	0,7	0,5	0,5	0,25	0,272
113	δ-kadinen	1,5	1,1	1,9	1,5	0,37	0,4	2,3	1,8	1,5	0,99	0,049
119	α-kalakoren	0,01	0,2	0,1	0,1	0,09	0,02	0,2	0,1	0,1	0,11	0,553

a składniki dla których zawartości w bielu i twardzieli różnią się istotnie, czyli wartość obliczona |t|^e jest większa od 2,776 (wartości odczytanej ze statystyki t-Studenta dla $\alpha=0,05$ i 4 stopni swobody)

b średnia z trzech powtórzeń

c średnia z trzech drzew

d odchylenie standardowe średniej z trzech drzew

e wartość bezwzględna t, obliczona według wzoru (z Części eksperymentalnej 3.1.17)

Węglowodory diterpenowe i ich tlenowe pochodne miały niewielki udział w wydzielonych metodą SPME składnikach drewna świerka, około 0,5% w bielu i 1% w twardzieli. Oznaczyłam 21 diterpenów, które występowały głównie w ilościach śladowych. Dominującymi były: tlenek manoilu i neocembren. Biel od twardzieli wyróżniała jedynie obecność w warstwie zewnętrznej *cis*-abienolu (0,1-0,3%).

Zidentyfikowałam ponadto składniki inne niż terpeny, takie jak: alifatyczne i aromatyczne aldehydy (heksanal, dekanal, izomery dekadienalu, benzaldehyd), alkany (nonadekan, eikozan, heneikozan, dokoza), kwasy (pentadekanowy, heksadekanowy). Sumaryczna zawartość tych składników wynosiła poniżej 2%. Najwięcej zidentyfikowanych składników nieterpenowych to związki trudnolotne, o indeksach retencji od około 1800 do 2200.

4.4.2. Lotne składniki drewna sosny zwyczajnej

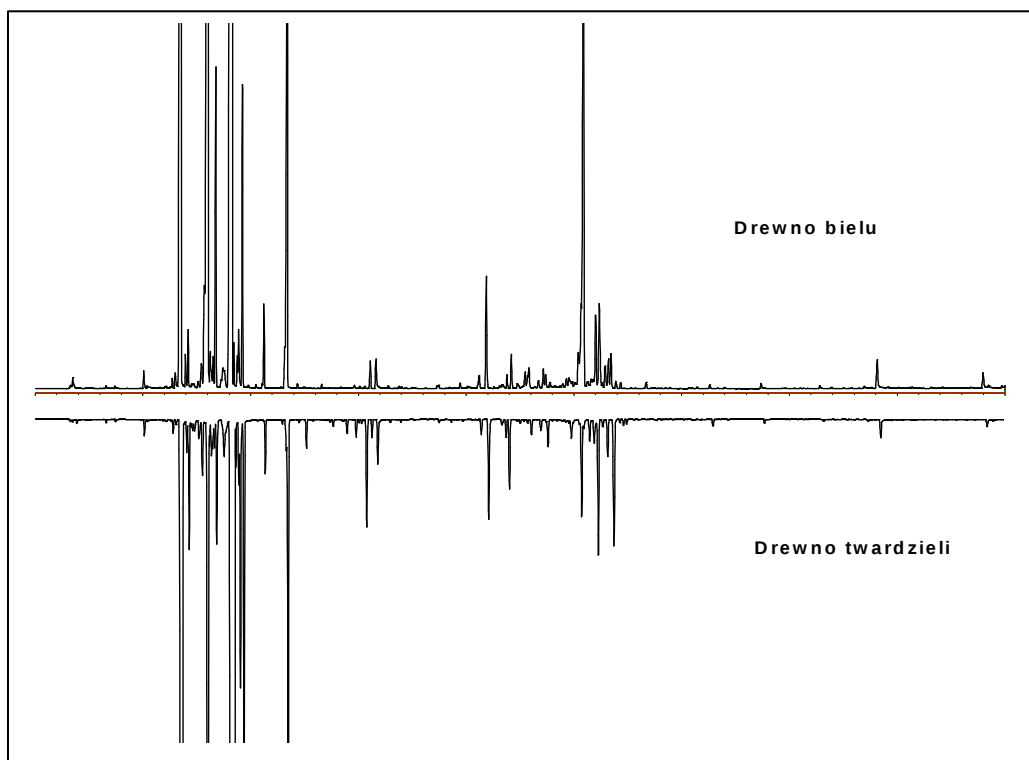
Wyniki analizy lotnych składników drewna sosny zestawiałam w Tabeli 15, a chromatogramy gazowe wydzielonych metodą SPME składników bielu i twardzieli przedstawiłam na Rysunku 28.

Główną grupą związków było 40 monoterpenów, które stanowiły w bielu i twardzieli sosny odpowiednio 87-95% i 94-97% składników. W grupie tej zidentyfikowałam 24 węglowodory monoterpenowe oraz 16 tlenowych pochodnych. Głównymi składnikami były węglowodory monoterpenowe: 3-karen (35,8-47,9%), α -pinen (25,0-47,5%), β -pinen (do 17,8%), β -felandren z limonenem (1,1-9,0%) i terpinolen (2,2-4,5%). Wszystkie zidentyfikowane monoterpeny występowały zarówno w bielu, jak i w twardzieli, z wyjątkiem wodzianu kamfenu i borneolu występujących w ilościach śladowych tylko w twardzieli. Tak więc skład jakościowy monoterpenów był podobny.

Skład ilościowy tej grupy związków w warstwach drewna sosny różnił się, ale w niewielkim stopniu. Jak wynika z rezultatów testu istotności różnicy dwóch średnich (Tabeli 17), zawartość sabinenu i mircenu była istotnie wyższa w bielu, natomiast 3-karenu w twardzieli. Zawartości pozostałych badanych związków z grupy monoterpenów w obu warstwach drewna nie różniły się istotnie.

Węglowodory seskwiterpenowe (25 związków) i ich tlenowe pochodne (6 związków) stanowiły odpowiednio 2-8% i 1-4% ogólnej sumy związków wyizolowanych z bielu i twardzieli trzech drzew sosny. W grupie tej dominowały: γ -muurolen (do 4,0%), α -muurolen (do 1,2%), *cis*- β -guaien (do 1,6%) i *trans*- β -guaien (do 2,1%). Obecność δ -elemenu tylko

w bielu oraz 1,10-di-*epi*-kubenolu i kubenolu tylko w twardzieli odróżniała te dwie warstwy drewna sosny. Zatem skład jakościowy seskwiterpenów w warstwach drewna sosny był bardzo podobny. Wyniki testu istotności różnicy dwóch średnich pokazały, że zawartość żadnego ze składników seskwiterpenowych nie różniła się istotnie (Tabela 17).



Rysunek 28. Chromatogram gazowy składników lotnych wydzielonych metodą SPME z bielu i twardzieli *Pinus sylvestris* 1

Diterpeny (5 węglowodorów i 3 tlenowe pochodne) występowały w obu warstwach drewna sosny w ilości sumarycznej poniżej 0,5%. Dwa spośród nich (*cis*-abienol i pimaral) dominowały w tej grupie. Skład jakościowy i ilościowy (Tabela 17) tej grupy związków był podobny w obu warstwach drewna gatunku *P.sylvestris*.

Metodą SPME oznaczyłam też 9 składników drewna sosny nie będących terpenami. Związki te stanowiły niewielki udział – do około 0,6%. Grupę tę można podzielić na lotne aldehydy o indeksach retencji od 800 do 1204 (heksanal, (E)-2-oktenal, nonanal, dekanal, benzaldehyd) oraz trudnolotne kwasy tłuszczowe i ich estry o indeksach retencji od około 1200 do 2100 (kwasy pentadekanowy i heksadekanowy oraz jego ester). Dominującymi składnikami nieterpenowymi były dekanal i kwas heksadekanowy.

Tabela 17. Istotność różnic w składzie lotnych związków bielu i twardzieli *Pinus sylvestris*

		Biel					Twardziel					t ^e
Drzewo		1	2	3			1	2	3			
Numer piku	Składnik	$\frac{b}{x}$	$\frac{b}{x}$	$\frac{b}{x}$	$\frac{c}{x}$	d	$\frac{b}{x}$	$\frac{b}{x}$	$\frac{b}{x}$	$\frac{c}{x}$	d	
4	tricyklen	0,1	0,1	0,1	0,1	0,03	0,1	0,1	0,03	0,1	0,04	0,938
6	α -pinen	36,0	47,5	25,0	36,2	11,28	41,2	40,2	31,5	37,6	5,37	0,203
8	kamfen	0,02	0,4	0,3	0,2	0,21	0,0	0,4	0,5	0,3	0,27	0,454
11	benzaldehyd	0,1	0,1	0,03	0,1	0,06	0,1	0,1	0,1	0,1	0,03	0,303
12	werbenen	0,3	0,3	0,2	0,3	0,09	0,2	0,2	0,1	0,2	0,06	1,317
13	sabinen^a	0,9	0,9	0,6	0,8	0,15	0,5	0,02	0,3	0,3	0,26	2,878
14	β -pinen	1,1	1,1	17,8	6,7	9,67	0,04	0,3	7,7	2,7	4,32	0,657
15	mircen^a	2,1	1,8	1,7	1,9	0,23	0,2	0,6	0,6	0,5	0,26	6,885
16	2-karen	0,1	0,01	0,03	0,03	0,02	1,2	0,4	0,4	0,6	0,45	2,263
17	α -felandren	0,5	0,3	0,1	0,3	0,21	0,2	0,2	0,01	0,1	0,10	1,134
18	3-karen^a	36,9	35,8	36,9	36,5	0,68	40,5	47,9	46,0	44,8	3,84	3,668
19	α -terpinen	0,2	0,2	0,2	0,2	0,02	0,3	0,3	0,2	0,2	0,07	0,991
20	o-cymen	0,3	0,2	0,1	0,2	0,08	0,2	0,1	0,3	0,2	0,06	0,019
21	p-cymen	0,5	0,8	0,3	0,5	0,24	0,6	0,8	1,1	0,8	0,26	1,509
22+23	β -felandren + limonen	3,9	1,1	1,6	2,2	1,48	3,6	1,2	2,2	2,4	1,18	0,146
27	γ -terpinen	0,5	0,4	0,4	0,4	0,06	0,6	0,01	0,2	0,3	0,31	0,729
30	m-cymenen	0,2	0,2	0,2	0,2	0,02	0,2	0,2	0,02	0,1	0,09	1,629
31	terpinolen	4,5	4,3	4,5	4,4	0,13	3,5	3,7	2,2	3,1	0,79	2,767
45	terpinen-4-ol	0,03	0,03	0	0,02	0,02	0,2	0,1	0,1	0,1	0,06	2,432
45	α -terpineol	0,02	0,1	0,1	0,1	0,06	0,1	0,4	0,0	0,2	0,19	0,727
48	estragol	0,3	0,1	0,2	0,2	0,07	0,3	0,1	0,5	0,3	0,24	0,704
49	dekanal	0,6	0,4	0,01	0,3	0,28	0,4	0,1	0,3	0,2	0,13	0,413
61	octan α -terpinyłu	0,8	1,5	0,01	0,7	0,72	0	0,6	0,6	0,4	0,35	0,744
70	α -kopaen	0,03	0,01	0,03	0,02	0,01	0,5	0,01	0,4	0,3	0,24	1,851
78	α -longifolen	0,3	0	0,1	0,1	0,16	0,1	0	0,02	0,03	0,04	1,205
80	metyleugenol	0,3	0,2	0,1	0,2	0,11	0,01	0,05	0,1	0,1	0,04	1,995
85	β -gurjunen	0,1	0	0,03	0,03	0,03	0,1	0	0,1	0,1	0,07	0,900
96	γ -muurolen	0,3	0	4,0	1,4	2,23	0,4	0	0,6	0,3	0,30	0,833
100	<i>cis</i> - β -guaien	1,6	0	0,04	0,5	0,89	0,1	0	0,1	0,1	0,06	0,926
105	α -muurolen	0,1	0	0,4	0,2	0,23	1,2	0	0,8	0,7	0,63	1,285
106	<i>trans</i> - β -guaien	2,1	0	0,6	0,9	1,08	0,03	0	0,04	0,02	0,02	1,381
110	γ -kadinen	0,1	0,01	0,2	0,1	0,10	0,1	0	0,2	0,1	0,10	0,057
113	δ -kadinen	0,3	0	0,04	0,1	0,14	0,5	0	0,8	0,4	0,40	1,349
165	pimaral	0,1	0,2	0,01	0,1	0,09	0,1	0,1	0,1	0,1	0,03	0,483

a składniki dla których zawartości w bielu i twardzieli różnią się istotnie, czyli wartość obliczona |t|^e jest większa od 2,776 (wartości odczytanej ze statystyki t-Studenta dla $\alpha=0,05$ i 4 stopni swobody)

b średnia z trzech powtórzeń

c średnia z trzech drzew

d odchylenie standardowe średniej z trzech drzew

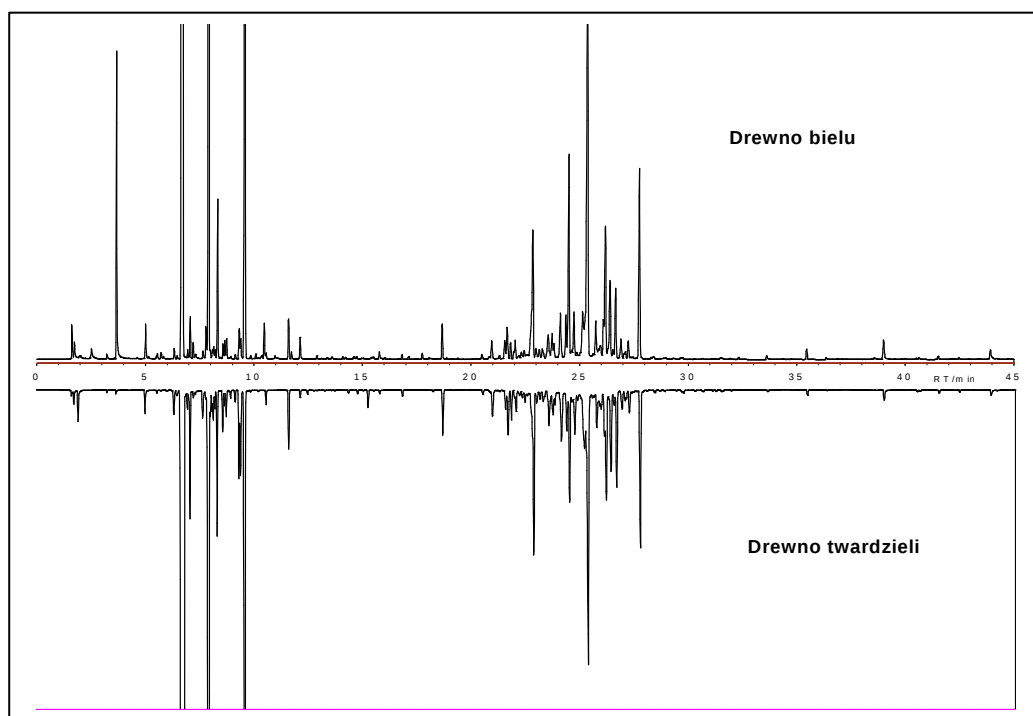
e wartość bezwzględna t, obliczona według wzoru (z Części eksperymentalnej 3.1.17)

4.4.3. Lotne składniki drewna modrzewia europejskiego

Wyniki analizy lotnych składników drewna modrzewia zestawiałam w Tabeli 15, a chromatogramy gazowe wydzielonych metodą SPME składników bielu i twardzieli przedstawiłam na Rysunku 29.

Najbardziej lotną, a zarazem mającą największy udział (Rysunek 29) grupą składników drewna modrzewia były węglowodory monoterpenowe i ich tlenowe pochodne. Związki te stanowiły w bielu i twardzieli odpowiednio 70-82% i 78-86% wyizolowanych metodą SPME związków. Oznaczyłam 31 monoterpenu: 18 węglowodorów i 13 tlenowych pochodnych. Głównymi składnikami były, tak jak w przypadku świerka: α -pinen (41,6-65,7%), β -pinen (10,3-21,3%), β -felandren i limonen (4,8-11,4%) oraz mircen (0,5-1,6%). Zdecydowana większość zidentyfikowanych monoterpenu występowała w obu warstwach drewna modrzewia, jedynie α - i β -fenchol, wodzian kamfenu oraz α -terpineol występowały tylko w drewnie twardzieli. Skład jakościowy monoterpenu w dwóch różnych warstwach drewna modrzewia był więc podobny.

Z rezultatów obliczeń statystycznych zamieszczonych w Tabeli 18 wynika, iż jedynie p-cymen występował w ilości istotnie wyższej w twardzieli niż bielu. Zawartość pozostałych monoterpenu poddanych testowi nie różniła się istotnie.



Rysunek 29. Chromatogram gazowy składników lotnych wydzielonych z bielu i twardzieli *Larix decidua* metodą SPME

Tabela 18. Istotność różnic w składzie lotnych związków bielu i twardzieli *Larix decidua*

Numer piku	Drzewo	Biel					Twardziel					t ^e
		1	2	3			1	2	3			
	Składnik	$\frac{\bar{b}}{x}$	$\frac{\bar{b}}{x}$	$\frac{\bar{b}}{x}$	$\frac{\bar{c}}{x}$	$\bar{s}$	$\frac{\bar{b}}{x}$	$\frac{\bar{b}}{x}$	$\frac{\bar{b}}{x}$	$\frac{\bar{c}}{x}$	$\bar{s}$	
1	heksanal ^a	2,2	1,8	0,6	1,5	0,86	0,03	0,02	0,01	0,02	0,01	3,027
3	heptanal ^a	0,1	0,1	0,04	0,1	0,02	0,01	0,02	0,01	0,01	0,01	3,983
4	tricyklen	0,1	0,1	0,1	0,1	0,03	0,2	0,1	0,1	0,1	0,05	0,887
6	α -pinen	47,2	41,6	44,0	44,3	2,82	65,7	51,6	53,6	57,0	7,62	2,705
11	benzaldehyd	0,04	0,1	0,3	0,2	0,14	0,2	0,3	0,4	0,3	0,12	1,285
14	β -pinen	10,3	13,3	21,0	14,8	5,50	11,4	15,0	21,3	15,9	5,01	0,246
15	mircen	1,5	1,5	1,6	1,5	0,08	0,5	1,3	1,0	1,0	0,37	2,610
17	α -felandren	0,2	0,2	0,3	0,2	0,07	0,1	0,2	0,2	0,2	0,05	1,308
18	3-karen	0,04	0,1	1,2	0,4	0,65	0,1	0,1	1,8	0,6	0,96	0,309
19	α -terpinen	0,4	0,05	1,0	0,5	0,48	0,4	0,8	0,8	0,7	0,20	0,587
21	p-cymen ^a	0,3	0,3	0,5	0,4	0,13	0,6	0,9	0,8	0,8	0,16	3,133
22+23	β -felandren + limonen	8,5	9,4	11,4	9,8	1,49	4,8	8,7	8,0	7,2	2,06	1,768
27	γ -terpinen	0,3	0,2	0,1	0,2	0,13	0,1	0,5	0,1	0,2	0,25	0,069
31	terpinolen	0,4	0,4	0,6	0,5	0,12	0,3	0,01	0,4	0,2	0,21	1,706
33	nonanal ^a	0,2	0,3	0,2	0,2	0,06	0,1	0,1	0,04	0,1	0,01	4,374
49	dekanal ^a	0,1	0,1	0,1	0,1	0,02	0,03	0,1	0,04	0,05	0,02	2,899
51	eter metylowy tymolu	0,1	0,2	0,1	0,1	0,09	0,04	0,2	0,1	0,1	0,10	0,142
54	octan bornylu	0,4	0,6	0,6	0,6	0,14	0,3	0,5	0,4	0,4	0,13	1,494
63+64	α -longipinen + α -kubeben	0,2	0,4	0,3	0,3	0,08	0,2	0,3	0,3	0,3	0,05	0,744
68	longicyklen	0,2	0,1	0,1	0,2	0,05	0,1	0,1	0,1	0,1	0,02	1,643
69	izoleden	0,4	0,5	0,4	0,4	0,03	0,4	0,4	0,5	0,4	0,08	0,750
70	α -kopaen	0,2	0,3	0,1	0,2	0,08	0,2	0,3	0,1	0,2	0,10	0,195
71	daucen	0,1	0,01	0,1	0,1	0,07	0,1	0,2	0,1	0,1	0,04	0,944
77	β -longipinen	0,1	0,4	0,04	0,2	0,19	0,1	0,1	0,03	0,1	0,03	0,992
78	α -longifolen	1,2	2,4	1,9	1,8	0,58	1,5	1,6	1,6	1,6	0,05	0,786
82	α -cedren	1,4	0,1	0,04	0,5	0,78	0,1	0,05	0,03	0,1	0,03	0,975
83	β -cedren	0,1	0,4	0,07	0,2	0,18	0,04	0,2	0,1	0,1	0,11	0,571
84	β -kariofilen	0,1	0	0,1	0,1	0,08	0	0	0,1	0,02	0,04	1,262
85	β -gurjunen	0,4	0,1	0,2	0,3	0,15	0,3	0,1	0,1	0,2	0,10	0,861
86	γ -elemen	0,3	0,2	0,2	0,2	0,09	0,2	0,1	0,1	0,1	0,05	1,755
87	trans- α -bergamoten	0,2	0,1	0,01	0,1	0,07	0,1	0,05	0,01	0,04	0,03	0,778
89	(Z)- β -farnezen	2,2	0,3	0,4	1,0	1,03	0,7	0,2	0,3	0,4	0,28	0,917
97	germakren D ^a	6,0	5,2	3,7	5,0	1,20	2,1	2,7	1,8	2,2	0,46	3,710
99	ar-kurkumen	0,4	0,1	0,01	0,2	0,20	0,02	0,1	0,01	0,1	0,08	1,034
101	walencen	0,1	0,4	0,1	0,2	0,19	0,3	0,01	0,1	0,1	0,13	0,525
104	zingiberen	0,2	0,01	0,1	0,1	0,08	0,1	0,3	0,1	0,2	0,14	0,951
105	α -muurolen	0,5	0,6	0,01	0,4	0,30	0,1	0,6	0,01	0,2	0,31	0,455
107	(Z)- α -bisabolen	0,0	0,8	0,2	0,3	0,40	0,2	0,3	0,1	0,2	0,09	0,553
108	β -bisabolen	1,7	1,9	0,4	1,3	0,81	0,9	0,01	0,3	0,4	0,43	1,739
112	(Z)- γ -bisabolen	1,1	0,1	0,1	0,4	0,62	0,7	1,2	0,0	0,7	0,61	0,463
113	δ -kadenin	0,1	3,0	0,4	1,2	1,57	0,1	0,1	0,4	0,2	0,18	1,076
114	β -seskwifelandren	0,8	0	0,1	0,3	0,47	0,7	0	0,02	0,3	0,41	0,121
116	(E)- γ -bisabolen	0,3	0,2	0,1	0,2	0,11	0,1	2,1	0,1	0,8	1,16	0,894
117	α -kadenin	0,1	0,3	0,1	0,1	0,14	0,04	0,1	0,05	0,1	0,03	0,972
118	selina-3,7(11)-dien	0,1	0,2	0,1	0,1	0,04	0,1	0,2	0	0,1	0,11	0,590
121	germakren B ^a	2,2	1,8	1,8	1,9	0,22	1,0	0,9	1,0	1,0	0,04	7,499

a składniki dla których zawartości w bielu i twardzieli różnią się istotnie, czyli wartość obliczona |t|^e jest większa od 2,776 (wartości odczytanej ze statystyki t-Studenta dla $\alpha=0,05$ i 4 stopni swobody)

b średnia z trzech powtórzeń

c średnia z trzech drzew

d odchylenie standardowe średniej z trzech drzew

e wartość bezwzględna t, obliczona według wzoru (z Części eksperymentalnej 3.1.17)

Poza monoterpunami oznaczyłam w drewnie modrzewia również trudniej lotne składniki – 46 seskwiterpenów, stanowiących 12-22% i 8-14% ogólnej sumy związków wyizolowanych odpowiednio z bielu i twardzieli tego gatunku. W grupie tej węglowodory stanowiły 37 związków, a ich tlenowe pochodne 9. Głównymi składnikami frakcji seskwiterpenowej były: germakren D (1,8-6,0%), α -longifolen (1,2-2,4%), germakren B (0,9-2,2%) i β -bisabolen (do 1,9%). Skład jakościowy i ilościowy grupy seskwiterpenów był podobny w warstwie zewnętrznej i wewnętrznej modrzewia. Tylko jeden mikroskładnik wyróżniał twardziel od bielu. Był nim α -kalakoren, który zidentyfikowałam jedynie w twardzieli drzew. Przeprowadzenie testu istotności różnicy dwóch średnich potwierdziło podobieństwo w zawartości seskwiterpenów w warstwach drewna. Spośród badanych seskwiterpenów germakren D i B występowały w istotnie większej zawartości w bielu niż twardzieli modrzewia.

Cechą charakterystyczną oznaczanego metodą SPME składu lotnej frakcji drewna trzech badanych drzew iglastych była niska zawartość trudnolotnych diterpenów. Również w modrzewiu związki te stanowiły zaledwie do 0,2% wydzielonych składników obu warstw drewna. W grupie sześciu zidentyfikowanych diterpenów, 4 to węglowodory diterpenowe, a 2 to ich tlenowe pochodne. Manol oznaczyłam jako główny składnik z tej grupy (do 0,2%), pozostałe występowały w śladowych ilościach.

Zidentyfikwane składniki nieterpenowe miały niewielki udział w sumie związków wydzielonych z drewna modrzewiowego. W porównaniu jednak z liczbą i ilością nieterpenowych związków drewna świerka i sosny, związki te występowały najliczniej (do 9) właśnie w modrzewiu, w ilości do około 4%. W grupie tej dominowały aldehydy o indeksach retencji od 800 do około 1800 (heksanal, heptanal, benzaldehyd, (E)-2-oktenal, nonanal, dekanal, (E,E) i (E,Z)-2,4-dekadienal i heksadekanal). Zidentyfikowałam ponadto alkany (tetradekan, heptadekan, dokoza) oraz śladowe ilości tylko jednego kwasu: heksadekanowego i jego estru izopropylowego, co odróżniało drewno modrzewia od drewna świerka i sosny. Wszystkie związki o nieterpenowej budowie wykryłam zarówno w bielu, jak i twardzieli. Wyjątek stanowiły (E,E) i (E,Z)-2,4-dekadienal oraz heksadekanal, występujące tylko w bielu modrzewia. Tak więc skład jakościowy związków o nieterpenowej strukturze jest podobny, większe różnice występują w składzie ilościowym tych związków. Zawartość czterech spośród sześciu ocenianych metodą statystyczną aldehydów (heksanal, heptanal, nonanal, i dekanat, Tabela 18) była istotnie wyższa w bielu niż w twardzieli.

4.4.4. Porównanie składników lotnych drewna świerka, sosny i modrzewia

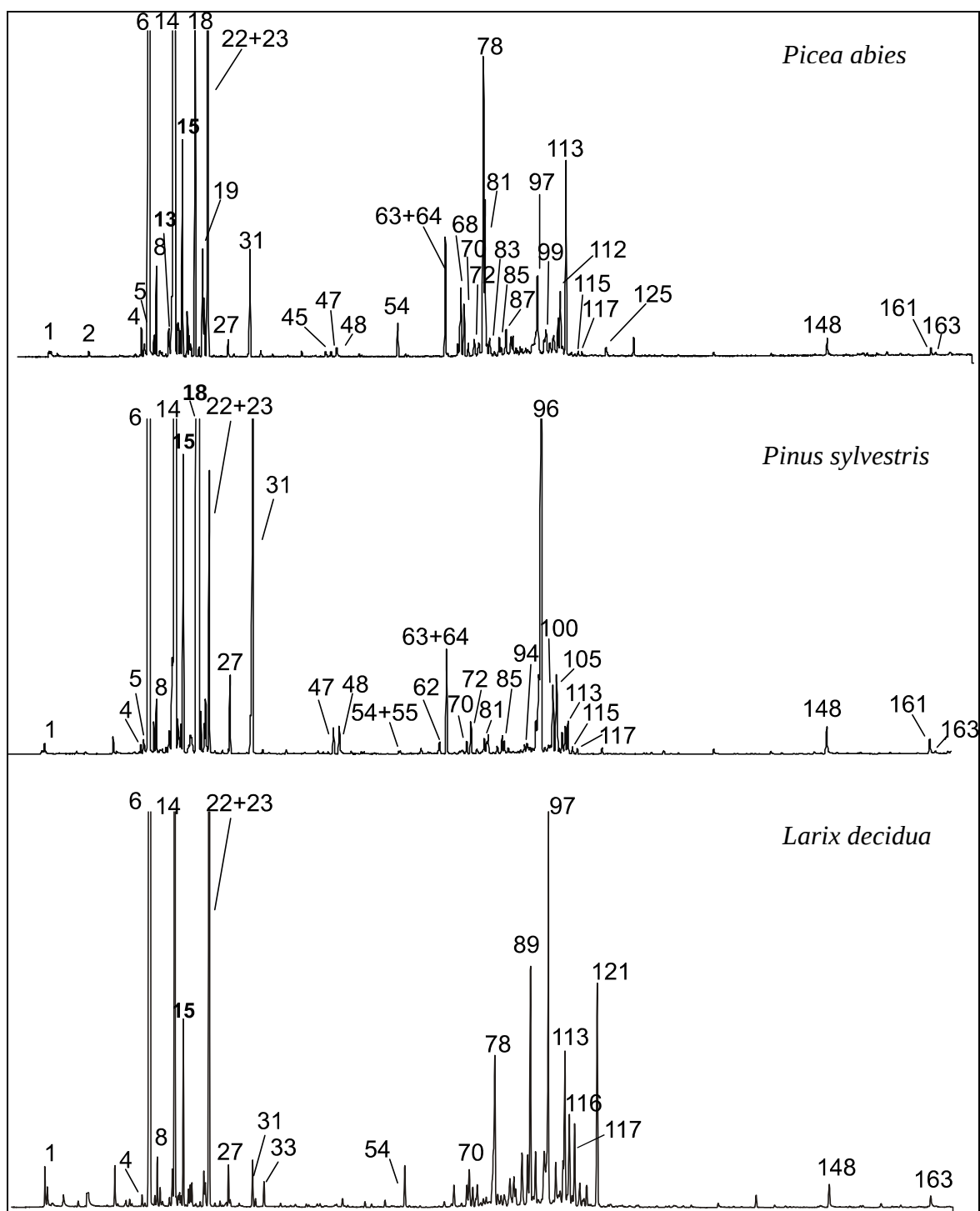
Celem tej części pracy było uzyskanie szczegółowej wiedzy na temat składu lotnych związków przemysłowo wartościowych drzew: świerka pospolitego, sosny zwyczajnej i modrzewia europejskiego. Głównymi składnikami obu warstw drewna każdego z gatunków były te same węglowodory monoterpenowe: α -pinen, β -pinen, 3-karen, mircen, β -felandren i limonen, ale ich proporcje w każdym z gatunków były inne. Dla zilustrowania tych różnic na Rysunku 30 zamieściłam chromatogramy związków lotnych bielu świerka, sosny i modrzewia, a w Tabeli 19 zestawiałam średnie zawartości głównych składników, których udział w lotnej frakcji przynajmniej jednego drzewa wynosił 0,3% lub więcej.

Każdy z trzech egzemplarzy danego gatunku pozyskiwałam do badań z tego samego miejsca. Obserwowałam czasami dość znaczne różnice w zawartości niektórych składników między drzewami każdego z gatunków. Różnice w obrębie jednego gatunku mogły być spowodowane uwarunkowaniami genetycznymi drzew, zróżnicowanym ich wiekiem (dla świerka lub sosny) oraz warunkami rozwoju [Berta i in., 1997; Zini i in., 2002]. Różnice w składzie związków lotnych bielu i twardego każdego z gatunków były nieznaczne. Występowały natomiast zasadnicze różnice między gatunkami.

Monoterpeny

Główne związki lotne wydzielone z drewna badanych drzew iglastych metodą SPME to węglowodory monoterpenowe. Składniki monoterpenowe stanowiły w poszczególnych egzemplarzach drewna drzew odpowiednio: w świerku 64-86% (biel) i 78-85% (twardziel); w sosnie 89-90% (biel) i 94-98% (twardziel); w modrzewiu 71-84% (biel) i 81-90% (twardziel). wszystkich weluowanych związków (Tabela 19)

α -Pinen, β -pinen oraz β -felandren z limonenem były głównymi składnikami lotnymi drewna świerka i modrzewia, natomiast 3-karen i α -pinen drewna sosny. Uzyskane rezultaty są zgodne z wcześniejszymi danymi dotyczącymi składu związków w fazie nadpowierzchniowej drewna [Boscherini i Michelozz, 1993] lub igieł świerka [Isidorov i in., 2003] oraz drewna [Bengtsson i Sanati, 2004; Manninen i in. 2002], nasion [Tammela i in., 2003] lub igieł sosny [Pohjola i in., 1989; Vuorela i in., 1989]. Modrzew nie był badany tą metodą. Wymienione związki były również głównymi składnikami olejków i ekstraktów z różnych części świerka, sosny i modrzewia, co zostało przedstawione w części literaturowej pracy.



Rysunek 30. Chromatogram gazowy związków lotnych wydzielonych z bielu *Picea abies* 1, *Pinus sylvestris* 1 i *Larix decidua* 1 metodą HS-SPME

Tabela 19. Główne składniki bielu i twardzieli świerka pospolitego, sosny zwyczajnej i modrzewia europejskiego

Numer Składnik piku		Świerk pospolity		Sosna zwyczajna		Modrzew europejski	
		Biel	Twardziel	Biel	Twardziel	Biel	Twardziel
		Zawartość [%]					
6	α-pinen	42,3	47,7	36,2	37,6	44,3	57,0
8	kamfen	0,7	1,2	0,2	0,3	0,3	0,4
13	sabinen	0,6	0,1	0,8	0,3		
14	β-pinen	16,6	8,4	6,7	2,7	14,8	15,9
15	mircena	2,5	0,1	1,9	0,5	1,5	1,0
17	α-felandren	0,2	0,1	0,3	0,1	0,2	0,2
18	3-karen	2,8	4,2	36,5	44,8	0,4	0,6
19	α-terpinen	0,4	0,2	0,2	0,2	0,5	0,7
21	p-cymen	0,5	1,5	0,5	0,8	0,4	0,8
22+23	β-felandren + limonen	7,0	9,5	2,2	2,4	9,8	7,2
27	γ-terpinen	0,3	0,1	0,4	0,3	0,2	0,2
31	terpinolen	1,0	1,5	4,4	3,1	0,5	0,2
47	α-terpineol	0,3	0,6	0,1	0,2		0,1
48	estragol	0,4	1,8	0,2	0,3	0,03	0,1
49	dekanal	0,4	0,5	0,3	0,2	0,1	0,10
54	octan bornylu	0,8	0,1			0,6	0,4
63+64	α-longipinen+α-kubeben	1,3	1,4	tr	0,3	0,3	0,3
68	longicyklen	0,7	0,2			0,2	0,1
70	α-kopaen	0,3	0,4	tr	0,3	0,2	0,2
78	α-longifolen	1,9	2,6	0,1	0,03	1,8	1,6
81	izokariofilen	2,2	3,4				
82	α-cedren	1,0	0,2			0,5	0,1
83	β-cedren	0,3	0,4			0,2	0,1
85	β-gurjunen	0,1	0,2	tr	0,1	0,3	0,2
89	(Z)-β-farnezen	0,2	0,2			1,0	0,4
96	γ-muurolen	0,4	0,5	1,4	0,3		
97	germakren D	7,6	0,8	0,1	tr	5,0	2,2
99	ar -kurkumen	0,4	0,6			0,2	0,1
105	α-muurolen	0,2	0,30	0,2	0,7	0,4	0,2
108	β-bisabolen	0,2	0,1			1,3	0,4
112	(Z)-γ-bisabolen	0,4	0,5			0,4	0,7
113	δ-kadinen	1,5	1,5	0,1	0,4	1,2	0,2
121	germakren B	tr	tr			1,9	1,0
monoterpeny		73,8	81,1	92,1	94,9	76,2	82,5
seskwiterpeny		21,9	15,8	4,9	2,9	16,7	11,2
diterpeny		0,7	1,2	0,5	0,3	0,1	0,1
inne		0,6	0,6	0,5	0,4	2,4	2,3
suma zidentyfikowanych		97,0	98,3	98,0	98,5	95,4	96,1

tr <0,05%

Badania związków lotnych igieł różnych populacji sosny zwyczajnej pozwoliły wyodrębnić dwa chemotypy: o wysokiej i niskiej zawartości 3-karenu [Orav i in., 1996; Pohjola i in., 1989; Tammela i in., 2003]. Egzemplarze sosny, które badałam należały do chemotypu o wysokiej zawartości 3-karenu, podobnie jak badana wcześniej sosna z Finlandii [Pohjola i in., 1989; Tammela i in., 2003] i Estonii [Orav i in., 1996].

Wiele ze zidentyfikowanych w moich badaniach składników to typowe składniki świerka, sosny i modrzewia: santen (2), tricyklen (4), α -pinen (6), kamfen (8), sabinen (13), β -pinen (14), mircen (15), α -felandren (17), 3-karen (18), p-cymen (21), β -felandren (22), limonen (23), 1,8-cyneol (24), (Z)- i (E)- β -ocymen (25 i 26), γ -terpinen (27), terpinolen (31), *cis*- i *trans*-werbenol (38 i 41), borneol (44), terpinen-4-ol (45), α -terpineol (47), werbenon (50), octan bornylu (54). Były one wcześniej zidentyfikowane jako składniki ekstraktów z drewna pnia lub drewna gałązek drzew tych trzech gatunków [Back i Allen 2000; Englund i Nussbaum, 2000; Fuksman, 1990; Lawrence, 2003, 1991, 2001; Manninen i in., 2002; Martin i in., 2002; Staccidi i in., 1999]. Niektóre monoterpenoidy oznaczone w drewnie drzew: fenzen, fenchol, α -kamfolenal i eter metylowy tymolu były zidentyfikowane w korze świerka [Heemann i Francke, 1977], w różnych częściach sosny [Marchioni i in., 2003] lub gałązkach różnych gatunków modrzewia [Kurowska i Kalembe, 1998, 1999]. Werbenol (*cis* i *trans*)– wabik seksualny [Lindmark-Henriksson, 2003], zidentyfikowałam w drewnie świerka oraz sosny, nie wykryłam natomiast tego związku w drewnie modrzewia.

Większość związków zidentyfikowanych w badanym drewnie świerka była już wcześniej wykryta w różnych częściach drzew gatunku *P. abies*. Natomiast składniki takie jak: α -tujen, tuja-2,4(10)-dien, benzaldehyd, p-menta-1,3,8-trien i wodzian sabinenu, występujące najczęściej w ilościach śladowych, zidentyfikowałam w drewnie świerka po raz pierwszy.

Zidentyfikowane składniki drewna sosny, w dużej mierze były już wykryte wcześniej w igłach tego gatunku [Lawrence, 2003, 1991, 2001; Góra i Lis, 2005]. Zidentyfikowałam jednakże kilka nowych monoterpenów: tuja-2,4(10)-dien (9), werbenen (12), p-cymenen (32), p-menta-1,3,8-trien (34), m-cymen-8-ol (46), octan *trans*-werbenylu (57). Składniki te stanowiły w sumie mniej niż 0,4% składników wydzielonych metodą SPME.

Jako nowe składniki modrzewia zidentyfikowałam: (Z)- β -ocymen (25), *trans*-sabinol (39) i eter metylowy tymolu (51) stanowiące 0,3%. Pozostałe wykryte monoterpeny drewna modrzewiowego były zidentyfikowane wcześniej w innych częściach tego drzewa [Holm i Hiltunen, 1997; Kubeczka i Schultze, 1987; Kurowska i Kalembe, 1999].

Związki wymienione jako nowo zidentyfikowane składniki drewna badanych gatunków świerka, sosny i modrzewia, były wykryte w innych gatunkach sosny i modrzewia [Kurowska i Kalembe, 1998; Lawrence, 2001; Marchioni i in., 2003; Mumm i in., 2004; Ucar i in., 2003].

Wszystkie główne monoterpeny występowały w obu warstwach drewna i ich średnie zawartości w biele i twardzieli każdego gatunku były podobne, z wyjątkiem β -pinenu, którego zawartość w biele świerka i sosny (odpowiednio 16,6% i 6,7%) była około

dwukrotnie wyższa niż w twarzieli (8,4% i 2,7%). Nieliczne były związki, których udział w obu warstwach drewna różnił się istotnie. W drewnie świerka były to: p-cymen i terpinen-4-ol, w drewnie sosny: 3-karen, mircen i sabinen, a modrzewia p-cymen.

Seskwiterpeny

Węglowodory seskwiterpenowe i ich tlenowe pochodne stanowiły drugą co do zawartości grupę związków wyeluowanych z drewna badanych drzew metodą HS-SPME. Ich zawartość wynosiła odpowiednio: w drewnie świerka 12-34% (biel) i 12-19% (twardziel); sosny 2-8% (biel) i 1-4% (twardziel); modrzewia 12-22% (biel) i 8-14% (twardziel) (Tabela 19). Najwyższy był udział seskwiterpenów we frakcji lotnej drewna świerkowego, a najniższy w drewnie sosny.

Niewiele publikacji opisuje związki seskwiterpenowe drewna świerka, sosny i modrzewia. Główne składniki z tej grupy, które oznaczyłam w drewnie świerka: α -longifolen (78), izokariofilen (81) i δ -kadinen (113), były wcześniej zidentyfikowane jako główne seskwiterpeny tego surowca [Kimland i Norin, 1972; Lindmark-Henriksson, 2003; Martin i in., 2002]. Wśród zidentyfikowanych seskwiterpenów drewna świerka składniki takie jak: α -longipinen, cyklosatiwen, longicyklen, ylangen, α -kopaen, α -longifolen, β -kariofilen, α -cedren, β -farnezen, α -, γ -muurolen, α -selinen, α -, δ -, γ -kadinen, germakren B i D, (E)-nerolidol, α -kadinol były wcześniej zidentyfikowane nie tylko w drewnie, ale i igłach i korze tego gatunku [Back i Allen, 2000; Boscherini i Michelozz, 1993; Fuksman, 1990; Heemann i Francke i in., 1977; Lindmark-Henriksson, 2003; Lorber i Zelman, 1988; Manninen i in., 2002; Martin i in., 2002; Orav i in., 1998; Staccidi i in., 1999]. Pozostałe oznaczone seskwiterpeny są nowo zidentyfikowanymi związkami drewna świerka, aczkolwiek były oznaczone w innych gatunkach drzew iglastych [Lawrence, 2001; Macchioni i in., 2003; Ucar i in., 2003].

Dominującymi seskwiterpenami badanego drewna sosny były izomeryczne muuroleny i kadeniny, co jest zgodne z danymi literaturowymi [Lawrence, 2003, 2001, 1991; Westfelt, 1966a; b; c]. α -, γ -, ϵ -Muurolen są głównymi seskwiterpenami drewna sosny i jednocześnie siarkowej terpentyny pozyskiwanej z tego surowca [Back i Allen, 2000]. Zidentyfikowałam α - i γ -muurolen (105 i 96) w ilościach odpowiednio do 1,2% i 4,0%. Wcześniejsze badania pokazały, iż główne seskwiterpeny sosny można podzielić na dwie grupy: pierwsza zawiera związki o szkieletie kadinanu, drugą stanowi longifolen i składniki pokrewne [Westfelt, 1966a; b; c]. Drewno sosny wyróżnia od drewna świerka i modrzewia niewielka zawartość longifolenu (78, 0-0,3% wobec 1,2-3%). Składnik ten został zidentyfikowany jako

dominujący seskwiterpen tylko w bielu sosny [Bengtsson i Sanati, 2004], według moich badań występuje on jednak w obu warstwach drewna tego gatunku, ale w mniejszej zawartości. Z kolei α -muurolen oznaczony w większej ilości w twardzieli sosny, został wcześniej opisany jako charakterystyczny dla tej warstwy drewna [Bengtsson i Sanati, 2004].

Głównymi seskwiterpenami zidentyfikowanymi w drewnie modrzewia były: germakren D (97) oraz – tak jak w przypadku świerka – α -longifolen (78) i δ -kadinen (113). Składniki te były już wcześniej zidentyfikowane w gałązkach modrzewia [Holm i Hiltunen, 1997; Kurowska i Kalembe, 1999].

Ilościowy i jakościowy skład seskwiterpenów drewna świerka, sosny i modrzewia jest zbliżony. Jedynie germakren D oznaczyłam w bielu jednego z badanych egzemplarzy świerka w ilości 15%, podczas gdy w pozostałych dwóch drzewach tego gatunku składnik ten zidentyfikowałam w ilości 0-2,2%. Tak duża zawartość germakrenu w jednym ze świerków mogła być spowodowana m.in. reakcją drzewa na jego zranienie lub atak insektów [Lindmark-Henriksson, 2003]. Skład jakościowy seskwiterpenów różnych warstw drewna w obrębie każdego z gatunków był zbliżony. Różnice dotyczyły obecności α -selinenu (103) i (E)-nerolidolu (123) tylko w świerku tylko w bielu, δ -elemenu (60) obecnego w sośnie tylko w bielu oraz oznaczonych tylko w bielu modrzewia 1,10-di-epi kubenolu (128) i kubenolu (131) i w twardzieli α -kalakorenu (119).

Skład ilościowy frakcji seskwiterpenów bielu i twardzieli świerka i sosny był bardzo podobny: zawartość żadnego ze składników nie różniła się istotnie. Natomiast w przypadku drewna modrzewiowego różnice w składzie ilościowym seskwiterpenów były większe. Dwa z głównych seskwiterpenów: germakren D i B (97 i 121) występowały w dwukrotnie większej ilości w bielu niż w twardzieli drzew gatunku *Larix*.

Diterpeny

Metodą HS-SPME wyizolowałam i zidentyfikowałam niewielkie ilości składników diterpenowych, które w każdym z badanych trzech gatunkach drzew iglastych stanowiły poniżej 1% (Tabela 19). Składniki diterpenowe wykryłam najliczniej w drewnie świerka. Były to między innymi izomery cembrenu (142, 144), palustradien (151), abietatrien (154). Związki te nie były dotychczas opisane jako składniki drewna świerka, zostały jednak oznaczone w innych gatunkach drzew iglastych [Macchioni i in., 2003; Ucar i in., 2003]. *cis*-Abienol (161) i tlenek manoilu (150) zidentyfikowałam w drewnie świerka i sosny, zaś tunbergol (155) w drewnie świerka i modrzewia. Trzy ostatnie związki były głównymi składnikami świerkowej oleożywicy [Back i Allen, 2000; Norin i Winell, 1972], a *cis*-abienol

i tunbergol były oznaczone jako główne składniki frakcji wolnych diterpenowych alkoholi w oleju z bielu i z twardzieli *Picea orientalis* [Ucar i in., 1972]. Spośród innych bicyklicznych diterpenowych alkoholi o szkielecie labdanu zidentyfikowanych w ekstrakcie z gałązek i kory świerka pospolitego [Staccidi i in., 1999], zidentyfikowałam w tym gatunku jedynie śladową zawartość δ -13-*trans*-neoabienolu (158), a spośród aldehydów tylko pimaral (160). Pimaral był wykryty wcześniej metodą SPME, również jako jedyny aldehyd diterpenowy, w bielu i twardzieli *P. sylvestris* [Bengtsson i Sanami, 2004], aczkolwiek w ekstraktach z sosny i świerka występują liczne związki z tej grupy.

Inne składniki

W drewnie wszystkich ocenianych gatunków zidentyfikowałam metodą SPME również składniki należące do innych niż terpeny grup związków, a mianowicie: aldehydów, alkanów, aromatycznych alkoholi i eterów, kwasów tłuszczowych i ich estrów.

Najliczniejszą grupą składników o największym udziale były aldehydy alifatyczne. Szczególnie drewno modrzewia miało wysoką zawartość tych związków we frakcji lotnej (do 4%), podczas gdy dla świerka i sosny było to poniżej 1%. Obecność aldehydów można wyjaśnić tym, iż powstają one z rozpadu nienasyconych kwasów tłuszczowych. Aldehydy te zidentyfikowano wcześniej w TMP-terpentynie [Lindmark-Henriksson, 2003]. Związki, które zidentyfikowałam jako nowe w drewnie świerka i sosny to: benzaldehyd (11), estragol (48) i 3,4-dimetoksytoluen (52). Stanowiły one mniej niż 0,5% wszystkich wydzielonych metodą SPME składników.

W drewnie badanych drzew zidentyfikowałam też kwasy tłuszczowe i ich estry. Związki te opisano wcześniej jako składniki żywicy i terpentyny pozyskiwanej z drewna świerków [Lindmark-Henriksson, 2003; Lorbeer i Zelman, 1988; Staccidi i in., 1999] oraz w ekstraktach z drewna świerka, sosny [Back i Allen, 2000; Norin i Winell, 1972] i innych drzew iglastych [Macchioni i in., 2003; Mumm i in., 2004; Roussis i in., 1995; Ucar i in., 2003].

4.5. Składniki lotne drewna drzew iglastych – podsumowanie i wnioski

Podsumowując przeprowadzone metodą SPME badania składu drewna gatunków *P. abies*, *P. sylvestris* i *L. decidua* stwierdzam że:

- Wykorzystując technikę HS-SPME zidentyfikowałam we frakcji lotnej bielu i twardzieli każdego z gatunków po około 100 składników, stanowiących w świerku i sosnie 96-99%, a w modrzewiu 94-98% wyizolowanych związków.
- W badanych gatunkach zidentyfikowałam łącznie ponad 160 związków.
- Skład jakościowy i ilościowy frakcji lotnej był specyficzny dla drewna danego gatunku drzewa.
- Drewno sosny zwyczajnej, której olejki eteryczne wyróżniają się spośród drzew iglastych wysoką zawartością seskwiterpenów (około 15%), charakteryzowały się niską zawartością tej grupy związków (do 5%). Odwrotnie drewno świerka: oznaczona zawartość seskwiterpenów była znacznie wyższa (do 22%) niż podawana dla cetyny i igieł świerka (do 5%), ale też wyższa od oznaczonej wcześniej dla drewna.
- Badana sosna zwyczajna należała do chemotypu o wysokiej zawartości 3-karenu.

Wnioski

- Metoda mikroekstrakcji do fazy stałej z fazy nadpowierzchniowej (HS-SPME) w połączeniu z GC i GC-MS okazała się efektywną metodą oznaczania składników lotnych warstw drewna świerka, sosny i modrzewia.

5. BADANIA WŁASNE – NASIONA ROŚLIN RODZAJU CZARNUSZKA

5.1. Zakres badań

Zakres badań roślin gatunku czarnuszka obejmował porównanie wydajności i składu lotnych związków nasion: czarnuszki siewnej (*Nigella sativa* L.), czarnuszki damasceńskiej (*Nigella damascena* L.) i czarnuszki orientalnej (*Nigella orientalis* L.), wydzielonych następującymi metodami:

- destylacja z parą wodną (HD) i destylacja z parą wodną-ekstrakcja (SDE): olejek eteryczny (OE)
- destylacja z parą wodną konkretów (E_x/HD): olejek lotny (OL); „x” oznacza symbol rozpuszczalnika użytego do ekstrakcji
- mikroekstrakcja do fazy stałej z fazy nadpowierzchniowej (HS-SPME).

Dodatkowo nasiona *N. sativa* poddałam:

- analizie fazy nadpowierzchniowej metodą dynamiczną (DHS)
- ekstrakcji nadkrytycznej ditlenkiem węgla (SFE): olejek lotny (OL).

Zakres tej części pracy obejmował też określenie aktywności przeciwdrobnoustrojowej olejków z nasion czarnuszki siewnej i damasceńskiej.

Badania roślin rodzaju czarnuszka przeprowadziłam w Instytucie Podstaw Chemii Żywności Politechniki Łódzkiej.

Czarnuszka siewna

5.2. Materiał

Materiał do badań stanowiły nasiona czarnuszki siewnej zakupione lub otrzymane od czterech polskich firm konfekcjonujących zioła (pochodzenie deklarowane przez producentów):

- Zakład Zielarski Kawon, Gostyń (pochodzenie nasion: Wielkopolska): lata 2000-2005
- Herbador, Bydgoszcz (pochodzenie nasion: Lubelszczyzna): 2001 r.
- Firma Zielarska – Lewandowski, Kruszyn (pochodzenie nasion: Kujawy): 2001 i 2005 r.
- Flos – Zakład Konfekcjonowania Ziół, Mokrsko (pochodzenie nasion: Kujawy): 2001 r.

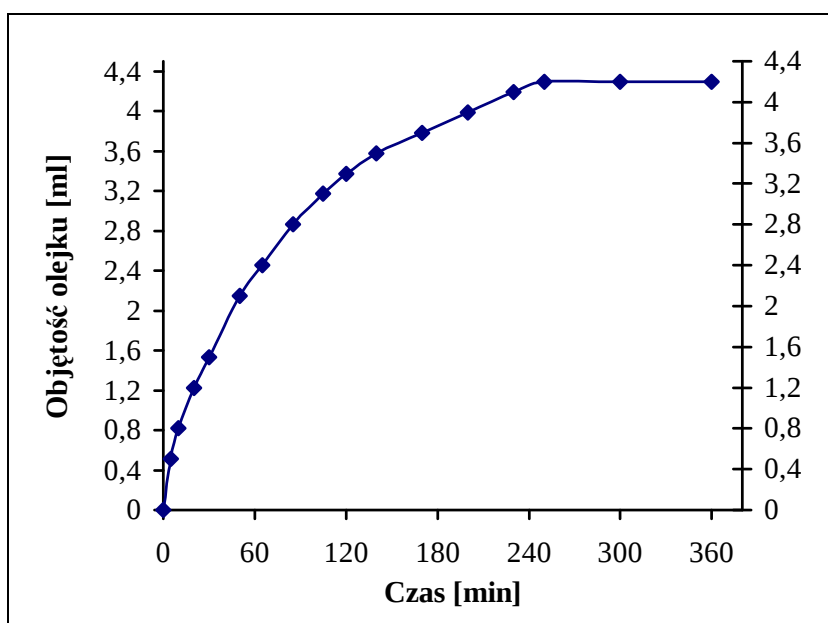
Analizowałam również olejek eteryczny i lotny otrzymane z nasion *N. sativa* uprawianej w północnej Bułgarii (okolice Shumen).

5.3. Wydzielanie składników lotnych nasion czarnuszki siewnej

5.3.1. Destylacja z parą wodną

5.3.1.1. Otrzymanie i charakterystyka olejku eterycznego czarnuszki siewnej

Czas destylacji z parą wodną nasion czarnuszki siewnej ustaliłam obserwując przyrost objętości wydzielonego olejku eterycznego w czasie destylacji zmielonych nasion o masie 250 g. Od czwartej godziny destylacji objętość fazy organicznej nie zwiększała się (Rysunek 31), zatem czas 4 godz. przyjąłam za właściwy do pozyskiwania olejku eterycznego. Mieszanina nasion i wody bardzo się pieniała i dlatego destylację olejku prowadziłam z dodatkiem silikonowego środka antypieniającego.



Rysunek 31. Zmiany objętości olejku w czasie destylacji z parą wodną nasion *Nigella sativa*

Olejek eteryczny z nasion czarnuszki siewnej był żółtą cieczą o zapachu intensywnym, aromatycznym, ziołowym. Jego właściwości fizykochemiczne, zbliżone do danych literaturowych [El Alf, 1975], były następujące:

gęstość $d_{20} = 0,8922$ g/ml

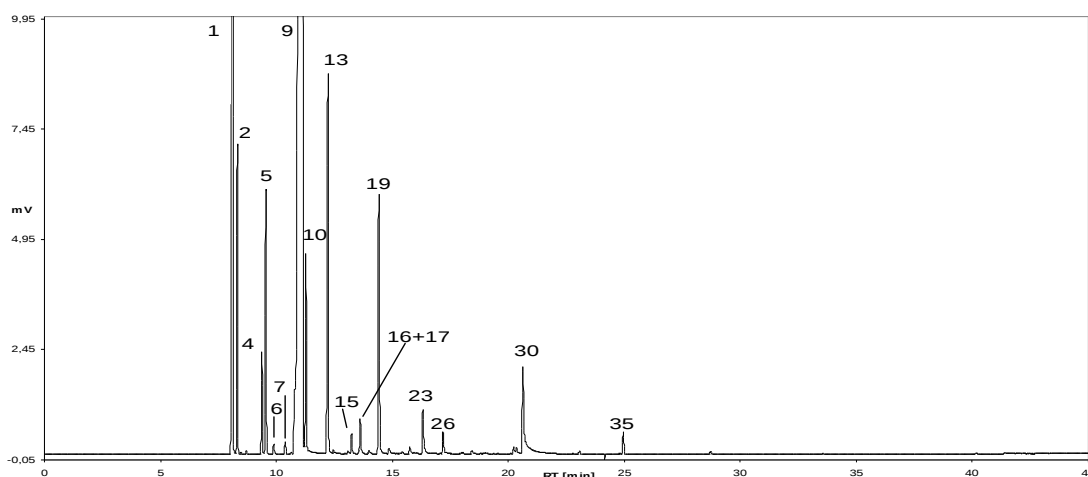
współczynnik refrakcji $n_D^{20} = 1,4812$

skręcalność optyczna $\alpha_D^{25} = +2,230$.

Olejki lotne pozyskiwane metodą destylacji z parą wodną konkretnie, na skutek wyższej zawartości tymochinonu, niż w olejku eterycznym, charakteryzowały się ciemnożółtą barwą. Ich zapach był intensywny, ziołowy z nutą drzewną.

5.3.1.2. Składniki olejku eterycznego czarnuszki siewnej

Do identyfikacji składników i określenia właściwości przeciwbakteryjnych i przeciwgrzybowych użyłam olejku eterycznego pozyskanego z nasion *N. sativa* (Wielkopolska, 2001). Olejek wydzieliłam metodą destylacji z parą wodną w aparacie Derynga z wydajnością 1,7%. Na podstawie analizy GC i GC-MS olejku zidentyfikowałam w nim ponad 30 składników, jako główne monoterpény, m. in.: p-cymen, α -tujen, γ -terpinen. W celu identyfikacji mikroskładników, a także potwierdzenia obecności głównych składników metodą $^1\text{H-NMR}$, poddałam olejek destylacji frakcjonowanej pod zmniejszonym ciśnieniem, a następnie wielokrotnej chromatografii faszowej (Rysunek 17 w Części eksperymentalnej).



Rysunek 32. Chromatogram gazowy olejku eterycznego z nasion *Nigella sativa* (Wielkopolska, 2001) (kolumna CP Sil 5)

Skład olejku z nasion *N. sativa* zamieściłam w Tabeli 20, w której kolejność wymienianych związków jest zgodna z ich czasami retencji na kolumnie CP Sil 5. Rysunek 32 przedstawia chromatogram gazowy olejku, numery składników olejku są zgodne z numeracją w Tabeli 20 oraz innych tabelach przedstawiających składniki lotne nasion czarnuszki siewnej.

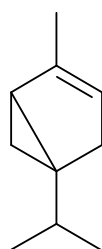
W olejku eterycznym z nasion czarnuszki siewnej zidentyfikowałam 50 składników stanowiących 98,7% olejku. Głównym był p-cymen stanowiący 60,2% oraz inne węglowodory monoterpénowe: γ -terpinen (12,9%), α -tujen (7,2%), β -pinen (2,1%), α -pinen (2,0%). Do grupy głównych składników należały też dwie tlenowe pochodne monoterpénów: karwakrol (3,0%) oraz związek zidentyfikowany po raz pierwszy w nasionach *N. sativa* – eter metylowy *cis*-tujan-4-olu, czyli eter metylowy *cis*-hydratu sabinenu (4,0%).

Tabela 20. Skład olejku eterycznego z nasion *Nigella sativa* (Wielkopolska, 2001, CP Sil 5)

Nr	Składnik	RI _{eksp.}	RI _{lit.}	[%]	Metoda identyfikacji
1	α-tujen	914	926	7,2	MS, RI, ¹ H-MNR
2	α-pinen	921	935	2,0	MS, RI
3	kamfen	934	950	tr	MS, RI
4	sabinen	960	970	0,8	MS, RI
5	β-pinen	964	974	2,1	MS, RI
6	β-mircen	978	983	0,4	MS, RI
7	α-felandren	1000	998	0,2	MS, RI
8	α-terpinen	1022	1013	tr	MS, RI
9	p-cymen	1022	1016	60,2	MS, RI, ¹ H-MNR
10	limonen	1025	1025	1,3	MS, RI
11	(Z)-β-ocymen*	1026	1025	tr	MS, RI
12	(E)-β-ocymen*	1040	1041	tr	MS, RI
13	γ-terpinen	1051	1055	12,9	MS, RI, ¹ H-MNR
14	<i>trans</i> -tujan-4-ol	1056	1060	tr	MS, RI
15	terpinolen*	1079	1081	0,6	MS, RI
16	<i>cis</i> -tujan-4-ol	1088	1087	} 0,5	MS, RI, ¹ H-MNR
17	eter metylowy <i>trans</i> -tujan-4-olu*	1088	-		MS, RI, ¹ H-, ¹ H- ¹ H-, ¹³ C-MNR
18	β-tujon	1102	1101	tr	MS, RI
19	eter metylowy <i>cis</i>-tujan-4-olu*	1110	-	4,0	MS, RI, ¹ H-, ¹ H- ¹ H-, ¹³ C-MNR
20	kamfora	1125	1127	0,1	MS, RI
21	<i>trans</i> -werbenol	1135	1134	0,3	MS, RI
22	borneol	1149	1155	tr	MS, RI
23	terpinen-4-ol	1167	1168	0,9	MS, RI, ¹ H-NMR
24	α-terpineol	1181	1178	tr	MS, RI
25	<i>trans</i> -dihydrokarwon	1189	1182	0,7	MS, RI
26	karwon	1218	1209	0,2	MS, RI
27	tymochinon	1248	1249	tr	MS, RI, ¹ H-NMR
28	octan <i>cis</i> -chryzantenylu*	1250	1250	0,1	MS, RI
29	octan bornylu	1263	1273	0,1	MS, RI, ¹ H-NMR
30	tymol	1269	1273	tr	MS, RI
31	karwakrol	1277	1282	3,0	MS, RI, ¹ H-NMR
32	α-longipinen	1339	1355	0,1	MS, RI
33	cyklosatiwen*	1361	1378	tr	MS, RI
34	α-kopaen*	1366	1379	tr	MS, RI
35	longicyklen*	1387	1382	0,4	MS, RI
36	longifolen	1403	1407	tr	MS, RI, ¹ H-NMR
37	alloizolongifolen*	1392	1391	tr	MS, RI
38	β- <i>cis</i> -farnezen*	1442	1448	tr	MS, RI
39	tridekan-2-on	1473	1480	0,1	MS, RI
40	β-selinen	1479	1484	0,1	MS, RI
41	mirystycyna*	1494	1500	tr	MS, RI
42	β-bisabolen*	1500	1502	tr	MS, RI
43	γ-kadinen*	1507	1512	0,1	MS, RI
44	tymohydrochinon	1557	1553	tr	MS, RI
45	tlenek β-kariofilenu*	1573	1573	tr	MS, RI
46	apiol*	1666	1651	0,1	MS, RI
47	pentadekan-2-on*	1675	1683	tr	MS, RI
48	farnesal D (<i>cis</i> , <i>trans</i>)*	1720	1721	0,2	MS, RI
49	kwas mirystynowy	1752	1745	tr	MS, RI
50	kwas palmitynowy	1956	1942	tr	MS, RI
węglowodory monoterpeneowe				87,7	tr - <0,05% * - związek wykryty po raz pierwszy ** tujan-4-ol = hydrat sabinenu
tlenowe pochodne monoterpenu				9,9	
węglowodory seskwiterpenowe				0,7	
tlenowe pochodne seskwiterpenów				0,3	
związki nieterpeneowe				0,1	
suma zidentyfikowanych				98,7	

Węglowodory monoterpene

Węglowodory monoterpene były główną grupą składników olejku nasion *N. sativa* i stanowiły 87,7% olejku. Chromatografia faszowa frakcji 1.1 i 1.4 z rektyfikacji olejku pozwoliła na wydzielenie α -terpinenu, p-cymenu i γ -terpinenu w ilości i czystości umożliwiające ich analizę spektroskopową. Przesunięcia chemiczne charakterystyczne dla tych związków, zamieszczone na rysunkach, były zgodne z danymi wzorców zgromadzonymi w IPChŻ.

1,75 (dd, 3H, $J=1,7/3,5\text{Hz}$)

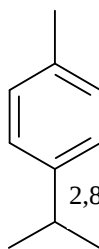
4,94 (s, 1H)

2,19 (m, 1H)

2,29 (m, 1H)

0,88 (d, 3H, $J=7,0\text{ Hz}$)0,93 (d, 3H, $J=7,0\text{ Hz}$) α -tujen

2,30 (s, 3H)

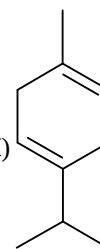


7,12 (s, 4H)

2,85 (spt, 1H, $J=6,8\text{Hz}$)1,23 (d, 6H, $J=6,8\text{ Hz}$)

p-cymen

1,65 (s, 3H)



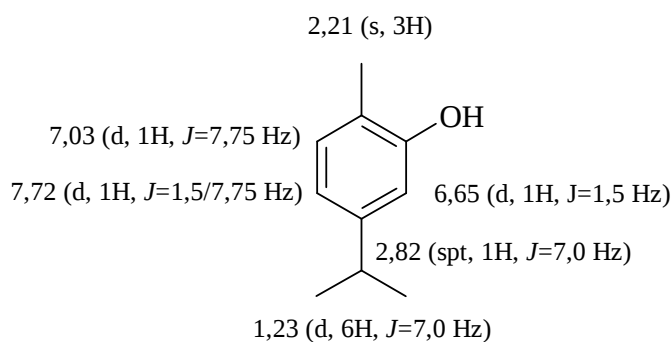
5,45 (m, 1H)

5,45 (m, 1H)

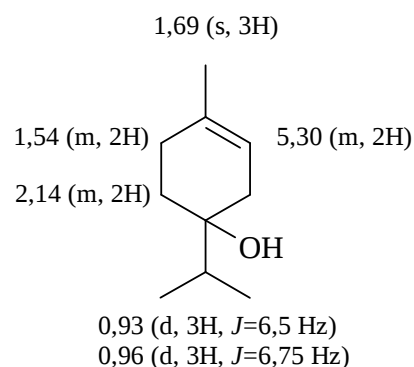
1,02 (d, 6H, $J=6,8\text{ Hz}$) γ -terpinen

Tlenowe pochodne monoterpenu

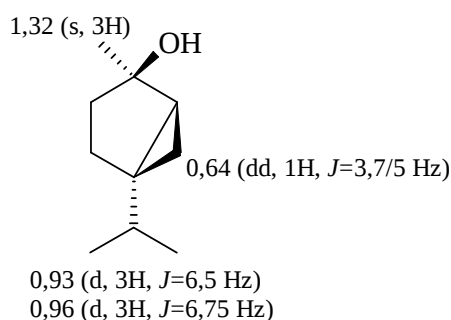
Liczną grupą składników (17 związków), stanowiącą 9,9% olejku, były tlenowe pochodne monoterpenu. W olejku zidentyfikowałam: *cis*-tujan-4-ol (nazwa zwyczajowa: *cis*-hydrat sabinenu), kamforę, *trans*-werbenol, terpinen-4-ol, dihydrokarwon, karwon, karwakrol, tymochinon i octan bornylu, w pogonie: *trans*-tujan-4-ol i tymohydrochinon, a we frakcjach po rozdziale pogonu: tymol (3,8% frakcji 2.6), α -terpineol (2,4% frakcji 2.12), i α -tujon (1,6% frakcji 5.7). Metodą chromatografii faszowej (FC) wydzieliłam siedem tlenowych pochodnych monoterpenu, których strukturę potwierdziłam metodą $^1\text{H-NMR}$. Przesunięcia chemiczne charakterystyczne dla tych związków, umożliwiające potwierdzenie ich obecności, uprzednio ustalonej na podstawie widm MS i indeksów retencji, były zgodne z danymi wzorców zgromadzonymi w IPChŻ.



karwakrol

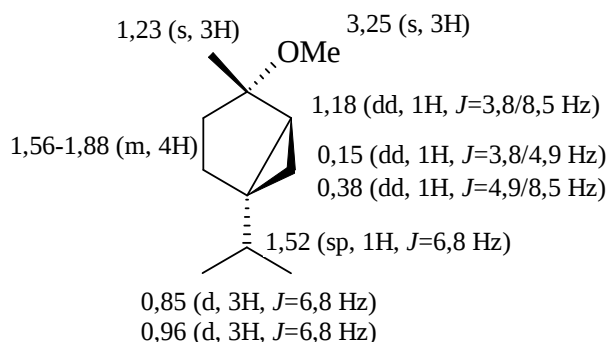
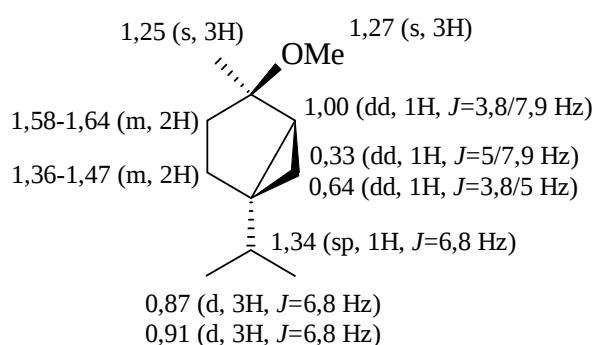


terpinen-4-ol



cis-tujan-4-ol

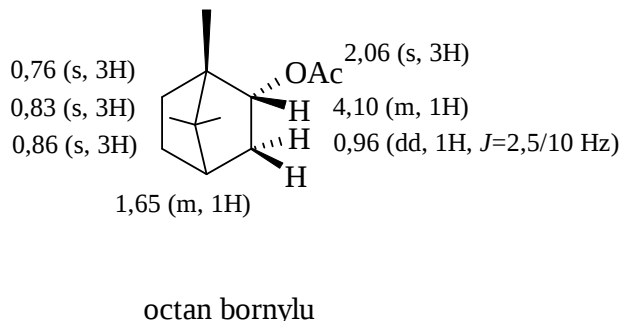
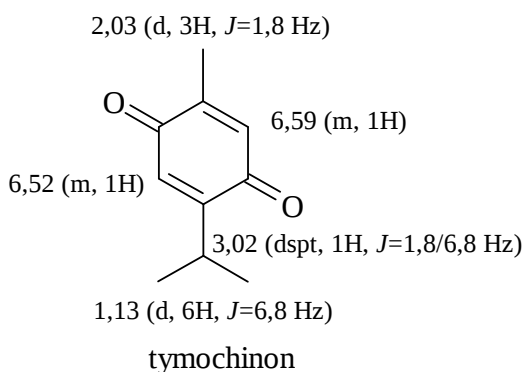
W olejku z *N. sativa* zidentyfikowałam również dwie nowe, dotychczas spektroskopowo nie scharakteryzowane tlenowe pochodne monoterpenu. Były to izomery eterów metylowych *trans*- i *cis*-tujan-4-olu (*trans*- i *cis*-hydratu sabinenu).

eter metylowy *trans*-tujan-4-olueter metylowy *cis*-tujan-4-olu

Dyskusję dotyczącą izolowania i ustalania struktury nowych związków metodami GC, GC-MS, ^{13}C - i ^1H NMR oraz ^1H - ^1H NMR opisałam w rozdziale 5.3.1.3.

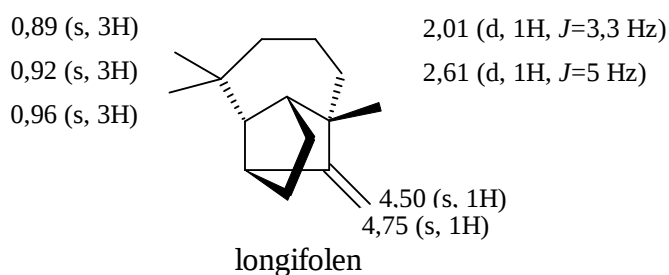
Niektóre związki występujące w olejku eterycznym z nasion czarnuszki w ilościach śladowych, wydzieliłam z olejku lotnego (E_{pe}/HD), otrzymanego metodą destylacji konkretnego uzyskanego z nasion mieszaniną pentan:eter dietylowy. Należały do nich tymochinonu (31,2% w olejku lotnym) i octan bornylu (4,7%). Związki te wydzielone zostały metodą

wielokrotnej chromatografii faszowej pogonu z destylacji frakcjonowanej olejku lotnego, a sygnały pochodzące od protonów tymochinonu i octanu bornylu były zgodne z widmami wzorców zgromadzonymi w IPChŻ.



Seskwiterpeny

Seskwiterpeny stanowiły około 1% olejku. Zidentyfikowałam wśród nich 10 węglowodorów (0,7%) i 3 pochodne tlenowe (0,3%). Analizując chromatogram GC-MS olejku zidentyfikowałam: α -longipinen (0,07%), longifolen (0,02%), β -bisabolen (0,42%), γ -kadinen (0,04%) i (Z) β -farnezen (0,01%). We frakcji 2.1 zidentyfikowałam cyklosatiwen (0,6%), α -kopaen (0,2%) oraz śladowe ilości alloizolongifolenu. Z tej grupy związków w czystości odpowiedniej do analizy ^1H -NMR wydzieliłam jedynie longifolen (38,5%, frakcja 2.1), którego eksperymentalne wartości przesunięć chemicznych, były zgodne z literaturowymi [Joulain i König, 1998].



Inne składniki

Wykorzystując metody GC i GC-MS zidentyfikowałam w olejku eterycznym również składniki inne niż terpeny, które stanowiły około 0,1% olejku. Do grupy tej zaliczyć można alifatyczne ketony (tridekan-2-on i pentadekan-2-on), pochodne aromatyczne (mirystycyna) oraz kwasy tłuszczowe, takie jak mirystynowy i palmitynowy, które występowały w szczególnie w dużych ilościach we frakcjach 4.3 i 4.4 (od 13,7% do 69%) oraz frakcjach od 2.10 do 2.14.

5.3.1.3. Izolowanie, synteza i identyfikacja eterów metylowych *trans*- i *cis*-tujan-4-olu

W poniższym rozdziale przedstawione będą pochodne znanych i opisanych w literaturze alkoholi o szkielecie tujanu: *trans*- i *cis*-hydratu sabinenu, których nazwy zwyczajowe błędnie przyporządkowują te związki do grupy hydratów. Naturalną nazwą tych alkoholi, otrzymywanych przez przyłączenie wody do sabinenu, byłaby nazwa zawierająca ten sam rdzeń, co sabinen. Nazwa sabinol (tujan-3-ol) została jednak zarezerwowana już dla innej pochodnej tlenowej sabinenu wyizolowanej z *Schizonepeta multifida* [Rumak i in., 1989]. Zatem dla izomerów hydratu sabinenu zaproponowałam nazwę tujan-4-ol, którą będę się posługiwać w dalszej części pracy.

Metodą chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią masową wykryłam w olejku eterycznym z nasion *N. sativa* obecność dwu związków o zawartości i indeksach retencji (CP Sil 5) odpowiednio **1**: 0,5%, RI 1088 oraz **2**: 4,0%, RI 1110. Widm masowych tych związków nie znalazłam w dostępnych bibliotekach widm: NIST 98.1 i MassFinder 3.1.

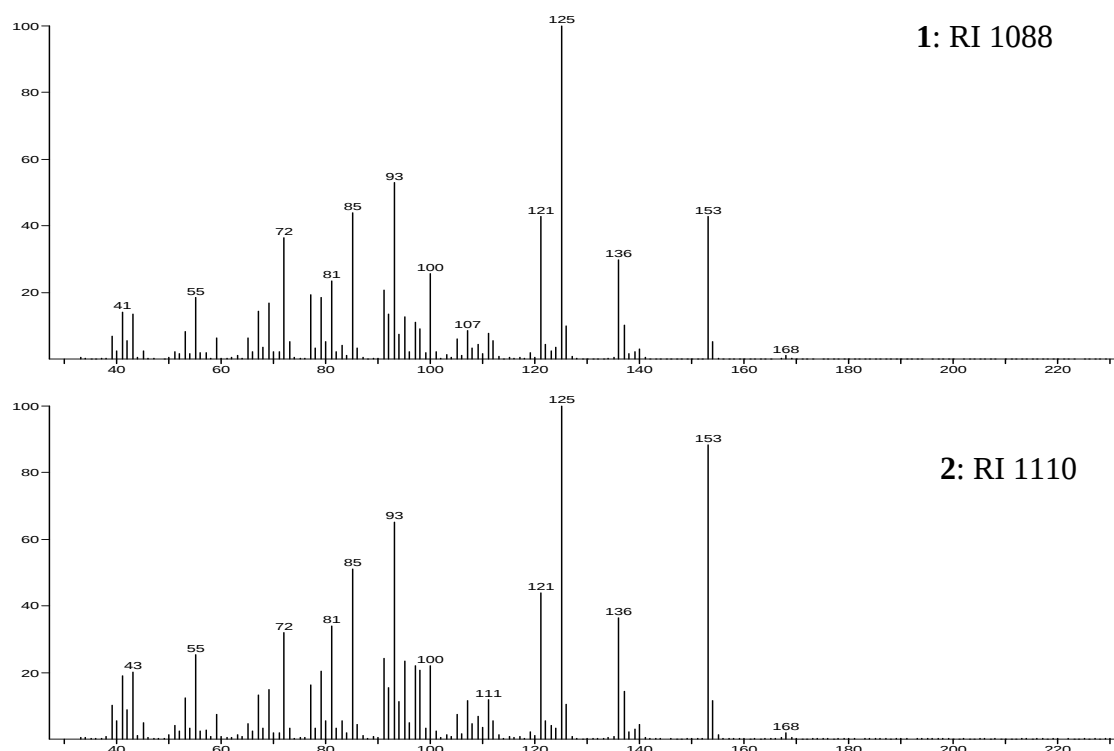
Widma masowe obu związków wykazywały bardzo duże podobieństwo, co sugerowało, że były to izomery. Prawdopodobny pik masowy nieznanego związku $m/z = 168$ świadczył, iż mogły to być związki o wzorze sumarycznym $C_{11}H_{20}O$, z łatwo fragmentującą grupą metylową ($m/z = 153$, M-15) (Rysunek 33). Wartości obu indeksów retencji mieściły się w zakresie dla tlenowych pochodnych monoterpenów, co potwierdzało przypuszczalny wzór sumaryczny badanych związków.

Związek **1** eluował z kolumny CP Sil 5 wraz z *cis*-tujan-4-olem (*cis*-hydratem sabinenu). Oba nieznanne związki wydzieliłam z olejku eterycznego metodą destylacji frakcjonowanej pod zmniejszonym ciśnieniem, a następnie chromatografii faszowej frakcji najbogatszych w te składniki. Oba związki eluowane były układem o małej polarności – 2% roztworem eteru dietylowego w pentanie, co wskazywało na ich niską polarność (eter/ester), a składnik **1** dobrze oddzielał się od polarnego *cis*-tujan-4-olu.

Związek **2** wydzieliłam we frakcji 2.3, (27 mg), w której stanowił 80,6%. Na widmie 1H -NMR izomeru **2** widoczne były między innymi:

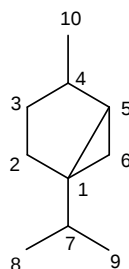
- singlet o integracji 3 (3H) i δ 3,27 – prawdopodobnie grupa metoksylova
- δ 1,25, singlet, 3 H – izolowana grupa metylowa
- δ 0,91 i 0,87, dwa dublety, $J=6,8\text{Hz}$, $2 \times 3\text{H}$ – grupa izopropylowa
- trzy dublety dubletów δ 1,00, 0,64 i 0,33, każdy o integracji 1; wartości stałych sprzężenia dla tych sygnałów świadczyły o wzajemnym ich sąsiedztwie.

Na widmie ^{13}C -NMR zaobserwowałam 11 sygnałów, w tym dwa o przesunięciach chemicznych w zakresie atomów węgla związanych z atomem tlenu (δ 83,8 (s) i 51,4 (q)).



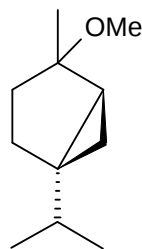
Rysunek 33. Widma MS związków **1** i **2**

Uwzględniając stopień nienasycenia równy 2 oraz brak sygnałów pochodzących od olefinowych protonów i atomów węgla, stwierdziłam, że związek ten ma budowę bicykliczną. Z kolei sprzężone sygnały δ 0,64 i 0,33 (dd), o wartościach i jednej ze stałych sprzężenia ($J=4,9$ Hz), charakterystycznych dla grupy metylenowej pierścienia cyklopropanowego, wskazywały na szkielet tujanu.



Łącząc tę informację z obecnością w badanej strukturze podstawnika metoksyłowego, za czym przemawiała obecność na widmie NMR singletu o wysokiej wartości przesunięcia chemicznego (3,27 ppm) i dwóch sygnałów pochodzących od atomów węgla połączonych z atomem tlenu, można postawić tezę, iż podstawnik ów znajduje się w pozycji 4 układu

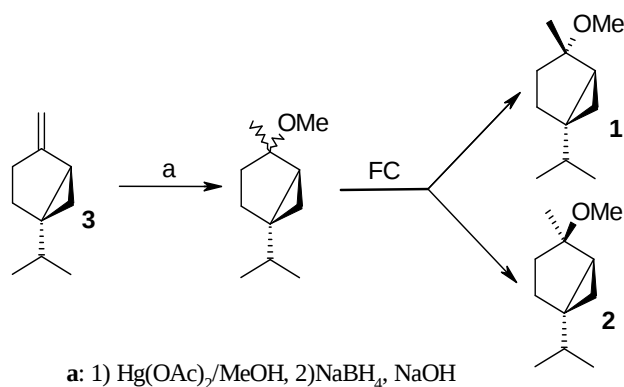
tujanowego. Stąd badanym związkiem jest eter metylowy tujan-4-olu (eter metylowy hydratu sabinenu).



Związek **1** wydzieliłam we frakcji 2.2 (9 mg), zawierającej 21,5% tego składnika. Duże podobieństwo widma ^1H -NMR związku **1** do widma składnika **2**, jakim były sygnały: grupy metoksyłowej (δ 3,25), izolowanego podstawnika metylowego (δ 1,23), dwa dubletowe sygnały grupy izopropylowej (δ 0,96 i 0,85) oraz charakterystyczny układ trzech sygnałów *dd* (δ 1,18, 0,38 i 0,15) pozwoliły stwierdzić, iż jest on izomerem geometrycznym związku **2** (izomery *cis* i *trans*).

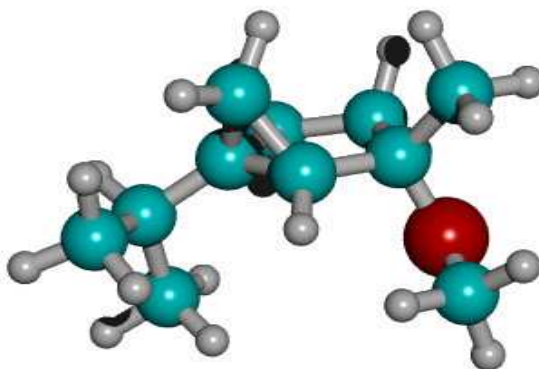
Niewielka ilość wydzielonych z olejku izomerów eterów metylowych tujan-4-olu (**1** i **2**), a zatem niezbyt dobra jakość widm NMR, oraz potrzeba bardziej szczegółowych analiz spektralnych, potwierdzających budowę i stereochemię tych związków (który z nich jest izomerem *trans*, a który *cis*) skłoniła mnie do ich syntezy. W wyniku zmodyfikowanej reakcji metoksyrtęciowania z odrtęciowaniem sabinenu [Brown i Rei, 1969] (Rysunek 34), po oczyszczeniu i rozdzieleniu mieszaniny poreakcyjnej metodą chromatografii faszowej, uzyskałam dwa związki, których indeksy retencji, widma MS oraz widma ^1H - i ^{13}C -NMR były identyczne ze związkami, które wydzieliłam wcześniej z olejku eterycznego *N. sativa*. To potwierdziło, że wyizolowane z olejku składniki są rzeczywiście diastereoizomerycznymi eterami metylowymi tujan-4-olu.

Potwierdzenie struktury zsyntezowanych (a przez to i wyizolowanych z olejku) eterów metylowych *trans*- i *cis*-tujan-4-olu możliwe było dzięki analizie ich widm ^1H - i ^{13}C -NMR, a przypisaną konfigurację potwierdziłam przez porównanie widm tych związków (**1** i **2**) z widmami *trans* i *cis*-tujan-4-olu (**3** i **4**, *trans*- i *cis*-hydratów sabinenu), (Rysunek 39).



Rysunek 34. Synteza eterów metylowych tujan-4-olu (**1** i **2**) z sabinenu (**3**)

Najbardziej widocznymi różnicami na widmie ^1H -NMR składnika **1** w porównaniu z **2** były: wyższa wartość przesunięcia chemicznego protonu metinowego podstawnika izopropylowego (dla związku **1** i **2** odpowiednio: 1,52 ppm i 1,34 ppm), jak również protonów jednej z grup metylowych tego ugrupowania (odpowiednio **1** 0,96 ppm, **2** 0,91 ppm). Ponadto różnica pomiędzy wartościami przesunięć chemicznych dubletowych sygnałów protonów atomów węgla C-8 i C-9 (grupa izopropylowa) związku **1** jest wyższa i wynosi 0,11 ppm (0,96–0,85), a związku **2**: 0,04 ppm (0,91–0,87). Efekt ten w przypadku związku **1** tłumaczyć można bliskością przestrzenną podstawnika metoksykowego w stosunku do grupy izopropylowej. Na tej podstawie stwierdziłam, że związek **1** to izomer *trans* (Rysunek 35).



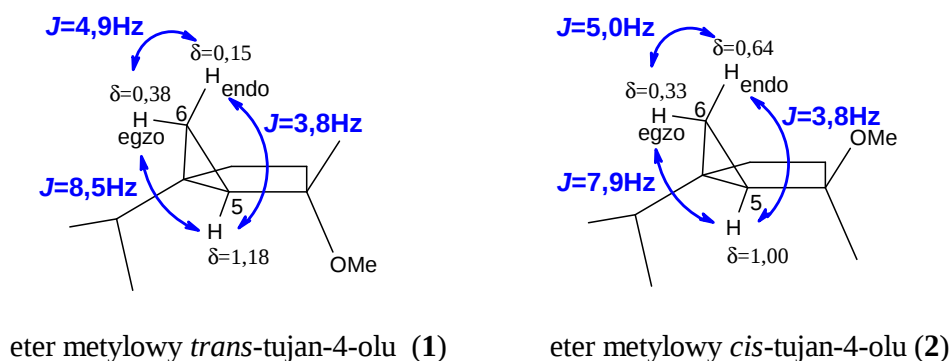
Rysunek 35. Model cząsteczki eteru metylowego *trans*-tujan-4-olu (**1**; HyperChem v.7.01)

Wartości stałych sprzężenia protonów pierścienia cyklopropanowego (Rysunek 36) pozwalają określić ich położenie w przestrzeni, i tak odpowiednio:

- związek **1** (izomer *trans*), proton o przesunięciu chemicznym 1,18 ppm ($J=3,8$ i $8,5$ Hz) to proton atomu węgla C-5, protony o przesunięciach chemicznych 0,15 ppm ($J=3,8$

i 4,9 Hz) i 0,38 ppm ($J=4,9$ i 8,5 Hz), to odpowiednio protony *endo* i *egzo* atomu węgla C-6

- związek 2 (izomer *cis*), odpowiednio: proton H-5 – δ 1,00 ($J=3,8$ oraz 7,9 Hz); proton *egzo* atomu węgla C-6 δ 0,33 ($J=5,0$ i 7,9 Hz); proton *endo* δ 0,64 ($J=3,8$ oraz 5,0 Hz).



Rysunek 36. Modele cząsteczek *trans*- i *cis*-4-metoksytujanu (HyperChem v.7.01), przesunięcia chemiczne i stałe sprzężenia protonów pierścienia cyklopropanowego

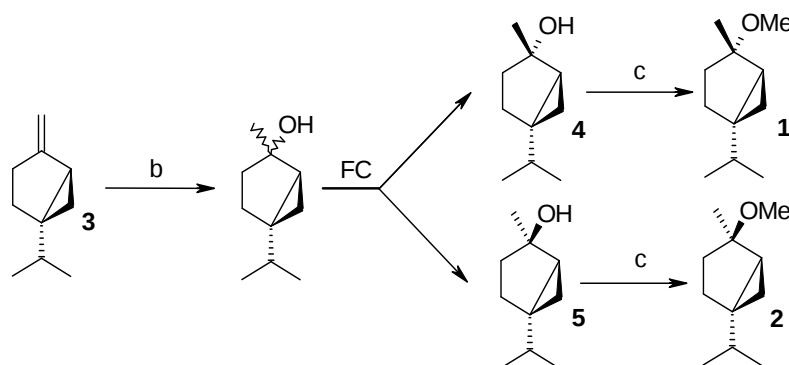
Dla sygnałów tych widoczne jest przesunięcie protonu *endo* pierścienia cyklopropanowego izomeru 2 w kierunku niższych pól (δ 0,64) w porównaniu z przesunięciem analogicznego protonu izomeru 1 (δ 0,15). Wydaje się logicznym, że usytuowanie grupy metoksyłowej po tej samej stronie płaszczyzny wyznaczonej przez pierścień cyklopentanowy powoduje wzrost przesunięcia chemicznego protonu *endo* składnika 2, który znajduje się w bliskim sąsiedztwie sterycznym atomu tlenu, co potwierdza, iż związek ten jest izomerem *cis*.

Aby dodatkowo i ostatecznie potwierdzić stereochemię wyizolowanych związków oraz dokonać porównania wykonanych w tych samych warunkach widm izomerów eterów metylowych ze znanymi i opisanymi w literaturze widmami ich hydroksyłowych odpowiedników, zsyntezowałam *trans*- i *cis*-tujan-4-ol, a następnie przekształciłam otrzymane alkohole w etery metylowe (Rysunek 37).

Alkohole otrzymałam z sabinenu metodą hydroksyrtęciowania z odrtęciowaniem [Blay i in., 2001], natomiast ich etery metylowe (oddzielnie izomer *trans* i *cis*) w reakcji z siarczanem dimetylu w obecności wodoru sodowego (Rysunek 37).

Widma protonowe obu hydratów [Wayne i Erman, 1968; Soutwell i Stiff, 1989; Golpin, 2001] i widmo węglowe *trans*-tujan-4-olu [Baesström i in., 1996] były zgodne z danymi zamieszczonymi w literaturze. Analiza ^{13}C -NMR *cis*-tujan-4-olu uzupełniła lukę dotyczącą

widma węglowego tego związku, który jest dość pospolitym składnikiem olejków eterycznych.



b: 1) $\text{Hg}(\text{OAc})_2/\text{H}_2\text{O}-\text{THF}$, 2) NaBH_4 , NaOH , **c:** $\text{SO}_2(\text{OMe})_2$, NaH , DMF

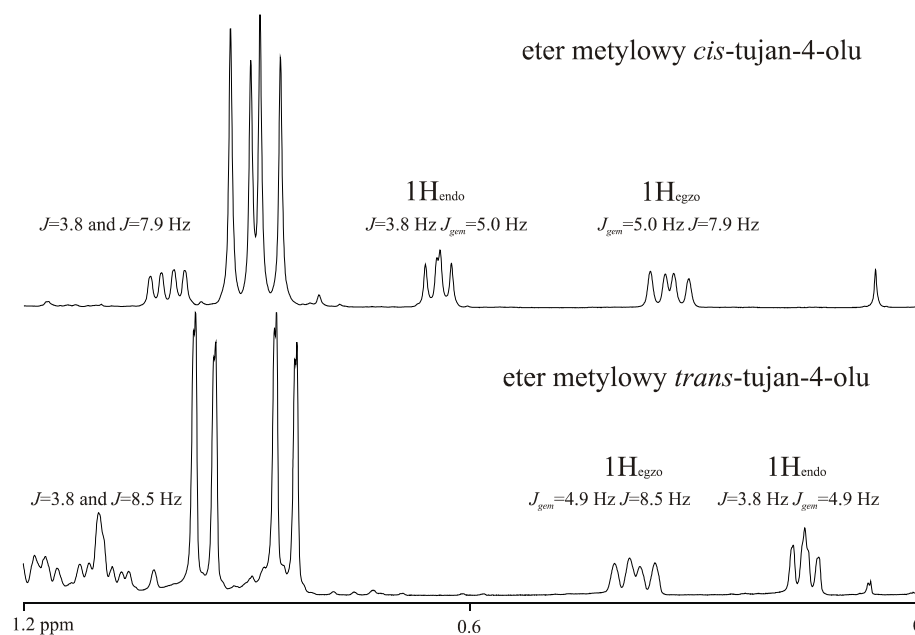
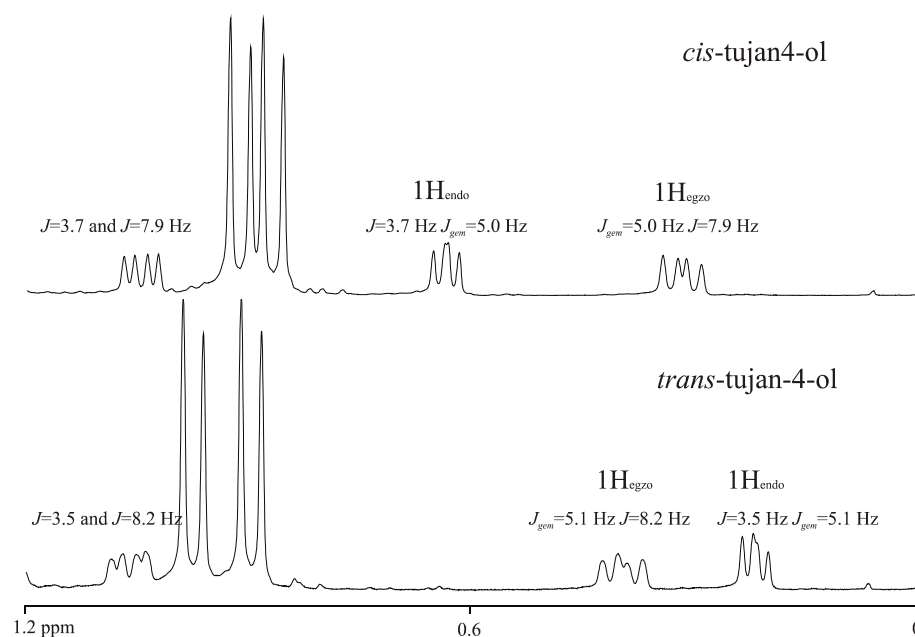
Rysunek 37. Transformacja sabinenu (3) do *trans*- oraz *cis*-eterów metylowych tujan-4-olu (1 i 2) poprzez ich hydroksylowe analogi (*trans*-tujan-4-ol 4 oraz *cis*-tujan-4-ol 5).

Podobieństwa i różnice widm ^1H -NMR oraz ^{13}C -NMR eterów metylowych tujan-4-oli i widm odpowiadających im izomerycznych alkoholi (Tabele 21 i 22, Rysunki 38 i 39), potwierdzają, iż związek 1 to izomer *trans*, a związek 2 to izomer *cis*.

Na widmach ^1H -NMR widoczna jest charakterystyczna zamiana kolejności sygnałów pochodzących od protonów *endo* i *egzo* atomu węgla C-6. W izomerach *cis* proton *endo* charakteryzuje się wyższą wartością przesunięcia chemicznego od protonu *egzo*, natomiast w izomerach *trans* obserwuje się odwrotną zależność. Podobnie opisywana już różnica w wartościach przesunięć chemicznych dubletowych sygnałów grupy izopropylowej w przypadku obu izomerów *cis* jest znacznie mniejsza.

Dodatkowo na widmach ^{13}C -NMR izomerycznych eterów 1 i 2 można zaobserwować prawidłowość, pojawiającą się również na widmach izomerów alkoholi 4 i 5. Polega ona na różnej wartości przesunięć chemicznych atomu węgla C-6: izomer *trans* (12,07 ppm) i *cis* (11,70 ppm).

W przypadku izomeru *cis* (2), na skutek bliskości przestrzennej podstawnika metoksyłowego i węgla C-6, obserwuje się silniejszy efekt γ , który powoduje jego przesunięcie chemiczne w kierunku wyższych pól. W przypadku izomeru *trans*, gdzie w sąsiedztwie węgla C-6 znajduje się podstawnik metylowy, efekt ten jest słabszy co skutkuje zwiększeniem wartości przesunięcia chemicznego.

Rysunek 38. Rozciąg obszaru 0-1,2 ppm widm 1H -NMR eteru metylowego *cis*- i *trans*-tujan-4-oluRysunek 39. Rozciąg obszaru 0-1,2 ppm widm 1H -NMR *cis*- i *trans*-tujan-4-olu

W celu odczytania wartości przesunięć chemicznych sygnałów protonowych węgla C-2, C-3 i C-7 obu izomerów eterów metylowych hydratów sabinenu oraz protonów węgla C-5 izomeru *trans*, pokrywających się z innymi sygnałami na widmie 1H -NMR (250 MHz), zostały dodatkowo wykonane widma 1H - 1H COSY tych związków.

Tabela 21. Przesunięcia chemiczne (^{13}C i ^1H) eterów metylowych *trans*- i *cis*-tujan-4-olu

C/H	eter metylowy <i>trans</i> -tujan-4-olu (1) <i>trans</i> -1-izopropyl-4-metoksy-4-metylobicyklo[3.1.0]heksan		eter metylowy <i>cis</i> - tujan-4-olu (2) <i>cis</i> -1-izopropyl-4-metoksy-4-metylobicyklo[3.1.0]heksan	
	^{13}C (ppm)	^1H (ppm)	^{13}C (ppm)	^1H (ppm)
1	34,8 (s)		33,0 (s)	
2	27,2 (t)	1,56÷1,88 (m, 4H)	24,9 (t)	1,36÷1,47 (m, 2H)
3	33,3 (t)		33,6 (t)	1,58÷1,64 (m, 2H)
4	85,1 (s)		83,8 (s)	
5	32,1 (d)	1,18 (dd, 1H, $J = 3,8/8,5$ Hz)	32,8 (d)	1,00 (dd, 1H, $J = 3,8/7,9$ Hz)
6	12,1 (t)	0,15 (dd, 1H endo , $J = 3,8$ Hz $J_{gem} = 4,9$ Hz)	11,7 (t)	0,33 (dd, 1H exo , $J_{gem} = 5,0$ Hz $J = 7,9$ Hz)
		0,38 (dd, 1H exo , $J_{gem} = 4,9$ Hz $J = 8,5$ Hz)		0,64 (dd, 1H endo , $J = 3,8$ Hz $J_{gem} = 5,0$ Hz)
7	30,8 (d)	1,52 (sp, 1 H, $J = 6,8$ Hz)	29,9 (d)	1,34 (sp, 1 H, $J = 6,8$ Hz)
8	19,9 (q)	0,85 (d, 3 H, $J = 6,8$ Hz)	19,5 (q)	0,87 (d, 3 H, $J = 6,8$ Hz)
9	20,1 (q)	0,96 (d, 3 H, $J = 6,8$ Hz)	19,7 (q)	0,91 (d, 3 H, $J = 6,8$ Hz)
10	20,9 (q)	1,23 (s, 3H)	23,5 (q)	1,25 (s, 3H)
OCH₃	49,8 (q)	3,25 (s, 3H)	51,4 (q)	3,27 (s, 3H)

Tabela 22. Przesunięcia chemiczne (^{13}C i ^1H) *trans*- i *cis*-tujan-4-olu

C/H	<i>trans</i> -tujan-4-ol (3) <i>trans</i> -5-izopropyl-2-metylobicyklo[3.1.0]heksan-2-ol		<i>cis</i> - tujan-4-ol (4) <i>cis</i> -5-izopropyl-2-metylobicyklo[3.1.0]heksan-2-ol	
	^{13}C (ppm)	^1H (ppm)	^{13}C (ppm)	^1H (ppm)
1	34,6 (s)		33,2 (s)	
2	25,9 (t)	-	25,5 (t)	-
3	36,6 (t)		36,1 (t)	
4	80,5 (s)		79,3 (s)	
5	34,4 (d)	1,06 (dd, 1H, $J = 3,5/8,2$ Hz)	33,6 (d)	1,04 (dd, 1H, $J = 3,7/7,9$ Hz)
6	13,2 (t)	0,22 (dd, 1H endo , $J = 3,5$ Hz $J_{gem} = 5,1$ Hz)	11,1 (t)	0,32 (dd, 1H exo , $J_{gem} = 5,0$ Hz $J = 7,9$ Hz)
		0,64 (dd, 1H exo , $J_{gem} = 5,1$ Hz $J = 8,2$ Hz)		0,64 (dd, 1H endo , $J = 3,7$ Hz $J_{gem} = 5,0$ Hz)
7	32,1 (d)	-	32,5 (d)	-
8	19,9 (q)	0,90 (d, 3H, $J = 6,8$ Hz)	19,5 (q)	0,87 (d, 3H, $J = 6,8$ Hz)
9	20,0 (q)	0,97 (d, 3H, $J = 6,8$ Hz)	19,6 (q)	0,91 (d, 3H, $J = 6,8$ Hz)
10	25,0 (q)	1,30 (s, 3H)	28,0 (q)	1,32 (s, 3H)

- wartości przesunięć chemicznych nie udało się odczytać

Etery metylowe tujan-4-olu zidentyfikowałam po raz pierwszy jako składniki pochodzenia naturalnego. Dotychczas bowiem ich obecność stwierdzono jedynie w ekstraktach metanolowych majeranku (*Majorana hortensis* Moenh) [Fischer i in., 1987, 1988; Nitz i in., 1985]. Analogiczne etery etylowe zostały zidentyfikowane w ekstraktach etanolowych majeranku [Taskinen, 1974]. Uważano, iż etery metylowe lub etylowe

tujan-4-olu (hydratu sabinenu) są produktami transformacji tujan-4-oli (hydratów sabinenu) [Taskinen, 1974] lub ich octanów pod wpływem odpowiednio metanolu lub etanolu [Fischer i in., 1987, 1988]. Związków tych nie wykryto ani w olejkach eterycznych, ani też w ekstraktach uzyskanych z majeranku innymi niż metanol rozpuszczalnikami [Nitz i in., 1985; Fischer i in., 1987, 1988].

Składniki te zidentyfikowałam nie tylko w oleju eterycznym uzyskanym przy użyciu aparatu Derynga i Likensa-Nickersona, ale też w oleju lotnym z konkretów otrzymanych pentanem i eterem dietylowym (1:1). Ostatecznym potwierdzeniem ich naturalnego występowania było wykrycie widm masowych tych związków podczas analizy nasion *N. sativa* metodą HS-SPME połączoną z GC-MS.

W jednej z publikacji opisujących skład olejku eterycznego z nasion czarnuszki siewnej autorzy wspomnieli o składniku, którego nie udało im się zidentyfikować [Burits i Buckar, 2000]. Podane przez nich widmo MS oraz indeks retencji wskazują, iż nieznanym związkiem mógł być eter metylowy tujan-4-olu, prawdopodobnie izomeru *cis* – obecnego w badanym przeze mnie oleju z czarnuszki w wyższej zawartości.

5.3.2. Mikroekstrakcja do fazy stałej nasion czarnuszki siewnej

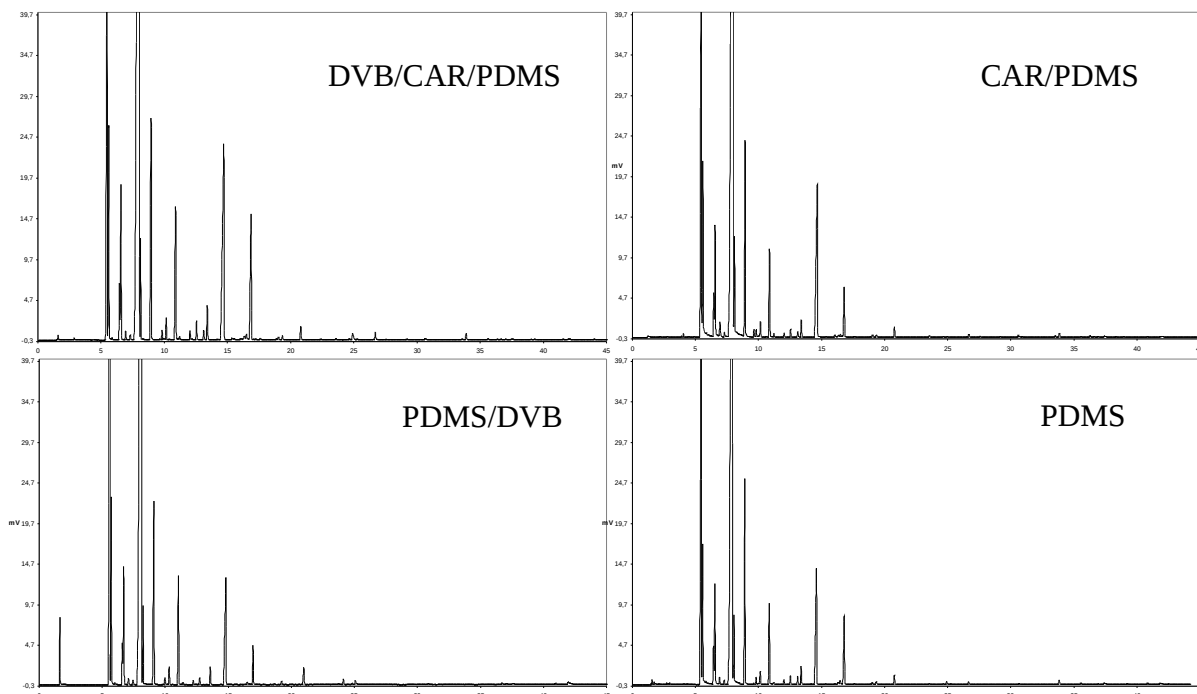
5.3.2.1. Dobór warunków SPME nasion

Pierwszym etapem analizy związków lotnych nasion czarnuszki siewnej metodą HS-SPME był wybór włókna. Testowałam cztery włókna (DVB/CAR/PDMS, CAR/PDMS, PDMS/DVB i PDMS) w następujących warunkach: masa nasion 10 g w 20 ml fiolce, temperatura łaźni wodnej 60°C, czas ustalania równowagi i ekstrakcji 30 min. Kierując się intensywnością i ilością pików na chromatogramie gazowym (Rysunek 40), wybrałam włókno trójskładnikowe DVB/CAR/PDMS.

W kolejnym etapie ustaliłam masę zmielonych nasion i objętość fiolki. Spośród wariantów (masa nasion/objętość fiolki): 4 g/10 ml, 10 g/20 ml i 20 g/20 ml, wybrałam wariant pierwotny, czyli: 10 g nasion w fiolce 20 ml. Chromatogramy składników lotnych w wariantach pierwszym i drugim były zbliżone, ale ilość i wielkość pików była większa w wariacie drugim. W wariacie 20 g/20 ml nastąpiło przeładowanie włókna składnikami lotnymi.

W ostatnim etapie sprawdziłam jak skrócenie czasu ustalania równowagi z 30 min. do 15 min. wpłynie na wynik analizy. Ponieważ nie obserwowałam pogorszenia obrazu chromatograficznego, analizę SPME składników lotnych nasion czarnuszki siewnej

przewodziłam w następujących warunkach: 10 g nasion w 20 ml fiolce, włókno DVB/CAR/PDMS, temperatura 60°C, czas ustalania równowagi 15 min., czas ekstrakcji 30 min., czas desorpcji 2 min.



Rysunek 40. Chromatogram gazowy lotnych składników nasion *Nigella sativa* ekstrahowanych przy użyciu czterech włókien SPME

5.3.3. Lotne składniki nasion czarnuszki siewnej wyodrębnione różnymi metodami

W celu porównania wpływu metody wyodrębniania na wydajność i skład olejków z nasion czarnuszki siewnej (Wielkopolska, Kawon, 2003) wydzieliłam związki lotne następującymi metodami z podaną wydajnością (W):

- destylacja z parą wodną (aparat Derynga) – HD, W = 1,14%
- destylacja-ekstrakcja (aparat Likensa-Nickersona) – SDE, W = 0,74%
- ekstrakcja pentanem (aparat Soxhleta), (konkret W = 10,36%) i destylacja konkretnu z parą wodną (aparat Derynga) – E_p/HD, W = 1,50%
- ekstrakcja mieszaniną pentan-eter dietylowy 1:1 (aparat Soxhleta), (konkret W = 10,52%) i destylacja konkretnu z parą wodną (aparat Derynga) – E_{pe}/HD, W = 1,56%
- ekstrakcja nadkrytyczna (CO₂), (ekstrakt W = 18,52%) i destylacja ekstraktu z parą wodną (Deryng) –SFE, W = 4,08%.

Wykonałam również analizę lotnych składników nasion wyodrębnionych metodami:

- mikroekstrakcji do fazy stałej nasion z fazy nadpowierzchniowej (HS-SPME)
- analizy fazy nadpowierzchniowej metodą dynamiczną – DHS.

Otrzymane produkty ze względu na odmienny skład chemiczny, wykazywały różnice w barwie i zapachu. Olejek eteryczny miał barwę jasnożółtą i zapach ziołowy. Konkretyny miał barwę od jasnobrązowej do ciemnobrunatnej i intensywny, nieco ciężki ziołowo-ziemisty zapach. Otrzymane z nich olejki lotne były ciemnożółte o zapachu zbliżonym do olejku eterycznego.

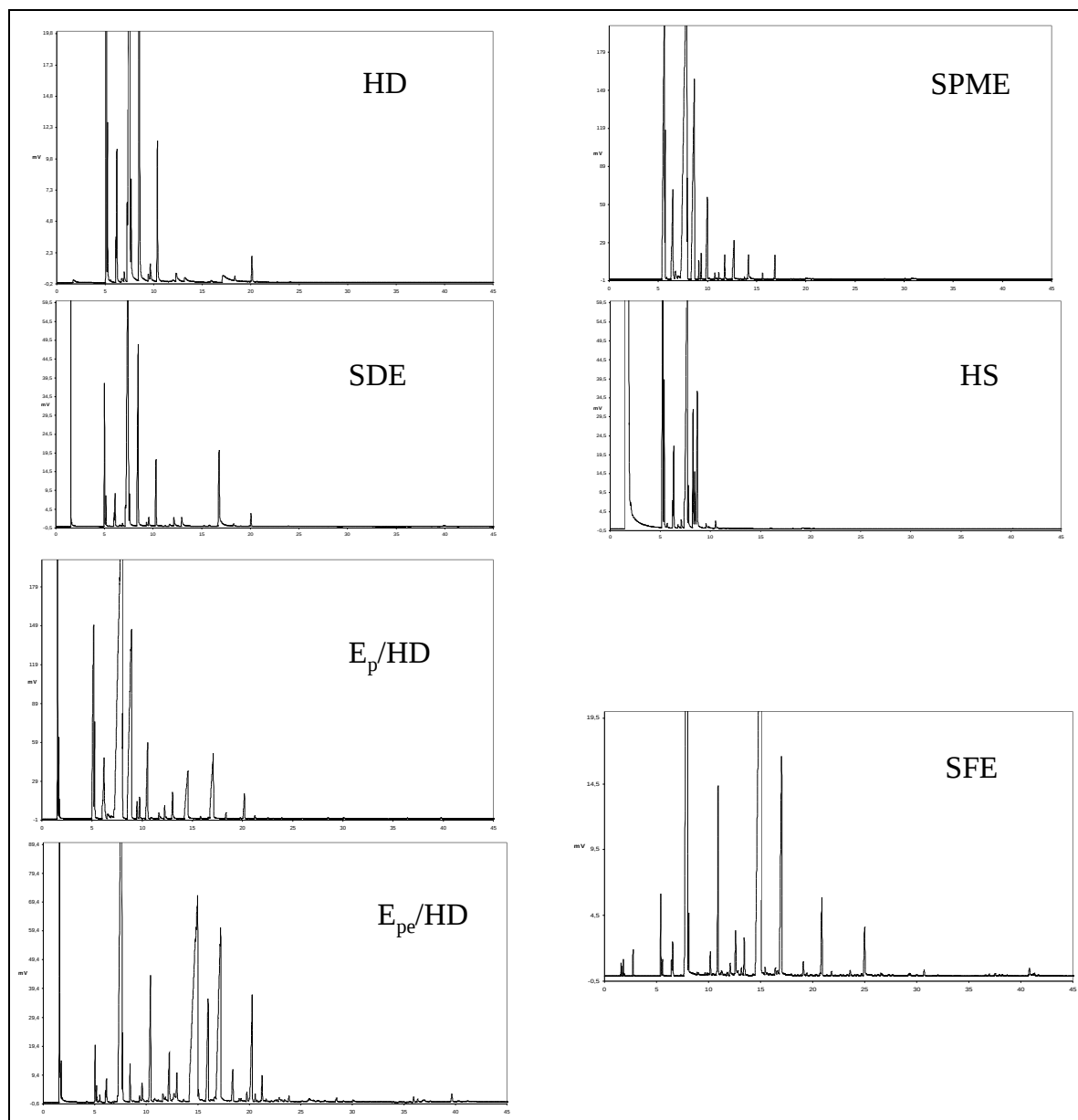
Wydajności poszczególnych metod różniły się znacznie między sobą. Najniższą wydajność uzyskałam metodą destylacji-ekstrakcji w aparacie Likensa-Nickersona (0,74%), aczkolwiek teoretycznie powinna ona być podobna do wydajności destylacji z parą wodną, która wynosiła 1,14%. Być może zbyt długi czas procesu, albo też zbyt wysoka temperatura czasz grzejnych lub łaźni wodnej podczas odparowywania pentanu spowodowały straty olejku. Wskazuje to na potrzebę doboru warunków destylacji-ekstrakcji. Metodą destylacji konkretów (zatręzione ekstrakty otrzymane w aparacie Soxhleta pentanem i mieszaniną pentan:eter dietylowy), otrzymałam olejki lotne z wydajnością odpowiednio 1,50% i 1,56%. Olejki lotne zawierały więcej składników mniej lotnych niż olejki eteryczne. Użycie mieszaniny pentan:eter dietylowy, jako bardziej polarnej, dawało produkt o bardziej różnorodnym składzie: olejek nie składał się głównie z węglowodorów monoterpenowych, ale zawierał również dużą ilość tlenowych pochodnych.

Najbardziej wydajnym procesem pozyskiwania zarówno ekstraktu, jak i olejku lotnego (4,08%), okazała się ekstrakcja ditlenkiem węgla w stanie nadkrytycznym (SFE). Niestety jest to metoda wymagająca skomplikowanej, drogiej aparatury. Wcześniej olejek lotny pozyskany był z największą wydajnością (3%) również tą metodą [Ghorab, 2003].

Skład chemiczny olejku eterycznego i olejków lotnych przedstawiony jest w Tabeli 23 i na Rysunku 41. W składzie jakościowym olejków występowały tylko niewielkie różnice, natomiast różnice w składzie ilościowym były znaczące.

Głównymi składnikami otrzymanych olejków eterycznych i lotnych, podobnie jak wynika to z danych literaturowych, były węglowodory monoterpenowe i ich pochodne tlenowe. Najważniejsze związki to: p-cymen (25-55%) oraz towarzyszące mu γ -terpinen i α -tujen. p-Cymen występował w największej ilości w olejku eterycznym oraz olejku lotnym z ekstraktu pentanowego i ekstraktu uzyskanego metodą ekstrakcji nadkrytycznej. W olejku lotnym (E_{pe}/HD) z destylacji konkretu otrzymanego przez ekstrakcję mieszaniną pentan:eter, zawartość p-cymenu była najniższa (25,3%), mniejszy był też udział α -tujenu (0,9%)

i γ -terpinenu (0,8%), natomiast pojawiło się znacznie więcej składników mniej lotnych. Na uwagę zasługuje wysoka zawartość tymochinonu (31,2%), obecnego także w olejku lotnym pozyskanym metodą ekstrakcji nadkrytycznej (10,3%), i w znacznie niższej ilości w olejku lotnym E_p /HD (3,2%). W olejkach eterycznych składnik ten nie występował lub obecny był w śladowej ilości.



Rysunek 41. Chromatogramy gazowe składników lotnych nasion *Nigella sativa* wydzielonych różnymi metodami

HD-destylacja z parą wodną, **SDE**-destylacja z parą wodną-ekstrakcja, **E_p /HD**-ekstrakcja pentanem nasion i destylacja z parą wodną konkretnie, **E_{pe} /HD**-ekstrakcja mieszaniną pentan:eter dietylowy nasion i destylacja z parą wodną konkretnie, **SFE**-ekstrakcja nadkrytyczna, **SPME**-mikroekstrakcja do fazy stałej, **HS**-analiza fazy nadpowierzchniowej.

Tabela 23. Skład olejku eterycznego i lotnego oraz skład fazy nadowierzchniowej nasion *Nigella sativa* (Wielkopolska, 2003)

Nr	Składnik	Zawartość w olejkach [%]						
		HD	SDE	E _p /HD	E _{pe} /HD	SFE	SPME	DHS
1	α-tujen	9,9	6,6	8,8	0,9	4,6	17,5	26,9
2	α-pinen	2,9	1,6	2,4	0,3	1,4	3,0	6,2
3	kamfen	tr	tr	tr	0,1	0,1	tr	0,2
4	sabinen	0,7	0,7	0,6	0,2	0,6	-	1,3
5	β-pinen	2,8	2,5	1,9	0,5	2,2	4,8	3,7
6	mircen	0,2	0,2	0,3	-	1,3	0,4	0,3
7	α-felandren	0,3	0,3	0,2	tr	0,8	0,1	0,6
8	α-terpinen	1,7	1,4	1,6	25,3	0,5	-	37,5
9	p-cymen	54,8	51,5	54,1		47,8	48,2	
10	limonen	1,3	1,3	1,2	1,1	1,6		2,4
13	γ-terpinen	14,8	17,2	17,1	0,8	3,1	15,7	10,2
15	terpinolen	0,2	0,3	0,2	0,2	0,6	0,4	0,3
16	cis-tujan-4-ol	} 0,5	0,7	0,6	0,6	0,9	0,6	0,1
17	eter metylowy							
	trans-tujan-4-olu							
18	β-tujon	tr	tr	tr	tr	0,3	tr	tr
19	eter metylowy cis-tujan-4-olu	3,5	4,7	3,4	4,8	3,6	3,5	0,5
20	kamfora	tr	tr	tr	0,1	0,6	tr	tr
21	trans-werbenol	-	tr	-	tr	0,3	-	-
22	borneol	0,1	0,3	0,3	0,3	0,5	0,2	tr
23	terpinen-4-ol	0,5	1,0	0,5	1,7	0,7	0,2	tr
24	α-terpineol	-	-	-	0,5	-	-	-
25	trans-dihydrokarwon	0,5	1,1	0,9	0,9	0,4	0,7	-
27	tymochinon	-	-	3,9	31,2	10,3	2,1	-
28	octan cis-chryzantenylu	-	tr	tr	tr	tr	tr	-
29	octan bornylu	0,1	0,1	0,1	4,7	0,1	0,1	0,1
30	tymol	-	tr	0,1	0,1	-	tr	-
31	karwakrol	1,7	7,8	5,2	14,9	-	1,0	-
32	α-longipinen	0,1	0,2	0,2	1,0	0,4	0,2	-
34	α-kopaen	tr	tr	tr	0,1	1,0	-	0,2
35	longicyklen	-	-	tr	0,3	-	-	-
36	longifolen	0,8	1,0	0,9	4,7	-	0,7	tr
37	alloizolongifolen	tr	tr	tr	0,2	-	-	-
39	tridekan-2-on	-	tr	tr	0,1	-	tr	-
40	β-selinen	-	-	tr	0,2	-	-	-
42	β-bisabolen	-	-	tr	0,1	-	tr	-
43	γ-kadinen	tr	tr	tr	0,2	tr	tr	tr
44	tymohydrochinon	-	tr	tr	0,2	-	0,2	-
45	tlenek β-kariofilenu	-	-	tr	tr	-	-	-
46	apiol	-	tr	0,1	0,2	-	tr	-
47	pentadekan-2-on	-	-	tr	tr	-	-	-
48	farnezal D (cis, trans)	-	-	0,1	0,1	-	tr	-
49	kwas mirystynowy	-	-	tr	tr	-	-	-
50	kwas palmitynowy	-	tr	tr	tr	-	tr	-
węglowodory monoterpenowe		93,2	83,6	84,4	29,4	64,6	90,1	89,6
monoterpeny tlenowe		3,4	11,1	10,5	54,8	14,1	5,0	0,2
węglowodory seskwiterpenowe		0,9	1,3	4,4	1,2	1,4	1,0	0,2
seskwiterpeny tlenowe		-	tr	0,1	0,5	-	0,2	-
kwasy tłuszczowe		-	tr	tr	tr	-	tr	-
suma zidentyfikowanych		97,5	96,1	99,5	86,0	80,1	96,3	90,0
wvdainość olejku		1.14	0.74	1.56	1.50	4.08		

tr - < 0,05%; - - związek niewykryty

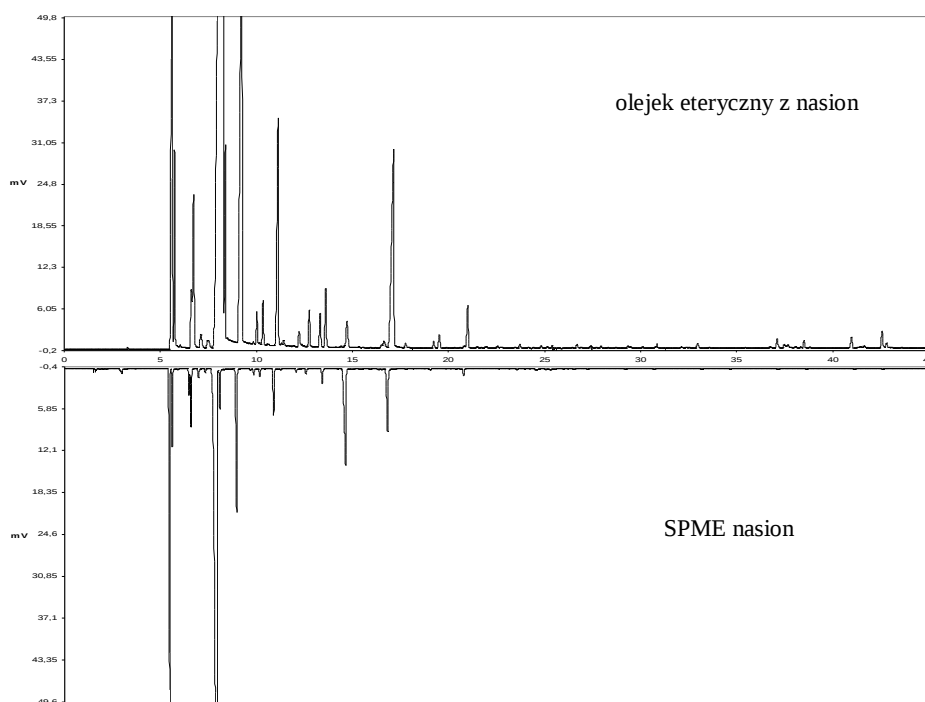
Występowanie tymochinonu jako głównego składnika ekstraktów lub olejków lotnych, a brak tego związku lub jego występowanie w ilościach śladowych w olejkach eterycznych, odnotowano w wielu publikacjach [Aboutable i in., 1986; Burits i Bucar, 2000; Ghorab 2003]. W olejkach lotnych tymochinon był zwykle głównym składnikiem i jego zawartość wynosiła od 24% do 57% [Aboutable i in., 1986; Burits i Bucar, 2000]. Niewyjaśniona jest dotychczas przyczyna, dla której metoda otrzymywania olejku w tak zasadniczy sposób wpływa na zawartość tymochinonu. Literatura podaje, że w trakcie izolowania chinonów z nasion lub też procesu przechowywania zarówno nasion, jak i oleju tymochinon ulega pod wpływem światła i ciepła dimeryzacji tworząc ditymochinon – substancję znaną początkowo jako „nigellon” [Gad i in., 1963; Ghosheh i in., 1999]. Inne źródła podają, że tymochinon jest produktem utleniania tymolu, zachodzącego w warunkach ekstrakcji nasion czarnuszki [Ghosheh i in., 1999]. Nie dotyczy to jednak surowca, który badałam, ponieważ zawierał on śladową ilość tymolu ($< 0,1\%$) zarówno w olejkach destylowanych z parą wodną, jak i otrzymanych z ekstraktów. Zauważyłam, że produkty o wysokiej zawartości tymochinonu zawierały mniej p-cymenu.

Tymochinon zidentyfikowałam analizując nasiona czarnuszki metodą HS-SPME. Jego udział był różny w różnych partiach surowca i wynosił od 2,1% (Wielkopolska, Kawon, 2003) do 8-9% (Wielkopolska, Kawon, 2005; Kujawy, Lewandowski, 2005). Metoda HS-SPME jest metodą nieinwazyjną, wykluczającą wpływ rozpuszczalników czy temperatury, mogę zatem stwierdzić, że tymochinon występuje w stanie wolnym jako naturalny składnik nasion czarnuszki. Ekstrakcja nasion, szczególnie rozpuszczalnikami polarnymi, pozwala wydzielić ten związek w znacznie większej ilości niż destylacja z parą wodną i HS-SPME. Jest prawdopodobne, że występuje on w nasionach również w postaci związanej i w warunkach wydzielania uwalnia się.

Olejek lotny otrzymany z ekstraktu nadkrytycznego, podobnie jak olejki eteryczne i ekstrakty SPME, charakteryzował się wysoką p-cymenu (47%) i tymochinonu (10%), obecnego w większej ilości tylko w oleju lotnym E_{pe}/HD . Skład jakościowy frakcji monoterpenowej olejku lotnego SFE zbliżony był do składu olejków wydzielanych innymi metodami. Olejek ten był bardzo ubogi w seskwiterpeny, zidentyfikowałam w nim jedynie α -longipinen, α -kopaen i śladowe ilości γ -kadinenu, podczas, gdy w pozostały olejkach, a także ekstraktach SPME, głównym był α -longifolen (do 4,7%). Cechą wyróżniającą olejek SFE od innych był brak karwakrolu, którego zawartość w oleju lotnym E_{pe}/HD była dość wysoka (14,9%). W olejkach lotnych E_p/HD oraz E_{pe}/HD wykryłam obecność niewielkich ilości kwasów tłuszczowych (palmitynowy i mirystynowy).

5.3.4. Porównanie metody SPME z destylacją z parą wodną

Chromatogramy gazowe składników lotnych tej samej partii owoców czarnuszki wydzielonych metodą HS-SPME na włóknie DVB/CAR/PDMS były bardzo podobne do chromatogramów olejków eterycznych (Rysunek 42). Z przedstawionych w Tabeli 24 danych dla dwu partii surowca (Wielkopolska, Kawon, 2005 i Kujawy, Lewandowski, 2005) wynika, że udziały najbardziej lotnych składników nasion, takich jak: α -tujen i α -pinen, oznaczone metodą SPME były około 50% wyższe niż w oleju eterycznym, w konsekwencji udziały większości pozostałych składników były większe w olejkach. Dotyczyło to szczególnie wyższej zawartości p-cymenu i karwakrolu. Największą jednak różnicę obserwowałam w zawartości tymochinonu, który występował w olejkach eterycznych w ilości śladowej, natomiast jego zawartość oceniona metodą HS-SPME wynosiła w obu partiach powyżej 8%.



Rysunek 42. Chromatogram gazowy olejku eterycznego fazy nadpowierzchniowej nasion *Nigella sativa* (Mazowsze, 2005), (kolumna CPSil 5)

Porównanie wyników analizy olejku eterycznego i HS-SPME wskazuje, że metody te nie mogą być stosowane alternatywnie do analizy lotnych składników czarnuszki siewnej, gdyż różnice w oznaczanym składzie dotyczą zawartości bardzo istotnego składnika.

Tabela 24. Główne składniki olejku eterycznego i fazy nadpowierzchniowej nasion *Nigella sativa*

Nr	Składnik	uprawa 2005 rok			
		Wielkopolska (Kawon)		Kujawy (Lewandowski)	
		HD	SPME	HD	SPME
1	α-tujen	8,3	13,0	8,9	13,8
2	α-pinen	1,8	2,6	2,0	2,7
3	kamfen	0,1	tr	0,1	tr
4	sabinen	0,8	1,0	0,9	1,1
5	β-pinen	2,2	2,0	2,3	2,3
6	mircen	0,3	0,4	0,3	0,4
7	α -felandren	0,2	0,2	0,2	0,2
9	p-cymen	56,8	51,0	60,5	54,0
10	limonen	1,6	1,4	1,8	1,5
11	(E)- β -ocymen	0,3	-	0,3	-
12	(E)- β -ocymen	0,3	-	0,1	-
13	γ-terpinen	9,8	7,0	7,9	5,7
16	cis-tujan-4-ol	} 0,5	0,4	0,6	0,4
17	eter metylowy trans-tujan-4-olu				
18	β -tujon	0,2	tr	0,1	tr
19	eter metylowy cis-tujan-4-olu	3,6	3,0	3,7	2,4
22	borneol	0,3	0,2	0,3	tr
23	terpinen-4-ol	0,5	0,3	0,6	0,3
24	α -terpineol	0,5	-	0,4	-
25	trans-dihydrokarwon	0,8	0,8	0,8	0,7
27	tymochinon	tr	8,2	tr	8,8
29	octan bornylu	0,2	-	0,1	-
31	karwakrol	5,3	4,5	4,3	3,7
32	α -longipinen	0,2	0,1	0,2	0,1
36	longifolen	0,7	0,4	0,6	0,4
39	tridekan-2-on	0,1	0,1	0,1	0,1

tr – <0,05%; - – związek niewykryty

5.3.5. Porównanie wydajności i składu olejków eterycznych nasion czarnuszki siewnej w zależności od roku i miejsca zbioru

Wydajność i skład olejku eterycznego badałam dla nasion czarnuszki uprawianej w latach 2000-2005, w różnych regionach Polski oraz w Bułgarii. Wydajności olejków w zależności od roku zbioru nasion i rejonu ich uprawy przedstawiłam w Tabeli 25.

Nasiona czarnuszki siewnej uprawianej w Polsce są dobrym materiałem olejkodajnym. Wydajność olejku eterycznego wynosiła od 1,12% do 2,38% i zmieniała się w zależności od roku zbioru oraz miejsca uprawy. Wydajność olejku eterycznego z nasion czarnuszki konfekcjonowanej w firmie Kawon w latach 2000-2005 wahała się w przedziale 1,14-1,70%. Wydajność olejku z czterech miejsc w roku 2001 wynosiła od 1,58% do 2,38% i najwyższa była z surowca z firmy Flos. Oznaczana wydajność była zwykle wyższa od podanej w literaturze. Olejki z nasion czarnuszki uprawianej w krajach południowej Europy, Azji i północnej Afryki wydzielane były ze znacznie mniejszą wydajnością (0,18%-1,4%). Analizowany przeze mnie olejek z nasion rośliny uprawianej w Bułgarii otrzymany został

również z niską wydajnością (0,45%). Prawdopodobnie niższa wydajność spowodowana jest suchym i ciepłym klimatem w tych rejonach. Uzyskane wyniki wskazują, że warunki klimatyczne w Polsce są bardziej odpowiednie dla uprawy czarnuszki o wysokiej zawartości olejku eterycznego w nasionach.

Tabela 25. Wydajności olejku eterycznego w zależności od roku zbioru nasion i rejonu uprawy

Nigella sativa

Pochodzenie nasion Rok zbioru	Polska				Bulgaria
	Wielkopolska (Kawon)	Lubelszczyzna (Herbador)	Kujawy (Lewandowski)	Kujawy (Flos)	północna Bułgaria (Shumen)
2000	1,40				0,45
2001	1,70	2,10	1,58	2,38	
2002	1,40				
2003	1,14				
2004	1,12				
2005	1,45		1,53		

Skład jakościowy i ilościowy olejków eterycznych pozyskanych z upraw z tego samego regionu, ale w różnych latach zbioru (2001-2005) (Tabela 26), jak i olejków otrzymanych z nasion czarnuszki uprawianej w czterech różnych miejscach w roku 2001 (Tabela 27) różnił się nieznacznie. Głównymi składnikami olejków były zawsze: p-cymen (55-67%), α -tujen (7-12%), γ -terpinen (5-16%), eter metylowy *cis*-tujan-4-olu (3-4%), α -pinen (2-3%), β -pinen (1-3%) oraz limonen (1-2 %).

W przypadku olejków z nasion czarnuszki uprawianej w latach 2001-2005 pochodzących z Kawonu największe różnice odnotowałam dla: α -tujenu, którego zawartość w oleju z 2001 r. (7,2%) była dwukrotnie mniejsza niż w oleju z 2002 r. (14,4%); γ -terpinenu, którego najwięcej było w oleju z 2003 r. (14,8%), a trzykrotnie mniej (5,3%) w oleju z 2004 r.; oraz dla karwakrolu, którego zawartość wahała się w przedziale 0-5,3%.

Skład olejków z czarnuszki uprawianej w różnych regionach Polski w 2001 r. różnił się jedynie zawartością α -tujenu (od 7,2-12,0%), najwyższa zawartość w oleju (Lubelszczyzna, Herbador), najniższa w oleju (Wielkopolska, Kawon) oraz karwakrolu, którego zawartość wahała się od 0,1% (Kujawy, Flos) do 3,0% (Wielkopolska, Kawon). Pozostałe składniki występowały w ilościach zbliżonych.

Tabela 26. Skład olejku eterycznego nasion *Nigella sativa* (Wielkopolska, 2001-2005) w zależności od terminu zbioru

Nr	Składnik	Wielkopolska / Zawartość [%]				
		2001	2002	2003	2004	2005
1	α-tujen	7,2	14,4	9,9	10,5	8,3
2	α-pinen	2,0	2,9	2,9	2,2	1,8
3	kamfen	tr	tr	tr	tr	0,1
4	sabinen	0,8	1,1	0,7	0,7	0,8
5	β-pinen	2,1	2,7	2,8	1,3	2,2
6	mircen	0,4	0,2	0,2	0,2	0,3
7	α -felandren	0,2	0,2	0,3	0,2	0,2
8	α -terpinen	tr	0,8	1,7	-	-
9	p-cymen	60,2	64,1	54,8	66,6	56,8
10	limonen	1,3	1,6	1,3	1,4	1,6
11	(E)- β -ocymen	tr	-	-	-	0,3
12	(E)- β -ocymen	tr	-	-	-	0,3
13	γ-terpinen	12,9	9,0	14,8	5,3	9,8
14	<i>trans</i> -tujan-4-ol	tr	-	-	tr	tr
15	terpinolen	0,6	0,2	0,2	0,2	tr
16	<i>cis</i> -tujan-4-ol	0,5	0,3	0,5	0,4	0,5
17	eter metylowy <i>trans</i> -tujan-4-olu					
18	β -tujon	tr	-	tr	tr	0,2
19	eter metylowy <i>cis</i>-tujan-4-olu	4,0	2,3	3,5	2,9	3,6
20	kamfora	0,1	-	tr	tr	0,1
21	<i>trans</i> -werbenol	0,3	-	-	tr	tr
22	borneol	tr	-	0,1	0,1	0,3
23	terpinen-4-ol	0,9	tr	0,5	0,7	0,5
24	α -terpineol	tr	0,1	-	0,2	0,5
25	<i>trans</i> -dihydrokarwon	0,7	-	0,5	0,4	0,8
26	karwon	0,2	-	-	-	0,5
27	tymochinon	tr	tr	-	-	tr
28	octan <i>cis</i> -chryzantenylu	tr	-	-	tr	tr
29	octan bornylu	0,1	tr	0,1	0,1	0,2
30	tymol	tr	-	-	0,1	-
31	karwakrol	3,0	-	1,7	1,7	5,3
32	α -longipinen	0,1	tr	0,1	0,1	0,2
33	cyklosatiwen	tr	-	-	tr	tr
34	α -kopaen	tr	-	tr	tr	tr
35	longicyklen	-	-	-	-	tr
36	longifolen	tr	0,2	0,8	0,4	0,7
37	alloizolongifolen	tr	-	tr	tr	-
38	β -(Z)-farnezen	tr	-	-	tr	tr
39	tridekan-2-on	0,1	-	-	tr	0,1
40	β -selinen	0,1	-	-	-	tr
41	mirystycyna	-	-	-	tr	tr
42	β -bisabolen	tr	-	-	-	-
43	γ -kadinen	tr	-	tr	tr	tr
44	tymohydrochinon	-	-	-	-	tr
45	tlenek β -kariofilenu	tr	-	-	tr	tr
46	apiol	0,1	-	-	tr	tr
47	pentadekan-2-on	tr	-	-	tr	tr
48	farnezal D (<i>cis</i> , <i>trans</i>)	0,2	-	-	tr	-
49	kwas mirystynowy	tr	-	-	-	tr
50	kwas palmitynowy	tr	-	-	tr	tr
suma zidentyfikowanych		98,7	99,2	97,5	95,7	96,8
wydajność olejku		1,70	1,40	1,14	1,40	1,45

tr – < 0,05 %; - - związek niewykryty

Tabela 27. Skład olejku eterycznego w zależności od rejonu uprawy *Nigella sativa*

Nr	Składnik	uprawa 2001 rok			
		Zawartość w olejkach [%]			
		Wielkopolska (Kawon)	Lubelszczyzna (Herbador)	Kujawy	
				(Flos)	(Lewandowski)
1	α-tujen	7,2	12,0	11,2	10,6
2	α-pinen	2,0	2,3	2,2	2,1
3	kamfen	tr	tr	tr	tr
4	sabinen	0,8	1,0	1,0	1,0
5	β-pinen	2,1	2,3	2,3	2,2
6	mircen	0,4	0,2	0,2	0,3
7	α-felandren	0,2	0,2	0,2	0,3
8	α-terpinen	tr	1,2	2,7	1,5
9	p-cymen	60,2	63,1	56,7	63,3
10	limonen	1,3	1,6	1,5	1,5
11	(E)-β-ocymen	tr	-	-	-
12	(E)-β-ocymen	tr	-	-	-
13	γ-terpinen	12,9	10,4	15,8	9,8
14	<i>trans</i> -tujan-4-ol	tr	tr	-	tr
15	terpinolen	0,6	0,2	0,2	0,3
16	<i>cis</i> -tujan-4-ol	}	0,4	0,4	0,4
17	eter metylowy <i>trans</i> -tujan-4-olu				
18	β-tujon				
19	eter metylowy <i>cis</i>-tujan-4-olu	4,0	2,8	3,1	3,3
20	kamfora	0,1	-	-	tr
21	<i>trans</i> -werbenol	0,3	-	-	-
22	borneol	tr	0,1	-	0,2
23	terpinen-4-ol	0,9	0,3	0,6	0,5
24	α-terpineol	tr	-	-	-
25	<i>trans</i> -dihydrokarwon	0,7	0,4	-	0,6
26	karwon	0,2	-	-	-
27	tymochinon	tr	0,1	-	-
28	octan <i>cis</i> -chryzantenylu	tr	-	-	-
29	octan bornylu	0,1	tr	-	0,1
30	tymol	tr	-	-	tr
31	karwakrol	3,0	1,1	0,1	2,1
32	α-longipinen	0,1	tr	0,2	-
33	cyklosatiwen	tr	-	-	-
34	α-kopaen	tr	-	-	tr
36	longifolen	tr	0,3	0,4	tr
37	izolongifolen	tr	-	-	-
38	β-(Z)-farnezen	tr	-	-	-
39	tridekan-2-on	0,1	-	-	-
40	β-selinen	0,1	-	-	-
42	β-bisabolen	tr	-	-	-
43	γ-kadinen	tr	tr	-	-
45	tlenek β-kariofilenu	tr	-	-	-
46	apiol	0,1	-	-	-
47	pentadekan-2-on	tr	-	-	-
48	farnesal D	0,2	-	-	-
49	kwas mirystynowy	tr	-	-	-
50	kwas palmitynowy	tr	-	-	-
suma zidentyfikowanych		98,7	99,8	98,7	99,1
wydajność olejku		1,70	2,10	2,38	1,58

tr – < 0,05%; - – związek niewykryty

Olejki z nasion *N. sativa* uprawianej w Bułgarii otrzymałam z Department of Essential Oils, Plovdiv. Olejek eteryczny pozyskany był metodą destylacji z parą wodną (HD) z wydajnością 0,45% lub wydzielony w aparaturze do destylacji z parą wodną dostarczaną z zewnątrz (SD) z wydajnością 0,42%. Olejek lotny (E_n /HD) uzyskano przez destylację z parą wodną ekstraktu heksanowego nasion z wydajnością najniższą – 0,2%.

Skład olejków z surowca z Bułgarii zamieściłam w Tabeli 28. Głównym składnikiem olejku eterycznego (HD) były: p-cymen (56,4%) i α -tujen (17,3%). Skład olejku eterycznego był zbliżony do składu olejków eterycznych uzyskanych z nasion z różnych regionów Polski, z wyjątkiem znaczącej zawartości tymochinonu – 2,8%.

Tabela 28. Skład olejków nasion *Nigella sativa* uprawianej w Bułgarii

Składnik	HD	SD	E_n /HD
	Zawartość [%]		
α -tujen	17,3	4,9	7,3
α -pinen	4,1	1,4	1,8
kamfen	0,1	tr	tr
sabinen	1,9	0,7	0,9
β -pinen	4,4	1,7	2,0
α -terpinen	0,6	0,2	0,1
p-cymen	56,4	30,1	33,9
limonen	3,7	1,3	1,7
cis-tujan-4-ol	}	1,0	1,1
eter metylowy trans-tujan-4-olu*			
eter metylowy cis-tujan-4-olu*			
trans-werbenol	0,1	0,3	0,3
terpinen-4-ol	0,5	0,6	0,6
trans-p-2,8-mentadien-1-ol*	0,3	0,5	0,7
pulegon*	tr	tr	tr
tymochinon	2,8	48,2	42,8
tymol	0,1	0,2	0,1
karwakrol	tr	tr	tr
α -longipinen	0,2	0,5	0,2
longifolen	0,8	2,1	1,1
<i>suma zidentyfikowanych</i>	<i>98,5</i>	<i>99,8</i>	<i>99,9</i>
<i>wydajność olejku [%]</i>	<i>0,45</i>	<i>0,41</i>	<i>0,20</i>

tr – <0,05%; * – związek wykryty po raz pierwszy w czarnuszce siewnej

Cechą odróżniającą olejki eteryczne SD i HD z Bułgarii, a także olejek SD od olejków z badanych przeze mnie surowców z Polski, była bardzo wysoka zawartość tymochinonu, 48,2% wobec 2,8%. Zawartość ta była wyższa niż w oleju z konopki. Obserwacja ta jest zaskakująca i trudna do wytłumaczenia. Prawdopodobnie rodzaj aparatury i sposób dostarczania pary wodnej do układu wpływa na efektywność wydzielania tymochinonu z matrycy roślinnej. Olejek lotny (E_n /HD) miał skład podobny jak olejek eteryczny (SD). We wszystkich olejkach z Bułgarii zidentyfikowałam pulegon i trans-p-2,8-mentadien-1-ol, których obecności nie wykryłam w olejkach roślin z terenów Polski. Nie były one także wymienione w literaturze jako składniki olejku z czarnuszki siewnej.

5.4. Składniki lotne nasion czarnuszki siewnej – podsumowanie i wnioski

Podsumowując przeprowadzone badania wydajności i składu olejków eterycznych i lotnych oraz składników lotnych nasion czarnuszki siewnej, stwierdzam że:

- Wydajność z jaką pozyskałam olejki zależała od zastosowanej metody wyodrębniania, pochodzenia surowca i roku zbioru:
 - Z najwyższą wydajnością otrzymałam olejek lotny metodą ekstrakcji nadkrytycznej (4,08%); olejki lotne z konkretów otrzymałam z wydajnością wyższą (>1,5%) niż olejek eteryczny (1,14%).
 - Wydajność olejku eterycznego: z jednego miejsca wahała się w różnych latach od 1,14% do 1,70%, w różnych miejscach w jednym roku od 1,58% do 2,38%.
- Metoda otrzymywania olejku wpływała w małym stopniu na skład jakościowy, ale silnie determinowała skład ilościowy:
 - Olejki lotne charakteryzowały się wysoką zawartością tymochinonu, nieobecnego lub obecnego w ilościach śladowych w olejkach eterycznych.
 - Skład jakościowy i ilościowy frakcji lotnej oznaczony metodą mikroekstrakcji do fazy stałej (HS-SPME) i skład olejków eterycznych (HD, SDE) były podobne, a głównym składnikiem był p-cymen (25-67%).
 - Olejek lotny otrzymany metodą ekstrakcji nadkrytycznej miał skład zbliżony do składu olejków pozyskanych innymi metodami.
 - Metodą analizy fazy nadpowierzchniowej zostały zidentyfikowane tylko najbardziej lotne składniki nasion.
- Skład olejku eterycznego z odmiennych miejsc i lat różnił się nieznacznie.
- W nasionach *N. sativa* uprawianej w Polsce zidentyfikowałam 18 nowych dla tego gatunku składników, w tym 11 z nich należało do seskwiterpenów, a w nasionach z Bułgarii kolejne dwa nowe związki.
- Dwa składniki nasion: eter metylowy *trans*-tujan-4-olu i eter metylowy *cis*-tujan-4-olu zostały poraz pierwszy zidentyfikowane jako produkty naturalne i po raz pierwszy scharakteryzowane spektroskopowo.

Wnioski jakie wynikają z badań to:

- Nasiona czarnuszki siewnej uprawianej we wszystkich rejonach w Polsce są bardziej wydajnym surowcem olejkodajnym niż nasiona roślin uprawianych w innych krajach.
- Najlepszym sposobem wykorzystania nasion jako źródła związków lotnych jest pozyskanie olejku lotnego metodą destylacji ditlenkiem węgla w stanie nadkrytycznym.
- Metodą alternatywą dla kosztownej ekstrakcji nadkrytycznej może być ekstrakcja klasyczna (pentan:eter etylowy 1:1) i destylacja konkretu.

Czarnuszka damasceńska

5.5. Materiał

Materiał do badań stanowiły nasiona czarnuszki damasceńskiej uprawianej w Polsce, otrzymane lub zakupione z następujących firm konfekcjonujących te nasiona (pochodzenie deklarowane przez producentów):

- Torseed – Przedsiębiorstwo Nasiennictwa Ogrodniczego i Szkółkarstwa, Toruń, (pochodzenie nasion: Kujawy): 2002 r. i 2005 r.
- Przedsiębiorstwo Nasiennictwa Ogrodniczego i Szkółkarstwa, Ożarów Mazowiecki, (pochodzenie nasion: Lubelszczyzna): 2005 r.

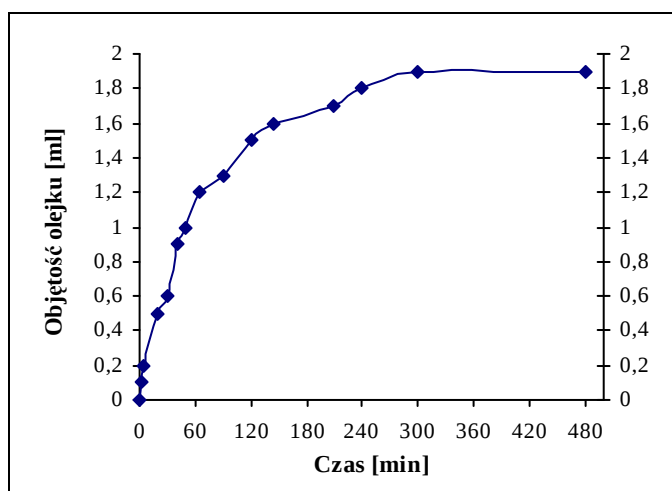
Nasiona tuż przed wydzielaniem i analizą składników lotnych były mielone w młynku udarowym do kawy (1 min.).

5.6. Wydzielanie składników lotnych nasion czarnuszki damasceńskiej

5.6.1. Destylacja z parą wodną

5.6.1.1. Otrzymanie i charakterystyka olejku eterycznego czarnuszki damasceńskiej

Czas destylacji z parą wodną nasion czarnuszki damasceńskiej ustaliłam obserwując przyrost objętości wydzielonego olejku eterycznego w czasie destylacji zmielonych nasion o masie 330 g. Zaobserwowałam, że po 5-ciu godzinach prowadzenia procesu (Rysunek 43), objętość olejku nie zwiększyła się. Zatem czas 5 godzin przyjąłam za właściwy do wydzielania olejku eterycznego.



Rysunek 43. Przyrost objętości olejku w czasie destylacji z parą wodną nasion *Nigella damascena*

Olejek eteryczny z nasion czarnuszki damasceńskiej był mleczno-fioletową cieczą, o zapachu przyjemnym landrynkowym z nutą kwiatową. Miał on następujące właściwości fizykochemiczne, zbliżone do danych literaturowych [Gildemeister i Hofmann, 1956]:

gęstość $d_{20} = 0,9042$ g/ml

współczynnik refrakcji $n_D^{20} = 1,4528$.

5.6.1.2. Składniki olejku eterycznego z nasion czarnuszki damasceńskiej

Olejek eteryczny do analizy składników lotnych pozyskałam metodą destylacji z parą wodną (5 godz.) nasion czarnuszki (Kujawy, 2002) z wydajnością 0,58%.

Składniki olejku eterycznego zestawiałam w Tabeli 29 w kolejności w jakiej opuszczały kolumnę CP Sil 5. Numeracja w Tabeli 29 nie jest ciągła, ponieważ metodą HS-SPME nasion zidentyfikowałam dodatkowo inne związki. Chromatogram badanego olejku przedstawiłam na Rysunku 44, numery pików składników na chromatogramie odpowiadają numerom związków podanym w Tabel 29 i innych tabelach przedstawiających składniki czarnuszki damasceńskiej.

Analiza GC-RI, GC-MS olejku nasion czarnuszki damasceńskiej oraz analiza NMR wybranych frakcji uzyskanych metodą chromatografii faszowej, pozwoliły na identyfikację ponad 40 składników, stanowiących 99,7% olejku. Prawie wszystkie zidentyfikowane składniki to węglowodory seskwiterpenowe. W oleju dominował β -elemen (59,1%), innymi głównymi składnikami były: β -selinen (12,8%), α -selinen (12,6%) i selina-4,11-dien (4,0%). Aby potwierdzić struktury głównych składników olejku, a także niektórych związków o niewielkim udziale, których identyfikacja metodą GC-MS nie była jednoznaczna, olejek poddałam destylacji frakcjonowanej pod zmniejszonym ciśnieniem. Następnie otrzymane frakcje rozdzielałam metodą wielokrotnej chromatografii faszowej (FC), aż do uzyskania frakcji o masie i zawartości składników, które pozwalały na potwierdzenie analizą NMR. Wykonane rozdziały olejku ilustruje Rysunek 19 w Części eksperymentalnej.

Węglowodory monoterpenowe i ich tlenowe pochodne

Monoterpeny występowały w oleju z nasion czarnuszki damasceńskiej w ilościach śladowych. Piki związków należących do tej grupy widoczne były jedynie na widmie GC-MS, a także we frakcjach uzyskanych metodą chromatografii faszowej. Były to: p-cymen, limonen i octan bornylu.

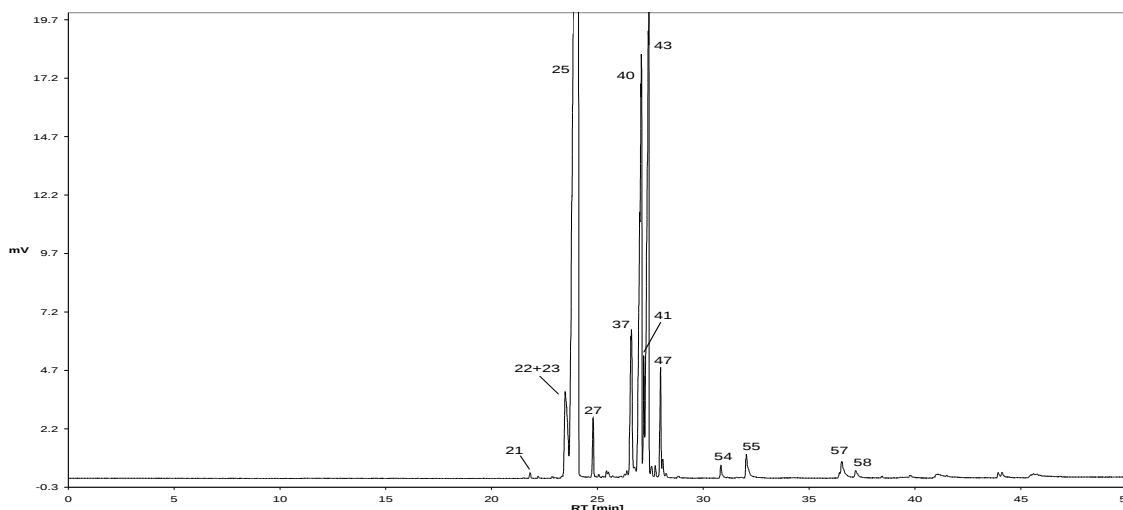
Tabela 29. Skład olejku eterycznego z nasion *Nigella damascena* (Kujawy, 2002, kolumna CP Sil 5)

Nr	Składnik	RI lit.	RI eksp.	Zawartość [%]	Metoda identyfikacji
12	p-cymen	1016	-	tr	MS
13	limonen	1025	-	tr	MS
19	octan bornylu*	1276	1280	tr	MS, RI
20	silfin-1-en*	1341	1341	tr	MS, RI
21	α -kopaen	1355	1365	tr	MS, RI
22	α -burbonen*	1378	1373	tr	MS, RI
23	β-burbonen	1386	1377	} 3,6	MS, RI, $^1\text{H-NMR}$
24	cis-β-elemen*	1381 [^]	1377		MS, RI
25	β-elemen	1389	1395	59,1	MS, RI, $^1\text{H-}, ^{13}\text{C-NMR}$
26	izolongifolen*	1393	1409	tr	MS, RI
27	izokariofilen*	1409	1415	0,9	MS, RI
28	β -ylangen*	1420	1416	tr	MS, RI
29	β -kariofilen	1421	1423	tr	MS, RI
30	selina-3,6-dien*	1424	1424	tr	MS, RI
31	γ -maalien*	1428	1427	tr	MS, RI
32	<i>trans</i> - α -bergamoten*	1434	1430	0,1	MS, RI
33	aromadendren*	1442	1435	0,1	MS, RI
34	guaia-6,9-dien*	1443	1436	tr	MS, RI
35	α -himachalen*	1450	1445	0,1	MS, RI
36	4,5-di- <i>epi</i> -aristolochen*	1470	1466	0,1	MS, RI
37	selina-4,11-dien*	1475	1472	4,0	MS, RI, $^1\text{H-NMR}$
38	germakren D	1479	1473	tr	MS, RI
40	β-selinen	1484	1487	12,8	MS, RI, $^1\text{H-}, ^{13}\text{C-NMR}$
41	γ-humulen*	1483	1489	1,7	MS, RI
42	walencen	1490	1490	tr	MS, RI
43	α-selinen	1494	1497	12,6	MS, RI, $^1\text{H-}, ^{13}\text{C-NMR}$
44	hinesen*	1495	1502	0,2	MS, RI
45	germakren A	1503	1507	0,2	MS, RI
46	α -bulnesen*	1503	1508	tr	MS, RI
47	7-<i>epi</i>-α-selinen	1519	1515	1,6	MS, RI, $^1\text{H-NMR}$
48	<i>trans</i> - β -bisabolen*	1521	1517	tr	MS, RI
49	zonaren*	1521	1518	0,3	MS, RI
51	γ -selinen*	1534	1534	tr	MS, RI
52	selina-3,7(11)-dien*	1542	1543	tr	MS, RI
54	5- <i>epi</i> -paradisiol*	1600	1604	0,3	MS, RI, $^1\text{H-NMR}$
55	eudesm-11-en-4 α -ol*	1643	1643	0,6	MS, RI, $^1\text{H-NMR}$
56	oktadec-1-en*	1799	1790	0,1	MS, RI
57	oktadekan*	1800	1794	0,6	MS, RI
58	heksadekan-1-ol*	1877	1867	0,2	MS, RI
59	nonadec-1-en*	1890	1887	tr	MS, RI
60	palmitynian metylu*	1908	1907	tr	MS, RI
61	palmitynian etylu*	1980	1980	0,3	MS, RI
62	oleinian metylu*	2081	2076	0,1	MS, RI
63	linolonian metylu*	2090	2084	0,1	MS, RI
suma zidentyfikowanych				99,7	

tr – <0,05%;

[^] – indeks retencji literaturowy na kolumnie HP-5

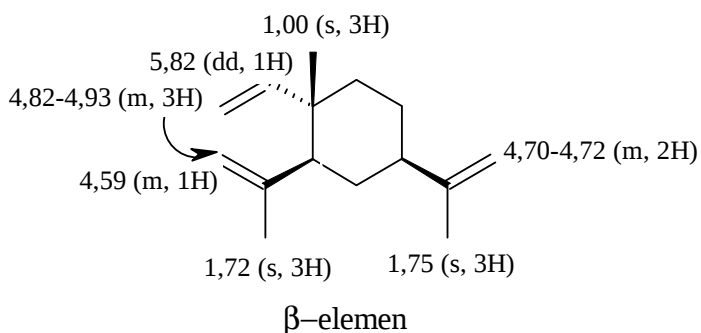
* – związek zidentyfikowany po raz pierwszy



Rysunek 44. Chromatogram gazowy olejku eterycznego z nasion *Nigella damascena* (Kujawy, 2002, kolumna CP Sil 5)

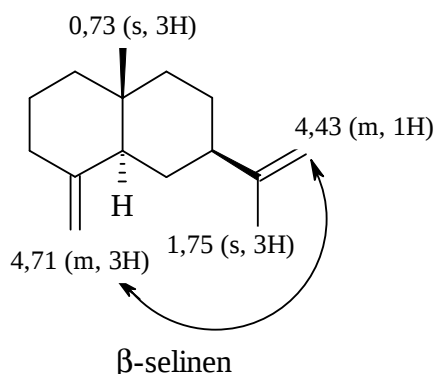
Węglowodory seskwiterpenowe

Węglowodory seskwiterpenowe to największa co do liczebności (31 związków) oraz zawartości (97,4%) grupa składników olejku. W czystości wystarczającej do potwierdzenia ich obecności metodą $^1\text{H-NMR}$ wydzieliłam z olejku: β -elemen, β -selinen i α -selinen β -burbonen, selina-4,11-dien i 7-*epi*- α -selinen. Obecność β -elemenu, β -selinen i α -selinen potwierdziłam dodatkowo analizą $^{13}\text{C-NMR}$ olejku. Eksperymentalne przesunięcia chemiczne wszystkich tych związków były zgodne z danymi literaturowymi [Joulain i König, 1998].

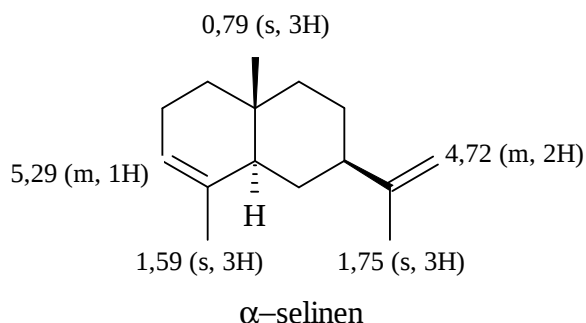


Na widmie protonowym frakcji 1.7 zawierającej 80% β -elemenu obserwowałam trzy singletowe sygnały grup metylowych, wysokie wartości przesunięć chemicznych dwóch z nich (δ 1,72 i 1,75) sugerowały bliskie sąsiedztwo wiązania wielokrotnego (podstawniki izopropenyłowe). Stwierdziłam obecność siedmiu protonów olefinowych, a obecność wiązań podwójnych charakterystycznych dla struktury β -elemenu potwierdziłam analizą $^{13}\text{C-NMR}$ olejku, zawierającego 78% tego składnika. Na widmie było sześć sygnałów pochodzących od

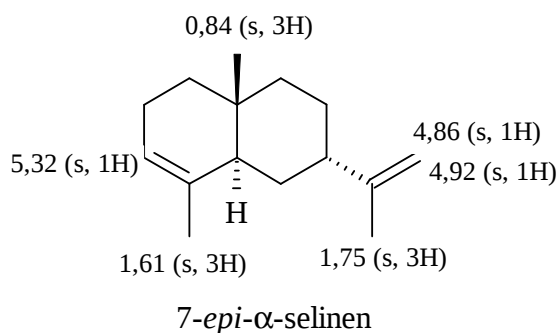
atomów węgla połączonych wiązaniem podójnym (δ 108,2; 109,7; 112,1; 147,2; 150,0; 150,3).



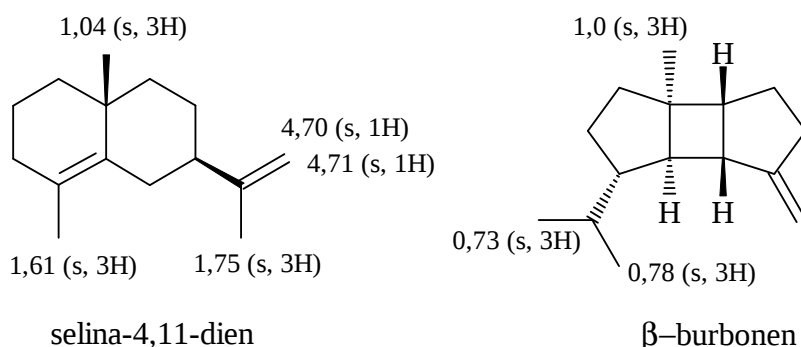
Na widmie węglowym olejku (12,8% β -selineny) widoczne były cztery sygnały pochodzące od atomów węgla połączonych wiązaniem podwójnym (δ 105,4; 108,2; 150,0; 150,1), którym na widmie ^1H -NMR frakcji 2.5 (99,6% β -selineny) w zakresie niskich pól odpowiadały sygnały protonów dwóch grup metylenowych: egzocyklicznej i z podstawnika izopropenyłowego. Znamienne było również przesunięcie chemiczne singletowego sygnału grupy metylowej podstawnika izopropenyłowego (δ 1,75). Ponadto zaobserwowałam na widmie protonowym tylko jeden singlet geminalnej grupy metylowej (0,73 ppm).



Na widmie protonowym frakcji 3.3 i 5.1 zawierających odpowiednio 51,4% i 35,7% α -selineny obserwowałam multipletowe sygnały pochodzące od protonów olefinowych (δ 4,72 i 5,29), o wartości integracji odpowiadającej trzem atomom wodoru. Ponadto widoczne były trzy sygnały singletowe (δ 0,79; 1,59; 1,75), odpowiadające trzem izolowanym grupom metylowym tego związku. Dodatkowym potwierdzeniem struktury α -selineny były między innymi obecne na widmie ^{13}C -NMR olejku zawierającego 12,6% tego składnika cztery sygnały (δ 108,3; 120,8; 134,7; 150,6), potwierdzające obecność dwóch wiązań podwójnych.



Na widmie protonowym, frakcji 3.2 zawierającej 76,3% 7-*epi*- α -selinenu, zlokalizowałam trzy singlety o przesunięciach chemicznych: 0,84; 1,61 i 1,75 ppm odpowiadające trzem grupom metylowym związku oraz sygnały charakterystyczne dla trzech protonów alkenowych (dwa wiązania podwójne). Przesunięcia chemiczne protonów podstawnika metylenowego wynosiły 4,86 i 4,92 ppm, a protonu wchodzącego w skład wiązania podwójnego pierścienia hydronaftalenowego 5,32 ppm.

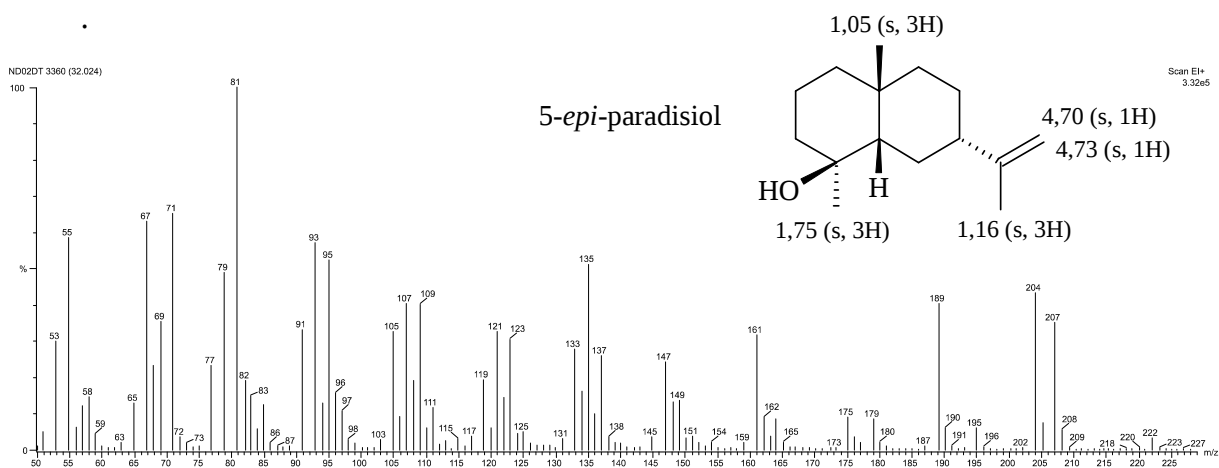


Na widmie protonowym frakcji 3.3 i 3.2 zawierających odpowiednio 34,9% i 13,2% selina-4,11-dienu widoczne były: singlet geminalnej grupy metylowej (δ 1,04) oraz dwa sygnały singletowe charakterystyczne dla grup metylowych, których przesunięcia chemiczne: 1,61 i 1,75 ppm wskazywały na sąsiedztwo wiązań podwójnych. Sygnały pochodzące od dwóch protonów olefinowych o niskich jak dla tego typu protonów wartościach przesunięcia chemicznego (4,70 i 4,71 ppm), sugerowały, iż tworzą one ugrupowanie metylenowe podstawnika izopropenyłowego. Jednocześnie stopień nienasycenia równy trzy (przy założeniu na podstawie analizy MS wzoru sumarycznego $C_{15}H_{24}$), może sugerować obecność jeszcze jednego, w tym wypadku czteropodstawionego wiązania podwójnego, co potwierdziło strukturę selina-4,11-dienu.

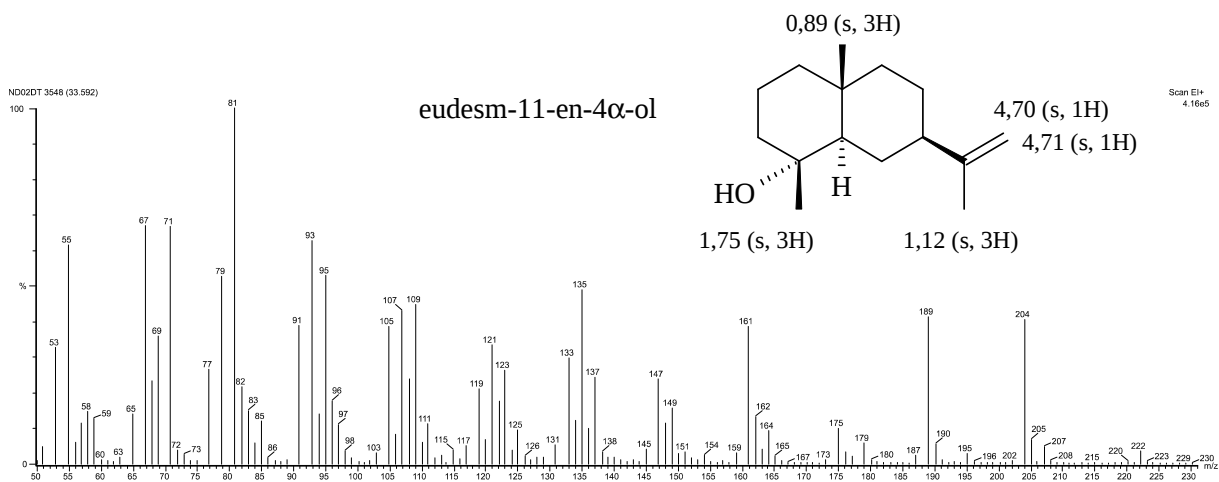
Strukturę β -burbonenu potwierdziłam porównując kilka charakterystycznych dla tego związku sygnałów odczytanych z widma 1H -NMR frakcji 1.7 (zawierającej 7,2% tego składnika) z danymi literaturowymi [Joulain i König, 1998].

Tlenowe pochodne seskwiterpenów

Tlenowe pochodne seskwiterpenów (2 składniki) stanowiące 0,9% olejku wydzieliłam metodą chromatografii faszowej z pogonu po destylacji frakcjonowanej olejku. Ich zbliżone widma MS wskazywały na podobieństwo struktur. Metodą $^1\text{H-NMR}$ frakcji 5.6 (87,3% 5-*epi*-paradisiolu) i 6.2 (69,7% eudesm-11-en-4 α -olu) potwierdziłam obecność tych alkoholi, których sygnały protonowe były zgodne z danymi literaturowymi [Kesselmans i in., 1991].



5-*epi*-Paradisiol charakteryzował się obecnością jednego wiązania podwójnego. Singlety należące do protonów olefinowych tego wiązania miały przesunięcia chemiczne o wartościach: 4,70 i 4,73 ppm. Natomiast trzy sygnały singletowe (1,05; 1,16 i 1,75 ppm) o wartości integracji wskazującej na 9 protonów ($3 \times 3\text{H}$) sugerowały obecność trzech grup metylowych, przy czym jedna z nich była podstawnikiem węgla połączonego z grupą hydroksylową.



Na widmie frakcji zawierającej eudesm-11-en-4 α -ol (selina-11-en-4 α -ol) w zakresie niskich pól widoczne były sygnały pochodzące od dwóch protonów podstawnika

izopropenylowego (4,70 i 4,71 ppm) tego związku. Zaobserwowałam ponadto trzy sygnały należące do izolowanych grup metylowych: geminalnej (0,89 ppm), izopropenylowej (1,12 ppm) oraz metylowej usytuowanej w sąsiedztwie podstawnika hydroksylowego tego seskwiterpenu.

Inne składniki

W skład olejku eterycznego z nasion *N. damascena* wchodziły również związki o strukturach innych niż terpenowe, m. in.: alkany, alkeny oraz estry kwasów tłuszczowych, które stanowiły około 1,5% olejku. Dominowały wśród nich oktadekan (0,6%), heksadekanol (0,2%) oraz palmitynian etylu (0,3%).

Olejek eteryczny z nasion *N. damascena* uzyskałam z wydajnością wyższą (0,58%) niż podawana wcześniej w literaturze (0,13-0,53%) [Fico i in., 2003; Gildemester i Hofmann 1956; Moretii i in., 2004; Wolsk i Najda, 2003]. W olejku zidentyfikowałam ponad 40 składników, 32 z nich to nowe dla tego gatunku związki, które w Tabeli 29 zostały oznaczone gwiazdką (*). W grupie wykrytych składników dominowały seskwiterpeny, w tym β -elemen jako główny. Jest to cecha charakterystyczna również olejków opisywanych w literaturze. Nie zidentyfikowałam wykrytych wcześniej w olejku w śladowych ilościach węglowodorów monoterpenowych (7 związków) i ich tlenowych pochodnych (5 związków) [Moretii i in., 2004; Fico i in., 2003].

5.6.2. Lotne składniki czarnuszki damasceńskiej wyodrębnione różnymi metodami

W celu sprawdzenia jak metoda wyodrębniania wpływa na wydajność i skład olejków oraz składników lotnych z nasion czarnuszki damasceńskiej (Kujawy, 2002) wydzieliłam związki lotne następującymi metodami:

- destylacja z parą wodną (aparat Derynga) – HD, W = 0,58%
- destylacja-ekstrakcja (aparat Likensa-Nickersona) – SDE, W = 1,02%
- ekstrakcja eterem naftowym (aparat Soxhleta), W = 33,54% (konkret) i destylacja konkretu z parą wodną (aparat Derynga) – E_n /HD, W = 1,30%
- ekstrakcja mieszaniną pentan-eter dietylowy (aparat Soxhleta), W = 31,69% (konkret) i destylacja konkretu z parą wodną (apara Derynga) – E_{pe} /HD, W = 1,00%
- mikroekstrakcja do fazy stałej nasion (HS-SPME) – SPME:

Analizę SPME nasion czarnuszki damascenskiej prowadziłam w warunkach ustalonych dla nasion czarnuszki siewnej: włókno DVB/CAR/PDMS, masa nasion 10 g, objętość fiolki 20 ml, temperatura 60°C, czas ustalania równowagi 15 min., czas ekstrakcji 30 min.

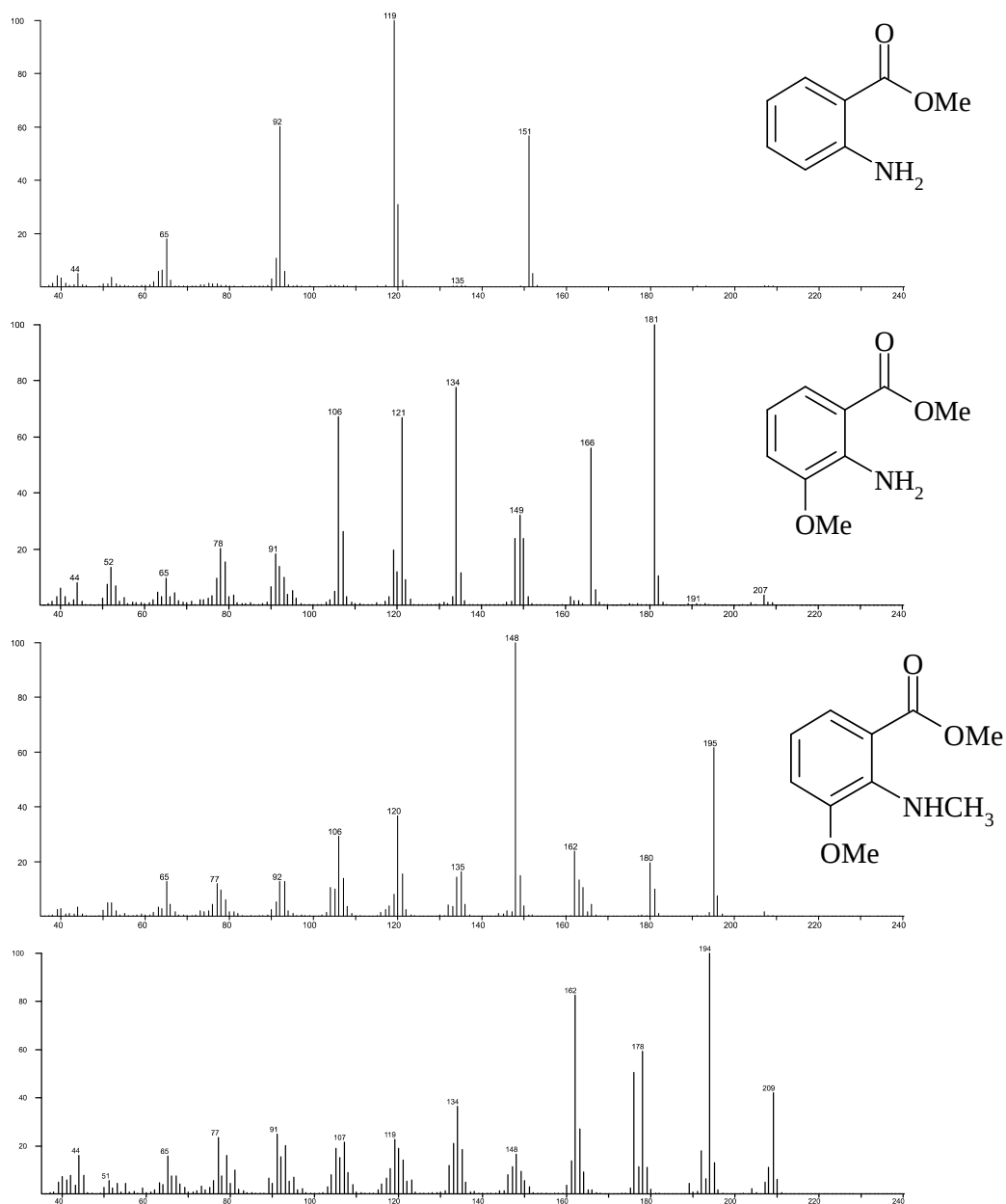
Wydajności poszczególnych metod wydzielania związków lotnych różniły się między sobą. W aparacie Likensa-Nickersona otrzymałam olejek z wydajnością 1,02% i była ona prawie dwukrotnie wyższa od wydajności olejku otrzymanego w aparacie Derynga (0,58%). Wydajności olejków lotnych pozyskanych przez destylację z parą wodną konkretów były podobne jak olejku wydzielonego w aparacie Likensa-Nickersona: olejek z konketu otrzymanego eterem naftowym (E_n/HD) – 1,30%, a z konketu pentanowo-eterowego (E_{pe}/HD) – 1,00%. Nie znalazłam informacji literaturowych na temat olejków lotnych z czarnuszki damasceńskiej. Otrzymywane wcześniej z wysoką wydajnością ekstrakty ditlenkiem węgla w stanie nadkrytycznym (około 30%) zawierały głównie kwasy tłuszczowe, a związki lotne były ich drugorzędnymi składnikami.

Skład olejków oraz związków lotnych nasion czarnuszki damasceńskiej wydzielanych i analizowanych czterema różnymi technikami zamieściłam w Tabeli 30. Metoda wydzielania składników lotnych w zasadniczy sposób determinowała skład otrzymanych produktów. Cechą wspólną wszystkich olejków oraz mieszaniny związków lotnych nasion oznaczonych metodą SPME była zdecydowana przewaga seskwiterpenów z β -elemenem jako dominującym (59-76%). Zawartości pozostałych składników zależały od stosowanej metody.

Najbogatszy w liczne związki seskwiterpenowe był olejek eteryczny (HD), w którym na 99,7% związków zidentyfikowanych, 97% stanowiły seskwiterpeny, w tym 59% β -elemen. Duży udział miały też α - i β -selinen, odpowiednio 12,6% i 12,8%. Zawartość tych dwóch związków w oleju SDE i olejkach lotnych była dużo niższa (do 4,6%). W oleju eterycznym zidentyfikowałam również wyższe węglowodory alifatyczne oraz estry kwasów tłuszczowych (około 1%), związków tych – z wyjątkiem oktadekanu – nie oznaczyłam w innych olejkach.

Metodami destylacji z parą wodną-ekstrakcji i destylacji z parą wodną konketu, otrzymałam olejki z bardzo podobną wydajnością i o podobnym składzie. Tak jak olejek eteryczny, nie zawierały one najbardziej lotnych związków, zawierały natomiast znacznie więcej β -elemenu (ponad 70%) oraz dwa związki azotowe: 3-metoksyantranilan metylu (do 0,1%) i 3-metoksy-N-metyloantranilan metylu (damascenina, do 10,6%) (Rysunek 45). Obie te pochodne antranilanu metylu były wcześniej zidentyfikowane w oleju otrzymanym w aparacie Likensa-Nickersona (odpowiednio do 0,2% i do 3,2%) [Fico i in., 2003]. Brak związków azotowych w olejkach destylowanych z parą wodną, mógł wynikać z ich częściowej rozpuszczalności w wodzie lub rozkładu podczas długotrwałej destylacji.

Dauksas i in. [2002] w analizowanym oleju tłoczonym na zimno oraz ekstraktach: eterem etylowym (aparatury Soxhleta) i ditlenkiem węgla z nasion czarnuszki, zaobserwowali pik związku, którego nie zidentyfikowali, a który stanowił do 21% ekstraktów. Podane przez autorów wartości m/z widma masowego, po porównaniu z widmem zidentyfikowanej przez mnie damasceniny, wskazują, że był to ten związek.



Rysunek 45. Widma MS i wzory antranilanu metylu, 3-metoksyantranilanu metylu i damasceniny (3-metoksy-N-metyloantranilanu metylu) oraz związku niezidentyfikowanego (39)

Tabela 30. Składniki lotne nasion *Nigella damascena* (Kujawy, 2002) wydzielone różnymi metodami

Nr	Składnik	Kujawy 2002				
		HD	SPME	SDE	E _n /HD	E _{pe} /HD
		Zawartość [%]				
2	kwas octowy*	-	tr	-	-	-
3	2-etylofuran*	-	tr	-	-	-
4	maślan etylu*	-	tr	-	-	-
5	maślan izopropylu*	-	tr	-	-	-
6	2-metylomaślan etylu*	-	tr	-	-	-
12	p-cymen	-	tr	-	-	-
13	limonen	-	tr	-	-	-
16	kapronian izopropylu*	-	tr	-	-	-
18	antranilan metylu*	-	tr	-	-	-
19	octan bornylu*	tr	tr	-	-	-
20	silfin-1-en*	tr	tr	0,1	0,1	0,1
21	α-kopaen	tr	tr	-	tr	tr
22	α-burbonen*	tr	-	-	-	-
23	β-burbonen	} 3,6	5,8	5,7	4,4	5,0
24	cis-β-elemen*					
25	β-elemen	59,1	76,3	75,6	72,8	74,0
26	izolongifolen*	tr	tr	-	tr	tr
27	izokariofilen*	0,9	1,1	0,4	0,7	0,7
28	β-ylangen*	tr	-	-	-	-
29	β-kariofilen	tr	tr	-	tr	tr
30	selina-3,6-dien*	tr	tr	-	-	-
31	γ-maalien*	tr	-	-	-	-
32	<i>trans</i> -α-bergamoten*	0,1	-	-	tr	tr
33	aromadendren*	0,1	tr	-	tr	tr
34	guaia-6,9-dien*	tr	-	-	-	-
35	α-himachalen*	0,1	tr	-	-	tr
36	4,5-di- <i>epi</i> -aristocholen*	0,1	tr	0,2	tr	tr
37	selina-4,11-dien*	4,0	0,9	1,0	0,9	0,9
38	germakren D	tr	tr	-	0,2	0,2
39	n.z. M 209	-	1,1	-	0,5	0,5
40	β-selinen	12,8	1,7	0,9	3,9	3,9
41	γ-humulen*	1,7	-	-	-	-
42	walencen	tr	-	-	-	-
43	α-selinen	12,6	0,8	2,2	4,3	4,6
44	hinesen*	0,2	-	-	-	-
45	germakren A	0,2	tr	0,1	0,2	0,2
46	α-bulnesen*	tr	-	-	-	-
47	7-<i>epi</i>-α-selinen	1,6	1,1	1,0	3,9	4,0
48	<i>trans</i> -β-bisabolen*	tr	-	-	-	-
49	zonaren*	0,3	-	0,2	tr	0,2
50	3-metoksyantranilan metylu	-	1,1	0,1	tr	tr
51	γ-selinen*	tr	-	-	-	-
52	selina-3,7(11)-dien*	tr	-	-	-	-
53	damascenina	-	6,9	10,6	6,5	4,6
54	5- <i>epi</i> -paradisiol*	0,3	-	-	-	-
55	eudesm-11-en-4α-ol*	0,6	tr	-	-	-
56	oktadec-1-en*	0,1	tr	-	-	-
57	oktadekan*	0,6	tr	1,3	0,2	tr
58	heksadekan-1-ol*	0,2	tr	-	-	-
59	nonadecen*	tr	-	-	-	-
60	palmitynian metylu*	tr	tr	-	-	-
61	palmitynian etylu*	0,3	tr	-	-	-
62	oleinian metylu*	0,1	-	-	-	-
63	linolenian metylu*	0,1	-	-	-	-
suma zidentyfikowanych		99,7	96,8	99,4	98,6	98,9
wydajność oleju		0,58	-	1,02	1,30	1,00

tr – <0,05%; - - związek niewykryty; n.z. – związek niezidentyfikowany (194/162/178/134, M209);

* – związek zidentyfikowany po raz pierwszy

Wśród składników wydzielonych metodą SPME zlokalizowałam pik związku, którego nie zidentyfikowałam (39, RI 1,1%). Miał on nieparzystą masę molową (209), sugerującą obecność jednego atomu azotu, a charakter widma wskazywał, że jest to pochodna kwasu antranilowego. Związek ten był też obecny w olejku lotnym (0,5%).

Olejki lotne E_n/HD i E_{pe}/HD otrzymywałam z konkretów, które wydzieliłam z podobną wydajnością: 33,54% (ekstrakcja eterem naftowym) i 31,69% (ekstrakcja mieszaniną pentan:eter dietylowy). Wydajności były zbliżone do wartości literaturowych (33,56%, ekstrakcja eterem dietylowym) [Dauksas i in., 2002].

Składniki nasion czarnuszki damasceńskiej charakteryzujące się wyższą niż seskwiterpeny lotnością zidentyfikowałam jedynie metodą SPME. Do grupy tej należały monoterpény i estry niższych kwasów (masłowego, kapronowego). Zidentyfikowałam ponadto siarczki dimetylu i antranilan metylu, które mimo śladowych zawartości w nasionach czarnuszki tworzą jej charakterystyczny zapach. Obok najbardziej licznej i stanowiącej najwyższy udział procentowy grupy seskwiterpenów, w tym β -elemenu (76,3%), metodą SPME zidentyfikowałam dwie metoksyłowe pochodne antranilanu metylu, które nie występowały w olejku eterycznym (Kujawy, 2002).

W przypadku nasion *N. damascena* metoda SPME okazała się bardziej odpowiednia w analizie składników lotnych niż techniki tradycyjne (destylacja, ekstrakcja).

5.6.2.1. Porównanie metody SPME z destylacją z parą wodną

W celu sprawdzenia, czy różnice w składzie olejku eterycznego i ekstrakcji HS-SPME jednej partii czarnuszki damasceńskiej nie były przypadkowe, a równocześnie porównania składu olejku eterycznego z różnych lat i miejsc zbioru, analizowałam dodatkowo dwie partie surowca ze zbiorów w 2005 r. z Kujaw i Lubelszczyzny. Wyniki zestawiałam w Tabeli 31 razem z wynikami analizy nasion: Kujawy, 2002. Chromatogramy gazowe związków lotnych nasion (Kujawy, 2002) otrzymanych tymi dwiema metodami umieściłam na Rysunku 46.

Potwierdziłam wcześniejsze swoje obserwacje o obecności tylko w fazie nadpowierzchniowej: licznych monoterpenu, estrów niższych kwasów (masłowego, kapronowego), antranilanu metylu i 3-metoksyantranilanu metylu oraz dużo wyższej zawartości 3-metoksy-N-metyloantranilanu metylu. Natomiast w olejku eterycznym były obecne jedynie alkan, alkeny i estry kwasów tłuszczowych.

Tabela 31. Skład olejku eterycznego i fazy nadpowierzchniowej nasion *Nigella damascena* z różnych miejsc (kolumna CPSil 5)

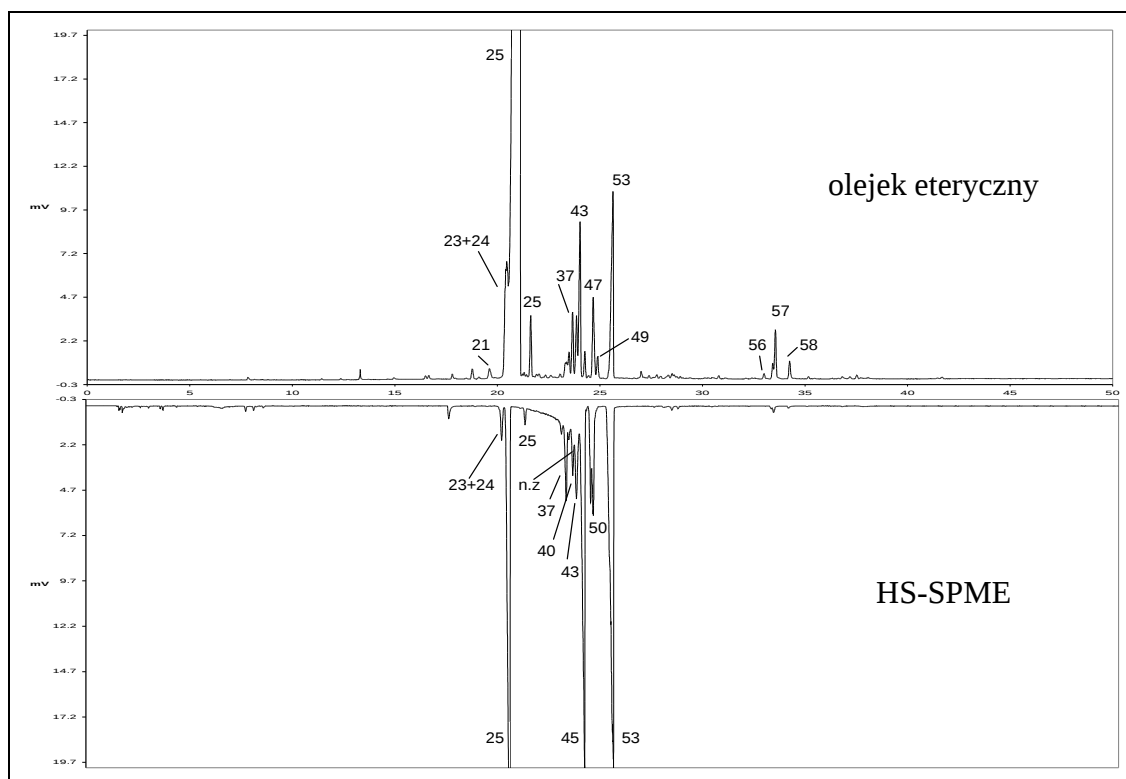
Nr	Składnik	RI _{lit.}	RI _{eksp.}	Kujawy 2002		Kujawy 2005		Lubelszczyzna 2005	
				HD	SPME	HD	SPME	HD	SPME
1	siarczek dimetylu*	505 [^]	-	-	-	-	0,1	-	0,1
2	kwask octowy*	600 [^]	-	-	tr	-	0,2	-	0,1
3	2-etylofuran*	717 [^]	719	-	tr	-	tr	-	tr
4	maślan etylu*	804 [^]	822	-	tr	-	tr	-	tr
5	maślan izopropylu*	847 [^]	830	-	tr	-	tr	-	tr
6	2-metylomaślan etylu*	849 [^]	869	-	tr	-	tr	-	tr
7	tricyklen*	915	916	-	-	-	tr	-	tr
8	α -pinen	935	930	-	-	-	tr	-	tr
9	β -pinen	974	972	-	-	-	tr	-	tr
10	mircen	983	979	-	-	-	tr	-	tr
11	3-karen*	1006	1003	-	-	-	tr	-	tr
12	p-cymen	1016	1008	-	tr	tr	tr	0,4	0,1
13	limonen	1025	1020	-	tr	-	tr	-	tr
14	(Z)- β -ocymen*	1025	1026	-	-	-	tr	-	tr
15	(E)- β -ocymen*	1041	1043	-	-	-	tr	-	tr
16	kapronian izopropylu*	1046 [^]	1049	-	tr	-	tr	-	tr
17	γ -terpinen	1055	1057	-	-	-	-	-	tr
18	octan bornylu*	1276	1280	tr	tr	0,1	0,1	0,1	-
19	antranilan metylu*	1354 [^]	1338	-	tr	-	tr	-	tr
20	silfin-1-en*	1341	1341	tr	tr	tr	tr	tr	tr
21	α -kopaen	1355	1365	tr	tr	-	0,2	tr	tr
22	α -burbonen*	1378	1373	tr	-	-	-	-	-
23	β-burbonen	1386	1377	} 3,6	5,8	3,8	1,6	3,9	1,1
24	cis-β-elemen*	1381[^]	1377						
25	β-elemen	1389	1395	59,1	76,3	81,2	26,8	58,1	14,0
26	izolongifolen*	1410	1409	tr	tr	tr	tr	tr	tr
27	izokariofilen*	1409	1415	0,9	1,1	0,5	0,5	0,7	0,4
28	β -ylangen*	1420	1416	tr	-	-	-	tr	tr
29	β -kariofilen	1421	1423	tr	tr	tr	-	tr	-
30	selina-3,6-dien*	1424	14124	tr	tr	tr	-	0,1	-
31	γ -maalien*	1428	1427	tr	-	-	-	-	-
32	trans- α -bergamoten*	1434	1430	0,1	-	tr	tr	0,1	-
33	aromadendren*	1442	1435	0,1	tr	0,4	tr	0,2	tr
34	guaia-6,9-dien*	1443	1436	tr	-	-	-	-	-
35	α -himachalen*	1450	1445	0,1	tr	tr	tr	-	-
36	4,5-di- <i>epi</i> -aristolochen*	1470	1466	0,1	tr	0,4	tr	0,5	tr
37	selina-4,11-dien*	1475	1472	4,0	0,9	1,0	3,6	1,8	1,9
38	germakren D	1479	1473	tr	tr	-	-	-	-
39	n.z. M209		1475	-	1,1	-	4,1	-	6,8
40	β-selinen	1484	1487	12,8	1,7	0,9	3,2	7,9	6,5
41	γ -humulen*	1484	1489	1,7	-	-	-	-	-
42	walencen	1490	1490	tr	-	-	-	-	-
43	α-selinen	1494	1497	12,6	0,8	2,4	5,3	8,5	9,0
44	hinensen*	1495	1502	0,2	-	-	-	-	-
45	germakren A	1503	1507	0,2	tr	0,4	18,9	tr	17,6
46	α -bulnesen*	1503	1508	tr	-	tr	-	tr	-
47	7-<i>epi</i>-α-selinen*	1519	1515	1,6	1,1	1,4	2,8	8,6	8,2
48	trans- β -bisabolen*	1521	1517	tr	-	-	-	-	-
49	zonaren*	1521	1518	0,3	-	0,3	-	0,2	-

Tabela 31. c.d.

Nr	Składnik	RI _{lit.}	RI _{eksp.}	Kujawy 2002		Kujawy 2005		Lubelszczyzna 2005	
				HD	SPME	HD	SPME	HD	SPME
50	3-metoksyantranilan metylu		1519	-	1,1	-	4,5	-	2,5
51	γ-selinen*	1534	1534	tr	-	-	-	-	-
52	selina-3,7(11)-dien*	1542	1543	tr	-	-	-	-	-
53	3-metoksy-N-metylo antranilan metylu		1536	-	6,9	3,7	24,6	4,1	28,3
54	5- <i>epi</i> -paradisiol*	1600	1604	0,3	-	-	tr	tr	tr
55	eudesm-11-en-4α-ol*	1643	1643	0,6	tr	tr	tr	tr	tr
56	oktadec-1-en*	1799	1790	0,1	tr	0,2	0,1	0,4	0,1
57	oktadekan*	1800	1794	0,6	tr	0,7	0,2	1,0	0,3
58	heksadekan-1-ol*	1877	1867	0,2	tr	0,3	0,1	0,4	0,1
59	nonadec-1-en*	1890	1887	tr	-	tr	tr	tr	tr
60	palmitynian metylu*	1908	1907	tr	tr	tr	-	tr	0,2
61	palmitynian etylu*	1980	1980	0,3	tr	tr	-	tr	0,1
62	oleinian metylu*	2081	2076	0,1	-	tr	-	tr	0,1
63	linolenian metylu*	2090	2084	0,1	-	-	-	tr	-
suma zidentyfikowanych				99,7	96,8	97,7	96,9	97,0	97,5
wydajność olejku				0,58		0,40		0,30	

tr – <0,05%; - – związek niewykryty; n.z. – związek niezidentyfikowany (m/z 194/162/178/134, M209)

^ – indeksy retencji literaturowe na kolumnie HP-5 lub DB-5;

* – związki zidentyfikowane po raz pierwszy w olejku *Nigella damascena*

Rysunek 46. Chromatogram gazowy oleju eterycznego i fazy nadpowierzchniowej nasion

Nigella damascena (Kujawy, 2005), (kolumna CP Sil 5)

Metodą SPME oznaczyłam w 2005 r. dużo niższą zawartość β -elemenu niż w 2002 r., ale też niższą niż w olejkach 2005 r., natomiast znaczną zawartość germakrenu A (około 18%). Prawdopodobnie β -elemen tworzy się podczas destylacji z parą wodną z germakrenu A, związku podobnie mało trwałego jak germakren D [Bülow, 1998].

Analiza SPME trzech partii nasion połączona z metodami chromatograficznymi (GC i GC-MS) pozwoliła zidentyfikować ponad 50 składników, stanowiących około 97% związków wyeluowanych z kolumny GC. Zidentyfikowane związki należały głównie do seskwiterpenów i pochodnych antranilanu metylu, niewielki był udział dość licznej grupy monoterpenów. Dzięki zastosowaniu techniki SPME oznaczyłam najbardziej lotne składniki nasion czarnuszki, nie tylko monoterpeny, ale również niskocząsteczkowe estry kwasu masłowego, kapronowego, kwas octowy, siarczek dimetylu, etylofuran. Związki te nadają nasionom czarnuszki charakterystyczny aromat, dzięki któremu znajdują one zastosowanie w przemyśle spożywczym. Spośród zidentyfikowanych monoterpenów: tricyklen, 3-karen, β -ocymeny oraz octan bornylu były nowymi składnikami nasion czarnuszki. Pozostałe zidentyfikowane węglowodory monoterpenowe oznaczono tylko w olejku eterycznym *N. damascena* [Fico i in., 2003; Moretti i in., 2004].

Cechą charakterystyczną składu fazy nadpowierzchniowej nasion była również obecność związków azotowych – pochodnych kwasu antranilowego, stanowiących w zależności od pochodzenia surowca, nawet do 35% składników lotnych nasion zaadsorbowanych na włóknie SPME. Były to: antranilan metylu (ilość śladowa), 3-metoksyantranilan metylu (1-4,5%) i damascenina (3-metoksy-N-metylo-antranilan metylu, 7-28%). Z grupy składników nieterpenowych zidentyfikowanych zarówno w olejkach, jak i fazy nadpowierzchniowej oznaczone zostały wcześniej tylko 3-metoksyantranilan metylu i damascenina [Fico i in., 2003; Moretti i in., 2004], pozostałe to nowe dla *N. damascena* składniki. Kilka estrów kwasów tłuszczowych (kapronowego, stearynowego i linolenowego) zostało zidentyfikowanych w ekstraktach z nasion czarnuszki z Litwy [Dauksas i in. 2002], nie są to jednak te same estry które oznaczyłam w olejku i fazy nadpowierzchniowej nasion *N. damascena* z Polski. Żadną też z wykorzystywanych metod nie oznaczyłam kwasów tłuszczowych, a związki te występowały bardzo licznie w ekstraktach z nasion rośliny [Dauksas i in. 2002].

Metoda SPME okazała się konkurencyjna wobec tradycyjnych technik izolowania składników lotnych nasion czarnuszki damasceńskiej.

5.7. Składniki lotne nasion czarnuszki damasceńskiej – podsumowanie i wnioski

W momencie rozpoczęcia przeze mnie badań składników lotnych czarnuszki damasceńskiej dane literatuowe na ten temat były bardzo ubogie. W latach 2002-2005 ukazało się jednak 5 publikacji, których przeglądu dokonałam w części literaturowej niniejszej pracy. **Podsumowanie** rezultatów moich badań jest następujące:

- Wydajność z jaką pozyskałam olejki zależała od zastosowanej metody wyodrębniania, pochodzenia surowca i roku zbioru:
 - Olejek eteryczny otrzymałam z wydajnością podobną do podawanej w literaturze (0,30-0,58%).
 - Olejki lotne oraz olejek otrzymany w aparacie Likensa-Nickersona były pozyskane z większą wydajnością (1,0-1,3%).
- Metoda wydzielania składników lotnych nasion w zasadniczy sposób wpływała na skład zarówno jakościowy, jak i ilościowy.
 - W olejku eterycznym zidentyfikowałam 40 składników, w ogromnej przewadze węglowodory seskwiterpenowe: β -elemen (58-81%) oraz α -, 7-*epi*- α - i β -selinen.
 - Skład olejków lotnych był wzajemnie bardzo zbliżony, ale odmienny od składu olejku eterycznego. Cechą odróżniającą była obecność pochodnych kwasu antranilowego w olejkach lotnych.
 - Metodą HS-SPME jako jedyną wykryłam (oprócz seskwiterpenów i pochodnych kwasu antranilowego) najbardziej lotne składniki w dużym stopniu determinujące charakterystyczny zapach nasion.
- Spośród 63 zidentyfikowanych różnymi technikami składników lotnych *N. damascena*, 44 to związki nowe dla nasion tej rośliny składniki.

Wnioski

- Uprawiana w Polsce czarnuszka damasceńska jest równie dobrym surowcem olejkodajnym, jak czarnuszka z innych rejonów świata.
- Najdokładniejszą, a równocześnie najszybszą metodą oceny składu lotnych związków nasion czarnuszki damasceńskiej była metoda HS-SPME.
- Najkorzystniejszą metodą pozyskiwania olejku z nasion czarnuszki damasceńskiej była destylacja z parą wodną-ekstrakcja.

Czarnuszka orientalna

5.8. Materiał

Materiał do badań stanowiły nasiona czarnuszki orientalnej uprawianej w Polsce pozyskane od następujących firm konfekcjonujących ten surowiec

- Torseed – Przedsiębiorstwo Nasiennictwa Ogrodniczego i Szkółkarstwa, Toruń, (pochodzenie nasion: Mazowsze): 2002 r.
- Przedsiębiorstwo Nasiennictwa Ogrodniczego i Szkółkarstwa, Ożarów Mazowiecki, (pochodzenie nasion: Kujawy): 2002 r. i 2005 r.

5.9. Wydzielanie składników lotnych nasion czarnuszki orientalnej

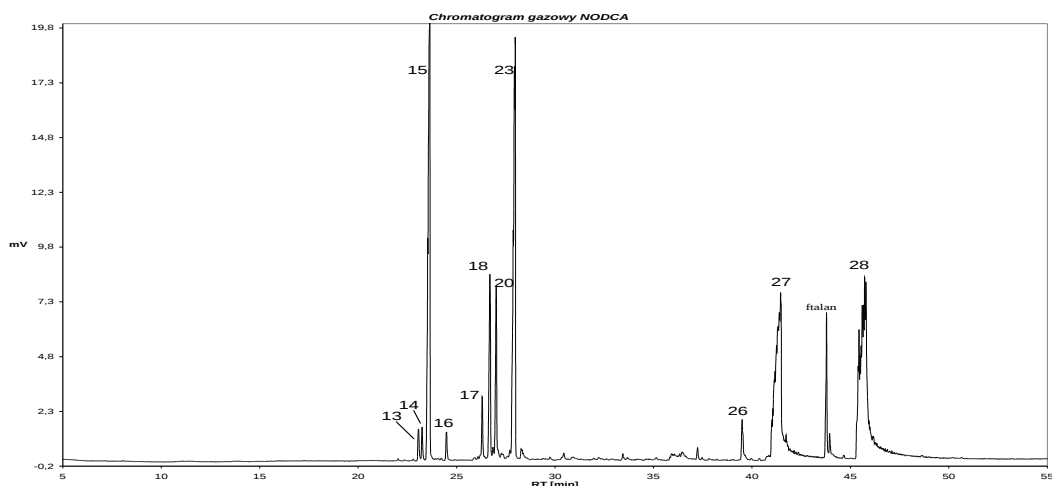
5.9.1. Destylacja z parą wodną

W wyniku destylacji z parą wodną zmielonych nasion czarnuszki orientalnej uprawianej na Mazowszu w latach 2002 i 2005 oraz na Kujawach w 2005 r. uzyskałam olejek eteryczny, z wydajnością odpowiednio 0,03% i 0,04%. Olejek był mętny i miał zapach roztartego ziarna maku. Zawierał duże ilości kwasów tłuszczowych, utrudniających analizę GC. Aby uniknąć obecności kwasów w olejku, przeprowadziłam destylację surowca z dodatkiem roztworu węglanu wapnia (II) (masa: masa CaCO_3 , 10:1). Zabieg ten tylko w niewielkim stopniu wpłynął na zmniejszenie ilości kwasów tłuszczowych w olejku eterycznym, ale jednocześnie spowodował obniżenie wydajności olejku do 0,01%. W związku z tym badałam skład olejków wydzielanych w procesie destylacji nasion bez dodatku CaCO_3 .

5.9.1.1. Składniki olejku eterycznego czarnuszki orientalnej

Skład chemiczny olejku eterycznego z nasion *N. orientalis* przedstawiony jest w Tabeli 32. Związki wymienione są w kolejności opuszczania kolumny CP Sil 5, a nieciągła numeracja wynika z faktu, że dodatkowe składniki lotne zidentyfikowałam metodą HS-SPME. Rysunek 47 przedstawia chromatogram olejku (Mazowsze, 2002). Numery pików na chromatogramie odpowiadają numerom związków podanym w Tabelach 32 i 33. Analiza GC i GC-MS olejków pozwoliła na identyfikację 20 składników, wśród których dominowały węglowodory seskwiterpenowe. Zidentyfikowane związki stanowiły w poszczególnych partiach surowca od 85% do 95% olejku. Głównymi składnikami były seskwiterpeny: β -elemen i δ -kadinen, stanowiące w sumie od 36% do

62%. Kwasy palmitynowy i linolowy stanowiły od 18% do 42%. W olejku znajdowały się również niewielkie ilości monoterpenu i alkanów. Skład jakościowy olejków pozyskanych z nasion uprawianych na Mazowszu i Kujawach był podobny, natomiast bardzo różnicowane były zawartości poszczególnych składników.



Rysunek 47. Chromatogram gazowy olejku eterycznego nasion *Nigella orientalis* (kol.CP Sil 5)

Tabela 32. Skład olejku eterycznego nasion *Nigella orientalis* (kolumna CP Sil 5)

Nr	Składnik	RI _{lit.}	RI _{eksp.}	HD			SDE
				Mazowsze 2002	Mazowsze 2005	Kujawy 2005	Mazowsze 2002
				Zawartość [%]			
8	p-cymen	1012	1016	-	0,1	tr	-
9	limonen	1025	1021	-	0,1	tr	-
10	γ-terpinen*	1055	1049	-	0,1	tr	-
12	octan bornylu*	1273	1272	tr	0,1	tr	-
13	α-kopaen	1379	1375	0,8	0,4	0,5	0,2
14	cis-β-elemen	1381 [^]	1380	0,8	2,5	3,7	0,5
15	β-elemen	1389	1391	18,3	33,8	49,2	9,8
16	izokariofilen*	1409	1416	0,7	0,7	1,1	0,2
17	selina-4,11-dien*	1475	1472	1,4	0,4	1,2	tr
18	β-selinen	1484	1484	4,9	1,4	2,8	0,1
19	walencen*	1490	1490	0,1	-	-	-
20	α-selinen	1494	1494	4,2	1,4	2,7	0,7
21	germakren A	1503	1502	tr	1,0	1,1	0,6
22	7-epi-α-selinen	1519	1516	0,2	0,5	0,6	tr
23	δ-kadinen	1520	1524	17,4	15,0	12,6	8,8
24	heksadekan*	1600	1603	0,2	0,6	0,6	-
25	palmitynian metylu*	1908	1916	1,3	0,3	0,2	tr
26	kw. palmitynowy*	1942	1955	18,6	9,4	6,7	18,4
27	kw. linolowy *	2113	2129	23,3	17,5	11,2	44,7
suma zidentyfikowanych				95,3	85,2	94,2	84,4
wydajność olejku				0,03	0,03	0,04	0,07

tr – ilości śladowe (<0,05); - - związek niewykryty

[^] – indeks retencji literaturowy na kolumnie HP-5

Skład jakościowy olejku eterycznego (HD) z nasion czarnuszki orientalnej pozyskanej z dwóch regionów Polski oraz dwóch lat zbioru był zbliżony, ale skład ilościowy różnił się. Olejek z nasion z upraw w 2005 r. charakteryzował się wyższą (33,8% i 49,2%) niż uprawy z 2002 r. (18,3%) zawartością głównego składnika β -elemenu, a niższą δ -kadienu oraz obecnością większej ilości monoterpenu, co mogło być spowodowane np. innymi warunkami przechowywaniem nasion.

5.9.2. Inne metody otrzymywania olejku

Składniki lotne nasion *N. orientalis* (Mazowsze, 2002) wydzieliłam również metodą destylacji z parą wodną-ekstrakcji (SDE, Tabela 32) z wydajnością prawie dwukrotnie wyższą 0,07% niż w aparacie Derynga. Olejek (SDE) całkowicie różnił się składem od olejku otrzymanego w aparacie Derynga (HD), miał dużo niższą zawartość seskwiterpenów takich jak: selina-4,11-dien, β -i α -selinen, δ -kadinen, ale zawierał więcej kwasów tłuszczowych (ponad 60%). Metoda jednoczesnej destylacji-ekstrakcji okazała się nieprzydatna do wydzielenia składników lotnych z tego gatunku czarnuszki.

W wyniku destylacji z parą wodną konkretnie, otrzymanego przez ekstrakcję nasion eterem naftowym (wydajność 35,3%, Mazowsze 2002), uzyskałam z wydajnością 1,13% olejek lotny o składzie całkowicie odmiennym od składu olejków eterycznych i frakcji lotnej analizowanej metodą SPME. Zawierał on bowiem tylko nasycone i nienasycone węglowodory alifatyczne.

5.9.3. Porównanie metody SPME z destylacją z parą wodną

Analizę HS-SPME nasion *N. orientalis* przeprowadziłam w warunkach ustalonych wcześniej dla nasion czarnuszki siewnej tzn: włókno DVB/CAR/PDMS masa zmielonych nasion 10 g, objętość fiolki 20 ml, temperatura łaźni wodnej 60°C, czas ustalania równowagi 15 min., czas ekstrakcji 30 min. Badałam nasiona uprawiane w 2005 r. na Mazowszu i Kujawach. W fazie nadpowierzchniowej zidentyfikowałam metodą SPME 23 składniki, stanowiące odpowiednio 80,2% i 96,1% (Tabela 33, Rysunek 48). Poza węglowodorami seskwiterpenowymi, będącymi składnikami olejku eterycznego, wykryłam liczne monoterpenu (7 węglowodorów i octan bornylu), ale również kwas octowy, but-2-enal i kaprońian izobutylu. Dzięki zastosowaniu techniki SPME zidentyfikowałam w nasionach najbardziej lotne składniki, których obecności nie stwierdziłam w olejku. Składniki te występowały w olejkach eterycznym i lotnym w ilościach tak niewielkich, że

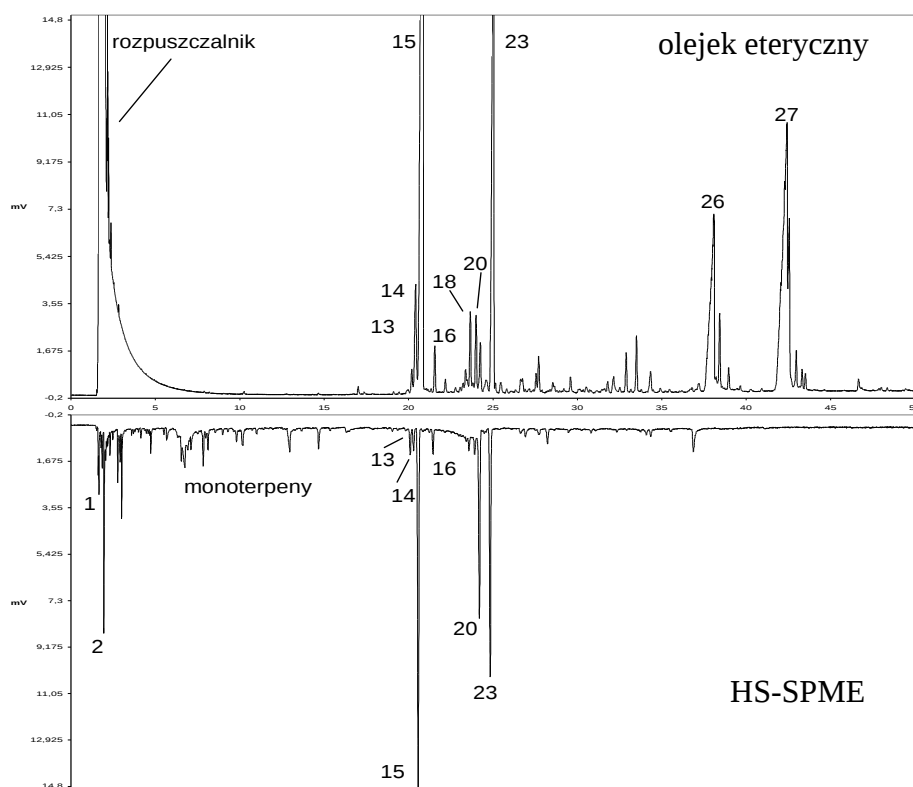
nie wykryłam ich. Olejek eteryczny zawierał dużą ilość kwasów tłuszczowych i innych związków wysokocząsteczkowych utrudniających analizę GC. Związki te nie były adsorbowane na włóknie SPME.

Tabela 33. Skład olejku eterycznego i fazy nadpowierzchniowej nasion *Nigella orientalis* z różnych miejsc (Mazowsze i Kujawy, 2005), (kolumna CP Sil 5)

Nr	Składnik	RI _{lit.}	RI _{eksp.}	Mazowsze 2005		Kujawy 2005	
				HD	SPME	HD	SPME
1	kwas octowy*	600 [^]	580	-	2,9	-	1,5
2	but-2-enal*	657 [^]	631	-	5,2	-	6,2
3	tricyklen*	915	920	-	0,2	-	0,2
4	α -tujen*	926	928	-	0,1	-	0,1
5	α -pinen*	935	932	-	0,1	-	0,1
6	mircen*	983	991	-	0,8	-	0,2
7	α -terpinen*	1013	1015	-	1,1	-	0,7
8	p-cymen	1016	1016	0,1	2,2	tr	5,6
9	limonen	1025	1021	0,1	1,8	tr	0,3
10	γ -terpinen*	1055	1049	0,1	0,2	tr	0,2
11	kapronian izobutylu*	1149 [^]	1164	-	1,9	-	1,4
12	octan bornylu*	1273	1272	0,1	-	tr	-
13	α -kopaen	1379	1375	0,4	1,5	0,5	1,1
14	cis- β -elemen	1381 [^]	1380	2,5	1,4	3,7	1,5
15	β-elemen	1389	1391	33,8	26,0	49,2	43,3
16	izokariofilen*	1409	1416	0,7	1,5	1,1	1,7
17	selina-4,11-dien*	1475	1472	0,4	0,8	1,2	1,3
18	β -selinen	1484	1484	1,4	1,2	2,8	1,7
20	α-selinen	1494	1494	1,4	13,2	2,7	16,4
21	germakren A	1503	1502	1,0	tr	1,1	0,4
22	7-epi- α -selinen	1519	1516	0,5	-	0,6	-
23	δ-kadinen	1520	1524	15,0	16,1	12,6	11,1
24	heksadekan*	1600	1603	0,6	tr	0,6	0,1
25	palmitynian metylu*	1908	1916	0,3	2,0	0,2	1,0
26	kwas palmitynowy*	1942	1955	9,4	-	6,7	-
27	kwas linolowy*	2113	2129	17,5	-	11,2	-
suma zidentyfikowanych				85,2	80,2	94,2	96,1

tr – <0,05%; – – związek niewkryty

[^] – indeks retencji literaturowy na kolumnie HP-5 lub DB-5



Rysunek 48. Chromatogram gazowy olejku eterycznego i fazy nadpowierzchniowej nasion *Nigella orientalis* (Mazowsze, 2005; kolumna CP Sil 5)

5.10. Składniki lotne nasion czarnuszki orientalnej – podsumowanie i wnioski

Podsumowując przeprowadzone badania mogę powiedzieć, iż:

- Nasiona czarnuszki orientalnej zawierają niewiele olejku eterycznego (0,03-0,04%).
- Wykorzystując różne techniki zidentyfikowałam w nasionach 27 związków lotnych, w tym 17 nowych dla tego surowca.
- Metodą najbardziej skuteczną w analizie lotnych składników z czarnuszki orientalnej była metoda HS-SPME, tylko tą metodą oznaczyłam najbardziej lotne związki.
- Olejek eteryczny zawierał duże ilości kwasów tłuszczowych (do 40%).
- Metody destylacji z parą wodną-ekstrakcji i destylacji konkretów były nieodpowiednie dla tego surowca.

Wnioski

- Nasiona czarnuszki orientalnej nie są surowcem olejkodajnym. Zarówno wydajność związków lotnych, jak i skład oraz będący jego pochodną zapach nie są interesujące.

5.11. Właściwości przeciwdrobnoustrojowe olejków z nasion *Nigella sativa* i *Nigella damascena*

Badania zostały wykonane we współpracy z Instytutem Technologii Fermentacji i Mikrobiologii PŁ.

Olejki eteryczne (OE) z nasion *N. sativa* (o składzie zamieszczonym w Tabeli 20) i *N. damascena* (o składzie zamieszczonym w Tabeli 29) oraz olejek lotny (OL) z konretu otrzymanego eterem dietylowym z nasion *N. sativa* (Wielkopolska 2002) poddano badaniom oceniającym aktywność przeciwbakteryjną wobec bakterii gramujemnych: *Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa*, bakterii gramdodatnich: *Staphylococcus aureus* i *Bacillus subtilis*, a także aktywność przeciwgrzybową wobec: drożdży *Candida albicans*, *C. mycoderma* i *Penicilium expansum* oraz pleśni *Aspergillus niger*. Badania dla olejku lotnego czarnuszki siewnej oraz olejku eterycznego czarnuszki damasceńskiej wykonano metodą impedymetryczną dla stężeń olejku równych: 0,1; 1; 5 i 10 µl/ml. Natomiast dla olejku eterycznego *N. sativa* metodą płytkową rozcieńczeń, dla następujących stężeń olejku: 0,05; 0,1 i 0,8%. Aktywność statyczna i bójcza olejków została określona przez wyznaczenie odpowiednich wartości MIC (minimalne stężenie hamujące) i MBC (minimalne stężenie bójcze) w stosunku do testowanych drobnoustrojów. Wyniki badań przedstawiłam w Tabeli 34.

Tabela 34. Właściwości przeciwdrobnoustrojowe olejków z nasion *Nigella sativa* i *N. damascena*

Olejek		<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida mycoderma</i>	<i>Aspergillus niger</i>
		bakterie gram –		bakterie gram +		drożdże		pleśnie
<i>N. sativa</i> (OE)	metoda płytkowa	4000 µg/ml MIC	5000 µg/ml MIC	3000 µg/ml MIC	4000 µg/ml MIC	5000 µg/ml MIC	-	-
<i>N. sativa</i> (OL)	metoda impedymetryczna	10 µl/ml 2 lg	10 µl/ml 0,5 lg	10 µl/ml 2,5 lg	10 µl/ml MIC	-	nie działa	10 µl/ml 2,5 lg
<i>N. damascena</i> (OE)		10 µl/ml 2 lg	10 µl/ml 1 lg	10 µl/ml 4 lg	10 µl/ml MIC	-	10 µl/ml MIC	10 µl/ml MBC

-- nie badano

Aktywność przeciwdrobnoustrojowa badanych olejków była zróżnicowana w zależności od rodzaju drobnoustrojów.

Powyższe wyniki świadczą o tym, iż olejek eteryczny z czarnuszki siewnej ma dobre właściwości przeciwdrobnoustrojowe, oddziałuje na szerokie spektrum mikroorganizmów, tzn. zarówno na bakterie gramdodatnie, gramujemne, jak i na grzyby. Porównując uzyskane wartości MIC można wnioskować, iż bakterie gramdodatnie są bardziej podatne na hamujące działanie olejku aniżeli bakterie gramujemne. Największą oporność na działanie olejku wykazują grzyby.

W literaturze aktywność przeciwdrobnoustrojową olejku z czarnuszki siewnej ocenia się jako wysoką, sugerując by stosować go nawet jako substytut antybiotyków lub środek do ochrony upraw [Khan, 1999; Rathee i in., 1982].

Aktywność przeciwdrobnoustrojowa olejku lotnego z nasion *N. sativa* była podobna do olejku eterycznego z *N. damascena*. Badane olejki wykazywały dobre właściwości bójcze w stosunku do bakterii *B. subtilis*. Olejek z czarnuszki damasceńskiej w stężeniu 10 µl/ml całkowicie eliminował pleśń *A. niger* ze środowiska i w takim też stężeniu działał hamująco wobec drożdży *C. albicans*. Niestety w przypadku pozostałych mikroorganizmów olejki te nie wykazywały aktywności bójczej.

6. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

W pracy przedstawiłam zastosowanie różnych technik do wydzielania składników lotnych drewna drzew iglastych, pospolitych na kontynencie europejskim oraz nasion roślin rodzaju czarnuszka, popularnych w krajach basenu Morza Śródziemnego, ale też uprawianych w Polsce. Wykorzystując nowoczesne techniki analityczne (GC, SPME) i spektroskopowe (MS, NMR), dokonałam identyfikacji składników lotnych i określenia struktury nowych związków badanych surowców roślinnych.

Podsumowanie zebranych w rozdziałach 4 i 5 spostrzeżeń dotyczących metod wyodrębniania związków lotnych pozwala mi stwierdzić, że:

- Praco- i energochłonna metoda destylacji z parą wodną jest jedyną metodą prowadzącą do otrzymania produktu, jakim jest olejek eteryczny. Pozwala ona w prosty sposób określić sumaryczną zawartość nierozpuszczalnych w wodzie związków lotnych zawartych w matrycy o dowolnym stanie skupienia i strukturze, a analiza olejku daje informacje o składzie jakościowym i ilościowym.
- Destylacja z parą wodną konkretów jest metodą bardziej skomplikowaną od destylacji surowca, ale daje produkty (olejki lotne), które niekiedy mają lepsze cechy niż olejki eteryczne. Wadą metody jest stosowanie znacznych ilości rozpuszczalnika, a zatem produkt nie spełnia wymagań zielonej chemii.
- Rozwijająca się nowoczesna metoda ekstrakcji nadkrytycznej może być alternatywą dla destylacji z parą wodną i ekstrakcji klasycznej. Jest to jednak metoda wymagająca bardzo kosztownej aparatury i pracochłonnego ustalenia warunków procesu.
- SPME to metoda nowa i na obecnym etapie jej rozwoju zbyt skomplikowana w określeniu bezwzględnej zawartości mieszanin złożonych z kilkudziesięciu lub kilkuset składników, jakimi są produkty naturalne. Jednak jest to wygodna, prosta i szybka metoda bezrozpuszczalnikowa, doskonała do porównania składu zarówno jakościowego, jak i ilościowego nawet bardzo złożonych mieszanin. Dużą zaletą tej metody jest jej wysoka czułość umożliwiająca wykonanie powtarzalnych analiz na niewielkiej próbce materiału.
- Metoda mikroekstrakcji do fazy stałej z fazy nadpowierzchniowej (HS-SPME) w połączeniu z GC i GC-MS okazała się efektywną metodą oznaczania składników lotnych warstw drewna świerka, sosny i modrzewia. Niezastąpiona była ta metoda w identyfikacji najbardziej lotnych składników nasion trzech gatunków czarnuszki, ale także w wykrywaniu naturalnych składników nasion, które były nieobecne

w produktach otrzymanych metodami tradycyjnymi. Była to metoda najkorzystniejsza w analizie jakościowej wszystkich analizowanych surowców, ponieważ pozwalała wykryć największą ilość składników, w tym również takie których nie wykryłam innymi metodami.

- Najmniej odpowiednia w porównawczej ocenie drewna świerka, jak też analizie nasion czarnuszki okazała się metoda analizy fazy nadpowierzchniowej (DHS).

Wnioski

- Każda z testowanych metod ma wady i zalety, a najważniejsze kryteria wyboru jednej z nich to:
 - cel, jaki chcemy osiągnąć
 - cechy surowca, a szczególnie jego składników lotnych.
- Uniwersalną metodą analizy związków lotnych jest HS-SPME w warunkach optymalizowanych dla każdego surowca.
- Wybór metody pozyskiwania produktu (olejek eteryczny/olejek lotny) powinien być poprzedzony odpowiednimi doświadczeniami.

7. SPIS TABEL

Tabela 1. Skład chemiczny olejków z różnych części <i>Picea abies</i>	34
Tabela 2. Zawartość terpenów w drewnie i korze świerka pospolitego zdrowego oraz zainfekowanego metylojasmonem.....	37
Tabela 3. Skład olejku sosnowego z cetyny (<i>Pinus sylvestris</i>) z surowca z różnych krajów	42
Tabela 4. Skład olejku eterycznego z igieł oraz fazy nadpowierzchniowej olejku i igieł <i>P. sylvestris</i>	44
Tabela 5. Skład olejku eterycznego różnych organów <i>Larix decidua</i>	48
Tabela 6. Skład olejku eterycznego oraz olejku lotnego z nasion <i>Nigella sativa</i>	55
Tabela 7. Zawartość pochodnych tymolu w oleju z nasin <i>Nigella sativa</i>	57
Tabela 8. Skład olejków eterycznych z nasion <i>Nigella damascena</i>	61
Tabela 9. Skład i wydajność otrzymanych różnymi metodami ekstraktów z nasion <i>N. damascena</i> ..	63
Tabela 10. Skład olejku eterycznego z nasion <i>Nigella orientalis</i>	65
Tabela 11. Charakterystyka badanych drzew iglastych	95
Tabela 12. Skład olejków eterycznych z bielu oraz twardzieli świerka pospolitego	99
Tabela 13. Lotne składniki bielu i twardzieli świerka pospolitego (<i>Picea abies</i> <u>1</u>) oznaczone metodą SPME z wykorzystaniem dwu włókien.....	107
Tabela 14. Składniki lotne bielu i twardzieli świerka wydzielone różnymi.....	113
Tabela 15. Składniki lotne bielu i twardzieli świerka, sosny i modrzewia oznaczone metodą SPME	119
Tabela 16. Istotność różnic w składzie lotnych związków bielu i twardzieli <i>Picea abies</i>	125
Tabela 17. Istotność różnic w składzie lotnych związków bielu i twardzieli <i>Pinus sylvestris</i>	128
Tabela 18. Istotność różnic w składzie lotnych związków bielu i twardzieli <i>Larix decidua</i>	130
Tabela 19. Główne składniki bielu i twardzieli świerka pospolitego, sosny zwyczajnej i modrzewia europejskiego.....	134
Tabela 20. Skład olejku eterycznego z nasion <i>Nigella sativa</i>	143
Tabela 21. Przesunięcia chemiczne (^{13}C i ^1H) eterów metylowych <i>trans</i> - i <i>cis</i> -tujan-4-olu	154
Tabela 22. Przesunięcia chemiczne (^{13}C i ^1H) <i>trans</i> - i <i>cis</i> -tujan-4-olu.....	154
Tabela 23. Skład olejku eterycznego i lotnego oraz skład fazy nadpowierzchniowej nasion <i>N. sativa</i>	159
Tabela 24. Główne składniki olejku eterycznego i fazy nadpowierzchniowej nasion <i>Nigella sativa</i> .	162
Tabela 25. Wydajności olejku eterycznego w zależności od roku zbioru nasion i rejonu uprawy <i>Nigella sativa</i>	163
Tabela 26. Skład olejku eterycznego nasion <i>Nigella sativa</i> w zależności od terminu zbioru.....	164
Tabela 27. Skład olejku eterycznego w zależności od rejonu uprawy <i>Nigella sativa</i>	165
Tabela 28. Skład olejków nasion <i>Nigella sativa</i> uprawianej w Bułgarii.....	166
Tabela 29. Skład olejku eterycznego z nasion <i>Nigella damascena</i>	170
Tabela 30. Składniki lotne nasion <i>Nigella damascena</i> wydzielone różnymi metodami	178
Tabela 31. Skład olejku eterycznego i fazy nadpowierzchniowej nasion <i>Nigella damascena</i> z różnych miejsc	180
Tabela 32. Skład olejku eterycznego nasion <i>Nigella orientalis</i>	185
Tabela 33. Skład olejku eterycznego i fazy nadpowierzchniowej nasion <i>Nigella orientalis</i> z różnych miejsc	187
Tabela 34. Właściwości przeciwdrobnoustrojowe olejków z nasion <i>Nigella sativa</i> i <i>N. damascena</i> .	189

8. SPIS RYSUNKÓW

Rysunek 1. Ekstrakcja analitów (A) na włóknie SPME i (B) w rurce SPME.....	15
Rysunek 2. SPME na włóknie z fazy nadpowierzchniowej: (A) HS-SPME i z roztworu: (B) DI-SPME połączone z systemem desorpcji (C) GC i (D) HPLC	16
Rysunek 3. Właściwości komercyjnie dostępnych włókien SPME	20
Rysunek 4. Rejony występowania świerka pospolitego w Europie	25
Rysunek 5. Rejony występowania sosny zwyczajnej w Europie	26
Rysunek 6. Rejony występowania modrzewia europejskiego w Europie	26
Rysunek 7. Przekrój poprzeczny pnia drzewa.....	27
Rysunek 8. Żywicowanie sosny zwyczajnej (<i>Pinus sylvestris</i>)	29
Rysunek 9. Świerk pospolity (<i>Picea abies</i> L.)	31
Rysunek 10. Sosna zwyczajna (<i>Pinus sylvestris</i> L.)	39
Rysunek 11. Modrzew europejski (<i>Larix decidua</i> Mill.)	46
Rysunek 12. Czarnuszka siewna (<i>N. sativa</i> L.) i czarnuszka damasceńska (<i>N. damascena</i> L.)	50
Rysunek 13. Tymol i pochodne.....	56
Rysunek 14. Czarnuszka damasceńska (<i>Nigella damascena</i> L.)	59
Rysunek 15. Czarnuszka orientalna (<i>Nigella orientalis</i> L.)	64
Rysunek 16. Schemat aparatury doświadczalnej do ekstrakcji nadkrytycznej	68
Rysunek 17. Schemat rozdziału olejku eterycznego z nasion <i>Nigella sativa</i>	77
Rysunek 18. Schemat izolowania eterów metylowych trans- i cis-tujan-4-olu z olejku eterycznego <i>Nigella sativa</i>	83
Rysunek 19. Schemat rozdziału olejku eterycznego z nasion <i>Nigella damascena</i>	87
Rysunek 20. Chromatogram gazowy olejków eterycznych z bielu i twardej <i>Picea abies</i> 1.....	98
Rysunek 21. Chromatogram gazowy składników lotnych fazy nadpowierzchniowej bielu <i>P. abies</i> 1	103
Rysunek 22. Chromatogram gazowy lotnych składników bielu <i>Picea abies</i> 1 zaadsorbowanych na czterech włóknach SPME.....	104
Rysunek 23. Zawartość mono- i seskwiterpenów w drewnie <i>Picea abies</i> 1 w zależności od czasu ekspozycji włókna DVB/CAR/PDMS	105
Rysunek 24. Chromatogram gazowy składników lotnych izolowanych metodą HS-SPME z bielu i twardej <i>Picea abies</i> 1	106
Rysunek 25. Chromatogram gazowy olejku eterycznego i składników lotnych z bielu <i>Picea abies</i> 1 wydzielonych metodą HS-SPME i DHS.....	111
Rysunek 26. Chromatogram gazowy składników bielu <i>Picea abies</i> 1 wydzielonych metodą destylacji z parą wodną i metodą HS-SPME.....	112
Rysunek 27. Chromatogram gazowy składników lotnych wydzielonych z bielu <i>Picea abies</i> 2 i 1 metodą HS-SPME	118

Rysunek 28. Chromatogram gazowy składników lotnych wydzielonych metodą SPME z bielu i twardzieli <i>Pinus sylvestris</i> 1.....	127
Rysunek 29. Chromatogram gazowy składników lotnych wydzielonych z bielu i twardzieli <i>Larix decidua</i> 2 metodą SPME	129
Rysunek 30. Chromatogram gazowy związków lotnych wydzielonych z bielu <i>Picea abies</i> 1, <i>Pinus sylvestris</i> 1 i <i>Larix decidua</i> 1 metodą HS-SPME	133
Rysunek 31. Zmiany objętości olejku w czasie destylacji z parą wodną nasion <i>Nigella sativa</i>	141
Rysunek 32. Chromatogram gazowy olejku eterycznego z nasion <i>Nigella sativa</i>	142
Rysunek 33. Widma MS związków eterów metylowych <i>trans</i> - i <i>cis</i> -tujan-4-oli	148
Rysunek 34. Synteza eterów metylowych tujan-4-olu z sabinenu	150
Rysunek 35. Model cząsteczki eteru metylowego <i>trans</i> -tujan-4-olu (1: HyperChem v.7.01).....	150
Rysunek 36. Modele cząsteczek <i>trans</i> - i <i>cis</i> -4-metoksytujanu (HyperChem v.7.01), przesunięcia chemiczne i stałe sprzężenia protonów pierścienia cyklopropanowego.....	151
Rysunek 37. Transformacja sabinenu do <i>trans</i> - oraz <i>cis</i> -eterów metylowych tujan-4-olu poprzez ich hydroksylowe analogi (<i>trans</i> -tujan-4-ol oraz <i>cis</i> -tujan-4-ol).....	152
Rysunek 38. Rozciąg obszaru 0-1,2 ppm widm ¹ H-NMR eteru metylowego <i>cis</i> - i <i>trans</i> -tujan-4-olu	153
Rysunek 39. Rozciąg obszaru 0-1,2 ppm widm ¹ H-NMR <i>cis</i> - i <i>trans</i> -tujan-4-olu	153
Rysunek 40. Chromatogram gazowy lotnych składników nasion <i>Nigella sativa</i> ekstrahowanych przy użyciu czterech włókien SPME.....	156
Rysunek 41. Chromatogramy gazowe składników lotnych nasion <i>Nigella sativa</i> wydzielonych różnymi metodami.....	158
Rysunek 42. Chromatogram gazowy olejku eterycznego fazy nadpowierzchniowej nasion <i>N sativa</i>	161
Rysunek 43. Przyrost objętości olejku w czasie destylacji z parą wodną nasion <i>Nigella damascena</i>	168
Rysunek 44. Chromatogram gazowy olejku eterycznego z nasion <i>Nigella damascena</i>	171
Rysunek 45. Widma MS i wzory antranilanu metylu, 3-metoksyantranilanu metylu i damasceniny (3-metoksy-N-metyloantranilanu metylu) oraz związku niezidentyfikowanego (39)..	177
Rysunek 46. Chromatogram gazowy olejku eterycznego i fazy nadpowierzchniowej nasion <i>Nigella damascena</i>	181
Rysunek 47. Chromatogram gazowy olejku eterycznego nasion <i>Nigella orientalis</i>	185
Rysunek 48. Chromatogram gazowy olejku eterycznego i fazy nadpowierzchniowej nasion <i>Nigella orientalis</i>	188

9. SPIS LITERATURY

- Abdel-Fattah M, Matsumoto K, Watanabe H. 2000. Antinociceptive effects of *N. sativa* and its major component, thymoquinone, in mice, *Eur. J. Pharmacol.* 400, 89-97.
- About-Enein Y, Abou-Basha I. 1995. Simple HPLC method for the determination of thymoquinone in black seed oil (*N. sativa* Linn). *Liquid Chromatography* 18, 895-902.
- Aboutable EA, El-Azzouny AA, Hammerschmidt FJ. 1986. Aroma volatiles of *N. sativa* seeds. *Prog. Essent. Res.*, Proc 16th Int. Symp. Essent. Oils, 49-55. Chem. Abstr. 105, 102316m, 1986.
- Anniesannuals: www.anniesannuals.com/signs/images/gif100s/nigella_orientalis_t.gif
- Assarso A, Akerlund G. Studies on wood resin, especially the change in chemical composition during seasoning of the wood. *Svensk. Paper.* 16, 517-525.
- Atta URS, Malik S. 1995. Nigellidine – a new indazole alkaloid from the seeds of *N. sativa*. *Tetrahedron Lett.* 36, 1993-1996.
- Back EB, Allen LH. 2000. *Pitch Control, Wood Resin and Deresination*. TAPPI PRESS. Atlanta.
- Baeckström P, Koutek B, Saman D, Vrkoc J. 1996. A convenient synthesis of *trans*-sabinene hydrate from (-)-3-thujol via highly selective ene reaction of singlet oxygen. *Bioorganic Med. Chem.* 4, 419-421.
- Baltussen E, Cramers CA, Sandra PJF. 2002. Sorptive sample preparation – a review. *Anal. Bioanal. Chem.* 373, 3-22.
- Bartelt RJ. 1997. Calibration of a commercial solid-phase microextraction device for measuring headspace concentration of organic volatiles. *Anal. Chem.* 69, 364-372.
- Bauer K, Garbe D, Surburg H. 2001. *Common Fragrance and Flavor Materials. Preparation, properties and uses*. Wiley-VCH
- Benyoussef EH, Zouaghi N, Belabbes R, Bessiere JM. 2001. Botanical study of Algerian *Nigella* seeds and analysis of their essential oil. *Riv. Ital. EPPOS* 31, 15-19.
- Berger F. 1964. *Handbuch der Drogenkunde* Band 6, 335-338.
- Bengtsson P, Sanari M. 2004. Evaluation of hydrocarbon emission from heart- and sapwood of Scots pine using a laboratory-scale wood drier. *Holzforschung*, 58, 660-665.
- Berta F, Spupuka J, Chladna A. 1997. The composition of terpenes in needles of *Pinus sylvestris* in a relatively clear and in a city environment. *Biol. Bratislava*, 52, 71-78.
- Blay G, Bargues V, Cardona L, Garcia B, Pedro JR. 2001. Ultrasound assisted reductive cleavage of eudesmane and guaiane γ -enonolactones. Synthesis of 1 α ,7 α ,10 α H-guaian-4,11-dien-3-one and hydrocolorenone from santonin. *Tetrahedron Lett.* 57, 9719-9725.
- Boscherini G, Michelozzi M. 1993. Capillary gas chromatography of the terpene components of *Picea abies* K. *J. High Resol. Chrom.*, 16, 619-620.
- Botanix: <http://botanix.org/botanix/tn/14nigellax>
- Bourrel C, Vilarem G, Michel G, Gaset A. 1995. Etude des propriétés bactériostatiques et fongostatiques en milieu solide de 24 huiles essentielles préalablement analysées (FR) *Riv. Ital. EPPOS* 16, 3-10.

- Brown HC, Rei MH. 1969. The solventmercuration-demercuration of representative olefins in the presence of alcohols. Convenient procedure for the synthesis of ethers. *J. Amer. Chem. Soc.* 24, 5646-5647.
- Burits M, Bucar F. 2000. Antioxidant activity of *N. sativa* essential oil, *Phytother. Res.* 14, 323-328.
- Buszewski B, Ligor M. 2001. Qualitative and quantitative analyses of volatile organic compounds in wines using SPME-GC. *Chem. Anal.(Warsaw)* 46, 215-222.
- Bülow N. 1998. Umlagerungen von germakren D. Phd Dissertation. Shaker Verlag Aachen.
- Chaintreau A. 2001. Simultaneous distillation-extraction: from birth to maturity – review. *Flavour Fragr. J.* 16, 136-148.
- Chernobrovkina NP, Stepanov AA. 1983. Essential oil content of spruce and pine needles, birch buds and ledum leaves. Konferencja - *Lipdnyi Obmen Drev. Rast. Usloviyakh Sev.* 132-140.
- Ceva-Antunes PMN, Bizzo HR, Alves SM, Antunes OAC. 2003. Analysis of volatile compounds of tapereba (*Spondias mombin* L.) and caja (*Spondias mombin* L.) by simultaneous distillation and extraction (SDE) and Solid Phase Microextraction (SPME). *J. Agric. Food Chem.* 51, 1387-1392.
- Coleman WM, Lawrence BM. 1997. A comparison of selected analytical approaches to the analysis of an essential oil, *Flavour Fragr. J.* 12, 1-8.
- Crooks PA, Worthen DR, Ghosheh OA. 2001. Use of naturally-occurring quinones thymoquinone and dithymoquinone as antineoplastic and cytotoxic agents. *Patent US 6218434 B1* 17.04.2001 6pp.; Chem. Abstr. 134, 290402, 2001.
- Daba MH, Abdel-Rahman MS. 1998. Hepatoprotective activity of thymoquinone in isolated rat hepatocytes. *Toxicol. Lett.* 95, 23-29.
- Da Costa NC, Eri S. 2005. *Identification of aroma chemicals*: 12-30. Rowe DJ. (ed.). Chemistry and technology of flavour and fragrances. Blackwell publishing: Oxford.UK.
- D'Antuono LF, Moretti A, Lovato AFS. 2002. Seed yield, yield components, oil content and essential oil content and composition of *Nigella sativa* L. and *Nigella damascena* L. *Ind. Crops Prod.* 15, 59-69.
- Dauksas E, Veskutonis PR, Sivik B. 2002. Comparison of oil from *Nigella damascena* seed recovered by pressing conventional solvent extraction and carbon dioxide extraction. *J. Food Science* 67, 1021-1024.
- Dedio I. 1999. Rośliny zielarskie w apteczce domowej i w kuchni. *Wiadomości zielarskie.* 5, 10.
- Demirci B, Demirci F, Baser KH. 2004. Headspace-SPME and hydrodistillation of two fragrant *Artemisia* sp. *Flavour Fragr. J.* 19, 395-398.
- Deng X, Peng J, Luo B, Wei M, Hu Wenli, Du Jiawei. 2004. A direct quantitative analysis method for monitoring biogenic volatile organic compounds released from leaves of *Pelargonium hortorum* in situ. *Anal. Bioanal. Chem.* 380, 950-957.
- Dirinck P, de Pooter H, Willaert G, Schamp N. 1984. Application of a dynamic headspace procedure in fruit flavour analysis: 381-401. Schreirer P. (ed.). *Analysis of volatiles: methods – applications*. Walter de Gruyter. New York.

- Dopke W, Fritsch F. 1970. Der alkaloidgehalt von *Nigella damascena* L. *Pharmazie* 25, 69-70.
- Dron A, Guyer DE, Gage DA Lira CT. 1997. Yield and quality of onion flavour obtained by SFE and other methods. *J. Food Eng.* 20, 107-124.
- Dung NX, Thang TD. Extraction and distillation of essential oils. Processing. *Analysis and Application of Essential Oil*. Jirovetz L, Buchbauer G. (eds.). Har Krishan Bhalla Sons, Dehradun. Indie 2005.
- El-Alfy T, El-Fataty H. Toama M. 1975. Isolation and structure assignment of an antimicrobial principle from the volatile oil of *N. sativa* seeds. *Pharmazie* 30, 109-111.
- El-Dakhahny M. 1963. Studies on the chemical constitution of Egyptian *N. sativa* seeds, II The essential oil. *Planta Med.* 11, 465-470.
- El-Ghorab AH. 2003. Supercritical fluid extraction of the Egyptian Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) leaves and *Nigella sativa* L. seeds volatile oils and their antioxidant activities. *J. Essent. Oil Bearing Plant* 6, 67-77.
- El-Kamali HH, Ahmed AH, Mohammed AS, Yahia AA, El-Tayeb LH. 1998. Antibacterial properties of essential oils from *N. sativa* seeds, *Cymbopogon citratus* leaves and *Pulicaria undulata* aerial parts. *Fitoterapia*, 69, 77-78.
- El Tahir KEH, Ashour MMS, Al.-Harbi MM. 1993. The respiratory effects of the volatile oil of the black seed in Guinea-pigs: Elucidation of the mechanisms of action. *Gen. Pharmac.* 24, 1115-1122.
- El Tahir KEH, Ashour MMS, Al.-Harbi MM. 1993. The cardiovascular actions of the volatile oil of the black seed (*N. sativa*) in rats: elucidation of the mechanism of action. *Gen. Pharmac.* 24, 1123-1131.
- Engel W, Bahr W, Schieberle P. 1999. Solvent assisted flavour evaporation – a new versatile technique for the careful and direct isolation of aroma compounds from complex food matrices. *Eur. Food Res. Tech.* 209, 237-241.
- Englund F, Nussbaum RM. 2000. Monoterpenes in Scots pine and Norway spruce and their emission during kiln drying. *Holzforschung* 54, 449-456.
- Enomoto S, Asano R, Iwahori Y, Narui T, Okada Y. 2001. Hematological studies on black cumin oil from seeds of *N. sativa*. *Biol. Pharm. Bull.* 24, 307-310.
- Erdtman H, Westfelt L. 1963. The neutral diterpenes from pine wood resin. *Acta Chem. Scand.* 17, 1826-1830.
- Faldt J. 2000. *Volatile constituents in conifers and conifer-related wood-decaying fungi*. Doctoral thesis. Royal Institute of Technology (KTH). Stockholm.
- FAO: Corporate Document Repository. *Wood forest products from conifers* 12, 6. www.fao.org
- Farmakopea Polska VI. 2002. PTFarm, Warszawa.
- Ferdous AJ, Islam SN, Asnah M, Hasan CM. 1992. In vitro antibacterial activity of the volatile oil of *N. sativa* seeds against multiple drug-resistant isolates of *Shigella* spp. and isolated of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli*. *Phytother. Res.* 6, 137-140.

- Fico G, Bader A, Flamini G, Cioni PL, Morelli I. 2003. Essential oil of *Nigella damascena* (Ranunculaceae) seeds. *J. Essent. Oil Res.* 15, 57-58.
- Fico G, Braca A, Tome F, Morelli I. 2000. Phenolic derivatives from *Nigella damascena* seeds. *Pharm. Biol.* 38, 371-373.
- Fischer N, Nitz S, Drawert F, 1987. Original flavour compounds and the essential oil composition of marjoram *Majorana hortensis* Moench) *Flavour Fragr J.* 2, 55-61.
- Fischer N, Nitz S, Drawert F. 1988. Original composition of marjoram flavour and its changes during processing. *J. Agric. Food Chem.* 36, 996-1003.
- Fuksman IL. 1990. Composition and content of essential oils in various parts of Norway spruce biomass. *Kosnes Kimija* 5, 83-86.
- Gad M, El-Dakhakhny M, Hassan MM. 1963. Studies on the chemical constitution of Egyptian *N. sativa* L. –oil, *Planta Med.* 11, 134-138.
- Ghosheh O, Houdi A, Crooks A. 1999. High performance liquid chromatographic analysis of the pharmacologically active quinones and related compounds in the oil of the black seed (*N. sativa* L.). *J. Pharm. Biomed. Anal.* 19, 757-762.
- Gildemeister E, Hofmann F. 1956. *Die ätherischen öle*. Schwarzkümmelöl 4, 611-612.
- Giordano L, Calabrese R, Davoli E, Rotilio D. 2003. Quantitative analysis of 2-furfural and 5-methylfurfural in different Italian vinegars by HS-SPME coupled to GC-MS using isotope dilution. *J. Chromatogr. A* 1017, 14-149.
- Galopin C. 2001. A short and efficient synthesis of (±)-*trans*-sabinene hydrate. *Tetrahedron Lett.* 42, 5589-5591.
- Grimm CC, Lloyd SW, Miller JA, Spanier AM. 1997. The analysis of food volatiles using direct thermal desorption: 59-81. Marsisli R.(ed.). *Techniques for analyzing food aroma*. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Góra J, Lis A. 2005. *Najcenniejsze olejki eteryczne*. Wydawnictwo Uniwersytetu Mikołaja Kopernika. Toruń.
- Góra J, Majda T, Lis A, Tichek A, Kurowska A. 1997. The main constituents of polish commercial essential oils. *Riv. Ital. EPPOS* (Num. Spec.), 761.
- Groth AB. 1958. Investigation of Swedish turpentine. *Svensk papperstidn.* 61, 311.
- Hafizoglu H. 1983. Wood extractives of *Pinus sylvestris* L., *Pinus nigra* Arn. and *Pinus brutia* Ten. with special reference to nonpolar components. *Holzforschung*, 37, 321-326.
- Hannig E, Vishin ML. 1960. Zur wirkungskennntnis des damascenins. *Planta Med.* 2, 185-190.
- Hasanzadeh M, Ramazani M, Golmohammadzadeh S. 2000. Volatile constituents of *N. sativa* seeds. *Orient. J. Chem.* 16, 461-462.
- Hartman TG, Overton SV, Manura JJ, Baker CW, Manos JN. 1991. Short path thermal desorption: food science application. *Food Tech.* 45, 104-105.
- Hawthorne SB, Grabanski CB, Hageman KJ, Miller DJ. 1998. Simple method for estimating polychlorinated biphenyl concentrations on soils and sediments using subcritical water extraction coupled with solid-phase microextraction. *J. Chromatogr. A* 814, 151-160.

- Heemann V, Francke W. 1977. Gas-chromatographic mass spectrometric study of the volatile constituents from the bark of *Picea abies*. *Planta Med.* 32, 342-346.
- Hejnowicz Z. 2002. *Anatomia i histogeneza roślin naczyniowych*. PWN, Warszawa..
- Herba: www.herba.msu.ru/Flora_von_Deutschland/pages/26.html
- Hiroyuki K. 2003. New trends in sample preparation for clinical and pharmaceutical analysis. *Trends Anal. Chem.* 22, 232-244.
- Hodisan V, Hongan D, Oprean R, Pintea A. 1997. Cercetari fitochemice asupra acizilor grasi din *Nigellae damascenae semen*. *Cluj Med.* 70, 638-641.
- Houghton P, Zarka R, Heraz B, Hoult JR. 1995. Fixed oil of *N. sativa* and derived thymoquinone inhibit eicosanoid generation in leukocytes and membrane lipid peroxidation. *Planta Med.* 61, 33-36.
- Isidorov VA, Vinogorova VT, Rafalowski K. 2003. HS-SPME analysis of volatile compounds of coniferous needle litter. *Atmosph. environ.* 37, 4645-4650.
- Jadayil SA, Tukan SKH, Takruri HR. 1999. Bioavailability of iron from four different local food plants in Jordan. *Plant Food Hum. Nutr.* 54, 285-294.
- Jeleń HH, Obuchowska M, Zawirska-Wojtasiak R, Wąsowicz E. 2000. Headspace Solidphase microextraction use for the characterization of volatile compounds in vegetable oils of different sensory quality. *J. Agric. Food Chem.* 48, 2360-2367.
- Jorgensen U, Hansen M, Christensen LP, Jensen K, Kaack K. 2000. Olfactory and quantitative analysis of aroma compounds in elder flower (*Sambucus Nigra* L.) Drink processed from five cultivars. *J Agric. Food Chem.* 48, 2376-2383.
- Joulain D, König WA. 1998. *The Atlas of Spectral Data of Sesquiterpene Hydrocarbons*. E.B-Verlag, Hamburg.
- Kaiser CS, Rompp H, Schmidt PC. 2001. Pharmaceutical applications of supercritical carbon dioxide. *Pharmazie* 56, 907-926.
- Kakuda DY. 2001. Headspace Analysis of Food and Flavors, Theory and Practice. *Trends Food Science Tech.* 12, 392.
- Kataoka H, Lord HL, Pawliszyn J. 2000. Applications of solid-phase microextraction in food analysis. *J. Chromatogr. A* 880, 35-62.
- Kataoka H. 2002. Automated sample preparation using in-tube solid-phase microextraction and its application – a review. *Anal. Bioanal. Chem.* 373, 31–45.
- Kesselmans RPW, Wijnberg JB, Minnaard AJ, Walinga RE, Groot A. 1991. Synthesis of all stereoisomers of eudesm-11-en-4-ol. *J. Org. Chem.* 56, 7237-7244.
- Khan Akram M. 1999. Chemical composition and medical properties of *N. sativa* L. *Inflammopharmacology* 7, 15-35.
- Kim NS, Lee DS. 2002. Comparison of different extraction methods for the analysis of fragrances from *Lavandula* species by gas chromatography – mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 982, 31-47.

- Kimland B, Norin F. 1972. Wood extractives of common spruce, *Picea abies* (L.) Karst., *Sven Papperstidn* 10, 403-409
- Kjeldsen F, Christenesen LP, Edelendbos M. 2001. Quantitative analysis of aroma compounds in carrot (*Daucus carota* L.) cultivars by capillary gas chromatography using large-volume injection technique. *J. Agric. Food Chem.* 49, 4342-4348.
- Klimek D. 1957. *Olejki eteryczne*. Wydawnictwo Przemysłu Lekkiego i Spożywczego. Warszawa.
- Kubeczka KH. 1997. New approaches in essential oil analysis using polymer-coated silica fibres: Franz Ch., Máthé A., Buchbauer G (Ed.) *Essential Oils: Basic and Applied Research*, Allured Publ. Corp. p. 131-146.
- Kubeczka KH, Schultze W. 1987. Biology and chemistry of conifer oils. *Flavour Fragr. J.* 2, 137-148.
- Kokoska L, Halik J, Valterova I, Nepovim A, Rada V, Venek T. 2004. Chemical composition of the essential oil of *Nigella orientalis* L. seeds *Flav. Fragr. J.* 19, 419-420.
- Kozłowski J. 1990. Czarnuszka siewna i gatunki jej pokrewne. *Wiadomości zielarskie*. 7, 19-20.
- Koukos PK, Papadopoulou KI, Papagiannopoulos AD. 2001. Essential oils of the twigs of some conifers grown in Greece. *Holz Roh-Werkstoff*, 6, 437.
- Köhler FE. 1914. Köhler's Medizinal-Pflanzen in naturgetreuen Abbildungen mit kurz erläuterndem Texte: *Atlas zur Pharmacopoea germanica*, vol. 3, Gera-Untermhaus.
- Kruk I, Michalska T, Lichtszeld K, Kładna A. 2000. The effect of thymol and its derivatives on reactions generating reactive oxygen species. *Chemosphere* 41, 1059-1064.
- Kula J, Masarwen A, Góra J. 1996. Main constituents of the sesquiterpene fraction of Polish turpentine. *J. Essent. Oil Res.* 8, 453-454.
- Kurowska A, Kalembe D. 1998. Chemical composition of essential oil of *Larix kaemferi*. *Riv. Ital. EPPOS*, num. spec., 709-715.
- Kurowska A, Kalembe D. 1999. Chemical composition of essential oil of *Larix decidua* Mill. ssp. *Polonica* Domin. *Riv. Ital. EPPOS*, num. spec., 432-439.
- Lawrence BM. 2003. Progress in essential oils. *Perfum. Flavor.* 28, 70-73.
- Lawrence BM. 2001. Progress in essential oils. *Perfum. Flavor.* 26, 72-75.
- Lawrence BM. 1991. Progress in essential oils. *Perfum. Flavor.* 16, 64-67.
- Lindmark-Henriksson M. 2003. *Biotransformation of Turpentine Constituents: Oxygenation and Esterification*. Doctoral Thesis. Royal Institute of Technology (KTH). Stockholm.
- Lee XP, Kumazawa T, Sato K, Seno H, Ishii A, Suzuki O. 1998. Improved Extraction of Ethanol from Human Body Fluids by Headspace Solid-Phase Microextraction with a Carboxen-Polydimethylsiloxane-Coated Fiber. *Chromatographia* 47, 593-595.
- Lindskog A, Potter A. 1995. Terpene emission and ozone stress. *Chemosphere* 30, 1171-1181.
- Llompert M, Li K, Figas M. 1999. HS-SPME for the determination of volatile and semivolatile pollutants in soils. *Talanta* 48, 451-459.
- Łomnicki A. 2002. Wprowadzenie do statystyki dla przyrodników. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.

- Maarse H, Belz R. 1981. *Handbuch der aroma forschung. Isolation, separation and identification of volatile compounds in aroma research*. Akademie Verlag – Berlin.
- Maccchioni F, Cioni PL, Flamini G, Morelli I, Maccioni S, Ansaldi M. Chemical composition of essential oils from needles branches and cones of *Pinus pinea*, *P. halepensis*, *P. pinaster* and *P. nigra* from central Italy. *Flavour Fragr. J.* 18, 139-143.
- Mahattanatawee K, Rouseff R, Goodner K, 2004. Quantification of β -damascenone in orange juice using headspace standard addition SPME with selected ion GC-MS. *American Chemical Society National Meeting*. August 23,
- Manninen AM, Utrainen J. Holopainen T, Kainualinen P. 2002a. Terpenoids in the wood of Scots pine and Norway spruce seedling exposed to ozone at different nitrogen availability. *Can. J. For. Res.* 32, 2140-2145.
- Manninen AM, Pasanen P. Holopainen T. 2002b. Comparing the VOC emission between air-dried and heat-treated Scots pine wood. *Atmosph. Environ.* 36, 1763-1768.
- Martin D, Tholl D, Gershenzos J, Bolmann J. 2002. Methyl jasmonate induces traumatic resin ducts, terpenoid resin biosynthesis, and terpenoid accumulation in developing xylem of Norway spruce stems. *Plant Physiol.*, 129, 1003-1018.
- Martos PA, Saraullo A, Pawliszyn J. 1997. Estimation of air/coating distribution coefficients for SPME using retention indexes from linear temperature-programmed capillary GC. *Anal. Chem.* 69, 402-108.
- Marsili R. 2002. *Flavour, Fragrance and Odour Analysis*. Dean Foods Company, Rockford, Illinois.
- Matich AJ, Rowan DD, Banks NH. 1996. Solid phase microextraction for quantitative headspace sampling of apple volatiles. *Anal. Chem.* 68, 4114-4118.
- Mitchel Z. 1988, Mac Donald. 1984. www.pennine.demon.co.uk/Arboretum/Lade
- Moretti A, D'Antuono LF, Elementi S. 2004. Essential oils of *Nigella sativa* L. and *Nigella damascena* L. seed. *J. Essent. Oil Res.* 16, 182-183
- Morsi NM. 2000. Antimicrobial effect of crude extracts of *N. sativa* on multiple antibiotics resistant. *Acta Microbiol. Polon.* 49, 63-74.
- Mozaffari F, Ghorbanli M, Babai A. Seper M, 2000. The effect of water stress on the seed oil of *N. sativa*. *J. Essent. Oil Res.* 12, 36-38.
- Mullett WM, Pawliszyn J. 2003. The development of selective and biocompatible coatings for solid phase microextraction. *J. Sep. Sci.* 26, 25-260.
- Mumm R, Tiemann T, Schultz S, Hilker M. 2004. Analysis of volatiles from black pine. *Phytochem.* 65, 3221-3230.
- Nagi MN, Khurhid A, Badary OA. 1999. Thymoquinone protects against carbon tetrachloride hepatotoxicity in mice via an antioxidant mechanism. *Biochem. Mol. Int.* 47, 153-159.
- Naik SN, Lentz H, Mahashwari RC. 1989. Extraction of perfumes and flavours plant materials with liquid carbon dioxide liquid-vapor equilibrium conditions. *Fluid Phase Equilib.* 49, 115-126; Chem. Abstr. 111, 201361 (1989).

- NIST Standard Reference Database. 2005 June, nr 69. *National Institute of Standards and Technology*.
<http://webbook.nist.gov>
- Nitz S, Fischer N, Drawert F. 1985. Über gebundene aromastoffe in pflanzen I. Mitt. L. Flüchtige terpenverbindungen aus gebunden vorstufen in *Majorana hortensis* Moench. *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.* 9, 87-94.
- Norin T, Winell B. 1972. Extractives from the bark of common spruce *Picea abies* L. Karst. *Acta. Chem. Scand.* 26, 2289-2296.
- Ochocka RJ, Sybilska D, Asztemborska M, Kowalczyk J, Geranowicz J. 1991. Approach to direct chiral recognition of some terpenic hydrocarbon constituents of essential oils by gas chromatography systems via alpha-cyclodextrin complexation. *J. Chromatogr.* 543, 171-178.
- Orav A, Kalais T, Koel M. 1996. Analysis of terpenoic composition of conifer needles oils by steam distillation/extraction, gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. *Chromatographia* 43, 215-219.
- Orav A, Kalais T, Koel M. 1998. Simultaneous distillation, extraction and supercritical fluid extraction for isolating volatiles and other materials from conifer. *J. Essent. Oil Res.* 10, 387-393.
- Ozel MZ, Gogus F, Hamilton JF, Lewis AC. 2004. The essential oil of *Pistacia vera* L. at various temperatures of direct thermal desorption using comprehensive gas chromatography coupled with Time-of Flight Mass Spectrometry. *Chromatogr.* 60, 79-83.
- Paris M, Clair G, Unger J. 1979. Recherche des principes odoranta des graines de *Nigella de Damas*. *Riv. Ital. EPPOS.* 5, 225-227.
- Pawiliszyn J. 1997. *Solid Phase Microextraction -Theory and Practice*. Wiley VCH: New York.
- Penalver A, Pocurull E, Borrull F, Marce RM. 1999. Trends in solid-phase microextraction for determining organic pollutants in environmental samples. *Trends Anal. Chem.* 18, 557-568.
- Person M. 2003. *Chemodiversity and functions of monoterpene hydrocarbons in conifers*. Ph.D. Thesis. Royal Institute of Technology (KTH): Stockholm.
- Philips MA, Croteau RB. 1999. Resin-based defenses in conifers. *Trends Plant Sci.* 5, 1360-1385.
- Pohiola J, Hiltunen R, Schantz M. 1989. Variation and inheritance of terpenes in Scot pine. *Flavour Fragr. J.* 4, 121-124.
- Mała encyklopedia leśna*, Polskie Towarzystwo Leśne. 1980. PWN, Warszawa.
- Purzyńska A, Modzelewska A, Isidorov V. 2005. Wyznaczanie współczynników K_{fg} alifatycznych alkoholi, związków karbonylowych i estrów w układzie powietrze – włókno CAR/PDMS. VII *Polska Konferencja Chemii Analitycznej* Toruń 3-7.07.2005. Materiały konferencyjne: str.385.
- Rao TS, Nigam SS. 1978. Chemical and microbial examination of the essential oil from the seeds of *N. sativa*. *Indian Perfum.* 22, 232-238; *Chem. Abstr.* 92, 82213n (1980).
- Rathee P, Mishra S, Kaushal R, 1982. Antimicrobial activity of essential oil, fixed oil and unsaponifiable matter of *N. sativa*. *Indian J. Pharmac.* 1/2, 8-10.
- Reineccius G. 1994. *Source book of flavour*. 2nd edition: Chapman & Hall. New York, London.
- Reunanen M, Ekman R, Hafizoglu H. 1996. Composition of tars from softwoods and birch. *Holzforschung* 50, 118-120.

- Reverchon E. 1997. Supercritical fluid extraction and fractionation of essential oils and related products. *J. Supercrit. Fluids* 10, 1-37.
- Richter BE, Jones BA, Ezzel JL, Porter NL, Avdalovic N, Pohl C. 1996. Accelerated solvent extraction: a technique for sample preparation. *Anal. Chem.* 68, 1033-1039.
- Rivero RT, Topiwala V. 2004. Quantitative determination of formaldehyde in cosmetics using a combined solid phase microextraction – isotope dilution mass spectrometry method. *J. Chromatogr. A* 1029, 217-222.
- Roussis V, Petrakis P, Ortiz A, Mazomenos BE. 1995. Volatile constituents of needle of five pinus species grown in Greece. *Phytochem.* 39, 357-361.
- Rumak AV, Khan VA. 1989. Chemical composition of essential oils of plants of the genus *Schizonepeta*. *Chem. Nat. Compd.*(Engl.Transl.). 25, 254-255.
- Salem LM, Hossain SM. 2000. Protective effect of black cumin oil from *N. sativa* against murine cytomegalovirus infection. *Int. J. Immunopharmacol*, 22, 729-740.
- Scheffer JC. 1996. Various methods for the isolation of essential oils. *Phytother. Res.* 10, S6-S7.
- Schneider S. 1992. Die Ätherischen Öle von *Hedychium gardnerianum*, *Artemisia sibiri*, *Cabralea cangerana*. 124-174. Phd Dissertation. Technischen Universität, Berlin.
- Schmidt-Vogt H. 1997. *Die Fichte*, Verlag Paul Parey, Hamburg and Berlin. p. 647.
- Soutwell IA, Stiff IA. 1989. Ontogenetical changes in monoterpenoids of *Melaleuca alternifolia* leaf. *Phytochemistry* 28, 1047-1051.
- Stevens R. 1999. An introduction to the cumulative subject Index. *Flavour Fragr. J.* 14, 260-261.
- Strzelecka H., Kamińska J., Kowalski J., Wawelska E. 1987. *Chemiczne metody badań roślinnych surowców leczniczych*. PZWL, Warszawa.
- Tammela P, Nygren M, Laakso I, Hopia A, Vuorela M, Hiltunen R. 2003. Volatile compound analysis of ageing *Pinus sylvestris* L. (Scot pine) seeds. *Flavour Fragr. J.* 18, 290-295.
- Taskinen J. 1974. Composition of the essential oil of sweet marjoram obtained by distillation with steam and by extraction and distillation with alcohol-water mixture. *Acta Chem. Scand.* B 28, 1121-1128.
- Theodoridis G, Koster EHM, de Jong GJ. 2000. Solid-phase microextraction for the analysis of biological samples. *J. Chrom. B: Biomed. Sci. Appl.* 745, 49-82.
- Tołpa S, Radomski J. 1980. *Botanika*. Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, Warszawa.
- Tsitsimpikou C, Petrakis PV, Ortiz A, Harvala C, Roussis V. 2001. Volatile needle terpenoids of six *Pinus* species. *J. Essent. Oil Res.* 13, 174-178.
- Tuszyńska-Kownacka D. 1987. Na początku są nasiona. *Wiadomości zielarskie* 5, 22.
- Ucar G, Balaban M, Usta M. Volatile needle and wood extracts of oriental spruce. 2003. *Flavour Fragr. J.* 18, 368-375.
- Üstün G, Kent L, Cekin N, Civelekoglu H. 1990. Investigation of the technological properties of *N. sativa* seed oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 67, 59-60.

- Wajs A, Kalembe D. 2003. Czarnuszka siewna (*Nigella sativa* L.) skład chemiczny i aktywność biologiczna. *Zeszyty Naukowe Politechniki Łódzkiej. Chemia Spożywcza i Biotechnologia*. 67, 121-141.
- Wady L, Bunte A, Pehrson C, Larsson L. 2003. Use of gas chromatography-mass spectrometry/solid phase microextraction for the identification of MVOCs from moldy building material. *J. Microbiol. Methods*. 52, 325-332.
- Wampler TP. 1997. Analysis of food volatiles using headspace-gas chromatographic techniques: 27-59. R. Marsili (ed.), *Techniques for analyzing food aroma*. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Westfelt L. 1966a. High-boiling neutral constituents from the wood of *Pinus sylvestris* L. *Acta Chem. Scand.* 20, 2829-2840.
- Westfelt L. 1966b. High-boiling constituents of Swedish sulphate turpentine (*Pinus sylvestris* L.) *Acta Chem. Scand.* 20, 2841-2851.
- Westfelt L. 1966c. α -, γ -, ε -Muurolene, major sesquiterpenes of the wood of *Pinus sylvestris* L. and Swedish sulphate turpentine. *Acta Chem. Scand.* 20, 2852-2864.
- Wolski T, Najda M. 2004. Lipidy i olejki eteryczne występujące w owocach (nasionach) z rodzaju *Nigella* SP. *Aromaterapia* 38, 18-25.
- Wolski T, Najda M. 2004. Zawartość i skład lipidów oraz olejków eterycznych w owocach (nasionach) czarnuszki damasceńskiej (*N. damascena* L.) *Aromaterapia* 40, 1-23.
- Veren DA, McCall JP, Butcher DJ. 2000. Solid phase microextraction for the determination of volatile organic in the foliage of Fraser fir (*Abies fraseri*). *Microchemical J.* 65, 269-276.
- Vichi S, Pizzale L, Conte LS, Buxaderas S, Lopez-Tomames E. 2003. Solid-Phase Microextraction in the analysis of Virgin olive oil volatile fraction: Characterization of virgin olive oils from two district geographical areas of northern Italy. *J. Agric. Food Chem.* 51, 6564-6571.
- Vilegas JHY, Lanca FM, Vilegas W. 1995. Application of a home-made supercritical fluid extraction system to the study of essential oils. *Flavour Fragr. J.* 9, 39-43.
- Vuorela H, Pohiola J, Krause C, Hiltunen R. 1989. Application of headspace gas chromatography in essential oil analysis. Part IX. Selective loss of terpene compounds during hydrodistillation. *Flavour Fragr. J.* 4, 117-120.
- Zawirska-Wojtasiak R, Wąsowicz E. 2002. Estimation of the main dill seeds odorant carvone by solid-phase microextraction and gas chromatography. *Flavour Fragr. J.* 46, 357-359.
- Zini AC, Augusto F, Christensen E, Smith BP, Caramo EB, Pawliszyn J. 2001. Monitoring biogenic volatile compounds emitted by *Eucalyptus citrodora* using SPME. *Anal. Chem.* 73, 4729-4735.
- Zini AC, Augusto F, Christensen E, Caramo EB, Pawliszyn J. 2002. SPME applied to the study of volatile organic compounds emitted by three species of *Eucalyptus* in situ. *J. Agric. Food Chem.* 50, 7199-7205.
- Zombonin CG. 2003. Coupling solid-phase microextraction to liquid chromatography. A review. *Anal. Bioanal. Chem.* 375, 73-80.
- Yang MJ, Orton ML, Pawliszyn J. 1997. Quantitative determination of caffeine in beverages using a combined SPME-GC/MS method. *J. Chem. Educ.* 74, 1130-1132.

DOROBEK NAUKOWY

Spis publikacji

- Wajs A, Pranovich A, Reunanen M, Willför S, Holmbom B. 2006. Characterization of volatile organic compounds (VOCs) in stemwood using solid phase microextraction (SPME). *Phytochem. Anal.* 17, 91-101.
- Wajs A, Pranovich A, Reunanen M, Willför S, Holmbom B. (Marzec 2006, przyjęty do druku). Headspace-SPME analysis of the sapwood and heartwood of *Picea abies*, *Pinus sylvestris*, and *Larix decidua*. *J. Essent. Oil Res.*
- Wajs A, Pranovich A, Reunanen M, Willför S, Holmbom B. 2004. Solid phase microextraction, dynamic headspace and hydrodistillation – methods for analysis of volatiles in wood. *8th European Workshop on Lignocellulosics and Pulp*. Printed in “Kipografija Tërse” Ltd. p. 335-338. Riga/Latvia.
- Wajs A, Kalembe D. 2003. Czarnuszka siewna (*Nigella sativa* L.): Skład chemiczny i aktywność biologiczna. *Zeszyty Naukowe P.L., Chemia Spożywcza i Biotechnologia* 67, 123-136.
- Stoyanowa A, Georgiev E, Wajs A, Kalema D. 2003. A comparative investigation on the composition of the volatiles from seeds of *Nigella sativa* L. from Bulgaria. *J. Essent. Oil-Bearing Plant.* 6, 207-209.
- Wawrzyniak P, Iwanek D, Kalembe D, Wajs A, Siedlanowski M. 2003. Wpływ stopnia wysuszenia surowca na jakość ekstraktu z nasion czarnuszki siewnej (*Nigella sativa* L.). *X Sympozjum Suszarnictwa*. Wydawnictwo Politechniki Łódzkiej. str.655-663.

Doniesienia na konferencje

- Wajs A, Bonikowski R, Kalembe D. Isolation and structure determination of two new monoterpenoids from the essential oil of *Nigella sativa* L. – *5th International Symposium on Chromatography of Natural Products*. 19-22.06.2006 Lublin.
- Wajs A, Wojtunik I, Kalembe D. Zastosowanie mikroekstrakcji do fazy stałej (HS-SPME) w analizie lotnych związków organicznych z ekstraktów z nasion czarnuszki siewnej (*Nigella sativa* L.). *VII Polska Konferencja Chemii Analitycznej*. 3-7.07.2005 Toruń.
- Wajs A, Pranovich A, Reunanen M, Willför S, Holmbom B. 2004. Solid phase microextraction (SPME), dynamic headspace and hydrodistillation – methods for analysis of volatiles in wood. *8th European Workshop on Lignocellulosics and Pulp*. 22-25.08.2004 Riga/Latvia.
- Wajs A, Pranovich A, Reunanen M, Willför S, Holmbom B. Solid phase microextraction (SPME), dynamic headspace and hydrodistillation – methods for analysis of volatiles in wood. *Åbo Akademi Process Chemistry Group - Annual Meeting*. 19.08.2004 Turku/Åbo, Finland.
- Wawrzyniak P, Iwanek D, Kalembe D, Wajs A, Siedlanowski M. Wpływ stopnia wysuszenia surowca na jakość ekstraktu z nasion czarnuszki siewnej (*Nigella sativa* L.). *X Sympozjum Suszarnictwa*. 17-19.09.2003 Łódź.
- Wawrzyniak P, Kalembe D, Wajs A. Ekstrakcja nadkrytycznym dwutlenkiem węgla z matrycy ciała stałego pochodzenia roślinnego. *IV Kongres Technologii Chemicznej* 8-12.09.2003 Łódź.
- Wajs A, Sielatycka K, Góra J, Kalembe D. Composition of essential oil and fixed oil of *Nigella sativa* L. seeds. *3rd International Symposium on Chromatography of Natural Products*. 12-15.06.2002 Lublin.
- Wajs A, Góra J, Kalembe D. Skład chemiczny i aktywność biologiczna olejku eterycznego z czarnuszki siewnej (*Nigella sativa* L.). *VII Sesja Młodej Kadry Naukowej PTTŻ, Jakość i Prozdrowotne Cechy Żywności – Nauka w Praktyce*. 21- 22.05.2002 Wrocław.